



(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)



1-0025457

(51)⁷ A61K 36/28; A61K 31/366; A61K
31/385; A61K 36/42; A61K 36/18;
A61K 36/185; A61K 31/365; A61K
31/704

(13) B

(21) 1-2013-03260

(22) 10/09/2011

(86) PCT/IB2011/053962 10/09/2011

(87) WO2012/127287 27/09/2012

(30) 61/454,246 18/03/2011 US

(45) 25/09/2020 390

(43) 26/05/2014 314A

(73) FEBRIS BIO-TECH LIMITED (NZ)

Suite 405, 24 Garden Place, Hamilton, 3204, NEW ZEALAND

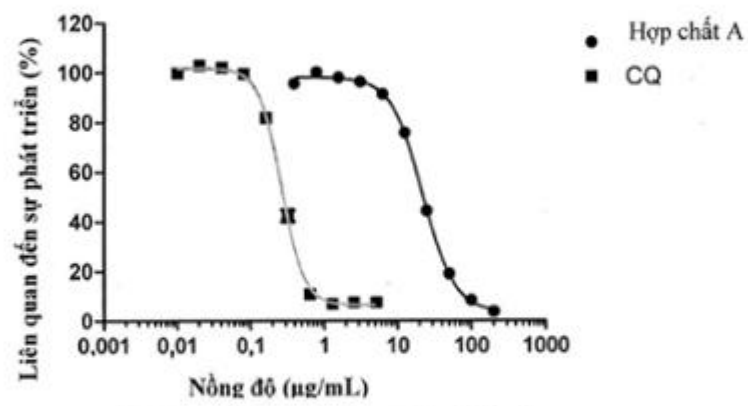
(72) SMITH, Garth Selwyn (NZ); ZHANG, Lixin (CN); DAI, Huanqin (CN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH SỐT RÉT KHÁNG ĐA THUỐC

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chất chiết từ lá cỏ ngọt Stevia có chứa steviol glycosit và chất mang có thể chấp nhận được dùng để chữa trị bệnh sốt rét. Chất chiết có hiệu lực và có hiệu quả có chứa hợp chất chống bệnh sốt rét có thể có nguồn gốc từ quả la hán và lá cỏ ngọt Stevia, kể cả hỗn hợp của chúng, dùng để điều trị và ngăn ngừa bệnh sốt rét. Chế phẩm này được dùng qua đường uống ở dạng rắn hoặc dạng lỏng.

Đường cong liều lượng – phản ứng



	Hợp chất A	CQ
IC50	22,14	0,2644

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chất chiết từ lá cỏ ngọt Stevia có chứa steviol glycosit và chất mang có thể chấp nhận được dùng để chữa trị bệnh sốt rét. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh sốt rét ở người bị nhiễm loài *Plasmodium* kháng thuốc sốt rét, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất di- hoặc tri-terpen. Chế phẩm có hiệu lực và có hiệu quả có nguồn gốc từ quả *Siraitia grosvenorii* (quả la hán - Luo Han guo) và lá cỏ ngọt Stevia (*Stevia rebaudiana*), kể cả các hỗn hợp của chúng, đã được phát hiện là có chứa lượng hữu hiệu hợp chất di- hoặc tri-terpen. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế được dùng qua đường uống ở dạng rắn hoặc dạng lỏng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh sốt rét là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm và mỗi năm có từ 350 đến 500 triệu trường hợp mắc bệnh trên thế giới. Bệnh sốt rét là mối quan tâm y tế chính ở châu Á, châu Phi, Trung Đông, và Trung và Nam Mỹ, khoảng 41% dân số của thế giới sinh sống ở các khu vực mà ở đó bệnh sốt rét lan truyền. Và còn nguy hiểm hơn nữa, ở các nước phát triển, bệnh sốt rét gây ra 11% trong tổng số các trường hợp tử vong ở trẻ em. Ví dụ, Tổ chức y tế thế giới (WHO: World Health Organization) đã báo cáo rằng trong năm 2008, bệnh sốt rét gây ra cho gần một triệu trường hợp tử vong, chủ yếu là ở trẻ em châu Phi. Ở châu Phi, cứ 45 giây lại có một trẻ em chết vì bệnh sốt rét, và căn bệnh này chiếm 20% trong tổng số các trường hợp tử vong ở trẻ em.

Những phương pháp điều trị bệnh sốt rét, chủ yếu là điều trị bằng thuốc, đã được biết. Các quinin (hoặc nhóm quinolin), ví dụ, cloquin, mefloquin, đã được biết rõ là chất điều trị. Các hỗn hợp thuốc khác cũng đã được phát triển. Điều trị hiện có tốt nhất, cụ thể là đối với bệnh sốt rét do *P. falciparum*, là điều trị bằng hỗn hợp gốc artemisinin (artemisinin-based combination therapy: "ACT"). Artemisinin có nguồn gốc từ thực vật, *Artemisia annua*, thuộc họ Asteraceae.

Không may là, hai vấn đề cơ bản đã xuất hiện trong cuộc chiến chống lại bệnh sốt rét, cụ thể là, tính kháng thuốc và giá thành thuốc cao và điều trị y tế tốn kém. Rõ ràng là có nhu cầu cấp bách về các phương pháp điều trị thay thế khác để tránh được sự phát triển của tính kháng thuốc do *Plasmodium* và giảm mạnh chi phí liên quan đến việc chữa trị bệnh sốt rét. Đây có thể là sự góp phần vào lĩnh vực dược phẩm để tạo ra chế phẩm điều trị bệnh sốt rét dễ mua và dễ sử dụng mà có thể sử dụng được ở các dạng khác nhau.

Theo số liệu của WHO, nếu tính kháng artemisinin phát triển và lan rộng đến các vùng địa lý rộng lớn khác, như đã xảy ra trước đây với cloquin và sulfacoxin-pyrimetamin (sulfacoxine-pyrimethamine: SP), hậu quả về y tế cộng đồng có thể rất khủng khiếp, vì có thể là không có thuốc điều trị bệnh sốt rét thay thế khác sẽ có thể có được trong tương lai gần.

Hơn nữa, giả thiết là nồng độ tương tự của chất chiết từ quả la hán có chứa hợp phần theo sáng chế có hiệu quả bằng nồng độ của các dẫn xuất của artemisinin, giá thành của chất chiết từ quả la hán có thể chỉ bằng một phần của chi phí cho một lần điều trị bằng artemisinin để chữa trị bệnh sốt rét. Vấn đề tương tự cũng có thể được nói về chất chiết từ lá cỏ ngọt Stevia. Mặc dù lượng lớn hơn đáng kể của các hoạt chất có nguồn gốc từ quả la hán và/hoặc cỏ ngọt Stevia cần cho việc điều trị bệnh sốt rét, thì việc tiết giảm chi phí so với phương pháp điều trị hiện có sẽ là rất lớn.

Các di- và tri-terpen glycosit nhất định đã được biết là chất làm ngọt, nhưng vẫn chưa có báo cáo nào về việc sử dụng các hợp chất như vậy để chữa trị bệnh sốt rét ở đối tượng là người.

Đây có thể còn là sự đóng góp vào lĩnh vực y tế để tạo ra phương pháp điều trị bệnh sốt rét bằng cách sử dụng chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất di- hoặc tri-terpen cho bệnh nhân cần điều trị. Đây có thể còn là sự đóng góp thêm nữa vào lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra phương pháp điều trị bệnh sốt rét kháng thuốc bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị dùng một lượng hữu hiệu của chế phẩm theo sáng chế ở dạng chất chiết có chứa một hoặc nhiều hợp chất di- hoặc tri-terpen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các hợp chất có hiệu lực và có hiệu quả có nguồn gốc từ quả *Siraitia grosvenorii* (quả la hán -Luo Han guo) và lá cỏ ngọt *Stevia (Stevia rebaudiana)*, kể cả hỗn hợp của chúng, đã được phát hiện là có chứa lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều di- hoặc tri-terpen. Các hợp chất có hiệu lực này bao gồm mogrosit có thể được chiết từ quả la hán. Theo một phương án, giả thiết là nồng độ tương tự của chất chiết từ quả la hán thường có hiệu quả bằng nồng độ của dẫn xuất của artemisinin, thì giá thành của chất chiết từ quả la hán có thể chỉ bằng một phần của chi phí cho một lần điều trị bệnh sốt rét. Các hợp chất có hiệu lực khác bao gồm rebaudiosit A có thể được chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia*.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh sốt rét ở người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm chứa chất chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia* có chứa steviol glycosit và chất mang có thể chấp nhận được.

Theo phương án khác, chất chiết từ quả la hán có thể có trong chế phẩm để chữa trị bệnh sốt rét. Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh sốt rét ở người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm chứa chất chiết từ quả la hán và chất mang có thể chấp nhận được.

Theo phương án thay thế khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh sốt rét ở người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm chứa ít nhất một chất trong các hợp chất di-terpen hoặc tri-terpen và chất mang có thể chấp nhận được.

Theo phương án thay thế khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh sốt rét ở người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm chứa rebaudiosit A, chất chiết từ quả la hán và chất mang có thể chấp nhận được.

Theo phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh sốt rét ở người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm chứa ít nhất một chất di-terpen hoặc tri-terpen, kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất chống bệnh sốt rét được lựa chọn từ nhóm bao gồm mefloquin, halofantrin, artesunat, artemeter, cloquin, lumefantrin, primaquin, sulfadoxin, sulfalen, pyrimetamin, doxycyclin, tetracyclin, azithromycin, proguanil, xycloguanil, dapson, artemisinin và atovoquon, nhưng tốt hơn là artemisinin.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét chứa lượng có hiệu quả điều trị của rebaudiosit A, lượng có hiệu quả điều trị của chất chiết từ quả la hán và chất mang có thể chấp nhận được. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét có thể còn chứa lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất được lựa chọn từ nhóm bao gồm mefloquin, halofantrin, artesunat, artemeter, cloquin, lumefantrin, primaquin, sulfadoxin, sulfalen, pyrimetamin, doxycyclin, tetracyclin, azithromycin, proguanil, xycloguanil, dapson, artemisinin, atovoquon và hỗn hợp của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 biểu thị đường cong liều lượng - phản ứng (phần trăm sinh trưởng theo nồng độ hoạt chất) mô tả một phương án về chất chiết từ quả la hán (nghĩa là, etyl axetat, phần chiết EtOAc: "hợp chất A") được sử dụng để điều trị *P. falciparum* 7G8 (chủng thử nghiệm kháng thuốc, mua được từ the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), Manassas, Virginia, Mỹ) *in vitro*, bằng cách sử dụng cloquin ("CQ") làm đối chứng dương.

Fig.2 biểu thị đường cong liều lượng - phản ứng (phần trăm ức chế sinh trưởng theo nồng độ thuốc) mô tả ảnh hưởng của CQ đến dòng vô tính *P. falciparum* 3D7 theo một phương án là chủng thử nghiệm nhạy với thuốc.

Fig.3 biểu thị đường cong liều lượng - phản ứng (phần trăm ức chế sinh trưởng theo nồng độ thuốc) mô tả ảnh hưởng của CQ đến dòng vô tính kháng nhiều thuốc *P. falciparum* Dd2 theo một phương án là chủng thử nghiệm kháng thuốc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các di- và tri-terpen có hiệu lực và có hiệu quả được bộc lộ trong bản mô tả này có thể có trong chế phẩm để chữa trị bệnh sốt rét an toàn. Các hoạt chất của di- và/hoặc tri-terpen có hiệu lực và có hiệu quả bao gồm mogrosit có thể được chiết từ quả la hán. Các hợp chất hoạt tính của di- và/hoặc tri-terpen có hiệu lực và có hiệu quả bao gồm rebaudiosit A có thể được chiết từ lá cỏ ngọt Stevia. Theo cách khác hoặc ngoài ra, các hợp chất di- và/hoặc tri-terpen như vậy, kể cả mogrosit và/hoặc rebaudiosit A, có thể được chiết hoặc được phân lập từ nguồn tự nhiên hoặc thực vật thích hợp bất kỳ.

Theo phương án thay thế khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất di- hoặc tri-terpen dùng để chữa trị bệnh nhiễm sốt rét có thể còn chứa sesquiterpen lacton, ví dụ, artemisinin.

Tốt hơn là, chế phẩm chứa các thành phần được xem là an toàn và có hiệu quả cho sự tiêu thụ và sử dụng ở người.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" khi được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ lượng hoặc nồng độ của hợp chất theo sáng chế mà có hiệu quả trong trường hợp áp dụng hoặc sử dụng nó, có thể là ức chế, phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh. Nhìn chung, ưu tiên sử dụng chế phẩm ở dạng dùng được qua đường uống, nhưng các chế phẩm nhất định có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong cơ, qua da, trong miệng, dưới da, hậu môn-âm đạo hoặc các đường khác.

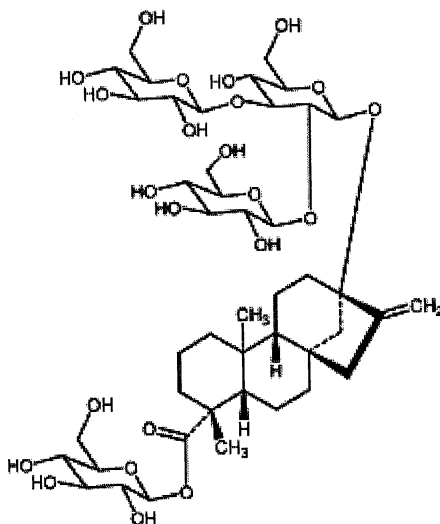
Sự nhiễm bệnh sốt rét gây ra bởi ký sinh trùng *Plasmodium*. Ký sinh trùng lan truyền vào người qua muỗi anôfen bị nhiễm bệnh, được gọi là "vật truyền sốt rét".

Có bốn loại gây bệnh sốt rét ở người: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* và *Plasmodium malariae*. Theo WHO, trong những năm gần đây, một số trường hợp sốt rét ở người cũng đã xảy ra với *Plasmodium knowlesi* – bệnh sốt rét tác động vào khỉ, xảy ra ở một số khu vực rừng núi nhất định ở Đông Nam Á.

Terpen bao gồm một nhóm lớn chất thực vật tự nhiên. Monoterpen chứa hai đơn vị isopren và có công thức chung là $C_{10}H_{16}$. Terpen có thể là không vòng hoặc có vòng, mặc dù hầu hết các chất hoạt hóa sinh học chứa một hoặc nhiều vòng, có thể được ngưng tụ hoặc được tạo cầu nối. Sesquiterpen có ba đơn vị isopren và bao gồm artemisinin và các dẫn xuất của nó, nhóm lacton có cầu peroxy đã biết. Di-terpen bao gồm bốn đơn vị isopren, bao gồm nhóm lớn hơn của các hợp chất quan trọng về sinh học bao gồm steviol, forskolin và chất tương tự. Sau cùng là, tri-terpen bao gồm sáu đơn vị isopren, là nhóm còn lớn hơn nữa của các hợp chất thường có khung cacbon hoặc cấu trúc lõi gồm 30 nguyên tử cacbon. Squalen và các steroid sinh học khác, xuất hiện từ nhóm này, như hợp chất liên quan đến cucurbitan. Tri-terpen bao gồm nhóm hợp chất có rất nhiều và được phân bố rộng rãi trong tự nhiên, xuất hiện chủ yếu ở các cây. Cucurbitan là tri-terpen được tìm thấy trong nhiều cây và một số trong các hợp chất này, như cucurbitacin, mogrosin I đến VI, momordicin, và chất tương tự, là các hóa chất từ thực vật quan trọng.

Di-terpen và tri-terpen, và các dẫn xuất của chúng, bao gồm dẫn xuất của glycosit, chúng được cho là hữu dụng cho chế phẩm dùng điều trị bệnh sốt rét theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: rebaudiosin A, rebaudiosin B, rebaudiosin C, rebaudiosin D, rebaudiosin E, rebaudiosin F, dulcosin A, dulcosin B, rubusosin, steviosin, steviolbiosin, mogrosin II, mogrosin III, mogrosin IV, mogrosin V, siamensin I, grosin I và các hỗn hợp của chúng. Ngoài ra, khi cần, việc sử dụng các muối, solvat và tiền dược chất của các thành phần này cũng được dự tính.

Steviol glycosit có trong chất chiết được tinh chế từ lá thảo mộc Nam Mỹ *Stevia rebaudiana*. Hiện nay, *Stevia* được trồng và được sử dụng làm thực phẩm ở nhiều nơi trên thế giới. Rebaudiosin A (thường được gọi là "rebiana" hoặc "Reb A") và steviosin là thành phần chủ yếu của chất chiết, và cả hai đều là di-terpen. Reb A có tên là este β -D-glucopyranosyl của axit (14 α)-13-[(2-O- β -D-glucopyranosyl-3-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-19-oic. Cấu trúc của Reb A được biểu thị trong hợp chất có công thức (1):



Steviosit có ít hơn một nhóm glucosyl ở vị trí C-13, cụ thể là, thiếu nhóm 3-O-glucopyranosyl của Reb A.

Cả Reb A lẫn steviosit đã được biết là chất làm ngọt không dinh dưỡng, lần lượt ở mức lớn hơn gấp khoảng 300 lần độ ngọt của sucroza, và 350-450 lần độ ngọt của sucroza. Hiện nay, steviol glycosit được sử dụng chủ yếu làm chất làm ngọt không calo và chất làm tăng hương vị.

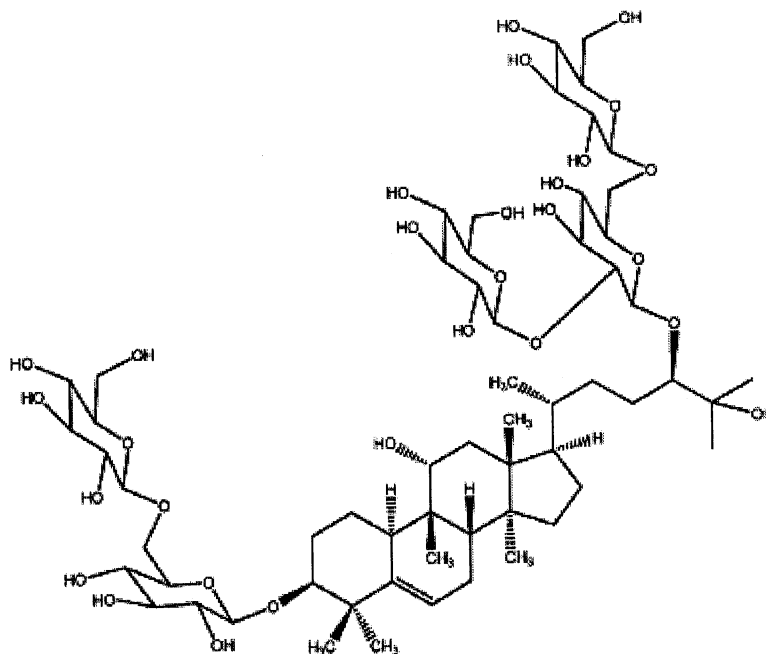
Rebaudiosit A đã được cấp thông báo tình trạng GRAS (Generally Regarded as Safe: nói chung được coi là an toàn) của Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ - U.S. Food and Drug Administration (các thông báo số 252 và 253).

Trong những nghiên cứu về chuyển hóa ở người, cả steviosit lẫn Reb A đều được biến đổi thành steviol, sau đó nó kết hợp với axit glucuronic để tạo thành steviol glucuronit, và được bài tiết trong nước tiểu trong quá trình chuyển hóa pha II. Thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) của cả hai glycosit ở người là khoảng 14 giờ. Hơn nữa, với liều lượng được sử dụng trong bản mô tả này, Reb A không thể hiện tác dụng huyết động lực ngược hoặc tác dụng hạ glucoza trong máu. Các tác dụng dược lý được thông báo duy nhất của steviol glycosit là sự quan sát thấy huyết áp giảm và hạ thấp mức glucoza trong máu ở tỷ lệ liều lượng rất cao (từ khoảng 750 đến 1500 mg/ngày).

Chế phẩm chứa Reb A và chất mang có thể chấp nhận được, có thể được sử dụng để chữa trị bệnh sốt rét. Còn được mong đợi là hỗn hợp của các hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm rebaudiosit A, rebaudiosit B, rebaudiosit C, rebaudiosit D, rebaudiosit E, rebaudiosit F, dulcosit A, dulcosit B, rubusosit, steviosit, và steviolbiosit, khi được pha chế với chất mang được dụng, có thể có tác dụng trị liệu để chữa trị bệnh sốt rét ở bệnh nhân, kể cả sự nhiễm kháng thuốc của *Plasmodium* spp.

Quả la hán (tiếng Trung, Quả la hán -Luo Han guo), hoặc quả bao bóp, được tạo ra bởi cây (*Siraitia grosvenorii*) chỉ sinh trưởng ở vùng phía Bắc của tỉnh Quảng Châu, ở phía Nam Trung Quốc. Cây này là cây leo lưu niên thuộc họ Cucurbitaceae (cây dưa chuột hoặc cây dưa hấu). Quả này được sử dụng rộng rãi làm thực phẩm ăn kiêng và thực phẩm chữa bệnh khắp Trung Quốc và Đông Nam Á, và đã được trồng cho mục đích sử dụng này trong nhiều thế kỷ. Ở Trung Quốc, quả này hay được sử dụng làm thành phần chính trong "đồ uống lạnh hoặc chè". Theo truyền thống, quả này được sử dụng bằng cách sắc uống và uống để điều trị các bệnh về họng và về phổi. Ngoài ra, nước ép của quả la hán rất ngọt và một số thành phần của quả la hán đã được sử dụng làm chất làm ngọt.

Chất chiết từ quả la hán được mô tả trong bản mô tả này. Các thành phần chính của chất chiết từ quả la hán là cucurbitan tri-terpen glycosit được biết là mogrosit, cụ thể là mogrosit II, III, IV, V, và VI, cùng với flavonoid và melanoidin. Vị ngọt của quả la hán có nguồn gốc chủ yếu từ mogrosit, đặc biệt là mogrosit V bao gồm nhóm tri-terpen glycosit chiếm khoảng từ 0,5% đến 1% khối lượng quả khô. Mogrosit V đã được xác định là thành phần terpenoid chính và là thành phần glycosit chủ yếu, và bằng cách sử dụng phương pháp chiết và phân lập khác có thể thu được với mức nằm trong khoảng từ 30 đến 60% khối lượng, chẳng hạn. Hơn nữa, chất chiết từ quả la hán có thể chứa >45% khối lượng đến 48% khối lượng của tổng mogrosit kể cả các dẫn xuất và/hoặc chất chuyển hóa của mogrosit. Mogrosit V có tên là (3 β ,9 β ,10 α ,11 α ,24R)-3-[(6-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)oxy]-11,25-dihydroxy-9-metyl-19-norlanost-5-en-24-yl-O- β -D-glucopyranosyl-(1-2)-O-[[β -D-glucopyranosyl-(1-6)]- β -D-glucopyranosit. Cấu trúc của mogrosit V được biểu thị trong hợp chất có công thức (2):



Mogrosin đã được biết là chất làm ngọt không dinh dưỡng và mogrosin V ở dạng tinh khiết của nó có độ ngọt lên đến 300 lần so với độ ngọt của đường.

Một chất chiết hữu dụng từ quả la hán có chứa mogrosin V đã được cấp thông báo GRAS của Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ (thông báo số 301).

Ví dụ về dẫn xuất hoặc chất chuyển hóa của mogrosin là 11-oxo-mogrosin V, mà cũng có thể có mặt với lượng đáng kể trong chất chiết từ quả la hán được mô tả trong bản mô tả này, đến 8% khối lượng.

Còn được mong đợi là chất chiết từ quả la hán, khi được pha chế với chất mang được dụng, có thể có tác dụng trị liệu để chữa trị bệnh sốt rét ở bệnh nhân, kể cả nhiễm *Plasmodium spp.* kháng thuốc.

Artemisinin được chiết và được phân lập từ *Artemisia annua* (cây bụi nhỏ thuộc họ Asteraceae và được tìm thấy ở vùng ôn đới của châu Á; thường được biết là cây ngải tây). Các dẫn xuất của artemisinin khác hữu ích cho các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, artemeter, arteether, dihydroartemisinin, artesunate và các dẫn xuất tương tự. Như được đề cập ở trên, một trọng tâm chính của việc

nghiên cứu thuốc đối với bệnh sốt rét là điều trị bằng hỗn hợp gốc artemisinin ("ACT"). Những trị liệu này kết hợp dẫn xuất của artemisinin với thuốc đi kèm. Ví dụ, một hỗn hợp đã được biết rõ bao gồm artemeter và lumefantrin với tỷ lệ 1:6 theo khối lượng (a.k.a. co-artemeter). Lumefantrin là (+/-)-2-dibutylamino-1-[2,7-điclo-9-(4-clobenzyliden)-9,11-floren-4-yl]etanol (a.k.a. benflumetol và dl-benflumelol), và có thể được kết hợp với các thành phần khác theo các phương án của sáng chế. Tuy nhiên, các hỗn hợp của artemisinin hoặc các dẫn xuất của nó với di- hoặc tri-terpen còn chưa được báo cáo. Cụ thể, hỗn hợp của artemisinin hoặc các dẫn xuất của nó với di-terpen glycosit và/hoặc tri-terpen glycosit chưa được báo cáo để sử dụng trong việc điều trị bệnh sốt rét.

Artemisinin và nhiều dẫn xuất của nó tan rất kém trong nước, điều này có thể dẫn đến vấn đề về sự hấp phụ vào trong cơ thể người và sự hấp thụ chậm. Ngược lại, các di- và tri-terpen glycosit nhất định như được bộc lộ trong bản mô tả này tan trong nước rất tốt, và khắc phục được nhược điểm về khả năng hấp thụ và độ sinh khả dụng một cách dễ dàng hơn nhiều. Ví dụ, cả Reb A lẫn mogrosit V đều tan hoàn toàn trong nước và do đó hữu ích hơn và được làm sẵn để chữa trị bệnh sốt rét khi có trong chế phẩm trị sốt rét theo sáng chế.

Không được bao bởi lý thuyết, cần tin rằng các hợp chất di-terpen và/hoặc tri-terpen nhất định, được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất dùng để chữa trị bệnh sốt rét được chọn từ nhóm bao gồm mefloquin, halofantrin, artesunat, artemeter, cloquin, lumefantrin, primaquin, sulfadoxin, sulfalen, pyrimetamin, doxyxycilin, tetraxycilin, azithromyxin, proguanil, xycloguanil, dapson, artemisinin và atovoquon, tốt nhất là artemisinin hoặc các dẫn xuất của nó, có thể đem lại tác dụng điều trị hữu hiệu đối với bệnh sốt rét, vì vậy tiêu diệt hoặc ức chế ký sinh trùng *Plasmodium* có ở bệnh nhân, theo cách hiệp đồng. Được mong đợi là ACT sử dụng dẫn xuất của di-terpen và/hoặc tri-terpen glycosit có thể đem lại tác dụng điều trị tốt hơn nhiều so với chỉ một trong hai chất riêng rẽ, nghĩa là, hợp chất artemisinin với terpen, và cũng tránh được tính kháng thuốc. Theo phương án thay thế khác, được mong đợi là ACT sử dụng artemisinin (hoặc dẫn xuất) và hỗn hợp của di-terpen và tri-terpen có thể tạo ra tác dụng điều trị tốt hơn nhiều so với chỉ dùng một chất bất kỳ trong số các chất riêng rẽ, và cũng tránh được tính kháng

thuốc. Theo phương án thay thế khác nữa, còn được mong đợi là ACT sử dụng artemisinin (hoặc dẫn xuất) và hỗn hợp của chất chiết từ lá cỏ ngọt Stevia có chứa steviol glycosit và chất chiết từ quả la hán có thể tạo ra tác dụng điều trị tốt hơn nhiều so với chỉ dùng một chất bất kỳ trong số các chất riêng rẽ, và cũng tránh được tính kháng thuốc. Theo phương án thay thế khác nữa, còn được mong đợi là ACT sử dụng artemisinin (hoặc dẫn xuất) và hỗn hợp của chất chiết từ lá cỏ ngọt Stevia có chứa steviol glycosit và mogrosit V có thể tạo ra tác dụng điều trị tốt hơn nhiều so với chỉ dùng một chất bất kỳ trong số các chất riêng rẽ, và cũng tránh được tính kháng thuốc. Theo phương án thay thế khác nữa, còn được mong đợi là ACT sử dụng artemisinin (hoặc dẫn xuất) và hỗn hợp của rebaudiosit A và mogrosit V có thể tạo ra tác dụng điều trị tốt hơn nhiều so với chỉ dùng một chất bất kỳ trong số các chất riêng rẽ, và cũng tránh được tính kháng thuốc. Theo phương án thay thế khác nữa, còn được mong đợi là ACT sử dụng artemisinin (hoặc dẫn xuất) và hỗn hợp của rebaudiosit A và chất chiết từ quả la hán có thể tạo ra tác dụng điều trị tốt hơn nhiều so với chỉ dùng một chất bất kỳ trong số các chất riêng rẽ, và cũng tránh được tính kháng thuốc.

Ví dụ, hợp chất dùng để chữa trị bệnh sốt rét có thể được sử dụng kết hợp với di-terpen glycosit và/hoặc tri-terpen glycosit theo các phương án của sáng chế. Hợp chất dùng để chữa trị bệnh sốt rét thích hợp bao gồm mefloquin, halofantrin, artesunat, artemeter, cloquin, lumefantrin, primaquin, sulfadoxin, sulfalen, pyrimetamin, doxyxycilin, tetraxycilin, azithromyxin, proguanil, xycloguanil, dapson, artemisinin và atovoquon, nhưng tốt hơn là artemisinin.

Các phương pháp được mô tả ở trên có thể còn được hiểu rõ hơn qua các ví dụ dưới đây. Chất chiết steviol glycosit có thể mua được từ EUSTAS (European Stevia Assoc., Huesca, Spain), và Pure Circle, Oak Brook, Illinois, Mỹ. Reb A (chất chiết từ lá cỏ ngọt Stevia) có độ tinh khiết từ khoảng 90 đến 95% có thể mua được như ở trên và từ GLG, Vancouver, British Columbia, Canada. Mogrosit V (bột chất chiết được tinh chế từ quả la hán) với độ tinh khiết bằng từ khoảng 35 đến 60% có thể mua được dưới tên PureLo® của BioVittoria Limited (Hamilton, New Zealand). Bột quả la hán cũng có thể

mua được dưới tên Fruit-Sweetness™ của BioVittoria Limited (Hamilton, New Zealand), và Guilin Layn Natural Ingredients Corp., Guilin, Guangxi, P.R. China.

Các chữ viết tắt dưới đây được sử dụng trong bản mô tả này. EtOAc: etyl axetat; DMSO: dimetyl sulfoxit; MDR: kháng đa thuốc; CQ: cloquin; PBS: muối đệm phosphat.

Ví dụ thực hiện sàng chế

Ví dụ 1A

Mẫu số 1: Rebaudiosit A (chất chiết được tinh chế từ lá cỏ ngọt Stevia), độ tinh khiết >95% khối lượng.

Mẫu số 2: Steviol glycosit (chất chiết được tinh chế từ lá cỏ ngọt Stevia), độ tinh khiết khoảng 95% khối lượng.

Mẫu số 3: Bột chất chiết được tinh chế từ quả la hán có chứa mogrosit V (khoảng 40% khối lượng).

Mẫu số 4: Chất cô của nước ép quả la hán (từ quả la hán tươi).

Mẫu số 5: Chất chiết quả la hán (pha nước).

Mẫu số 6: Chất chiết quả la hán (pha n-butanol) = "hợp chất B".

Mẫu số 7: Chất chiết quả la hán (pha EtOAc) = "hợp chất A".

Mẫu số 8: Chất chiết quả la hán thông thường (từ quả la hán khô).

Đối với bước thứ nhất, bột quả la hán (135 mg), nghĩa là, bột chất chiết được tinh chế có chứa mogrosit V (khoảng 40% khối lượng), được hoàn nguyên trong nước bằng cách chiết bằng nước nóng (3 X 400 ml), và chất chiết bằng nước kết hợp được phân cách, lần lượt trước tiên bằng EtOAc (200 ml, 2 X 100 ml), và tiếp theo bằng n-butanol (200 ml, 2 X 100 ml), để tạo ra 3 phần tương ứng với mẫu 5 đến 7 ở trên, và dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng thiết bị bay hơi quay để tạo ra "hợp chất A" (phần chiết EtOAc)

và "hợp chất B" (thành phần n-butanol). Hợp chất A và hợp chất B được thử nghiệm về hoạt tính chống bệnh sốt rét. Mẫu 5 tương ứng với pha nước sau cùng sau khi phân cách bằng EtOAc, tiếp theo là n-butanol.

Ngoài ra, chất chiết quả la hán thông thường (mẫu 8) được chuẩn bị bằng cách chiết quả la hán khô bằng nước nóng như trong bước đầu tiên ở trên mà không cần thao tác gì thêm.

Điều chế dung dịch hoạt chất. Mỗi mẫu nêu trên được hòa tan trong DMSO để điều chế dung dịch gốc có nồng độ 0,1 mg/μl.

Ví dụ 1B

Chủng kháng nhiều thuốc (multidrug resistant: MDR) *Plasmodium falciparum* 7G8, (mua được từ the Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4), Manassas, Virginia, Mỹ), được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI 1640 (được bổ sung với huyết thanh người 10%) với PCV (thể tích tế bào được đóng gói: packed cell volume: PVC: khối lượng hồng cầu kết tủa) ở 5%. *P. falciparum* là tế bào được đồng bộ hóa bằng cách bổ sung D-sorbitol 5% và sau đó tế bào đã được đồng bộ hóa được rải trên đĩa nuôi cấy sau khi đạt được pha tạo vòng, với tỷ lệ nhiễm ban đầu là 1% và PCV ở 5%.

Dung dịch gốc DMSO dùng cho mẫu số 7 ("Hợp chất A") và mẫu số 6 ("Hợp chất B") như ở trên được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy đến 2000 μg/ml làm dung dịch gốc và được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy để đạt được nồng độ chênh lệch gấp 3 lần dạng pha loãng hàng loạt trong phân tích thử nghiệm hoạt tính (dung dịch hoạt chất cần nhỏ hơn 10% của hệ nuôi cấy và nồng độ DMSO cần thấp hơn 0,5% để tránh ảnh hưởng có hại đối với sự sinh trưởng của *P. falciparum*). 10 μl dung dịch hoạt chất cộng với 90 μl môi trường nuôi cấy *P. falciparum* được rải trên mỗi lỗ. Mẻ nuôi cấy tế bào được quan sát dưới kính hiển vi về tỷ lệ nhiễm bằng cách phân tích vết ô bằng chất màu Giemsa tiêu chuẩn như đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phần trăm ức chế = (tỷ lệ nhiễm của mẫu trống- tỷ lệ nhiễm của nhóm được điều trị bằng hoạt chất hoặc được điều trị bằng thuốc)/ tỷ lệ nhiễm của mẫu trống x 100%.

Sử dụng nhóm được điều trị bằng cloquin làm đối chứng dương, đường cong liều lượng - phản ứng được tạo ra như là giá trị phần trăm sinh trưởng theo nồng độ hoạt chất/thuốc (Chức năng phân tích hồi quy không tuyến tính trong phần mềm Graphpad Prism 3.0, GraphPad Software, La Jolla, California, Mỹ) để xác định IC₅₀ (nồng độ ức chế bán tối đa). Fig.1 thể hiện các đường cong ức chế sinh trưởng dạng liều lượng - phản ứng của cloquin (CQ) và hợp chất A.

Bảng 1

Mẫu	Hoạt tính chống bệnh sốt rét, IC ₅₀ (µg/ml)
CQ (cloquin)	0,264±0,012
7 (phần chiết EtOAc của bột quả la hán 40%) “hợp chất A”	22,14±1,68
6 (phần chiết n-butanol của bột quả la hán 40%) “hợp chất B”	>200

Như được thể hiện trong Bảng 1, mẫu số 7 cho thấy hoạt tính mạnh đối với *P. falciparum* 7G8, với IC₅₀ bằng 22,14 µg/ml. Như được thể hiện trên Fig.1, chất chiết từ quả la hán của mẫu số 7 chứng tỏ sự ngăn chặn hoàn toàn sự sinh trưởng của tế bào bị nhiễm ở nồng độ cao hơn khi được thử nghiệm.

Ví dụ 1C

Nuôi cấy ký sinh trùng. Dòng nhạy cảm với thuốc 3D7 và dòng kháng nhiều thuốc (MDR) Dd2 của *Plasmodium falciparum*, mua được từ the Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4), Manassas, Virginia, Mỹ, được duy trì liên tục trong hồng cầu của người thuộc nhóm máu O+ và 10% huyết thanh người trong hỗn hợp khí gồm 7% CO₂, 5% O₂ và 88% N₂.

Dung dịch gốc theo ví dụ 1A và CQ được sử dụng làm đối chứng dương (được chuẩn bị như dung dịch gốc 10 mM trong PBS), được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Từng dung dịch xử lý mới được điều chế trong môi trường nuôi cấy tế bào. Trong tất cả các phân tích, nồng độ của DMSO và PBS được duy trì ở mức 0,5% để không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của các môi trường nuôi cấy đối chứng.

Phân tích nồng độ ức chế *in vitro*. Dòng vô tính *P. falciparum* 3D7 và Dd2 được duy trì liên tục trong hồng cầu của người thuộc nhóm máu O+ và huyết thanh người 10% trong hỗn hợp khí gồm 7% CO₂, 5% O₂ và 88% N₂, được đồng bộ hóa bởi những lần điều trị bằng D-sorbitol 5%. Sự ức chế sinh trưởng *in vitro* của hồng cầu được sống ký sinh ở giai đoạn vòng bắt đầu ở mức 1% ký sinh trùng trong máu và 2,5% dung tích hồng cầu được xác định bằng phép soi dưới kính hiển vi quang học đối với các vết ô được nhuộm màu bằng Giemsa.

Kết quả của các thử nghiệm với đối chứng dương sử dụng CQ được trình bày trên Fig.2 và Fig.3.

Fig.2 thể hiện ảnh hưởng của CQ lên dòng vô tính *P. falciparum* 3D7 trên đường cong liều lượng - phản ứng là phần trăm ức chế sinh trưởng theo nồng độ thuốc.

Fig.3 thể hiện ảnh hưởng của CQ lên dòng vô tính *P. falciparum* Dd2 trên đường cong liều lượng - phản ứng là phần trăm ức chế sinh trưởng theo nồng độ thuốc.

Tiếp theo, chất chiết của ví dụ 1A được thử nghiệm dựa vào dung dịch gốc được đề cập ở trên. Bảng 2 dưới đây thể hiện ảnh hưởng của chất chiết lên dòng vô tính *P. falciparum* 3D7 và Dd2.

Bảng 2

Mức chữa trị	Phần trăm ức chế (%, số trung bình $\pm$ SD)	
	3D7	Dd2
Mẫu số 1 (10 ⁻⁴ g/l)	41,33 $\pm$ 0,00	56,14 $\pm$ 1,36

Mẫu số 2 (10^{-4} g/l)	41,87 $\pm$ 8,30	57,83 $\pm$ 2,39
Mẫu số 3 (10^{-4} g/l)	12,00 $\pm$ 11,31	44,58 $\pm$ 3,41
Mẫu số 4 (10^{-4} g/l)	25,33 $\pm$ 7,54	42,17 $\pm$ 0,00
Mẫu số 5 (10^{-4} g/l)	9,33 $\pm$ 7,54	50,12 $\pm$ 4,43
Mẫu số 6 (10^{-4} g/l)	4,00 $\pm$ 7,54	27,71 $\pm$ 6,82
Mẫu số 7 (10^{-4} g/l)	30,67 $\pm$ 7,54	42,17 $\pm$ 6,82
Mẫu số 8 (10^{-4} g/l)	9,33 $\pm$ 0,00	32,53 $\pm$ 6,82

Kết quả trên Bảng 2 chứng tỏ rõ ràng là các chất chiết có nguồn gốc từ lá cỏ ngọt Stevia và quả la hán có thể ức chế sự sinh trưởng của dòng vô tính *P. falciparum* 3D7 và Dd2. Hơn nữa, tham khảo chế phẩm chiết của ví dụ 1A để tạo ra các mẫu 5 đến 7, các kết quả chứng tỏ rằng hợp chất hoạt tính xuất hiện là trong pha EtOAc (mẫu 7).

Cần lưu ý là tất cả các chất chiết, có nguồn gốc từ lá cỏ ngọt Stevia hoặc quả la hán, chứng tỏ tính hiệu quả để ức chế ký sinh trùng gây ra bệnh sốt rét. Cụ thể là, chất chiết, có nguồn gốc từ lá cỏ ngọt Stevia hoặc quả la hán, có tác dụng mạnh chống lại chủng kháng thuốc Dd2.

Ví dụ 1D

Chất chiết thông thường từ quả la hán (mẫu 8) được chuẩn bị bằng cách chiết quả la hán khô bằng nước nóng như trong ví dụ 1A và sau đó lần lượt được phân đoạn bằng EtOAc và n-butanol như trong ví dụ 1A để tạo ra 3 thành phần tương ứng với mẫu 5a đến 7a. Mẫu 6a và 7a lần lượt cũng tương ứng với "hợp chất B" và "hợp chất A".

P. falciparum là tế bào được đồng bộ hóa bằng cách bổ sung 5% D-sorbitol và sau đó tế bào đã được đồng bộ hóa được rải trên đĩa nuôi cấy sau khi đạt được pha dạng vòng, với tỷ lệ nhiễm ban đầu bằng 1% và PCV ở 5%.

Dung dịch gốc DMSO dùng cho mẫu số 7a ("hợp chất A") và mẫu số 6a ("hợp chất B") như ở trên được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy đến 2000 μ g/ml làm môi trường gốc và được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy để đạt được nồng độ chênh lệch gấp 3

lần dạng pha loãng hàng loạt trong phân tích thử nghiệm hoạt tính (dung dịch hoạt chất cần nhỏ hơn 10% hệ nuôi cấy, và nồng độ DMSO cần thấp hơn 0,5% để tránh tác dụng phụ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của *P. falciparum*). 10 μ l dung dịch hoạt chất cùng với 90 μ l môi trường nuôi cấy *P. falciparum* được rải trên mỗi lỗ. Môi trường nuôi cấy tế bào được quan sát dưới kính hiển vi về tỷ lệ nhiễm bằng phân tích vết ố bằng chất màu Giemsa tiêu chuẩn.

Phần trăm ức chế = (tỷ lệ nhiễm của mẫu trống - tỷ lệ nhiễm của nhóm được điều trị bằng hoạt chất hoặc được điều trị bằng thuốc) / tỷ lệ nhiễm của mẫu trống x 100%.

Việc sử dụng nhóm được điều trị bằng cloquin và artemisinin làm đối chứng dương, đường cong liều lượng - phản ứng được tạo ra bằng phần trăm giá trị sinh trưởng theo nồng độ hoạt chất/thuốc (chức năng phân tích hồi quy không tuyến tính trong phần mềm Graphpad Prism 3.0, GraphPad Software, La Jolla, California, Mỹ) để xác định IC₅₀ (nồng độ ức chế bán tối đa). Xem bảng 3 dưới đây.

Dòng nhạy cảm với thuốc (drug-sensitive: DS) 3D7 và dòng kháng nhiều thuốc (MDR) Dd2 của *Plasmodium falciparum*, mua được từ the Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4), Manassas, Virginia, Mỹ, được duy trì liên tục trong hồng cầu của người thuộc nhóm máu O+ và huyết thanh người 10% trong hỗn hợp khí gồm 7% CO₂, 5% O₂ và 88% N₂.

Trong tất cả các thử nghiệm, nồng độ của DMSO và PBS được duy trì ở 0,5% để không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của mẻ nuôi cấy đối chứng. Phân tích nồng độ ức chế *in vitro*. Dòng *P. falciparum* 3D7 và Dd2 được duy trì liên tục trong hồng cầu của người thuộc nhóm máu O+ và huyết thanh người 10% trong hỗn hợp khí gồm 7% CO₂, 5% O₂ và 88% N₂, được đồng bộ hóa bằng cách xử lý liên tiếp bằng D-sorbitol 5%. Sự ức chế sinh trưởng *in vitro* của hồng cầu được sống ký sinh ở giai đoạn tạo vòng bắt đầu ở 1% ký sinh trùng trong máu và 2,5% dung tích hồng cầu được xác định bằng phép soi kính hiển vi quang học đối với các vết ố được nhuộm màu bằng Giemsa.

Bảng 3

Mẫu	(IC50, nM trung bình)	
	3D7 (DS)	Dd2 (MDR)
1	219,56±10,15	376,18±12,39
2	231,87±18,19	398,85±22,31
3	222,98±11,38	349,15±13,76
4	528,76±27,19	848,35±40,67
5a	>1000	>1000
6a “hợp chất B”	>1000	>1000
7a “hợp chất A”	90,89±7,32	232,17±16,76
8	457,32±35,65	556,35±49,98
CQ (cloquin)	1,37±0,12	22,59±0,82
Coartem	0,09±0,00	0,13±0,02

Như được thể hiện trong Bảng 3, mẫu số 7a chứa hoạt tính chống bệnh sốt rét sau khi chiết. Cũng đã tìm thấy là Rebaudiosit A (mẫu 1) và mogrosit V (mẫu 3) chứng tỏ hoạt tính nói chung mạnh đáng kể kháng ký sinh trùng được thử nghiệm.

Ví dụ 2

Phân tích kiểu bàn cờ. Hoạt tính chống bệnh sốt rét của chất chiết từ quả la hán và chất chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia in vitro* được xác định và được dự báo bằng cách sử dụng chủng sốt rét *P. falciparum* DD2. Các mẫu được trộn thành dãy dung dịch pha loãng 1:2 và chỉ số FIC (chỉ số FIC: FICI) được tính. (Rand, K. H., Houck, H. J., Brown, P. và cộng sự. "Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy," Antimicrobial Agents & Chemotherapy (1993) 37:613-5; Eliopoulos, G.M., Moellering R.C. in Antibiotics in Laboratory Medicine, ed. Lorian V (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1991), các trang 432-492; Ghannoum, M.A., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Mortara, L.A., Shafiq, M.C., Edwards, J.E., Jr., Criddle, R.S. Antimicrob. Agents Chemother. (1995) 39:2459-2465; Barchiesi, F., DiFrancesco, L.F., Scalise, G. "In Vitro

Activities of Terbinafine in Combination With Fluconazole and Itraconazole Against Isolates of *Candida albicans* With Reduced Susceptibility to Azoles," *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997) 41 : 1812-1814. Mỗi tham chiếu trong số các tham chiếu nêu trên được đưa ra trọn vẹn trong bản mô tả này nhờ viện dẫn.)

Để xác định xem là kết quả của việc điều trị kết hợp là bổ sung, hiệp đồng hay bình thường, chỉ số FIC (FICI) được tính bằng cách sử dụng phân tích kiểu bàn cờ. FICI là tổng của các FIC của mỗi thuốc được thử nghiệm, trong đó FIC (fractional inhibitory concentration: FIC: nồng độ ức chế phần chiết) được xác định cho mỗi thuốc bằng cách chia MIC của mỗi thuốc khi được sử dụng trong hỗn hợp cho MIC của mỗi thuốc khi được sử dụng riêng rẽ. $FICI = (MIC \text{ của thuốc A trong hỗn hợp} / MIC \text{ của một mình thuốc A}) + (MIC \text{ của thuốc B trong hỗn hợp} / MIC \text{ của một mình thuốc B})$. Giả thiết là (i) việc thử nghiệm sử dụng các nồng độ cách nhau bởi hệ số bằng 2 và (ii) sự thay đổi của MIC pha loãng một bước nằm trong khoảng sai số thử nghiệm. Các phương pháp phức tạp khác cũng đã được sử dụng; ví dụ, phương pháp vẽ đồ thị đường mức được sử dụng để mô tả đặc điểm bản chất của ba chất kháng nấm trong các hỗn hợp sử dụng các nồng độ khác nhau của mỗi chất.

FICI chứng tỏ sự hiệp đồng ở giá trị $\leq 0,5$, trong khi đó các giá trị được tìm thấy nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,0 chứng tỏ tác dụng bổ sung và không phải là hiệp đồng.

Ví dụ 2A

Hỗn hợp của chất chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia* có chứa steviol glycosit và chất chiết từ quả la hán. Hỗn hợp của chất chiết từ quả la hán (hợp chất A) như được mô tả ở trên và chất chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia* có chứa steviol glycosit (như trong ví dụ 1A, mẫu 2) tạo ra FICI bằng 0,3, chứng tỏ khả năng hiệp đồng để ức chế sự sinh trưởng của *P. falciparum* *in vitro* đến mức lớn hơn so với chỉ một trong hai thành phần. (MIC của chỉ một mình hợp chất A: 232 nM; MIC của một mình steviol glycosit: 400 nM; MIC của hợp chất A trong hỗn hợp: 14,5 nM; MIC của steviol glycosit trong hỗn hợp: 100 nM).

Ví dụ 2B

Hỗn hợp của chất chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia* có chứa steviol glycosit và mogrosit V. Theo một phương án, được mong đợi là hỗn hợp của chất chiết từ lá cỏ ngọt *Stevia* có chứa steviol glycosit (như trong ví dụ 1A, mẫu 2) và bột chất chiết được tinh chế từ quả la hán có chứa mogrosit V (40%) theo tỷ lệ 1:1 theo khối lượng (như trong ví dụ 1A, mẫu 3) có thể ngăn chặn sự sinh trưởng của *P. falciparum in vitro* và *in vivo* đến mức lớn hơn so với chỉ một trong hai thành phần.

Ví dụ 2C

Hỗn hợp của rebaudiosit A (Reb A) và mogrosit V. Theo một phương án, mong đợi là hỗn hợp của Reb A (như trong ví dụ 1A, mẫu 1) và bột chất chiết được tinh chế từ quả la hán có chứa mogrosit V (40%) theo tỷ lệ 1:1 theo khối lượng (như trong ví dụ 1A, mẫu 3) có thể ngăn chặn sự sinh trưởng của *P. falciparum in vitro* và *in vivo* đến mức lớn hơn so với chỉ một trong hai thành phần.

Ví dụ 2D

Hỗn hợp của rebaudiosit A (Reb A) và chất chiết từ quả la hán. Hỗn hợp của Reb A (như trong ví dụ 1A, mẫu 1) và chất chiết từ quả la hán (hợp chất A) tạo ra FICI bằng 0,3, chứng tỏ khả năng hiệp đồng để ngăn chặn sự sinh trưởng của *P. falciparum in vitro* đến mức lớn hơn so với chỉ một trong hai thành phần. (MIC của chỉ một mình hợp chất A: 232 nM; MIC chỉ một mình Reb A: 376 nM; MIC của hợp chất A trong hỗn hợp: 14,5 nM; MIC của Reb A trong hỗn hợp: 94 nM).

Ví dụ 2E (đối chứng)

Hỗn hợp của rebaudiosit A (Reb A) và artemisinin. Hỗn hợp của Reb A (như trong ví dụ 1A, mẫu 1) và artemisinin tạo ra FICI bằng khoảng từ 0,9 đến 1,0, chỉ chứng tỏ tác dụng bổ sung. (MIC của chỉ một mình artemisinin: 0,13 nM; MIC của chỉ một mình Reb A: 376 nM; MIC của artemisinin trong hỗn hợp: 0,0081 nM; MIC của Reb A trong hỗn hợp: 376 nM).

Ví dụ 3A

Chế phẩm chứa rebaudiosit A (Reb A). Theo một phương án, bệnh nhân (hoặc mỗi thành viên của nhóm bệnh nhân) được điều trị qua đường uống bằng một hoặc nhiều liều của chế phẩm dạng nước chứa tổng liều lượng dùng hằng ngày bằng đến 500 mg rebaudiosit A. Được mong đợi là sự nhiễm *P. falciparum* sẽ bị ngăn chặn hoặc bị ức chế trong khoảng từ 3 đến 7 ngày khi được đánh giá bằng cách theo dõi màng máu tiêu chuẩn.

Ví dụ 3B

Hỗn hợp của rebaudiosit A (Reb A) và chất chiết từ quả la hán chứa mogrosit V. Theo một phương án, bệnh nhân (hoặc mỗi thành viên của nhóm bệnh nhân) được điều trị qua đường uống bằng một hoặc nhiều liều chế phẩm dạng nước chứa tổng liều lượng hằng ngày bằng đến 500 mg rebaudiosit A và đến 500 mg mogrosit V. Được mong đợi là sự nhiễm *P. falciparum* sẽ bị ngăn chặn hoặc bị ức chế trong khoảng từ 3 đến 7 ngày khi được đánh giá bằng cách theo dõi màng máu tiêu chuẩn.

Ví dụ 4

Hoạt tính chống bệnh sốt rét *in vitro* cũng được xác nhận bằng phương pháp huỳnh quang dựa vào bệnh sốt rét SYBR Green I được mô tả trước đây bởi Smilkstein và cộng sự, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May 2004, trang 1803-1806, Vol. 48, No. 5, với những cải biến nhỏ. Dung dịch thuốc lần lượt được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy và được phân phối vào môi trường nuôi cấy ký sinh trùng không đồng bộ trên đĩa 96 lỗ thành bốn bản để thu được 0,2% ký sinh trùng trong máu cùng với 2% dung tích hồng cầu trong tổng thể tích 100 μ l. Sau đó đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37 °C. Sau khi ủ, bổ sung 100 μ l chất đệm phân giải với 0,2 μ l/ml SYBR Green I vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ trong bóng tối và sau đó được đặt trong thiết bị đọc đĩa huỳnh quang 96 lỗ (Multilabel HTS Counter; PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Mỹ) với bước sóng kích thích và phát xạ lần lượt ở 497 nm và 520 nm, để đo sự phát huỳnh quang. Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) được xác định bằng phép phân tích hồi quy không tuyến tính đường cong liều lượng - phản ứng logistic bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Ví dụ này như là một phương pháp so sánh.

Tiếp theo, phần phân tích của qui trình theo ví dụ 1C được thực hiện bằng cách sử dụng Coartem làm đối chứng dương. Coartem là điều trị bằng hỗn hợp gốc artemisinin (ACT) với liều lượng cố định có thể mua được từ Novartis AG, Basel, Thụy Sĩ. Mỗi viên Coartem chứa 20 mg artemeter và 120 mg lumefantrin. Artemeter có sự bắt đầu tác dụng nhanh và nhanh bị đào thải, trong khi đó lumefantrin bị đào thải chậm hơn. Do đó, hỗn hợp tiêu diệt ký sinh trùng nhanh, trong khi cũng ngăn ngừa sự xuất hiện lại của ký sinh trùng trong máu. Thuốc này đã được sử dụng rộng rãi ở Trung quốc để thay thế cho cloquin (CQ) trong phòng và điều trị bệnh sốt rét. Bảng 4 thể hiện tác dụng của việc điều trị bằng thuốc tiêu chuẩn đối với dòng vô tính *P. falciparum* 3D7 và Dd2 khi được xác định bằng phương pháp huỳnh quang. Người ta tin rằng các hoạt chất được phát hiện trong các ví dụ nêu trên cũng có thể tạo ra sự ức chế đáng kể nếu không nói là không thể so sánh được đối với sự sinh trưởng của tế bào ký sinh trùng.

Bảng 4

Điều trị	Tính mẫn cảm <i>in vitro</i> (IC ₅₀ , nM)	
	3D7	Dd2
CQ	1,63±0,10	22,14±1,96
Coartem	0,07±0,09	0,09±0,05
IC ₅₀ được thể hiện bằng số trung bình ± sai số tiêu chuẩn của số trung bình (n>3)		

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất mang chấp nhận được. Hoạt chất trong chế phẩm như vậy có thể chiếm từ 1% khối lượng đến 99% khối lượng, hoặc theo cách khác, từ 0,1% khối lượng đến 99,9% khối lượng. "Chất mang chấp nhận được" chỉ chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược bất kỳ mà có thể tương thích với các thành phần khác của chế phẩm và không có hại cho người sử dụng. Tá dược hữu dụng bao gồm xenluloza vi tinh thể, magie stearat, canxi stearat, hoặc đường chấp nhận được bất kỳ (ví dụ, manitol, xylitol).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất mang dược dụng. Thành phần hoạt tính trong chế phẩm này có thể bao gồm 1% khối lượng đến 99% khối lượng, hoặc theo cách khác, từ 0,1% khối lượng đến 99,9% khối lượng. "Chất mang dược

dụng" chỉ chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược bất kỳ mà có thể tương hợp với các thành phần khác của chế phẩm và không có hại cho người sử dụng.

Chế phẩm trị sốt rét theo sáng chế và hợp chất có hiệu lực có nguồn gốc từ quả la hán và/hoặc lá cỏ ngọt Stevia có thể được sử dụng kết hợp với chất mang chấp nhận được. Hoạt chất trong các chế phẩm này có thể chiếm từ 1% khối lượng đến 99% khối lượng, hoặc theo cách khác, từ 0,1% khối lượng đến 99,9% khối lượng. "Chất mang chấp nhận được" chỉ chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược bất kỳ mà có thể tương hợp với các thành phần khác của chế phẩm và không có hại cho người sử dụng.

Hệ vận chuyển

Dạng định liều thích hợp bao gồm viên dẹt, viên con nhộng, dung dịch, huyền phù, bột, gôm và kẹo. Hệ vận chuyển dưới lưỡi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, miếng hòa tan ở dưới và trên lưỡi, giọt chất lỏng và đồ uống. Màng ăn được, polyme ưa nước, màng hòa tan qua đường miệng hoặc băng hòa tan qua đường miệng có thể được sử dụng. Hệ vận chuyển hữu ích khác bao gồm loại phun vào miệng hoặc vào mũi hoặc loại hít, và loại tương tự.

Khi sử dụng qua đường uống, chất có hoạt tính có thể được kết hợp với một hoặc nhiều thành phần không hoạt tính dạng rắn để điều chế viên dẹt, viên con nhộng, viên tròn, bột, hạt hoặc dạng liều lượng thích hợp khác. Ví dụ, hoạt chất có thể được kết hợp với ít nhất một tá dược như chất độn, chất liên kết, chất giữ ẩm, chất phân rã, chất chống ẩm, chất tăng hấp thụ, chất làm ướt, chất hấp thụ hoặc chất làm trơn. Tá dược hữu dụng khác bao gồm magie stearat, canxi stearat, manitol, xylitol, chất làm ngọt, tinh bột, carboxymetylxenluloza, xenluloza vi tinh thể, silic oxit, gelatin, silic đioxit, và chất tương tự.

Đường dùng

Hợp chất có hoạt tính có thể được sử dụng bằng đường bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở sử dụng qua đường uống, dưới lưỡi, má, mắt, phổi, trực tràng, và ngoài

đường tiêu hóa, hoặc dưới dạng chất phun vào miệng hoặc vào mũi (ví dụ, hít hơi, giọt nhỏ, hoặc hạt chất rắn được hóa bụi). Sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, sử dụng qua tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong bụng, trong mũi, trong âm đạo, trong bàng quang (ví dụ, vào bàng quang), trong da, qua da, tiếp xúc hoặc dưới da. Ví dụ, thành phần hoạt tính có thể giữ trong bao để kiểm soát sự giải phóng để đưa vào lưu thông.

Việc điều trị có thể được thực hiện trong khoảng thời gian dài khi cần, trong một giai đoạn liên tục, hoặc trong các giai đoạn riêng rẽ. Bác sĩ chữa trị sẽ biết tăng, giảm, hoặc dừng chữa trị như thế nào dựa vào phản ứng của bệnh nhân. Theo một phương án, việc điều trị được thực hiện trong khoảng từ một ngày đến bảy ngày. Lịch trình điều trị có thể lặp lại khi cần.

Tóm lại, đã phát hiện ra rằng cả Reb A tinh khiết lẫn chất chiết thô từ lá cỏ ngọt Stevia có tác dụng mạnh kháng các chủng kháng thuốc đã biết của ký sinh trùng gây ra bệnh sốt rét. Cũng đã phát hiện là cả chất chiết được tinh chế lẫn chất chiết thô của quả Quả la hán -Luo Han guo có hiệu quả cao đối với các chủng kháng thuốc đã biết của ký sinh trùng gây ra bệnh sốt rét. Còn được mong đợi là hỗn hợp của Reb A và chất chiết từ quả la hán cũng có thể có tác dụng mạnh đối với các chủng kháng thuốc đã biết của ký sinh trùng gây ra bệnh sốt rét.

Theo mô tả ở trên, sáng chế đã được mô tả liên quan đến các phương án nhất định của nó, và nhiều chi tiết đã được đưa ra cho mục đích minh họa, sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng sáng chế có thể bị ảnh hưởng bởi các phương án bổ sung và các chi tiết nhất định được mô tả trong bản mô tả này có thể thay đổi đáng kể mà không trệt khỏi các nguyên tắc cơ bản của sáng chế.

Tất cả các tham chiếu được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa ra nhờ viện dẫn. Sáng chế có thể được thể hiện ở các dạng cụ thể khác mà không trệt khỏi nguyên lý hoặc các thuộc tính cơ bản của nó và, vì vậy, sự tham chiếu cần được thực hiện đối với các yêu cầu bảo hộ đính kèm hơn là đối với phần mô tả ở trên, khi đề cập đến phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét chứa lượng có hiệu quả điều trị của rebaudiosit A, lượng có hiệu quả điều trị của chất chiết quả la hán, lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm artemeter, arteether, artesunat, và dihydroartemisinin, và chất mang có thể chấp nhận được, trong đó rebaudiosit A và chất chiết quả la hán có mặt trong hỗn hợp theo tỷ lệ khối lượng là 1:1 với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 99% khối lượng của tổng chế phẩm.
2. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm mefloquin, halofantrin, artesunat, artemeter, cloquin, lumefantrin, primaquin, sulfadoxin, sulfalen, pyrimetamin, doxyxycilin, tetraxycilin, azithromyxin, proguanil, xycloguanil, dapson, artemisinin, atovoquon và hỗn hợp của chúng.
3. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét theo điểm 2, trong đó chất mang có thể chấp nhận được là chất mang được dụng.
4. Chế phẩm trị sốt rét theo điểm 2, trong đó chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường uống, ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong cơ, qua da, trong má, dưới da hoặc nhét hậu môn.
5. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét theo điểm 1, trong đó lượng có hiệu quả điều trị của rebaudiosit A là nằm trong khoảng từ 10 mg đến khoảng 500 mg, và lượng có hiệu quả điều trị của chất chiết quả la hán là nằm trong khoảng từ 10 mg đến khoảng 500 mg.
6. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được bào chế để dùng qua dùng qua đường uống, dưới lưỡi, trong má, trong mũi, ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong da, qua da và dưới da.
7. Chế phẩm dùng để điều trị bệnh sốt rét theo điểm 1, trong đó chất mang là tá dược được chọn từ nhóm bao gồm xenluloza vi tinh thể, magie stearat, canxi stearat, mannitol và xylitol.

Đường cong liều lượng – phản ứng

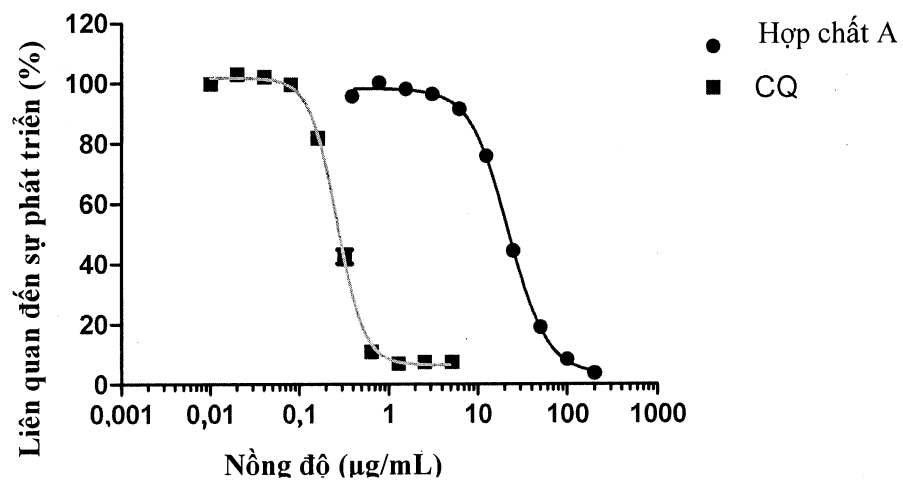


FIG. 1

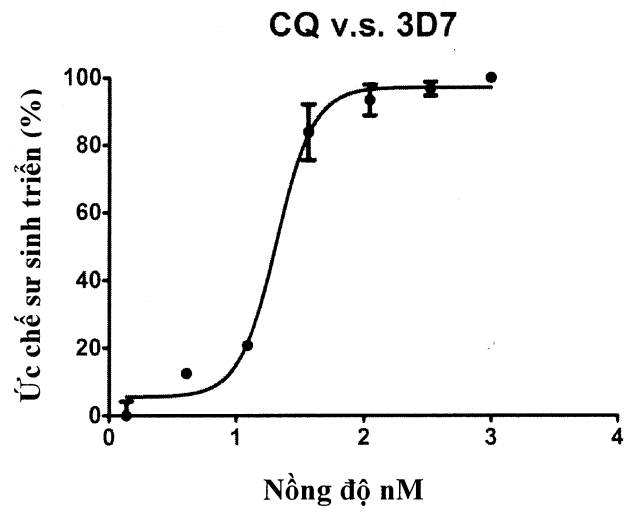


FIG. 2

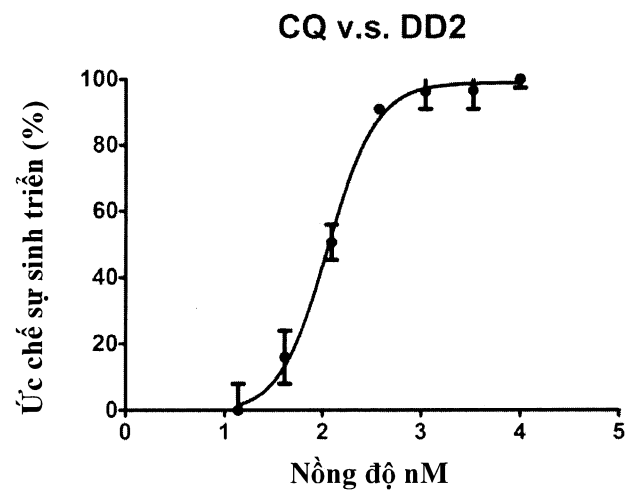


FIG. 3