



(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) 
1-0022557

(51)⁷ **C07H 17/08, A61K 31/7048, C12N 9/10, (13) B**
A61P 31/10, C12P 19/62, A61P 31/04

(21)	1-2012-03864	(22)	25.05.2011		
(86)	PCT/CN2011/074644	25.05.2011	(87)	WO2011/147313	01.12.2011
(30)	201010182111.0	25.05.2010	CN		
	201010182109.3	25.05.2010	CN		
	201010182108.9	25.05.2010	CN		
(45)	25.12.2019	381	(43)	25.04.2013	301
(73)	SHENYANG FUYANG PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO. LTD (CN) No. 18-12 Yaoyang Street, Shenbei New District, Shenyang, Liaoning, 110013, China				
(72)	Yang JIANG (CN), Yuyou HAO (CN)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **HỢP CHẤT LEVOISOVALERYLSPIRAMYXIN I, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramycin, phương pháp điều chế và chế phẩm chứa chúng. Hợp chất levoisovalerylspiramycin này được chọn trong số levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III. Chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin và chất mang dược dụng, trong đó độ tinh khiết của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III là lớn hơn 90% trọng lượng. Hợp chất levoisovalerylspiramycin có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và chế phẩm ở dạng dung dịch, bột hoặc bột đông khô nhanh dùng để tiêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn mới được bào chế theo kỹ thuật di truyền, cụ thể, sáng chế đề cập đến levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III, và tinh thể, dược phẩm và phương pháp điều chế chúng để dùng trong thuốc chống nhiễm khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn đóng vai trò quan trọng trong lâm sàng do chúng có hoạt tính mạnh đối với các vi khuẩn gram dương, và cả một số vi khuẩn gram âm và còn có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và có khả năng thấm qua mô đối với các tác nhân gây bệnh không kiểm soát được như một số trùng cong và *Legionella* ngày càng lan truyền bệnh dịch. Được đặc trưng bởi độ hấp thu nhanh khi dùng qua đường miệng, có ít phản ứng bất lợi, thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn hầu như không ảnh hưởng đến gan và thận, mà có chức năng điều hòa miễn dịch tiềm tàng. Vào những năm chín mươi, thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn được coi là thuốc cạnh tranh với các thuốc β -lactam trong việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp ở người lớn.

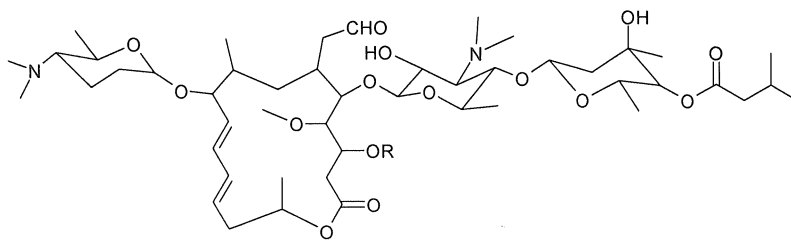
Tính không đối xứng là thuộc tính cơ bản của vật thể ba chiều và một trong số các thuộc tính thiết yếu của tự nhiên. Các đại phân tử sinh học bao gồm protein, polysaccharit, axit nucleic và enzym, là nền tảng quan trọng của hoạt động sống, thường có các chức năng sinh lý quan trọng. Thuốc không đối xứng là cặp chất đồng phân đối ảnh của đối tượng nguyên liệu và ảnh chiếu qua gương thu được sau khi cấu trúc phân tử của thuốc được đưa vào tâm không đối xứng. Các chất đồng phân đối ảnh này hầu như giống nhau về đặc tính hóa lý nhưng khác nhau về hoạt tính quang học. Các chất đồng phân đối ảnh lần lượt được gọi là loại R (quay phải) hoặc loại S (quay trái), và triệt quang. Trong vòng 20 năm trở lại đây, do các nghiên cứu dược học được tiến hành một cách thấu đáo hơn, đã chứng minh được rằng sự khác biệt về ái lực của chất đồng phân đối ảnh của thuốc với thụ thể là so sự khác biệt về độ chọn lọc lập thể của chất đồng phân đối ảnh của thuốc, dẫn đến sự khác biệt đáng kể về tác dụng dược lý. Chất đồng phân đối ảnh có hoạt tính mạnh trong số các thuốc không đối xứng được gọi là eutome; còn chất đồng phân đối ảnh không có hoặc có hoạt tính thấp được gọi là distome. Trong nhiều trường hợp, distome không chỉ

không có tác dụng dược lý, mà còn làm giảm hoạt tính của eutome. Đôi khi, các phản ứng phụ gây độc nghiêm trọng cũng xảy ra, cho thấy độ phức tạp của sự khác biệt về chức năng dược lý và xác định mức độ khác biệt đáng kể về chỉ số điều trị của từng chất đồng phân đối ảnh và hỗn hợp triệt quang của chúng. Ví dụ, tác dụng chữa bệnh đã biết của DL-(+/-) syntomyxin bằng một nửa tác dụng chữa bệnh của D(-) cloramphenicol; hoạt tính dược lý của chất đồng phân L propranolol mạnh hơn 100 lần hoạt tính của chất đồng phân D; (-) adanon là thuốc giảm đau mạnh trong khi dạng (+) lại không có tác dụng này. Ngoài ra, cũng có sự khác biệt về độc tính. Ví dụ, hai chất đồng phân đối ảnh của thalidomit có tác dụng an thần giống nhau đối với chuột, nhưng chỉ chất đồng phân S(-) và chất chuyển hóa của chúng có khả năng gây độc đối với thai và sinh quái thai; ketamin được sử dụng một cách rộng rãi làm thuốc gây mê và thuốc giảm đau, nhưng có các tác dụng phụ như bị ảo giác. Các nghiên cứu cho thấy chất đồng phân S (+) có tác dụng mạnh gấp 3 đến 4 lần so với chất đồng phân R(-) và các tác dụng phụ gây độc chỉ xuất hiện ở chất đồng phân R(-). Sự khác biệt đáng kể về tác dụng chữa bệnh của các thuốc không đối xứng đã thúc đẩy việc nghiên cứu và phát triển thuốc không đối xứng và việc phát triển phép phân tích tách. Bằng cách áp dụng kỹ thuật “không đối xứng”, các tác giả sáng chế có thể loại bỏ các dạng không có tác dụng hoặc các tác dụng phụ gây độc ra khỏi thuốc một cách hữu hiệu và tạo ra thuốc không đối xứng tinh khiết với cấu trúc đơn lẻ và định hướng, do đó tạo ra các thành phần dược tính tinh khiết hơn, đẩy mạnh thêm tác dụng chữa bệnh và rút ngắn thời gian điều trị bệnh. Vì vậy, việc nghiên cứu về thuốc không đối xứng đã trở thành một trong số các phương pháp mới để nghiên cứu dược phẩm mới trên toàn thế giới. Các chính phủ và tập đoàn dược phẩm đã đầu tư rất mạnh vào các lĩnh vực như bào chế thuốc không đối xứng, nguyên liệu không đối xứng và sản phẩm trung gian không đối xứng để nghiên cứu và phát triển, nhằm mục đích chiếm lĩnh địa vị thống trị trên thị trường dược phẩm không đối xứng. Ngoài ra, cùng với sự cải tiến không ngừng của kỹ thuật không đối xứng, đặc biệt là việc áp dụng rộng rãi và nhanh chóng của phương pháp sắc ký lỏng, phân tích tách và xác định các chất đồng phân đối ảnh của thuốc không đối xứng cũng được thúc đẩy. Thuốc không đối xứng của từng chất đồng phân đối ảnh đã được sử dụng một cách rộng rãi.

Carimyxin là dẫn xuất mới của spiramycin được phát triển bằng cách áp dụng kỹ

thuật di truyền, ban đầu được gọi là spiramycin sinh học và trước đây được gọi là biotechmyxin [Patent số: ZL97104440.6]. Theo tài liệu “Rules for Chinese Approved Drug Names”, và dựa trên việc xem xét các đặc tính kỹ thuật và xác nhận của Hội đồng Dược điển Trung Quốc (Chinese Pharmacopoeia Commission), tên gốc của spiramycin sinh học được đổi thành carimyxin. Cấu tạo hóa học của carimyxin chủ yếu gồm 4''-isovalerylspiramycin, bao gồm 4''-isovalerylspiramycin I, II, III, và khoảng 6 loại spiramycin axyl hóa ở 4''-hydroxy, vì vậy có tên hóa học là 4''-axylspiramycin.

Công thức cấu tạo hóa học của carimyxin được thể hiện trong công thức (1):



(1)

trong đó: R trong isovalerylspiramycin I là H; R trong isovalerylspiramycin II là COCH_3 , R trong isovalerylspiramycin III là COCH_2CH_3 .

Carimyxin là thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn có nhân gồm 16 cạnh, có khả năng ức chế quá trình tổng hợp protein bằng cách kết hợp với ribosom của vi khuẩn.

Nghiên cứu dược động học cho thấy rằng các thành phần hữu hiệu của carimyxin có hoạt tính chủ yếu là isovalerylspiramycin I, II và III. Carimyxin chuyển hóa một cách nhanh chóng thành spiramycin *in vivo*. Theo AUC_{0-t} của thuốc gốc isovalerylspiramycin I, II và III và chất chuyển hóa hoạt tính spiramycin I, II và III, độ sinh khả dụng tuyệt đối khi dùng qua đường miệng trung bình bằng 91,6%. Đã có thông báo rằng độ sinh khả dụng tuyệt đối của spiramycin khi dùng qua đường miệng nằm trong khoảng từ 30 đến 40% (Frydman AM et al J Antimicrob Chemother.1988,22(suppl B):93-103). Đã phát hiện ra rằng isovalerylspiramycin cải thiện một cách rõ ràng độ sinh khả dụng của thành phần hoạt tính spiramycin. Liều đơn carimyxin được loại bỏ một cách từ từ. $T_{1/2}$ nằm trong khoảng từ 23 đến 27 giờ.

Các kết quả thử nghiệm *in vitro* chỉ ra rằng carimyxin là hữu hiệu đối với vi khuẩn gram dương, đặc biệt là một số vi khuẩn kháng thuốc như *Staphylococcus aureus* kháng

β -lactam và *Staphylococcus aureus* kháng erythroxin, và không kháng chéo một cách rõ ràng với các loại thuốc tương tự. Trong khi đó, carimyxin có hoạt tính kháng khuẩn với Mycoplasma và Chlamydia, cũng như một số vi khuẩn gram âm, có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và có khả năng thấm qua mô trùng cong và Legionella gây bệnh dịch, và vẫn có chức năng điều hòa miễn dịch tiềm năng. Hoạt tính kháng khuẩn *in vivo* này mạnh hơn nhiều hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* (ZL200310122420.9). Nghiên cứu lâm sàng cho thấy rằng việc dùng viên nén carimyxin với liều lượng nằm trong khoảng từ 200mg đến 400mg hàng ngày trong thời gian từ 5 đến 7 ngày là thích hợp để điều trị bệnh viêm họng cấp tính do vi khuẩn và bệnh viêm amidan có mủ cấp do Streptococcus sinh mủ gây ra; bệnh viêm xoang do vi khuẩn và viêm phế quản cấp tính do vi khuẩn nhạy cảm gây ra; bệnh viêm phổi nhẹ do Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenza và Mycoplasma pneumonia gây ra; bệnh viêm niệu đạo không do lậu do Mycoplasma và Chlamydia gây ra; các bệnh truyền nhiễm như nhiễm khuẩn da và mô mềm, bệnh viêm quanh răng và bệnh viêm tai giữa do vi khuẩn nhạy cảm gây ra. Tổng tỷ lệ hữu hiệu bằng 92,68%.

Nghiên cứu lâm sàng chứng minh rằng carimyxin là thuốc kháng sinh an toàn và hữu hiệu khi dùng qua đường miệng. Tuy nhiên, do carimyxin là sản phẩm thu được theo quy trình lên men và là thuốc đa thành phần, rất khó để tách và tinh chế tiếp các thuốc đa thành phần. Phương pháp HPLC hiện nay có thể tách nhiều loại axylspiramycin trong mẫu carimyxin, ví dụ, mức độ tách isovalerylspiramycin II và isobutyrylspiramycin III, isobutyrylspiramycin II và propionylspiramycin III, propionylspiramycin III và thành phần này, propionylspiramycin II và axetyl spiramycin III là cao hơn 1,5 so với mức độ quy định trong Dược điển Trung Quốc, trong khi mức độ tách axetyl spiramycin III và thành phần này bằng 1,2.

Qua nhiều nghiên cứu và điều chỉnh và tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men, các tác giả sáng chế thu được levocarimyxin, là chất có hoạt tính chống nhiễm khuẩn mạnh hơn.

Hiện nay, phương pháp HPLC được áp dụng và đã xác định được rằng carimyxin gồm 9 thành phần axylspiramycin, bao gồm isovalerylspiramycin (I+II+III), có mặt với tổng lượng không nhỏ hơn 60%, và axylspiramycin, có mặt với tổng lượng không nhỏ hơn 80%. Điều tương đối khó là phải đáp ứng tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng của thuốc

tiêm chứa thuốc kháng sinh đa thành phần được bào chế theo quy trình lên men, nhưng việc tiêm thường có tác dụng nhanh đối với bệnh nhân nguy kịch và các bệnh nhân không thể dùng qua đường miệng, do vậy chế phẩm một thành phần chứa isovalerylspiramycin có ý nghĩa vô cùng quan trọng. Theo sáng chế, nhờ các nghiên cứu tiếp về levocarimyxin, thu được thành phần duy nhất là levoisovalerylspiramycin I có độ tinh khiết cao đến 98% trọng lượng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề xuất levoisovalerylspiramycin I, levoisovalerylspiramycin II và levoisovalerylspiramycin III.

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm lần lượt chứa levoisovalerylspiramycin I, levoisovalerylspiramycin II và levoisovalerylspiramycin III.

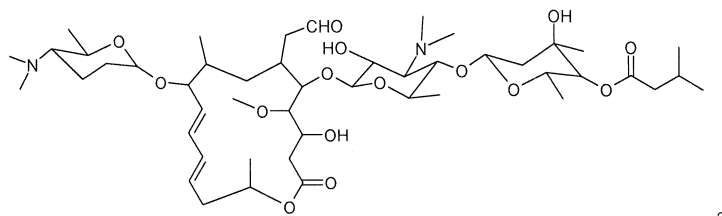
Theo mục đích thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế levoisovalerylspiramycin I, levoisovalerylspiramycin II và levoisovalerylspiramycin III.

Theo mục đích thứ tư, sáng chế đề xuất việc sử dụng levoisovalerylspiramycin I, levoisovalerylspiramycin II và levoisovalerylspiramycin III.

Theo mục đích thứ năm, sáng chế đề xuất levoisovalerylspiramycin I, levoisovalerylspiramycin II và levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, cũng như chế phẩm lần lượt chứa các dạng tinh thể này.

Để đạt được mục của sáng chế, quy trình kỹ thuật sau được áp dụng:

Sáng chế đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramycin I, công thức cấu tạo hóa học của nó được thể hiện bằng công thức (I):

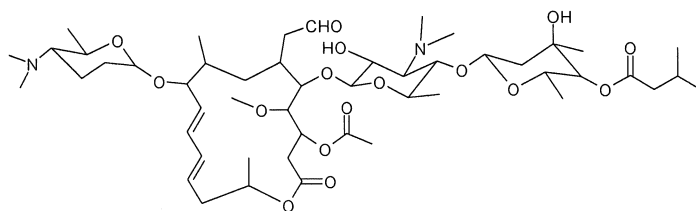


(I)

Độ quay quang riêng $[\alpha]_D$ nằm trong khoảng từ -49° đến -62° , tốt hơn là nằm trong khoảng từ -51° đến -60° , từ -60° đến -62° , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ -51° đến

-58°, từ -53° đến -58°, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ -55° đến -58°, - 55° đến -57°, từ -58° đến -60°, từ -51° đến -55°, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ -53° đến -55°, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ -49° đến -51° ($C=0,02\text{g/ml}$, CHCl_3 , 25°C, $\lambda=589,3\text{nm}$); và nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 116 đến 122°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 118 đến 120°C;

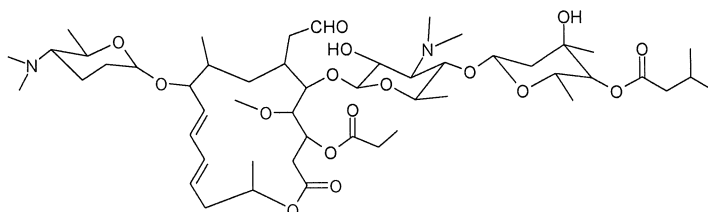
Sáng chế đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramycin II, công thức cấu tạo hóa học của nó được thể hiện bằng công thức (II):



(II)

Độ quay quang riêng $[\alpha]_D$ nằm trong khoảng từ -55° đến -61°, tốt hơn là, nằm trong khoảng từ -57° đến -59° ($C=0,02\text{g/ml}$, CHCl_3 , 25°C, $\lambda=589,3\text{nm}$); và nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 120 đến 128°C, tốt hơn là, 123 đến 125°C;

Sáng chế đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramycin III, công thức cấu tạo hóa học của nó được thể hiện bằng công thức (III):



(III)

Độ quay quang riêng $[\alpha]_D$ nằm trong khoảng từ (-)-49° đến -51° ($C=0,02\text{g/ml}$, CHCl_3 , 25°C, $\lambda=589,3\text{nm}$); và nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 116°C đến 118°C;

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin I, trong đó: chế phẩm này chứa levoisovalerylspiramycin I, muối được dụng của isovalerylspiramycin I, isovalerylspiramycin I và chất bổ trợ được dụng, hoặc muối được dụng của isovalerylspiramycin I và chất bổ trợ được dụng, trong đó độ tinh khiết của

isovalerylspiramycin I lớn hơn 90% trọng lượng, tốt hơn nếu lớn hơn 95% trọng lượng, và tốt hơn nữa nếu lớn hơn 98% trọng lượng;

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II, trong đó: chế phẩm này chứa isovalerylspiramycin II, muối được dụng của isovalerylspiramycin II, isovalerylspiramycin II và chất bổ trợ được dụng, hoặc muối được dụng của isovalerylspiramycin II và chất bổ trợ được dụng, trong đó độ tinh khiết của isovalerylspiramycin II lớn hơn 90% trọng lượng, tốt hơn nếu lớn hơn 95% trọng lượng, và tốt hơn nữa nếu lớn hơn 98% trọng lượng;

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin III, trong đó: chế phẩm này chứa isovalerylspiramycin III, muối được dụng của isovalerylspiramycin III, isovalerylspiramycin III và chất bổ trợ được dụng, hoặc muối được dụng của isovalerylspiramycin III và chất bổ trợ được dụng, trong đó độ tinh khiết của isovalerylspiramycin III lớn hơn 90% trọng lượng, tốt hơn nếu lớn hơn 95% trọng lượng, và tốt hơn nữa nếu lớn hơn 98% trọng lượng.

Theo quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất của sáng chế: chế phẩm theo sáng chế ở dạng lỏng, dạng rắn, dạng bán rắn, hoặc dạng khí, trong đó, chế phẩm dạng lỏng này gồm dung dịch dùng để tiêm, truyền, hỗn hợp, xirô, cồn thuốc, keo, nước thơm, glyxerit, dung dịch keo, dịch nhầy, hỗn dịch, hoặc nhũ tương; chế phẩm rắn gồm bột dùng để tiêm, bột đông khô dùng để tiêm, viên nén, viên nang, bột, thuốc cốm, viên tròn, chế phẩm thăng hoa, hoặc màng; chế phẩm dạng bán rắn gồm thuốc mỡ, thuốc cao, thuốc đạn, dịch chiết, hoặc gel; và chế phẩm dạng khí gồm sol khí hoặc thuốc xịt; tốt hơn nếu là dung dịch dùng để tiêm, bột dùng để tiêm hoặc bột đông khô dùng để tiêm.

Theo quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ hai của sáng chế: chế phẩm theo sáng chế chứa levoisovalerylspiramycin I (liều đơn vị) với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg; chế phẩm theo sáng chế chứa levoisovalerylspiramycin II (liều đơn vị) với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg; chế phẩm theo sáng chế chứa levoisovalerylspiramycin III (liều đơn vị) với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng

từ 100 đến 500mg.

Theo quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ ba của sáng chế: phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramyxin I trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10 đến 95%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 95%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75 đến 95%; phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramyxin II trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10 đến 95%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 95%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75 đến 95%; phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramyxin III trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10 đến 95%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 95%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75 đến 95%.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm lần lượt chứa levoisovalerylspiramyxin I, levoisovalerylspiramyxin II hoặc levoisovalerylspiramyxin III:

Chế phẩm là dung dịch dùng để tiêm, bột dùng để tiêm hoặc bột đông khô dùng để tiêm được bào chế từ isovalerylspiramyxin I và ít nhất một trong số các axit xitric, axit adipic và axit maleic; chế phẩm là dung dịch dùng để tiêm, bột dùng để tiêm hoặc bột đông khô để tiêm được bào chế từ isovalerylspiramyxin II và ít nhất một trong số axit xitric, axit adipic và axit maleic; chế phẩm là dung dịch dùng để tiêm, bột dùng để tiêm hoặc bột đông khô để tiêm được bào chế từ isovalerylspiramyxin III và ít nhất một trong số axit xitric, axit adipic và axit maleic.

Trong đó, tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin I với axit xitric là 1:0,8 đến 1,2, tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin I với axit adipic là 1:0,8 đến 1,2 và tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin I với axit maleic là 1:0,8 đến 1,2; tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin II với axit xitric là 1:0,8 đến 1,2, tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin II với axit adipic là 1:0,8 đến 1,2 và tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin II với axit maleic là 1:0,8 đến 1,2; tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin III với axit xitric là 1:0,8 đến 1,2, tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin III với axit adipic là 1:0,8 đến 1,2 và tỷ lệ mol của levoisovalerylspiramyxin III với axit maleic là 1:0,8 đến 1,2.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III, bao gồm các bước: điều chế levocarimyxin và tinh chế levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc

III.

Trong đó, quy trình điều chế levocarimyxin bao gồm bước: nuôi cấy và lên men sinh học chủng nấm đã tách dòng WSP-195 được tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, và chiết dịch lên men; thực hiện lên men ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0, tốt hơn là từ 6,0 đến 8,0, và tốt hơn nữa là từ 6,0 đến 7,5. Đường cong biến đổi pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, trong đó, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1 = k_1 x_1 + 6,0$, trong đó $0,0227 \leq k_1 \leq 0,1364$, $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2 = k_2 x_2 + b_2$, trong đó $-0,0735 \leq k_2 < 0$, $6,5 < b_2 \leq 10,62$, $22 \leq x_2 \leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3 = k_3 x_3 + b_3$, trong đó $0 < k_3 \leq 0,0078$, $6,06 \leq b_3 < 6,5$, $56 \leq x_3 \leq 120$. Theo sáng chế, bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men, đặc biệt là bằng cách kiểm soát độ pH trong quá trình lên men bằng chất điều chỉnh độ pH, đường cong biến đổi pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, và mỗi pha lần lượt thỏa mãn công thức nhất định, do đó thu được levocarimyxin có hoạt tính quay quang. Ngoài ra, levoisovalerylsipramycin I, II hoặc III lần lượt thu được bằng cách tách.

Tốt hơn nếu các điều kiện lên men sinh học theo sáng chế là: nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, trên môi trường nuôi cấy aga nghiêng chứa 2% bột đậu tương, 1% glucoza, 3% tinh bột, 0,5% CaCO_3 , 0,4% NaCl và 2% aga trong thời gian từ 8 đến 15 ngày ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 38°C, sau đó cấy vào môi trường giữ giống chứa 1,5% bột đậu tương, 3,0% tinh bột, 0,4% NaCl, 0,5% CaCO_3 , 0,3% pepton cá và 0,05% KH_2PO_4 và nuôi cấy trong thời gian từ 40 đến 80 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C, cấy chuyển vào môi trường lên men chứa 0,5% glucoza, 6,0% tinh bột, 0,5% bột nấm men, 2,0% bột cá, 0,6% NH_4NO_3 , 1,0% NaCl, 0,5% CaCO_3 , 0,05% KH_2PO_4 , 0,1% MgSO_4 , 0,5% dầu đậu nành và 0,02% chất khử bọt và nuôi cấy trong thời gian từ 72 đến 120 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26 đến 30°C và 0,1 đến 20% lượng cấy, để thu được dịch lên men.

Chất điều chỉnh độ pH là ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, axit xitric, axit clohydric, axit axetic, amoniac, natri hydroxit, và kali hydroxit.

Tốt hơn nếu quy trình chiết dịch lên men sinh học theo sáng chế là: xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH của dịch lọc đến trị số nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0, sử dụng butyl axetat để chiết, làm sạch dịch chiết butyl axetat bằng dung dịch không phải nước muối và NaH_2PO_4 1%, sau đó sử dụng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,5 để chiết để thu được dịch chiết chứa nước, điều chỉnh độ pH của dịch chiết chứa nước đến độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết chứa nước, lọc dịch chiết chứa nước, điều chỉnh độ pH của dịch lọc đến độ pH nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0, kết tủa dịch lọc và rửa bằng nước tinh khiết để thu được sản phẩm ướt, và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Trong đó, ít nhất một trong số các hợp chất axit clohydric, axit axetic, axit xitric, natri hydroxit, kali hydroxit, natri bicacbonat và natri cacbonat được sử dụng để điều chỉnh độ pH.

Trong đó, quy trình tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III bao gồm các công đoạn: tinh chế mẫu levocarimyxin bằng phương pháp sắc ký, thực hiện rửa giải theo gradien và tách pic của hợp phần đích là levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III bằng cột sắc ký ODS trong dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat.

Tốt hơn là, trong quá trình tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III, thực hiện ghi sơ đồ phổ UV của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao và phát hiện tia UV, và gom mẫu levoisovalerylspiramycin I dựa trên thời gian lưu bằng 44,759 phút, mẫu levoisovalerylspiramycin II dựa trên thời gian lưu bằng 43,34 phút, và mẫu levoisovalerylspiramycin III dựa trên thời gian lưu bằng 48,009 phút.

Tốt hơn nữa là, trong quá trình tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III, loại bỏ axetonitril lần lượt trong levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III đã gom bằng phương pháp làm bay hơi kiểu quay, sau đó sử dụng etyl axetat để chiết, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu thu được này bằng ete dầu mỏ, loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi để lần lượt thu được bột màu trắng chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III.

Trong đó, pha động là dung môi hỗn hợp gồm axetonitril A và dung dịch amoni axetat 150mM có độ pH bằng 8,5.

Điều kiện cần để tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III: gradien tuyến tính: từ 0 đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%, và từ 61 đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

Lưu tốc: 260 mL/phút;

Kích thước mẫu: 10mL;

Nồng độ mẫu: 0,5g/mL;

Bước sóng đo: 231nm;

Cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia UV.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể, phổ nhiễu xạ bột tia X của nó được đo bằng tia Cu-Ka có các pic đặc trưng ở $2\theta = 7,6^\circ, 8,0^\circ, 10,0^\circ, 11,4^\circ, 16,4^\circ, 17,0^\circ, 17,5^\circ, 17,9^\circ, 19,5^\circ, 22,7^\circ, 23,7^\circ$ và $24,4^\circ$. Biểu đồ nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.5.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin I dạng tinh thể bao gồm các bước: hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng rắn trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, làm mát đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy trong khi làm mát, sau đó thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể.

Trong đó, quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể là: thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp từ 2 đến 9 lần so với tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, tốt hơn là gấp từ 2,5 đến 7,5 lần, và tốc độ bổ sung nước nằm trong khoảng từ 4 đến 10ml/phút, tốt hơn là từ 6 đến 8ml/phút.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ hai của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể đã nêu là: tỷ lệ thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn

nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ ba của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I dạng tinh thể là: tốc độ khuấy nước tinh khiết đã bổ sung nằm trong khoảng từ 30 đến 60 vòng/phút, tốt hơn là từ 45 đến 60 vòng/phút; tốc độ khuấy sau khi bổ sung nước tinh khiết nằm trong khoảng từ 10 đến 30 vòng/phút, tốt hơn là từ 10 đến 20 vòng/phút.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ tư của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I dạng tinh thể là: tốc độ làm mát sau khi bổ sung nước tinh khiết nằm trong khoảng từ 1 đến 3°C/giờ, tốt hơn là từ 1 đến 1,5°C/giờ.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, phổ nhiễu xạ bột tia X của nó được đo bằng tia Cu-Ka có các pic đặc trưng ở $2\theta = 10,0^\circ, 11,6^\circ, 16,4^\circ, 17,3^\circ, 19,1^\circ, 21,2^\circ, 22,1^\circ, 22,7^\circ, 26,4^\circ, 26,9^\circ, 27,5^\circ$ và $31,5^\circ$. Biểu đồ nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.6.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể bao gồm các bước: hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp này, làm mát đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy trong khi làm mát, sau đó thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Trong đó, quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể là: thể tích nước tinh khiết được bổ sung gấp từ 2 đến 9 lần so với tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, tốt hơn là gấp từ 2,5 đến 7,5 lần, và tốc độ bổ sung nước nằm trong khoảng từ 4 đến 10ml/phút, tốt hơn là từ 6 đến 8ml/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ hai của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể đã nêu là: tỷ lệ thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ ba của phương pháp điều chế hợp chất

levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể là: tốc độ khuấy của nước tinh khiết được bổ sung nằm trong khoảng từ 30 đến 60 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45 đến 60 vòng/phút; tốc độ khuấy sau khi bổ sung nước tinh khiết nằm trong khoảng từ 10 đến 30 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 20 vòng/phút.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ tư của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể là: tốc độ làm mát sau khi bổ sung nước tinh khiết nằm trong khoảng từ 1 đến 3°C/giờ, tốt hơn là từ 1 đến 1,5°C/giờ.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, phổ nhiễu xạ bột tia X của nó được đo bằng tia Cu-Ka có các pic đặc trưng ở $2\theta = 8,0^\circ, 10,0^\circ, 11,2^\circ, 11,7^\circ, 16,4^\circ, 19,1^\circ, 19,6^\circ, 20,0^\circ, 21,4^\circ, 22,9^\circ, 23,6^\circ$ và $29,4^\circ$. Biểu đồ nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.7.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể bao gồm các bước: hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, làm mát đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy trong khi làm mát, sau đó thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể.

Trong đó, quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: thể tích nước tinh khiết được bổ sung gấp từ 2 đến 9 lần so với tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, tốt hơn là gấp từ 2,5 đến 7,5 lần, và tốc độ bổ sung nước nằm trong khoảng từ 4 đến 10ml/phút, tốt hơn là từ 6 đến 8ml/phút.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ hai của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: tỷ lệ thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ ba của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: tốc độ khuấy của nước tinh khiết được bổ sung nằm trong khoảng từ 30 đến 60 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45 đến 60

vòng/phút; tốc độ khuấy sau khi bổ sung nước tinh khiết nằm trong khoảng từ 10 đến 30 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 20 vòng/phút.

Quy trình kỹ thuật được ưu tiên thứ tư của phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể là: tốc độ làm mát sau khi bổ sung nước tinh khiết nằm trong khoảng từ 1 đến 3°C/giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5°C/giờ.

Các phân tử trong các loại cấu trúc tinh thể khác nhau là khác nhau về cấu trúc lập thể, cấu hình và cách bố trí, do đó độ hòa tan hiển nhiên là khác nhau, dẫn đến tình huống là các chế phẩm này có tốc độ tiêu hóa khác nhau trong cơ thể người, điều này ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ hấp thu, phân phối, bài tiết và chuyển hóa các chế phẩm này trong cơ thể người và cuối cùng sẽ dẫn đến sự khác biệt về tác dụng dược lâm sàng do độ sinh khả dụng khác nhau. Bằng cách so sánh tác dụng giữa levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III ở dạng tinh thể được điều chế theo sáng chế và levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III đã biết, đã phát hiện ra rằng tác dụng của hợp chất levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III ở dạng tinh thể được điều chế theo sáng chế lần lượt tốt hơn tác dụng của levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III đã biết.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể, bao gồm hợp chất isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể, muối dược dụng của hợp chất isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể, hợp chất isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể và chất bổ trợ dược dụng, hoặc muối dược dụng của hợp chất isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể và chất bổ trợ dược dụng, trong đó, độ tinh khiết của hợp chất isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là lớn hơn 99% trọng lượng;

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, bao gồm hợp chất isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, muối dược dụng của hợp chất isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, hợp chất isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể và chất bổ trợ dược dụng, hoặc muối dược dụng của hợp chất isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể và chất bổ trợ dược dụng, trong đó, độ tinh khiết của hợp chất isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể là lớn hơn 99% trọng lượng;

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể, bao gồm hợp chất isovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể, muối dược dụng

của hợp chất isovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, hợp chất isovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể và chất bổ trợ được dụng, hoặc muối được dụng của hợp chất isovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể và chất bổ trợ được dụng, trong đó, độ tinh khiết của hợp chất isovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là lớn hơn 99 % trọng lượng.

Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng isovalerylspiramycin I, hợp chất ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng để bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh truyền nhiễm; sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng isovalerylspiramycin II, hợp chất ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng để bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh truyền nhiễm; sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng isovalerylspiramycin III, hợp chất ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng để bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh truyền nhiễm. Các bệnh truyền nhiễm bao gồm các bệnh do các vi khuẩn gram dương, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, Streptococcus sinh mủ, *Micrococcus catarrhalis*, Gonococcus, *Bacillus influenzae*, Legionella hoặc vi khuẩn yếm khí gây ra.

Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng isovalerylspiramycin I, hợp chất ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng để bào chế thuốc kháng sinh; sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng isovalerylspiramycin II, hợp chất ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng để bào chế thuốc kháng sinh; sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng isovalerylspiramycin III, hợp chất ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng để bào chế thuốc kháng sinh. Các vi khuẩn được đề cập trong bản mô tả bao gồm *Streptococcus pneumoniae*, Streptococcus nhóm A, Streptococcus sinh mủ, Enterococcus, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Catarrhal coccus*, Gonococcus, *Bacillus influenzae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sinh độc tố ruột, *Escherichia coli* gây bệnh đường ruột, *Escherichia coli* xâm nhập ruột, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus proteus vulgaris*, *Bacillus* gây bệnh thương hàn, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens*, *S. Sonnei*, *Sh. flexneri*, *Tritirachium album*; Legionella như *Legionella pneumophila*, *Legionella gormanii*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella jordanis*, và *Legionella micdadei*; vi khuẩn yếm khí như *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. prevotella*, *Prevotella asaccharolyticus*, *Prevotella oralis*, *Fusobacteriumnu cleatum*,

Fusobacterium russii, Bifidobacteria, Lactobacillus, Peptostreptococcus, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, và nấm dạng nấm men.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện biểu đồ sắc ký được tập hợp bằng cách kích hoạt tia UV levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III theo phương án 1;

Fig.2 là đồ thị đường cong thể hiện sự biến đổi độ pH theo thời gian của quy trình lên men theo phương án 1 của sáng chế;

Fig.3 là đồ thị đường cong thể hiện sự biến đổi độ pH theo thời gian của quy trình lên men theo phương án 2 của sáng chế;

Fig.4 là đồ thị đường cong thể hiện sự biến đổi độ pH theo thời gian của quy trình lên men theo phương án 3 của sáng chế;

Fig.5 là biểu đồ nhiễu xạ bột tia X của levoisovalerylspiramyxin I theo sáng chế;

Fig.6 là biểu đồ nhiễu xạ bột tia X của levoisovalerylspiramyxin II theo sáng chế;

Fig.7 là biểu đồ nhiễu xạ bột tia X của levoisovalerylspiramyxin III theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Sáng chế đề xuất hợp chất levoisovalerylspiramyxin I, thu được bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men và kiểm soát nghiêm ngặt độ pH của dung dịch.

Sáng chế đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramyxin II, thu được bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men và kiểm soát nghiêm ngặt độ pH của dung dịch.

Sáng chế đề cập đến hợp chất levoisovalerylspiramyxin III, thu được bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men và kiểm soát nghiêm ngặt độ pH của dung dịch.

Hợp chất levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, bổ sung một loại hợp chất có thể sử dụng cho thuốc kháng sinh dùng để tiêm

và là giải pháp mới cho vấn đề kháng thuốc kháng sinh hiện nay.

Trong đó, phương pháp đo độ quay riêng của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III theo sáng chế là: cân chính xác sản phẩm này, bổ sung cloroform vào để hòa tan, pha loãng nó thành dung dịch có nồng độ 20mg/ml, chọn dòng D của phổ natri (589,3nm) để đo hoạt tính quay quang ở chiều dài đo là 1 dm và nhiệt độ là 25°C, và sử dụng thiết bị đo độ phân cực có số ghi đến 0,0001° và đã được hiệu chỉnh trước.

Phương pháp đo nhiệt độ nóng chảy của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III theo sáng chế bao gồm các bước: cho levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III khô với lượng thích hợp vào ống mao quản được sử dụng để đo nhiệt độ nóng chảy, đo nhiệt độ nóng chảy, lặp lại việc đo 3 lần để thu được trị số trung bình.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III, bao gồm levoisovalerylspiramycin I và chất mang và/hoặc chất bổ trợ dược dụng, trong đó độ tinh khiết của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III là lớn hơn 90% trọng lượng, tốt hơn là lớn hơn 95% trọng lượng, và tốt hơn nữa là lớn hơn 98% trọng lượng.

Chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III hoặc hợp chất ở dạng tinh thể của nó được ưu tiên là dung dịch dùng để tiêm, bột dùng để tiêm và bột đông khô dùng để tiêm. Chế phẩm một thành phần chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III này được bào chế thành dung dịch dùng để tiêm hoặc bột dùng để tiêm, sao cho chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III theo sáng chế có thể được hấp thu tốt hơn trong cơ thể người để tạo ra tác dụng chống nhiễm khuẩn.

Chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin I theo sáng chế bao gồm liều đơn vị sau: levoisovalerylspiramycin I với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg;

Chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin II theo sáng chế bao gồm liều đơn vị sau: levoisovalerylspiramycin II với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg;

Chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin III theo sáng chế bao gồm liều đơn vị sau: levoisovalerylspiramycin III với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là

nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg.

Chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể theo sáng chế bao gồm liều đơn vị sau: hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg;

Chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo sáng chế bao gồm liều đơn vị sau: hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg;

Chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể theo sáng chế bao gồm liều đơn vị sau: hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000mg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg.

Phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramycin I trong chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin I theo sáng chế nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 90%;

Phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramycin II trong chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin II theo sáng chế nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 90%;

Phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramycin III trong chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin III theo sáng chế nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 90%.

Phần trăm trọng lượng của hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể trong chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể theo sáng chế nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 90%;

Phần trăm trọng lượng của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể trong chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo sáng chế

nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 90%;

Phần trăm trọng lượng của hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể trong chế phẩm chứa levoisovalerylspiramyxin III hợp chất tinh thể theo sáng chế nằm trong khoảng từ 10 đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 90%, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75% đến 90%.

Chế phẩm dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể chứa tá dược thông thường, như chất kết dính, chất độn, chất pha loãng, chất trợ dập viên nén, chất bôi trơn, chất gây rã, chất tạo màu, gia vị hoặc chất giữ ẩm, và viên nén có thể được bao nếu cần. Trong đó, chất độn có thể sử dụng bao gồm xenluloza, manit, lactoza và các chất độn tương tự khác; chất phân hủy có thể sử dụng bao gồm tinh bột, polyvinylpyrrolidon và dẫn xuất tinh bột như natri tinh bột glycolat; chất gây rã có thể sử dụng bao gồm, ví dụ, magie stearat; và chất giữ ẩm được dụng có thể sử dụng bao gồm lauryl natri sulfat.

Chế phẩm rắn dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể được bào chế theo các phương pháp thông thường như trộn, nhồi và dập.

Chế phẩm dạng lỏng dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể ở dạng gồm, ví dụ, hỗn dịch gốc nước hoặc gốc dầu, dung dịch, nhũ tương, xirô hoặc cồn ngọt, hoặc nó có thể là sản phẩm sấy khô có thể tăng thể tích gấp đôi bằng nước hoặc chất mang có thể sử dụng khác trước khi sử dụng. Chế phẩm dạng lỏng này có thể chứa chất phụ gia thông thường như chất tạo hỗn dịch như sorbitol, xirô, metyl xenluloza, gelatin, hydroxyetyl xenluloza, carboxymetyl xenluloza, gel nhôm stearat hoặc chất béo hydro hóa ăn được, và chất nhũ hóa, như lexithin, sorbitan oleat hoặc gôm Arabic; chất mang không chứa nước (có thể bao gồm dầu ăn), như dầu quả hạnh, phân đoạn dầu dừa và este của dầu như glyxerol, propylen glycol hoặc etanol; chất bảo quản, như paraben hoặc Propyl 4-hydroxybenzoat hoặc axit sorbic, ngoài ra, có thể chứa chất tạo mùi vị hoặc chất tạo màu thông thường, nếu cần.

Chế phẩm tiêm theo sáng chế có thể chứa chất mang dùng trong y tế thông thường và/hoặc tá dược, chất làm ổn định, chất chống oxy hóa, chất tạo phức, hoặc chất bảo quản dùng trong y tế, chất đệm hoặc thuốc gây tê cục bộ và chất tương tự. Chế phẩm tiêm được

bào chế theo phương pháp bào chế thông thường.

Chất mang được dùng trong chế phẩm theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm: manitol, sorbitol, natri pyrosulfit, natri bisulfit, natri thiosulfat, crystein hydroclorua, axit mercaptoaxetic, methionin, vitamin C, EDTA dinatri, EDTA natri canxi, cacbonat monobazơ, axetat, phosphat hoặc dung dịch nước của nó, axit muriatic, axit axetic, axit sulfuric, axit phosphoric, axit amin, natri clorua, kali clorua, natri lactat, xylitol, maltoza, glucoza, fructoza, dextran, glyxin, tinh bột, đường, lactoza, manitol, dẫn xuất silicon, xenluloza và dẫn xuất của nó, alginat, gelatin, polyvinylpyrrolidon, glyxerol, tween-80, aga, canxi cacbonat, canxi bicarbonat, chất hoạt động bề mặt, polyetylen glycol, xyclodextrin, β -xyclodextrin, nguyên liệu chứa phospholipit, cao lanh, bột talc, canxi stearat, magie stearat, v.v.

Cách dùng và liều lượng của chế phẩm theo sáng chế dựa trên tình trạng thực tế của bệnh nhân. Chế phẩm này có thể được dùng qua đường miệng hoặc được tiêm từ 1 đến 3 lần với từ 1 đến 20 liều mỗi lần trong một ngày.

Các tác dụng có lợi của sáng chế là:

(1) levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III theo sáng chế có đặc tính kháng khuẩn mạnh. Theo các nghiên cứu dược học hiện đại, do sự khác biệt về độ chọn lọc lập thể của các chất đồng phân đối ảnh của thuốc, ái lực của thuốc với mỗi thụ thể cũng khác nhau, do đó dẫn đến sự khác biệt đáng kể về tác dụng dược. Vì vậy, levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III theo sáng chế có được tính mạnh;

(2) các phân tử trong các loại cấu trúc tinh thể khác nhau là khác nhau về cấu trúc lập thể, cấu hình và cách sắp xếp, do vậy độ hòa tan hiển nhiên là khác nhau, dẫn đến tình huống các chế phẩm này có tốc độ tiêu hóa khác nhau trong cơ thể người, điều này ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ hấp thu, sự phân phối, bài tiết và chuyển hóa của chế phẩm này trong cơ thể người và cuối cùng sẽ dẫn đến sự khác biệt về tác dụng dược lâm sàng do độ sinh khả dụng khác nhau. Khi so sánh tác dụng giữa các hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở dạng tinh thể được điều chế theo sáng chế và levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III đã biết, đã phát hiện ra rằng tác dụng của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở dạng tinh thể được điều chế theo sáng chế lần

lượt tốt hơn tác dụng của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III đã biết.

(3) chế phẩm tiêm chứa thành phần duy nhất là levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III, hoặc chế phẩm tiêm chứa thành phần duy nhất là hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể tạo ra tiềm năng cho dạng liều, mà có thể có tác dụng nhanh chóng và được chấp nhận một cách dễ dàng đối với bệnh nhân ốm nguy kịch hoặc bệnh nhân không thể dùng thuốc qua đường miệng;

(4) chế phẩm chứa thành phần duy nhất là levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III, hoặc chế phẩm chứa thành phần duy nhất là hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở dạng tinh thể theo sáng chế có quy trình sản xuất ổn định, và dễ dàng kiểm soát được tiêu chuẩn chất lượng, có thể áp dụng cho quy trình sản xuất công nghiệp ở quy mô lớn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án sau được bộc lộ chỉ nhằm mục đích giải thích và minh họa sáng chế, chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Phương án 1. Tách và điều chế levoisovalerylspiramycin I, II và III

(1) Lên men theo phương pháp sinh học: nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, trên môi trường nuôi cấy aga nghiêng chứa 2% bột đậu tương, 1% glucoza, 3% tinh bột, 0,5% CaCO_3 , 0,4% NaCl và 2% aga trong thời gian từ 8 đến 15 ngày ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 38°C, sau đó cấy vào môi trường giữ giống chứa 1,5% bột đậu tương, 3,0% tinh bột, 0,4% NaCl, 0,5% CaCO_3 , 0,3% pepton cá và 0,05% KH_2PO_4 để nuôi cấy trong thời gian từ 40 đến 80 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C, cấy chuyển vào môi trường lên men chứa 0,5% glucoza, 6,0% tinh bột, 0,5% bột nấm men, 2,0% bột cá, 0,6% NH_4NO_3 , 1,0% NaCl, 0,5% CaCO_3 , 0,05% KH_2PO_4 , 0,1% MgSO_4 , 0,5% dầu đậu nành và 0,02% chất khử bọt để nuôi cấy trong thời gian từ 72 đến 120 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26 đến 30°C, và lượng cấy nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20%, sau đó thu được dịch lên men.

Trong đó, kiểm soát nghiêm ngặt độ pH của dung dịch bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men; thực hiện việc lên men trong thời gian

120 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0, và đường cong biến đổi độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, trong đó, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,1364x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0735x_2+10,64$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 120$. Fig.2 thể hiện các đường cong. Dịch lên men được thu nhận.

(2) Chiết dịch lên men sinh học: xử lý dịch lên men thu được ở bước (1) bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,5, sử dụng butyl axetat để chiết, làm sạch dịch chiết butyl axetat lần lượt bằng dung dịch không phải nước muối và NaH_2PO_4 1%, sau đó sử dụng nước có độ pH=2,0 để chiết để thu được dịch chiết chứa nước, điều chỉnh độ pH đến 4,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết chứa nước, lọc, và điều chỉnh độ pH đến 8,5, kết tủa dịch lọc và rửa bằng nước tinh khiết để thu được sản phẩm ướt, và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

(3) Tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II và III: tinh chế mẫu đã được tách sơ bộ bằng sắc ký lỏng điều chế, rửa giải từ từ bằng cột sắc ký ODS trong dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat, và ghi biểu đồ phổ cực tím riêng biệt bằng cách phát hiện tia UV, và gom pic của thành phần đích của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III.

Cột sắc ký: cột sắc ký được chuẩn bị theo ODS;

Pha động: axetonitril (A), dung dịch nước amoni axetat 100mM (B);

Điều kiện gradien: gradien tuyến tính trong thời gian từ 0 đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%, và từ 61 đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

Lưu tốc: 260 mL/phút;

Kích thước mẫu: 10mL;

Nồng độ mẫu: 0,5g/mL;

Bước sóng đo: 231nm;

Cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia UV.

Gom mẫu levoisovalerylspiramycin I dựa trên thời gian lưu bằng 44,759 phút, mẫu levoisovalerylspiramycin II dựa trên thời gian lưu bằng 43,34 phút, và mẫu

levoisovalerylspiramycin III dựa trên thời gian lưu 48,009 phút.

Loại bỏ axetonitril trong levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III đã gom lần lượt bằng phương pháp làm bay hơi kiểu quay, sau đó sử dụng etyl axetat với lượng gấp đôi để chiết, loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay, và thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu thu được này trong ete dầu mỏ, loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để lần lượt thu được bột màu trắng chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III.

Phương án 2. Tách và điều chế levoisovalerylspiramycin I, II và III

(1) Lên men theo phương pháp sinh học: nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, trên môi trường nuôi cấy aga nghiêng chứa 2% bột đậu tương, 1% glucoza, 3% tinh bột, 0,5% CaCO_3 , 0,4% NaCl và 2% aga trong thời gian 12 ngày ở độ pH=7,2 và nhiệt độ 32°C, sau đó cấy vào môi trường giữ giống chứa 1,5% bột đậu tương, 3,0% tinh bột, 0,4% NaCl , 0,5% CaCO_3 , 0,3% pepton cá và 0,05% KH_2PO_4 và nuôi cấy trong 70 giờ ở độ pH=7,2 và nhiệt độ 27°C, cấy chuyển vào môi trường lên men chứa 0,5% glucoza, 6,0% tinh bột, 0,5% bột nấm men, 2,0% bột cá, 0,6% NH_4NO_3 , 1,0% NaCl , 0,5% CaCO_3 , 0,05% KH_2PO_4 , 0,1% MgSO_4 , 0,5% dầu đậu nành và 0,02% chất khử bọt, và nuôi cấy trong 100 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0, nhiệt độ 26°C và lượng cấy là 12%, sau đó thu được dịch lên men. Thực hiện việc lên men trong thời gian 110 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, và đường cong biến đổi độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, trong đó, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0909x_1+6,4$, trong đó $0 < x_1 < 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0441x_2+7,8$, trong đó $22 < x_2 < 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 110$. Fig.3 thể hiện các đường cong. Dịch lên men được thu nhận. Xem Fig.3 về các đường cong đối chứng cụ thể.

(2) Chiết dịch lên men sinh học: xử lý dịch lên men thu được ở bước (1) bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,6, sử dụng butyl axetat để chiết, làm sạch dịch chiết butyl axetat lần lượt bằng dung dịch không phải nước muối và NaH_2PO_4 1%, sau đó sử dụng nước có độ pH=2,3 để chiết để thu được dịch chiết chứa nước, điều chỉnh độ pH đến 5,0, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết chứa

nước, lọc, và điều chỉnh độ pH đến 8,6, kết tủa dịch lọc, và rửa bằng nước tinh khiết để thu được sản phẩm ướt, và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

(3) Tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III: tinh chế mẫu đã được tách sơ bộ bằng sắc ký lỏng điều chế, rửa giải từ từ qua cột sắc ký ODS trong dung dịch đậm axetonitril và amoni axetat, và ghi biểu đồ phổ cực tím riêng biệt bằng cách phát hiện tia UV, và gom pic của thành phần đích của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III.

Cột sắc ký: cột sắc ký được chuẩn bị theo ODS;

Pha động: axetonitril (A), dung dịch nước amoni axetat 100mM (B);

Điều kiện gradien: gradien tuyến tính trong thời gian từ 0 đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%, và 61 đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

Lưu tốc: 260 mL/phút;

Kích thước mẫu: 10mL;

Nồng độ mẫu: 0,5g/mL;

Bước sóng đo: 231nm;

Cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia UV.

Gom mẫu levoisovalerylspiramycin I dựa trên thời gian lưu bằng 44,759 phút, mẫu levoisovalerylspiramycin II dựa trên thời gian lưu bằng 43,34 phút, và mẫu levoisovalerylspiramycin III dựa trên thời gian lưu bằng 48,009 phút;

Loại bỏ axetonitril trong levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III đã gom lần lượt bằng phương pháp làm bay hơi kiểu quay, sau đó sử dụng etyl axetat với lượng gấp đôi để chiết, loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay, và thu được mẫu bột nhão trong ete dầu mỏ, loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để lần lượt thu được bột màu trắng chứa levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III.

Phương án 3. Tách và điều chế levoisovalerylspiramycin I, II và III

(1) Nuôi cấy và lên men: nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, trên môi trường nuôi cấy aga nghiêng, cấy vào môi trường giữ giống để nuôi cấy, và sau đó cấy vào môi trường lên men, và quá trình lên men diễn ra trong thời gian 115 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5,

được kiểm soát bằng glucoza và axit xitric trong quy trình lên men. Đường cong biến đổi độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, trong đó, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0682x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0294x_2+8,147$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 < x_3 < 115$. Fig.4 thể hiện các đường cong. Dịch lên men được thu nhận.

(2) Chiết dịch lên men theo phương pháp sinh học: xử lý dịch lên men ở bước (1) bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,6, sử dụng butyl axetat để chiết, làm sạch butyl axetat dịch chiết lần lượt bằng dung dịch không phải nước muối và NaH_2PO_4 1%, sau đó sử dụng nước có độ pH=2,3 để chiết để thu được dịch chiết chứa nước, điều chỉnh độ pH đến 5,0, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết chứa nước, lọc, và điều chỉnh độ pH đến 8,6, kết tủa dịch lọc, và rửa bằng nước tinh khiết để thu được sản phẩm ướt, và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

(3) Tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III: tinh chế mẫu đã được tách sơ bộ bằng sắc ký lỏng điều chế, rửa giải từ từ qua cột sắc ký ODS trong dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat, và ghi biểu đồ phổ cực tím riêng biệt bằng cách phát hiện tia UV, và gom pic của thành phần đích của levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III.

Cột sắc ký: cột sắc ký được chuẩn bị theo ODS;

Pha động: axetonitril (A), dung dịch nước amoni axetat 100mM (B);

Điều kiện gradien: gradien tuyến tính trong thời gian từ 0 đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%, và 61 đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

Lưu tốc: 260 mL/phút;

Kích thước mẫu: 10mL;

Nồng độ mẫu: 0,5g/mL;

Bước sóng phát hiện: 231nm;

Phương pháp gom: gom bằng cách kích hoạt tia UV;

Gom mẫu levoisovalerylspiramycin I dựa trên thời gian lưu bằng 44,759 phút, mẫu levoisovalerylspiramycin II dựa trên thời gian lưu bằng 43,34 phút, và mẫu levoisovalerylspiramycin III dựa trên thời gian lưu bằng 48,009 phút;

Loại bỏ axetonitril trong levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III đã gom lần lượt bằng phương pháp làm bay hơi kiểu quay, sau đó sử dụng etyl axetat với lượng gấp đôi để chiết, loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay, và thu được mẫu bột nhão trong ete dầu mỏ, loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để lần lượt thu được bột màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III.

Phương án 4. Bào chế dung dịch chứa levoisovalerylspiramyxin I dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin I và axit adipic với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) nạp, bịt kín, tiệt trùng, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 5. Bào chế dung dịch chứa isovalerylspiramyxin I dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin I và axit citric với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) nạp, bịt kín, tiệt trùng, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 6. Bào chế dung dịch chứa isovalerylspiramyxin I dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin I và axit maleic với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) nạp, bịt kín, tiệt trùng, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 7. Bào chế bột chứa levoisovalerylspiramyxin I dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg levoisovalerylspiramycin I và axit xitric với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bổ sung manitol với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 150mg làm cát nhân tạo đông khô nhanh; làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô để thu được cục to màu vàng nhạt, sau đó đập dập, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 8. Bào chế bột chứa levoisovalerylspiramycin I dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg levoisovalerylspiramycin I và axit maleic với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bổ sung manitol với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 150mg làm cát nhân tạo đông khô nhanh; làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô để thu được cục to màu vàng nhạt, sau đó đập dập, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 9. Bào chế bột chứa levoisovalerylspiramycin I dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg levoisovalerylspiramycin I và axit xitric với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bổ sung manitol với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 150mg làm cát nhân tạo đông khô nhanh; làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô để

thu được cục to màu vàng nhạt, sau đó đập dập, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 10. Viên nén chứa levoisovalerylspiramycin I (tính trong 1000 viên nén)

Công thức:	Levoisovalerylspiramycin I	100g
	Hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp (5%)	9,25g
	Tinh bột natri carboxymetyl (3%)	5,55g
	Magie stearat (1%)	1,85g
	Tinh bột	Tổng trọng lượng - trọng lượng của các chất bổ trợ khác
	Tổng trọng lượng	185g

Quy trình bào chế: cân lượng tinh bột thích hợp và pha loãng đến nồng độ 15%, đun nóng cho đến khi thành hồ tinh bột để tạo ra chất kết dính; rây lần lượt thành phần hoạt tính carimyxin, chất bổ trợ bao gồm tinh bột, hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp, tinh bột natri carboxymetyl và magie stearat bằng rây có cỡ lỗ 100, và cân thành phần hoạt tính và các chất bổ trợ yêu cầu theo công thức; trộn kỹ levoisovalerylspiramycin I, tinh bột và hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp, sử dụng 15% hồ tinh bột để tạo ra nguyên liệu mềm, xử lý nguyên liệu mềm này thành hạt bằng rây có cỡ lỗ 14, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50 đến 60°C cho đến khi hàm lượng nước được kiểm soát trong khoảng từ 3% đến 5%; phân loại hạt bằng rây có cỡ lỗ 14, bổ sung tinh bột natri carboxymetyl và magie stearat để trộn, xác định hàm lượng hạt; tính trọng lượng của từng viên nén theo hàm lượng hạt này; dập thành viên nén (máy dập lõm đường kính 9mm), phát hiện sự khác biệt trọng lượng của viên nén, và sau đó đóng gói các viên nén đạt yêu cầu sau khi kiểm tra.

Phương án 11. Viên nang chứa levoisovalerylspiramycin (tính trong 1000 viên nén)

Công thức:	Bột thô chứa levoisovalerylspiramycin I	100g
	Tinh bột (để dùng trong dược phẩm)	108 – trọng lượng bột thô chứa levoisovalerylspiramycin I
	Vỏ nang dùng trong dược phẩm loại số 3	100 vỏ nang

Parafin lỏng

5ml

Quy trình bào chế: cân thành phần hoạt tính levoisovalerylspiramycin I, chất hỗ trợ tinh bột (để dùng trong dược phẩm) lần lượt theo công thức và sau đó cho chúng vào máy khuấy để trộn kỹ trong thời gian từ 1,5 đến 2 giờ; dữ liệu về hàm lượng mẫu phát hiện được hầu như phải phù hợp với dữ liệu lý thuyết (khoảng 0,105g cho mỗi viên nang). Nhồi viên nang loại số 3 phù hợp dùng trong dược phẩm và nguyên liệu đã trộn để nạp vào máy nạp liệu theo yêu cầu vận hành của máy bao nang hoàn toàn tự động; phát hiện sự khác biệt về các viên nang đã được nhồi (trong khoảng $\pm 10\%$, $< 0,3g$) và tốc độ hòa tan, cho viên nang phù hợp vào máy đánh bóng và bổ sung parafin lỏng để đánh bóng trong thời gian từ 15 đến 20 phút, và sau đó lấy ra để kiểm tra hộp đóng gói thành phẩm.

Phương án 12. Viên nén bao đường chứa levoisovalerylspiramycin I (tính trong 1000 viên nén)

Công thức: giống với phương án 10

Quy trình bào chế: theo phương pháp bào chế nêu trong phương án 12, cho viên nén trần đạt yêu cầu vào chậu để bao đường và xirô thu được (nồng độ nằm trong khoảng từ 65% đến 70%) được cho từ từ vào chậu này, sau đó tăng nhiệt độ đến khoảng 40°C , bổ sung bột talc thích hợp vào, thổi lặp đi lặp lại nhiều lần để sấy khô trong thời gian từ 25 đến 30 phút cho đến khi lớp phủ trở nên nhẵn, sau đó bao trong thời gian từ 15 đến 20 phút cho đến khi lớp đường trở nên nhẵn, tiến hành bao lớp bao với màu sắc yêu cầu; cho bột màu đặc điều chế được vào xirô để trộn đều và sau đó rót hỗn hợp này vào chậu; khuấy đều hỗn hợp trong vài lần, 15 đến 20 mỗi lần.

Phương án 13. Xirô chứa levoisovalerylspiramycin I (tính trong 1000 túi)

Công thức:	Bột thô chứa levoisovalerylspiramycin I	125g
	Axit xitric (0,5%)	1,5g
	Đường mía	Tổng trọng lượng – các chất hỗ trợ khác
	Tổng trọng lượng	khoảng 50g
	Bột màu (curcumin)	khoảng 0,1g

Quy trình bào chế: nghiền bột thô chứa levoisovalerylspiramycin I, axit xitric và

đường mía thành hạt lần lượt bằng máy nghiền kiểu khí nén tốc độ cao, với 85% hạt bằng rây có cỡ lỗ 300 và 15% hạt bằng rây có cỡ lỗ 180, và sau đó cân bột mịn đã nghiền này theo công thức và trộn kỹ trong thời gian từ 1 đến 1,5 giờ, đo hàm lượng và tính lượng nạp (500mg mỗi túi theo lý thuyết), sau đó nạp hỗn hợp này vào máy đóng túi, nạp vào bao giấy tráng nhôm, và phân phối hỗn hợp theo yêu cầu vận hành của thiết bị phân phối, với mức độ chênh lệch khi nạp trong khoảng $\pm 5\%$, và kiểm tra chất lượng sau khi nạp, và cuối cùng là đóng gói.

Phương án 14. Viên nén bao tan trong ruột chứa levoisovalerylspiramycin I (tính trong 1000 viên nén)

Công thức: xem Phương án 10.

Quy trình bào chế: bào chế viên nén trần theo Phương án 5; cho viên nén trần đạt yêu cầu vào chậu để bao đường, sử dụng xirô và bột talc với lượng nằm trong khoảng từ 60 đến 70% để bao ba lớp làm lớp bao nền, và sau đó bao lớp riêng biệt, bổ sung dung dịch rượu zein 10%, sấy khô trong thời gian từ 10 đến 15 phút bằng phương pháp đảo, và sau đó nhỏ giọt diethyl ortho-phtalat, axeton, xenluloza axetat-phtalat và dung dịch rượu, nghĩa là dung dịch tan trong ruột vào chậu, và sấy khô từ 2 đến 3 lần bằng phương pháp đảo; thực hiện việc bao đường theo Phương án 13 sau khi qua quy trình kiểm tra chất lượng.

Phương án 15. Viên nén bao tan trong dạ dày chứa levoisovalerylspiramycin I (tính trong 1000 viên nén)

Công thức: xem Phương án 10.

Quy trình bào chế: bào chế viên nén trần theo Phương án 11; cho viên nén trần đạt yêu cầu vào máy bao hiệu suất cao, và sau đó xử lý bột bao có chất lượng đạt yêu cầu (bao gồm bột tan trong chất béo và bột tan trong nước) thành dung dịch bao theo yêu cầu, và cho dung dịch bao này vào máy nghiền keo để nghiền, và lọc để sử dụng. Đun nóng sơ bộ chậu bao hiệu suất cao chứa đầy viên nén trần, với tốc độ quay trong khoảng từ 5 đến 10 vòng/phút và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 60°C, phun dung dịch bao vào chậu bằng thiết bị phun dạng sol khí (cỡ lỗ > 300), và sau đó sấy khô trong thời gian từ 25 đến 35 phút, tiến hành lặp đi lặp lại quy trình này từ 8 đến 12 lần, cho đến khi lớp bao trở nên đồng nhất; và cuối cùng là đóng gói sau khi sấy khô và kiểm tra sự tuân thủ yêu cầu.

Phương án 16. Hạt chứa levoisovalerylspiramyxin I (tính trong 1000 túi)

Công thức:	Bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin I	125g
	Đường bột	2000g
	Dextrin	900g
	PVP-K30 5%	Lượng thích hợp

Quy trình bào chế: sàng bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin I, đường bột và dextrin bằng rây có cỡ lỗ 120, cân levoisovalerylspiramyxin I, đường bột và dextrin theo công thức, và trộn đều chúng; xử lý nguyên liệu đã trộn đều ở trên thành nguyên liệu mềm với dịch nhầy PVP-K30 5%; bào chế nguyên liệu này thành hạt bằng máy tạo hạt dao động, sấy khô hạt ở nhiệt độ 70°C, phân loại hạt, và sau đó đóng gói chúng sau khi kiểm tra chất lượng.

Phương án 17. Bào chế dung dịch chứa levoisovalerylspiramyxin II dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin II và axit adipic với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bịt kín, tiệt trùng, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 18. Bào chế dung dịch chứa levoisovalerylspiramyxin II dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin II và axit citric với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bịt kín, tiệt trùng, kiểm tra và đóng gói dung dịch này trong điều kiện vô trùng.

Phương án 19. Bào chế bột chứa levoisovalerylspiramyxin II dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin II và axit xitric với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bổ sung manitol với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 150mg làm cát nhân tạo đông khô; làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô để thu được cục tối màu vàng nhạt, và sau đó đập dập, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 20. Bào chế chứa viên nén chứa levoisovalerylspiramyxin II (tính trong 1000 viên nén)

Công thức:	Levoisovalerylspiramyxin II	100g
	Hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp (5%)	9,25g
	Tinh bột natri carboxymetyl (3%)	5,55g
	Magie stearat (1%)	1,85g
	Tinh bột	Tổng trọng lượng - trọng lượng của các chất bổ trợ khác
	Tổng trọng lượng	185g

Quy trình bào chế: cân lượng tinh bột thích hợp và pha loãng đến nồng độ 15%, đun nóng cho đến khi thành hồ tinh bột để tạo ra chất kết dính; rây lần lượt thành phần hoạt tính carimyxin, chất bổ trợ bao gồm tinh bột, hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp, tinh bột natri carboxymetyl và magie stearat bằng rây có cỡ lỗ 100, và cân thành phần hoạt tính và các chất bổ trợ yêu cầu theo công thức; trộn kỹ levoisovalerylspiramyxin II, tinh bột và hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp, bằng cách sử dụng 15% hồ tinh bột để tạo ra nguyên liệu mềm, xử lý nguyên liệu mềm này thành hạt bằng rây có cỡ lỗ 14, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50 đến 60°C cho đến khi hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 5%; phân loại các hạt này bằng rây có cỡ lỗ 14, và bổ sung tinh bột natri carboxymetyl và magie stearat vào và trộn, xác định hàm lượng hạt; tính trọng lượng của từng viên nén theo hàm lượng của hạt; dập viên nén

(máy dập lõm đường kính 9mm), phát hiện sự khác biệt trọng lượng của viên nén, và sau đó đóng gói các viên nén đạt yêu cầu sau khi kiểm tra.

Phương án 21. Bào chế viên nang chứa levoisovalerylspiramyxin II (tính trong 1000 viên nang)

Công thức: Bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin II	100g
Tinh bột (dùng trong dược phẩm)	108g - trọng lượng bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin II
Vỏ nang dùng trong dược phẩm loại số 3	100 vỏ nang
Parafin lỏng	5ml

Quy trình bào chế: cân thành phần hoạt tính levoisovalerylspiramyxin II, chất bổ trợ tinh bột (để dùng trong dược phẩm) lần lượt theo công thức và sau đó cho chúng vào máy khuấy để trộn kỹ trong thời gian từ 1,5 đến 2 giờ; dữ liệu của hàm lượng mẫu phát hiện được hầu như phải phù hợp với dữ liệu lý thuyết (khoảng 0,105g cho mỗi viên nang). Nhồi viên nang loại số 3 phù hợp dùng trong dược phẩm và nguyên liệu đã trộn để nạp vào máy nạp liệu theo yêu cầu vận hành của máy bao nang tự động hoàn toàn; phát hiện sự khác biệt về các viên nang đã được nhồi (trong khoảng $\pm 10\%$, $< 0,3g$) và tốc độ hòa tan, cho viên nang phù hợp vào máy đánh bóng và bổ sung parafin lỏng để đánh bóng trong thời gian từ 15 đến 20 phút, và sau đó lấy ra để kiểm tra hộp đóng gói thành phẩm.

Phương án 22. Bào chế dung dịch chứa isovalerylspiramyxin III dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin III và axit maleic với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bịt kín, tiệt trùng, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 23. Bào chế bột chứa levoisovalerylspiramyxin III dùng để tiêm

(1) trộn đều 100mg isovalerylspiramyxin III và axit maleic với lượng mol bằng nhau, và hòa tan vào 1 đến 5ml nước cất để thu được dung dịch trong suốt, màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6.

(2) bổ sung than hoạt tính với lượng bằng 0,1% thể tích dung dịch vào dung dịch điều chế được ở bước (1), và lọc dung dịch này;

(3) bổ sung manitol với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 150mg làm cát nhân tạo đông khô; làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô để thu được cục to màu vàng nhạt, sau đó đập dập, kiểm tra và đóng gói trong điều kiện vô trùng.

Phương án 24. Viên nang chứa levoisovalerylspiramyxin III (tính trong 1000 viên nang)

Công thức:	Levoisovalerylspiramyxin III bột thô	100g
	Tinh bột (để dùng trong dược phẩm)	108g - trọng lượng bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin III
	Vỏ nang dùng trong dược phẩm loại số 3	100 vỏ nang
	Parafin lỏng	5ml

Quy trình bào chế: cân lần lượt thành phần hoạt tính levoisovalerylspiramyxin III, chất bổ trợ tinh bột (để dùng trong dược phẩm) theo công thức, và sau đó cho chúng vào máy khuấy để trộn kỹ trong thời gian từ 1,5 đến 2 giờ; dữ liệu của hàm lượng mẫu phát hiện được hầu như phải phù hợp với dữ liệu lý thuyết (khoảng 0,105g cho mỗi viên nang). Nhồi viên nang loại số 3 phù hợp dùng trong dược phẩm và nguyên liệu đã trộn để nạp vào máy nạp liệu theo yêu cầu vận hành của máy bao nang tự động hoàn toàn; phát hiện sự khác biệt về các viên nang đã được nhồi (trong khoảng $\pm 10\%$, $< 0,3g$) và tốc độ hòa tan, cho viên nang phù hợp vào máy đánh bóng và bổ sung parafin lỏng để đánh bóng trong thời gian từ 15 đến 20 phút, và sau đó lấy ra để kiểm tra hộp đóng gói thành phẩm.

Phương án 25. Xirô chứa levoisovalerylspiramyxin III (tính trong 1000 túi)

Công thức:	Bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin I	125g
	Axit xitric (0,5%)	1,5g
	Đường mía	Tổng trọng lượng-nguyên liệu thô và chất bổ trợ

khác

Tổng trọng lượng

50g

Bột màu (curcumin)

khoảng 0,1g

Quy trình bào chế: nghiền bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin III, axit xitric và đường mía thành hạt lần lượt bằng máy nghiền kiểu khí nén tốc độ cao, với 85% hạt bằng rây có cỡ lỗ 300 và 15% hạt bằng rây có cỡ lỗ 180, và sau đó cân bột mịn đã nghiền theo công thức và trộn kỹ trong thời gian từ 1 đến 1,5 giờ, đo hàm lượng và tính lượng nạp (500mg cho mỗi túi theo lý thuyết), sau đó nạp hỗn hợp này vào máy đóng túi, nạp vào bao giấy tráng nhôm, và phân phối hỗn hợp theo yêu cầu vận hành của thiết bị phân phối, với mức độ chênh lệch khi nạp trong khoảng $\pm 5\%$, và kiểm tra chất lượng sau khi nạp, và cuối cùng là đóng gói.

Phương án 26. Hạt chứa levoisovalerylspiramyxin III (tính trong 1000 túi)

Công thức:	Bột thô chứa levoisovalerylspiramyxin III	125g
	Đường bột	2000g
	Dextrin	900g
	PVP-K30 5%	Lượng thích hợp

Quy trình bào chế: sàng bột thô levoisovalerylspiramyxin III, đường bột và dextrin bằng rây có cỡ lỗ 120, cân levoisovalerylspiramyxin III, đường bột và dextrin theo công thức và trộn đều chúng; xử lý nguyên liệu đã trộn đều nêu trên thành nguyên liệu mềm với dịch nhầy PVP-K30 5%; bào chế nguyên liệu này thành hạt bằng máy tạo hạt dạng dao động, sấy khô hạt ở nhiệt độ 70°C, phân loại hạt, và sau đó đóng gói chúng sau khi kiểm tra chất lượng.

Phương án 27

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I theo phương án 1 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin I rắn thu được theo phương án 1 trong

dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:10:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung bằng 2,5 lần của tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; vận tốc bổ sung nước là 4ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 30 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 5°C với tốc độ bằng 1°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể được đo bằng tia Cu-Ka có các pic đặc trưng ở góc 2 θ bằng 7,6°, 8,0°, 10,0°, 11,4°, 16,4°, 17,0°, 17,5°, 17,9°, 19,5°, 22,7°, 23,7° và 24,4°, và phổ nhiễu xạ tia X là như được thể hiện trên Fig.5.

Phương án 28

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I theo phương án 1 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin I rắn trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:10:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung bằng 9 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 10ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 60 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 15°C với tốc độ bằng 3°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể được đo bằng tia Cu-Ka giống Fig.5.

Phương án 29. Phương pháp bào chế dung dịch dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể theo phương án 27 thành dung dịch dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 30. Phương pháp bào chế bột dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể theo phương án 28 thành bột dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 31. Phương pháp bào chế viên nén chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể theo phương án 27 thành viên nén, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 32

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II theo phương án 1 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin II rắn theo phương án 1 trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:10:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 2,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 4ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 30 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 5°C với tốc độ bằng 1°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể được đo bằng tia Cu-Ka có các pic đặc trưng khi góc 2θ bằng 10,0°, 11,6°, 16,4°, 17,3°, 19,1°,

21,2°, 22,1°, 22,7°, 26,4°, 26,9°, 27,5° và 31,5°, và phổ nhiễu xạ tia X là như được thể hiện trên Fig.6.

Phương án 33

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II theo phương án 1 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin II rắn theo phương án 1 trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:10:0,8;
2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 9 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 10ml/phút; và tốc độ khuấy nước tinh khiết bổ sung bằng 60 vòng/phút;
3. làm mát đến nhiệt độ 15°C với tốc độ bằng 3°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.6.

Phương án 34

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II theo phương án 2 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin II rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:5:1;
2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 6ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 40 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 10°C với tốc độ bằng 2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.6.

Phương án 35

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II theo phương án 3 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin II rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:3:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; vận tốc bổ sung nước bằng 8ml/phút; và tốc độ khuấy nước tinh khiết bổ sung bằng 45 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 12°C với tốc độ bằng 2,5°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 20 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.6.

Phương án 36

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II theo phương án 3 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin II rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:6:0,8;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh

khiết bổ sung bằng 5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 7ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 60 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 12°C với tốc độ bằng 1,2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.5.

Phương án 37. Phương pháp bào chế dung dịch dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 34 thành dung dịch dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 38. Phương pháp bào chế dung dịch dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 33 thành dung dịch dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 39. Phương pháp bào chế bột dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 36 thành bột dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 40. Phương pháp bào chế bột dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 35 thành bột dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 41. Phương pháp bào chế viên nén chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 36 thành viên nén, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 42. Phương pháp bào chế viên nang chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 32 thành viên nang, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 43. Phương pháp bào chế hạt chứa hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo phương án 33 thành hạt, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 44

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramycin III theo phương án 1 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramycin III rắn theo phương án 1 trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:10:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 2,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; vận tốc nước bổ sung bằng 4ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 30 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ nằm trong khoảng 5°C với tốc độ bằng 1°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể được đo bằng tia Cu-Ka có các pic đặc trưng ở góc 2 θ bằng 8,0°, 10,0°, 11,2°, 11,7°, 16,4°, 19,1°, 19,6°, 20,0°, 21,4°, 22,9°, 23,6° và 29,4°, và phổ nhiễu xạ tia X là như được thể hiện trên Fig.7.

Phương án 45

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin III theo phương án 2 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin III rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:10:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 9 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 10ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 60 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 15°C với tốc độ bằng 3°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.7.

Phương án 46

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin III theo phương án 2 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin III rắn trong dung môi hỗn hợp của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:5:0,8;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 6ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 40 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 10°C với tốc độ bằng 2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể đo

được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.7.

Phương án 47

Xử lý tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin III thu được theo phương án 3 thành dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể:

1. trước hết hòa tan levoisovalerylspiramyxin III rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích bằng 1:2:1;

2. sau đó bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, và thể tích nước tinh khiết bổ sung bằng 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; tốc độ bổ sung nước bằng 8ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết bằng 45 vòng/phút;

3. làm mát đến nhiệt độ 12°C với tốc độ bằng 2,5°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy với tốc độ bằng 20 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-Ka là giống Fig.7.

Phương án 48. Phương pháp bào chế dung dịch dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể theo phương án 44 thành dung dịch dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 49. Phương pháp bào chế bột dùng để tiêm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể theo phương án 45 thành bột dùng để tiêm, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 50. Phương pháp bào chế viên nén chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể theo phương án 46

thành viên nén, theo phương pháp bào chế như trên.

Phương án 51. Phương pháp bào chế viên nang chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Bào chế hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể theo phương án 47 thành viên nang, theo phương pháp bào chế như trên.

Thử nghiệm 1. Thử nghiệm độc tính cấp của levoisovalerylspiramyxin I, II và III

1. Phương pháp thử nghiệm:

Cả chuột nhắt và chuột to được cho dùng thuốc qua đường miệng (levoisovalerylspiramyxin I, II và III thu được theo phương án 1)

Sau khi quan sát chuột nhắt và chuột to trong hai ngày trước khi thử nghiệm, thử nghiệm được tiến hành đối với các con chuột không có các biểu hiện bất thường. Các con chuột nhắt và chuột to này không được ăn gì trong cả đêm trước khi thử nghiệm. Theo kết quả dự đoán, lần lượt cho chuột nhắt và chuột to dùng 4000mg/kg thuốc thử nghiệm qua đường trong dạ dày, mà không con chuột nào chết. Trong thử nghiệm này, thuốc được dùng cho chuột nhắt và chuột to lần lượt là 4000mg/kg, trong đó, chuột nhắt được cho dùng tiếp liều 100mg/ml, với dung tích dùng trong dạ dày nằm trong khoảng từ 0,6ml/lần đến 0,8ml/lần, trong khi chuột to được cho dùng tiếp liều 173mg/ml, với dung tích dùng trong dạ dày nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,0ml/50g. Quan sát các con chuột dùng thuốc này trong một tuần về phản ứng độc tính và tỷ lệ chết.

II. Xem Bảng 1 và 2 về kết quả thử nghiệm

Bảng 1. Độc tính cấp của thuốc thử nghiệm trên chuột nhắt bằng cách dùng qua đường miệng (LD₅₀)

Thuốc thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	Số lượng	Số bị chết	Tỷ lệ tử vong (%)	LD ₅₀ (mg/kg)
Levoisovalerylspiramyxin I	4000	20	7	35	>4000
Levoisovalerylspiramyxin II	4000	20	7	35	>4000
Levoisovalerylspiramyxin III	4000	20	7	35	>4000

Bảng 2. Độc tính cấp của thuốc thử nghiệm trên chuột to bằng cách dùng qua đường miệng (LD₅₀)

Thuốc thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	Số lượng	Số bị chết	Tỷ lệ tử vong (%)	LD50 (mg/kg)
Levoisovalerylspiramyxin I	4500	20	3	15	>4500
Levoisovalerylspiramyxin II	4500	20	3	15	>4500
Levoisovalerylspiramyxin III	4500	20	3	15	>4500

Các thử nghiệm tương tự đã được tiến hành với levoisovalerylspiramyxin I, II và III hoặc các chế phẩm levoisovalerylspiramyxin I, II, III thu được theo các phương án khác của sáng chế, và kết quả thu được là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 2: Tác dụng *in vivo* của levoisovalerylspiramyxin I và dạng tinh thể của nó

Phương pháp thử nghiệm: điều chế dung dịch vi khuẩn gây nhiễm: lấy dung dịch vi khuẩn thử nghiệm được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ -80°C ra và để ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ, sau đó cấy *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus* sinh mủ và *Enterococcus*, cho hấp thụ 0,1ml dung dịch vi khuẩn lần lượt vào 2ml nước canh MH (bổ sung 10% huyết thanh ngựa đã bất hoạt), và cấy 0,1ml dung dịch vi khuẩn *Staphylococcus aureus* vào 2ml nước canh MH theo cùng phương pháp như trên; cho nó vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C để nuôi cấy trong 18 giờ, để thu được dung dịch vi khuẩn gốc; pha loãng dung dịch vi khuẩn gốc này với 5% dịch nhầy của dạ dày để làm cho các con chuột bị nhiễm 100% vi khuẩn gây chết, để thu được dung dịch vi khuẩn gây nhiễm.

Đường dùng lâm sàng của carimyxin được đề xuất là dùng qua đường miệng, do vậy việc dùng trong dạ dày được áp dụng trong thử nghiệm carimyxin. Cho các con chuột dùng levoisovalerylspiramyxin I (thu được theo phương án 1) và hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể (thu được theo phương án 27) bằng cách tiêm bắp.

Sau khi dùng 0,5ml liều gây chết cho chuột nhất bằng cách tiêm trong màng bụng; các con chuột này có các triệu chứng như giảm hoạt động đáng kể, nghỉ ngơi và rụng lông

v.v.. Sau khi các con chuột được gây nhiễm, lần lượt cho mỗi con chuột dùng 0,2ml bằng cách dùng trong dạ dày vào thời điểm từ 0,5 đến 6 giờ, và chúng không có phản ứng bất lợi. Quan sát số lượng con chuột chết trong 7 ngày, và tính 50% liều hữu hiệu (ED₅₀) của mỗi loại thuốc đối với các con chuột bị nhiễm bệnh và so sánh tác dụng bảo vệ của thuốc bằng chương trình Bliss.

Kết quả của thử nghiệm *in vivo*:

Bảng 3: So sánh tác dụng chữa bệnh của 5 loại thuốc kháng sinh trên chuột bị nhiễm 6 chủng Streptococci ở bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₃	6,4×10 ⁴	isovalerylspiramyxin I	0,12	9,73
		isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể	0,12	8,39
		carimyxin	0,12	10,41
		azithromyxin	0,12	18,29
		axetyl spiramyxin	0,5	66,96
		erythroxin	1	85,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₁₈	9,6×10 ⁴	isovalerylspiramyxin I	0,03	9,51
		isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể	0,03	8,65
		carimyxin	0,03	10,06
		azithromyxin	0,06	14,87
		axetyl spiramyxin	0,06	37,93
		erythroxin	0,06	57,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₅₇	8,8×10 ⁴	isovalerylspiramyxin I	0,06	13,86
		isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể	0,06	12,82
		carimyxin	0,12	16,02
		azithromyxin	0,12	19,02
		axetyl spiramyxin	1	398,01
		erythroxin	0,25	102,33
Streptococcus sinh mủ ₇₇₂	6,9×10 ³	isovalerylspiramyxin I	0,06	26,15
		isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể	0,06	23,37
		carimyxin	0,12	26,30
		azithromyxin	0,25	46,89
		axetyl spiramyxin	0,25	98,11
		erythroxin	0,5	101,33
Streptococcus sinh mủ ₁₀₂	7,8×10 ⁴	isovalerylspiramyxin I	0,12	66,40
		isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể	0,12	60,99
		carimyxin	0,25	87,84
		azithromyxin	0,5	159,06
		axetyl spiramyxin	0,5	227,07
		erythroxin	0,5	361,01

Streptococcus sinh mủ ₁₁₉	4,9×10 ⁴	isovalerylspiramycin I	0,12	57,25
		isovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể	0,12	54,58
		carimycin	0,25	68,48
		azithromycin	0,25	68,48
		axetyl spiramycin	0,5	117,53
		erythroxin	0,5	233,72

Bảng 4: So sánh tác dụng chữa bệnh của 5 thuốc kháng sinh trên chuột bị nhiễm

Enterococcus và *Staphylococcus aureus* ở bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
Enterococcus ₃₂	5,4×10 ⁴	isovalerylspiramycin I	0,5	77,55
		isovalerylspiramycin I dạng tinh thể	0,5	62,11
		carimycin	0,5	89,29
		azithromycin	1	146,51
		axetyl spiramycin	1	130,34
		erythroxin	2	175,23
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₆	5,2×10 ³	isovalerylspiramycin I	0,5	23,54
		isovalerylspiramycin I dạng tinh thể	0,5	21,33
		carimycin	0,5	31,98
		azithromycin	0,5	31,98
		axetyl spiramycin	1	43,58
		erythroxin	1	82,36
<i>Staphylococcus aureus</i> ₇₆	5,8×10 ⁴	isovalerylspiramycin I	0,5	24,40
		isovalerylspiramycin I dạng tinh thể	0,5	22,26
		carimycin	0,5	31,50
		azithromycin	1	58,79
		axetyl spiramycin	1	66,63
		erythroxin	1	64,17
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₂	4,8×10 ⁴	isovalerylspiramycin I	1	110,24
		isovalerylspiramycin I dạng tinh thể	1	107,46
		carimycin	2	120,35
		azithromycin	2	120,35
		axetyl spiramycin	2048	>500
		erythroxin	256	266,11
<i>Staphylococcus aureus</i> ₂₁	4,2×10 ⁴	isovalerylspiramycin I	0,5	42,67
		isovalerylspiramycin I dạng tinh thể	0,5	38,00
		carimycin	1	59,30
		azithromycin	4	142,99
		axetyl spiramycin	2048	>500
		erythroxin	4	213,67

Kết quả của thử nghiệm *in vivo*:

Xem Bảng 3 và Bảng 4 về tác dụng chữa bệnh của isovalerylspiramyxin I trên chuột bị nhiễm 12 chủng vi khuẩn, cho thấy tác dụng bảo vệ tốt; và hợp chất isovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể thể hiện tác dụng bảo vệ tốt hơn trên chuột bị nhiễm 12 chủng vi khuẩn.

Thử nghiệm tương tự được tiến hành với levoisovalerylspiramyxin I và levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể thu được theo các phương án khác của sáng chế hoặc chế phẩm chứa levoisovalerylspiramyxin I hoặc dạng tinh thể của nó, kết quả thu được là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 3: Tác dụng *in vivo* của levoisovalerylspiramyxin II và hợp chất ở dạng tinh thể của nó

Sử dụng hợp chất levoisovalerylspiramyxin II thu được theo phương án 1 và hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể thu được theo phương án 36, và phương pháp thử nghiệm giống như phương pháp được nêu trong ví dụ thử nghiệm 2.

Xem Bảng 5 và Bảng 6 về kết quả của thử nghiệm *in vivo*:

Bảng 5: So sánh tác dụng chữa bệnh của 5 thuốc kháng sinh trên chuột bị nhiễm 6 chủng Streptococci ở bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/ con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₃	6,4×10 ⁴	isovalerylspiramyxin II	0,12	8,99
		isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể	0,12	7,69
		carimyxin	0,12	10,41
		azithromyxin	0,12	18,29
		axetyl spiramyxin	0,5	66,96
		erythroxin	1	85,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₁₈	9,6×10 ⁴	isovalerylspiramyxin II	0,03	8,98
		isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể	0,03	8,09
		carimyxin	0,03	10,06
		azithromyxin	0,06	14,87
		axetyl spiramyxin	0,06	37,93
		erythroxin	0,06	57,08

<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₅₇	$8,8 \times 10^4$	isovalerylspiramycin II	0,06	13,10
		isovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể	0,06	12,04
		carimycin	0,12	16,02
		azithromycin	0,12	19,02
		axetyl spiramycin	1	398,01
		erythroxin	0,25	102,33
Streptococcus sinh mủ ₇₇₂	$6,9 \times 10^3$	isovalerylspiramycin II	0,06	24,61
		isovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể	0,06	21,90
		carimycin	0,12	26,30
		azithromycin	0,25	46,89
		axetyl spiramycin	0,25	98,11
		erythroxin	0,5	101,33
Streptococcus sinh mủ ₁₀₂	$7,8 \times 10^4$	isovalerylspiramycin II	0,12	63,21
		isovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể	0,12	58,00
		carimycin	0,25	87,84
		azithromycin	0,5	159,06
		axetyl spiramycin	0,5	227,07
		erythroxin	0,5	361,01
Streptococcus sinh mủ ₁₁₉	$4,9 \times 10^4$	isovalerylspiramycin II	0,12	52,77
		isovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể	0,12	49,94
		carimycin	0,25	68,48
		azithromycin	0,25	68,48
		axetyl spiramycin	0,5	117,53
		erythroxin	0,5	233,72

Bảng 6: So sánh tác dụng chữa bệnh của 5 thuốc kháng sinh trên chuột bị nhiễm

Enterococcus và *Staphylococcus aureus* ở bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
Enterococcus ₃₂	$5,4 \times 10^4$	isovalerylspiramycin II	0,25	70,16
		isovalerylspiramycin II dạng tinh thể	0,25	56,16
		carimycin	0,5	89,29
		azithromycin	1	146,51
		axetyl spiramycin	1	130,34
		erythroxin	2	175,23
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₆	$5,2 \times 10^3$	isovalerylspiramycin II	0,25	20,87
		isovalerylspiramycin II dạng tinh thể	0,25	16,18
		carimycin	0,5	31,98
		azithromycin	0,5	31,98
		axetyl spiramycin	1	43,58
		erythroxin	1	82,36

<i>Staphylococcus aureus</i> ₇₆	$5,8 \times 10^4$	isovalerylspiramyxin II	0,25	22,26
		isovalerylspiramyxin II dạng tinh thể	0,25	18,71
		carimyxin	0,5	31,50
		azithromyxin	1	58,79
		axetyl spiramyxin	1	66,63
		erythroxin	1	64,17
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₂	$4,8 \times 10^4$	isovalerylspiramyxin II	1	108,04
		isovalerylspiramyxin II dạng tinh thể	1	104,67
		carimyxin	2	120,35
		azithromyxin	2	120,35
		axetyl spiramyxin	2048	>500
		erythroxin	256	266,11
<i>Staphylococcus aureus</i> ₂₁	$4,2 \times 10^4$	isovalerylspiramyxin II	0,5	38,90
		isovalerylspiramyxin II dạng tinh thể	0,5	36,09
		carimyxin	1	59,30
		azithromyxin	4	142,99
		axetyl spiramyxin	2048	>500
		erythroxin	4	213,67

Kết quả của thử nghiệm *in vivo*:

Xem Bảng 13 và Bảng 14 về tác dụng chữa bệnh của hợp chất isovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể trên chuột bị nhiễm 12 chủng vi khuẩn, cho thấy tác dụng bảo vệ tốt, tác dụng tốt hơn hợp chất của isovalerylspiramyxin II.

Thử nghiệm tương tự được tiến hành với hợp chất levoisovalerylspiramyxinI II ở dạng tinh thể và chế phẩm chứa chúng thu được theo các phương án khác của sáng chế, kết quả thu được là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 4: Tác dụng *in vivo* của levoisovalerylspiramyxin III và hợp chất ở dạng tinh thể của nó

Sử dụng hợp chất levoisovalerylspiramyxin III theo phương án 1 và hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể theo phương án 45, và phương pháp thử nghiệm giống như phương pháp được nêu trong ví dụ thử nghiệm 2.

Xem Bảng 7 và Bảng 8 về kết quả của thử nghiệm *in vivo*:

Bảng 7: So sánh tác dụng chữa bệnh của 5 thuốc kháng sinh trên chuột bị nhiễm 6 chủng *Streptococci* ở bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₃	6,4×10 ⁴	isovalerylspiramycin III	0,12	8,99
		isovalerylspiramycin III dạng tinh thể	0,12	6,45
		carimycin	0,12	10,41
		azithromycin	0,12	18,29
		axetyl spiramycin	0,5	66,96
		erythroxin	1	85,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₁₈	9,6×10 ⁴	isovalerylspiramycin III	0,03	8,98
		isovalerylspiramycin III dạng tinh thể	0,03	8,68
		carimycin	0,03	10,06
		azithromycin	0,06	14,87
		axetyl spiramycin	0,06	37,93
		erythroxin	0,06	57,08
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ₅₇	8,8×10 ⁴	isovalerylspiramycin II	0,06	13,10
		isovalerylspiramycin II dạng tinh thể	0,06	11,08
		carimycin	0,12	16,02
		azithromycin	0,12	19,02
		axetyl spiramycin	1	398,01
		erythroxin	0,25	102,33
Streptococcus sinh mủ ₇₇₂	6,9×10 ³	isovalerylspiramycin III	0,06	24,61
		isovalerylspiramycin III dạng tinh thể	0,06	22,81
		carimycin	0,12	26,30
		azithromycin	0,25	46,89
		axetyl spiramycin	0,25	98,11
		erythroxin	0,5	101,33
Streptococcus sinh mủ ₁₀₂	7,8×10 ⁴	isovalerylspiramycin III	0,12	63,21
		isovalerylspiramycin III dạng tinh thể	0,12	52,91
		carimycin	0,25	87,84
		azithromycin	0,5	159,06
		axetyl spiramycin	0,5	227,07
		erythroxin	0,5	361,01
Streptococcus sinh mủ ₁₁₉	4,9×10 ⁴	isovalerylspiramycin III	0,12	52,77
		isovalerylspiramycin III dạng tinh thể	0,12	49,94
		carimycin	0,25	68,48
		azithromycin	0,25	68,48
		axetyl spiramycin	0,5	117,53
		erythroxin	0,5	233,72

Bảng 8: So sánh tác dụng chữa bệnh của 5 thuốc kháng sinh trên chuột bị nhiễm *Enterococcus* và *Staphylococcus aureus* ở bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/ con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
Enterococcus ₃₂	5,4×10 ⁴	isovalerylspiramyxin III	0,25	70,16
		isovalerylspiramyxin III dạng tinh thể	0,25	65,89
		carimyxin	0,5	89,29
		azithromyxin	1	146,51
		axetyl spiramyxin	1	130,34
		erythroxin	2	175,23
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₆	5,2×10 ³	isovalerylspiramyxin III	0,25	20,87
		isovalerylspiramyxin III dạng tinh thể	0,25	19,29
		carimyxin	0,5	31,98
		azithromyxin	0,5	31,98
		axetyl spiramyxin	1	43,58
		erythroxin	1	82,36
<i>Staphylococcus aureus</i> ₇₆	5,8×10 ⁴	isovalerylspiramyxin III	0,25	22,26
		isovalerylspiramyxin III dạng tinh thể	0,25	18,71
		carimyxin	0,5	31,50
		azithromyxin	1	58,79
		axetyl spiramyxin	1	66,63
		erythroxin	1	64,17
<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₂	4,8×10 ⁴	isovalerylspiramyxin III	1	108,04
		isovalerylspiramyxin III dạng tinh thể	1	105,24
		carimyxin	2	120,35
		azithromyxin	2	120,35
		axetyl spiramyxin	2048	>500
		erythroxin	256	266,11
<i>Staphylococcus aureus</i> ₂₁	4,2×10 ⁴	isovalerylspiramyxin III	0,5	38,90
		isovalerylspiramyxin III dạng tinh thể	0,5	36,09
		carimyxin	1	59,30
		azithromyxin	4	142,99
		axetyl spiramyxin	2048	>500
		erythroxin	4	213,67

Kết quả của thử nghiệm *in vivo*:

Xem Bảng 7 và Bảng 8 về tác dụng chữa bệnh của hợp chất isovalerylspiramyxin III ở dạng dạng tinh thể trên chuột bị nhiễm 12 chủng vi khuẩn, cho thấy tác dụng bảo vệ tốt, tác dụng tốt hơn hợp chất của isovalerylspiramyxin III.

Thử nghiệm tương tự được tiến hành với hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể hoặc chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể thu được theo các phương án khác của sáng chế, kết quả thu được là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 5. Thử nghiệm dược lực học *in vitro*:

I. Xác định các thể phân lập từ lâm sàng:

Phương pháp thử nghiệm: phương pháp pha loãng gấp đôi aga: rót môi trường aga nóng chảy theo định lượng vào đĩa chứa các nồng độ thuốc tuân tự để trộn với dung dịch thuốc (bổ sung 5% máu cừu đã tách fibrin vào Streptococcus và Enterococcus để thu được môi trường máu; bổ sung 7% máu cừu đã tách fibrin vào Hemophilus influenza và bổ sung 7% máu cừu đã tách fibrin vào môi trường Gonococcus để thu được môi trường sôcôla); sau khi hỗn hợp này hóa rắn, nó được pha loãng đến nồng độ 10^6 CFU/mL bằng dung dịch nuôi cấy vi khuẩn mới, sau đó được cấy bằng dụng cụ cấy đa điểm vào đĩa aga chứa chất kháng khuẩn để nuôi cấy trong thời gian 18 giờ ở 37°C ; cho Gonococcus vào tủ áp 5% CO_2 để nuôi cấy trong thời gian 24 giờ; cho Legionella vào tủ áp 5% CO_2 để nuôi cấy trong thời gian 48 giờ; cho vi khuẩn yếm khí vào hộp yếm khí để nuôi cấy trong thời gian 48 giờ ở 37°C . Quan sát nồng độ tối thiểu của thuốc kháng khuẩn để ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn, tức là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), và tính MIC_{50} và MIC_{90} của thuốc và so sánh chúng với thuốc đối chứng.

Lưu ý: MIC_{50} có nghĩa là nồng độ ức chế tối thiểu để ức chế 50% mức độ sinh trưởng của vi khuẩn;

MIC_{90} có nghĩa là nồng độ ức chế tối thiểu để ức chế 90% mức độ sinh trưởng của vi khuẩn.

Xem Bảng 9 về kết quả thử nghiệm:

Bảng 9: So sánh mức độ phân bố nhạy của các thể phân lập lâm sàng giữa isovalerylspiramycin I, II, III và các thuốc kháng sinh khác

Loại và số chủng vi khuẩn	Thuốc	Phạm vi MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC_{90} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (112)	isovalerylspiramycin I	0,005->32	0,12	2
	isovalerylspiramycin II	0,005->32	0,12	2
	isovalerylspiramycin III	0,005->64	0,12	4
	carimycin	0,005->64	0,12	4
	azithromycin	0,005->64	0,25	8
	axetyl spiramycin	0,005->64	0,12	>64
	erythroxin	0,005->64	0,25	64
Streptococcus sinh mủ (93)	isovalerylspiramycin I	0,06->32	0,25	32
	isovalerylspiramycin II	0,06->32	0,25	32
	isovalerylspiramycin III	0,06->32	0,25	32

	carimyxin	0,06->64	0,25	64
	azithromyxin	0,25->64	0,5	>64
	axetyl spiramycin	0,005->64	0,25	>64
	erythroxin	0,06->64	0,5	>64
Enterococcus (106)	isovalerylspiramycin I	0,12->32	1	32
	isovalerylspiramycin II	0,12->32	1	16
	isovalerylspiramycin III	0,12->64	2	64
	carimyxin	0,5->64	2	64
	azithromyxin	0,25->64	8	>64
	axetyl spiramycin	0,12->64	4	>64
	erythroxin	0,5->64	4	>64
<i>Staphylococcus aureus</i> (155)	isovalerylspiramycin I	0,06->64	1	64
	isovalerylspiramycin II	0,06->64	1	32
	isovalerylspiramycin III	0,06->64	2	32
	carimyxin	0,06->64	2	64
	azithromyxin	0,5->64	2	>64
	axetyl spiramycin	0,12->64	64	>64
	erythroxin	0,12->64	1	>64
<i>S. epidermidis</i> (115)	isovalerylspiramycin I	0,12->32	1	32
	isovalerylspiramycin II	0,12->64	1	64
	isovalerylspiramycin III	0,12->32	1	32
	carimyxin	0,12->64	2	>64
	azithromyxin	0,12->64	8	>64
	axetyl spiramycin	0,03->64	64	>64
	erythroxin	0,06->64	8	>64
<i>Hemophilus influenzae</i> (37)	isovalerylspiramycin I	0,03-32	0,12	1
	isovalerylspiramycin II	0,03-32	0,12	1
	isovalerylspiramycin III	0,03-32	0,12	1
	carimyxin	0,03-32	0,12	1
	azithromyxin	0,03->64	0,25	2
	axetyl spiramycin	0,03->64	0,12	4
	erythroxin	0,03->64	0,06	32
Gonococcus (10)	isovalerylspiramycin I	0,12-16	1	4
	isovalerylspiramycin II	0,12-16	1	4
	isovalerylspiramycin III	0,12-16	1	4
	carimyxin	0,12-16	2	8
	azithromyxin	0,12-64	2	8
	axetyl spiramycin	0,12-64	4	8
	erythroxin	0,12-64	1	8

II. Xác định *Chlamydia trachomatis* và *Chlamydia pneumoniae* in vitro

Phương pháp thử nghiệm:

1. Cấy chuyển lần lượt các dòng tế bào HEp-2 và McCoy trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ (Costar Company) ở môi trường có nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ để nuôi cấy trong thời gian 48 giờ, để thu được các tế bào đơn lớp.

2. Pha loãng các chủng cần cấy đến nồng độ nằm trong khoảng từ 10000 ifu đến 20000 ifu (đơn vị tạo thể vùi)/ml, 0,1 ml/lỗ để cấy. Cấy *Chlamydia trachomatis* kiểu huyết thanh B/TW-5/OT và D/UW-3/Cx trên đĩa nuôi cấy tế bào McCoy và *Chlamydia pneumoniae* CWL-029 trên đĩa nuôi cấy tế bào HEp-2. Trước hết, hút dung dịch nuôi cấy tế bào trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ, và cấy theo tiêu chuẩn 0,1ml/lỗ. Trong đó, 4 lỗ A11-D11 và 2 lỗ C12 và D12 không được cấy.

3. Sau khi cấy, sử dụng máy ly tâm J-6MC của Beckman-Coulter Company để ly tâm đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ với lực ly tâm $\times 1500g$, nhiệt độ ly tâm 35°C và thời gian ly tâm 60 phút.

4. Sau khi ly tâm, hút *Chlamydia trachomatis* hoặc *Chlamydia pneumoniae* đã cấy, và lần lượt bổ sung 4 loại thuốc kháng sinh được pha loãng tuần tự, 0,1ml/lỗ.

5. Nuôi cấy trên đĩa thử nghiệm nhạy thuốc chứa *Chlamydia trachomatis* trong thời gian 48 giờ và đĩa thử nghiệm nhạy thuốc chứa *Chlamydia pneumoniae* trong thời gian 72 giờ trong môi trường có nhiệt độ 37°C và 5%CO₂. Sau khi nuôi cấy, hút dung dịch thuốc kháng sinh, rửa 2 lần bằng PBS (0,01M, độ pH=7,4), và giữ trong 100% rượu metylic trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng.

6. Nhận diện theo kỹ thuật nhuộm màu miễn dịch huỳnh quang gián tiếp: lần lượt bổ sung kháng thể đơn dòng *Chlamydia trachomatis* (dòng vô tính N54) và kháng thể đơn dòng *Chlamydia pneumoniae* (dòng vô tính P33) đã tinh chế vào các đĩa thử nghiệm nhạy thuốc chứa *Chlamydia trachomatis* và *Chlamydia pneumoniae*, 50µl/lỗ; ủ trong thời gian 30 phút trong hộp ươm ở nhiệt độ 37°C; sau đó, sử dụng thiết bị rửa đĩa để rửa các đĩa này 4 lần, sau đó bổ sung các kháng thể huỳnh quang kháng chuột của thỏ (do Sigma Company cung cấp), 50µl/lỗ; ủ và rửa theo cách tương tự trong cùng điều kiện. Bổ sung glyxerol cố định, 100µl/lỗ; cuối cùng, quan sát kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang đảo ngược Nikon (Diaphot-200).

7. Xác định MIC: Đây là nồng độ thuốc kháng sinh được pha loãng tối thiểu có thể

làm dừng hoàn toàn quá trình sinh trưởng của thể vùi *Chlamidia trachomatis* hoặc *Chlamidia pneumoniae* trong đĩa thử nghiệm 96 lỗ (Không phát hiện được thể vùi nhuộm màu huỳnh quang trong các lỗ).

Bảng 10: So sánh MIC của 5 loại thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn đối với *Chlamydia trachomatis* và *Chlamydia pneumoniae* theo tác dụng *in vitro*

	Levoisovalerylspiramycin I (Phương án 1)	Levoisovalerylspiramycin II (Phương án 1)	Levoisovalerylspiramycin III (Phương án 1)	Carimyxin	Axetyl Spiramycin (AT-SPM)	Erythroxin (EM)	Azithromycin (AM)
<i>Chlamydia trachomatis</i> B/TW-5/OT	0,25µg/ml	0,25µg/ml	0,25µg/ml	0,25µg/ml	4µg/ml	0,5µg/ml	0,5µg/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/Cx	0,25µg/ml	0,25µg/ml	0,25µg/ml	0,25µg/ml	2µg/ml	0,5µg/ml	0,25µg/ml
<i>Chlamydia pneumoniae</i> CWL-029	0,016µg/ml	0,016µg/ml	0,016µg/ml	0,016µg/ml	0,5µg/ml	≤0,016µg/ml	0,032µg/ml

1. Đối với *Chlamydia trachomatis* kiểu huyết thanh B/TW-5/OT, Levoisovalerylspiramycin I, II và III tốt hơn Carimyxin, Erythroxin và Azithromycin về tác dụng *in vitro*, và Axetyl Spiramycin (MIC bằng 4µg/ml) là tương đối kém.

2. Đối với *Chlamydia trachomatis* kiểu huyết thanh D/UW-3/Cx, Levoisovalerylspiramycin I, II và III là tương tự như Carimyxin và Azithromycin về tác dụng *in vitro*, với MIC bằng 0,25µg/ml, là tương đối nhạy; kém hơn chút là Erythroxin (0,5µg/ml); và Axetyl Spiramycin (MIC bằng 2µg/ml) là tương đối kém;

3. Đối với *Chlamydia pneumoniae* CWL-029, Levoisovalerylspiramycin II và Erythroxin là nhạy nhất về tác dụng *in vitro*, với MIC ≤ 0,016µg/ml; Azithromycin, Carimyxin, Levoisovalerylspiramycin I và III là tương đối nhạy; Axetyl Spiramycin (MIC bằng 0,5µg/ml) là tương đối kém.

4. Nói chung, tác dụng của Levoisovalerylspiramycin đối với *Chlamydia* tốt hơn các thuốc thử nghiệm khác.

III. *Mycoplasma urealyticum* và *Mycoplasma pneumoniae in vitro*

1. Các phương pháp thử nghiệm: bổ sung 0,8ml U-PPLO vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy

tế bào 12 lỗ vô trùng (bổ sung 0,9ml vào lỗ đối chứng chứa chủng vi sinh vật và 1,0ml vào lỗ đối chứng chứa môi trường).

2. Bổ sung 0,1 ml giống cấy Uu với mật độ 10^4 CCU/ml vào mỗi lỗ thử nghiệm. Liều lượng cuối cùng trong lỗ bằng 10^3 CCU/ml (lỗ đối chứng chứa môi trường sẽ không được bổ sung giống cấy).

3. Chia thành 3 nhóm (dung dịch gốc thuốc kháng sinh có nồng độ 100µg/ml, 10µg/ml và 1µg/ml), sử dụng đầu bít vô trùng để bổ sung thuốc kháng sinh thử nghiệm vào mỗi lỗ: 100µl, 50µl, 25µl, 12,5µl theo gradien nồng độ giảm dần hai lần. (Lỗ đối chứng chứa giống cấy và lỗ đối chứng chứa môi trường sẽ không được bổ sung thuốc kháng sinh, và trong khi đó lỗ đối chứng chứa thuốc kháng sinh được chuẩn bị).

4. Trộn đều tất cả các lỗ. Bịt kín đĩa nuôi cấy bằng băng dính và cho nó vào hộp có nhiệt độ 37°C để nuôi cấy.

5. Vào thời điểm từ 17 đến 24 giờ sau khi thử nghiệm, quan sát và ghi mức độ sinh trưởng của Uu. Khi lỗ đối chứng chứa giống cấy Uu xuất hiện sự sinh trưởng rõ ràng, thì nồng độ thuốc kháng sinh tối thiểu, mà có thể triệt tiêu sự phát triển của Uu, là MIC của mẫu. MIC sau khi thử nghiệm là MIC cuối cùng (24 giờ).

Xác định MIC của các chủng *Mycoplasma urealyticum* và *Mycoplasma pneumoniae* 4 lần và kết quả như sau:

MIC của Levoisovalerylspiramycin I nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,125 µg/ml.

MIC của Levoisovalerylspiramycin II nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,125 µg/ml.

MIC của Levoisovalerylspiramycin III nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,125 µg/ml.

MIC của Carimycin nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,125 µg/ml.

MIC của Axetyl Spiramycin bằng 0,5µg/ml.

MIC của Erythroxin bằng 5µg/ml.

MIC của Azithromycin nằm trong khoảng từ 0,025 đến 0,125µg/ml.

Kết quả nêu trên chỉ ra rằng Levoisovalerylspiramycin I, II, III và Carimycin có tác dụng kháng Uu thuận lợi, tương tự tác dụng của Azithromycin, tốt hơn Axetyl Spiramycin,

và tác dụng của Erythroxin là kém nhất trong tất cả các mẫu.

Thử nghiệm này được tiến hành với Levoisovalerylspiramycin I, II, III theo các phương án khác của sáng chế hoặc chế phẩm chứa Levoisovalerylspiramycin I, II, III, kết quả thu được là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 4. Thử nghiệm lâm sàng Levoisovalerylspiramycin I, II và III

Hiệu quả và độ an toàn của Levoisovalerylspiramycin I, II và III (thu được theo Phương án 1) và Azithromycin trong việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp cấp tính ở người lớn do vi khuẩn nhạy cảm gây ra, bao gồm bệnh viêm họng cấp tính do vi khuẩn, bệnh viêm amidan có mủ, bệnh viêm khí-phế quản cấp tính, và bệnh viêm phổi nhẹ, v.v.

Áp dụng thử nghiệm kiểm soát mô phỏng kép, mù đôi, ngẫu nhiên, đa tâm, mà được tiến hành đồng thời ở 5 bệnh viện theo chương trình thử nghiệm lâm sàng thống nhất.

I. Các tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng

1. Bệnh nhân trong độ tuổi từ 18 đến 65 tuổi (nam và nữ);
2. Bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp cấp tính nhạy cảm do vi khuẩn nhạy cảm gây ra bao gồm viêm họng cấp tính do vi khuẩn, bệnh viêm amidan có mủ cấp, bệnh viêm khí-phế quản cấp tính, bệnh viêm phổi nhẹ và bệnh viêm xoang cấp tính v.v.;
3. Tất cả các đối tượng đều phải ký giấy chấp thuận như đã thông báo trước khi được chọn.
4. Tất cả các đối tượng phải tránh thụ thai trong giai đoạn nghiên cứu và trong vòng ít nhất 3 tháng sau khi dùng liều.

II. Các tiêu chuẩn loại trừ đối tượng

1. Các đối tượng suy gan hoặc thận (nồng độ Cr trong máu > 1,5mg/dl và chỉ số ALT > giới hạn trên thông thường)
2. Phụ nữ đang trong giai đoạn mang thai hoặc cho con bú
3. Các đối tượng mắc các bệnh về dải dạ dày ruột, không thể dùng thuốc qua đường miệng.

4. Các đối tượng dùng thuốc kháng khuẩn trong một tuần trước khi được chọn.

5. Nghiện rượu trong thời gian dài.

Theo thống kê về kết quả thử nghiệm của các chuyên gia thống kê, hiệu quả lâm sàng (FAS) là như sau:

Tác dụng của Levoisovalerylspiramycin I, II, III và Azithromycin lần lượt là 92,30%, 92,30%, 92,30% và 89,61%.

Tỷ lệ thanh thải mầm bệnh:

Tỷ lệ thanh thải mầm bệnh của Levoisovalerylspiramycin I, II, III và Azithromycin lần lượt là 97,56%, 97,56%, 97,56% và 92,86%.

Phản ứng bất lợi:

Phản ứng bất lợi của Levoisovalerylspiramycin I, II, III và Azithromycin lần lượt là 2,5%, 2,5%, 2,5% và 7,6%.

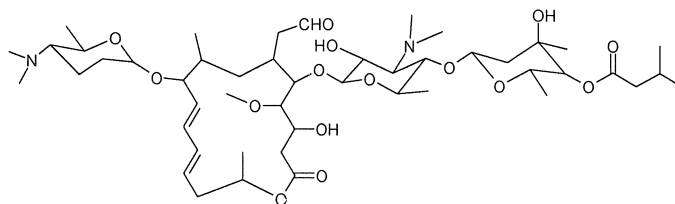
Thử nghiệm lâm sàng chỉ ra rằng Levoisovalerylspiramycin I, II, III là thuốc chống nhiễm khuẩn an toàn và hữu hiệu.

Thử nghiệm tương tự được tiến hành với Levoisovalerylspiramycin I, II, III thu được theo các phương án của sáng chế hoặc chế phẩm chứa Levoisovalerylspiramycin I, II, III, kết quả thu được là tương tự.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất levoisovalerylspiramyxin I, trong đó:

công thức cấu tạo hóa học của hợp chất levoisovalerylspiramyxin I được thể hiện theo công thức (I), ở điều kiện cloroform là dung môi, nhiệt độ 25°C, và nồng độ 0,02g/ml, độ quay quang riêng đo được $[\alpha]_D$ nằm trong khoảng từ -49° đến -62°, và nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 116 đến 122°C;



(I),

trong đó levoisovalerylspiramyxin I là hợp chất dạng tinh thể, phổ nhiễu xạ bột tia X của nó đo được bằng tia Cu-K-alpha có các pic đặc trưng ở $2\theta = 7,6^\circ, 8,0^\circ, 10,0^\circ, 11,4^\circ, 16,4^\circ, 17,0^\circ, 17,5^\circ, 17,9^\circ, 19,5^\circ, 22,7^\circ, 23,7^\circ$ và $24,4^\circ$.

2. Hợp chất levoisovalerylspiramyxin I theo điểm 1, trong đó, ở điều kiện cloroform là dung môi, nhiệt độ 25°C, và nồng độ 0,02g/ml, độ quay quang riêng đo được $[\alpha]_D$ nằm trong khoảng từ -51° đến -58°.

3. Chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I dạng tinh thể theo điểm 1, trong đó, chế phẩm này chứa levoisovalerylspiramyxin I, muối được tính của levoisovalerylspiramyxin I, levoisovalerylspiramyxin I và chất bổ trợ dược dụng, hoặc muối được tính của levoisovalerylspiramyxin I và chất bổ trợ dược dụng, độ tinh khiết của levoisovalerylspiramyxin I lớn hơn 90% trọng lượng.

4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này chứa liều đơn vị như sau: hàm lượng của levoisovalerylspiramyxin I nằm trong khoảng từ 10 đến 1500mg.

5. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramyxin I nằm trong khoảng từ 10 đến 95%.

6. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này bao gồm dung dịch dùng để tiêm, bột dùng để tiêm hoặc bột được làm đông khô thu được bởi levoisovalerylspiramyxin I và ít

nhất một trong số axit xitric, axit adipic, axit maleic.

7. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó phần trăm trọng lượng của levoisovalerylspiramycin I nằm trong khoảng từ 75 đến 95%.

8. Phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin I theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

điều chế levocarimyxin, và tinh chế levoisovalerylspiramycin I, trong đó bước điều chế levocarimyxin bao gồm các công đoạn:

nuôi cấy và lên men sinh học các chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, và chiết dịch lên men;

thực hiện lên men ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0, các đường cong biến đổi pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, trong đó, pha đầu tiên thỏa mãn công thức $y_1 = k_1 x_1 + 6,0$, trong đó $0,0227 \leq k_1 \leq 0,1364$, $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2 = k_2 x_2 + b_2$, trong đó $-0,0735 \leq k_2 < 0$, $6,5 < b_2 \leq 10,62$, $22 \leq x_2 \leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3 = k_3 x_3 + b_3$, trong đó $0 < k_3 \leq 0,0078$, $6,06 \leq b_3 < 6,5$, $56 \leq x_3 \leq 120$;

bước tinh chế levoisovalerylspiramycin I bao gồm các công đoạn: tinh chế mẫu levocarimyxin bằng phương pháp sắc ký, thực hiện việc rửa giải gradien và tách pic mục tiêu thành phần của levoisovalerylspiramycin I nhờ cột sắc ký ODS trong dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat;

trong bước tinh chế levoisovalerylspiramycin I, loại bỏ axetonitril trong levoisovalerylspiramycin I đã gom bằng phương pháp làm bay hơi kiểu quay, sau đó sử dụng etyl axetat để chiết, loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết bằng cách làm bay hơi để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu bằng ete dầu mỏ, loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi để thu được tương ứng bột levoisovalerylspiramycin I màu trắng;

trong đó phương pháp điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể bao gồm các bước: hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin I rắn trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, bổ sung nước tinh khiết và đồng thời khuấy hỗn hợp, làm mát đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C sau khi bổ sung nước tinh khiết, tiếp tục khuấy trong khi làm mát, sau đó thu được hợp chất

levoisovalerylspiramycin I dạng tinh thể, trong đó, tỷ lệ thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp là 1:0,1 đến 10: 0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó công đoạn nuôi cấy của phương pháp điều chế levocarimycin là:

nuôi cấy các chủng nấm đã tách dòng WSP-195 tạo ra khi có spiramycin, chứa gen 4"- isovaleryl transferaza, trên môi trường nuôi cấy aga nghiêng chứa 2% bột đậu tương, 1% glucoza, 3% tinh bột, 0,5% CaCO_3 , 0,4% NaCl và 2% aga trong thời gian từ 8 đến 15 ngày ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 38°C, sau đó cấy sang môi trường giữ giống chứa 1,5% bột đậu tương, 3,0% tinh bột, 0,4% NaCl , 0,5% CaCO_3 , 0,3% pepton cá và 0,05% KH_2PO_4 và nuôi cấy trong thời gian từ 40 đến 80 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 30°C, cấy chuyển vào môi trường lên men chứa 0,5% glucoza, 6,0% tinh bột, 0,5% bột nấm men, 2,0% bột cá, 0,6% NH_4NO_3 , 1,0% NaCl , 0,5% CaCO_3 , 0,05% KH_2PO_4 , 0,1% MgSO_4 , 0,5% dầu đậu nành và 0,02% chất khử bọt và nuôi cấy trong thời gian từ 72 đến 120 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26 đến 30°C, lượng cấy nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20%, để thu được dịch lên men.

10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó công đoạn chiết dịch lên men sinh học bao gồm:

xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH của dịch lọc đến khoảng từ 8,5 đến 9,0, sử dụng butyl axetat để chiết, làm sạch chất chiết butyl axetat bằng dung dịch không phải nước muối và NaH_2PO_4 1%, sau đó sử dụng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,5 để chiết để thu được dịch chiết chứa nước, điều chỉnh độ pH đến khoảng từ 4,5 đến 5,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết chứa nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến khoảng từ 8,5 đến 9,0, kết tủa dịch lọc và rửa bằng nước tinh khiết để thu được sản phẩm ướt, và làm khô nó để thu được levocarrimycin.

11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó trong bước tinh chế levoisovalerylspiramycin I, thực hiện việc ghi biểu đồ phổ UV của levoisovalerylspiramycin I thông qua sắc ký lỏng hiệu suất cao điều chế và phát hiện tia UV, và gom mẫu levoisovalerylspiramycin I dựa

vào thời gian lưu là 44,759 phút.

12. Phương pháp theo điểm 8, trong đó pha động là dung môi hỗn hợp của axetonitril A và dung dịch amoni axetat 150mM có độ pH=8,5,

điều kiện cần để tinh chế levoisovalerylspiramycin I là:

gradient tuyến tính: từ 0 đến 60 phút, A từ 25% đến 65%; và từ 61 đến 90 phút, A từ 65% đến 90%;

lưu tốc: 260 mL/phút;

kích thước mẫu: 10mL;

nồng độ mẫu: 0,5g/mL;

bước sóng đo: 231nm;

cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia UV.

13. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bột levoisovalerylspiramycin I màu trắng được làm thành dạng tinh thể, trong đó, tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

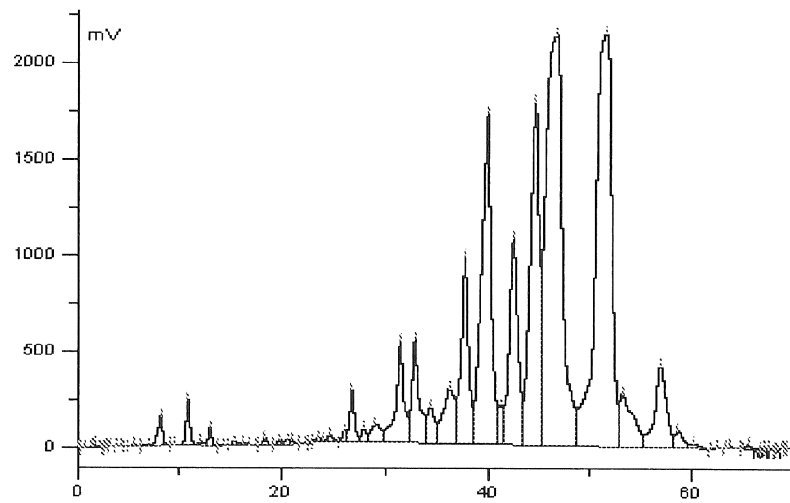


Fig. 1

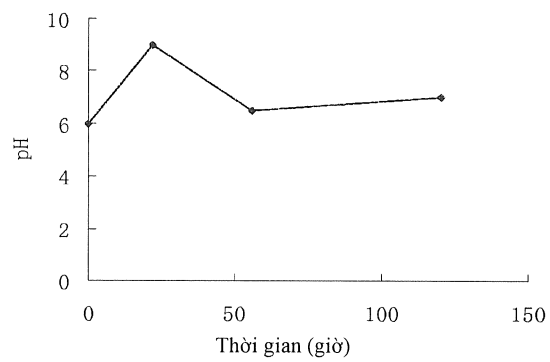


Fig. 2

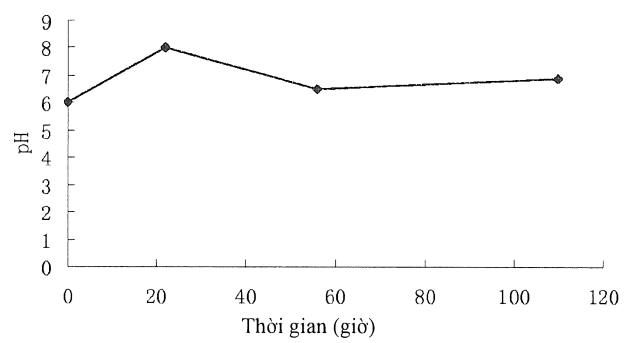


Fig. 3

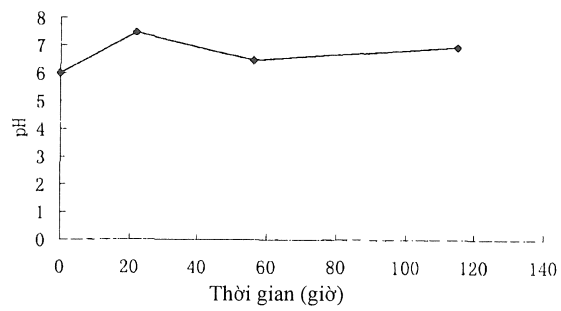


Fig. 4

Cường độ (cps)

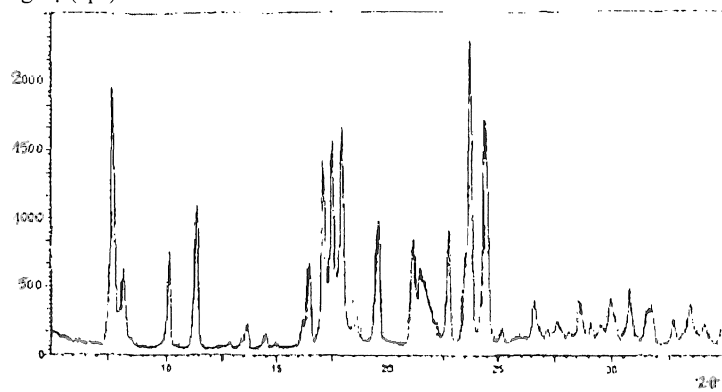


Fig. 5

Cường độ (cps)

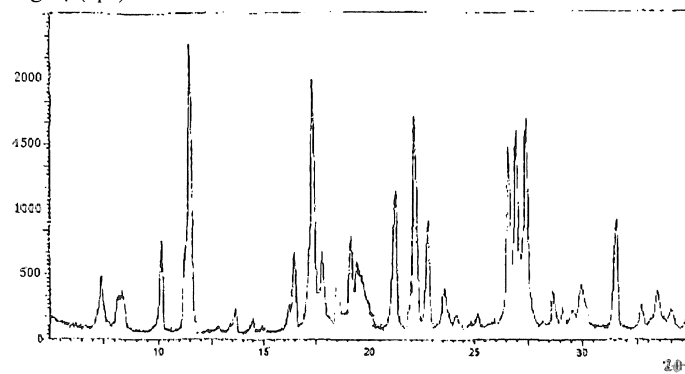


Fig. 6

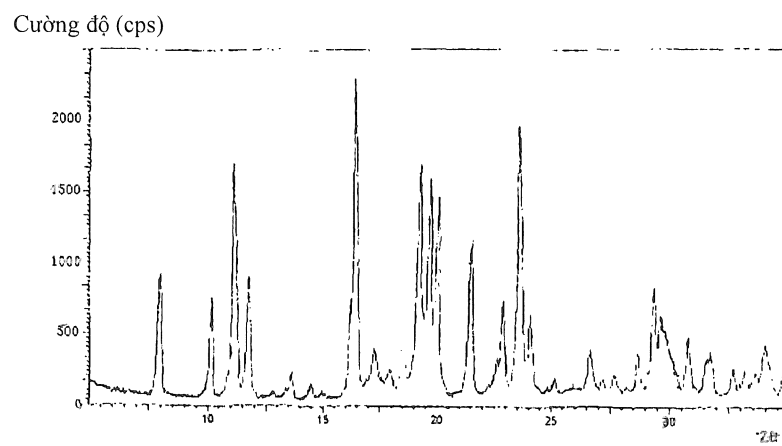


Fig. 7