



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0040275

(51)⁷ A61K 47/10; A61K 9/08; A61K 31/166; (13) B
A61K 31/519

(21) 1-2018-02602

(22) 13/12/2016

(86) PCT/KR2016/014594 13/12/2016

(87) WO2017/105059 22/06/2017

(30) 10-2015-0178339 14/12/2015 KR

(45) 25/06/2024 435

(43) 25/09/2018 366A

(73) CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP. (KR)

8, Chungjeong-ro Seodaemun-gu Seoul 03742, Korea

(72) JOO, Min Jae (KR); SEO, Hye Jin (KR); PARK, Shin Jung (KR).

(74) CÔNG TY TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN TƯ VẤN ĐẦU TƯ VÀ SỞ HỮU TRÍ TUỆ
INTERFIVE (INTERFIVE CO., LTD)

(54) CHẾ PHẨM DẠNG LÔNG ỔN ĐỊNH CHỨA PEMETREXED HOẶC MUỐI
DƯỢC DỤNG CỦA NÓ

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm dạng lông có chứa pemetrexed và muối dược dụng của nó có độ ổn định được tăng cường và phương pháp điều chế chúng. Sáng chế đề xuất chế phẩm dùng tiêm ở dạng lông có chứa pemetrexed, có khả năng đảm bảo đủ sự ổn định trong suốt quá trình lưu hành và lưu trữ bằng việc lựa chọn vật liệu tối ưu và thiết lập khoảng nồng độ tối ưu để đảm bảo sự ổn định của pemetrexed. Sáng chế đề xuất chế phẩm pemetrexed được điều chế dưới dạng thương mại dùng sẵn, ngăn ngừa sự nhiễm vi sinh vật xảy ra trong quá trình đông khô hoặc hoàn nguyên, và tạo ra sự thuận tiện hơn trong việc sử dụng và độ ổn định.

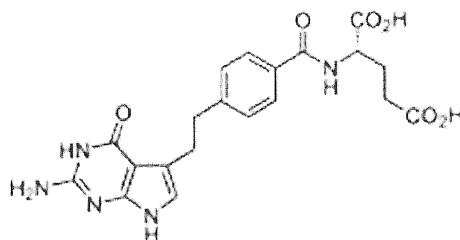
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa pemetrexed hoặc muối được dụng của nó, và phương pháp để bào chế chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Pemetrexed hoặc muối của nó (cụ thể là muối dinatri) thể hiện hiệu quả chống ung thư nhờ ức chế hoạt động của các chất chuyển hóa tham gia vào con đường chuyển hóa folat thành các dạng khác nhau của bệnh ung thư, bao gồm u trung biểu mô và ung thư phổi không tế bào nhỏ. Pemetrexed là chất kháng folat đa mục tiêu, ức chế thymidylat synthaza (TS) và dihydrofolat reductaza (DHFR) khi nó được hoạt hóa thành dẫn xuất của polyglutamat bởi folylpolyglutamat synthetaza (FPGS), sau đó nó được đưa tới tế bào thông qua chất mang folat được khử, là kênh vận chuyển nội bào chính của folat (Chattopadhyay và cộng sự, 2007. Pemetrexed: Dược lý hóa sinh học và tế bào, cơ chế và các ứng dụng lâm sàng. Tạp chí Liệu pháp ung thư bằng phân tử. 6, 404-417).

Tên hóa học của pemetrexed là N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl]-L-axit glutamic với cấu trúc hóa học như sau (xem sáng chế Mỹ số 5.344.932).



Ngày nay, pemetrexed được phát triển với tên thương mại là ALIMTA[®], và được bán tại Hàn Quốc từ năm 2007, và được sử dụng kết hợp với cisplatin cho những bệnh nhân có bệnh lý u trung mô màng phổi ác tính không phẫu thuật được mà không được tiếp nhận hóa trị, hoặc nó được sử dụng như yếu tố đơn trị liệu cho ung thư vú di căn cục

bộ và ung thư phổi không tế bào nhỏ sau khi thực hiện hóa trị. ALIMTA[®] được bán trên thị trường dưới dạng công thức đông khô, cần được hoàn nguyên trước khi sử dụng, tức là khi sử dụng cho bệnh nhân, công thức dưới dạng bột đông khô (100 hoặc 500 mg) cần được hoàn nguyên với dung dịch natri clorua 0,9% và hòa tan hoàn toàn (nồng độ cuối là 0,25 mg/ml) trong dung dịch natri clorua 0,9%.

Do sự không ổn định của dược phẩm trong pha dung dịch nước, nên chế phẩm tiêm của công thức đông khô được chuẩn bị trước dưới dạng bột đông khô và được sử dụng sau khi hoàn nguyên nó với nước muối sinh lý hoặc nước tiêm trước khi dùng cho bệnh nhân. Tuy nhiên, quá trình hoàn nguyên khá rườm rà khi đòi hỏi phải cân một lượng cần thiết nhất định và cho vào lọ đựng sản phẩm đông khô, và có nguy cơ bị nhiễm vi sinh vật trong suốt quá trình hoàn nguyên. Hơn nữa, nó cũng bị hạn chế về thời gian sử dụng sau khi đã hoàn nguyên. Hơn nữa, do chu kỳ sấy khô dài của quá trình đông khô yêu cầu nhiều giờ nên giá thành của sản phẩm cao và quá trình sản xuất phức tạp. Theo đó, khi xem xét về tính khả thi về kinh tế của sản xuất, sự tiện lợi của người dùng và tương tự thì cần có một chế phẩm dạng lỏng có sự ổn định được đảm bảo có thể sẵn sàng sử dụng.

Trong nhiều trường hợp, vấn đề của chế phẩm dạng lỏng là ở sự không ổn định trong suốt quá trình lưu trữ. Do sự không ổn định ở dạng lỏng nên nhiều chế phẩm dạng tiêm được sản xuất dưới dạng chế phẩm đông khô và được hòa tan trước khi được sử dụng tiêm cho bệnh nhân. Trong khi đó, pemetrexed là một ví dụ dược phẩm điển hình bị oxy hóa nhanh khi ở dạng nước, tạo ra các loại tạp chất khác nhau.

Phương pháp sử dụng các chất chống oxy hóa được thực hiện để tăng cường sự ổn định của chế phẩm dạng lỏng, và chế phẩm pemetrexed dạng lỏng có chứa chất chống oxy hóa được chọn từ nhóm bao gồm monothioglyxerol, L-cystein, và axit thioglycolic được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 6,686,365 (Đơn sáng chế Hàn Quốc có số công bố 2002-0081293) là chế phẩm dạng dung dịch ổn định của pemetrexed có chứa lượng pemetrexed phù hợp trị liệu, lượng chất chống oxy hóa phù hợp, và tá dược được chấp nhận dùng trong dược phẩm. Trong các ví dụ của sáng chế được đề cập ở trên, monothioglyxerol 2,4 mg/ml, L-cystein 0,03% , và axit thioglycolic được mô tả như là thành phần chất chống oxy hóa. Tuy nhiên, mức độ cải thiện sự ổn định dựa trên ví dụ

thử nghiệm cụ thể, như đánh giá sự an toàn, không được đề cập đến. Hơn nữa, loại chất oxy hóa tối ưu và nồng độ tối ưu của nó không được lựa chọn trong các ví dụ cụ thể. Hơn nữa, khi các tác giả sáng chế đánh giá sự an toàn bằng cách lặp lại các ví dụ theo sáng chế được đề cập ở trên, kết quả cho thấy sự thay đổi trong 4 tuần các đặc tính như sự đổi màu, gia tăng tạp chất, hoặc tương tự sau khi thực hiện thử nghiệm an toàn dưới các điều kiện được tăng cường (40°C, 75% RH) ở tất cả các ví dụ. Như vậy, các tác giả sáng chế đã thừa nhận nhu cầu cần phát triển công nghệ cụ thể và tiên tiến hơn, cho phép tạo ra công thức dạng lỏng có chứa pemetrexed có đủ độ ổn định trong suốt quá trình lưu hành và lưu trữ, và do đó chúng tôi đã bắt đầu nghiên cứu sáng chế này.

Hơn nữa, trong đơn sáng chế Hàn Quốc số 1260636, chế phẩm có độ ổn định được tăng cường bằng cách sử dụng axetyl cystein làm chất chống oxy hóa và axit xitric làm chất đệm cho pemetrexed được bộc lộ, và đơn sáng chế Hàn Quốc có số công bố 2013-0122065 đề cập đến chế phẩm có độ ổn định được tăng cường bằng cách có chứa ít nhất một chất ổn định được lựa chọn từ natri sunfua và natri sunfit làm chất chống oxy hóa. Đối với kết quả đánh giá độ ổn định của dạng chất lỏng được điều chế theo các ví dụ của sáng chế nêu trên, sự ổn định không được thể hiện bởi có sự thay đổi các đặc tính như sự đổi màu, gia tăng tạp chất, hoặc tương tự trong vòng 4 tuần ở 60°C, và do đó nó không được công nhận là công nghệ dễ lặp lại. Hơn nữa, trong đặc điểm kỹ thuật, chỉ mô tả kết quả quan sát độ an toàn trong vòng 4 tuần ở 60°C, và hoàn toàn không đề cập đến độ ổn định sau 4 tuần. Theo đó, các tác giả sáng chế của sáng chế có dự định đề xuất công nghệ dễ dàng lặp lại và có khả năng duy trì độ ổn định trong 3 tháng hoặc lâu hơn, và tốt hơn là thời gian là 6 tháng ở 60°C hoặc cao hơn.

Trong quá trình nghiên cứu các chất chống oxy hóa khác nhau, các tác giả sáng chế của sáng chế đã tìm ra trong số các chất chống oxy hóa có thể được sử dụng trong lĩnh vực thích hợp, chất monothioglycerol có khả năng tăng cường đáng kể độ ổn định của pemetrexed. Thông thường, chất chống oxy hóa được biết là dùng để ngăn chặn sự phân hủy của một chất có hoạt tính dược lý bị gây ra bởi sự oxy hóa và làm gia tăng tạp chất, độ an toàn được tăng cường tương ứng với lượng chất chống oxy hóa khi nó được chứa với mức độ nhất định hoặc cao hơn. Tuy nhiên, trừ các mô tả được đưa ra trong các sáng chế đã biết, các tác giả sáng chế của sáng chế chỉ ra hiệu quả tích cực của

monothioglycerol trong việc làm ổn định pemetrexed khi monothioglycerol ở nồng độ 1,5 mg/ml hoặc cao hơn. Như vậy, bằng cách lựa chọn vật liệu tối ưu và thiết lập nồng độ tối ưu cho việc đảm bảo độ ổn định của pemetrexed, các tác giả sáng chế của sáng chế đã thành công trong việc tạo ra chế phẩm tiêm dạng lỏng có chứa pemetrexed cho phép đảm bảo sự ổn định đủ trong suốt quá trình lưu hành và cất giữ và chế phẩm được ổn định trong 3 tháng hoặc lâu hơn, và tốt hơn là 6 tháng hoặc lâu hơn ở 60°C. Do đó, có thể tạo ra chế phẩm pemetrexed dạng lỏng có độ ổn định được duy trì trong thời gian dài ở nhiệt độ cao.

Chế phẩm cũng đòi hỏi giảm thiểu sự tiếp xúc với oxy để đảm bảo sự ổn định của dược chất dễ bị phân hủy bởi quá trình oxy hóa. Như vậy, để làm giảm sự phân hủy của pemetrexed do tiếp xúc với oxy, lượng oxy hòa tan trong dung dịch và lượng oxy ở khoảng trống đầu lọ chứa cần được kiểm soát. Sau nhiều thử nghiệm khác nhau, các tác giả sáng chế xác định có thể thu được chế phẩm đủ ổn định khi hàm lượng oxy trong chế phẩm dạng lỏng được tạo ra theo sáng chế được kiểm soát dưới 1,5%, và tốt hơn là dưới 1,0% ở phần khoảng trống đầu lọ chứa. Về khía cạnh này, phương pháp làm đầy khí trơ (ví dụ nitơ và argon) được thực hiện để làm chất phân cách ở khoảng trống đầu lọ chứa.

Kết quả là, bằng cách lựa chọn chất chống oxy hóa tối ưu và thiết lập nồng độ chất chống oxy hóa tối ưu và nồng độ oxy tiêu chuẩn trong khoảng trống đầu lọ chứa, các tác giả sáng chế đã tạo ra công thức dạng lỏng có chứa pemetrexed có độ ổn định đáng kể khi so sánh với các công nghệ đã biết và có thể sản xuất một cách ổn định dưới dạng sản phẩm thương mại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Khi xem xét các vấn đề được mô tả ở trên, các tác giả sáng chế của sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu khác nhau để cải thiện độ ổn định của chế phẩm dạng lỏng có chứa pemetrexed hoặc muối của nó dưới dạng dung dịch tiêm, và qua quá trình sàng lọc nhiều chất chống oxy hóa khác nhau, các tác giả sáng chế đã tìm ra chất monothioglycerol có hiệu quả chống oxy hóa tốt, đồng thời cho thấy hiệu quả chống oxy hóa bị giảm khi nồng độ trên 1,5 mg/ml. Bằng cách thiết lập tiêu chuẩn oxy được hòa

tan trong chế phẩm cấu thành nên sáng chế và hàm lượng oxy trong khoảng trống đầu lọ chứa, độ ổn định của chế phẩm đã được tăng cường.

Để đảm bảo độ an toàn của pemetrexed ở trạng thái dung dịch, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng lỏng dùng để tiêm có chứa pemetrexed được bào chế bằng cách hòa tan pemetrexed hoặc muối được dụng của nó trong dung dịch nước có chứa monothioglycerol 0,5-1,25 mg/ml làm chất chống oxy hóa, và sau đó rót đầy vào lọ chứa và kiểm soát oxy ở khoảng trống đầu lọ chứa dưới 1,5%, và tốt hơn là dưới 1,0%.

Theo sáng chế, nồng độ của pemetrexed hoặc muối được dụng của chúng là 1-100 mg/ml, tốt hơn là 20-100 mg/ml, và tốt hơn nữa là 25 mg/ml.

Theo sáng chế Mỹ số 6.686.365 (đơn sáng chế Hàn Quốc có số công bố 2002-0081293), bộc lộ việc sử dụng monothioglycerol làm chất chống oxy hóa để đảm bảo sự ổn định của pemetrexed dưới dạng dung dịch và chế phẩm dạng lỏng có chứa 2,4 mg/ml monothioglycerol trong các ví dụ. Cụ thể, các kết quả thử nghiệm cụ thể liên quan đến tính ổn định không được đưa ra. Ngược lại, sự thiếu hiệu quả chống oxy hóa ở nồng độ nêu trên được xác nhận bởi quy trình của sáng chế. Nó cũng bộc lộ hiệu quả chống oxy hóa được thể hiện khi monothioglycerol được chứa trong chế phẩm với nồng độ nhất định hoặc cao hơn.

Dựa trên các thử nghiệm sử dụng nhiều khoảng nồng độ khác nhau trong thời gian dài, các tác giả sáng chế đã nhận thấy hiệu quả chống oxy hóa tối ưu được thể hiện khi chế phẩm chứa monothioglycerol 1,25 mg/ml hoặc nhỏ hơn, và khi chứa monothioglycerol nồng độ lớn hơn thì hiệu quả chống oxy hóa bị giảm đáng kể. Hơn nữa, để thu được tác dụng phụ thấp hơn của chế phẩm dạng lỏng cho cơ thể con người và giá thành sản xuất thấp hơn bằng việc giảm hàm lượng chất chống oxy hóa, chế phẩm cần chứa monothioglycerol nồng độ ít nhất là 0,5 mg/ml để duy trì những ưu điểm kể trên trong khi vẫn duy trì được hiệu quả chống oxy hóa tuyệt vời. Theo đó, nhận thấy rằng độ ổn định của pemetrexed được tăng cường đáng kể trong chế phẩm dạng lỏng khi chứa monothioglycerol nồng độ 0,5-1,25 mg/ml, tốt hơn là 0,5-1,00 mg/ml, và tốt hơn nữa là 0,5-0,8 mg/ml.

Hơn nữa, độ ổn định của pemetrexed được tăng cường đáng kể trong chế phẩm dạng lỏng trong đó có chứa pemetrexed hoặc muối được dụng của nó làm thành phần hoạt tính và monothioglycerol làm chất chống oxy hóa với tỷ lệ 20: 1 đến 50: 1, tốt hơn là 25: 1 đến 50: 1.

Chế phẩm dùng tiêm dạng lỏng có chứa pemetrexed đủ độ ổn định trong quá trình lưu hành và cất giữ được tạo ra bằng việc thiết lập lượng oxy hòa tan trong dung dịch thấp hơn 0,5 ppm và thiết lập hàm lượng oxy ở khoang trống đầu lọ chứa dưới 1,5%, và tốt hơn là dưới 1%, là cách làm giảm tối đa sự phân hủy của pemetrexed do tiếp xúc với oxy.

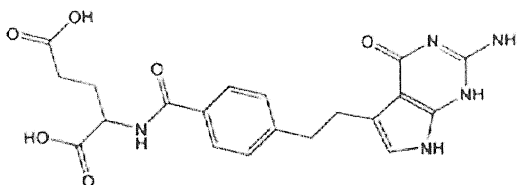
Theo đánh giá dựa trên tiêu chuẩn quản lý chất lượng sản phẩm, chế phẩm được đề xuất bởi sáng chế được xác nhận là có độ ổn định tương đương với độ ổn định của công thức dùng cho tiêm hiện có ở dạng rắn về sự gia tăng sự phân hủy sản phẩm bao gồm sự đổi màu trong 3 tháng hoặc lâu hơn, và tốt hơn là trong 6 tháng ở điều kiện lưu giữ khắc nghiệt (60°C).

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm pemetrexed theo sáng chế chứa pemetrexed hoặc muối được dụng của nó như thành phần hoạt tính.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "pemetrexed" dùng để chỉ hợp chất pyrrolo[2,3-d]pyrimidin được thế ở vị trí 5' được biểu diễn bởi công thức hóa học 1 dưới đây và là chất chống folat đa mục tiêu cho thấy hiệu quả chống ung thư trong các dạng ung thư khác nhau bao gồm ung thư phổi không tế bào nhỏ và u trung mô màng phổi ác tính.

[Công thức hóa học 1]



Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "muối được dụng" dùng để chỉ muối được sản xuất bằng các phương pháp thông thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể là, muối được dụng bao gồm muối có nguồn gốc từ các axit vô cơ được dụng, axit hữu cơ được dụng, hoặc bazơ, và sáng chế không nhằm giới hạn ở các chất này. Đặc biệt là, muối được dụng của pemetrexed có thể là muối dinatri của pemetrexed được bán sẵn hiện nay, nhưng không giới hạn.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "pemetrexed hoặc muối được dụng của nó" dùng để chỉ khái niệm bao gồm cả dạng pemetrexed ngâm nước hoặc muối được dụng ngâm nước của nó, và bất kỳ dạng ngâm nước nào, ví dụ ngâm 2,5 nước, ngâm 7 nước hoặc tương tự, và sáng chế không nhằm giới hạn ở các chất này.

Theo sáng chế, chế phẩm pemetrexed có thể chứa chất mang được dụng và chất điều chỉnh độ pH.

Theo sáng chế, chế phẩm pemetrexed tốt hơn là chế phẩm dạng lỏng có khả năng lưu trữ dưới dạng dung dịch, và tốt hơn nữa là chế phẩm dạng lỏng sẵn sàng sử dụng cho tiêm được chứa trong đồ chứa kín.

Theo sáng chế, khi chế phẩm pemetrexed là chế phẩm dạng lỏng dùng cho tiêm, chất mang được chấp nhận trong được phẩm là nước tiêm.

Để sản xuất chế phẩm theo sáng chế, khí trơ như khí nitơ hoặc argon có thể được sử dụng để loại bỏ khí oxy được hòa tan trong dung dịch tiêm bằng cách đuổi khí ra khỏi dung dịch. Có thể kết hợp các phương pháp đuổi khí, ví dụ đuổi khí bằng chân không kết hợp đuổi khí bằng bóng khí N₂, đuổi khí bằng chân không kết hợp đuổi khí bằng màng, hoặc đuổi khí bằng chân không kết hợp đuổi khí bằng chất xúc tác bằng nhựa hoặc tương tự. Hơn nữa, việc đuổi khí có thể được thực hiện một hoặc nhiều lần.

Theo sáng chế, pH của chế phẩm pemetrexed dạng lỏng dùng cho tiêm tốt hơn là trong khoảng 6-8, và tốt hơn nữa là khoảng 7,2-7,8. pH của dung dịch được điều chỉnh bằng cách sử dụng axit như axit clohydric hoặc bazơ như natri hidroxit.

Chế phẩm pemetrexed theo sáng chế có thể không chứa chất phụ gia khác ngoài monothioglycerol được đề cập ở trên. Tuy nhiên, chế phẩm cũng có thể chứa thêm tá

được được chấp nhận trong được phẩm. Tá được được dụng được sử dụng là tá được đã biết như lactozơ, dextrozơ, xyclodextrin và dẫn xuất của nó, saccarozơ, glyxerol, hoặc natri cacbonat. Tốt hơn là tá được bao gồm natri clorua và mannitol, nhưng không giới hạn.

Dung dịch chứa pemetrexed được ổn định dùng cho tiêm theo sáng chế được đóng gói trong đồ chứa thích hợp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ về đồ chứa thích hợp bao gồm lọ thủy tinh, chai thủy tinh, hộp chứa, ống tiêm được làm đầy sẵn, và bất kỳ dạng nào tương tự, và tốt hơn là lọ thủy tinh.

Chế phẩm được chia ra vào các đồ chứa đã được rửa và khử trùng trước và được bịt bằng nút bịt teflon thích hợp với đồ chứa và trợ với dung dịch nước pemetrexed. Nút bịt được gắn bằng kim kẹp.

Theo sáng chế, chế phẩm pemetrexed được sản xuất dưới dạng thương mại dùng sẵn, ngăn ngừa sự nhiễm vi sinh vật xảy ra trong quá trình đông khô hoặc hoàn nguyên, và tạo ra sự thuận tiện hơn trong việc sử dụng và độ ổn định. Đặc biệt là, dựa vào sự lựa chọn chất chống oxy hóa tối ưu, sự thiết lập nồng độ chất chống oxy hóa tối ưu, và sự quản lý nồng độ oxy ở phía đầu lọ để đạt sự ổn định tối ưu cho dung dịch chứa pemetrexed, độ ổn định được tăng đáng kể so với các công nghệ đã biết. Cuối cùng, chế phẩm tiêm có chứa pemetrexed ở dạng lỏng theo sáng chế có độ ổn định tốt trong suốt chu trình sử dụng và lưu trữ và được ổn định trong 3 tháng hoặc lâu hơn, và tốt hơn là 6 tháng ở 60°C.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được làm rõ hơn thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa để làm rõ sáng chế, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1-4 và ví dụ so sánh 1-2: Sản xuất dung dịch tiêm chứa pemetrexed theo các nồng độ chất chống oxy hóa khác nhau

D-mannitol được hòa tan vào 1000 ml nước tiêm, và monothioglyxerol được thêm vào với các nồng độ theo bảng 1 dưới đây và được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch. Để hoàn thành chế phẩm, 30,206 g dinatri pemetrexed ngâm 2,5 nước (tương

đương 25 g pemetrexed) được thêm vào từ từ và được khuấy cho đến khi trở nên trong suốt. Dung dịch thu được được lọc vô trùng bằng cách sử dụng màng lọc 0,22 μm , và nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch sau lọc được điều chỉnh về khoảng 0,5 ppm bằng nitơ được làm sạch. pH của tất cả các dung dịch được điều chế theo ví dụ 1-4 và ví dụ so sánh 1-2 được đo là 7,6. Dung dịch thu được ở trên của mỗi ví dụ 1-4 và ví dụ so sánh 1-2 được cho vào lọ, và sau đó được điều chỉnh nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa bằng cách sử dụng khí nitơ, và được bịt bằng nút bịt cao su và bọc nắp nhôm.

Bảng 1.

	Nồng độ của thành phần chính (mg/ml)	Chất chống oxy hóa	Nồng độ của chất chống oxy hóa (mg/ml)	Lượng oxy hòa tan (ppm)	Nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa (%)
Ví dụ 1	25	monothioglycerol	0,50	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ 2	25	monothioglycerol	0,75	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ 3	25	monothioglycerol	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ 4	25	monothioglycerol	1,25	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 1	25	monothioglycerol	1,50	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 2	25	monothioglycerol	0,10	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn

Ví dụ 3, 5-6 và ví dụ so sánh 3-4: Sản xuất dung dịch tiêm chứa pemetrexed theo các nồng độ oxy ở phần đầu lọ khác nhau

Dung dịch tiêm chứa pemetrexed được sản xuất theo cách giống ví dụ 3 ở trên theo các nồng độ oxy ở phần đầu lọ khác nhau được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2

	Nồng độ của thành phần chính (mg/ml)	Chất chống oxy hóa	Nồng độ của chất chống oxy hóa (mg/ml)	Lượng oxy hòa tan (ppm)	Nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa (%)
Ví dụ 5	25	monothioglycerol	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	0,5

Ví dụ 3	25	monothioglycerol	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0
Ví dụ 6	25	monothioglycerol	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,5
Ví dụ so sánh 3	25	monothioglycerol	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	2,0
Ví dụ so sánh 4	25	monothioglycerol	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	5,0

Ví dụ so sánh 5-10: Sản xuất dung dịch tiêm chứa pemetrexed theo loại chất chống oxy hóa

Dung dịch tiêm chứa pemetrexed được sản xuất theo cách giống ví dụ 3 ở trên theo thành phần và hàm lượng trên bảng 3 dưới đây. Trong ví dụ so sánh 5, sản phẩm được tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch chỉ có nước tiêm được loại khí được sử dụng làm dung môi mà không bổ sung chất chống oxy hóa.

Bảng 3

	Nồng độ của thành phần chính (mg/ml)	Chất chống oxy hóa	Nồng độ của chất chống oxy hóa (mg/ml)	Lượng oxy hòa tan (ppm)	Nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa (%)
Ví dụ so sánh 5	25	-	-	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 6	25	L-Cystein	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 7	25	axit thioglycolic	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 8	25	EDTA	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 9	25	Natri sunfit	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn
Ví dụ so sánh 10	25	Natri sunfua	1,00	0,5 hoặc nhỏ hơn	1,0 hoặc nhỏ hơn

Thử nghiệm độ ổn định

Đối với các chế phẩm thu được từ ví dụ 1-6 theo sáng chế, cũng như ví dụ so sánh 1-10, thử nghiệm đánh giá độ ổn định trong 6 tháng được thực hiện ở điều kiện được tăng cường (40°C, 75% RH) và điều kiện khắc nghiệt (60°C). Đối với thử nghiệm

độ ổn định, ngoài việc đánh giá các đặc tính của dung dịch nước thì lượng tạp chất còn lại trong dung dịch nước được phân tích và được đo theo phương pháp dưới đây.

Điều kiện để chạy sắc ký lỏng cao áp HPLC cho các tạp chất

- Máy dò: Máy đo quang phổ UV (bước sóng đo: 250 nm)
- Cột sắc ký: Zorbax SB-C8 (4,6 mm x 15 cm, 3,5 μ m) hoặc cột tương đương
- Lượng thuốc tiêm: 20 μ l
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Nhiệt độ cột: 35°C
- Nhiệt độ dò chất lỏng: Nhiệt độ không đổi khoảng 2-8°C
- Pha động A - Hỗn hợp chất lỏng của đệm chiết axetat¹⁾ : axetonitril (97 : 3)
- Pha động A - Hỗn hợp chất lỏng của đệm chiết axetat¹⁾ : axetonitril (87,5 : 12,5)

Bảng 4.

Thời gian (phút)	Pha di động A (%)	Pha di động B (%)
0	100	0
40	0	100
45	0	100
47	100	0
55	100	0

*¹⁾ Đệm chiết axetat (0,03 mol/l, pH 5,5): Chất lỏng được thu bằng cách bổ sung 3,4 ml axit axetic vào 2 lít nước sau đó trộn kỹ và điều chỉnh pH về pH 5,5 bằng cách sử dụng natri hydroxit.

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm độ ổn định được tăng cường (Đánh giá độ ổn định trong 6 tháng ở 40°C, 75%RH)

Như được mô tả ở trên, kết quả thực hiện thử nghiệm độ ổn định được tăng cường trong 6 tháng (40°C, 75% RH) đối với các chế phẩm thu được từ ví dụ 1-6 và ví dụ so sánh 1-10 được thể hiện trên bảng 5-7. Đối với các tiêu chuẩn đánh giá cho thử nghiệm độ ổn định, sự duy trì "không màu" đến "vàng nhạt sáng" được thiết lập làm tiêu chuẩn cho các đặc tính của dung dịch nước, và tạp chất tổng số chiếm 1,5% hoặc ít hơn và tạp chất đơn lẻ chiếm 0,24% hoặc ít hơn được thiết lập làm tiêu chuẩn giống như tiêu chuẩn theo dõi tạp chất đã biết được tạo bởi sự oxy hóa.

Bảng 5.

	Nồng độ monothioglycerol (mg/ml)	Thời gian	Đặc tính	Tạp chất tổng số (%)	Tạp chất đơn lẻ (%)
Ví dụ 1	0,50	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,04	0,04
		4 tuần	Không màu	0,25	0,10
		3 tháng	Không màu	0,38	0,14
		6 tháng	Không màu	0,46	0,15
Ví dụ 2	0,75	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,14	0,09
		3 tháng	Không màu	0,20	0,11
		6 tháng	Không màu	0,26	0,13
Ví dụ 3	1,00	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,09	0,08
		3 tháng	Không màu	0,18	0,10
		6 tháng	Không màu	0,24	0,11

Ví dụ 4	1,25	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,11	0,09
		4 tuần	Không màu	0,12	0,10
		3 tháng	Không màu	0,18	0,12
		6 tháng	Màu vàng nhạt sáng	0,36	0,23
Ví dụ so sánh 1	1,50	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Màu vàng nhạt sáng	0,61	0,20
		3 tháng	Màu vàng sáng	0,95	0,36
		6 tháng	Màu vàng sáng	1,21	0,52
Ví dụ so sánh 2	0,10	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,05	0,05
		4 tuần	Màu vàng nhạt sáng	0,56	0,13
		3 tháng	Màu vàng sáng	0,71	0,24
		6 tháng	Màu vàng sáng	0,94	0,30

Theo kết quả thu được ở bảng 5, khi monothioglycerol được sử dụng làm chất chống oxy hóa với nồng độ xấp xỉ 0,5-1,25 mg/ml, thì tạp chất đơn lẻ (tiêu chuẩn: 0,24% hoặc ít hơn) và tạp chất tổng số (tiêu chuẩn: 1,5% hoặc ít hơn) được duy trì ở mức tiêu chuẩn hoặc thấp hơn trong suốt 6 tháng thử nghiệm độ ổn định được tăng cường, cho thấy độ ổn định tuyệt vời của nó (ví dụ 1-4). Mặt khác, khi nồng độ monothioglycerol nằm trong khoảng 0,1-1,5 mg/ml (ví dụ so sánh 1) thì nhận thấy rằng tạp chất đơn lẻ vượt quá mức tiêu chuẩn với sự thay đổi đặc tính của dung dịch nước (tức là sự đổi màu).

Bảng 6

	Nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa (%)	Thời gian	Đặc tính	Tạp chất tổng số (%)	Tạp chất đơn lẻ (%)
Ví dụ 5	0,5	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,14	0,09
		3 tháng	Không màu	0,22	0,10
		6 tháng	Không màu	0,26	0,11
Ví dụ 3	1,0	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,09	0,08
		3 tháng	Không màu	0,18	0,10
		6 tháng	Không màu	0,24	0,11
Ví dụ 6	1,5	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Không màu	0,14	0,09
		3 tháng	Không màu	0,20	0,11
		6 tháng	Không màu	0,26	0,12
Ví dụ so sánh 3	2,0	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Màu vàng nhạt sáng	0,46	0,20
		3 tháng	Màu vàng sáng	0,81	0,63
		6 tháng	Màu vàng	1,10	0,92

Ví dụ so sánh 4	5,0	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,10	0,09
		4 tuần	Màu vàng	2,32	1,32
		3 tháng	Màu vàng	3,08	1,59
		6 tháng	Màu vàng	3,56	1,82

Theo kết quả thu được từ bảng 6, khi nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa nhỏ hơn 1,5%, thì tạp chất đơn lẻ (tiêu chuẩn: 0,24% hoặc ít hơn) và tạp chất tổng số (tiêu chuẩn: 1,5% hoặc ít hơn được duy trì ở mức tiêu chuẩn hoặc thấp hơn trong suốt 6 tháng thử nghiệm độ ổn định được tăng cường, cho thấy độ ổn định tuyệt vời của nó (ví dụ 3, 5 và 6). Mặt khác, khi nồng độ oxy ở phần đầu lọ cao hơn so với nồng độ được đề cập ở trên (ví dụ so sánh 3 và 4) thì nhận thấy rằng tạp chất tăng lên so với tiêu chuẩn thông qua sự thay đổi của đặc tính dung dịch nước (tức là sự đổi màu).

Bảng 7

	Chất chống oxy hóa	Thời gian	Đặc tính	Tạp chất tổng số (%)	Tạp chất đơn lẻ (%)
Ví dụ so sánh 5	-	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Màu vàng	1,46	0,80
		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 6	L-Cystein	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Màu vàng	0,80	0,46
		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 7	Axit thioglycolic	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,10	0,08
		4 tuần	Màu vàng	1,34	0,39

		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 8	EDTA	Trạng thái ban đầu	Không màu	1,20	0,53
		4 tuần	Màu vàng	3,02	1,38
		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 9	Natri sunfit	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Màu vàng	1,70	0,56
		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 10	Natri sunfua	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,07
		4 tuần	Màu vàng	1,46	0,48
		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-

Theo kết quả được thể hiện trên bảng 7, khi chế phẩm không chứa chất chống oxy hóa hoặc chất chống oxy hóa thường được sử dụng phổ biến, thì có sự thay đổi đặc tính (tức là có sự đổi màu) hoặc lượng tạp chất đơn lẻ và tạp chất tổng số tăng lên so với tiêu chuẩn sau 1 tháng thử nghiệm độ ổn định được tăng cường. Hơn nữa, chỉ sau 3 tháng lưu trữ, xảy ra sự đổi màu thành màu vàng đậm, và do đó không có sự quan sát nào được thực hiện sau đó. Cụ thể, việc sử dụng monothioglycerol để sản xuất chế phẩm dung dịch tiêm chứa pemetrexed tạo ra độ ổn định cao hơn đáng kể so với trường hợp sử dụng L-cystein, natri sunfua, natri sunfit, hoặc dạng tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm độ ổn định khắc nghiệt (Đánh giá độ ổn định trong 6 tháng ở 60°C)

Như được mô tả ở trên, kết quả thực hiện thử nghiệm độ ổn định trong điều kiện khắc nghiệt trong 6 tháng (60°C) đối với các chế phẩm thu được từ ví dụ 1-6 và ví dụ so sánh 1-4 được thể hiện trên bảng 8 và 9. Đối với các tiêu chuẩn đánh giá cho thử nghiệm

độ ổn định, sự duy trì "không màu" đến "vàng nhạt sáng" được thiết lập làm tiêu chuẩn cho các đặc tính của dung dịch nước, và tạp chất tổng số chiếm 1,5% hoặc ít hơn và tạp chất đơn lẻ chiếm 0,24% hoặc ít hơn được thiết lập làm tiêu chuẩn giống như tiêu chuẩn theo dõi tạp chất đã biết được tạo bởi sự oxy hóa.

Bảng 8

	Nồng độ monothioglyxerol (mg/ml)	Thời gian	Đặc tính	Tạp chất tổng số (%)	Tạp chất đơn lẻ (%)
Ví dụ 1	0,50	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,04	0,04
		4 tuần	Không màu	0,26	0,12
		3 tháng	Không màu	0,48	0,13
		6 tháng	Không màu	0,51	0,13
Ví dụ 2	0,75	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,24	0,09
		3 tháng	Không màu	0,42	0,15
		6 tháng	Không màu	0,81	0,20
Ví dụ 3	1,00	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,34	0,13
		3 tháng	Không màu	0,65	0,17
		6 tháng	Không màu	0,72	0,19
Ví dụ 4	1,25	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,11	0,09
		4 tuần	Không màu	0,10	0,09

		3 tháng	Không màu	0,15	0,12
		6 tháng	Màu vàng nhạt sáng	1,08	0,23
Ví dụ so sánh 1	1,50	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Màu vàng	1,49	0,34
		3 tháng	Màu vàng	2,24	1,78
		6 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 2	0,10	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,05	0,05
		4 tuần	Màu vàng sáng	0,74	0,13
		3 tháng	Màu vàng	1,68	0,32
		6 tháng	Màu vàng	1,97	0,68

Theo kết quả thu được ở bảng 8, khi monothioglycerol được sử dụng như là chất chống oxy hóa với nồng độ xấp xỉ 0,5-1,25 mg/ml, thì tạp chất đơn lẻ (tiêu chuẩn: 0,24% hoặc ít hơn) và tạp chất tổng số (tiêu chuẩn: 1,5% hoặc ít hơn) được duy trì ở mức tiêu chuẩn hoặc thấp hơn trong suốt 6 tháng thử nghiệm độ ổn định với điều kiện khắc nghiệt, cho thấy độ ổn định tuyệt vời của nó (ví dụ 1-4). Mặt khác, khi nồng độ monothioglycerol nằm trong khoảng 0,1 mg/ml (ví dụ so sánh 2) đến 1,5 mg/ml (ví dụ so sánh 1), thì xảy ra sự đổi màu thành màu vàng đậm sau 6 tháng lưu trữ, và do đó việc đo lường tạp chất không cần được thực hiện.

Bảng 9

	Nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa (%)	Thời gian	Đặc tính	Tạp chất tổng số (%)	Tạp chất đơn lẻ (%)
--	--	-----------	----------	----------------------	---------------------

Ví dụ 5	0,5	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,19	0,11
		3 tháng	Không màu	0,21	0,14
		6 tháng	Không màu	0,31	0,17
Ví dụ 3	1,0	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,08	0,07
		4 tuần	Không màu	0,34	0,13
		3 tháng	Không màu	0,65	0,17
		6 tháng	Không màu	0,72	0,19
Ví dụ 6	1,5	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Không màu	0,19	0,11
		3 tháng	Không màu	0,33	0,16
		6 tháng	Không màu	1,08	0,18
Ví dụ so sánh 3	2,0	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,09	0,08
		4 tuần	Màu vàng sáng	0,79	0,25
		3 tháng	Màu vàng	1,25	0,84
		6 tháng	Màu vàng đậm	-	-
Ví dụ so sánh 4	5,0	Trạng thái ban đầu	Không màu	0,10	0,09
		4 tuần	Màu vàng	3,17	1,79
		3 tháng	Màu vàng đậm	-	-
		6 tháng	Màu vàng đậm	-	-

Theo kết quả thu được từ bảng 9, khi nồng độ oxy ở khoảng trống ở đầu lọ chứa nhỏ hơn 1,5%, thì tạp chất đơn lẻ (tiêu chuẩn: 0,24% hoặc ít hơn) và tạp chất tổng số (tiêu chuẩn: 1,5% hoặc ít hơn) được duy trì ở mức tiêu chuẩn hoặc thấp hơn trong suốt 6 tháng thử nghiệm độ ổn định với điều kiện khắc nghiệt, cho thấy độ ổn định tuyệt vời của nó (ví dụ 3, 5 và 6). Mặt khác, do nồng độ oxy trong khoảng trống ở đầu lọ chứa cao hơn so với nồng độ nêu trên (ví dụ so sánh 3 và 4), nên nhận thấy sự thay đổi của đặc tính dung dịch nước (tức là sự đổi màu) và tạp chất cao hơn đáng kể so với tiêu chuẩn của 3 tháng lưu trữ dưới điều kiện khắc nghiệt.

Trong trường hợp nồng độ oxy ở phần đầu lọ là 2,0% (ví dụ so sánh 3) hoặc 5% (ví dụ so sánh 4), thì sự đổi màu thành màu vàng đậm tương ứng với thời gian lưu trữ sau 6 và 3 tháng, và do đó việc đo lường tạp chất không cần được thực hiện. Từ đó nhận thấy rằng, khi sản xuất dung dịch tiêm chứa pemetrexed và muối được dụng của nó có chứa monothioglycerol như một chất chống oxy hóa với khoảng nồng độ nhất định và nồng độ oxy ở phần đầu lọ được giữ 1,5%, thì công thức có độ ổn định được cải thiện đáng kể không chỉ ở điều kiện nhiệt độ thường mà còn ở điều kiện khắc nghiệt 60°C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dạng lỏng chứa pemetrexed hoặc muối được dụng của nó làm thành phần hoạt tính và monothioglycerol có nồng độ từ 0,50 đến 1,00 mg/ml làm chất chống oxy hóa, trong đó lượng oxy hòa tan trong dung dịch không vượt quá 0,5 phần triệu.
2. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, trong đó monothioglycerol làm chất chống oxy hóa có mặt trong chế phẩm với nồng độ từ 0,5 đến 0,8 mg/ml.
3. Chế phẩm dạng lỏng chứa pemetrexed hoặc muối được dụng của nó làm thành phần hoạt tính và monothioglycerol làm chất chống oxy hóa, trong đó thành phần hoạt tính và monothioglycerol có tỷ lệ từ 25:1 đến 50:1, trong đó lượng oxy hòa tan trong dung dịch không vượt quá 0,5 phần triệu.
4. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính có nồng độ từ 20 đến 100 mg/ml.
5. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó thành phần hoạt tính là dinatri pemetrexed ngâm 2,5 nước.
6. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó thành phần hoạt tính là dinatri pemetrexed ngâm 7 nước.
7. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.
8. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm dạng lỏng được đóng gói trong vật chứa kín, và nồng độ oxy trong khoang khí phía trên của vật chứa kín chiếm không quá 1,5% theo thể tích.
9. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 8, trong đó nồng độ oxy trong khoang khí phía trên của vật chứa kín chiếm không quá 1,0% theo thể tích.
10. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó từng loại tạp chất được duy trì ở mức 0,24% hoặc thấp hơn và tạp chất tổng số được duy trì ở

mức 1,5% hoặc thấp hơn trong thời gian 3 tháng hoặc lâu hơn ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối 75%.

11. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó từng loại tạp chất được duy trì ở mức 0,24% hoặc thấp hơn và tạp chất tổng số được duy trì ở mức 1,5% hoặc thấp hơn trong thời gian 3 tháng hoặc lâu hơn ở nhiệt độ 60°C.

12. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 10, trong đó từng loại tạp chất được duy trì ở mức dưới 0,24% hoặc thấp hơn và tạp chất tổng số được duy trì ở mức 1,5% hoặc thấp hơn trong thời gian 6 tháng hoặc lâu hơn ở nhiệt độ 40°C và độ ẩm tương đối 75%.

13. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 11, trong đó từng loại tạp chất được duy trì ở mức 0,24% hoặc thấp hơn và tạp chất tổng số được duy trì ở mức 1,5% hoặc thấp hơn trong thời gian 6 tháng hoặc lâu hơn ở nhiệt độ 60°C.