بسم الله الرحمن الرحيم

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

المملكة العربية السعودية

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ١١٨٨٢٨/م/١٠ وتاريخ ١٤٢٥/١١/١٤هـ، يقرر منح:

فيرينج بي. في.

Ferring B.V.

براءة اختراع رقم ٤١٦٧

بتاريخ ١٤٣٦/٠٩/٢٢هـ الموافق ٢٠١٥/٠٧/٠٩ م

عن الاختراع المسمى/ تثبيت الهرمونات المنشطة للحويصلات (FSH)

Stabilization follicle stimulating hormone (FSH)

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي

م. سامي بن علي السديس

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

[19] **المملكة العربية السعودية** SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] **رقم البراءة:** ٤١٦٧
[45] **تاريخ المنح:** ١٤٣٦/٠٩/٢٢ هـ
الموافـــق: ٢٠١٥/٠٧/٠٩ م

[12] براءة اختراع

[72] **اسم المخترع:** هيلين سجوجرين، هيدي لويس باجير

[73] **مالك البراءة :** فيرينج بي . في.
عنوانه: بولاريس افينو ١٤٤، ٢١٣٢ جيه اكس هووفدورب، هولندا
جنسيته: هولندية

[74] **الوكيل:** مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[21] **رقم الطلب:** ١١٤٣٥٠٧٨٦

[22] **تاريخ الإيداع :** ١٤٣٢/٠٨/٢٩ هـ
الموافق : ٢٠١١/٠٧/٣٠ م

[62] **طلب مجزأ من الطلب رقم** ١١١٣٢٠٦٦١

[30] **بيانات الأسبقية:**

EP	١٠١٧١٤٢٨.٥	٢٠١٠/٠٧/٣٠م

[51] **التصنيف الدولي** (IPC^8) :
A61K 038/024, A61K 047/002, A61K 047/012

[56] **المراجع:**

EP	٠٩٧٤٣٥٩	٢٠٠٠/٠١/٢٦م

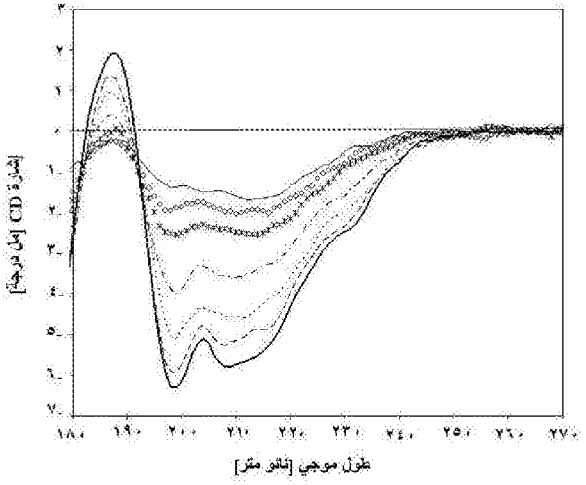
اسم الفاحص: ماجد بن غرم الله الغامدي

[54] **اسم الاختراع:** تثبيت الهرمونات المنشطة للحويصلات (FSH)

Stabilization follicle stimulating hormone (FSH)

[57] **الملخص:** يتعلق الاختراع الحالي بصفة عامة بمجال تثبيت صيغ الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH)، وبصفة خاصة صيغ FSH السائلة. يتحقق التثبيت بواسطة إضافة أملاح تشتمل على كاتونات معدنية قلوية alkali metal cations مقبولة صيدلانياً، وفي النماذج المفضلة يتحقق التثبيت بإضافة أملاح تشتمل على كاتونات معدنية قلوية alkali metal cations مقبولة صيدلانياً، وفي النماذج المفضلة يتم ذلك من خلال إضافة أملاح مقبولة صيدلانياً، مثل أملاح صوديوم sodium أو أملاح بوتاسيوم potassium.

عدد عناصر الحماية (١٩)، عدد الأشكال (٦)



الشكل (١)

تثبيت الهرمونات المنشطة للحويصلات (FSH)

Stabilization follicle stimulating hormone (FSH)

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

ان هذا الطلب عبارة عن طلب جزئي من الطلب رقم ١١١٣٢٠٦٦١ والذي تم إيداعه في المملكة العربية السعودية بتاريخ ٢٩ / ٨/ ١٤٣٢هـ الموافق ٣٠ / ٧ / ٢٠١١ م .

يتعلق الاختراع الحالي بصفة عامة بمجال تثبيت صيغ follicle stimulating hormone (FSH)، وبخاصة صيغ FSH السائلة. يتحقق التثبيت بواسطة إضافة أملاح، وفي النماذج المفضلة يتحقق التثبيت بإضافة أملاح تشتمل على كاتونات معدنية قلوية alkali metal cations مقبولة صيدلانياً من الأملاح المقبولة صيدلانياً، مثل أملاح sodium أو أملاح potassium .

إن موجهات الغدد التناسلية Gonadotropins هي عبارة عن هورمونات، والتي تشترك بصفة رئيسية في دورة الخصوبة لدى الإناث والذكور. يمكن الحصول على موجهات الغدد التناسلية من البول urinary ، وذلك لتحقيق أغراض البحث والعلاج، على الرغم من ذلك، فإنه يمكن الحصول على العديد من موجهات الغدد التناسلية من خلال ناتج عودة الارتباط الجيني recombinantly.

وبصفة خاصة، يمكن استخدام موجهات الغدد التاسلية في علاج عدم العقم.

إن موجهات الغدد التناسلية الرئيسية الأربعة والتي تشترك هنا والتي تنتمي جميعها لنفس عائلة موجه الغدد التناسلية تتمثل في الهورمون المحفز للجريبات follicle stimulating hormone (FSH)، والهورمون المحفز للغدد الدرقية thyroid stimulating hormone ، والورمون الملوتن luteinizing hormone وموجه الغدد التناسلية المشيمي (hCG) chorionic gonadotropin. وجميع موجهات الغدد التناسلية Gonadotropins تتكون من الوحدات الفرعية ألفا وبيتا؛ وتكون الوحدة الفرعية ألفا أكثرهم

شيوعاً، مثلاً ينطبق نفس الأمر على موجهات الغدد التناسلية Gonadotropins الأربعة سابقة الذكر، في حين أن الوحدة الفرعية بيتا تختلف عنهم على التوالي.

على النحو المُستخدم أعلاه، تكون موجهات الغدد التناسلية عبارة عن مجموعة من الهورمونات البروتينية السكرية الديمرية غير المتجانسة والتي تنظم الوظيفة التناسلية لدى الذكر والأنثى. تشتمل على الهورمون المحفز للجريبات follicle stimulating hormone (FSH)، والهورمون الملوتن (LH)، والهورمون المحفز للدرقية thyroid stimulating hormone وموجه الغدد التناسلية المشيمية (البشرية) chorionic gonadotropin (hCG).

يتم بصورة طبيعية إفراز follicle stimulating hormone (FSH) بواسطة الغدة النخامية الأمامية وتعمل على تدعيم التطور الجريبي والإباضة. تشتمل FSH على وحدة ألفا فرعية ذات ٩٦ حمض أميني، ومعرفة أيضاً بالنسبة لهورمونات البروتينات السكرية، مثلاً LH و hCG والوحدة الفرعية المتفردة بيتا ذات ١١١ حمض أميني بالنسبة لـ FSH التي تؤدي إلى التحديد البيولوجي للهورمون :

Pierce and Parsons, 1981, Glycoprotein hormones: structure and function, Ann Rev Biochem., 50: 465-495

يتم تعديل كل وحدة فرعية بعد التعبير الوراثي بإضافة الوحدات البنائية الكربوهيدراتية المعقدة. تحمل كل من الوحدتين الفرعيتين مكانين لتوصيل glycan المرتبط بـ N، والوحدة الفرعية ألفا عند ٥٢ و٧٨ حمض أميني للوحدة الفرعية بيتا وذلك عند ٧ و٢٤ وحدة بنائية للحمض الأميني amino acid :

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).

بناء على ذلك يعتبر follicle stimulating hormone (FSH) معالجاً بـ glycosylated لحوالي ٣٪ بالكتلة :

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.

لقد تم استخدام follicle stimulating hormone (FSH) المنقى من البول urinary البشري بعد الدورة الشهرية لعدة سنوات في علاج العقم؛ وكل منها لتعزيز الإباضة في التناسل الطبيعي وتوفير الخلايا البيضية لتكنولوجيات المساعدة على التناسل. أصبحت هناك نسختي ناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinantly لـ FSH، وGonal-f (Serono Merck) وأصبح (Schering-Plough)uregon متاحاً في منتصف تسعينيات القرن الماضي. يتم التعبير عن كل منها وراثياً في خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) (Howles, C.M. (1996), genetic engineering of human FSH (Gonal-f), Hum Reprod. Update, 2: 172-191). يُستخدم CG عادة في معالجات العقم لأن هذا المركب له نشاط LH.

إن كل من FSH وhCG البشريين عبارة عن دايمرات غير متجانسة heterodimers متكونة من وحدة فرعية ألفا وبيتا. تكون الوحدة الفرعية ألفا في كلا الهرومونين متطابقين. يتم توضيح الاختلافات بين الهورمونين بواسطة الوحدة الفرعية بيتا. تتكون الوحدة الفرعية بيتا الناضجة لـ FSH من ١١١ حمض أميني، في حين أن hCG يتكون من ١٤٥ حمض أميني، وعلى نحو إضافي تختلف متوالية الحمض الأميني amino acid sequence الأولي لـ FSH والوحدة الفرعية بيتا hCG خلال سلسلة بيتا الكلية. تشتمل سلسلة بيتا لكل من FSH وhCG على ٦ جسور ثنائي الكبريتيد disulfide ، ونتيجة متوالية الحمض الأميني amino acid sequence فإنها على الرغم من ذلك تختلف من حيث البنية الأعلى، وتؤدي إلى طية مختلفة وتوزيع مناطق قطبية وغير آلفة للماء (Fox et al. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol Endocrinol. 15(3), 379-89).

على الرغم من أن كل من الوحدتين الفرعيتن بيتا لـ follicle stimulating hormone (FSH) و hCG يتم معالجتهما بـ glycosylated ، فإن الوحدة الفرعية بيتا لـ follicle stimulating hormone (FSH) يشتمل فقط على المعالجة بـ N–glycosylation (N–٧ و N–٢٤) في حين أن الوحدة الفرعية بيتا لـ hCG تشتمل على كل من المعالجة بـ N و O – glycosylation (N–١٣، و N–٣٠، و O–١٢١، و O–١٢٧، و O–١٣٢، و O–١٣٨). تجعل المعالجة الإضافية بـ glycosylated في الوحدة الفرعية بيتا لـ hCG أكثر تآلفاً للماء من FSH. توفر الوحدات الفرعية –ß تحديد تفاعل المستقبل.

تُستخدم خلايا CHO عامة لإنتاج بروتينات ناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinantly الصيدلاني. لقد تم تحديد التحليل البنيوي لـ sialic acid ويتم توصيله بصورة حصرية بواسطة ترابط ألفا ٢، ٣. تشتمل العديد من البروتينات السكرية البشرية على خليط من روابط ألفا ٢، ٣– وألفا ٢، ٦ للوحدات البنائية لـ sialic acid. بناء على ذلك، سوف تختلف البروتينات الناتجة عن عن ناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinantly باستخدام نظام CHO وذلك عن النظائر الطبيعية من أنواعها لروابط sialic acid طرفية.

العقم

في السياق الحالي، سوف يتم تحديد "العقم infertility " على هيئة القدرة القليلة أو عدم القدرة على أن تحمل المرأة ويكون لها نسل. يُطلق أيضاً على النساء اللاتي يستطعن الحمل ولكنهن يتعرضن للإجهاض المتكرر أنهن عقيمات. يتحدد العقم أيضاً بتعبيرات محددة على أنه الفشل في حدوث الحمل بعد عام من الجِماع المنتظم دون استخدام موانع حمل. يمكن أن يرجع العقم إلى عدة أسباب. ولقد أظهرت الدراسات أن أكثر من نصف حالات العقم تنتج عن حالات النساء. وتنتج البقية عن اضطرابات المني وعوامل غير مفسرة.

هناك العديد من الاحتمالات المتعددة حالياً لمعالجة العقم.

هناك الجِماع المحدد بوقت، واستخدام تكنولوجيات المساعدة على التناسل assisted reproductive technologies (ARTs) ، والتحكم الطبي في التهاب بطانة الرحم، والأورام

الليفية والقصور الجنسي لدى الإناث female sexual dysfunction (FSD) ، والجراحة لتصحيح الحالات غير الطبيعية.

في التكنولوجيا الخاصة بالمساعدة في التناسل، فإنه تُستخدم العقاقير التي تحث على الإباضة. بعد LH وhCG ، يعد follicle stimulating hormone (FSH) واحد من تلك المركبات والتي تُستخدم في هذا السياق.

للقيام بالإعطاء، فإن الصيغ السائلة تعتبر مناسبة ضمن تلك المركبات. ولسوء الحظ فإنه قد تم في الماضي توضيح أن إضافة المواد الحافظة إلى الصيغ السائلة، وبخاصة benzyl alcohol (BA)، وphenol وm-cresol ، تحدث تأثيراً غير مثبت على البروتين

Maa, Y.F. and Chung, C.H. 1996, Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds. Int. J. Pharm. 140:155-168; Lam, X.M., Patapoff, T.W., and Nguyen, T.H. 1997, The effect of benzyl alcohol on recombinant human interferon-gamma. Pharm. Res. 14:725-729; Hoffmann, J.A. and Lu, J. 2002, FSH and FSH variant formulations comprising benzyl alcohol as a preservative.

البراءة الوروبية ٠٩٧٤٣٥٩ ، ٥٠-١ ، بالتالي من المهم أن يتم توفير صيغ مثبتة، وبخاصة في ضوء الحقيقة التي توضح أن جرعة FSH التي تُعطى ينبغي أن تقلل من خطوة التأثيرات الجانبية للصور المنفصلة أو المُجمعة مثل الاستجابات المولدة للمناعة، إذا تواجد FSH غير الأصلي.

على الرغم من أن الأحداث غير المثبتة تنتج عن المواد الحافظة فإنها تقلل المستوى الفعلي لموجه الغدد التناسلية الفعلية، أي follicle stimulating hormone (FSH)، وذلك ضمن صيغة سائلة.

بناء على ذلك، فإن هدف الاختراع الحالي يتمثل في توفير صيغ، وبخاصة صيغ FSH سائلة، والتي تكون ثابتة، وكذلك طريقة لتثبيتها.

الوصف العام للاختراع

يتعلق الاختراع الحالي باستخدام أملاح تشتمل على كاتونات معدنية قلوية alkali metal cations مقبولة صيدلانياً لتثبيت صيغة FSH سائلة وذلك لتثبيت صيغة FSH سائلة. يمكن أن تكون الصيغة السائلة المطلوب تثبيتها عبارة عن صيغة بها مادة حافظة preservative أو لا توجد بها.

وتُفضل النماذج التالية:

١- استخدام أملاح تشتمل على كاتونات معدنية قلوية alkali metal cations مقبولة صيدلانياً لتثبيت صيغة FSH سائلة، حيث يتم اختيار الملح من المجموعة المكونة من أملاح sodium + و potassium + مقبولة صيدلانياً، أو توليفة منهما.

٢- استخدام وفقاً للبند ١، حيث تكون الأملاح عبارة عن أملاح sodium +.

٣- استخدام وفقاً للبند ١ أو ٢، حيث يكون الملح عبارة عن NaCl أو Na2SO4.

٤- استخدام وفقاً لأي من البندين ١ أو ٢، حيث يكون الملح عبارة عن Na2SO4.

٥- استخدام أي من البندين ١ أو ٢، حيث يكون الملح عبارة عن توليفة من NaCl و Na2SO4.

٦- استخدام وفقاً لأي من البنود من ١ إلى ٥ حيث يتكون الملح من مقدار ٢٠ إلى ٥٠٠ ملي مولار، أو بمقدار من ٣٠ إلى ٣٠٠ ملي مولار أو بمقدار من ٥٠ إلى ٢٠٠ ملي مولار.

٧- استخدام وفقاً لأي من البنود من ١ إلى ٦ حيث تكون صيغة follicle stimulating hormone (FSH) عبارة عن صيغة rFSH.

٨- استخدام وفقاً لأي من البنود من ١ إلى ٧ حيث تشتمل الصيغة بصورة إضافية على مادة حافظة preservative .

٩- استخدام وفقاً للبند ٨ حيث تشتمل الصيغة على benzyl alcohol ، و/أو phenol و/أو m-cresol .

١٠- استخدام وفقاً لأي من البنود من ١ إلى ٩، حيث تكون الصيغة عبارة عن صيغة قابلة للحقن.

١١- طريقة لتثبيت صيغة follicle stimulating hormone (FSH) سائلة حيث تشتمل الطريقة على خطوة إضافة أملاح تشتمل على cations فلزية قلوية مقبولة صيدلانياً إلى الصيغة المذكورة، حيث يتم اختيار الأملاح المذكورة من المجموعة المكونة من أملاح + sodium وأملاح + potassium أو توليفة منهما.

١٢- طريقة وفقاً للبند ١١ حيث تتحدد الأملاح كما في البنود من ٢ إلى ٦ أعلاه.

١٣- طريقة وفقاً للبندين ١١ و/أو ١٢ حيث FSH التي يجب تثبيتها تكون عبارة عن rFSH.

١٤- طريقة وفقاً لأي من البنود من ١١ إلى ١٣ حيث تشتمل الصيغة بصورة إضافية على مادة حافظة preservative .

١٥- طريقة وفقاً للبند ١٤ حيث يتم اختيار المادة الحافظة من المجموعة المكونة من benzyl alcohol ، و phenol، و m-cresol .

١٦- استخدام وفقاً لأي من البنود من ١ إلى ١٠، حيث تكون الصيغة السائلة عبارة عن صيغة سائلة يتم إعادة حلها، والتي قد تم الحصول عليها من صيغة مجففة بالتجميد freeze-dried .

١٧- الطريقة وفقاً لأي من البنود من ١١ إلى ١٥، حيث تتم خطوة إضافة الملح قبل خطوة التجفيف بالتجميد.

١٨- الطريقة وفقاً للبند ١٧، حيث تتم خطوة إعادة الحل بعد خطوة التجفيف بالتجميد.

١٩- الطريقة وفقاً للبند ١٧ و/أو ١٨ حيث يتكون الملح من صيغة مجففة بالتجميد freeze-dried أو ملح يتكون من إعادة الحل بالسائل.

تكون بالتالي الصيغة التي قد تم توفيرها بالملح المثبت في نموذج بديل مخزنة في حالة تجفيف بالتجميد. يتم التجفيف بالتجميد على النحو المعروف بصفة عامة لصاحب المهارة في المجال. ويمكن بناء على ذلك تخزين الصيغة المجففة بالتجميد freeze-dried إلى أن يحين الاستخدام النهائي من قِبل المستخدم. وقبل الإعطاء، يتم بالتالي إعادة حل الصيغة المجففة بالتجميد freeze-dried باستخدام واحدة من أوساط إعادة الحل المعروفة، مثل، الماء المعقم. وبالتالي

يتكون الملح إما من صيغة مجففة بالتجميد freeze-dried أو في سائل إعادة الحل re-constitution liquid .

٢٠- استخدام أو طريقة وفقاً لأي من البنود أعلاه حيث تكون الصيغة السائلة عبارة عن صيغة تُستخدم لمرة واحدة أو صيغة متعددة الجرعات، ومن المفضل من أجل الحقن.

٥ في نموذج مفضل، يتكون الملح من صيغة سائلة في حد ذاتها والتي تكون غير مجففة بالتجميد freeze-dried ولكنها على هيئة سائل في حالة التخزين liquid in storage .

بصفة خاصة، في نموذج مفضل يتعلق الاختراع الحالي بتثبيت صيغة follicle stimulating hormone (FSH) سائلة حيث يتم اختيار Cation المعدني القلوي من المجموعة المكونة من sodium + و potassium + . ويُفضل بخاصة أن يكون الملح عبارة عن NaCl أو Na2SO4.

١٠

على النحو الموصوف أعلاه، تكون الصيغ FSH السائلة مناسبة لعلاج العقم. في هذا الصدد، فقد أصبحت خالية بحيث يمكن أن تكون الصيغ FSH السائلة غير ثابتة؛ ويصبح ذلك صحيحاً بالنسبة لجميع الصيغ FSH السائلة بما في ذلك تلك المحددة للاستخدام المنفرد. يمكن أن يوجد عدم الثبات إذا ما كانت الصيغ FSH السائلة تشتمل على مادة حافظة preservative ، والتي

١٥ تكون على سبيل المثال ضرورية لجميع الصيغ ذات الجرعات المتعددة. يمكن أن تكون هذه المادة الحافظة عبارة عن كل مادة حافظة لحفظ صيغة FSH؛ وبالتالي، يمكن أن تكون المادة الحافظة عبارة عن مادة حافظة مسموح بها من FDA بالنسبة للصيغ FSH، وبخاصة على سبيل المثال المادة الحافظة المسموح بها من FDA، والمسموح بها من أجل الصيغ FSH التي تُعطى بطريق غير معوي، على سبيل المثال benzyl alcohol ، و phenol و/أو m-كريسول؛ وعلى الرغم من

٢٠ ذلك لا تصبح المادة الحافظة مقيدة بتلك الأمثلة. ينخفض ثبات FSH على سبيل المثال benzyl alcohol ، phenol، و/أو m-cresol .

بناء على ذلك، تُستخدم الأملاح المطلوب حمايتها حالياً والموصوفة والمشتملة على cations مقبولة صيدلانياً، وذلك في تثبيت صيغ FSH للاستخدام لمرة واحدة.

علاوة على ذلك، تُستخدم الأملاح المطلوب حمايتها حالياً والموصوفة والمشتملة على cations مقبولة صيدلانياً، وذلك في تثبيت صيغ FSH للاستخدام لعدة مرات؛ ولا تحتاج هذه الصيغ إلى مادة حافظة preservative ولكنها يمكن أن تشتمل على مادة حافظة preservative .

تؤدي إضافة الأملاح المطلوب حمايتها حالياً والمشتملة على cations المقبولة صيدلانياً مثلاً أملاح + sodium و + potassium ، إلى تثبيت الصيغ FSH السائلة. في نموذج مفضل بصفة خاصة، وتكون الأملاح عبارة عن أملاح مقبولة صيدلانياً. يتحقق الثبات في الصيغ ذات الاستخدام لمرة واحدة أو الصيغ التي تستخدم لعدة مرات، وبخاصة في فترة أطول للتخزين ويمكن بصفة خاصة أن تكون في النموذج المحتمل الإضافي مفيدة كمعيار مضاد لإزالة تأثير التثبيت للمواد الحافظة، مثل benzyl alcohol ، و/أو phenol و/أو m-cresol .

يمكن أن تشتمل الأملاح التي تُستخدم وفقاً للاختراع الحالي، في نموذج NaCl أو Na2SO4 مفضل.

يُفضل أن يتكون الملح من مقدار يتراوح من ٢٠ إلى ٥٠٠ ملي مولار، ومن الأفضل أن يتكون من مقدار ٣٠ إلى ٣٠٠ ملي مولار؛ وفي نموذج مفضل بصفة خاصة يتكون من مقدار من ٥٠ - ٢٠٠ مللي مولار.

يتقيد أقصى مقدار للملح بـ osmolality الخاصة بالمحلول. لتقليل الألم عند الحقن، فإنه ينبغي أن يكون المحلول متساوي التوتر السطحي أو على الأقل لا يكون فائق التوتر السطحي. نظراً لأن جميع السواغات excipients في المحلول تسهم في osmolality ، فإن أقصى مقدار للملح يمكن إضافته إلى محلول يعتمد على مقدار المكونات الحالية الأخرى.

يتكون الملح بصورة مفضلة من مقدار يؤدي إلى أقصى osmolality تبلغ ٣٥٠ ملي أسمول/كجم، ومن الأفضل أن يكون بمقدار يؤدي إلى أقصى osmolality تبلغ ٣٢٠ ملي أسمول/كجم؛ وفي نموذج مفضل بصفة خاصة يتكون من مقدار يؤدي إلى أقصى osmolality تبلغ ٣٠٠ ملي أسمول/كجم.

نظرية osmolality

إن osmolality هي وسيلة عملية لإعطاء مقياس كلي لإسهام العديد من الذوائب المتواجدة في محلول إلى الضغط الأسموزي osmotic pressure للمحلول. يمكن قياس osmolality وفقاً لـ Ph. Eur. 2.2.35, 7th edition, supplement 2011 (7.2), Osmolality, .01/2008:20235

يكون "الملح" في سياق الاختراع الحالي عبارة عن مركب كيميائي مشتق من حمض من خلال إحلال الهيدروجين hydrogen replacing ، كلية أو جزئياً، بفلز أو شق موجب كهربائياً electropositive radical .

يشير التعريف "أملاح ذات (أو تشتمل على) cations من أملاح مقبولة صيدلانياً" إلى تلك الأملاح والموجودة مع cations والتي يُسمح بها من أجل الإعطاء في العضل أز تحت الجلد وفقاً لقائمة المكونات غير الفعالة لـ FDA؛ وتكون cations المعدنية القلوية في هذه المجموعة عبارة عن sodium (sodium +) potassium (potassium +).

ولقد وجد المخترعون على نحو مذهل أن cations بالغا التحديد يناسبين بصفة خاصة تثبيت صيغة FSH.

بناء على ذلك يمكن تشكيل الأملاح باستخدام cations التالية المقبولة صيدلانياً: potassium (أحادي القاعدة، أو ثنائي، أو ثلاثي القاعدة mono-, di- or tribasic)، أو sodium (أحادي القاعدة، أو ثنائي، أو ثلاثي القاعدة mono- or di-or tri-basic). على نحو مفضل، تكون الأملاح عبارة عن أملاح sodium .

ويُفضل بصورة خاصة NaCl و Na2SO4.

إن موجه الغدد التناسلية التي يمكن تثبيتها وفقاً للاختراع الحالي تكون عبارة عن FSH، مثلاً الهورمون المحفز للجريبات follicle stimulating hormone ، واختيارياً بالاشتراك مع مكونات فعالة إضافية.

إن FSH تمثل يتم اشتقاقها من البول urinary أو البلازما أو ناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant (rFSH). في نموذج مفضل، يكون FSH مأخوذ من البول أو rFSH؛ يُفضل بصفة خاصة rFSH.

على النحو المذكور أعلاه، فإنه من الممكن الحصول على FSH من خلال ناتج عودة الاتحاد الجيني. بناء على ذلك، فإنه يتم الإشارة هنا إلى FSH يشتمل بصفة عامة على كل من النوع المشتق من البول urinary وكذلك المشتق من ناتج عودة الارتباط الجيني recombinantly (r) موجه الغدد التناسلية. بناء على ذلك فإن الإشارة إلى FSH تتضمن أيضاً rFSH.

في نموذج مفضل للاختراع، تكون الصيغة عبارة عن صيغة rFSH سائلة، ومن الأكثر تفضيلاً تكون قابلة للحقن، والتي يتم تثبيتها بواسطة Na2SO4 أو NaCl.

في نموذج مفضل وفقاً للاختراع، تكون الصيغة عبارة عن rFSH، ومن الأكثر تفضيلاً تكون قابلة للحقن، والتي تكون مثبتة بواسطة Na2SO4 أو NaCl.

في نموذج بديل، يكون لـ rFSH في جميع النماذج FSH طويل المفعول. ويمكن الحصول على صيغ FSH طويلة المفعول على النحو المعروف بصفة عامة لصاحب المهارة في المجال، مثلاً من خلال تعديل جزيء FSH أو بتعديل الصيغة.

بالتالي تشتمل FSH على جميع الصور المحتملة المشتقة من البول urinary أو ناتج عودة الارتباط الجيني recombinantly لـ FSH السابق الذكر وكذلك جميع التوليفات المحتملة لصور FSH. يتم أيضاً تضمين صيغة للاستخدام لمرة واحدة وواحدة أو أكثر من الصيغ الأخرى (من نفس موجه الغدد التناسلية أو المختلفة عنه) من أجل استخدام عدة جرعات.

يمكن أن يشتمل المنتج المحتمل للصيغة على FSH (اختيارياً مع نشاط CG، LH، LH إلخ) وجميع القارورات المختلفة. إذا كان نشاط LH متواجداً فإنه يمكن أن ينتج عن LH أو CG. يمكن إحلال LH بواسطة جرعة مكافئة من CG f وبالعكس؛ و"جرعة مكافئة" في هذا السياق يمكن حسابها على أساس أن ١ وحدة دولية لـ CG يكافئ من ٥ إلى ٧ وحدة دولية في دستور الأدوية Van Hell Bioassay (Van Hell, H et al, Acta Endocrin. 47, 409-418, 1964).

تتمثل توليفة مفضلة في r)FSH)، وr)LH)، وr)hCG)، وجميعهم في قارورات مختلفة.

تشتمل التوليفات المحتملة في القارورات المختلفة أيضاً على: FSH (u) بول وuhCG أو uFSH وuLH؛ علاوة على ذلك (rhCG أو rLH أو rFSH) و(uhCG أو uLH أو rhCG أو rLH)، وجميع البدائل المحتملة منها.

٥ تتمثل توليفة أخرى مفضلة في r)FSH) وr)hCG)، في قارورات مختلفة على التوالي.

تتمثل توليفة مفضلة أخرى في r)FSH) وr)LH)، وذلك في قارورات مختلفة، على التوالي.

إن صيغ FSH وفقاً للاختراع الحالي هي عبارة عن صيغ سائلة. على نحو مفضل، فإن الصيغ تكون قابلة للحقن. يمكن توفير الصيغ على هيئة منتج له تركيبة أو تركيبتين أو أكثر بما في ذلك FSH أو FSH/hCG، وذلك للإعطاء بصورة منفصلة أو معاً. إذا ما تم إعطاؤه بصورة منفصلة، ١٠ فإن الإعطاء يكون تتابعياً. يمكن توفير المنتج في أي عبوة مناسبة. على سبيل المثال، يمكن أن يشتمل المنتج على عدد من المحاقن سابقة الملء وكل منها يشتمل على FSH (تركيبة FSH)، أو على نحو إضافي hCG (تركيبة hCG) مثلاً حيث يمكن أن يتم تعبئة المحاقن في عبوة حبوب أو غيرها من وسائل للمحافظة على التعقيم. ويمكن أن يحتوي المنتج اختيارياً على تعليمات لاستخدام صيغ FSH.

١٥ وفقاً لجانب رابع، يتم توفير صيغة FSH مبتكرة كمستحضر متعدد الجرعات. وعلى الرغم من ذلك فإن الاختراع الحالي يوجه بصورة واضحة لصيغ مقرر لها الاستخدام لمرة واحدة. ويتعلق الاختراع الحالي أيضاً بتثبيت الصيغة كجزء من الطاقم. مثل ذلك الطاقم سوف يشتمل على حاوية واحدة على الأقل تتكون من واحدة أو أكثر من الجرعات اليومية لـ FSH، أو حاويتين (مثلاً، قارورة)، وكل منها يشتمل على موجه غدد تناسلية مختلف، وتوجد مثلاً المزيد من التعليمات (على سبيل ٢٠ المثال الخاصة بالإعطاء) ومثلاً وسيلة إضافية من أجل الحقن.

في نموذج مفضل، يستخدم قلم حقن من أجل عدد مرات الحقن المتعددة، حيث يتم ملء الخراطيش المناظرة بمحلول FSH.

في نموذج مفضل، يتكون FSH باستخدام ٣٥-٨٥٠ وحدة دولية/مل، ومن المفضل من ٥٠ إلى ٨٠٠ وحدة دولية/مل، ومن الأفضل من ١٠٠ إلى ٦٠٠ وحدة دولية/مل.

تشتمل الصيغة المفضلة بصفة خاصة على سبيل المثال لـ ٦٠٠ وحدة دولية/مل من rFSH على التركيبة التالية:

٦٠٠ وحدة دولية/مل من Rfsh

٠.٠٠١- ٠.٠٠٥، ومن المفضل ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠

٠.١ إلى ١٠، ومن المفضل ١.٠ مجم/مل L-methionine

٠.٥ إلى ٥٠، ومن المفضل ٥.٠ مجم/مل phenol

١ إلى ١٠٠، ومن المفضل ١٤ مجم/مل من disodium sulphate (أي ٠.١ مولار)

٠.١ إلى ١٠، ومن المفضل ١ ملي مولار من المحلول المنظم sodium phosphate ، (رقمه الهيدروجيني pH من ٦ إلى ٨، ومن المفضل أن يكون الرقم الهيدروجيني pH ٦.٥).

من المفضل أن تكون osmolality المحلول ٣٠٠ ملي أسمول/كجم

(يشير الرقم الهيدروجيني pH إلى رقم هيدروجيني للمحلول الكلي).

يمكن عمل الغرائس القابلة للحقن بواسطة تشكيل قوالب كبسولات دقيقة microencapsule matrices من FSH (وغيرها من عناصر أخرى، إذا كان أي منها متوجداً) في البوليمرات القابلة للتحلل حيوياً. يمكن أن تكون البوليمرات التي تقوم على أنظمة الغرائس/والمفعول المستديم sustained release systems، طبقاً لطبيعتها الكيميائية، على سبيل المثال، عبارة عن جسيمات بحكم الميكرو أو النانو، وأنواع الجل المائي hydrogels ، والمذيلات micelles ، والمستحلبات emulsions أو الغرائس implants . طبقاً لمعدل FSH إلى البوليمر وطبيعة البوليمر المحدد، فإنه يمكن التحكم في معدل إطلاق FSH. تشتمل أمثلة البوليمرات القابلة للتحلل الحيوي على أنظمة :

polylactide/polyglycolide copolymer systems, polyvinylpyrrolidone, poly(orthoesters), poly(anhydrides), poly(ethylene glycol), poly amino acids, polysaccharides e.g. sodium hyaluronate (NaHA)

أو غيرها من أملاح منها، و gelatine ، و chitosan إلخ. يمكن اشتقاق أو تعديل جميع البوليمرات للوصول إلى المستوى الأمثل من إعطاء عقار من البروتينات أو ثباته. يتم أيضاً تحضير صيغ الغرائس القابلة للحقن بواسطة احتجاز FSH في أنظمة دهنية، أو قوالب دهنية للبوليمر مثل المذيلات micelles ، أو الدهون، أو المستحلبات emulsions الدقيقة والتي تتوافق مع أنسجة الجسم body tissues .

يمكن على سبيل المثال تعقيم الصيغ القابلة للحقن بواسطة الترشيح خلال مرشح يحتجز البكتيريا، أو تضمين عوامل معقمة في صورة تركيبات صلبة معقمة والتي يمكن إذابتها أو تشتتيها في ماء معقم أو غيرها من وسط آخر معقم قابل للحقن قبل الاستخدام.

يمكن توفير الصيغ القابلة للحقن في أية حاوية مناسبة، مثل، قارورة، ومحقن معبأ مسبقاً، وخراطيش حقن injection cartridges ، وما شابه، وذلك على النحو الموصوف أعلاه.

يتم ضبط تركيز الرقم الهيدروجيني pH والتركيز المحدد للعديد من مكونات التركيبة الصيدلانية وفقاً للتطبيق الروتيني في هذا المجال. انظر :

GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICES, 7th edition.

في نموذج مفضل، يتم توفير تركيبات وفقاً للاختراع على هيئة تركيبات للإعطاء بطريق غير معوي. تُعرف الطرق العامة لتحضير الصيغ التي تُعطى بطريق غير معوي في المجال ويتم وصفها في remington; the science and practice of pharmacy ، الموضحة سابقاً في الصفحات ٧٨٠-٨٢٠. يمكن توفير التركيبات التي تُعطى بطريق غير معوي في صيغة سائلة أو على هيئة مادة صلبة والتي سوف يتم خلطها مع وسط معقم قابل للحقن قبل الإعطاء. في النموذج المفضل بصفة خاصة، يتم توفير التركيبات بطريق غير معوي في صورة وحدة جرعة لتسهيل إعطاء الجرعة وتماسكها.

يمكن الحصول على FSH وفقاً للاختراع الحالي بواسطة وسيلة تقليدية من البول urinary أو يمكن إنتاجه من ناتج عودة الاتحاد الجيني. بالنسبة لطرق الإنتاج المحتملة فإنه يتم بصورة إضافية الإشارة إلى مثلاً ١٢٧٨٢٦/٢٠٠٩ .

يمكن الحصول على hCG بواسطة أي طريقة معروفة في المجال. يشتمل hCG على النحو المستخدم هنا على hCG المشتق من البشر وناتج عن عودة الاتحاد الجيني. يمكن تنقية hCG المشتق من البشر من أي مصدر مناسب (البول urinary والمشيمة placenta) بواسطة أي من الطرق المعروفة في المجال. وتعرف جيداً طرق التعبير الوراثي وتنقية ناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinantly لـ hCG في المجال.

يمكن الحصول على LH بواسطة أي طريقة معروفة في المجال. يشتمل LH، على النحو المُستخدم هنا، على LH المشتق من البشر وناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinantly. يمكن تنقية LH المشتق من البشر من أي من المصادر المناسبة (مثلاً البول urinary) بواسطة أي من الطرق المعروفة في المجال. تُعرف طرق التعبير الوراثي وتنقية LH لناتج عودة الارتباط الجيني recombinantly في المجال. يمكن أن تكون التركيبة الصيدلانية لعلاج العقم، مثلاً للاستخدام في مثال التكنولوجيات المساعدة على التناسل assisted reproductive technologies (ARTs) ، أو حث الإباضة ovulation induction (OI) أو الإمناء داخل الرحم intrauterine insemination (IUI). يمكن على سبيل المثال استخدام التركيبة الصيدلانية في الأعراض الطبية حيث تُستخدم المستحضرات FSH المعروفة. يقدم الاختراع الحالي أيضاً استخدام مستحضر FSH مثبت موصوف هنا (وفقاً لجوانب الاختراع)، وذلك في تصنيع دواء لعلاج العقم. يمكن صياغة التركيبات الصيدلانية على هيئة تركيبات معروفة جيداً لأي من الطرق لإعطاء العقار، مثلاً، عن طريق الفم، أو المستقيم، أو بطريق غير معوي، أو عبر البشرة (مثلاً تكنولوجيا الرقعة patch technology)، وعن طريق الوريد، وعن طريق العضل، وتحت الجلد، وفي داخل الصهريج المخيخي، وفي المهبل، وفي الغشاء البريتوني، وبطريقة موضعية (المساحيق powders ، أو المراهم ointments أو القطرات drops) أو على مادة رش شدقية أو أنفية buccal or nasal spray . تشتمل التركيبة النمطية على مادة حاملة carrier مقبولة صيدلانياً، مثل محلول مائي aqueous solution ، سواغات غير سامة non-toxic

excipients ، بما في ذلك الأملاح والمواد الحافظة، والمحاليل المنظمة وما شابه، وذلك على النحو الموصوف في :

Remington's Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company, 1975).

في الصفحات ١٤٠٥ إلى ١٤١٢ ومن ١٤٦١ إلى ٨٧، و

the national formulary XIV fourteenth edition (American Pharmaceutical Association, 1975).

وذلك بين غيرها من مواد أخرى.

تشتمل أمثلة المواد الحاملة المناسبة المائية وغير المائية، أو المواد المخففة diluents ، أو المذيبات solvents ، أو المواد الناقلة على الماء، و ethanol ، والمجموعات polyols (مثل glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol ، وما شابه)، و carboxy-methylcellulose وخلائط مناسبة منها، وزيوت نباتية (مثل زيت الزيتون)، والإسترات العضوية القابلة للحقن injectable organic esters مثل ethyl oleate .

يمكن أن تشتمل التركيبة أيضاً على مواد الإضافة على سبيل المثال وليس الحصر مواد حافظة preservatives ، وعوامل ترطيب wetting agents ، وعوامل استحلاب emulsifying agents ، وعوامل منظمة buffering agents ، وعوامل مشتتة dispersing agents . يمكن تضمين العوامل المضادة للبكتيريا والمضادة للفطريات لمنع نمو الميكروبات وتشتمل على سبيل المثال، على مواد parabens ، و chlorobutanol ، ومواد phenol، و sorbic acid ، وما شابه. علاوة على ذلك، يمكن أن يكون من المطلوب أن يتم تضمين عوامل خافضة لشدة التوتر السطحي tonicity agents .

في بعض الحالات، حتى يتم إحداث تأثير ممتد فإنه من المطلوب إبطاء امتصاص FSH (وغيرها من مكونات فعالة، إذا كان أي منها موجوداً) من الحقن تحت الجلد أو في العضل. يمكن أن يتحقق ذلك بواسطة استخدام معلق سائل من مادة متبلرة أو غير متبلرة ذات قابلية ضعيفة

للإذابة. إن معدل الامتصاص على سبيل المثال FSH يعتمد على معدل تفككه والذي في المقابل، يمكن أن يعتمد على الحجم المتبلر والصورة المتبلرة crystalline . على نحو بديل، يتحقق الامتصاص المتأخر لتوليفة FSH التي تُعطى بطريق غير معوي بواسطة إذابة أو تعليق توليفة FSH في المادة الناقلة الزيتية oil vehicle .

وفقاً للاختراع الحالي، فقد أُجريت الجهود بواسطة المخترعين لدراسة تاثير المركبات المحددة على ثبات الصيغة السائلة الموجهة للغدد التناسلية؛ وتمت أيضاً دراسة تأثيرات التثبيت وعدم التثبيت لمركبات محددة.

يمكن أن يشير تعبير "الثبات" إلى الثبات الكيميائي، حيث يشتمل على التعديل تساهمي الرابطة في متوالية الحمض الأميني amino acid sequence ، ولكن في سياق ثبات البروتين فإنه يمكن أيضاً أن يشير إلى الثبات الفيزيائي، والذي يشتمل على تغيرات الحالة المطوية للبروتين (مثلاً الحالة الأصلية) التي لا تشتمل على انشطار الرابطة التساهمية.

في الاختراع الحالي يشير تعبير "الثبات stability " إلى الصيغ المادية، وثبات الصيغ لموجهات الغدد التناسلية Gonadotropins ، وبخاصة FSH وفقاً للاختراع. يمكن أن يؤدي عدم الثبات المادي لصيغ البروتين الناتج عن تجمع جزيئات البروتين إلى تشكيل تكتلات ذات أعلى، وبواسطة تفكيك الدايمرات غير المتجانسة إلى مونومرات، أو بواسطة أي تغير توافقي آخر يقلل من نشاط حيوي واحد على الأقل من بروتينات FSH المضمنة في الاختراع الحالي.

إن المحلول "المثبت" أو الصيغة تعد واحدة حيث يتم على نحو مقبول التحكم في درجة التكتل، والتفكك، والتعديل التوافقي، وفقد النشاط الحيوي وما شابه، من البروتينات الموجودة فيه، ولا تزيد على نحو غير مقبول بمرور الوقت. يمكن تقييم الثبات بواسطة الطرق المعروفة في المجال، بما في ذلك قياس تفريق الضوء في عينة، والفحص البصري لدرجة الصفاء و/أو التلون، أو الغياب، أو الكثافة الضوئية، وتحديدات الحجم الجزيئي (على سبيل المثال بواسطة كروماتوجراف الاستثناء على حسب الحجم أو التجزيئ لتدفق المجال)، والنشاط في المعمل أو في الكائن الحي و/أو بواسطة قياس الفحص التفاضلي differential scanning calorimetry (DSC). وتعرف طرق أخرى لتقييم الثبات في المجال ويمكن استخدامهم وفقاً للاختراع الحالي.

من المعروف أن العديد من المواد الحافظة قد أظهرت تأثيراً غير مثبتاً على الصيغ الموجهة للغدد التناسلية وقد اتضح على نحو مذهل هنا أن أملاح محددة تشتمل على كاتونات معدنية قلوية alkali metal cations مقبولة صيدلانياً، والتي اتضح أنها تكون مناسبة لتثبيت صيغ FSH السائلة وبخاصة sodium + أو potassium +، مثل NaCl أو Na2SO4 تكون مفيدة بصورة إضافية لتقاوم تأثيرات عدم التثبيت لمادة حافظة preservative مثل benzyl alcohol ، و phenol و m –كريسول، والتي تحتاج إلى أن تشتمل على صيغة FSH سائلة متعددة الجرعات وذلك للاستخدام الطبي. إن للأملاح الحالية المطلوب حمايتها تأثير مثبت على صيغة FSH السائل والتي تمثل طريقة مفيدة ومذهلة وذلك على نحو أكبر من تأثيرات التثبيت للمثبتات المعروفة، مثل sucrose . إن التأثير المثبت المحسن مقارنة بالمثبتات المعروفة مثل sucrose يعد مذهلاً بصفة خاصة. علاوة على ذلك، فإن التأثيرات المثبتة غير المتوقعة إلى حد ما للأملاح المبتكرة يمكن توضيحها مع صيغ FSH، على الرغم من ذلك، لا يمكن توضيح تأثير مثبت على hCG المشابه لدرجة كبيرة.

ولقد كان من المذهل أيضاً وضوح أن تأثيرات التثبيت على النحو الملاحظ لا تتبع سلسلة هوميستر Hofmeister series المذكورة (انظر أيضاً أدناه)، ولكنه يمضي بالفعل ضدها.

كان من المعروف من المجال السابق أن هناك تفكك لـ FSH يحدث في صيغ FSH الصيدلانية ولقد تأكد ذلك بواسطة المجموعة الألى من الأمثلة الحالية.

إن FSH سوف يتحلل كدالة للزمن وكدالة لدرجة الحرارة. وبصفة خاصة، عند درجات حرارة أعلى من درجة حرارة الغرفة، وسوف يتم تغير البنيات الثانوية، والثلاثية والرباعية.

يتضح أن فك الطية التوافقي لبنيات FSH الثلاثية والثانوية الناتجة عند التسخين يكون عبارة عن انتقال ثنائي الحالة (عندما يتم تقييد تكتل البروتينات). يمكن أن يكون فك الطية غير معتمد على تفكيك الوحدة الفرعية (التغيرات في البنية الرباعية changes in the quaternary structure).

علاوة على ذلك، اتضح مع الاختراع الحالي أن FSH، يحتوي على مادة حافظة preservative مثل benzyl alcohol أو phenol، حيث تكون المواد الحافظة ضرورية، على سبيل المثال

كعوامل مضادة للميكروبات antimicrobial في الصيغ FSH السائلة، وتؤثر بوضوح على ثبات الصيغ FSH متعددة الجرعات وذلك بطريقة سالبة. ويتم هنا تقليل فترة الثبات الطويلة لـ FSH، وتكون درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية لـ FSH منخفضة، ويكون للصور ذات الطبيعة المتغيرة بالفعل مستوى بنيات ثانوية أقل من FSH التي لا تشتمل على المواد الحافظة.

يوضح الاختراع الحالي لأول مرة أن الأملاح المشتملة على cations فلزية قلوية مقبولة صيدلانياً من أجل تثبيت صيغ FSH السائلة، وتحديداً sodium و potassium ، لها تأثير كبير على ثبات صيغ FSH السائلة. ويمكن توضيح أن البنية الثانوية لـ FSH في الصيغ FSH السائلة تشتمل على تلك الأملاح التي لا تتغير بدرجة كبيرة عند التسخين حتى ٧٦.٥° م. إن الصورة ذات الطبيعة المتغيرة يتم نسبياً بناؤها في وجود مثلاً Na2SO4، ويجعل ذلك تغير الطبيعة أكثر انعكاساً، وبالتالي، يزيد بصورة كبيرة الثبات الحركي للبروتين. ويتم تدعيم ذلك بواسطة بيانات التثبيت في الوقت الحقيقي حالياً والتي تبين تاثير التثبيت على بنية ديمرية غير متجانسة لـ FSH.

ولقد أظهرت النتائج بوضوح أن عناصر الحماية الحالية المطلوب حمايتها، مثلاً sodium sulphate و sodium chloride ، يمكنها أن تحد من ميل جزيئات FSH للتفكك وبالتالي تزيد بصورة كبيرة من الثبات عند التخزين.

يوجه الاختراع الحالي إلى طريقة لتثبيت صيغة FSH سائلة حيث تشتمل الطريقة على خطوة إضافة الأملاح المذكورة أعلاه على الصيغة المذكورة.

تأكدت جميع الدراسات بواسطة البيانات التي تتم على نحو إضافي في الوقت الحقيقي.

شرح مختصر للرسومات

شكل ١: يتم توضيح إشارة CD (ثنائي اللون الدائري circular dichroism، انظر أدناه) (ملي درجة) كدالة للطول الموجي wavelength (نانو متر) وذلك لـ rFSH عند العديد من درجات الحرارة. لم يتم ملاحظة تغيرات كبيرة بين أطياف ٢٤.٠° م ← ٤٥.٩° م ولكن تمت ملاحظة انخفاض معتمد على درجة الحرارة لإشارة CD إلى ما دون ٥٠° م. تمت إذابة بروتين rFSH (٠.٩٣ مجم/مل) في ٣.٥٧ ملي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer

رقمه الهيدروجيني pH ٦.٣ يحتوي على ٠.٠٠٠٣٦ مجم/مل من Polysorbate ٢٠. تم الفحص عند ٢٤.٠ °م (رسم متواصل بخط ثقيل)، و ٥٠.٣ °م (رسم على هيئة شرط)، و٥٤.٧ °م (خط على هيئة نقاط)، و٥٩.٠ (رسم على هيئة نقاط متقطعة)، و٦٣.٠٤ °م (على هيئة نجوم)، و٦٧.٨ °م (على هيئة معينات) و٧٦.٥ °م (رسم بخط ثقيل).

شكل ٢: يتم توضيح إشارة CD (ملي درجة) كدالة للطول الموجي wavelength (نانو متر) وذلك لـ rFSH المحتوي على Na2SO4 عند العديد من درجات الحرارة. لم يتم ملاحظة تغيرات كبيرة بين أطياف ٢٤.٠ °م ← ٤٥.٩ °م. تمت إذابة بروتين rFSH في ٣.٥٧ ملي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer رقمه الهيدروجيني pH ٦.٣ يحتوي على ٠.٠٠٠٣٦ مجم/مل من Polysorbate ٢٠ و٨.٦ مجم/ مل من sodium sulphate (Na2SO4). تم الفحص عند ٢٤.٠ °م (رسم متواصل بخط ثقيل)، و ٥٠.٣ °م (رسم على هيئة شرط)، و٥٤.٧ °م (خط على هيئة نقاط)، و٥٩.٠ (رسم على هيئة نقاط متقطعة)، و٧٦.٥ °م (رسم بخط ثقيل).

شكل ٣: يتم توضيح إشارة CD (ملي درجة) كدالة للطول الموجي wavelength (نانو متر) وذلك لـ rFSH المحتوي على benzyl alcohol عند العديد من درجات الحرارة. لم يتم ملاحظة تغيرات كبيرة بين أطياف ٢٤.٠ °م ← ٤٥.٩ °م. تمت إذابة بروتين rFSH (٠.٩٣ مجم/مل) في ٣.٥٧ ملي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer رقمه الهيدروجيني pH ٦.٣ يحتوي على ٠.٠٠٠٣٦ مجم/مل من Polysorbate ٢٠ و٠.١٧ مجم/مل benzyl alcohol . تم الفحص عند ٢٤.٠ °م (رسم متواصل بخط ثقيل)، ٤٥.٩ °م (دوائر) و٥٠.٣ °م (رسم على هيئة شرط)، و٥٤.٧ °م (خط على هيئة نقاط)، و٥٩.٠ (رسم على هيئة نقاط متقطعة)، ٦٣.٤ (على هيئة نجوم)، و٦٧.٨ °م (على هيئة معينات) و٧٦.٥ °م (رسم بخط ثقيل).

شكل ٤: عمليات فحص DSC التالية لـ hCG وrFSH. إن بيانات DSC لـ ٥ مجم/مل لـ hCG في ٠.٠٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ٠.٥ مجم/مل من L-METHIONINE و١ ملي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer ، ورقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ و٢.٤ مجم/مل rFSH في ٠.٠٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ٠.٥ مجم/مل من L-

METHIONINE ، ٠.٢٤ مولار NaCl، ١ ملي مولار من محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer ، الرقم الهيدروجيني pH ٦.٥. معدل الفحص Scan rate ٢٠.٠ ْم/دقيقة.

الفحص الأول rFSH (رسم متواصل)، والفحص الثاني rFSH (رسم على هيئة شرط- نقط)، والفحص الأول hCG (رسم على هيئة شرط) والفحص الثاني (رسم على هيئة نقط). بعد الفحص الأول تم تبريد العينة حتى ٢٠ ْم قبل الفحص الثاني.

شكل ٥ : عمليات فحص DSC لـ hCG بالعديد من أنواع السكر والأملاح. إن بيانات DSC لـ ٥ مجم/مل لـ hCG في ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ٠.٥ مجم/مل من L- METHIONINE و ١ ملي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer ، ورقمه الهيدروجيني pH ٦.٥. ليست هناك إضافات سكر أو ملح (رسم بخط ثقيل متواصل)، ٠.١ مولار Na2SO4 (رسم متواصل)، و ٠.١ مولار NaCl (رسم منقط)، و ٠.١ مولار NaClO4 (رسم على هيئة شرط) و ٠.١ مولار من الsucrose (مادة متبقية على هيئة شرط). معدل الفحص Scan rate ٢٠.٠ ْم/دقيقة.

شكل ٦ : عمليات فحص DSC لـ rFSH بالعديد من أنواع السكر والأملاح. إن بيانات DSC لـ ٢.٤ مجم/مل لـ rFSH في ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ٠.٥ مجم/مل من L- METHIONINE و ١ ملي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer ، ورقمه الهيدروجيني pH ٦.٥. ليست هناك إضافات سكر أو ملح (رسم بخط ثقيل متواصل)، ٠.١ مولار Na2SO4 (رسم متواصل)، و ٠.١ مولار NaCl (رسم منقط)، و ٠.١ مولار NaClO4 (رسم على هيئة شرط) و ٠.١ مولار من الsucrose (مادة متبقية على هيئة شرط). معدل الفحص Scan rate ١٠.٠ ْم/دقيقة.

يتم شرح الاختراع الحالي بصورة إضافية على سبيل المثال، والذي على الرغم من ذلك لا يجب اعتبارها مقيدة لمجاله.

الوصف التفصيلي:

الأمثلة

مثال ١- الفحص الطيفي ثنائي اللون الدائري circular dichroism بالإشعاع بواسطة جهاز سينكرترون Synchrotron Radiation Circular Dichroism

الطريقة

تم الفحص الطيفي ثنائي اللون الدائري circular dichroism باستخدام وسيلة السينكروترون في جامعة Aarhus، في الدنمارك. تم تسجيل جميع أطياف CD باستخدام خلية سوبراسيل suprasil cell من الكوارتز quartz بطول ٠.١ مم (Hellma GmbH, Germany) خلال طول مدي موجات من ١٨٠ إلى ٢٧٠ نانو متر في خطوات ١ نانو متر، وبزمن بقاء ٣ ثوان لكل طول موجي. تم تسجيل ثلاث فحوصات CD متطابقة لكل تجربة منهما اثنتين من أجل rFSH وواحدة مرجعية (باستخدام العلاج الإرضائي). تم الحصول على أطياف CD لـ rFSH المتواجدة في هذا التقرير بواسطة خصم المتوسط المناظر لفحص العقار الإرضائي من متوسط فحص البروتين. لكل مجموعة من فحوصات CD تم استخدام حوالي ١٢٠ ميكرو لتر من محلول (يناظر حوالي ١١٢ ميكرو جرام من rFSH). أثناء عمليات البحث في تأثيرات درجة الحرارة على أطياف CD لـ rFSH، وتنوعت درجة الحرارة في حجيرة التسخين heating chamber من ٢٥° م إلى ٨٥° م مع وجود فواصل ٥° م، وزمن التوازن Equilibrium يبلغ ٥ دقائق. من ملف تحديد العيارات تحددت درجة الحرارة التجريبية الفعلية (درجة حرارة في خلية سوبراسيل suprasil cell من الكوارتز quartz).

تقوم CD بقياس الفرق في امتصاص الضوء القطبي الدائر من اليد اليسرى واليمنى والذي يمكن أن يحدث نتيجة التماثل البنيوي structural asymmetry . يمكن دراسة التركيبات الثانوية للبروتينات بواسطة القياس الطيفي spectroscopy لـ CD في المنطقة البعيدة للأشعة فوق البنفسجية UV region (حوالي ١٨٠- ٢٥٠ نانو متر). بصفة عامة، تتبع البنية المنظمة إشارات CD أكثر شدة (إيجابياً أو سلبياً). على الرغم من ذلك، فإن للبنيات الثانوية المختلفة أطياف CD مختلفة، وللحلزونات α إشارات CD أكثر شدة من التركيبات- ß، ولا يمكن إتمام مقارنات مباشرة بين بروتينات مختلفة بخصوص البنيات المرتبة ordered structures .

نتيجة للحساسية العالية نحو التغيرات البنيوية structural changes ، فإن القياس الطيفي CD spectroscopy يمثل أداة قوية عند دراسة الثبات الفيزيائي للبروتينات. تتم هذه الدراسات عادة بواسطة استكشاف طيف CD كدالة للتغيرات في عوامل خارجية مثل درجة الحرارة، والرقم الهيدروجيني pH ، وتركيز العوامل المغيرة للحالة الطبيعية، والمواد الخافضة للتوتر السطحي أو المثبتات. في الدراسة الحالية يتم دراسة طيف CD لـ rFSH كدالة لدرجة الحرارة. على نحو إضافي لقد تمت دراسة تأثيرات benzyl alcohol و sodium sulphate (Na2SO4) على البنية الثانوية لـ rFSH.

يكون موجه الغدد التناسلية المُستخدم في هذا المثال وكذلك في المثالين ٢ و٣ عبارة عن ناتج عن عودة الاتحاد الجيني للهورمون المحفز للجريبات recombinant Follicle Stimulating Hormone (rFSH)، وهورمون بشري human hormone والذي يتم التعبير عنه من سلالة خلايا PER.C6® البشرية باستخدام تكنولوجيا DNA لناتج عن عودة الاتحاد الجيني. يكون rFSH عبارة عن بروتين دايمر غير متجانس heterodimer يتكون من مونومرين معالجين بـ glycosylated : وحدة فرعية ألفا ذات ٩٢ حمض أميني والتي تعتبر معروفة لـ FSH، والهورمون الملوتن Luteinizing Hormone (LH)، وموجه الغدد التناسلية البشرية المشيمية Human Chorionic Gonadotropin (hCG) وهورمون تحفيز الدرقية thyroid stimulating hormone ، و وحدة فرعية بيتا ذات ١١١ حمض أميني والتي تعتبر محددة لـ FSH. إن هورمونات البروتين السكري، تشتمل على FSH، وجميعهم يفقدون نشاطهم الحيوي عند تفكيك المونومرات المتقارنة بصورة غير تساهمية. لقد أظهرت النتائج السابقة أن عدم ثبات rFSH يرجع بصفة رئيسية على تفكك الدايمر (تفكك البنية الرباعية، والانخفاض المصاحب في استجابة الربط المناعي).

طبقاً للاستخدام المقصود، يتم توفير صيغ rFSH التي يتم تسويقها حالياً في تركيزات مختلفة، وتتراوح من ٣٧.٥ وحدة دولية/مل (تناظر حوالي ٢.٨ ميكرو جرام/مل لـ Gonal-f) حتى ٨٣٣ على الأقل وحدة دولية/مل (تناظر حوالي ٨٣.٣ ميكرو جرام/مل لـ Puregon).

إن rFSH المُستخدم في الدراسات يُقصد من أجل صيغ منتج العقار السائل، ٦٠٠ وحدة دولية/مل من rFSH من أجل الحقن تحت الجلد. نظراً لأن المنتج يُقصد به جرعات ذات حقن

متعدد، فإن إضافة مادة حافظة preservative تعد ضرورية.تم الحصول على الصيغ التي تم دراستها من خلال خلط المحاليل الخام ذات المكونات المختلفة. يتم حصر فاصل التركيز الذي تم دراسته لكل من البروتين والسواغات excipients نتيجة للطريقة المُستخدمة، أي تركيز البروتين المطلوب الاحتفاظ به عالياً بصورة نسبية مقارنة بتركيزات السواغ.

ونتيجة لامتصاص المركبات العطرية للأشعة فوق البنفسجية في المنطقة ذات الطول الموجي الذي تم فحصه، فإن هناك حاجة إلى الاحتفاظ بتركيز benzyl alcohol ليكون منخفضاً.

يوضح الجدول أدناه الصيغ المختلفة الثلاثة التي قد تم فحصها في تصميم التجربة الأول بواسطة المخترعين الحاليين.

جدول ١

يوضح الجدول محتوى الصيغ الثلاثة والتي تم استخدامها في دراسات SRCD تأثيرات درجة الحرارة على rFSH

العينة	المحتوى
١	rFSH ٠.٩٣ مجم/مل، polysorbate ٢٠ ٣.٦ ميكرو جرام/مل، ٣.٥٧ Na2SO4 مللي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer ، الرقم
٢	rFSH ٠.٩٣ مجم/مل، polysorbate ٢٠ ٣.٦ ميكرو جرام/مل، Na2SO4 ٣.٥٧ مللي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer ، الرقم
٣	rFSH ٠.٩٣ مجم/مل، polysorbate ٢٠ ٣.٦ ميكرو جرام/مل، benzyl alcohol ٠.١٧ مجم/مل ٣.٥٧ مللي مولار من المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer ، الرقم الهيدروجيني pH ٦.٣

العينة ١

تم تسجيل طيف CD لـ rFSH، العينة ١ (انظر الجدول ١) عند ١٣ درجة حرارة مختلفة بين ٢٤° م و٧٧° م. وللتوضيح فقط تم توضيح سبعة فقط من تلك الأطياف في الشكل ١. لم تتكون العينة ١ على النحو المشتق من جدول ١، من الملح أو مادة حافظة preservative . يتم توضيح

الأطياف في الشكل ١. وتبين النتائج بوضوح أن شدة الإشارة CD تقل كدالة لدرجة الحرارة، حيث تبين تحلل البنيات الثانوية عند درجة حرارة عالية (> ٥٠° م). لم يتم استكشاف اختلافات مميزة بين أطياف الكتلة ٢٤.٠° م ← ٤٥.٩° م، والتي تظهر أثناء تلك الفترة من الوقت أن القياسات(حوالي ٢٠ دقيقة) فإن التركيب الثانوي للبروتين يعد سليماً عند التسخين حتى حوالي ٤٦° م. تظهر أطياف كتلة SRCD لـ FSH عند التسخين حتى نقطة تساوي اللون المزدوج لحوالي ١٩٣ نانو متر، والتي توجد لأطياف الكتلة في العينة ٢، انظر الشكل ٢.

العينة ٢

تم تسجيل أطياف CD لـ rFSH، العينة ٢ (الجدول ١) المحتوي على Na2SO4. يتم الحصول على الأطياف عند ١٣ درجة حرارة مختلفة بين ٢٤° م و٧٧° م، ويتم توضيح ذلك في الشكل ٢. لمزيد من التوضيح فقط تبين تلك الأطياف في الشكل ٢.

تبين تلك النتائج تحلل البنيات الثانوية كدالة لدرجة الحرارة. تكشف البيانات أن البنية الثانوية لـ rFSH في العينة ٢ تعد سليمة عند التسخين لحوالي ٤٦° م (في مدة التجربة). على نحو هام، تظهر تلك البيانات أيضاً أن الصورة ذات الطبيعة المتغيرة يتم بناؤها بصورة نسبية في وجود Na2SO4.

العينة ٣

تم تسجيل أطياف CD لـ rFSH، العينة ٣ (العينة ١) المحتوية على benzyl alcohol (BA). إن benzyl alcohol يمثل مادة حافظة preservative مضادة للميكروبات antimicrobial والتي يتم اختيارها إلى حد كبير من أجل الصيغة السائلة لـ FSH. ونتيجة لقدرة الحفظ الضعيف نسبياً مقارنة على سبيل المثال بـ m-cresol ، فإنه يجب استخدام BA عند تركيزات عالية (حوالي ١٠- ١٥ مجم/ مل). إن المادة الحافظة تعد ضرورية نظراً لأنه الاستخدام المقصود لـ rFSH يكون من أجل عدة مرات حقن خلال فترة تبلغ ١ شهر، ونظراً لأن rFSH يتم تخزينه بصفة عامة عند درجة حرارة الغرفة.

يتم الحصول على الأطياف لـ rFSH في وجود ٠.١٧ مجم/مل BA عند ثلاث عشرة درجة بين ٢٤° م و٧٧° م، وتم توضيح ذلك في الشكل ٣. ومن أجل المزيد من التوضيح فقد تم توضيح

ثمانية من تلك الأطياف في الشكل ٣. نتيجة للامتصاص العالي benzyl alcohol للأشعة فوق البنفسجية (والإشارة CD المصاحبة المنخفضة) فإنه لا يمكن زيادة تركيز BA الذي يتم دراسته، وبالتالي لا يمكن الاقتراب من التركيز الذي سوف يُستخدم في المحافظة على صيغ rFSH.

على الرغم من ذلك، تمت ملاحظة تأثير عدم تثبيت واضح لـ BA. وتوضح نتائج CD أن البنية الثانوية لـ rFSH في العينة ٣ تكون سليمة عند التسخين حتى ٤٢° م والتي تكون أقل بصورة طفيفة من درجة حرارة بداية تغير الحالة الطبيعية لـ rFSH في العينتين ١ و٢. وعلى نحو إضافي وبصورة هامة، فإن البيانات توضيح أن الصور ذات الطبيعة المتغيرة ينقصها البنية المرتبة حتى درجة أعلى بصورة ملحوظة من FSH في غياب المادة الحافظة. تأثيرات السواغات excipients على التغيرات البنيوية structural changes المستحثة بدرجة الحرارة . أظهرت أملاح Na2SO4 التي تم هنا استخدامها كمثال تمثيلي للملح المطلوب حمايته تأثير كبير على بنية درجة حرارة البروتينات التي تم تغير طبيعتها. يعد ذلك معطى هام بوضوح. نظراً لأن البروتينات التي تم تغير حالتها الطبيعية (غير المطوي أو غير المطوي جزئياً) تكن أكثر عرضة للتجمع لتشكيل تكتلات أكبر من بروتينات أصلية (Fink, A.L., 1998, Fold Des. 3(1):R9-R23)، وتبين النتائج أن sodium sulphate يمكنها أن تحد اتجاه جزيئات rFSH لتغير الحالة الطبيعية وبالتالي خطورة التكتل ومن ثم يزيد بدرجة كبيرة تثبيت التخزين. إن benzyl alcohol من جهة أخرى يحث التحلل البنيوي الكبير عند درجات حرارة عالية. لم يتم استكشاف بنيات ثانوية مرتبة بواسطة SRCD. يمكن أن تكون تأثيرات BA الملحوظة (بنيات أكثر طية) جزءاً لتفسير التكتل الزائد الموجود في أنظمة بروتين أخرى عند إضافة benzyl alcohol :

Maa, Y. and Hsu, C.C., 1996, Int. J. Pharm. 140:155-168; Zhang, Y. et al., 2004, J. Pharm. Sci. 93(12):3076-3089.

على الرغم من ذلك، فإن إضافة المواد الحافظة تعد هامة لتطوير صيغ متعددة الجرعات، ومن وجود منتجات rFSH في الأسواق فإنه من المعروف أن الصيغ الأكثر ثباتاً تحتاج إلى التطوير حتى مع محتوى عال نسبياً من benzyl alcohol (Puregon® يشتمل على ١٠ مجم/مل benzyl alcohol). اتضح أن benzyl alcohol يقلل ثبات rFSH وذلك في مقابل فقد البنيات الثانوية المرتبة عند التسخين. على الرغم من ذلك، تعد إضافة المواد الحافظة هامة.

وأظهرت هذه الدراسة أن الأملاح الحالية المطلوب حمايتها تزيد مستوى البنيات المرتبة ordered structures في الصيغ rFSH المسخنة. وبناء على ذلك، تناسب تلك الأملاح جيداً كمادة (مواد) مثبتة في الصيغة rFSH السائلة، على سبي المثال، لتعويض تأثيرات benzyl alcohol أو المواد الحافظة phenolic preservatives .

المثال ٢- الفحص الحراري التفاضلي Differential Scanning Calorimetry (DSC)

إن FSH المستخدم على سبيل التوضيح في هذا المثال هو نفس المستخدم في المثال ١.

بصفة عامة تكون البنية الأصلية (الفعالة حيوياً) من البروتينات حساسة جداً نحو ما يحيط بها على سبيل المثال تركيبة الصيغة، وأنظمة الحاوية، والرقم الهيدروجيني pH ودرجة الحرارة. في المثال الحالي لقد تمت دراسة درجة حرارة تغير الطبيعة rFSH، Tm، وذلك واسطة الفحص الحراري التفاضلي Differential Scanning Calorimetry (DSC). إن درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية لـ rFSH تؤدي إلى إشارة بثبات البروتين في المحلول، حيث تشير Tm الأعلى إلى بروتين أكثر ثباتاً. إن البنية الثلاثية والرباعية للبروتينات يتم بصفة رئيسية تثبيتها بواسطة تفاعلات غير تساهمية. ونظراً لأن تلك التفاعلات داخل الجزيئات يتم إحلالها بالتفاعلات التساهمية مع جزيئات الماء أثناء تفاعل فك الطي فإن التوازن Equilibrium الديناميكي الحراري بين الصور البنيوية المختلفة (أي الأصلية وذات الطبيعة المتغيرة) يكون بارعاً. وبصفة عامة هذا يعني أن ثبات البروتينات الأصلية يكون محدوداً. تفك العديد من البروتينات الطيات حرارياً حول ٧٠° م. يمكن وصف طيات البروتينات أو تغير طبيعتها بواسطة المتغيرات الحرارية الديناميكية thermodynamic والتي يمكن دراستها وتحديد كمياتها مباشرة باستخدام DSC. حالياً، يكون DSC عبارة عن أداة مهمة لدراسة التأثيرات الخاصة بالسواغات excipients على ثبات البروتين، وبناء على ذلك في تحديد الصيغ المثالية للعلاجات البروتينية.

نظرية فحص قياس الحرارة التفاضلي السائل Differential Scanning Calorimetry (DSC)

عند تسخين عينة البروتين (أي زيادة درجة حرارة العينة) في DSC السائل، يتم الحصول فقط على خط قاعدة خفيف، ولكن عندما يستمر التسخين (أي تستمر الزيادة في درجة الحرارة)، ويتم امتصاص الحرارة بواسطة البروتين حيث تؤدي إلى فك الطية حرارياً خلالمدى سمة درجة حرارة

لبروتين تم دراسته. إن ذلك يؤدي إلى قمة ماصة للحرارة. أثناء فك البروتين، فإن جزيئات الماء المحيطة بالبروتين تقوم بإعادة ترتيب أكثر من سلسلة غير آلفة للماء ويتم ترتيبهم. عندما يكون فك الطية كاملاً فإن امتصاص الحرارة يقل ويتشكل خط قاعدة جديد.

إن دمج سعة الحرارة، Cp، للعينة يؤدي إلى تغير، ΔH، المرتبط بعملية معادلة فك الطية (١). ينشأ تغير المحتوى الحراري الملحوظ من العمليات الماصة للحرارة مثل كسر روابط الهيدروجين والعمليات الطاردة للحرارة مثل تكوين روابط هيدروجين بين البروتين والأوساط المحيطة. تكون النقطة الوسيطة للانتقال الحراري أو النقطة الوسيطة للانتقال، Tm (وعادة يُسمى درجة حرارة تغير طبيعة البروتين) تكون عبارة عن درجة الحرارة عندما يتم طي جزيئات البروتينات ويتم فك طية نصف جزيئات البروتينات.

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \qquad (١)$$

يمكن أن يتم بسهولة إعادة تدوير البيانات من قياسات Differential Scanning Calorimetry (DSC) التي لم يتم معالجتها، والتي تكون عبارة عن معدل التسخين (في W) كدالة لدرجة الحرارة وذلك إلى سعة حرارة مولارية جزئية (على هيئة جول/ مول كلفن)، مع معرفة الكتلة المولارية وتركيز البروتين المُستخدم.

طريقة الاختبار : تم قياس درجة حرارة تغير طبيعة البروتين، Tm، باستخدام DSC سائل، Nano DSC من TA Instruments، ومزود بـ ٣٠٠ ميكرو لتر من الخلايا الشعرية المزدوجة ويتم استخدام المتغيرات التالية:

معدل الفحص Scan rate : ٠.٥-٢.٠ ْم/دقيقة، إذا لم يتم توضيح خلاف ذلك، ويتم استخدام معدل فحص ١.٠ ْم/دقيقة (٢.٠ ْم/دقيقة للمثال ٤)

درجة حرارة البداية: ٢٠ ْم

درجة الحرارة النهائية: ١٠٠ ْم

التوازن Equilibrium : ٩٠٠ ثانية (أو ٩٠٠ ثانية (فحص أول) ٦٠٠ فحص (فحص ثانٍ) للمثال ٤)

الضغط الثابت Constant pressure : ٣ ضغط جوي

تم إزالة الغاز من جميع العينات لمدة ١٥ دقيقة قبل القياسات. تم تنظيف خلايا العينة باستخدام ٥٠٪ حمض فورميك لكل بروتين في العينات. على نحو إضافي، تم شطف الخلايا باستخدام ١٠٠٠ مل من الماء المنقى بعد استخدم كل عينة.

تم قياس جميع العينات باستخدام العلاج الإرضائي في الخلية المرجعية.

تم خصم النتائج من عملية فحص منفصلة بالمحلول المستخدم في العلاج الإرضائي المملوء في كل خلية مرجعية وخلية العينة من البيانات قبل التقييم، أي خصم المادة الغفل.

MALDI-TOF MS

تم تحليل عينات rFSH، قبل المعالجة وبعدها بإنزيم سياليداز، وذلك بواسطة زمن مج/تأين شعاع الليزر المُساعد بالقالب للقياس الطيفي الكتلي (MALDI-ToF MS) لتقييم مدى تفاعل إزالة سياليل. تم الحصول على جميع أطياف الكتلة على مقياس طيف الكتلة Autoflex II MALDI ToF (Bruker Daltonics). تم استخدام حمض السينابيك كقالب. تم التحليل في حالة الأيون الخطي الإيجابي، وذلك مع الاستخلاص المتأخر. تم استخدام مدى فحص ٤٠٠٠-٢٠٨٩٣ دالتون مع تحديد العيار الخارجي.

هدف هذا المثال

يتمثل هدف المثال في فحص الثبات الحراري thermal stability لـ rFSH بواسطة عملية الفحص الحراري التفاضلي السائل Differential Scanning Calorimetry (DSC) ، ولدراسة تأثير تثبيت العديد من الأملاح على rFSH ومع إضافة أو دون إضافة مادة حافظة preservative (phenol أو benzyl alcohol).

تهدف هذه الدراسة مع الدراسات السابقة للفحص الطيفي ثنائي اللون الدائري circular dichroism (مثال ١ أعلاه) وتهدف دراسات ثبات الوقت الفعلي (المثال ٣ أدناه) إلى دراسة تأثير الأملاح والمواد الحافظة على ثبات rFSH في المحاليل.

المنتجات المطلوب دراستها

٥ معلومات تشغيلية حول rFSH

إن rFSH، وهي عبارة عن مادة عقار ذات رقم تشغيلة ٠٨٨٠٠٠٢٠ ورقم تشغيلة ٨٠٠١٠ د ٠٩ تم تصنيعها بواسطة Bio-Technology General (BTG).

يُجرى تحديد النشاط البيولوجي لـ rFSH وفقاً لـ Ph.Eur. تحدد التركيز ليكون ١٣.٢٢٣ وحدة دولية/مجم (حيث تؤدي إلى ٩.٢٥٦ وحدة دولية/مل) للتشغيلة ٠٨٨٠٠٠٢٠و١٥.١٩ وحدة ١٠ دولية/مجم (حيث تؤدي إلى ١٠.٥٧٦ وحدة دولية/مل) للتشغيلة ٨٠٠١٠ د ٠٩ ، على التوالي لدفعتي rFSH المستخدمتين.

المواد

السواغات Excipients

يتم إدراج قائمة للسواغات المُستخدمة في محاليل rFSH في هذه الدراسة في الجدول ٢.

١٥ جدول ٢: قائمة بالسواغات

الاسم	المورد
Di-sodium hydrogen phosphate × 2 H2O, Ph.Eur.	Merck
Phosphoric acid 85%, Ph .Eur.	Merck
Sodium chloride, Ph.Eur.	Merck
Di-sodium sulphate × 10 H2O, Ph.Eur.	Merck

Merck	Magnesium chloride × 6 H2O, Ph.Eur.
Merck	Potassium chloride, p.a.
Merck	Sodium iodide, Ph.Eur.
Merck	Ammonium sulphate, Ph.Eur.
Merck	Potassium iodide, Ph.Eur.
Riedel-de-Haën	Zinc chloride, Ph.Eur.
Merck	Tri-sodium citrate × 2 H2O, Ph.Eur.
Fluka	Ammonium acetate, Ultra >99.0%
Merck	Sodium acetate, × 3 H2O, Ph.Eur.
Merck	Sodium perchlorate × H2O, p.a.
Merck	Zinc iodide, p.a.
Merck	Zinc sulphate, Ph.Eur.
Merck	Di-potassium sulphate, Ph.Eur.
Merck	Di-sodium tartrate × 2 H2O, p.a.
Merck	Ammonium iodide, p.a.
Merck	Sucrose, Ph.Eur.
Merck	Di-potassium hydrogen phosphate × 3 H2O, p.a.
Fluka	Magnesium sulphate × 7 H2O, Ph.Eur.

Polysorbate 20 (Tween 20) Ph. Eur.	Merck
Phenol, Ph. Eur.	Merck
Benzyl alcohol, Ph. Eur.	Merck
L-methionine, Ph. Eur.	Sigma
Milli-Q water	Millipore

تركيبة المحاليل المختبرة tested solutions

يتم إدراج تركيبة محاليل rFSH والعلاج الإرضائي المختبرين في الجدول ٣، والجدول ٤، والجدول ٥. يتم اختيار التركيز المختبر للمواد الحافظة بناء على التركيز المطلوب لتحقيق معيار Ph. Eur. وهو عبارة عن معيار يتعلق بكفاءة الحفظ لصيغة مستهدفة للاستخدام بطريق غير معوي.

٥ تقوم تركيزات الملح المختبرة على تركيز sodium sulphate المطلوب للحصول على تساوي توتر في المحاليل المختبرة، والذي يبلغ sodium sulphate ٠.١ مولار. يتم اختبار جميع الأملاح الأخرى عند نفس التركيز المولاري مثل sodium sulphate . على نحو إضافي يتم اختبار تركيز أعلى وأقل sodium chloride ، وذلك لتقييم تأثير تركيز الملح على درجة حرارة Tm تغير طبيعة rFSH.

١٠ يتم الاحتفاظ بتركيز المحلول المنظم sodium phosphate في المحاليل المختبرة ليكون منخفضاً لتقليل خطورة تأثيرات التثبيت/إزالة التثبيت للأملاح المنظمة على النحو التالي.

جدول ٣: تركيبة محاليل rFSH

rFSH	محلول منظم	مادة خافضة للتوتر السطحي	مادة حافظة preservative	مادة مضادة للأكسدة	مثبت

٢.٤ مجم/مل	١ ملي مولار محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer رقم هيدروجيني ٥.٥ أو رقم هيدروجيني ٦.٥ أو رقم هيدروجيني ٧.٥	٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠	٥ مجم/مل phenol أو ١٥ مجم/مل benzyl alcohol أو لا يوجد	٠.٥ مجم/مل L-METHIONINE	٠.١ مولار Na2SO4 أو ٠.٢٤ مولار NaCl أو ٠.١ مولار NaCl أو ٠.٠٧ مولار NaCl أو ٠.١ مولار Na - acetate أو ٠.١ مولار Na3 -citrate أو ٠.١ مولار tartrate -Na2 أو ٠.١ مولار NaI أو ٠.١ مولار NaClO4 أو ٠.١ مولار K2SO4 أو ٠.١ مولار K2HPO4 أو ٠.١ مولار KCl أو ٠.١ مولار KI أو ١٠٠ ملي مولار (NH4)2SO4 أو ٠.١ مولار NH4 - acetate أو ٠.١ مولار NH4I أو ٠.١ مولار MgSO4 أو

					٠.١ مولار MgCl2 أو ٠.١ مولار ZnSO4 أو ٠.١ مولار ZnCl2 أو ٠.١ مولار ZnI2 أو ٠.١ مولار sucrose أو لا يوجد

جدول ٤: تركيبة محاليل rFSH تمت إزالة السياليل De-sialylation de-sialylated منها

Rfsh مُزال منه السياليل	محلول منظم	مادة خافضة للتوتر السطحي	مادة مضادة للأكسدة	مثبت
٢.٤ مجم/مل	١ ملي مولار محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer رقم هيدروجيني ٦.٥	٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠	٠.٥ مجم/مل L-methionine	٠.١ مولار Na2SO4 أو ٠.١ مولار NaClO4 أو لا يوجد

جدول ٥: تركيبة محاليل العلاج الإرضائي

محلول منظم	مادة خافضة للتوتر السطحي	مادة حافظة preservative	مادة مضادة للأكسدة	مثبت

١ ملي مولار محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer رقم هيدروجيني ٥.٥ أو رقم هيدروجيني ٦.٥ أو رقم هيدروجيني ٧.٥	٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠	٥ مجم/مل phenol أو ١٥ مجم/مل benzyl alcohol أو لا يوجد	٠.٠٥ مجم/مل L-methionine	٠.١ مولار Na2SO4 أو ٠.٢٤ مولار NaCl أو ٠.١ مولار NaCl أو ٠.٠٧ مولار NaClأو ٠.١ مولار Na acetate - أو ٠.١ مولار citrate -Na3 أو ٠.١ مولار Na2 - tartrate أو ٠.١ مولار NaI أو ٠.١ مولار NaClO4 أو ٠.١ مولار K2SO4 أو ٠.١ مولار K2HPO4 أو ٠.١ مولار KCl أو ٠.١ مولار KI

				أو ١٠٠ ملي مولار (NH4)2SO4 أو ٠.١ مولار acetate-NH4 أو ٠.١ مولار NH4Iأو ٠.١ مولار MgSO4 أو ٠.١ مولار MgCl2أو ٠.١ مولار ZnSO4 أو ٠.١ M ZnCl2أو ٠.١ مولار ZnI2 أو ٠.١ مولار sucrose أو لا يوجد

إجراء التصنيع

يتم تصنيع جميع المحاليل (الجدول ٣، والجدول ٤، والجدول ٥) في المعمل في Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhagen, Denmark. ويتم تلخيص إجراء التصنيع أدناه:

تحضير محلول خام rFSH

يتم تحضير المحاليل الخام rFSH في المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer بواسطة إضافة خطوة تركيز باستخدام تشغيلة rFSH رقم ٠٨٨٠٠٠٢٠ أو محلول مادة عقار بتشغيلة رقم ٨٠٠١٠ د ٠٩، كمادة بادئة. يتم التركيز للأعلى باستخدام جهاز Vivaspin ٢٠ مع غشاء بوزن جزيئي ١٠ كيلو دالتون من Vivascience. يتم الغسل المسبق بواسطة الطرد المركزي centrifugation ١٥ مل من المحلول الإرضائي المناظر، والمحتوي على ٠.٥ مجم/مل من L-methionine، و ٠.٠٠٥ مجم/مل من polysorbate ٢٠ في ١ ملي مولار محلول فوسفات رقمه الهيدروجيني pH ٥.٥، أو ٦.٥، أو ٧.٥ عبر المرشح filter . يتم الطرد المركزي centrifugation عند ٣٠٠٠× g لمدة ٢٠ دقيقة باستخدام التأرجح خارج العضو الدوار swing-out rotor .

لإتمام خطوة التركيز، يُستخدم مقدار كلي ٨٠ مل من عينة rFSH وذلك لملء أربعة أجهزة Vivaspin ٢٠ (٢٠ مل لكل جهاز) وتم الطرد المركزي centrifugation عند ٣٠٠٠ × g لمدة ١٥ دقيقة. وتم نقل كل ناتج احتجاز إلى دورق حجمي ٢٠ مل. يتم غسل المرشح filters بمقادير متساوية صغيرة من المحلول المطلوب للعلاج الإرضائي.

يتم نقل محلول الغسيل إلى الدورق الحجمي، والذي يتم تخفيفه في النهاية حتى حجم باستخدام نفس محلول العلاج الإرضائي. يؤدي ذلك إلى محلول خام rFSH ٢.٨ مجم/ مل يحتوي على ٠.٥ مجم/مل L-methionine، و ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠ في ١ ملي مولار عند رقم هيدروجيني لمحلول منظم بالفوسفات phosphate buffer ٥.٥، أو ٦.٥، أو ٧.٥، على التوالي.

تحضير محاليل rFSH والعلاج الإرضائي

يتم تحضير المحاليل الخام من جميع السواغات، فيما عدا أنه يتم تحضير المواد الحافظة في ماء Milli-Q.

لتحضير محاليل rFSH ومحاليل العلاج الإرضائي، يتم خلط المحاليل الخام من كل سواغ للحصول على التركيزات المطلوبة الموضحة الموضحة في الدول ٣، والجدول ٤، والجدول ٥. يتم إضافة المادة ال حافظة مباشرة إلى المحاليل.

إزالة السياليل De-sialylation من rFSH

يتم استخدام محلول rFSH المركز الذي له تركيز rFSH يبلغ ٢.٨ مجم/مل يحتوي على ٠.٥ مجم/مل من methionine L ، و ٠.٠٠٠٥ مجم/مل من polysorbate ٢٠ في محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer ١ ملي مولار رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ لإزالة sialic acid من أشطر السكر الموصلة بـ rFSH. إن الإزالة تتم إنزيمياً، وذلك باستخدام α (٢ ← ٣، ٦، ٨، ٩) إنزيم Neuraminidase (a sialidase) من سيجما. يتم معالجة rFSH باستخدام إنزيم نيوأمينيداز اثناء الرج طوال الليل عند ٣٧° م . يتم إزالة المواد المتفاعلة باستخدام أجهزة Vivaspin الموصوفة أعلاه لتركيز rFSH. يتم نقل محلول rFSH المحتوي على الإنزيمات إلى جهاز تم غسله مسبقاً Vivaspin. يتم طرد الجهاز مركزياً، ويتم تفريغ ناتج الترشيح وإعادة تعليق ناتج الاحتجاز في المحلول المُستخدم في العلاج الإرضائي، و ٠.٥ مجم/مل من L – methionine ، و ٠.٠٠٠٥ مجم/ مل من polysorbate ٢٠ في ١ ملي مولار من محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥. ويتم مركزياً طرد المحلول المنظم بالفوسفات phosphate buffer . ويتكرر نفس الإجراء ثلاث مرات قبل نقل الدورق الحجمي وتخفيفه إلى الحجم مع محلول علاج إرضائي.

يؤدي ذلك إلى محلول خام rFSH ٢.٨ مجم/مل تمت إزالة السياليل De-sialylation منه ويحتوي على ٠.٥ مجم/مل methionine L ، و ٠.٠٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠ في محلول منظم ١ ملي مولار رقمه الهيدوجيني pH ٦.٥.

النتائج والمناقشة

تأثير سرعة فحص DSC على rFSH Tm لدراسة تأثير سرعة فحص DSC على درجة حرارة، Tm تغير الحالة الطبيعية لـ rFSH تتم القياسات باستخدام ثلاث سرعات فحص مختلفة. على النحو الذي يمكن ملاحظته في الجدول ٦، تتنوع rFSH Tm بتنوع معدل فحص DSC المُستخدم أثناء عمليات القياس.طالما أنه تمت مقارنة درجات حرارة الحالة تغير الحالة الطبيعية التي تم الحصول عليها من القياسات بمعدلات فحص متطابقة، فإن Tm التي تتنوع بتنوع معدل الفحص Scan rate لا تؤثر في تفسير البياناتن انظر على سبيل المثال الجدول ٧.

جدول ٦ : درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية، Tm، فيما يتعلق بمعدل الفحص Scan rate للعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل methionine L ، و ٠.٠٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠ في محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer ١ ملي مولار رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥.

معدل الفحص Scan rate	Tm	
٠.٥ درجة مئوية / دقيقة	٧١.٩ درجة مئوية	
١.٠ درجة مئوية / دقيقة	٧٢.٩ درجة مئوية	
٢.٠ درجة مئوية / دقيقة*	٧٤.٩ درجة مئوية	متوسط = ٧٤.٦ درجة مئوية
٢.٠ درجة مئوية / دقيقة*	٧٤.٣ درجة مئوية	

* مضاعفة تحضير العينة والتحليلات

إن تكرار عمليات فحص DSC حتى ١٠٠ °م قد أظهرت أن تغيير طبيعة rFSH يعد معكوساً جزئياً في ظل الظروف التجريبية (انظر شكل ٤). يعني ذلك أن إعادة الطي أبطأ من زمن التوازن Equilibrium بين عمليتي فحص DSC أو عدم الطي المرتبط بالخطوة غير المعكوسة على النحو الموضح في المعادلة ٢.

$$Native \leftrightarrow Unfolded \rightarrow Irreversibly\ Denatured \quad (٢)$$

تأثير إضافة مادة حافظة preservative على rFSH Tm

على النحو الملاحظ في الجدول ٧، فإن إضافة مادة حافظة preservative إلى محلول rFSH يقلل من درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية، Tm، باستخدام ٢ – ٦ °م، وذلك طبقاً للمادة الحافظة المُستخدمة. يناظر ذلك جيداً البيانات الموضحة سابقاً لكل من ناتج عودة الارتباط الجيني recombinantly للبروتينات و FSH المشتق من البول urinary .

كلما كان الانخفاض أكبر فإن Tm التي تم الحصول عليها لمحاليل rFSH مع benzyl alcohol مقارنة بمحاليل rFSH مع phenol (انظر جدول ٧) يمكن تفسيرها من تركيزات benzyl alcohol (١٥ مجم/ مل) الأعلى من phenol (٥ مجم/مل) في التجارب.

جدول ٧: درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية مع إضافة ودون إضافة المادة الحافظة، Tm(مادة حافظة preservative) و Tm (مع عدم وجود مادة حافظة preservative)، ولعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل L-METHIONINE ، و ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول منظم بالفوسفات phosphate buffer رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ وسواغات موضحة في الجدول. ΔT (مادة حافظة preservative)= Tm (مادة حافظة preservative) – Tm (مع عدم وجود مادة حافظة preservative)

مادة حافظة preservative	ملح	Tm(لا توجد مادة حافظة)	Tm (مادة حافظة)
٥ مجم/مل phenol	لا يوجد ملح	٧٢.٩ درجة مئوية * ٧٤.٩ درجة مئوية **	٧٠.٢ درجة مئوية * ٧٢.٣ درجة مئوية **
١٥ مجم/مل benzyl alcohol	لا يوجد ملح	٧٤.٩ درجة مئوية **	٧٠.١ درجة مئوية**
٥ مجم/مل phenol	٠.١ مولار Na2SO4	٧٨.٠ درجة مئوية	٧٥.١ درجة مئوية *
١٥ مجم/مل benzyl alcohol	٠.١ مولار Na2SO4	٧٨.٩ درجة مئوية**	٧٣.٣ درجة مئوية

* محسوب من قياسات DSC التي تمت بمعدل مسح يبلغ ١.٠ْ م/ دقيقة.

** محسوب من قياسات DSC التي تمت بمعدل مسح يبلغ ٢.٠ْ م/ دقيقة.

تأثير إضافة العديد من الأملاح على rFSH Tm

يعرف ترتيب الأملاح وفقاً لتأثيراتها العامة على إذابة البروتين وثباته يعرف كسلسلة هوميستر Hofmeister series أو سلسلة أليفة للمذيب lyothropic series ، المعادلة ٣ أدناه. تعرف العوامل التي تتخلص من الأملاح في الجانب الأيسر، وهى عبارة عن أيونات مثبتة kosmotropic ions تؤدي إلى تأثير التثبيت على البروتينات. في حين أنه تعرف الأيونات الاضطرابية أو الأيونات التي تدخل الأملاح salting-in ions إلى الجانب الأيمن وهى معروفة بأن تؤدي إلى عدم تثبيت البروتينات

$$SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > F^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^- \quad (٣)$$

تأثير إضافة العديد من الأملاح إلى المحاليل دون مادة حافظة preservative على rFSH Tm

عند قياس تأثير العديد من أملاح sodium على rFSH Tm، على نحو مذهل إلى حد ما، فإنه لم يتم ملاحظة تأثير تثبيت / عدم تثبيت متوقع وفقاً لسلسلة هوميستير Hofmeister series على النحو الموصوف أعلاه، عند تنويع cations انظر جدول ٨ وجدول ٩. على الرغم من ذلك سواء أتم استخدام معظم أيون مثبت، أو سلفات أو أيون اضطرابي، فوق كلورات، فإن زيادة درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية كانت كما هى تقريباً. في الواقع تم الحصول على أكبر زيادة في rFSH Tm للأملاح من أيونات فوق الكلورات حيث من المتوقع حدوث تأثير عدم التثبيت على rFSH. كانت الزيادة في Tm هى نفس المدى لكل من التنويع في anions غير العضوية inorganic anions مثل sulphate ، والكلوريد، وفوق الكلورات ولكنه ينطبق أيضاً نفس الأمر على anions العضوية organic anions مثل citrate ، و acetate ، و tartrate .

جدول ٨:

درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية، Tm، وفيما يتعلق بتوليفة anion الملح لعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل L-METHIONINE ، و ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول منظم sodium phosphate رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ وملح ٠.١ مولار .

anion	Cation				
	K+	Na+	NH4+	Mg2+	Zn2+
SO42-	٧٧.٦ درجة مئوية	٧٨.٠ درجة مئوية	٧٤.٩ درجة مئوية	٧٥.٠ درجة مئوية	٦٠.٢ درجة مئوية
HPO42-	٧٧.٩ درجة مئوية				
acetate		٧٧.٧ درجة مئوية	٧٦.٢ درجة مئوية		
citrate		٧٨.٤ درجة مئوية			
tartrate		٧٨.٤ درجة مئوية			
Cl-	٧٧.٦ درجة مئوية	٧٧.٧ درجة مئوية		٧٤.٤ درجة مئوية	٥٩.٩ درجة مئوية
I-	٧٨.٣ درجة مئوية	٧٨.٧ درجة مئوية	٧٦.٣ درجة مئوية		٥٧.٥ درجة مئوية
ClO4-		٨٠.٩ درجة مئوية			

ليس هناك ملح مضاف: Tm= ٧٢.٩° م، وغيرها من سواغات أخرى لرأس الجدول

٠.١ مولار Sucrose : Tm = ٧٣.٣° م، وغيرها من السواغات excipients وفقاً لرأس الجدول

جدول ٩: درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية، ΔTm (ملح)، وفيما يتعلق بتوليفة anion و Cation الملح لعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل L-methionine ، و ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول منظم sodium phosphate رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ عند إضافة ملح ٠.١ مولار.

٥ ΔTm (ملح)= Tm (ملح)- Tm (مع عدم وجود ملح).

anion	Cation				
	K+	Na+	NH4+	Mg2+	Zn2+
SO42-	٤.٧ °م	٥.١ °م	٢.١ °م	٢.١ °م	-١٢.٧ °م
HPO42-	٥.٠ °م				
acetate		٤.٨ °م	٣.٣ °م		
citrate		٥.٥ °م			
tartrate		٥.٥ °م			
Cl-	٤.٧ °م	٤.٨ °م		١.٥ °م	-١٣.٠ °م
I-	٥.٥ °م	٥.٨ °م	٣.٤ °م		-١٥.٤ °م
ClO4-		٨.٠ °م			

٠.١ مولار Sucrose : ٠.٤ °م، سواغات أخرى وفقاً لرأس الجدول

أن الاتجاه الملحوظ، فإن موضع anions في سلسلة هوميستر Hofmeister series لا تؤثر على زيادة rFSH Tm عند إضافة أملاح sodium المختلفة، واتضح بالنسبة لـ potassium (انظر الجدول ٨ والجدول ٩).

نظراً لوجود نفس Cation ، فإن anion يؤثر بصفة عامة فقط على تغيرات في rFSH Tm وذلك لدرجة طفيفة ولا يؤدي إلى تغيرات وفقاً لسلسلة هوميستير Hofmeister series .

على نحو مذهل إلى حد ما، إن cations من جهة أخرى تؤثر على rFSH Tm. على نحو أكثر تحديداً فإن الأملاح ذات Cation أحادي التكافؤ تظهر بصفة عامة rFSH Tm أكبر من الأيونات ثنائية التكافؤ (انظر جدول ٨). بصفة خاصة تؤدي أيونات الفلز القلوي أحادية التكافؤ إلى rFSH Tm أعلى. بطريقة أخرى، فإن تأثيرات التثبيت الملحوظة (أي، زيادة rFSH Tm) عند إضافة الملح لا تعد مستقلة إلى حد ما عن anions التي يتم اختبارها (انظر جدول ٨ و٩)، في حين أن cations تأثير كبير على درجة التثبيت. تظهر أملاح potassium و sodium تأثير تثبيت كبير بصفة خاصة.

إن للمحاليل التي تم اختبارها أعلاه تركيز ملح ٠.١ مولار. لدراسة تأثير تركيز الملح على rFSH Tm، فإنه تمت دراسة قياسات DSC لمحاليل rFSH المحتوية على ثلاثة تركيزات مختلفة من sodium chloride . تمت ملاحظة تأثير التثبيت عند إضافة ملح إلى محلول rFSH في المدى الكلي لتركيز الملح الذي تم اختباره (انظر جدول ١٠).

جدول ١٠: درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية، ΔTm (ملح)، لعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل L-METHIONINE ، و٠.٠٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول منظم sodium phosphate رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ عند إضافة تركيزات مختلفة من sodium chloride . ΔTm (ملح)= Tm (ملح)- Tm (مع عدم وجود ملح).

تركيز NaCl	ΔTm (ملح)
٠.٠٧ مولار	٤.٢ درجة مئوية **
٠.١ مولار	٤.٨ درجة مئوية *
٠.٢٤ مولار	٥.٤ درجة مئوية **

* تم حسابها من قياسات DSC بمعدل فحص ١.٠ °م/دقيقة.

** تم حسابه من قياسات DSC التي تمت مع معدل فحص ٢.٠ °م/دقيقة

تستخدم براءات الاختراع الحالية الخاصة بصيغ FSH مثلاً sucrose كمثبتات لـ FSH. تؤدي إضافة ٠.١ مولار sucrose إلى محلول rFSH إلى تغير دقيق في rFSH Tm (انظر الجدول ٨ والجدول ٩)، حيث يوضح أن تأثير الثبات على rFSH عند إضافة أملاح potassium أو sodium يكون أكبر بدرجة كبيرة من التأثير الذي تم الحصول عليه عند إضافة sucrose .

تأثير إضافة العديد من الأملاح إلى محاليل مع المادة الحافظة المضافة على rFSH Tm

من المعروف جيداً أن إضافة المواد الحافظة إلى محاليل البروتينات يقلل من ثبات البروتين في محلول. على الرغم من ذلك، بالنسبة للصيغة السائلة متعددة الجرعات فإنها تهدف إلى الاستخدام غير المعوي، وتكون المادة الحافظة مطلوبة. بالتالي من المهم جداً تعويض التقليل في ثبات البروتين عنتد إضافة مادة حافظة preservative من خلال إضافة المواد المثبتة، ومثل الأملاح، إلى محاليل rFSH.

جدول ١١: درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية، Tm، والتغيرات في درجة حرارة الحالة الطبيعية ΔTm (مادة حافظة preservative). وΔTm (ملح) لعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل L-methionine ، و٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول منظم sodium phosphate رقمه الهيدروجيني pH ٦.٥ و ٠.١ مولار ملح على النحو الموضح في الجدول. هنا ΔTm (مادة حافظة)= Tm (مادة حافظة) – ΔTm (مادة غير حافظة) وΔTm (ملح)* = Tm (ملح)– Tm (من غير ملح) .

	Tm	ΔTm (مادة حافظة)	ΔTm (ملح)*
لا يوجد ملح	٧٠.٢ درجة مئوية	-٢.٧ درجة مئوية	-
Na2SO4	٧٥.١ درجة مئوية	-٢.٩ درجة مئوية	٤.٩ درجة مئوية
NaCl	٧٤.٧ درجة مئوية	-٢.٩ درجة مئوية	٤.٦ درجة مئوية

NaClO4	٧٨.٦ درجة مئوية	-٢.٣ درجة مئوية	٨.٤ درجة مئوية

*بالنسبة للمحاليل rFSH تشتمل على ٥ مجم/مل من phenol

على النحو الملحوظ في الجدول ١١، تؤدي إضافة مادة حافظة preservative إلى محلول rFSH إلى تقليل درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية لـ rFSH بـ ٢-٣° م. تزيد إضافة ملح إلى محاليل rFSH محفوظة من درجة حرارة تغير الحالة الطبيعية لـ rFSH بحوالي ٥° م. وفي كلمات أخرى، تمت ملاحظة أن تأثير عدم التثبيت عند إضافة مادة حافظة preservative إلى محلول rFSH يتم تعويضه بإضافة ملح على النحو المحدد بالاختراع. وبصورة فعلية، لا تؤدي إضافة الملح إلى المحاليل المحتوية على phenol فقط على تعادل تأثير المادة الحافظة على rFSH Tm، وتزيد فعلياً من Tm مقارنة بـ rFSH في محلول مائي aqueous solution دون إضافة مادة حافظة preservative أو ملح (انظر جدول ١١).

تأثير تعديل الرقم الهيدروجيني pH على rFSH Tm

لدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني pH على rFSH Tm ومع إضافة أملاح التثبيت أو دون إضافتها، فإنه تحددت درجة حرارة تغير طبيعة rFSH عند رقم هيدروجيني ٥.٥، و٦.٥، و٧.٥ وذلك مع إضافة ثلاثة أملاح sodium مختلفة أو دون إضافتها (انظر الجدول ١٢).

الجدول ١٢: درجة حرارة تغير الحالة الطبيعة، Tm، عند أرقم هيدروجين مختلفة أو عينات rFSH مختلفة تحتوي على ٢.٤ مجم/مل rFSH، ٠.٥ مجم/مل من methionine L ، و ٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbate ٢٠، محلول منظم sodium phosphate ١ ملي مولار وملح ٠.١ مولار.

هنا ΔTm (ملح) = Tm (ملح)- Tm (مع عدم وجود ملح)

	Tm			ΔTm (ملح)		
	pH ٥.٥	pH ٦.٥	pH ٧.٥	pH ٥.٥	pH ٦.٥	pH ٧.٥

لا يوجد ملح	٧٠.٥ درجة مئوية	٧٢.٩ درجة مئوية	٧٤.٩ درجة مئوية	–	–	–
Na2SO4	٧٦.٢ درجة مئوية	٧٨.٠ درجة مئوية	٧٨.٧ درجة مئوية	٥.٧ درجة مئوية	٥.١ درجة مئوية	٣.٨ درجة مئوية
NaCl	٧٥.٠ درجة مئوية	٧٧.٧ درجة مئوية	٧٨.٦ درجة مئوية	٤.٥ درجة مئوية	٤.٨ درجة مئوية	٣.٧ درجة مئوية
NaClO4	٧٨.٦ درجة مئوية	٨٠.٩ درجة مئوية	٨١.٧ درجة مئوية	٨.١ درجة مئوية	٨.٠ درجة مئوية	٦.٧ درجة مئوية

على النحو الموضح في الجدول ١٢، تتمثل الاتجاهات العامة لـ rFSH Tm عند إضافة أملاح sodium مختلفة في نفس الرقم الهيدروجيني الكلي الذي يتراوح من ٥.٥ إلى ٧.٥، والذي يلاحظ الانحراف عن تأثير التثبيت/عدم التثبيت للأملاح وفقاً لسلسلة هوميستير Hofmeister series عند جميع الأرقام الهيدروجينية التي تم اختبارها.

٥ في مدى الرقم الهيدروجيني pH الذي تمت دراسته، فإن درجات الحرارة لتغير طبيعة rFSH الملحوظة تزيد بزيادة الرقم الهيدروجيني pH في المحاليل، وذلك مع كل من إضافة أو دون إضافة ملح (انظر الجدول ١٢). تكون الزيادة الفعلية في درجة حرارة تغير طبيعة rFSH عند إضافة أملاح، (salt) ΔTm، تكون أقل عند الرقم الهيدروجيني pH الأعلى (انظر الجدول ١٢).

تأثير معالجة rFSH بالسياليل sialylated على rFSH Tm

١٠ على النحو الموضح أعلاه، فإن تأثير إضافة الأملاح إلى محلول rFSH لا يتبع كلية سلسلة هوميستر Hofmeister series الموصوفة أعلاه، حيث يتوقع لأملاح أيونات فوق الكلورات أن

تؤدي إلى عدم تثبيت البروتينات (ناتج بروتين أقل Tm) ويتوقع أن تقوم أيونات sulphate بتثبيت البروتينات (ناتج بروتين أعلى Tm).

نظراً لأن rFSH عبارة عن بروتين معالج بـ glycosylated ، له العديد من الوحدت البنائية لـ sialic acids الموصلة بأشطر السكر، وبالتالي تؤدي إلى شحنة إجمالية سالبة عالية بدرجة ما، فإن تأثير sialic acids على أداء التثبيت غير المتوقع للأملاح تمت دراسته.

لدراسة تاثير sialic acids على rFSH Tm عند إضافة أملاح مختلفة، فإنه تمت إزالة sialic acids إنزيمياً. تم بالتالي تحليل rFSH المزال منه السياليل بواسطة DSC، وذلك مع إضافة ملح أو دونها.

لتأكيد أن الوحدات البنائية sialic acids تمت إزالتها بنجاح، فإنه تم تحليل عينة rFSH قبل الإزالة الإنزيمية وبعدها sialic acids بواسطة MALDI-ToF MS.

في ظل ظروف عينة حمض MALDI-ToF MS فإنه تم تفكيك الوحدات الفرعية ألفا وبيتا وبالتالي تم قياسها بصورة منفصلة. يبلغ متوسط الوزن الجزيئي للوحدة الفرعة ألفا قبل العلاج بسياليداز حوالي ١٥٠٠٠ دالتون. وبعد المعالجة sialidase وصل متوسط الوزن الجزيئي ١٤٠٠٠ دالتون. وصل متوسط الوزن الجزيئي للوحدة الفرعية بيتا قبل المعالجة sialidase ١٨٠٠٠ دالتون، و ١٧٠٠٠ دالتون بعد المعالجة sialidase . ووصلت الإزاحة من حيث الكتلة لكلا الوحدتين الفرعيتين نتيجة لإزالة sialic acid والتي تؤدي إلى خفض الكتلة. وعلى نحو عملي فإن جميع الوحدات البنائية sialic acid تمت إزالتها من rFSH أثناء عملية إزالة السياليل De-sialylation .

إن زيادة rFSH Tm عند إضافة sodium sulphate أو فوق sodium perchlorate تتبع نفس الاتجاه لـ rFSH غير المعدل وrFSH المزال منه السياليل، ويعني ذلك أن تأثير التثبيت (يزيد في rFSH Tm) الملحوظ لا يتبع سلسلة هوميستر Hofmeister series الموصوفة أعلاه.

وبصفة عامة تكون Tm الملحوظة أقل بمقدار من ٢- ٦ْ م عن rFSH المزال منه de-sialylated rFSH غير المعدل (انظر الجدول ١٣). يكون تأثير التثبيت الملحوظ عند إضافة الملح أيضاً أقل من rFSH المزال منه السياليل مقارنة بـ rFSH غير المعدل (انظر الجدول ١٣).

يتوقع أن Tm الأقل الذي يتم الحصول عليها لـ rFSH المزال منه de-sialylated أقل من rFSH غير المعدل، نظراً لأن وجود sialic acid على أشطر السكر على rFSH يُعتقد أنه يزيد ثبات Rfsh.

تتبع حقيقة أن كل من rFSH و rFSH المزال منه de-sialylated نفس الاتجاه (المنحرف عن تأثير التثبيت/عدم التثبيت وفقاً لسلسلة هوميستير Hofmeister series) عند إضافة العديد من الأملاح، وتثبت أن وجود sialic acids على rFSH في حد ذاته والذي يؤدي إلى هذا التأثير.

الجدول ١٣: درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية، Tm، لـ rFSH و عينات rFSH منزوعة السياليل de-sialylated محتوية على ٢.٤ مجم/ مل rFSH أو ٢.٤ مجم/ مل منزوعة السياليل de-sialylated rFSH، ٠.٥ مجم/ مل methionine L ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥ و ٠.١ مولار من ملح. في هذه الحالة، ΔTm (ملح) = Tm(ملح) - Tm (بدون ملح).

	Tm		ΔTm (ملح)	
	rFSH	منزوعة السياليل de-sialylated rFSH	rFSH	منزوعة السياليل de-sialylated rFSH
بدون ملح	٧٢.٩ درجة مئوية	٧٠.٧ درجة مئوية	-	-
Na2SO4	٧٨.٠ درجة مئوية	٧٢.١ درجة مئوية	٥.١ درجة مئوية	١.٥ درجة مئوية
NaClO4	٨٠.٩ درجة مئوية	٧٥.٠ درجة مئوية	٨.٠ درجة مئوية	٤.٤ درجة مئوية

الاستنتاجات

تمت ملاحظة تأثير عدم الثبات (خفض rFSH Tm) لـ rFSH أثناء إضافة النظائر الحامية يمكن تحديدها بسهولة من معرفة الفن داخل المنطقة. ومع ذلك يكون الإنحراف الملاحظ من سلسلة هوميستر Hofmeister series في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH أثناء إضافة أملاح مع anions مختلفة، غير متوقعاً. وفقاً لسلسلة هوميستير Hofmeister series ، (التي تصنّف الأملاح وفقاً لتأثيراتها العامة على قابلية ذوبان وقابلية ثبات البروتين)، anions كوزموتربية مثل بروتينات ثبات الكبريتات الطبيعية sulphate normally (ناتج أعلى Tm) حيث anions حالّة للبروتين مثل بروتينات perchlorate مزيلة للثبات (ناتج أقل Tm). في تلك الدراسة تعرض كل anions المختبرة ذات نفس Cation ، نفس الزيادة في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH. على النقيض تماماً من توقع سلسلة هوميستر Hofmeister series ، تعرض أملاح أيونات perchlorate أعلى زيادة في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH.

بصورة أخرى، يكون تأثير التثبيت الملاحظ (أي، الزيادة في rFSH Tm) أثناء إضافة ملح مستقلاً تماماً عن anions المختبرة. تعرض أملاح sodium و potassium تأثير تثبيت كبير بشكل خاص. بصفة خاصة تعطي إضافة sodium perchlorate إلى محلول rFSH زيادة كبيرة في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH. مع ذلك، تكون perchlorate عالية التفاعل بشكل عام و تكون عبارة عن عوامل مؤكسدة وبالتالي تكون perchlorate غير مقبولة كمكوّن غير خامل في الصياغات الصيدلانية. لا يمكن شرح تأثير التثبيت غير المتوقع الناتج عن rFSH أثناء إضافة أملاح عن طريق وجود sialic acid على جزيئات لاسكر من rFSH.

تعرض تحديدات درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH على rFSH منزوعة السياليل de-sialylated نفس الميل في تأثير التثبيت على rFSH أثناء إضافة أملاح في صورة rFSH غير معدّلة.

المثال رقم ٣ – الاستقرار في الوقت الفعلي على محاليل rFSH

هدف الدراسة

يتمثل هدف تلك الدراسة هو التحقق إذا كان الاستقرار في الوقت الفعلي لـ rFSH في صياغات مختلفة يتبع نفس الميل كما يمكن رؤيته في قياسات درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH بواسطة DSC سائل كما هو موصوف في المثال رقم ٢ و أيضاً التغيّر في التركيب الثانوي لـ rFSH أثناء التسخين كما تم قياسه باستخدام مطياف CD، كما هو موصوف في المثال رقم ١.

تم تحديد تفكيك ثبات تركيب rFSH أثناء التخزين، الذي يقيس ميل rFSH للتفكك إلى مونومراته في تلك الدراسة. تمت دراسة ثبات rFSH ٦٠٠ وحدة دولية/ مل من صياغات بعد التخزين عند درجتين حرارة تخزين مختلفة على المدى الطويل ٥ ± ٣ درجة مئوية/ RH المحيطة و ظروف معجلة ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH لمدة ٦-١٢ شهر.

تم تخزين كل الدوارق في وضع مقلوب. تم تخزين عينات علاج إرضائي محتوية على الصياغات المقابلة ولكن بدون إضافة rFSH تحت نفس الظروف الموصوفة بالنسبة لـ rFSH.

المنتج الذي سيتم دراسته

معلومات الدفعة

تم تصنيع rFSH، مادة عقار الدفعة رقم ٠٨٨٠٠٠٦٠ و الدفعة رقم ٠٩٨٠٠٠٢٠ بواسطة تقنية حيوية عامة Bio-Technology General (BTG)، Israel.

تم إجراء تحديد النشاط الحيوي لدفعات rFSH السابقة وفقاً لـ Ph.Eur.

المواد

السواغات Excipients

تم وصف قائمة السواغات excipients المستخدمة في تلك الدراسة في الجدول ١٤.

الجدول ١٤: قائمة السواغات

الاسم	المورّد
Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate, Ph. Eur.	Merck

Phosphoric acid 85%, Ph .Eur.	Merck
Sucrose, Ph. Eur.	Merck
Polysorbate (polysorbate) 20 Ph. Eur.	Merck
Phenol, Ph. Eur.	Merck
L-methionine, Ph. Eur.	Sigma
Sodium chloride, Ph.Eur.	Merck
Di-sodium sulphate ×10H2O, Ph. Eur.	Merck
Milli-Q water	ميلي بور

الحاوية Container و نظام الإغلاق Closure system

تم إدراج مواد الحشو الأساسية المستخدمة في الجدول ١٥.

الجدول ١٥: الحاوية/ نظام الإغلاق

البند	الوصف	المورّد
الحاوية		
	النوع ١ دوارق زجاجية من borosilicate بدون لون Ph. Eur.، R٢	ISO-GmbH
المطاط		
	سدادة chlorobutyl ١٣ مم مغطاة بـ ٤٤٣٢/٥٠ FluoroTec ، B٢-٤٠	West Pharmaceutical Services

الغطاء		
	غطاء ألومينيوم و غطاء بلاستيك (الوجه المقابل)	West Pharmaceutical Services

تم إدراج تركيبة محاليل مخزون rFSH و الصياغات المختلفة (rFSH و علاج إرضائي placebo) في الجدول ١٦، الجدول ١٧ و الجدول ١٨. باستثناء الصياغة غير المحتوية على أي مادة مثبتة stabiliser / عامل ضبط التوتر tonicity agent ، يتم تعديل تركيز المادة المثبتة concentration of the stabiliser / عامل ضبط التوتر لإعطاء محاليل متساوية التوتّر give isotonic solutions . ٥

الجدول ١٦: تركيبة محاليل مخزون rFSH

الدفعة	تركيز rFSH	المادة الناقلة
٠٨٨٠٠٠٦٠	١٦٢٣٥ وحدة دولية/ مجم ٠.٧ مجم / مل	٠.٥ مجم/ مل L-methionine ، ٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠ في ١ ملي مولار Disodium hydrogen phosphate رقم هيدروجيني ٦.٧-٦.٨
٠٩٨٠٠٠٢٠	١٣٢٢٣ وحدة دولية/ مجم ٠.٧ مجم / مل	٠.٥ مجم/ مل L-METHIONINE ، ٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠ في ١ ملي مولار Disodium hydrogen phosphate رقم هيدروجيني ٦.٧-٦.٨

الجدول ١٧: تركيبة صياغات rFSH

rFSH	محلول منظم	مادة خافضة للتوتر السطحي	مادة حافظة	مضاد التأكسد	المادة المثبتة/ عامل ضبط التوتر

٦٠٠ وحدة دولية/ مل	٢٠ ملي مولار Phosphate pH ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠	-	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	١٥ مجم/ مل Na2SO4
٦٠٠ وحدة دولية/ مل	١ ملي مولار Phosphate pH ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-METHIONINE	١٤ مجم/ مل Na2SO4
٦٠٠ وحدة دولية/ مل	١ ملي مولار Phosphate pH ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	٧ مجم/ مل NaCl
٦٠٠ وحدة دولية/ مل	١ ملي مولار Phosphate pH ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	٧٥ مجم/ مل Sucrose
٦٠٠ وحدة دولية/ مل	١ ملي مولار Phosphate pH	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	-

	٦.٥*				

* يشير الرقم الهيدروجيني pH إلى الرقم الهيدروجيني pH للمحلول النهائي

الجدول ١٨: تركيبة صياغات العلاج الإرضائي

محلول منظم	مادة خافضة للتوتر السطحي	مادة حافظة	مضاد التأكسد	المادة المثبتة/ عامل ضبط التوتر
٢٠ ملي مولار فوسفات pH ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbat ٢٠ e	–	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	١٥ مجم/ مل Na2SO4
١ ملي مولار فوسفات رقم هيدروجيني ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbat ٢٠ e	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	١٤ مجم/ مل Na2SO4
١ ملي مولار فوسفات pH ٦.٥*	٠.٠٠٠٥ مجم/ مل polysorbat ٢٠ e	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	٧ مجم/ مل NaCl

١ ملي مولار فوسفات pH ٦.٥*	٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbat ٢٠ e	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	٧٥ مجم/ مل Sucrose
١ ملي مولار فوسفات pH ٦.٥*	٠.٠٠٥ مجم/مل polysorbat ٢٠ e	٥ مجم/ مل phenol	١ مجم/ مل L-methionine	-

* يشير الرقم الهيدروجيني pH إلى الرقم الهيدروجيني pH للمحلول النهائي

إجراء التصنيع

تم تصنيع كل المحاليل (الجدول ١٧ و الجدول ١٨) بتدرج معملي عند Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhagen, Denmark. تم تلخيص إجراء التصنيع فيما يلي.

٥ تحضير rFSH و صياغات العلاج الإرضائي placebo formulations

تم تحضير محاليل مخزون من كل السواغات excipients في ماء Milli-Q.

بالنسبة لتحضير صياغات العلاج الإرضائي placebo formulations ، تم خلط محاليل المخزون من كل سواغة للحصول على التركيزات المعطاة في الجدول ١٨. قبل التخفيف إلى الحجم، تم تعديل الرقم الهيدروجيني pH لكل صياغة، عند الضرورة.

١٠ بالنسبة لتحضير صياغات rFSH، تم تحضير محلول مخفف من محلول مخزون من كل سواغ. تم تعديل الرقم الهيدروجيني pH لمحاليل التخفيف. تم خلط محاليل التخفيف مع محلول مخزون rFSH (أنظر الجدول ١٦) للحصول على التركيزات النهائية المدرجة في الجدول ١٧.

ترشيح معقّم و حشوة مطهّرة Sterile filtration and aseptic filling

تم ترشيح الصياغات النهائية بشكل معقّم باستخدام مرشّح ٠.٢٢ ميكرو متر PVDF (ميلي بور). تم ترشيح صياغات العلاج الإرضائي بشكل مطهّر داخل زجاجات أوتوكلاف autoclaved glass باستخدام مرشحات Stericup. تم ترشيح صياغات rFSH بشكل معقّم داخل فرن أوتوكلاف زجاجي باستخدام مرشحات Sterivex-GV ومعقّم ٢٠ مل Luer Lock syringes (Braun). تم إجراء ترشيح معقّم، وحشو وتغطية الدوارق في مقعد LAF باستخدام دوارق أتوكلاف وسدادات مطاطية. قبل وبعد الحشو، تم تطهير الدوارق باستخدام غاز نيتروجين nitrogen gas ، يمر خلال مرشح ٠.٢٠ ميكرو متر Millex-FG PFTE (ميلي بور) لمدة على الأقل ٦ ثواني. تم حشو الدوارق بـ ١.٥ مل من العينة لكل دورق. تم حشو كل الدوارق بشكل معقّم وغلقها مباشرةً باستخدام السدادات المطاطية وأغطية مواجهة من alumino.

ظروف التخزين storage conditions

تم تخزين العينات المحتوية على rFSH ٦٠٠ وحدة دولية/ مل و علاج إرضائي لمدة ٦-١٨ شهر عند ٥ ± ٣ درجة مئوية/ RH المحيطة. بالإضافة لذلك، تم تخزين العينات لمدة ٦- ١٨ شهر عند ظروف معجّلة، ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH. عند كل درجة حرارة تخزين، تم تخزين الدوارق في وضع مقلوب. تمت حماية كل الدوارق من الضوء.

برامج الثبات

تم توضيح برامج الثبات لـ rFSH ٦٠٠ وحدة دولية/ مل و علاج إرضائي في الجدول ١٩ التالي.

الجدول ١٩: برنامج الثبات لصياغة rFSH سائلة ٦٠٠ وحدة دولية/ مل و علاج إرضائي، مخزنة في وضع مقلوب

ظروف التخزين	زمن التخزين (بالشهور)					
	٠	١	٣	٦	١٢*	١٨*
٥ ± ٣ درجة مئوية/ RH المحيطة	X	-	-	X	X	X
٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH	X	X	X	X	X	X

– لم يتم إدراج اختبار وفقاً لبرنامج الثبات * تم اختبارها فقط لتحديد بعض الصياغات

طرق التحليل

تم وصف الطريقة التحليلية المستخدمة في تلك الدراسة فيما يلي. عند كل حالة اختبار، سوف يتم تحليل دورقين من rFSH و دورق واحد من علاج إرضائي مقابل لكل صياغة.

صور وزن جزيئي منخفض low molecular weight (LMW)

تم تحديد صور LMW من rFSH بواسطة LC–UV باستخدام تصفية متساوية التأثير على عمود استبعاد الحجم size exclusion (SEC) . تم إجراء التحليل باستخدام عمود على أساس سيليكا باستخدام محلول TRIS منظّم في صورة طور متحرك وتحديد UV. بلغت صور LMW من rFSH قمم التصفية بوزن جزيئي أقل (بعد) عنه للقمة الأساسية لـ rFSH. تم تحديد صور LMW كنسبة مساحة قمة من مساحة القمة الإجمالية.

بالنسبة للعينات المحتوية على مادة حافظة preservative ، تمت إزالة مادة الحافظة من محلول العينة قبل دخول عمود استبعاد الحجم.

النتائج والمناقشة

تفكك rFSH أثناء التخزين

بما أن rFSH يفقد نشاطه الحيوي أثناء تفكك المونومرات المقترنة غير التساهمية، تم توفير طريقة مباشرة لتتبع الفقد في نشاط rFSH بسبب تفكك المونومر لقياس كمية صورة rFSG LMW في المحلول. يمكن استخراج تلك المعلومات من كروماتوجراف SEC، حيث تكون قمة صور LMW المصفاة بعد قمة rFSH الأساسية معروفة بتكونها من rFSH المفككة.

الجدول ٢٠: كمية rFSH النسبية لصور LMW (٪) كما هي محددة بواسطة SEC بعد التخزين عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH. تم إدراء الوصف الكامل لكل الصياغات في الجدول ١٧.

المادة المثبّتة	مادة حافظة preservative	زمن التخزين (بالشهور)					
		٠	١	٣	٦	١٢	١٨
١٥ مجم/ مل Na2SO4	–	١.٥	٢.٥	١.٧	٢.٤	٣.٠	٢.٧
١٤ مجم/ مل Na2SO4	٥ مجم/ مل phenol	١.٧	٣.٥	٣.١	٣.٩	٦.٥	٦.٠
٧ مجم/ مل NaCl	٥ مجم/ مل phenol	١.٨	١.٧	٣.١	٣.١	٤.٤	.N.P
٧٥ مجم/ مل Sucrose	٥ مجم/ مل phenol	١.٩	٦.٢	٧.٣	١٠.١	.N.P	.N.P
–	٥ مجم/ مل phenol	٢.٠	٧.٧	١٦.٩	٢٣.٤	٣٢.٢	.N.P

N.P. لم يتم إجراءه.

الجدول ٢١: كمية rFSH النسبية لصور LMW (٪) كما هي محددة بواسطة SEC بعد التخزين عند ٥ ± ٣ درجة مئوية/ RH المحيطة. تم إدراء الوصف الكامل لكل الصياغات في الجدول ١٧.

المادة المثبّتة	مادة حافظة preservative	زمن التخزين (بالشهور)			
		٠	٦	١٢	١٨
١٥ مجم/ مل Na2SO4	–	١.٥	١.٥	١.٠	٠.٨
١٤ مجم/ مل	٥ مجم/ مل phenol	١.٧	٢.٠	١.٦	١.٣

Na2SO4					
٧ مجم/ مل NaCl	٥ مجم/ مل phenol	١.٨	١.١	١.٣	.N.P
٧٥ مجم/ مل Sucrose	٥ مجم/ مل phenol	١.٩	١.٩	.N.P	.N.P
-	٥ مجم/ مل phenol	٢.٠	١.١	١.٧	.N.P

N.P. لم يتم إجراءه.

كما يمكن رؤيته في الجدول ٢٠، يعرض محلول rFSH محضّر حديثاً يحتوي على مادة مثبّتة مختلفة، مع و بدون إضافة مادة حافظة preservative كمية مماثلة نسبياً من rFSH منفصلة (صور LMW). بما أن حد المعايرة لطريقة SEC هو ٣٪ لا يمكن إجراء اختلافات غير متداخلة بين الصياغات أدنى ذلك الحد، بمعنى أن الاختلافات الملاحظة في صور LMW عند النقطة الزمنية الأولية تكون ضمن حدود اختلاف الطريقة.

بالفعل بعد شهر من التخزين عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH، تمت زيادة الكمية النسبية من rFSH المنفصلة من العينات المحتوية على phenol سوياً مع sucrose أو بدون المادة المثبّتة، حيث لا تعرض العينات المحتوية على sodium sulphate أو sodium chloride أي زيادة ملحوظة في rFSH المنفصلة (أنظر الجدول ٢٠).

بعد التخزين لمدة ستة شهور عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH، تحتوي عينة rFSH المحتوية على phenol بدون إضافة المادة المثبّتة على أكثر من ٢٠٪ rFSH المنفصلة (صور LMW). تحتوي عينات rFSH المحتوية على phenol على sucrose في صورة مادة مثبّتة تعرض أيضاً زيادة ملحوظة من rFSH المنفصلة (أكثر من ١٠٪ rFSH المفككة)، حيث تعرض العينات المحتوية على phenol مثبّتة مع أي من sodium chloride أو sodium sulphate فقط زيادة لحظية في rFSH المنفصلة (أنظر الجدول ٢٠). تكون العينات غير المحتوية على أي مادة حافظة preservative أكثر ملائمة نحو التفكك أثناء التخزين؛ مع ذلك، لصياغة مائية

متعددة الجرعة تستهدف للاستخدام بالحقن، يتطلب ذلك إضافة مادة حافظة preservative ، لذلك تمت إضافة الصياغة منفردة كعينة مقارنة.

بعد التخزين لمدة ستة شهور عند ٥ ± ٣ درجة مئوية/ RH المحيطة، لا تكشف أي من صياغات rFSH المختبرة زيادة في الكمية النسبية من rFSH المنفصلة (أنظر الجدول ٢١). ومع ذلك، يكون المطلوب على الأقل ٢٤ شهر من التخزين عند ٥ درجة مئوية و يصاحبه شهر واحد، على نحو مفضل ٣-٤ شهور من التخزين عند درجة حرارة الغرفة، لمنتج تجاري من rFSH ليكون ناجحاً.

درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH، تتغير في تركيب ثانوي و درجة من التفكك بما أن هدف ذلك المثال هو تحديد العلاقة بين بيانات دراسة الاستقرار في الوقت الفعلي، تحديدات درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH بواسطة DSC و بيانات التركيب الثانوي لـ rFSH المحددة بواسطة مطياف CD، تم عرض جزء من بيانات DSC (أنظر المثال رقم ٢) و جزء من بيانات CD (أنظر المثال رقم ١) فيما يلي.

تم إعطاء كل تفاصيل نتائج DSC المعروضة في المثال رقم ٢ و إعطاء تفاصيل بيانات CD في المثال رقم ١.

الجدول ٢٢: كمية rFSH النسبية (٪) لصور LMW كما هي محدد بواسطة SEC بعد ٦ شهور من التخزين عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH و درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH، Tm، كما هي محدد بواسطة DSC.

في دراسة DSC يتم حفظ تركيز المواد المثبّتة عند ٠.١ مولار لكل المحاليل المختبرة بالمقارنة بالكمية المستخدمة في دراسة الاستقرار في الوقت الفعلي المعطاة في الجدول.

المادة المثبّتة	مادة حافظة preservative	SEC، LMW ٦ شهور at ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH	DSC Tm
١٥ مجم/ مل	–	٢.٣	٧٨.٠ درجة مئوية

Na2SO4			
١٤ مجم/ مل Na2SO4	٥ مجم/ مل phenol	٣.٩	٧٥.١ درجة مئوية
٧ مجم/ مل NaCl	٥ مجم/ مل phenol	٣.١	٧٤.٧ درجة مئوية
٧٥ مجم/ مل Sucrose	٥ مجم/ مل phenol	١٠.١	-
-	٥ مجم/ مل phenol	٢٣.٤	٧٠.٢ درجة مئوية

كما يمكن رؤيته في الجدول ٢٢، تم عرض درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH الناتجة بواسطة DSC ترتبط جيداً مع بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي بعد التخزين لمدة ستة شهور عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH، ارتباطات متشابهة بين DSC و الاستقرار في الوقت الفعلي كما هو محلل بواسطة SEC مسبقاً للأجسام المضادة المأشوبة recombinant antibodies و جليكو بروتينات المأشوبة recombinant glycoproteins (أنظر على سبيل المثال

Burton et al (2007), Pharm. Dev. Technol. 12:265-273 and Remmele et al (1998), Pharm. Res. 15:200-208.

تعرض محلول rFSH بدون إضافة مادة حافظة preservative مثبّتة باستخدام sodium sulphate فقط درجة منخفضة من rFSH المنفصلة بعد التخزين لمدة ست ساعات، تعرض أيضاً ارتفاع كبير في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية عن المحاليل المحتوية على مادة حافظة preservative . يمكن أيضاً رؤية أنه للمحاليل المحتوية على مادة حافظة preservative (phenol) بإضافة ملح، سواء sodium chloride أو sodium sulphate ، ينتج درجة منخفضة بشكل كبير من rFSH المنفصلة بعد التخزين لمدة ستة شهور، عن المحاليل المحتوية

على sucrose أو بدون المادة المثبّتة. تكون درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH بدون إضافة المادة المثبّتة منخفض أيضاً بشكل كبير عن rFSH Tm للمحاليل المحتوية على ملح. لم يتم تحديد درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لمحاليل rFSH المحتوية على sucrose بإضافة phenol، مع ذلك، كما يمكن رؤيته في الجدول ٢٣، تعرض قياسات rFSH Tm للمحاليل بدون إضافة مادة حافظة preservative ، نفس الميل مثل بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي بعد التخزين لمدة ستة شهور عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH (أنظر الجدول ٢٢). في الاستنتاج، تكون NaCl و Na2SO4 عبارة عن مثبتات أفضل بشكل كبير عن sucrose تجاه تفكك التركيب. يتم توضيح ذلك بواسطة كلاً من قياسات Tm (أنظر الجدول ٢٣) و بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي (أنظر الجدول ٢٢).

الجدول ٢٣: درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH، Tm، للمحاليل بدون إضافة مواد حافظة preservatives محددة بواسطة DSC؛ لتفاصيل أكثر أنظر المثال رقم ٢.

المادة المثبّتة	Tm ،DSC
٠.١ مولار Na2SO4	٧٨.٠ درجة مئوية
٠.١ مولار NaCl	٧٧.٧ درجة مئوية
٠.١ مولار Sucrose	٧٣.٣ درجة مئوية

الجدول ٢٤: التغيّر في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية، ΔTm لعينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/ مل rFSH، ٠.٥ مجم/ مل L-methionine ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥ عند إضافة مادة حافظة preservative أو ملح كما هي مدرجة في الجدول. معدل الفحص Scan rate ٢ درجة مئوية/ الدقيقة. ΔTm=Tm(مادة حافظة preservative /ملح)Tm -(بدون إضافة)

مادة حافظة preservative	ملح	ΔTm
١٥ مجم/ مل benzyl alcohol	بدون ملح	-٤.٧ درجة مئوية

١٥ مجم/ مل benzyl alcohol	٠.١ مولار Na2SO4	-١.٦ درجة مئوية
No مادة حافظة preservative	٠.١ مولار Na2SO4	+٤.١ درجة مئوية
No مادة حافظة preservative	بدون ملح	٠ درجة مئوية

لم يتم تحديد أي بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي للمحاليل المحتوية على benzyl alcohol كمادة حافظة preservative ، مع ذلك، عند مقارنة درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH كما هي محددة بواسطة DSC و التتغير في التركيب الثانوي لـ rFSH أثناء التسخين كما هو محدد باستخدام مطياف CD، تمت ملاحظة نفس الاتجاه (أنظر الجدول ٢٤). تم تحديد التركيب الثانوي لـ rFSH بالنسبة لعينات البروتين المختلفة؛ يمكن اعتبار التركيب الثانوي المحدد عند ٢٤ درجة مئوية بوصفه التركيب الأساسي، و هنا لا يمكن ملاحظة أي اختلافات في التركيب الثانوي لـ rFSH لمحاليل rFSH أثناء إضافة إما benzyl alcohol (عند ٠.١٧ مجم / مل) أو sodium sulphate . برغم ذلك، عند تسخين المحاليل إلى ٧٦.٥ درجة مئوية، يختلف الانخفاض الملحوظ في التركيب الثانوي لـ rFSH مع إضافة السواغات. تعطي إضافة مادة حافظة preservative (benzyl alcohol) زيادة إلى فقد أكبر من التركيب الثانوي لـ rFSH عنه لمحاليل rFSH غير المحتوية على أي مادة حافظة preservative ، بينما إضافة ملح (sodium sulphate) تنتج انخفض مشابه في التركيب الثانوي لـ rFSH عنه لمحاليل rFSH بدون إضافة ملح. يمكن تفسير الفقد في ترتيب التركيب الثانوي لـ rFSH كتغير في الخواص الطبيعية جزئياً أو كلياً للبروتين.

المثال رقم ٤ – بيانات مقياس سعرات بفحص الانحراف Differential Scanning Calorimetry (DSC) لـ hCG

يكون موجّه الغدة التناسلية المشيمي للإنسان Human Chorionic Gonadotropin (hCG) عبارة عن بروتين ديمير غير متجانس heterodimer يتكون من مونومرين جليكوسيلية glycosylated monomers : وحدة فرعية – α من ٩٢ amino acid حث تكون شائعة لـ

hCG، هورمون المنبه للجريب Follicle Stimulating Hormone (FSH) ، هورمون ليتويني Luteinizing Hormone (LH) و هورمون تحفيز الغدة الدرقية thyroid stimulating hormone (TSH) ، و وحدة فرعية- ß من ١٤٥ amino acid حيث تكون مخصصة لـ hCG. هورمونات جليكوبروتين، تتضمن FSH و hCG، كلها تفقد نشاطها الحيوي أثناء تفكك المونومرات المقترنة غير التساهمية. أشارت نتائج من تحاليل الثبات إلى أن عدم ثبات FSH المأشوبة recombinant FSH يعتمد بشكل أساسي على تفكك الديمير (تركيب رباعي التفكك، و زيادة مصاحبة استجابة الارتباط المناعي immunobinding response).

يكون هدف ذلك المثال هو تحديد ما إذا كان الاعتماد الملاحظ مسبقاً لعدد من المواد السكرية وأملاح على درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH، كما هو محدد بواسطة DSC، و كما هو موصوف في الأمثلة ١ – ٣ أعلاه، والملاحظ أيضاً لبروتين hCG مشابه جداً. على نحو إضافي، تمت مقارنة درجة حرارة تغير خواص DSC الطبيعية لـ hCG المحددة في تلك الدراسة مع بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي المنشورة سابقاً (Samaritani, F. 1995, hCG liquid formulations. EP 0 814, 841).

تمت دراسة درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ hCG في وجود و غياب ٠.١ مولار من أملاح أو sucrose مختلفة في ١ ملي مولار من محلول فوسفات منظّم المحتوية على ٠.٥ مجم/ مل L-METHIONINE و ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠. تم فحص أربع كميات مختلفة من سكر و أملاح؛ Sucrose ، sodium sulphate ، sodium chloride و sodium perchlorate البولية المشتقة من موجّه الغدة التناسلية المشيمي للإنسان (hCG)

تم استخدام hCG، مادة عقار، الدفعة رقم ٢٨٢٣٢٨٧٥١٠ (٧٠٥٩ وحدة دولية/ مجم) كما تمت تنقيتها من بول إنسان من Massone S.A., Argentina. تم تخزين المادة باردة عند ٢-٨ درجة مئوية.

تم إجراء تحديد النشاط الحيوي لدفعة hCG السابقة وفقاً لـ Ph.Eur.

تم استخدام rFSH و المواد الأخرى كما هو موصوف في الأمثلة ٢-٣.

الجدول ٢٥: قائمة السواغات

الاسم	المورّد
Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate, Ph. Eur.	Merck
Phosphoric acid 85%, Ph .Eur.	Merck
L-methionine, Ph. Eur.	Sigma
Polysorbate (Tween) 20 Ph. Eur.	Merck
Sucrose, Ph. Eur.	Merck
Sodium sulphate × 10 H2O, Ph. Eur.	Merck
Sodium chloride, Ph.Eur.	Merck
Sodium perchlorate × H2O, p.a.	Merck
Milli-Q water	ميلي بور

تم إدراج تركيبة صياغات hCG المختلفة في الجدول ٢٦.

الجدول ٢٦: تركيبة صياغات hCG

hCG	محلول منظم	مادة خافضة للتوتر السطحي	مضاد التأكسد	سكر /ملح
٥ مجم / مل *	١ ملي مولار فوسفات رقم هيدروجيني ٦.٥	٠.٠٠٥ مجم/ مل ٢٠ polysorbate	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	٠.١ مولار Na2SO4
٥ مجم / مل *	١ ملي مولار فوسفات رقم هيدروجيني ٦.٥	٠.٠٠٥ مجم/ مل ٢٠ polysorbate	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	٠.١ مولار NaCl

٥ مجم / مل *	١ ملي مولار فوسفات رقم هيدروجيني ٦.٥	٠.٠٠٥ مجم/ مل ٢٠ polysorbate	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	٠.١ مولار NaClO4
٥ مجم / مل *	١ ملي مولار فوسفات رقم هيدروجيني ٦.٥	٠.٠٠٥ مجم/ مل ٢٠ polysorbate	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	٠.١ مولار Sucrose
٥ مجم / مل *	١ ملي مولار فوسفات رقم هيدروجيني ٦.٥	٠.٠٠٥ مجم/ مل ٢٠ polysorbate	٠.٥ مجم/ مل L-methionine	-

* تقابل ٣٥ ٣٠٠ وحدة دولية/ مل لتلك الدفعة.

إجراء التصنيع

تم تصنيع كل المحاليل (الجدول ٢٦) بتدرج معملي عند Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhagen, Denmark.

٥ تحضير صياغات hCG

تم تحضير محاليل مخزون من كل السواغات excipients في ماء Milli-Q. تم تحضير محاليل علاج إرضائي باستخدام السواغات excipients المختلفة من محلول المخزون. تمت إذابة مادة عقار hCG في محاليل العلاج الإرضائي للحصول على التركيزات المعطاة في الجدول ٢٦. بما أن بيانات الثبات لتلك الصياغات لا تكون متاحة، عادةً ما يتم إجراء تحاليل DSC على عينات ١٠ حديثة التحضير؛ خلال ساعة من تحضير العينة.

كما يمكن رؤيته في الشكل ٤ و الجدول ٢٧، درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية، Tm، لـ hCG أقل من Tm بالنسبة لـ rFSH. على نحو إضافي، يكون المحتوى الحراري في وحدة كتلة لعملية تغيير الخواص الطبيعية (أي، حجم قمة تغيير الخواص الطبيعية) أصغر بشكل ملحوظ لـ hCG

عنه لـ rFSH. وعلى النقيض بالنسبة لـ rFSH حيث تكون عملية تغيير الخواص الطبيعية في الأغلب غير قابلة للعكس بشكل كامل بعد تسخين عينات rFSH إلى ١٠٠ درجة مئوية، تكون عملية تغيير الخواص الطبيعية بعد تسخين hCG إلى ١٠٠ درجة مئوية، على مدى طويل، قابلة للعكس (٢).

$$Native \leftrightarrow Unfolded \rightarrow Irreversibly\ Denatured \qquad (٢)$$

يكون شرح حقيقة أن عملية تغيير الخواص الطبيعية لـ hCG، على نطاق كبير، قابلاً للعكس في النطاق الزمني لقياسات DSC، بينما لا يكون من الحقيق لـ rFSH، يمكن أن تكون –إذا كانت وحدتين فرعيتين في hCG– أقل عرضة لتفكك عنها في rFSH. إذا كانت الوحدات الفرعية مفككة أثناء تسخين عينات hCG يمكن أن التركيب المحلي أسهل في إعادة التركيب مرة أخرى أثناء التبريد إلى درجة حرارة الغرفة. يكون مقدار ΔH للتحوّل أثناء التسخين إلى ١٠٠ درجة مئوية أكبر بشكل كبير لـ rFSH عن hCG، بينما يكون مقدار ΔH للتحوّل في فحص حالة مصاحبة (أي، تسخين العينة إلى ١٠٠ درجة مئوية، تبريد إلى ٢٥ درجة مئوية و إجراء فحص ثاني إلى ١٠٠ درجة مئوية) في نفس نطاق حجم rFSH و hCG.

تأثير إضافة سكر أو ملح على hCG و rFSH TM

يكون من المتوقع أن تؤثّر إضافة ملح إلى محاليل بروتين مائية على ثبات البروتين في المحلول وبالتالي تؤثّر على درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية للبروتين.

عند قياس التأثيرات المختلفة لأملاح sodium على hCG و rFSH Tm على نحو غير متوقّع تماماً، لا يكون تأثير التثبيت / عدم التثبيت المتوقّع وفقاً لسلسلة هوميستير Hofmeister series ملاحظاً عند تغيير anions ، أنظر الشكل ٥، الشكل ٦ و الجدول ٢٧. بالنسبة لـ hCG يكون كلاً من sodium sulphate و sodium chloride فعلياً غير مثبّت للبروتين، بينما بالنسبة لـ rFSH تقوم تلك الأملاح بتثبيت البروتين. بالنسبة لكلاً من hCG و rFSH تزيد sodium perchlorate ، من المتوقع أن تكون لها تأثير غير مثبّت على البروتينات بشكل فعلي، من Tm لأكثر من كل المواد السكرية والأملاح المختبرة.

الجدول ٢٧: درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية، Tm، و التغيّر في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية، ΔTm (سكر /ملح)، لعينات hCG المحتوية على ٥ مجم/ مل hCG، ٠.٥ مجم/ مل L-METHIONINE ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥ أثناء إضافة ٠.١ مولار سكر أو ملح و ٥ عينات rFSH المحتوية على ٢.٤ مجم/ مل rFSH، ٠.٥ مجم/ مل L-METHIONINE ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥ أثناء إضافة ٠.١ مولار سكر أو ملح. ΔTm (سكر /ملح)=Tm(سكر /ملح) - Tm (سكر /ملح).

سكر /ملح	hCG		rFSH	
	Tm	ΔTm	Tm	ΔTm
بدون سكر أو ملح	٧٢.١ درجة مئوية	-	٧٢.٩ درجة مئوية	-
Na2SO4	٦٩.٨ درجة مئوية	-٢.٣ درجة مئوية	٧٨.٠ درجة مئوية	٥.١ درجة مئوية
NaCl	٦٩.٣ درجة مئوية	-٢.٧ درجة مئوية	٧٧.٧ درجة مئوية	٤.٨ درجة مئوية
NaClO4	٧٥.٠ درجة مئوية	٢.٩ درجة مئوية	٨٠.٩ درجة مئوية	٨.٠ درجة مئوية
Sucrose	٧٢.٤ درجة مئوية	٠.٣ درجة مئوية	٧٣.٣ درجة مئوية	٠.٤ درجة مئوية

تأثير إضافة سكر أو ملح على نقاء HCG و RFSH

تفكك نقاء الوحدات الفرعية rFSH، rFSH أثناء التخزين بما أن rFSH يفقد نشاطه الحيوي أثناء تفكك المونومرات المقترنة غير التساهمية، تم تقديم طريق مباشرة لتتبع فقد نشاط rFSH بسبب تفكك المونومر لقياس كمية تكوينات rFSH LMW في المحلول. يمكن استرجاع ذلك التكوين من كروماتوجراف SEC، حيث يتم تصفية تكوينات LMW بعد اعتبار القمة الرئيسية لـ rFSH ناشئة من rFSH المتفكك. في التكوين محل الدراسة، لم يتم ملاحظة أي مركبات أخرى متعلقة بالبروتين، مثل تجمّعات rFSH. وبالتالي، يمكن احتساب نقاء بروتين rFSH بـ

$$Purity(\%) = 100\% - LMW\ forms(\%) \quad (٤)$$

الجدول ٢٨: نقاء rFSH (٪) كما هو محدد بواسطة SEC بعد التخزين عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH.

سكر /ملح	مادة حافظة preservative	زمن التخزين (بالشهور)				
		٠	١	٣	٦	١٢
١٥ مجم/ مل Na2SO4	–	٪٩٨.٥	٪٩٧.٥	٪٩٨.٣	٪٩٧.٧	٪٩٧.٠
١٤ مجم/ مل Na2SO4	٥ مجم/ مل phenol	٪٩٨.٣	٪٩٦.٥	٪٩٦.٩	٪٩٦.١	٪٩٣.٥
٧ مجم/ مل NaCl	٥ مجم/ مل phenol	٪٩٨.٢	٪٩٨.٣	٪٩٦.٩	٪٩٦.٩	٪٩٥.٦
٧٥ مجم/ مل Sucrose	٥ مجم/ مل phenol	٪٩٨.١	٪٩٣.٨	٪٩٢.٧	٪٨٩.٩	–
–	٥ مجم/ مل phenol	٪٩٨.٠	٪٩٢.٣	٪٨٣.١	٪٧٦.٦	٪٦٧.٨

كما يمكن رؤيته في الجدول ٢٨، تكشف المحاليل المحضّرة حديثاً rFSH المحتوية على سكر أو أملاح مختلفة، مع و بدون إضافة مادة حافظة preservative نقاء مماثل، وعليه، تكون الكميات النسبية المماثلة من rFSH منفصلة (صور LMW).

بالفعل بعد تخزين لمدة شهر واحد عند ٣٠ درجة مئوية، ينخفض نقاء rFSH للعينات المحتوية على phenol سوياً مع sucrose أو بدون سكر أو ملح، حيث لا تعرض العينات المحتوية على phenol و sodium sulphate أو sodium chloride سوياً مع العينات بدون إضافة phenol أي انخفاض كبير في نقاء rFSH (أنظر الجدول ٢٨). بعد التخزين لمدة ستة شهور عند ٣٠ درجة مئوية، أنتجت عينات rFSH المحتوية على phenol بدون إضافة سكر أو ملح نقاء rFSH أقل من ٨٠٪. تعرض عينات rFSH المحتوية على phenol بها sucrose كمادة مثبّتة أيضاً انخفاض ملحوظ في نقاء rFSH، حيث تعرض العينات المحتوية على phenol المثبّتة إما لـ sodium chloride أو لـ sodium sulphate فقط انخفاض لحظي في نقاء rFSH (أنظر الجدول ٢٨). تكون العينات غير المحتوية على أي مادة حافظة preservative هي الأكثر ملائمة للتفكك أثناء التخزين، أي، تعرض أعلى نقاء، على الرغم من، بالنسبة لصياغة مائية متعددة الجرعة مستهدفة للاستخدام بالحقن، ضرورة إضافة مادة حافظة preservative .

نقاء hCG أثناء التخزين

تم استخدام البيانات المنشورة مسبقاً للتتغير في نقاء hCG أثناء تخزين بالمقارنة ببيانات ثبات rFSH الموضحة أعلاه (Samaritani, supra).

بالفعل بعد تخزين لمدة شهر واحد عند ٥٠ درجة مئوية، ينخفض نقاء hCG بشكل ملحوظ. يكون الانخفاض أعلى بكثير للعينات المحتوية على sodium chloride عن العينات المحتوية على sucrose (أنظر الجدول ٢٩). بعد التخزين لستة أسابيع عند ٥٠ درجة مئوية، يكون hCG للعينات المحتوية على sodium chloride أكثر من ١٠٪ أقل من العينات المحتوية على Sucrose الجدول ٢٩: نقاء hCG (٪) كما هو محدد بواسطة SEC بعد التخزين عند ٥٠ درجة مئوية. تم إدراك الوصف الكامل للصياغات في الصفحة ١١ في براءة الاختراع EP 0814841.

سكر /ملح	مادة حافظة preservative	زمن الختزين (بالأسابيع)			
		٠	١	٢	٦
٧ مجم/ مل NaCl	٥ مجم/ مل phenol	٪١٠٠	٪٨٩.٧	٪٨٥.٦	٪٧١.٧
٧٥ مجم/ مل Sucrose	٥ مجم/ مل phenol	٪١٠٠	٪٩٤.١	٪٩٠.٣	٪٨٣.٠

مقارنة Tm و نقاء hCG و rFSH

كما يمكن رؤيته في الجدول ٣٠، تنتج درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لكلاً من rFSH و hCG بواسطة ارتباطات DSC جيداً مع نقاء rFSH و hCG كما هو ناتج من بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي. تم عرض الارتباطات المتشابهة بين DSC و الاستقرار في الوقت الفعلي كما هو محلل بواسطة SEC مسبقاً للأجسام المضادة المأشوبة recombinant antibodies و جليكو بروتينات المأشوبة recombinant glycoproteins .

تم تحديد بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي لـ rFSH عند ٣٠ درجة مئوية. بما أنه يتم استهداف منتج rFSH ليتم تبريده لمدة تخزينية طويلة، تكون ٢٥-٣٠ درجة مئوية عبارة عن نطاق مناسب لدراسات ثبات معجّلة. تكون بيانات الاستقرار في الوقت الفعلي لـ hCG متاحة فقط لمدة ١٢ أسبوع من التخزين عند ٥٠ درجة مئوية، ١١ أسبوع من التخزين عند ٢٥ درجة مئوية و ٤٠ درجة مئوية و ٦ أسابيع من التخزين عند ٥٠ درجة مئوية. بالنسبة لدرجات حرارة ٤٠ درجة مئوية أو أقل، الانخفاض في نقاء hCG أقل من ٦٪ أثناء تخزين كلا الصياغتين مع sucrose و sodium chloride و بالتالي يكون من الصعب التفرقة بين تأثير مواد سكرية وأملاح مختلفة بالفعل بعد ١١-١٢ أسبوع من التخزين. فقط عند ٥٠ درجة مئوية، يمكن التفرقة بين الصياغات المختلفة بشكل واضح، إن كان الاتجاه الملاحظ عند درجات حرارة منخفض مشابهاً له عند ٥٠ درجة مئوية.

الجدول ٣٠: النقاء كما هو محدد بواسطة SEC و درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية كما هي محددة بـ DSC لـ hCG و rFSH. تم تحديد النقاء لـ hCG بعد ٦ أسابيع من التخزين عند ٥٠ درجة مئوية و تم تحديد النقاء لـ rFSH بعد ٦ شهور من التخزين عند ٣٠ درجة مئوية.

سكر /ملح	hCG		rFSH	
	النقاء*	ΔTm**	النقاء#	ΔTm##
Na2SO4	-	-٢.٣ درجة مئوية	٩٦.١٪	٥.١ درجة مئوية
NaCl	٧١.٧٪	-٢.٧ درجة مئوية	٩٦.٩٪	٤.٨ درجة مئوية
Sucrose	٨٣.٠٪	٠.٣ درجة مئوية	٨٩.٩٪	٠.٤ درجة مئوية

* العينات المحتوية على ١٠ ٠٠٠ وحدة دولية/ مل hCG، ١٥٤ ملي مولار NaCl أو ٣٠٠ ملي مولار Sucrose ، ١٠ ملي مولار من محلول فوسفات منظّم رقم هيدروجيني ٧.

** العينات المحتوية على ٥ مجم/ مل (٣٥ ٣٠٠ وحدة دولية/ مل) hCG، ٠.١ مولار سكر أو ملح، ٠.٥ مجم/ مل L-METHIONINE ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥.

العينات المحتوية على ٦٠٠ وحدة دولية/ مل rFSH، ٤٣ ملي مولار Na2SO4 أو ١٢٠ ملي مولار NaCl أو ٢١٩ ملي مولار Sucrose ، ١.٠ مجم/ مل methionine L ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ٥ مجم/ مل phenol، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥.

العينات المحتوية على ٢.٤ مجم/ مل (٣٦ ٣٠٠ وحدة دولية/ مل) rFSH، ٠.١ مولار سكر أو ملح، ٠.٥ مجم/ مل L-methionine ، ٠.٠٠٥ مجم/ مل polysorbate ٢٠، ١ ملي مولار من محلول sodium phosphate منظم رقم هيدروجيني ٦.٥.

الاستنتاجات

أنتجت دراسات ثبات hCG و rFSH في محاليل مختلفة بواسطة درجات حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ hCG و rFSH بالإضافة إلى درجات نقاء hCG و rFSH بعد التخزين عند درجات حرارة مرتفعة أدلة لا جدال فيها بالنسبة لتأثير مواد سكرية وأملاح مختلفة على ثبات hCG و rFSH في المحلول. تعرض كلاً من التقنيتين المستخدمتين، كروماتوجراف DSC سائل و SEC، نتائج متطابقة. تم تأكيد تلك النتائج بشكل واحد بواسطة بيانات الثبات في الوقت الفعلي الحالية.

أنتجت دراسات ثبات rFSH في محاليل مختلفة بواسطة تتغير في التركيب الثانوي لـ rFSH (بواسطة مطياف CD – المثال رقم ١)، درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية لـ rFSH (تتغير في التركيب الثلاثي والرباعي بواسطة DSC – المثال رقم ٢) أو الكمية النسبية من rFSH المنفصلة المتكونة بعد التخزين عند ٣٠ ± ٢ درجة مئوية/٦٥ ± ٥٪ RH (تتغير في التركيب الرباعي بواسطة SEC – المثال رقم ٣) أدلة لا جدال فيها بالنسبة لتأثير مواد حافظة preservatives و مثبتات على ثبات rFSH في المحلول. تعرض كل التقنيات الثلاثة المستخدمة، كروماتوجراف CD، DSC و SEC نتائج متطابقة.

استنتاج نتائج كل الأمثلة ١-٣، يمكن بوضوح رؤية أن إضافة مادة حافظة preservative ، phenol أو benzyl alcohol ، يقلل من ثبات rFSH في المحلول. من المتوقّع أن يعطي phenolic الحافظ الآخر، مثل m-cresol and chlorocresol ارتفاع في نفس تأثيرات عدم الثبات. يمكن تحديد تأثير عدم الثبات الملاحظ لـ rFSH أثناء إضافة النظائر الحامية بسهولة من معرفة الفن داخل المنطقة. تؤدي إضافة معدن قلوي مقبول صيدلانياً من ملح sodium + أو potassium +- إلى تأثير عدم ثبات معادلات محاليل rFSH من مواد حافظة preservatives على rFSH و – على نحو أكثر فائدة – إلى زيادة ثبات rFSH في المحلول بالمقارنة بـ محاليل rFSH التي لا تحتوي على مادة حافظة preservative ولا ملح. تعطي كل أملاح sodium و potassium المختبرة زيادة لثبات rFSH الزائد المستقل عن anions المستخدمة؛ على سبيل المثال anions غير العضوية inorganic anions مثل الكبريتات، و الكلوريد و perchlorate وأيضاً باستخدام anions عضوية مثل citrate ، acetate و ترترات. يؤدي اختلاف Cation الأملاح إلى تأثير كبير على درجة ثبات rFSH؛ cations أحادية التكافؤ؛ بصفة خاصة تعطي الأملاح مع cations sodium أو potassium زيادة في تأثير تثبيت واضح على rFSH.

تؤدي إضافة sodium perchlorate إلى محلول rFSH إلى زيادة في محاليل rFSH الأكثر ملائمة، ومع ذلك، تكون perchlorate عالية التفاعل وعبارة عن عوامل مؤكسدة و لذلك تكون perchlorate غير مقبولة كمكونات غير فعّالة في الصياغات الصيدلانية. وبالتالي، تكون أملاح sodium أو أملاح potassium من كبريتات و كلوريد، هي العوامل المثبّتة الأكثر تفضيلاً. أدت إضافة sucrose إلى محاليل hCG أو rFSH إلى زيادة طفيفة في ثبات البروتين، كلاً من hCG و rFSH، بينما يكون لإضافة sodium chloride تأثير مزعزع للثبات على hCG و تأثير ثبات على rFSH (أنظر المثال رقم ٤). يكون لإضافة sodium perchlorate إلى محاليل hCG و rFSH تأثير مثبّت على كلاً من hCG و rFSH (المثال رقم ٤). يكون تأثير ثبات تلك الأملاح على محاليل rFSH أفضل بشكل واضح على نحو غير متوقّع عن تأثير التثبيت الملاحظة Sucrose .

كانت استنتاجات تلك النتائج كما يلي:

١) تحت الظروف محل الدراسة، لا تتبع تأثيرات الملح على ثبات hCG و rFSH سلسلة Hoffmeister.

٢) على الرغم من حقيقة أن hCG و FSH متشابهة هيكلياً (أي، أنهم ينتمون لنفس فئة البروتينات، يكون كلاهما معالج بـ glycosylated و كلاهما يتكون مع وحدتين فرعيتين من أي وحدة α متشابهة في البروتينين)، يختلف تأثير مواد سكرية وأملاح مختلفة مثل sucrose و sodium chloride على ثبات البروتين عن hCG و rFSH. على نحو غير متوقّع تماماً، بالنسبة للبروتينات المتشابهة جداً مثل hCG و rFSH، أملاح لا تعرض نفس تأثير الثبات.

٣) تعرض أملاح +Na− و −+ potassium تأثيرها المثبّت على محاليل FSH، تعتمد على anions المستخدمة.

٤) يمكن أن تواجه تأثير ثبات أملاح −+ sodium و −+ potassium على محاليل FSH تأثير عدم ثبات المواد الحافظة.

الاختصارات والتعريفات

تم استخدام الاختصارات والتعريفات التالية خلال النص والأمثلة:

ΔTm	التغيّر في درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية أثناء إضافة مادة حافظة preservative أو ملح، أنظر أيضاً Tm
ARTs	تقنيات إنتاجية مساعدة Assisted reproductive technologies
BA	benzyl alcohol
BTG	تقنية حيوية عامة
CD	إزدواج لون دائري Circular Dichroism
CHO	مبيض الهامستر الصيني Chinese hamster ovary
CoA	شهادة التحليل
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSC	مقياس سعرات بفحص الانحراف
FSD	الضعف الجنسي للإناث Female Sexual Dysfunction
FSH	هورمون المنبه للجريب Follicle Stimulating Hormone
hCG	موجّه الغدة التناسلية المشيمي للإنسان Human Chorionic Gonadotropin
IU	وحدات دولية قياس النشاط الحيوي لـ rFSH كما تم تحديده بواسطة Steelman–Pohley Bioassay وفقاً لـ Ph.Eur. و USP.
IUI	التلقيح داخل الرحم Intrauterine insemination
LC–UV	كروماتوجراف سائل باستخدام الكشف عن الأشعة فوق البنفسجية

LH	هورمون ليوتينيسي Luteinising Hormone
LMW	وزن جزيئي منخفض من، يتكون بشكل أساسي من أو فقط من بروتين مونوميري مفكك
OI	تعريف الإباضة
.p.a	تحليل مسبق
Ph. .Eur	دستور الأدوية الأوروبي
RH	رطوبة نسبية Relative Humidity
rFSH	هورمون منبه لجريب تأشبي بشري Recombinant human Follicle Stimulating Hormone
SEC	حجم الاستبعاد الكروماتوجرافي Size Exclusion Chromatography
SRCD	إشعاع السنكروترو إزدواج لون دائري Synchrotron Radiation Circular Dichroism
Tm	نقطة وسط من التحول الحراري أو نقطة التحول الوسيط أو درجة حرارة تغير الخواص الطبيعية. درجة الحرارة عندما ينطوي نصف جزيئات البروتين ويكون نصف جزيئات البروتين غير مطوياً
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TSH	هورمون تحفيز الغدة الدرقية Thyroid Stimulating Hormone
USP	دستور الأدوية بالولايات المتحدة
UV	الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet

عناصر الحماية

١- طريقة لتثبيت صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) سائلة، وتشتمل على تحضير صيغة سائلة تضم هرمون محفز للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH)، ومادة حافظة preservatives ، و sodium sulfate بكمية تعمل على تثبيت الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH).

٢- الطريقة وفق عنصر الحماية (١)، حيث يكون الهرمون المنشط للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) ناتج عن معاودة الترابط الجيني.

٣- الطريقة وفق عنصر الحماية (١)، حيث تختار المادة الحافظة على مجموعة تتكون من كحول البنزيل benzyl alcohol ، و phenol و m-cresol .

٤- الطريقة وفق عنصر الحماية (١)، حيث تشتمل الصيغة أيضاً على sodium chloride .

٥- صيغة للهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) سائلة تشتمل على:

هرمون محفز للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) بتركيز يتراوح من ٥٠ إلى ٨٠٠ وحدة دولية/ مل؛ sodium sulfate بتركيز يتراوح من ١ إلى ١٠٠ مجم/ مل؛ phenol بتركيز يتراوح من ٠.٥ إلى ٥٠ مجم/ مل؛ Polysorbate 20 بتركيز يتراوح من ٠.٠٠١ إلى ٠.٠٠٥ مجم/ مل؛ L-methionine بتركيز يتراوح من ٠.١ إلى ١٠ مجم/ مل؛ محلول sodium phosphate منظم بتركيز يتراوح من ٠.١ إلى ١٠ مل مولار ورقم هيدروجيني (pH) يتراوح من ٦ إلى ٨.

٦- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٥)، حيث يكون تركيز الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) ٦٠٠ وحدة دولية/ مل.

٧- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٥)، حيث تكون درجة الأسموزية في الصيغة ٣٠٠ مل أسمول/ كجم.

٨- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٥)، وتشتمل على:

FSH بتركيز يتراوح من ١٠٠ إلى ٦٠٠ وحدة دولية/ مل؛ sodium sulfate بتركيز ١٤ مجم/ مل؛ phenol بتركيز ٥ مجم/ مل؛ Polysorbate 20 بتركيز ٠.٠٠٥ مجم/ مل؛ L-methionine بتركيز ١ مجم/ مل؛ محلول sodium phosphate منظم بتركيز ١ مل مولار ورقم هيدروجيني (pH) ٦.٥.

٩- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٨)، حيث تكون درجة الأسموزية في الصيغة ٣٠٠ مل أسمول/ كجم.

١٠ - صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٨)، حيث يكون تركيز الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) ٦٠٠ وحدة دولية/ مل.

١١- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٨)، حيث تكون درجة الأسموزية في الصيغة ٣٠٠ مل أوسمول/ كجم.

١٢- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (٥)، حيث يتراوح تركيز الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) من ١٠٠ إلى ٦٠٠ وحدة دولية/ مل.

١٣- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) سائلة، وتشتمل على:

هرمون محفز للحويصلات (FSH) بتركيز يتراوح من ٥٠ إلى ٨٠٠ وحدة دولية/ مل؛

واحدة أو أكثر من المواد الحافظة؛ sodium sulfate بتركيز يتراوح من ١ إلى ١٠٠ مجم/ مل.

١٤ - صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (١٣)، حيث يتراوح تركيز الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) من ١٠٠ إلى ٦٠٠ وحدة دولية/ مل.

١٥ - صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (١٣)، حيث يكون تركيز الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) ٦٠٠ وحدة دولية/ مل.

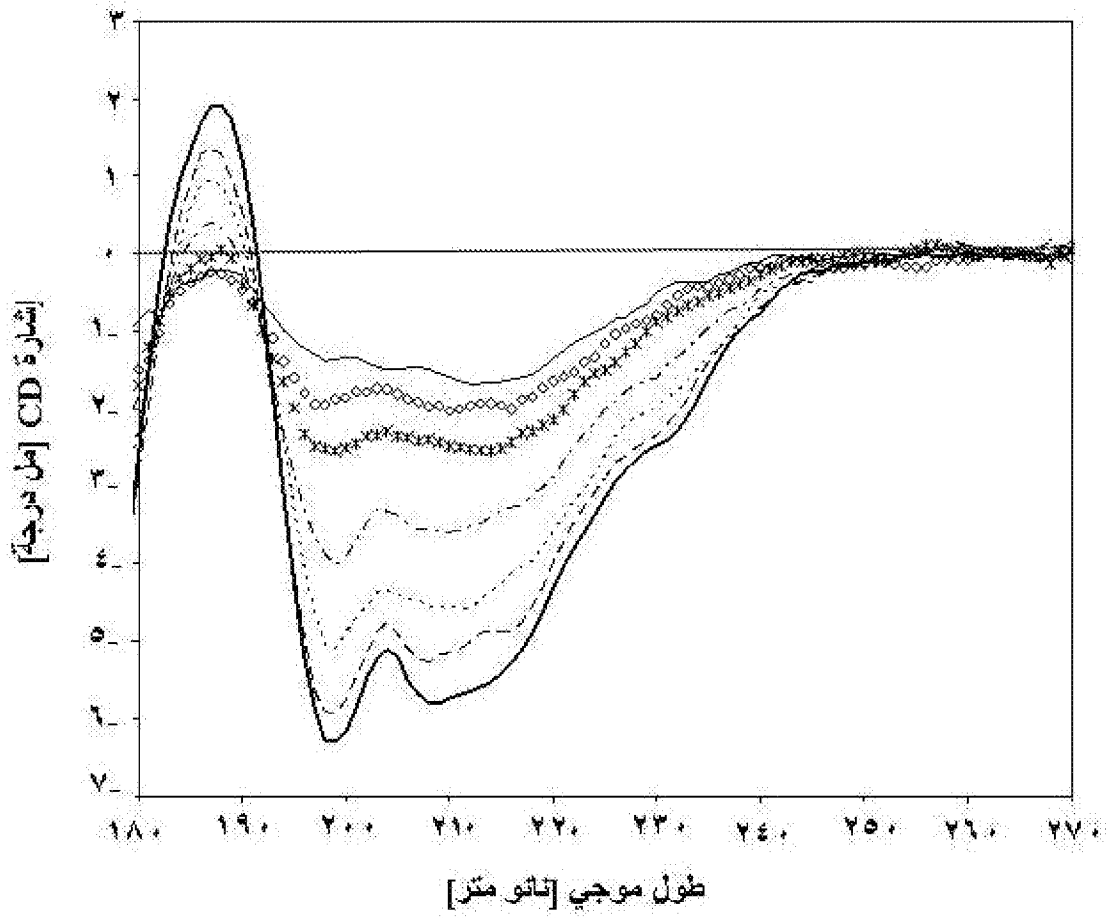
١٦- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (١٣)، وتشتمل على phenol بتركيز يتراوح من ٠.٥ إلى ٥٠ مجم/ مل.

١٧- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (١٣)، وتشتمل على محلول sodium phosphate منظم بتركيز يتراوح من ٠.١ إلى ١٠ مل مولار برقم هيدروجيني (pH) يتراوح من ٦ إلى ٨.

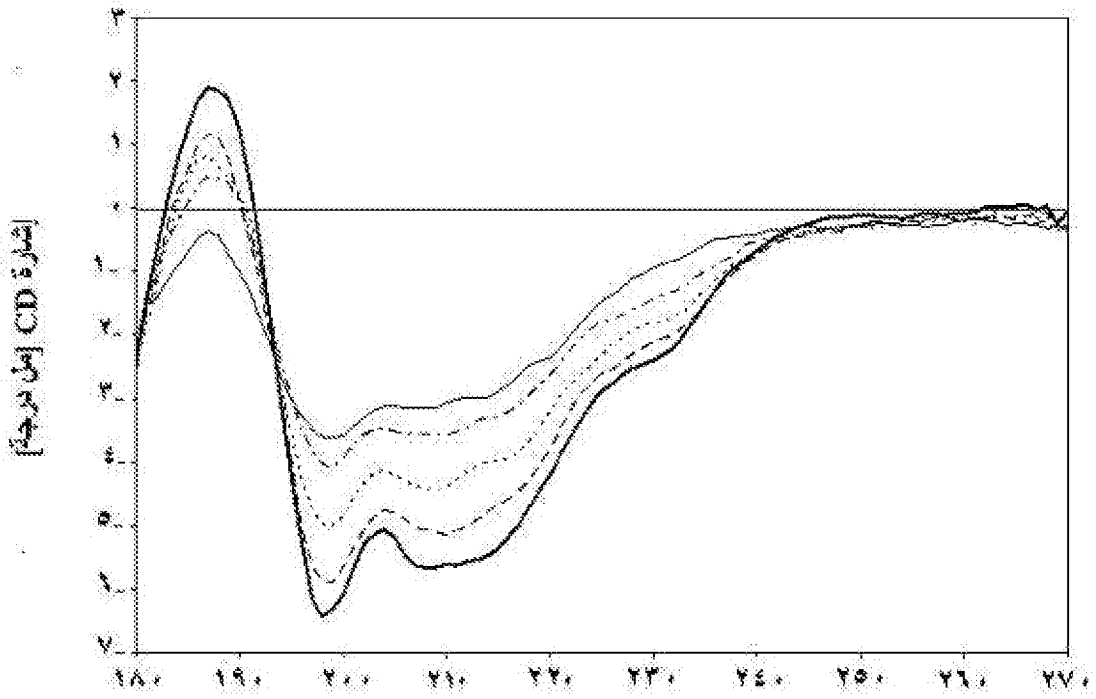
١٨- صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (١٣)، وتشتمل على:

FSH بتركيز يتراوح من ١٠٠ إلى ٦٠٠ وحدة دولية/ مل؛ sodium sulfate بتركيز يتراوح من ١ إلى ١٠٠ مجم/ مل؛ phenol بتركيز يتراوح من ٠.٥ إلى ٥٠ مجم/ مل؛ محلول sodium phosphate منظم بتركيز يتراوح من ٠.١ إلى ١٠ مل مولار، ورقم هيدروجيني (pH) يتراوح من ٦ إلى ٨.

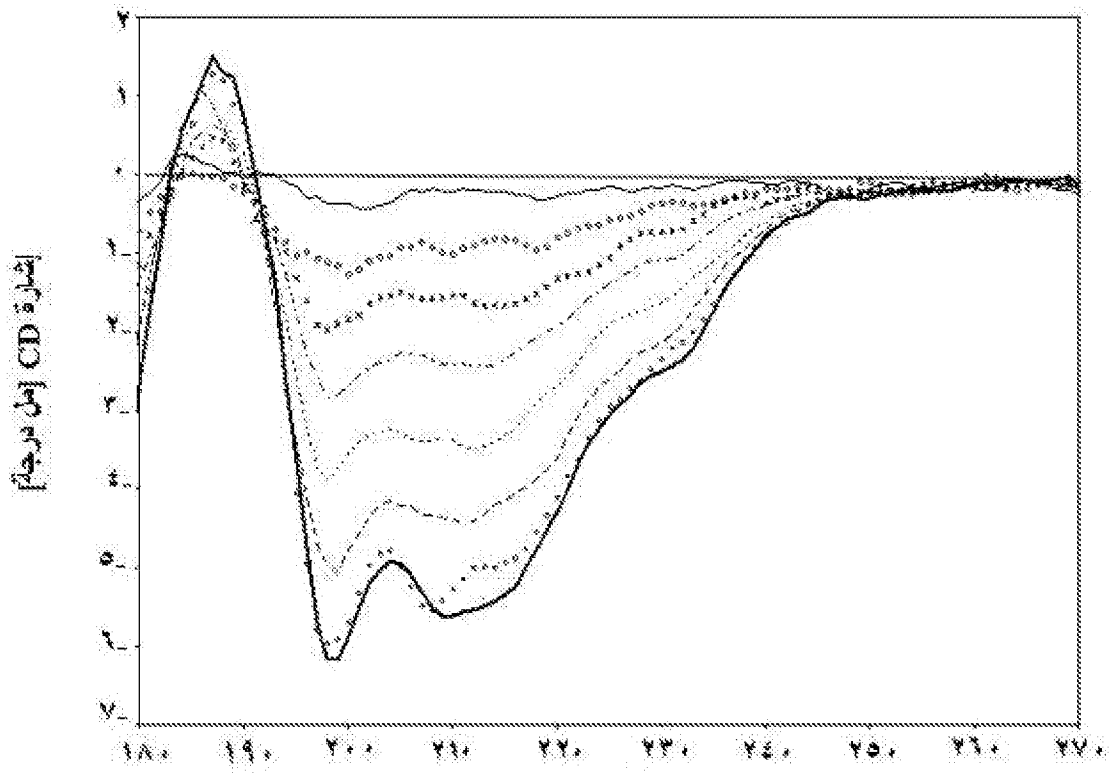
١٩ - صيغة الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) السائلة وفق عنصر الحماية (١٨)، حيث يكون تركيز الهرمونات المنشطة للحويصلات follicle stimulating hormone (FSH) ٦٠٠ وحدة دولية/ مل.


٣
٢
١
٠
١-
٢-
٣-
٤-
٥-
٦-
٧-
[إشارة CD [مل درجة
١٨٠
١٩٠
٢٠٠
٢١٠
٢٢٠
٢٣٠
٢٤٠
٢٥٠
٢٦٠
٢٧٠
طول موجي [نانو متر]

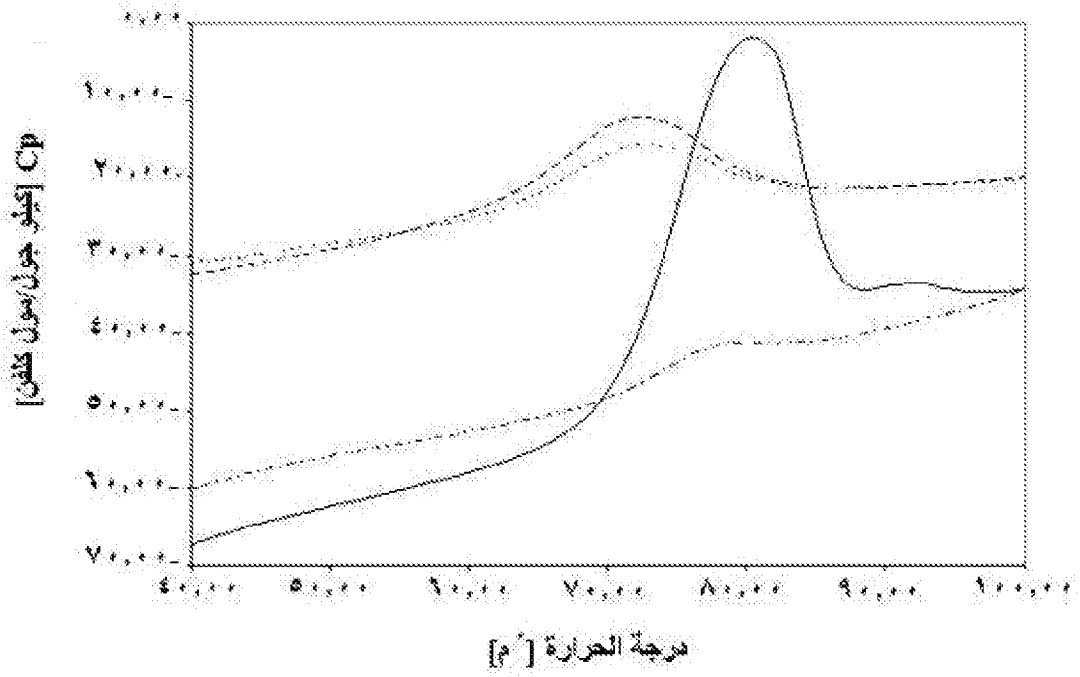
شكل ١


[إهليلجة CD [مثل درجة
٣
٢
١
٠
١-
٢-
٣-
٤-
٥-
٦-
٧-
١٨٠
١٩٠
٢٠٠
٢١٠
٢٢٠
٢٣٠
٢٤٠
٢٥٠
٢٦٠
٢٧٠
طول موجي [نانو متر]

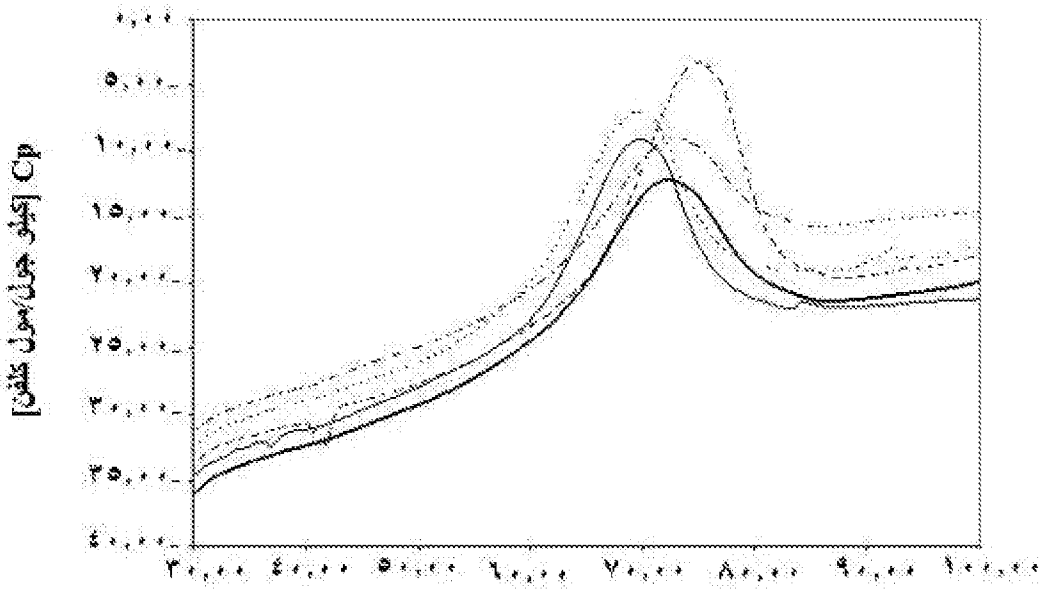
شكل ٢


إشارة CD [بال درجة]
٢
١
٠
١-
٢-
٣-
٤-
٥-
٦-
٧-
١٨٠
١٩٠
٢٠٠
٢١٠
٢٢٠
٢٣٠
٢٤٠
٢٥٠
٢٦٠
٢٧٠
طول موجي [نانو متر]

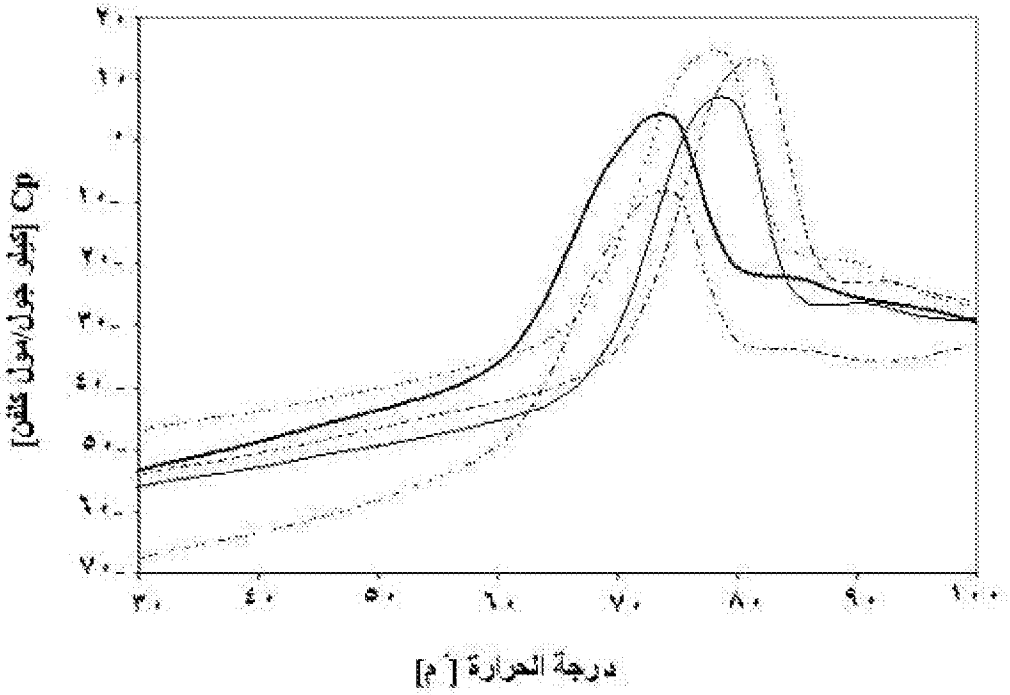
شكل ٢


Cp [كيلو جول/مول كلفن]
٠,٠٠٠
١٠,٠٠٠
٢٠,٠٠٠
٣٠,٠٠٠
٤٠,٠٠٠
٥٠,٠٠٠
٦٠,٠٠٠
٧٠,٠٠٠
٤٠,٠٠
٥٠,٠٠
٦٠,٠٠
٧٠,٠٠
٨٠,٠٠
٩٠,٠٠
١٠٠,٠٠
درجة الحرارة [°م]

شكل ٤


٠,٠٠
٥,٠٠
١٠,٠٠
١٥,٠٠
٢٠,٠٠
٢٥,٠٠
٣٠,٠٠
٣٥,٠٠
٤٠,٠٠
٣٠,٠٠ ٤٠,٠٠ ٥٠,٠٠ ٦٠,٠٠ ٧٠,٠٠ ٨٠,٠٠ ٩٠,٠٠ ١٠٠,٠٠
Cp [كيلو جول/مول كلفن]
درجة الحرارة [° م]

شكل ٥


Cp [كيلو جول/مول كلفن]
٢٠
١٠
٠
١٠-
٢٠-
٣٠-
٤٠-
٥٠-
٦٠-
٧٠-
٣٠
٤٠
٥٠
٦٠
٧٠
٨٠
٩٠
١٠٠
درجة الحرارة [م]

شكل ١

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa