



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 35 033 T2** 2008.05.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 735 896 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 35 033.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA94/00693**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 903 732.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/017207**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.12.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **29.06.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.10.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **03.10.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.05.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/29** (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

172206 **23.12.1993** **US**

(73) Patentinhaber:

NPS Allelix Corp., Toronto, Ontario, CA

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HOLTHUIS, Josephus Johannes, NL-2333 AJ
Leiden, NL; MEKKING, Albert, NL-3448 CR
Woerden, NL; VOETMAN, Alwinus Antonius,
NL-1161 DT Zwanenburg, NL**

(54) Bezeichnung: **PARATHORMONARZNEIZUSAMMENSETZUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend Parathyroidhormon. Genauer betrifft die Erfindung Parathyroidhormonformulierungen mit verbesserter Lagerungsstabilität.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Parathyroidhormon (PTH) ist ein sekretiertes Produkt von 84 Aminosäuren aus der Nebenschilddrüse der Säuger, welches die Kalziumspiegel im Serum durch seine Wirkung auf verschiedene Gewebe, einschließlich Knochen, kontrolliert. Studien in Menschen mit bestimmten Formen von PTH haben eine anabole Wirkung auf Knochen gezeigt, und haben ein signifikantes Interesse an seiner Verwendung zur Behandlung von Osteoporose und verwandten Knochenkrankheiten bewirkt.

[0003] Zum Beispiel wurde bei Verwendung der N-terminalen 34 Aminosäuren des Rinder- und humanen Hormons, die in allen publizierten Berichten als biologisch äquivalent zum Hormon voller Länge gehalten werden, in Menschen gezeigt, dass das Parathyroidhormon das Knochenwachstum steigert, insbesondere wenn es auf eine rhythmische Weise auf subkutanen und intravenösen Wegen verabreicht wird. Eine leicht unterschiedliche Form von PTH, humanes PTH (1-38), hat ähnliche Ergebnisse gezeigt. Da es erst seit kurzer Zeit erhältlich ist, wurde die rekombinante Form des humanen Hormons voller Länge, d.h. humanes PTH (1-84) noch nicht in Menschen untersucht, obwohl Studien in Ratten eine gleich wirksame und in einigen Aspekten etwas verbesserte Wirksamkeit auf Knochenwachstum anzeigen.

[0004] Die PTH-Zubereitungen, die in diesen Studien verwendet wurden, wurden aus frischem oder lyophilisiertem Hormon rekonstituiert, und schließen verschiedene Formen von Trägern, Trägerstoffen, und Vehikeln ein. Die meisten werden in auf Wasser basierenden Vehikeln zubereitet, wie Salzlösung, oder Wasser, das typischerweise mit Essigsäure angesäuert ist, um das Hormon zu lösen. Der Großteil der veröffentlichten Formulierungen schließt auch Albumin als Träger ein (siehe z. B. Reeve et al., Br. Med. J., 1980, 280:6228; Reeve et al., Lancet, 1976, 1:1035; Reeve et al., Calcif. Tissue Res., 1976, 21:469; Hodsmann et al., Bone Miner, 1990, 9(2):137; Tsai et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1989, 69(5):1024; Isaac et al., Horm. Metab. Res., 1980, 12(9):487; Law et al., J. Clin. Invest., 1983, 72(3):1106; und Hulter, J. Clin. Hypertens., 1986, 2(4):360). Andere veröffentlichte Formulierungen schlossen einen Trägerstoff wie Mannitol ein, das entweder mit dem lyophilisierten Hormon oder im Vehikel zur Rekonstitution vorhanden ist. Formulierung-

gen, die diese widerspiegeln, die für menschliche Studien verwendet wurden, schließen eine Zubereitung von humanem PTH (1-34), bestehend nach der Rekonstitution aus Mannitol, hitzeinaktiviertem humanem Serumalbumin und Carbonsäure (ein Proteaseinhibitor) als Absorptionsverstärker ein (siehe Reeve et al., 1976, Calcif. Tissue Res., 21, Ergänzung, 469-477); eine Zubereitung von humanem PTH (1-38, rekonstituiert in ein Vehikel aus Salzlösung (siehe Hodsmann et al., 1991, 14(1), 67-83); und eine Zubereitung von Rinder-PTH (1-34) in einem wässrigen Vehikel, deren pH mit Essigsäure eingestellt wird, und die Albumin enthält. Es gibt auch eine internationale Referenzzubereitung, die für humanes PTH aus 100 ng Hormon besteht, abgefüllt in eine Ampulle mit 250 µg humanem Serumalbumin und 1,25 mg Lactose (1981, und die für Rinder-PTH aus 10 µg lyophilisiertem Hormon in 0,01 M Essigsäure und 0,1 % Gew./Vol. Mannitol besteht (siehe Martindale, The Extra Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, London, 29. Auflage, 1989 auf S.1338).

[0005] WO-A-94/08613 (publiziert am 28. April 2004) offenbart Zusammensetzungen umfassend Parathyroidhormon oder seine biologisch aktiven Fragmente. Neben anderen pharmazeutischen Formulierungen wird eine Form der Zusammensetzung beschrieben, in der ein Stabilisierungsmittel, eine Trägersubstanz und eine Mischung zum Puffer vorhanden sind.

[0006] Die kommerzielle Nutzung von Parathyroidhormon verlangt die Entwicklung einer Formulierung, die bezüglich der Lagerungsstabilität und der Leichtigkeit der Zubereitung und Rekonstitution nützlich ist. Da es ein Protein ist und daher bei weitem labiler als die Wirkstoffe mit traditionell kleinem Molekulargewicht, bietet jedoch das Formulieren von Parathyroidhormon Herausforderungen, die der pharmazeutischen Industrie für gewöhnlich nicht begegnen. Weiterhin, und anders als die anderen Proteine, die erfolgreich formuliert wurden, ist PTH besonders sensitiv gegenüber Oxidation, und verlangt weiterhin, dass seine N-terminale Sequenz intakt bleibt, um seine biologische Aktivität zu bewahren.

[0007] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine pharmazeutisch verwendbare PTH-Zubereitung bereitzustellen, insbesondere eine, die als aktiven Bestandteil die Form voller Länge von humanem PTH umfasst.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Eine pharmazeutisch verträgliche PTH-Zubereitung wird nun bereitgestellt. In einem Aspekt stellt die Erfindung eine Parathyroidhormonzubereitung, wie in den Ansprüchen definiert, bereit. Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Hormonzubereitung in Form einer gefriergetrock-

neten Zusammensetzung, umfassend eine medizinisch nützliche Menge von Parathyroidhormon, einem Trägerstoff, der mit dem Hormon unter Erhalt eines amorphen Kuchens colyophilisiert, und einem nicht-flüchtigen Puffermittel in einer Menge, die ausreichend ist, um den pH der Zubereitung auf einen physiologisch verträglichen pH einzustellen, wie weiterhin in den Ansprüchen definiert. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Hormon in der Zubereitung humanes 1-84-Parathyroidhormon, der Trägerstoff ist Mannitol, und das Puffermittel ist eine Citratquelle.

[0009] Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Erhalten einer PTH-Zubereitung bereitgestellt, welches die Schritte des Kombinierens in Wasser von PTH, dem Puffermittel und dem Trägerstoff umfasst, und dann das Unterziehen der sich ergebenden Lösung einem Gefriertrocknungsverfahren, das ein Produkt ergibt, das weniger als 2 Gew.-% Wasser einschließt, wie weiterhin in den Ansprüchen definiert.

[0010] Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Erhalten einer Parathyroidhormonformulierung zur parenteralen Verabreichung bereitgestellt, welches den Schritt des Rekonstituierens einer gefriergetrockneten Zubereitung der vorliegenden Erfindung in sterilem Wasser umfasst.

[0011] Weiterhin wird gemäß der vorliegenden Erfindung ein therapeutisch verwendbares Kit bereitgestellt, das ein steriles Gefäß, welches eine gefriergetrocknete Zubereitung der Erfindung enthält, ein Vehikel, das zur Rekonstitution davon geeignet ist, und Anweisungen zur Rekonstitution und gegebenenfalls zur Anwendung umfasst, wie weiterhin in den Ansprüchen definiert. Das Kit kann weiterhin eine Vorrichtung umfassen, die geeignet zur Injektion der rekonstituierten Zubereitung durch den endgültigen Anwender ist. Die Erfindung stellt auch ein Gefäß bereit, das eine Parathyroidhormonzubereitung enthält, wie in den Ansprüchen definiert. Weiterhin stellt die Erfindung die Verwendung einer PTH-Zubereitung zur Zubereitung von pharmazeutischen Zusammensetzungen bereit, wie in den Ansprüchen definiert. Die Erfindung wird nun genauer und unter Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen beschrieben, in denen:

Kurze Bezugnahme auf die Zeichnungen

[0012] Fig. 1 und 2 zeigen die Wirkung der Lagerung bei 4°C und 37°C auf die Stabilität von PTH-Zubereitungen, die bei pH 4 und pH 6 gepuffert werden, wobei die Stabilität durch Bioaktivitätsversuche (Fig. 1) und durch SDS-PAGE-Analyse (Fig. 2) gezeigt wird.

Genauere Beschreibung der Erfindung

[0013] Die Erfindung betrifft Parathyroidhormonzubereitungen, die Lagerungsstabilität bezüglich der Hormonzusammensetzung und -aktivität aufweisen.

[0014] Als aktiven Bestandteil schließt die Zubereitung vorzugsweise die Form voller Länge von 84 Aminosäuren von humanem Parathyroidhormon ein, das entweder rekombinant, durch Peptidsynthese, oder durch Extraktion aus menschlichen Flüssigkeiten erhalten wird. In dieser Beschreibung wird die humane Form von PTH als hPTH (1-84) abgekürzt, welches die Aminosäuresequenz veröffentlicht durch Kimura et al., Biochem Biophys Res Comm, 114(2):493 besitzt. Als Alternative zur humanen Form voller Länge von PTH kann die Zubereitung solche Homologe, Fragmente oder Varianten von humanem PTH einschließen, die humane PTH-Aktivität besitzen, wie durch das Osteoporosemodell mit ovariectomierten Ratten bestimmt, das durch Kimmel et al., Endocrinology, 1993, 32(4):1577 publiziert wurde.

[0015] Das Parathyroidhormon kann zum Beispiel die Rinder- oder Schweineform von PTH sein (siehe Keutmann et al., Current Research on Calcium Regulating Hormones, Cooper, C.W. (Hrsg.), 1987, University of Texas Press, Austin, S.57-63), oder Fragmente oder Varianten der reifen PTH-Homologen. Alternativen in der Form von PTH-Fragmenten schließen mindestens die ersten 27 N-terminalen Reste von PTH ein, und schließen vorzugsweise mindestens die ersten 34 N-terminalen Reste ein, wie PTH(1-34), PTH(1-37), PTH(1-38) und PTH(1-41). Alternativen in der Form von PTH-Varianten schließen von 1 bis 5 Aminosäuresubstitutionen ein, die die PTH-Stabilität und -Halbwertszeit verbessern, wie das Ersetzen von Methioninresten an den Positionen 8 und/oder 18 mit Leucin oder anderen hydrophoben Aminosäuren, was die PTH-Stabilität gegenüber Oxidation verbessert, und das Ersetzen von Aminosäuren in der Region 25-27 mit Trypsinunempfindlichen Aminosäuren wie Histidin oder einer anderen Aminosäure, was die PTH-Stabilität gegenüber einer Protease verbessert. Diese Formen von PTH werden durch den Begriff „Parathyroidhormon“ wie hierin allgemein verwendet eingeschlossen.

[0016] Die Parathyroidhormonzubereitungen der vorliegenden Erfindung werden in einer Pulverform bereitgestellt, die nicht mehr als 2 Gew.-% Wasser enthält, welches das Ergebnis des Gefriertrocknens einer sterilen wässrigen Hormonlösung ist, die durch Mischen des gewählten Parathyroidhormons, eines nicht-flüchtigen Puffermittels, und eines Trägerstoffs zubereitet wurde.

[0017] Der Trägerstoff, der in die Zubereitung eingeschlossen wird, dient als Frostschutzmittel während des Gefriertrocknungsverfahrens und auch als Füll-

stoff, um die Formulierung der Dosierung zu erleichtern. Von den pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen vermeidet die vorliegende Erfindung Zucker wie Lactose und Maltose, und benutzt nur jene Trägerstoffe, die die Fähigkeit besitzen, wenn sie mit dem gewählten Puffermittel kombiniert werden, einen nicht-kristallinen, amorphen Kuchen beim Gefriertrocknen zu bilden. Wenn der Trägerstoff auf dieser Grundlage ausgewählt wurde, besitzt der sich aus dem Gefriertrocknungsverfahren ergebende Kuchen die gewünschte homogene Qualität für eine schnelle Rekonstitution. Trägerstoffe vom Polyoltyp sind hierin bevorzugt. Eine Auswertung der Eigenschaften des Kuchenbildens von Trägerstoffen vom Polyoltyp hat gezeigt, dass Mannitol ein besonders bevorzugter Trägerstoff ist, nicht nur aufgrund seiner Fähigkeit, einen Kuchen von Qualität zu ergeben, sondern auch, weil Mannitol selbst eine gewisse Stabilität auf das PTH in der Lösung überträgt.

[0018] Das Puffermittel, das in die Zubereitung der vorliegenden Erfindung eingebracht wird, ist zusätzlich zu seiner pharmazeutischen Eignung, notwendigerweise ein nicht-flüchtiges Puffermittel, d.h. eines, das nicht während des Gefriertrocknungsprozesses in einem Ausmaß verflüchtigt wird, dass der pH mehr als 0,4 pH-Einheiten reduziert wird. Puffermittel, die bisher in PTH-Zubereitungen verwendet wurden, wie Essigsäure, wurden befunden, sich mit verschiedenen Geschwindigkeiten während des Gefriertrocknungsprozesses zu verflüchtigen, was nicht nur zu einem unbeständigen Produkt, sondern auch zum Verlust von Puffermittel führt, und damit zu unbeständigen pH-Werten im rekonstituierten Produkt. Die nicht-flüchtigen Puffermittel, die in die vorliegenden Zubereitungen eingeschlossen werden, werden aus denen ausgewählt, die die Fähigkeit besitzen, die Zubereitung auf einen pH innerhalb eines physiologisch verträglichen pH-Bereichs zu puffern. Ein pH, der physiologisch verträglich ist, ist einer, der entweder keine oder minimale Beschwerden beim Patienten hervorruft, wenn die Formulierung verabreicht wird, und kann daher abhängig von der Verabreichungsweise variieren. Für Zubereitungen, die vor der Verabreichung verdünnt werden, wie durch Verdünnung in eine Infusionsstammllösung, kann der pH der Zubereitung per se weit variieren, z. B. von ungefähr pH 3 bis ungefähr pH 9. Wenn die Zubereitung direkt nach der Rekonstitution verabreicht werden soll, wird die PTH-Zubereitung vorzugsweise auf innerhalb des pH-Bereichs von 3,5-7,5 gepuffert. Geeignete nicht-flüchtige Puffer sind demgemäß solche pharmazeutisch verträgliche Mittel, die den pH der Zubereitung auf innerhalb des Ziel-pH-Bereichs puffern können, und schließen auf Phosphat basierende Puffer und bevorzugt auf Citrat basierende Puffer wie Natriumcitrat/Zitronensäure ein.

[0019] Um lagerungsstabile Zubereitungen von Parathyroidhormon gemäß der Erfindung bereitzustellen,

wird das ausgewählte nicht-flüchtige Puffermittel eingeschlossen, um einen endgültigen pH innerhalb des Bereichs von 3,5-6,5 zu ergeben, und der Trägerstoff wird eingeschlossen, um eine endgültige Konzentration im Bereich von 2 % bis 10 % (Gew./Vol.) zu ergeben. In Ausführungsformen der Erfindung ist der pH, der durch das Puffermittel bewirkt wird, im Bereich von 3,8-6,2, und die endgültige Konzentration des Trägerstoffs ist von 3-7 %, z. B. 4-6 % (Gew./Vol.). Am meisten bevorzugt ist das Puffermittel eine Citratquelle, wie Mononatriumcitrat/Zitronensäure, und der Trägerstoff ist 5 % Mannitol (Gew./Vol.).

[0020] Die PTH-Zubereitungen der vorliegenden Erfindung schließen PTH in einer medizinisch nützlichen Menge ein, ein Begriff, der mit Bezug auf die Mengen benutzt wird, die entweder therapeutisch oder in der medizinischen Diagnose nützlich sind. Die genaue Menge des Parathyroidhormons, das in die Zubereitung eingebracht wird, kann basierend auf dem Typ des ausgewählten PTHs und der beabsichtigten letztendlichen Verwendung der Zubereitung vorherbestimmt werden. In einer Anwendung werden die Zubereitungen für therapeutische Zwecke benutzt, und besonders zur Behandlung von Osteoporose. Osteoporosetherapie bedingt eine Verabreichung der rekonstituierten Zubereitung durch Injektion, vorzugsweise subkutaner Injektion, in Dosierungseinheiten, die den verschriebenen Behandlungsplan widerspiegeln, aber für humanes PTH (1-84) innerhalb des Bereichs von 25 µg PTH/ml injizierter Lösung bis 500 µg/ml injizierter Lösung pro Patient sind, wobei die Injektionsvolumina vorzugsweise von 0,3-1,3 ml betragen. Demgemäß wird das gereinigte und steril filtrierte PTH vorzugsweise mit dem Puffermittel und Trägerstoff eingeschlossen, um eine wässrige Lösung zu ergeben, die PTH in einem Konzentrationsbereich von 25 µg/ml bis 250 µg/ml enthält, bevorzugt 50 µg/ml bis 150 µg/ml. Molare Äquivalente der im Wesentlichen gleich wirksamen Formen von PTH, wie Varianten und Fragmente von PTH (1-84), können auf ähnliche Weise anstelle des humanen PTH (1-84) eingebracht werden, wenn gewünscht.

[0021] In einer Ausführungsform der Erfindung werden die Zubereitungen in einer Form bereitgestellt, die eine Dosierungseinheit von 50-150 µg von humanem PTH (1-84) nach Rekonstitution in ungefähr 1 ml (0,8-1,2 ml) des Rekonstitutionsvehikels ergibt, und die Gefäße werden demgemäß mit ungefähr 1 ml der wässrigen PTH-Zubereitung für das anschließende Gefriertrocknen beladen.

[0022] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst die PTH-Zubereitung, die dem Gefriertrocknen unterzogen wird, von 25-250 µg/ml humanes PTH (1-84), von 2 – 8 Gew.-% Mannitol, und eine Citratquelle in einer Menge, die die Fähigkeit be-

sitzt, die Zubereitung auf innerhalb des Bereichs von 3,5-6,5 nach Rekonstitution in sterilem Wasser zu Puffern. In spezifischen Ausführungsformen der Erfindung wird das Citratpuffermittel in einer Menge eingeschlossen, die ausreicht, um den pH auf $6,0 \pm 0,4$ zu Puffern.

[0023] Sobald die Zubereitung als wässrige Lösung erhalten wird, die die gewünschten Mengen und Konzentrationen des Puffermittels, Trägerstoffs und PTH enthält, werden individuelle Gefäße mit der Lösung auf das gewünschte Volumen aufgefüllt, und die Gefäße werden dann gemeinsam dem Gefriertrocknungsverfahren unterzogen.

[0024] Wie es auf dem Gebiet von Formulierungen gebräuchlich ist, bedingt das Gefriertrocknungs- oder Lyophilisierungsverfahren ein Verfahren mit zyklischer Temperatur, die sorgfältig kontrolliert wird, um sicherzustellen, dass das Trocknen gleichförmig und bis zum wesentlichen Abschluss voranschreitet, d.h. um ein Pulver zu ergeben, das nicht mehr als 2 Gew.-% Wasser und vorzugsweise nicht mehr als 1,5 Gew.-% Wasser enthält. Ein Protokoll, das geeignet ist, um die vorliegenden gefriergetrockneten PTH-Zubereitungen zu erhalten, bedingt ein Unterziehen der Gefäße, die mit der wässrigen PTH-Zubereitung gefüllt sind, einem Trocknungsprozess, der mindestens zwei Trocknungsabschnitte beinhaltet, wobei das erste ausgeführt wird, um ungebundenes Wasser aus der wässrigen Zubereitung auszutreiben, ohne einen Kollaps des Kuchens zu verursachen. Dies wird erreicht, indem die abgefüllte wässrige PTH-Zubereitung auf eine Produkt-Eistemperatur von weniger als -30°C , bevorzugt ungefähr -50°C gekühlt wird, und dann die Temperatur des Faches auf ungefähr -10°C gebracht und gehalten wird, unter reduziertem Druck von nicht mehr als 350 μbar , z. B. 260 μbar , bis im Wesentlichen alles ungebundene Wasser ausgetrieben wird. Unter den Bedingungen, die in den Beispielen hierin genauer dargestellt werden, ist eine Trocknungszeit von 16 Stunden angemessen. Der zweite Trocknungszyklus wird gestaltet, um gebundenes Wasser aus dem Kuchen zu befreien, während wiederum ein Kollaps des Kuchens vermieden wird, und eine Temperatur verwendet wird, die unter der liegt, die der PTH-Bioaktivität schädlich ist. Dieser zweite Trocknungsschritt kann erreicht werden unter weiter reduziertem Druck ($< 50 \mu\text{bar}$) bei -10°C für 3 Stunden, dann ein Erwärmen auf und ein Halten bei 25°C , bis im Wesentlichen alles ($< 2 \%$) des gebundenen Wassers ausgetrieben wird, z. B. mindestens 12 Stunden, aber bevorzugt 16 Stunden oder länger. Nach Abschluss können die Gefäße versiegelt werden, z. B. durch automatisches Verstöpseln, und dann aus dem Gefriertrockner entfernt und mit Kappen verschlossen werden.

[0025] Die PTH-Zubereitungen der vorliegenden Erfindung sind vollständig im Sinne, dass der endgülti-

ge Anwender die Zubereitung nur in sterilem Wasser rekonstituieren muss, um eine verabreichbare Formulierung zu erzeugen. Zu diesem Zweck, und in Übereinstimmung mit einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung, wird ein medizinisch nützliches Kit bereitgestellt, das mindestens ein Gefäß, das eine gefriergetrocknete PTH-Zubereitung der Erfindung enthält, mindestens ein Gefäß, das steriles Wasser zur Rekonstitution der Zubereitung enthält, und ein Instruktionsblatt, das die Rekonstitution des gefriergetrockneten PTHs anleitet, umfasst. Das Kit kann weiterhin eine Injektionsvorrichtung zum Verabreichen der rekonstituierten Formulierung durch den endgültigen Anwender umfassen. In einer Ausführungsform der Erfindung ist die Injektionsvorrichtung eine Injektionsnadel zur subkutanen Anwendung, z. B. eine Kanüle mit 25 Gauge, und einer Spritze, die die Fähigkeit besitzt, ein Lösungsvolumen von ungefähr 0,5-5 ml, z. B. 1 oder 2 ml, aufzunehmen. Alternativ kann das Kit ein Gefäß, das mehrere Dosierungen von PTH enthält, und ein begleitendes Gefäß umfassen, das genug steriles Wasser enthält, um die mehrfache Dosierungsformulierung zu rekonstituieren.

[0026] Bei der Verwendung zieht der endgültige Anwender aus dem wassergefüllten Gefäß in die Injektionsvorrichtung auf, und überträgt dieses Wasser in das PTH-gefüllte Gefäß, um ein Mischen und die Rekonstitution des gefriergetrockneten PTH-Pulvers zu verursachen, wobei, wenn nötig, die Kanüle benutzt wird, um die Mischung aufzuziehen und hinauszuspritzen, bis das Pulver sichtbar gelöst ist. Die vorliegende PTH-Zubereitung besitzt jedoch den Vorteil, dass das Mischen schnell vor sich geht, und ohne Mischen innerhalb einer Minute, und gewöhnlich innerhalb von 30 Sekunden, abgeschlossen ist. Nach dem Mischen injiziert der endgültige Anwender die PTH-Formulierung in der Weise und der Menge, die durch den Arzt verschrieben wird. Im Falle, wo ein Gefäß mit mehrfachen Dosierungen bereitgestellt wird, sollte ein bakteriostatisches Mittel eingeschlossen werden, und die Formulierung, die nach der Verabreichung jeder Dosis zurückbleibt, kann zur anschließenden Verwendung innerhalb eines Zeitrahmens von mehreren Tagen gekühlt werden.

[0027] Zusätzlich zu ihrer therapeutischen Verwendung können die vorliegenden PTH-Zubereitungen formuliert und verabreicht werden, um in der medizinischen Diagnose zu helfen, und insbesondere, um beim Erstellen der Diagnose von Hypoparathyroidismus und Pseudohypoparathyroidismus in Patienten mit Hypokalzämie zu helfen. Außer der Dosis von PTH wird die Zusammensetzung der PTH-Zubereitung wie hierin beschrieben zur therapeutischen Verwendung gleichbleiben. Eine intravenös infundierte, einzelne Dosis von humanem PTH (1-84) oder einem PTH-Bioäquivalent, das 200 internationalen Einheiten an PTH-Aktivität entspricht, ist für diesen diag-

nostischen Zweck geeignet. Die Diagnose wird dann gemacht, indem die Wirkung des verabreichten PTHs auf die cAMP-Spiegel im Urin bestimmt wird, wobei eine cAMP-Erhöhung den Zustand des Hypoparathyroidismus anstelle seiner Pseudoform anzeigt.

Beispiele

[0028] Wässrige PTH-Zubereitungen wurden zuerst zum anschließenden Gefriertrocknen hergestellt, indem humanes PTH (1-84) als Hormon, Mannitol als Trägerstoff und eine Citratquelle als Puffermittel gemischt wurden.

[0029] Als erster Schritt zum Erzeugen der Zubereitungen wurden zwei wässrige Mischungen aus einer sterilen 20%-igen (Gew./Vol.) injizierbaren Mannitollösung (British Pharmacopeia) zubereitet. Die 20%-ige Mannitollösung wurde (1) mit einer wässrigen Lösung von Zitronensäure vermischt, um eine erste wässrige Mischung von 10 mM Zitronensäure und 5 % Mannitol zu ergeben, und (2) mit einer wässrigen Natriumcitratmonohydratlösung, um eine zweite wässrige Mischung von 10 mM Citrat und 5 % Mannitol zu ergeben. Lösungen mit eingestelltem pH-Wert mit 5 % Mannitol wurden dann durch Vermischen der Mischungen erhalten, in Volumen, die geeignet sind, um eine 5%-ige Mannitollösung mit ungefähr pH 4 ($\pm 0,2$) und eine 5%-ige Mannitollösung mit ungefähr pH 6 ($\pm 0,2$) zu ergeben.

[0030] Die 5%-igen Mannitollösungen (pH 4 und pH 6) erhielten dann abgemessene Mengen von gefriergetrocknetem humanen PTH (1-84), das mikrobiell hergestellt, gereinigt, und dann steril filtriert wurde, bevor es gefriergetrocknet wurde. Abgemessene Mengen des PTHs wurden dann zu den pH-4- und pH-6-Lösungen mit 5 % Mannitol zugefügt, um Stocklösungen zu erzeugen, die, wenn sie mit einem Volumen von 1,1 ml in Gefäße gefüllt wurden, Gefäße ergaben, die PTH in den folgenden μg -Mengen enthielten: 100, 250, 500, 1000 und 2500.

[0031] Zum Gefriertrocknen wurden Lösungen, die PTH mit jeder der zubereiteten Konzentrationen enthielten, aseptisch entweder per Hand oder durch einen automatischen Abfüller in 1,1 ml Volumina in 5 ml Glasgefäße (USP-Typ 1) gefüllt, und dann in Schubfächern in einen sterilisierten, mit Stickstoff gereinigten Gefriertrockner geladen, der auf -50°C vorgekühlt war. Nach dem Laden und einer Vor-Gefrierzeit von 4 Stunden wurde die Gefriertrocknungskammer evakuiert, indem der Druck auf 0,26 mbar 1 Stunde lang reduziert wurde. Der primäre Trocknungszyklus wurde dann ausgeführt, der in einem schrittweisen Erwärmen über 30 Minuten von -50°C auf -10°C bestand, wo die Gefäße für 16 Stunden gehalten wurden. Der zweite Trocknungszyklus wurde dann ausgeführt, der in einer weiteren Erwärmung von -10°C auf 25°C bei weiter reduziertem Druck von 0,05 mbar über drei

Stunden und dann in einem Halten bei dieser Temperatur und diesem Druck für 16 Stunden bestand. Am Ende des zweiten Trocknungszyklus wurde die Kammer mit Stickstoff gereinigt und auf 0,85-0,95 bar gebracht. Das Schubfach wurde dann angehoben, um Gummistöpsel in die Öffnungen der Gefäße einzubringen, und die Schubfächer der Gefäße entfernt und mit einem Aluminiumsiegel überkapselt, gefolgt vom Druckausgleich.

[0032] Gefäße, die die gefriergetrockneten PTH-Zubereitungen enthielten, bei verschiedenen Konzentrationen und bei pH 4 oder pH 6, wurden dann bei 4°C und 37°C zur anschließenden Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten von 1, 2, 3, 6 und 9 Monaten gelagert. Eine Analyse der Stabilität wurde durchgeführt, indem die abgefüllte Zubereitung in 1,1 ml steriles Wasser rekonstituiert wurde. Dies wurde erreicht, indem das Wasser durch den Gummistöpsel injiziert wurde, und dann, nachdem eine Minute für die Rekonstitution gegeben wurde, die Lösung zur Analyse entfernt wurde.

[0033] Ergebnisse der Stabilitätsversuche werden nachstehend im Kontext der verschiedenen verwendeten Tests, die benutzt wurden, um die Zubereitung auszuwerten, berichtet:

Die Bioaktivität des PTH wurde gemessen unter Verwendung des etablierten, auf Ratten-Osteosarkomazellen (UMR 106)-basierenden Tests von PTH-stimulierter Adenylatcyclaseherstellung. Protokolle für diesen PTH-Test werden von Rodan et al. berichtet in J. Clin. Invest., 1983, 72:1511 und durch Rabbani et al. in Endocrinol. 1988, 123:2709. Nach bis zu 9 Monaten Lagerung wurde keine signifikante Verringerung der PTH-Bioaktivität bei entweder 4°C oder 37°C , bei einer beliebigen PTH-Konzentration, oder bei entweder pH 4 oder pH 6 beobachtet. **Fig. 1** verdeutlicht, mit einer angepassten Geraden zwischen den gemittelten Ergebnissen, die analytischen Ergebnisse für eine PTH-Zubereitung, die eine PTH-Dosis von 1000 μg enthält.

[0034] SDS-PAGE-Analyse der rekonstituierten PTH-Zubereitungen, durchgeführt auf übliche Weise, zeigte gleichermaßen keine signifikante Verringerung der Reinheit während der Lagerung bei jedem der pH-Werte, Temperaturen und Lagerungstemperaturen, die untersucht wurden, wie in **Fig. 2** gezeigt. Eine gewisse Verringerung der Reinheit zeigte sich durch RP-HPLC-Analyse der rekonstituierten Formulierung, aber nur bei der höheren 37°C -Lagerungstemperatur (0,7 % Verringerung an Reinheit pro Monat Lagerung), wobei die 4°C -Lagerung keine signifikante Verringerung der Reinheit durch Umkehrphasen-HPLC („reversed Phase HPLC“) zeigte. Es wurde auch durch Immunoassay (Allegro) gezeigt, dass die Stabilität des intakten PTH während der Lagerungsdauer bei allen Konzentrationen, pHs und Temperaturen, die untersucht wurden, konstant ist.

[0035] Restfeuchte in der PTH-Zubereitung wurde durch das Karl-Fischer-Standardverfahren bestimmt, und zeigte an, dass der Wassergehalt aller gefriergetrockneten Zubereitungen unter 2 Gew.-%, und typischerweise bei ungefähr 1 Gew.-% während der Lagerungsdauer blieb.

[0036] Der pH nach Rekonstitution zeigte keine signifikante pH-Änderung während des Gefrier Trocknungs- und Lagerungsverfahrens, was bestätigt, dass das Puffermittel sich nicht während der Lyophilisierung verflüchtigt hatte. Zubereitungen, die auf pH 4 gepuffert waren, blieben bei pH $4 \pm 0,2$, und die auf pH 6 gepufferten blieben bei pH $6 \pm 0,4$.

[0037] Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Lösung der gefriergetrockneten Zubereitungen wurden untersucht. Alle Proben lösten sich in 1,1 ml sterilem Wasser innerhalb 1 Minute bei Raumtemperatur. Die maximale Zeit zum Auflösen, die beobachtet wurde, war 0,5 Minuten für die pH-4-Zubereitungen, und 0,4 Minuten für die pH-6-Zubereitungen. Weiterhin wurden keine Partikel nach der Rekonstitution des gefriergetrockneten Pulvers bei jedem der pH-Werte und bei jeder der Lagerungstemperaturen beobachtet.

Patentansprüche

1. Parathyroidhormonzubereitung, umfassend:
 (a) eine medizinisch nützliche Menge von humanem Parathyroidhormon 1-84;
 (b) einen Trägerstoff, der mit dem Hormon unter Erhalt eines amorphen Kuchens co-lyophilisiert;
 (c) ein nicht-flüchtiges Puffermittel in einer Menge, die ausreichend ist, um den pH der Zubereitung auf einen pH innerhalb eines physiologisch verträglichen pH-Bereich einzustellen, wobei der pH-Bereich von 3,5 bis 6,5 beträgt; und
 (d) Wasser.

2. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 1, wobei der Trägerstoff Mannitol ist.

3. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Puffermittel eine Zitratquelle ist.

4. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 1, umfassend:
 (a) humanes Parathyroidhormon 1-84 in einer Konzentration innerhalb des Bereichs von 25 bis 250 µg/mL;
 (b) Mannitol in einer Konzentration im Bereich von 3 bis 7 % (Gew./Vol.);
 (c) Zitratpuffer in einer Menge, die ausreichend ist, um den pH der Zubereitung auf einen pH innerhalb des Bereichs von pH 3,5 bis pH 6,5 einzustellen; und
 (d) Wasser.

5. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 4, wobei Mannitol in einer Konzentration innerhalb des Bereichs von 4 bis 6 % (Gew./Vol.) vorhanden ist.

6. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, wobei der Zitratpuffer in einer Menge vorhanden ist, die ausreichend ist, um den pH der Zubereitung auf pH $6 \pm 0,4$ einzustellen.

7. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 4 in Form einer gefriergetrockneten Zusammensetzung, die nicht mehr als 2 Gew.-% Wasser enthält.

8. Parathyroidhormonzubereitung in Form einer gefriergetrockneten Zusammensetzung umfassend:
 (a) eine medizinisch nützliche Menge von humanem Parathyroidhormon 1-84;
 (b) einen Trägerstoff, der mit dem Hormon unter Erhalt eines amorphen Kuchens co-lyophilisiert;
 (c) ein nicht-flüchtiges Puffermittel in einer Menge, die ausreichend ist, um den pH der Zubereitung auf einen pH innerhalb eines physiologisch verträglichen pH-Bereichs von 3,5 bis 6,5 einzustellen; und
 (d) Wasser.

9. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 8, wobei der Trägerstoff Mannitol ist.

10. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 8, wobei das Puffermittel eine Zitratquelle ist.

11. Parathyroidhormonzubereitung nach Anspruch 8, wobei die gefriergetrocknete Zusammensetzung nicht mehr als 2 Gew.-% Wasser enthält.

12. Gefäß, das eine Parathyroidhormonzubereitung nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 11 enthält.

13. Kit, das verwendbar ist, um eine injizierbare PTH-Lösung zu formulieren, die umfasst:
 (a) mindestens ein erstes Gefäß, das eine Parathyroidhormonzubereitung wie in einem beliebigen der Ansprüche 8 bis 11 definiert enthält,
 (b) mindestens ein zweites Gefäß, das steriles Wasser zum Rekonstituieren der Zubereitung zu einer injizierbaren Lösung enthält, und
 (c) einen Zettel mit Anweisung zur Zubereitung einer Formulierung davon.

14. Kit nach Anspruch 13, weiterhin umfassend eine Vorrichtung zur Injektion der rekonstituierten PTH-Lösung.

15. Verfahren zum Erhalten einer Parathyroidhormonzubereitung in Form einer gefriergetrockneten Zusammensetzung umfassend:
 (a) Kombinieren in Wasser von Parathyroidhormon,

einem nicht-flüchtigem Puffermittel und einem Trägerstoff, der mit dem Hormon unter Erhalt eines amorphen Kuchens co-lyophilisiert, und
(b) Unterziehen der sich ergebenden Lösung einem Gefriertrocknungsverfahren, das ein Produkt ergibt, das weniger als 2 Gew.-% Wasser einschließt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Parathyroidhormonzubereitung in einer gefriergetrockneten Zusammensetzung wie in mindestens einem der Ansprüche 8 bis 11 definiert ist.

17. Verfahren zum Erhalten einer Parathyroidhormonformulierung zur parenteralen Verabreichung, umfassend:

(a) Rekonstituieren einer gefriergetrockneten Zubereitung nach einem der Ansprüche 8 bis 11 oder einer Zusammensetzung, die im Verfahren der Ansprüche 15 bis 16 erhalten wird.

18. Verwendung der Parathyroidhormonzubereitung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Osteoporose.

19. Parathyroidhormonformulierung zur parenteralen Verabreichung, erhältlich durch Rekonstituieren der Parathyroidhormonzubereitung eines beliebigen der Ansprüche 8 bis 11.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

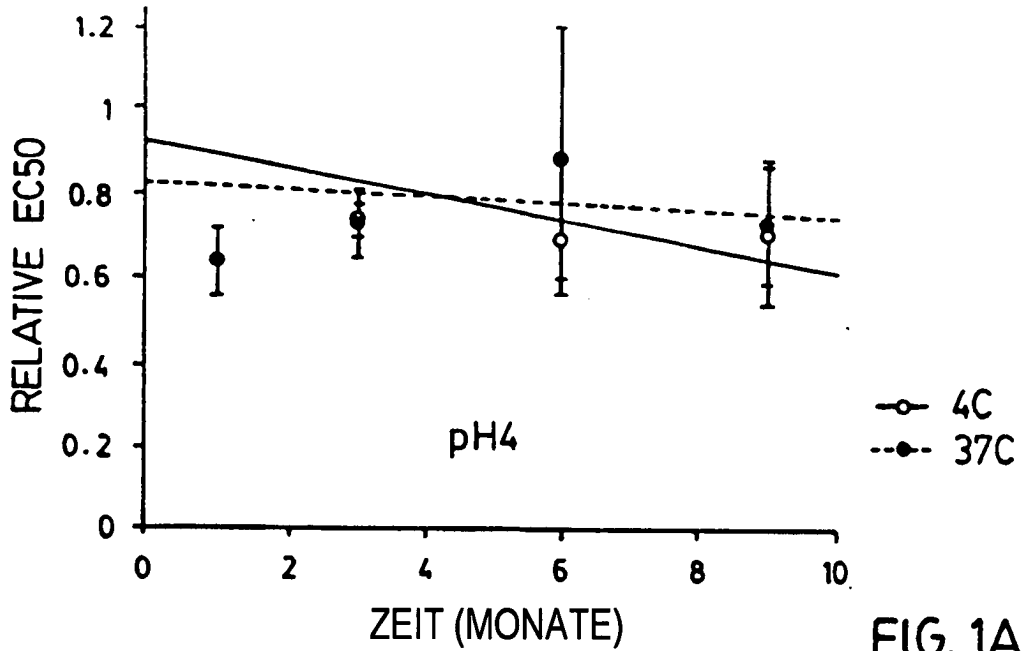


FIG. 1A

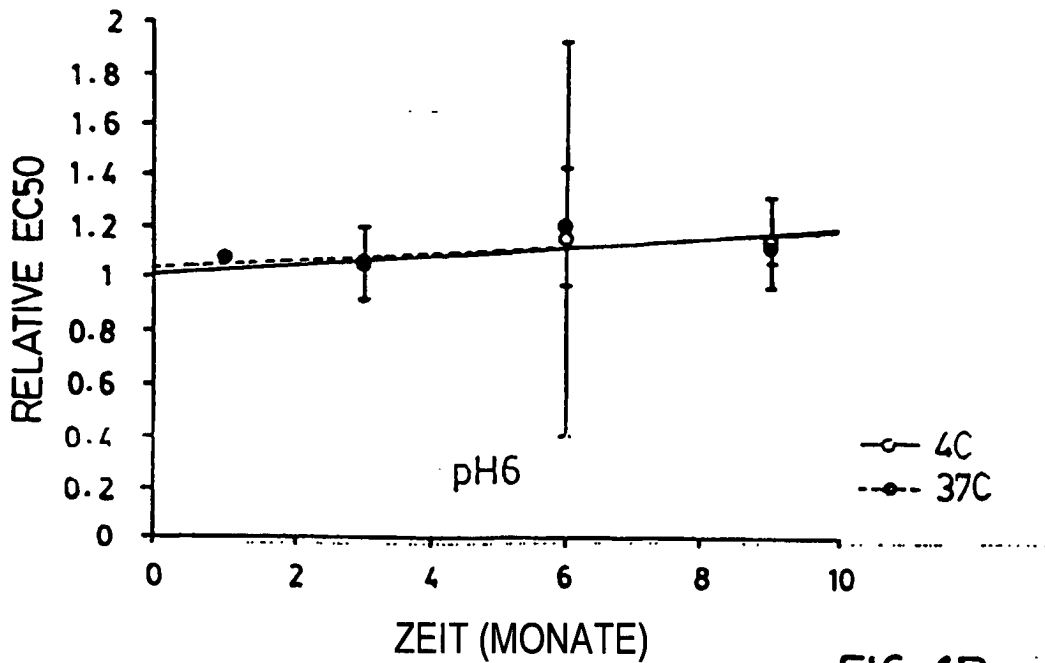


FIG. 1B

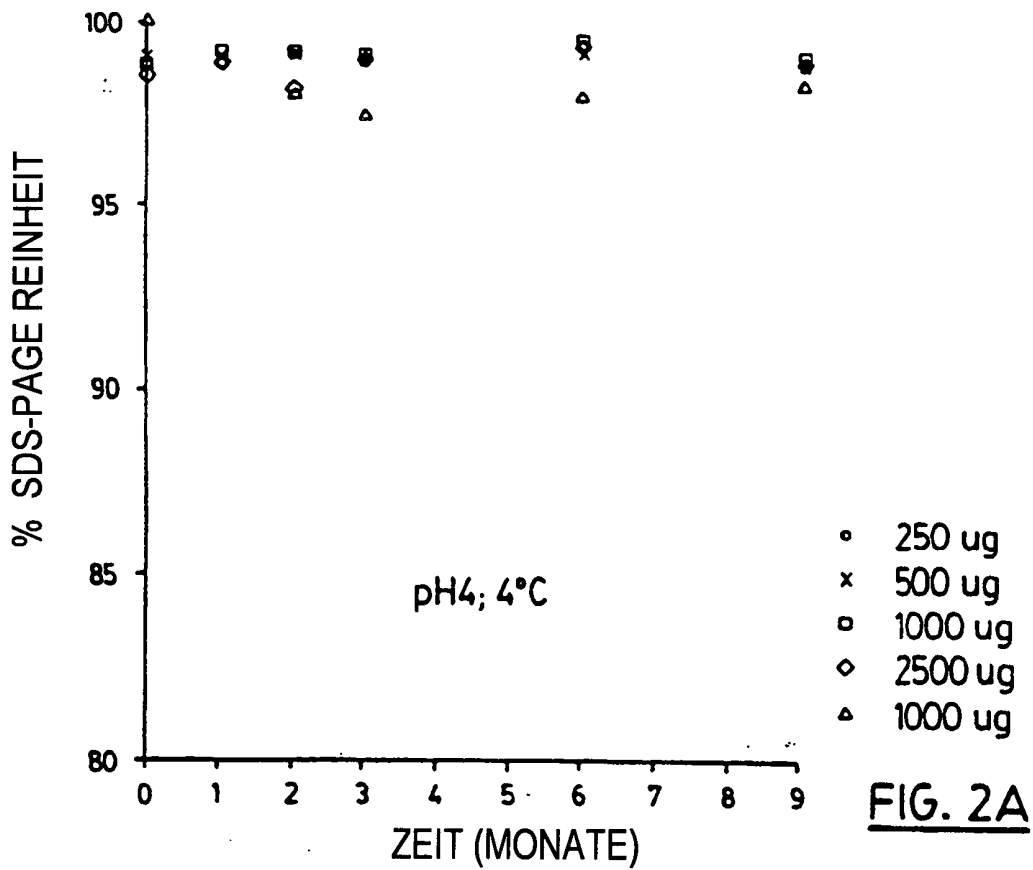


FIG. 2A

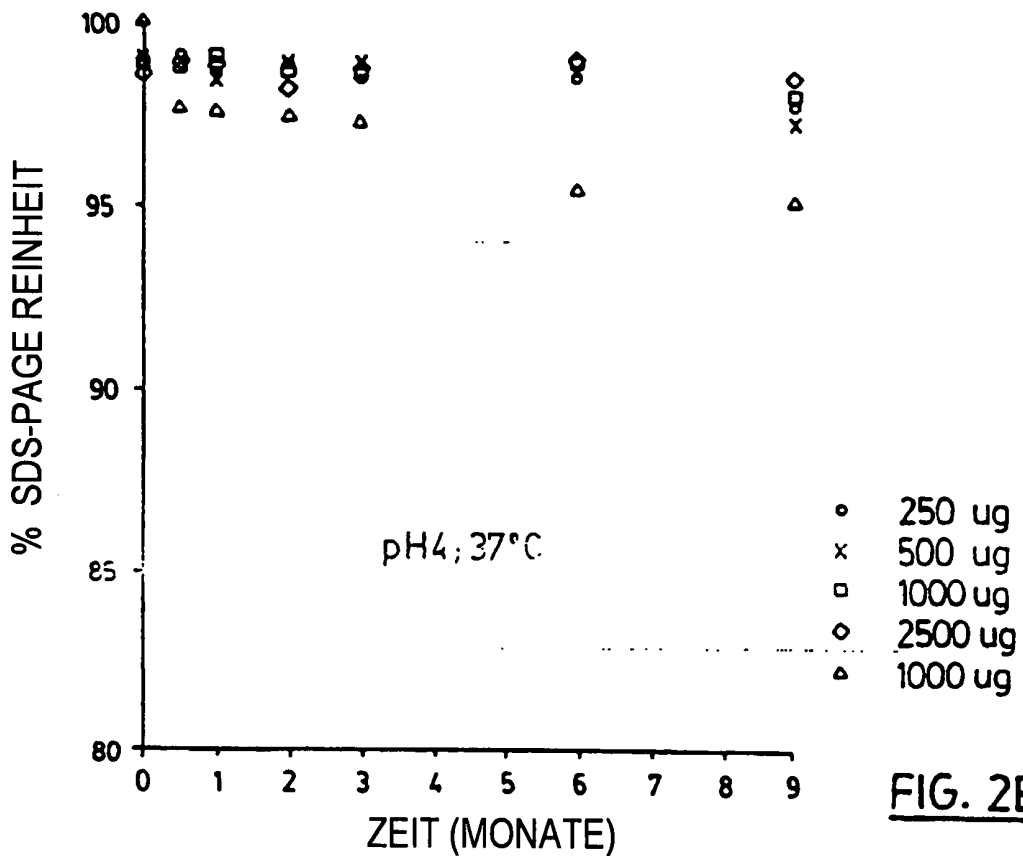


FIG. 2B

