



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0041804

(51)⁸ A61K 9/00; A61K 38/39; A61K 47/10; (13) B
A61K 9/06; A61K 47/18; A61K 47/32;
A61K 38/18; A61K 47/14

(21) 1-2018-01436

(22) 01/09/2016

(86) PCT/IB2016/055247 01/09/2016

(87) WO/2017/037655 09/03/2017

(30) 62/214,618 04/09/2015 US

(45) 25/11/2024 440

(43) 26/11/2018 368A

(73) REMEDOR BIOMED LTD. (IL)

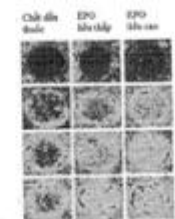
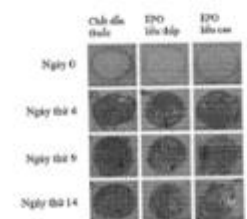
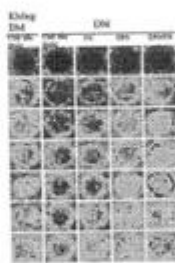
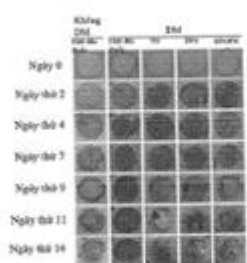
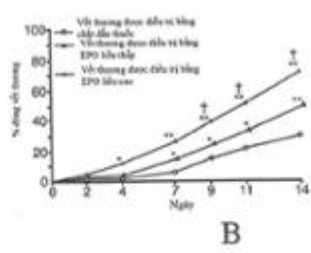
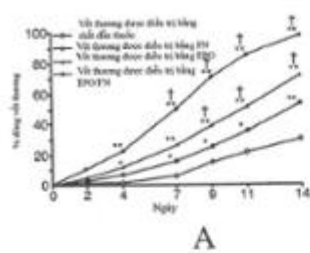
12, Haavodah Street, P.O. Box 21073, 1784124 Nazareth Elite, Israel

(72) HAMED, Saher (IL).

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

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA ERYTHROPOIETIN DÙNG TẠI CHỖ ĐỂ THỨC ĐẨY
QUÁ TRÌNH CHỮA LÀNH VẾT THƯƠNG

(57) Sáng chế đề xuất dược phẩm dùng tại chỗ chứa erythropoietin (EPO), tốt hơn là còn chứa fibronectin (FN), cụ thể là ở dạng gel, được sử dụng để thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương, ví dụ, vết thương do bị bỏng, so với quá trình chữa lành không sử dụng dược phẩm này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế dược phẩm này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng tại chỗ chứa erythropoietin (EPO), tốt hơn là còn chứa fibronectin (FN), cụ thể là dược phẩm ở dạng gel. Sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm dùng tại chỗ để thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương, ví dụ, vết thương do bị bỏng, so với quá trình chữa lành mà không sử dụng dược phẩm này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế các dược phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo các trung tâm Hoa kỳ về Phòng ngừa và Kiểm soát Bệnh (CDC), có hơn 380 triệu người trên toàn thế giới bị bệnh tiểu đường (DM). CDC cũng ước tính khoảng 5% trong số các bệnh nhân này sẽ phát triển thành vết loét da do bệnh tiểu đường (DSU) và 1% sẽ cần thủ thuật cắt cụt dưới nghiêm trọng. Mặc dù có nhiều tiến bộ trong việc quản lý và chăm sóc vết thương (Sen, 2009) việc chữa lành vết thương trong DM bị trì hoãn bởi vì tất cả các pha của các dây được sắp xếp của các trường hợp tế bào và hóa sinh của việc chữa lành vết thương bị phá vỡ (Brown, 1992; Shukla, 1998; Mustoe, 2004). Ngoài ra, việc chữa lành DSU bị trì hoãn bởi vì sự hình thành mạch bị suy giảm, sự lưu lượng máu kém, sự viêm nhiễm tăng, sự tăng sinh giảm của nguyên bào sợi (Hehenberger, 1999), và sự tái biểu hiện giảm bởi các tế bào sừng (Mansbridge, 1999; Stadelmann, 1998; Sheetz, 2002).

Hocmon glycoprotein, erythropoietin (EPO), điều hòa khối tế bào hồng cầu, và là thuốc được chấp thuận cho việc điều trị thiếu máu. EPO cũng có các mục tiêu không tạo máu trên da, và nó được thể hiện rằng các mục tiêu này tham gia vào việc chữa lành các vết thương da (Hamed, 2014). Như được báo cáo trước đây rằng việc chữa lành các vết thương da trên chuột với DM thử nghiệm gây ra được tăng theo việc dùng tại chỗ của EPO ở người tái tổ hợp lên vết thương gia bằng cách (a) kích thích sự hình thành mạch, sự tái biểu hiện, sự lắng đọng collagen, và (b) triệt giảm đáp ứng viêm và quá trình chết tế bào (Hamed, 2010). Các hoạt động có lợi của EPO trong việc chữa lành vết thương trong DM được bổ sung bởi fibronectin (FN). FN tạo điều kiện thuận lợi tạo

thành của chất nền vết thương tạm thời và ngăn chặn quá trình phân ly của nó (Hamed, 2011).

Các Aquaporin (AQP) là các protein màng nguyên có chức năng là điều chỉnh sự cầm huyết dịch nội bào, nhờ đó vận chuyển nước và glyxerol. Các AQP được biểu hiện trong các màng Plasma của các tế bào sừng trong lớp nền của da và ống thu tủy xương của thận (Agre, 1998). Việc biểu hiện điều hòa ức chế của các AQP có thể là nguyên nhân dẫn đến việc giảm khả năng tập trung tiết liệu trong suy thận cấp tính chứng thiếu máu cục bộ và EPO có thể ngăn quá trình điều hòa ức chế này (Gong, 2004). AQP3 là AQP mà được biểu hiện trên da (Hara-Chikuma, 2005) nơi mà nó tạo điều kiện thuận lợi sự di cư tế bào và sự tăng sinh và sự tái biểu hiện trong quá trình chữa lành vết thương (Hara-Chikuma 2006, Levin, 2006, Hara-Chikuma, 2008). Vai trò tích cực đối với độ ẩm trong việc chữa lành các vết thương trên da đầu tiên được thể hiện vào năm 1962, khi Winter đã đánh giá sự hình thành vảy và tỷ lệ của sự tái biểu hiện của các vết thương hời hợt trên da lợn và được báo cáo rằng việc chữa lành vết thương ướt nhanh hơn vết thương khô (Winter, 1962). Như là một hệ quả, sự khô da của bàn chân tương ứng với chứng loét chân ở những bệnh nhân bị DM (Tentolouris, 2010). Vai trò đặc biệt đối với AQP3 trong việc chữa lành vết thương do bệnh tiểu đường được đặt khi nó được thấy rằng AQP3 được điều hòa ức chế trong việc tái sinh biểu bì trong quá trình chữa lành các vết thương da hoàn toàn ở chuột bị DM (Sugimoto, 2012). Công đoạn biểu thị EPO có thể được sử dụng để kích thích việc chữa lành của các vết thương không lành. Các phát hiện này cũng đề xuất sự tồn tại mối quan hệ nhân quả giữa sự biểu hiện AQP3 suy giảm và sự tái biểu hiện trì hoãn trong DM, mà bao gồm (a) Sự di chuyển và sự tăng sinh bị suy giảm của các tế bào đó mà tham gia vào sự hình thành mạch, (b) việc sản xuất giảm của chất nền ngoại bào (ECM) của nguyên bào sợi, và (c) sự suy giảm của các tế bào sừng để tái biểu hiện vết thương da.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các dược phẩm dùng tại chỗ chứa erythropoietin (EPO), tốt hơn là còn chứa fibronectin (FN), cụ thể là các dược phẩm dạng gel. Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả chứa gel, erythropoietin và fibronectin. Theo một số khía cạnh, fibronectin có mặt trong dược phẩm với lượng có khả năng tăng cường các hoạt động có lợi của erythropoietin khi được bôi lên vết thương. Theo các khía cạnh khác,

phương pháp điều trị vết thương bao gồm việc dùng tại chỗ lượng hiệu quả trị liệu của dược phẩm chứa gel, erythropoietin và fibronectin trong đó fibronectin có mặt trong dược phẩm với lượng có khả năng tăng cường các hoạt động có lợi của erythropoietin khi được bôi lên vết thương trong việc điều trị vết thương đã được mô tả. Theo một số phương án, vết thương là vết thương của đối tượng được chuẩn đoán mắc hoặc mắc bệnh đường huyết cao. Theo các phương án khác, vết thương là vết thương của đối tượng được chuẩn đoán mắc hoặc mắc bệnh kháng insulin. Theo các phương án khác nữa, vết thương là vết thương của đối tượng được chuẩn đoán mắc hoặc nghi ngờ mắc chứng thiếu hụt sản xuất insulin hoặc kháng insulin. Theo các phương án, vết thương là vết thương của đối tượng được chuẩn đoán mắc hoặc bị mắc bệnh tiểu đường. Theo các khía cạnh cụ thể, vết thương là vết thương ở người.

Tốt hơn là, dược phẩm dạng gel chứa ít nhất một thành phần từ danh sách không giới hạn của các tá dược bao gồm, ví dụ, rượu benzylic, glyxerol hoặc các rượu khác, các polyme chẳng hạn như polyme carboxy polyvinyl như Carbomer 940 mà có thể được sử dụng như, ví dụ, chất tăng cường độ nhớt, tác nhân keo hóa, hoặc tác nhân huyền phù (Carbomer 940 là liên kết chéo với ete của pentaerythriol), các paraben chẳng hạn như metylparaben, propylparaben; trietanolamin, và các tá dược khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo gel, hoặc bất kỳ hỗn hợp của chúng. Các dược phẩm dạng gel của sáng chế cũng nên có nước.

Theo các khía cạnh cụ thể của dược phẩm chứa gel, erythropoietin và fibronectin, erythropoietin có mặt với lượng 5% khối lượng của dược phẩm. Theo các khía cạnh khác, fibronectin có mặt với lượng 30% khối lượng. Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm chứa erythropoietin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% khối lượng và fibronectin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 50% khối lượng. Theo các phương án khác, dược phẩm chứa erythropoietin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, fibronectin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50% khối lượng, glyxerol với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, carbomer 940 với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% khối lượng, rượu benzylic với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng trietanol amin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, metylparaben với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% trong lượng, propylparaben với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng. Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm chứa 5% khối lượng glyxerol, 1% khối

lượng Carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic, 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben. Theo các khía cạnh cụ thể, dược phẩm chứa 5% khối lượng glyxerol, 1% khối lượng Carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic, 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben, và nước cho đến 100% khối lượng. Theo một số các phương án, trong đó gel là fibrin, collagen hoặc gel axit hyaluronic. Theo các phương án khác, trong đó gel chứa fibrin, collagen hoặc axit hyaluronic. Theo các phương án cụ thể, gel là hydrogel.

Theo các khía cạnh cụ thể, dược phẩm chứa erythropoietin, trong đó dược phẩm được điều chế theo công thức như gel, được mô tả. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm chứa fibronectin. Theo các khía cạnh khác nữa, erythropoietin có mặt với lượng 5% khối lượng. Theo các khía cạnh khác, fibronectin có mặt với lượng 30% khối lượng. Theo các khía cạnh khác, dược phẩm chứa erythropoietin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, fibronectin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50% khối lượng, glyxerol với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, carbomer 940 với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% khối lượng, rượu benzylic với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng trietanol amin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, metylparaben với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% trong lượng, propylparaben với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng. Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm chứa 5% khối lượng glyxerol, 1% khối lượng Carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic, 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben. Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm chứa 5% khối lượng glyxerol, 1% khối lượng Carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic, 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben, và nước cho đến 100% khối lượng. Theo các khía cạnh cụ thể, trong đó gel là fibrin, collagen hoặc gel axit hyaluronic. Theo các khía cạnh khác, trong đó gel chứa fibrin, collagen hoặc axit hyaluronic. Theo một số phương án, gel là hydrogel.

Cũng được đề xuất là phương pháp điều trị vết thương ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hiệu quả trị liệu của dược phẩm chứa erythropoietin, trong đó dược phẩm là gel. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm chứa fibronectin. Theo các khía cạnh khác, erythropoietin có mặt với lượng 5% khối lượng. Theo một số khía cạnh

khác, fibronectin có mặt với lượng 30% khối lượng. Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm chứa erythropoietin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, fibronectin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50% khối lượng, glyxerol với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, carbomer 940 với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% khối lượng, rượu benzylic với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng trietanol amin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, metylparaben với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% trong lượng, propylparaben với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng. Theo các khía cạnh cụ thể khác, dược phẩm chứa 5% khối lượng glyxerol, 1% khối lượng Carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic, 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben. Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm chứa 5% khối lượng glyxerol, 1% khối lượng Carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic, 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben, và nước cho đến 100% khối lượng. Theo các khía cạnh khác nữa, trong đó gel là fibrin, collagen hoặc gel axit hyaluronic. Theo các khía cạnh khác, trong đó gel chứa fibrin, collagen hoặc axit hyaluronic. Theo các khía cạnh cụ thể, gel là hydrogel.

Theo một số khía cạnh, phương pháp điều trị vết thương ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hiệu quả trị liệu của dược phẩm chứa erythropoietin, trong đó dược phẩm là gel, trong đó dược phẩm là gel được đề xuất trong đó đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị mắc bệnh có đường huyết cao Theo các khía cạnh khác, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh kháng insulin. Theo các khía cạnh khác, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị thiếu hụt trong việc sản xuất insulin. Theo các khía cạnh khác nữa, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh tiểu đường. Theo một số phương án, đối tượng là người. Theo các phương án khác, dược phẩm được đề xuất qua nhiều lần dùng. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm được dùng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều lần hơn. Theo các phương án bổ sung, dược phẩm được đề xuất qua 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 hoặc 24 tuần. Theo các phương án khác nữa, dược phẩm được đề xuất qua 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 hoặc 24 tháng. Theo các phương án, khoảng thời gian giữa các việc dùng là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12, 13 hoặc 14 ngày. Theo các phương án khác nữa, khoảng thời gian giữa các việc dùng là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

hoặc 8 tuần. Theo các phương án bổ sung, gel được điều chế cho việc dùng lên da hoặc được dùng lên da. Theo các phương án khác nữa, vết thương là vết loét hoặc vết bỏng. Theo một số khía cạnh khác, vết thương là vết loét do bệnh tiểu đường. Theo các phương án bổ sung, vết thương là vết loét do bệnh tiểu đường mạn tính. Theo một số phương án, vết thương là vết loét do bệnh tiểu đường mạn tính nghiêm trọng. Theo các khía cạnh khác, vết thương là vết loét bàn chân do bệnh tiểu đường mạn tính.

Cũng được đề xuất là các phương pháp điều trị vết thương ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hiệu quả trị liệu của dược phẩm mà kích thích sự biểu hiện aquaporin. Theo các phương án cụ thể, aquaporin là aquaporin-3. Theo một số khía cạnh, trong đó dược phẩm là fibrin, collagen hoặc gel axit hyaluronic. Theo các phương án khác nữa, trong đó gel chứa fibrin, collagen hoặc axit hyaluronic. Theo các phương án nữa, gel là hydrogel. Theo các phương án cụ thể, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh đường huyết cao. Theo các khía cạnh khác, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh kháng insulin. Theo các khía cạnh khác, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị thiếu hụt trong việc sản xuất insulin. Theo các khía cạnh khác nữa, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh tiểu đường. Theo một số phương án, đối tượng là người. Theo các phương án khác, dược phẩm được đề xuất qua nhiều lần dùng. Theo các khía cạnh cụ thể, dược phẩm được dùng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều lần hơn. Theo các khía cạnh bổ sung, dược phẩm được đề xuất qua 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 hoặc 24 tuần. Theo các phương án khác nữa, dược phẩm được đề xuất qua 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 hoặc 24 tháng. Theo các phương án bổ sung, khoảng thời gian giữa các việc dùng là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12, 13 hoặc 14 ngày. Theo các phương án khác nữa, khoảng thời gian giữa các việc dùng là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 tuần. Theo các phương án bổ sung, gel được điều chế cho việc dùng lên da hoặc được dùng lên da. Theo các phương án khác nữa, vết thương là vết loét hoặc vết bỏng. Theo một số khía cạnh khác, vết thương là vết loét do bệnh tiểu đường. Theo các phương án bổ sung, vết thương là vết loét do bệnh tiểu đường mạn tính. Theo một số phương án, vết thương là vết loét do bệnh tiểu đường mạn tính nghiêm trọng. Theo các khía cạnh khác, vết thương là vết loét bàn chân do bệnh tiểu đường mạn tính.

Theo một số các dược phẩm và các phương pháp, erythropoietin và/hoặc fibronectin được kết hợp với chất nền. Theo các khía cạnh cụ thể, erythropoietin và/hoặc

fibronectin được kết hợp với chất nền và ít nhất một chất có thể cắt được. Theo các khía cạnh khác, chất nền kết hợp một hoặc nhiều chemokine có thể cắt được, các hóa chất dẫn dụ, các hóa chất xua đuổi hoặc một hoặc nhiều cytokine có thể cắt được. Ví dụ, chemokines có thể là một hoặc bất kỳ hỗn hợp của các chemokine được chọn từ nhóm bao gồm CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2 và CX3CL1. Cytokine cho sử dụng với các phương pháp hoặc các dược phẩm được bộc lộ ở đây có thể bao gồm các thành phần của IL 17, IL-10, Interleukin, Lymphokine, Monokine, Myokine, yếu tố hoại tử mô hoặc các họ cytokine chống viêm. Các ví dụ cụ thể về các cytokine cho việc sử dụng với các phương pháp và các dược phẩm được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều hỗn hợp của GcMAF, yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt, yếu tố kích thích tạo cụm hạt đại thực bào, yếu tố tăng trưởng tế bào gan, IL1A, Interferon, Interferon beta-1a, Interferon beta-1b, Interferon gamma, Interferon loại I, Interferon loại II, Interferon loại III, Interleukin 1 beta, chất đối kháng thụ thể Interleukin 13, Interleukin 10, Interleukin 12, Interleukin 13, Interleukin 16, Interleukin 2, Interleukin 23, Interleukin 23 subunit alpha, Interleukin 34, Interleukin 35, Interleukin 6, Interleukin 7, Interleukin 8, họ Interleukin-1, Interleukin-12 subunit beta, Interleukin-36, yếu tố chất ức chế Leukemia, yếu tố tăng cường tế bào bạch cầu, lymphotoxin, Lymphotoxin alpha, Lymphotoxin beta, yếu tố kích thích cụm khuẩn đại thực bào, protein viêm đại thực bào, yếu tố kích hoạt đại thực bào, Myonectin, Nicotinamide phosphoribosyltransferase, Oncostatin M, Oprelvekin, yếu tố tiểu huyết cầu 4, Promegapoeitin, RANKL, yếu tố nhận được từ tế bào cơ chất 1, yếu tố hoại tử mô alpha hoặc chất ức chế tăng trưởng nội mô mạch máu. Các yếu tố tăng trưởng cụ thể bao gồm, ví dụ, FGF 1, FGF 2, IGF 1, IGF 2, PDGF, EGF, KGF, HGF, VEGF. SDF-1, GM-CSF, CSF, G-CSF, TGF alpha, TGF beta, NGF và ECGF. Cũng được bao gồm là các yếu tố cảm ứng sự giảm oxy huyết (ví dụ, HIF-1 alpha và betavaf HIF~2), các hormone (ví dụ, insulin, hormone tăng trưởng (GH), CRH, Leptin, Prolactin và TSH), các yếu tố tạo mạch (ví dụ, angiogenin và angiopoietin), sự đông máu và các yếu tố chống đông máu [ví dụ, yếu tố I, yếu tố XIII, yếu tố mô, canxi, vWF, protein C, protein S, protein 2, fibronectin, kháng thrombin,

heparin, plasminogen, heparin khối lượng phân tử thấp (Clixan), kininogen khối lượng phân tử cao (HMOVVK), prekailikrein, chất ức chế hoạt hóa plasminogen 1 (PAI 1), chất ức chế hoạt hóa plasminogen 2 (PAI 2), urokinaza, thrombomodulin, chất hoạt hóa plasminogen mô (tPA), 2-antiplasmin alpha và chất ức chế proteaza liên quan đến protein Z.

Theo một số phương án, chất nền là gel. Theo các phương án nữa, chất nền là hydrogel. Trong một số trường hợp nhất định, hydrogel chỉ các mạng polyme liên kết ngang ưa nước ba chiều mà có thể hấp phụ lượng lớn nước và dịch sinh học mà không hòa tan. Các hydrogel có thể được bao gồm các polyme mà không hòa tan do có mặt các liên kết chéo vật lý (ví dụ, các vùng tinh thể, các tương tác giữa các phân tử và các vướng mắc) hoặc các liên kết chéo hóa học (ví dụ, liên kết hóa trị). Theo các phương án cụ thể, hydrogel là hydrogel fibrin hoặc hydrogel glycol polyetylen biến đổi miền fibrin.

Theo một phương án, hydrogel là gel hydrogel fibrin mà được liên kết chéo với tác nhân liên kết ngang. Theo các phương án cụ thể, hydrogel fibrin được liên kết ngang có các đặc tính cơ học hoặc các đặc tính hóa học, vật lý mà thích hợp cho việc sử dụng chúng trong việc cấy vào đối tượng hoặc bệnh nhân, cụ thể là cấy dưới da.

Không có giới hạn, gel có thể chứa bất kỳ tỷ lệ của tác nhân liên kết ngang với fibrin. Do đó, gel có thể chứa tác nhân liên kết ngang với tỷ lệ fibrin nằm trong khoảng từ 0,1:1 đến 10:1. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ fibrin từ 0,1:1 đến 5:1, từ 0,1:1 đến 4:1, từ 0,1:1 đến 2:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1:1, từ 0,1:1 đến 0,9:1, từ 0,2:1 đến 0,8:1, và/hoặc từ 0,25 đến 0,75:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ fibrin là 0,20:1 đến 0,5:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ fibrin là 0,25:1 hoặc 0,5:1.

Các hydrogel có thể được làm từ các dung dịch fibrin chứa phạm vi nồng độ rộng fibrin. Theo đó, gel được tạo nên từ dung dịch fibrin với nồng độ khoảng từ 50 đến 500 mg/ml, khoảng từ 100 đến 400 mg/ml, khoảng 150 đến 300 mg/ml, khoảng 200 mg/ml đến 250 mg/ml fibrin, hoặc khoảng bất kỳ có thể nhận được trong đó. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel được tạo nên từ dung dịch fibrin chứa khoảng 200 mg/ml fibrin. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch fibrin chứa khoảng 250 mg/ml fibrin. Theo một

số phương án khác nữa của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch fibrin chứa khoảng 300 mg/ml fibrin.

Theo các phương án khác, hydrogel chỉ polyme mà được tạo ra bởi sự polyme hóa gốc tự do của dung dịch monome ưa nước được tạo gell và được liên kết chéo để tạo ra lưới polyme ba chiều neo giữ các đại phân tử. Các đại phân tử bao gồm thành phần chất nền của mô, chẳng hạn như collagen tự nhiên. Collagen có thể được đặt trong lưới polyme tạo ra hydrogel collagen. Theo một số phương án hydrogel collagen có khả năng tăng cường tăng trưởng tế bào biểu mô.

Collagen hòa tan để liên kết ngang có thể được điều chế bằng các kỹ thuật được xác nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thêm vào đó, các protein khác mà hỗ trợ sự liên kết và tăng trưởng tế bào có thể được sử dụng để tạo ra hydrogel liên kết ngang. Một ví dụ về protein bổ sung được biết là để hỗ trợ tăng trưởng tế bào là fibronectin.

Polysacarit và mucopolysacarit cũng có thể được bổ sung vào các hydrogel của sáng chế.

Các polyme hydrogel được tạo ra bởi sự polyme hóa gốc tự do của các dung dịch monome cần liên kết ngang để tạo ra cấu trúc polyme ba chiều của lưới để tạo gel dung dịch chứa nước. Sự bổ sung của các tác nhân liên kết ngang như dimetacrylat glycol etylen với quá trình polyme hóa có thể thay đổi hydrogel kết quả. Thông thường, sự bổ sung của các tác nhân liên kết ngang có xu hướng làm tăng độ cứng và độ bền cơ học của hydrogel. Sự bổ sung các liên kết ngang, chẳng hạn như dimetacrylat và metylmetacrylat glycol etylen, vào hỗn hợp polyme hóa trong sự có mặt của collagen tự nhiên, vẫn thay đổi các đặc tính vật lý của hydrogel, sự bổ sung này vào hỗn hợp polyme hóa phù hợp với collagen tự nhiên, và kết quả thu được hydrogel collagen. Các tác nhân liên kết ngang đã biết khác có thể được sử dụng sản xuất hydrogel collagen theo yêu cầu bao gồm các diacrylat và dimetacrylat hoặc các phân tử hóa trị hai khác.

Không có giới hạn, gel có thể chứa bất kỳ tỷ lệ của tác nhân liên kết ngang với collagen. Do đó, gel có thể chứa tác nhân liên kết ngang với tỷ lệ collagen nằm trong khoảng từ 0,1:1 đến 10:1. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ collagen từ 0,1:1 đến 5:1, từ 0,1:1 đến 4:1, từ 0,1:1 đến 2:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1:1, từ 0,1:1 đến 0,9:1, từ 0,2:1 đến 0,8:1, và/hoặc từ 0,25 đến 0,75:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân

liên kết ngang: tỷ lệ collagen là 0,20:1 đến 0,5:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ collagen là 0,25:1 hoặc 0,5:1.

Các hydrogel có thể được làm từ các dung dịch collagen chứa phạm vi nồng độ collagen lớn. Theo đó, gel được tạo nên từ dung dịch collagen với nồng độ khoảng từ 50 đến 500 mg/ml, khoảng từ 100 đến 400 mg/ml, khoảng 150 đến 300 mg/ml, khoảng 200 mg/ml đến 250 mg/ml collagen, hoặc khoảng bất kỳ có thể nhận được trong đó. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel được tạo nên từ dung dịch collagen chứa khoảng 200 mg/ml collagen. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch collagen chứa khoảng 250 mg/ml collagen. Theo một số phương án khác nữa của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch collagen chứa khoảng 300 mg/ml collagen.

Các hydrogel, mà có thể được sử dụng như các polyme “đáp ứng kích thích” tổng hợp có thể được dựa vào các polyme tổng hợp, chẳng hạn như poly(etylen glycol) (PEG), rượu poly(vinyl) (PVA), poly(N-isopropylacrylamit) (poly(PAAm)). Các hydrogel này đã được dùng trong nhiều ứng dụng y học tái tạo (xem ví dụ N. A. Peppas, P. Bures, WLeobandung, and H. Ichikawa. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:27-46 (2000)), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo các khía cạnh cụ thể, các hydrogel được điều chế với nhiều polyme khác nhau nhau chẳng hạn như rượu polyvinyl (PVA), polyvinyl pyrrolidon (PVP), hoặc polyacrylamit. Các hydrogel dựa vào PVA minh họa được bộc lộ, ví dụ, trong các patent Mỹ số: 6,231,605; 5,346,935; 5,981,826; 4,663,358; và 4,988,761, nội dung trong các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án cụ thể các hydrogel dựa vào polyetylen glycol (PEG) tạo ra mức độ lớn sự đồ mồ hôi trong các dung dịch chứa nước. Các hydrogel dựa vào PEG khác nhau được bộc lộ trong các patent Mỹ số: 5,514,379; 6,362,276; và 6,541,015, nội dung trong các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Đơn PCT WO2006125082, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, đề xuất các dược phẩm hydrogel chứa các hạt hydrogel được hóa cứng trước trong các dung dịch hydrogel tiền chất.

Không có giới hạn, gel có thể chứa bất kỳ tỷ lệ của tác nhân liên kết ngang với poly(etylen glycol) (PEG). Do đó, gel có thể chứa tác nhân liên kết ngang với tỷ lệ PEG nằm trong khoảng từ 0,1:1 đến 10:1. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ PEG từ 0,1:1 đến 5:1, từ 0,1:1 đến

4:1, từ 0,1 :1 đến 2:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1:1, từ 0,1:1 đến 0,9:1, từ 0,2:1 đến 0,8:1, và/hoặc từ 0,25 đến 0,75:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ PEG là 0,20:1 đến 0,5:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ PEG là 0,25:1 hoặc 0,5:1.

Các hydrogel có thể được làm từ các dung dịch PEG chứa phạm vi nồng độ rộng PEG. Theo đó, gel được tạo nên từ dung dịch PEG với nồng độ khoảng từ 50 đến 500 mg/ml, khoảng từ 100 đến 400 mg/ml, khoảng 150 đến 300 mg/ml, khoảng 200 mg/ml đến 250 mg/ml PEG, hoặc khoảng bất kỳ có thể nhận được trong đó. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel được tạo nên từ dung dịch PEG chứa khoảng 200 mg/ml PEG. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch PEG chứa khoảng 250 mg/ml PEG. Theo một số phương án khác nữa của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch PEG chứa khoảng 300 mg/ml PEG.

Theo phương án khác, hydrogel là hydrogel axit hyaluronic mà được liên kết chéo với tác nhân liên kết ngang. Theo các phương án cụ thể, hydrogel axit hyaluronic được liên kết ngang có các đặc tính cơ học hoặc các đặc tính hóa học, vật lý mà thích hợp cho việc sử dụng chúng trong việc cấy vào đối tượng hoặc bệnh nhân, cụ thể là cấy dưới da. Theo các phương án khác, hydrogel axit hyaluronic được liên kết ngang có các đặc tính cơ học hoặc các đặc tính hóa học, vật lý mà thích hợp cho việc sử dụng chúng trong việc điều trị các vết thương da của đối tượng hoặc bệnh nhân, cụ thể là các ứng dụng trên da.

Không có giới hạn, gel có thể chứa bất kỳ tỷ lệ của tác nhân liên kết ngang với axit hyaluronic. Do đó, gel có thể chứa tác nhân liên kết ngang với tỷ lệ axit hyaluronic nằm trong khoảng từ 0,1:1 đến 10:1. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ axit hyaluronic từ 0,1:1 đến 5:1, từ 0,1:1 đến 4:1, từ 0,1 :1 đến 2:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1,5:1, từ 0,1:1 đến 1:1, từ 0,1:1 đến 0,9:1, từ 0,2:1 đến 0,8:1, và/hoặc từ 0,25 đến 0,75:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ axit hyaluronic là 0,20:1 đến 0,5:1. Theo một số phương án, gel chứa tác nhân liên kết ngang: tỷ lệ axit hyaluronic là 0,25:1 hoặc 0,5:1.

Các hydrogel có thể được làm từ các dung dịch axit hyaluronic chứa phạm vi nồng độ rộng axit hyaluronic. Theo đó, gel được tạo nên từ dung dịch axit hyaluronic

với nồng độ khoảng từ 50 đến 500 mg/ml, khoảng từ 100 đến 400 mg/ml, khoảng 150 đến 300 mg/ml, khoảng 200 mg/ml đến 250 mg/ml axit hyaluronic, hoặc khoảng bất kỳ có thể nhận được trong đó. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, gel được tạo nên từ dung dịch axit hyaluronic chứa khoảng 200 mg/ml axit hyaluronic. Theo một số phương án của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch axit hyaluronic chứa khoảng 250 mg/ml axit hyaluronic. Theo một số phương án khác nữa của các khía cạnh được mô tả ở đây, hydrogel được tạo nên từ dung dịch axit hyaluronic chứa khoảng 300 mg/ml axit hyaluronic.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, “a” hoặc “an” có thể có nghĩa là một hoặc nhiều hơn. Như được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ, khi được sử dụng kết hợp với thuật ngữ “chứa”, các thuật ngữ “a” hoặc “an” có thể có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một.

Sử dụng thuật ngữ “hoặc” trong các điểm yêu cầu bảo hộ được dùng có nghĩa là “và/hoặc” trừ phi được biểu thị rõ ràng để chỉ duy nhất sự thay thế hoặc sự thay thế là loại trừ, mặc dù sáng chế hỗ trợ định nghĩa để chỉ duy nhất sự thay thế và “và/hoặc”. Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “khác” có thể ít nhất là hai hoặc nhiều hơn.

Trong toàn bộ sáng chế, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng để chỉ ra giá trị gồm biến thể cố hữu có sai số với thiết bị, phương pháp được sử dụng để xác định giá trị, hoặc biến thể tồn tại trong số các mục tiêu nghiên cứu.

Các mục đích, đặc điểm và ưu điểm khác của bản mô tả này sẽ trở nên rõ ràng hơn từ mô tả chi tiết sau đây. Tuy nhiên, nên hiểu rằng, mô tả chi tiết và ví dụ cụ thể, trong khi thể hiện các phương án được ưu tiên của sáng chế, được đưa ra chỉ nhằm minh họa, do các sự thay đổi và biến đổi khác trong tinh thần và phạm vi của sáng chế sẽ được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ từ bản mô tả chi tiết này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ sau đây tạo thành một phần của bản mô tả sáng chế và gồm các khía cạnh nhất định được chứng minh khác theo sáng chế. Sáng chế có thể được hiểu thêm từ một hoặc nhiều hình vẽ kết hợp với bản mô tả chi tiết về các phương án thực hiện cụ thể được thể hiện ở đây.

Fig.1: EPO tại chỗ làm tăng băng bó vết thương và làm tăng lưu lượng máu trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường theo cách thức phụ thuộc liều dùng; hiệu quả được tăng bởi FN. Việc băng bó vết thương và tỷ lệ lưu lượng máu trong da tái sinh của các con lợn bị bệnh tiểu đường và không bị bệnh tiểu đường được xác định vào ngày 0, 2, 4, 7, 9, 11 và 14 sau các điều trị khác nhau. (A) tỷ lệ băng bó vết thương của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (B) tỷ lệ băng bó vết thương của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng EPO liều thấp, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO liều cao ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (C) Các hình ảnh chụp minh họa và máy quét Doppler laze của các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở con lợn không bị bệnh tiểu đường (trái) và lợn bị bệnh tiểu đường (phải) ở ngày 0, 2, 4, 7, 9, 11 và 14. (D) Bộ hình ảnh chụp minh họa và máy quét Doppler laze của các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc tương tự, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở con lợn không bị bệnh tiểu đường (trái) và lợn bị bệnh tiểu đường (phải) ở ngày 0, 2, 4, 7, 9, 11 và 14. Các hình tròn trắng trong các máy quét Doppler laze thể hiện khu vực vết bỏng ở ngày 0. Màu xanh sẫm thể hiện các khu vực không được tạo mạch, các màu đỏ và vàng thể hiện các khu vực được tạo mạch với các vùng màu đỏ minh họa các vùng mà được tạo mạch nhiều hơn các khu vực màu vàng. Kích thước mẫu trong mỗi nhóm điều trị là 12 ngoại trừ nhóm vết bỏng được điều trị bằng EPO liều thấp mà mẫu là 6. * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA hai chiều với sự hiệu chỉnh của Bonferroni. † $p < 0,05$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa (a) các vết bỏng được điều trị bằng EPO hoặc được điều trị bằng EPO/FN và các vết thương được điều trị bằng FN và (b) các vết bỏng được điều trị bằng EPO liều cao và vết bỏng được điều trị bằng EPO liều thấp theo kết quả của ANOVA hai chiều và sự hiệu chỉnh của Bonferroni.

Fig.2: FN tại chỗ không ảnh hưởng tỷ lệ băng bó vết thương và tỷ lệ lưu lượng máu trong da tái sinh của các vết thương không phải do bệnh tiểu đường. Việc băng bó vết thương và tỷ lệ lưu lượng máu trong da tái sinh của các con lợn bị bệnh tiểu đường và không bị bệnh tiểu đường được xác định vào ngày 0, 4, 9 và 14 sau các điều trị khác

nhau. (A) tỷ lệ băng bó vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn không bị bệnh tiểu đường. (B) Bộ hình ảnh chụp minh họa (trái) và máy quét Doppler laze phải của ác vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở con lợn không bị bệnh tiểu đường ở ngày 0, 4, 9 và 14. Các hình tròn màu trắng trong các máy quét Doppler laze thể hiện khu vực vết bỏng ở ngày 0. Màu xanh sẫm thể hiện các khu vực không được tạo mạch, các màu đỏ và vàng thể hiện các khu vực được tạo mạch với các vùng màu đỏ minh họa các vùng mà được tạo mạch nhiều hơn các khu vực màu vàng. Kích thước mẫu trong mỗi nhóm điều trị ở hai con lợn không bị bệnh tiểu đường là 12. * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA hai chiều với sự hiệu chỉnh của Bonferroni. † $p < 0,05$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN và các vết bỏng điều trị EPO theo kết quả của thử nghiệm t của sinh viên từ hai phía.

Fig.3: EPO tại chỗ làm tăng mật độ vi mạch (MVD) và sự biểu hiện eNOS trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường và các hiệu quả này được tăng bởi FN. (A) Bộ các hình ảnh hiển vi mà thể hiện việc nhuộm hóa mô miễn dịch đối với sự biểu hiện CD31 bằng các tế bào nội mạc mạch máu của các mao mạch trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO và EPO/FN của lợn không bị bệnh tiểu đường (tám trên) và lợn bị bệnh tiểu đường (tám dưới) được thu thập sau 14 ngày điều trị. MVD trong da tái sinh được xác định bằng cách đếm số các mao mạch trong năm lĩnh vực vi mô ngẫu nhiên (phóng to 200 lần) theo kính hiển vi quang học trong mỗi vị trí vết thương. (B) MVD trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn không bị bệnh tiểu đường. (C) MVD trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, được điều trị bằng FN, được điều trị bằng EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (D và E). Westen blots minh họa của sự biểu hiện eNOS trong các mô mà được thu thập ở ngày 14 và sau đó được đo trong các sản phẩm phân giải mà được điều chế từ da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO, EPO/FN của các con lợn không bị bệnh tiểu đường (D) và con lợn bị bệnh tiểu đường (E). a-

Actin được sử dụng để chuẩn hóa việc nạp protein và các vết được lấy từ các mẫu mà được phân tích đồng thời trên gel riêng biệt. Kích thước mẫu của mỗi nhóm điều trị là 12 và dữ liệu được biểu hiện như trung bình của hai lần đo $\pm$ SD (B và C) cho mỗi nhóm điều trị. * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA một chiều với thử nghiệm đánh giá của Tukey. † $p < 0,05$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN và các vết bỏng điều trị EPO theo kết quả của ANOVA một chiều với thử nghiệm đánh giá của Tukey. Thanh quy mô: 200 μ m (A).

Fig.4: EPO tại chỗ làm tăng lượng hydroxyprolin (HP) và tổng hợp axit hyaluronic (HA) trong da tái sinh của vết thương do bệnh tiểu đường và hiệu quả này được làm tăng bởi FN. (A) Bộ các hình ảnh hiển vi mà thể hiện việc nhuộm hóa mô miễn dịch đối với lượng FIP bằng cách nhuộm tricrom của Masson trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO và EPO/FN của lợn không bị bệnh tiểu đường (tám trên) và lợn bị bệnh tiểu đường (tám dưới) được thu thập sau 14 ngày điều trị. (B) Lượng FIP trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn không bị bệnh tiểu đường ở ngày 14. (C) Lượng FIP trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (D) Lượng HA trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn không bị bệnh tiểu đường. (E) Lượng HA trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO, và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (F và G). Westen blots thể hiện các mức độ biểu hiện của HAS1 và HAS2 trong các mô mà được thu thập ở ngày 14 và sau đó được đo trong các sản phẩm phân giải mà được điều chế từ da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN của các con lợn không bị bệnh tiểu đường (F) và các con lợn bị bệnh tiểu đường (G). a-Actin được sử dụng để chuẩn hóa việc nạp protein và các vết được lấy từ các mẫu mà được phân tích đồng thời chạy trên gel riêng biệt. Kích thước mẫu của mỗi nhóm điều trị là 12 và dữ liệu được biểu hiện như trung bình của hai lần đo của HP (B và C) hoặc HA (D và E) lượng $\pm$ SD. * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng

được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA một chiều với thử nghiệm đánh giá của Tukey. $\dagger p < 0,05$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN (C) và các vết bỏng điều trị EPO (E) theo kết quả của ANOVA một chiều với thử nghiệm đánh giá của Tukey. Thanh quy mô: 200 μm (A).

Fig.5: Sự biểu hiện AQP3 bị giảm trong vết thương da không do bệnh tiểu đường. Bộ hình ảnh hiển vi thể hiện việc nhuộm hóa mô miễn dịch cho AQP3 trên da không có vết thương của lợn không bị bệnh tiểu đường (A) và lợn bị bệnh tiểu đường (B). Thanh quy mô: (trái) 50 μm ; (phải) 200 μm (A và B). (C) Bộ hình ảnh hiển vi thể hiện việc nhuộm miễn dịch huỳnh quang cho AQP3 trên da không có vết thương của lợn không bị bệnh tiểu đường và lợn bị bệnh tiểu đường (D). Thanh quy mô: 200 μm (C và D). (E) Western blots thể hiện sự biểu hiện của AQP3 trong da không có vết thương của các con lợn bị bệnh tiểu đường 30 ngày sau khi cảm ứng DM và da không có vết thương của lợn không bị bệnh tiểu đường. Các giá trị được biểu hiện như độ lệch chuẩn $\pm$ của việc xác định ba lần của sự biểu hiện protein AQP3 và như tỷ lệ phần trăm của các giá trị da không bị bệnh tiểu đường không có vết thương (100%) α -Actin được sử dụng để chuẩn hóa việc nạp protein và các vết được lấy từ các mẫu mà được chạy đồng thời trên gel riêng biệt. (F) tổng số ARN được cô lập khỏi các sản phẩm phân giả da không có vết thương được điều chế từ các mẫu của da tái sinh từ các mô vết bỏng của hai con lợn bị bệnh tiểu đường và con lợn không bị tiểu đường và được thu thập ở ngày 14. AQP3 mRNA được định lượng bằng RT-PCR. Các giá trị được biểu hiện như độ lệch chuẩn $\pm$ của việc xác định ba lần của sự biểu hiện mRNA AQP3 và như tỷ lệ phần trăm của các giá trị da không bị bệnh tiểu đường không có vết thương (100%) $\dagger p < 0,01$ và sự khác biệt giữa các con lợn khỏe mạnh và con lợn bị bệnh tiểu đường theo kết quả của thử nghiệm t của hai sinh viên.

Fig.6: EPO tại chỗ kích thích sự biểu hiện AQP3 trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường và các hiệu quả này được tăng bởi FN. (A và B) Bộ các hình ảnh hiển vi mà thể hiện việc nhuộm hóa mô miễn dịch đối với AQP3 trong da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO và EPO/FN của lợn không bị bệnh tiểu đường (A) và lợn bị bệnh tiểu đường (B) được thu thập sau 14 ngày điều trị. Thanh quy mô: (A hoặc B; trái) 50 μm ; (A hoặc B; phải) 200 μm . (C và D) Western Blots thể hiện sự biểu hiện protein AQP3 sau 14 ngày điều trị các vết bỏng của hai con

lợn không bị bệnh tiểu đường (C) và hai con lợn bị bệnh tiểu đường với các giá trị gel chứa chất dẫn thuốc, chứa EPO và chứa EPO/FN được biểu hiện với giá trị $SD \pm$ của ba lần đo của sự biểu hiện protein AQP3 trong các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc của các con lợn không bị bệnh tiểu đường (100%). Western blots thể hiện của sự biểu hiện protein AQP3 trong các sản phẩm phân giải của da tái sinh của các vết bỏng từ lợn không bị bệnh tiểu đường (E) và lợn bị bệnh tiểu đường (F) sau 14 ngày điều trị. a-Actin được sử dụng để chuẩn hóa việc nạp protein và các vết được lấy từ các mẫu mà được chạy đồng thời trên gel riêng biệt (G và H). Tổng số ARN được cô lập từ các sản phẩm phân giải của da tái sinh của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO và EPO/VN của lợn không bị bệnh tiểu đường (G) và lợn bị bệnh tiểu đường (H). AQP3 mRNA được định lượng bằng RT-PCR. Các giá trị được biểu hiện như độ lệch chuẩn trung bình $\pm$ của việc xác định ba lần của sự biểu hiện mRNA AQP3 và như tỷ lệ phần trăm của các giá trị da không bị bệnh tiểu đường không có vết thương (100%). ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA hai chiều với sự hiệu chỉnh của Bonferroni. † $p < 0,05$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN và các vết bỏng điều trị EPO theo kết quả của thử nghiệm t của hai sinh viên.

Fig.7: Sự biểu hiện protein AQP3 tương ứng tích cực với sự kéo dài của sự hình thành mạch và lượng của hydroxyprolin (HP) và axit hyaluronic (HA) trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường. Sự biểu hiện protein AQP3 tương ứng đáng kể với (a) mật độ vi mạch (MVD) ($r=0,61$), (b) lượng FIP ($r=0,79$), (c) lượng của HA ($r=0,88$) trong các vết bỏng của lợn không bị tiểu đường. Sự biểu hiện protein AQP3 tương ứng đáng kể với (a) MVD ($r=X$), (b) lượng FIP ($r=0,60$), (c) lượng của HA ($r=0,93$) trong các vết bỏng của lợn bị tiểu đường ($r=0,88$). Mỗi điểm là trung bình sự biểu hiện protein AQP3, MVD, lượng FIP và HA trên sáu vết thương.

Fig.8: Sự ức chế AQP3 bởi $HgCl_2$ làm giảm tác động của EPO lên tỷ lệ băng bó vết thương, kéo dài sự hình thành mạch, và các lượng của hydroxyprolin (HP) và axit hyaluronic (HA) trong các vết thương do bệnh tiểu đường. Tỷ lệ băng bó vết thương và lưu lượng máu trong da tái sinh của lợn bị bệnh tiểu đường được xác định sau 14 ngày điều trị với gel chứa chất dẫn thuốc, chứa EPO liều cao và chứa EPO/ $HgCl_2$. (A) tỷ lệ băng bó vết thương của các vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc, EPO, và các vết

bong được điều trị bằng EPO/HgCl₂ của lợn bị bệnh tiểu đường. (B) Bộ hình ảnh chụp minh họa (tấm trên) và máy quét Doppler laze (tấm dưới) của các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc, EPO và EPO/HgCl₂ trên lợn bị bệnh tiểu đường sau 14 ngày điều trị. Màu xanh sẫm thể hiện các khu vực không được tạo mạch, các màu đỏ và vàng thể hiện các khu vực được tạo mạch với các vùng màu đỏ thể hiện các vùng mà được tạo mạch nhiều hơn các khu vực màu vàng. Các vết bong (n=6) trên mỗi nhóm điều trị của một trong số những con lợn bị bệnh tiểu đường được đánh giá và so sánh. Western blots thể hiện các mức độ biểu hiện eNOS, HAS1 và HAS2 trong các mô mà được thu thập ở ngày 14 và sau đó được đo trong các sản phẩm phân giải mà được điều chế từ da tái sinh của các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN, EPO và các vết bong được điều trị bằng EPO/FN của các con lợn bị bệnh tiểu đường. a-Actin được sử dụng để chuẩn hóa việc nạp protein và các vết được lấy từ các mẫu mà được chạy đồng thời trên gel riêng biệt (D). MVD trong da tái sinh của các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc, EPO, và EPO/HgCl₂ ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (E) lượng HP của da tái sinh của các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc, EPO, và EPO/HgCl₂ ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. (F) lượng HA của da tái sinh của các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc, EPO, và EPO/HgCl₂ ở các con lợn bị bệnh tiểu đường. * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA hai chiều với sự hiệu chỉnh của Bonferroni (A). ** $p < 0,01$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bong được điều trị bằng chất dẫn thuốc và các phương pháp điều trị khác theo kết quả của ANOVA một chiều với thử nghiệm đánh giá của Tukey (D-F). † $p < 0,05$ và ý nghĩa của sự khác biệt giữa các vết bong được điều trị bằng EPO/HgCl₂ và các vết bong điều trị EPO theo kết quả của thử nghiệm t của hai sinh viên (D-F).

Fig.9: Sự biểu hiện AQP3 điều hòa ức chế glucoza cao trong các tế bào sừng và các nguyên bào sợi được lấy từ da người; tác động được tạo khối bởi EPO. (A) tác động của EPO lên sự tăng sinh của HEKCs ở môi trường glucoza thấp (bình thường) và môi trường glucoza cao. (A) tác động của EPO lên sự tăng sinh của HEKCs ở môi trường glucoza thấp (bình thường, NG) và môi trường glucoza cao (HG) (C và D). Western blots thể hiện các mức độ biểu hiện AQP3 ở các sản phẩm phân giải mà được điều chế NHBCs và HEKCs được điều trị bằng EPO sau 5 ngày cấy trong môi trường NG hoặc HG. a-Actin được sử dụng để chuẩn hóa chạy trên gel riêng biệt (E và F). Bộ các hình

ảnh hiển vi thể hiện của việc nhuộm hóa mô miễn dịch đối với mức độ biểu hiện AQP3 trong HEKCs (E) và NHBCs (F). Thanh quy mô: 500 μm . ** $p < 0,01$ và là sự khác biệt theo kết quả của ANOVA một chiều với thử nghiệm đánh giá của Tukey.

Fig.10: Biểu đồ đường thể hiện sự giảm chiều dài và chiều rộng của vết loét chân do bệnh tiểu đường mạn tính trong nhiều tuần điều trị EPO/FN.

Fig.11: Biểu đồ đường thể hiện sự giảm khu vực loét của vết loét chân do bệnh tiểu đường mạn tính trong nhiều tuần điều trị EPO/FN.

Fig.12: Các hình ảnh thể hiện của việc băng bó vết thương của vết loét chân do bệnh tiểu đường mạn tính trong nhiều tuần điều trị EPO/FN.

Fig.13: Các hình ảnh thể hiện của vết loét bàn chân do bệnh tiểu đường mạn tính trước và sau khi nhiều lần điều trị EPO/FN.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Sáng chế

Trên cơ sở lĩnh vực kỹ thuật, các tác giả sáng chế cho rằng hoạt động điều trị có lợi của EPO đối với việc chữa lành DSU là một phần do khả năng của nó kích thích biểu hiện AQP3 trong da. Giả thuyết này được thử nghiệm ở lợn với thử nghiệm được gây ra DM loại 1 và bỏng da một phần. Đã được tìm thấy rằng việc điều trị EPO tại chỗ của các vết bỏng ở lợn bị bệnh tiểu đường đã tăng cường việc chữa lành của chúng thông qua cơ chế phụ thuộc AQP3 bằng cách kích thích sự hình thành mạch và sản xuất ECM. Các bằng chứng bổ sung đề xuất là FN có thể có khả năng hoạt động tăng cường của EPO trên việc chữa lành các vết bỏng trên lợn bị bệnh tiểu đường. Cũng được đề xuất là các vết thương bàn chân do bệnh tiểu đường có thể được điều trị theo sáng chế. Việc điều trị ở người cũng được bao gồm.

Do đó, sáng chế một phần liên quan đến các dược phẩm và điều trị các vết thương như được mô tả ở trên và ở bất kỳ đâu trong bản mô tả sáng chế này. Nó cũng liên quan một phần đến dược phẩm chứa gel, erythropoietin và fibronectin, trong đó fibronectin có mặt trong dược phẩm với lượng có khả năng làm cho các hoạt động có lợi của erythropoietin khi được bôi lên vết thương.

Phương pháp điều trị vết thương bao gồm việc dùng tại chỗ lượng hiệu quả trị liệu của dược phẩm mà được mô tả ở trên hoặc ở bất kỳ phần nào trong bản mô tả sáng

chế này đối với vết thương để điều trị và/hoặc tăng cường việc chữa lành vết thương, ví dụ, vết bỏng hoặc vết thương bàn chân do bệnh tiểu đường.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, sáng chế được tin rằng việc chữa lành hoạt động thông qua cơ chế phụ thuộc AQP3 mà kích hoạt sự hình thành mạch, kích hoạt collagen và tổng hợp axit hyaluronic và sự tạo thành của chất nền ngoại bào (ECM), và kích thích sự tái biểu hiện bởi các tế bào sừng. Việc bổ sung của fibronectin trong dược phẩm có thể có khả năng hoạt động tăng cường EPO vào việc chữa lành vết thương do bỏng.

II. Định nghĩa

Do đó, theo một khía cạnh của sáng chế đã đề xuất phương pháp tăng cường việc chữa lành vết thương và tái tạo mô liên kết ở đối tượng có nhu cầu sử dụng chúng. Theo một số phương án, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh tiểu đường. Theo các phương án khác, đối tượng được chuẩn đoán hoặc bị bệnh đường huyết cao và kháng insulin.

Cụm từ “mô liên kết” được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này để chỉ mô động vật trong đó chất nền ngoại bào (ECM) và collagen cụ thể tạo ra phần chính, mà các chức năng của mô để hỗ trợ và liên kết các mô và các bộ phận cơ thể với mô và các bộ phận khác. Ví dụ điển hình là da và các cơ quan nội tạng.

Cụm từ “tái tạo mô liên kết” như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này để chỉ sự phục hồi về yếu tố thẩm mỹ, cấu trúc, chức năng, và sinh lý đã bị hỏng hoặc mô không khỏe. Sự tái tạo này dẫn đến việc chữa lành tái tạo. Hơn nữa, sự tái tạo mô liên kết đề cập đến sự gia tăng trong việc sản xuất collagen trong mô khỏe mạnh. Theo phương án minh họa, sự tái tạo dẫn đến sự suy giảm mô. Theo các phương án minh họa khác, sự tái tạo mô liên kết không có sơ hóa.

Cụm từ “mô không khỏe mạnh hoặc bị tổn thương” như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này đề cập đến mức độ chênh lệch so với mô có chức năng khỏe mạnh. Trong trường hợp của da, da sẽ yếu, ít đàn hồi, và dễ bị tổn thương hơn là da khỏe mạnh. Cấu trúc của da yếu hoặc da bị tổn thương kém hơn da khỏe mạnh (ví dụ, hạ bì và biểu bì có ít tế bào và collagen hơn). Mục đích để điều trị da yếu là để giảm sự thoái hóa của da và phục hồi chức năng của nó đến mức bình thường hoặc gần bình thường.

Cụm từ “mô khỏe mạnh” được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này đề cập đến da khỏe, đàn hồi, mịn và đầy đặn. Mục đích để điều trị da khỏe mạnh là ngăn sự suy

giảm của da gây ra bởi lão hóa hoặc môi trường căng thẳng bao gồm ánh sáng mặt trời quá nhiều và nhiễm vi khuẩn.

Thuật ngữ “tăng cường” tương ứng với mô liên kết đề cập đến quá trình gia tăng sản xuất collagen bởi các tế bào da chẳng hạn như nguyên bào sợi và tế bào sừng, theo cách mà cho phép sự tái tạo da. Do đó theo một số phương án của sáng chế, việc tăng cường để chỉ tăng ít nhất khoảng 10%, 20%, 50%, 80% trong sự tái tạo mô hoặc gần ít nhất 10%, 20%, 50%, 80% trong sự thoái hóa mô. Những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng có thể sử dụng các phương pháp luận và thử nghiệm khác nhau để đánh giá việc thúc đẩy sự tái tạo mô và cũng có thể sử dụng nhiều phương pháp luận và thử nghiệm có thể được dùng để đánh giá sự thoái hóa mô.

Thuật ngữ “vết thương” được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này để chỉ các chấn thương với da hoặc các mô dưới da cũng như các cơ quan nội tạng theo nghĩa rộng được bắt đầu theo cách bất kỳ trong số các cách khác nhau (ví dụ, vết loét do bệnh tiểu đường, các vết loét áp lực do nằm giường kéo dài, các vết thương gây ra bởi chấn thương, các vết thương trong hoặc sau quá trình phẫu thuật và tương tự) và với các đặc tính khác nhau. Ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn, vết bầm tím, vết xước, vết thương do bỏng, vết thương do cháy nắng, vết thương rạch, vết thương hở, vết thương phẫu thuật, viêm loét hoại tử, vết loét, vết loét do ứ máu tĩnh mạch, vết loét do bệnh tiểu đường, vết loét tá tràng, vết loét aphthous, vết loét áp lực, vết sẹo, rụng tóc từng vùng, viêm da, viêm da do tiếp xúc dị ứng, viêm da dị ứng, viêm da berloque, viêm da do tẩy lột, viêm túi mật, viêm da chàm, bệnh vẩy nến, eczema, ban đỏ, mụn cóc, mụn cóc hậu môn, đau mạch, đau mạch do anh đào, chân của vận động viên, nốt ruồi không bình thường, ung thư biểu mô tế bào cơ bản, bateman's purpura, pemphigoid ở bò, Candida, viêm xoang chondrodermatitis, bệnh Darier, dermatofibroma. Luput ban đỏ dạng đĩa, chàm hình đồng xu, chàm dị ứng, chàm rối loạn nhịp, chàm ở tay, ban nốt đỏ đa dạng, bệnh Fordyce, Bệnh thiếu máu đa nang Keloidalis Nuchae, viêm nang lông, Granuloma Annulare, Bệnh Graver, phát ban nhiệt, Bệnh giộp da không đau, bệnh Zona (shingles), Viêm thượng vị, nổi mề đay, nhồi máu cơ tim, bệnh vẩy cá, bệnh chốc lở, xơ dày mỡ, sẹo lồi, u gai sừng, mụn nhọt teo, mụn nhọt teo như chứng dày sừng, Lichen Simplex Chxonicus, Lichen Sclerosus, Ung thư bạch huyết, Lupus da, bệnh Lyme, Lichen Striatus, U nang dạng nhầy, u sùi dạng nấm, u mềm biểu mô, tàn nhang, nấm móng tay, hoại tử mỡ đài tháo đường, nốt sùng viêm da, Onychoschizis Onychomycosis, Pityriasis Lichenoides,

bệnh vẩy phấn hồng, bệnh vẩy phấn đỏ tóc, mụn cơm, cây sơn độc, cây sồi độc, Pompholyx, Viêm mô bàng quang, ngứa hậu môn và Pityriasis Alba.

Các vết thương thường được phân loại thành một trong bốn loại phụ thuộc vào độ sâu vết thương: (i) Loại 1: Vết thương giới hạn đối với biểu mô; (ii) Loại 2: vết thương kéo dài thành viêm da; (iii) vết thương kéo dài thành mô dưới da; và (iv) loại 4 (hoặc vết thương toàn bộ): vết thương nơi da bị tiếp xúc (ví dụ, điểm áp lực xương, ví dụ như mấu chuyển hoặc xương cùng lớn hơn).

Thuật ngữ "vết thương từng phần" được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này liên quan đến các vết thương bao gồm các loại 1 đến 111, ví dụ các vết thương từng phần bao gồm vết bỏng, vết loét áp lực, vết loét do ứ máu tĩnh mạch và vết loét do bệnh tiểu đường.

Thuật ngữ “vết thương sâu” được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này bao gồm các vết thương loại III và loại IV.

Thuật ngữ “vết thương mạn tính” được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này để chỉ vết thương mà không chữa lành được trong vòng 30 ngày.

Thuật ngữ “chữa lành” đề cập đến quá trình hồi phục vết thương chẳng hạn như sự hình thành sẹo (theo các phương án minh họa việc chữa lành không có sự hình thành mô xơ hóa).

Theo phương án cụ thể, các dược phẩm của một số phương án của sáng chế tức là tăng cường quá trình chữa lành.

Cụm từ “tăng cường hoặc thúc đẩy quá trình chữa lành vết thương da” đề cập đến việc khởi tạo sự hình thành các mô hạt của sự co dẫn vết thương và/hoặc sự kích thích biểu mô (nghĩa là, tạo ra các màng mới trong biểu mô). Việc chữa lành vết thương được đo bằng cách giảm diện tích vết thương.

Theo một số khía cạnh, việc điều trị của tất cả các vết thương, bao gồm các vết thương sâu và các vết thương mạn tính.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “điều trị” để chỉ việc ngăn ngừa, chữa bệnh, đảo ngược, giảm nhẹ, giảm bớt, giảm thiểu, ức chế hoặc phòng ngừa các ảnh hưởng có hại của tình trạng thiếu máu, ví dụ bằng cách tăng cường truyền dịch. Những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng có thể sử dụng các phương pháp luận và thử nghiệm khác nhau có thể sử dụng để đánh giá sự

tiến triển của tình trạng, và tương tự, các phương pháp luận và thử nghiệm khác nhau có thể được sử dụng để đánh giá việc giảm, giảm bớt hoặc phục hồi tình trạng.

Việc điều trị được đánh giá bằng thử nghiệm thông thường, chẳng hạn như các mẫu được mô tả trong các phần ví dụ bên dưới. Các phép đo kết quả như sự truyền dịch và sự sống sót, cũng như tiêu chí mô học và chức năng có thể được sử dụng để đánh giá hiệu quả về sự thay đổi các thông số khác nhau, để tiếp cận hiệu quả tối ưu trong số các biểu mô có giá trị trị liệu tối đa trong việc điều trị các vết thương da. Các thông số khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được định lượng để xác định sự truyền dịch trong mô bị ảnh hưởng là chụp X quang mạch máu và MRI, và các thông số lâm sàng chẳng hạn như kéo dài hoại tử mô ở khu vực bị ảnh hưởng, vết loét và sự cắt cụt mô của các ngón chân và/hoặc các ngón tay.

Trong bối cảnh của việc “tăng cường” chữa lành vết thương chỉ khả năng để cho phép hoặc giúp chữa lành vết thương, theo cách điều trị chúng. Do đó theo một số phương án của sáng chế, việc tăng cường để chỉ giảm ít nhất khoảng 10%, 20%, 50%, 80% thời gian để chữa lành hoặc tăng ít nhất 10%, 20%, 50%, 80% trong việc băng bó vết thương.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “đối tượng” đề cập đến động vật có vú bất kỳ (ví dụ, người hoặc các động vật được thuần hóa), con đực hoặc con cái ở độ tuổi bất kỳ mà trải qua hoặc có thể trải qua sự tổn thương mô hoặc bị thương hoặc bị bệnh thiếu máu ở bất kỳ giai đoạn và/hoặc mức độ.

Như được đề cập, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế đạt được bằng cách dùng tại chỗ cho đối tượng các liều lượng được biểu thị của EPO và FN.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “erythropoietin” (EPO) để chỉ protein erythropoietin ở động vật có vú (ví dụ, người) (có thể sử dụng thay thế với polypeptit) hoặc chất tương tự của chúng như được đề cập trong số truy cập ngân hàng gen NP0Q0790. Erythropoietin có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc công nghệ pha rắn. Erythropoietin cũng được bán trên thị trường (ví dụ, Cytolab/Peptotech, Rehovot Israel, Arenesp, Amgen, Thousand Oaks, Calif, USA; and Epogen, Amgen, Thousand Oaks, Calif, USA, Bristol-Myers Squibb, Roche and Sanofi-Aventis). Erythropoietin có thể được dùng như một glycoprotein hoàn chỉnh hoặc chỉ như tiêu đơn vị protein không có đường liên kết. Vì erythropoietin của sáng chế được sử dụng trong các ứng dụng lâm sàng, tốt hơn là nó được vô trùng hoặc

có thể được tinh chế các yếu tố có thể lây bệnh (ví dụ, vi khuẩn, hoặc các thành phần vi khuẩn chẳng hạn bằng bộ lọc).

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “fibronectin” (FN) để chỉ protein fibronectin ở động vật có vú (ví dụ, người) (có thể sử dụng thay thế với polypeptit) hoặc chất tương tự của chúng như được đề cập trong số truy cập ngân hàng gen NP002017. Fibronectin có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc công nghệ pha rắn. Fibronectin cũng có bán trên thị trường (ví dụ, Chemicon international Inc., Temecula, Calif, USA). Vì Fibronectin của sáng chế được sử dụng trong các ứng dụng lâm sàng, tốt hơn là nó được vô trùng hoặc có thể được tinh chế các yếu tố có thể lây bệnh (ví dụ, vi khuẩn, hoặc các thành phần vi khuẩn chẳng hạn bằng bộ lọc).

Cần phải hiểu rằng khi các dược phẩm mirneic được sử dụng các liều lượng của FN và EPO nên được hiệu chỉnh chẳng hạn theo giá trị mol. Sự hiệu chỉnh này là cách tính toán thông thường đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dược phẩm hoặc mỹ phẩm của sáng chế có thể chứa erythropoietin và fibronectin trong đồng dược phẩm (như được đề xuất trong ví dụ 1 bên dưới) hoặc trong hai dược phẩm riêng biệt.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này cụm từ “dùng tại chỗ” để chỉ việc dùng hoặc lây lan các dược phẩm của sáng chế lên trên bề mặt của cơ thể, tức là, da, da đầu, tóc, móng và tương tự, tốt hơn là trên bề mặt của mô tổn thương (ví dụ, da), vết thương hoặc trên bề mặt của vết thương hoặc vết loét do bệnh tiểu đường. Khi không được đồng điều chế theo công thức, việc dùng của erythropoietin và fibronectin có thể bị ảnh hưởng đồng thời hoặc liên tiếp.

Cần phải hiểu rằng liều lượng của erythropoietin và fibronectin được sử dụng theo hướng dẫn của sáng chế có thể thay đổi. Do đó, erythropoietin có thể được dùng với liều lượng giữa 10 đến 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tổn thương mô hoặc vết thương được điều trị. Theo một phương án liều lượng của erythropoietin nằm trong khoảng từ 15 đến 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô. Theo phương án khác liều lượng của erythropoietin ở khoảng 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô. Fibronectin có thể được dùng với liều lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của sự tổn thương mô và vết thương được điều trị, theo một phương án liều lượng của

fibronectin nằm trong khoảng từ 150 đến 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô. Theo phương án khác liều lượng của fibronectin ở khoảng 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô.

Theo các phương án cụ thể, liều lượng của erythropoietin được dùng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô. Theo các phương án khác, liều lượng của fibronectin được dùng nằm trong khoảng từ 10 đến 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mô. Theo các phương án cụ thể, liều lượng erythropoietin và/hoặc fibronectin được làm cho thích hợp để sử dụng trong mỹ phẩm. Ví dụ, liều lượng của erythropoietin và/hoặc fibronectin có thể được làm cho thích hợp để điều trị da bị xước. Do đó, các dược phẩm của sáng chế cũng có thể được sử dụng trong thẩm mỹ và/hoặc việc chữa lành vết thương nhỏ để điều trị đối với các tình trạng bệnh về da với các vết thương nhỏ hoặc rất nhỏ mà để lại các vết xước, chỗ da nề mềm, mụn và tương tự với tên của một vài các ví dụ không giới hạn. Do đó, sáng chế liên quan một phần đến phương pháp điều trị thẩm mỹ bề mặt da bị xước bằng cách dùng lượng vừa đủ dược phẩm theo sáng chế lên bề mặt da bị xước để điều trị thẩm mỹ bề mặt, ví dụ, nơi bề mặt da bị xước để lại vết xước, chỗ da nề mềm, mụn và tương tự.

Sáng chế cũng liên quan đến phương pháp chữa lành bề mặt da bị xước bằng cách dùng lượng vừa đủ dược phẩm theo sáng chế lên bề mặt da bị xước để chữa lành bề mặt da bị xước, ví dụ, nơi bề mặt da bị xước để lại vết xước, chỗ da nề mềm, mụn hoặc tương tự.

Các dược phẩm chứa erythropoietin và/hoặc fibronectin theo các phương án có thể được dùng cho đối tượng đã biết hoặc trong dược phẩm hoặc mỹ phẩm. Theo một số khía cạnh, erythropoietin và/hoặc fibronectin theo các phương án được điều chế theo công thức trong chất nền. Theo các khía cạnh cụ thể, chất nền là gel. Theo các phương án cụ thể khác, gel là hydrogel.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này “dược phẩm hoặc mỹ phẩm” để chỉ dược phẩm của các thành phần hoạt tính được mô tả ở đây với các thành phần hóa học như các chất mang và tá dược sinh lý phù hợp. Mục đích của dược phẩm là có thể làm cho việc dùng các thành phần hoạt tính (ví dụ, EPO và FN) cho đối tượng một cách dễ dàng.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này “thành phần hoạt tính” để chỉ các dược phẩm erythropoietin và dược phẩm fibronectin chịu trách nhiệm về tác động sinh học được dự báo (tức là, tăng cường việc chữa lành vết thương, sự tái tạo mô liên kết và điều trị bệnh thiếu máu).

Dưới đây, các cụm từ “chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý” và “chất mang được dụng” có thể được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng mà không gây ra sự kích thích đáng kể đối với đối tượng và không hủy bỏ các hoạt tính và đặc tính sinh học của các thành phần hoạt tính được dùng. Chất phụ gia cũng được bao gồm theo các cụm từ này

Trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “tá được” để chỉ chất trợ được thêm vào được phẩm (được phẩm hoặc mỹ phẩm) còn tạo điều kiện thuận lợi dùng thành phần hoạt tính của sáng chế.

Các kỹ thuật đối với được phẩm và việc dùng các thuốc có thể được tìm thấy trong "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., tái bản mới nhất, mà được kết hợp vào đây bằng cách tham khảo.

Được phẩm có thể được điều chế ở dạng liều đơn vị, ở dạng này, được phẩm được chia nhỏ thành các liều đơn vị chứa các định lượng thích hợp của các thành phần hoạt tính như dùng đơn liều. Dạng liều đơn vị có thể được đóng gói được phẩm, việc đóng gói chứa các định lượng riêng biệt của được phẩm, ví dụ, băng vết thương bám dính, băng vết thương không bám dính, khăn lau, khăn lau cho trẻ sơ sinh, gạc, đệm bông gòn và đệm bông gòn vệ sinh.

Dạng liều đơn vị theo các hướng dẫn của sáng chế có thể chứa erythropoietin với liều lượng khoảng 10 đến 30 μg , fibronectin với liều lượng khoảng 100 đến 300 μg , hoặc cả erythropoietin với liều lượng ở vào khoảng 10 đến 30 μg và fibronectin với liều lượng ở vào khoảng 100 đến 300 μg . Theo một phương án, dạng liều đơn vị chứa erythropoietin với liều lượng khoảng 15 đến 25 μg , fibronectin với liều lượng khoảng 150 đến 250 μg , hoặc cả erythropoietin với liều lượng ở vào khoảng 15 đến 25 μg và fibronectin với liều lượng ở vào khoảng 150 đến 250 μg . Theo phương án khác, dạng liều đơn vị chứa erythropoietin với liều lượng khoảng 20 μg , fibronectin với liều lượng khoảng 200 μg , hoặc cả erythropoietin với liều lượng ở vào khoảng 20 μg và fibronectin với liều lượng ở vào khoảng 200 μg . Ngoài ra, dạng liều đơn vị theo các hướng dẫn của sáng chế có thể chứa erythropoietin với liều lượng khoảng 0,1 đến 10 μg , fibronectin với liều lượng khoảng 10 đến 100 μg , hoặc cả erythropoietin với liều lượng ở vào khoảng 0,1 đến 10 μg và fibronectin với liều lượng ở vào khoảng 10 đến 100 μg .

Định lượng của hợp chất hoạt tính ở dạng liều đơn vị của được phẩm có thể được thay đổi hoặc được điều chỉnh thích hợp theo ứng dụng cụ thể.

Các dược phẩm (ví dụ, các dược phẩm hoặc mỹ phẩm) của sáng chế có thể được dùng theo cách tại chỗ, ví dụ, thông qua việc dùng các dược phẩm trực tiếp lên vùng mô (ví dụ, vết thương) của bệnh nhân. Ví dụ, các đường dùng thích hợp của dược phẩm, có thể bao gồm việc dùng tại chỗ (ví dụ, lên mô sừng, như da, tóc, móng, da đầu) và việc dùng qua da (ví dụ, đường miệng, tĩnh mạch, mắt).

Các dược phẩm của sáng chế có thể được dùng qua việc tiêm dược phẩm bao gồm thành phần hoạt tính (ví dụ, EPO và FN) và chất mang được chấp nhận về mặt sinh lý. Đối với việc dùng tại chỗ, dược phẩm có thể được tiêm vào vết thương, và/hoặc vào da khỏe mạnh mà xung quanh da bị thương, hoặc cả hai.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sản xuất theo cách thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng các quy trình trộn, hòa tan, nghiền hạt, tạo viên bao đường, tán thành bột mịn, nhũ tương hóa, đóng gói, quán hoặc đông khô nhanh truyền thống.

Thành phần hoạt tính có thể ở dạng bột để cấu thành với chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ dung dịch dựa vào nước không có pyrogen vô trùng.

Do đó, các dược phẩm sử dụng theo sáng chế có thể được điều chế theo cách thông thường sử dụng một hoặc nhiều chất mang được chấp nhận về mặt sinh lý chứa các tá dược và các chất phụ trợ, mà tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình của các thành phần hoạt tính vào các dược phẩm. Dược phẩm thích hợp phụ thuộc vào cách tiếp cận việc dùng được chọn.

Việc xác định lượng hiệu quả trị liệu là nằm trong khả năng của những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, cụ thể là được bộc lộ chi tiết trong bản mô tả sáng chế này.

Đối với bất kỳ dược phẩm được sử dụng theo phương pháp của sáng chế, liều lượng hoặc lượng hiệu quả (trị liệu) có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm in vitro. Thêm vào đó, liều lượng có thể được điều chế trong các hệ thống cấy mô hoặc ở các động vật mô hình để đạt được hàm lượng hoặc lượng mong muốn. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn các liều lượng có lợi ở người.

Hiệu quả trị liệu và độc tính của các thành phần hoạt tính được mô tả trong bản mô tả sáng chế này có thể được xác định bởi quy trình được chuẩn in vitro, trong cấy tế bào hoặc các động vật dùng để thử nghiệm. Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm cấy tế bào và thử nghiệm in vitron và các nghiên cứu trên động vật được sử dụng trong điều

chế có khoảng liều dùng ở người. Liều lượng có thể thay đổi phụ thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng và đường dùng được sử dụng. Dược phẩm, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được chọn bởi bác sỹ riêng theo tình trạng bệnh của người bệnh. (See, e.g., Fingi, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch. 1, p. 1.)

Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng (ví dụ, vùng, độ sâu và mức độ tổn thương mô, vết thương hoặc thiếu máu) và sự đáp ứng của mô, liều lượng có thể dùng đơn liều hoặc đa liều, với quá trình điều trị kéo dài từ vài ngày đến vài tuần hoặc cho đến khi điều trị được thực hiện hoặc làm giảm tình trạng da. Tốt hơn là , dược phẩm của sáng chế được dùng ít nhất mỗi ngày một lần.

Dĩ nhiên, lượng chế phẩm được dùng sẽ phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, mức độ của bệnh, cách thức dùng, đánh giá của bác sỹ kê đơn thuốc,v.v.

Nếu mong muốn, các dược phẩm của sáng chế có thể có mặt trong một thiết bị đóng gói hoặc phân phối, chẳng hạn như bộ dụng cụ được FDA chấp thuận, có thể chứa một hoặc nhiều đơn vị liều lượng chứa thành phần hoạt tính. Ví dụ, thiết bị đóng gói có thể chứa lá kim loại hoặc lá nhựa, chẳng hạn như bao gói phòng. Thiết bị đóng gói hoặc thiết bị phân phối có thể đi kèm với các chỉ dẫn cho việc dùng. Thiết bị đóng gói hoặc thiết bị phân phối cũng có thể được kèm với thông báo theo đơn do cơ quan chính phủ quy định về sản xuất, sử dụng hoặc bán dược phẩm mà thông báo đó phản ánh sự chấp thuận của cơ quan về dạng dược phẩm dùng cho người hoặc thú y. Ví dụ, thông báo như vậy có thể bao gồm việc dán nhãn đã được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ phê duyệt cho thuốc theo toa hoặc bằng cách chèn sản phẩm được chấp thuận. Các dược phẩm bào gồm dược phẩm của sáng chế được điều chế trong chất mang dược dụng cũng có thể được điều chế, được đặt trong hộp chứa thích hợp, được dán nhãn để điều trị bệnh chỉ định, như được mô tả chi tiết ở trên.

Vì các dược phẩm của sáng chế đã được sử dụng trong cơ thể, nên các dược phẩm này có độ tinh khiết cao và không chứa các chất gây ô nhiễm có hại, ví dụ như ít nhất là Loại Thực phẩm Quốc gia (NF), thường ít nhất là loại phân tích, và tốt hơn là ít nhất là loại dược phẩm Trong phạm vi mà hợp chất nhất định phải được tổng hợp trước khi sử dụng, việc tổng hợp hoặc thanh lọc này tốt hơn là sẽ dẫn đến một sản phẩm hoàn toàn không có bất kỳ chất độc hại nào có thể đã được sử dụng trong quá trình tổng hợp hoặc tinh chế.

Các yếu tố bổ sung có thể được kết hợp các dược phẩm hoặc gel của sáng chế (tức là, erythropoietin và fibronectin được ở trên). Các yếu tố này bao gồm, nhưng không giới hạn, các thành phần chất nền ngoại bào (ví dụ, vitronectin, laminin, collagen, elastin), các yếu tố tăng trưởng (ví dụ, FGF 1, FGF 2, IGF 1, IGF 2, PDGF, EGF, KGF, F1GF, VEGF, SDF-1, GM-CSF, CSF, G-CSF, TGF alpha, TGF beta, GF và ECGF), yếu tố cảm ứng sự giảm oxy huyết (ví dụ, HIF-1 alpha và beta và HIF-2) các hormone (ví dụ, insulin, hormone tăng trưởng, (GH), CRH, Leptin, Prolactin và TSH), các yếu tố tạo mạch (ví dụ, angiogenin và angiopoietin), các yếu tố đông máu và yếu tố chống đông máu [ví dụ, yếu tố I, yếu tố XIII, yếu tố mô, canxi, vVWF, protein C, protein S, protein 2, fibronectin, kháng thrombin, heparin, plasminogen, heparin khối lượng phân tử thấp (Clixan), kininogen khối lượng phân tử cao (HMOVVK), prekallikrein, chất ức chế hoạt hóa plasminogen 1 (PAI 1), chất ức chế hoạt hóa plasminogen 2 (PAI 2), urokinaza, thrombomodulin, chất hoạt hóa plasminogen mô (tPA), chất ức chế proteaza liên quan đến protein Z, 2-antiplasmin alpha, các cytokin (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 and INF-alpha, INF-beta, and INF-gamma), các chemokin (ví dụ, MCP-1 hoặc CCL2), các enzym (ví dụ endoglycosidaza, exoglycosidaza, endonucleaza, exonucleaza, peptidaza, lipaza, oxidaza, decarboxylaza, hydrolaza, chondroitinaza, chondroitinaza ABC, chondroitinaza AC, hyaluronidaza, keratanaza, heparanaza, phosphatase heparanaza, collagenaza, trypsin, catalaza), các chất dẫn truyền thần kinh (ví dụ, acetylcholin và monoamin), neuropeptin (ví dụ, chất P), vitamin (ví dụ, D-biotin, Cholin Clorua, axit Folic, Myo-inositol, Niacinamid, axit D-Pantothenic, muối Canxi, Pyridoxal.HCl, Pyridoxin.HCl, Riboflavin, Thiamin, HCl, Vitamin B 12, vitamin E, vitamin C, vitamin D, vitamin B 1-6, vitamin K, vitamin A and vitamin PP), carbohydrat (ví dụ, Mono Di/Polysaccharit bao gồm glucoza, mannoza, maltoza and fructoza), các ion, chất tạo phức (ví dụ, chất tạo phức Fe, chất tạo phức Ca), chất chống oxy hóa (ví dụ, Vitamin E, Quercetin, chất khử superoxit, Superoxit dismutaza), chất khử H₂O₂, chất khử các gốc tự do, chất khử Fe), các axit béo (ví dụ, Triglycerit, Phospholipit, Cholesterol, các axit béo tự do và các axit béo không tự do, rượu béo, axit Linoleic, axit oleic và axit lipoic), chất kháng sinh (e.g., Penicillin, Cephalosporin và Tetracyclin), thuốc giảm đau, thuốc gây mê, chất kháng khuẩn, thuốc chống nấm men, thuốc chống nấm, thuốc kháng virus, thuốc kháng sinh, thuốc chống đại tràng, thuốc chống rít, thuốc chống trầm cảm, thuốc chống buồn nôn,

thuốc chống viêm, thuốc chống trầm cảm, thuốc chống trăn, thuốc chống sung tẩy, thuốc chống ứ màng, thuốc chống histamin, axit amin (ví dụ, glutamin và arginin thiết yếu và không cần thiết đặc hiệu (từ A đến Z)), các muối (ví dụ, các muối pmrivat và các muối sulphat), sulphat (ví dụ, Canxi Sulphat), steroid (e.g., androgen, estrogen, progestagen, glucocorticoid và corticoid khoáng), catecholamin (, Epinephrine and Norepinephrine), Nucleosides and Nucleotides (ví dụ, Putin và Pyrimidin), Prostaglandin (ví dụ, Prostaglandin E2), Leucotrien, Erythropoietin (ví dụ, Thrombopoietin), Proteoglycan (ví dụ, Heparan sulfat, keratan sulfat), Hydroxyapatit [ví dụ, Hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)], Haptoglobin (Hp 1-1, Hp2-2 và Hp 1-2), Superoxid dismutaza (ví dụ, SOD 1/2/3), Nitric Oxid, phần tử cho nitric oxid (ví dụ, nitropmsside, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA, Glutathion peroxidaza, các hợp chất Hydrat (ví dụ, vasopressin), tế bào (ví dụ, tiểu cầu), môi trường tế bào (ví dụ MI 99, DME /F12, RPMI, Iscoves), huyết thanh (ví dụ, huyết thanh ở người, huyết thanh thai nhi, huyết thanh bò thai), chất đệm (ví dụ, HEPES, Natri Bicacbonat), chất tẩy rửa (ví dụ, Tween), chất khử trùng, cỏ, chiết xuất trái cây, chiết xuất rau (ví dụ, cải bắp, quả dưa chuột), chiết xuất hoa, chiết xuất thực vật, flavinoid (ví dụ, nước ép quả lựu), gia vị, lá (ví dụ, Trà xanh, trà hoa cúc), Polyphenol (ví dụ, rượu vang đỏ), mật ong, lectin, vi khuẩn, hạt nano (liposom), mixen, canxi cacbonat (CaCO_3 , ví dụ, canxi cacbonat kết tủa, ground/pulverized canxi cacbonat bột/được nghiền, albacar, PCC, GCC), canxit, đá vôi, đá vôi nghiền, đá vôi, vôi, phần (ví dụ như phần trắng, phần champagne, phần Pháp) và các yếu tố như BH4 (tetrahydrobiopterin).

Sáng chế cũng có thể chứa các thành phần, các chất, các nguyên tố và các nguyên liệu có hydro, nhóm alkyl, nhóm aryl, nhóm halo, nhóm hydroxy, nhóm alkoxy, nhóm alkylamino, nhóm dialkylamino, nhóm acyl, nhóm carboxyl, nhóm carboamido, nhóm sulfonamid, nhóm aminoacyl, nhóm amit, nhóm amin, nhóm nitro, hợp chất selen hữu cơ, hydrocacbon, và hydrocarbon tuần hoàn.

Dược phẩm sáng chế có thể được kết hợp với các chất như benzol peroxid, thuốc co mạch, thuốc giãn mạch, axit salicylic, axit retinoic, axit azelaic, axit lactic, axit glycolic, axit pyruvic, tanin, benziliden camphor và các dẫn xuất của chúng, hydroxy alpha, các chất hoạt động bề mặt.

Các dược phẩm theo một số phương án của sáng chế có thể được liên hợp sinh học với polyetylen glycol (ví dụ, PEG, SE-PEG mà bảo quản độ ổn định (ví dụ, chống

lại các hoạt tính proteaza) và độ hòa tan (ví dụ, trong dịch sinh học như máu, dịch tiêu hóa) của các thành phần hoạt tính (tức là các dược phẩm EPO và/hoặc FN của sáng chế) trong khi bảo quản các hoạt tính sinh học và kéo dài chu kỳ bán rã của nó.

Thêm vào đó lượng hiệu quả về mặt dược lý của tác nhân được bộc lộ ở đây, các dược phẩm theo khía cạnh này của sáng chế cũng bao gồm chất mang được chấp nhận về mặt da liễu.

Cụm từ “chất mang được chấp nhận về mặt da liễu” để chỉ chất mang thích hợp cho việc dùng tại chỗ lên da, tức là, mô sừng có các đặc tính thẩm mỹ tốt, phù hợp với các tác nhân hoạt tính của sáng chế và bất kỳ thành phần khác mà an toàn và không độc để sử dụng cho các động vật có vú.

Để tăng cường sự hấp phụ qua da của các thành phần hoạt tính (ví dụ, erythropoietin và/hoặc fibronectin của sáng chế), một hoặc nhiều lượng các tác nhân có thể được bổ sung vào các dược phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn, dimetylsulfoxit, dimetylaxetamit, dimetylsulfoxit, dimetylaxetamit, dimetylformamit, chất hoạt động bề mặt, azon, rượu, axeton, propylen glycol và polyetylen glycol.

Chất mang được dùng trong các dược phẩm của sáng chế có thể ở các dạng khác nhau phổ biến. Các chất mang này bao gồm các chất mang nhũ tương, bao gồm, các nhũ tương lỏng dầu trong nước, nhũ tương lỏng nước trong dầu, và nhũ tương silicon dầu trong nước, kem, thuốc mỡ, dung dịch chứa nước, thuốc xức ngoài, bánh xà phòng, bột nhão, nhũ thương, gel, bình xịt hoặc bình phun. Như được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, thành phần nhất định sẽ phân phối chủ yếu vào nước hoặc pha dầu/silicon, phụ thuộc vào hợp chất hòa tan trong nước của thành phần trong dược phẩm.

Nhũ tương theo sáng chế thường chứa lượng hiệu quả về mặt dược lý của tác nhân được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này và lipit hoặc lipit dầu và dầu có thể được lấy từ động vật, thực vật, hoặc dầu và có thể là tự nhiên hoặc tổng hợp (tức là, nhân tạo). Các ví dụ về các chất nhũ tương thích hợp được mô tả trong các sáng chế Mỹ số 3,755,560, được đưa ra bởi Dickert, et al. Aug. 28, 1.973; U.S. Pat. No. 4,421,769, được đưa ra bởi Dixon, et al, Dec. 20, 1983; và McCutheoniis Detergents and Emulsifiers, North American Edition, pages 317-324 (1986), tất cả được đưa vào đây bằng cách tham khảo.

Chất nhũ tương cũng có thể chứa chất chống tạo bọt để giảm thiểu sự tạo bọt khi dùng lên mô sừng. Các chất tạo bọt tay bao gồm các silicon khối lượng phân tử cao và các chất khác đã biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này để sử dụng như vậy.

Các chất nhũ tương thích hợp có thể có phạm vi độ nhớt rộng, phụ thuộc vào dạng sản phẩm mong muốn.

Các ví dụ về các chất mang thích hợp chứa các chất nhũ tương dầu trong nước được mô tả trong patent Mỹ No. 5,073,371 đến Turner, D. J. et al, được cấp ngày 17 tháng 12 năm 1991, và Patent Mỹ số 5,073,372, đến Turner, D. J. et al, được cấp ngày 17 tháng 12 năm 1991, toàn bộ các công bố này được đưa vào đây với mục đích tham khảo. Chất nhũ tương dầu trong nước đặc biệt được ưu tiên chứa tác nhân tạo kết cấu, chất hoạt động bề mặt ưa nước và nước, được mô tả chi tiết dưới đây.

Chất nhũ tương dầu trong nước được ưu tiên chứa tác nhân tạo kết cấu trong việc tạo thành cấu trúc mạng gel tinh thể lỏng. Không giới hạn bởi lý thuyết, sáng chế được tin rằng tác nhân kết cấu hỗ trợ trong việc tạo ra các đặc tính lưu biến vào được phẩm mà làm tăng độ ổn định của được phẩm. Tác nhân kết cấu cũng có thể có chức năng như chất nhũ tương hoặc chất hoạt động bề mặt.

Các chất hoạt động bề mặt anion khác nhau phổ biến cũng hữu ích trong bản mô tả sáng chế này. Ví dụ xem patent Mỹ số 3,929,678, đến Laughlin et al, được cấp ngày 30 tháng 12 năm 1975, toàn bộ các công bố này được đưa vào đây với mục đích tham khảo. Thêm vào đó, các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính và chất hoạt động ion lưỡng tính cũng hữu ích trong bản mô tả sáng chế này.

Các được phẩm của sáng chế có thể được điều chế theo công thức ở các dạng khác nhau bất kỳ được dùng trong ngành công nghiệp dược cho ứng dụng đa bao gồm dung dịch, thuốc xức, thuốc xịt, kem, thuốc mỡ, dầu mỡ, gel, dầu, giặt, vv, như mô tả dưới đây

Các được phẩm của sáng chế có thể được điều chế đủ nhớt để giữ trên vùng da được điều trị, không bay hơi, và/hoặc không dễ loại bỏ bằng cách rửa bằng nước, nhưng có thể loại bỏ với sự hỗ trợ của xà phòng, chất làm sạch và/hoặc dầu gội.

Các phương pháp để điều chế các được phẩm có các đặc tính như vậy đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được mô tả một cách chi tiết trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990 (supra); và

Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 6th ed., Williams & Wilkins (1995).

Các dược phẩm dùng tại chỗ của sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn thuốc xức và kem, có thể chứa chất làm ẩm được chấp nhận về mặt da liễu. Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, “chất làm ẩm” để chỉ chất hữu ích cho việc ngăn và làm nhẹ việc khô, cũng như bảo vệ da. Nhiều loại chất làm ẩm thích hợp được biết đến và có thể được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này. Ví dụ, xem: Sagarin, Mỹ phẩm, Khoa học và Công nghệ, Ấn bản lần 2, Vol. 1, trang 3243 (1972), trong đó có nhiều ví dụ về các chất phù hợp làm chất làm ẩm và được đưa vào đây bằng cách tham khảo. Chất làm ẩm được ưu tiên là glyxerin.

Các thuốc xức và kem theo sáng chế thường chứa hệ chất mang dung dịch và một hoặc nhiều chất làm ẩm.

Dược phẩm được dùng tại chỗ của sáng chế cũng có thể bao gồm các thành phần bổ sung mà được thêm vào, ví dụ, để nâng cao các dược phẩm với hương liệu và các yếu tố dinh dưỡng của da.

Các thành phần này được chọn thích hợp sử dụng trên mô sùng ở người mà không gây độc tính, tính không tương thích, tính không ổn định, phản ứng dị ứng, và tương tự trong phạm vi ý kiến y khoa hợp lý, thêm vào đó, các thành phần tùy ý như vậy được đề xuất hữu hiệu mà chúng không chấp nhận thay đổi các lợi ích của các hợp chất hoạt tính theo sáng chế.

The CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Second Edition (1992) mô tả rất nhiều các thành phần mỹ phẩm không giới hạn được sử dụng phổ biến trong ngành chăm sóc da, phù hợp cho sử dụng trong các dược phẩm theo sáng chế. Các ví dụ về các loại thành phần này bao gồm: chất mài mòn, chất hấp thụ, các thành phần thẩm mỹ như nước hoa, chất nhuộm, chất tạo màu/chất màu, tinh dầu, da nhạy cảm, chất làm se, vv (ví dụ, dầu đinh hương, mentol, camphor, dầu bạch đàn, eugenol, mentyl lactat, chùng cất cây phi) tác nhân chống mụn trứng cá, tác nhân chống đóng băng, tác nhân chống tạo bọt, tác nhân kháng khuẩn (ví dụ, iodopropyl butylcarbamate), chất chống oxy hóa, chất kết dính, chất phụ gia sinh học, các chất đệm, các chất tải, các chất tạo phức, các chất phụ gia hóa học, chất tạo màu, chất làm se mỹ phẩm, chất diệt khuẩn mỹ phẩm, chất làm biến tính, thuốc giảm đau, chất làm se thuốc, chất tạo màng hoặc các chất, ví dụ như polyme, để hỗ trợ các đặc tính tạo màng và tính chất của dược phẩm (ví dụ, copolyme

eicosene và vinyl pyrrolidon), chất làm mờ, chất điều chỉnh pH, chất đẩy, các chất khử, các chất dưỡng da (ví dụ, chất làm ướt, bao gồm đặc tính khác nhau và ngoại biên), các chất làm dịu da và/hoặc chữa lành da (ví dụ như panthenol và các chất dẫn xuất (như ethyl panthenol), cây lô hội, axit pantothenic và các dẫn xuất của nó, allantoin, bisabolol và dikali glycyrrhizinat), các chất điều trị da, chất làm đặc, vitamin và các chất dẫn xuất của chúng.

Các dược phẩm của sáng chế có thể được dùng trực tiếp lên da.

Ngoài ra, nó có thể được phân phối qua việc dùng lên da thông thường bằng các hệ thống phân phối thuốc qua da khác nhau mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn như các tấm áp da mà giải phóng dược phẩm vào da theo cách giải phóng theo thời gian. Các hệ thống phân phối thuốc khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm bình xịt hơi nước áp suất cao, sự điện chuyển ion hoặc sonophoresis. Sự điện chuyển ion được dùng để làm tăng sự thẩm thấu qua da và tạo điều kiện thuận lợi phân phối qua da. Đơn xin cấp Patent Mỹ Số 5,667,487 và 5,658,247 bộc lộ thiết bị ionosonic thích hợp cho vận chuyển qua trung gian siêu âm trên các chất điều trị trên da. Ngoài ra, hoặc thêm vào đó, các liposom hoặc mixen cũng có thể được dùng làm chất dẫn thuốc phân phối.

Vì vết thương và thiếu máu cục bộ có thể dính vào da đầu, nên các dược phẩm của sáng chế bao gồm các chất làm ẩm, các chất hoạt động bề mặt và/hoặc chất dưỡng thích hợp cho việc sử dụng trên da và tóc của da đầu.

Các chất làm ẩm bao gồm, nhưng không giới hạn, dầu hydrocarbon và sáp, chẳng hạn như dầu khoáng, dầu hỏa, và các loại dầu tương tự, dầu thực vật và động vật và chất béo như dầu ôliu, dầu cọ, dầu thầu dầu, dầu ngô, dầu đậu nành, và các dầu tương tự, và lanolin và các dẫn xuất của nó, chẳng hạn như lanolin, dầu lanolin, sáp ong lanolin, rượu lanolin, và các chất tương tự. Các chất làm ẩm khác bao gồm este của axit béo có 10 đến 20 nguyên tử cacbon, chẳng hạn như axit myristic, axit stearic, axit isostearic, axit palmitic, và các chất tương tự, chẳng hạn như methyl myristat, propyl myristat, butyl myristat, propyl stearat, propyl isostearat, propyl palmitat, và các chất tương tự. Các chất làm ẩm khác bao gồm các axit béo có 10 đến 20 nguyên tử cacbon bao gồm axit stearic, axit myristic, axit lauric, axit isostearic, axit palmitic, và chất tương tự. Các chất làm ẩm cũng bao gồm các rượu béo có 10 đến 20 nguyên tử cacbon, chẳng hạn như xetyl, myristyl, lauryl, isostearyl, stearyl và tương tự.

Tốt hơn là, chất nhũ tương/chất hoạt động bề mặt được sử dụng khi điều chế các dược phẩm của sáng chế để sử dụng lên tóc.

Các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt bao gồm, nhưng không giới hạn, các sản phẩm trùng ngưng oxit polyoxyalkylen oxit của alkyl kỵ nước, alken, hoặc nhóm chức thơm alkyl có hydro phản ứng tự do có khả năng trùng ngưng với alkylen oxit kỵ nước, polyetylen oxit, propylen oxit, butylen oxit, polyetylen oxit hoặc polyetylen glycol. Đặc biệt hiệu quả là các sản phẩm ngưng tụ của octylphenol với khoảng 7 đến 13 mol của etylen oxide, được bán bởi Công ty Rohm & Haas dưới các dòng sản phẩm nhãn hiệu TRITON 100® của họ.

Các thành phần khác như, nước hoa, chất ổn định, thuốc nhuộm, chất chống vi trùng, chất kháng khuẩn, chất chống kết tụ, chất hấp thụ bức xạ tia cực tím, và các chất tương tự cũng được đưa vào trong dược phẩm theo các phương án.

Chất dưỡng ổn định để thủy phân axit, chẳng hạn như hợp chất silicon có ít nhất một gốc amoni bậc bốn cùng với monoquat etoxyl hóa tốt hơn là cũng được sử dụng để ổn định và độ dày tùy ý dược phẩm theo các phương án.

Các chất có thể được sử dụng để làm mờ các dược phẩm của sáng chế bao gồm các este béo, các polyme làm mờ, như các polyme styren, như OPACIFIER 653™ từ Morton, International, inc.; và rượu béo. Dưới đây là danh sách không giới hạn của các rượu béo: rượu xetyl; rượu stearyl; rượu cetearyl; rượu behenyl; và rượu arachidyl.

Các dược phẩm dưỡng của sáng chế là không rõ ràng có thể bao gồm amin S-13, dixetyl amoni clorua, ceteareth-20.

Theo một phương án cụ thể, dược phẩm erythropoietin và dược phẩm fibronectin chứa erythropoietin khoảng 10 đến 30 ug/mL và khoảng 100 đến 300g/mL fibronectin, khoảng 0,20% Metyl Paraben, khoảng 9% Laureth và isoparafm và Polyacrylamit, khoảng 12% nước khử ion, và lên đến 100% dung dịch đệm phosphat.

Theo phương án khác nữa, dược phẩm erythropoietin và dược phẩm fibronectin chứa 5% khối lượng erythropoietin (EPO), 30% khối lượng fibronectin (FN), 5% khối lượng glyxerol, 1% khối lượng carbomer 940, 2% khối lượng rượu benzylic (BA), 0,9% khối lượng trietanolamin, 0,2% khối lượng metylparaben, 0,05% khối lượng propylparaben (PP) và 100% khối lượng nước.

Theo các khía cạnh khác nữa, dược phẩm erythropoietin và dược phẩm fibronectin chứa erythropoietin với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01

đến 30% khối lượng, fibronectin với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50% khối lượng, glyxerol với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, carbomer 940 với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% khối lượng, rượu benzylic với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, trietanol amin với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, metylparaben với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, propylparaben với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng, và nước với lượng của bất kỳ giá trị nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100% khối lượng.

Do đó, các phương án của sáng chế bao gồm các dược phẩm tại chỗ để tăng cường sự hình thành mạch và chữa lành vết thương.

Cần phải hiểu rằng các dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp thực hành hiện tại khác chẳng hạn như, mà không bị giới hạn, liệu pháp ánh sáng/ánh (e.g., Derm an wand™ for Wound Care by National Biological Corp. Beachwood, Ohio) và liệu pháp siêu âm (xem ví dụ, U.S. Pat. số 6.960.173).

Người ta dự kiến rằng trong suốt thời gian của sáng chế bắt đầu từ ứng dụng này, sẽ phát triển được nhiều dược phẩm erythropoietin và dược phẩm fibronectin có liên quan và phạm vi của thuật ngữ các dược phẩm erythropoietin và các dược phẩm fibronectin được dự định bao gồm tất cả các công nghệ mới đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “khoảng” để chỉ 10%.

Các dược phẩm erythropoietin và fibronectin và các dược phẩm được mô tả trong US2014/0154205 A1 ("Erythropoietin And Fibronectin Compositions For Therapeutic And Cosmetic Applications") và trong US2010/0310626 A1 ("Erythropoietin And Fibronectin Compositions For Bone Regeneration"), nội dung trong các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được gồm để chứng minh các phương án thực hiện được ưu tiên của sáng chế. Nó nên được đánh giá cao bởi những người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật này trong đó các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ tiếp theo thể hiện các kỹ thuật được phát hiện bởi các tác giả để thực hiện tốt trong thực tiễn của sáng chế, và do đó có thể được cân nhắc để cấu thành các cách thức được ưu tiên với thực tiễn của

nó. Tuy nhiên, những người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong việc làm sáng tỏ bản mô tả, nên đánh giá đúng nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án thực hiện cụ thể được bộc lộ và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không tách khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Bốn con lợn trong đó hai con lợn bị DM và hai con lợn đối chứng, đã hoàn thành giai đoạn nghiên cứu 14 ngày. Hai con lợn bị tiểu đường có mức glucoza trong máu và hemoglobin glycosyl hóa cao hơn đáng kể và các khối lượng cơ thể thấp hơn hai con lợn đối chứng. Việc điều trị tại chỗ của các vết bỏng bằng các gel chứa chất dẫn thuốc, FN, EPO và EPO/FN đã không thay đổi (a) tế bào hồng cầu, tế bào bạch cầu, hoặc lượng tiểu cầu và các mức glucoza trong máu tăng ở các con lợn bệnh tiểu đường, và (b) các mức HbA1c và mức hemoglobin huyết trong các con lợn bệnh tiểu đường và đối chứng (bảng 1)

Bảng 1: Tác động của bệnh tiểu đường lên khối lượng cơ thể của lợn và việc điều trị vết thương tại chỗ về huyết học.

	Con lợn không bị bệnh tiểu đường (n=2)			Con lợn bị bệnh tiểu đường (n=2)		
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14
Trọng lượng cơ thể (kg)	68±3	73±4	78±4	54±3*	53±3*	52±3*
Mức gloza huyết (mg/dl)	109±8	99±10	102±7	587±123*	601±134*	569±187*
HbA1c (%)	5.1±0.3	4.9±0.3	5.0±0.3	5.3±0.4	5.2±0.4	5.5±0.4
Lượng RBC ($10^6/\mu l$)	7.2±0.4	6.9±0.3	7.4±0.5	6.8±0.4	6.6±0.5	7.0±0.7
Lượng bạch cầu ($10^3/\mu l$)	17.6±0.7	18.2±0.9	18.0±0.8	19.6±1.1	17.5±0.8	18.3±0.9
Lượng tiểu cầu ($10^3/\mu l$)	407±71	461±92	387±69	419±73	428±82	456±101
Các mức Hemoglobin (g/dl)	9.6±0.6	10.7±0.9	10.7±1.1	8.8±0.7	10.9±1.2	10.8±0.9

Các giá trị được biểu hiện như độ lệch chuẩn $\pm$, (n) là số lợn.

Ý nghĩa thống kê được xác định ở mức 5%. * $p < 0,05$ và là ý nghĩa của sự khác biệt trong nhóm giữa ngày 0, 7 và ngày 14, NS; không đáng kể; RBC, tế bào hồng cầu; HbA1c, hemoglobin được glycat.

EPO tại chỗ làm tăng băng bó vết thương và làm tăng lưu lượng máu trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường theo cách thức phụ thuộc liều dùng; hiệu quả được tăng bởi FN. Vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO, FN và EPO/FN được đóng nhanh hơn các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Sự khác biệt đáng kể nhất về tỷ lệ việc băng bó vết thương đã được phát hiện giữa các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị chất dẫn thuốc và được điều trị bằng EPO/FN từ ngày thứ 4 trở đi. Từ ngày thứ 4 trở đi, tỷ lệ băng bó vết thương của các vết thương được điều trị bằng EPO/FN nhanh hơn đáng kể với các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO và FN. Từ ngày thứ 9 trở đi, tỷ lệ băng bó vết thương của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO nhanh hơn các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng FN.

Tỷ lệ băng bó vết thương của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc là chậm hơn đáng kể so với các vết thương khỏe mạnh được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Các tỷ lệ băng bó vết thương của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO là phụ thuộc liều dùng. Tỷ lệ băng bó vết thương của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO liều cao là nhanh hơn đáng kể so với các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO liều thấp. Thêm vào đó, tỷ lệ băng bó vết thương của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO liều thấp là nhanh hơn đáng kể so với các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc liều thấp (Fig.1B).

Sự lưu lượng máu trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc ít hơn các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc từ ngày thứ hai trở đi. IT cũng phát hiện ra rằng sự lưu lượng máu trong vết thương do bệnh tiểu đường không khác biệt đáng kể với vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN, hai sự lưu lượng máu này cao hơn đáng kể so với sự lưu lượng máu trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc và được điều trị bằng FN (Fig.1C: Tấm bên phải). Sự lưu lượng máu trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO liều cao cao hơn đáng kể các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc từ ngày thứ 4 trở đi và các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO liều thấp từ ngày thứ 7 trở đi. Sự lưu lượng máu trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO liều

thấp cao hơn đáng kể các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc từ ngày thứ 9 trở đi (Fig.1D: Tấm bên phải).

FN tại chỗ không ảnh hưởng việc băng bó vết thương và lưu lượng máu trong da tái sinh của các vết thương không phải do bệnh tiểu đường. Các tỷ lệ băng bó vết thương và lưu lượng máu của các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc và FN ở các con lợn khỏe mạnh là rất giống nhau. Từ ngày thứ 4 trở đi, tỷ lệ băng bó vết thương và sự lưu lượng máu của các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO nhanh hơn đáng kể với các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc và FN. Đáng chú ý là, sự khác biệt đáng kể nhất trong các tỷ lệ băng bó vết thương và sự lưu lượng máu được phát hiện giữa các vết thương được điều trị bằng EPO/FN và các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc, FN và EPO ở các con lợn khỏe mạnh qua thời gian từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 11 (Fig.2A và 2B).

EPO tại chỗ làm tăng mật độ vi mạch (MVD) và các mức biểu hiện eNOS trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường và các hiệu quả này được tăng bởi FN. Các mức biểu hiện MVD và eNOS trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc là thấp hơn mức biểu hiện ở trên trong các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc (các Fig.3A-E). Việc điều trị FN tại chỗ trong 14 ngày không có ảnh hưởng đến các mức biểu hiện MVD và eNOS trong các vết thương do bệnh tiểu đường và không do bệnh tiểu đường (các Fig.3B-E). Mặt khác, việc điều trị EPO tại chỗ trong 14 ngày làm tăng đáng kể các mức biểu hiện MVD và eNOS trong các vết thương do bệnh tiểu đường và không do bệnh tiểu đường (các Fig.3B-E). Trong các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN, các mức biểu hiện MVD và eNOS không khác biệt đáng kể với mức biểu hiện ở trên trong các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO. Ngược lại, các mức biểu hiện MVD và eNOS của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN cao hơn đáng kể với các mức biểu hiện ở trên trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO.

EPO tại chỗ làm tăng lắng đọng collagen và tổng hợp axit hyaluronic (HA) trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường và các hiệu quả này được tăng bởi FN. Các lượng của hydroxyprolin (HP) và HA và các mức biểu hiện của hai synthaza HA, HAS1 và HAS2 trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc là thấp hơn mức biểu hiện ở trên trong các vết thương không do bệnh tiểu

được được điều trị bằng chất dẫn thuốc sau 14 ngày (các Fig.4A-G). Việc điều trị FN tại chỗ trong 14 ngày không làm thay đổi các lượng HP và HA và các mức biểu hiện HAS1 và HAS2 trong các vết thương do bệnh tiểu đường và không do bệnh tiểu đường (các Fig.4B-G). Mặt khác, việc điều trị EPO tại chỗ trong 14 ngày làm tăng đáng kể các lượng HP và HA và các mức biểu hiện HAS1 và HAS2 trong các vết thương do bệnh tiểu đường và không do bệnh tiểu đường (các Fig.4B-G). Lượng HP trong các vết thương không do bệnh tiểu đường và do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN cao hơn đáng kể so với các lượng HP trong các vết thương không do bệnh tiểu đường và do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO. Lượng HA và các mức biểu hiện HAS1 và HAS2 trong các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN là rất giống với lượng HA và các mức biểu hiện HAS1 và HAS2 của các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO. Ngược lại, lượng HA và các mức biểu hiện HAS1 và HAS2 của các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN cao hơn đáng kể với lượng HA và các mức biểu hiện HAS1 và HAS2 trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO (các Fig.4E & 4G).

Sự biểu hiện AQP3 bị giảm trong vết thương da không do bệnh tiểu đường. Các mức biểu hiện AQP3 trên da lợn bị bệnh tiểu đường không có vết thương thấp hơn so với mức biểu hiện AQP3 ở da lợn khỏe mạnh không có vết thương (các Fig.5A-D). Các mức biểu hiện protein AQP3 trên da lợn bị bệnh tiểu đường không có vết thương thấp hơn đáng kể so với mức biểu hiện protein AQP3 ở da lợn khỏe mạnh không có vết thương (các Fig.5E & 5G). Kết quả này cũng phản chiếu các mức biểu hiện mRNA AQP3. Các mức biểu hiện mRNA AQP3 trên da bị bệnh tiểu đường không có vết thương thấp hơn ($p < 0,01$) đáng kể so với mức biểu hiện mRNA AQP3 ở da lợn khỏe mạnh không có vết thương (Fig.5F).

EPO tại chỗ kích thích sự biểu hiện AQP3 trong da tái sinh của các vết thương do bệnh tiểu đường và FN làm tăng hiệu quả này. Sau 14 ngày, các mức biểu hiện mRNA AQP3 trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc là thấp hơn đáng kể mức biểu hiện mRNA AQP3 trong các vết thương không do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc (các Fig.6A-H). Theo các con lợn bị bệnh tiểu đường và các con lợn đối chứng, sự biểu hiện mRNA và protein AQP3 trong (a) các vết thương được điều trị bằng EPO cao hơn đáng kể so với các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc và FN, (b) các vết thương được điều trị bằng EPO/FN cao

hơn đáng kể so với các vết thương được điều trị bằng EPO, và (c) các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc và FN không khác nhau (các Fig.6A-6H).

Sự biểu hiện protein AQP3 tương ứng tích cực với sự kéo dài của sự hình thành mạch và các lượng HP và HA trong da tái sinh của các vết bỏng do bệnh tiểu đường. Sự tương quan của Pearson được sử dụng để khảo sát mối quan hệ giữa mức biểu hiện protein AQP3, mức độ hình thành mạch và lượng HP và HA trong các vết bỏng ở các con lợn khỏe mạnh và con lợn bị bệnh tiểu đường. Ở các con lợn khỏe mạnh và con lợn bị bệnh tiểu đường, mức độ biểu hiện protein AQP3 tương quan tích cực với mức độ hình thành mạch (Fig.7A & 7B), lượng HP (Fig.7C & 7D) và lượng HA (Fig.7E & 7F). Đáng chú ý là sự tương quan này có ý nghĩa mạnh đáng kể trong việc da tái sinh của các vết bỏng của các con lợn bị bệnh tiểu đường hơn so với được tìm thấy trong da tái sinh vết bỏng của các con heo khỏe mạnh.

Sự ức chế AQP3 làm giảm tác động của EPO lên tỷ lệ băng bó vết thương, kéo dài sự hình thành mạch, và các lượng HP và HA trong các vết bỏng do bệnh tiểu đường. Khi hoạt tính AQP3 bị chặn bởi HgCl₂, tỷ lệ băng bó vết thương của vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/HgCl₂ được giảm đáng kể (Fig.8A). Việc giảm tỷ lệ băng bó vết thương đi kèm với sự giảm lưu lượng máu (Fig.8B), mức biểu hiện eNOS thấp (Fig.8C), mức biểu hiện HAS1 và HAS2 thấp (Fig.8C), sự kéo dài sự hình thành mạch thấp (Fig.8D) lượng HP giảm (Fig.8E), và lượng HA giảm (Fig.8F). Hơn nữa, các tỷ lệ băng bó vết thương, các mức biểu hiện của eNOS, HAS1 và HAS2, và các lượng của HP và HA trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị EPO/HgCl₂ thấp hơn đáng kể so với các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO.

Sự biểu hiện AQP3 điều hòa ức chế glucoza cao trong các tế bào sừng và các nguyên bào sợi được lấy từ da người; và tác động này được tạo khối bởi EPO. Tỷ lệ tăng sinh của HEKCs và NHFCs mà được tiếp xúc với các mức glucoza cao (HG) trong 5 ngày thấp hơn các tế bào được tiếp xúc với các mức glucoza bình thường (NG) (các Fig.9A & 9B). Các mức biểu hiện AQP3 trong các tế bào tiếp xúc HG được xem là thấp hơn các tế bào tiếp xúc NG (các Fig.9C & 9D). Việc điều trị EPO đã phục hồi các mức biểu hiện AQP3 và tỷ lệ tăng sinh của các tế bào được ủ trong HG trong 5 ngày.

Phương pháp

Mô hình lợn của DM loại 1. Nghiên cứu bao gồm 4 con lợn cái khỏe mạnh 60 kg (*Sus domesticus*), được mua từ Viện Nghiên cứu Động vật Lahav (Kibbutz Lahav,

Israel). Lợn được chọn làm động vật thí nghiệm cho cuộc điều tra này vì việc chữa lành vết thương da ở lợn tương tự như ở người (Sullivan, 2001). Lợn được nuôi ở đồn điền trong một căn phòng có chu trình sáng/tối 12 giờ nhân tạo ở khoảng nhiệt độ không đổi ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) và độ ẩm tương đối ($55 \pm 10\%$). Các con lợn đã được thích nghi trong một tuần trước khi nghiên cứu, và đã được truy cập tự do vào thức ăn và nước phòng thí nghiệm chuẩn. Việc duy trì và phúc lợi của các con lợn tuân thủ (a) các hướng dẫn về phúc lợi động vật và điều trị động vật nhân tạo được mô tả trong "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", tái bản lần thứ 7, Nhà xuất bản Học viện Quốc gia, Washington DC, USA và (b) các hướng dẫn của Technion, phù hợp với luật pháp quốc gia của Israel về việc sử dụng động vật cho các mục đích thực nghiệm và các mục đích khoa học khác.

Việc gây mê DM, tạo vết thương, điều trị vết thương, thay đổi việc băng bó và thu thập dữ liệu được thực hiện bằng việc gây tê toàn thân bởi vì rất khó để làm sạch, điều trị và băng vết thương trên những con lợn có nhận thức mà không cố định. Gây tê toàn thân đã được gây ra bằng cách sử dụng propofol tiêm tĩnh mạch (5 mg/kg) và sau đó duy trì bằng cách sử dụng 5% isofluran ở 2:1 oxy/hỗn hợp oxit nitơ sau khi đặt nội khí quản vào. Ống thông tĩnh mạch được đặt cố định trong tĩnh mạch cổ bên phải dưới sự gây tê toàn thân ở 4 con lợn để lấy mẫu máu trong quá trình điều tra và truyền dịch trong khi bắt đầu điều trị bằng DM ở hai con lợn. Tỷ lệ nhịp tim và độ bão hòa oxy trong máu của lợn được gây mê đã được theo dõi bằng cách sử dụng phương pháp đo oxy không xâm lấn và nhiệt độ cơ thể của lợn được theo dõi bằng nhiệt kế trực tràng số. Sau tất cả các quy trình, lợn được phép hồi phục từ gây tê trên bàn mổ, rút nội khí quản và sau đó trở về đồn điền của chúng. Vào ngày 14, ngày cuối cùng của thí nghiệm, lợn đã được gây mê để thu thập dữ liệu và mẫu vật và sau đó bị giết bằng thuốc tiêm KC1 (2 mmol/kg, 40ml) và dùng quá liều isofluran (5%).

DM đã được gây ra ở hai con lợn theo quy trình được mô tả trước đây (Hara, 2008). Tóm lại, lợn được để đói qua đêm và sau đó được ngâm nước tiêm tĩnh mạch 0,9% NaCl (10 ml/kg/h) trong một giờ trước khi dùng streptozotocin (STZ, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA). STZ (200 mg/kg) đã được hòa tan trong 0,9% NaCl, và tiêm tĩnh mạch thông qua ống cấy truyền tĩnh mạch trong một phút. Mức glucoza trong máu được kiểm tra mỗi lần 15 phút trong vòng 6 giờ sau việc dùng STZ sử dụng đường kế (FreeStyle FREEDOM Lite, Abbot Diabetes Care Inc., Alameda, CA,

USA). Glucoza (50 g được hòa tan trong 100 ml nước) được truyền qua ven liên tục hoặc không liên tục trong suốt hai giờ đầu tiên sau khi dùng STZ sao cho tránh khỏi chứng giảm glucoza huyết nghiêm trọng mà có thể bị gây ra bởi sự tổn thương gây ra STZ của tế bào nội mô β . Mức glucoza trong máu được kiểm tra ít nhất 2 lần mỗi ngày bằng đường kế trong suốt giai đoạn nghiên cứu. Việc gây mê DM được xem là thành công khi các mức glucoza trong máu tương đương hoặc cao hơn 300mg/dl, 6 giờ sau khi dùng STZ và đã tồn tại trong giai đoạn nghiên cứu 14 ngày. Insulin tác dụng kéo dài (24 IU Lantus; Aventis Pharmaceuticals, Kansas City, Mo, USA) được tiêm trong ven để duy trì các mức glucoza trong máu nhanh của các con lợn giữa 300 đến 400 mg/dl.

Việc tạo ra các vết bỏng trên da dày một phần. DM được duy trì trong một tháng trước khi các vết bỏng da dày một phần được tạo ra trong điều kiện gây tê. Sau khi gây mê, lông của da lưng ở mỗi bên cột sống của mỗi con lợn được lấy đi bằng cách sử dụng kem làm rụng lông VEET (Reckitt Benckiser pic, Slough, Berkshire, Anh). Sau đó, da được làm sạch bằng nước và làm khô bằng các mô trước khi tạo ra vết bỏng trên bề mặt da dày 12cm² trên da lưng của lợn bằng kỹ thuật vô trùng. Các vết bỏng được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trước đó (Davis, 1990). Tóm lại, bốn thanh đồng bằng hình trụ, mỗi ống có đường kính 2.25 cm và nặng 358 g, được đặt trong nước nóng (92°C) trong hai phút. Bốn nhóm có sáu vết bỏng có độ dày một phần được tạo ra bằng cách đặt thanh vuông góc trên da của mỗi con lợn được gây mê trong 20 giây và không có áp lực bổ sung. Ở hai con lợn bị bệnh đái đường, nhóm bổ sung của 6 vết bỏng có độ dày đã được tạo ra. Trước khi sử dụng thanh nóng lên da, thanh đã được lau khô để tránh tạo hơi nước trên da khỏi những giọt nước bay hơi.

Các dược phẩm EPO cho điều trị vết thương tại chỗ. Sáu gel khác nhau để điều trị vết thương tại chỗ đã được chuẩn bị trong phòng thí nghiệm Remedor Biomed theo các khuyến cáo trong Dược điển Hoa Kỳ: (a) gel không chứa các thành phần hoạt tính (gel dẫn thuốc), (b) gel chứa 2000 IU/g EPO (EPO liều cao), (c) gel chứa 500 IU/g EPO (EPO liều thấp), (d) gel chứa 300 μ g/g FN, (e) gel chứa 2000 IU/g EPO và 300 μ g/g FN, và (f) gel chứa 0,1 mM HgCl₂ và 2000IU/g EPO. EPO tái tổ hợp ở người được mua như là thuốc tiêm (EPREX® 40,000IU, Janssen Cilag Bucks, UK). FN được mua như 1 mg/ml dung dịch (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). HgCl₂ (0.1mM) được đưa vào gel chứa 2000 IU/g EPO để tạo khối hoạt động AQP3 trong da (kiểm soát âm) và được mua từ Sigma (Sigma-Aldrich, USA). Kết quả thử nghiệm về độ ổn định

của gel thiết lập rằng EPO và FN ổn định trong gel trong ít nhất 3 tháng ở 4°C, được xác định bởi ELISA.

Dược phẩm theo công thức của dược phẩm được dùng trong các ví dụ

Tên chất	% trọng lượng	Chi tiết (nhà cung cấp)
Erythropoietin (EPO)	5	JANSSEN-CILAG, EPREX 40000IU
Fibronectin (FN)	30	Probe International Inc
Glyxerol	5	Merck
Carbomer 940	1	Spectrum
Rượu benzylic (BA)	2	Merck
Trietanolamin	~0,9	Merck
Metylparaben (MP)	0,2	Merck
Propylparaben (PP)	0,05	Merck
Nước (WFI)	QS 100%	
Tổng	100,0	

Phương pháp điều chế theo dược phẩm. Dược phẩm được điều chế như sau:

1. Metylparaben (MP) và Propylparaben (PP) được cân vào cốc thủy tinh và hòa tan trong Glixerol và rượu benzylic (BA).

2. 1/3 kích cỡ mẻ được bổ sung và khuấy ở 60°C trong 30 phút, bằng cách sử dụng tấm nhiệt và máy trộn trên.

3. Hỗn hợp được làm mát bằng cách khuấy lên đến 30°C.

4. Thêm lượng yêu cầu của Carbomer 940 chậm trong khi khuấy mà không đun nóng/

5. Thêm EPO vào hỗn hợp và trộn trong 10 phút.

6. Thêm FN vào hỗn hợp và trộn trong 10 phút.

7. Điều chỉnh pH tới $6,5 \pm 0,3$ bằng cách bổ sung đủ lượng Trietanolamin.

8. Thêm đủ lượng WFI để có được khối lượng yêu cầu.

9. Trộn trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Dạng điều chế của mẻ được ưu tiên của gel dùng tại chỗ Carbopol 940 3000IU/gr (gram) Erythropoietin (EPO) & 300µg/gr (gam) Fibronectin (FN)

Các thành phần	Đối với 100 gr (grams)
	Kích thước mẻ
EPO	*300000/BA

FN (1,0 mg/ml)	30 gr (grams)
Rượu benzylic	2 gr (grams)
Glyxerin	5 gr (grams)
Carbomer 940p	1 gr (grams)
Trietanolamin	Qs ml (~0,9 gr (grams))
Metylparaben	200 mg
Propylparaben	50 mg
Nước	Qs 100gr (grams)

* Theo kết quả hoạt tính sinh học (Từ thử nghiệm CoA hoặc thử nghiệm đi đến)

BA= hoạt tính sinh học (IU/ml)

Khối lượng = 300000/X

Phương pháp điều chế Lượng yêu cầu của mỗi thành phần đối với tổng lượng được điều chế. Mỗi thành phần được cân chính xác. Tổng lượng của metylparaben và propylparaben được trộn với glyxerin và rượu benzylic. Khoảng 40 gram nước được bổ sung vào hỗn hợp và hỗn hợp được trộn đều trong 30 phút và lên tới 60°C. Carbopol 940p được rắc từ từ vào hỗn hợp được trộn nhanh và trộn đều ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, tất cả EPO trong hỗn hợp được trộn đều trong 10 phút. Sau đó, tất cả FN được bổ sung vào hỗn hợp được trộn đều trong 10 phút. Bổ sung đầy đủ trietanolamin vào hỗn hợp sau đó trộn cho đến khi đạt được độ nhớt mong muốn, sau khi xác nhận không có khối Carbopol 940p trong hỗn hợp. Bổ sung đầy đủ nước và tổng lượng 100gr (gram), và hỗn hợp được trộn đều. Sau đó, gel được đóng gói trong lọ Eppendor cho mỗi gel. Sau đó dán nhãn lên các lọ với số mề, ngày điều chế, ngày dạng điều chế và điều kiện lưu trữ. Mẫu 30gr (gram) gel đã được dùng để kiểm tra độ ổn định và thử nghiệm vi sinh và phân bố như sau: a. 20 gr(gram) ở nhiệt độ 4°C cho các thử nghiệm Elisa b. 10 gram ở nhiệt độ 4°C cho các thử nghiệm vi sinh

Điều trị vết thương bằng các dược phẩm EPO dùng tại chỗ khác nhau. Mỗi nhóm trong sáu vết bỏng có độ dày một phần được phân ngẫu nhiên để được điều trị bằng một trong số những loại gel dùng tại chỗ sau đây: gel chứa chất dẫn thuốc, gel chứa EPO liều cao, gel chứa FN, và gel chứa EPO/FN. Nhóm bổ sung của các vết bỏng trên một con lợn bệnh tiểu đường được điều trị bằng gel chứa EPO/HgCl₂ và nhóm bổ sung của vết bỏng trên con lợn bệnh tiểu đường thứ hai được điều trị bằng gel chứa EPO liều thấp

(EPO liều thấp) Gel (3g) được bôi tại chỗ cho từng vết thương mỗi lần hai ngày trong giai đoạn nghiên cứu 14 ngày. Để ngăn chặn việc loại bỏ gel sau khi cọ xát và để bảo vệ vết bỏng giữa các phương pháp điều trị, các vết thương đã được điều trị được phủ bằng miếng gạc không dính, đã được cố định bằng băng dính co giãn Tensoplast (Smith & Nephew, London, UK). Các thuốc giảm đau và kháng sinh sau khi mổ không được dùng vì các thuốc này có thể ảnh hưởng đến quá trình chữa bệnh, và do đó làm nhầm lẫn việc giải thích dữ liệu.

Các thông số nghiên cứu. Mỗi con lợn được cân ở thời điểm đầu và cuối của giai đoạn nghiên cứu 14 ngày, cũng như trong giai đoạn nghiên cứu. Vào mỗi ngày điều trị, mỗi vết thương được chụp bằng máy ảnh số 12 megapixel (Olympus, Styles Tough, Tokyo, Japan), và một mẫu máu được thu thập để xác định hồng cầu, bạch cầu và số lượng tiểu cầu và lượng hemoglobin huyết tương và lượng HbA1c. Lấy mẫu sinh thiết từ vùng được chọn ngẫu nhiên của da tái sinh của vết bỏng đã được điều trị và được điều trị bằng chất dẫn thuốc và da không bị thương của các con lợn bệnh tiểu đường và không bệnh tiểu đường đã được thu thập vào ngày thứ 2, ngày thứ 7 và ngày thứ 14 bằng lưỡi tròn 6 mm. Các mẫu của mỗi mẫu sinh thiết đã được cố định ngay lập tức trong 10% formalin đệm trung tính để xác định mô học của MVD (xem chi tiết sau) hoặc được lưu trữ trong nitơ lỏng để xác định hàm lượng protein bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch học, phân tích western blot, ELISA và PCR (xem chi tiết sau).

Xác định tỷ lệ băng bó vết thương. Tỷ lệ băng bó vết thương được tính từ diện tích mô tái biểu hiện trên vết bỏng. Để tính tỷ lệ này, diện tích của mỗi vết bỏng được phân thành ba khu vực (a) vùng vảy, nơi da bị bỏng trở thành lớp vảy cứng sau khi tạo ra thương tích do bỏng, (b) vùng đỏ nơi có thể tách rời vảy nhưng không có tế bào biểu mô, và (c) vùng trắng có thể tách rời vết sẹo và có các tế bào biểu mô mới. Tỷ lệ băng bó vết thương được tính bằng cách đo vùng trắng vào ngày thứ 2, 4, 7, 9, 11, và 14 khi vết thương được điều trị và băng đã được thay. Với mục đích này, giấy trong suốt được đặt trên mỗi vết thương, và hình dạng của vùng trắng đã được kéo ra trên giấy. Sau đó, giấy trong suốt được chồng lên giấy đồ thị 1mm² để đo vùng trắng trong vết thương. Thay đổi theo thời gian trong kích thước của tỷ lệ trắng được tính bằng công thức sau:

$$\% \text{ Vùng trắng (đóng vết thương)} = \frac{\text{Vùng trắng ở ngày thứ X}}{\text{Vùng vết thương ở ngày 0}} \times 100$$

Tất cả các phép đo của vùng trắng được thực hiện bởi ba người kiểm tra không tìm thấy phương thức điều trị.

Xác định lưu lượng máu trên các vết bỏng. Lưu lượng máu trong các vết thương được đo không xâm lấn bằng hệ thống ảnh truyền dịch Doppler lazer (Peri Scan PIM 2 System, Perimed, Stockholm, Thụy Điển) vào thời gian đầu và kết thúc giai đoạn nghiên cứu 14 ngày và trong suốt giai đoạn nghiên cứu. Việc quét vết thương được thực hiện ở các cài đặt sau: bước sóng lazer 670 nm (nhìn thấy màu đỏ), khoảng cách từ các vết bỏng - 25 cm, độ phân giải quét - 256 x 64 pixel, và thời gian quét - 180 giây. Đầu dò của máy quét được đặt vuông góc với da để tránh sự phản xạ của tia lazer từ các vùng không hợp lệ, như được đề xuất trong hướng dẫn của thiết bị. Đối với mỗi vết bỏng, thông số truyền dịch, chỉ số truyền dịch Doppler lazer có tỷ lệ tuyến tính với sự lan truyền mô, được tính toán từ sự phản xạ của chùm tia lazer từ sự di chuyển hồng cầu. Sự truyền dịch trong vùng được quan tâm (ROI) được đo bằng thang sáu màu, trong đó màu xanh đậm miêu tả tốc độ truyền dịch thấp nhất và màu đỏ tượng trưng tốc độ truyền dịch nhanh nhất bằng phần mềm PIMSoft đối với hình ảnh truyền máu (Lisca Development AB, Linkoping, Sweden) Đối với mỗi vết bỏng, ROI là vòng tròn 12 cm² được vẽ xung quanh vết bỏng ban đầu và lưu lượng máu trong vết thương là giá trị trung bình của tất cả các màu trong ROI.

Xác định mức độ sự hình thành mạch trong da tái sinh của các mô vết bỏng. CD31 là phân tử bám dính được biểu hiện bằng các tế bào nội mạc mạch máu và được sử dụng rộng rãi như là một dấu hiệu để chứng minh sự có mặt của các tế bào nội mô và các mao mạch mới được hình thành trong các mô. Chất đánh dấu này được sử dụng để xác định MVD và mức độ sự hình thành mạch trong da tái sinh của vết thương lành lại. Đối với mục đích này, các phần dày 5µm của các mẫu được duy trì bằng formalin đậm các sinh thiết của vết thương, được thu thập trong các ngày thứ 2, 7, và 14, đã được chuẩn bị và gắn trên các mặt nạ thủy tinh để nhuộm CD31. Tóm lại, các mẫu được nhúng trong các khối paraffin, được khử sắt bằng cách sử dụng xylen, được thẩm thấu trong một loạt các dung dịch propanol được phân loại (100-0%) trong nước khử trùng đôi (ddH₂O) và sau đó được ngâm trong nước muối đệm Tris (TBS độ pH 7,5) trong năm phút. Sau khi điều trị bằng TBS, peroxidaza nội sinh trong các phần đã được tạo khối bằng cách nhúng các mặt trong 3% dung dịch hydro peroxi /metanol trong 20 phút. Sau đó các mặt được rửa bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và ngâm trong 10 mM dung

dịch đệm xitrat (độ pH là 6,0) ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút để lộ ra kháng nguyên bằng việc làm nóng bằng lò vi sóng. Các mặt đầu tiên được tạo khối bởi huyết thanh dê bình thường 1: 50 (Sigma) trong 30 phút để loại bỏ việc nhuộm không đặc hiệu của kháng nguyên, được rửa trong PBS, và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối với kháng thể CD31 1: 100 (R & D Systems, MN, USA). Sau khi ủ qua đêm, các mặt này được rửa bằng PBS và được chà lại bằng hematoxylin của Mayer (Sigma) trong 10 giây trước khi dùng 1% axit axetic để phân biệt phần mô và rửa dưới vòi nước đang chảy. Các mặt đã được kiểm tra dưới kính hiển vi Nikon Eclipse E800 thẳng đứng và các hình ảnh của các phần được chụp và được phân tích bằng phần mềm phân tích hình ảnh Metamorph® (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Số lượng các mao mạch trong da tái sinh ở mỗi vết thương được tính bằng năm lĩnh vực hiển vi ngẫu nhiên (phóng đại x200) bởi ba người nghiên cứu chạy ấu làm phương pháp điều trị.

Phát hiện AQP3 trong da tái sinh của các mô vết bỏng. AQP3 được phát hiện trên da heo khỏe mạnh khôn có vết thương và da heo bệnh tiểu đường, một tháng sau khi gây mê DM và một ngày trước khi tạo ra các vết bỏng và trong da tái sinh của các vết thương trong giai đoạn nghiên cứu 14 ngày bằng phương pháp hóa mô miễn dịch và miễn dịch huỳnh quang. Đối với hóa mô miễn dịch AQP3, các phần dày 5 µm từ các mẫu vật được lấy từ da lợn không bị bệnh tiểu đường không có vết thương và da lợn bị bệnh tiểu đường và ngày thứ 2, 7, và 14 từ da tái sinh trong giai đoạn nghiên cứu 14 ngày đã được chuẩn bị và gắn kết trên các mặt nạ thủy tinh theo cách giống nhau đã được mô tả để nhuộm CD31. Các phần này bị chặn đầu tiên với 1: 50 huyết thanh dê (Sigma) trong 30 phút, rửa nhẹ bằng PBS, và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối với 1: 200 kháng thể chính AQP3 đa dòng (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Sau khi ủ qua đêm, các tráng được rửa sạch bằng PBS và ủ với 1 kháng thể phụ IgG được biotin hóa (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Sau khi ủ, các phần được rửa nhẹ bằng PBS và được ủ bằng streptavidin peroxidaza (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Phát hiện kháng nguyên được tạo điều kiện bằng cách sử dụng S- (2-aminoethyl) -l-cystein (AEC/RED, Invitrogen Corp. Camarillo, CA, USA) làm chất nền, cho đến khi phát hiện tín hiệu màu. Sau đó, các sản phẩm được rửa ngay bằng PBS và nghiền lại với dung dịch hematoxylin của Mayer (Sigma) trong 10 giây trước khi dùng 1% axit axetic trong PBS để phân biệt các phần

mô. Sau đó, các phần này được rửa sạch bằng nước ở vòi đang chảy và, khử nước trong các etanol được phân cấp trong năm phút trước khi chúng được gắn kết với Immu-Mount (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA). Hình ảnh của các phần đã được phân tích bằng phần mềm phân tích hình ảnh Metamorph®, như đã mô tả trước đó.

Để xác nhận sự có mặt của AQP3 bằng cách miễn dịch huỳnh quang trong da lợn khỏe mạnh không có vết thương và da lợn bị bệnh tiểu đường và trong da tái sinh của vết thương, một bộ các phần parafin được khử paraffin hóa được ủ với 1: 100 kháng thể AQP3 đa dòng ở thỏ (Santa Cruz) qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi ủ, các mặt được rửa nhẹ bằng nước vòi, được ủ với với kháng thể phụ IgG kết hợp rhodamin 1: 200 (Jackson ImmunoResearch) trong 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng, và sau đó được phản chất nhuộm với vết ố hạt nhân, TOPRO-3 (Invitrogen) trong 30 phút. Khi kết thúc quá trình ủ TOPRO-3, các mặt đã được kiểm tra dưới kính hiển vi đồng tụ (Bio-Rad MRC 1024, CA, USA) sau khi rửa nhẹ trong PBS. Hình ảnh của các phần đã được phân tích bằng phần mềm phân tích hình ảnh Metamorph®, như đã mô tả trước đó.

Phát hiện collagen trong da tái sinh của các mô vết bỏng. Lượng collagen trong da tái sinh được xác định bằng mẫu đã được thu thập trong các ngày thứ 2, 7, và 14 sau khi nhuộm tricrom của Masson (Sigma-Aldrich) của một số phần dày 5 µm đã được chuẩn bị cho việc nhuộm miễn dịch CD31 và AQP3. Sử dụng phương pháp này, các sợi collagen được nhuộm màu xanh da trời, nhân được nhuộm màu đen, tế bào chất và các sợi cơ được nhuộm màu đỏ. Hình ảnh của các phần đã được phân tích bằng phần mềm phân tích hình ảnh Metamorph®, như đã mô tả trước đó.

Xác định lượng collagen trong da tái sinh của các mô vết bỏng. Hydroxyprolin (HP) là thành phần axit amin của collagen loại I và thường được sử dụng làm chất đánh dấu collagen, do đó, lượng HP trong mẫu da được lấy từ con lợn khỏe mạnh và con lợn bệnh tiểu đường vào các ngày thứ 2, 7, và 14 đã được sử dụng như một chỉ số về lượng collagen trong da tái sinh của vết thương. Vì mục đích này, các mẫu da 100 mg đã được đồng nhất trong PBS chứa hỗn hợp chất ức chế proteaza (Sigma-Aldrich, MO, USA) sử dụng chất đồng hóa mô (HG-300, MRC, Hoi on, Israel). Các chất đồng nhất đầu tiên được ly tâm tại 1500g trong năm phút ở nhiệt độ 4°C. Các dịch nổi được thu thập, được lọc qua giấy lọc Whatman Grade 540 (Sigma-Aldrich), được thủy phân trong HCl, và sau đó pha loãng với nước khử ion. Các ước số (2 µm) của dung dịch pha loãng trước tiên được trộn với dung dịch cloamin-T trước khi thêm p-dimetyl-amino-benzaldehyt,

sử dụng một quy trình được mô tả trước đây (Hamed, 2009). Các ước số (150 μ m) của dung dịch thu được sau đó được chuyển sang tấm vi thể, và sự hấp thụ của mỗi mẫu được đo bằng một đầu đọc vi tấm huỳnh quang tại 557 nm. Kết quả được biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm trung bình của các phép đo lượng HP trong các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc ở các con lợn khỏe mạnh (100%).

Xác định lượng HA trong da tái sinh của các mô vết bỏng. Kể từ khi HA được liên kết với sức chịu và độ ẩm của da, lượng HA trong da tái sinh của các mô vết bỏng được xác định trong mẫu đã được lấy từ những con lợn không bị bệnh tiểu đường và con lợn bị bệnh tiểu đường vào các ngày thứ 2, 7, và 14 bằng cách sử dụng Hyaluronan Quantikine ELISA Kit (R & D Systems) theo quy trình của nhà sản xuất. Tóm lại, các ước số (150 μ m) của các dung dịch pha loãng tương tự được chuẩn bị để xác định lượng HA trong da tái sinh của các vết bỏng được chuyển vào tấm vi thể. Sự hấp thụ của mỗi mẫu sau đó được đo bằng đầu đọc vi tấm huỳnh quang ở bước sóng 450 nm với sự hiệu chỉnh bước sóng là 570 nm. Kết quả được biểu hiện bằng tỷ lệ phần trăm trung bình của các phép đo lượng HA trong các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc ở các con lợn khỏe mạnh (100%).

Xác định các mức biểu hiện AQP3, eNOS, và HAS1, và HAS 2 trong da tái sinh của các mô vết bỏng bằng phương pháp Western blot. Kể từ khi biểu hiện AQP3 trong da tái sinh được liên kết với sự hydrat hóa trên da, ảnh hưởng của EPO trên AQP3 và sự hydrat hóa tế bào trong tầng vết bỏng đã được kiểm tra bởi vì AQP3 tạo điều kiện thuận lợi cho nước xâm nhập vào tế bào. Vì HA được liên kết với và độ ẩm của da, ảnh hưởng của EPO lên sự biểu hiện HAS2 và HAS2 đã được kiểm tra bởi vì HA là một phân tử quan trọng liên quan đến độ ẩm da và được tổng hợp bởi HAS1 và HAS2. Vì sự hình thành mạch trong da tái sinh, ảnh hưởng của EPO đối với sự biểu hiện eNOS đã được kiểm tra bởi vì eNOS là isoform NOS ưu tiên và mức biểu hiện của nó cho thấy mức độ sự hình thành mạch. Các mức biểu hiện của AQP3, eNOS, HAS1 và HAS2 được xác định trong da tái sinh của các mô vết bỏng đã được thu thập từ lợn khỏe mạnh và lợn bị bệnh tiểu đường vào ngày thứ 14. Tóm lại, các mẫu trước tiên được đồng nhất trong PBS chứa hỗn hợp chất ức chế Proteaza (Roche Applied Science) và sau đó được ly giải trong chất đệm RIPA. Phép điện di gel SDS-polyacrylamit được sử dụng để tách các protein trong các mẫu protein 40g của lysat. Sau đó, các protein tách ra đã được chuyển sang các màng nitroxenluloza trước tiên được ủ qua đêm với kháng thể AQP3

da dòng 1: 100, kháng thể eNOS đơn dòng 1: 150, một kháng thể HAS1 1: 100 và kháng thể HAS2 2: 100 (tất cả mua từ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C, và sau đó được ủ với kháng thể phụ IgG liên hợp peroxidaza (HRP) của cây cải ngựa (Jackson ImmunoResearch, Europe) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. a-Actin (Santa Cruz) được sử dụng để bình thường hoá lượng protein. Các mức biểu hiện protein được phát hiện bằng phép đo tỷ trọng sử dụng hệ thống phát hiện chemiluminescence HRP của Bio-Rad Immun-Star (Bio-Rad, USA). Kết quả được biểu hiện bằng phần trăm mức protein trung bình của các lần đọc trong các vết thương được điều trị bằng chất dẫn thuốc ở các con lợn khỏe mạnh (100%).

PCR thời gian thực (RT) để định lượng mức độ mRNA AQP3. RT-PCR đã được sử dụng để kiểm tra xem ảnh hưởng của EPO đối với sự biểu hiện AQP3 là do ảnh hưởng của nó lên gen AQP3. Các mẫu của da tái sinh từ các mô vết bỏng của các con lợn khỏe mạnh và con lợn bị bệnh tiểu đường vào ngày thứ 14 và được đồng nhất trong PBS. Tổng ARN đã được chiết xuất từ homogenat bằng cách sử dụng bộ tinh khiết ARN MasterPure (EPICENTER Biotechnologies, Madison, WI, USA). Đối với mỗi mẫu, xấp xỉ 2 µm ARN, đã được sao chép bằng ba thanh trùng sử dụng các chất phản ứng chuyển mã ngược hoàn toàn QPCR và bộ sao chép ngược Verso cADN, cả hai đều được mua từ ABgene, Anh. Định lượng biểu hiện gen AQP3 trong các mẫu da tái sinh được thực hiện bằng phương pháp RT-PCR bằng cách sử dụng SYBR Green PCR Master Mix (Molecular Probes, Eugene, OR) trong Rotor-Gene 6000 Cyclers (Corbett Life Science, Sydney, Australia). Phương pháp dựa trên đường cong chuẩn được sử dụng để đánh giá hiệu quả PCR và sự biến đổi nội suy. Các điều kiện chu kỳ nhiệt là một chu kỳ (10 phút @ 95°C), tiếp theo là 40 chu kỳ (30 giây @ 95°C, 1 phút @ 60°C và 30 giây @ 72°C), tiếp theo là một chu kỳ (1 phút @ 95°C, 30 giây @ 55°C và 30 giây @ 95°C). Phương pháp 2^{-ΔΔCT} đã được sử dụng để phân tích sự thay đổi tương đối trong biểu hiện gen AQP3 trong các mẫu mô đã được điều trị, được điều trị bằng chất dẫn thuốc và không được điều trị, được lấy từ các vết thương không bị bệnh tiểu đường và bị bệnh tiểu đường. Kết quả được biểu hiện bằng sự thay đổi phần trăm từ sự kiểm soát sau khi bình thường hóa thành gen tham chiếu nội sinh (glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza; GAPDH).

Nuôi cấy tế bào: Các tế bào sừng biểu bì ở người chính (HEKCs) và nguyên bào sợi ở người chính (NHFCs), cả hai được lấy từ bao da trước sinh (Cell Systems,

Kirkland, WA, USA), biểu hiện AQP3. Hai loại tế bào đã được nhân giống riêng trên các bình chứa được phủ collagen loại 1 trong môi trường CSC (Hệ thống Tế bào) đã được bổ sung 10% huyết thanh bò thai nhi (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin và 2 µg/ml amphotericin. Khả năng của chúng là tăng sinh khi có mặt nồng độ NG (5 mmol/ml D-glucoza) và nồng độ HG (30 mmol/ml D-glucoza) và EPO (100 R7/ml) được xác định vì AQP3 được cho là cần thiết cho sự tăng sinh của chúng. Với mục đích này, trước tiên các tế bào được thu hoạch, chuyển tới các giếng (100000 tế bào/giếng) của tấm 24 giếng được phủ collagen loại 1 có chứa môi trường CSC với 10% FBS, và sau đó tiếp xúc với nồng độ HG có hoặc không có EPO (100 IU/ml) trong năm ngày trong buồng ủ được giữ ẩm ở 5% CO₂ và 37°C. Sau năm ngày, sự tăng sinh của HEKCs và HFCs được đo bằng thử nghiệm MTT (Sigma) theo quy trình của nhà sản xuất. Ba lần lặp lại thử nghiệm đã được thực hiện và kết quả được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) về tỷ lệ tăng sinh của các tế bào không được điều trị đối chứng (100%). Chiết xuất protein của hai loại tế bào đã được chuẩn bị để xác định các mức biểu hiện AQP3 bằng việc sử dụng phân tích western blot, như đã mô tả trước đó. Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang đã được sử dụng để nằm trên AQP3 trong sự gắn kết HEKCs và FFCs. Với mục đích này, trước tiên các tế bào được cố định bằng paraformaldehyt 2%, sau đó ủ với kháng thể AQP3 đa dòng ở tỷ lệ 1: 100 (Santa Cruz) ở nhiệt độ 4°C trong hai giờ. Sau khi ủ, các tế bào được rửa nhẹ trong PBS trước khi ủ chúng với kháng thể phụ IgG được kết hợp với rhodamin 1:200 (Jackson ImmunoResearch) trong 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Sau đó, nhân của các tế bào sau đó được phản chất nhuộm với TOPRO-3 (Invitrogen) trong 30 phút. Sau khi phản chất nhuộm với TOPRO-3, tế bào được rửa nhẹ trong PBS và sau đó được kiểm tra dưới kính hiển vi cùng tiêu điểm (Bio-Rad MRC 1024, CA, USA). Hình ảnh của các tế bào nhuộm đã được phân tích bằng phần mềm phân tích hình ảnh Metamorph®, như đã mô tả trước đó.

Thống kê tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình thống kê trên máy vi tính (GraphPad Prism phiên bản 5.0, GraphPad Software Inc, CA, USA) và tất cả các dữ liệu được trình bày là trung bình hoặc tỷ lệ phần trăm $\pm$ SD. Ý nghĩa thống kê được xác định ở mức 5%. Thử nghiệm t của hai sinh viên cụ thể đã được sử dụng để so sánh các thông số nghiên cứu của lợn khỏe mạnh và bị bệnh tiêu đường và ANOVA hai chiều với sự điều chỉnh của Bonferroni để kiểm soát lỗi loại I đã

được sử dụng để so sánh nhiều lần. Hệ số tương quan của Pearson được sử dụng để xác định mối quan hệ giữa sự biểu hiện protein AQP3 và (a) sự hình thành mạch được thể hiện bởi MVD, (b) hàm lượng collagen được thể hiện bằng lượng FIP, và (c) HA trong da tái sinh của các mô vết bỏng. Tỷ lệ băng bó vết thương giữa các nhóm được so sánh và phân tích bằng cách sử dụng ANOVA một chiều với thử nghiệm sau của Tukey và ANOVA hai chiều với sự điều chỉnh của Bonferroni để kiểm soát lỗi loại I trong các so sánh nhiều lần. Dữ liệu từ những con lợn khỏe mạnh và con lợn bị bệnh tiểu đường đã được so sánh bằng cách sử dụng thử nghiệm t của hai sinh viên cụ thể.

Thảo luận Sự chữa lành của DSU bị trì hoãn vì sự hình thành mạch bị suy giảm, giảm hoạt động của tế bào da và tăng đáp ứng viêm. Do đó, vết thương mạn tính phát triển, và trong trường hợp nặng, tổn thương chân tay có thể xảy ra. Trước đây, có báo cáo cho rằng EPO tại chỗ làm tăng khả năng chữa lành toàn bộ vết thương trên da của chuột và chuột bị tiểu đường thông qua một số cơ chế bao gồm (a) kích thích sự hình thành mạch, (b) tăng sự lắng đọng collagen, (c) ngăn chặn đáp ứng viêm, và (d) giảm quá trình chết tế bào ở vết thương (10, 11) (Hamed, 2010; 2011). Một cơ chế mới đã được phát hiện bằng cách sử dụng EPO tại chỗ thúc đẩy việc chữa lành vết thương trên da do bệnh tiểu đường: dùng EPO tại chỗ làm tăng biểu hiện AQP3 trong vết thương của các con lợn khỏe mạnh và lợn bị bệnh tiểu đường.

Nâng cao các mức biểu hiện AQP3 trong vết bỏng của lợn bệnh tiểu đường sau khi điều trị EPO tại chỗ phản ánh hiệu quả tích cực của EPO đối với sự hình thành mạch và lượng HP và HA và kết quả là băng bó vết thương đã tăng. Kể từ khi các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng sự biểu hiện AQP3 được giảm ở da lợn bị bệnh tiểu đường không có vết thương, các tác giả sáng chế cho rằng mức độ thấp của AQP3 trong tế bào, ít nhất là một phần, không chữa lành được DSU. Hơn nữa, cũng phát hiện ra rằng (a) mức biểu hiện AQP3 thấp hơn ở các tế bào sừng và nguyên bào sợi được điều trị bằng HG so với các tế bào sừng và nguyên bào sợi được điều trị bằng NG và (b) khả năng sinh ra các tế bào sừng và các nguyên bào sợi được điều trị bằng HG ít hơn các tế bào sừng và nguyên bào sợi được điều trị bằng NG. Điều thú vị là, điều trị bằng EPO có thể ngăn chặn tác động tiêu cực này của HG đối với các tế bào sừng và nguyên bào sợi. Những phát hiện này hàm ý rằng mức HG làm giảm biểu hiện AQP3 trong tế bào da và cung cấp sự chứng thực in vitro cho kết quả thử nghiệm của các tác giả sáng chế trên da của lợn bị DM.

Đây là những cơ chế có thể giải thích; tác giả sáng chế không có ý định bị ràng buộc bởi các lý thuyết như vậy.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy mức biểu hiện AQP3 có liên quan đến tỷ lệ băng bó vết thương trên vết thương trên da do bệnh tiểu đường. Một chứng cứ ngày càng tăng cơ thể cho thấy sự thiếu AQP3 trong da tái sinh của DSU làm giảm sự di cư và tăng sinh tế bào biểu mô và làm giảm tái biểu hiện và làm chậm lại việc chữa lành vết thương (Levin, 2006, Sigomoto, 2012). Tác giả sáng chế đã báo cáo rằng sự di cư tế bào, sự tăng sinh, sự tái biểu hiện tế bào biểu mô giác mạc được kích thích bởi AQP3 (Levin, 2006). Đã có báo cáo rằng việc biểu hiện điều hòa ức chế của các AQP có thể là nguyên nhân dẫn đến việc giảm khả năng tập trung tiết liệu trong suy thận cấp tính chứng thiếu máu cục bộ và EPO có thể ngăn quá trình điều hòa ức chế này (Gong, 2004). Theo đó, đã đặt ra rằng kích thích biểu hiện AQP3 tại chỗ trong DSU bằng EPO có thể làm tăng quá trình chữa lành vết thương. Kết quả của nghiên cứu này cung cấp bằng chứng hỗ trợ giả thuyết của các tác giả sáng chế rằng việc điều trị EPO tại chỗ đối với thương tích do bỏng ở da lợn bệnh tiểu đường nhanh chóng làm lành vết thương thông qua cơ chế phụ thuộc AQP3 bằng việc kích thích sự hình thành mạch và sản xuất ECM. Các kết quả của nghiên cứu này cũng cung cấp bằng chứng rằng kích thích biểu hiện AQP3 trong vết loét chữa chữa lành bởi EPO tiếp tục đẩy nhanh quá trình chữa lành bằng cách tăng cường độ hydrat hóa tế bào và làm tăng độ ẩm của vết thương. Tăng cường độ hydrat hóa tế bào và tăng độ ẩm tạo ra sự tương tác giữa các loại tế bào khác nhau và các thành phần ECM. Tương tác như vậy dẫn đến vận động di chuyển tế bào, di cư và sự biệt hóa, và cuối cùng là khôi phục lại da nguyên vẹn.

Sự hình thành mạch, tổng hợp các thành phần ECM như collagen và HA, và sự hydrat hóa tế bào thích hợp trên vết thương là cần thiết cho việc chữa lành vết thương bình thường. EPO kích thích tăng sinh tế bào nội mô và tiết xytokin tạo mạch và các yếu tố tăng trưởng như yếu tố tăng trưởng nội mô mạch, yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi và yếu tố tăng trưởng giống insulin 1 từ các tế bào nội mô và các tế bào sừng, gây ra sự nảy mầm của các mạch máu mới vào tầng vết thương (Anagnostou, 1990). Trong quá trình điều tra này, tác giả sáng chế nhận thấy rằng việc điều trị vết thương bằng EPO tại chỗ làm tăng đáng kể lưu lượng máu trong da tái sinh của vết bỏng do bệnh tiểu đường được đo bằng phương pháp quét Doppler lazer. Hiệu quả này đã được khẳng định khi đo các mức biểu hiện của MVD và eNOS trong da tái sinh của vết bỏng do bệnh tiểu đường:

các mức biểu hiện của MVD và eNOS trong da tái sinh của các vết bỏng do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO đã cao hơn so với ở những vùng da tái sinh của vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Việc điều trị bằng EPO tại chỗ cũng làm tăng đáng kể lượng HP và HA trong các vết thương do bệnh tiểu đường. Vedrenne đã báo cáo sự tồn tại của mối quan hệ chặt chẽ giữa ECM và sự tổng hợp các phân tử điều chỉnh sự liên kết giữa các tế bào và ECM, sự hình thành mạch, việc chữa lành vết thương ở da, và vòng tuần hoàn của nguyên bào sợi da ở người (Vedrenne, 2012). Sự hydrat hóa tế bào và môi trường ẩm ướt là những yếu tố quan trọng để tạo điều kiện cho vòng tuần hòa của nguyên bào sợi, sự hình thành mạch và sự tái biểu hiện tế bào bằng các tế bào sừng trong quá trình chữa lành vết thương. Do đó, bất kỳ yếu tố hoặc sự kiện nào ngăn chặn hoặc giới hạn sự biểu hiện và/hoặc kích hoạt protein AQP3 cục bộ có thể làm giảm mức hydrat hóa tế bào và chữa lành vết thương giảm. Collagen và HA có nhiều chức năng trong ECM, trong đó có giàn mô tế bào để duy trì hình dạng và biệt hóa tế bào, hỗ trợ việc di chuyển và di cư tế bào, và cho phép ECM trong lớp da chống lại sự nén.

HA là một phân tử rất ưa nước và đặc tính này cho phép nó để điều chỉnh sự hydrat hóa mô vì nó thu hút và liên kết với nước. Tác giả sáng chế phát hiện thấy mức biểu hiện AQP3 được giảm xuống trên da không có vết thương của lợn bị bệnh tiểu đường. Tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, ngoài việc giảm sự hình thành mạch và lượng HP và HA thấp, mức biểu hiện AQP3 trong da tái sinh của vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc ở những con lợn bị bệnh tiểu đường thấp hơn so với những người trong da tái tạo của vết bỏng được điều trị bằng chất dẫn thuốc trong các con lợn khỏe mạnh. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng điều trị EPO tại chỗ làm tăng đáng kể sự hình thành mạch và lượng HP và HA trong các vết thương do bệnh tiểu đường và sự gia tăng này đi kèm với sự gia tăng đáng kể mức biểu hiện AQP3. Các tác giả sáng chế cũng thấy rằng sự ức chế của AQP3 bởi HgCl₂ trong các vết bỏng của những con lợn bị bệnh tiểu đường đã gây phản tác dụng với các hoạt động tích cực của EPO, và kết quả này cho thấy sự kích thích của AQP3 qua trung gian EPO có thể kích thích việc chữa lành vết thương trong DM. Hơn nữa, các tác giả sáng chế cũng phát hiện thấy mức biểu hiện AQP3 tương quan với mức độ sự hình thành mạch và lượng HP và HA trong các vết bỏng được điều trị bằng EPO cho những con lợn khỏe mạnh và con lợn bị bệnh tiểu đường. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện thấy các mối tương quan này mạnh hơn

trong các vết bỏng được điều trị bằng EPO và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN của những con lợn bị bệnh tiểu đường hơn các vết bỏng được điều trị bằng EPO và các vết bỏng được điều trị bằng EPO/FN của các con lợn khỏe mạnh. Vì (a) EPO có tác động tích cực đối với biểu hiện AQP3 trong da tái sinh của vết thương ở lợn bệnh tiểu đường và (b) sự tương quan giữa mức biểu hiện AQP3 và mức sự hình thành mạch và lượng HP và HA trong các mô vết thương trước và sau khi điều trị tại chỗ rất mạnh, có thể kết luận rằng tăng tốc quá trình chữa lành do EPO gây ra là trung gian thông qua cơ chế phụ thuộc AQP3. Khi cơ chế này được kích hoạt, các sự kiện chính của quá trình chữa lành vết thương, tức là sự hình thành mạch, tổng hợp collagen và HA, và tái biểu hiện, được kích thích và tỷ lệ băng bó vết thương nhanh hơn.

Sự biểu hiện AQP3 giảm trong da tái sinh trong quá trình chữa lành vết thương toàn bộ độ dày ở chuột bị bệnh tiểu đường được báo cáo bởi Sugimoto et al, 2012. Hara-Chikuma và Verkman cũng báo cáo rằng lượng nước và tính đàn hồi của lớp sừng thấp hơn và việc chữa lành vết thương và sinh tổng hợp ECM chậm hơn ở chuột thiếu AQP3 so với chuột hoang dã (Hara-Chikuma, 2008a). Điều thú vị là, sự biểu hiện AQP3 ở da người tăng lên ở một số bệnh về da, chẳng hạn như bệnh chàm da dị ứng và ung thư da (Hara-Chikuma, 2008b) và vết bỏng da (Sebastian, 2015). Những phát hiện này có hàm ý rằng AQP3 là nhân tố chính trong sinh học lớp biểu bì, sự phục hồi da sau khi vết thương được tăng cường khi AQP3 được kích thích.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng tỷ lệ băng bó vết thương chậm của vết thương do bệnh tiểu đường liên quan đến quá trình tạo mạch giảm và lượng HP và HA thấp trong vết thương. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng khả năng giảm của HEKC và HBC được điều trị HG tăng lên liên quan đến việc làm giảm mức biểu hiện AQP3 trong tế bào. Những phát hiện này hàm ý rằng mức biểu hiện AQP3 giảm là do nồng độ HG và làm cơ sở cho sự gia tăng giảm các tế bào sừng và nguyên bào sợi trong DM. Vì EPO đã ngăn chặn được các tác động bất lợi của nồng độ HG đối với sự tăng lên của tế bào và biểu hiện AQP3, bằng chứng cho thấy rằng EPO tăng tốc quá trình chữa lành vết thương do bệnh tiểu đường thông qua (các) cơ chế phụ thuộc AQP3 mà các mô thừa của một số tác động của nồng độ HG.

Một phát hiện thú vị khác nữa là mức biểu hiện AQP3 trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN cao gấp bốn lần so với các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO. Sự gia tăng đáng kể mức biểu hiện AQP3

trong các vết thương do bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN có liên quan đến tỷ lệ băng bó vết thương nhanh chóng và tăng lưu lượng máu và tăng gấp đôi lượng MVD và lượng HP và HA trong các mô vết thương. FN và fibrin là hai thành phần quan trọng của chất nền tạm thời hỗ trợ các đại thực bào, nguyên bào sợi và sự hình thành mạch (Stadelmann, 1998). Sự hình thành phù hợp của chất nền tạm thời và mô hạt cho phép biểu mô và băng bó vết thương (Martin, 1997). Trong DM, sự thiếu hụt FN và/hoặc sự xuống cấp của nó bởi các proteaza dẫn đến sự phân hủy của chất nền tạm thời và quá trình tái biểu hiện không xảy ra hoặc bị trì hoãn. Đã báo cáo trước đây rằng việc chữa lành vết thương trên da của chuột bị bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO/FN nhanh hơn so với những vết thương trên da của chuột bị bệnh tiểu đường được điều trị bằng EPO (Hamed, 2011). FN có chức năng thiết yếu trong sự hình thành mô hạt trong giai đoạn tăng sinh của việc chữa lành vết thương. Do đó, tác giả sáng chế cho rằng FN ngoại sinh có thể khôi phục chất nền tạm thời thông thường trong các vết thương do bệnh tiểu đường. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng FN một mình không có ảnh hưởng đến tỉ lệ băng bó vết thương, tốc độ lưu thông máu, mức độ tạo mạch máu và các lượng HP và HA trong vết thương của các con lợn khỏe mạnh. Hơn nữa, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng FN ngoại sinh không làm tăng hoạt động của EPO đối với việc chữa lành các vết thương của con lợn khỏe mạnh bởi vì FN nội sinh có mặt ở mức bình thường và không bị suy thoái ở các con lợn khỏe mạnh. Vì FN nội sinh bị phân hủy trong DSU, đưa FN vào gel chứa EPO là mong muốn bởi vì FN có khả năng hoạt động của gel chứa EPO.

Do đó, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng ứng dụng EPO tại chỗ đối với vết thương do bệnh tiểu đường tăng sự tái biểu hiện và tỉ lệ băng bó vết thương, do đó dựa trên các phát hiện trên các con lợn bệnh tiểu đường, việc áp dụng EPO tại chỗ có thể có lợi cho sức khỏe để kích thích sự chữa lành của DSU bằng cách tăng mức biểu hiện AQP3 trên da.

Ví dụ 2 - Điều trị vết loét do bệnh tiểu đường mạn tính ở người

Công thức của Ví dụ 1 đã được thử nghiệm để xác định hiệu quả điều trị vết loét do bệnh tiểu đường mạn tính ở người. Một người đàn ông 77 tuổi được chẩn đoán bị bệnh tiểu đường, tăng huyết áp và tăng đường huyết xuất hiện các vết loét do bệnh tiểu đường ở chân phải và lưng. Tổn thương da khoảng 9,6 cm² (xem Fig.13, tấm “TRƯỚC”).

Các thông số của bệnh nhân

Giới tính: Nam

Tuổi: 77 tuổi

Dân tộc: Bắc Phi

Hút thuốc: Tiền sử là không hút thuốc

Tiền sử bệnh tim mạch, tăng huyết áp, tăng lipid.

Chiều cao: 176 cm

Trọng lượng: 96 kg

BMI: 30,99 kg m⁻²

ABI 0,76 (Nhiễm nhẹ)

RBC 4,13 10⁸/μl

Số lượng tiểu cầu 169 10³/μl

Glucose 159 mg/dL

Thuốc dùng kèm (đang được tiến hành):

Amlodipine từ 2015

Metformin từ 2015

Pravastatin từ 2013

Cartia từ 2002

Enaladex từ 2012

Vết loét do bệnh tiểu đường

Vị trí: vị trí phía sau, vị trí trung gian

Diện tích: 9,6 cm

Tiền sử: hơn 2 tháng không cải thiện

Kiểu Wagner: I

Vi khuẩn thiếu khí (*Pseudomonas aeruginosa*)

Vết thương được mô tả lướt qua trước khi dùng được phẩm vào ngày thứ 1. Được phẩm của ví dụ 1 đã được bôi lên vết thương 5 ngày một tuần với liều 0,25 g/cm² của vết thương, theo diện tích của vết loét vào ngày điều trị. Việc điều trị kéo dài gần tám tuần (55 ngày) và bao gồm 36 ứng dụng tại chỗ về được phẩm của ví dụ 1 cho đến khi vết thương kết thúc, như bác sĩ chẩn đoán. Việc điều trị được cung cấp tại nhà của bệnh nhân bởi y tá khám. Bệnh nhân đã đến phòng khám ngoại trú hàng tuần để đánh giá, xét

nghiệm và đánh giá vết loét. Fig.13 (Tâm "SAU") là hình ảnh của vết thương đóng hoàn toàn sau khi điều trị 8 tuần.

Việc điều trị bằng dược phẩm của Ví dụ 1 trong tám tuần không có bất kỳ hiệu quả hệ thống nào được nhận thấy, nghĩa là không gây ra những thay đổi đáng kể về thông số máu hoặc huyết áp. Một số các thông số được có mặt dưới bảng 3

Bảng 3.

Các thông số được đo	Trước khi điều trị	Sau khi điều trị
Hemoglobin (g/dL)	12,3	12,5
HCT (%)	36,5	37,8
RBC ($10^8/\mu\text{l}$)	4,13	4,32
Lượng tiểu cầu ($10^3/\mu\text{l}$)	169	167
Huyết áp (mmHg)	139/70	139/79

Các tác dụng phụ

Quá trình tạo hạt đã được quan sát thấy sau ba tuần điều trị. Đây được coi là tác dụng phụ nhỏ. Do đó việc điều trị đã được tạm dừng trong 3 ngày, trong khi ba đơn thuốc hàng ngày đã được bỏ qua. Sau ba ngày khoảng thời gian hiệu quả tạo hạt cao được giảm và việc điều trị được tiếp tục. Không có dấu hiệu nào của quá trình tạo hạt cao được cho đến khi kết thúc quá trình điều trị.

Kết luận

Việc điều trị ở bệnh nhân K. bằng RMD-G1 là an toàn và hiệu quả. Việc đóng hoàn toàn vết thương do bệnh tiểu đường mạn tính được quan sát trong 8 tuần của việc điều trị.

* * *

Tất cả các phương pháp đã bộc lộ và trong yêu cầu bảo hộ của sáng chế có thể được tạo ra và thực hiện mà không cần thử nghiệm quá mức theo sáng chế. Trong khi các thành phần và phương pháp theo sáng chế đã được minh họa theo các phương án được, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng hiểu được rằng có thể áp dụng các biến đổi cho các phương pháp và trong các bước của phương pháp đã mô tả mà không rời khỏi ý niệm chung, tinh thần và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn, nó sẽ làm rõ rằng các chất đã biết có liên quan cả về phương diện hóa học và sinh lý học có thể được thế bởi các chất được mô tả ở đây trong khi vẫn đạt được các kết quả tương tự. Tất cả các cải biến và các phần tử thay thế tương tự trên rõ ràng hơn với những người

có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật này dường như nằm trong tinh thần, phạm vi và khái niệm của sáng chế như được định rõ bởi các điểm bảo hộ đính kèm.

Tài liệu tham khảo

Các tài liệu tham khảo sau đây, đề xuất phương pháp làm thí dụ hoặc bổ sung các chi tiết khác cho các phương pháp được đưa ra ở đây, được kết hợp cụ thể ở đây bằng cách tham khảo.

Agre, et al. "The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems." J Biol Chem. 1998;

12;273(24): 14659-62.

Anagnostou, et al., "Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on

endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(15):5978-82.

Brown, et al., "Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth

factor) by epidermal keratinocytes during wound healing." J Exp Med. 1992;

176: 1375-9

Davis, et al., "Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream." J

Surg Res. 1990 Mar;48(3):245-8.

Gong, et al., "EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of

AQPs and sodium transporters in rat kidney." Kidney Int. 2004; 66:683-695.

Hamed, et al., "Topical erythropoietin promotes wound repair in diabetic rats." J Invest

Dermatol 2010; 130: 287-94.

Hamed, et al., "Fibronectin potentiates topical erythropoietin-induced wound repair in

diabetic mice." J Invest Dermatol 2011; 6: 1365-74.

Hamed, et al., "Erythropoietin, a novel repurposed drug: An innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus." Wound Repair Regen. 2014 Jan-Feb;

22(1):23-33.

Hara, et al., "Safe induction of diabetes by high-dose streptozotocin in pigs." *Pancreas*. 2008

Jan;36(1):31-8. doi: 10.1097/mpa.0b013e3181452886.

Hara-Chikuma & Verkman, "Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin." *Biol Cel* 2005; 97:479-86.

Hara-Chikuma & Verkman, "Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins." *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(12): 1386-92.

Hara-Chikuma & Verkman, "Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and

proliferation during wound healing." *J Mol Med*. 2008; 86:221-31

Hara-Chikuma & Verkman, "Roles of aquaporin-3 in the epidermis." *J Invest Dermatol*.

2008; 128:2145-51

Hehenberger, et al., "Impaired proliferation and increased L-lactate production of dermal fibroblasts in the GK-rat, a spontaneous model of non-insulin dependent diabetes mellitus." *Wound Repair Regen* 1999, 7:65-71

Levin & Verkman, "Aquaporin-3 -dependent cell migration and proliferation during corneal re-epithelialization." *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(10):4365-72.

Mansbridge, et al., "Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers." *Diabetes Obes Metab* 1999, 1 :265-79

Martin, "Wound healing—aiming for perfect skin regeneration." *Science* 1997; 276:75-81. Mustoe, "Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy." *Am J Surg* 2004, 187:65S-70S

Sebastian, et al., "Epidermal aquaporin-3 is increased in the cutaneous burn wound." *Burns*.

2015 Jan 17.

Sen, et al., "Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy." *Wound Repair Regen* 2009; 17: 763-71.

Sheetz & King, "Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications." *JAMA* 2002, 288:2579-88

Shukla, et al., "Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models." *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;

244:434-9

Stadelmann, et al., "Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds." *Am J*

Surg. 1998; 176:26S-38S

Sugimoto, et al., "Impaired Aquaporin 3 Expression in Reepithelialization of Cutaneous

Wound Healing in the Diabetic Rat." *Biol Res Nurs.* 2012; 15(3): 347-55.

Sullivan, et al., "The pig as a model for human wound healing." *Wound Repair Regen.* 2001;

9(2):66-76.

Tentolouris, et al., "Moisture status of the skin of the feet assessed by the visual test neuropad correlates with foot ulceration in diabetes." *Diabetes Care.* 2010; 33(5): 1112-4.

Vedrenne, et al., "The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing." *Pathol Biol (Paris).* 2012; Feb;60(1):20-7.

Winter, "Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig." *Nature.* 1962; 20; 193:293-4.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa:

gel;

erythropoietin; và

fibronectin; trong đó fibronectin có mặt trong dược phẩm với lượng có khả năng tăng cường các hoạt động có lợi của erythropoietin khi được bôi lên vết thương;

trong đó dược phẩm này chứa rượu benzylic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% (khối lượng/khối lượng) và polyme carboxy polyvinyl.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó erythropoietin có mặt với nồng độ là 5% khối lượng/khối lượng.

3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó fibronectin có mặt với nồng độ là 30% khối lượng/khối lượng.

4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó polyme carboxy polyvinyl là Carbomer 940.

5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dược phẩm chứa erythropoietin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), fibronectin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50% (khối lượng/khối lượng), glyxerol với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), Carbomer 940 với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% (khối lượng/khối lượng), trietanolamin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), metylparaben với nồng độ nằm trong khoảng 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), propylparaben với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng).

6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó dược phẩm này chứa 5% (khối lượng/khối lượng) glyxerol, 1% (khối lượng/khối lượng) Carbomer 940, 2% (khối lượng/khối lượng) rượu

benzylic, 0,9% (khối lượng/khối lượng) trietanolamin, 0,2% (khối lượng/khối lượng) metylparaben, 0,05% (khối lượng/khối lượng) propylparaben.

7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó dược phẩm này chứa 5% (khối lượng/khối lượng) glyxerol, 1% (khối lượng/khối lượng) Carbomer 940, 2% (khối lượng/khối lượng) rượu benzylic, 0,9% (khối lượng/khối lượng) trietanolamin, 0,2% (khối lượng/khối lượng) metylparaben, 0,05% (khối lượng/khối lượng) propylparaben, và nước cho đến 100% (khối lượng/khối lượng).

8. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó gel bao gồm fibrin, collagen hoặc axit hyaluronic.

9. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó gel là hydrogel.

10. Dược phẩm được chứa erythropoietin, trong đó dược phẩm này được bào chế ở dạng gel, và trong đó dược phẩm này chứa rượu benzylic ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 30% (khối lượng/khối lượng) và polyme carboxy polyvinyl.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này chứa fibronectin.

12. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó erythropoietin có mặt với nồng độ là 5% (khối lượng/khối lượng).

13. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó fibronectin có mặt với nồng độ là 30% (khối lượng/khối lượng).

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó dược phẩm này chứa erythropoietin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), fibronectin với nồng độ nằm trong khoảng 0,01 đến 50% (khối lượng/khối lượng), glyxerol với nồng độ nằm trong khoảng 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), Carbomer 940 với nồng độ nằm trong khoảng 0,01% đến 30% (khối lượng/khối lượng), trietanolamin với nồng độ nằm trong khoảng 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), metylparaben với nồng độ nằm

trong khoảng 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng), propylparaben với nồng độ nằm trong khoảng 0,01 đến 30% (khối lượng/khối lượng).

15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó dược phẩm chứa 5% (khối lượng/khối lượng) glyxerol, 1% (khối lượng/khối lượng) Carbomer 940, 2% (khối lượng/khối lượng) rượu benzylic, 0,9% (khối lượng/khối lượng) trietanolamin, 0,2% (khối lượng/khối lượng) metylparaben, 0,05% (khối lượng/khối lượng) propylparaben.

1 / 14

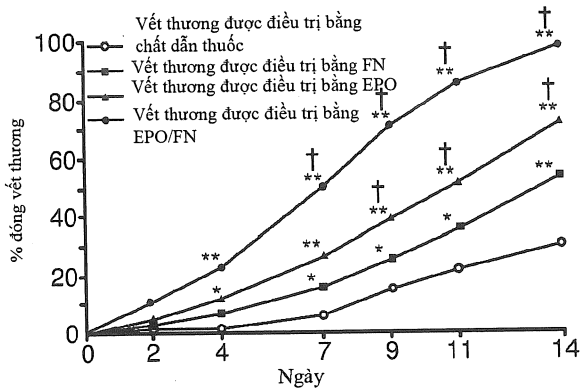


FIG. 1A

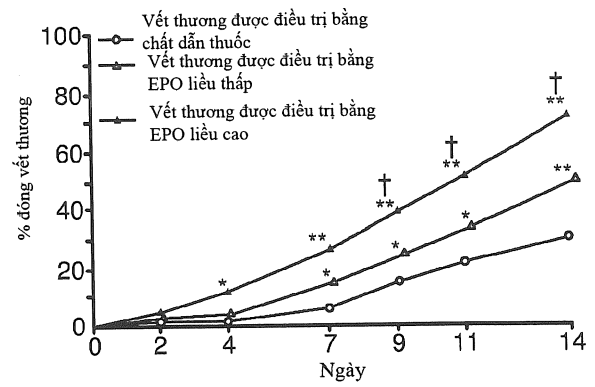


FIG. 1B

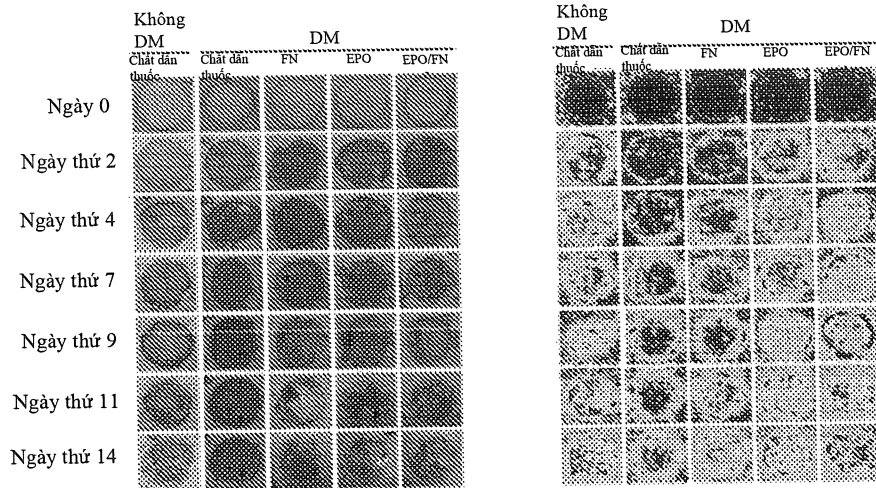


FIG. 1C

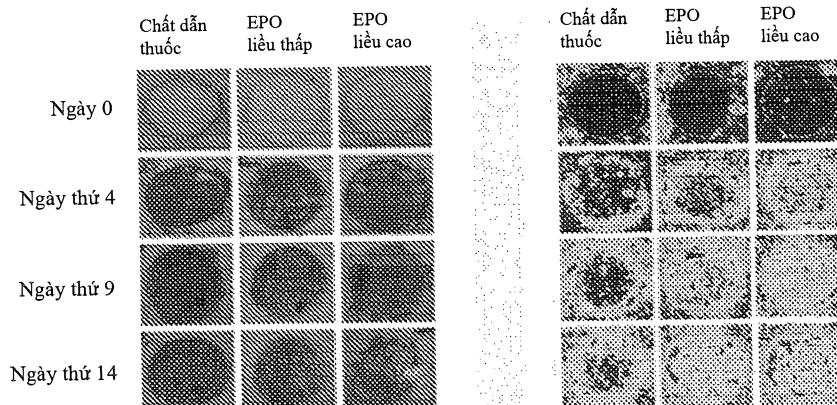


FIG. 1D

2 / 14

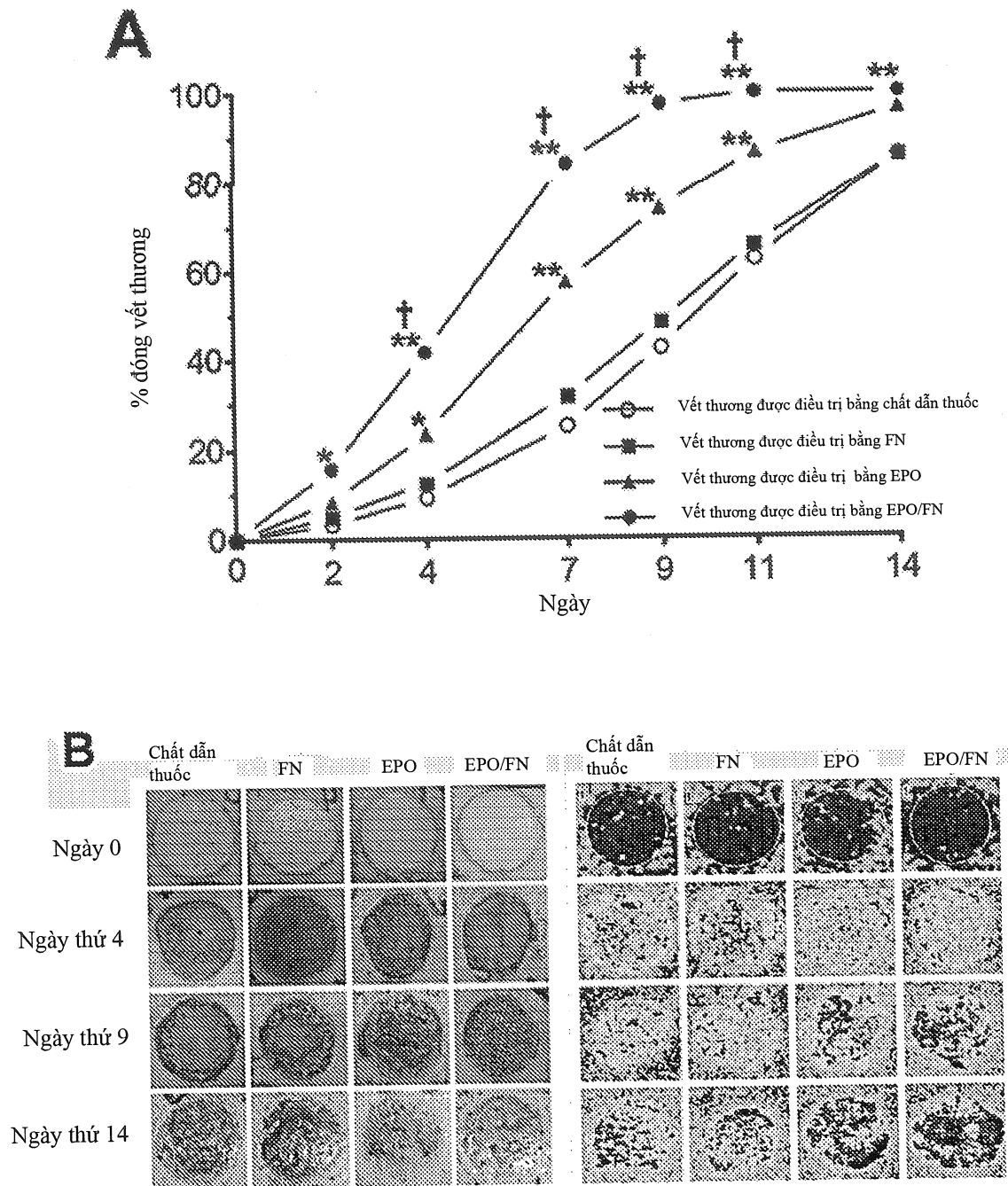


FIG. 2A-B

3 / 14

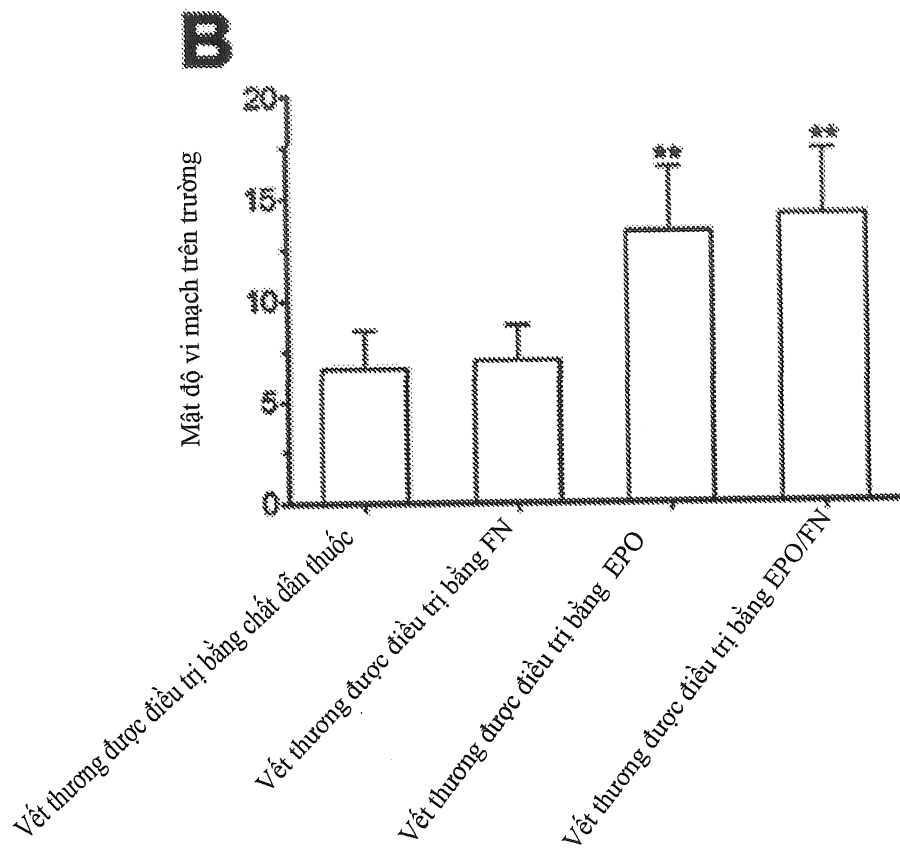
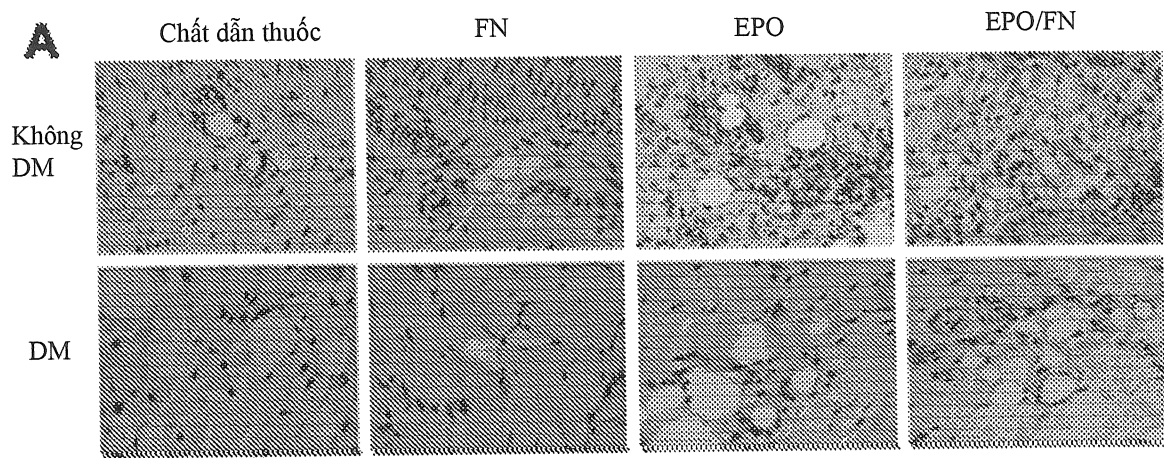


FIG. 3A-B

4 / 14

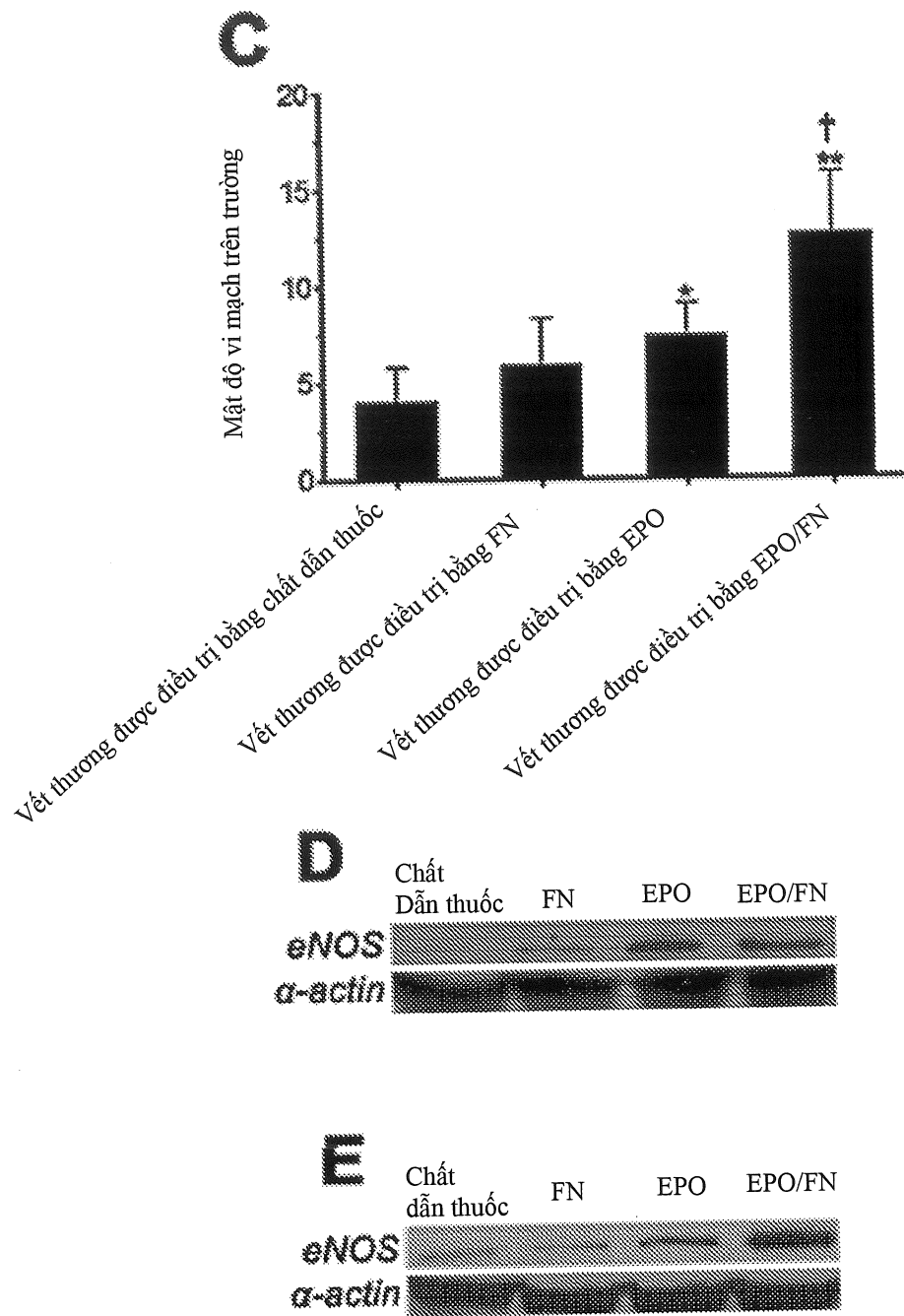


FIG. 3C-E

5 / 14

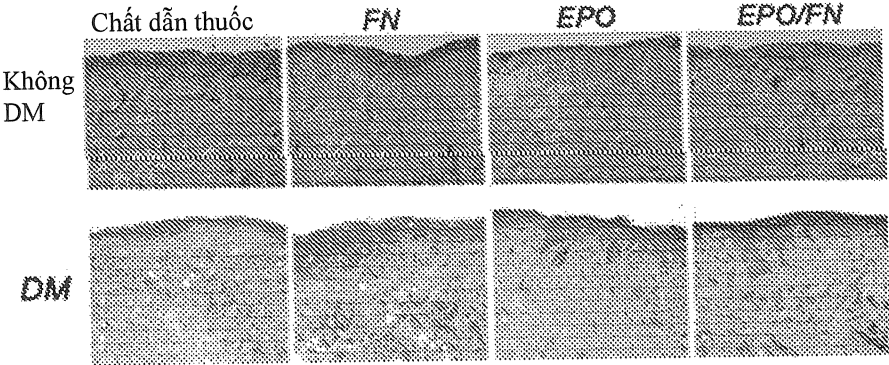


FIG. 4A

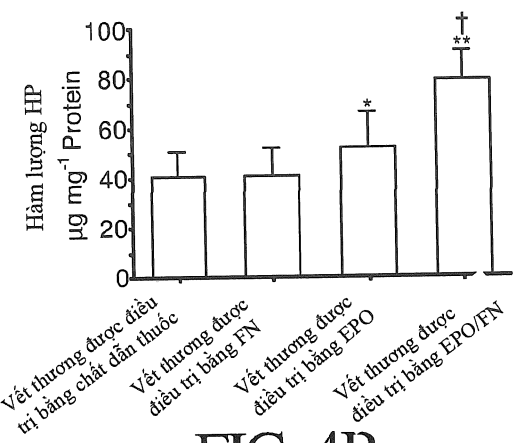


FIG. 4B

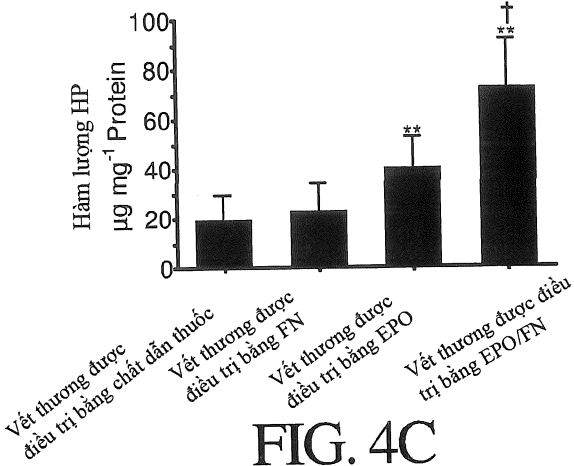


FIG. 4C

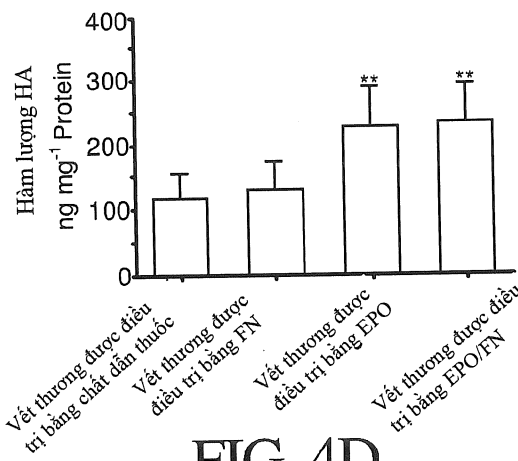


FIG. 4D

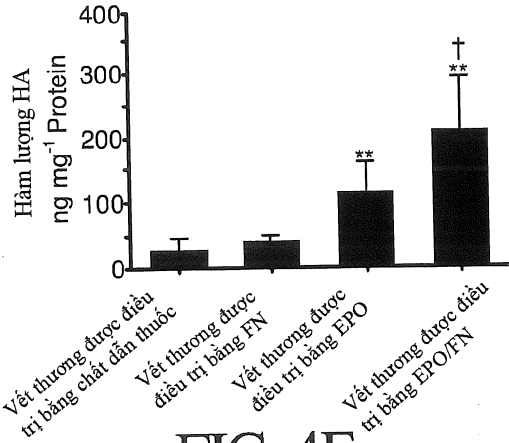


FIG. 4E

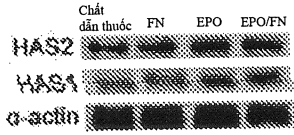


FIG. 4F

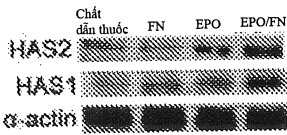


FIG. 4G

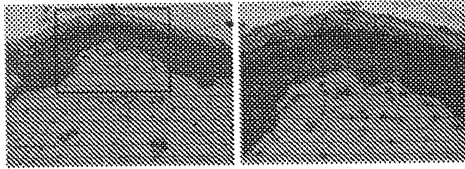


FIG. 5A

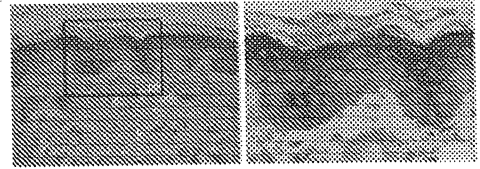


FIG. 5B



FIG. 5C

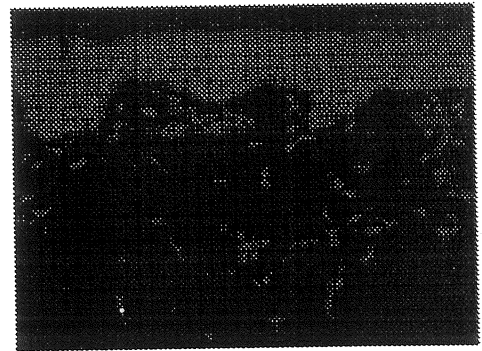


FIG. 5D

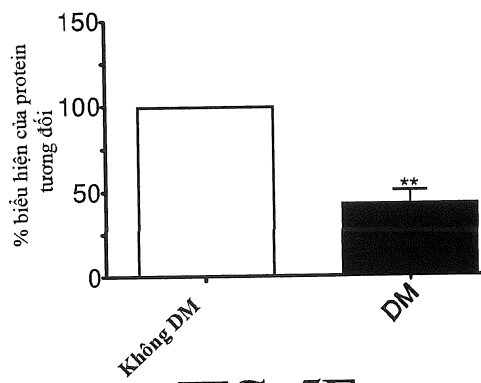


FIG. 5E

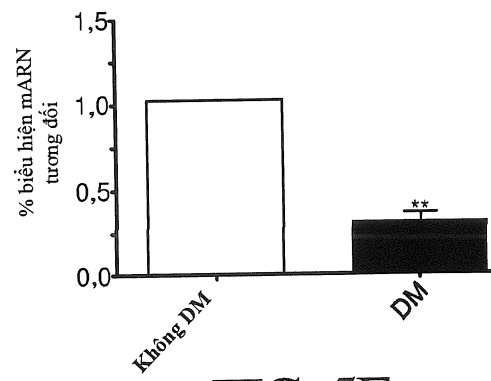


FIG. 5F

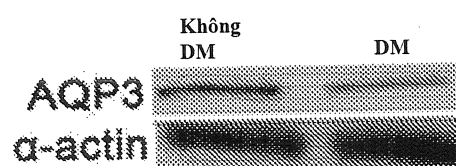


FIG. 5G

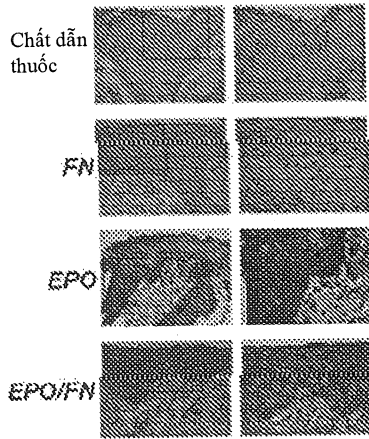


FIG. 6A

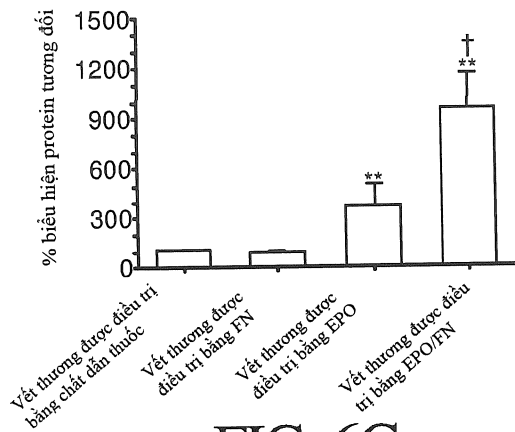


FIG. 6C

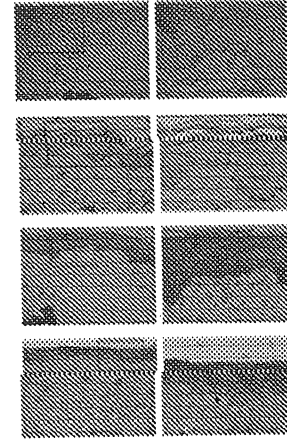


FIG. 6B

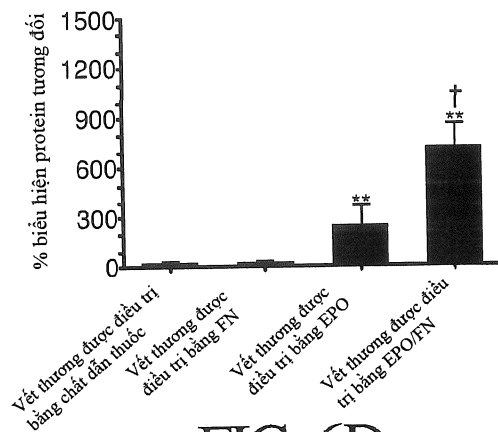


FIG. 6D

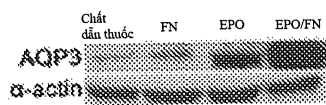


FIG. 6E

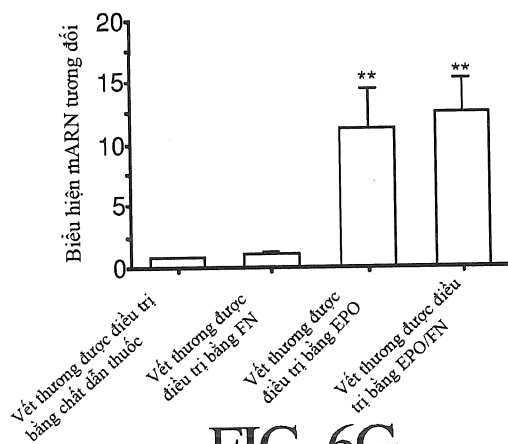


FIG. 6G

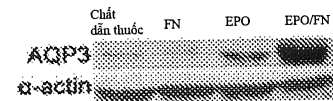


FIG. 6F

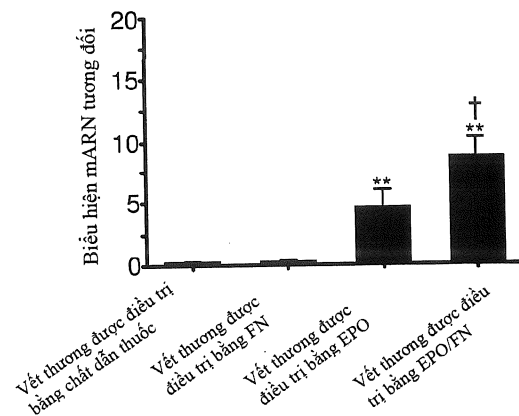


FIG. 6H

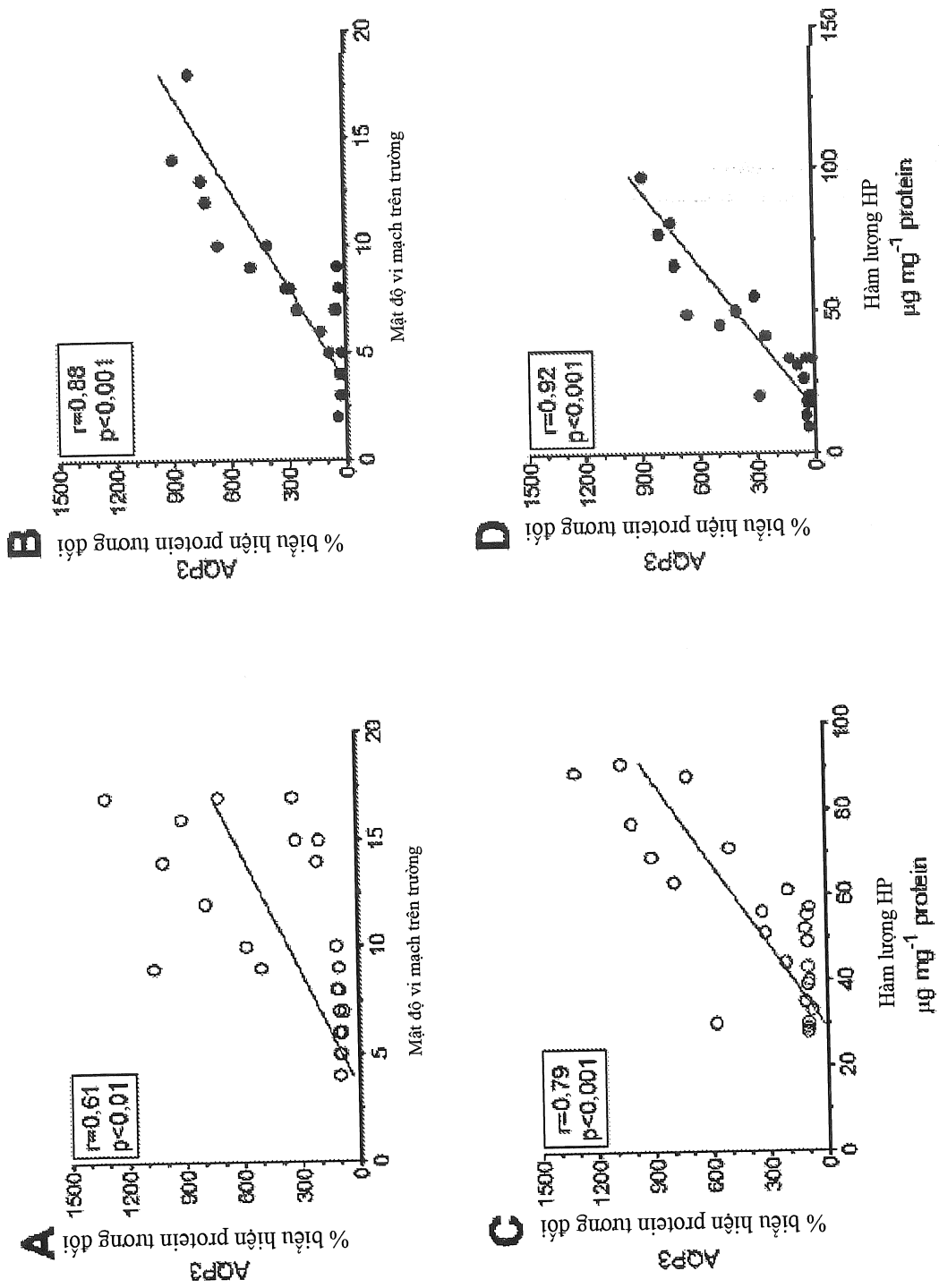


FIG. 7A-D

9 / 14

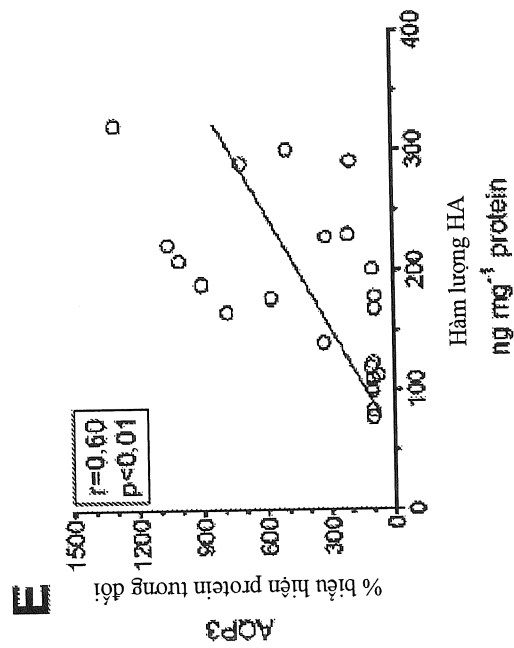
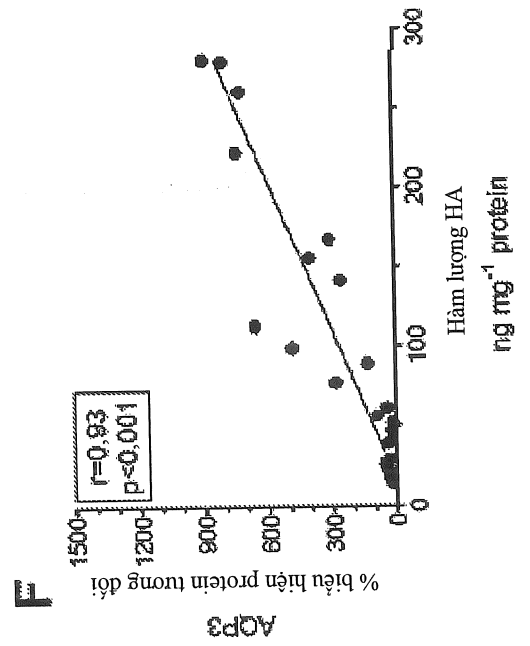


FIG. 7E-F

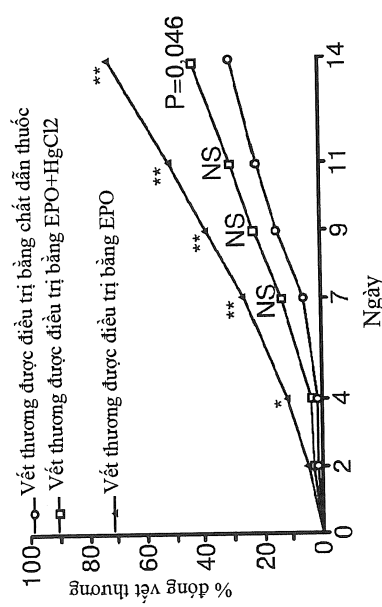


FIG. 8A

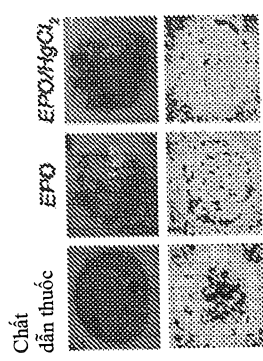


FIG. 8B



FIG. 8C

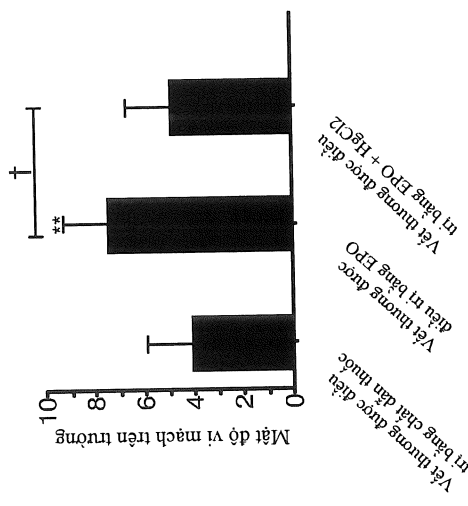


FIG. 8D

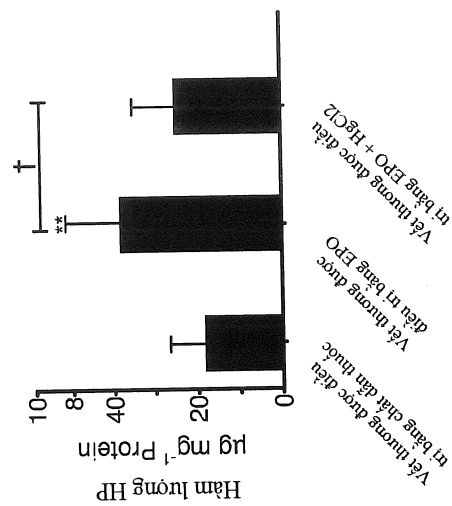


FIG. 8E

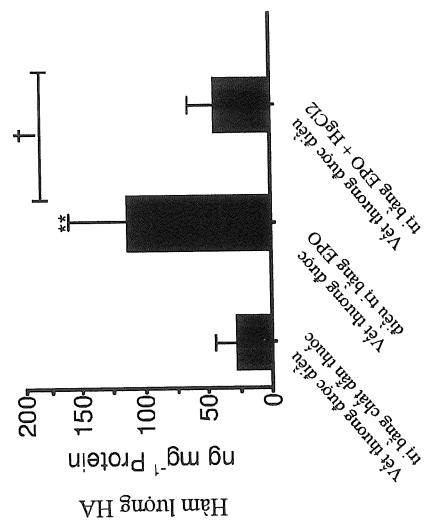


FIG. 8F

11 / 14

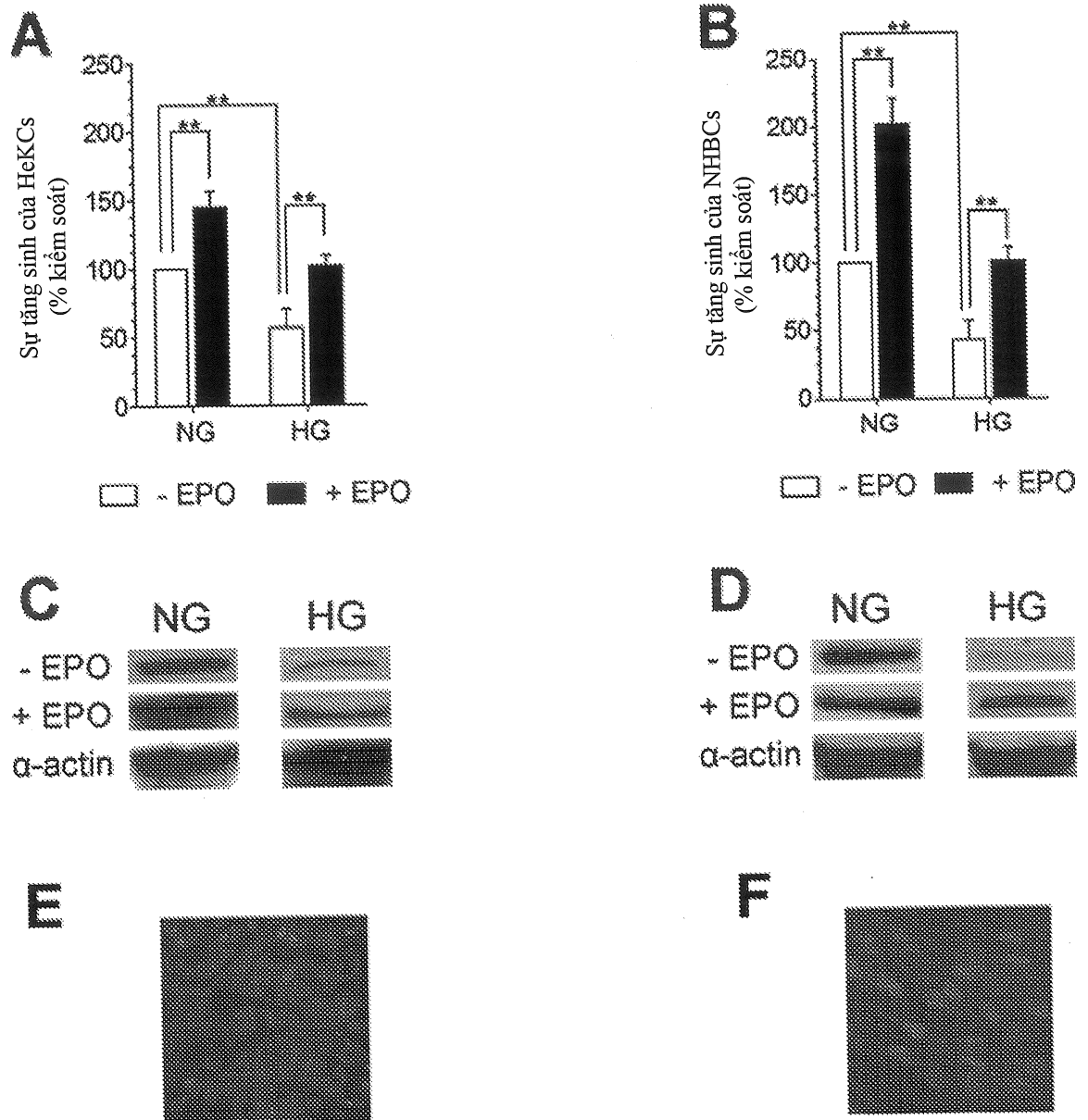


FIG. 9

12 / 14

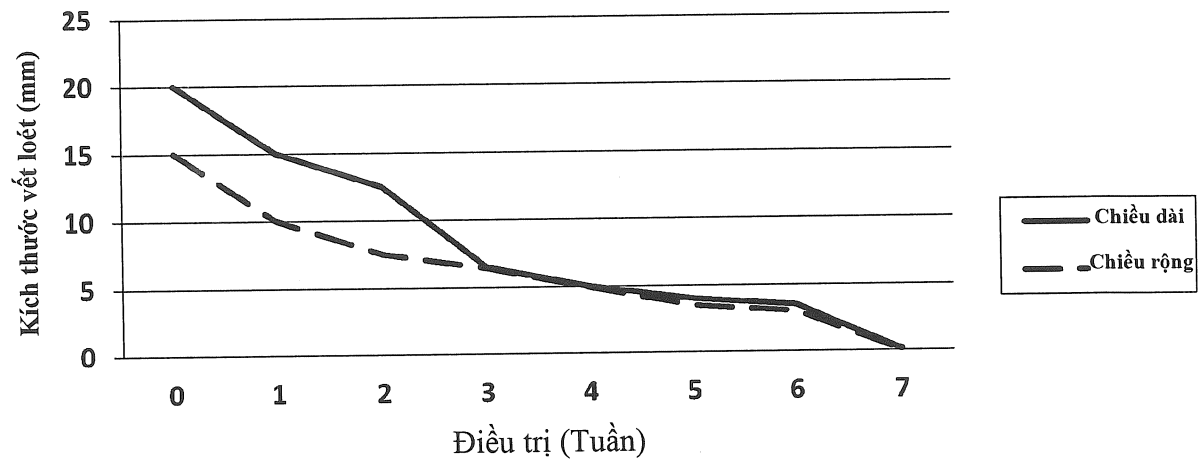


FIG. 10

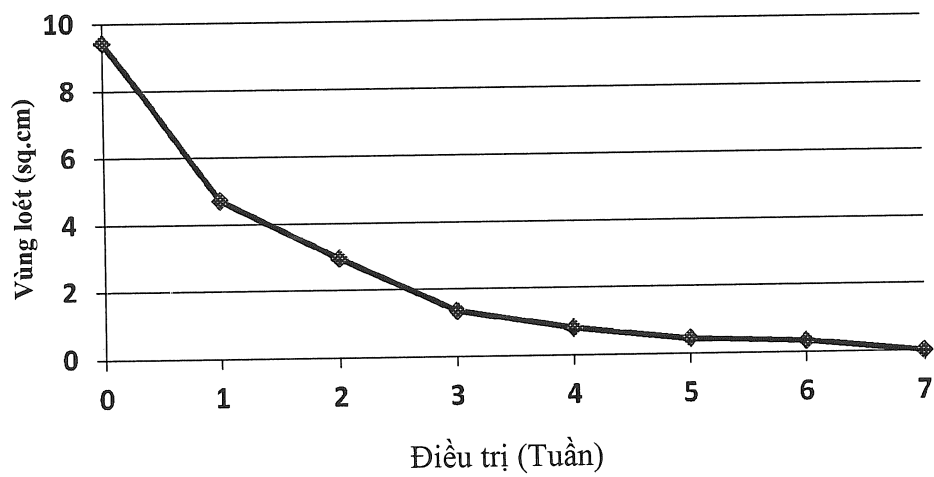


FIG. 11

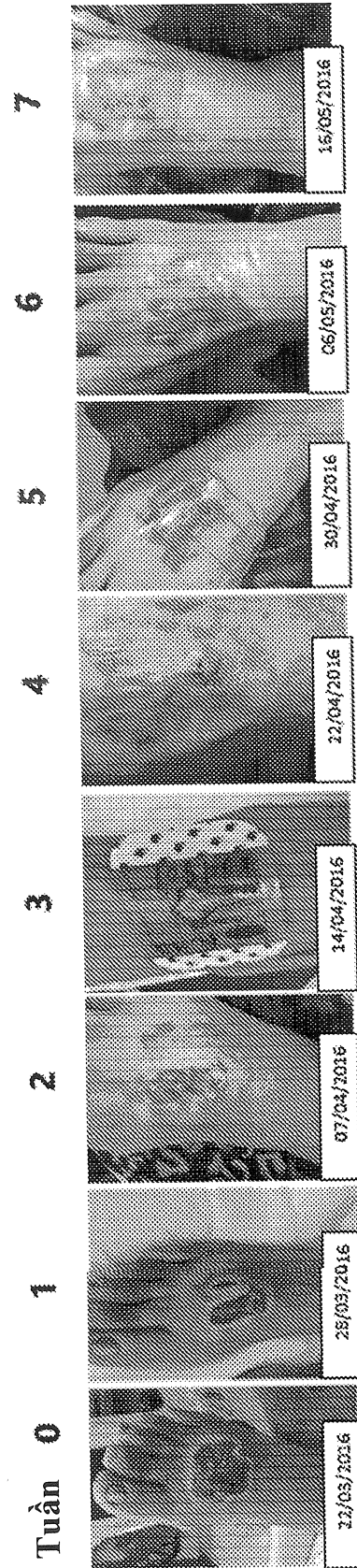
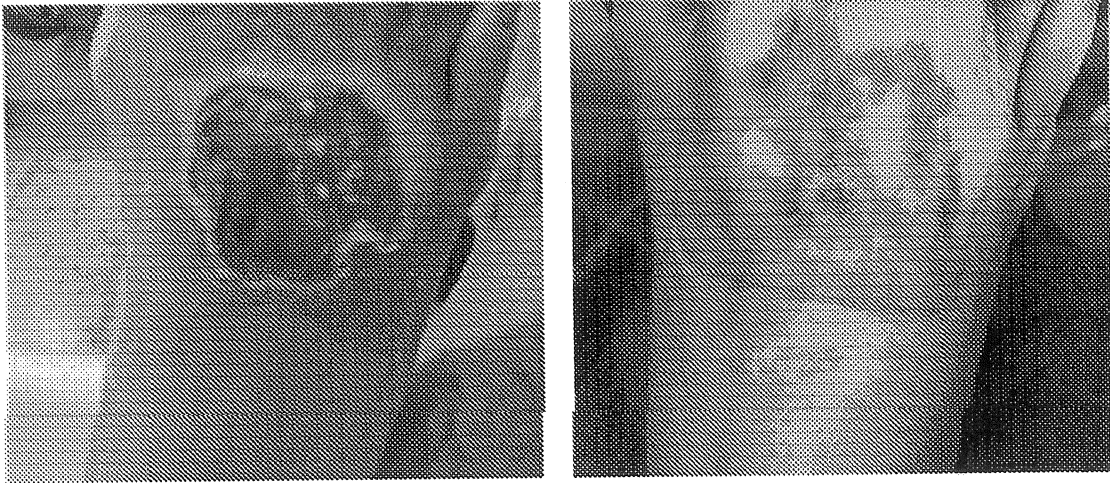


FIG. 12



Trước

Sau

FIG. 13