



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

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

(11)



1-0051650

(51)^{2021.01} A61K 9/00; A61K 31/685; A61Q 19/00; (13) B
A61P 17/00; A61K 31/365; A61K
31/728

(21) 1-2022-04702

(22) 25/02/2021

(86) PCT/IB2021/051573 25/02/2021

(87) WO 2021/171215 02/09/2021

(30) 102020000004069 27/02/2020 IT

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/11/2022 416A

(73) RICERFARMA S.R.L. (IT)

Via Egadi, 7, 20144 Milano, ITALY

(72) CERINI, Roberto (IT).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM DÙNG TẠI CHỖ ĐƯỢC THIẾT KẾ ĐỂ DUY TRÌ VÀ/HOẶC KHÔI
PHỤC TÍNH NGUYÊN VẸN CỦA NIÊM MẠC VÀ BIỂU BÌ BỊ TỔN THƯƠNG

(21) 1-2022-04702

(57) Sáng chế bộc lộ các chế phẩm bám dính niêm mạc dùng tại chỗ chứa axit hyaluronic hoặc muối của nó, cholin alfosxerat, este của axit ascorbic ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,050% khối lượng/khối lượng và 0,0004% khối lượng/khối lượng, và ít nhất một tá dược hoặc chất mang dược dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm dùng tại chỗ để duy trì và/hoặc khôi phục tính nguyên vẹn của niêm mạc và biểu bì bị tổn thương.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tính nguyên vẹn của mô da và niêm mạc có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều nguyên nhân ngoại sinh và nội sinh, như thiếu hụt vitamin, chế độ ăn không đúng, vệ sinh kém, nhiễm vi khuẩn, virus hoặc nấm, rối loạn hệ khuẩn ruột, các thay đổi của hệ vi khuẩn niêm mạc, sự mất cân bằng nội tiết, các bệnh suy nhược, các yếu tố di truyền, các yếu tố cơ học, vật lý, hóa học và chấn thương, bức xạ, v.v..

EP2646036 bộc lộ các chế phẩm hữu dụng để duy trì và khôi phục tính nguyên vẹn của niêm mạc và biểu bì, bao gồm cholin alfosxerat và axit hyaluronic.

Cholin alfosxerat được biết đến là chất nootropic có khả năng cải thiện tính hướng của tế bào não (bằng cách hoạt hóa nguồn cung máu và sự chuyển hóa tế bào), và do đó, cải thiện các chức năng trí tuệ. WO93/19730 bộc lộ việc sử dụng trên da và tóc với hoạt động tạo ẩm, làm mềm, tạo đàn hồi, phục hồi, tăng cường độ dày.

Như được bộc lộ trong WO93/19730, cholin alfosxerat theo thực tiễn không có độc tính toàn thân, và có khả năng dung nạp tại chỗ rõ rệt. Nó đã được biết đến trong lĩnh vực dược lý với công dụng trong các chế phẩm có thể tiêm được và chế phẩm uống để điều trị các thay đổi của chức năng nhận thức, và là yếu tố tiết hormon sinh trưởng khả thi.

Axit hyaluronic, mà có mặt rộng rãi ở nhiều loại mô cơ thể người và động vật khác nhau, có tính nhớt đàn cao và có khả năng giữ lên đến 1000 lần khối lượng của nó trong nước. Nó được sử dụng rộng rãi, chủ yếu ở dạng natri hyaluronat, trong các chế phẩm mỹ phẩm và dược phẩm, do các tính chất bám dính niêm mạc, kháng viêm và phân

cách của nó.

Ascorbyl palmitat (AP), dạng hòa tan trong lipit của vitamin C, hữu dụng để bảo vệ các lipit khỏi sự peroxy hóa, và chủ yếu được sử dụng trong mỹ phẩm ở các nồng độ nằm trong khoảng giữa 1,0 và 0,1% khối lượng/khối lượng cho các mục đích chống oxy hóa và kháng gốc trong điều trị chống lão hóa. Tương tự như các lipit, nó dễ thấm qua da và niêm mạc, trong khi nó sử dụng hoạt tính chống oxy hóa, ngăn chặn sự lão hóa tế bào và sự thoái hóa collagen. Ascorbyl palmitat cũng được bán ở dạng thực phẩm bổ sung, để cải thiện sự hấp thụ sắt, hỗ trợ sự tuần hoàn máu và tăng cường sự hình thành collagen, nhờ đó giúp tránh sự khởi phát chứng đau khớp và thấp khớp. Nó cũng được sử dụng ở dạng chất phụ gia thực phẩm (E304) nhằm mục đích chống oxy hóa. Cũng đã biết rằng axit ascorbic và các este của nó, cụ thể là L-ascorbyl palmitat, có hoạt tính ức chế đáng kể chống lại các hyaluronidaza, các enzym chịu trách nhiệm đối với sự phân hủy axit hyaluronic.

Nhu cầu đặc biệt đối với các chế phẩm mà hữu dụng để duy trì và khôi phục tính nguyên vẹn của niêm mạc và có khả năng thích ứng với các loại dạng bào chế khác nhau cho các vị trí áp dụng khác nhau, và có tác dụng hiệp đồng giữa các thành phần và độ ổn định được cải thiện đối với các hyaluronidaza.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bây giờ đã phát hiện ra rằng việc sử dụng tại chỗ trên niêm mạc và biểu bì bị tổn thương của tổ hợp gồm axit hyaluronic khối lượng phân tử cao, este của axit ascorbic, tốt hơn là ascorbyl palmitat, ở các nồng độ thấp hơn hoặc bằng 0,05% khối lượng/khối lượng, và cholin alfosxerat trong chất nền sinh học/bám dính niêm mạc, duy trì và khôi phục tính nguyên vẹn của mô niêm mạc và biểu bì với tính hiệu quả và độ linh hoạt của ứng dụng cao hơn so với của các chế phẩm phối chế đã biết.

Tổ hợp theo sáng chế đặc biệt hữu dụng để điều trị các tình trạng kích ứng/viêm của niêm mạc và biểu bì (vết bỏng, vết loét, rôm sảy, viêm da và loại tương tự).

Do đó, sáng chế đề xuất chế phẩm bám dính niêm mạc dùng tại chỗ chứa axit

hyaluronic hoặc muối của nó, cholin alfosxerat, este của axit ascorbic ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,050% khối lượng/khối lượng và 0,0004% khối lượng/khối lượng, và ít nhất một tá dược hoặc chất mang dược dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Este của axit ascorbic, tốt hơn là ascorbyl palmitat, có mặt trong chế phẩm phối chế theo sáng chế ở các nồng độ thấp hơn so với nồng độ thường được sử dụng cho việc sử dụng làm chất chống oxy hóa và chống gốc (0,500-0,100% khối lượng/khối lượng) trong các chế phẩm mỹ phẩm và chế phẩm da liễu thông thường.

Độ cân bằng tốt nhất giữa hiệu quả kháng hyaluronidaza và các tính chất bám dính niêm mạc của các chế phẩm phối chế được xem xét để đạt được ở các nồng độ được chỉ định của este của axit ascorbic.

Khối lượng phân tử trung bình của axit hyaluronic tốt hơn là nằm trong khoảng giữa 800.000 và 4.000.000 Da. Axit hyaluronic có thể có mặt trong các chế phẩm phối chế ở dạng muối natri ở nồng độ nằm giữa 20,000% khối lượng/khối lượng và 0,0005% khối lượng/khối lượng.

Cholin alfosxerat có nằm ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,0005 đến 10,000% khối lượng/khối lượng, tốt hơn là từ 0,001% đến 1,000% khối lượng/khối lượng.

Các chế phẩm theo sáng chế cũng chứa một hoặc nhiều chất bám dính niêm mạc được chọn từ beta-glucan, natri carboxymetyl beta-glucan, chitosan, carboxymetyl chitosan, carboxymetylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, carbome, PVA (rượu polyvinyl), PVP (polyvinylpyrrolidon), polycarbophil (axit polyacrylic được liên kết ngang với divinyl glycol), PVM/MA copolyme (copolyme của methyl vinyl ete và maleic anhydrit) và VP/eicosen copolyme (1-vinyl-2-pyrrolidinon - 1-eicosen (1:1)).

Theo khía cạnh khác, các chế phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm các thành phần hoạt tính khác hữu dụng cho điều trị tại chỗ của niêm mạc, như các thành phần được mô tả trong tài liệu Martindale, The Complete Drug Reference, 34th Edition.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thích hợp cho sử dụng

tại chỗ theo các phương pháp thông thường đã biết rõ, như các phương pháp được mô tả trong tài liệu Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition.

Các tá dược hoặc chất mang đã biết, như các chất tạo màng, như các chất được mô tả trong tài liệu Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th Edition, Pharmaceutical Press, cũng có thể được bổ sung để tối ưu hóa việc sử dụng chuyên dụng của các chế phẩm.

Các ví dụ về các chế phẩm phối chế được ưu tiên là dạng gel, dầu trong nước (o/w) và nước trong dầu (w/o) nhũ tương, dạng kem, thuốc mỡ, dạng xịt, dạng bột, thuốc xức và dạng bột.

Các chế phẩm được đặc biệt ưu tiên là ở dạng gel có nước (hydrogel), mà có thể thu được bằng cách sử dụng polyme được dùng có thể hấp thụ được đáng kể nước và do đó bám dính vào niêm mạc (sự bám dính niêm mạc).

Sự bám dính niêm mạc của các chế phẩm theo sáng chế đảm bảo thời gian cư ngụ đủ trên niêm mạc, mà là đối tượng cho hoạt động rửa trôi của các yếu tố vật lý và cơ học mà có thể làm giảm thời gian cư ngụ của thành phần hoạt tính, ví dụ trong trường hợp niêm mạc miệng.

Các chế phẩm theo sáng chế, mà thích hợp cho việc sử dụng ở người hoặc thú y, kết hợp hoạt tính kháng viêm và sửa chữa mô của axit hyaluronic với sự tạo thành màng và hoạt động bảo vệ của các chất nền chế phẩm sinh học/bám dính niêm mạc chứa cholin alfosxerat và hoạt động kháng hyaluronidaza của ascorbyl palmitat ở các nồng độ thấp.

Theo các phương án được ưu tiên, axit hyaluronic và este của axit ascorbic, tốt hơn là ascorbyl palmitat, ở tỷ lệ mol (so với đơn vị disacarit của axit hyaluronic) nằm trong khoảng từ 60:1 đến 1:1. Tốt hơn nữa là, axit hyaluronic và este của axit ascorbic là ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 20:1 đến 1:1; hoạt tính kháng hyaluronidaza tốt nhất thu được ở các tỷ lệ đã nêu.

Thực tế, trong sự có mặt của hyaluronidaza, axit hyaluronic phân hủy nhanh chóng bằng lên đến 95-97% sau chỉ 5 giờ. Như được quan sát thấy trong phần Ví dụ dưới đây, ascorbyl palmitat đã chứng tỏ là có hiệu quả đáng kể trong việc làm chậm các động

lực enzym và do đó làm giảm sự phân hủy không mong muốn của axit hyaluronic. Trên thực tế, sau 5 giờ, các chế phẩm chứa ascorbyl palmitat được thể hiện sự phân hủy HA ít hơn lên đến 50% so với được quan sát ở các mẫu của axit hyaluronic được sử dụng một mình hoặc kết hợp với cholin alfosxerat. Sau 24 giờ, các chế phẩm chứa ascorbyl palmitat được thể hiện sự phân hủy HA ít hơn lên đến 27% so với được quan sát ở mẫu của axit hyaluronic được sử dụng một mình hoặc được kết hợp với cholin alfosxerat.

Hoạt tính kháng hyaluronidaza của ascorbyl palmitat hiệp đồng với hoạt động của axit hyaluronic, dù là nội sinh đối với mô hoặc ngoại sinh. Hoạt động kháng hyaluronidaza có tầm quan trọng cốt lõi để làm tăng hiệu quả kháng viêm và sửa chữa mô của axit hyaluronic, bảo vệ nó chống lại hoạt động enzym của hyaluronidaza nội sinh và vi khuẩn và bảo đảm sự cư ngụ chức năng dài hạn tại chỗ, và do đó hoạt tính lớn hơn được kết hợp với độ sinh khả dụng và tính nguyên vẹn cấu trúc lớn hơn.

Hơn thế nữa, hoạt động kháng hyaluronidaza cũng tiến hành hoạt động kháng khuẩn/kháng viêm; trên thực tế, nhiều vi khuẩn tiến hành hoạt động viêm bằng việc sản sinh các hyaluronidaza đặc hiệu mà thúc đẩy sự tạo khuẩn lạc hóa mô, nhờ đó thúc đẩy sự khởi phát và sự lan rộng của sự nhiễm khuẩn/tạp nhiễm ở mức cục bộ.

Dựa trên cơ sở các xem xét được nêu ra ở trên, hoạt tính kháng viêm/sửa chữa mô của HA được bảo vệ và được tăng cường mạnh bởi hoạt động kháng hyaluronidaza và sự có mặt của chất nền hình thành màng và sinh học/bám dính niêm mạc có khả năng tạo thành môi trường ưa thích cho sự bảo vệ và sửa chữa mô (làm lành vết thương).

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng cho niêm mạc bên ngoài, như các niêm mạc của miệng và khoang miệng nói chung, niêm mạc mũi, niêm mạc mắt, niêm mạc tai, niêm mạc sinh dục, niêm mạc hậu môn và trực tràng.

Các chế phẩm theo sáng chế hữu dụng trong ngăn ngừa và điều trị các rối loạn viêm và/hoặc các bệnh liên quan đến sự tổn thương đối với niêm mạc miệng, trong việc ngăn ngừa và/hoặc đối tượng viêm niêm mạc do bức xạ.

Chứng viêm và các tổn thương của niêm mạc miệng nghĩa là, ví dụ, viêm lợi, viêm niêm mạc (loét miệng, bao gồm loét miệng tái phát), viêm miệng, viêm lưỡi, v.v..

Các rối loạn này có thể có căn nguyên khác nhau; ví dụ, chúng có thể có các nguyên nhân cơ học, hóa học hoặc bệnh lý học (các nhiễm trùng, rối loạn hệ khuẩn của khoang miệng hoặc rối loạn hệ khuẩn ruột).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây minh họa thêm sáng chế. Các tỷ lệ phần trăm được biểu diễn ở dạng số phần theo khối lượng (khối lượng/khối lượng) của tổng thể tích của chế phẩm.

Ví dụ 1 - Chế phẩm dạng lỏng cho niêm mạc miệng

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	1,000%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,300%
Ascorbyl palmitat	0,005%
Polycarbophil	0,050%
Carboxymetyl chitosan	0,100%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất tạo mùi	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 2 – Chế phẩm dạng gel để điều trị loét miệng

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,400%
Ascorbyl palmitat	0,040%
Cholin alfosxerat	0,200%
Carboxymetylxenluloza	1,000%
Polycarbophil	0,500%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	1,000%
PVA (rượu polyvinyl)	0,500%
Xylitol	7,000%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất tạo mùi	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 3 - Chế phẩm dạng gel để điều trị viêm niêm mạc miệng

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,500%
Ascorbyl palmitat	0,050%
Cholin alfosxerat	0,100%
Carboxymetylxenluloza	1,000%
Polycarbophil	0,400%
Carboxymetyl chitosan	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	1,500%
PVA (rượu polyvinyl)	0,500%
Xylitol	7,500%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất tạo mùi	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 4 - Chế phẩm dạng lỏng để điều trị viêm niêm mạc miệng

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,200%
Ascorbyl palmitat	0,020%
Cholin alfosxerat	0,050%
Polycarbophil	0,050%
Carboxymetyl chitosan	0,050%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,200%
PVA (rượu polyvinyl)	0,100%
Xylitol	7,500%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất tạo mùi	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 5 - Chế phẩm dạng gel để sử dụng trên niêm mạc mũi

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,050%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,200%
Ascorbyl palmitat	0,020%
Carboxymetylxenluloza	4,500%
Polycarbophil	0,300%

Copolyme PVM/MA	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%
PVA (rượu polyvinyl)	0,100%
Nước <i>Euphrasia</i> được cất	10,000%
Natri clorua	0,800%
Natri phosphat dodecahydrat dibazơ	0,300%
Natri phosphat monohydrat monobazơ	0,030%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 6 - Chế phẩm dạng lỏng để sử dụng trên niêm mạc mắt

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,010%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,150%
Ascorbyl palmitat	0,005%
Polycarbophil	0,050%
Carboxymetyl chitosan	0,050%
Nước chiết xuất cây phi được cất	10,000%
Nước cam cúc được cất	10,000%
Natri clorua	0,800%
Natri phosphat dodecahydrat dibazơ	0,300%
Natri phosphat monohydrat monobazơ	0,030%
EDTA	0,050%
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 7 - Chế phẩm dạng lỏng để sử dụng trên niêm mạc tai

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,100%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,100%
Ascorbyl palmitat	0,015%
Polycarbophil	0,050%
Copolyme PVM/MA	0,150%
Glyxerol	50,000%
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 8 - Chế phẩm dạng lỏng để sử dụng trên niêm mạc âm đạo và âm hộ

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,050%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,200%
Ascorbyl palmitat	0,010%
Polycarbophil	0,100%
Copolyme PVM/MA	0,050%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,200%
PVA (rượu polyvinyl)	0,100%
Natri clorua	0,800%
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất thơm	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 9 - Chế phẩm dạng gel để sử dụng trên niêm mạc âm đạo và âm hộ

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,025%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,150%
Ascorbyl palmitat	0,040%
Muối carboxymetylxenluloza natri	4,500%
Polycarbophil	0,250%
Copolyme PVM/MA	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%
PVA (rượu polyvinyl)	0,100%
Natri clorua	0,800%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất thơm	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 10 - Chế phẩm dạng gel để sử dụng trên niêm mạc của bộ phận sinh dục nam

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,500%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,250%
Ascorbyl palmitat	0,050%
Muối carboxymetylxenluloza natri	4,500%
Polycarbophil	0,250%
Copolyme PVM/MA	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%

PVA (rượu polyvinyl)	0,100%
Natri clorua	0,800%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 11 - Chế phẩm dạng gel để sử dụng trên niêm mạc của hậu môn - trực tràng

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,500%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,250%
Ascorbyl palmitat	0,015%
Muối carboxymetylxenluloza natri	4,500%
Polycarbophil	0,250%
Carboxymetyl chitosan	0,150%
Copolyme PVM/MA	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%
PVA (rượu polyvinyl)	0,100%
Nước xạ hương trắng được cất	10,000%
Nước oải hương được cất	10,000%
Nước thanh cúc được cất	10,000%
Natri clorua	0,800%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 12 - Chế phẩm gel để điều trị viêm lợi

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,250%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,450%
Ascorbyl palmitat	0,045%
Xylitol	7,500%
Muối carboxymetylxenluloza natri	4,000%
Rượu polyvinyl	0,300%
Polycarbophil	0,300%
copolyme VP/eicosen	0,100%
Copolyme PVM/MA	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất tạo mùi	lượng vừa đủ

Tạo màu	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 13 - Chế phẩm gel để điều trị tổn thương lợi

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,500%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,350%
Ascorbyl palmitat	0,025%
Xylitol	7,500%
Muối carboxymetylxenluloza natri	4,000%
Rượu polyvinyl	0,100%
Polycarbophil	0,100%
copolyme VP/eicosen	0,100%
Copolyme PVM/MA	0,150%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	0,500%
Chất làm tan	lượng vừa đủ
Chất bảo quản	lượng vừa đủ
Chất tạo mùi	lượng vừa đủ
Tạo màu	lượng vừa đủ
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ 100

Ví dụ 14 - Vòng nâng âm đạo

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,100%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,200%
Ascorbyl palmitat	0,045%
Carboxymetyl chitosan	0,050%
Carboxymetyl beta glucan	0,050%
Gelatin	20,000%
Glyxerol	70,000%
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ đến 100%

Ví dụ 15 - Chế phẩm thụt hậu môn - trực tràng

Hợp chất	Tỷ lệ phần trăm
Cholin alfosxerat	0,300%
Natri hyaluronat (MW trung bình 1.500.000 Da)	0,300%
Ascorbyl palmitat	0,050%

Silic dioxit keo	1,700%
Polyvinylpyrrolidon	0,840%
Carboxymethylxenluloza	0,840%
Polycarbophil	0,100%
Carboxymetyl chitosan	0,050%
Natri benzoat	0,400%
Kali metabisulphit	0,250%
Axit phosphoric	0,100%
Nước được khử khoáng	lượng vừa đủ 100

Ví dụ 16. Nghiên cứu về sự phân hủy enzym axit hyaluronic enzymatic ở các chế phẩm chứa Glyxerophosphocholin và Ascorbyl Palmitat

Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá sự phân hủy enzym của hai mẻ khác nhau của các axit hyaluronic (HA) được vận hành bởi Hyaluronidaza, họ các enzym mà xúc tác sự phân hủy của polysacarit này, trong chế phẩm chứa các thành phần khác nhau. Sự phân bố khối lượng phân tử của các axit bị phân hủy sẽ được phân tích bằng cách sử dụng sắc ký loại cỡ hiệu năng cao được ghép cặp với mảng thiết bị phát hiện bộ ba (HP-SEC-TDA).

Sau đây là danh sách các chất phản ứng và các nguyên liệu được sử dụng:

- Axit hyaluronic (Mw 1.348.000 Da), Contipro a.s. (Cộng hòa Séc)
- Axit hyaluronic (Mw 1.450.000 Da), Lehvoss Italia S.r.l. (Ý)
- Glyxerophosphocholin
- Ascorbyl Palmitat
- Axit xitric monohydrat, Sigma Aldrich
- H₂O khử ion thu được bằng thiết bị Culligan;
- Hyaluronidaza từ tinh hoàn bò, Loại I-S. 400-1000 đơn vị/mg. Sigma Aldrich;
- NaNO₃. Sigma Aldrich;
- NaN₃. Sigma Aldrich;
- Lọ Snap-it 0,3 ml, 11,6 x 32 mm. Thermo Scientific;
- Nắp Snap-it 11 mm, Thermo Scientific;
- Natri xitrat diidrat, Sigma Aldrich.

Các mẫu được chuẩn bị và được thử nghiệm:

HA Contipro (dung dịch A): khoảng 50 mg mẫu HA được hòa tan trong 50 ml đệm xitrat (pH=6,06) và được khuấy trong 16 giờ tại 38°C; nồng độ của dung dịch axit hyaluronic là khoảng 1mg/ml. 10 ml dung dịch được thủy phân.

HA Levhoss (dung dịch B): khoảng 50 mg mẫu HA được hòa tan trong 50 ml đệm xitrat (pH=6,06) và được khuấy trong 16 giờ tại 38°C; nồng độ của dung dịch axit hyaluronic là khoảng 1mg/ml. 10 ml dung dịch được thủy phân.

HA Contipro + GPC (dung dịch C): 7,5mg Glyxerophosphocholin được bổ sung vào 10 ml dung dịch A.

HA Levhoss + GPC (dung dịch D): 7,5mg Glyxerophosphocholin được bổ sung vào 10 ml dung dịch B.

HA Contipro + GPC + AP (dung dịch E): 5mg Ascorbyl Palmitat và 7,5mg Glyxerophosphocholin được bổ sung vào 10 ml dung dịch A.

HA Levhoss + GPC + AP (dung dịch F): 5mg Ascorbyl Palmitat và 7,5mg Glyxerophosphocholin được bổ sung vào 10 ml dung dịch B.

Điều chế dung dịch đệm:

Dung dịch 1: 420 mg axit xitric monohydrat được hòa tan trong 100ml nước khử ion tại nhiệt độ phòng trong 30'.

Dung dịch 2: 9,212 g natri xitrat dihydrat được hòa tan trong 100 ml nước khử ion tại nhiệt độ phòng trong 30'.

Dung dịch đệm: Dung dịch 1 đã được bổ sung vào Dung dịch 2 và được khuấy tại nhiệt độ phòng trong 30'. pH thu được =6,06.

Điều chế dung dịch enzym:

Hyaluronidaza: khoảng 10mg hyaluronidaza được hòa tan trong khoảng 1ml H₂O và được khuấy tại nhiệt độ phòng trong 3 giờ (10mg/ml).

Quy trình phân hủy enzym:

Các dung dịch được khuấy tại 38°C trong bể dầu trong khoảng 1 giờ trước khi bổ

sung 67 μ l dung dịch enzym (HA/Hyaluronidaza 15/1 khối lượng/khối lượng).

Các phân phân ước khác nhau của các dung dịch được thu gom tại các thời gian khác nhau (1 giờ; 2 giờ; 3 giờ; 4 giờ; 5 giờ; 6 giờ, 24 giờ) và được gia nhiệt tại 100°C trong 5' sử dụng máy lắc nhiệt để làm biến tính enzym. Các dung dịch được lọc để loại bỏ enzym bị kết tủa (thiết bị lọc LLG-Syringe, kích cỡ lỗ CA 0,20 μ m. Ø 13 mm). Trước các phân tích HP-SEC-TDA, các dung dịch được pha loãng đến 0,5 mg/ml HA với pha động.

Phân tích HP-SEC-TDA

Các điều kiện sắc ký đồ

Hai thiết bị HP-SEC-TDA tương đương được sử dụng:

1) Hệ thống Viscotek mẫu TDA305. được trang bị các thiết bị dò chỉ số khúc xạ, tán xạ ánh sáng góc phải và thấp và các nhớt kế, được sử dụng trong các điều kiện sau đây:

Các cột: 2 cột TSKGMPWXL 13 μ m. 7 mm ID x 30 cm L. Tosoh Bioscience;

Pha động: 0,1 M NaNO₃ + NaN₃ 0,05 %;

Thể tích tiêm: 100 μ l;

Nhiệt độ: 40°C;

Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút.

2) Hệ thống đa bộ dò OmniSEC (Malvern Instruments Ltd. UK) được trang bị các thiết bị dò chỉ số khúc xạ, bộ phận tán xạ ánh sáng góc phải và thấp và các nhớt kế, được sử dụng trong các điều kiện sau đây:

Các cột: 2 cột TSKGMPWXL 13 μ m. 7 mm ID x 30 cm L. Tosoh Bioscience;

Pha động: 0,1 M NaNO₃ + NaN₃ 0,05 %;

Thể tích tiêm: 100 μ l;

Nhiệt độ: 40°C;

Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút.

Các hệ thống được hiệu chuẩn với tiêu chuẩn Pullulan, với khối lượng phân tử,

chỉ số đa phát tán và độ nhớt nội tại được chứng thực (PolyCAL-PullulanSTD-Malvern Panalytical).

Tạo dựng sắc ký đồ

Các sắc ký đồ từ TDA 305 được thu và được dựng lên sử dụng phần mềm OmniSEC phiên bản 4.6.2. trong khi các sắc ký đồ từ hệ thống đa bộ dò OmniSEC được thu và được dựng lên sử dụng phần mềm OmniSEC phiên bản 10.10.

Các kết quả

Đánh giá sự phân bố khối lượng phân tử

- Tạo mẫu ban đầu

Khoảng 50 mg axit hyaluronic được hòa tan trong 50 ml đệm Xitrat, được khuấy trong 16 giờ, được pha loãng đến 0,5 mg/ml với pha động và được tiêm một lần. Để đánh giá sự phân bố khối lượng phân tử của axit hyaluronic, giá trị 0,155 dn/dc được sử dụng đã biết bởi tài liệu (ref. Theisen A. Johann C. Deacon MP. Harding SE. Refractive Increment Data-Book. Nottingham University Press. 2000).

Mẫu HA có thời gian rửa giải giữa 10 và 15 ml với đỉnh sắc ký đồ dạng chuồng lớn, chỉ số của giá trị chỉ số đa phân tán khá cao. Sau đỉnh HA, các đặc tính pha động được rửa giải.

Trong Bảng 1. Các kết quả phân tích được báo cáo theo khối lượng phân tử trung bình khối (M_w Da), khối lượng phân tử trung bình số (M_n Da), khối lượng phân tử đỉnh (M_p Da), và chỉ số đa phân tán (M_w/M_n); hơn nữa, nhờ kỹ thuật TDA, giá trị độ nhớt nội tại ($[\eta]$, dl/g), bán kính thủy động (R_h , nm) và % thu hồi. Các giá trị của a và $\log k$ mà thể hiện tương ứng các hằng số độ dốc và hệ số chặn của đường cong Mark-Houwink cũng được báo cáo; các kết quả là trung bình của hai phân tích khác nhau và các giá trị của M_n và M_w được làm tròn đến hàng nghìn Da.

Bảng 1. Các kết quả HP-SEC-TDA HA của các mẫu HA

Mẫu	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	MH α	MH logk	$[\eta]$ dl/g	Rh (nm)	% Thu hồi
HA Contipro	1.034 kDa	1.348 kDa	1,3	0,65	-2,68	19,32	72,72	84,38
HA Lehvoss	1.097 kDa	1.450 kDa	1,32	0,66	-2,74	20,07	75,49	81,72

Các mẫu thủy phân bằng enzym

Hoạt động hyaluronidaza qua các axit hyaluronic đã được nghiên cứu và báo cáo rộng rãi; để nghiên cứu hoạt tính enzym trên mẫu đã được chuẩn bị, động lực của sự thủy phân được theo dõi bằng kỹ thuật HP-SEC-TDA. Sự giảm tỉ số của khối lượng phân tử (tính bằng M_w) của thành phần của polysacarit được xác định bằng cách sử dụng công thức sau đây:

$$((M_{wt0} - M_{wt_n}) * 100) / M_{wt0}$$

trong đó 0 là khối lượng phân tử trung bình khối (M_w) tại thời gian 0 và M_{wt_n} là M_w tại thời gian n.

Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA với Hyaluronidaza

Các mẫu đã được thủy phân hai lần, để xác minh khả năng lặp lại được. Trong các bảng dưới đây, các giá trị trung bình của khối lượng phân tử (được làm tròn đến hàng trăm) và sự giảm tỷ lệ tương ứng của cả hai thí nghiệm được báo cáo.

Bảng 2. Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA (dung dịch A)

Thời gian	M_w (Da)	% giảm của M_w
0	1.348.000	0
1 giờ	267.700	63%
2 giờ	140.850	90%
3 giờ	104.000	92%
4 giờ	76.610	94%
5 giờ	64.590	95%
17 giờ	23.620	98%
24 giờ	23.920	98%

Bảng 3. Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA (dung dịch B)

Thời gian	M _w (Da)	% giảm của M _w
0	1.450.000	0
1 giờ	213.500	86%
2 giờ	107.595	93%
3 giờ	74.920	95%
4 giờ	59.620	96%
5 giờ	50.480	97%
17 giờ	18.200	99%
24 giờ	24.980	98%

Bảng 4. Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA (dung dịch C)

Thời gian	M _w (Da)	% giảm của M _w
0	1.348.000	0%
1 giờ	269.500	80%
2 giờ	169.200	87%
3 giờ	95.840	93%
4 giờ	92.710	93%
5 giờ	85.790	94%
24 giờ	29.100	98%

Bảng 5. Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA (dung dịch D)

Thời gian	M _w (Da)	% giảm của M _w
0	1.450.000	0
1 giờ	191.500	87%
2 giờ	117.300	92%
3 giờ	59.680	96%
4 giờ	54.650	96%
5 giờ	52.880	96%
24 giờ	16.790	99%

Bảng 6. Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA (dung dịch E)

Thời gian	M _w (Da)	% giảm của M _w
0	1.348.000	0%
1 giờ	716.200	47%
3 giờ	698.900	48%
5 giờ	692.100	49%
20h	394.500	71%
24 giờ	382.000	72%

Bảng 7. Sự phân hủy HP-SEC-TDA HA (dung dịch F)

Thời gian	M _w (Da)	% giảm của M _w
0	1.450.000	0%
1 giờ	571.100	61%
3 giờ	556.700	62%
5 giờ	552.000	62%
20h	344.300	76%
24 giờ	336.400	77%

Kết luận

Cả hai mẫu axit hyaluronic như vậy, trong sự có mặt của Hyaluronidaza, được phân hủy nhanh chóng lên đến 95-97% trong 5 giờ. Axit hyaluronic Lehvoss được phân hủy nhanh hơn một chút so với axit hyaluronic Contipro, thậm chí nếu sau 24 giờ, sự giảm của M_w là khá giống nhau.

Glyxerophosphocholin không đóng góp theo cách bất kỳ vào các động lực của enzym, nwh đã biết là các kết quả của các dung dịch C và D.

Ngược lại, sự bổ sung Ascorbyl Palmitat đã thể hiện có hiệu quả đáng kết trong việc làm chậm xuống các động lực enzym và làm giảm sự phân hủy HA không mong muốn.

Thực vậy, sau 5 giờ, tất cả các dung dịch A đến D đã thể hiện sự phân hủy HA lên đến 97%, trong khi các dung dịch E và F đặc trưng cho ascorbyl palmitat đã thể hiện sự phân hủy HA lần lượt là 49% và 62% (nhất quán với các tốc độ phân hủy khác nhau được quan sát thấy đối với các sản phẩm HA như vậy, tức là dung dịch A và dung dịch B). Điều này có nghĩa là sự cải thiện so với các dung dịch mà không có ascorbyl palmitat, lên đến 50%.

Sau 24 giờ, các dung dịch E và F đặc trưng cho ascorbyl palmitat đã thể hiện sự phân hủy HA lần lượt là 72% và 77%. Điều này có nghĩa là sự cải thiện so với các dung dịch mà không có ascorbyl palmitat, lên đến 27%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bám dính niêm mạc dùng tại chỗ chứa axit hyaluronic hoặc muối của nó, cholin alfosxerat, ascorbyl palmitat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,050% khối lượng/khối lượng và 0,0004% khối lượng/khối lượng, và ít nhất một tá dược hoặc chất mang dược dụng.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó axit hyaluronic hoặc muối dược dụng của nó có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 800.000 đến 4.000.000 Da.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó axit hyaluronic ở dạng muối natri với nồng độ nằm trong khoảng từ 20,000% khối lượng/khối lượng đến 0,0005% khối lượng/khối lượng.
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của cholin alfosxerat là giữa 0,0005% khối lượng/khối lượng và 10,000% khối lượng/khối lượng.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tá dược hoặc chất mang dược dụng được chọn từ beta-glucan, natri carboxymethyl beta-glucan, chitosan, carboxymetyl chitosan, carboxymetyl xenluloza, hydroxyetyl xenluloza, carbome, rượu polyvinyl, polyvinylpyrrolidon, polycarbophil, copolyme PVM/MA (copolyme của methyl vinyl ete và maleic anhydrit) và copolyme VP/eicosen (1-vinyl-2-pyrrolidinon - 1-eicosen (1:1)).
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chế phẩm này ở dạng của các hydrogel, lipogel, gel khan, nhũ tương O/W hoặc W/O, các dung dịch hoặc huyền phù.