



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0043197
(51)⁷ C08B 37/08; A61L 27/20; C08L 5/08; (13) B
C08J 3/075; A61K 47/36; A61L 27/54
-

- (21) 1-2019-04838 (22) 02/02/2018
(86) PCT/KR2018/001473 02/02/2018 (87) WO/2018/143736 09/08/2018
(30) 10-2017-0014856 02/02/2017 KR; 10-2017-0014855 02/02/2017 KR
(45) 25/02/2025 443 (43) 25/02/2020 383A
(73) AMTIXBIO CO., LTD. (KR)
A-513 11, Beobwon-ro 11-gil Songpa-gu Seoul 05836, Republic of Korea
(72) CHO, Seung Woo (KR); LEE, Jung-Seung (KR); CHO, Jung Ho (KR); LEE, Jong-Seung (KR).
(74) CÔNG TY TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN TƯ VẤN ĐẦU TƯ VÀ SỞ HỮU TRÍ TUỆ
INTERFIVE (INTERFIVE CO., LTD)
-

- (54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HYDROGEL CỦA AXIT HYALURONIC VÀ
HYDROGEL CỦA AXIT HYALURONIC ĐƯỢC ĐIỀU CHẾ THEO PHƯƠNG
PHÁP NÀY

(21) 1-2019-04838

(57) Sáng chế đề xuất hydrogel làm chất nền sử dụng axit hyaluronic (HA) liên kết gốc nhóm pyrogallol (PG). Chất liên kết HA-PG theo sáng chế có thể được tạo liên kết ngang nhanh chóng bởi hai phương pháp khác nhau, mỗi phương pháp có chất oxy hóa được sử dụng hoặc pH được thêm vào. Hydrogel theo sáng chế không chỉ có tính tương hợp sinh học tuyệt vời, mà còn có các đặc tính vật lý được kiểm soát tuyệt vời như tỉ lệ liên kết ngang, tính đàn hồi, và độ bám dính, phụ thuộc vào từng phương pháp liên kết ngang. Dựa trên tính ổn định và tính năng tuyệt vời đó, hydrogel theo sáng chế có thể được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau bao gồm chất dẫn truyền thuốc, vật liệu dược phẩm sinh học như là chất làm lành vết thương hoặc chất chống bám dính, dược phẩm, và các sản phẩm mỹ phẩm.

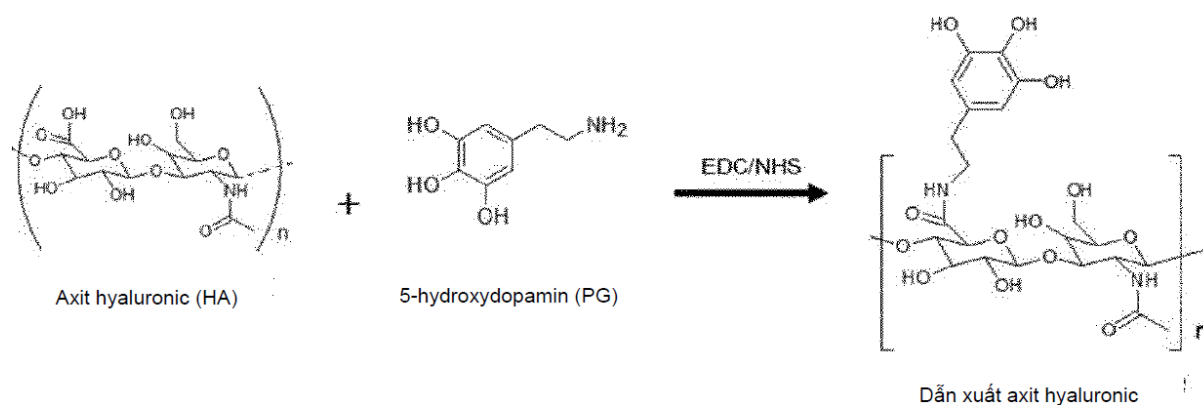


FIG.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hydrogel dựa trên dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vật liệu sinh học chức năng đang ngày càng được chú ý do các thị trường liên quan đến y tế và công nghiệp công nghệ sinh học, công nghiệp mỹ phẩm, và các thị trường tương tự đang được mở rộng nhanh chóng. Cụ thể là, việc phát triển của vật liệu có tính tương hợp sinh học sử dụng polyme tự nhiên đang ngày càng trở nên phổ biến, nhờ đó tính ổn định được đảm bảo hơn so với việc dùng polyme tổng hợp có thể gây ra độc tố hoặc các tác dụng phụ.

Rất nhiều nghiên cứu và phát triển đã được thực hiện đối với vật liệu có tính tương hợp sinh học axit hyaluronic. Axit hyaluronic là polyme sinh học có rất ít tác dụng phụ khi áp dụng cho cơ thể sống, và thẩm nước do cấu trúc hóa học của hợp chất nhóm đường chứa trong nó. Hơn nữa, do chứa rất nhiều độ ẩm, axit hyaluronic được biết đến là có tác dụng tạo đệm tự nhiên và tác dụng bôi trơn đối với ma sát của khớp xương, bao gồm cả sự đàn hồi của da. Thêm vào đó, axit hyaluronic có đặc tính bảo vệ chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn từ bên ngoài và phân hủy tự nhiên nhờ men hialuronidaza trong cơ thể sống khi được cấy vào cơ thể sống. Axit hyaluronic được sử dụng làm vật liệu quan trọng cho hệ dẫn truyền thuốc bằng cách cho axit hyaluronic liên kết với các thuốc khác nhau. Cụ thể là, từ khi được chấp thuận bởi Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ, axit hyaluronic đã được sử dụng rộng rãi trong vật liệu y sinh, vật liệu làm giá đỡ dùng cho công nghệ mô, và polyme cho việc dẫn truyền thuốc. Ngoài ra, axit hyaluronic có nhiều ở một vài lớp da khác nhau, và có chức năng phức hợp như chức năng cung cấp độ ẩm, chức năng hỗ trợ mô của cấu

trúc nền, chức năng hoạt động như là chất làm đầy, và chức năng tham gia vào cơ chế tái tạo mô. Tuy nhiên, do lão hóa, lượng axit hyaluronic, collagen, elastin, và các polyme nền khác có trong da bị giảm đi. Ví dụ, sự tiếp xúc lặp đi lặp lại với tia cực tím từ mặt trời làm cho các tế bào da không chỉ bị giảm sự tạo thành axit hyaluronic, mà còn làm cho tốc độ phân hủy axit hyaluronic tăng. Kết quả của việc mất đi vật liệu này là các nếp nhăn, các lỗ rỗ, tình trạng mất ẩm, và/hoặc các tình trạng không mong muốn khác góp phần vào sự lão hóa. Do đó, một trong những phương pháp cải thiện tình trạng của da là việc sử dụng rộng rãi chất làm đầy chứa axit hyaluronic là thành phần chính.

Do axit hyaluronic thông thường liên quan đến công nghệ, các ví dụ về việc tổng hợp dẫn xuất của axit hyaluronic không tan được tạo liên kết ngang sử dụng các hợp chất có hai nhóm chức như là bisepoxit, bisalit, và fomandehyt đã được báo cáo trong một vài tài liệu. Cụ thể là, Bằng sáng chế Mỹ số 4,582,865 mô tả ví dụ về việc sử dụng divinylsulfon cho việc tạo liên kết ngang của axit hyaluronic; Bằng sáng chế Mỹ số 4,713,448 mô tả phản ứng tạo liên kết ngang sử dụng fomandehyt; và Bằng sáng chế Mỹ số 5,356,883 mô tả ví dụ tổng hợp về gel dẫn xuất của axit hyaluronic, có nhóm cacboxyl được sửa đổi bởi O-axylure hoặc N-axylure sử dụng các cacbodiimit. Tuy nhiên, chế phẩm được liên kết ngang axit hyaluronic được bào chế bằng các phương pháp theo các sáng chế này có tính ổn định thấp so với axit hyaluronic phân hủy enzyme và có hàm lượng hóa chất không phản ứng cao, có thể gây ra độc tính sinh học. Thêm vào đó, không dễ để kiểm soát sự liên kết ngang hoặc các tính chất vật lý của các chế phẩm này dựa trên việc sử dụng theo dự kiến. Do vậy, có rất nhiều hạn chế trong việc áp dụng các sản phẩm trên cho các vật liệu y tế khác nhau. Vì thế, cần thiết phải phát triển trình độ kỹ thuật để kiểm soát dễ dàng tính chất vật lý của hydrogel của axit hyaluronic trong khi vẫn duy trì khả năng tương thích sinh học xuất sắc của nó.

Theo đó, để giải quyết các vấn đề này, sáng chế đề xuất đã tiếp tục nỗ lực phát triển trình độ kỹ thuật trong việc cải tiến chức năng của axit hyaluronic là vật liệu có

tính tương thích sinh học. Kết quả là sáng chế đã phát triển kỹ thuật nền tảng hydrogel dựa trên axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm pyrogallol, và hoàn thiện sáng chế trên cơ sở của kỹ thuật này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất dẫn xuất của axit hyaluronic được điều chế bằng cách sửa đổi axit hyaluronic bởi nhóm pyrogallol và phương pháp điều chế chúng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế dẫn xuất dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic, bao gồm bước tạo liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic có cấu trúc mà trong đó các dẫn xuất của axit hyaluronic được tạo liên kết ngang.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất mang dẫn truyền thuốc hay là hệ dẫn truyền thuốc: “drug delivery system” (DDS) sử dụng dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vật liệu y tế là giá đỡ dùng cho công nghệ mô sử dụng dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất băng vết thương hoặc màng chống bám dính dựa trên dẫn xuất của axit hyaluronic.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất làm đầy có chứa dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cải thiện các nếp nhăn trên da, bao gồm bước tiêm chất làm đầy trong hoặc dưới da của một cá thể.

Tuy nhiên, các vấn đề kỹ thuật được giải quyết bởi sáng chế không chỉ giới hạn ở những vấn đề nêu trên mà các vấn đề khác không được đề cập cũng có thể được

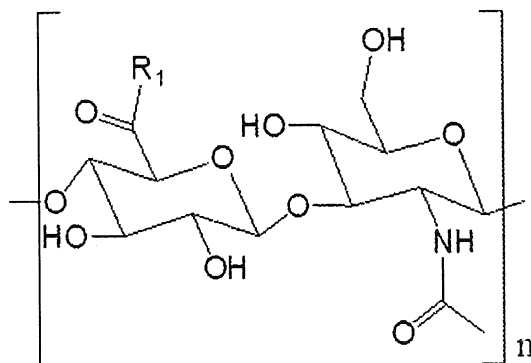
hiểu một cách rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này từ phần mô tả dưới đây.

Giải pháp cho vấn đề

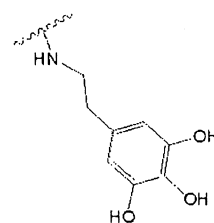
Để đạt được các mục đích của sáng chế nói trên, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hydrogel của axit hyaluronic, phương pháp bao gồm bước tạo liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất được sửa đổi bởi nhóm galol, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol do phản ứng giữa axit hyaluronic và 5'-hydroxydopamin.

Theo một phương án của sáng chế đề xuất, dẫn xuất của axit hyaluronic có Công thức 1 sau đây, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic có khối lượng phân tử từ 10.000 Da đến 2.000.000 Da, và có tỉ lệ thay thế nhóm galol khoảng 0,1% đến 50%.

[Công thức 1]



(Trong Công thức 1, R₁ là nhóm hydroxyl hoặc nguyên từ 1 đến 1.000).



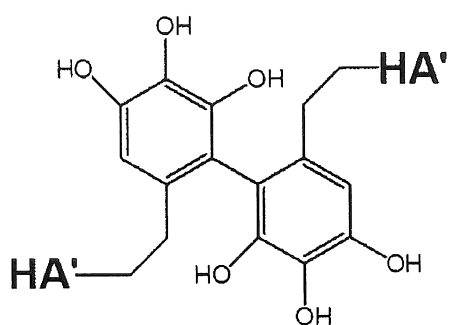
, và n là số

Theo một phương án khác của sáng chế đề xuất, ở bước tạo liên kết ngang, liên kết ngang được thực hiện bằng cách bổ sung chất oxy hóa hoặc chất điều chỉnh

pH, trong đó chất oxy hóa có thể là natri periodat, hydro peroxit, peroxidaza cải ngựa, hoặc tyrosinaza, và chất điều chỉnh pH có thể là natri hydroxit, liti hydroxit, kali hydroxit, rubidi hydroxit, xesi hydroxit, magie hydroxit, canxi hydroxit, stronti hydroxit, hoặc bari hydroxit.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất, ở bước tạo liên kết ngang được thực hiện bằng cách bổ sung chất oxy hóa, liên kết ngang có Công thức 2 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic.

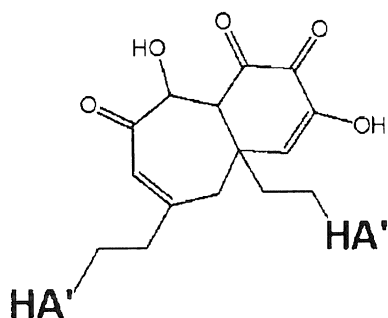
[Công thức 2]



(Trong Công thức 2, HA' thể hiện axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thay thế bằng nhóm amit.)

Theo một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất, ở bước tạo liên kết ngang được thực hiện bằng cách bổ sung chất điều chỉnh pH, liên kết ngang có Công thức 3 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic.

[Công thức 3]



(Trong Công thức 3, HA' thể hiện axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thay thế bằng nhóm amit.)

Ngoài ra, sáng chế đề xuất hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi việc tạo liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất có Công thức 1, ví dụ, hydrogel của axit hyaluronic, trong đó liên kết ngang có Công thức 2 hoặc Công thức 3 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic; và chất mang để dẫn truyền chất có hoạt tính sinh học có chứa hydrogel của axit hyaluronic. Từ quan điểm này, theo một phương án của sáng chế đề xuất, chất mang bao gồm, nhưng không giới hạn, kháng thể, mảnh kháng thể, protein, peptit, polypeptit, hợp chất hóa học phân tử nhỏ, DNA và/ hoặc RNA, siRNA, gen, và tế bào gốc bao gồm tế bào gốc trưởng thành, tế bào gốc trung mô, hoặc các tế bào gốc vạn năng cảm ứng: “induced pluripotent stem cells” (iPSCs). Từ quan điểm này, theo một phương án khác của sáng chế đề xuất, chất mang để dẫn truyền chất có hoạt tính sinh học giúp giải phóng dần dần chất có hoạt tính sinh học *in vivo* và *ex vivo*.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất có Công thức 1, ví dụ, hydrogel của axit hyaluronic trong đó liên kết ngang có Công thức 2 hoặc Công thức 3 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic; và giá đỡ cho công nghệ mô có chứa hydrogel của axit hyaluronic.

Bên cạnh đó, sáng chế đề xuất chất làm đầy có chứa dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol hoặc dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi việc tạo liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic.

Theo một phương án của sáng chế đề xuất dựa trên mục đích này, dẫn xuất của axit hyaluronic có khối lượng phân tử từ 10.000 Da đến 2.000.000 Da; và dẫn xuất của axit hyaluronic có tỉ lệ thay thế nhóm pyrogallol từ 0,1% đến 50%, tốt hơn là từ 1% đến 30%, và tốt hơn nữa là từ 2% đến 20%. Theo một phương án khác của sáng chế,

dẫn xuất của axit hyaluronic chiếm một lượng từ 0,1% (trọng lượng/ thể tích) đến 15% (trọng lượng/ thể tích) so với toàn bộ chất làm đầy.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất, chất làm đầy có trạng thái lỏng *ex vivo* và tạo thành trạng thái được tạo gel *in vivo* không cần chất liên kết ngang. Theo một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất, chất làm đầy được tiêm vào bất kỳ vị trí nào được chọn trong nhóm bao gồm vùng rãnh nước mắt, vùng nếp nhăn giữa hai chân mày, vùng khóe mắt, vùng trán, vùng sống mũi, vùng rãnh mũi-má, vùng rãnh môi-hàm, và vùng nếp nhăn cổ. Theo một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất, chất làm đầy còn chứa bất kỳ yếu tố tăng trưởng tế bào được lựa chọn trong nhóm yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi: “fibroblast growth factor” (FGF), yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì: “epithelial cell growth factor” (EGF), yếu tố tăng trưởng tế bào sừng: “keratinocyte growth factor” (KGF), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng alpha: “transforming growth factor alpha” (TGF- α), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta: “transforming growth factor beta” (TGF- β), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt: “granulocyte colony stimulating factor” (GCSF), yếu tố tăng trưởng giống insulin: “insulin-like growth factor” (IGF), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu: “vascular endothelial growth factor” (VEGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan: “hepatocyte growth factor” (HGF), yếu tố tăng trưởng từ tiểu cầu-BB: “platelet-derived growth factor-BB” (PDGF-BB), yếu tố tế bào thần kinh có nguồn gốc từ não: “brain-derived neurotrophic factor” (BDNF), và yếu tố thần kinh đệm: “glial cell-derived neurotrophic factor” (GDNF). Theo một phương án khác nữa của sáng chế đề xuất, chất làm đầy còn chứa bất kỳ thành phần nào được lựa chọn trong nhóm bao gồm thuốc gây tê cục bộ, chất chống oxy hóa, vitamin, và các chế phẩm của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chất làm đầy, bao gồm bước đưa nhóm pyrogallol vào khung của axit glucuronic có trong axit hyaluronic để điều chế dẫn xuất của axit hyaluronic; và bước bổ sung dẫn xuất của axit hyaluronic vào môi trường nước và thực hiện sự hòa trộn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện nếp nhăn trên da, bao gồm bước tiêm chất làm đầy trong hoặc dưới da của cá thể.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chất làm lành vết thương hoặc màng chống bám dính có chứa dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol hoặc dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi việc tạo liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic.

Tác dụng có lợi của sáng chế

Công nghệ điều chế hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế dựa trên dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol, và bao gồm bước tạo liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic trong điều kiện oxy hóa thích hợp và độ pH cụ thể. Sáng chế giúp kiểm soát hiệu quả tính chất vật lý của hydrogel như tỉ lệ liên kết ngang, tính đàn hồi, và độ bám dính phụ thuộc vào từng phương pháp liên kết ngang, trong đó vẫn cho phép hydrogel có tính tương hợp sinh học tuyệt vời. Do đó, sáng chế có thể áp dụng cho nhiều lĩnh vực khác nhau như lĩnh vực y tế và lĩnh vực mỹ phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 minh họa quy trình tổng hợp dẫn xuất của axit hyaluronic theo sáng chế.

FIG. 2 minh họa các kết quả thu được nhờ việc phân tích cấu trúc của dẫn xuất của axit hyaluronic theo sáng chế bằng phép (a) FT-IR hoặc (b) H-NMR.

FIG. 3 minh họa sơ đồ thể hiện hydrogel của axit hyaluronic và những thay đổi của nó trong liên kết ngang phụ thuộc vào các phương pháp liên kết ngang khác nhau.

FIG. 4 minh họa (a) các kết quả thu được nhờ việc phân tích những thay đổi trong cấu trúc hóa học diễn ra trong quá trình điều chế hydrogel của axit hyaluronic sử dụng NaIO_4 bằng phép UV-vis, và (b) cơ chế tạo thành liên kết ngang dựa trên các kết quả này.

FIG. 5 minh họa (a) các kết quả thu được nhờ việc phân tích những thay đổi trong cấu trúc hóa học diễn ra trong quá trình điều chế hydrogel của axit hyaluronic sử dụng NaOH bằng phép UV-vis, và (b) cơ chế tạo thành liên kết ngang dựa trên các kết quả này.

FIG. 6 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định các tỉ lệ mà tại đó hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế được tạo thành. (a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định sự hình thành dần dần hydrogel, và (b) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định sự biến dạng dần dần các mô đun đàn hồi của hydrogel.

FIG. 7 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định tính bền vững và tính đàn hồi của hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế. (a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định sự biến dạng các mô đun đàn hồi của hydrogel trong khoảng từ 0.1 đến 1 Hz, và (b) minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh các mô đun đàn hồi và tang δ (G''/G') của các hydrogel.

FIG. 8 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định sự thay đổi tính bền vững và tính đàn hồi của hydrogel của axit hyaluronic liên kết ngang NaIO_4 phụ thuộc khối lượng và nồng độ phân tử của các dẫn xuất của axit hyaluronic. (a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định sự biến dạng các mô đun đàn hồi của hydrogel trong khoảng từ 0.1 đến 1 Hz, và (b) minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh các mô đun đàn hồi và tang δ (G''/G') của các hydrogel.

FIG. 9 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định độ bám dính của hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế. (a) minh họa kết quả thu được nhờ việc đo đặc bằng lưu biến kể các thay đổi hữu hiệu được áp dụng dựa trên khoảng cách giữa các lớp và (b) minh họa kết quả thu được nhờ việc xác định số lượng và đánh giá độ bám dính.

FIG. 10 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định các mẫu trương lên và phân hủy của hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế, và các kết quả thu được

nhờ việc xác định số lượng, đánh giá tỉ lệ tương và tỉ lệ phân hủy của hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi việc sử dụng các dẫn xuất của axit hyaluronic đã được tổng hợp bằng cách bổ sung 0,5X (a) hoặc 1,0X (b) 5-hydroxydopamin tùy theo nồng độ phân tử của axit hyaluronic.

FIG. 11 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định xem các hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế có gây ra độc tế bào và phản ứng viêm hay không. (a) và (b) lần lượt minh họa phương pháp nhuộm để xác định tế bào sống/ chết (khung tỉ lệ = 100 μ m) (a) và khả năng sống được (b) của các hADSC ở ngày thứ 1, 3, và 7 sau khi bao nang của các hADSC nhằm đánh giá độ độc của hydrogel HA-PG. (c) minh họa kết quả thu được nhờ việc thực hiện thí nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết ngang bởi enzyme để xác định số lượng TNF- α tiết ra từ đại thực bào (RAW 264,7) khi được đồng nuôi cấy với hydrogel HA-PG được liên kết ngang bởi dung dịch NaIO₄ hoặc NaOH ($n = 4$, $**p < 0,01$ vs nhóm LPS).

FIG. 12 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định tính tương hợp *in vivo* của các hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế. (a) minh họa hình dạng của các hydrogel HA-PG (DS 8%) phục hồi ở vùng dưới da của chuột ở ngày 0, 7, 28, và 84 sau khi được cấy vào vùng dưới da. (b) minh họa các dạng phân hủy sinh học *in vivo* của hydrogel HA-PG. (c) và (d) lần lượt minh họa sự nhuộm màu H&E (c) và sự nhuộm màu xanh toulidin (d) của hydrogel phục hồi cùng với mô lân cận ở ngày 28 sau khi cấy (khung tỉ lệ = 300 μ m).

FIG. 13 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định các mảnh phân hủy *in vivo* của hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế *in vivo*. (a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định thay đổi về thể tích của hydrogel và (b) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định trọng lượng của các hydrogel còn lại, sau khi hydrogel được cấy dưới da của chuột.

FIG. 14 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định khả năng dùng hydrogel được bào chế bởi việc sử dụng NaIO₄ để tạo ra sự dẫn truyền thuốc. (a) minh

họa các kết quả thu được nhờ việc xác định sự tạo thành và hình dạng của các vi hạt trước và sau khi sấy đông khô, và (b) minh họa kết quả thu được nhờ việc xác định lượng BSA được bao nang trong các vi hạt được giải phóng ra.

FIG. 15 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định khả năng dùng hydrogel được bào chế bởi việc sử dụng NaIO_4 để tạo ra sự dẫn truyền thuốc. (a) minh họa phản ứng tạo thành liên kết ngang sử dụng NaIO_4 , (b) minh họa hình ảnh qua kính hiển vi thể hiện sự tạo thành các vi hạt HA-PG (khung tỉ lệ = 50 μm), và (c) minh họa lượng VEGF tích lũy thoát ra khỏi khối hydrogel HA-PG hoặc vi hạt HA-PG (PBS, 37°C) ($n = 4$).

FIG. 16 minh họa hiệu quả dẫn truyền VEGF và chữa bệnh của hydrogel được điều chế bởi việc sử dụng NaIO_4 trên mô hình chuột thiếu máu chi. (a) minh họa hình ảnh thể hiện các kết quả thu được nhờ việc tiêm trong cơ vi hạt HA-PG có chứa VEGF và tiến hành quan sát ở ngày 0 (ngày tiêm thuốc) và ngày 28, (b) minh họa giá trị số của các kết quả ($n = 4$ đến 5), (c) minh họa kết quả của việc nhuộm H&E và nhuộm MT, sử dụng mô chuột thường làm tiêu chuẩn so sánh (khung tỉ lệ = 100 μm), (d) minh họa kết quả thu được nhờ việc xác định số lượng vùng hóa xơ ở chi thiếu máu ($n = 12$, $**p < 0,01$ với nhóm PBS, $##p < 0,01$ với nhóm HA-PG, và $@p < 0,05$ với nhóm VEGF), và (e) minh họa hình ảnh cơ chân thiếu máu đã được nhuộm miễn dịch để được α -SMA (hình thành tiểu động mạch) và vWF (hình thành mao mạch). Các mũi tên đen chỉ ra lần lượt sự hình thành tiểu động mạch (α -SMA dương tính) và mao mạch (vWF dương tính) ở mô thiếu máu (khung tỉ lệ = 100 μm). (f) minh họa số lumen nhuộm dương tính với α -SMA và các mao mạch dương tính với vWF trong cơ thiếu máu ($n = 18,20$, $*p < 0,05$, và $**p < 0,01$ với nhóm PBS, $##p < 0,01$ với nhóm HA-PG, và $@p < 0,01$ với nhóm VEGF).

FIG. 17 minh họa sự điều chế chất bám dính mô hydrogel HA-PG sử dụng liên kết ngang gián tiếp NaOH. (a) minh họa sự tạo thành dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic bởi liên kết ngang gián tiếp NaOH. (b) minh họa kết quả thu được nhờ việc

so sánh độ bám dính giữa dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic liên kết ngang bởi NaOH và dẫn xuất hydrogel của axit hyaluronic liên kết ngang bởi NaIO₄. (c) minh họa kết quả thu được nhờ việc so sánh mức độ tách ra trung bình giữa các hydrogel HA-PG tương ứng ($n = 3$, $**p < 0,01$ với nhóm NaIO₄).

FIG. 18, (a) minh họa vắn tắt hóa học bám dính của hydrogel HA-PG được tạo ra bởi cảm ứng với NaOH, and (b) minh họa hình ảnh thể hiện sự bám dính trực tiếp của hydrogel với các cơ quan của chuột (tim, thận và gan).

FIG. 19, (a) minh họa kết quả thu được nhờ việc áp dụng hydrogel HA-PG được tạo ra bởi cảm ứng với NaOH trên bề mặt gan chuột và thực hiện việc nhuộm H&E với hydrogel bám trên bề mặt mô gan sau 7 ngày (khung tỉ lệ = 500 μ m). (b) minh họa kết quả thu được nhờ việc cấy các tế bào gốc trung mô từ mô mỡ của người: “human adipose tissue-derived stem cell” (hADSC) lên trên gan chuột sử dụng HA-PG liên kết ngang bởi NaOH, và sau đó mô tả việc nhuộm hóa mô miễn dịch cùng với mô gan gốc và các hADSC có trong cấu trúc hydrogel theo sáng chế. Các tế bào ký hiệu là Dil đã được phát hiện ra trước khi cấy (trái). Nhuộm hóa mô miễn dịch được thực hiện đối với CD44 và nhân tế bào phản chất nhuộm bằng DAPI (phải) (khung tỉ lệ = 500 μ m)

FIG. 20 minh họa sự tạo gel của dung dịch HA-PG theo sáng chế nhờ khả năng oxy hóa trong cơ thể, trong đó FIG. 20(a) minh họa việc tiêm dung dịch HA-PG và sự tạo gel theo đó nhờ khả năng oxy hóa trong cơ thể; và FIG. 20(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc xác định da chuột có chứa hydrogel được tạo thành trong cơ thể.

FIG. 21 minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế trong da, và sau đó xác định xem hydrogel được tạo thành trong cơ thể có được duy trì trong cơ thể hay không, trong đó FIG. 5(a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định hydrogel được tạo thành trong cơ thể (tuần 0, 10, và 24); và FIG. 5(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc đo đặc sự thay đổi về trọng lượng của hydrogel được tạo thành trong cơ thể trong khoảng 6 tháng.

FIG. 22 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định điều kiện để hình thành hydrogel HA-PG có trong dung dịch HA-PG theo sáng chế và để tiêm dung dịch đó vào cơ thể, trong đó FIG. 22(a) minh họa biểu đồ thể hiện sự hình thành hydrogel HA-PG; và FIG. 22(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc so sánh cỡ kim tiêm dùng để tiêm vào cơ thể các sản phẩm chất làm đầy thông thường (Megafill, Perlane).

FIG. 23 minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế trong da, và sau đó xác định hiệu quả cải thiện nếp nhăn trước và sau khi tiêm, trong đó FIG. 23(a) minh họa kết quả thu được nhờ việc lấy mẫu da nhăn và so sánh; và FIG. 23(b) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định phạm vi, độ dài và độ sâu của các nếp nhăn và so sánh.

FIG. 24 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh với các sản phẩm chất làm đầy thông thường (Megafill, Perlane) với điều kiện có thể duy trì trong cơ thể, trong đó FIG. 24(a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm trong da dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane, sau đó nhận diện hydrogel được tạo thành trong cơ thể (ngày 0, 14, 28, 56, 84, 168, và 252); và FIG. 24(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc đo đạc sự thay đổi về trọng lượng của hydrogel được tạo thành trong cơ thể trong khoảng 9 tháng.

FIG. 25 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh với các sản phẩm chất làm đầy thông thường (Megafill, Perlane) với điều kiện có thể duy trì trong cơ thể, trong đó FIG. 25(a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm trong da dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane, sau đó nhận diện sự tạo thành hydrogel trong cơ thể (ngày 0, 14, 28, 56, 84, và 168); và FIG. 25(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc đo đạc sự thay đổi về lượng hydrogel tạo thành trong cơ thể trong khoảng 9 tháng.

FIG. 26 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định độ bám dính trong cơ thể của hydrol tạo thành trong cơ thể, trong đó FIG. 26(a) minh họa kết quả đối với

sản phẩm Perlane; và FIG. 26(b) minh họa các kết quả đối với dung dịch HA-PG (200 KDa, 1 MDa).

FIG. 27 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh với các sản phẩm chất làm đầy thông thường (Megafill, Perlane) với điều kiện có thể tiêm được, và các kết quả thu được theo đó nhờ việc xác định các thay đổi về lực đẩy ra khi tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane sử dụng kim tiêm các cỡ khác nhau (21G, 25G, 29G, 30G).

FIG. 28 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh với các sản phẩm chất làm đầy thông thường (Megafill, Perlane) với điều kiện có thể tiêm được, trong đó FIG. 28(a) minh họa kết quả thu được nhờ việc xác định các thay đổi về lực đẩy ra khi tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane sử dụng kim tiêm 30G; và FIG. 28(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc xác định các thay đổi về lực đẩy ra khi tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane sử dụng kim tiêm 29G.

FIG. 29 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh với các sản phẩm chất làm đầy thông thường (Megafill, Perlane) với điều kiện có thể tiêm được, trong đó FIG. 29(a) minh họa kết quả thu được nhờ việc so sánh lực sủi ra khi tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane sử dụng các kim tiêm có các cỡ khác nhau (21G, 25G, 29G, 30G); và FIG. 29(b) minh họa kết quả thu được nhờ việc so sánh lực trượt động lực khi tiêm dung dịch HA-PG theo sáng chế (200 KDa, 1 MDa), sản phẩm Megafill, và sản phẩm Perlane sử dụng kim tiêm các cỡ khác nhau (21G, 25G, 29G, 30G).

FIG. 30 minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm trong da dung dịch HA-PG theo sáng chế trong đó yếu tố tăng trưởng biểu mô (20 ng/ml, 1 µg/ml, 20 µg/ml) được bao nang, và tiếp theo xác định hiệu quả cải thiện nếp nhăn trước và sau khi tiêm, trong đó FIG. 30(a) minh họa các kết quả thu được nhờ việc lấy mẫu da nhăn và so

sánh; và FIG. 30(b) minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định phạm vi, độ dài và độ sâu của các nếp nhăn và so sánh.

FIG. 31 minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm trong da dung dịch HA-PG theo sáng chế, trong đó yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô (20 ng/ml, 1 μ g/ml, 20 μ g/ml) được bao nang, thực hiện việc nhuộm H&E các mẫu cắt đông lạnh OTC theo đó, và tiến hành xét nghiệm mô bệnh học.

FIG. 32 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh hiệu quả phục hồi mô da dần dần (1 tháng) giữa sản phẩm chất làm đầy thông thường (Perlane), dung dịch HA-PG, trong đó yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô không được bao nang, và dung dịch HA-PG theo sáng chế, trong đó yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô (10 μ g/ml) được bao nang, và các kết quả thu được theo đó nhờ thực hiện việc nhuộm H&E các mẫu cắt đông lạnh OTC theo đó và tiến hành xét nghiệm mô bệnh học.

FIG. 33 minh họa các kết quả thu được nhờ việc so sánh hiệu quả phục hồi mô da dần dần (1 tháng) giữa sản phẩm chất làm đầy thông thường (Perlane), dung dịch HA-PG, trong đó yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô không được bao nang, và dung dịch HA-PG theo sáng chế, trong đó yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô (10 μ g/ml) được bao nang, và các kết quả thu được theo đó nhờ thực hiện phương pháp nhuộm ba màu của Masson (MT) các mẫu cắt đông lạnh OTC theo đó và tiến hành xét nghiệm mô bệnh học.

FIG. 34 minh họa các kết quả thu được nhờ việc sử dụng dung dịch HA-PG theo sáng chế cho chỗ bị thương, và sau đó xác định hydrogel có được tạo thành ở chỗ bị thương hay không, và nhờ thể hydrogel được dính chặt vào đó.

FIG. 35 minh họa mô tả vắn tắt quy trình bào chế dung dịch HA-PG theo sáng chế thành dạng bột.

FIG. 36 minh họa các kết quả thu được nhờ việc tiêm trong da dung dịch HA-PG theo sáng chế đã được hòa tan lại từ dạng bột đông khô của nó, và sau đó xác định hydrogel tạo thành trong cơ thể.

FIG. 37 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định độ ổn định bảo quản của dung dịch HA-PG theo sáng chế, và các kết quả thu được theo đó nhờ việc xác định xem dung dịch HA-PG có tạo gel trong côngtenơ bảo quản hay không trong quá trình cất giữ dung dịch HA-PG ở nhiệt độ phòng (25°C) hoặc trong tình trạng được làm lạnh (4°C).

FIG. 38 minh họa các kết quả thu được nhờ việc xác định độ ổn định bảo quản của dung dịch HA-PG theo sáng chế. Khí nitơ được phun vào côngtenơ bảo quản để ngăn tiếp xúc giữa dung dịch HA-PG và khí oxy, và sau đó dung dịch HA-PG được bảo quản trong tình trạng được làm lạnh (4°C) trong 3 ngày; mặt khác, dung dịch HA-PG được bảo quản trong tình trạng đông lạnh (-80°C) trong 10 ngày. Sau đó, các dung dịch này được tiêm trong da, và hydrogel tạo thành trong cơ thể được nhận diện, nhờ đó thu được kết quả.

Mô tả chi tiết sáng chế

Từ phần dưới đây, sáng chế đề xuất sẽ được mô tả chi tiết.

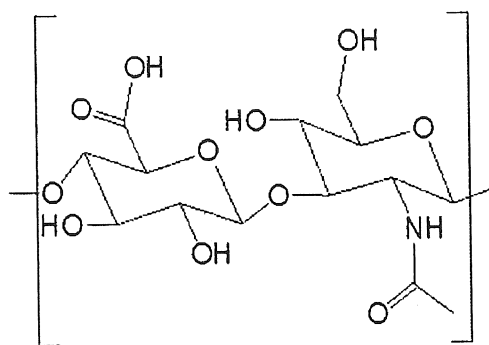
Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hydrogel của axit hyaluronic, phương pháp bao gồm bước tạo liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất được sửa đổi bởi nhóm galol, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol nhờ phản ứng giữa axit hyaluronic và 5'-hydroxydopamin.

Thuật ngữ "axit hyaluronic" (HA) sử dụng trong tài liệu này đề cập đến polysacarit mạch thẳng cao phân tử chứa disacarit làm đơn vị cấu trúc, trong đó axit D-glucuronic (GlcA) và N-axetyl-D-glucosamin (GlcNAc) được liên kết bởi liên kết β 1,3-glycosidic, và bao gồm cả axit hyaluronic và muối của nó. Đối với muối, muối

natri, muối kali, muối magie, muối canxi, muối nhôm, và các muối tương tự được lấy làm ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Đơn vị cấu trúc disacarit của axit hyaluronic có Công thức 4, và có giá trị trong khoảng 1 đến 1,000, nhưng không bị giới hạn ở đó.

[Công thức 4]

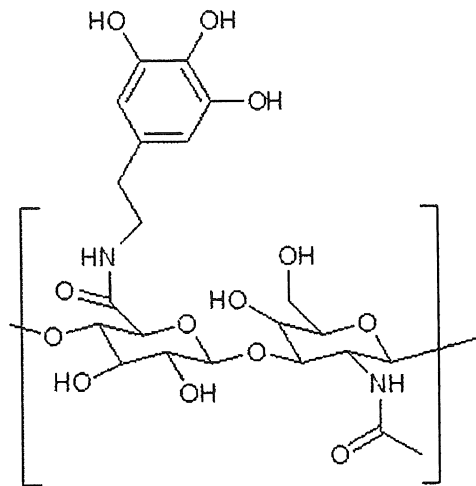


Axit hyaluronic có trong dịch thủy tinh thể mắt, hoạt dịch khớp, mào gà, và các dạng tương tự, và được biết đến như là vật liệu sinh học có tính tương hợp sinh học cao. Mặc dù hydrogel của axit hyaluronic có tính ứng dụng cao đối với vật liệu sinh học, tính chất cơ học bị giới hạn do polyme tự nhiên bản thân nó khiến cho hydrogel của axit hyaluronic khó có thể áp dụng làm vật liệu sinh học (ví dụ, chất mang dẫn truyền thuốc, giá đỡ dùng cho công nghệ mô). Vì thế, các tác giả đã đưa nhóm galol có tính oxy hóa cao vào axit hyaluronic để điều chế dẫn xuất của axit hyaluronic (Ví dụ thực hiện 1), và tạo thành liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic trong điều kiện oxy hóa thích hợp và chỉ số pH cụ thể (pH 8 đến 9) để điều chế hydrogel (Ví dụ thực hiện 2). Theo đó, sáng chế có sự khác biệt kỹ thuật về tính chất vật lý như là tỉ lệ liên kết ngang, tính đàn hồi, và độ bám dính của hydrogel được kiểm soát hiệu quả (Ví dụ 1 và 3).

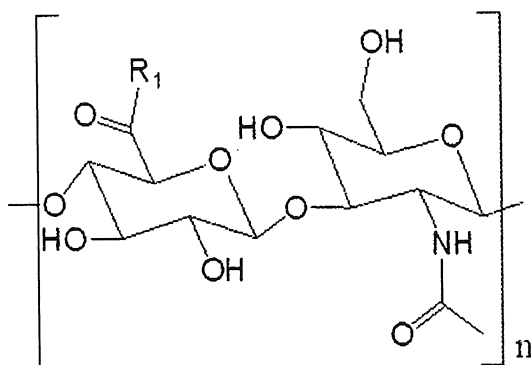
Thuật ngữ "dẫn xuất của axit hyaluronic" hay "axit hyaluronic-liên kết pyrogallol" được sử dụng trong tài liệu này được hiểu là bao gồm cả axit hyaluronic hoặc muối của nó, trong đó nhóm galol được đưa vào kết cấu của axit glucuronic có trong axit hyaluronic hoặc muối của nó.

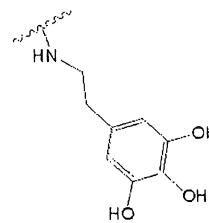
Theo một phương án, dẫn xuất của axit hyaluronic được điều chế bởi phản ứng giữa đầu mút của đơn vị lặp disacarit có Công thức 4, cụ thể là, nhóm cacboxyl và 5'-hydroxydopamin. Dẫn xuất của axit hyaluronic được điều chế bởi phản ứng chứa ít nhất một đơn vị lặp có Công thức 5, và có Công thức 1.

[Công thức 5]



[Công thức 1]





(Trong Công thức 1, R_1 là nhóm hydroxyl hoặc , và n là số nguyên từ 1 đến 1,000.)

Ngoài ra, dẫn xuất của axit hyaluronic có khối lượng phân tử 10.000 Da đến 2.000.000 Da, và dẫn xuất của axit hyaluronic có tỉ lệ thay thế nhóm galol 0,1% đến 50%, tuy nhiên tỉ lệ thay thế nhóm pyrogallol không bị giới hạn theo đó.

"Tỉ lệ thay thế" nghĩa là một nhóm chức cụ thể có trong axit hyaluronic hoặc muối của nó được thay thế hoặc sửa đổi bởi nhóm galol. Tỉ lệ được thay thế bởi nhóm galol được xác định là tỉ lệ đơn vị lặp, trong đó nhóm galol được đưa vào toàn bộ các đơn vị lặp axit hyaluronic, và được thể hiện bằng việc xác định giá trị số từ lớn hơn 0 đến nhỏ hơn hoặc bằng 1, giá trị số từ lớn hơn 0% đến nhỏ hơn hoặc bằng 100%, hoặc giá trị số từ lớn hơn 0% mol đến nhỏ hơn hoặc bằng 100% mol.

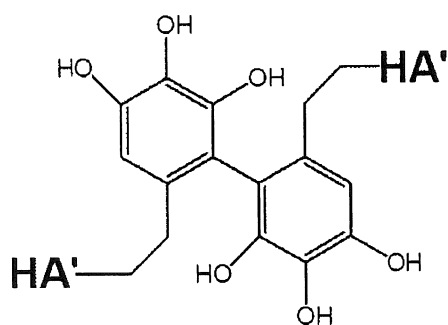
Thuật ngữ "hydrogel" được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa cấu trúc ba chiều của polyme thấm nước giữ lại một lượng hiệu quả độ ẩm. Theo mục đích của sáng chế, hydrogel nghĩa là hydrogel được tạo thành bởi các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất được sửa đổi bởi nhóm galol.

Quy trình điều chế hydrogel của axit hyaluronic được thực hiện bởi phản ứng tạo thành liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic. Để có phản ứng tạo thành liên kết ngang, quy trình còn bao gồm bước hòa lẫn các dẫn xuất của axit hyaluronic với PBS và chất tương tự để điều chế dung dịch tiền chất hydrogel của axit hyaluronic. Liên kết ngang này được thực hiện bởi liên kết ngang hóa học gây ra do sự chiếu tia UV, liên kết ngang vật lý, hoặc liên kết ngang sinh học, để tạo thành hydrogel. Ở đây, liên kết ngang hóa học gây ra do sự chiếu tia UV bao gồm liên kết ngang quang, liên kết ngang sử dụng chất tạo liên kết ngang phản ứng, hoặc các loại tương tự. Liên kết ngang sinh học bao gồm liên kết ngang áp dụng lực liên kết giữa

heparin và yếu tố tăng trưởng, liên kết ngang sử dụng liên kết bổ sung DNA hoặc các loại tương tự. Liên kết ngang vật lý bao gồm liên kết ngang được tạo thành bởi liên kết hydro, liên kết ngang được tạo thành bởi tương tác chất kỵ nước, liên kết ngang sử dụng tương tác tĩnh điện, hoặc các loại tương tự. Tốt hơn là, liên kết ngang được thực hiện bằng việc bổ sung chất oxy hóa hoặc chất điều chỉnh pH. Chất oxy hóa có thể là natri periodat, hydro peroxit, peroxidaza cải ngựa, hoặc tyrosinaza, và chất điều chỉnh pH có thể là natri hydroxit, liti hydroxit, kali hydroxit, rubidi hydroxit, xesi hydroxit, magie hydroxit, canxi hydroxit, stronti hydroxit, hoặc bari hydroxit. Tuy nhiên, chất oxy hóa và chất điều chỉnh pH không bị giới hạn theo đó.

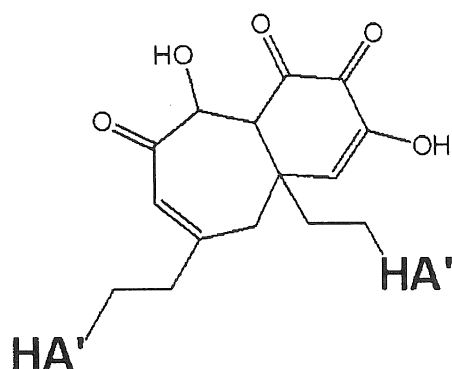
Theo một phương án, trường hợp chất oxy hóa được bổ sung và liên kết ngang được thực hiện, liên kết ngang có Công thức 2 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic. Trong Công thức 2, HA' là axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thay thế bởi nhóm amit.

[Công thức 2]



Theo một phương án khác, trường hợp chất điều chỉnh pH được bổ sung và liên kết ngang được thực hiện, liên kết ngang có Công thức 3 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic. Trong Công thức 3, HA' là axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thay thế bởi nhóm amit.

[Công thức 3]



Theo một phương án của sáng chế, ở bước tạo thành liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất được sửa đổi bởi nhóm galol, hydrogel của axit hyaluronic lần lượt được điều chế bởi việc sử dụng natri periodat là chất oxy hóa, hoặc natri hydroxit là chất điều chỉnh pH (xem Ví dụ thực hiện 2). Kết quả là có khả năng xác định các hydrogel của axit hyaluronic được điều chế theo các phương pháp tạo liên kết ngang tương ứng với các khác biệt đáng kể về tính chất vật lý như tỉ lệ liên kết ngang, tính bền vững, tính đàn hồi, độ bám dính, và dạng phân hủy, cùng với tính tương hợp sinh học tuyệt vời (xem Ví dụ 1 đến 3).

Theo một phương án của sáng chế, chất làm đầy được đề xuất bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic hoặc hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế. Chất làm đầy theo sáng chế có dạng lỏng hoặc dạng dung dịch, trong đó các dẫn xuất của axit hyaluronic có nhóm galol đưa vào được hòa tan trong môi trường nước. Cụ thể, trường hợp tiêm vào cơ thể là dung dịch, mặc dù không chứa thành phần tạo liên kết ngang, vẫn có thể tạo thành hydrogel chỉ với khả năng oxy hóa trong cơ thể mà không có độ lệch giữa các cá nhân với nhau, do đó đáp ứng việc làm đầy mô da và duy trì độ ẩm trong da. Theo một phương án, môi trường nước là dung dịch muối đệm phosphate: “phosphate buffered saline” (PBS), và dẫn xuất của axit hyaluronic chứa một lượng tốt hơn là 0,1% (trọng lượng/ thể tích) đến 20,0% (trọng lượng/ thể tích), và tốt hơn nữa là 0,3% (trọng lượng/ thể tích) đến 10,0% (trọng lượng/ thể tích), trong toàn bộ chất làm đầy. Tuy nhiên, nhiều sửa đổi và thay đổi khác nhau đã được tiến hành dựa

trên môi trường nước và tỉ lệ chứa trong chất làm đầy đã được biết đến trong cùng lĩnh vực.

Thuật ngữ "chất làm đầy" được sử dụng trong tài liệu này là vật liệu tiêm để làm đầy mô da, ví dụ tiêm vật liệu có tính tương hợp sinh học trong hoặc dưới da để cải thiện các nếp nhăn và phục hồi thẩm mỹ. Hiện nay, các vật liệu để điều chế chất làm đầy đã được chấp thuận bởi FDA hoặc MFDS là collagen, axit hyaluronic, canxi hydroxyapatit, axit polylactic, và các chất tương tự đã được đề cập đến. Trong số đó, axit hyaluronic là vật liệu tương tự yếu tố cấu tạo cơ thể người và có thể sử dụng mà không cần thử nghiệm phản ứng với da; và axit hyaluronic có đặc điểm hút 214 phân tử nước mỗi phân tử, do đó duy trì hiệu quả độ ẩm trong da. Vì vậy, axit hyaluronic gần đây chiếm khoảng 90% thị trường chất làm đầy. Do việc sử dụng dẫn xuất của axit hyaluronic, trong đó nhóm galol có khả năng oxy hóa cao được đưa vào, chất làm đầy theo sáng chế có thể tạo thành hydrogel chỉ với khả năng oxy hóa trong cơ thể mà không cần điều kiện chất tạo liên kết ngang, nhờ đó khả năng tương hợp sinh học được tăng cường, và hydrogel nói trên được tạo thành trong cơ thể có thể duy trì hình dạng của nó ở trạng thái rõ ràng trong một thời gian dài (ít nhất là 6 tháng). Do vậy, chất làm đầy có sự khác biệt kỹ thuật ở việc thể hiện hiệu quả cải thiện nếp nhăn tuyệt vời dựa trên các đặc điểm của axit hyaluronic như được mô tả ở phần trên, có độ bám dính và tính ổn định tuyệt vời trong cơ thể khi so sánh với các sản phẩm chất làm đầy thông thường, và có thể được tiêm ổn định vào vị trí đã định mà không phụ thuộc lực đẩy ra (Ví dụ 2 và 3).

Ngoài ra, chất làm đầy theo sáng chế còn được bào chế dưới dạng bột, và cụ thể hơn là dưới dạng bột đông khô, nhằm đem lại việc sử dụng dễ dàng và độ ổn định bảo quản. Mặt khác, chất làm đầy nói trên yêu cầu bước xử lý trước, trong đó nó được hòa tan trong môi trường nước như là PBS và làm hòa tan trước khi được tiêm trong da. Tuy nhiên, cũng có khả năng áp dụng trực tiếp chất làm đầy, đã được làm dưới dạng dung dịch, phụ thuộc sự bảo quản và điều kiện đưa ra theo đó.

Theo một phương án khác, nhằm tăng hiệu quả phục hồi da, chất làm đầy theo sáng chế còn chứa yếu tố tăng trưởng tế bào hoặc vitamin. Yếu tố tăng trưởng tế bào đề cập chung đến polypeptit giúp phân chia tế bào, sự tăng trưởng, và sự phân hóa, và tốt hơn là được lựa chọn trong nhóm bao gồm yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì (EGF), yếu tố tăng trưởng tế bào sừng (KGF), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng alpha (TGF- α), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố tăng trưởng từ tiểu cầu-BB (PDGF-BB), yếu tố tế bào thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF), và yếu tố thần kinh đệm (GDNF). Yếu tố tăng trưởng tế bào có thể chứa lượng 20 ng/ml đến 20 μ g/ml, nhưng không giới hạn chỉ trong khoảng này.

Theo một phương án khác nữa, chất làm đầy theo sáng chế còn chứa thuốc gây tê cục bộ để giảm đau trong quá trình tiêm. Thuốc gây tê cục bộ có thể được chọn trong nhóm bao gồm ambucain, amolanon, amylocain, benoxinat, benzocain, betoxycain, biphenamin, bupivacain, butacain, butamben, butanilicain, butetamin, butoxycain, caticain, cloprocain, cocaetylen, cocain, xyclometicain, dibucain, dimetisoquin, dimetocain, diferodon, dyxyclonin, ecgonidin, ecgonin, etyl clorua, etidocain, beta-eucain, euprocin, fenalcomin, fomocain, hexylcain, hydroxytetacain, isobutyl p-aminobenzoat, leuxinocain mesylat, levoxadrol, lidocain, mepivacain, meprylcain, metabutoxycain, metyl clorua, mytecain, naepain, octacain, ortocain, oxetazain, paretoxycain, phenacain, phenol, piperocain, piridocain, polidocanol, pramoxin, prilocain, procain, propanocain, proparacain, propipocain, propoxycain, pseudococain, pyrocain, ropivacain, bupivacain, rượu salixyl, tetracain, tolycain, trimecain, zolamin, và muối của chúng. Thuốc gây tê chứa một lượng tốt hơn là 0,1% theo trọng lượng đến 5,0% theo trọng lượng, và tốt hơn nữa là 0,2% theo trọng lượng đến 1,0% theo trọng lượng so với khối lượng của toàn bộ chất làm đầy, nhưng không giới hạn chỉ nằm trong khoảng đó.

Theo một phương án khác, chất làm đầy theo sáng chế còn bao gồm chất chống oxy hóa nhằm ngăn ngừa sự oxy hóa và sự phân hủy của hydrogel hình thành nhờ được tạo gel trong cơ thể. Chất chống oxy hóa được lựa chọn trong nhóm bao gồm polyol, manitol, và sobitol. Chất chống oxy hóa được lựa chọn trong nhóm bao gồm 0,1% theo trọng lượng đến 5.0% theo trọng lượng, và tốt hơn nữa là 0.2% theo trọng lượng đến 1.0% theo trọng lượng so với khối lượng của toàn bộ chất làm đầy, nhưng không giới hạn chỉ ở trong khoảng đó.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chất làm đầy, bao gồm bước đưa nhóm galol vào khung của axit glucuronic có trong axit hyaluronic, để điều chế dẫn xuất của axit hyaluronic; và bước bổ sung dẫn xuất của axit hyaluronic vào môi trường nước và thực hiện sự hòa lẫn.

Theo sáng chế, bước bổ sung dẫn xuất của axit hyaluronic vào môi trường nước và thực hiện sự hòa lẫn, tốt hơn là được thực hiện với trạng thái, trong đó việc tiếp xúc với khí oxy và các nguồn oxy hóa khác bị phong tỏa (ví dụ, bằng việc tiêm khí nitơ) trong điều kiện khoảng 4°C đến 28°C và/ hoặc độ pH 4 đến 8 trước khi tiêm, nhằm ngăn chặn sự tạo gel chất làm đầy ở trạng thái lỏng .

Theo một phương án, môi trường nước là dung dịch muối đệm phosphat (PBS), và dẫn xuất axit hyaluronic có Công thức 1 được hình thành bởi phản ứng giữa axit hyaluronic và 5'-hydroxydopamin. Chất làm đầy theo sáng chế được điều chế nhờ việc bổ sung yếu tố tăng trưởng tế bào, thuốc gây tê cục bộ, chất chống oxy hóa, vitamin, và hợp chất của chúng.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, đưa ra phương pháp cải thiện nếp nhăn trên da, bao gồm bước tiêm chất làm đầy trong hoặc dưới da của cá thể. Theo sáng chế đề xuất, vị trí định áp dụng chất làm đầy có thể là bất kỳ điểm nào của cơ thể như khuôn mặt, cổ, tai, ngực, hông, cánh tay và bàn tay của cá thể, và tốt hơn là trên bất kỳ điểm nào là vùng bị nhăn da và được chọn từ nhóm bao gồm vùng rãnh nước mắt, vùng nếp nhăn giữa hai chân mày, vùng khóe mắt, vùng trán, vùng sống mũi, vùng

nếp nhăn rãnh mũi, vùng rãnh môi-hàm, và vùng nếp nhăn cổ. Tuy nhiên, điểm áp dụng không chỉ giới hạn ở đây. Ngoài ra, theo sáng chế, thuật ngữ "cá thể" nghĩa là đối tượng cần cải thiện da nhăn, và cụ thể hơn là bao gồm tất cả mọi người, động vật linh trưởng và các đối tượng tương tự.

Cụ thể là, chất làm đầy theo sáng chế có thể dễ dàng tiêm vào vị trí đã định mà không cần quan tâm đến lực đẩy ra. Ở bước tiêm, chất làm đầy có thể được tiêm trong hoặc dưới da sử dụng kim tiêm và ống thông các cỡ khác nhau. Ví dụ phương pháp tiêm chất làm đầy là phương pháp tiêm đa điểm, trong đó việc tiêm nhiều lần được thực hiện với từng lượng nhỏ một; phương pháp tiêm đường thẳng, trong đó kim tiêm được tiêm xuống sâu khoảng 10 mm, và sau đó việc tiêm được thực hiện với từng lượng nhỏ một trong quá trình rút kim ra; phương pháp tiêm hình quạt, trong đó kim tiêm chỉ chọc một lần, và sau đó phương pháp tiêm đường thẳng được thực hiện lặp đi lặp lại theo cách thức giống nhau với các góc tiêm xoay nhẹ mà không dịch chuyển kim tiêm; và các phương pháp tương tự được sử dụng.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, đề xuất axit hydrogel hyaluronic được điều chế bởi việc tạo thành liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất có Công thức 1, trong đó liên kết ngang có Công thức 2 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic; và chất mang dẫn truyền thuốc, hệ dẫn truyền thuốc, hoặc giá đỡ dùng cho công nghệ mô có chứa hydrogel của axit hyaluronic.

Ngoài ra, theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, đề xuất hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi việc tạo thành liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic, mỗi dẫn xuất có Công thức 1, trong đó liên kết ngang có Công thức 3 được tạo thành giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic; và chất mang dẫn truyền thuốc, hệ dẫn truyền thuốc, hoặc giá đỡ dùng cho công nghệ mô có chứa hydrogel của axit hyaluronic.

Hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế có thể được sử dụng làm ma trận ngoại bào nhân tạo để tạo khung hiệu quả cho việc dẫn truyền thuốc, và có khác biệt

kỹ thuật ở chỗ dạng vi hạt của nó theo đơn vị nano hoặc micrô có thể được bổ sung do khả năng oxy hóa cao của dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol. Thuốc không bị giới hạn cụ thể, và tốt hơn là bao gồm không giới hạn cơ chất hóa học, tiểu phân tử, peptit, kháng thể, mảnh kháng thể, axit nucleic bao gồm DNA, RNA, hoặc siRNA, protein, gen, vi rút, vi khuẩn, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm, chất chống ung thư, chất kháng viêm, hỗn hợp của chúng, và các chất tương tự.

Ngoài ra, hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế có thể được sử dụng làm giá đỡ dùng cho công nghệ mô dựa trên tính đàn hồi và độ bám dính tuyệt vời. Công nghệ mô nghĩa là các tế bào hoặc tế bào gốc được tách ra từ mô của người bệnh được nuôi cấy trên giá đỡ để điều chế một phức hợp giá đỡ tế bào, và sau đó phức hợp giá đỡ tế bào đã được điều chế được cấy ghép trở lại vào cơ thể sống. Hydrogel của axit hyaluronic được bổ sung vào giá đỡ tương tự cho mô sinh học nhằm tối ưu hóa sự phục hồi của các bộ phận và các mô sinh học. Vì vậy, hydrogel của axit hyaluronic có thể sử dụng cho liệu pháp gen hoặc liệu pháp tế bào.

Ngoài ra, hydrogel theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm vật liệu mỹ phẩm và y tế như nhân tố làm lành vết thương, vật liệu bao phủ vết thương, màng chống bám dính, hoặc làm khuôn răng. Tuy nhiên, việc sử dụng hydrogel theo sáng chế không bị giới hạn chỉ trong phạm vi này.

Dưới đây, các ví dụ được ưu tiên sẽ được mô tả nhằm hiểu rõ sáng chế. Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây được đưa ra chỉ nhằm hiểu rõ sáng chế dễ dàng hơn, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi những ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ thực hiện 1: Điều chế dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol

Như được minh họa trong FIG. 1, dẫn xuất của axit hyaluronic được sửa đổi bởi nhóm galol theo sáng chế được điều chế. Cụ thể là, axit hyaluronic (MW 200K, Lifecore Biomedical, LLC, IL, USA) được hòa tan hoàn toàn trong nước (TDW), và 1

đương lượng N-hydroxysuccinimit (NHS, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) và 1.5 đương lượng 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimite hydroclorua (EDC, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) được bổ sung vào. Sau 30 phút, 1 đương lượng 5'-hydroxydopamin (Sigma-Aldrich, Inc.) được bổ sung vào làm gốc nhóm PG và kết quả là cho phép xảy ra phản ứng ở pH từ 4 đến 4.5 trong 24 giờ. Các chất phản ứng có hai tỉ lệ phân tử khác nhau được sử dụng để điều chế chất liên kết HA-PG (HA:EDC:NHS:PG = 1:1.5:1:1 hoặc 2:1.5:1:1). Sau đó, EDC, NHS, và 5'-hydroxydopamin bị loại bỏ bằng cách thẩm tách dựa trên PBS và nước (Cellu/Sep (tên thương mại), màng thẩm tách (6.8 kDa bị loại, Membrane Filtration Products Inc., Seguin, TX, USA)), và dung môi bị bay hơi qua quá trình đông khô để điều chế dẫn xuất của axit hyaluronic theo sáng chế. Để xác định sự tổng hợp dẫn xuất của axit hyaluronic, việc phân tích đã được thực hiện bởi phổ hồng ngoại biến đổi: Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) (Vertex 70, Bruker, Billerica, MA, USA) và cộng hưởng từ hạt nhân proton (H-NMR) (Bruker 400 MHz, Bruker). Kết quả như được minh họa trong FIG. 2(a), có khả năng xác định liên kết amit được tạo mới thông qua đỉnh mạnh nằm trong vùng số sóng từ khoảng $1,580\text{ cm}^{-1}$ đến $1,700\text{ cm}^{-1}$, và như được minh họa trong FIG. 2(b), có khả năng xác định các cấu trúc của vòng benzene thơm và $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ trong 5'-hydroxydopamin tương ứng thông qua các đỉnh ở vùng lân cận 6.5 ppm và 3 ppm. Dựa vào kết quả trên, tìm thấy 5'-hydroxydopamin được đưa vào dẫn xuất của axit hyaluronic theo sáng chế nhờ liên kết amit được tạo thành giữa nhóm cacboxyl của axit hyaluronic và nhóm amit của 5'-hydroxydopamin. Để tính độ thay thế của nhóm galol tương ứng với khung HA, chất liên kết HA-PG được hòa tan trong PBS (pH 5) ở 1 mg/ml và độ hấp thụ của dung dịch đo được là 283 nm (UV-máy quang phổ tử ngoại) (Cary 100 UV-vis, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)). Tỷ lệ phần trăm của các nhóm carboxy được thay thế bởi PG trong HA được tính toán dựa trên đường cong tiêu chuẩn đạt được nhờ việc pha loãng dần dung dịch 5'-hydroxydopamin (từ nồng độ 1 mg/mL).

Ví dụ thực hiện 2: Điều chế hydrogel của axit hyaluronic

Các dẫn xuất của axit hyaluronic theo Ví dụ thực hiện 1 được tạo thành liên kết ngang để điều chế hydrogel của axit hyaluronic, trong đó mỗi phương pháp tạo thành liên kết ngang sử dụng natri periodat (NaIO_4) làm chất oxy hóa hoặc natri hydroxit (NaOH) làm chất điều chỉnh pH (pH 8 đến 9). Cụ thể là, các dẫn xuất của axit hyaluronic được hòa tan trong PBS (1% (trọng lượng/ thể tích), 2% (trọng lượng/ thể tích)), từ đó cho phép thực hiện việc tạo thành liên kết ngang trong khi thực hiện hòa lẫn NaIO_4 4,5 mg/ml hoặc NaOH 0,08 M với tỉ lệ thể tích 1.5:1 đến 4:1 so với dung dịch dẫn xuất của axit hyaluronic. Như được minh họa trong FIG. 3, với mỗi phương pháp tạo liên kết ngang, hydrogel của axit hyaluronic màu nâu sáng hoặc hydrogel của axit hyaluronic màu xanh được điều chế.

Để xác định cụ thể việc tạo thành liên kết ngang của hydrogel của axit hyaluronic, sự phân tích được thực hiện với máy quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-vis). Trường hợp sử dụng NaIO_4 như được minh họa trong FIG. 4, vùng bước sóng xác định trong khoảng từ 350 đến 400 nm được thay đổi dần dần (FIG. 4(a)), nghĩa là sự tạo thành cùng lúc và giảm các gốc là các sản phẩm trung gian trong quá trình oxy hóa; và khi đó biphenol được tạo thành nhờ sự polyme hóa gốc (FIG. 4(b)). Ngoài ra, trường hợp sử dụng NaOH như được minh họa trong FIG. 5, vùng bước sóng xác định trong khoảng từ 600 nm được thay đổi dần dần (FIG. 5(a)); từ kết quả này, phức chất chuyển điện tích và benzotropolon được tạo thành nhờ sự hỗn biến hóa [5+2] trong quá trình oxy hóa (FIG. 5(b)).

[Các ví dụ]

Ví dụ 1. Những thay đổi về tính chất vật lý của hydrogel của axit hyaluronic phụ thuộc phương pháp tạo liên kết ngang

Trong ví dụ này, những thay đổi về tính chất vật lý của các hydrogel của axit hyaluronic được so sánh dựa trên sự khác biệt về phương pháp tạo liên kết ngang trong Ví dụ thực hiện 2. Mặt khác, ở bước điều chế hydrogel, tỉ lệ nồng độ phân tử của

axit hyaluronic và 5'-hydroxydopamin là (0,5X (HA:EDC:NHS:5'-hydroxydopamin = 2:1.5:1:1), 1X (HA:EDC:NHS:5'-hydroxydopamin = 1:1.5:1:1)) có thể được dùng để đánh giá tỉ lệ bị thay thế bởi nhóm galol từ 4% đến 5% (0,5X) hoặc 8% đến 9% (1X) (không được thể hiện), và những thay đổi về tính chất vật lý của các hydrogel dựa trên mức độ thay thế 5'-hydroxydopamin cũng được so sánh. Cụ thể là, việc tạo thành hydrogel và những thay đổi dần dần của mô đun đàn hồi đã được so sánh dựa trên các phương pháp tạo liên kết ngang; và tính đàn hồi, độ bám dính, sự trương ra, và các mẫu phân hủy dựa trên phương pháp tạo liên kết ngang và mức độ thay thế 5'-hydroxydopamin lần lượt được so sánh và phân tích.

1-1. So sánh tỉ lệ tạo thành hydrogel của axit hyaluronic

Như được minh họa trong FIG. 6(a), trường hợp sử dụng NaIO_4 , hydrogel màu nâu sáng được tạo thành ngay lập tức nhờ phản ứng tạo liên kết ngang tức thời; mặt khác, trường hợp sử dụng NaOH , hydrogel màu xanh được tạo thành tương đối chậm. Ngoài ra, các mô đun tích trữ (G') và các mô đun tổn hao (G'') được đo đạc, và các kết quả đo được so sánh với các mô đun đối với hydrogel (HA-CA(NaIO_4)) thu được nhờ liên kết ngang các dẫn xuất của axit hyaluronic sử dụng NaIO_4 , trong mỗi dẫn xuất được đưa vào nhóm catechin. Kết quả như được minh họa trong FIG. 6(b), tất cả hydrogel được tạo thành ổn định nhờ quá trình oxy hóa được thực hiện ($G' > G''$). Cụ thể, thời điểm mà tại đó hydrogel được tạo thành được xác định là thời điểm mà tại đó đường cong mô đun tích trữ và đường cong mô đun tổn hao tiếp xúc lẫn nhau, cần khoảng 2 đến 3 phút để tạo liên kết ngang sử dụng NaOH , và khoảng 30 giây cho việc tạo thành HA-CA (NaIO_4); mặt khác, trong trường hợp tạo liên kết ngang sử dụng NaIO_4 , liên kết ngang được thực hiện quá nhanh đến nỗi không thể thực hiện việc đo đạc.

Hệ số nhớt của axit hyaluronic được phân tích bằng cách đo các mô đun tích trữ (G') và các mô đun tổn hao (G'') với phạm vi chế độ quét tần số nằm trong dải tần số từ 0,1 đến 1 Hz. Tính đàn hồi của axit hyaluronic được tính bằng cách chia hệ số tích trữ cho hệ số tổn hao ở 1 Hz ($n = 45$). Động lực tạo gel của HA-PG được đo bởi

lưu biến kế (MCR 102, Anton Paar, VA, USA) trong chế độ quét thời gian ở biên dạng và tần số được không chế lần lượt là 10% và 1 Hz. Hai chất oxy hóa (NaIO_4 và NaOH) được bổ sung 30 phút sau đo đặc ban đầu G' và G'' . Tính bám dính của hydrogel được đo bởi việc ghi lại ứng suất tách ra của hydrogel đã được tạo liên kết ngang hoàn toàn giữa mẫu thử và lớp nền trong lưu biến kế (MCR 102, Anton Paar) ($n = 3$). Tốc độ kéo cho mẫu thử là $5 \mu\text{m}/\text{giây}$.

1-2. So sánh tính đàn hồi và độ bám dính

Như được minh họa trong FIG. 7(a), mặc dù có những khác biệt về phương pháp tạo liên kết ngang hoặc mức độ thay thế 5'-hydroxydopamin, trong tất cả các trường hợp, các mô đun tích trữ (G') đo được cao hơn ở mức độ nhất định so với các mô đun tổn hao (G''), nhờ đó có thể xác định các hydrogel được tạo thành ổn định. Ngoài ra, mô đun đàn hồi thể hiện tính bền vững của hydrogel và tang δ (G''/G') thể hiện mức độ đàn hồi được tính toán. Kết quả như được minh họa trong FIG. 7(b), trong trường hợp sử dụng NaIO_4 , tính bền vững tốt hơn của hydrogel được thể hiện và tất cả các hydrogel có lực đàn hồi tuyệt vời thậm chí ở tỉ lệ thay thế thấp; mặt khác, trong trường hợp sử dụng NaOH , lực đàn hồi tốt hơn thu được nhờ tỉ lệ thay thế tăng. Ngoài ra, trong trường hợp phương pháp tạo thành liên kết ngang giống nhau, các tính chất vật lý tuyệt vời tương ứng này cũng được cải thiện do tỉ lệ thay thế 5'-hydroxydopamin tăng ($0,5X < 1X$). Ngoài ra, dựa vào các kết quả trên, các khác biệt về tính chất vật lý của các hydrogel tạo liên kết ngang bởi NaIO_4 được xác định, phụ thuộc các khối lượng phân tử (40, 200, 500 kDa) và các nồng độ (1% (trọng lượng/ thể tích), 2% (trọng lượng/ thể tích)) của các dẫn xuất của axit hyaluronic. Kết quả như được minh họa trong FIG. 8, trong tất cả các trường hợp, các mô đun tích trữ (G') đo được cao hơn ở mức độ nhất định so với các mô đun tổn hao (G''), nhờ đó có thể xác định các hydrogel được tạo thành ổn định (FIG. 8(a)); và hydrogel còn thể hiện tính bền vững và lực đàn hồi được cải thiện hơn do axit hyaluronic có khối lượng phân tử tăng và có nồng độ cao hơn (FIG. 8(b)). Ngoài ra, để ước lượng độ bám dính của các hydrogel, mỗi hydrogel được liên kết giữa các lớp tương ứng của dụng cụ lưu

biến (Bohlin Advanced Rheometer, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) và lực áp vào dụng cụ được đo trong khi tăng khoảng cách giữa các lớp. Các kết quả trên được so sánh với hydrogel (HA-CA(NaIO_4)) thu được bởi các dẫn xuất của axit hyaluronic có liên kết ngang sử dụng NaIO_4 , trong mỗi dẫn xuất nhóm catechin được đưa vào. Kết quả như được minh họa trong FIG. 9, hydrogel được tạo thành nhờ việc sử dụng NaOH và HA-CA (NaIO_4) thể hiện độ bám dính tốt hơn, trong khi đó ở hydrogel được tạo thành bởi việc sử dụng NaIO_4 thì hầu như không quan sát thấy có độ bám dính nào.

1-3. So sánh các mẫu trương lên và phân hủy

Như được minh họa trong FIG. 10, có sự khác biệt không đáng kể về sự trương lên và phân hủy của các mẫu, phụ thuộc phương pháp tạo liên kết ngang và mức độ thay thế của 5'-hydroxydopamin. Đặc điểm trương lên đã được đánh giá nhờ việc đo trọng lượng của các hydrogel còn lại ở các thời điểm cụ thể (ngày 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, và 28). Cụ thể là, HA-PG được ủ ở nhiệt độ 37°C trong PBS, tỉ lệ trương lên được tính bằng biểu thức sau: $(W_t - W_i)/W_i \times 100$, trong đó W_t là trọng lượng của hydrogel tại mỗi thời điểm, và W_i là trọng lượng của hydrogel tại thời điểm ban đầu ($n = 4$ đến 5). Để nghiên cứu mẫu phân hủy, hydrogel HA-PG đã trương lên trong 3 ngày được xử lý bởi men hialuronidaza (5 đơn vị/mL, Sigma) và trọng lượng của axit hyaluronic còn lại được đo ở các thời điểm tương ứng ($n = 4$ đến 7, 0, 2, 5, 12, 24, 48, và 72 giờ). Trường hợp sử dụng NaIO_4 hơn là NaOH , tỉ lệ trương lên thấp đã được thể hiện và sự phân hủy được tiến hành nhanh hơn. Khi có cùng phương pháp tạo liên kết ngang, trong trường hợp tỉ lệ thay thế 5'-hydroxydopamin tăng, tỉ lệ trương lên và tỉ lệ phân hủy có xu hướng giảm. Các kết quả này được thực hiện cùng với nhau chỉ ra rằng mặc dù các dẫn xuất của axit hyaluronic có cùng cấu trúc và được sử dụng, các hydrogel được tạo liên kết ngang theo các dạng liên kết khác nhau phụ thuộc vào phương pháp liên kết ngang (Ví dụ thực hiện 2), điều này dẫn đến các thay đổi về các tính chất vật lý vốn có như tính bền vững, tính đàn hồi, độ bám dính, tính trương lên, sự phân hủy. Ngoài ra, ngược lại, thậm chí khi sử dụng các phương pháp tạo liên kết

ngang giống nhau thì các tính chất vật lý nói trên cũng thay đổi phụ thuộc vào cấu trúc của dẫn xuất của axit hyaluronic.

Ví dụ 2. Phân tích về tính độc tế bào và khả năng tương hợp sinh học

Trong Ví dụ này, độc tế bào và khả năng tương hợp sinh học của hydrogel của axit hyaluronic theo Ví dụ thực hiện 2 được đánh giá. Trước tiên, để xác định xem hydrogel có gây ra độc tính và phản ứng viêm khi nuôi cấy tế bào 3D hay không, các tế bào gốc mỡ của người (human adipose-derived stem cells: hADSC) ($1,0 \times 10^6$ tế bào trên mỗi 100 μL hydrogel) được cấy vào hydrogel, và bộ kit xác định khả năng tồn tại SỐNG/CHẾT/ độc tế bào (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) được sử dụng để thực hiện phương pháp nhuộm để xác định tế bào sống/ chết ở các thời điểm tương ứng (ngày 1, 3, và 7) dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được nhuộm được quan sát bởi kính hiển vi đồng tiêu (LSM 880, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), và khả năng tồn tại được xác định số lượng nhờ đếm các tế bào có thể tồn tại và các tế bào chết dựa trên hình ảnh huỳnh quang ($n = 4$ đến 5). hADSC thu được dựa trên ATCC (ATCC, Manassas, VA, USA) được cấy vào Môi Trường Cơ Bản Nuôi Cấy Tế Bào Gốc Trung Mô (ATCC) được bổ sung bởi Kit Tăng Trưởng- huyết thanh thấp (ATCC) và penixilin1% /streptomycin (Invitrogen).

Ngoài ra, các tế bào miễn dịch (RAW 264,7) được đồng nuôi cấy trong hydrogel sử dụng hệ thống Transwell (các giá đỡ thấm qua được với các lỗ lọc cỡ 3,0 μm , Corning, New York, NY, USA), và sau đó một lượng yếu tố hoại tử khối u: (tumor necrosis factor:TNF- α) tiết ra bởi phản ứng viêm được đo đặc sử dụng xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym: (enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA). Các tế bào RAW 264,7 được ủ qua đêm, và sau đó được cấy trên đĩa 96 lỗ ($2,0 \times 10^4$ tế bào mỗi lỗ). Tiếp đó, 50 μL hydrogel được nạp vào thông qua phần cửa nạp bên trên của Transwell, và sau đó ủ thêm 24 giờ. Một lượng TNF- α trong môi trường thu được từ môi trường đồng nuôi cấy được xác định số lượng bằng cách sử dụng bộ kit xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym TNF- α (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Để đánh giá khả năng tương hợp sinh học *in vivo* của hydrogel HA-PG, 100µl hydrogel HA-PG (nồng độ cuối cùng là 2% [trọng lượng/ thể tích]) được tạo thành bởi việc sử dụng NaIO₄ hoặc NaOH cấy ghép dưới da chuột ICR. Trước khi cấy ghép, chuột (giống đực 5 tuần tuổi, OrientBio, Seongnam, Korea) được gây mê bởi ketamin (100mg/kg, Yuhan, Seoul, Korea) và xylazin (20 mg/kg, Bayer Korea, Ansan, Korea). Để phân tích mô, các cấu trúc axit hyaluronic được phục hồi bởi các mô lân cận tại các thời điểm xác định trước (ngày 0, 7, 14, 28, và 84). Axit hyaluronic phục hồi được cố định trong paraformaldehyt 4% (Sigma) trong 2 ngày, được gắn vào hộp chất OCT (Leica Biosystems, Wetzlar, Hesse, Germany), và sau đó cắt theo độ dày 6 µm. Các mẫu cắt dựa trên thử nghiệm *in vivo* được nhuộm H&E để đánh giá sự duy trì hydrogel. Việc nhuộm màu xanh toluidin đã được thực hiện để kiểm tra phản ứng miễn dịch sau khi cấy ghép hydrogel HA-PG. Sự phân hủy *in vivo* của hydrogel HA-PG được đánh giá bằng cách đo trọng lượng còn lại của cấu trúc hydrogel được phục hồi ở mỗi thời điểm (n = 3 đến 5).

Kết quả như được minh họa trong FIG. 11 và 12, không có loại nào trong hai loại hydrogel dựa trên phương pháp tạo liên kết ngang thể hiện tính độc tế bào trong 7 ngày sau khi nuôi cấy (FIG. 11(a) và 11(b)). chỉ phát hiện được một lượng nhỏ TNF-α tăng lên do LPS ở vị trí xem xét với hai dạng hydrogel được thực hiện, và điều này không khác biệt lớn so với đối chứng (NT) trong đó không có việc điều trị nào được thực hiện (FIG. 11(c)). Ngoài ra, như được minh họa trong FIG. 12, thậm chí trong trường hợp ở vị trí mà hydrogel được cấy ghép vào chuột, việc tìm ra viêm cụ thể không quan sát thấy, vì thế có khả năng xác định cấu trúc của nó được duy trì tốt mà không cần sự gia tăng các tế bào viêm liên quan như các đại thực bào trong ở vùng lân cận hydrogel được cấy ghép (FIG. 12(c) và 12(d)).

Ví dụ 3. Phân tích mẫu phân hủy *in vivo*

Trong Ví dụ này, các hydrogel của axit hyaluronic có sự khác biệt về phương pháp tạo liên kết ngang (NaIO₄/NaOH) và tỉ lệ phân tử (0,5X, 1X) của 5'-hydroxydopamin tham gia phản ứng được cấy ghép dưới da chuột. Vào ngày cấy ghép,

và ở các tuần 1, 4, và 12 sau khi cấy ghép, các con chuột bị giết và các hydrogel tương ứng được thu thập. Đối với các hydrogel này, mức độ trương lên được xác định bằng mắt, và số lượng còn lại *in vivo* được tính toán, bằng cách đó có thể phân tích mẫu phân hủy *in vivo* và các mẫu tương tự.

Kết quả như được minh họa trong FIG. 13, được xác định là hydrogel thu được nhờ thực hiện liên kết ngang sử dụng NaIO_4 có mức độ trương lên nhỏ hơn, và được phát hiện ra là hydrogel đó thể hiện sự phân hủy nhanh hơn *in vivo*. Ngoài ra, với cùng phương pháp tạo liên kết ngang, trong trường hợp tỉ lệ thay thế 5'-hydroxydopamin (nhóm galol) tăng, tỉ lệ phân hủy có xu hướng tăng.

Các kết quả theo Ví dụ 2 và 3 đề xuất hydrogel của axit hyaluronic theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, trong lĩnh vực vật liệu sinh học như là chất mang dẫn truyền thuốc và giá đỡ dùng cho công nghệ mô. Cụ thể, xem xét các tính chất vật lý vốn có theo Ví dụ 1 và các tính chất tương tự, hydrogel được tạo thành bởi việc sử dụng NaIO_4 thể hiện tỉ lệ tạo liên kết ngang nhanh chóng và mẫu phân hủy *in vivo* có thể được sử dụng làm chất mang dẫn truyền thuốc dưới dạng các hạt mịn, và hydrogel được tạo thành bởi việc sử dụng NaOH thể hiện độ bám dính tuyệt vời và các mẫu phân hủy chậm *in vivo* có thể được sử dụng làm giá đỡ dùng cho công nghệ mô và các sử dụng tương tự.

Ví dụ 4. Tạo thành các vi hạt để sử dụng làm hệ dẫn truyền thuốc

4-1. Sự giải phóng kéo dài protein sử dụng các vi hạt hydrogel HA-PG

Trong ví dụ này, một phương án là hydrogel được tạo thành bởi việc sử dụng NaIO_4 , việc điều chế dẫn truyền thuốc dưới dạng các vi hạt có đường kính đơn vị nano hoặc micro được thực hiện và tính hiệu quả của nó đã được xác định. Đầu tiên, phương pháp nhũ tương dầu/ nước được sử dụng để tạo ra sự hình thành nhũ tương của dung dịch dẫn xuất của axit hyaluronic (HA-PG) theo Ví dụ thực hiện 2, và chất oxy hóa (NaIO_4) được bổ sung vào dung dịch. Tiếp theo, sự hình thành và hiện diện của các vi hạt được xác định trước và sau khi đông khô. Ngoài ra, dung dịch HA-PG

được hòa lẫn với protein (albumin huyết thanh bò: “bovine serum albumin”, BSA), và hỗn hợp được làm dưới dạng nhũ tương. Sau đó, chất oxy hóa (NaIO_4) được bổ sung vào và liên kết ngang được thực hiện, nhờ đó điều chế các vi hạt trong đó BSA được bao nang. Mẫu giải phóng protein của các vi hạt được xác định qua 14 ngày. Kết quả như được minh họa trong FIG. 14, các vi hạt chứa thành phần hydrogel của axit hyaluronic được sinh ra nhờ quá trình điều chế nói trên, và được duy trì không đổi, thậm chí sau khi trải qua quá trình đông khô (FIG. 14(a)). Ngoài ra, có thể xác định là các protein được bao nang rất khó bị giải phóng ở khối hydrogel HA-PG, trong khi đó các protein được giải phóng theo tỉ lệ không đổi ở hạt HA-PG (FIG. 14(b)). Do đó, hydrogel được tạo thành bởi việc sử dụng NaIO_4 dưới dạng các vi hạt có thể được sử dụng để điều chế dẫn truyền thuốc.

4-2. Sự giải phóng kéo dài kháng thể sử dụng các vi hạt hydrogel HA-PG

Trước tiên, các vi hạt hydrogel HA-PG đóng vai trò là phương pháp dẫn truyền yếu tố tăng trưởng kéo dài và được kiểm soát cho ứng dụng trị liệu được điều chế bởi phương pháp nhũ tương dầu/ nước sử dụng phương pháp tạo gel siêu nhanh bởi liên kết ngang qua trung gian NaIO_4 (FIG. 15(a)). Các vi hạt HA-PG được điều chế bằng cách chỉ cần bổ sung dung dịch HA-PG vào nhũ tương nước trong dầu. Sự tạo liên kết ngang hóa học nhanh của dung dịch HA-PG bởi NaIO_4 trong nền dầu dẫn đến việc tạo ra số lượng lớn các hạt siêu nhỏ HA trong vòng vài phút. Các vi hạt HA-PG được tạo ra có hình cầu với đường kính trung bình $8,8\mu\text{m}$ ($\pm 3,9\mu\text{m}$) (FIG. 15(b)). Thú vị là, các yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGFs) được bao nang trong các vi hạt HA-PG được giải phóng dần trong 60 ngày, trong khi đó, các VEGF hầu như không được giải phóng khỏi cấu trúc của khối HA-PG (FIG. 15(c)). Trong các nghiên cứu trước đây của các tác giả sáng chế, các tác giả đã tìm ra là các yếu tố tăng trưởng được bao nang trong hydrogel anginit được sửa đổi bởi catechin hầu như không được giải phóng do sự liên kết mạnh của các protein với catechin được oxy hóa trong quá trình tạo gel. Cũng giống nhóm catechin, nhóm PG cũng có thể tạo ra sự liên kết mạnh của các yếu tố tăng trưởng với cấu trúc hydrogel. Tuy nhiên, do việc

tăng đáng kể diện tích bề mặt của các yếu tố tăng trưởng cho việc giải phóng, HA-PG được tạo thành các hạt mịn có thể giải phóng các VEGF.

Các vi hạt HA-PG có chứa các VEGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) được áp dụng để tạo nhánh mới cho động mạch vành cho các bệnh mạch máu ngoại biên. Việc hiện có bán trên thị trường các VEGF chứa trong các vi hạt HA-PG (liều tải VEGF: 6 μ g mỗi con chuột) cho thấy hiệu quả điều trị được cải thiện đáng kể ở mô hình chuột thiếu máu chi được thực hiện bởi việc cắt bỏ và thắt động mạch đùi. Chuột (balb/c, giống cái 6 tuần tuổi) đạt được từ OrientBio Inc. Sau 4 tuần tiêm, không có sự cắt chi hay hoại tử mô nào trong nhóm được điều trị bởi các vi hạt HA-PG có chứa VEGF. Mặt khác, chỉ 20% nhóm được điều trị bởi PBS hoặc HA-PG không chứa các VEGF thể hiện sự cải thiện ở các chi bị thiếu máu (FIG. 16(a)). Việc áp dụng tiêm 1 liều duy nhất các VEGF với liều giống nhau (6 μ g mỗi con chuột) thể hiện sự cải thiện không đáng kể ở các chi thiếu máu; tuy nhiên, 50% chuột bị thiếu máu chi vẫn bị mất chi hoặc hoại tử mô (FIG. 16(b)). Ngoài ra, việc phân tích mô học được xác định bởi phương pháp nhuộm H&E và nhuộm ba màu của Masson (MT) chỉ ra sự tổn thương cơ rất nhỏ và việc hình thành sự xơ hóa ở nhóm HA-PG/VEGF của mô hình chuột bị thiếu máu (FIGS. 16(c) và 16(d)). Ngoài ra, việc phân tích hóa mô miễn dịch sử dụng sợi α -smooth muscle actin (α -SMA) và yếu tố von Willebrand factor (vWF) để nhuộm tiểu động mạch và nhuộm mao mạch chỉ ra là tiểu động mạch và mao mạch tăng đáng kể trong nhóm HA-PG/VEGF khi so sánh với các nhóm kiểm soát (PBS, HA-PG, và VEGF) (FIGS. 16(e) và 16(f)). Các kết quả này thể hiện sự cải thiện đáng kể trong sự hình thành mạch. Liên kết ngang gián tiếp NaOH được sử dụng để điều chế giá đỡ hydrogel bám dính để cấy ghép tế bào không xâm lấn và không bằng cách tiêm (FIG. 17(a)). Dựa vào các nghiên cứu trước đây, có thể xác định polyme được sửa đổi bởi catechin thể hiện độ bám dính mô mạnh nhờ ái lực gắn kết mạnh với các nucleophile khác nhau của catechin được oxy hóa trong các protein.

Ví dụ 5. Xác định sự tạo gel của chất làm đầy axit hyaluronic sử dụng chất oxy hóa trong cơ thể và hiệu quả cải thiện nếp nhăn theo đó

5-1. Sự tạo thành và duy trì các hydrogel sử dụng chất oxy hóa trong cơ thể

Dung dịch HA-PG điều chế theo Ví dụ thực hiện 1 được tiêm dưới da chuột. Sau đó, xác định xem có xảy ra sự tạo gel dung dịch HA-PG được tiêm trong cơ thể hay không khi không bổ sung chất tạo liên kết ngang. Ngoài ra, những thay đổi về trọng lượng của hydrogel HA-PG tạo thành được đo, với điều kiện ở trong cơ thể trong khoảng 6 tháng, để xác định khả năng hydrogel HA-PG tạo thành có thể duy trì trong cơ thể trong một thời gian dài.

Kết quả như được minh họa trong FIG. 20 và 21, có thể thấy là dung dịch HA-PG ở trạng thái lỏng được tiêm dưới da đã tạo gel trong vòng 5 phút tạo thành hydrogel HA-PG trong cơ thể, và hydrogel HA-PG tạo thành đó được duy trì tốt trong cơ thể trong suốt trong 6 tháng và không có khác biệt lớn nào về trọng lượng. Ngoài ra, như được minh họa trong FIG. 22, trường hợp dung dịch HA-PG được thể hiện ở điều kiện oxy hóa trong cơ thể, các quinon dễ dàng được tạo thành trong số các nhóm galol có khả năng tự oxy hóa mạnh, vì vậy axit hyaluronic được polyme hóa và hydrogel HA-PG được tạo thành. Theo đó, có thể thấy là không giống các sản phẩm chất làm đầy khác (Megafill, Perlane) chứa các chế phẩm ở dạng polyme hóa, chất làm đầy theo sáng chế có thể sử dụng làm chế phẩm ở dạng dung dịch, cho phép tiêm trong da dễ dàng hơn và cho phép đa dạng các thành phần bổ sung chứa trong đó. Tức là, dung dịch HA-PG theo sáng chế tạo thành hydrogel trong cơ thể mà không cần điều kiện về chất tạo liên kết ngang và có thể duy trì ổn định trong đó. Vì vậy, có thể xác định khả năng sử dụng dung dịch HA-PG làm chất làm đầy.

5-2. Xác định hiệu quả cải thiện nếp nhăn

Dựa trên các kết quả trong Ví dụ 5-1, hiệu quả cải thiện nếp nhăn của dung dịch HA-PG được xác định. Cụ thể là, chuột trụi lông được đưa vào Calcitriol 0,2 $\mu\text{g}/\text{ngày}$ như thế cho 5 lần mỗi tuần trong tổng số 6 tuần, vì vậy các nếp nhăn trên da được tạo ra. Tiếp đó, dung dịch HA-PG được tiêm vào dưới da, và các nếp nhăn trên

da trước và sau khi tiêm được lấy mẫu. Phạm vi, độ dài và độ sâu của các nếp nhăn được đo bởi máy phân tích nếp nhăn, và so sánh. Kết quả như được minh họa trong FIG. 23, phạm vi, chiều dài và độ sâu của các nếp nhăn trước khi tiêm dung dịch HA-PG lần lượt là khoảng 6 mm², 36 mm, và 90 μ m, trong khi những chỉ số này sau khi tiêm dung dịch HA-PG lần lượt là khoảng 2 mm², 19 mm, và 68 μ m. Do vậy, có thể xác định là phạm vi, chiều dài và độ sâu của các nếp nhăn giảm đáng kể. Những kết quả này chỉ ra rằng dung dịch HA-PG theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất làm đầy cho việc cải thiện các nếp nhăn trên da.

5-3. So sánh với các sản phẩm chất làm đầy hiện nay

(1) So sánh với điều kiện độ bám dính và khả năng ổn định trong cơ thể

Để xác định cụ thể hơn khả năng và việc sử dụng dung dịch HA-PG làm chất làm đầy, đối với các hydrogel HA-PG dựa trên các dẫn xuất của axit hyaluronic có các khối lượng phân tử khác nhau (200 KDa, 1 MDa) và các sản phẩm chất làm đầy thông thường hiện có bán sẵn (Megafill, Perlane), các mẫu tồn tại và phân hủy của nó trong cơ thể được đo trong khoảng 9 tháng và so sánh. Ngoài ra, đối với các hydrogel được điều chế bởi dung dịch HA-PG theo sáng chế và sản phẩm Perlane, độ bám dính hoặc khả năng ổn định trong cơ thể được so sánh. Kết quả như được minh họa trong FIG. 24 và 25, có thể xác định là đối với các sản phẩm Megafill và Perlane, trọng lượng và thể tích của hydrogel trong cơ thể có xu hướng giảm từ khoảng một tháng sau ngày tiêm, trong khi đối với các hydrogel HA-PG, hình dạng của nó được duy trì 9 tháng mà không có thay đổi lớn về trọng lượng và thể tích. Có thể thấy là các hydrogel HA-PG có khả năng duy trì tuyệt vời trong cơ thể. Ngoài ra, đối với các hydrogel, độ bám dính trong cơ thể được xác định. Kết quả như được minh họa trong FIG. 26, sản phẩm Perlane cho thấy hiện tượng trong đó hydrogel được điều chế bằng cách này không cố định với da và hướng vào vị trí cụ thể, trong khi hydrogel được điều chế bằng dung dịch HA-PG được duy trì tốt trong cơ thể bằng cách bám dính và cố định với vị trí được tiêm. Độ bám dính tuyệt vời trong cơ thể theo đó là kết quả của phản ứng giữa

nhóm chức, như là nhóm amin và nhóm thiol, có trên da với dẫn xuất của axit hyaluronic theo sáng chế (FIG. 22(a)). Cụ thể là, dung dịch HA-PG theo sáng chế thể hiện tính ổn định và độ bám dính trong cơ thể tốt hơn so với các sản phẩm chất làm đầy hiện có.

(2) So sánh khả năng tiêm (thử nghiệm khả năng tiêm)

Để xác định một cách cụ thể khả năng tiêm tuyệt vời của dung dịch HA-PG, đối với các hydrogel HA-PG dựa trên các dẫn xuất của axit hyaluronic với các khối lượng phân tử khác nhau (200 KDa, 1 MDa) và các sản phẩm chất làm đầy thông thường hiện có bán trên thị trường (Megafill, Perlane), các thay đổi về lực đẩy ra phụ thuộc các cỡ kim tiêm (21G, 25G, 29G, 30G) không chỉ được đo bởi việc sử dụng máy thử nghiệm vạn năng: Universal Testing Machine (UTM), mà cả lực sổ ra, là lực yêu cầu để di chuyển ống tiêm ban đầu, và lực trượt động lực, là lực yêu cầu để duy trì sự di động của ống tiêm đang dịch chuyển, được xác định số lượng và so sánh. Kết quả như được minh họa trong FIG. 27 và 28, Megafill không được đẩy ra ở kim tiêm cỡ nhỏ do kích cỡ hạt lớn, và việc đẩy ra chỉ có thể ở cỡ kim 21G hoặc ít hơn. Ngay cả đối với Perlane, lực đẩy ra ở hình dạng không đều được thể hiện ở cỡ kim 29G 30G do kích cỡ hạt. Mặt khác, trong trường hợp của dung dịch HA-PG (200 KDa, 1 MDa) theo sáng chế, có thể xác định được sự đẩy ra một cách hiệu quả có thể đạt được thậm chí với lực nhỏ với tất cả các cỡ kim bao gồm cả 29G và 30G. Ngoài ra, các lực sổ ra và lực trượt động lực được so sánh. Kết quả như được minh họa trong FIG. 29, khi được so sánh với Megafill, việc đo đặc không thể thực hiện được do sự đẩy ra quá kém, và Perlane thể hiện giá trị lực cao, dung dịch HA-PG theo sáng chế (200K, 1M) thể hiện giá trị lực chậm đáng kể. Do vậy, có thể thấy là dung dịch HA-PG theo sáng chế có thể được tiêm dễ dàng bất kể lực đẩy ra để tiêm, cụ thể là, kích cỡ kim tiêm. Các kết quả này chỉ ra rằng dung dịch HA-PG theo sáng chế có thể được tiêm trực tiếp vào vị trí đã định và có thể được tiêm ổn định hơn.

5-4. Chất làm đầy chức năng chứa yếu tố tăng trưởng tế bào

Để xác định việc áp dụng làm chất làm đầy chức năng, dung dịch HA-PG trong đó yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô (EGF; 20 ng/ml, 1 μ m /ml, 20 μ g/ml) được bao nang được tiêm trong da của chuột trụi lông, trong đó các nếp nhăn được tạo ra theo phương pháp của Ví dụ 5-2; vùng da nhăn trước và sau khi tiêm được lấy mẫu; phạm vi, độ dài và độ sâu của các nếp nhăn được đo bởi máy phân tích nếp nhăn, và so sánh. Một tháng sau khi tiêm dung dịch HA-PG, trong đó các EGF được bao nang, mô da được tập hợp lại và các mẫu được đông đá OCT của nó được tạo cấu trúc. Sau đó, bằng cách nhuộm hematoxylin & eosin (H&E) các mẫu được đông đá OCT, việc xét nghiệm mô bệnh học được thực hiện. Ngoài ra, một tháng sau khi tiêm, trong chuột trụi lông, dung dịch HA-PG trong đó các EGF (10 μ g/ml) được bao nang, dung dịch HA-PG, Perlane là sản phẩm hiện có, các khác biệt về sự phục hồi mô da được so sánh bằng cách nhuộm H&E và nhuộm ba màu của Masson (MT) theo cách giống nhau như được thể hiện ở trên.

Kết quả như được minh họa trong FIG. 30, có thể thấy dung dịch HA-PG, trong đó các EGF được bao nang được tiêm, bất kể đến kích cỡ của nếp nhăn tạo thành, phạm vi, chiều dài và độ sâu của các nếp nhăn giảm đáng kể khi so sánh với trước khi tiêm. Ngoài ra, như được minh họa trong FIG. 31, các sợi collagen ở lớp bì của da bị phá hủy thể hiện mật độ nghèo nàn và sự sắp xếp không theo quy tắc; mặt khác, do nồng độ của yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô được bao nang tăng, các sợi collagen có xu hướng được sắp xếp một cách cân đối. Từ đó, có thể xác định hiệu quả khôi phục da và cải thiện nếp nhăn đáng kể. Ngoài ra, như được minh họa trong FIG. 32 và 33, trường hợp dung dịch HA-PG, trong đó các EGF được bao nang được tiêm, có thể xác định lớp biểu bì dày lên do hiện tượng cảm ứng của các nếp nhăn nhỏ đi đáng kể so với các nhóm so sánh khác (không chất làm đầy, Perlane, HA-PG) và mật độ collagen của lớp bì được tăng ở mức độ lớn. Các kết quả này chỉ ra rằng yếu tố tăng trưởng tế bào để cải thiện các nếp nhăn trên da được áp dụng cho dung dịch HA-PG theo sáng chế, và do đó kết quả là có thể sử dụng làm chất làm đầy.

Ví dụ 6. Tạo ra băng vết thương, chất hàn gắn vết thương, và màng chống bám dính

Để xác định ứng dụng tạo ra băng cho việc hàn gắn vết thương, dung dịch HA-PG được áp dụng cho mô hình động vật bị thương, trong đó da lưng của chuột bị rạch một miếng cỡ 1 cm × 1 cm, và sau đó liên kết ngang được thực hiện bao quanh oxy hoạt tính. Tiếp đó, việc tạo thành hydrogel tại chỗ bị thương, và sự bám dính của dung dịch HA-PG với chỗ bị thương được thực hiện. Kết quả như được minh họa trong FIG. 34, có khả năng xác định được là màng hydrogel được tạo thành trong vòng 10 phút sau khi dung dịch HA-PG được bôi vào chỗ bị thương, từ đó dung dịch HA-PG bám dính vào chỗ bị thương. Các kết quả này chỉ ra là dung dịch HA-PG có thể sử dụng làm mẫu mới cho vật liệu băng vết thương có khả năng oxy hóa tuyệt vời và có thể thậm chí dùng cho vết thương mà không cần bổ sung chất phụ gia.

Ví dụ 7. Phân tích chế phẩm dạng bột và độ ổn định bảo quản

7-1. Chế phẩm dạng bột

Để xác định khả năng bào chế chất làm đầy ở dạng bột, như được minh họa trong FIG. 35, dung dịch HA-PG theo Ví dụ thực hiện 1 được làm đông khô để điều chế chất làm đầy dưới dạng bột. Sau đó, chất làm đầy dạng bột hòa tan trong PBS (pH 7) được hòa tan lại, và sau đó tiêm dưới da chuột để quan sát hydrogel được tạo thành. Kết quả như được minh họa trong FIG. 36, có thể xác định chất làm đầy theo sáng chế được hòa tan lại ở dạng bột đông khô được tạo liên kết ngang nhờ khả năng oxy hóa trong cơ thể để tạo thành hydrogel như trước đó. Các kết quả này chỉ ra rằng chất làm đầy theo sáng chế, được bào chế dưới dạng bột, đem lại cho người dùng sự dễ dàng sử dụng và dễ dàng bảo quản.

7-2. Phân tích độ ổn định bảo quản

Để xác định độ ổn định bảo quản cụ thể của chất làm đầy, đầu tiên phải xác định xem dung dịch HA-PG trong Ví dụ thực hiện 1 có được tạo gel trong côngtenơ

bảo quản khi được cất giữ ở nhiệt độ phòng (25°C) hoặc trạng thái làm lạnh (4°C) hay không. Ngoài ra, khí nitơ được bơm vào côngtenơ bảo quản để ngăn tiếp xúc giữa dung dịch HA-PG và khí oxy, và sau đó được bảo quản ở trạng thái làm lạnh (4°C) trong 3 ngày; mặt khác, dung dịch HA-PG được cất giữ ở trạng thái đông đá (-80°C) trong 10 ngày. Sau đó, các dung dịch này được tiêm dưới da chuột để quan sát hydrogel được tạo thành. Kết quả như được minh họa trong FIG. 37, do mức độ oxy hóa cao, sự tạo gel của chất làm đầy theo sáng chế được thực hiện trong một ngày ở nhiệt độ phòng và trong ba ngày ở trạng thái làm lạnh. Mặt khác, như được minh họa trong FIG. 38, có thể xác định là dưới điều kiện khí oxy bị ngăn lại, trong trường hợp ở trạng thái làm lạnh, sự tạo gel không thực hiện thậm chí sau 3 ngày qua đi; đối với trường hợp dung dịch HA-PG được bảo quản ở trạng thái đông đá và sau đó được làm tan sau 10 ngày, dung dịch HA-PG vẫn duy trì các tính chất của dung dịch, và ngay cả trong trường hợp dung dịch HA-PG được tiêm trong da chuột, như dung dịch HA-PG được tạo liên kết ngang nhờ khả năng oxy hóa trong cơ thể để tạo thành hydrogel như trước đó. Các kết quả này chỉ ra rằng chất làm đầy theo sáng chế có thể được bảo quản trong khoảng thời gian dài hơn trong điều kiện khí oxy được ngăn lại hoặc ở trạng thái cấp đông.

Có thể hiểu là bằng những hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến, phần mô tả sáng chế ở trên nhằm mục đích để minh họa và các sửa đổi và thay đổi khác nhau có thể dễ dàng thực hiện không đúng với tinh thần kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Do đó, có thể hiểu là các Ví dụ nêu trên có tính minh họa trong tất cả các lĩnh vực và không làm giới hạn phạm vi sáng chế.

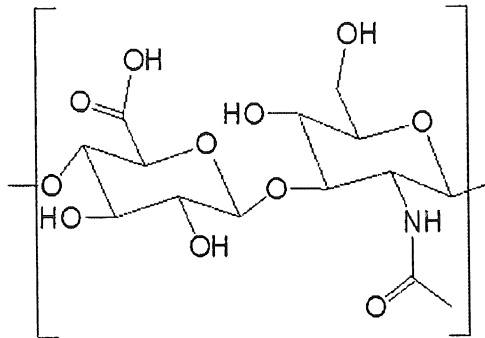
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế hydrogel của axit hyaluronic, bao gồm các bước:

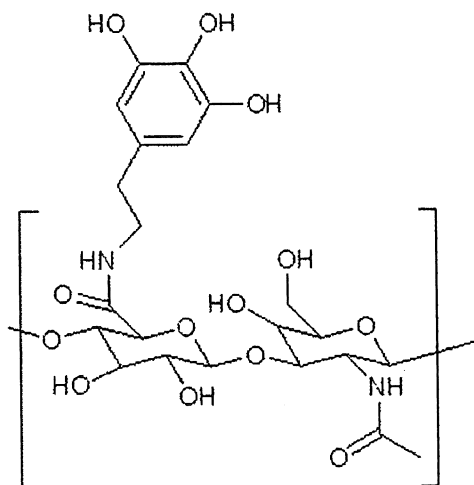
thu được các dẫn xuất của axit hyaluronic bao gồm ít nhất một đơn vị lặp có công thức 5 dưới đây được sửa đổi bởi nhóm pyrogallol bằng cách cho ít nhất một đơn vị lặp của axit hyaluronic có công thức 4 dưới đây phản ứng với 5'-hydroxydopamin; và

tạo liên kết ngang cho các dẫn xuất của axit hyaluronic này:

[Công thức 4]



[Công thức 5]



2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong bước tạo liên kết ngang, liên kết ngang được thực hiện bằng cách bổ sung một chất oxy hóa hoặc chất điều chỉnh độ pH.

3. Phương pháp theo điểm 2,

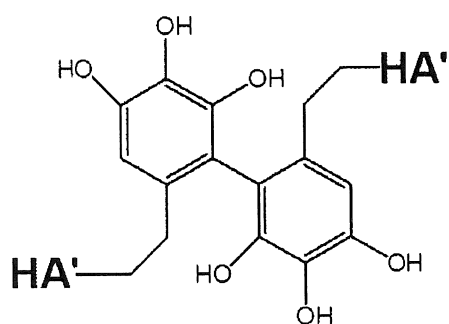
trong đó chất oxy hóa là chất bất kỳ được chọn trong số các chất natri periodat, hydro peroxit, peroxidaza cải ngựa, và tyrosinaza và

trong đó chất điều chỉnh độ pH là chất bất kỳ được chọn trong nhóm bao gồm natri hydroxit, liti hydroxit, kali hydroxit, rubidi hydroxit, xesi hydroxit, magie hydroxit, canxi hydroxit, stronti hydroxit, và bari hydroxit.

4. Phương pháp điều chế hydrogel của axit hyaluronic, bao gồm các bước: tạo liên kết ngang cho các dẫn xuất của axit hyaluronic, được sửa đổi bởi nhóm pyrogallol, bằng cách bổ sung chất oxy hóa hoặc chất điều chỉnh độ pH,

trong đó ở bước tạo thành liên kết ngang bằng cách bổ sung chất oxy hóa, liên kết ngang được tạo thành có Công thức 2:

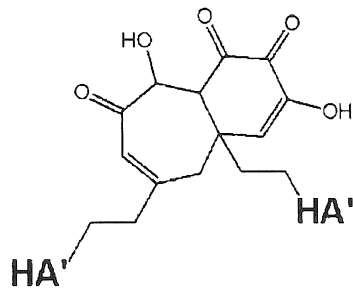
[Công thức 2]



(trong Công thức 2, HA' là axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thế bởi nhóm amit) và

trong đó ở bước tạo thành liên kết ngang được thực hiện bằng cách bổ sung chất điều chỉnh pH, liên kết ngang được tạo thành có Công thức 3:

[Công thức 3]

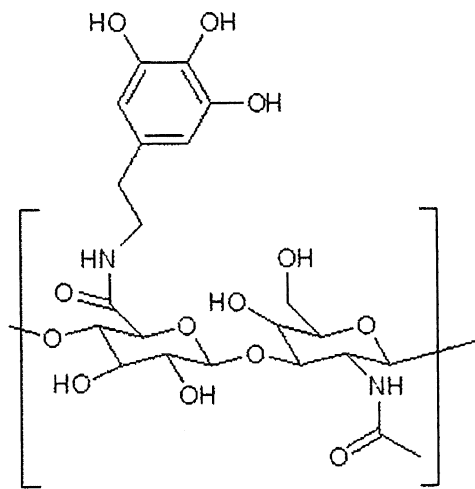


(trong Công thức 3, HA' là axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thế bởi nhóm amit).

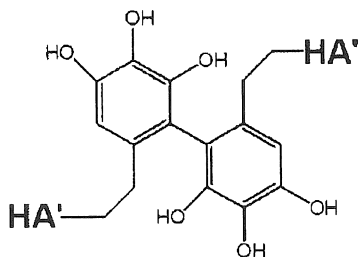
5. Hydrogel của axit hyaluronic được điều chế bởi việc tạo thành liên kết ngang giữa các dẫn xuất của axit hyaluronic bao gồm ít nhất một đơn vị lặp có công thức 5 dưới đây,

trong đó liên kết ngang có công thức 2 hoặc công thức 3 được tạo thành:

[Công thức 5]

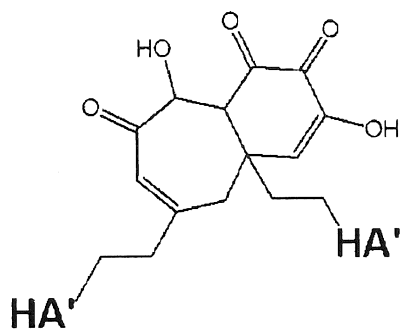


[Công thức 2]



(trong Công thức 2 nêu trên, HA' là axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thế bởi nhóm amit).

[Công thức 3]



(trong Công thức 3, HA' là axit hyaluronic, trong đó nhóm cacboxyl được thế bởi nhóm amit).

6. Hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5, trong đó khối lượng phân tử trung bình (Mw) của dẫn xuất của axit hyaluronic là nằm trong khoảng từ 10.000 Da đến 10.000.000 Da.

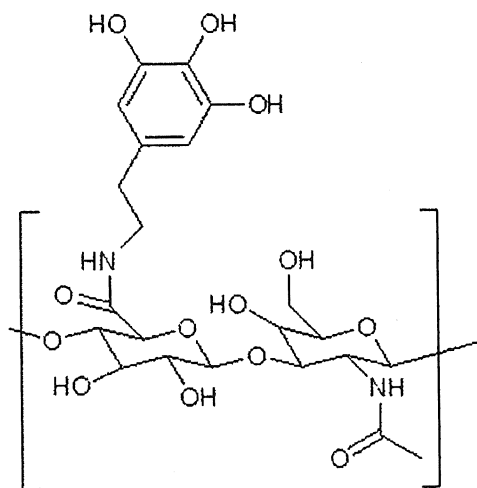
7. Hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic có tỉ lệ thay thế nhóm galol là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 50%.

8. Giá đỡ dùng cho công nghệ mô, bao gồm hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6.

9. Chất mang dẫn truyền thuốc, bao gồm hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6.

10. Chất mang dẫn truyền thuốc theo điểm 9, trong đó thuốc là kháng thể, mảnh kháng thể, axit nucleic bao gồm ADN, ARN, hoặc siARN, peptit, gen, protein, tế bào gốc, hoặc hợp chất hóa học.
11. Chế phẩm làm đầy, bao gồm hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6.
12. Chế phẩm màng chống bám dính, bao gồm hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6.
13. Chế phẩm băng vết thương, bao gồm hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6.
14. Chế phẩm giải phóng kéo dài dược chất, bao gồm hydrogel của axit hyaluronic theo điểm 5 hoặc 6.
15. Dẫn xuất của axit hyaluronic bao gồm ít nhất một đơn vị lặp có công thức 5 dưới đây và được sửa đổi bởi nhóm pyrogalol:

[Công thức 5]



16. Dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10.000 Da đến 10.000.000 Da.

17. Dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15 hoặc 16, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic này có tỉ lệ thể nhóm galol là từ 0,1% đến 50%.
18. Chế phẩm làm đầy, chế phẩm này bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15 hoặc 16.
19. Chế phẩm làm đầy theo điểm 18, trong đó dẫn xuất của axit hyaluronic có hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% (trọng lượng/ thể tích) đến 15% (trọng lượng/ thể tích) trong toàn bộ chế phẩm làm đầy.
20. Chế phẩm làm đầy theo điểm 18, trong đó chế phẩm ở trạng thái lỏng *in vitro* và tạo thành trạng thái gel *in vivo* không cần chất tạo liên kết ngang.
21. Chế phẩm làm đầy theo điểm 18, trong đó chế phẩm này còn bao gồm thêm: yếu tố tăng trưởng tế bào bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì (EGF), yếu tố tăng trưởng tế bào sừng (KGF), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng alpha (TGF- α), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGF- β), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF), yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố tăng trưởng từ tiểu cầu-BB (PDGF-BB), yếu tố tế bào thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF), và yếu tố thần kinh đệm (GDNF).
22. Chế phẩm làm đầy theo điểm 18, chế phẩm này còn bao gồm thêm: thành phần được chọn bất kỳ trong nhóm bao gồm thuốc gây tê cục bộ, chất chống oxy hóa, vitamin, và các hỗn hợp của chúng.
23. Giá đỡ dùng cho công nghệ mô, bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15 hoặc 16.
24. Chất mang dẫn truyền thuốc, bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15 hoặc 16.

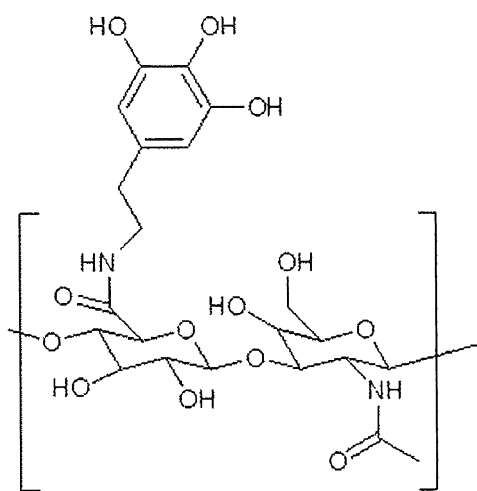
25. Chất mang dẫn truyền thuốc theo điểm 25, trong đó thuốc là kháng thể, mảnh kháng thể, axit nucleic bao gồm ADN, ARN, hoặc siARN, peptit, gen, protein, tế bào gốc, hoặc hợp chất hóa học.

26. Chế phẩm màng chống bám dính, bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15 hoặc 16.

27. Chế phẩm băng vết thương, bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic theo điểm 15 hoặc 16.

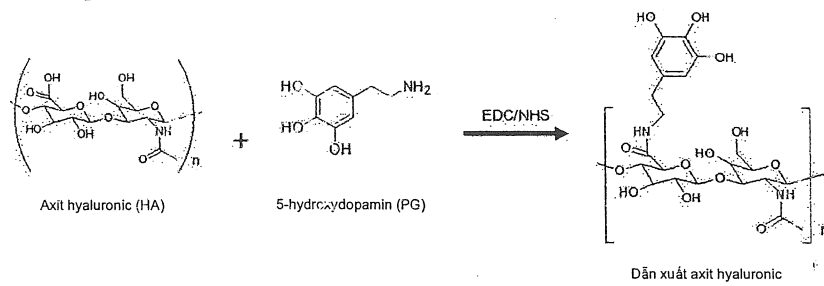
28. Chế phẩm giải phóng chậm dược chất, chế phẩm này bao gồm dẫn xuất của axit hyaluronic có ít nhất một đơn vị lặp có công thức 5 dưới đây và được sửa đổi bởi nhóm pyrogallol:

[Công thức 5]

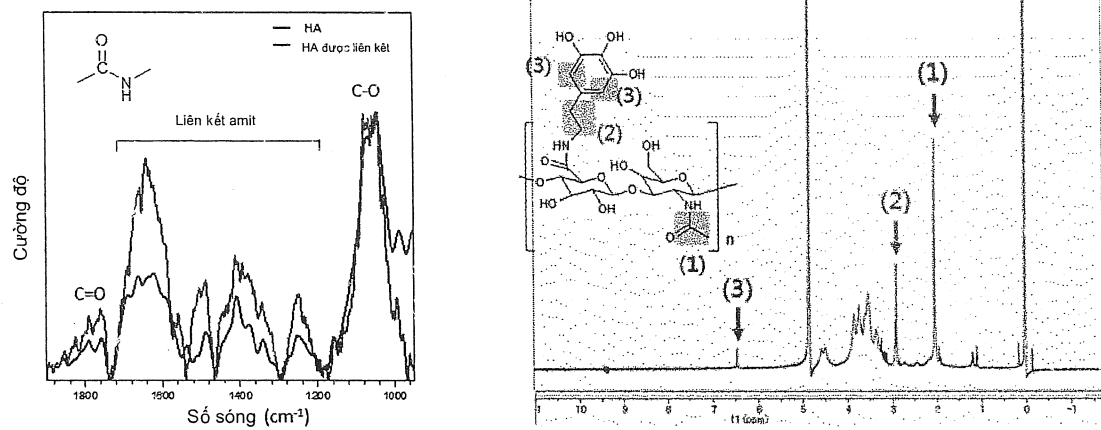


1/16

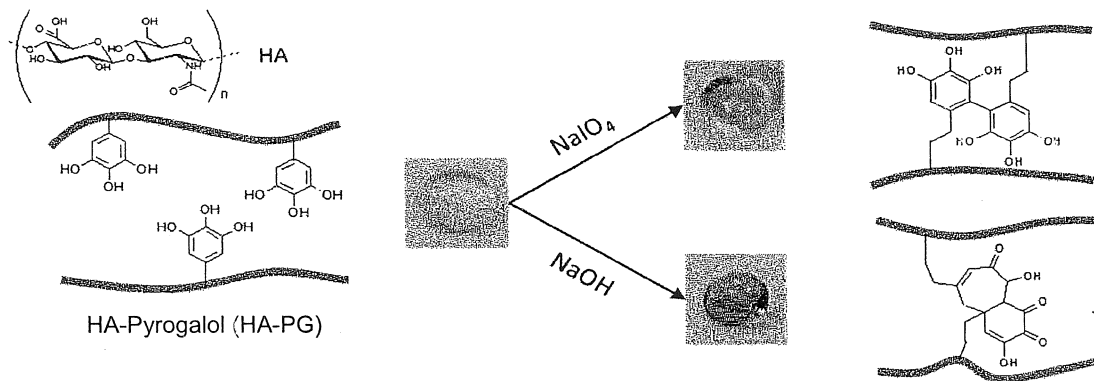
[FIG. 1]



[FIG. 2]

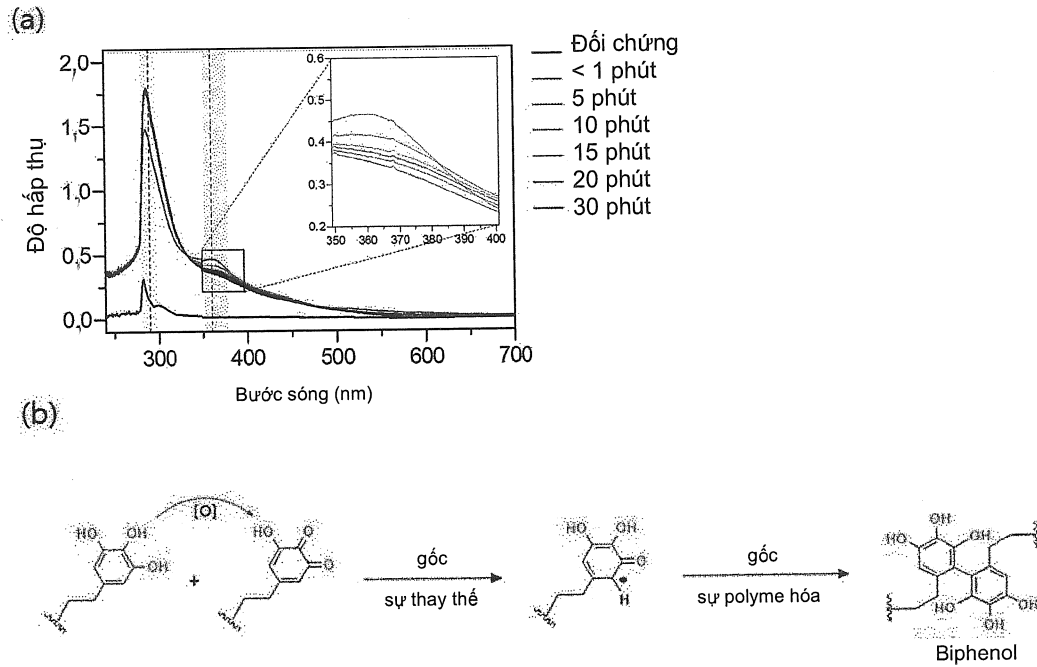


[FIG. 3]

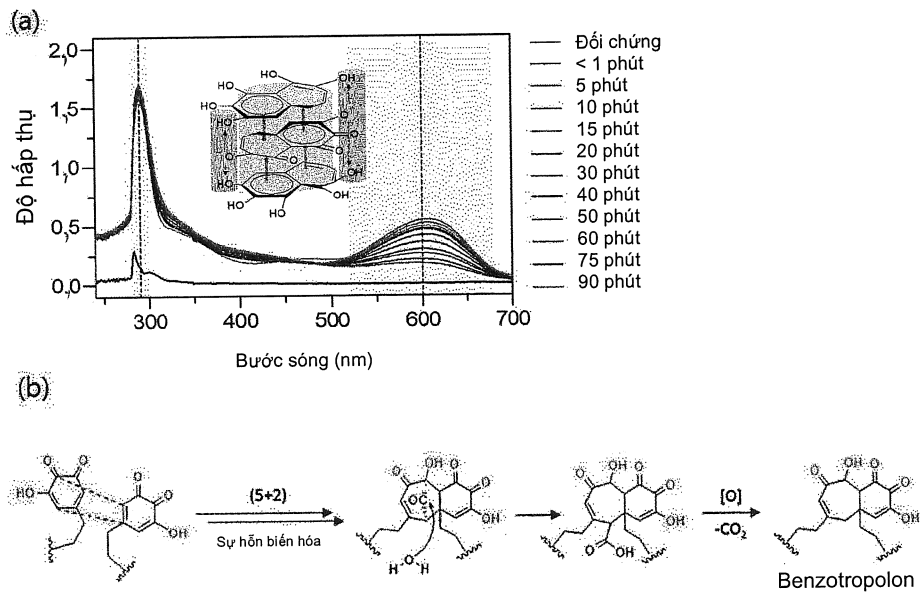


2/16

[FIG. 4]



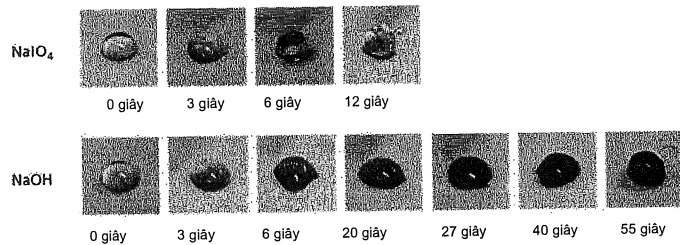
[FIG. 5]



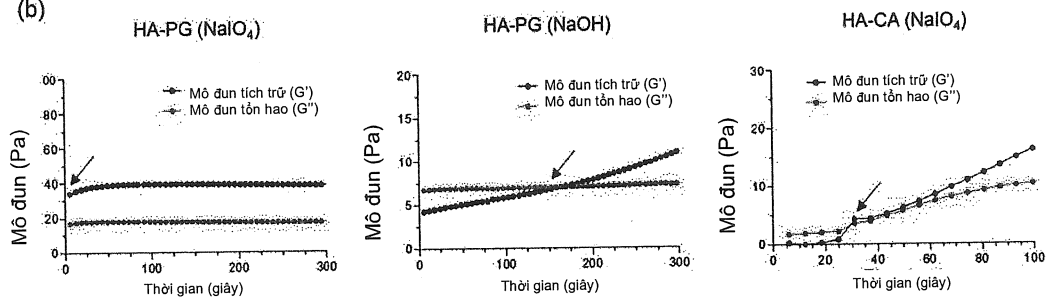
3/16

[FIG. 6]

(a)

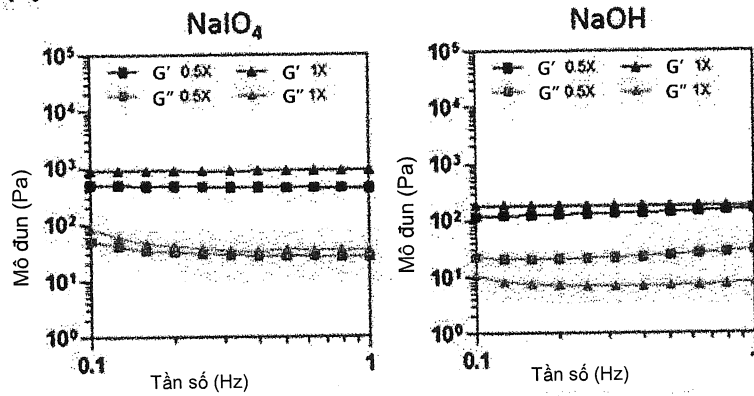


(b)

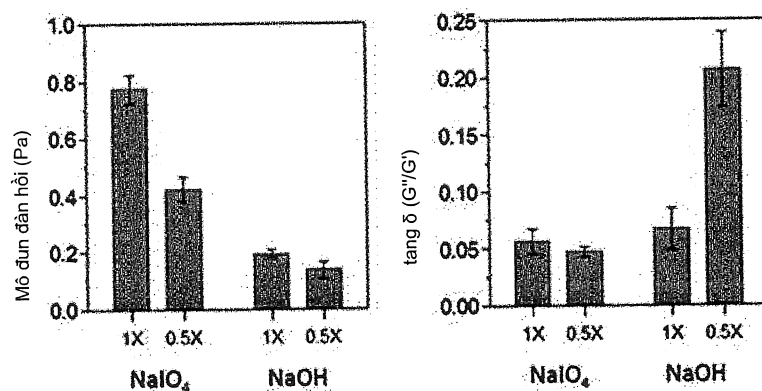


[FIG. 7]

(a)

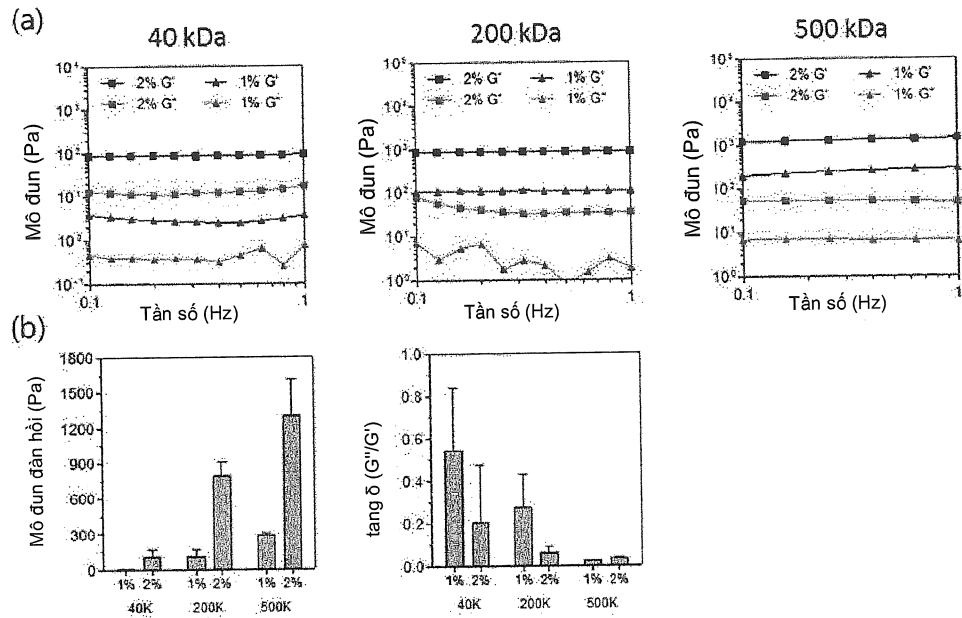


(b)

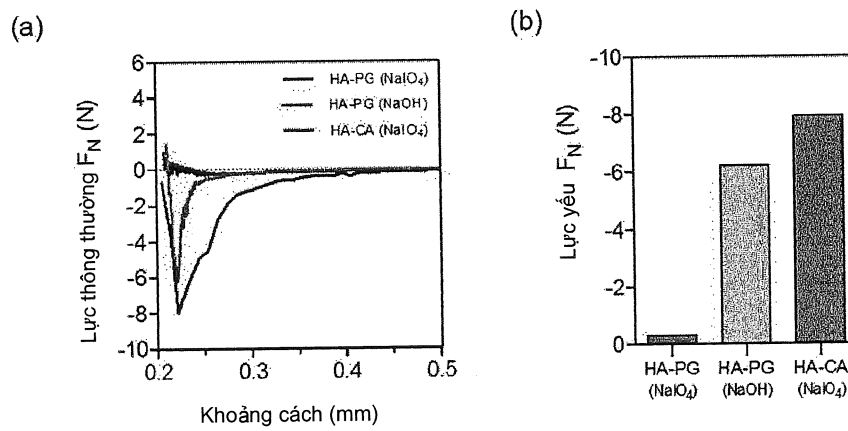


4/16

[FIG. 8]

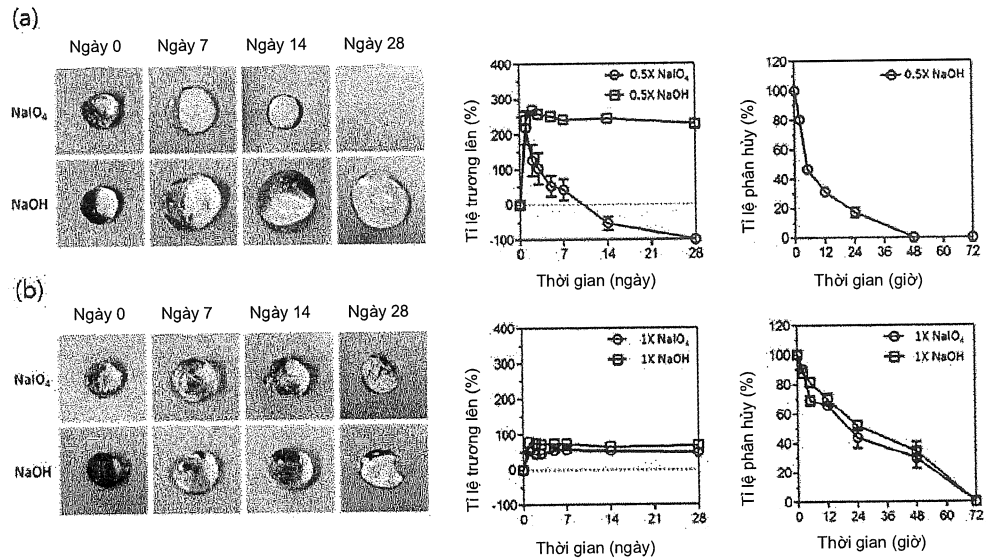


[FIG. 9]

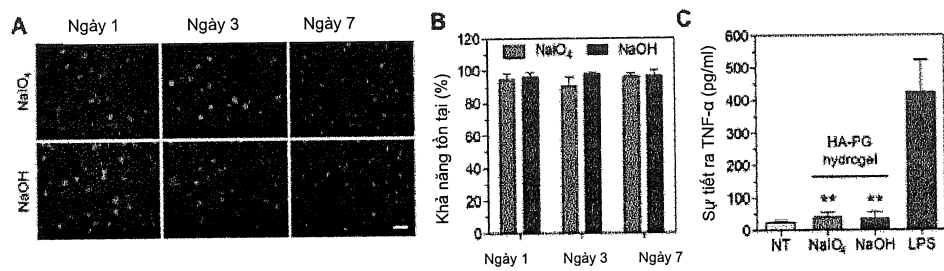


5/16

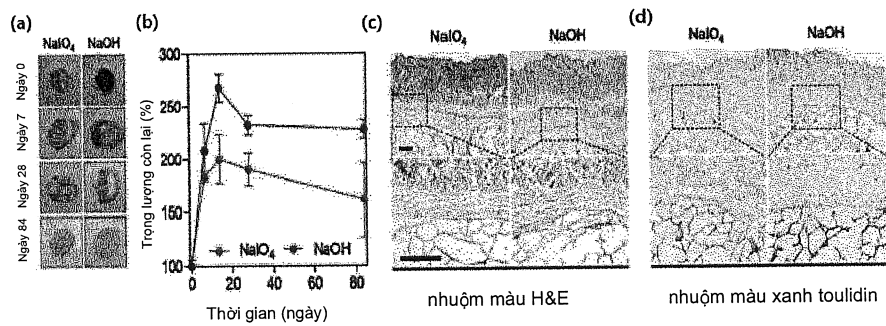
[FIG. 10]



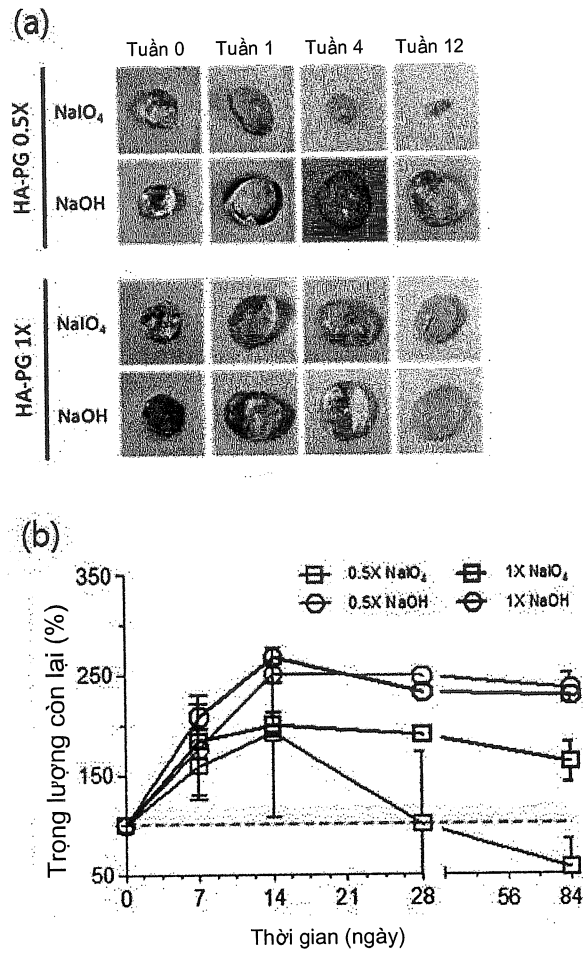
[FIG. 11]



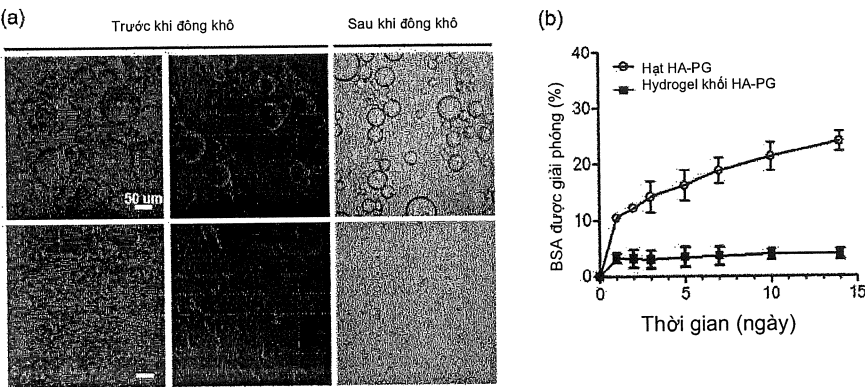
[FIG. 12]



[FIG. 13]

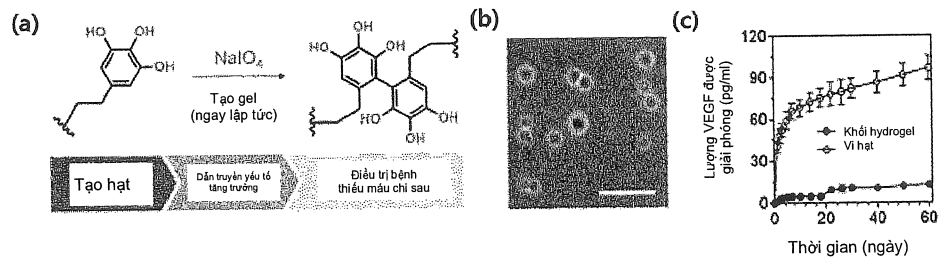


[FIG. 14]

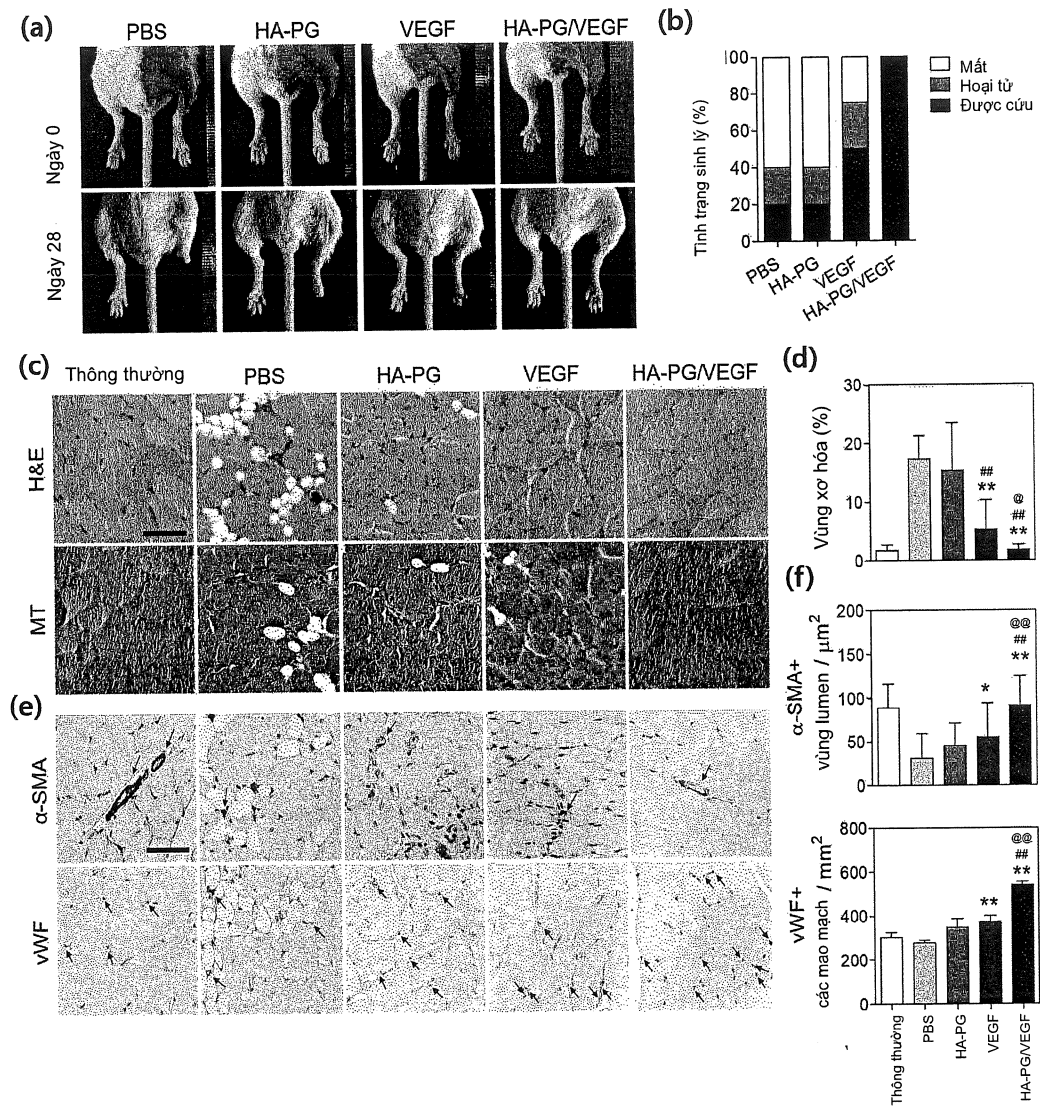


7/16

[FIG. 15]

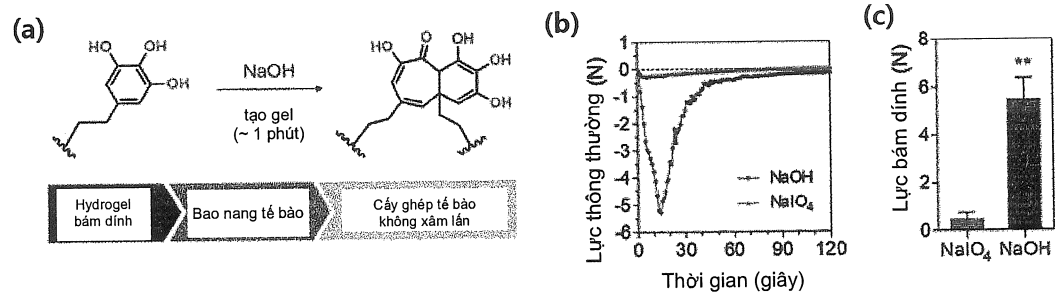


[FIG. 16]

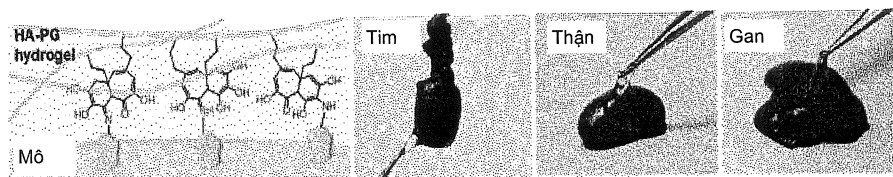


8/16

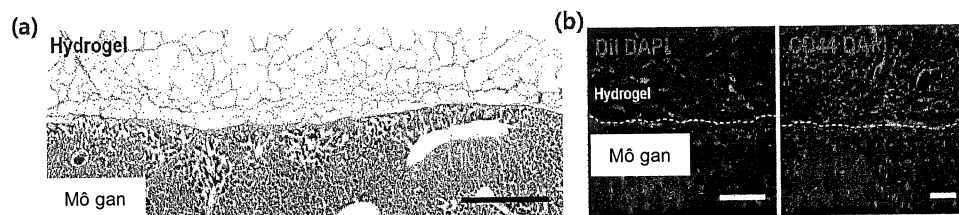
[FIG. 17]



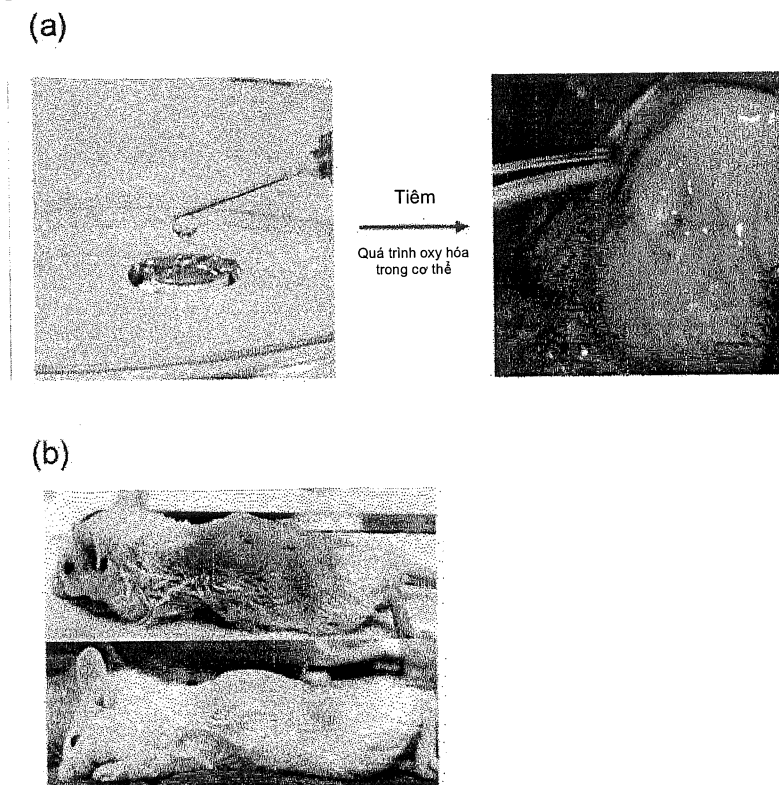
[FIG. 18]



[FIG. 19]



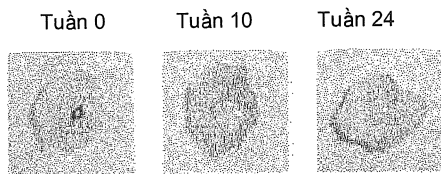
[FIG. 20]



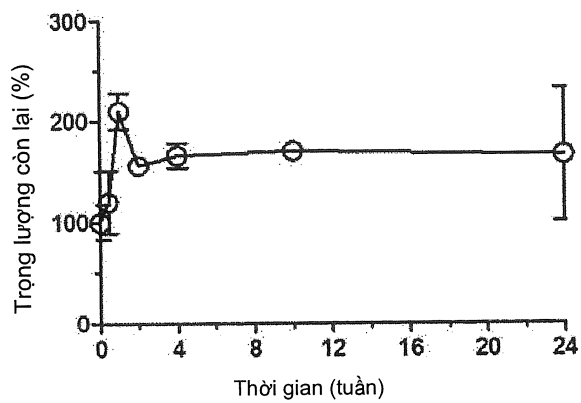
9/16

[FIG. 21]

(a)

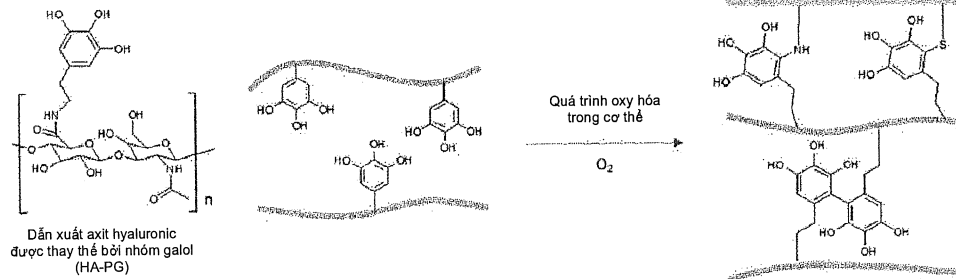


(b)

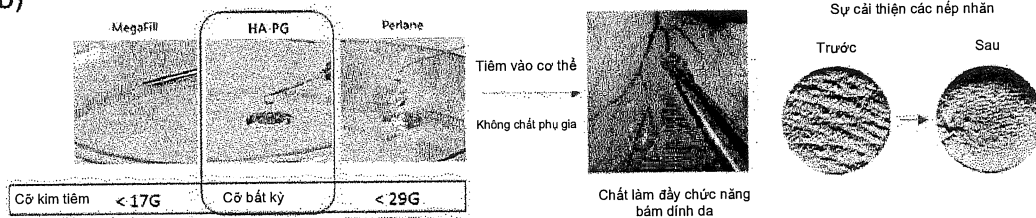


[FIG. 22]

(a)



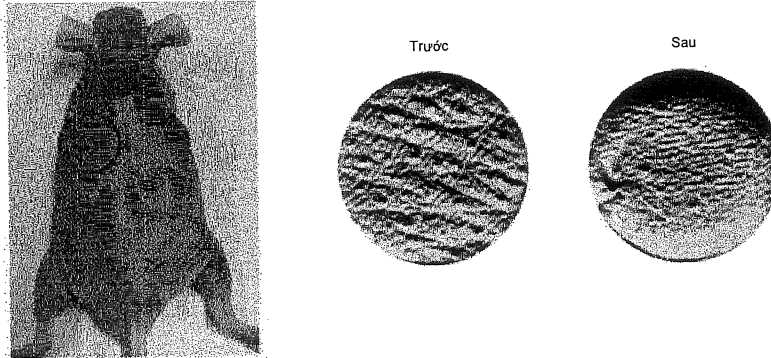
(b)



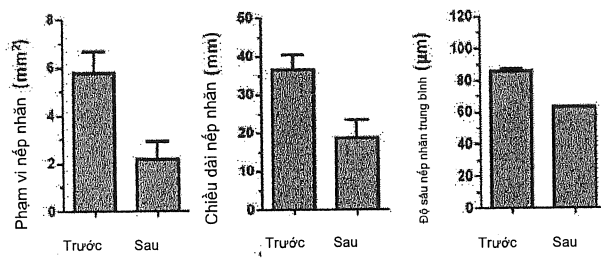
10/16

[FIG. 23]

(a)

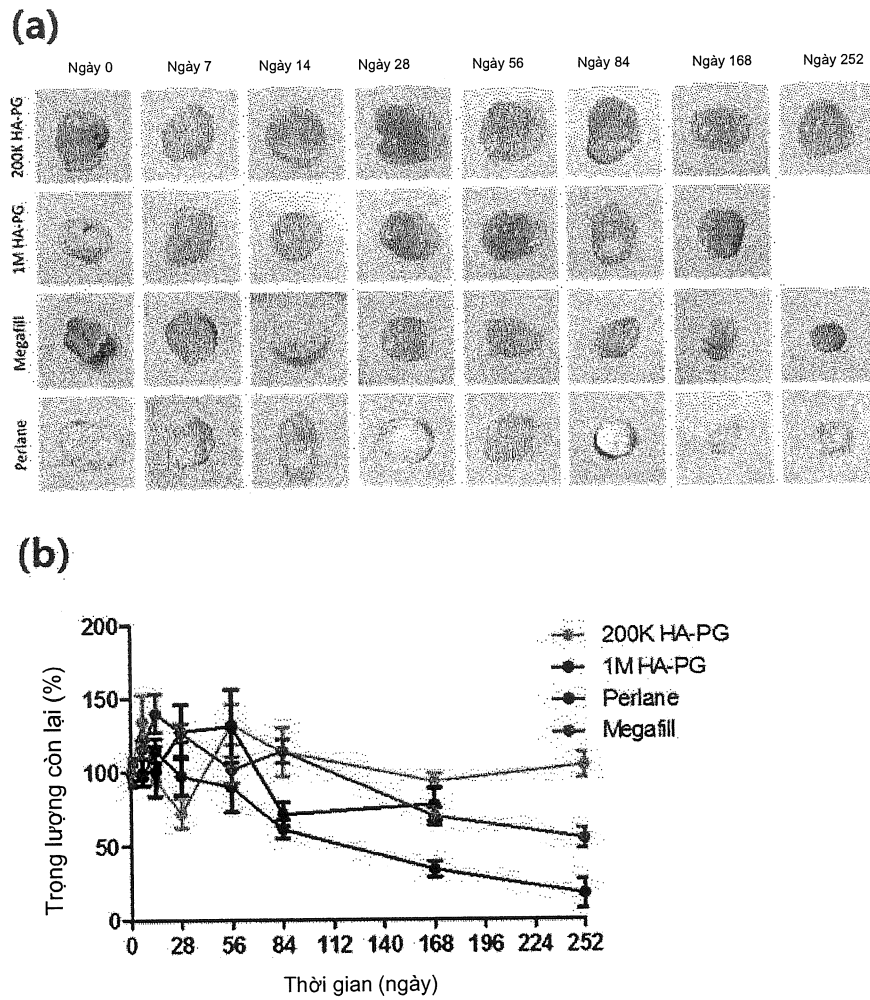


(b)



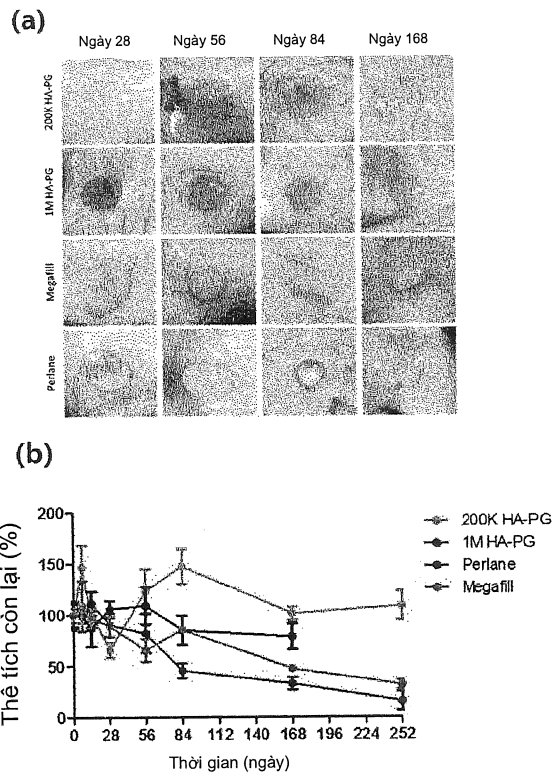
11/16

[FIG. 24]

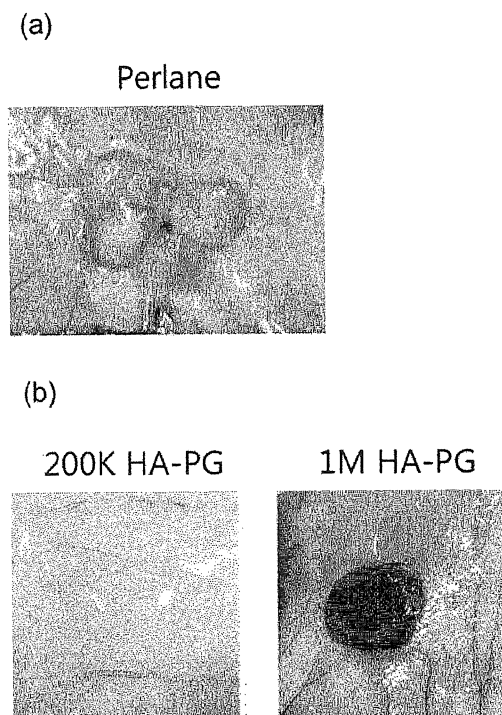


12/16

[FIG. 25]

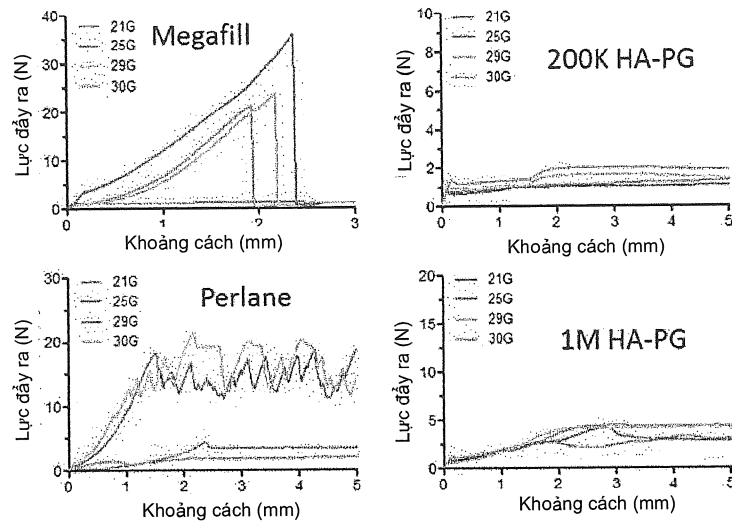


[FIG. 26]

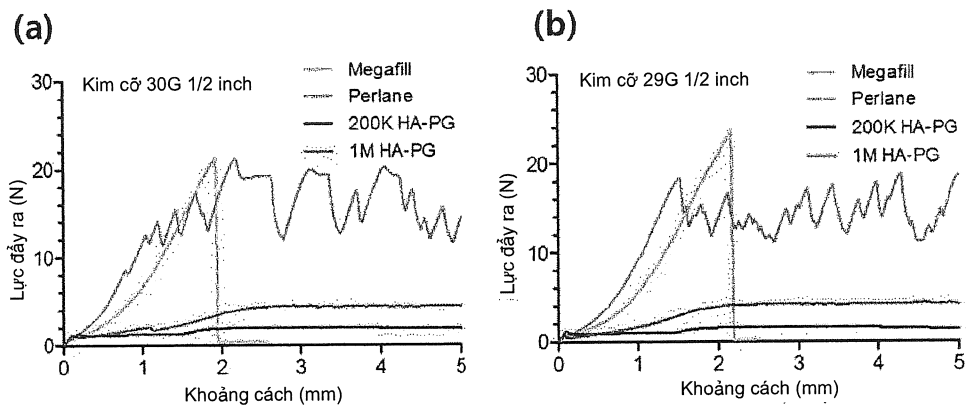


13/16

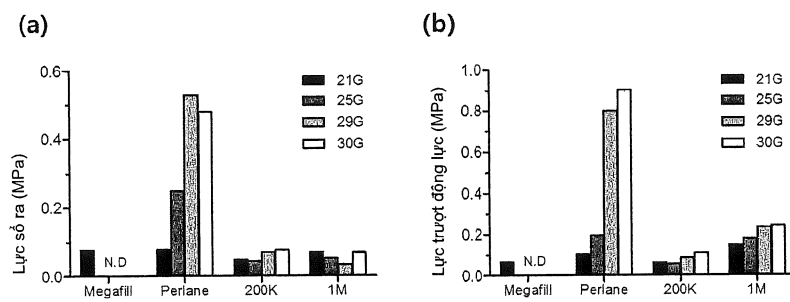
[FIG. 27]



[FIG. 28]

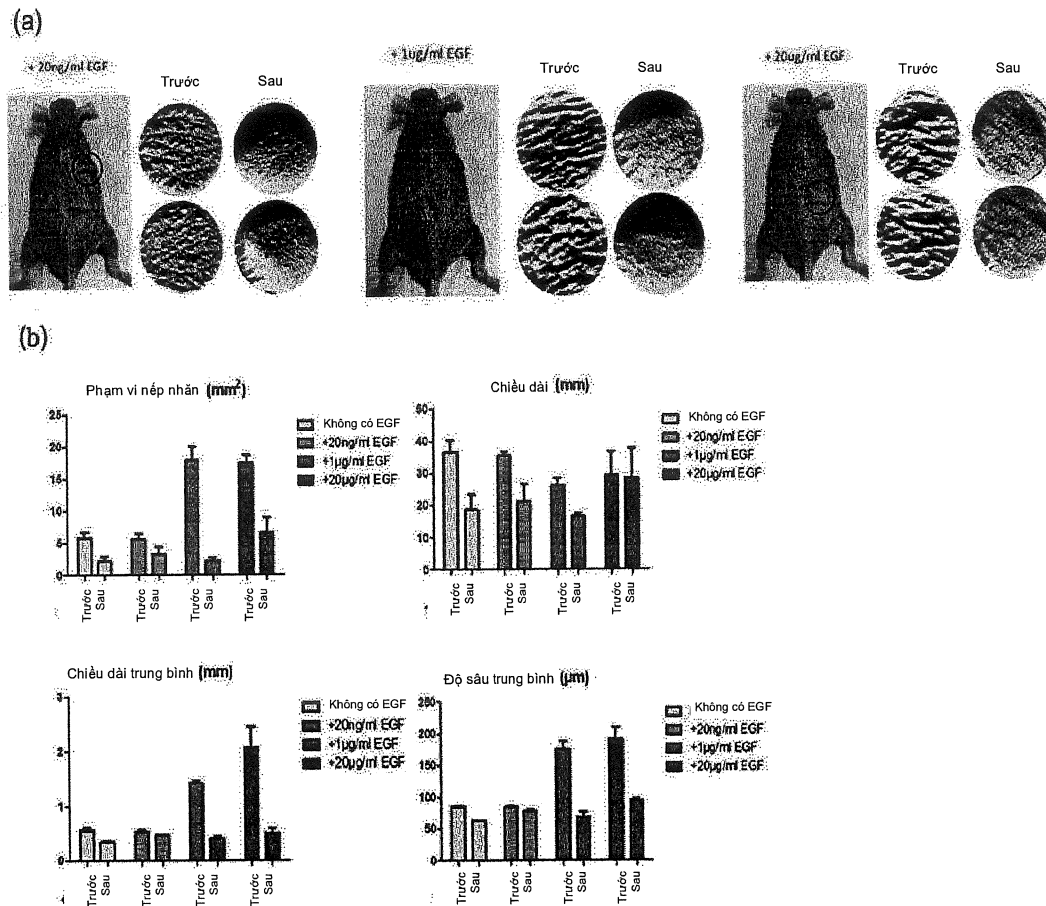


[FIG. 29]

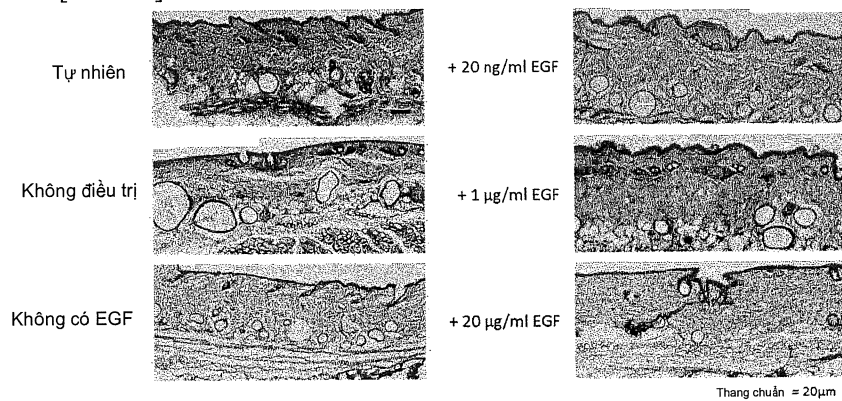


14/16

[FIG. 30]

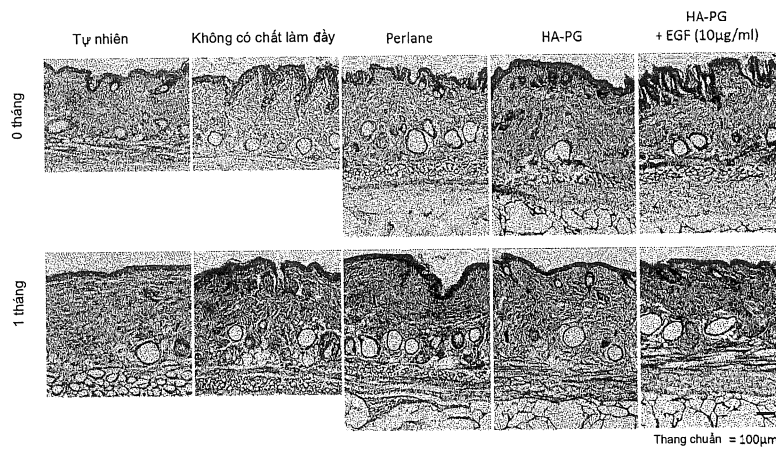


[FIG. 31]

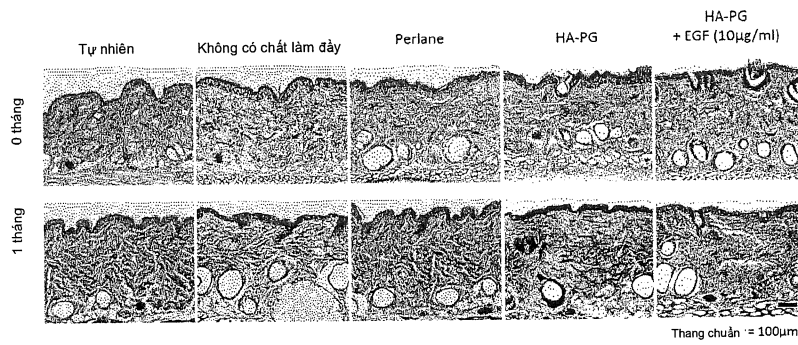


15/16

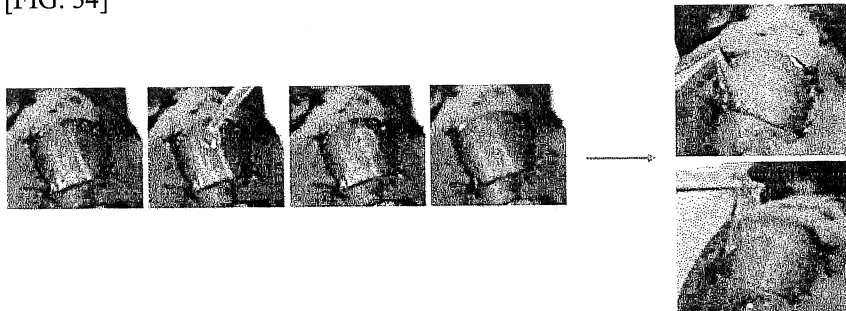
[FIG. 32]



[FIG. 33]

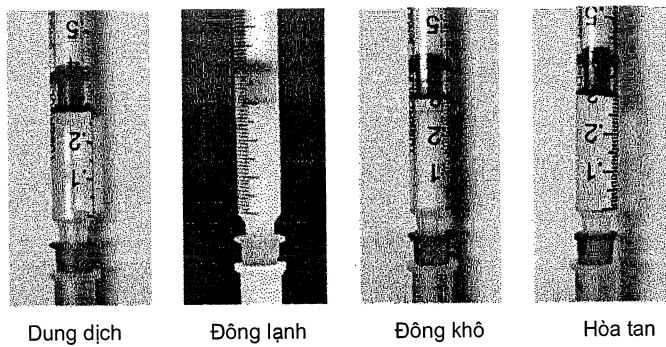


[FIG. 34]



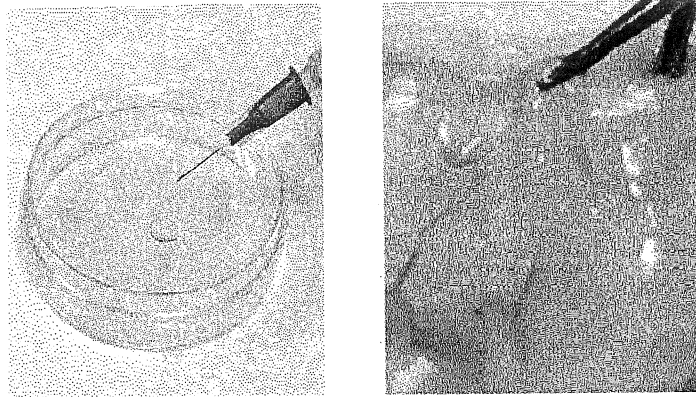
[FIG. 35]

Xi lanh

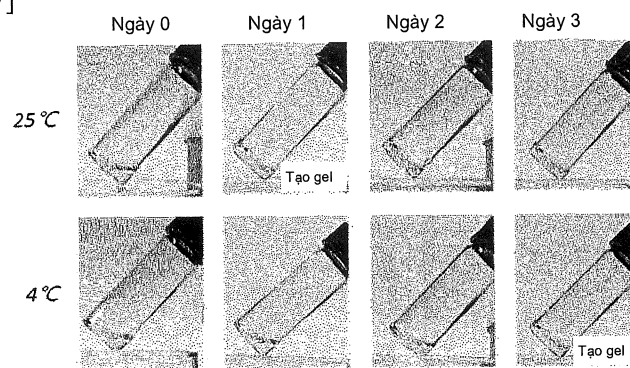


16/16

[FIG. 36]



[FIG. 37]



[FIG. 38]

