



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

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

(11) 
1-0019772

(51)⁷ **A61K 31/131, 31/14, 31/16, 45/06**

(13) **B**

(21)	1-2012-02576	(22)	15.02.2011		
(86)	PCT/EP2011/000691	15.02.2011	(87)	WO2011/101113	25.08.2011
(30)	PCT/EP2010/001056	19.02.2010	EP		
(45)	25.09.2018	366	(43)	26.11.2012	296
(73)	MEGAINPHARM GMBH (AT) Worthersee-Suduferstr. 163 c.5, A-9082 Maria Worth, Austria				
(72)	RUDKO, Adolina (UA)				
(74)	Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)				

(54) **DUỐC PHẨM CHỨA MYRAMISTIN**

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm benzyldimetyl-(3-[myristoylamino]- propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa, dimetyl- (3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amin trong dung môi dược dụng thích hợp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực dược phẩm và công nghiệp dược phẩm. Các dược phẩm này có thể được dùng trong việc phát triển và bào chế thuốc để chữa bệnh và phòng bệnh cho người và động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc tổng hợp và sử dụng muối amoni bậc bốn chứa đồng thời nhóm amit được mô tả đầu tiên trong patent Mỹ số 2.459.062 (tài liệu viện dẫn 1). Cụ thể, trong ví dụ 1, [myristamido]propyl)dimethylbenzylamoni clorua được tổng hợp nhờ phản ứng của [(myristoylamido)propyl]dimetylamin với benzyl clorua trong benzen.

Trong patent này, hoạt tính của sản phẩm thu được đối với chủng Staf chuẩn đã được chứng minh. Ở nhiệt độ trong phòng, sản phẩm đã được mô tả bởi các tác giả sáng chế là chất bán rắn có nhiệt độ nóng chảy ở 54°C (cột 3, dòng 69-70). Trong ví dụ 1, không có nội dung nào khẳng định được cấu trúc của sản phẩm thu được này. Tuy nhiên, các nghiên cứu theo sáng chế liên quan tới việc tách chế phẩm tinh khiết thích hợp để dùng trong y khoa đã chỉ ra rằng [myristamido]propyl)dimethylbenzylamoni clorua ở nhiệt độ trong phòng là chất kết tinh có nhiệt độ nóng chảy lớn hơn 90°C.

Do đó, có thể cho rằng các tác giả sáng chế đó đã thu được hỗn hợp chứa sản phẩm sơ cấp và dung môi (benzen) và đã tiến hành nghiên cứu hiệu quả của chúng. Tuy nhiên, không thể sử dụng sản phẩm này trong y khoa, do độc tính của benzyl clorua và benzen.

Ở cột 3, dòng 62, có nêu rằng [(myristamido)propyl]dietylamin gốc cũng là chất rắn, như được chứng minh bởi các nghiên cứu theo sáng chế đó. Với lý do này, sản phẩm thu được trong ví dụ 1 không thể là hỗn hợp của amidoamin gốc và hợp chất cuối. Ngoài ra, không thể có mặt phần dư của amidoamin gốc, do trong Ví dụ 1 benzyl clorua được sử dụng với lượng vừa đủ cho phản ứng.

Cũng nhận thấy rằng ([myristamido]propyl)dimethylbenzylamoni clorua tinh khiết trong nước không tạo ra được dung dịch với nồng độ lớn hơn 20%, và [(myristoylamido)-propyl]dimethylamin gốc hoàn toàn không hòa tan trong nước và được tách ra khỏi các dung dịch khác vào các dung môi khác bởi nước. Cũng nhận thấy rằng thành phẩm thu được ở ví dụ 1 không thể chứa hỗn hợp [(myristamido)propyl]dimethylamin, vì ở cột 3, dòng 73-74, bộc lộ chế phẩm chứa dung dịch nước 25% trong suốt.

Đã biết đến nhiều dược phẩm chứa benzyldimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)ammoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa. Các dược phẩm này được dùng để điều trị và phòng ngừa một số loại bệnh (SU 1796185 (tài liệu viện dẫn 2), EP 1634590 (tài liệu viện dẫn 3), WO 93/00892 (tài liệu viện dẫn 4), RU 2157214 (tài liệu viện dẫn 5), US 67795 (tài liệu viện dẫn 6), RU 2161961 (tài liệu viện dẫn 8), RU 2188005 (tài liệu viện dẫn 13), RU 2184534 (tài liệu viện dẫn 14), RU 2164135 (tài liệu viện dẫn 15), RU 2177314 (tài liệu viện dẫn 16), RU 2185157 (tài liệu viện dẫn 17), RU 2173142 (tài liệu viện dẫn 19), và UA 30143 (tài liệu viện dẫn 20)). Nhược điểm của các dược phẩm này nằm ở chỗ chúng có hiệu quả rất hạn chế hoặc không đủ hiệu lực so với giải pháp kỹ thuật được đề xuất. Một vài dấu hiệu cụ thể, nhưng chưa đầy đủ, mang tính so sánh được nêu ra trong các ví dụ của bản mô tả sáng chế này.

Cũng đã có ý định sử dụng các amin bậc ba trong các hợp chất có hoạt tính sinh học. Các amin này chứa nhóm amit, bao gồm dimetyl-[3-(myristoylamino)propyl]amin ([[(myristamido)propyl]dimethylamin) (ví dụ, US WO 2007/136558) (tài liệu viện dẫn 10). Các hợp chất như vậy trong dược phẩm chứa polyhexametylen biguanidin được sử dụng trong hỗn hợp nhiều thành phần để sát khuẩn nhiều bề mặt khác nhau. Tuy nhiên, ở các nồng độ như vậy, chúng không thể được sử dụng làm dược phẩm do chúng có độc tính mạnh. US 2004/0058924 (tài liệu viện dẫn 9) bộc lộ rằng có thể sử dụng các amidoamin trong các dược phẩm để điều trị bệnh nhiễm nấm mắt và sử dụng kết hợp với *acanthamoeba*. Trong đơn sáng chế Mỹ số 2004/0033208 (tài liệu viện dẫn 21), gợi ý rằng các amidoamin được sử dụng trong dược phẩm chứa thuốc kháng sinh để điều trị và phòng ngừa các bệnh nấm mắt và mũi. Tuy nhiên, hiệu quả của các dược phẩm này đối

với các bệnh nhiễm khuẩn là không cao, và chúng không thể được sử dụng để điều trị các cơ quan bên trong hoặc, ví dụ, dùng làm dược phẩm diệt tinh trùng.

Trong WO 95/08266 (tài liệu viện dẫn 22), gợi ý rằng các loại amidoamin như vậy được sử dụng trong chế phẩm tương ứng để làm sạch kính áp tròng. Tuy nhiên, các chế phẩm như vậy không thể được sử dụng để điều trị các bệnh về mắt hoặc tai và họng, chẳng hạn. Chúng không thể được sử dụng trong phẫu thuật trong hốc hoặc được dùng để phòng ngừa các bệnh lây truyền qua đường tình dục, do chúng chứa nhiều thành phần và các thành phần có nồng độ lớn.

Việc sử dụng các loại amin oxit này được mô tả trong Patent Mỹ số 4.093.711 (tài liệu viện dẫn 11). Trong patent này, gợi ý rằng dung dịch nước 1% chứa các amin oxit khác nhau, cụ thể là dimethylaminopropyl myristamit N oxit, được sử dụng trong chế phẩm để làm sạch răng, dễ dàng loại bỏ cao răng và phòng ngừa sự hình thành cao răng. Trong trường hợp này, amidoamin oxit đã dùng đóng vai trò là chất làm mềm và chất nhũ hóa các mảng và không phải là dược phẩm.

Người nộp đơn không tìm ra được dược phẩm chứa amidoamin oxit và đồng thời chứa muối amoni bậc bốn và amidoamin bậc ba và/hoặc oxit của amin trong các nguồn tài liệu có thể tiếp cận.

Tình trạng kỹ thuật gần nhất với sáng chế này là dược phẩm được bộc lộ trong patent Âu Á 005132 (tài liệu viện dẫn 23). Dược phẩm này chứa hợp chất amoni bậc bốn benzyldimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ([myristamido]propyl)dimetylbenzylamoni clorua) ở dạng monohydrat. Dược phẩm này cũng chứa nước và/hoặc rượu, là chất hòa tan dùng trong dược phẩm, dùng cho dược phẩm lỏng. Ở các dạng dùng khác của dược phẩm, nó chứa bazơ tùy ý có nguồn gốc từ thực vật, động vật hoặc tổng hợp. Dược phẩm này có tác dụng kháng vi trùng và kháng nấm tốt. Tác dụng kháng khuẩn của dược phẩm trong các thử nghiệm *in vitro* là khá cao. Tuy nhiên, hiệu lực của nó bị suy giảm đáng kể khi các chế phẩm khác nhau được sử dụng để phòng ngừa và điều trị *in vivo*, dưới ảnh hưởng của nồng độ protein lớn. Mặt khác, việc tăng đáng kể nồng độ sẽ làm tăng kích ứng. Ngoài ra, dược phẩm này không thể kết hợp một cách hữu hiệu với một số bazơ và dược phẩm có nhiều tác dụng đã định khác nhau, vì sau đó phức chất tạo

thành sẽ bị phân tách ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm để điều trị và phòng ngừa các bệnh có nguyên nhân khác nhau của người và động vật, trong đó được phẩm này chứa các thành phần như sau:

benzylđimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa, và dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-[3-(myristoylamino)propyl]amin trong dung môi được dụng thích hợp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để dùng ngoài, ở mức độc tính có thể chấp nhận được, được phẩm có tác dụng mạnh nhất với tỷ lệ của các thành phần (tính theo % khối lượng) như sau:

- benzylđimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa với lượng nằm trong khoảng từ 0,008 đến 5,0;
- dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-[3-(myristoylamino)propyl]amin với lượng nằm trong khoảng từ 0,00005 đến 1,0;
- dung môi được dụng thích hợp với lượng cho vừa đủ 100.

Được phẩm để dùng ở màng nhầy hoặc trong hốc gây kích ứng và độc tính ở mức tối thiểu cho người và động vật và có hiệu quả thích hợp với tỷ lệ của các thành phần (tính theo % khối lượng) như sau:

- benzylđimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa với lượng nằm trong khoảng từ 0,008 đến 2,0;
- dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-(3-[myristoylamino)propyl]amin với lượng nằm trong khoảng từ 0,00005 đến 0,01;
- dung môi được dụng thích hợp với lượng cho vừa đủ 100.

Dung môi được dụng theo sáng chế có thể là nước và/hoặc rượu và tùy ý chất lỏng, vazolin được dụng tương tự gel, bazơ tẩy rửa hoặc bazơ rắn có nguồn gốc từ thực vật, động vật hoặc tổng hợp được sử dụng, tùy thuộc vào đường dùng và vị trí mà nó

được sử dụng.

Sáng chế cũng đề xuất nhiều dạng kết hợp của dược phẩm này với các dược phẩm có tác dụng khác. Các dược phẩm này có các tác dụng khác nhau bao gồm, ví dụ, thuốc gây tê tại chỗ (lidocaine, bupivacaine, pyromecaine, hoặc trimecaine), natri clorua, thuốc chống phù (xylometazoline, oxymetazoline, naphazoline, phenylephrine, phenylpropanolamin hoặc pseudoephedrin) hoặc các corticosteroid (triamcinolone, betamethasone hoặc fluocinolone acetonide, hydrocortisone, halomethasone, hoặc dexametasone), thuốc khử trùng và/hoặc diệt virus (metronidazole, clotrimazole, ketoconazole, acyclovir hoặc rimantidine).

Dược phẩm theo sáng chế có thể mở rộng tác dụng phòng ngừa và điều trị. Điều này có nghĩa là chúng có phổ hiệu lực rộng và tác dụng mạnh, gây kích ứng và độc tính thấp, và có tác dụng điều biến miễn dịch, gây tê, chống phù và ức chế sự nhiễm khuẩn. Dược phẩm có thể được dùng cho nhiều loại bệnh. Dược phẩm này được khuyến khích dùng để điều trị và phòng ngừa các bệnh nhiễm khuẩn và bệnh viêm. Các bệnh này cũng bao gồm cả bệnh đặc hiệu lẫn bệnh không đặc hiệu bệnh ở hệ niệu sinh dục, đường dạ dày-ruột, và mũi và họng và mắt. Nó cũng thích hợp dùng để phòng ngừa các bệnh lây truyền qua đường tình dục, như bệnh nhiễm HPV và HIV và có tác dụng diệt tinh trùng, khử trùng và sát khuẩn.

Tuy sử dụng các thành phần cách thông thường, nhưng nhận thấy rằng dược phẩm theo sáng chế này lại có tác dụng hiệp đồng bất ngờ, không dễ thấy được từ tình trạng kỹ thuật đã biết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hiệu lực của dược phẩm theo sáng chế và tác dụng đã khẳng định sẽ được mô tả trong trong các ví dụ không mang tính giới hạn dưới đây.

Ví dụ 1

Để minh họa cho giải pháp kỹ thuật của sáng chế, các phương án khác nhau của thành phần dược phẩm theo đơn sáng chế này được sử dụng. Trong bảng 1, một số thành

phần đã nghiên cứu được thể hiện, đặc biệt là các thành phần được sử dụng trong các ví dụ dưới đây.

Bảng 1

Các phương án của thành phần dược phẩm (tính theo % khối lượng)

Thành phần (Z) số	Benzylđimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)ch (Ach)	Amido oxit (AO)	Amido amin (AA)	Dung môi vừa đủ 100
Z1	0,007	0,001	-	Nước tinh khiết
Z2	0,01	0,001	-	Dung dịch NaCl đẳng trương
Z3	0,4*	0,01	0,01	Vazolin được dụng ưa nước
Z4	1,5	0,5	-	Nước tinh khiết
Z5	0,1	0,05	-	Dung dịch NaCl đẳng trương
Z6	0,006	0,001	-	Nước tinh khiết
Z7	0,5*	0,01	0,1	Vazolin được dụng ưa nước
Z8	0,5	-	0,01	Khí dung
Z9	0,1*	-	0,01	Etanol 70%
Z10	0,04	0,01	-	Nước tinh khiết
Z11	0,05*	0,01	0,01	Thuốc đạn

Lưu ý: * Monohydrat

Ví dụ 2

Tiến hành xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - minimal inhibition concentration) đối với môi trường thử nghiệm chứa virus corona (virus corona OC43 ở người) *in vitro* trong môi trường nuôi cấy tế bào phôi thận người. Thành phần Z1 (hai hợp phần với tỷ lệ 6:1) và mẫu gốc để so sánh với được phẩm theo tài liệu viện dẫn 3 là (benzylđimetyl-(3-myristoylamino)propyl)amoni clorua tinh khiết) và đimetyl-[3-(myristoylamino)propyl]amin oxit (AA) tinh khiết được sử dụng. Tiến hành nghiên cứu

song song theo sơ đồ dưới đây:

Giai đoạn thứ nhất	Thử nghiệm virus + myramistin (ở nồng độ thích hợp)
Giai đoạn thứ hai	Ủ (2 giờ)
Giai đoạn thứ ba	Trộn chất trung tính (như 25% huyết thanh từ phôi thai bò) của thành phần và ủ các thành phần trong 10-20 phút.
Giai đoạn thứ tư	Gây nhiễm môi trường nuôi cấy tế bào bị nhiễm bệnh (như phôi thận người)
Giai đoạn thứ năm	Ủ (5-8 ngày)
Giai đoạn thứ sáu	Phát hiện các kết quả liên quan tới tác dụng bám dính hồng cầu và tác dụng trên tế bào và tạo thành qua tế bào

Tiến hành ba dãy thử nghiệm, mỗi dãy ở nồng độ pha loãng 4 lần của dược phẩm. Tiếp theo, xác định nồng độ MIC thích hợp đối với virus corona. Các kết quả của các thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Nồng độ MIC của dược phẩm theo sáng chế và các chất khử trùng khác đối với virus corona OC43 của người *in vitro*

Chất khử trùng	MIC (%)
Z1	0,007 ± 0,002
D3 (Ach)	0,01 ± 0,005
AO	0,1 ± 0,05

Từ các số liệu trong bảng 2, có thể thấy rằng Z1 là thành phần có tác dụng bất hoạt virus corona vượt trội hơn cả hai thành phần riêng rẽ và có tác dụng hiệp đồng.

Ví dụ 3

Sự kích ứng tại chỗ trên da và màng mô liên kết và màng nhầy âm đạo gây ra bởi dược phẩm theo sáng chế được nghiên cứu trên chuột lang và thỏ. Sự kích ứng tại chỗ trên màng nhầy của đường niệu và bàng quang được nghiên cứu trên chó.

Các số liệu thu được chứng tỏ rằng việc dùng các thành phần Z4 và Z9 trên da

không gây ra các biến đổi nhìn thấy được cũng như các biến đổi mô học trong khoảng thời gian 40 ngày. Việc tăng nồng độ toàn phần của các thành phần này trong được phẩm lên tới 5,0% khối lượng gây khô da nhẹ và teo da không đáng kể ở biểu bì ở ngày thứ 30 của liệu trình dùng được phẩm này.

Trong khi đó, theo các tài liệu viện dẫn 8, 20 và 23, các dung dịch ACh tinh khiết gây kích ứng da ở các nồng độ lớn hơn 1% khối lượng, và các nồng độ lớn hơn (nằm trong khoảng từ 2% đến 3% khối lượng) ở các ngày từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 15 về cơ bản là gây ra các biến đổi trên da nhiều hơn đáng kể.

Khi dùng dung dịch AA tinh khiết 0,01% trong rượu 70%, sự kích ứng da xuất hiện ở ngày thứ 10.

Dung dịch chứa thành phần theo sáng chế (Z5) trong dung dịch natri clorua đẳng trương được nhỏ giọt vào mắt thỏ và chuột lang trong 10 ngày với nồng độ toàn phần của các thành phần là 0,15% khối lượng. Không thấy có tác dụng kích ứng trên các màng nhầy này (được đánh giá bởi thang điểm Draize = 0; đánh giá bằng cách phân loại Ogur: nhóm A). Trong khi đó, được phẩm theo tài liệu viện dẫn 23 ở nồng độ lớn hơn 0,05% khối lượng sẽ gây kích ứng màng mô liên kết (trên thang điểm Draize — từ 8 đến 10 điểm; được đánh giá bằng cách phân loại Ogur = nhóm B).

20ml mỗi dung dịch 0,05% chứa thành phần theo sáng chế (AZ, Z10) trong nước được nhỏ 4 lần/ngày, trong khoảng thời gian 10 ngày, vào đường niệu của chó đực. Sau khi điều trị, không quan sát thấy sự thay đổi về hành vi của các động vật này. Các xét nghiệm nước tiểu, xét nghiệm máu, và nghiên cứu mô học của màng nhầy ở đường niệu, bàng quang và các cơ quan khác của chó không phát hiện thấy sự khác biệt so với tiêu chuẩn.

Cũng không thấy sự khác biệt về hình thái hoặc mô học ở màng nhầy âm đạo của các động vật giống cái khi Z7 và Z8 (vazolin được dụng và khí dụng) được nhỏ giọt vào các bộ phận này.

Trong khi đó, các tài liệu viện dẫn 4, 8 và 23 cũng cho thấy sự kích ứng ở các nồng độ thấp hơn từ 2 đến 5 lần, chứng tỏ rằng được phẩm theo sáng chế có xuất hiện tác dụng hiệp đồng.

Ví dụ 4

Tiến hành nghiên cứu về tác dụng diệt tinh trùng bằng một trong số các phương pháp được khuyến dùng bởi WHO. Nhằm mục đích này, tinh trùng của người được trộn với các nồng độ AZ khác nhau. Tiếp theo, khả năng di chuyển của tinh trùng được kiểm tra bằng cách sử dụng kính hiển vi. Ngoài ra, các thông số khác (độ pH, mức giảm xanh metylen, kiểm tra sự tiếp xúc với dịch nhầy cổ, nồng độ fructoza, và các yếu tố khác) cũng được nghiên cứu. Tất cả có 17 mẫu tinh trùng của nam giới ở độ tuổi từ 18 đến 23 được nghiên cứu. Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng nồng độ tối ưu của dược phẩm theo sáng chế, tức là nồng độ tại đó khả năng di chuyển của tinh trùng được làm ngừng hẳn trong vòng 20 giây, là 0,02% khối lượng. Các nồng độ lớn hơn của dược phẩm không những làm tinh trùng bất động tức thời mà còn làm phân hủy tinh trùng.

Ví dụ 5

Tác dụng phòng bệnh lây truyền qua đường tình dục của dược phẩm theo sáng chế được nghiên cứu bằng cách sử dụng bệnh giang mai thử nghiệm ở thỏ làm mẫu. Thử nghiệm được tiến hành trên 56 con thỏ thuộc giống sóc sinsin. Thỏ được gây nhiễm bằng huyền phù mới điều chế chứa xoắn khuẩn màu xám (chủng Nichols và ZKVI-8 (Zentrales Institute für Haut- und Geschlechtskrankheiten [Central Institute Skin and Sexually Transmitted Diseases — Viện nghiên cứu da liễu và các bệnh lây truyền qua đường tình dục]) bằng phương pháp thử nghiệm trên da. Ở các phút 30, 60, 120, 180 và 240 sau khi nhiễm khuẩn, vùng da bị nhiễm được xử lý bằng chế phẩm Z6 hoặc chế phẩm theo tài liệu viện dẫn 23. Thỏ ở nhóm đối chứng được xử lý bằng nước cất. Tất cả các động vật được kiểm soát lâm sàng và huyết thanh học trong vòng từ 6 đến 12 tháng. Đối với nhóm đối chứng, phản ứng Wassermann (RW — Wassermann reaction), thử nghiệm bất động khuẩn xoắn, và phản ứng phát huỳnh quang miễn dịch được sử dụng. Các phản ứng này được thực hiện từ 2 đến 3 tháng một lần, bắt đầu từ 1,5 tháng từ lúc gây nhiễm. Các phương pháp thụ động u bạch huyết và tái nhiễm khuẩn ở da bìu bằng dịch huyền phù chứa xoắn khuẩn từ cùng một chủng cũng được sử dụng. Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng quá trình thử nghiệm trên thỏ bằng chế phẩm Z6 và chế phẩm theo

tài liệu viện dẫn 23 trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 2,5 giờ sau khi nhiễm khuẩn có khả năng bảo vệ cho 100% động vật chống lại bệnh giang mai. Trong khi đó, theo tài liệu viện dẫn 23, nồng độ dưới 0,01% không cho kết quả 100% trong hơn 30 phút sau khi bị nhiễm khuẩn.

Ví dụ 6

Tác dụng chữa bệnh trên các mẫu tổn thương có mủ và viêm màng bụng ở các động vật thử nghiệm (chuột nhắt, thỏ, chuột lang, chó; tổng số trên 100 động vật) được nghiên cứu bằng cách sử dụng các phương pháp đã được phê chuẩn rộng rãi. Phương pháp nghiên cứu vi khuẩn học, hình thái học, mô học và miễn dịch học được sử dụng.

Các số liệu thu được chỉ ra hoạt tính điều trị mạnh của AZ. AZ được sử dụng ở các dạng dung dịch nước, thuốc mỡ, và khí dung đối với các bệnh nhiễm trùng có mủ và viêm màng bụng trên các động vật thử nghiệm. Nhận thấy rằng AZ là chế phẩm có tác dụng mạnh hơn để điều trị các tổn thương có mủ so với mẫu gốc và các thành phần tinh khiết (Bảng 3).

Bảng 3

Tác dụng của AZ trong việc hồi phục vết thương có mủ trên các động vật thử nghiệm (chuột nhắt, chuột lang, thỏ) so với mẫu gốc và các thành phần tinh khiết.

(tính theo ngày)

Nhóm động vật	Bắt đầu phục hồi	Chữa khỏi hoàn toàn
Đối chứng (hồi phục vết thương bằng cách sử dụng nước cất)	$7,2 \pm 1,1$	$20,0 \pm 3,5$
Điều trị bằng chế phẩm nêu trong tài liệu viện dẫn 23	$3,5 \pm 0,7$	$12,7 \pm 1,3$
Điều trị bằng Z7	$2,3 \pm 0,3$	$9,4 \pm 0,9$
Điều trị bằng Z8	$2,1 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,9$
Điều trị bằng Z10	$2,2 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,9$
Dung dịch nước AO 0,1%	$6,1 \pm 1,1$	$18,9 \pm 3,5$
Khí dung AA 0,1%	$5,2 \pm 1,3$	$17,0 \pm 3,1$

Ví dụ 7

Tác dụng chữa bệnh của dược phẩm theo sáng chế trên các mẫu bỏng của chuột nhắt được nghiên cứu. Vết bỏng do tiếp xúc với nhiệt được tạo ra trên bề mặt lưng đã cạo lông của chuột nhắt bằng cách sử dụng thiết bị có sẵn trên thị trường. Quá trình điều trị được bắt đầu sau 24 giờ gây bỏng. Thuốc mỡ và khí dung (Z7 và Z8) được sử dụng. Để so sánh, các chế phẩm theo tài liệu viện dẫn 6 và 17 được sử dụng theo mẫu gốc. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Từ các số liệu thể hiện trong bảng 4, có thể thấy rằng có sự giảm đáng tin cậy ở vùng bề mặt bị tổn thương khi được điều trị bằng Z7 và Z8 sau khi bắt đầu điều trị 8 ngày. Thời gian này là ngắn hơn 4 ngày so với thời gian theo tài liệu viện dẫn 6 và tài liệu viện dẫn 17. Có thể khẳng định rằng việc giảm này có thể là do tác dụng hiệp đồng gây ra.

Bảng 4

Kết quả đo diện tích vết bỏng được điều trị bằng thuốc mỡ và khí dung

Ngày	Diện tích bề mặt của các vết bỏng cm ²		
	Tài liệu viện dẫn 6 và 17	Z7	Z8
2	0,72 ± 0,05	0,80 ± 0,06	0,99 ± 0,08
4	0,77 ± 0,66	0,85 ± 0,07	0,81 ± 0,09
6	0,80 ± 0,05	0,85 ± 0,09	0,62 ± 0,06
8	0,78 ± 0,10	0,83 ± 0,10	0,76 ± 0,07
12	0,81 ± 0,05	0,70 ± 0,06	0,24 ± 0,04
15	0,36 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,14 ± 0,03
18	0,14 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,017
20	0,03 ± 0,017	0,012 ± 0,002	0,01 ± 0,001

Ví dụ 8

Tác dụng gây viêm có mủ và viêm giác mạc được nghiên cứu. Các thử nghiệm được thực hiện trên 16 con thỏ thuộc giống sóc sinsin. Trọng lượng của thỏ dao động

trong khoảng từ 2 đến 2,5 kg. Tác dụng gây viêm có mủ và viêm giác mạc bằng cách đưa vào giác mạc huyền phù chứa môi trường nuôi cấy *Staphylococcus aureus* (chủng 209 P) đã được nuôi cấy 24 giờ. Vào ngày thứ hai đến ngày thứ tư, các vết loét xuất hiện trên giác mạc ở 13 con thỏ. Các vết loét được đo có kích thước 3 x 6 mm và tiết ra mủ ở đáy mắt của chúng. Đồng thời, quan sát các phản ứng viêm: viêm màng kết, chứng co thất mí, và các chứng viêm khác.

Thỏ đã chọn để thử nghiệm được chia thành ba nhóm. Các động vật ở nhóm thứ nhất được điều trị bằng Z2. Các động vật ở nhóm thứ hai được điều trị bằng thuốc nhỏ mắt theo các tài liệu viện dẫn 7 và 15 (thuốc nhỏ mắt theo mẫu gốc, ATP). Thuốc nhỏ mắt chứa dung dịch natri clorua đẳng trương được nhỏ giọt vào mắt bị đau của các động vật ở nhóm thứ ba. Các chế phẩm được nhỏ giọt ba lần/ngày trong suốt quá trình thử nghiệm.

Tất cả các con vật được quan sát hàng ngày. Những thay đổi trên giác mạc ở các động vật thử nghiệm và động vật đối chứng được kiểm tra bằng các phương pháp nêu trên. Dịch tiêm rửa giác mạc thỏ cũng được đặt trong môi trường canh thịt và môi trường dinh dưỡng pepton để xác định sự có mặt của *S. aureus*, chủng 209 P. Kết quả của thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Kết quả của việc điều trị bệnh nhiễm trùng có mủ và bệnh viêm giác mạc ở thỏ

Đặc điểm của tác dụng điều trị	Nhóm động vật số	Tần số xuất hiện các đặc điểm nhận diện của tác dụng điều trị ở giác mạc (%) theo thời gian (ngày): **											
		2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14
Mắt không bị chảy mủ	1	50 (10)	90 (10)	100 (10)	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto
	2	12 (9)	12 (9)	55 (9)	88 (9)	100 (9)	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto
	3	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	16 (6)	50 (6)	66 (6)	66 (6)	83 (6)	83 (6)	100 (6)
Không có mặt <i>S. aureus</i> ở mắt bị chảy mủ	1	0 (10)	90 (10)	100 (10)	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto
	2	0 (9)	44 (9)	66 (9)	88 (9)	100 (9)	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto
	3	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	16 (6)	50 (6)	66 (6)	66 (6)	83 (6)	83 (6)	100 (6)
Rỉ mủ trở lại	1	0 (10)	40 (10)	70 (10)	100	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto	ditto

	2	0 (9)	0 (9)	11 (9)	(10)	55 (9)	66 (9)	88 (9)	100 (9)	ditto	ditto	ditto	ditto
	3	0 (6)	0 (6)	0 (6)	44 (9)	0 (6)	16 (6)	16 (6)	16 (6)	33 (6)	33 (6)	66 (6)	66 (6)
Tạo biểu mô	1	20 (10)	30 (10)	30 (10)	50 (10)	80 (10)	80 (10)	80 (10)	100	ditto	ditto	ditto	ditto
	2	0 (9)	0 (9)	0 (9)	11 (9)	11 (9)	22 (9)	22 (9)	(10)	33 (9)	100 (9)	ditto	ditto
	3	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	33 (9)	16 (6)	33 (6)	33 (6)	50 (6)

Lưu ý: 1: nhóm động vật được điều trị bằng Z2;

2: nhóm động vật được điều trị bằng ATP;

3: nhóm động vật đối chứng.

(**) — trong dấu ngoặc đơn, số lượng mắt được nghiên cứu.

Các số liệu trong bảng nêu trên cho thấy rằng có sự chảy mủ và các dấu hiệu về sự có mặt của *S. aureus* ở ngày thứ 4 ở tất cả các động vật được điều trị bằng Z2 và ở ngày thứ 6 ở tất cả các động vật được điều trị bằng ATP không thấy xuất hiện các dấu hiệu nêu trên. Đồng thời, hiện tượng chảy mủ được quan sát ở tất cả các động vật không được xử lý trong suốt quá trình thử nghiệm ban đầu.

Sự rỉ mủ trở lại bắt đầu và kết thúc nhanh trong 3 ngày ở tất cả các động vật được điều trị bằng Z2, và ở ngày thứ 3 và thứ 4 tính từ khi bắt đầu điều trị ở tất cả các động vật được điều trị bằng ATP. Ở tất cả các động vật được điều trị bằng Z2 và ATP, thời gian từ khi bắt đầu đến khi dừng rỉ mủ trở lại là 4 ngày và 10 ngày, tương ứng, tính từ khi bắt đầu điều trị. Quá trình tạo biểu mô giác mạc bắt đầu ở tất cả các động vật vào khoảng ngày thứ 10 và ngày thứ 16 từ khi bắt đầu điều trị bằng Z2 và ATP, tương ứng.

Do đó, từ các số liệu nêu trên, có thể kết luận được rằng Z2 có tác dụng điều trị rất hiệu quả đối với các bệnh viêm giác mạc có mủ. Tác dụng chữa bệnh của Z2 mạnh hơn tác dụng của ATP (thuốc nhỏ mắt dựa trên mẫu gốc), đang được sản xuất thương mại (tên thương mại "Okomistin").

Ví dụ 9

Tác dụng chống viêm được nghiên cứu. Thành phần theo tỷ lệ trong thuốc mỡ kết hợp chứa Z3 và betamethasone 0,025% được sử dụng để điều trị các bệnh dị ứng ngoài da. Việc kết hợp tương tự với mẫu gốc sẽ không đạt được độ đặc đồng nhất và không thể

sử dụng được làm được phẩm.

Tác dụng chống viêm trên mô hình chứng phù aerosil ở chuột cũng được nghiên cứu. Tác dụng của nó được so sánh với tác dụng của thuốc mỡ “Lorinden S” đã được sử dụng rộng rãi nhằm mục đích này và so sánh với nhóm đối chứng (không được điều trị). Nhận thấy rằng sự phát triển ở vùng sưng phồng ở chuột được điều trị bằng Z3 nhỏ hơn 2,67 lần ở động vật đối chứng và nhỏ hơn 1,14 lần so với chế phẩm so sánh. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Tác dụng kháng viêm của thuốc mỡ

Thuốc mỡ	Số lượng chuột nhất	Mức tăng trọng lượng chân chuột nhất (g)	Tác dụng ức chế (%)
Dược phẩm theo sáng chế trên cơ sở thuốc mỡ	12	$0,124 \pm 0,03$	62,4
Thuốc mỡ “Lorinden S”	12	$0,141 \pm 0,01$	57,0
Nhóm đối chứng (không được điều trị)	12	$0,331 \pm 0,02$	-

Các số liệu thể hiện trong bảng 6 chứng tỏ rằng thuốc mỡ Z3 có tác dụng kháng viêm đặc hiệu. Nó làm giảm chứng phù aerosil xuống mức trung bình 62,4%, và hiệu lực của nó cao hơn so với thuốc mỡ so sánh “Lorinden S”.

Ví dụ 10

Tiến hành nghiên cứu đặc tính khử trùng của thuốc đạn.

Hiệu lực kháng khuẩn của Z11 được nghiên cứu để so sánh với hiệu lực của các thành phần trong quá trình thử nghiệm *in vitro* bằng cách cho khuếch tán vào môi trường dinh dưỡng rắn.

Trong quá trình nghiên cứu thử nghiệm, các vi sinh vật sau được chọn làm vi sinh vật thử nghiệm:

- cầu khuẩn gram dương (Staphylococcus aureus ATCC 6538)

- nấm tương tự men bia (*Candida albicans* ATCC 885-653).

Chủng đối chứng *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 được sử dụng để nghiên cứu hiệu lực kháng khuẩn. Chủng này được mua từ D. K. Sabolotny Institute for Microbiology and Virology ở U-crai-na.

Để nghiên cứu hiệu lực kháng nấm, chủng đối chứng *Candida albicans* ATCC 885-653, được mua từ cùng địa chỉ nêu trên, được sử dụng. Trước khi tiến hành các thử nghiệm, từng môi trường nuôi cấy được kiểm tra về độ tinh khiết. Ngoài ra, đối với mỗi môi trường, các đặc tính chuẩn của nó về hình thái học và các đặc điểm nuôi cấy cũng được kiểm tra.

Hiệu lực kháng khuẩn được xác định như sau, bằng cách cho khuếch tán vào thạch aga: Môi trường dinh dưỡng được đun chảy, làm nguội đến nhiệt độ 45°C, và gây nhiễm huyền phù chứa môi trường thử nghiệm.

Khả năng mang vi khuẩn xấp xỉ bằng 1×10^7 KBE/ml.

20ml môi trường đã gây nhiễm vi sinh vật được rót vào mỗi đĩa petri. Sau đó, môi trường được để cho hóa rắn. Các hõm chứa môi trường dinh dưỡng aga được tạo ra trên lớp này có đường kính trung bình 8mm.

Chế phẩm cần nghiên cứu Z11, được đun chảy ở nhiệt độ 60°C, và 0,1ml chế phẩm này được đưa vào mỗi hõm đã tạo ra trước đó.

Để so sánh, thuốc đạn chứa 0,07% hợp chất theo tài liệu viện dẫn 20 (23) hoặc 0,07% AO hoặc 0,7% AA được điều chế.

Để so sánh, dung dịch nước chứa chất myramistin (tài liệu viện dẫn 23) được nghiên cứu, với các nồng độ tương ứng với chế phẩm cần thử nghiệm.

Dịch tiêm được tạo ra và ủ trong máy hiệu chỉnh nhiệt độ trong khoảng thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 35°C.

Ngay khi kết thúc thời gian ủ, tiến hành đo diện tích trung bình ở các vùng không có vi sinh vật phát triển (vùng ức chế). Các hõm chứa chế phẩm được đo xung quanh với độ chính xác 0,1 mm. Mỗi thử nghiệm được tiến hành 3 lần.

Hiệu lực kháng khuẩn của dược phẩm cần nghiên cứu được xác định bằng thử nghiệm *in vitro* bằng phương pháp khuếch đại và có thể thấy trong bảng 7.

Bảng 7

Tên chế phẩm	Thuốc đạn		Hợp chất (myramistin)	
	Kích thước trung bình của vùng ức chế, mm		Kích thước trung bình của vùng ức chế, mm	
	Staphylococcus aureus	Candida albicans	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Myramistin, dung dịch nước 0,07%	-	-	9,6	9,0
Thuốc đạn theo tài liệu viện dẫn 23	5,6	6,1		
AA	4,3	5,2		
Z11	14,3	13,2		
AO	1,2	2,1		

Từ bảng 7, nhận thấy rõ rằng dược phẩm theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm bao gồm benzyldimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này còn chứa dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amin trong dung môi được dụng thích hợp.
2. Dược phẩm theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tỷ lệ của các thành phần được đưa ra như sau (tính theo % khối lượng):
 - benzyldimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa: 0,008 đến 5,0;
 - dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amin: 0,00005 đến 1,0;
 - dung môi được dụng thích hợp cho vừa đủ 100.
3. Dược phẩm theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tỷ lệ của các thành phần được đưa ra như sau (tính theo % khối lượng):
 - benzyldimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni clorua ở dạng monohydrat hoặc ở dạng không được hydrat hóa: 0,008 đến 2,0;
 - dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amoni oxit và/hoặc dimetyl-(3-[myristoylamino]propyl)amin: 0,00005 đến 0,01;
 - dung môi được dụng thích hợp cho vừa đủ 100.
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này còn chứa chất gây tê tại chỗ được chọn từ nhóm hydroclorua bao gồm lidocaine, bupivacaine, pyromecaine, hoặc trimecaine, với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 5,0% khối lượng.
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này còn chứa natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 0,6% đến 1,0% khối lượng.
6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, dược phẩm

này còn chứa chất chống phù được chọn từ nhóm bao gồm xylometazoline, oxymetazoline, naphazoline, phenylephrine, phenylpropanolamin hoặc pseudoephedrin với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 2,0% khối lượng.

7. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, được phẩm này còn chứa corticosteroid được chọn từ nhóm bao gồm triamcinolone, betamethasone hoặc fluocinolone acetonide, hydrocortisone, halomethasone, hoặc dexametasone với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 3,0% khối lượng.

8. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, được phẩm này còn chứa chất khử trùng và/hoặc chất diệt virus được chọn từ nhóm bao gồm metronidazole, clotrimazole, ketoconazole, acyclovir hoặc rimantidine với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5,0% khối lượng.

9. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, khác biệt ở chỗ, được phẩm này chứa rượu và/hoặc nước làm dung môi được dụng.

10. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, khác biệt ở chỗ, được phẩm này chứa tùy ý chất lỏng, vazolin được dụng tương tự gel, bazơ tẩy rửa hoặc bazơ rắn có nguồn gốc từ thực vật, động vật hoặc tổng hợp.