



(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)



1-0035262

(51)⁸ A61K 9/08; A61K 47/18; A61K 9/00

(13) B

(21) 1-2018-03517

(22) 24/02/2017

(86) PCT/EP2017/054325 24/02/2017

(87) WO 2017/144659 31/08/2017

(30) 1603280.7 24/02/2016 GB

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/01/2019 370A

(73) FERRING B.V. (NL)

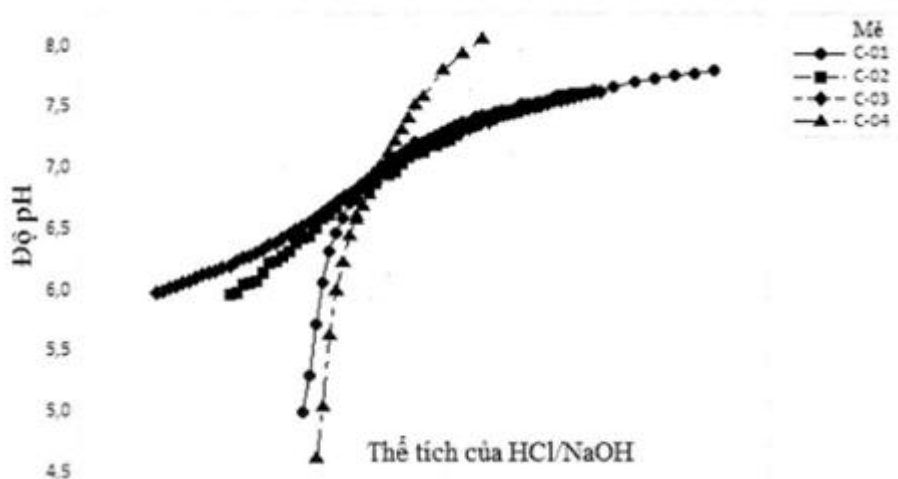
Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, Netherlands

(72) SJÖGREN, Helen Ulrika (SE); HØJER-PEDERSEN, Charlotte (DK).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) DƯỢC PHẨM DẠNG LỎNG CHỨA GONADOTROPIN VÀ PHƯƠNG PHÁP
LÀM ỔN ĐỊNH DƯỢC PHẨM DẠNG LỎNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm gonadotropin, cụ thể là dược phẩm dạng lỏng chứa gonadotropin và phương pháp làm ổn định dược phẩm dạng lỏng chứa hMG. Phương pháp làm ổn định được thực hiện bằng cách kết hợp riêng biệt các tá dược, tốt hơn là arginin và metionin. Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm này không chứa chất đệm.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm gonadotropin, cụ thể là dược phẩm gonadotropin dạng lỏng và phương pháp làm ổn định dược phẩm dạng lỏng này. Phương pháp làm ổn định thu được bằng cách kết hợp riêng biệt các tá dược, tốt hơn là arginin và metionin. Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm này không chứa chất đệm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gonadotropin là họ hormon, về cơ bản và chủ yếu liên quan đến chu kỳ sinh sản ở giống cái và giống đực. Gonadotropin có thể được lấy từ nước tiểu với cả hai mục đích nghiên cứu lẫn điều trị bệnh, tuy nhiên, một vài gonadotropin như, ví dụ, hCG, LH và FSH, cũng có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

Cụ thể là, gonadotropin có thể được sử dụng để điều trị vô sinh.

Tất cả bốn gonadotropin chính đều thuộc cùng một họ glycoprotein. Chúng là hormon kích thích nang trứng (follicle stimulating hormone- FSH), hormon kích thích tuyến giáp (thyroid stimulating hormone - TSH), hormon tạo hoàng thể (luteinizing hormone - LH) và gonadotropin kích thích tổ màng đệm (chorionic gonadotropin - hCG) (của người). Tất cả các gonadotropin này đều là đime khác loại và được cấu thành bởi cấu trúc siêu phân tử alpha và beta; cấu trúc siêu phân tử alpha là cấu trúc phổ biến trong số tất cả các cấu trúc, tức là, tương tự như tất cả bốn gonadotropin nêu trên, trong khi đó cấu trúc siêu phân tử beta lần lượt là khác nhau. Tác dụng của FSH được tạo ra bởi thụ thể FSH riêng biệt. Các chuỗi beta của LH và HCG đều có mức độ tương đồng trình tự protein là 82% và chúng tác động thông qua cùng một thụ thể LH.

FSH được tiết theo cách tự nhiên bởi thùy trước tuyến yên và có chức năng trợ giúp sự phát triển của nang trứng và sự rụng trứng. FSH chứa cấu trúc siêu phân tử alpha gồm 92 axit amin, cấu trúc này cũng phổ biến đối với các hormon glycoprotein khác, ví dụ, LH và hCG, và cấu trúc siêu phân tử beta gồm 111 axit amin chỉ có ở FSH, có tính đặc hiệu sinh học của hormon này (Pierce and Parsons, 1981, Glycoprotein hormones:

structure and function, *Ann Rev Biochem.*, 50: 465-495). Cấu trúc siêu phân tử beta hoàn chỉnh của hCG bao gồm 145 axit amin. Mỗi cấu trúc siêu phân tử trong FSH và hCG được cải biến sau dịch mã bằng cách bổ sung các gốc hydrat cacbon phức tạp. Đối với FSH, cả hai cấu trúc siêu phân tử này đều mang hai vị trí để gắn với glycan được liên kết bởi N, cấu trúc siêu phân tử alpha ở các axit amin 52 và 78 và cấu trúc siêu phân tử beta ở các gốc axit amin 7 và 24 (Rathnam and Saxena, (1975) *Primary amino acid sequence of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit*, *J Biol Chem.* 250 (17):6735-6746; Saxena and Rathnam, (1976) *amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands*, *J Biol Chem.* 251(4): 993-1005)). Do đó, FSH được glycosylat hóa tới khoảng 30% khối lượng (Dias and Van Roey, (2001) *Structural biology of human follitropin and its receptor*. *Arch Med Res.* 32(6): 510-519; Fox et al. (2001) *Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone*. *Mol Endocrinol.* 15(3), 379-89). Cấu trúc siêu phân tử beta của hCG có cả sự glycosyl hoá bởi N lẫn O (N-13, N-30, O-121, O-127, O-132 và O-138). Quá trình ngoại glycosyl hóa trong cấu trúc siêu phân tử beta của hCG khiến nó ưa nước hơn so với cấu trúc siêu phân tử beta của FSH. Cấu trúc siêu phân tử β tạo ra tính đặc hiệu với tương tác thụ thể.

Gonadotropin được lấy từ nước tiểu được sử dụng trên lâm sàng trong hơn 40 năm và tính an toàn của chúng đã được biết rõ. Các thể hệ mới của gonadotropin được lấy từ nước tiểu được tinh chế ở mức độ cao (highly purified - HP) so với thể hệ thứ nhất đã được giới thiệu từ lâu. Độ tinh khiết gia tăng thu được bằng cách bổ sung các bước tinh chế khác, như các bước sắc ký trao đổi anion và sắc ký tương tác kỵ nước để loại bỏ protein có trong nước tiểu không có hoạt tính sinh học FSH và/hoặc LH. Độ tinh khiết của dược phẩm gonadotropin thể hệ mới được gia tăng đáng kể tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu toàn diện hơn nhằm cung cấp thông tin bổ sung về dược phẩm này.

FSH từ nước tiểu đã được tinh chế và menotropin của phụ nữ mãn kinh (human menopausal menotropin - hMG) đều được tách ra từ nước tiểu của phụ nữ sau mãn kinh đã được sử dụng trong nhiều năm để điều trị vô sinh nhằm gây rụng trứng (đơn) hoặc kích thích đa nang trứng ở bệnh nhân đã được kích thích buồng trứng có kiểm soát (controlled ovarian stimulation - COS) trước các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (assisted reproduction technology - ART). Hai phiên bản FSH tái tổ hợp là Gonal-F® (follitropin alH a, Merck Serono) và Puregon®/Follistim® (follitropin beta, Merck) đã có bán trên

thị trường từ giữa những năm 1990. Cả hai sản phẩm này đều được biểu hiện trong các dòng tế bào của buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO) (Howles, C.M. (1996), *genetic engineering of human FSH (Gonal-f)*, *Hum Reprod. Update*, 2: 172-191).

Các tế bào CHO thường được sử dụng để sản xuất được phẩm protein tái tổ hợp. Việc phân tích cấu trúc đã xác định được rằng axit sialic được gắn chuyên biệt bởi liên kết $\alpha 2,3$. Nhiều glycoprotein của người chứa hỗn hợp gồm cả liên kết $\alpha 2,3$ lẫn liên kết $\alpha 2,6$ đối với các gốc axit sialic. Do đó, các protein tái tổ hợp đã được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ CHO sẽ khác so với các protein tự nhiên của chúng trong các loại liên kết axit sialic tận cùng của chúng.

Bệnh vô sinh

Trong bản mô tả này, "bệnh vô sinh" được xác định là khả năng suy giảm hoặc không có khả năng thụ thai và có con. phụ nữ có khả năng mang thai nhưng sau đó bị sảy thai nhiều lần cũng được gọi là bị vô sinh. Bệnh vô sinh cũng được xác định theo các thuật ngữ cụ thể là không có khả năng thụ thai sau một năm quan hệ tình dục bình thường mà không dùng biện pháp tránh thai. Bệnh vô sinh có thể do nhiều nguyên nhân gây ra. Các nghiên cứu đã cho thấy rằng dưới một nửa trường hợp vô sinh là do tình trạng bệnh lý của nữ giới gây ra. Các trường hợp còn lại gây ra bởi các rối loạn tinh dịch và các yếu tố chưa được lý giải. Hiện nay, đã có một số phương pháp điều trị vô sinh.

Các phương pháp này là quan hệ tình dục được định theo thời điểm, sử dụng các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART), quản lý y tế về bệnh lạc nội mạc tử cung, gây rụng trứng (ovulation induction - OI), u xơ tử cung và rối loạn chức năng sinh dục nữ (female sexual dysfunction - FSD), và phẫu thuật để điều chỉnh bất thường.

Trong kỹ thuật hỗ trợ sinh sản và gây rụng trứng, thuốc được sử dụng để kích thích sự rụng trứng. Tiếp sau FSH là đáp ứng chủ yếu cho việc kích thích buồng trứng, các được phẩm gonadotropin có thể chứa LH và/hoặc hCG.

Một số thuốc khác nhau chứa hormon gonadotropin được lấy từ nước tiểu của phụ nữ mang thai hoặc sau mãn kinh hiện được sử dụng trong thực hành lâm sàng để điều trị vô sinh, như được phẩm HMG (gonadotropin của phụ nữ mãn kinh) có hoạt tính sinh học chứa FSH và LH với tỷ lệ 1:1 (ví dụ, xem USP phiên bản 35, chuyên đề về menotropin),

cũng như các dược phẩm chỉ có hoạt tính sinh học của FSH. Từ 1995 trở về trước, các sản phẩm gonadotropin được sản xuất bởi kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã có bán trên thị trường.

Do đó, điều quan trọng là tạo ra các dược phẩm ổn định chứa các hợp chất gonadotropin này, ở dạng riêng lẻ hoặc hỗn hợp.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm, cụ thể là dược phẩm lỏng chứa một hoặc nhiều gonadotropin, đặc biệt là dược phẩm ổn định chứa hCG, tùy ý ở dạng kết hợp với FSH. Mục đích tiếp theo của sáng chế là đề xuất phương pháp làm ổn định các dược phẩm này. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm này mà ổn định trong 12 tháng, tốt hơn là trong 24 tháng, còn tốt hơn nữa là trong 24 tháng ở điều kiện bảo quản cộng thêm 1 tháng “khi sử dụng”, tức là ở nhiệt độ phòng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất dược phẩm gonadotropin dạng lỏng ổn định. Theo một phương án được ưu tiên, các dược phẩm này chứa hCG. Cũng theo các phương án được ưu tiên, dược phẩm này chứa cả FSH lẫn hCG. Tốt hơn nếu gonadotropin trong các dược phẩm theo sáng chế được lấy từ nước tiểu hoặc từ huyết tương, nhưng theo một phương án khác, nó được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Đường cong chuẩn độ. Độ nghiêng của đường cong này thể hiện độ đậm, ví dụ, sườn dốc đứng mô tả độ đậm kém.

Fig. 2: Đáp ứng tối ưu dựa trên các kết quả ở 25°C. Các đường thẳng đứng thể hiện nồng độ L-arginin và L-metionin và các đáp ứng trong thử nghiệm miễn dịch FSH và hCG là Y (tính theo IU/ml). R^2_{HCG} : 92,15% và R^2_{FSH} : 67,31%.

Tất cả các nghiên cứu được xác nhận bằng dữ liệu thực theo thời gian bổ sung.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, thuật ngữ “hMG” được sử dụng thay thế cho “gonadotropin được lấy từ nước tiểu”. Hầu hết gonadotropin được lấy từ nước tiểu là gonadotropin được lấy từ nước tiểu của người.

Gonadotropin kích thích tổ màng đệm của người (hCG) góp phần tạo ra hoạt tính của LH (hormon tạo hoàng thể), phù hợp với hướng dẫn sử dụng thuốc hiện đã được phê chuẩn. Điều này là đã biết và được mô tả là một phần SmPC (tóm tắt mô tả sản phẩm) của dược phẩm hMG như sản phẩm Menopur[®], được pH ép đối với các chỉ định như hiện được yêu cầu bảo hộ. Menopur[®] - trong các SmPC – có hoạt tính FSH và LH, mà còn xác nhận rằng hCG đáp ứng với ít nhất một phần hoạt tính LH. Do đó, sự vi phạm dẫn bất kỳ tới hCG trong bản mô tả sáng chế bao hàm các dược phẩm mà có hoạt tính LH mà có thể được gán cho hCG.

Các phương án được ưu tiên bao gồm các phương án sau:

1. Dược phẩm gonadotropin ở dạng lỏng, chứa gonadotropin, arginin với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 160mM, và metionin với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1,5mg/ml, trong đó dược phẩm này không chứa chất đệm bổ sung, và trong đó độ pH của dược phẩm này nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5.
2. Dược phẩm theo mục 1, trong đó gonadotropin này chứa hCG (gonadotropin kích thích tổ màng đệm của người), và tùy ý chứa FSH và/hoặc LH.
3. Dược phẩm theo mục 1 hoặc 2, trong đó gonadotropin này chứa hMG (gonadotropin của phụ nữ mãn kinh).
4. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, trong đó gonadotropin (như FSH, LH và/hoặc hCG) có nguồn gốc từ người và lấy từ nước tiểu.
5. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 3, trong đó gonadotropin này (như FSH, LH và/hoặc hCG) là tái tổ hợp.
6. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, còn chứa chất bảo quản, tốt hơn là phenol.
7. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, còn chứa chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là polysorbat, còn tốt hơn nữa là Polysorbat 20.
8. Dược phẩm theo mục 6 hoặc 7, trong đó chất bảo quản, tốt hơn là phenol, có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 6mg/ml, tốt hơn nếu với lượng là 5mg/ml.

9. Dược phẩm theo mục 7 hoặc 8, trong đó chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là Polysorbat 20, có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,05mg/ml, tốt hơn nếu với lượng là 0,005mg/ml.

10. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó tốt hơn nếu arginin này là L-arginin HCl.

11. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó hMG có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 300 đến 900, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 500 đến 700, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 600 đến 650, tốt hơn nữa là 625IU/ml.

12. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó dược phẩm này được cấu thành bởi

- 625IU/ml hMG
- 0,15mg/ml metionin
- 150mM arginin
- 5mg/ml phenol
- 0,005mg/ml Polysorbat 20
- Nước dùng để tiêm (water for injection - WFI), và
- trong đó dược phẩm này có độ pH là 6,8+/-0,3.

13. Dược phẩm dạng lỏng như được mô tả trong mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, để dùng trong phương pháp điều trị vô sinh.

14. Dược phẩm để dùng theo mục 13, trong đó phương pháp điều trị là phương pháp điều trị gây rụng trứng (OI), kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART), và/hoặc bệnh thiếu năng sinh dục ở nam giới.

15. Phương pháp làm ổn định dược phẩm dạng lỏng chứa hMG, bao gồm các bước

- Lấy mẫu nước tiểu từ người phụ nữ
- Chiết hMG

- Pha trộn dịch chiết này với arginin và metionin, với lượng như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên,
- Tùy ý còn bổ sung phenol và polysorbat vào với lượng như được xác định theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên,
- Điều chỉnh độ pH để tạo ra được phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5,
- trong đó không bổ sung chất đệm nào.

Như được mô tả trên đây, gonadotropin, ví dụ, FSH và hCG cũng như LH là thích hợp để điều trị vô sinh. Về mặt này, rõ ràng rằng được phẩm dạng lỏng chứa các gonadotropin này có thể là không ổn định; điều này là đúng ngay cả đối với các gonadotropin mà được dự định để dùng riêng lẻ. Tính không ổn định có thể được dễ nhận thấy hơn nữa nếu được phẩm dạng lỏng này chứa chất bảo quản, ví dụ, được kê đơn đối với tất cả các được phẩm đa liều.

Được phẩm theo sáng chế có thể lần lượt được dự định để dùng một lần hoặc để dùng nhiều lần.

FSH đã được bào chế trong được phẩm theo sáng chế có thể là FSH lấy từ nước tiểu hoặc lấy từ huyết tương hoặc FSH tái tổ hợp (rFSH). Theo một phương án được ưu tiên, FSH này là FSH từ nước tiểu hoặc rFSH; đặc biệt tốt hơn nếu nó là FSH từ nước tiểu.

Như đã nêu trên đây, hiện nay có thể tạo ra các gonadotropin, như FSH, LH hoặc hCG tái tổ hợp. Do đó, trong bản mô tả này việc viện dẫn tới gonadotropinnói chung thường bao gồm gonadotropin được lấy từ nước tiểu hoặc lấy từ huyết tương cũng như gonadotropin tái tổ hợp, trừ khi có quy định cụ thể. Do đó, ví dụ, việc viện dẫn tới "FSH" cũng bao hàm rFSH. Sự sản xuất và trình tự axit amin cũng như trình tự axit nucleic của FSH, hCG và LH là đã biết đối với chuyên gia có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các trình tự dưới đây có thể được sử dụng trong bản mô tả theo sáng chế:

Cấu trúc siêu phân tử alpha của FSH, LH và hCG (SEQ ID NO:1)

(xem thêm Fiddes, J.C. and Goodman, H.M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones J. Mol. Appl. Genet. 1 (1), 3-18 (1981))

MDYYRKYAAIFLVTLSVFLHVLHSAPDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQC
MGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTA
CHCSTCYHKS (phần được gạch dưới là peptit dẫn đầu) (116)

Cấu trúc siêu phân tử beta của FSH (SEQ ID NO:2)

(xem thêm Saxena, B.B. and Rathnam, P. Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands *J. Biol. Chem.* 251 (4), 993-1005 (1976))

MKTLQFFFFLECCWKAICCNSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYCYTR
DLVYKDPARPKIQKTCTFKELVYETVRVPGCAHHADSLYTYPVATQCHCGKCDS
DSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE (phần được gạch dưới là peptit dẫn đầu) (129)

Cấu trúc siêu phân tử beta của hCG (SEQ ID NO:3)

(xem thêm Fiddes, J.C., Goodman H.M. The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region *Nature*. 1980 Aug 14;286(5774):684-7)

MEMFQGLLLLLLLSMGGTWASKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN
TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV
SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPPSLPS
PSRLPGPSDT PILPQ (phần được gạch dưới là peptit dẫn đầu) (165)

Cấu trúc siêu phân tử beta của LH (SEQ ID NO:4)

(xem thêm Sairam, M.R. and Li, C.H. Human pituitary lutropin. Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of the beta-subunit *Biochim. Biophys. Acta* 412 (1), 70-81 (1975))

MEMLQGLLLLLLLSMGGAWASREPLRPWCH PINAILAVEKEGCPVCITVN
TTICAGYCPTMMRVLQAVLPPLPQVVCTYRDVRFESIRLP GCPRGVDPVVSFPVA
LSCRCGPCRRSTSDC GGPKDHPLTC DHPQLSGLLFL (phần được gạch dưới là peptit dẫn đầu) (141)

Theo một phương án khác, rFSH hoặc rHCG theo tất cả các phương án lần lượt là rFSH hoặc rhCG có tác dụng kéo dài. Các dược phẩm FSH có tác dụng kéo dài có thể thu

được, ví dụ, như đã biết đối với chuyên gia có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách cải biến phân tử FSH hoặc bằng cách cải biến dược phẩm này.

Do đó, “FSH” như được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm tất cả các dạng có thể lấy từ nước tiểu hoặc dạng tái tổ hợp chứa FSH nêu trên cũng như tất cả các dạng kết hợp có thể có chứa FSH. Sáng chế cũng bao hàm dược phẩm để dùng một lần và một hoặc nhiều dược phẩm khác (của gonadotropin cùng loại hoặc gonadotropin khác loại) để dùng nhiều lần.

Một sản phẩm có thể có có thể là dược phẩm chứa FSH (theo một phương án được ưu tiên cũng chứa hCG, và/hoặc tùy ý LH, hoạt tính LH v.v.), tất cả chúng được chứa trong đồ chứa khác nhau. Hoạt tính LH, nếu có, có thể có nguồn gốc từ LH hoặc hCG. LH có thể được thay thế bằng hCG với lượng tương đương và ngược lại; “lượng tương đương” trong bản mô tả này có thể được tính toán như đã biết trong lĩnh vực này.

Dạng kết hợp gonadotropin được đặc biệt ưu tiên là dạng kết hợp của FSH và hCG, tốt hơn là dược phẩm hMG được chứa trong một đồ chứa, nhưng tùy ý cũng được chứa trong đồ chứa khác nhau chẳng hạn, ví dụ, lọ hoặc hộp.

Dạng kết hợp có thể có mặt, mà có thể cũng được tạo ra trong các đồ chứa khác nhau, còn chứa: (u)FSH và uhCG hoặc uFSH và uLH từ nước tiểu; ngoài ra còn chứa (rhCG hoặc rLH hoặc rFSH) và (uhCG hoặc uLH hoặc rhCG hoặc rLH), và tất cả các dạng thay thế có thể có của chúng. Theo một phương án rất được ưu tiên, dược phẩm theo sáng chế chứa FSH và hCG. Theo một phương án được ưu tiên tương tự khác, dược phẩm theo sáng chế chứa hCG.

Dược phẩm gonadotropin theo sáng chế là dược phẩm lỏng. Tốt hơn nếu dược phẩm này có thể được dùng để tiêm. Các dược phẩm có thể được cấp ở dạng sản phẩm chứa một, hai hoặc nhiều dược phẩm bao gồm FSH hoặc FSH /hCG, và/hoặc LH, để dùng riêng rẽ hoặc dùng cùng nhau. Nếu được dùng riêng rẽ, có thể dùng theo thứ tự. Sản phẩm có thể được cung cấp trong gói thích hợp bất kỳ. Ví dụ, sản phẩm có thể bao gồm nhiều xi lanh đã được nạp sẵn, mỗi xi lanh này bao gồm FSH (dược phẩm FSH), hoặc hCG khác (dược phẩm hCG), ví dụ, trong đó các xi lanh này có thể được gói trong gói bao bì xộp hoặc các chất liệu khác để duy trì mức độ vô trùng. Sản phẩm có thể tùy ý bao gồm hướng dẫn sử dụng để dùng dược phẩm gonadotropin này.

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm gonadotropin theo sáng chế được tạo ra ở dạng dược phẩm đa liều. Tuy nhiên, sáng chế rõ ràng cũng đề cập đến dược phẩm được dự định để dùng một lần. Sáng chế cũng đề cập đến việc làm ổn định dược phẩm như một phần của bộ kit. Bộ kit này bao gồm ít nhất một đồ chứa bao gồm một hoặc nhiều liều lượng hằng ngày của gonadotropin, ví dụ, FSH, hoặc ví dụ, hai đồ chứa (ví dụ, lọ nhỏ), mỗi đồ chứa này chứa gonadotropin khác nhau như hCG, và ví dụ, các hướng dẫn sử dụng khác (ví dụ, để dùng) và ví dụ, các đồ chứa dùng để tiêm. Theo một phương án được ưu tiên, bút tiêm để tiêm nhiều lần được sử dụng, nhờ đó dung dịch gonadotropin được nạp vào hộp tương ứng. Các hoạt chất này có thể nằm trong các hộp khác nhau, nhưng đương nhiên có thể được tiêm đồng thời, hoặc theo thứ tự, là đã biết đối với chuyên gia có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, hai hoặc nhiều hoạt chất có thể nằm trong một hộp và hộp tương tự.

Theo một phương án rất được ưu tiên, dược phẩm theo sáng chế là để dùng ngoài đường ruột, còn tốt hơn nữa là dùng để tiêm dưới da.

Theo một phương án được ưu tiên, hMG có mặt trong dược phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 35 đến 850IU/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 800IU/ml, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 700IU/ml, tốt nhất là 625IU/ml, thường trong dược phẩm đa liều.

Dược phẩm được đặc biệt ưu tiên chứa các tá dược đối với dược phẩm đa liều chứa hMG như nêu trên, và/hoặc chứa hMG, và/hoặc hCG, và/hoặc tất cả các gonadotropin khác như được nêu theo sáng chế, chứa các thành phần sau:

50– 160mM arginin HCl, tốt hơn là 150mM arginin HCl

L-metionin với lượng nằm trong khoảng 0,05 - 1,5mg/ml, tốt hơn là 0,15mg/ml

Polysorbat 20 với lượng nằm trong khoảng 0,001 – 0,05mg/ml, tốt hơn là 0,005mg/ml

phenol với lượng nằm trong khoảng 4,0 đến 6,0mg/ml, tốt hơn là 5,0mg/ml

độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, tốt hơn là độ pH bằng 6,8+/-0,3, (độ pH được dùng để chỉ độ pH của toàn bộ dung dịch).

WFI.

Các nồng độ thông thường của hoạt chất này đối với các dược phẩm chứa hCG và/hoặc FSH tái tổ hợp là như dưới đây, mặc dù nồng độ của hoạt chất này không ảnh hưởng bất kỳ tới tính năng của sáng chế :

Đối với rFSH : 30 – 150 µg/ml

Đối với rhCG : 5 – 200 µg/ml

Các tá dược được ưu tiên đối với các dược phẩm tái tổ hợp này là tương tự như được mô tả trên đây đối với dược phẩm hMG đa liều. Dược phẩm đơn liều thông thường cũng được bao hàm trong sáng chế và có thể là tương tự như được mô tả trên đây, chỉ khác là chúng không chứa chất bảo quản như phenol.

Dạng thuốc tác dụng chậm dùng để tiêm có thể được tạo ra bằng cách tạo ra vi nền bao nang trứng chứa gonadotropin (và các chất khác, nếu có) trong polyme dễ bị vi sinh vật phân hủy. Dạng thuốc tác dụng chậm trên nền polyme/hệ giải phóng kéo dài có thể phụ thuộc vào bản chất hóa học của chúng, ví dụ, là vi hạt hoặc hạt nano, hydrogel, mixen, nhũ tương hoặc vật cấy ghép. Tùy thuộc vào tỷ lệ của gonadotropin và polyme và bản chất của polyme cụ thể được sử dụng, tỷ lệ giải phóng gonadotropin có thể được kiểm soát. Ví dụ về polyme dễ bị vi sinh vật phân hủy bao gồm hệ copolyme polylactit/polyglycolit, polyvinylpyrrolidon, poly(orthoeste), poly(anhydrit), poly(etylen glycol), poly axit amin, polysacarit, ví dụ, natrihyaluronat (NaHA) hoặc các muối khác của chúng, gelatin, chitosan v.v... Tất cả các polyme nêu trên có thể có nguồn gốc từ hoặc được cải biến để tối ưu hóa quá trình phân phối dược chất protein hoặc độ ổn định của nó. Dược phẩm tác dụng chậm dùng để tiêm cũng được điều chế bằng cách bẫy gonadotropin trong hệ lipid, hoặc hỗn hợp polyme lipid như mixen, liposom hoặc vi nhũ tương là tương hợp với các mô trong cơ thể.

Dược phẩm dùng để tiêm có thể được khử trùng, ví dụ, bằng cách lọc qua thiết bị lọc giữ vi khuẩn, và/hoặc bằng cách đưa chất tiệt trùng vào. Có thể tạo ra dược phẩm rắn vô trùng mà có thể được hòa tan hoặc phân tán trong nước vô trùng hoặc môi trường tiêm vô trùng khác ngay trước khi sử dụng. Dược phẩm dùng để tiêm có thể được cấp trong đồ chứa thích hợp bất kỳ, ví dụ, lọ nhỏ, xi lanh nạp sẵn, hộp tiêm, và đồ chứa tương tự, như được mô tả trên đây.

Độ pH và nồng độ phần chiết của các hợp phần khác nhau của dược phẩm để dùng ở dạng dược phẩm như được nêu trong bản mô tả này chủ yếu được điều chỉnh theo thực hành thông thường trong lĩnh vực này, ví dụ, xem Sách giáo khoa về thuốc (The textbook of Pharmaceutical Medicine), xuất bản lần thứ năm, được biên soạn bởi John P. Griffin và John O'Grady. Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm theo sáng chế được cấp ở dạng dược phẩm dùng ngoài đường ruột. Các phương pháp chung để bào chế dược phẩm dùng ngoài đường ruột là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, trước đây, ở các trang 780-820. Dược phẩm dùng ngoài đường ruột có thể được cấp ở dạng dược phẩm lỏng hoặc ở dạng chất rắn, được trộn với môi trường tiêu hóa ngay trước khi dùng. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, dược phẩm dùng ngoài đường ruột được cấp ở dạng đơn vị liều để dễ dùng và đồng đều về liều lượng.

FSH, hCG và/hoặc LH được bào chế theo sáng chế có thể được lấy ra theo các cách thông thường từ nước tiểu, như đã biết trong lĩnh vực này, hoặc có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Đối với các phương pháp sản xuất có thể có, có thể tham khảo thêm trong, ví dụ, WO 2009/127826.

Một phương án được ưu tiên theo sáng chế là dược phẩm chứa hCG được mô tả theo sáng chế.

hCG có thể thu được bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. hCG như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm hCG lấy từ nước tiểu và hCG tái tổ hợp. Dược phẩm chứa hCG lấy từ nước tiểu được đặc biệt ưu tiên. Dược phẩm có - ít nhất một phần - hoạt tính LH có nguồn gốc từ hCG (theo cách khác: hCG là phân tử góp phần tạo ra hoạt tính LH này) cũng được bao hàm. HCG có nguồn gốc từ người có thể được tinh chế từ nguồn thích hợp bất kỳ (ví dụ, nước tiểu và/hoặc nhau thai) bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp biểu hiện và tinh chế hCG tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực này.

LH có thể thu được bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. LH, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm LH có nguồn gốc từ người và LH tái tổ hợp. LH có nguồn gốc từ người có thể được tinh chế từ nguồn thích hợp bất kỳ (ví dụ, nước tiểu) bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp biểu hiện và tinh chế LH tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “được phẩm” trong bản mô tả này được sử dụng thay thế cho “được phẩm được”.

Được phẩm ổn định theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị vô sinh. “Điều trị vô sinh” trong bản mô tả theo sáng chế này bao gồm việc điều trị vô sinh bằng cách (siêu) kích thích buồng trứng có kiểm soát (COS) hoặc các phương pháp bao gồm bước hoặc giai đoạn kích thích buồng trứng có kiểm soát, ví dụ, thụ tinh trong tử cung (Intra Uterine Insemination - IUI), thụ tinh trong ống nghiệm (*in vitro* fertilisation - IVF), hoặc tiêm tinh trùng vào noãn (intracytoplasmic sperm injection - ICSI). Thuật ngữ này cũng bao gồm việc gây rụng trứng (OI) hoặc các phương pháp bao gồm bước hoặc giai đoạn rụng trứng. Thuật ngữ này cũng bao gồm việc điều trị vô sinh ở đối tượng bị tắc ống dẫn trứng hoặc bệnh vô sinh vô căn, bao gồm việc điều trị vô sinh ở đối tượng bị bệnh lạc nội mạc tử cung, ví dụ, bệnh lạc nội mạc tử cung giai đoạn I hoặc giai đoạn II (như được xác định bởi hệ phân loại của Hiệp hội Y học sinh sản Hoa kỳ (the American Society for Reproductive Medicine) đối với các giai đoạn khác nhau của bệnh lạc nội mạc tử cung, Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, Fertil Steril 1997; 67, 817-821), và/hoặc ở đối tượng cùng với đối tác bị bệnh vô sinh nam giới. Tốt hơn nếu thuật ngữ này bao gồm việc sử dụng trong, ví dụ, kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART), gây rụng trứng (OI) hoặc thụ tinh trong tử cung (IUI). Được phẩm này có thể được sử dụng, ví dụ, trong hướng dẫn sử dụng thuốc trong đó các được phẩm FSH đã biết hoặc các được phẩm chứa FSH và hCG được sử dụng. Theo một phương án thông thường, trong trường hợp được lấy làm ví dụ, được phẩm theo sáng chế được sử dụng đối với các hướng dẫn sử dụng thuốc tương tự như hướng dẫn sử dụng được phê chuẩn đối với Menopur®, ở Châu Âu, là như sau:

Điều trị bệnh vô sinh ở nữ giới và nam giới:

- phụ nữ không rụng trứng: MENOPUR có thể được sử dụng để kích thích sự phát triển nang trứng ở bệnh nhân mất kinh nguyệt. Clomiphen (hoặc chất gây rụng trứng tương tự ảnh hưởng tới cơ chế phản hồi steroid) là thuốc điều trị được ưu tiên cho phụ nữ bị nhiều rối loạn chu kỳ kinh nguyệt, bao gồm thiếu năng hoàng thể cùng với chu kỳ không rụng trứng và prolactin bình thường, và cũng như bệnh nhân mất kinh nguyệt có dấu hiệu của sự sản sinh oestrogen nội sinh nhưng nồng độ prolactin bình thường và

nồng độ gonadotropin bình thường. Sau đó, những người không đáp ứng được chọn để trị liệu bằng menotrophin.

- phụ nữ rụng trứng quá nhiều trong chương trình hỗ trợ thụ thai: MENOPUR có thể được sử dụng để giúp phát triển nhiều nang trứng ở bệnh nhân đã dùng kỹ thuật hỗ trợ thụ thai như kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (IVF).

- Bệnh thiếu năng sinh dục ở nam giới: MENOPUR có thể được dùng kết hợp với gonadotropin kích thích tổ màng đệm của người (ví dụ, Choragon) để kích thích sự sinh tinh.

hoặc hướng dẫn sử dụng như được phê chuẩn đối với Menopur® ở Mỹ là như sau: Sự phát triển đa nang trứng và thai kỳ ở phụ nữ trong thời kỳ rụng trứng là một phần của chu kỳ kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART).

Ngoài ra, các lựa chọn điều trị bằng Menopur® có thể được mô tả như sau:

MENOPUR được chỉ định để điều trị vô sinh trong các tình huống lâm sàng sau:

Không rụng trứng, bao gồm bệnh đa u nang trứng buồng trứng (polycystic ovarian disease - PCOD) ở phụ nữ không đáp ứng với việc điều trị bằng clomiphenxitrat.

Sự kích thích buồng trứng quá mức có kiểm soát để phát triển đa nang trứng đối với các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART) (ví dụ, thụ tinh trong ống nghiệm/chuyển phôi (IVF/ET), chuyển giao tử qua ống dẫn trứng (gamete intra-fallopian transfer GIFT) và tiêm tinh trùng vào noãn (ICSI)).

Việc kích thích sự phát triển nang trứng ở phụ nữ bị bệnh thiếu năng sinh dục.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng được phẩm gonadotropin ổn định được nêu trong bản mô tả này (theo các khía cạnh của sáng chế) để, hoặc trong sản xuất thuốc dùng để điều trị vô sinh.

Theo một phương án được ưu tiên, được phẩm theo sáng chế được sử dụng để gây rụng trứng, cho kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART) và/hoặc cho bệnh thiếu năng sinh dục ở nam giới.

Dược phẩm này có thể được bào chế tiếp thành các dược phẩm đã biết để dùng theo đường dùng thuốc bất kỳ, ví dụ, đường miệng, trực tràng, ngoài đường tiêu hóa, da (ví dụ, kỹ thuật cao dán), tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong khoang, trong âm đạo, trong

màng bụng (IP), khu trú (bột, thuốc mỡ, hoặc thuốc nhỏ) hoặc ở dạng dùng cho má hoặc xịt vào mũi. Dược phẩm thông thường chứa chất mang dược dụng, như dung dịch nước, tá dược không độc, bao gồm muối và chất bảo quản, chất đệm và các chất tương tự như được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences, xuất bản lần thứ mười lăm (Matt Publishing Company, 1975), ở các trang từ 1405 đến 1412 và từ 1461 đến 87; và USP-NF, The National Formulary XIV, xuất bản lần thứ mười bốn (American Pharmaceutical Association, 1975), trong số các tài liệu khác. Theo một số phương án, sáng chế đề cập tới khía cạnh cụ thể của dược phẩm có độ ổn định cao đáng ngạc nhiên và các ưu điểm khác, như không có chất màu không được chấp nhận, không có độ đục không được chấp nhận, ít đau hoặc không đau khi tiêm, và ít kích ứng hoặc không kích ứng trên da khi tiêm. Điều này chỉ có thể hiện được bằng các phát hiện của sáng chế mà chứng minh được rằng các hợp phần cụ thể có thể có tính năng có lợi và độ ổn định cao của dược phẩm lỏng gonadotropin được nêu trong bản mô tả này.

Mặc dù dược phẩm gonadotropin đã có mặt trên thị trường trong một vài thập kỷ, nhưng hiện nay các nhà bào chế sẽ nhận biết được rằng dược phẩm chứa các protein này sẽ gặp nhiều khó khăn. Các khó khăn này tồn tại và thay đổi nhiều dựa vào nhiều yếu tố, như

- Thực tế là protein cần được bào chế (các protein này khó để bào chế trong trường hợp bất kỳ)
- Thực tế là protein được glycosylat hóa đặc hiệu (quá trình glycosyl hoá có thể bị ảnh hưởng bởi việc lựa chọn cụ thể quá trình sản xuất và các tá dược)
- (các) protein cụ thể được bào chế (việc bào chế hóa làm thay đổi một cách đáng kể tùy thuộc vào protein thực: ví dụ, nhận thấy rằng ngay cả khi các protein có liên quan mật thiết như FSH và hCG được xử lý khác nhau trong cùng một dược phẩm, ví dụ, xem WO 2012/013742)
- Có hoặc không có protein thu được từ tự nhiên, ví dụ, nước tiểu, hoặc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp
- Xem liệu chất bảo quản có cần thiết hay không (một số chất bảo quản đáp ứng được các mục đích đã định của chúng về việc bảo vệ chống lại sự phát triển của vi khuẩn, nhưng lại ảnh hưởng tiêu cực tới độ ổn định của thành phẩm. Điều

này là chính xác đối với tất cả các m-cresol, phenol và rượu benzylic (có hoặc không có benzalkoni clorua), mà hiện nay là các chất bảo quản tốt nhất được phép sử dụng cùng với gonadotropin; ngoài ra, các chất bảo quản có thể có ảnh hưởng tiêu cực tới màu sắc, tùy thuộc vào các tá dược khác và hoạt chất có mặt trong dược phẩm này)

- Chất hoạt động bề mặt cụ thể được sử dụng (trong một số trường hợp, chúng có thể gây đục, còn tùy thuộc vào các tá dược khác như khi có mặt trong dược phẩm tương ứng)

- Chất đệm cụ thể được sử dụng (ví dụ, dung dịch đệm xitrat thường gây đau và gây kích ứng trên da khi tiêm)

- Các tá dược cụ thể đã được sử dụng để làm ổn định, sẽ làm ổn định các dược phẩm khác nhau theo cách không thể dự đoán được.

- Tùy thuộc vào tá dược đã được sử dụng để làm ổn định sẽ làm ổn định các dược phẩm khác nhau theo cách không thể dự đoán được.

Do đó, một mặt nhà bào chế phải đối mặt với nhiều vấn đề và mặt khác cũng phải đối mặt vô số các tá dược có thể có, khiến cho vấn đề trở nên phức tạp một mặt trong việc tạo ra dược phẩm có độ ổn định tốt và mặt khác không gây đục hoặc tạo màu hoặc gây đau khi tiêm.

Do đó, đáng ngạc nhiên là khi kết hợp arginin với metionin, mà không bổ sung chất đệm sẽ giải quyết được các vấn đề cụ thể trong khoảng pH theo sáng chế.

Về mặt này, “không có bước bổ sung chất đệm/chất đệm bổ sung” và “không chứa chất đệm” được sử dụng tương đương nhau trong đơn này. Sự biểu hiện này có nghĩa rằng không có hợp chất khác nào được bổ sung vào/có mặt trong dược phẩm mà có thể được coi là có độ đệm. Dung dịch được gọi là được đệm nếu nó không làm thay đổi hoạt tính của ion trong khi bổ sung các chất vào mà kỳ vọng là làm thay đổi hoạt tính của ion đó. Chất đệm là các chất hoặc dạng kết hợp của các chất tạo ra độ bền cho dung dịch. Các dung dịch đệm là các hệ trong đó ion ở trạng thái cân bằng với các chất có khả năng loại bỏ hoặc giải phóng ion. Nó được dùng để chỉ lượng nguyên liệu mà có thể được bổ sung vào dung dịch mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính của ion. Đã xác định được rằng tỷ lệ của axit hoặc bazơ được bổ sung (tính theo đương lượng gam/l) làm thay đổi đơn vị

pH. Khả năng của dung dịch đệm được điều chỉnh theo các điều kiện sử dụng, thông thường bằng cách điều chỉnh nồng độ của các chất đệm (USP NF). Thông thường, độ đệm được biểu hiện bằng số đương lượng (Eq) của axit mạnh (ví dụ, HCl) hoặc bazơ mạnh (ví dụ, NaOH) làm cho một lít dung dịch đã nêu làm thay đổi một đơn vị pH (tốt hơn là ở một atmôtphe và 21°C) (Skoog West and Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, fifth edition). Một đương lượng HCl bằng một mol HCl và một đương lượng NaOH bằng một mol NaOH. Theo sáng chế, độ đệm được biểu hiện bằng số đương lượng (Eq) của axit mạnh (ví dụ, HCl) hoặc bazơ mạnh (ví dụ, NaOH) khiến cho một lít dung dịch đã nêu làm thay đổi một đơn vị pH. Do đó, theo sáng chế, dược phẩm không chứa chất đệm bổ sung, tạo ra $\geq 0,5 \text{ mEq}/(\text{L} \cdot \text{pH})$ (tốt hơn là ở 1 atmôtphe (100 kPa), 21°C) trong khoảng pH như được bộc lộ đối với dược phẩm theo sáng chế.

Phương pháp xác định và tính toán độ đệm

Độ đệm có thể được xác định và được tính toán như sau.

Thể tích xác định của dung dịch cần được thử nghiệm được chuẩn độ bằng axit, ví dụ, HCl hoặc bazơ, ví dụ, NaOH.

Nồng độ thích hợp của axit và bazơ, ví dụ, là 0,2N được sử dụng để chuẩn độ đủ chính xác.

Việc chuẩn độ được thực hiện bằng cách bổ sung lượng nhỏ HCl hoặc NaOH vào dung dịch thử nghiệm. Đối với mỗi lần bổ sung, thể tích bổ sung và độ pH tương ứng được chứng minh.

Thể tích tích lũy của axit và bazơ được thể hiện bằng biểu đồ theo độ pH đo được, ví dụ, xem Fig.1.

Phương pháp hồi quy tuyến tính bình phương tối thiểu được thực hiện đối với vùng pH liên quan và R^2 được tính toán để xác nhận giá trị của đường thích hợp.

Độ đệm được biểu hiện trong $\text{mEq}/(\text{lít} \times \text{đơn vị pH})$ được tính toán bởi thoái biến tuyến tính.

Đẳng thức 1

$$Y = ax + b \Leftrightarrow x = \frac{Y - b}{a}$$

Trong đó ;

X=Độ đậm [μl HCl/NaOH 0,2N để loại 1 đơn vị pH]

Y-b=1 đơn vị pH

α =vòng

và

Đẳng thức 2

$$x = \frac{(Y - b) \times C}{\alpha \times V \times 10^6}$$

Trong đó mili đương lượng là mili đương lượng của axit hoặc bazơ được đưa ra từ nồng độ, ví dụ, 0,2N HCl/NaOH bằng 0,2 đương lượng/l HCl/NaOH, bằng 200 mEq/L HCl/NaOH.

x = Độ đậm [mEq/lít×đơn vị pH]

Y-b = 1 đơn vị pH

C = Nồng độ của axit hoặc bazơ, ví dụ, đối với HCl/NaOH [$\frac{\text{mmol}}{\text{L}} = \frac{\text{mEq}}{\text{L}}$]

V = Thể tích của dung dịch được đề cập

10^6 yếu tố hiệu chỉnh từ μl thành lít

Ví dụ về việc tính toán bằng cách sử dụng *Đẳng thức 2* và mẻ C-01_{khoảng pH 6,564-6,947}, từ Bảng 9:

$$x = \frac{1 \times 200}{0,001507 \times 0,1 \times 1000000} = 1,32 \text{ mEq}/(\text{lít} \times \text{đơn vị pH})$$

Để xác định xem nếu một thành phần tạo ra $\geq 0,5$ mEq/(lít×đơn vị pH) đối với độ đậm, độ đậm được xác định như được mô tả trên đây đối với dung dịch chứa thành phần đó và đối với dung dịch tương tự mà không chứa thành phần đó. Sự khác nhau về độ đậm đã xác định đối với hai dung dịch làm cho thành phần đã nêu ảnh hưởng tới độ đậm.

Thuật ngữ “không (bổ sung chất đậm/chất đậm bổ sung)” và “không chứa chất đậm” còn có nghĩa là được phẩm theo sáng chế không chứa chất đậm bất kỳ trong số các chất đậm sau, (là chất đậm được FDA phê chuẩn để dùng ngoài đường ruột có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5):

Histidin

Phosphat

Xitrat

Trometamin (Tris)

Axit Hydroxyethylpiperazin Etan sulfonic (HEPES)

Cacbonat

Ngoài ra, các thuật ngữ cũng có nghĩa rằng không có chất đệm đã được FDA phê chuẩn khác để dùng ngoài đường ruột cũng bao gồm, cụ thể

Axetat

Axit adipic

Amonisulphat

Sucxinat

Asparagin

Axit aspartic

Glutamat (Axit glutamic)

Glyxin

Lactat

Lysin

Maleat (Axit maleic)

Fumarat (Axit fumaric)

Malat

Meglumin

Propionat

Alanin

Phenylalanin

Xystein

Isoleuxin

Leuxin

Prolin

Serin

Tartrat

Threonin

Tryptophan

Tyrosin

Valin

Nếu không bổ sung chất đệm, các tác giả sáng chế thường cho rằng độ pH của dung dịch cuối không thể được duy trì được một cách dễ dàng trong khoảng mong muốn (và sẽ khó để đạt được độ pH đích cụ thể trong quá trình điều chỉnh) (theo sáng chế, độ pH phải nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,4, tốt hơn là ở hoặc khoảng 6,8), nhưng thường độ pH này sẽ dao động trong khoảng rộng.

Việc duy trì độ pH chuẩn đối với dược phẩm là cực kỳ quan trọng. Độ pH này xác định các thông số như độ ổn định, hoạt tính và thời hạn sử dụng. Vì lý do này, dược phẩm được thường được bào chế với chất đệm. Nhiều chất đệm được bán trên thị trường và chúng được chọn nhằm hữu ích ở độ pH mong muốn. Các chất đệm được lấy làm ví dụ mà được sử dụng thường xuyên trong tất cả dược phẩm gonadotropin tồn tại trên thực tế là dung dịch đệm phosphat, và dung dịch đệm xitrat. Chất đệm cần tạo ra dược phẩm có độ pH được duy trì trong các điều kiện mà dược phẩm này có thể được tiếp xúc trong quá trình bào chế và cụ thể là trong quá trình bảo quản nó. Thường có nhiều thách thức để tìm ra các chất đệm thích hợp này, và sau đó trong một số trường hợp chất đệm hữu hiệu tạo ra dược phẩm có tác dụng phụ không mong muốn, như gây đau khi tiêm đối với dung dịch đệm xitrat. Tất cả các chất đệm đều có nhược điểm cố hữu là thành phần bổ sung trong dược phẩm làm phức tạp quy trình bào chế, gây ra nguy cơ bất lợi ảnh hưởng tới các thành phần khác, độ ổn định, thời gian sử dụng, và khả năng chấp nhận đối với người sử dụng cuối cùng.

Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra được phẩm theo sáng chế không chứa chất đệm, đồng thời các được phẩm này không có sự thay đổi bất thường bất kỳ về độ pH không được chấp nhận. Các được phẩm này chứa hợp chất làm ổn định là arginin. Arginin có thể có độ đệm kỳ vọng là ± 1 đơn vị pH xung quanh pKa của nó, bằng 2,17, 12,5 và 9,04. Do đó, khả năng không đệm được kỳ vọng ở khoảng pH được ưu tiên theo sáng chế này (ví dụ, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,4, tốt hơn là ở hoặc khoảng 6,8). Tuy nhiên, cũng đã bất ngờ phát hiện ra rằng arginin có ảnh hưởng lớn tới độ ổn định của độ pH trong được phẩm cụ thể được nêu trong bản mô tả này. Tác dụng này của arginin chưa từng được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết.

Có lợi nếu việc đưa ra được phẩm mà không có chất đệm như được xác định ở đây cũng tạo ra được phẩm ít gây đau hoặc không gây đau khi tiêm và ít gây kích ứng hoặc không kích ứng trên da khi tiêm. Điều này là trái ngược với được phẩm mà, ví dụ, gây kích ứng trên da và gây đau khi tiêm đã được nhận thấy được khi sử dụng dung dịch đệm xitrat.

Arginin theo sáng chế có thể là arginin, hoặc có thể là arginin HCl, hoặc còn tốt hơn nữa, L-arginin (HCl). Tốt hơn nếu lượng arginin nằm trong khoảng từ 50 đến 160mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 80 đến 160mM, còn tốt hơn nữa là khoảng 150mM.

Như có thể thấy từ các ví dụ dưới đây, arginin có ảnh hưởng rõ rệt đối với quá trình oxy hóa FSH và hCG. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã chỉ ra tác dụng làm ổn định đặc biệt tốt của nó. Sau đó, khá ngạc nhiên là các tác giả sáng chế có thể tạo ra được phẩm gonadotropin dạng lỏng ổn định và chỉ có khả năng oxy hóa tối thiểu (ở nồng độ có thể chấp nhận được, ví dụ, xem phần dưới đây), nếu gonadotropin này được kết hợp với arginin với lượng làm ổn định ở mức độ cao (ví dụ, 150mM).

Đặc biệt đáng ngạc nhiên là tác dụng thu được ở khoảng pH khác biệt so với trị số pKa của arginin, tức là trong khoảng pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5. Đây là khoảng pH được ưu tiên đối với sáng chế. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,4. Còn tốt hơn nữa là khoảng pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,2. Tốt nhất nếu độ pH nằm trong khoảng từ $6,8 \pm 0,3$.

Đáng ngạc nhiên là, lượng metionin chống oxy hóa thấp, tốt hơn là L-metionin có thể ngăn ngừa được các sự kiện oxy hóa không mong muốn. Lượng nhỏ này có thể thấp

tới mức bằng 0,05mg/ml, nhưng cũng có thể lên tới 2,5mg/ml. Theo một phương án được ưu tiên, lượng metionin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,5mg/ml. Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, lượng metionin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1mg/ml. Theo một phương án còn được ưu tiên hơn nữa, lượng metionin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5mg/ml. Phương án tốt nhất là metionin ở nồng độ 0,15mg/ml. Không thể dự đoán được tất cả rằng mức độ oxy hóa cao của arginin đều có thể được tính toán và khắc phục được bởi lượng metionin thấp như vậy.

Còn đáng ngạc nhiên hơn nữa khi đã phát hiện ra rằng arginin có tác dụng làm ổn định rõ rệt hơn so với các chất làm ổn định đã biết khác, ví dụ, sucroza, là chất làm ổn định khá phổ biến được bổ sung vào và đã biết trên thị trường.

Các dược phẩm này có thể bao gồm chất mang, chất pha loãng, dung môi và/hoặc các tá dược được dụng chứa nước và không chứa nước thích hợp. Ví dụ về chất mang, chất pha loãng, dung môi hoặc tá dược được dụng chứa nước và không chứa nước thích hợp bao gồm nước, etanol, rượu polyhydric (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và chất tương tự), carboxy-metylxenluloza và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật (như dầu ôliu), và este hữu cơ có thể tiêm được như etyl oleat.

Đặc biệt là đối với dược phẩm đa liều theo sáng chế, việc bổ sung chất bảo quản là được ưu tiên. Rất được ưu tiên nếu chất bảo quản này là phenol. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phenol được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0mg/ml, tốt hơn là ở nồng độ 5,0mg/ml. Ngạc nhiên là, theo bản mô tả sáng chế, phenol trong dược phẩm là cũng có lợi hơn so với các chất bảo quản đã biết khác, ở chỗ nó không tạo màu và rất ổn định, thậm chí trong khoảng thời gian dài, mặc dù có mặt chất bảo quản, như được thể hiện trong phần ví dụ.

Theo sáng chế, việc bổ sung chất hoạt động bề mặt được ưu tiên hơn nữa. Rất được ưu tiên nếu chất hoạt động bề mặt này là polysorbat, còn tốt hơn nữa là Polysorbat 20. Theo một phương án ưu tiên khác, Polysorbat 20 được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,05mg/ml, tốt hơn là 0,005mg/ml Polysorbat 20. Có lợi nếu dược phẩm theo sáng chế này được bào chế với Polysorbat 20, không gây đục và rất ổn định, thậm chí là trong thời gian dài, mặc dù có mặt chất bảo quản, như được thể hiện trong phần ví dụ.

Dược phẩm này có thể còn chứa chất phụ gia ngoài các chất được nêu trên đây, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất bảo quản, chất gây ẩm, chất tạo nhũ tương, và chất phân tán (khác). Các chất kháng khuẩn và kháng nấm có thể được bao gồm để ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn và bao gồm, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và các chất tương tự. Ngoài ra, có thể mong muốn được phẩm bao gồm các chất đẳng trương. Tuy nhiên, dược phẩm theo sáng chế **không chứa chất đệm bổ sung**.

Trong một số trường hợp, để có tác dụng trong thời gian dài, việc làm chậm mức độ hấp thu của (các) gonadotrophin như FSH (và các hoạt chất khác, nếu có) từ việc tiêm dưới da hoặc trong cơ là điều mong muốn. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng huyền phù lỏng chứa nguyên liệu tinh thể hoặc vô định hình có độ hòa tan trong nước thấp. Sau đó, tốc độ hấp thu phụ thuộc vào tốc độ hòa tan mà có thể phụ thuộc lần lượt vào kích thước tinh thể và dạng kết tinh. Ngoài ra, quá trình hấp thu chậm của dạng kết hợp FSH dùng theo đường ngoài ruột được thực hiện bằng cách hoà tan hoặc tạo huyền phù dạng kết hợp FSH trong tá dược dầu.

Theo sáng chế, các nỗ lực của các tác giả sáng chế nhằm nghiên cứu tác dụng của các hợp chất nhất định đối với độ ổn định của dược phẩm gonadotropin dạng lỏng; trong bản mô tả này, tác dụng làm ổn định cũng như tác dụng khử ổn định của một số hợp chất đã được nghiên cứu. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã cải thiện dược phẩm thu được như độ trong, mức độ tạo màu, và gây đau khi tiêm.

Thuật ngữ “độ ổn định” được dùng để chỉ độ ổn định hóa học, có liên quan đến việc cải biến cộng hóa trị ở trình tự axit amin, nhưng liên quan tới độ ổn định của protein, thuật ngữ này cũng có thể được dùng để chỉ độ ổn định vật lý liên quan tới sự thay đổi trạng thái gấp nếp protein (tức là, trạng thái tự nhiên) nhưng không bao gồm sự phân cắt liên kết cộng hoá trị.

Theo sáng chế, thuật ngữ "độ ổn định" được dùng để chỉ độ ổn định sinh học của dược phẩm chứa gonadotropin, cụ thể là FSH và hCG. Tính không ổn định vật lý của dược phẩm protein có thể xuất hiện do sự kết tụ của các phân tử protein để tạo ra các khối kết tụ theo trật tự ở mức cao hơn, bằng cách phân ly các đime khác loại thành monome, hoặc bằng cách thay đổi cấu dạng khác bất kỳ nhằm làm giảm ít nhất một hoạt tính sinh học của, ví dụ, protein FSH (và các hoạt chất khác, nếu có) được bao gồm trong sáng chế.

Dung dịch hoặc dược phẩm "ổn định" là dung dịch hoặc dược phẩm trong đó mức độ kết tụ, phân ly, cải biến cấu dạng, sự giảm hoạt tính sinh học và các yếu tố tương tự, của protein trong đó được kiểm soát ở mức chấp nhận được, và không làm tăng một cách không chấp nhận được theo thời gian. Độ ổn định có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm phương pháp đo ánh sáng tán xạ của mẫu, đánh giá bằng mật độ trong và/hoặc màu sắc, độ hấp phụ, hoặc mật độ quang học, đo kích thước phân tử (ví dụ, bằng cách sắc ký loại trừ kích cỡ hoặc phân đoạn dòng trường thủy lưu), hoạt tính sinh học *in vitro* hoặc *in vivo* và/hoặc bằng cách đo nhiệt lượng quét phân biệt (DSC).

Dược phẩm theo sáng chế là ổn định trong 12 tháng ở điều kiện bảo quản, tốt hơn là 16 tháng ở điều kiện bảo quản, còn tốt hơn nữa trong 24 tháng, còn tốt hơn nữa là trong 24 tháng ở điều kiện bảo quản cộng với 1 tháng "khi sử dụng", tức là ở nhiệt độ phòng. Độ ổn định trong "các điều kiện bảo quản" được dùng để chỉ việc bảo quản dược phẩm trong môi trường lạnh, ví dụ, ở $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. "Nhiệt độ phòng" trong bản mô tả này có nghĩa là ở hoặc dưới 30°C , tốt hơn là $15 - 25^{\circ}\text{C}$, tốt hơn là $18 - 25^{\circ}\text{C}$, tốt nhất là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Để xác định độ ổn định trong dược phẩm này, đã sử dụng thử nghiệm (miễn dịch) đã biết đối với FSH và hCG, thử nghiệm này là đã biết đối với chuyên gia có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được nêu trong bản mô tả này, do đó chỉ nêu trong các thuật ngữ thông thường như sau:

RP-HPLC đối với quá trình oxy hóa

Quá trình oxy hóa protein được xác định bằng RP-HPLC, bằng cách rửa giải gradien trên cột C4 và phát hiện UV ở 210 nm.

Thử nghiệm phát huỳnh quang liên kết với enzym (ELFA)

Hoạt tính miễn dịch của FSH và hCG được xác định trong thử nghiệm miễn dịch kiểu "bánh mỳ kẹp" (sandwich) được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tự động VIDAS® (BioMérieux, France) với các bộ kit VIDAS® lần lượt tương ứng với FSH và hCG.

Sắc ký loại trừ kích cỡ (Size exclusion Chromatography - SEC)

Độ tinh khiết của rFSH được xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) trên cột SEC với khoảng protein nằm trong khoảng 3-70 kDa và phát hiện UV ở 210 nm.

Sắc ký tương tác kỵ nước (HIC)

Độ tinh khiết của rhCG được xác định bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) bằng cách rửa giải gradien trên cột có nhóm alkyl amit và phát hiện UV ở 220 nm.

Thử nghiệm sinh học FSH và LH

Hiệu lực của FSH và LH được xác định bằng cách lần lượt sử dụng các thử nghiệm sinh học *in vivo*; thử nghiệm Steelman-Pohley (FSH) và thử nghiệm tăng khối lượng túi tinh (LH).

Các phương pháp khác để đánh giá độ ổn định là đã biết trong lĩnh vực này và cũng có thể được sử dụng, theo sáng chế.

Thử nghiệm hoạt tính FSH và LH được chuẩn hóa bằng cách sử dụng Tiêu chuẩn quốc tế lần thứ tư về FSH và LH trong nước tiểu (the Fourth International Standard for Urinary FSH and Urinary LH, November 2000), tháng 11 năm 2000, bởi Ủy ban chuẩn hóa sinh học (the Expert Committee on Biological Standardization) của Tổ chức Y tế thế giới (WHO ECBS) và là đã biết đối với chuyên gia có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Đã biết rằng một số chất bảo quản có tác dụng làm cho dược phẩm gonadotropin mất ổn định và đã bất ngờ phát hiện ra rằng dược phẩm được mô tả theo sáng chế, cụ thể là chứa arginin và metionin, mà không chứa chất đệm, là đặc biệt ổn định – thậm chí trong thời gian dài và thậm chí với sự có mặt của phenol.

Dạng kết hợp chứa arginin và metionin theo sáng chế có tác dụng làm ổn định dược phẩm hMG dạng lỏng theo cách có lợi và bất ngờ hơn nhiều so với tác dụng làm ổn định của các chất ổn định đã biết, ví dụ, như sucroza. Tác dụng làm ổn định cải thiện được so sánh với chất ổn định đã biết như sucroza là đặc biệt bất ngờ. Ngoài ra, ngoài sự kỳ vọng, tác dụng làm ổn định của dạng kết hợp theo sáng chế là rõ ràng hơn mặc dù không có mặt chất đệm.

Từ lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng có sự thoái biến của FSH xuất hiện ở dược phẩm FSH và điều này đã được xác nhận bằng các ví dụ được nêu trong WO 2012/013742. FSH sẽ thoái biến theo hàm thời gian lẫn hàm nhiệt độ.

Nhận thấy rằng cấu dạng các cấu trúc FSH bậc ba và bậc hai không gấp nếp trong quá trình gia nhiệt chuyển tiếp hai trạng thái (khi sự kết tụ protein bị hạn chế). Sự không gấp nếp này có thể độc lập với cấu trúc siêu phân tử phân ly (các thay đổi trong cấu trúc bậc bốn).

Ngoài ra, trong lĩnh vực kỹ thuật này, rõ ràng nhận thấy rằng FSH chứa chất bảo quản như rượu benzylic hoặc phenol, trong đó các chất bảo quản này là cần thiết, ví dụ, chất diệt khuẩn trong dược phẩm FSH lỏng, ảnh hưởng rõ ràng của độ ổn định của dược phẩm đa liều chứa FSH theo cách tiêu cực. Trong bản mô tả này, độ ổn định trong thời gian dài của FSH bị giảm xuống, nhiệt độ làm biến tính của FSH là thấp hơn, và dạng đã biến tính có nồng độ cấu trúc bậc hai thấp hơn so với dược phẩm chứa FSH mà không chứa chất bảo quản.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm ổn định dược phẩm gonadotropin dạng lỏng, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung arginin và metionin vào dược phẩm này, mà không chứa chất đệm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

1. Tổng quan và giới thiệu

Một số sản phẩm thuốc khác nhau chứa hormon gonadotropin từ nước tiểu của phụ nữ sau mãn kinh hoặc phụ nữ mang thai được sử dụng để điều trị vô sinh, như dược phẩm hMG (gonadotropin của phụ nữ mãn kinh). hMG có hoạt tính của hormon kích thích nang trứng (FSH) và hormon tạo hoàng thể (LH) theo tỷ lệ 1:1.

FSH, LH và gonadotropin kích thích tổ màng đệm của người (hCG) thuộc họ gonadotropin của phức chất hormon glycoprotein. Chúng là các đime khác loại bao gồm cấu trúc siêu phân tử α và β . Cấu trúc siêu phân tử α gồm 92 axit amin là cấu trúc phổ biến đối với ba gonadotropin này, cấu trúc siêu phân tử β là duy nhất, khiến cho chúng có các đặc tính sinh học khác nhau (Wolfenson C. et al. 2005, Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotropin preparations compared with recombinant preparations).

Reproductive BioMedicine. Vol 10 No. 4:442-454; Shen, S. T., Cheng, Y. S., Shen, T. Y., and Yu, J. Y. 2006, Molecular cloning of follicle-stimulating hormone (FSH)-beta subunit cDNA from duck pituitary. *Gen. Comp Endocrinol.* 148:388-394; Fox, K. M., Dias, J. A., and Van, R. P. 2001, Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol. Endocrinol.* 15:378-389; Burova, T., Lecompte, F., Galet, C., Monsallier, F., Delpech, S., Haertle, T., and Combarnous, Y. 2001, Conformational stability and in vitro bioactivity of porcine luteinizing hormone. *Mol. Cell Endocrinol.* 176:129-134. The glycoprotein hormones all lose their bioactivity upon dissociation of the non-covalently linked subunits (Alevizaki, M. and Huhtaniemi, I. 2002, Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotropin subunit genes. *Hormones. (Athens.)* 1:224-232).

LH và hCG gắn kết với cùng một thụ thể và do đó đều có hoạt tính LH. Ở hMG, hoạt tính LH chủ yếu thu được từ hCG.

Mục đích của sáng chế là phát triển được phẩm gonadotropin ở dạng dược phẩm lỏng, dùng để tiêm dưới da. Để tiêm đa liều, việc bổ sung chất bảo quản thông thường là cần thiết (Meyer, B. K., Ni, A., Hu, B., and Shi, L. **2007**, Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. *J. Pharm. Sci.* 96:3155-3167; Chang, B. S. and Hershenson, S. Practical Approaches to Protein Formulation Development. *In* Rational Design of Stable Protein Formulations. J. F. Carpenter and M. C. Manning, editors. **2002**, Plenum Publ., New York. 1-25; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. **2000**, CRC Press, Boca Raton).

Nói chung, cấu trúc (có hoạt tính sinh học) tự nhiên của các protein rất nhạy cảm với môi trường xung quanh nó, ví dụ, thành phần của dược phẩm, đồ chứa /hệ đóng, độ pH và nhiệt độ, việc xác định dược phẩm lỏng thích hợp đối với gonadotropin là nhiệm vụ khó khăn nên các tá dược khác nhau được sàng lọc. Trong bản mô tả này, độ đậm và độ ổn định theo thời gian thực của các dược phẩm hMG khác nhau được nghiên cứu bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch FSH, thử nghiệm miễn dịch hCG, thử nghiệm sinh học RP-HPLC để xác định các protein đã được oxy hóa, quá trình chuẩn độ và độ pH như được mô tả chi tiết dưới đây.

2. Sản phẩm cần nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. Dược chất (Drug substance - DS)

Dược chất HMG-HP (DS) được sản xuất bởi Instituto Massone S.A. Argentina, hMG-HP DS được dùng ở dạng bột do Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhagen, Đan mạch cung cấp.

Bước xác định hoạt tính sinh học của FSH và LH trong dược chất được thực hiện theo phiên bản hiện hành của Dược điển Anh (BP). Cũng có thể thực hiện xác định theo Dược điển Mỹ USP phiên bản lần thứ 35, nếu muốn. Tỷ lệ hoạt tính sinh học của FSH:LH trong hMG là 1:1 và do đó, hoạt tính sinh học trung bình được xác định của FSH và LH được sử dụng để tạo ra thuốc. Do đó, khi nồng độ của hMG được đưa ra, ví dụ, như 625IU/ml tương đương với hoạt tính sinh học của FSH có nồng độ 625IU/ml và LH có nồng độ 625IU/ml.

2.1.2. Tá dược

Danh mục các tá dược được sử dụng trong bản mô tả này được mô tả trong Bảng 1.

Bảng 1. Danh mục các tá dược

Tên	Chất lượng	Nhà sản xuất
Viên tròn natri hydroxit	PH Eur, BP, JP, NF	Merck
Axit clohydric, bốc khói 37%	PH Eur, BP, JP, NF	Merck
Axit xitric monohydrat	PH Eur, BP, JPE, USP	Merck
Axit ortho-phosphoric 85%	PH Eur, BP, JPE, NF	Merck
Tri-natri xitrat dihydrat	PH Eur, BP, JPE, USP	Merck
Di-natri hydro phosphat đodecahydrat	PH Eur, BP, JPE, USP	Merck
L-histidin	EMPROVE® exp PH Eur, USP	Merck
L-metionin	USP, multicompendial	J.T. Baker
L-arginin	PH Eur, USP	Merck

L-arginin	PH Eur, USP	Merck
L-arginin monohydroclorua	PH arma Grade, EP, JP, USP	Sigma-Aldrich
Sucroza	EMPROVE® exp PH. Eur, BP, JPE, NF	Merck
D-(+)-trehaloza dehydrat	≥99%, cGMP	Sigma-Aldrich
Manitol	EMPROVE® PH Eur, BP, USP, JPE	Merck
Lactozamonohydrat	PH Eur, BP, NF, JP	Merck
Glyxin	EMPROVE® PH.Eur., BP, JPE, USP	Merck
Natri clorua	EMPROVE, PH.Eur., BP, USP	Merck
Polysorbat 20	PH.Eur, NF, JPE	J.T. Baker
Poloxamer 188	Thích hợp để được phẩm sinh học, PH.Eur., NF	Merck
Phenol	PH.Eur, JP, USP	Merck
Meta-cresol	PH. Eur. / USP loại dùng ngoài đường ruột	Hedinger
Mili-Q nước	-	Millipore

2.1.3. Hệ đồ chứa đóng kín

Để nghiên cứu độ ổn định, nguyên liệu đóng gói sơ cấp là lọ thủy tinh có nút cao su và nắp nhôm/chất dẻo, hoặc hộp thủy tinh có pittông cao su và nắp có khóa.

3. Quy trình sản xuất

3.1. Bào chế

Tất cả các dược phẩm được sản xuất trong quy mô phòng thí nghiệm.

Để bào chế dung dịch thuốc (DP), các dung dịch gốc chứa mỗi tá dược và dược chất (DS) lần lượt được trộn vào. Trước khi bổ sung hMG và pha loãng tới thể tích cuối cùng, điều chỉnh độ pH của mỗi dược phẩm, nếu cần. Các dung dịch gốc chứa tất cả các tá dược và hMG được điều chế trong nước Mili Q.

3.2. Lọc vô trùng và nạp vô trùng

Dược phẩm để làm ổn định được lọc vô trùng bằng thiết bị lọc Millipore PVDF 0,22 μ m. Quá trình lọc vô trùng được thực hiện trên bàn thí nghiệm LAF bằng cách sử dụng nguyên liệu đã được hấp vô trùng.

Quá trình nạp được thực hiện sau khi lọc. Đồ chứa được nạp dung dịch mẫu. Tất cả các lọ và hộp được nạp ở điều kiện vô trùng như điều kiện trên bàn thí nghiệm LAF và ngay lập tức được đậy bằng nút cao su hoặc nắp có khóa. Bên ngoài bàn thí nghiệm LAF, bịt kín lọ đã được nạp bằng nắp nhôm lật.

4. Các điều kiện bảo quản

4.1. Các điều kiện bảo quản

Đồ chứa chứa dược phẩm được bảo quản ở các điều kiện gia tốc đến 3 tháng ở 30 $\pm$ 2°C/ độ ẩm tương đối (RH) 65 $\pm$ 5% và/hoặc lên tới tối thiểu 6 tháng ở 25 $\pm$ 2°C/60 $\pm$ 5% RH. Ở mỗi nhiệt độ bảo quản, đồ chứa được bảo quản ở vị trí thẳng đứng. Hộp được bảo quản nằm ngang. Tất cả đồ chứa đều được bảo vệ khỏi ánh sáng.

5. Phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được sử dụng trong các nghiên cứu này được mô tả dưới đây.

5.1. Quy trình chuẩn độ

Theo USP-NF như đã mô tả trước đó, dung dịch được gọi là có độ đệm nếu nó chịu được sự thay đổi hoạt tính của ion trong việc bổ sung các chất được kỳ vọng là làm thay đổi hoạt tính của ion đó. Chất đệm là chất hoặc dạng kết hợp của các chất này tạo nên độ bền cho dung dịch. Dung dịch đệm là các hệ trong đó ion ở trạng thái cân bằng với các chất có khả năng loại bỏ hoặc giải phóng ion. Độ đệm được dùng để chỉ lượng nguyên liệu có thể được bổ sung vào dung dịch mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính của ion. Đã xác định được rằng tỷ lệ của axit hoặc bazơ được bổ sung (tính theo đương lượng gam/l) để làm thay đổi đơn vị pH. Khả năng của dung dịch được đệm được điều chỉnh đến các điều kiện sử dụng, thường bằng cách điều chỉnh các nồng độ chất đệm.

Độ đậm thường được biểu thị bằng số đương lượng (Eq) của axit hoặc bazơ mạnh làm cho một lít dung dịch quan tâm thay đổi một đơn vị pH, tạo ra đơn vị mEq/ (lít×độ pH) mà được sử dụng để xác định độ đậm theo sáng chế.

Điều này có nghĩa là độ đậm đã được xác định là số mol (đương lượng) của H^+/OH^- cần để thay đổi độ pH của một lít dung dịch đậm là một đơn vị.

Độ đậm được xác định bằng cách sử dụng dược phẩm giả dược (trong bản mô tả này, giả dược được dùng để chỉ dược phẩm không chứa hoạt chất) đã được điều chỉnh đến độ pH đích ở thời điểm ban đầu. Sử dụng NaOH/HCl 0,2N để chuẩn độ pH lên hoặc xuống. Độ pH được đo sau mỗi lần bổ sung NaOH/HCl 0,2N và thể tích của NaOH/HCl 0,2N được đưa ra trong tài liệu. Lượng NaOH/HCl 0,2N được biểu thị bằng đồ thị dưới dạng các trị số X và độ pH dưới dạng các trị số Y. Mức thoái biến tuyến tính được thực hiện quanh độ pH=6,8 đối với giả dược hMG (độ pH đích) và quanh độ pH 6,5 đối với giả dược tham chiếu (độ pH đích). Độ đậm có thể được tính toán bằng μl HCl/NaOH 0,2N để thay đổi độ pH là 0,01 đơn vị pH /L DP và ở dạng đương lượng mili (mEq) axit hoặc bazơ/(lít×đơn vị pH), như được mô tả trong phân định nghĩa nêu trên .

5.2. Thử nghiệm miễn dịch FSH và hCG

Thử nghiệm miễn dịch FSH và hCG được xác định bằng ELFA “bánh mỳ kẹp”.

5.3. Protein đã được oxy hóa

Quá trình oxy hóa protein được xác định bởi RP-HPLC.

5.4. Độ pH

Độ pH được đo theo PH. Eur.

6. Kết quả

Kết quả của các nghiên cứu về độ ổn định, đánh giá chất đậm trong nghiên cứu độ đậm, cũng như độ ổn định thu được từ nghiên cứu thiết kế thử nghiệm (DoE) được thể hiện dưới đây.

Bảng 2. Thành phần của dược phẩm hMG lỏng (600IU/ml)

Số mề	Chất đậm	Chất hoạt động bề mặt	Chất bảo quản	Chất ổn định/ chất đẳng trương
-------	----------	--------------------------	---------------	-----------------------------------

E-01	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	41,3mg/ml Manitol
E-02	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	85,9mg/ml Trehaloza
E-03	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	3,0mg/ml M-cresol	74,3mg/ml Sucroza
E-04	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	3,0mg/ml M-cresol	18,8mg/ml Glyxin
E-05	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	67,7mg/ml Sucroza
E-06	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	6,8mg/ml NaCl
E-07	10mMPhosphat ¹ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	37,6mg/ml Manitol
E-08	10mMXitrat ² , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	71,1mg/ml Sucroza
E-09	10mMXitrat ² , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	29,3mg/ml L-arginin HCl
E-10	10mMXitrat ² , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	3,0mg/ml M-cresol	39,5mg/ml Manitol
E-11	10mMXitrat ² , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	74,7mg/ml Trehaloza
E-12	10mMXitrat ² , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	64,5mg/ml Sucroza
E-13	10mMXitrat ² pH 6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	6,5mg/ml NaCl
E-14	10mMHistidin pH 6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	77,5mg/ml Sucroza

6.1. Độ ổn định của dược phẩm hMG lỏng/3 tháng

Các phân tử protein có thể được làm ổn định bằng cách bổ sung các tá dược vào dung dịch, ví dụ, các muối, hydrat cacbon hoặc axit amin nhưng mức độ làm ổn định khi bổ sung các hydrat cacbon, muối và axit amin khác nhau sẽ thay đổi nhiều giữa các dược phẩm khác nhau. Trong bản mô tả này, các nghiên cứu ban đầu về độ ổn định được thực hiện để sàng lọc các chất ổn định khác nhau kết hợp với chất bảo quản và chất đệm trong dược phẩm lỏng chứa hMG. Bất ngờ rằng các kết quả này thể hiện tác dụng làm ổn định vượt trội của L-arginin như được thể hiện trong các Bảng 3 và 6 đối với thử nghiệm miễn dịch hCG và các Bảng 4 và 7 đối với thử nghiệm miễn dịch FSH. Dược phẩm E-09 có độ ổn định vượt trội hơn so với tất cả các dược phẩm khác. Dược phẩm E-09 là dược phẩm duy nhất chứa L-arginin (xem Bảng 2). Dược phẩm K-01, K-03 và K-04 cũng như dược phẩm K-09 có độ ổn định vượt trội hơn so với tất cả các dược phẩm khác (xem Bảng 6). Các dược phẩm này lại chứa L-arginin (xem Bảng 5). Trong Bảng 4, dược phẩm E-09 có độ ổn định cao nhất so với tất cả các dược phẩm khác, tương tự đối với thử nghiệm miễn dịch FSH và Bảng 7 đã chỉ ra rằng dược phẩm K-09 có kết quả thử nghiệm miễn dịch FSH cao nhất so với tất cả các dược phẩm khác.

Bảng 3. Thử nghiệm miễn dịch hCG trong 1 tháng bảo quản ở $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$. Dược phẩm E-09 có độ ổn định vượt trội hơn so với tất cả các dược phẩm khác. Dược phẩm E-09 chứa L-arginin, xem Bảng 2.

hCG [% ban đầu]		$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$	
Dược phẩm	Ban đầu	0,5 tháng	1 tháng
E-01	100	91	85
E-02	100	88	87
E-03	100	87	80
E-04	-	-	-
E-05	100	83	81

hCG [% ban đầu]		30°C± 2°C/65±5% RH	
E-06	100	101	100
E-07	100	89	87
E-08	100	89	81
E-09 (L-arginin HCl)	100	113	106
E-10	100	95	91
E-11	100	99	89
E-12	100	94	87
E-13	100	99	86
E-14	-	-	-
E-15	-	-	-

(Dược phẩm E-04, E-14 và E-15 được loại ra khỏi thử nghiệm do có màu)

Bảng 4. Thử nghiệm miễn dịch FSH sau 3 tháng bảo quản ở 30±2°C/65±5% RH.
Dược phẩm E-09 có độ ổn định tốt nhất so với tất cả các dược phẩm khác. Dược phẩm E-09 chứa L-arginin, xem Bảng 2.

FSH [% ban đầu]	30°C± 2°C/65±5% RH	
Dược phẩm	Ban đầu	3 tháng
E-01	100	83
E-02	100	77
E-03	100	83
E-04	-	-
E-05	100	84
E-06	100	86

FSH [% ban đầu]	30°C± 2°C/65±5% RH	
E-02	100	77
E-03	100	83
E-04	-	-
E-05	100	84
E-06	100	86
E-07	100	86
E-08	100	84
E-09 (L-arginin)	100	95
E-10	100	83
E-11	100	83
E-12	100	89
E-13	100	85
E-14	-	-
E-15	-	-

(Dược phẩm E-04, E-14 và E-15 được loại ra khỏi thử nghiệm do có màu)

6.2. Độ ổn định của dược phẩm hMG dạng lỏng – 3 tháng

Từ việc sàng lọc ban đầu, dược phẩm bổ sung chứa arginin được sàng lọc.

Bảng 5. Nghiên cứu độ ổn định thành phần đối với hMG lỏng 600IU/ml – Tổng quan về dược phẩm

Số mẻ	Chất đệm	Chất hoạt động bề mặt	Chất bảo quản	Chất chống oxy hoá	Chất ổn định/ Chất đẳng trương	Chất
K-01 ¹	10mMXitrat ⁵ , độ pH =6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	1,5mg/ml metionin	L- 28,0mg/ml arginin HCl	L-
K-02	1mM Phosphat ⁴ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	1,0mg/ml L-metionin	21,0mg/ml Lactoza 7,0mg/ml NaCl	

K-03	10mMXitrat ⁵ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	1,5mg/ml metionin	L-	25,3mg/ml arginin HCl	L-
K-04	10mMPhosphat ⁴ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	3,0mg/ml M-cresol	1,5mg/ml metionin	L-	29,3mg/ml arginin HCl	L-
K-05 ²	10mMXitrat ⁵ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	1,0mg/ml metionin	L-	67,4mg/ml	Sucroza
K-06	10mMXitrat ⁵ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	3,0mg/ml M-cresol	1,0mg/ml metionin	L-	74,6mg/ml	Sucroza
K-07 ³	10mMXitrat ⁵ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	3,0mg/ml M-cresol	1,0mg/ml metionin	L-	38,3mg/ml	Manitol
K-08	10mMXitrat ⁵ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	1,0mg/ml metionin	L-	34,7mg/ml	Manitol
K-09 ⁶	10mMXitrat ⁵ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	3,0mg/ml M-cresol	1,5mg/ml metionin	L-	20mg/ml HCl	L-arginin
						22,1mg/ml	Sucroza

¹ Tương tự như dược phẩm E-09 trong Bảng 2

² Tương tự như dược phẩm E-12 trong Bảng 2

³ Tương tự như dược phẩm E-10 trong Bảng 2

⁴ 10mM Đi-natri hydro phosphat đodecahydrat, độ pH được điều chỉnh bằng axit pH ospH oric

⁵ 10mM Tri-natri xitrat dihydrat, độ pH được điều chỉnh bằng axit xitric

⁶ Độ bền là 530IU/ml

Bảng 6. Thử nghiệm miễn dịch hCG trong 3 tháng bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH.

Các dược phẩm K-01, K-03, K-04 và K-09 có độ ổn định vượt trội hơn so với tất cả các dược phẩm khác. Dược phẩm K-01, K-03, K-04 và K-09 chứa L-arginin, xem

Bảng 5

hCG [%ban đầu]		25°C± 2°C/65±5% RH		
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng
K-01 (L-arginin)	100	100	105	105

hCG [%ban đầu]		25°C± 2°C/65±5% RH		
K-02	100	100	68	57
K-03 (L-arginin)	100	110	106	104
K-04 (L-arginin)	100	109	106	113
K-05	100	94	82	71
K-06	100	98	76	80
K-07	100	85	74	67
K-08	100	93	79	71
K-09 (L-arginin)	100	99	101	100

Rõ ràng là, dược phẩm chứa L-arginin là ổn định hơn nhiều so với các dược phẩm chứa các chất làm ổn định khác nhau. Dược phẩm ví dụ so sánh K-02 và K-03 sau ba tháng.

Bảng 7. Thử nghiệm miễn dịch FSH trong 3 tháng bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH. Dược phẩm K-09 có kết quả thử nghiệm miễn dịch FSH cao nhất so với tất cả các dược phẩm khác. Dược phẩm K-09 chứa L-arginin, xem Bảng 5

FSH [% ban đầu]		25°C± 2°C/60±5% RH		
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng
K-01 (L-arginin)	100	112	112	111
K-02	100	104	106	87
K-03 (L-arginin)	100	108	120	107

FSH [% ban đầu]		25°C± 2°C/60±5% RH		
K-04 (L-arginin)	100	108	112	112
K-05	100	107	116	111
K-06	100	109	117	115
K-07	100	101	112	104
K-08	100	107	107	109
K-09 (L-arginin)	100	112	120	119

Các kết quả đối với hCG cũng được xác nhận đối với FSH – so với, ví dụ, được phẩm K-02 và K-03 sau ba tháng.

6.3. Nghiên cứu độ đệm

Chất đệm, ví dụ, natriphosphat và natriritrat là chất đệm dung nạp sinh lý và thường được bổ sung để duy trì độ pH trong khoảng mong muốn. Tri-natri xitrat dihydrat và Di-natri hydro phosphat đodecahydrat được đánh giá là chất đệm nhờ độ đệm. Độ đệm được tính toán là lượng axit hoặc bazơ cần để thay đổi độ pH ở bước đã định, tức là lượng μl của HCl/NaOH 0,2N cần để thay đổi độ pH 1 đơn vị pH /L DP được tính toán bằng mili đương lượng axit hoặc bazơ/(lít×đơn vị pH) như được giải thích trên đây.

Bảng 8. Nghiên cứu độ đệm của các thành phần – Tổng quan về dược phẩm

Số mề	Chất đệm	Chất hoạt động bề mặt	Chất bảo quản	Chất chống oxy hoá	Chất ổn định/ Chất đẳng trương
C-01	Không có chất đệm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	1,5mg/ml metionin	L- 120mM L-arginin HCl ⁴
C-02	5mM Xitrat ¹ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	1,5mg/ml metionin	L- 120mM L-arginin HCl ⁴
C-03	10mM Xitrat ¹ , độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	1,5mg/ml metionin	L- 120mM L-arginin HCl ⁴

C-04 ³	1mM ² Phosphat, độ pH=6,5	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	1,0mg/ml L-metionin	31,76mg/ml Na ₂ SO ₄ x 10 H ₂ O (14mg/ml Natri sulphat)
-------------------	--	-----------------------------	--------------------	------------------------	--

Tri-natri xitrat đihydrat

0,8mM Na₂HPO₄ × 12 H₂O và khoảng 0,2mM H₃PO₄ để độ pH=6,5

Giả dược tham chiếu

Tương đương 25,3mg/ml L-arginin HCl

Kết quả của việc chuẩn độ được thực hiện để xác định độ đậm được mô tả trong Fig.1. Độ nghiêng của các đường cong thể hiện độ đậm, ví dụ, sườn dốc đứng thể hiện độ đậm thấp. Từ Fig.1, có thể quan sát được rằng mẻ C-04 (dược phẩm viện dẫn) có độ đậm thấp nhất. Trong vùng pH liên quan nằm trong khoảng 6,8±0,3 đối với hMG, tất cả được phẩm hMG C-01 (không có chất đệm), C-02 (5mM Tri-natri xitrat đihydrat) và C-03 (10mM Tri-natri xitrat đihydrat) có độ đậm tương tự và độ đậm cao hơn so với dược phẩm viện dẫn chứa 1mM Di-natri hydro phosphat đodecahydrat. Độ pH đích đối với dược phẩm viện dẫn là 6,5. Dược phẩm C-01, C-02 và -03 được so sánh với dược phẩm viện dẫn đã biết là có độ pH ổn định. Đã thực hiện nhiều nghiên cứu về độ ổn định của dược phẩm viện dẫn C-04 mà không quan sát thấy sự thay đổi bất kỳ về độ pH.

Bảng 9 dưới đây thể hiện các kết quả của nghiên cứu độ đậm:

Bảng 9. Nghiên cứu về độ đậm. Trong vùng pH có liên quan của dược phẩm=6,8 đối với hMG, tất cả dược phẩm hMG đều có độ đậm cao hơn so với dược phẩm giả dược tham chiếu.

Mê	Chất đệm	Độ đậm quanh độ pH đích	khoảng pH	(vòng)	Độ đậm được biểu thị bằng: mEq axit hoặc bazo/(lít×đơn vị pH)
C-01	Không có chất đệm	6,8	6,564 - 6,947	0,001507	1,32
C-01	Không có chất đệm	7,0	6,786 - 7,193	0,000822	2,44
C-02	5mM Tri-natri xitrat đihydrat	6,8	6,599 - 6,951	0,000672	2,96

(viện dẫn)	hydro phosphat đodecahydrat		6,752		
C-04 (viện dẫn)	1mM Di-natri hydro phosphat đodecahydrat	6,8	6,582 - 6,982	0,002091	0,96

(C-01 và C-04 được đề cập hai lần do độ đậm được tính toán ở khoảng pH lần lượt quanh hai trị số pH khác nhau)

Bất ngờ là, độ đậm của dược phẩm hMG không chứa chất đậm (C-01) là cao hơn so với dược phẩm viện dẫn C-04. Thành phần tá dược chính trong dược phẩm hMG là L-arginin ở nồng độ là 120mM. Các trị số pKa đối với L-arginin là $pK_{a1}=2,17$; $pK_{a2}=9,04$ và $pK_{a3}=12,5$ (Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2015, Pharmaceutical Press, London). Rất bất ngờ rằng arginin có độ đậm đủ lớn hơn so với các trị số pKa.

6.4. Nghiên cứu oxy hóa

Sau 3 tháng bảo quản ở $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$, dược phẩm E-09 chứa L-arginin (xem Bảng 5) có nồng độ protein đã oxy hóa được gia tăng 241% so với trị số ban đầu (xem Bảng 10 dưới đây). Đây là lượng rất cao và có trường hợp trong đó lượng oxy hóa cao như vậy là không mong muốn.

Do đó, đã thực hiện các nghiên cứu khác để nghiên cứu xem liệu vấn đề này có thể khắc phục được không.

Có thể chọn chất chống oxy hoá được sử dụng trong các dược phẩm protein. Có thể bổ sung metionin để ngăn ngừa quá trình oxy hóa, theo cơ chế cạnh tranh với quá trình oxy hóa các gốc metionin trong các protein đã được gợi ý. Kết quả bổ sung metionin vào dược phẩm chứa arginin được thể hiện trên Bảng 10. Dược phẩm K-01, K-03, K-04 và K-09 chứa arginin và metionin và nồng độ protein đã oxy hóa là rõ ràng và có lợi nếu nồng độ này được giảm xuống. Dược phẩm K-01 (chứa metionin) là dược phẩm tương tự với dược phẩm E-09 (không chứa metionin). Bằng cách so sánh hai mẻ này, có thể nhận thấy rằng nồng độ protein đã oxy hóa được giảm mạnh nhờ metionin.

Bảng 10. % protein đã được oxy hóa được gia tăng so với ban đầu trong 3 tháng bảo quản ở $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$. Dược phẩm E-09 chứa arginin và không chứa metionin. Dược phẩm K-01, K-03, K-04 và K-09 chứa arginin và metionin, xem Bảng 5

Bảng 10. % protein đã được oxy hóa được gia tăng so với ban đầu trong 3 tháng bảo quản ở $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$. Dược phẩm E-09 chứa arginin và không chứa metionin. Dược phẩm K-01, K-03, K-04 và K-09 chứa arginin và metionin, xem Bảng 5

Các protein đã được oxy hóa [% gia tăng so với ban đầu]	$30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$
Dược phẩm	3 tháng
E-01	44
E-02	39
E-03	47
E-04	-
E-05	37
E-06	43
E-07	36
E-08	51
E-09 (arginin và không chứa metionin)	241
E-10	55
E-11	47
E-12	53
E-13	46
E-14	-
E-15	-
K-01 (arginin và metionin)	24
K-03 (arginin và metionin)	12
K-04 (arginin và metionin)	8
K-09 (arginin và metionin)	13

(Dược phẩm E-04, E-14 và E-15 được loại trừ do có màu)

Kết luận, hai nghiên cứu này cho thấy rằng tác dụng làm ổn định rất tốt của arginin và thậm chí là tác dụng chống oxy hóa của metionin với lượng nhỏ trong dược phẩm chứa gonadotropin.

6.5. Nghiên cứu độ ổn định DoE

Bằng cách kết hợp kết quả của các nghiên cứu nêu trên, và nghiên cứu độ đậm, nghiên cứu DoE được thực hiện để nghiên cứu sự tương tác giữa arginin và metionin và để xác định nồng độ tối ưu của hai tá dược này.

Bảng 11. Thành phần của nghiên cứu độ ổn định DoE đối với hMG lỏng
600IU/mL-tổng quan về dược phẩm

Số m ²	Chất đậm ²	Chất hoạt động bề mặt	Chất bảo quản	Chất chống oxy hoá	Chất ổn định/ Chất đẳng trương
D-01	Không có chất đậm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	1,5mg/ml L-metionin	80mM L-arginin HCl
D-02	Không có chất đậm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	1,5mg/ml L-metionin	160mM L-arginin HCl
D-03	Không có chất đậm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5, 0mg/ml Phenol	0,8mg/ml L-metionin	120mM L-arginin HCl
D-04	Không có chất đậm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	0,8mg/ml L-metionin	120mM L-arginin HCl-
D-05	Không có chất đậm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	0,1mg/ml L-metionin	160mM L-arginin HCl

D-06	Không có chất đệm, độ pH=6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	0,1mg/ml L- metionin	80mM L- arginin HCl
D-07 ³	Không có chất đệm, độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	1,5 mg/ L- metionin	120mM L- arginin HCl
D-08 ³	10mMXitrat ¹ , độ pH=6,8	0,1mg/ml Poloxamer 188	5,0mg/ml Phenol	1,5 mg/ L- metionin	120mM L- arginin HCl

¹ Tri-natrixitrat dehydrat

² Độ pH được điều chỉnh bằng HCl/NaOH 0,2N đối với các dược phẩm không chứa chất đệm và 0,2 N NaOH/0,5 M axit xitric monohydrat đối với dược phẩm chứa chất đệm Tri-natri xitrat dihydrat

³ Dược bao gồm ở dạng dược phẩm viên dẫn

6.5.1. Thử nghiệm miễn dịch FSH

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm miễn dịch FSH khi được bảo quản trong 3 tháng ở 25±2°C/60±5% RH được đưa ra trong Bảng 12.

Bảng 12. Kết quả thử nghiệm miễn dịch FSH khi được bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH.

Việc mô tả đầy đủ của tất cả dược phẩm được liệt kê trong bảng 11.

FSH [IU/ml]		25°C± 2°C/60±5% RH		
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng
D-01	516	501	468	462
D-02	521	492	503	478
D-03	511	503	513	474
D-04	515	505	490	477
D-05	532	521	513	473

FSH [IU/ml]		25°C± 2°C/60±5% RH		
D-06	518	488	458	493
D-07	518	528	482	490
D-08	514	499	472	481

Việc tính toán thống kê được thực hiện đối với hoạt tính FSH [IU/ml] để đánh giá ảnh hưởng và tương tác giữa arginin và metionin. Kết quả của việc đánh giá thống kê đã xác nhận rằng L-arginin có ảnh hưởng đáng kể có tính thống kê đối với các kết quả độ ổn định trong thử nghiệm miễn dịch FSH. metionin không có ảnh hưởng đáng kể có tính thống kê đối với các kết quả độ ổn định trong thử nghiệm miễn dịch FSH. Không có sự tương tác có ý nghĩa thống kê giữa arginin và metionin đối với thông số đáp ứng này.

6.5.2. Thử nghiệm miễn dịch hCG

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm miễn dịch hCG khi được bảo quản trong 3 tháng ở 25±2°C/60±5% RH được đưa ra trong Bảng 13.

Bảng 13. Kết quả thử nghiệm miễn dịch hCG khi được bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH.

Việc mô tả đầy đủ tất cả các dược phẩm được liệt kê trong bảng 11.

hCG [IU/ml]		25°C± 2°C/60±5% RH			
Dược phẩm	Ban đầu		1 tháng	2 tháng	3 tháng
D-01	83		82	75	56
D-02	87		83	93	76
D-03	93		93	88	70
D-04	86		91	87	70
D-05	90		98	92	85
D-06	87		85	72	61
D-07	93		92	88	71
D-08	91		96	94	81

Việc tính toán thống kê được thực hiện đối với hoạt tính hCG [IU/ml] để đánh giá sự ảnh hưởng và tương tác giữa arginin và metionin. Kết quả đánh giá thống kê đã xác

nhận rằng arginin có ảnh hưởng đáng kể có tính thống kê đối với kết quả về độ ổn định của thử nghiệm miễn dịch hCG. Hàm lượng metionin có ảnh hưởng rất nhỏ đối với kết quả về độ ổn định của thử nghiệm miễn dịch hCG ở 25°C. Rõ ràng rằng nồng độ metionin quá thấp (0,1mg/ml) không làm tăng độ ổn định bằng cách làm tăng nồng độ thậm chí lên tới 1,5mg/ml. Sự tương tác giữa arginin và metionin không có ý nghĩa thống kê đối với thông số đáp ứng này.

6.5.3. Protein đã được oxy hóa

Trong các nghiên cứu về độ ổn định nêu trên, đáng ngạc nhiên là sự có mặt của arginin có tác dụng làm ổn định đáng kể. Tuy nhiên, việc bổ sung arginin làm tăng nồng độ của protein đã được oxy hóa. Có thể bổ sung metionin để ngăn ngừa quá trình oxy hóa và nghiên cứu này nghiên cứu mức cân bằng nồng độ giữa chất ổn định arginin và chất chống oxy hoá metionin.

Kết quả về độ ổn định của lượng protein đã được oxy hóa [% mức gia tăng so với ban đầu] khi được bảo quản trong 6 tháng ở 25±2°C/60±5% RH và 3 tháng ở 30±2°C/65±5% RH đối với dược phẩm chứa arginin và metionin (trong khoảng nồng độ 0,1-1,5mg/ml) được nêu dưới đây. Để so sánh, dược phẩm E-09 chứa arginin và không chứa metionin cũng được bao gồm trong Bảng 14.

Bảng 14. Kết quả các protein đã được oxy hóa khi được bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH và 30±2°C/65±5% RH. Mô tả đầy đủ về tất cả các dược phẩm được đưa ra trong bảng 11.

Protein đã được oxy hóa [% mức gia tăng so với ban đầu]							
	30°C± 2°C/65±5% RH			25°C± 2°C/60±5% RH			
Dược phẩm	1 tháng	2 tháng	3 tháng	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng
D-01	5,5	4,1	8,3	10,1	4,1	9,6	6,9
D-02	9,9	8,5	10,3	11,7	11,7	6,6	8,5
D-03	10,9	10,0	11,4	12,3	13,3	11,8	12,8
D-04	8,9	8,4	8,9	8,9	11,2	9,8	8,9
D-05	12,9	13,8	13,8	13,3	20,5	11,0	15,2

Protein đã được oxy hóa [% mức gia tăng so với ban đầu]	30°C± 2°C/65±5% RH			25°C± 2°C/60±5% RH			
D-06	7,0	9,8	11,6	10,7	7,9	9,3	11,2
D-07	14,0	10,1	11,1	14,5	13,5	15,0	10,1
D-08	7,6	9,5	7,6	13,3	9,0	11,8	7,6
E-09 (không có L-metionin)	-	-	241	-	-	-	-

Từ Bảng 14, đã bất ngờ nhận thấy rằng ngay cả lượng nhỏ metionin cũng đủ để ngăn ngừa quá trình oxy hóa trong toàn bộ khoảng nồng độ arginin.

6.5.4. Tóm tắt DoE

Để kết luận và tóm tắt các kết quả DoE, công cụ tối ưu hóa đáp ứng trong Minitab đã được sử dụng, xem Fig.2. Công cụ tối ưu hóa đáp ứng Minitab chỉ ra các thiết lập yếu tố thử nghiệm khác nhau ví dụ, các nồng độ arginin và metionin ảnh hưởng tới các đáp ứng được dự đoán, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch FSH [IU/ml] và thử nghiệm miễn dịch hCG [IU/ml] đối với thiết kế thừa số. Biểu đồ tối ưu hóa thể hiện mức độ ảnh hưởng của mỗi yếu tố (cột) đối với các đáp ứng (hàng). Các dòng đậm thẳng đứng trên biểu đồ thể hiện các thiết lập nhân tố hiện thời. Các số nằm phía trên của cột thể hiện các thiết lập về nồng độ của yếu tố hiện thời (trong dấu ngoặc vuông). Các dòng nằm ngang và các số tương ứng thể hiện các đáp ứng đối với nồng độ yếu tố hiện thời. Tối ưu hóa đáp ứng dựa trên các kết quả trên ở 25°C. Kết quả của việc ứng dụng công cụ tối ưu hóa đáp ứng được mô tả trên Fig. 2. Độ ổn định tốt nhất (khả năng mong muốn tổng hợp) thu được ở các nồng độ cao của arginin và nồng độ thấp của metionin.

6.6. Nghiên cứu độ pH

Trong nghiên cứu độ đệm, đã nhận thấy rằng chất đệm không cần thiết có mặt trong được phẩm hMG, bằng cách chỉ sử dụng arginin để làm ổn định độ pH trong khoảng pH mong muốn.

Để xác nhận rằng độ pH được duy trì trong khi bảo quản, thì nó được đo trong 6 tháng bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH và 3 tháng ở 30±2°C/65±5% RH. Các kết quả được liệt kê trong Bảng 15.

Độ pH đích đối với tất cả các dược phẩm có độ pH=6,8 và độ pH của tất cả các dược phẩm bằng 6,8 ở thời điểm ban đầu. Độ pH khá ổn định nhưng gia tăng nhẹ tới khoảng 6,9 sau 2 tháng và duy trì ở độ pH khoảng 6,9 lên tới 6 tháng bảo quản. Kết quả tối đa 6 tháng bảo quản xác nhận độ ổn định của độ pH trong khoảng nồng độ arginin được thử nghiệm.

Bảng 15. Kết quả của nghiên cứu của độ pH

Độ pH		30°C± 2°C/65±5% RH		25°C± 2°C/60±5% RH		
Dược phẩm	Ban đầu	2 tháng	3 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng
D-01	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
D-02	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-03	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-04	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-05	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-06	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-07	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-08	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9

7. Kết luận

Rất ngạc nhiên rằng độ đậm của dược phẩm hMG không có chất đệm là cao hơn so với dược phẩm viên dẫn chứa 1mM Di-natri hydro phosphat đodecahydrat. Thành phần tá dược chính trong dược phẩm hMG là arginin. Các trị số pKa đối với arginin là $pK_{a1}=2,17$; $pK_{a2}=9,04$ và $pK_{a3}=12,5$. Bất ngờ rằng arginin có độ đậm đủ lớn so với các trị số pKa của nó. Tuy nhiên, các kết quả này chỉ ra một cách rõ ràng rằng không cần có chất đệm bổ sung trong dược phẩm hMG trong khoảng pH hiện thời. Chỉ có arginin đủ để duy trì độ pH trong khoảng pH mong muốn. Độ ổn định của độ pH được xác nhận trong nghiên cứu DoE thử nghiệm khoảng nồng độ của arginin trong 6 tháng bảo quản ở $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ và 3 tháng bảo quản ở $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 5\% \text{ RH}$ mà được xác nhận các quan sát trong nghiên cứu độ đậm.

Việc bổ sung arginin vào dược phẩm hMG lỏng theo sáng chế thể hiện tác dụng làm ổn định rất lớn trong dược phẩm hMG lỏng. Tuy nhiên, nhận thấy rằng arginin cũng làm tăng nồng độ của các protein đã được oxy hóa. Việc bổ sung metionin được thể hiện nhằm ngăn ngừa quá trình oxy hóa so với dược phẩm không chứa metionin.

Trong 6 tháng bảo quản ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH và 3 tháng bảo quản ở $30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\%$ RH, chứng tỏ rằng metionin ngay cả ở nồng độ nhỏ vẫn có tác dụng ngăn ngừa quá trình oxy hóa.

Từ kết quả của các nghiên cứu này, rõ ràng nhận thấy rằng việc bổ sung arginin là đủ để duy trì độ pH ở nồng độ pH mong muốn. Việc bổ sung arginin có tác dụng làm ổn định rất lớn dược phẩm gonadotropin đã được thử nghiệm trong dược phẩm lỏng. Axit amin, đường hoặc muối được thử nghiệm đều không có tác dụng làm ổn định tương tự. Nồng độ protein đã oxy hóa được gia tăng một cách đáng kể bằng cách bổ sung arginin, tuy nhiên, việc bổ sung metionin thậm chí với một lượng nhỏ cũng có tác dụng ngăn ngừa quá trình oxy hóa protein. Đáng ngạc nhiên là, thậm chí một lượng nhỏ metionin cũng đủ để ngăn ngừa quá trình oxy hóa độc lập với nồng độ của arginin.

Ví dụ 2

Các tác giả sáng chế còn xác nhận rằng dược phẩm có lợi theo sáng chế có thể là cũng thích hợp để làm ổn định dược phẩm gonadotropin tái tổ hợp tương ứng.

Có hiệu quả nếu FSH tái tổ hợp và hCG tái tổ hợp (lần lượt có các trình tự như được mô tả trên đây) được điều chế theo các phương pháp đã biết.

Nghiên cứu độ ổn định gia tốc được thực hiện đối với hai dược phẩm, lần lượt chứa rhCG hoặc rFSH, như được mô tả dưới đây.

Tác dụng làm ổn định đáng ngạc nhiên quan sát được của arginin cũng được xác nhận trong các protein tái tổ hợp. Cả rFSH lẫn rhCG được bào chế trong 5mg/ml phenol, 0,15mg/ml L-metionin, 150mM arginin HCl, 0,005mg/ml Polysorbat 20, độ pH=6,8. Để đơn giản hóa việc phân tích độ ổn định của protein, rFSH và rhCG được bào chế trong các đồ chứa khác nhau.

Bảng 16

	Hoạt tính miễn dịch (IU/ml]
--	-----------------------------

	Ban đầu	1 tháng, 30°C	2 tháng, 30°C	4 tháng, 30°C	16 tháng, 5°C
FSH [33,3 µg/ml]	464	444	456	469	435
rhCG [50 µg/ml]	711	680	656	600	685

	SEC (Độ tinh khiết của rFSH, %)				
	Ban đầu	1 tháng, 30°C	2 tháng, 30°C	4 tháng, 30°C	16 tháng, 5°C
FSH [33,3 µg/ml]	98,9	98,6	98,3	97,9	96,9

	HIC (Độ tinh khiết của rhCG, %)				
	Ban đầu	1 tháng, 30°C	2 tháng, 30°C	4 tháng, 30°C	14 tháng, 5°C
rhCG [50 µg/ml]	98,8	96,8	93,3	89,4	99,9

Bảng này xác nhận một cách đầy đủ rằng dược phẩm theo sáng chế chứa arginin, nhưng không chứa chất đệm bổ sung, và metionin với lượng nhỏ là thích hợp để làm ổn định gonadotropin tái tổ hợp.

Ví dụ 3

Các nghiên cứu khác được thực hiện, trong đó các thành phần sau đã được đánh giá:

Bảng 17. Thành phần của dược phẩm hMG lỏng 625IU/ml

Số mẻ	Chất đệm ¹	Chất hoạt động bề mặt	Chất bảo quản	Chất chống oxy hoá	Chất ổn định/đẳng trương
-------	-----------------------	-----------------------	---------------	--------------------	--------------------------

J-01	Không có chất đệm, độ pH 6,8	0,005mg/ml Polysorbat 20	5,0mg/ml Phenol	0,15mg/ml L-metionin	150mM L-arginin HCl
------	------------------------------	--------------------------	-----------------	----------------------	---------------------

¹ Độ pH được điều chỉnh bằng HCl/NaOH 0,2N

Độ ổn định của dược phẩm đích

Bằng cách kết hợp tất cả các kết quả nêu trên, độ ổn định tốt được xác nhận đối với dược phẩm nêu trên như sau:

Bảng 18 .Thử nghiệm miễn dịch FSH

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm miễn dịch FSH khi được bảo quản trong 3 tháng ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ độ ẩm tương đối (RH) 5% và 12 tháng ở $5\pm 3^{\circ}\text{C}$:

Kết quả thử nghiệm miễn dịch FSH khi được bảo quản ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH, và 12 tháng ở $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

FSH [% ban đầu]		$25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH			$5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$	
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng	3 tháng	12 tháng
J-01	100	95,2	95,9	98,8	96,8	100,5

Các kết quả này xác nhận độ ổn định như được xác định bởi thử nghiệm miễn dịch FSH.

Bảng 19. Thử nghiệm miễn dịch hCG

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm miễn dịch hCG khi được bảo quản trong 1 tháng ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH được liệt kê trong Bảng 19 và 12 tháng ở $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Kết quả thử nghiệm miễn dịch hCG khi được bảo quản ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH và 12 tháng ở $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

hCG [% ban đầu]		$25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH	$5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$	
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	3 tháng	12 tháng
J-01	100	88,3	94,1	89,5

Các kết quả này xác nhận độ ổn định như được xác định bởi thử nghiệm miễn dịch hCG.

Bảng 20. Protein đã được oxy hóa

Kết quả về độ ổn định của lượng protein đã được oxy hóa [% mức gia tăng so với ban đầu] khi được bảo quản trong 3 tháng ở $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ và 12 tháng ở $5\pm 3^\circ\text{C}$.

Kết quả của các protein đã được oxy hóa khi được bảo quản ở $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ và 12 tháng ở $5\pm 3^\circ\text{C}$.

Các protein đã được oxy hóa [% mức gia tăng so với ban đầu]	$25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$			$5^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$	
	1 tháng	2 tháng	3 tháng	3 tháng	12 tháng
J-01	1,8	5,7	7,9	2,6	11

Độ pH

Kết quả về độ ổn định của độ pH khi được bảo quản trong 3 tháng ở $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ và 12 tháng ở $5\pm 3^\circ\text{C}$ có độ pH ổn định.

Bảng 21. Kết quả của độ pH khi được bảo quản ở $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ và 12 tháng ở $5\pm 3^\circ\text{C}$.

Độ pH		$25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$			$5^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$	
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng	3 tháng	12 tháng
J-01	6,9	6,7	6,8	6,7	6,7	6,8

Ví dụ 4

Ngoài các thử nghiệm trên, các tác giả sáng chế cũng đã thực hiện nghiên cứu thử nghiệm sinh học (6 tháng bảo quản ở 25°C đối với các mẻ DoE).

Thử nghiệm sinh học FSH (Steelman-Pohley)

Kết quả về độ ổn định của FSH thử nghiệm sinh học khi được bảo quản trong 6 tháng ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ được đưa ra trong Bảng 22.

Bảng 22. Kết quả thử nghiệm sinh học FSH khi được bảo quản ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$.

Mô tả đầy đủ về tất cả các dược phẩm được đưa ra trong bảng 11.

FSH [% hiệu lực đã nêu (600IU/ml)]	$25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$
Dược phẩm	6 tháng
D-01	98,8
D-02	100,7
D-03	102,0
D-04	104,7
D-05	103,4
D-06	101,0
D-07	102,6
D-08	104,9

Các kết quả này xác nhận độ ổn định, như được xác định bởi thử nghiệm sinh học FSH.

Thử nghiệm sinh học LH (tăng khối lượng tinh dịch)

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm sinh học LH khi được bảo quản trong 6 tháng ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ được liệt kê trong Bảng 23.

Bảng 23. Kết quả thử nghiệm sinh học LH khi được bảo quản ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$. Mô tả đầy đủ về tất cả các dược phẩm được đưa ra trong bảng 11.

LH [% hiệu lực đã nêu (600IU/ml)]	$25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$
Dược phẩm	6 tháng
D-01	87,8

LH [% hiệu lực đã nêu (600IU/ml)]	25°C± 2°C/60±5% RH
D-02	101,3
D-03	90,9
D-04	95,6
D-05	97,5
D-06	95,0
D-07	97,3
D-08	100,1

Các kết quả này xác nhận độ ổn định, như được xác định bởi thử nghiệm sinh học LH.

Ngoài ra, thành phần của Ví dụ 3 cũng được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học FSH và LH, với kết quả như sau:

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm sinh học FSH khi được bảo quản trong 3 tháng ở 25±2°C/60±5% RH và 12 tháng ở 5±3°C được đưa ra trong Bảng 24:

Bảng 24: Kết quả thử nghiệm sinh học FSH khi được bảo quản ở 25±2°C/60±5% RH và 12 tháng ở 5±3°C.

FSH [% hiệu lực đã nêu(625IU/ml)]		25°C± 2°C/60±5% RH			5°C± 3°C	
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng	3 tháng	12 tháng
J-01	94,7	93,6	94,5	97,6	95,8	96,1

Các kết quả này xác nhận rằng độ ổn định được xác định bởi thử nghiệm sinh học FSH.

Kết quả về độ ổn định của thử nghiệm sinh học LH khi được bảo quản trong 3 tháng ở 25±2°C/60±5% RH và 12 tháng ở 5±3°C được liệt kê trong Bảng 25.

Bảng 25 Kết quả thử nghiệm sinh học LH khi được bảo quản ở $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ và 12 tháng ở $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

LH [% hiệu lực đã nêu (625IU/ml)]		$25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$			$5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$	
Dược phẩm	Ban đầu	1 tháng	2 tháng	3 tháng	3 tháng	12 tháng
J-01	102,1	102,2	99,0	100,0	101,5	100,0

Các kết quả này xác nhận độ ổn định đã được xác định bởi thử nghiệm sinh học LH.

8. Các chữ viết tắt và định nghĩa

BP	Dược điển Anh
DoE	Thiết kế thử nghiệm
DS	Dược chất
FSH	Hormon kích thích nang trứng trứng
hCG	Gonadotropin kích thích tổ màng đệm của người
hMG	Gonadotropin của phụ nữ mãn kinh
hMG-HP	Gonadotropin của phụ nữ mãn kinh được tinh chế ở mức độ cao
JP	Dược điển Nhật
LH	Hormon tạo hoàng thể
MD	Đa liều
NF	Dược thư quốc gia
PH Eur	Dược điển châu Âu
PS 20	Polysorbat 20
USP	Dược điển Mỹ
WFI	Nước dùng để tiêm

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ferring B.V.

<120> DƯỢC PHẨM DẠNG LÔNG CHỨA GONADOTROPIN VÀ PHƯƠNG PHÁP LÂM ỒN ĐỊNH DƯỢC PHẨM DẠNG LÔNG NÀY

<130> HE183650

<160> 4

<170> BISSAP 1.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> 1..24

<223> peptit dẫn đầu

<400> 1

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile PH e Leu Val Thr Leu Ser

1 5 10 15

Val PH e Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro

20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro PH e PH e Ser Gln Pro Gly Ala Pro

35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys PH e Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro

50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu

65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly

85 90 95

Gly PH e Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr

100 105 110

Tyr His Lys Ser

115

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> 1..18

<223> peptit dẫn đầu

<400> 2

Met Lys Thr Leu Gln PH e PH e PH e Leu PH e Cys Cys Trp Lys Ala Ile

1 5 10 15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys

20 25 30

Glu Glu Cys Arg PH e Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly

35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys

50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr PH e Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg

65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val

85 90 95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys

100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser PH e Gly Glu Met Lys

115 120 125

Glu

<210> 3

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> 1..20

<223> peptit dẫn đầu

<400> 3

Met Glu Met PH e Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly

1 5 10 15

Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile

20 25 30

Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr

35 40 45

Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val

50 55 60

Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg

65 70 75 80

Asp Val Arg PH e Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val

85 90 95

Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
 100 105 110
 Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
 115 120 125
 Thr Cys Asp Asp Pro Arg PH e Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 130 135 140
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 145 150 155 160
 Pro Ile Leu Pro Gln
 165

<210> 4
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> 1..20
 <223> peptit dẫn đầu

<400> 4
 Met Glu Met Leu Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Ala Trp Ala Ser Arg Glu Pro Leu Arg Pro Trp Cys His Pro Ile
 20 25 30
 Asn Ala Ile Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
 35 40 45
 Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val
 50 55 60
 Leu Gln Ala Val Leu Pro Pro Leu Pro Gln Val Val Cys Thr Tyr Arg
 65 70 75 80
 Asp Val Arg PH e Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
 85 90 95
 Asp Pro Val Val Ser PH e Pro Val Ala Leu Ser Cys Arg Cys Gly Pro
 100 105 110
 Cys Arg Arg Ser Thr Ser Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
 115 120 125
 Thr Cys Asp His Pro Gln Leu Ser Gly Leu Leu PH e Leu
 130 135 140

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm gonadotropin dạng lỏng chứa gonadotropin, arginin với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 160mM, và metionin với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1,5mg/ml, trong đó dược phẩm này không chứa chất đệm bổ sung, và trong đó độ pH của dược phẩm này nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó gonadotropin này là hCG (gonadotropin kích thích tổ màng đệm của người), và tùy ý là FSH và/hoặc LH.
3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gonadotropin này là hMG (gonadotropin của phụ nữ mãn kinh).
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gonadotropin này là FSH, LH và/hoặc hCG của người, được lấy từ nước tiểu của người.
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gonadotropin này là FSH, LH và/hoặc hCG tái tổ hợp.
6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm này còn chứa chất bảo quản, tốt hơn là phenol.
7. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm này còn chứa chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là polysorbat, còn tốt hơn nữa là polysorbat 20.
8. Dược phẩm theo điểm 6 hoặc 7, trong đó chất bảo quản, tốt hơn là phenol, có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 6mg/ml, tốt hơn là với lượng 5mg/ml.
9. Dược phẩm theo điểm 7 hoặc 8, trong đó chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là polysorbat 20, có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,05mg/ml, tốt hơn là với lượng 0,005mg/ml.
10. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tốt hơn nếu arginin này là L-arginin HCl.
11. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hMG có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 300 đến 900IU/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 500 đến 700IU/ml.

12. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm này được cấu thành bởi:

- 625IU/ml hMG
- 0,15mg/ml metionin
- 150mM arginin
- 5mg/ml phenol
- 0,005mg/ml polysorbat 20
- nước dùng để tiêm (WFI), và
- trong đó dược phẩm này có độ pH là 6,8+/-0,3.

13. Phương pháp làm ổn định dược phẩm dạng lỏng chứa hMG bao gồm các bước:

- lấy mẫu nước tiểu từ người phụ nữ,
- chiết hMG ra khỏi mẫu này,
- pha trộn dịch chiết này với arginin và metionin, với lượng như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên,
- tùy ý bổ sung phenol và polysorbat với lượng như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên,
- điều chỉnh độ pH của dược phẩm này sao cho độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5,
- không bổ sung chất đệm.

Fig.1

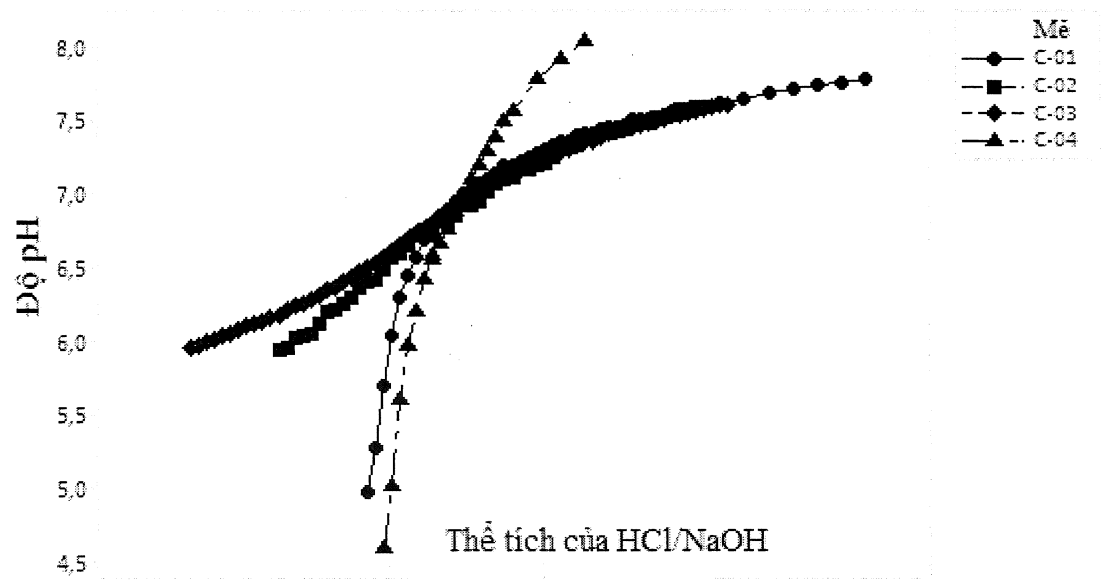


Fig. 2

