(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112638407 A
(43)申请公布日 2021.04.09

(21)申请号 201980056225.X
(22)申请日 2019.07.12
(30)优先权数据
62/711,767 2018.07.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.02.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/041609 2019.07.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/028011 EN 2020.02.06
(71)申请人 夏尔-NPS医药品有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 N·迪克西特 V·阮 P·苏亚克 S·巴苏
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 章蕾
(51)Int.Cl.
A61K 38/29(2006.01)
A61P 19/10(2006.01)
C07K 14/635(2006.01)

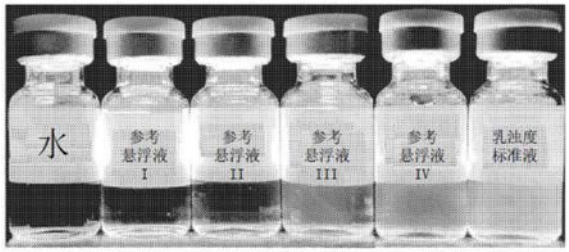
权利要求书3页 说明书33页 附图24页

(54)发明名称

重组人类甲状旁腺素的改进稳定性调配物

(57)摘要

本发明涉及包含全长重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))的药学组合物及剂型。本发明进一步涉及新颖和/或经改进的PTH组合物,其具有经改进的使用中稳定性,所述PTH组合物对响应物理及化学应力的蛋白质降解具有抗性。



CN 112638407 A

1.一种药学调配物,其包含:

(a)治疗有效量的重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84));

(b)表面活性剂;

(c)张力剂;

(d)抗氧化剂;

(e)防腐剂;

(f)生理上可接受的缓冲液,及

(g)水,

其中所述药学调配物被调配为注射用液体,且其中所述调配物是物理上稳定的并保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

2.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述调配物物理上稳定至少72小时。

3.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述调配物物理上稳定至少96小时。

4.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述调配物物理上稳定至少7天。

5.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述调配物物理上稳定至少14天。

6.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述调配物物理上稳定至少21天。

7.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述表面活性剂是选自泊洛沙姆-188和聚乙二醇及其组合。

8.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述张力剂是选自氯化钠、蔗糖和甘油及其组合。

9.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述防腐剂为间甲酚、苯酚、苄醇、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸丙酯或其组合。

10.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述生理上可接受的缓冲液为乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、L-组氨酸缓冲液或琥珀酸盐缓冲液。

11.根据权利要求1所述的药学调配物,其进一步包含抗氧化剂。

12.根据权利要求11所述的药学调配物,其中所述抗氧化剂为蛋氨酸、N-乙酰基-蛋氨酸、硫代硫酸盐、N-乙酰基色氨酸或其组合。

13.根据权利要求1所述的药学调配物,其具有约4到约6的pH。

14.根据权利要求1所述的药学调配物,其具有约5.5的pH。

15.根据权利要求1所述的药学调配物,其中所述调配物是呈单位剂量小瓶、多剂量小瓶、药筒、预填充注射器或注射笔的形式。

16.一种药学调配物,其包含:

(a)约0.2到约2.0mg/mL重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84));

(b)约0.03%到约3.0%w/v表面活性剂;

(c)约0.2%到约20%w/v张力剂;

(d)约0.015%到约1.50%w/v抗氧化剂;

(e)约0.03%到约3%防腐剂;

(f)约5mM到约50mM生理上可接受的缓冲液,及

(g)水,

其中所述药学调配物被调配为注射用液体,且其中所述调配物是物理上稳定的并保持

澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

17.根据权利要求16所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少72小时。

18.根据权利要求16所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少96小时。

19.根据权利要求16所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少7天。

20.根据权利要求16所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少14天。

21.根据权利要求16所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少21天。

22.一种药学调配物，其包含：

(e)治疗有效量的重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))；

(f)增积剂；

(g)冷冻保护剂，及

(h)药学上可接受的缓冲液，

其中所述药学调配物被调配为在注射前进行复水的冻干粉末，且其中所述调配物是物理上稳定的并在复水后保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

23.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少72小时。

24.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少96小时。

25.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少7天。

26.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少14天。

27.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少21天。

28.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述增积剂为甘露醇。

29.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述冷冻保护剂为蔗糖。

30.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述药学上可接受的缓冲液为乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、L-组氨酸缓冲液或琥珀酸盐缓冲液。

31.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述药学上可接受的缓冲液为L-组氨酸缓冲液。

32.根据权利要求31所述的药学调配物，其具有约5.5的pH。

33.根据权利要求22所述的药学调配物，其中所述药学上可接受的缓冲液为琥珀酸盐缓冲液。

34.根据权利要求33所述的药学调配物，其具有介于约4与约4.5之间的pH。

35.根据权利要求22所述的药学调配物，其进一步包含抗氧化剂和/或表面活性剂。

36.根据权利要求35所述的药学调配物，其中所述抗氧化剂为蛋氨酸及所述表面活性剂为泊洛沙姆-188。

37.一种药学调配物，其包含：

(e)约0.02到约2.0mg/mL重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))；

(f)约0.3％到约30％w/v增积剂；

(g)约0.2％到约20％w/v冷冻保护剂，及

(h)约5mM到约50mM药学上可接受的缓冲液，

其中所述药学调配物被调配为在注射前进行复水的冻干粉末，且其中所述调配物是物理上稳定的并在复水后保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

38.根据权利要求37所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少72小时。

39.根据权利要求37所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少96小时。

40.根据权利要求37所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少7天。

41.根据权利要求37所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少14天。

42.根据权利要求37所述的药学调配物，其中所述调配物物理上稳定至少21天。

43.一种用于调配rhPTH(1-84)的可注射溶液的试剂盒，其包括包含根据权利要求22到42中任一权利要求所述的药学调配物的第一容器、包含用于复水所述药学调配物的无菌水的第二容器、及说明由此制备复水调配物的说明书。

44.根据权利要求43所述的试剂盒，其进一步包含用于注射所述复水的rhPTH(1-84)溶液的装置。

45.一种向有需要的个体投与治疗有效量的rhPTH(1-84)的方法，所述方法包含向所述个体皮下、静脉内或肌肉内注射根据权利要求1到21中任一权利要求所述的药学调配物。

46.根据权利要求45所述的方法，其中所述注射是用注射器、自动注射器、注射笔或其组合进行的。

47.一种向有需要的个体投与治疗有效量的rhPTH(1-84)的方法，所述方法包含

(i)用无菌水复水根据权利要求22到42中任一权利要求所述的药学调配物，及

(ii)向所述个体皮下、静脉内或肌肉内注射所述复水的调配物。

48.根据权利要求47所述的方法，其中所述注射是用注射器、自动注射器、注射笔或其组合进行的。

重组人类甲状旁腺素的改进稳定性调配物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))的新颖且经改进的药学组合物及剂型,其具有经改进的使用中稳定性。

背景技术

[0002] 甲状旁腺素(PTH)是哺乳动物甲状旁腺的84个氨基酸的分泌型产物,其透过其对各种组织(包括骨骼)的作用来控制血清钙水平。于具有某些形式的PTH的人类中的研究已证实对骨骼的合成代谢作用,并引起对其用于治疗骨质疏松症及相关骨骼病症的显著兴趣。

[0003] 与已成功调配的其它蛋白质不同,PTH对各种形式的降解特别敏感。与已成功调配的其它蛋白质不同,PTH对氧化特别敏感,并进一步需要其N端序列保持完整以便于保持生物活性。例如,氧化可发生于位置8和18的蛋氨酸残基,产生氧化PTH物质ox-M(8)-PTH和ox-M(18)-PTH,而脱酰胺化可发生于位置16的天冬酰胺,产生d16-PTH。多肽链通过在N端和C端断开肽键而截短。此外,PTH还可吸附到表面,形成非特异性聚集物和/或沉淀,从而降低药物的可用浓度。所有这些降解反应及其组合导致PTH生物活性的部分或完全丧失。

[0004] 甲状旁腺素的商业开发需要在储存及使用中稳定性及易于制备及复水方面是可接受的调配物。因为其是一种蛋白质,且因此比传统小分子量药物远更不稳定,甲状旁腺素的调配物提出药学工业不常遇到的挑战。

[0005] 全长rhPTH(1-84)最近被批准作为甲状旁腺功能减退症的安全且有效的治疗(希雷制药(Shire Pharmaceuticals)以商标名NATPARA®/NATPAR®出售)。其是甲状旁腺功能减退症的第一特定激素替代品,且是每日一次皮下注射的,可作为钙和维生素D的辅助剂摄取。NATPARA®目前作为呈各种剂量强度的含有无菌冻干粉末和稀释剂的多剂量、双腔玻璃药筒提供。无菌冻干粉末含有0.40mg、或0.80mg、或1.21mg或1.61mg甲状旁腺素(取决于剂量强度)和4.5mg氯化钠、30mg甘露醇和1.26mg单水合柠檬酸。无菌稀释剂的重量为1.13g且所述稀释剂含有3.2mg/mL间甲酚水溶液。复水后,每个剂量由pH在5与6之间的rhPTH(1-84)溶液组成。

[0006] 丢弃式NATPARA®药筒经设计以与可再使用的混合装置一起使用以进行产品复水以及与可再使用的Q-Cliq笔一起使用以进行药物递送。Q-Cliq笔递送71.4μL的固定体积剂量。使用Q-Cliq笔,各NATPARA®双腔药筒递送14剂NATPARA®。

[0007] 据观测,在某些情况下,复水的NATPARA®溶液可在使用中期间形成蛋白质微粒。因此,期望NATPARA®调配物抵抗在正常加工条件、产品存放期及使用中寿命遇到的物理和化学应力的稳健性更高。

[0008] 因此,需要包含全长rhPTH(1-84)的经改进PTH调配物,特别是防止PTH的物理和化学降解,具有经改进的使用中稳定性,及易于制备、复水和使用的调配物。

发明内容

[0009] 以下描述本发明的各种非限制性方面和实施例。

[0010] 在一个方面中，提供包含重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))的稳定液体药学调配物。所述调配物经设计直接用作注射用液体，无需复水粉末的步骤。在一个实施例中，所述药学调配物包含：

[0011] (a)治疗有效量的重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))；

[0012] (b)表面活性剂；

[0013] (c)张力剂；

[0014] (d)抗氧化剂；

[0015] (e)防腐剂；

[0016] (f)药学上可接受的缓冲液，及

[0017] (g)水，

[0018] 其中所述药学调配物被调配为注射用液体，且其中所述调配物是物理上及化学上稳定的并保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

[0019] 在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少72小时。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少96小时。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少7天。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少14天。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少21天。

[0020] 在一个实施例中，表面活性剂为泊洛沙姆(poloxamer)。在一个实施例中，表面活性剂为泊洛沙姆-188。在一个实施例中，表面活性剂为泊洛沙姆-188，其以调配物的约0.03到约3％w/v存在。

[0021] 在一个实施例中，张力剂是选自氯化钠、蔗糖和甘油、或其组合。在一个实施例中，张力剂为氯化钠，其以调配物的约0.2到约20％w/v存在。在一个实施例中，张力剂为蔗糖，其以调配物的约0.2到约20％w/v存在。在一个实施例中，张力剂为甘油，其以调配物的约0.2到约20％w/v存在。

[0022] 在一个实施例中，防腐剂为间甲酚，其以调配物的约0.03到约3％w/v存在。在一个实施例中，防腐剂为间甲酚，其以调配物的约0.3％w/v存在。

[0023] 在一个实施例中，药学上可接受的缓冲液为乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、L-组氨酸缓冲液或琥珀酸盐缓冲液。在一个实施例中，药学上可接受的缓冲液是以约5mM到约50mM、或约20mM的浓度存在。

[0024] 在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸且其以调配物的约0.015％到约1.50％w/v的浓度存在。在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸，其以约0.15％w/v或10mM存在。

[0025] 在一个实施例中，药学调配物具有约3.8到约6.2、或约5.5的pH。

[0026] 如技术方案1的药学调配物，其中所述调配物是呈单位剂量小瓶、多剂量小瓶、药筒、预填充注射器、自动注射器或注射笔的形式。

[0027] 在一个实施例中，所述药学调配物包含：

[0028] (a)约0.2到约2.0mg/mL重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))；

[0029] (b)约0.03％到约3.0％w/v表面活性剂；

[0030] (c)约0.2％到约20％w/v张力剂；

[0031] (d)约0.015％到约1.50％w/v抗氧化剂；

[0032] (e)约0.03％到约3％防腐剂；

[0033] (f)约5mM到约50mM药学上可接受的缓冲液，及

[0034] (g)水，

[0035] 其中所述药学调配物被调配为注射用液体，且其中所述调配物是物理上及化学上稳定的并保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

[0036] 在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少72小时。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少96小时。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少7天。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少14天。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少21天。

[0037] 在另一个方面中，包含重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))的药学调配物是以在注射前进行复水的冻干粉末的形式提供。在一个实施例中，所述药学调配物包含：

[0038] (a)治疗有效量的重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84))；

[0039] (b)增积剂；

[0040] (c)冷冻保护剂，及

[0041] (d)药学上可接受的缓冲液，

[0042] 其中所述药学调配物被调配为在注射前进行复水的冻干粉末，且其中所述调配物是物理上及化学上稳定的并在复水后保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

[0043] 在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少72小时。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少96小时。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少7天。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少14天。在一个实施例中，所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少21天。

[0044] 在一个实施例中，增积剂为甘露醇。在一个实施例中，增积剂为甘露醇，其以调配物的约0.3％到约30％w/v存在。

[0045] 在一个实施例中，冷冻保护剂为蔗糖。在一个实施例中，冷冻保护剂为蔗糖，其以调配物的约0.2到约20％w/v存在。

[0046] 在一个实施例中，药学上可接受的缓冲液为磷酸盐缓冲液、L-组氨酸缓冲液或琥珀酸盐缓冲液。在一个实施例中，药学上可接受的缓冲液是以约5mM到约50mM、或约20mM的浓度存在。在一个实施例中，药学上可接受的缓冲液为L-组氨酸缓冲液。在一个实施例中，药学上可接受的缓冲液为琥珀酸盐缓冲液。

[0047] 在一个实施例中，药学调配物进一步包含抗氧化剂。在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸。在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸且其以调配物的约0.015％到约1.50％w/v的浓度存在。在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸，其以约0.15％w/v或10mM存在。

[0048] 在一个实施例中，药学调配物进一步包含表面活性剂。在一个实施例中，表面活性剂为泊洛沙姆(poloxamer)。在一个实施例中，表面活性剂为泊洛沙姆-188。在一个实施例中，表面活性剂为泊洛沙姆-188，其以调配物的约0.03到约3％w/v存在。

[0049] 在一个实施例中,药学调配物具有约3.8到约6.2、或约4.3、或约5.5的pH。

[0050] 在一个实施例中,所述药学调配物包含:

[0051] (a)约0.02到约2.0mg/mL重组人类甲状旁腺素(rhPTH(1-84));

[0052] (b)约0.3%到约30%w/v增积剂;

[0053] (c)约0.2%到约20%w/v冷冻保护剂,及

[0054] (d)约5mM到约50mM药学上可接受的缓冲液,

[0055] 其中所述药学调配物被调配为在注射前进行复水的冻干粉末,且其中所述调配物是物理上及化学上稳定的并在复水后保持澄清、无色、且无可见颗粒至少48小时。

[0056] 在一个实施例中,所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少72小时。在一个实施例中,所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少96小时。在一个实施例中,所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少7天。在一个实施例中,所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少14天。在一个实施例中,所述药学调配物保持澄清、无色、且无可见颗粒至少21天。

[0057] 在阅读以下具体实施方式,包括随附权利要求书后,所属领域的技术人员将明了本发明的这些及其它方面。

附图说明

[0058] 本专利或申请案文件包含至少一个彩色图式。具有彩色图式的本专利或专利申请公开案的复本将在请求及支付必要费用后由政府机关提供。

[0059] 图1显示参考悬浮液(RS)的乳浊度比较。

[0060] 图2显示在不同缓冲液中调配的rhPTH在环境条件(220转/分钟(rpm),回转式振荡)下在2R玻璃小瓶中搅动后的外观。

[0061] 图3A到3C显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的rhPTH主峰的RP-HPLC数据。

[0062] 图4A到4C显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的氧化Met8rhPTH杂质的RP-HPLC数据。

[0063] 图5A到5C显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的氧化Met18 rhPTH杂质的RP-HPLC数据。

[0064] 图6A到6C显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的IsoAsp33rhPTH的RP-HPLC数据。

[0065] 图7A到7C显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的rhPTH((1-30)+(1-33))杂质的RP-HPLC数据。

[0066] 图8A到8C显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的rhPTH(1-45)片段杂质的RP-HPLC数据。

[0067] 图9A到9C显示调配于含有50mM NaCl和不同赋形剂的pH 5.5乙酸盐缓冲液中且分别储存在40、25和5℃下的样品的rhPTH主峰的RP-HPLC数据。

[0068] 图10A到10C显示调配于含有50mM NaCl和不同赋形剂的pH 5.5乙酸盐缓冲液中且分别储存在40、25和5℃下的样品的氧化Met8 rhPTH杂质的RP-HPLC数据。

[0069] 图11A到11C显示调配于含有50mM NaCl和不同赋形剂的pH 5.5乙酸盐缓冲液中且

分别储存在40、25和5℃下的样品的氧化Met18 rhPTH杂质的RP-HPLC数据。

[0070] 图12A到12C显示调配于含有50mM NaCl和不同赋形剂的pH 5.5乙酸盐缓冲液中且分别储存在40、25和5℃下的样品的IsoAsp33 rhPTH杂质的RP-HPLC数据。

[0071] 图13显示根据本公开的各种实施例的rhPTH调配物的冻干饼的外观。

具体实施方式

[0072] 本文公开本发明的详细实施例;然而,应明了所公开的实施例仅说明可以各种形式体现的发明。另外,结合本发明的各种实施例给出的每个实例意欲是说明性的而非限制性的。因此,本文所公开的特定结构和功能性细节不应被解释为具限制性,而仅仅解释为教示所属领域的技术人员以各种方式使用本发明的代表性基础。

[0073] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术的一般人员通常所了解的含义相同的含义。

[0074] 如在本说明书和随附权利要求书中所用,单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“所述”包括多个指示物,除非本文清楚地另作指明。因此,例如,提及“方法”时包括一或多种方法、和/或本文所述类型和/或所属领域的技术人员在阅读本公开后当明了的步骤。

[0075] 如在本申请案中所用,术语“约(about)”和“近似(approximately)”是用作等效物。本申请案中与或不与约/近似一起使用的任何数字意味着涵盖相关技术中的一般人员所明了的任何正常波动。如本文所用,当应用于一或多个所关注值时,术语“近似”或“约”是指与所述参考值类似的值。在某些实施例中,术语“近似”或“约”是指以所述参考值的任一方向(大于或小于)落在25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的一系列值,除非另作说明或以其它方式从上下文显而易见(除非这类数字超过可能值的100%)。

[0076] 如本文所用,术语“载剂”和“稀释剂”是指可用于制备药学调配物的药学上可接受(例如,投与人类是安全且无毒的)的载剂或稀释物质。示例性稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。

[0077] 术语“治疗(treat/treatment)”状态、病症或病况包括:(1)预防、延迟或降低在可能罹患或易患所述状态、病症或病况但尚未经历或呈现所述状态、病症或病况的临床或亚临床症状的个体的所述状态、病症或病况的至少一种临床或亚临床症状的出现的发生率和/或可能性;或(2)抑制所述状态、病症或病况,也就是说,阻止、减少或延迟疾病或其复发或其至少一种临床或亚临床症状的发展;或(3)缓解疾病,也就是说,导致所述状态、病症或病况或其临床或亚临床症状中的至少一者的消退。对待治疗的个体的益处是统计学上显著的或至少是患者或医生可察觉的。

[0078] 如本文所用,“个体(subject)”或“患者”或“个体(individual)”或“动物”是指人类、兽医动物(例如,猫、狗、牛、马、羊、猪等)和疾病的实验动物模型(例如,小鼠,大鼠)。在一个优选的实施例中,个体为人类。

[0079] 如本文所用,应用于剂量或量的术语“有效”是指化合物或药学组合物的量足以在投与有需要的个体时产生所需活性。应注意,当投与活性成分的组合时,所述组合的有效量可能包括或可能不包括若单独投与将是有效的每种成分的量。所需的精确量将因个体而

异,取决于个体的物种、年龄和一般情况、所治疗病况的严重度、所用的特定药物、投药模式等。

[0080] 如与本发明的组合物结合使用,短语“药学上可接受”是指这些组合物的分子实体和其它成分,其在生理上是可耐受的并当投与哺乳动物(例如人类)时通常不产生不良反应。优选地,如本文所用,术语“药学上可接受”意味着由联邦或州政府管理机构批准或在美国药典或其它公认药典中列出用于哺乳动物中,且更特别用于人类中。

[0081] 与市售的rhPTH(1-84)调配物相比,根据本发明的组合物具有经改进的rhPTH(1-84)的使用中稳定性。如本文所用,术语“使用中”是指在多剂量容器打开后可使用多剂量调配物同时保持量在可接受的规格内的时间段。因此,“使用中稳定性”是指在使用中时间多剂量调配物的稳定性。在本发明的一些实施例中,使用中时间为7天。在本发明的一些实施例中,使用中时间为14天。在本发明的一些实施例中,使用中时间为21天。在本发明的一些实施例中,使用中时间为一个月。

[0082] rhPTH(1-84)

[0083] 本文所公开的组合物并有作为活性成分的人类甲状旁腺素的84个氨基酸的全长形式,其是以重组方式,通过肽合成或通过从人类体液提取而获得的。在本说明书中,PTH的重组人类形式缩写为rhPTH(1-84),其具有由木村(Kimura)等人,生化与生物物理学研究通讯(Biochem Biophys Res Comm),114(2):493报道的氨基酸序列。

[0084] 作为PTH的全长人类形式的替代,本发明的组合物可并有人类PTH的那些同源物、片段或变体,所述同源物、片段或变体具有PTH活性,如在坎摩尔(Kimmel)等人,内分泌学(Endocrinology),1993,32(4):1577中报道的卵巢切除大鼠骨质疏松症模型中测定并以引用的方式并入本文中。

[0085] 在一个方面中,本发明的甲状旁腺素组合物以单一单位或多单位液体剂型提供,呈用于注射的激素水溶液,其不需要任何复水、稀释或混合。

[0086] 在一个方面中,本发明的甲状旁腺素组合物以含有不超过3%水(以重量计)的冻干粉末剂型提供,所述冻干粉末剂型是由冷冻干燥通过混合所选的甲状旁腺素、非挥发性缓冲剂和赋形剂制得的无菌激素水溶液得到的。

[0087] 本发明的PTH组合物并有治疗有效量的PTH,治疗有效量是与治疗上有用或可用于医学诊断中的参考量使用的术语。并入制备物中的甲状旁腺素的特定量可根据所选PTH的类型及根据制备物的所欲最终用途预先确定。在一个方面中,所述组合物被用于治疗目的,及特别用于治疗骨质疏松症和相关骨骼疾病、以及甲状旁腺功能减退症。在一个方面中,此种疗法需要通过注射(例如,皮下注射)以反映规定治疗方案的单位剂量投与液体和/或经复水的冻干组合物。在一个实施例中,治疗方案可包括投与重组人类PTH(1-84),其范围为每个患者约0.01mg PTH/mL注射溶液到5mg PTH/mL注射溶液,注射体积为(例如)约0.3mL到约2.3mL、或约0.5mL到约2mL、或约1mL到约1.75mL、或约1.2mL、或约1.3mL、或约1.4mL、或约1.5mL、或约1.6mL、或约1.7mL。因此,在一个实施例中,将纯化并无菌过滤的PTH与缓冲剂和赋形剂一起并入以形成含有PTH的水溶液,浓度范围为0.01mg/mL到5mg/mL、或约0.02mg/mL到约2.5mg/mL、或约0.025mg/mL到约1mg/mL、或约0.025mg/mL到约0.5mg/mL、或约0.025mg/mL到约0.25mg/mL。在一个实施例中,将PTH与缓冲剂和赋形剂一起并入以形成含有PTH的水溶液,以一浓度范围,或约0.025mg/mL、或约0.05mg/mL、或约0.075mg/mL、或约0.1mg/mL。

[0088] 若需要,可类似地并入摩尔当量的基本上等效PTH形式(如PTH(1-84)变体和片段)替代人类PTH(1-84)。

[0089] 在一些实施例中,本发明的组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂和/或载剂。适合的赋形剂的实例提供于帕马克斯(Pramanick,S.)等人,胃肠外调配物开发中的赋形剂选择(Excipient Selection in Parenteral Formulation Development),药学时报(Pharma Times),2013,45,3,65-77中,其内容是以其全文引用的方式并入本文中。适合的赋形剂的非限制性实例如下所示。

[0090] 表面活性剂

[0091] 在一些实施例中,本文所公开的调配物进一步包含表面活性剂。在一些实施例中,表面活性剂可选自泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188)、聚乙二醇、十六烷基羟乙基纤维素、疏水改性的羟乙基纤维素、聚氧乙二醇烷基醚、聚氧丙二醇烷基醚、葡糖苷烷基醚、聚氧乙二醇烷基酚醚、甘油烷基酯、聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80)、椰油酰胺单乙醇胺(MEA)、椰油酰胺二乙醇胺(DEA)、十二烷基二甲基胺氧化物、或其任何组合。在一个实施例中,表面活性剂是选自泊洛沙姆-188、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80和聚乙二醇、及其组合。

[0092] 在一个实施例中,表面活性剂为泊洛沙姆。在一个实施例中,表面活性剂为泊洛沙姆-188。

[0093] 表面活性剂可以约0.01%到约20%(以重量计)、约0.01%到约15%、约0.01%到约10%、约0.01%到约5%、约0.02%到约4%、约0.03%到约3%、约0.03%到约1%、约0.05%到约0.5%、约0.1%到约0.5%、约0.1%到约20%、约0.1%到约10%、约0.1%到约5%、约0.1%到约2.5%、0.1%到约1%、或约0.1%到约0.7%、或约0.1%、或约0.2%、或约0.3%、或约0.4%、或约0.5%的浓度存在。在一个实施例中,表面活性剂为泊洛沙姆-188,且其以组合物的约0.3%w/v存在。

[0094] 张力剂

[0095] 在一些实施例中,本公开的组合物进一步包含张力剂。张力是由半透膜隔开的两种溶液的有效渗透压梯度(由两种溶液的水势定义)的量度。在描述浸入外部溶液中的细胞的反应时,通常使用张力。换言之,张力是确定扩散的方向及程度的溶液相对浓度。体液通常具有对应于0.9%氯化钠溶液的渗透压的渗透压。当组合物的张力约等于0.9%氯化钠溶液的张力(也就是说,290mOsm/kg)时,组合物(例如溶液或凝胶)被认为是等渗的。当组合物与生理溶液之间盐的量值相等时,组合物与体液溶液等渗。通过水移动跨过膜,但盐停留在其原始溶液中,而在生理溶液中达到张力平衡。若在细胞与溶液接触时,没有由所述细胞引起的水的净增加或损失,或所述细胞中没有其它变化,则所述溶液与活细胞等渗。

[0096] 在某些实施例中,用于本文所公开的组合物中的张力剂为电解质、单糖或二糖、无机盐(例如,氯化钠、氯化钙、硫酸钠、氯化镁)、多元醇或其组合。在一些实施例中,张力剂为葡萄糖、蔗糖、氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸钠、氯化镁、右旋糖、甘露醇、甘油或其任何组合。在一个实施例中,张力剂是选自氯化钠、蔗糖和甘油、或其组合。在一个实施例中,张力剂为蔗糖。在一个实施例中,张力剂为氯化钠。在一个实施例中,张力剂为甘油。

[0097] 张力剂可以实现等渗条件所需的任何浓度存在。在一些实施例中,张力剂可以组合物的约0.01%到约50%、约0.01%到约40%、约0.01%到约30%、约0.01%到约20%、约

0.02%到约20%、约0.03%到约20%、约0.05%到约15%、约0.1%到约10%、约0.1%到约20%、约0.1%到约15%、约0.1%到约9%、约0.2%到约10%、0.5%到约10%、或约1%到约10%、或约1%、或约2%、或约3%、或约4%、或约5%、或约6%、或约7%、或约8%、或约9% w/v的浓度存在。在一个实施例中，张力剂为蔗糖，且其以组合物的约0.2%到约20%、或组合物的约8.5%w/v存在。在一个实施例中，张力剂为甘油，且其以组合物的约0.2%到约20%、或组合物的约2.3%w/v存在。在一个实施例中，张力剂为氯化钠，且其以组合物的约0.2%到约20%、或组合物的约0.8%w/v存在。

[0098] 防腐剂

[0099] 在一些实施例中，本公开的组合物是无菌且无防腐剂的。在其它实施例中，本公开的组合物任选地包含防腐剂。在特定实施例中，防腐剂是无对羟基苯甲酸酯防腐剂。对羟基苯甲酸酯是一系列对羟基苯甲酸酯或对羟基苯甲酸的酯且已知会引起细胞因子释放及刺激并与几种类型的癌症相关联。对羟基苯甲酸酯的实例包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸庚酯、对羟基苯甲酸异丁酯、对羟基苯甲酸异丙酯、对羟基苯甲酸苄酯及其钠盐。

[0100] 示例性无对羟基苯甲酸酯防腐剂包括甲基苯酚(甲酚)，包括3-甲基苯酚(间甲酚(meta-cresol/m-cresol))、苯酚、苯乙醇、辛二醇、苯氧基乙醇、山梨酸盐、山梨酸钾、山梨酸钠、山梨酸、苯甲酸钠、苯甲酸、乙酰吗喃(acemannan)、橄榄苦苷、香芹酚、蔓越莓提取物、葡萄糖酸内酯、绿茶提取物、向日葵籽油(Helianthus annuus seed oil)、乳酸杆菌发酵剂、须松萝提取物(Usnea barbata extract)、聚氨基丙基双胍、聚甘油基-3棕榈酸酯、聚甘油基-6辛酸酯、石榴提取物、山杨(Populus tremuloides)树皮提取物、白藜芦醇、迷迭香(Rosmarinus officinalis)叶提取物、苄醇或其任何组合。

[0101] 在一个实施例中，防腐剂是选自间甲酚、苯酚、苄醇、苯甲酸钠和对羟基苯甲酸丙酯、及其组合。在一个实施例中，防腐剂包含间甲酚。

[0102] 在一些实施例中，本公开的组合物可包含防腐剂，其浓度为组合物的约0.005%到约10%(以重量计)、约0.005%到约5%、约0.01%到约5%、约0.02%到约4%、约0.03%到约3%、约0.05%到约2%、约0.1%到约1%、约0.2%到约0.5%、约0.01%到约10%、约0.01%到约5%、约0.01%到约2.5%、约0.01%到约1%、约0.01%到约0.5%、约0.1%到约10%、约0.1%到约5%、约0.1%到约2.5%、约0.1%到约1%、约0.1%到约0.5%、或约0.1%、或约0.2%、或约0.3%、或约0.4%、或约0.5%w/v。在一个实施例中，防腐剂为间甲酚，其以组合物的约0.03%到约3%存在。在一个实施例中，间甲酚以组合物的0.3%存在。

[0103] 药学上可接受的缓冲液

[0104] 在一些实施例中，本发明的组合物可通过并入缓冲剂而包含药学上可接受的缓冲液。在一个实施例中，并入本发明组合物中的缓冲剂是选自那些能够将制备物缓冲到生理上可接受范围内的pH的缓冲剂。生理上可接受的pH是在投与调配物时不会导致患者不适或使患者不适最小化的pH，且因此可视投药模式而加以改变。对于在投与前稀释的制备物，如通过溶解在储备输注溶液中，制备物本身的pH可广泛地改变，例如，从约pH 3到约pH 9。在复水后可直接投与制备物的情况下，将PTH制备物缓冲到3.5到7.5的pH范围内。因此，适合的缓冲液为可将制备物的pH缓冲到目标pH范围内的那些药学上可接受的药剂，并包括乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、L-组氨酸缓冲液、琥珀酸盐缓冲液。

[0105] 尽管任何药学上可接受的缓冲液可适用于根据本发明的调配物，但已令人惊讶地发现，缓冲剂的性质对rhPTH溶液的稳定性具有很大影响。

[0106] 例如，目前以NATPARA®使用的柠檬酸盐缓冲液在环境条件下，在短到24小时的搅动下会导致rhPTH蛋白质微粒形成。然而，搅动24小时，用乙酸盐、磷酸盐和L-组氨酸缓冲液制备的rhPTH溶液则保持澄清、无色且无可见颗粒。

[0107] 为提供根据本发明的甲状旁腺素的使用中稳定的调配物，并入所选的缓冲剂以产生在3.5到6.5的范围内的最终pH，且缓冲液是以约5mM到约50mM的浓度存在。在本发明的一些实施例中，缓冲剂产生的pH是在3.8到6.2的范围内，及缓冲液浓度为约10mM到约30mM。在一个实施例中，调配物的pH为5.5。在一个实施例中，调配物的pH为4.3。在一个实施例中，缓冲液为乙酸盐缓冲液，其以约20mM的浓度存在。在一个实施例中，缓冲液为L-组氨酸缓冲液，其以约20mM的浓度存在。在一个实施例中，缓冲液为琥珀酸盐缓冲液，其以约20mM的浓度存在。

[0108] 抗氧化剂

[0109] 在一些实施例中，本发明的调配物可进一步包含一或多种抗氧化剂，以便在使用中时间为rhPTH蛋白提供氧化稳定性。可能适合的抗氧化剂可包括(但不限于)丙酮亚硫酸氢钠、氩、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸盐(盐/酸)、亚硫酸氢钠、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、半胱氨酸/半胱氨酸盐HCl、二硫亚磺酸钠(亚硫酸氢钠、次硫酸钠)、龙胆酸、龙胆酸乙醇胺、谷氨酸单钠、谷胱甘肽、甲醛次硫酸钠、偏亚硫酸氢钾、蛋氨酸、单硫基甘油(硫基甘油)、氮、没食子酸丙酯、亚硫酸钠、生育酚α、琥珀酸氢α生育酚、硫基乙醇酸钠、或其中两者或更多者的组合。在一个实施例中，抗氧化剂可为蛋氨酸。

[0110] 抗氧化剂可以实现调配物的氧化稳定性所需的任何浓度存在。在一些实施例中，抗氧化剂可以约0.0001％到约20％(以重量计)、约0.001％到约10％、约0.01％到约5％、约0.01％到约2％、约0.02％到约2％、约0.03％到约2％、约0.05％到约1.5％、约0.1％到约1％w/v的浓度存在。在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸，其以组合物的约0.015％到约1.5％的量存在。在一个实施例中，抗氧化剂为蛋氨酸，其以组合物的约0.15％w/v的量存在。

[0111] 新颖冻干调配物

[0112] 在一个方面中，本发明的甲状旁腺素组合物以含有不超过3％水(以重量计)的冻干粉末形式提供，所述冻干粉末剂型是由冷冻干燥通过混合所选的甲状旁腺素、非挥发性缓冲剂和赋形剂制得的无菌激素水溶液得到的。

[0113] 在本发明的一个实施例中，冻干组合物是以在复水于约1到1.5mL(0.7-1.8mL)复水媒剂中时产生约0.05mg/mL到约0.15mg/mL单位剂量的重组人类PTH(1-84)的形式提供，并相应地将约1到1.5mL的PTH制备物水溶液加入到小瓶，以用于随后的冷冻干燥。

[0114] 在本发明的一个实施例中，进行冷冻干燥的PTH制备物包含25到250μg/mL人类PTH(1-84)、约0.3％到约30％w/v增积剂、约0.2％到约20％w/v张力剂、和生理上可接受的缓冲剂，其量能够在无菌水中复水时将制备物缓冲到3.5到6.5的范围内。在本发明的特定实施例中，缓冲剂是以足以将pH缓冲到5.5±0.3、或4.3±0.3的量并入。

[0115] 增积剂

[0116] 在一些实施例中，新颖冻干调配物可进一步包含一或多种增积剂以获得最佳的饼

状结构及外观。可能适合的增积剂包括可相容的碳水化合物、多肽、氨基酸或其组合。适合的碳水化合物可包括单糖，如半乳糖、D-甘露糖、山梨糖等；二糖，如乳糖、海藻糖等；环糊精，如2-羟基丙基-β-环糊精；多糖，如棉子糖、麦芽糊精、葡聚糖等；和醛糖醇，如甘露醇、木糖醇等。适合的多肽包括阿斯巴甜(aspartame)。氨基酸包括丙氨酸和甘氨酸。在一个实施例中，新颖冻干调配物可包含选自甘露醇、甘氨酸、聚(乙二醇)、硫酸铵、蔗糖、海藻糖及其组合的一或多种增积剂。在一个实施例中，新颖冻干调配物可包含甘露醇。

[0117] 增积剂可以实现冻干粉末的最佳结构及外观所需的任何浓度存在。在一些实施例中，增积剂可以组合物的约0.01％到约50％(以重量计)、约0.01％到约40％、约0.01％到约30％、约0.01％到约20％、约0.02％到约20％、约0.03％到约20％、约0.05％到约15％、约0.1％到约10％、约0.1％到约20％、约0.1％到约15％、约0.1％到约9％、约0.2％到约10％、0.5％到约10％、或约1％到约10％、或约1％、或约2％、或约3％、或约4％、或约5％、或约6％、或约7％、或约8％、或约9％w/v的浓度存在。在一个实施例中，增积剂为甘露醇，且其以组合物的约0.2％到约20％、或以组合物的约2％到约8％、或以组合物的约3％w/v、或组合物的约4％存在。

[0118] 冷冻保护剂

[0119] 在一些实施例中，新颖冻干调配物可进一步包含一或多种冷冻保护剂，以在冷冻干燥工艺及产品储存期间为rhPTH蛋白提供稳定性。可能适合的冷冻保护剂包括可相容的碳水化合物，如糖和多元醇。适合的碳水化合物可包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乙二醇、丙二醇、2-甲基-2,4-戊二醇和甘油。在一个实施例中，新颖冻干调配物可包含选自蔗糖、甘氨酸、甘露醇、二糖、聚(乙二醇)及其组合的一或多种冷冻保护剂。在一个实施例中，新颖冻干调配物可包含蔗糖。

[0120] 冷冻保护剂可以实现冻干粉末稳定性所需的任何浓度存在。在一些实施例中，冷冻保护剂可以组合物的约0.01％到约50％(以重量计)、约0.01％到约40％、约0.01％到约30％、约0.01％到约20％、约0.02％到约20％、约0.03％到约20％、约0.05％到约15％、约0.1％到约10％、约0.1％到约20％、约0.1％到约15％、约0.1％到约9％、约0.2％到约10％、0.5％到约10％、或约1％到约10％、或约1％、或约2％、或约3％、或约4％、或约5％、或约6％、或约7％、或约8％、或约9％w/v的浓度存在。在一个实施例中，冷冻保护剂为蔗糖，且其以组合物的约0.2％到约20％、或以组合物的约1％到约8％、或以组合物的约2％w/v、或组合物的约3％存在。

[0121] 剂型

[0122] 组合物可以单剂量或多剂量可注射形式提供，例如以笔形式提供。如已经提及，组合物可通过任何适合的药学方法来制备，所述方法包括使活性成分和载剂(其可由一或多种另外成分组成)接触的步骤。

[0123] 在某些实施例中，药学组合物可与用于施用的装置一起提供，例如与注射器、注射笔或自动注射器(例如Q-cliq笔)一起提供。这些装置可与药学组合物分开提供或预先填充药学组合物。

[0124] 实例

[0125] 以下实例说明本说明书的特定方面。所述实例不应被解释为具限制性，因为所述实例仅提供实施例及其各种方面的特定理解及实践。

[0126] 以下列方式制备调配物:使用所属领域的技术人员通常已知的透析方法将rhPTH(1-84)药物物质(活性药物成分)与各基础调配缓冲液交换。若需要,进一步用酸或碱储液溶液进行溶液pH值调整。赋形剂的储备溶液在基础缓冲液中分别制备,并与透析的肽溶液混合,以获得具有所需肽和赋形剂浓度的最终调配物。将调配物无菌过滤并装入玻璃小瓶或玻璃药筒中。塞住液体调配物并卷封,然后储存。将用于冻干的调配物暴露于预程序化冻干循环,所述循环由冷冻、退火、初级干燥和二级干燥步骤组成,然后进行塞住并卷封。

[0127] 实例1:rhPTH的新颖液体调配物的组成

[0128] 下表1概述根据本发明的rhPTH的新颖液体调配物的示例性实施例。如表1中所示,液体调配物#1到#3具有以下组成:

[0129] 液体调配物#1

[0130] 0.35到1.40mg/mL rhPTH;

[0131] 20mM乙酸盐缓冲液;

[0132] 10mM蛋氨酸;

[0133] 130mM氯化钠;

[0134] 0.3%w/v泊洛沙姆-188,及

[0135] 0.3%w/v间甲酚于水中。

[0136] 液体调配物#2

[0137] 0.35到1.40mg/mL rhPTH;

[0138] 20mM乙酸盐缓冲液;

[0139] 10mM蛋氨酸;

[0140] 8.5%w/v蔗糖;

[0141] 0.3%w/v泊洛沙姆-188,及

[0142] 0.3%w/v间甲酚于水中。

[0143] 液体调配物#3

[0144] 0.35到1.40mg/mL rhPTH;

[0145] 20mM乙酸盐缓冲液;

[0146] 10mM蛋氨酸;

[0147] 2.3%v/v甘油;

[0148] 0.3%w/v泊洛沙姆-188,及

[0149] 0.3%w/v间甲酚于水中。

[0150] 液体调配物#1到#3的pH为5.5。

[0151] 表1:新颖液体调配物或rhPTH的组成

[0152]

液体调配物#	组成
1	rhPTH (0.35 到 1.40 mg/mL) / pH 5.5 的 20 mM 乙酸盐缓冲液、10 mM 蛋氨酸、130 mM 氯化钠、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中
2	rhPTH (0.35 到 1.40 mg/mL)，pH 5.5、20 mM 乙酸盐缓冲液、10 mM 蛋氨酸、8.5% w/v 蔗糖、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中
3	rhPTH (0.35 到 1.40 mg/mL)，pH 5.5、20 mM 乙酸盐缓冲液、10 mM 蛋氨酸、2.3% v/v 甘油、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中

[0153] 实例2:rhPTH的新颖冻干粉末调配物的组成

[0154] 下表2概述根据本发明的rhPTH的新颖冻干粉末调配物的示例性实施例。如表2中所示,冻干调配物#1到#3具有以下组成:

[0155] 冻干调配物#1

[0156] 0.35到1.40mg/mL rhPTH;

[0157] 20mM L-组氨酸缓冲液;

[0158] 4%w/v甘露醇,及

[0159] 2%蔗糖于水中。

[0160] 冻干调配物#2

[0161] 0.35到1.40mg/mL rhPTH;

[0162] 20mM L-组氨酸缓冲液;

[0163] 10mM蛋氨酸;

[0164] 4%w/v甘露醇;

[0165] 2%w/v蔗糖,及

[0166] 0.3%w/v泊洛沙姆-188于水中。

[0167] 冻干调配物#3

[0168] 0.35到1.40mg/mL rhPTH;

[0169] 20mM琥珀酸盐缓冲液;

[0170] 10mM蛋氨酸;

[0171] 3%w/v甘露醇,及

[0172] 3%w/v蔗糖于水中。

[0173] 冻干调配物#1和#2的pH为5.5。冻干调配物#3的pH为4.3

[0174] 表2:新颖冻干调配物或rhPTH的组成

[0175]

冻干调配物#	组成
1	rhPTH (0.35 到 1.40 mg/mL)，pH 5.5、20 Mm L-组氨酸缓冲液、4% w/v 甘露醇和 2% w/v 蔗糖于水中
2	rhPTH (0.35 到 1.40 mg/mL)，pH 5.5、20 mM L-组氨酸缓冲液、10 mM 蛋氨酸、4% w/v 甘露醇、2% w/v 蔗糖和 0.3% w/v 泊洛沙姆-188 于水中
3	rhPTH (0.35 到 1.40 mg/mL)，pH 4.3、20 mM 琥珀酸盐缓冲液、3% w/v 甘露醇和 3% w/v 蔗糖于水中

[0176] 实例3:调配于不同缓冲液中的rhPTH的搅动研究

[0177] 实际药品储存容器/封闭物中或小规模代表性初级容器中的搅动(振荡)通常应用于蛋白质药品的开发,用作在真实工艺中也发生的物理应力条件下的稳定性的测试。这些“应力测试”的总体目的是欲加速蛋白质降解/聚集,否则蛋白质降解/聚集可能会以慢得多的速率发生,从而提高实验产量以加速确定稳定性的关键工艺参数。结果可用于确定调配物开发的关键参数。

[0178] 下表3和图2显示搅动研究的外观数据,其中rhPTH是用不同缓冲液调配的。在2R玻璃小瓶中将rhPTH与氯化钠(140mM)一起调配于不同缓冲液(10mM)中。使用回转式振荡器以220rpm进行搅动研究,其中小瓶处于水平位置,在环境条件下保持至少48小时。根据定期搅动时间间隔,根据概述于(例如)欧洲药典5.0,2.2.1.液体中的澄清度及乳浊度(Clarity and Degree of Opalescence in Liquids)中的标准程序,将搅动的样品的视觉外观与参考悬浮液(RSI-IV)和乳浊度标准液(SOP)进行比较。图1显示参考悬浮液RSI-IV和SOP的乳浊度。提供水用于比较。图2显示调配于不同缓冲液中的rhPTH的悬浮液的外观。

[0179] 表3:搅动研究的rhPTH(调配于不同缓冲液中)在T0时及在搅动4h、8h、24h和48h后的外观数据

[0180]

调配物*	T0	4h	8h	24h	48h
乙酸盐	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	RS II
柠檬酸盐	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	RS I	>SOP
组氨酸	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	RS III

[0181]

磷酸盐	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	澄清、无色且无可见颗粒	RS II

[0182] *用10mM缓冲物质和140mM氯化钠调配rhPTH(1mg/mL);RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液

[0183] 如表3和图2中所示,乙酸盐缓冲液显示抵抗rhPTH中搅动诱导的微粒形成的最佳的稳定性,接着是磷酸盐缓冲液,然后是L-组氨酸缓冲液。所有三种缓冲液均显示比柠檬酸盐缓冲液更优选的稳定性,柠檬酸盐缓冲液目前用于NATPARA®调配物中。

[0184] 实例4:新颖液体调配物中rhPTH的搅动研究

[0185] 下表4显示根据本发明的rhPTH的各种液体调配物的搅动研究的外观数据。液体调配物#1到#3是在双腔药筒中进行调配,并在环境条件下进行搅动研究(220rpm,回转式振荡)。根据定期搅动时间间隔,根据标准程序,将搅动的样品的视觉外观与参考悬浮液(RSI-IV)和乳浊度标准液(SOP)进行比较。还提供商业NATPARA®调配物的数据以用于比较。在不同时间点的乳浊度概述于表4中。

[0186] 表4:搅动研究的rhPTH(调配于不同缓冲液中)在T0时及在搅动5h、24h、48h和72h后的外观数据

[0187]

调配物	T0	5h	24h	48h	72h
液体调配物#1： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM 乙酸盐缓冲液、25 mM 蛋氨酸#、130 mM 氯化钠、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中	澄清且无可见颗粒(W 和 RSI)				
液体调配物#2： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM 乙酸盐缓冲液、25 mM 蛋氨酸#、8.5% w/v 蔗糖、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中	澄清且无可见颗粒(W 和 RSI)				
液体调配物#3： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM 乙酸盐缓冲液、25 mM 蛋氨酸#、2.3% w/v 甘油、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中	澄清且无可见颗粒(W 和 RSI)				
Natpara®	澄清且无可见颗粒(RSII 和 RSIII)	RSIV 和 SOP	>SOP		

[0188] W:水;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液;#用于这些研究中的蛋氨酸浓度为25mM,而非用于新颖液体调配物中的10mM(当在2R小瓶中搅动后,观测到蛋氨酸浓度对rhPTH微粒形成无任何影响)。

[0189] 如表4中所示,所有三种新颖液体调配物#1到#3保持澄清且无可见颗粒至少72小时。相反地,目前的商业调配物显示早在5小时的搅动期中就存在显著颗粒及更高的乳浊度。

[0190] 实例5:新颖冻干调配物中rhPTH的搅动研究

[0191] 下表5显示根据本发明的rhPTH的各种复水冻干调配物的搅动研究的外观数据。冻干调配物#1到#3是在双腔药筒中进行调配,并在环境条件下进行搅动研究(220rpm,回转式振荡)。根据定期搅动时间间隔,然后,根据标准程序,将搅动的样品的视觉外观与参考悬浮液(RSI-IV)和乳浊度标准液(SOP)进行比较。还提供商业NATPARA®调配物的数据以用于比较。在不同时间点的乳浊度概述于表5中。

[0192] 表5:搅动研究的rhPTH(调配于不同缓冲液中)在T0时及在搅动5h、24h、32h、48h和90h后的外观数据

[0193]

调配物	T0	5h	24h	32h	48h	90h
冻干调配物#1： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM L-组氨酸缓冲液、4% w/v 甘露醇和 2% w/v 蔗糖于水中	澄清、无色且无可见颗粒				>SOP	
冻干调配物#2#： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM L-组氨酸缓冲液、4% w/v 甘露醇、2% w/v 蔗糖和 0.3% w/v 泊洛沙姆-188 于水中	澄清、无色且无可见颗粒					
冻干调配物#3： rhPTH (1 mg/mL)，pH 4.3、20 mM 琥珀酸盐缓冲液、3% w/v 甘露醇和 3% w/v 蔗糖于水中	澄清、无色且无可见颗粒					
Natpara®	澄清且无可见颗粒(RSII 和 RSIII)	RSIV 和 SOP	>SOP			

[0194] *在搅动之前，用0.3％w/v间甲酚复水调配物；RS：参考悬浮液；SOP：乳浊度标准液；#在振荡研究期间未将蛋氨酸(10mM)并入此调配物中(观测到在含有新颖液体调配物的2R小瓶中搅动后蛋氨酸浓度对rhPTH微粒形成无任何影响)。

[0195] 如以上实例所示，可观测到新颖冻干调配物显著改进rhPTH的物理稳定性。如以上所示，rhPTH的新颖调配物保持澄清、无色且无可见颗粒至少24小时、和/或至少48小时、和/或至少72小时、和/或至少90小时。

[0196] 实例6：液体和冻干调配物的使用中稳定性研究

[0197] 下表6显示根据本发明的一个实施例的液体调配物的使用中研究的外观数据(如以液体调配物#2为例)及根据本发明的一个实施例的rhPTH的复水冻干调配物(如以冻干调配物#2为例)。

[0198] 表6：在使用中时间的第1天、第7天、第14天、第21天的液体调配物#2和冻干调配物#2的使用中外观数据

[0199]

调配物	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
液体调配物#2： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM 乙酸盐缓冲液、10 mM 蛋氨酸、8.5% w/v 蔗糖、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间
冻干调配物#2： rhPTH (1 mg/mL)，pH 5.5、20 mM L-组氨酸缓冲液、10 mM 蛋氨酸、4% w/v 甘露醇、2% w/v 蔗糖、0.3% w/v 泊洛沙姆-188 和 0.3% w/v 间甲酚于水中*	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间	澄清且无可见颗粒，乳浊度在 RSI 与 RSII 之间

[0200] *在开始使用之前用含有0.3％w/v间甲酚的注射用水将样品复水

[0201] 如上表6所示，rhPTH的新颖液体和冻干调配物(如以液体调配物#2和冻干调配物#2为例)保持澄清、无色且无可见颗粒长达至少1天、或至少7天、或至少14天、或至少21天的使用中时间。

[0202] 实例7：溶液pH筛选rhPTH的最佳的物理化学稳定性

[0203] 将重组人类甲状旁腺素调配在含有140mM氯化钠的10mM柠檬酸缓冲液(溶液pH范围为3.5到7.5，pH间隔为0.5个单位)中。将样品等分于2mL I型硼硅酸盐玻璃小瓶中并在5±3℃(5℃)、25±2℃(25℃)和40±2℃(40℃)的温度条件下放置稳定。以预定时间间隔，取出样品，观测外观，并使用适当的色谱法检定(尺寸排除色谱法(SEC)和反相色谱法(RP-HPLC))进行一些修改来分析rhPTH稳定性。

[0204] 将所供应的药物物质材料解冻并在2kDa截止分子量(MWCO)透析盒中用相应pH缓冲溶液透析。在5±3℃下进行透析并在约24小时的时间内包括至少3个循环的缓冲液交换。透析后，检定样品的pH及若需要用0.2N氢氧化钠调整。进行A280测量并使用0.584(mL.mg)

$^{1}cm^{-1}$的消光系数计算rhPTH浓度。在层流罩中无菌完成最终溶液制备。对于各溶液pH，通过使用相应缓冲液作为稀释介质，制备1.0mg/mL浓度的rhPTH。将所制得的样品透过0.22μm PVDF过滤膜过滤，以1.5mL体积填充于2mL I型硼硅酸盐玻璃小瓶中，接着塞住/卷封。

[0205] 在灯箱中观测每个小瓶的溶液外观。分离基线样品，等分于聚丙烯管中，并储存在-80℃下。将剩余的小瓶在5、25和40℃下培育。以预定的时间间隔，从各培育条件取出样品小瓶，观测外观，等分于聚丙烯管中，并储存在-80℃下直到分析。使用针对Natpara®验证的检定(包括SEC和RP-HPLC，其中注射体积及注射顺序有一些修改)测试样品的物理及化学变化。

[0206] 为证实物理稳定性，表7和8分别显示储存在40和25℃下6个月的rhPTH稳定性样品的外观结果。在测量时记录对比参考悬浮液的乳浊度。在40℃下储存2周内在pH7.0和7.5样品中可见白色絮凝物样颗粒。此种颗粒形成似乎随着时间从溶液pH的碱性侧到酸性侧进行。到3个月时，储存在40℃下的大多数样品均具有颗粒。储存在25℃下的样品显示与在40℃下所观测到的相同的颗粒形成倾向，但具有较慢的动力学。还注意到颗粒的大小根据溶液pH而不同。经调配在6.5-7.5的pH范围内的样品具有絮凝物，而那些经调配在较低pH下的样品具有细颗粒。储存在5℃下的样品具有澄清、无色、无可见颗粒的初始外观，其在6个月过程中无变化。

[0207] 表7：储存在40℃温度条件下的rhPTH pH筛选样品的外观结果

[0208]

溶液pH	T0	2w	1m	3m	6m
3.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	细颗粒(RSII和RSIII)
4.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	细颗粒(溶液具有轻微的乳浊度)	细颗粒(RSIV)
4.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	细颗粒(溶液具有轻微的乳浊度)	细颗粒(RSIV)
5.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	细颗粒(溶液具有轻微的乳浊度)	细颗粒(RSIV)
5.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	细颗粒(具有澄清溶液背景)	细颗粒(RSIV)
6.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	细颗粒(RSI和RSII)
6.5	CCFVP	CCFVP	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	大絮凝物(RSIII)
7.0	CCFVP	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	大絮凝物(RSIII)
7.5	CCFVP	白色絮凝物(具有澄清溶液背景)	白色絮凝物(具有澄清溶液背景)	白色絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	大絮凝物(RSII)

[0209] CCFVP：澄清、无色、无可见颗粒；RS：参考悬浮液

[0210] 表8：储存在25℃温度条件下的rhPTH pH筛选样品的外观结果

[0211]

溶液 pH	T0	1m	3m	6m
3.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
4.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
4.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
5.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
5.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
6.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
6.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	无可见颗粒(RSI 和 RSII)
7.0	CCFVP	CCFVP	细颗粒到絮凝物(溶液具有轻微的乳浊度)	无可见颗粒(RSIII 和 RSIV)
7.5	CCFVP	CCFVP	白色絮凝物(具有澄清溶液背景)	白色絮凝物(RSII 和 RSIII)

[0212] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒;RS:参考悬浮液

[0213] 为证实化学稳定性,表9提供分别储存在40和25℃下的稳定性样品的蛋白质浓度数据。将样品彻底离心(17,000g,5分钟)并将上清液用于A280测量。进行适当的光散射校正(A320减法)。在40℃下,蛋白质浓度的降低与样品在储存期间形成颗粒的倾向大致相关。对于储存在25℃(表9)和5℃下的样品,未观测到蛋白质浓度随时间的变化。

[0214] 表9:在不同温度条件下储存的rhPTH pH筛选样品的蛋白质浓度结果(mg/mL)

[0215]

溶液 pH	T0	40℃			25℃	
		1m	3m	6m	3m	6m
3.5	1.04	1.04	0.98	0.87	0.97	0.98
4.0	1.06	1.00	0.97	0.59	1.00	0.99
4.5	1.03	1.01	0.94	0.75	1.01	1.00
5.0	1.15	1.11	0.93	0.76	1.02	1.02
5.5	1.10	1.02	0.95	0.58	0.97	0.97
6.0	1.13	1.10	1.05	0.97	1.00	1.02
6.5	1.02	1.09	0.96	0.87	0.98	0.98
7.0	1.03	0.97	0.91	0.73	0.97	0.97
7.5	1.02	0.95	0.65	0.53	0.98	0.98

[0216] 为进一步证实化学稳定性,图3到8显示储存在40、25和5℃下长达6个月的pH筛选样品的rhPTH及相关杂质的RP-HPLC数据。对于40℃储存条件,仅呈现长达1个月的数据,因为之后样品过于降解而不能进行峰积分。

[0217] 主峰:对于所有储存温度观测到主峰的钟形倾向,在pH约5.0-6.0附近具有最大峰值恢复,如图3A到3C中所示。

[0218] 氧化Met8:还观测到Met8的氧化遵循钟形倾向(与主峰一样),其中于储存在40和25℃下时在约4.0-5.5的pH范围内观测到最大Met8氧化。在5℃下,在长达6个月的储存中未观测到倾向,如图4A到4C中所示。

[0219] 氧化Met18:发现Met18氧化速率朝着碱性溶液pH范围是最大的并随着溶液pH变成酸性而逐渐减小。此种倾向主要在40和25℃储存条件下可见,如图5A到5C中所示。

[0220] IsoAsp33:观测到自天冬酰胺33形成异天冬氨酸朝着调配的pH的酸性侧是最小的并观测到随着溶液pH增加超过约5.5而显著增加。此种倾向在所有储存温度下都很明显,如

图6A到6C中所示。

[0221] rhPTH((1-30)+(1-33))：这些rhPTH杂质在以经调配低于pH 5.0及高于pH 6.0的样品储存时显著增加。然而，高于pH 6.0的杂质的增加的程度明显低于在较低pH值下所观测到的程度。观测到杂质的此种增加在5.0-6.0的pH范围内是最小的，如图7A到7C中所示。

[0222] rhPTH(1-45)：观测到在经调配低于pH 5.0的样品中此片段相关杂质显著增加但在介于pH 5.0与7.5之间的样品中无显著变化。在所有储存温度下均观测到此种倾向，如图8A到8C中所示。

[0223] 本实例证实当经调配在3.5到7.5的pH范围中并暴露于热应力时，溶液pH对rhPTH的物理化学稳定性的影响。物理稳定性属性(如使用外观(可见颗粒形成)和SEC(聚集物及片段形成)监测)及化学稳定性属性(如使用RP-HPLC(氧化、脱酰胺化及片段化)监测)表明5.0到6.0的溶液pH范围对于rhPTH的物理及化学稳定性是最佳的。

[0224] 实例8：赋形剂筛选rhPTH的最佳的物理化学稳定性

[0225] 将重组人类甲状旁腺素(rhPTH)在含有20mM乙酸钠缓冲液和50mM氯化钠(NaCl)的pH 5.5的溶液中进行调配。将此基础调配物外加赋形剂储液以实现给定赋形剂的所需目标浓度。将样品在5±3℃(5℃)、25±2℃(25℃)和40±2℃(40℃)的温度条件下放置稳定。在预定时间间隔，取出样品，观测外观，并使用反相色谱法(RP-HPLC)分析rhPTH稳定性。基线(时间0)样品还分别暴露于多个冷冻-解冻循环及回转式搅动并观测溶液外观。

[0226] 静态储存热应力、冷冻-解冻应力及搅动应力的外观数据显示，与其它赋形剂相比，存在精氨酸和更高浓度(≥150mM)的NaCl导致显著程度的可见颗粒形成。RP-HPLC稳定性数据显示在所有培育温度下含有甘氨酸、赖氨酸或精氨酸的样品中氧化Met8和Met18的显著更高浓度。另一方面，具有蛋氨酸的样品显示显著降低的rhPTH氧化速率。搅动研究的结果显示，表面活性剂泊洛沙姆-188的存在阻止振荡时可见颗粒的形成。

[0227] 将所供应的药物物质材料解冻并在2kDa MWCO透析盒中用基础缓冲溶液透析。在5±3℃下进行透析并在约30小时的时间内包括至少3个循环的缓冲液交换。透析后，测试样品的pH及若需要用0.2N氢氧化钠调整。进行A280测量并根据0.584$(mL.mg)^{-1}cm^{-1}$的消光系数计算rhPTH浓度。在层流柜中以无菌方式完成最终溶液制备。对于每种赋形剂，通过使用基础缓冲液作为稀释介质并外加赋形剂储液以实现所需赋形剂浓度，制备1.0mg/mL浓度的rhPTH。另外，间甲酚是在每种调配物中以0.3％(v/v)的水平添加。

[0228] 表10提供用于赋形剂筛选研究的不同调配物的描述。将所制得的样品透过0.22μm PVDF过滤膜过滤，以1.5mL体积填充于2R I型玻璃小瓶中，接着塞住/卷封。在灯箱中观测每个小瓶的溶液外观。将基线样品等分于聚丙烯管中并储存在-80℃下。将剩余的小瓶在5、25和40℃下培育。在预定的时间间隔，从各培育条件取出样品小瓶，观测外观，等分于聚丙烯管中，并储存在-80℃下直到进一步分析。使用针对Natpara验证的检定(包括SEC和RP-HPLC，其中注射体积及注射顺序有一些修改)测试样品的物理及化学变化。

[0229] 将基线样品暴露于重复的冷冻/解冻循环(在-80℃下冷冻5-12小时并在室温下解冻)并在灯箱中观测溶液外观。在环境温度条件下使用回转式振荡器以220rpm水平搅动小瓶中的一组不同的基线样品并在灯箱中根据定期时间间隔观测溶液外观。搅动研究的初步结果用于选择另外调配物，其在2R小瓶和双腔药筒中进一步暴露于回转式搅动。

[0230] 表10：用于rhPTH赋形剂筛选研究中的赋形剂(及浓度)

[0231]

基础调配物	赋形剂
rhPTH (1 mg/mL) + 乙酸盐(20 mM) + 50 mM NaCl + 间甲酚(0.3%)	NaCl (50、150 和 300 mM)
	聚山梨醇酯 20 (0.005%和 0.02%)
	泊洛沙姆 188 (0.3%和 0.1%)
	蔗糖(2%和 8%)
	甘油(2%和 8%)
	甘露醇(50 和 150 mM)
	甘氨酸(50 和 150 mM)
	蛋氨酸(50 和 100 mM)
	精氨酸(50 和 150 mM)
	赖氨酸(50 和 150 mM)

[0232] 下表11到13显示分别储存在40、25和5℃下长达6个月的rhPTH稳定性样品的外观结果。在测量时记录对比参考悬浮液的乳浊度。在40℃下储存时，含有精氨酸(150mM)的样品显示显著存在的蛋白质颗粒，其在2周时出现并随时间保持增加。当储存在40℃下时，具有其它赋形剂的样品具有与基线相当的外观，持续长达3个月。在40℃下储存6个月结束时，大多数样品存在有可见颗粒，具有不同的颜色及乳浊度。类似地，对于在25℃下储存的样品，含有精氨酸(150mM)的溶液为第一个显示颗粒形成的溶液，其直到储存6个月才出现，而所有其它样品保持其基线外观。在5℃下储存的样品在储存3个月结束时具有类似基线的外观，然而，到6个月结束时，许多样品(特别是NaCl、甘油、甘氨酸、赖氨酸和精氨酸)存在有可见颗粒，与25℃下的结果不同。

[0233] 表11:在40℃下储存的rhPTH缓冲液筛选样品随时间的外观结果

[0234]

赋形剂	40℃			
	T0	1m	3m	6m
对照(无间甲酚)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
NaCl (50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
NaCl (150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	白色纤维状蛋白质颗粒(++)
NaCl (300 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	白色纤维状蛋白质颗粒(++)
PS20 (0.005%)	RS I(无颗粒)	CCFVP	CCFVP	CCFVP
PS20 (0.02%)	RS II 和 RS III (颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II 和 RS III (颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II 和 RS III (颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II (颗粒状非蛋白质颗粒)
P-188 (0.3%)	CCFVP	RS I (无颗粒)	W 和 RS I (无颗粒)	CCFVP
P-188 (1%)	CCFVP	RS II 和 RS III (无颗粒)	RS I 和 RS II (无颗粒)	RS I (无颗粒)
蔗糖(2%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
蔗糖(8%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	白色纤维样颗粒(+)
甘油(2%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I(白色纤维样颗粒(++))
甘油(8%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I(白色纤维样颗粒(+))
甘露醇(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (白色纤维样颗粒++)
甘露醇(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (白色纤维样颗粒+)
甘氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	泛黄色彩，少量纤维颗粒(++)
甘氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	泛黄色彩，少量纤维颗粒(++)
蛋氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I 和 RS II (颗粒++)

[0235]

蛋氨酸(100 mM)	CCFVP	CCFVP	RS I 和 RS II (无颗粒)	RS I 和 RS II (颗粒++)
赖氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	可能的颗粒征兆	泛黄色彩，少量絮凝物和纤维颗粒(++)
赖氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	泛黄色彩，少量絮凝物和纤维颗粒(++)
精氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	少量颗粒(+)
精氨酸(150 mM)	CCFVP	RS II 和 RS III (白色蛋白质絮凝物++)	RS II 和 RS III (白色蛋白质絮凝物+++)	RS II 和 RS III (白色蛋白质絮凝物+++)

[0236] RS:参考悬浮液;W:水样外观;CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒

[0237] 表12:在25℃下储存的rhPTH缓冲液筛选样品随时间的外观结果

[0238]

赋形剂	25℃			
	T0	1m	3m	6m
对照(无间甲酚)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
NaCl (50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
NaCl (150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
NaCl (300 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
PS20 (0.005%)	RS I(无颗粒)	CCFVP	CCFVP	CCFVP
PS20 (0.02%)	RS II 和 RS III (可见颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II 和 RS III (可见颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II 和 RS III (可见颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II (可见颗粒状非蛋白质颗粒)
P-188 (0.3%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
P-188 (1%)	CCFVP	RS I 和 RS II (无颗粒)	RS I 和 RS II (无颗粒)	RS II (无颗粒)
蔗糖(2%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
蔗糖(8%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘油(2%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘油(8%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘露醇(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘露醇(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
甘氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
蛋氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
蛋氨酸(100 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
赖氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (少量颗粒 +)
赖氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
精氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
精氨酸(150 mM)	CCFVP	W 和 RS I (无颗粒)	W 和 RS I (无颗粒)	RS III (白色蛋白质絮凝物 +++)

[0239] RS:参考悬浮液;W:水样外观;CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒

[0240] 表13:在5℃下储存的rhPTH缓冲液筛选样品随时间的外观结果

[0241]

赋形剂	5℃			
	T0	1m	3m	6m
对照(无间甲酚)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
NaCl (50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (具有蛋白质颗粒+++)
NaCl (150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	W (具有蛋白质颗粒++)
NaCl (300 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (具有蛋白质颗粒+++)
PS20 (0.005%)	RS I (无颗粒)	CCFVP	CCFVP	CCFVP
PS20 (0.02%)	RS II 和 RS III(可见颗粒状非蛋白质颗粒)	RS I (可见颗粒状非蛋白质颗粒)	RS II 和 RS III (可见颗粒状非蛋白质颗粒)	RS III (可见颗粒状非蛋白质颗粒)
P-188 (0.3%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
P-188 (1%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
蔗糖(2%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
蔗糖(8%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	W (可能的颗粒征兆)
甘油(2%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
甘油(8%)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS III (极细颗粒+)
甘露醇(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (无颗粒)
甘露醇(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
甘氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS II (极细颗粒++)
蛋氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
蛋氨酸(100 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
赖氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
赖氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I (少量颗粒+)
精氨酸(50 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
精氨酸(150 mM)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS III (白色蛋白质絮凝物++)

[0242] RS:参考悬浮液;W:水样外观;CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒

[0243] 为证实化学稳定性,图9到12显示调配于含有50mM NaCl和不同赋形剂的pH 5.5乙酸盐缓冲液中并储存在40、25和5℃下的样品的rhPTH及相关杂质的RP-HPLC数据。呈现样品的结果,其中可进行合理的峰积分而无报告的相对保留时间的变化。

[0244] 主峰:在40和25℃两种储存下,与其它赋形剂相比,含有甘氨酸、赖氨酸和精氨酸的样品显示主峰显著更快地降低。在5℃储存下观测到类似的倾向,参见图9A到9C。

[0245] 氧化Met8和Met18:与其它赋形剂相比,甘氨酸、赖氨酸和精氨酸样品在所有储存温度下显示显著更高氧化程度的氧化Met8和Met18。含有蛋氨酸的样品在所有储存温度下显示Met8和Met18氧化随时间的最小变化,参见图10A到10C(Met8)和11A到11C(Met18)。

[0246] IsoAsp33:在25和40℃储存时,尽管显示含有150和300mM NaCl的样品的IsoAsp33形成速率略低,但赋形剂之间无显著差异是值得注意的(观测到甘氨酸、赖氨酸和精氨酸样品的IsoAsp33水平显著降低且不一致,可归因于在这些样品的色谱图中积分缺失的峰/峰及略微偏移的保留时间的问题),参见图12A到12C。

[0247] 冷冻-解冻(F/T)研究

[0248] 表14显示在2R小瓶中进行重复冷冻-解冻后不同调配物的溶液外观。若观测到可见颗粒,则与乳浊度一起报告。含有150mM NaCl或更高NaCl的样品受到重复F/T的显著影响并发现含有白色纤维状蛋白质样颗粒。含有0.02%PS20的样品由于从一开始就是沙粒状(非蛋白质)颗粒而显示颗粒状外观。含有8%甘油的溶液在每个F/T循环后显示恶化的乳浊度,无任何可见微粒形成。

[0249] 表14:在pH 5.5下用不同赋形剂与20mM乙酸盐缓冲液、50mM NaCl和0.3%间甲酚调配的rhPTH样品在重复冷冻-解冻循环后的外观研究结果(n=3)

[0250]

调配物*	基线	1 F/T	2 F/T	3 F/T
50 mM NaCl,无间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
50 mM NaCl	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
150 mM NaCl	CCFVP	RS II	RS III	RS III (白色纤维蛋白质颗粒)
300 mM NaCl	CCFVP	RS III	RS IV 和 SOP (白色、纤维蛋白质颗粒)	RS IV 和 SOP (白色、纤维蛋白质颗粒)
0.005% PS20	CCFVP	RS I	RS I	RS I 和 II
0.02% PS20	RS III (颗粒状沙粒状颗粒，非蛋白质)	RS III (颗粒状沙粒状颗粒，非蛋白质)	介于 RS III 与 RS IV 之间 (颗粒状沙粒状颗粒，非蛋白质)	RS III (颗粒状沙粒状颗粒，非蛋白质)
0.3% P-188	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I	CCFVP
1% P-188	CCFVP	RS II	RS II	RS I
2%蔗糖	CCFVP	CCFVP	RS I	RS I
8%蔗糖	CCFVP	RS I	RS III	介于 RS II 与 RS III 之间

[0251]

2%甘油	CCFVP	RS I	介于 RS I 与 RS II 之间	RS II
8%甘油	CCFVP	RS II	RS II	RS III
50 mM 甘露醇	CCFVP	RS I	RS I	RS I
150 mM 甘露醇	CCFVP	RS II	RS I	RS I
50 mM 甘氨酸	CCFVP	RS I	RS I	RS I
150 mM 甘氨酸	CCFVP	RS II	RS II	RS I
50 mM 蛋氨酸	CCFVP	RS I	RS I	RS I
100 mM 蛋氨酸	CCFVP	CCFVP	RS I	RS I

[0252] *将赋形剂外加到含有1mg/mL rhPTH、20mM乙酸盐缓冲液、50mM氯化钠和0.3%间甲酚的基础调配物中。CCFVP:澄清、无色且无可见颗粒;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液;W:水样外观。赖氨酸和精氨酸样品由于材料限制而未作研究。

[0253] 搅动研究

[0254] 表15显示在环境条件下以220rpm在水平位置对一式三份2R小瓶进行的搅动研究的外观结果。除PS20(其存在沙粒状颗粒)外,所有样品均在基线下是澄清、无色且无可见颗粒。含有NaCl的样品显示最早的颗粒形成征兆,其速率随着NaCl含量的增加而增加。到24小时,含有150mM NaCl和PS20的样品具有混浊外观。除含有泊洛沙姆-188(P-188)的样品之外

的所有样品在48小时结束时均发展出混浊外观。含有P-188的样品保持其基线外观直到研究结束(72小时)。

[0255] 表15:在pH 5.5下用不同赋形剂与20mM乙酸盐缓冲液、50mM NaCl和0.3%间甲酚调配的rhPTH样品在环境条件下在2R小瓶中以220rpm进行回转式搅动后的外观研究结果(n=3)

[0256]

调配物*	T0	4h	8h	24h	48h	72h
50 mM NaCl，无间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS II 与 RS III 之间	介于 RS IV 与 SOP 之间
50 mM NaCl	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
150 mM NaCl	CCFVP	CCFVP	CCFVP	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
300 mM NaCl	CCFVP	RS III	>SOP	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
0.005% PS20	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	RS I	>SOP	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)

[0257]

0.02% PS20	RS I (颗粒状沙粒状颗粒，非蛋白质)	RS IV	介于 RS IV 与 SOP 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
0.3% P-188	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	介于 W 与 RS I 之间	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间
1% P-188	CCFVP	RSII	介于 RS I 与 RS II 之间	介于 RS I 与 RS II 之间	介于 RS I 与 RS II 之间	介于 RS I 与 RS II 之间
2%蔗糖	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS II 与 RS III 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
8%蔗糖	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS IV 与 SOP 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
2%甘油	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	介于 RS II 与 RS III 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
8%甘油	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS IV 与 SOP 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
50 mM 甘露醇	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
150 mM 甘露醇	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS I 与 RS II 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
50 mM 甘氨酸	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
150 mM 甘氨酸	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS IV	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
50 mM 蛋氨酸	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS I 与 RS II 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
100 mM 蛋氨酸	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS II 与 RS III 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)

[0258] *将赋形剂外加到含有1mg/mL rhPTH、20mM乙酸盐缓冲液、50mM氯化钠和0.3%间甲酚的基础调配物中。CCFVP:澄清、无色且无可见颗粒;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液;W:水样外观。赖氨酸和精氨酸样品由于材料限制而未作研究。

[0259] 根据以上储存稳定性、冷冻-解冻及搅动研究的初步结果，将调配物的范围缩小，其中NaCl、甘露醇、蔗糖和甘油被鉴定为其稳定化/等渗性潜力的赋形剂，以及蛋氨酸和间甲酚分别被鉴定为可减轻氧化及支持多剂量调配物。

[0260] 表16呈现在2R小瓶中在环境条件下以220rpm进行的水平搅动研究的结果，其中从基础调配物除去NaCl。间甲酚的存在导致乳浊度形成明显早于无间甲酚调配物。尽管从基础调配物除去50mM NaCl，但除了含有泊洛沙姆-188的溶液外，所有溶液在48小时振荡结束

时仍然产生混浊外观。还将这些调配物暴露于目前用于商业Natpara®的容器/封闭物中的振荡(1mL硅化药筒,其具有硅化中间及末端橡胶塞及铝密封件,使用1.1mL调配物填料)。观测到类似于在2R小瓶中振荡获得的外观结果的外观结果(表15),其中泊洛沙姆-188显著地防止/延迟颗粒形成。

[0261] 表16:在pH 5.5下用范围缩小的赋形剂与20mM乙酸盐缓冲液(与蛋氨酸和间甲酚一起及不与蛋氨酸和间甲酚一起)调配的rhPTH样品在环境条件下在2R小瓶中以220rpm进行回转式搅动后的外观研究结果(n=3)

[0262]

调配物*	T0	4h	8h	24h	48h	58h
对照(20 mM 乙酸盐)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	介于 RS III 与 RS IV 之间
对照+Met+间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
对照+间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS I 与 RS II 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
对照+Met	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	介于 RS III 与 RS IV 之间
50 mM NaCl	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	介于 RS III 与 RS IV 之间
50 mM NaCl+Met+间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
5%甘露醇	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	介于 RS III 与 RS IV 之间
5%甘露醇+Met+间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS II 与 RS III 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
5%蔗糖	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS III 与 RS IV 之间	介于 RS III 与 RS IV 之间

[0263]

5%蔗糖+Met+间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS I 与 RS II 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
2%甘油	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	>SOP (浑浊)	>SOP (浑浊)
2%甘油+Met+间甲酚	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	>SOP	>SOP (浑浊)
0.3% P-188	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
0.3% P-188+Met+间甲酚	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	介于 W 与 RS I 之间	介于 W 与 RS I 之间	介于 W 与 RS I 之间	介于 W 与 RS I 之间

[0264] *将赋形剂外加到含有1mg/mL rhPTH和20mM乙酸盐缓冲液的基础调配物中。Met:

蛋氨酸(100mM);间甲酚(0.3%);CCFVP:澄清、无色且无可见颗粒;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液;W:水样外观。

[0265] 当在2到8℃下进行振荡时,在表16中研究的所有调配物在72小时时间(2R小瓶)或48小时时间(1mL药筒)结束时保持其基线(澄清)外观。

[0266] 如实例证实,氯化钠、蔗糖、甘露醇和甘油为使rhPTH稳定化的适合的赋形剂。蛋氨酸显示显著抑制肽氧化的高潜力。已发现泊洛沙姆-188在搅动后对于防止可见微粒形成是至关重要的。

[0267] 实例9:针对液体剂型的rhPTH的调配物优化研究

[0268] 将重组人类甲状旁腺素用20mM乙酸盐缓冲液和0.3%w/v间甲酚以pH 5.5调配。此基础调配物用不同水平的蛋氨酸(抗氧化剂)和泊洛沙姆-188(表面活性剂)进行制备,赋形剂在早期调配物筛选(参见实例7)期间被鉴定为对于rhPTH稳定性是至关重要的。为使调配物等渗并进一步改进药品的稳定性,评估氯化钠、蔗糖、甘油和甘露醇。为筛选赋形剂并优化其浓度,将样品暴露于热及搅动应力。对于热应力,将样品在2R I型玻璃小瓶中于5±3℃(5℃)、25±2℃(25℃)和40±2℃(40℃)下放置稳定,并以预定时间间隔,取出样品,观测外观,并使用反相色谱法(RP-HPLC)分析rhPTH稳定性。对于搅动应力,将2R I型玻璃小瓶和1mL硅化双腔药筒中的基线样品分开暴露于回转式搅动并随时间观测溶液外观。

[0269] 在热应力下,在含有50mM、25mM和10mM蛋氨酸的调配物之间观测到rhPTH的氧化曲线之间并无差异。在搅动时,观测到rhPTH溶液中的可见颗粒形成与泊洛沙姆-188的浓度无关。呈NaCl、蔗糖和甘油形式的稳定剂/张力剂是选自在初步赋形剂筛选(参见实例7)期间进行的热及搅动压力下观测到的分子的化学及物理变化的组合。选择稳定剂/张力剂的浓度以获得等渗溶液。总体来说,鉴定针对液体剂型的三种调配物基质:

[0270] a)pH 5.5,20mM乙酸盐缓冲液、10mM蛋氨酸、0.3%w/v泊洛沙姆-188、130mM氯化钠、0.3%w/v间甲酚

[0271] b)pH 5.5,20mM乙酸盐缓冲液、10mM蛋氨酸、0.3%w/v泊洛沙姆-188、8.5%w/v蔗糖、0.3%w/v间甲酚

[0272] c)pH 5.5,20mM乙酸盐缓冲液、10mM蛋氨酸、0.3%w/v泊洛沙姆-188、2.3%v/v甘油、0.3%w/v间甲酚

[0273] 将所供应的药物物质材料解冻并在2kDa MWCO透析盒中用缓冲溶液透析。在5±3℃下进行透析并在约24-48小时的时间内包括至少3个循环的缓冲液交换。透析后,测试样品的pH并若需要用0.2N氢氧化钠调整pH。进行A280测量并根据0.584(mL.mg)$^{-1}$cm^{-1}的消光系数计算rhPTH浓度。在层流罩中无菌完成最终溶液制备。通过使用基础缓冲液作为稀释培养基并外加赋形剂储液以实现所需赋形剂浓度来制备浓度为1.0mg/mL的rhPTH溶液。另外,在每种调配物中添加0.3%w/v水平的间甲酚。

[0274] 蛋氨酸和泊洛沙姆-188浓度优化:表17提供用于蛋氨酸和P-188浓度优化研究的不同调配物的描述。

[0275] 表17:用于蛋氨酸和泊洛沙姆-188(P-188)浓度优化中的调配物

[0276]

基础调配物	每种蛋氨酸(Met)样品中的 P-188 浓度(%)			
	10 mM Met	25 mM Met	50 mMMet	
1 mg/mL rhPTH 于 20 mM 乙酸盐缓冲液和 0.3%间甲酚中	0	0	0	0
	0.1	0.1	0.1	0.3
	0.2	0.2	0.2	0.5
	0.3	0.3	0.3	0.75
	0.5	0.5	0.5	1.0

[0277] 稳定剂/张力剂的优化:表18提供用于评估稳定剂/张力剂对rhPTH稳定性的影响的不同调配物的描述。

[0278] 表18:用于优化稳定剂/张力剂中的调配物

[0279]

基础调配物	赋形剂
1 mg/mL rhPTH 于 20 mM 乙酸盐缓冲液、25 mM 蛋氨酸、0.3% P-188 和 0.3%间甲酚中	无(对照)
	130 mM NaCl
	8.5% w/v 蔗糖
	2.3% v/v 甘油
	250 mM 甘露醇

[0280] 使样品透过0.22μm PVDF过滤膜过滤,以1.5mL体积填充在2R I型玻璃小瓶中(对于搅动)或以1mL体积填充在2R I型玻璃小瓶中(对于储存稳定性),然后塞住/卷封。在灯箱中观测每个小瓶的溶液外观。将表17和表18中的所有基线样品在环境温度条件下使用220rpm的回转式振荡器暴露于水平搅动并在灯箱中根据定期时间间隔观测溶液外观。

[0281] 表17的样品(含有0.3%泊洛沙姆-188与0mM、10mM、25mM和50mM蛋氨酸)和表18的样品还根据储存稳定性进行放置。分离基线样品,等分于聚丙烯管中,并储存在-80℃下。将剩余的小瓶在5、25和40℃下培育。在预定的时间间隔,从各培育条件取出样品小瓶,观测外观,等分于聚丙烯管中,并储存在-80℃下直到分析。使用针对Natpara验证的检定(包括SEC和RP-HPLC,其中注射体积及注射顺序有一些修改)测试样品的物理及化学变化。

[0282] 外观:表19显示当在40、25和5℃下储存长达6个月时具有不同水平的蛋氨酸浓度的rhPTH稳定性样品的外观结果。在研究持续时间内,所有样品均保持澄清、无色且无可见颗粒。

[0283] 表19:具有不同蛋氨酸浓度的rhPTH稳定性样品在不同温度条件下的外观结果

[0284]

调配物	T0	40℃			25℃			5℃	
1 mg/mL rhPTH 于 20 mM 乙酸盐缓冲液、0.3% P-188 和 0.3% 间甲酚中		1m	3m	6m	1m	3m	6m	3m	6m
10 mM Met	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
25 mM Mel	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
50 mM Met	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP

[0285] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒

[0286] 在储存稳定期期间以不同蛋氨酸浓度调配的rhPTH的RP-HPLC数据显示当包括蛋氨酸作为调配物的一部分时肽氧化显著减少。然而,在检定变异性内,在所研究的不同蛋氨

酸浓度中，未观测到Met8和Met18峰的氧化或主峰百分比的显著差异。

[0287] 泊洛沙姆-188浓度的优化

[0288] 使用搅动研究以优化泊洛沙姆-188浓度。表20到22显示2R小瓶(其在环境条件下进行220rpm的水平回转式搅动)中具有不同浓度的泊洛沙姆-188(以不同蛋氨酸含量调配-表17)的样品的视觉外观结果。

[0289] 表20:以不同浓度的泊洛沙姆-188(P-188)和10mM蛋氨酸在pH 5.5下与20mM乙酸盐缓冲液和0.3％间甲酚一起调配的rhPTH样品在环境条件下以220rpm进行回转式搅动后的视觉外观结果(n＝3)

[0290]

P-188 (%)	T0	8h	14h	24h	40h	48h	58h
0 (对照)	CCFVP	CCFVP	>SOP	>SOP			
0.1	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS I 与 RS II 之间(细颗粒)	SOP
0.2	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
0.3	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS II (细颗粒)
0.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS I 与 RS II 之间	>SOP (颗粒)

[0291] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液

[0292] 表21:以不同浓度的泊洛沙姆-188(P-188)和25mM蛋氨酸在pH 5.5下与20mM乙酸盐缓冲液和0.3％间甲酚一起调配的rhPTH样品在环境条件下以220rpm进行回转式搅动后的视觉外观结果(n＝3)

[0293]

P-188 (%)	T0	8h	14h	24h	40h	48h	58h
0 (对照)	CCFVP	CCFVP	>SOP	>SOP			
0.1	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP
0.2	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS II 与 RS III 之间(细颗粒)	>SOP (颗粒)
0.3	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 RS II 与 RS III 之间(细颗粒)	>SOP (颗粒)
0.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	介于 W 与 RS I 之间	>SOP (颗粒)

[0294] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒;RS:参考悬浮液;W:水样外观;SOP:乳浊度标准液

[0295] 表22:以不同浓度的泊洛沙姆-188(P-188)和50mM蛋氨酸在pH 5.5下与20mM乙酸盐缓冲液和0.3％间甲酚一起调配的rhPTH样品在环境条件下以220rpm进行回转式搅动后的视觉外观结果(n＝3)

[0296]

P-188 (%)	T0	8h	14h	24h	40h	48h	58h
0 (对照)	CCFVP	CCFVP	RS I (颗粒)	>SOP			
0.3	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I	CCFVP
0.5	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I	CCFVP
0.75	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	RS I	RS I
1.0	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	>SOP	>SOP
0% P-188 于硅化药筒中	CCFVP	CCFVP	RS I (少许颗粒)	>SOP	>SOP	>SOP	>SOP

[0297]

0.3% P-188 于硅化药筒中	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP

[0298] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液

[0299] 稳定剂/张力剂的选择

[0300] 在rhPTH赋形剂筛选研究(实例8)期间,选择氯化钠(NaCl)、蔗糖、甘油和甘露醇作为适合的赋形剂。根据250到350mOsm/kg的渗透压目标来选择用于未来调配物中的浓度。

[0301] 在所研究的持续时间内所有样品均具有澄清到最低的乳浊度,而无任何可见颗粒存在(表23)。

[0302] 表23:以不同稳定剂/张力剂在pH 5.5的20mM乙酸盐缓冲液中与25mM蛋氨酸、0.3%泊洛沙姆-188和0.3%间甲酚一起调配的rhPTH稳定性样品在不同温度条件下储存时的视觉外观结果

[0303]

调配物	**T0**	**40℃**			**25℃**			**5℃**	
		1m	**3m**	**6m**	**1m**	**3m**	**6m**	**3m**	**6m**
无(对照)	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP
130 mM NaCl	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP
8.5% w/v 蔗糖	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP
2.3 v/v 甘油	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP
250 mM 甘露醇	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	W 和 RS I(无颗粒)	CCFVP

[0304] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒;RS:参考悬浮液;W:水样外观;SOP:乳浊度标准液

[0305] 在20mM乙酸盐缓冲液中以25mM蛋氨酸、0.3%P-188和0.3%间甲酚与不同稳定剂/张力剂一起调配的rhPTH在40、25和5℃下储存时的RP-HPLC数据指示在任何培育温度下使用的不同赋形剂之间的氧化Met8和Met18浓度无显著变化。在5℃储存下观测到相同倾向。对于所有所研究的赋形剂,除了NaCl(其含有显著较少量的IsoAsp33)外,IsoAsp33的形成速率是相似的。当与其它赋形剂相比时,使用NaCl,较低浓度的IsoAsp33以及在NaCl调配物中显著减少的未鉴定的拖尾峰的形成还导致最高主峰峰值恢复。

[0306] 搅动研究:将具有不同稳定剂的调配物(表18)暴露于2R小瓶和硅化药筒中以220rpm在环境条件下的回转式搅动。表24列出在2R小瓶中具有多个重复的一个示例性研究日的视觉外观结果。在一些情况下,个别小瓶的三个重复在搅动期间未显示相同外观概况;报告最差的视觉外观观测结果。

[0307] 当在硅化药筒中以220rpm在环境条件下水平搅动后,所有这些调配物在72小时结束时保持澄清且无可见颗粒。

[0308] 表24:以不同稳定剂/张力剂在pH 5.5下与20mM乙酸盐缓冲液、25mM蛋氨酸、0.3%泊洛沙姆-188和0.3%间甲酚一起调配的rhPTH样品在2R小瓶中在环境条件下以220rpm进行回转式搅动后的视觉外观结果

[0309]

调配物	T0	12h	24h	36h	48h	60h	76h	120h
对照	澄清且无可见颗粒(介于 W 与 RS I 之间)							>SOP (细颗粒)
130 mM NaCl	澄清且无可见颗粒(介于 W 与 RS I 之间)		RS II (细颗粒)	>SOP (细颗粒)	>SOP (细颗粒)	>SOP (细颗粒)	>SOP(细颗粒)	>SOP (细颗粒)
8.5%蔗糖	澄清且无可见颗粒(介于 W 与 RS I 之间)							介于 RS II 与 RS III 之间(浑浊)
2.3%甘油	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	CCFVP	澄清且无可见颗粒(介于 W 与 RS I 之间)	RS III (细颗粒)
250 mM 甘露醇	澄清且无可见颗粒(介于 W 与 RS I 之间)						RS IV(细颗粒)	>SOP (浑浊)

[0310] CCFVP:澄清、无色、无可见颗粒;W:水样外观;RS:参考悬浮液;SOP:乳浊度标准液

[0311] 在所测试的调配物中,对照样品及含有蔗糖和甘油的样品在搅动后显示最佳的视觉外观概况。

[0312] 总而言之,在热应力下,在含有50mM、25mM和10mM蛋氨酸的调配物之间观测到rhPTH的氧化曲线之间并无差异。在搅动后,观测到rhPTH溶液中的可见颗粒形成与泊洛沙姆-188的浓度无关。呈NaCl、蔗糖和甘油形式的稳定剂/张力剂是选自在初步赋形剂筛选(参见实例7)期间进行的热及搅动压力下观测到的分子的化学及物理变化的组合。选择稳定剂/张力剂的浓度以获得等渗溶液。根据热及搅动应力的总体数据,鉴定针对液体剂型的三种调配物基质:

[0313] a)pH 5.5,20mM乙酸盐缓冲液、10mM蛋氨酸、0.3%w/v泊洛沙姆-188、130mM氯化钠、0.3%w/v间甲酚

[0314] b)pH 5.5,20mM乙酸盐缓冲液、10mM蛋氨酸、0.3%w/v泊洛沙姆-188、8.5%w/v蔗糖、0.3%w/v间甲酚

[0315] c)pH 5.5,20mM乙酸盐缓冲液、10mM蛋氨酸、0.3%w/v泊洛沙姆-188、2.3%v/v甘油、0.3%w/v间甲酚

[0316] 这些调配物中rhPTH的目标浓度范围为0.35mg/mL到1.4mg/mL。

[0317] 实例10:用于皮下递送的多剂量冻干rhPTH药品的开发

[0318] 进行再调配研究以明了pH、缓冲液、表面活性剂、稳定剂/增积剂对冻干rhPTH(1-84)的化学及物理稳定性的影响。rhPTH(1-84)的化学稳定性受溶液pH的影响很大,在5.0到6.5的pH范围内观测到最佳的稳定性。较低的pH(4.0-4.5)显著增加rhPTH(1-84)的片段化,同时改进抵抗振荡引起的微粒形成的稳定性。在较高的pH(高于6.5)下,rhPTH(1-84)的复水冻干调配物越来越容易形成微粒。

[0319] 在5.5的最佳的溶液pH下,当与含有柠檬酸盐缓冲液的调配物相比时,含有L-组氨酸和磷酸盐缓冲液的调配物在2R小瓶和硅化药筒中振荡时显示抵抗可见微粒形成的显著改善。将泊洛沙姆-188添加到pH 5.5的L-组氨酸调配物进一步改进rhPTH(1-84)抵抗振荡引起的微粒形成的稳定性。

[0320] pH 4.0到4.3的琥珀酸盐缓冲液还被鉴定为另一候选缓冲液,因为其看起来提供抵抗振荡引起的微粒形成的完全保护,尽管当与pH 5.5的其它缓冲液相比时提供较差的化学稳定性。

[0321] 总体来说,这些筛选研究的结果有助于鉴定三种主要冻干rhPTH(1-84)候选调配物以用于使用目前的商业双腔药筒的进一步的评估。这些调配物的选择主要是根据实时、加速及应力储存稳定性研究的结果以及在用0.3%(v/v)间甲酚溶液于水中复水后的振荡引起的应力的研究的结果。三种冻干候选调配物(它们均需要在使用之前用含有0.3%(w/v)间甲酚的WFI复水)由下列组成:

[0322] 1.含在pH 5.5的20mM L-组氨酸及4%(w/v)甘露醇及2%(w/v)蔗糖中的1mg/mL rhPTH(1-84)

[0323] 2.含在pH 5.5的20mM L-组氨酸及4%(w/v)甘露醇、2%(w/v)蔗糖及0.3%(w/v)泊洛沙姆-188中的1mg/mL rhPTH(1-84)

[0324] 3.含在pH 4.3的20mM琥珀酸盐及3%(w/v)甘露醇及3%(w/v)蔗糖中的1mg/mL rhPTH(1-84)

[0325] 为监测rhPTH(1-84)的化学稳定性,使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)来定量与氧化、脱酰胺化、片段化及其它降解途径相关的杂质。除主要rhPTH(1-84)分子外,使用尺寸排除色谱法(SEC)定量任何高分子及低分子物质。

[0326] 为评估对rhPTH(1-84)的物理压力,采用回转式振荡的搅动并使用视觉外观评估结果。所有调配物用0.3%(v/v)间甲酚溶液于水中复水并使用设定在220rpm下的回转式振荡器在室温下在水平位置进行振荡。

[0327] 使用卡尔费歇尔(Karl Fisher)测量的含水量概述于表25中。除含有100mM氯化钠和5%蔗糖的调配物外,所有调配物均具有均低于2%的含水量。小于2%的含水量应不会引起rhPTH(1-84)的稳定性问题,因为其明显低于商业药品含水量规格。

[0328] 表25:根据卡尔费歇尔的含水量概述

[0329]

调配物描述	含水量
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、30mM NaCl、5%蔗糖	1.0%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、50mM NaCl、5%蔗糖	1.1%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、75mM NaCl、5%蔗糖	1.5%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、100mM NaCl、5%蔗糖	3.4%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、100mM NaCl、8%蔗糖	1.6%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、30mM NaCl、8%蔗糖	0.7%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、50mM NaCl、8%蔗糖	0.9%
0.5mg/mL rhPTH(1-84)、75mM NaCl、8%蔗糖	1.5%

[0330] 根据集体结果,选择具有约-39℃的Tg的由30mM氯化钠和5%(w/v)蔗糖组成的调配物用于初始冻干工作,因为其产生具有低水分含量的适合的饼状外观。

[0331] 冻干的rhPTH(1-84)的再调配研究证实最佳的pH范围为5.0-6.0,此使得hPTH(1-84)的化学降解最小。尽管rhPTH(1-84)在较低pH条件下在25℃和40℃的高温下降解得相当快,但研究还鉴定pH为4.0-4.3的rhPTH(1-84)调配物仍是可能的,因为其在5℃的储存条件下保持化学稳定性长达6个月并显著降低振荡引起的微粒形成。作为广泛冻干调配物筛选研究的结果,加上rhPTH(1-84)的同时进行的液体调配物的开发,选择rhPTH(1-84)的三种主要冻干调配物用于用目前的商业硅化双腔药筒评价。所选的调配物分别根据在25℃和40℃的加速及应力条件下3个月的稳定性、及其在用0.3%(v/v)间甲酚于水中复水后对rhPTH

(1-84)抵抗振荡引起的微粒形成的稳定性的影响。此三种所选调配物为下列：

[0332] 另外优化研究指示添加10mM蛋氨酸显著提高rhPTH(1-84)抵抗调配物2中Met8和Met18残余物氧化及抵抗上述调配物3中的聚集的稳定性。

[0333] ***

[0334] 由于可在不脱离本发明的范围及精神下对上述目标进行各种改变,因此希望将包含于以上描述中或定义于随附权利要求书中的所有目标解释为描述并说明本发明。鉴于上述教示,本发明的许多修改及变动是可能的。因此,本发明意欲包括所有这些替代、修改及变动,所述替代、修改及变动落在随附权利要求书的范围内。

[0335] 本文引述的所有专利、申请案、公开案、测试方法、文献及其它材料之全文是以引用的方式并入本文中,如同实际上存在于本说明书中一样。



图1

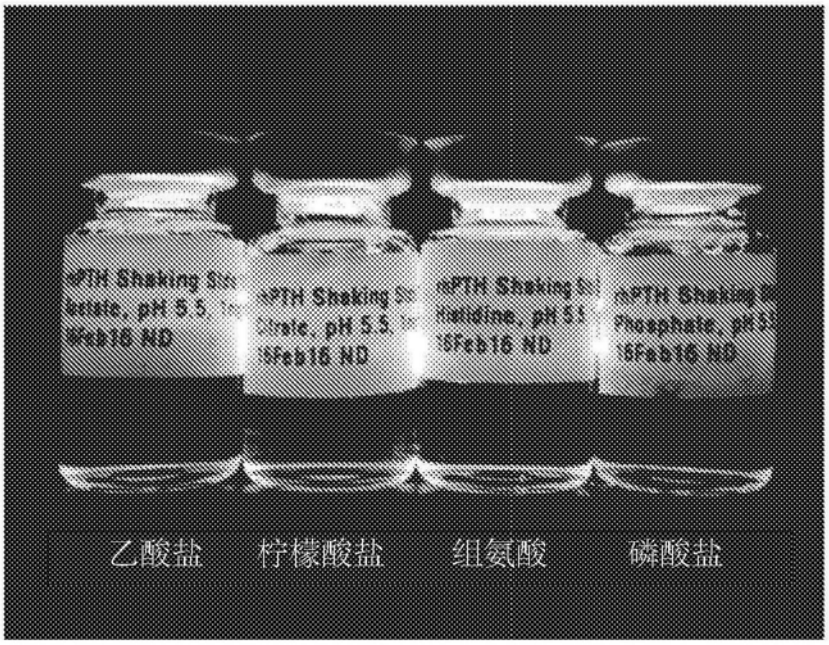


图2

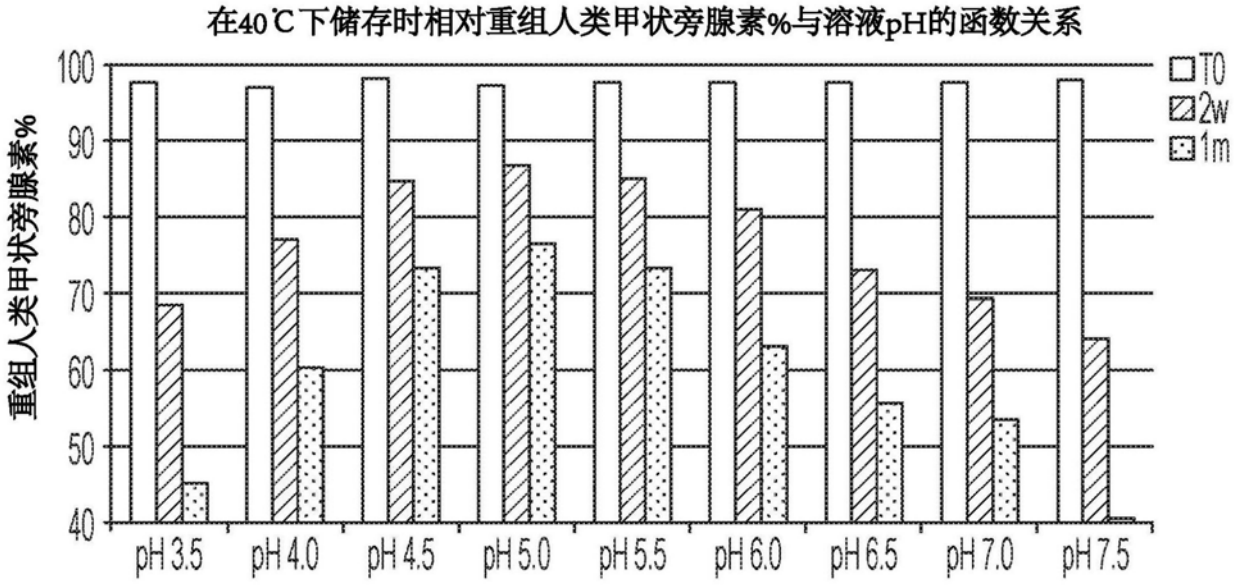

在40℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素%
100
90
80
70
60
50
40
T0
2w
1m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图3A

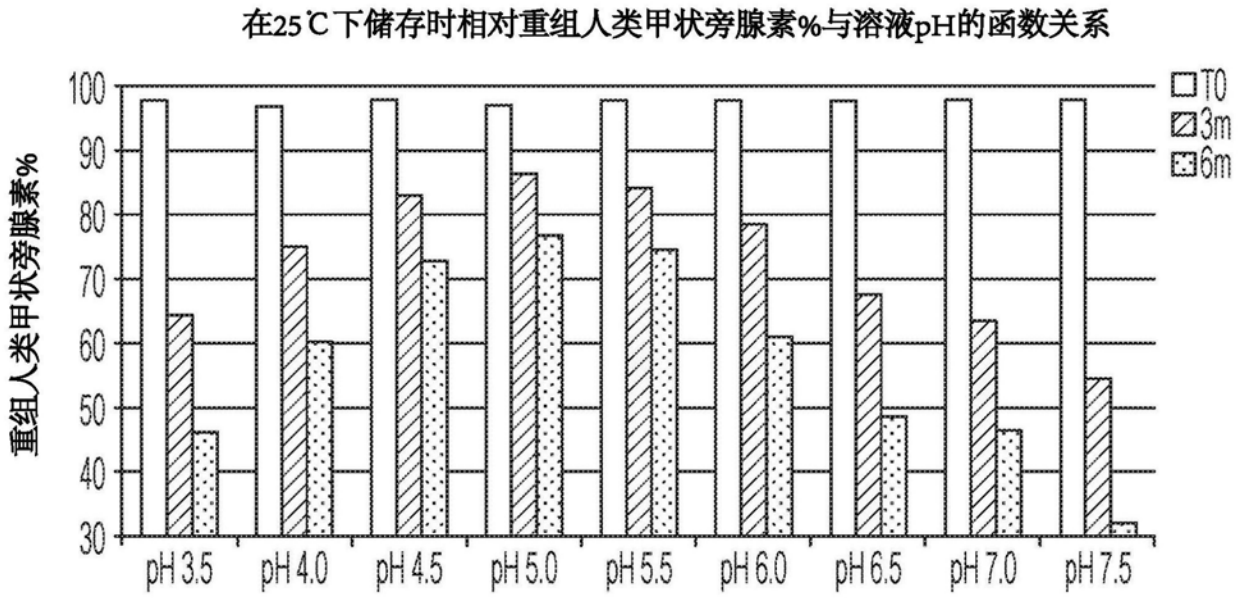

在25℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素%
100
90
80
70
60
50
40
30
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图3B

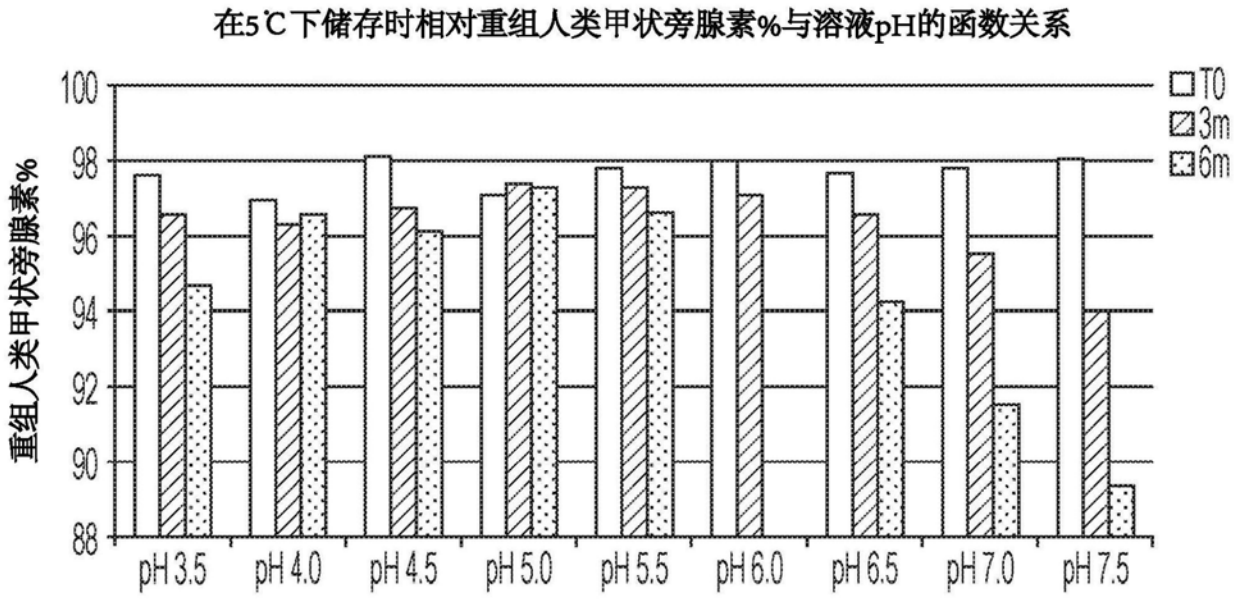

在5℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素%
100
98
96
94
92
90
88
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图3C

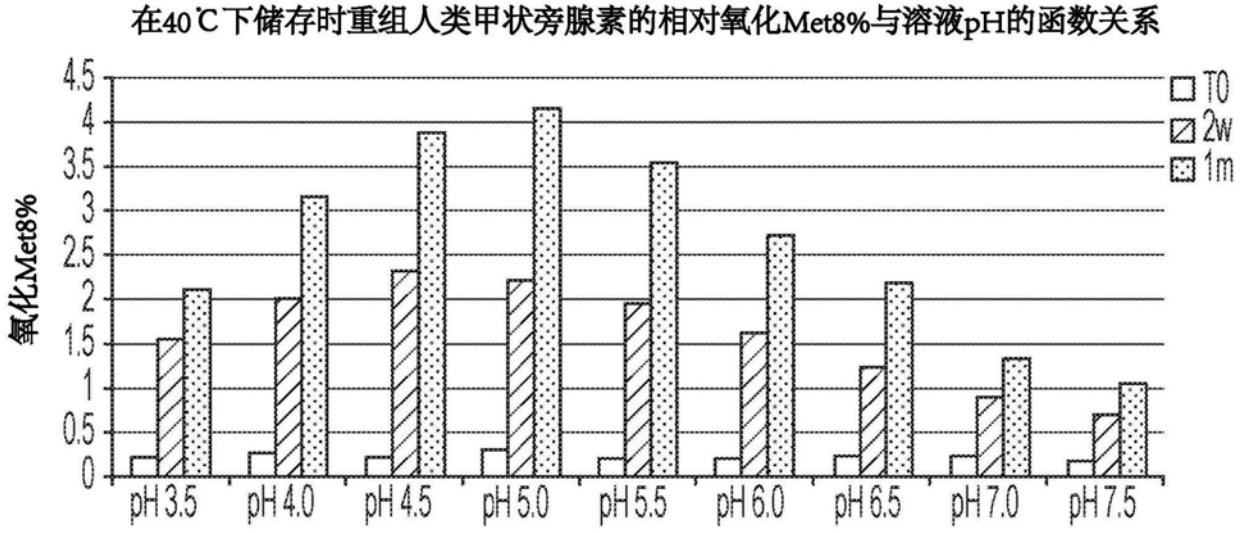

在40℃下储存时重组人类甲状旁腺素的相对氧化Met8%与溶液pH的函数关系
氧化Met8%
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
T0
2w
1m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图4A

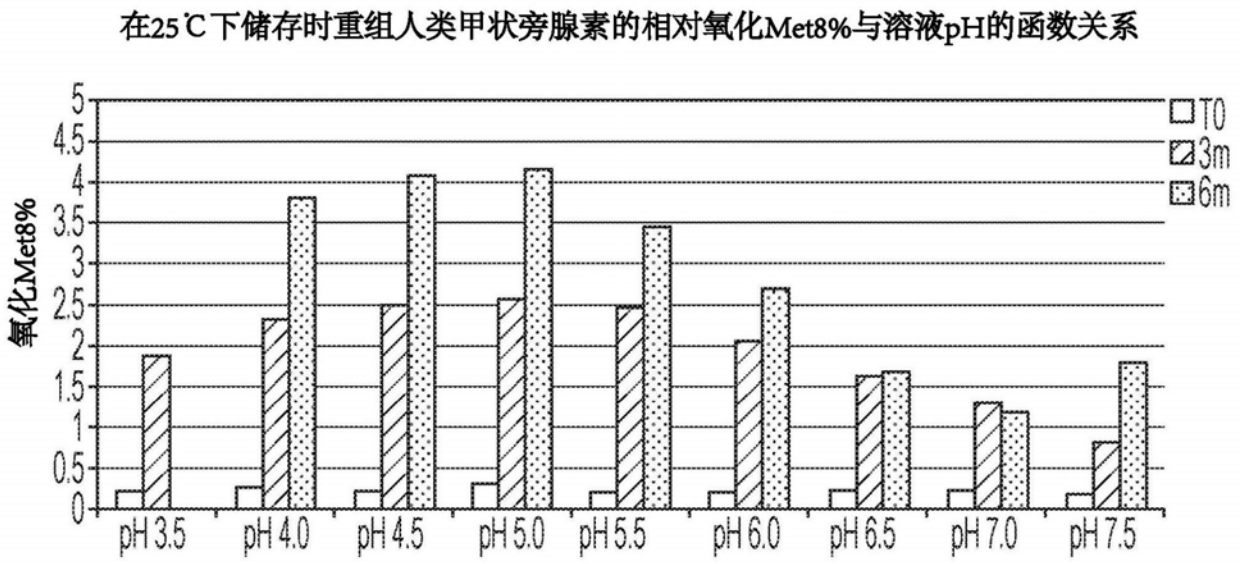

在25℃下储存时重组人类甲状旁腺素的相对氧化Met8%与溶液pH的函数关系
氧化Met8%
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图4B

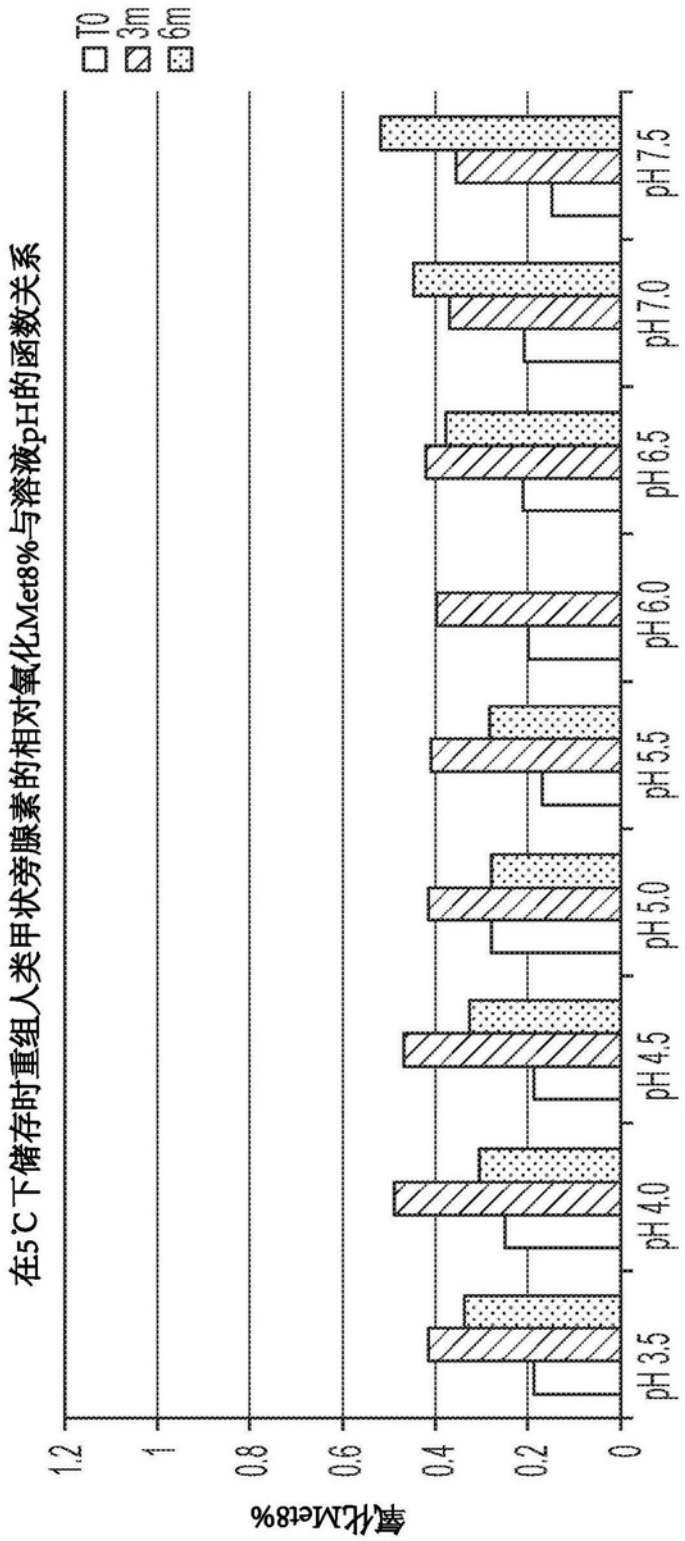

在5℃下储存时重组人类甲状旁腺素的相对氧化Met8%与溶液pH的函数关系
T0
3m
6m
氧化Met8%
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图4C

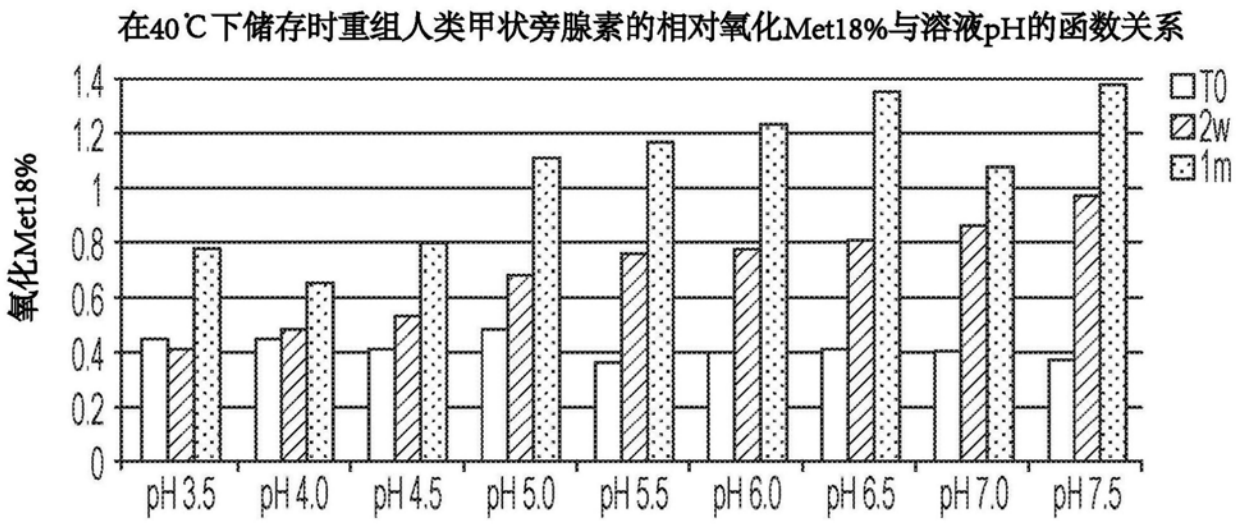

在40℃下储存时重组人类甲状旁腺素的相对氧化Met18%与溶液pH的函数关系
氧化Met18%
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
T0
2w
1m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图5A

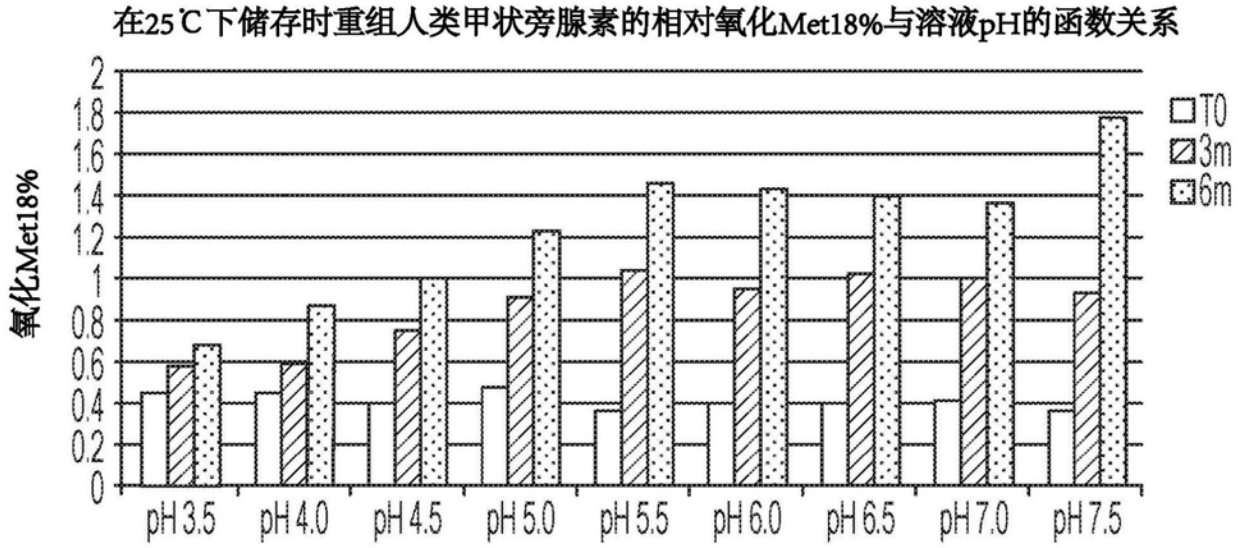

在25℃下储存时重组人类甲状旁腺素的相对氧化Met18%与溶液pH的函数关系
氧化Met18%
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图5B

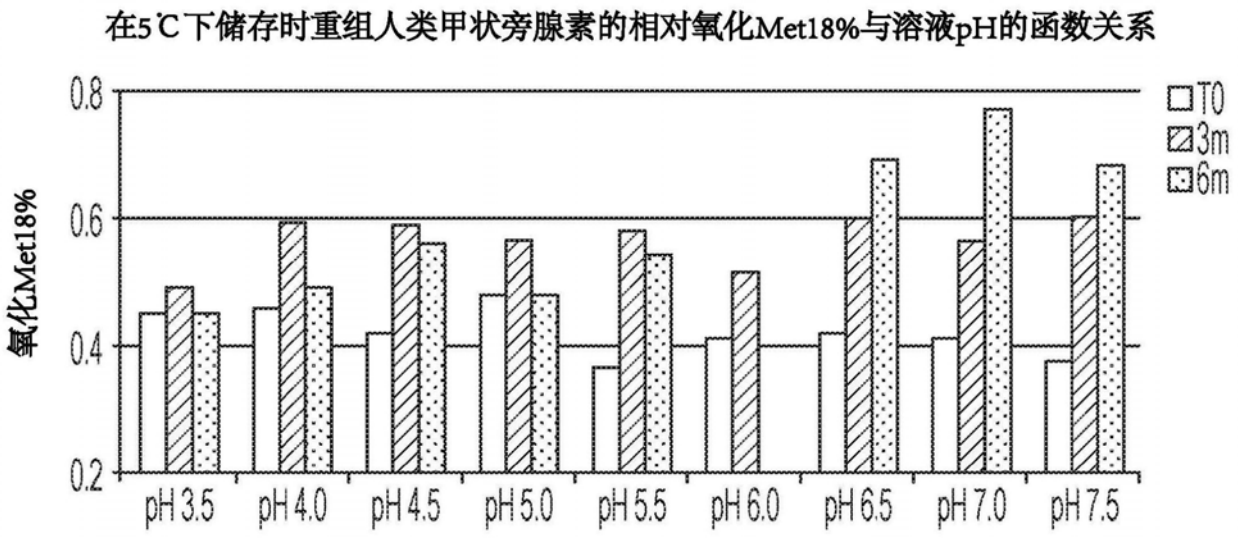

在5℃下储存时重组人类甲状旁腺素的相对氧化Met18%与溶液pH的函数关系
氧化Met18%
0.8
0.6
0.4
0.2
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图5C

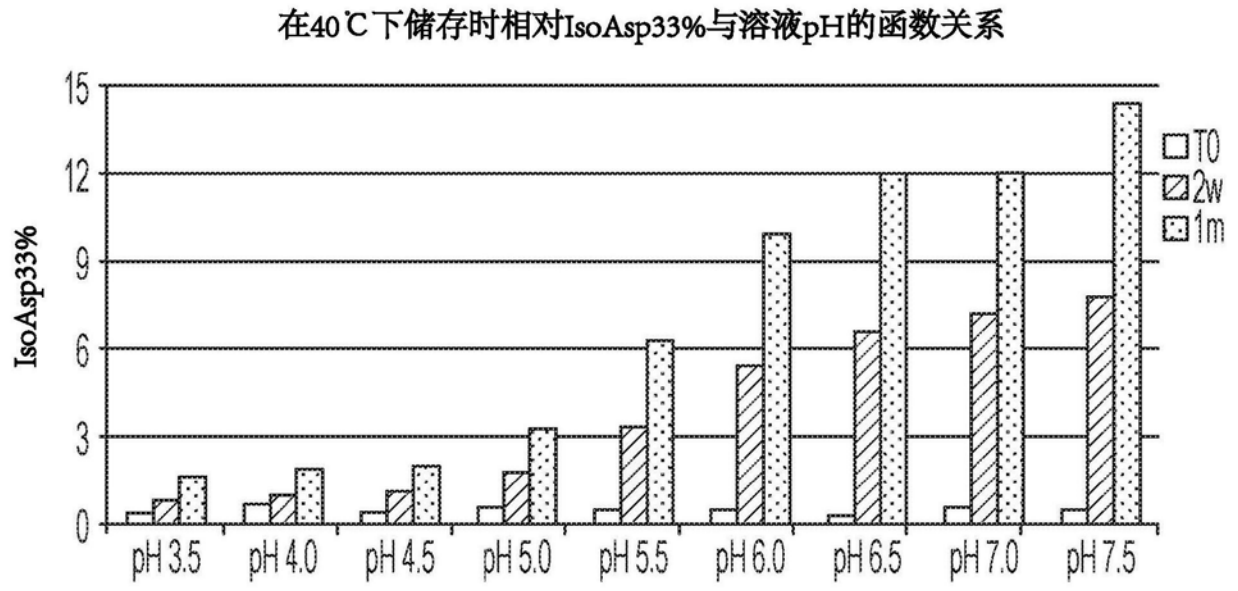

在40℃下储存时相对IsoAsp33%与溶液pH的函数关系
IsoAsp33%
15
12
9
6
3
0
T0
2w
1m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图6A

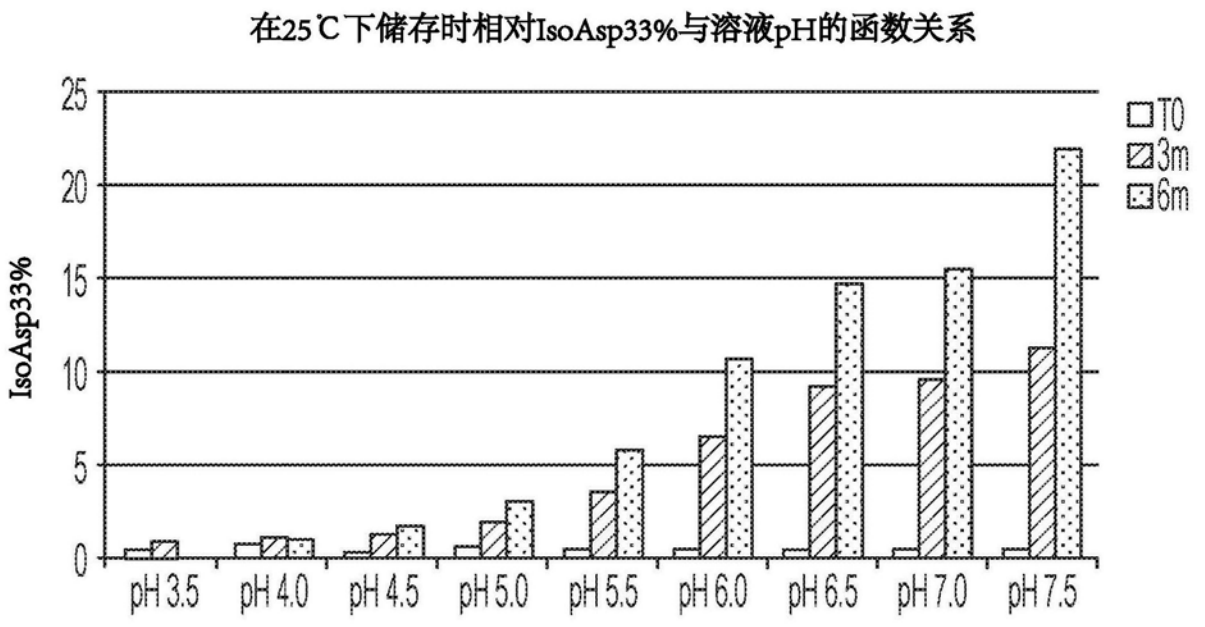

在25℃下储存时相对IsoAsp33%与溶液pH的函数关系
IsoAsp33%
25
20
15
10
5
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图6B

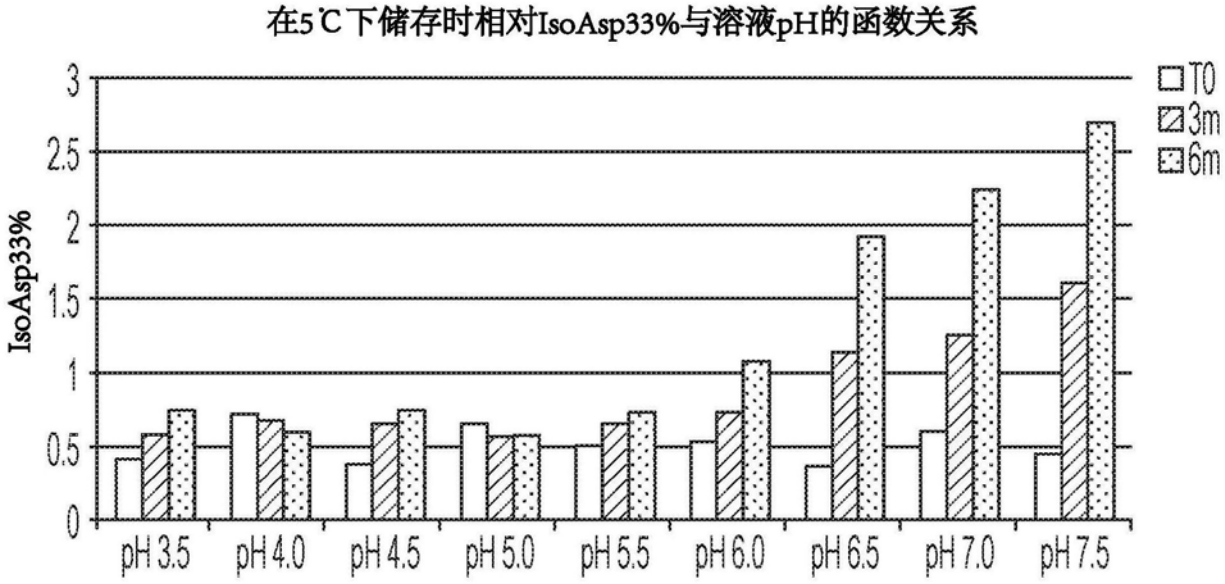

在5℃下储存时相对IsoAsp33%与溶液pH的函数关系
IsoAsp33%
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图6C

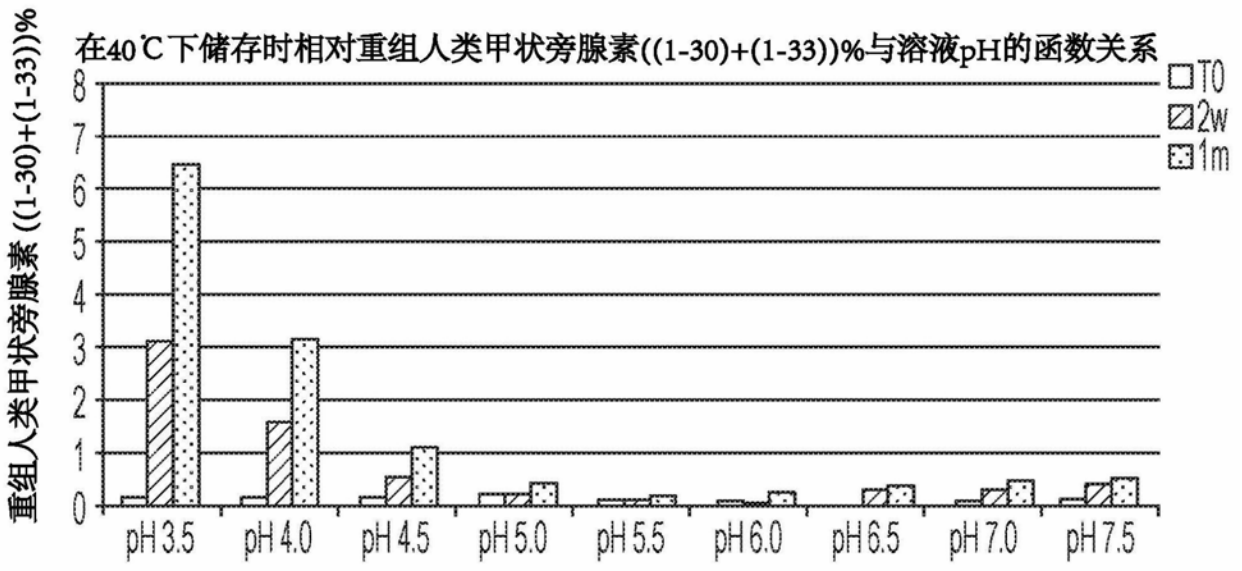

在40℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素((1-30)+(1-33))%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素 ((1-30)+(1-33))%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5
T0
2w
1m

图7A

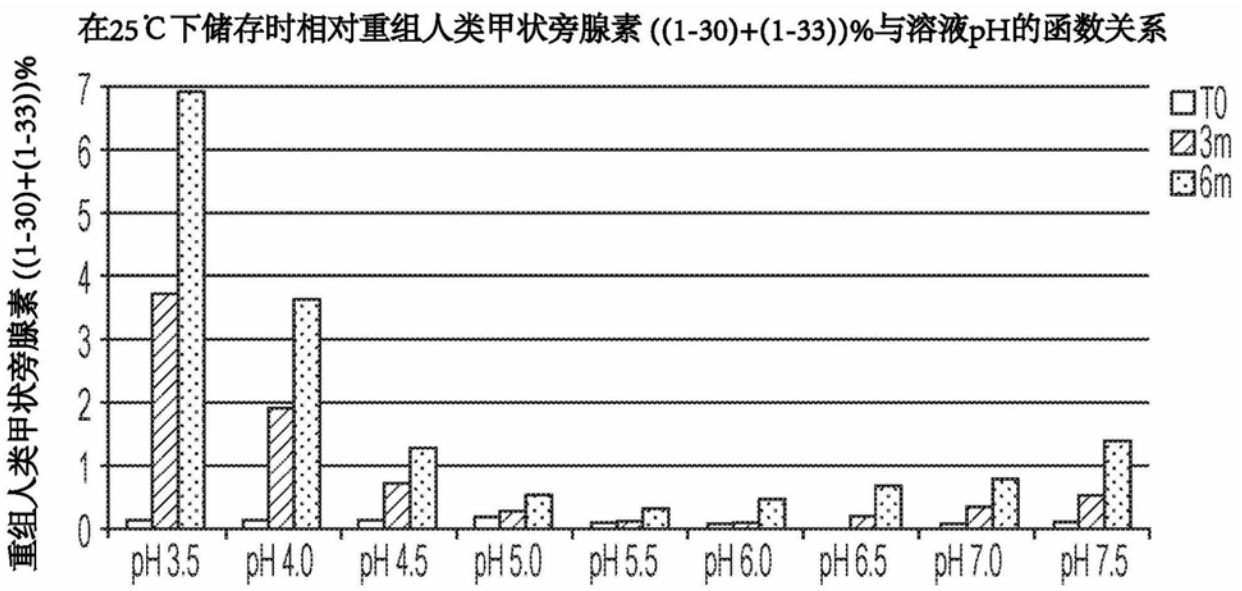

在25℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素 ((1-30)+(1-33))%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素 ((1-30)+(1-33))%
0
1
2
3
4
5
6
7
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5
T0
3m
6m

图7B

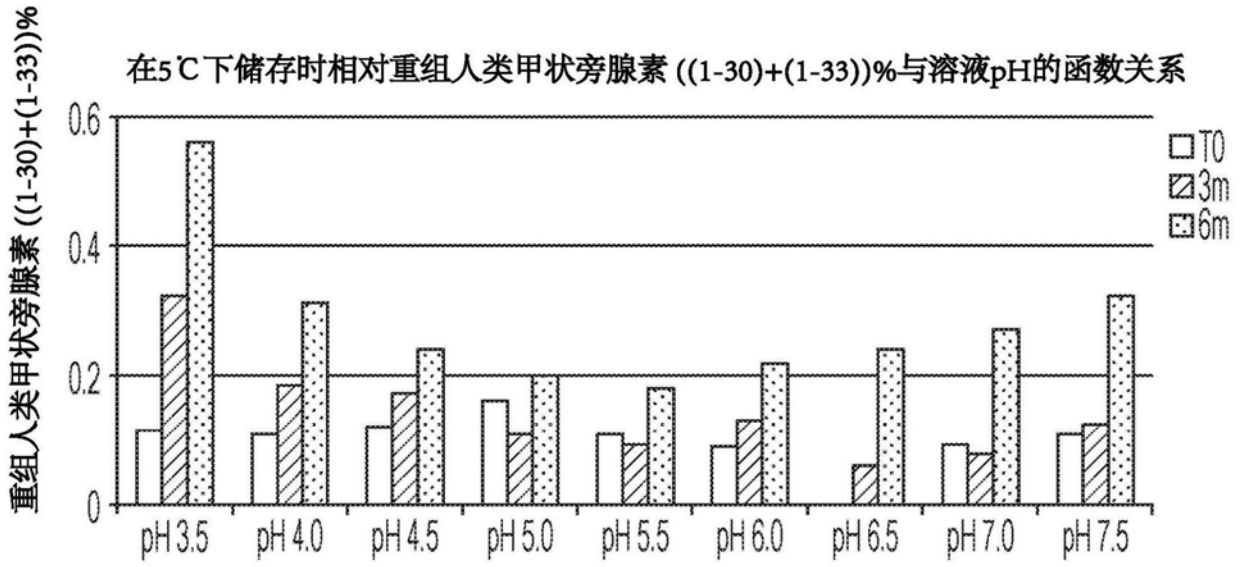

在5℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素 ((1-30)+(1-33))%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素 ((1-30)+(1-33))%
0.6
0.4
0.2
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图7C

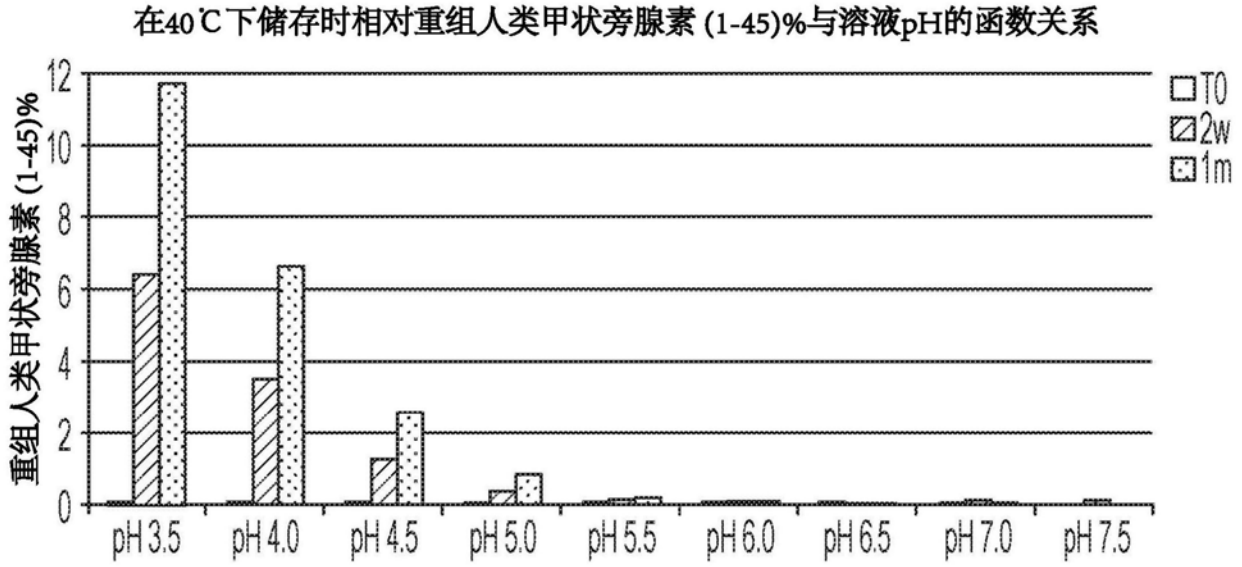

在40℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素 (1-45)%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素 (1-45)%
12
10
8
6
4
2
0
T0
2w
1m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图8A

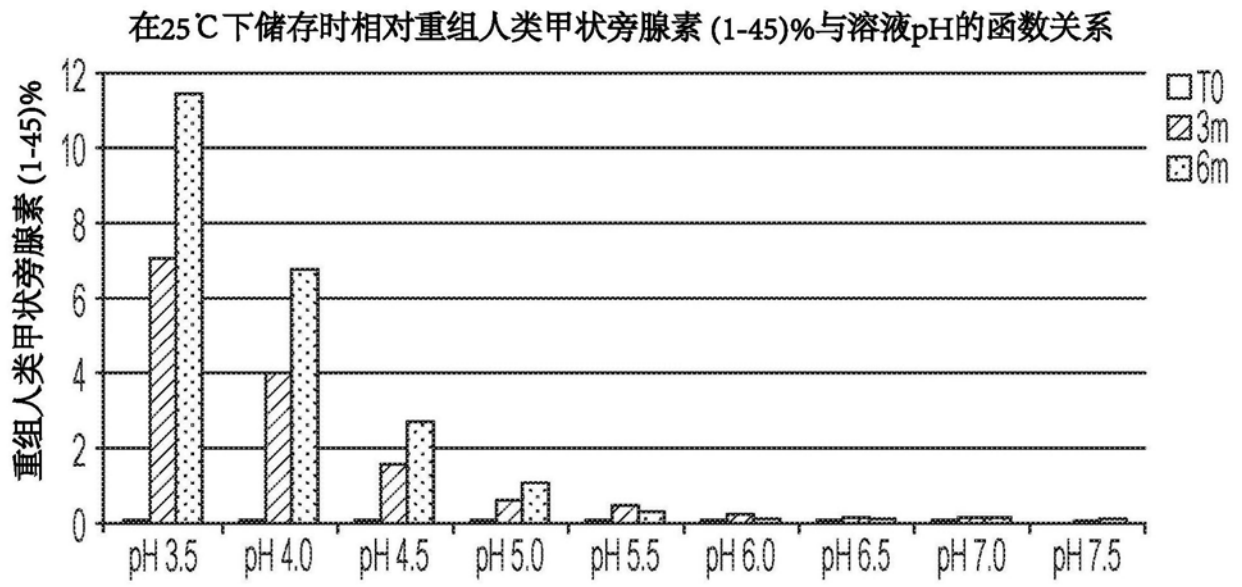

在25℃下储存时相对重组人类甲状旁腺素 (1-45)%与溶液pH的函数关系
重组人类甲状旁腺素 (1-45)%
12
10
8
6
4
2
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图8B

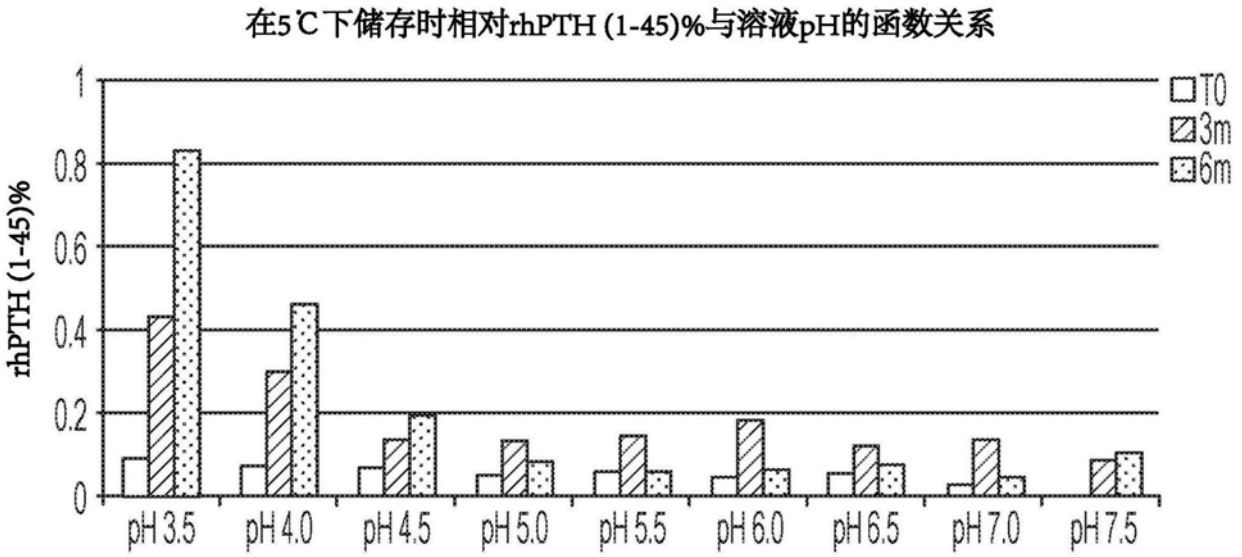

在5℃下储存时相对rhPTH (1-45)%与溶液pH的函数关系
rhPTH (1-45)%
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
T0
3m
6m
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
pH 7.5

图8C

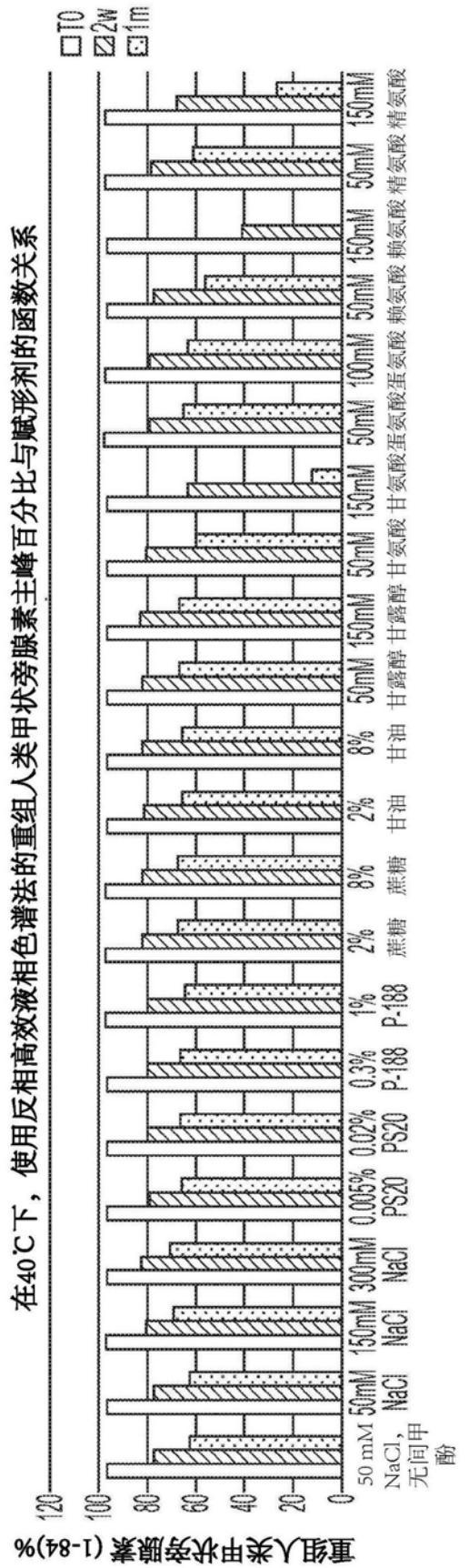

在40℃下，使用反相高效液相色谱法的重组人类甲状旁腺素主峰百分比与赋形剂的函数关系
重组人类甲状旁腺素(1-84)%
T0
2W
1m
120
100
80
60
40
20
0
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图9A

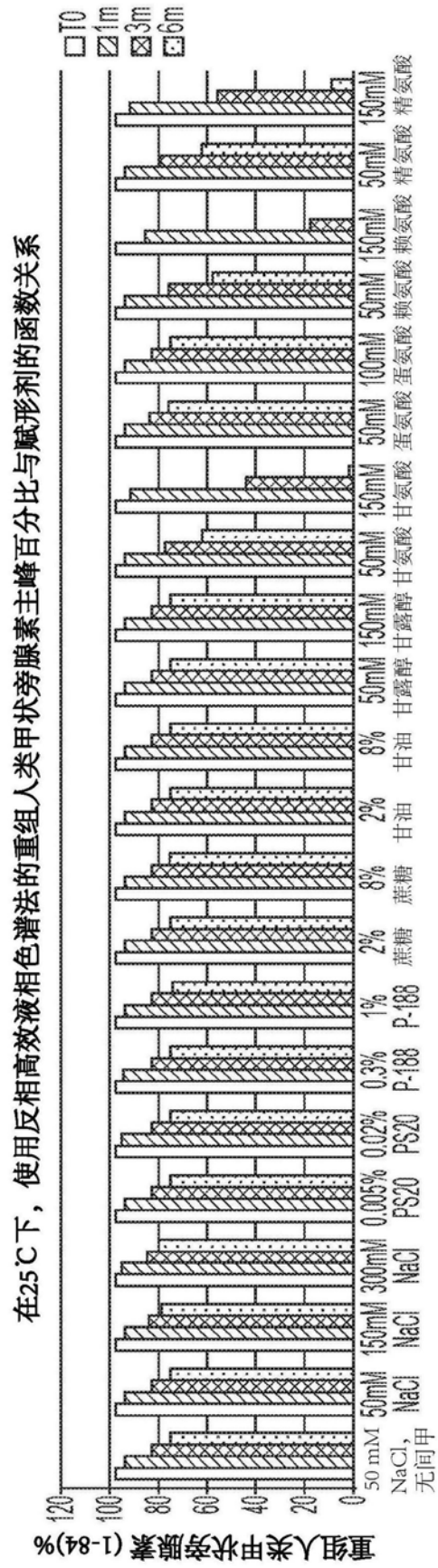

在25℃下，使用反相高效液相色谱法的重组人类甲状旁腺素主峰百分比与赋形剂的函数关系
重组人类甲状旁腺素 (1-84)%
T0
1m
3m
6m
50 mM NaCl, 无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图9B

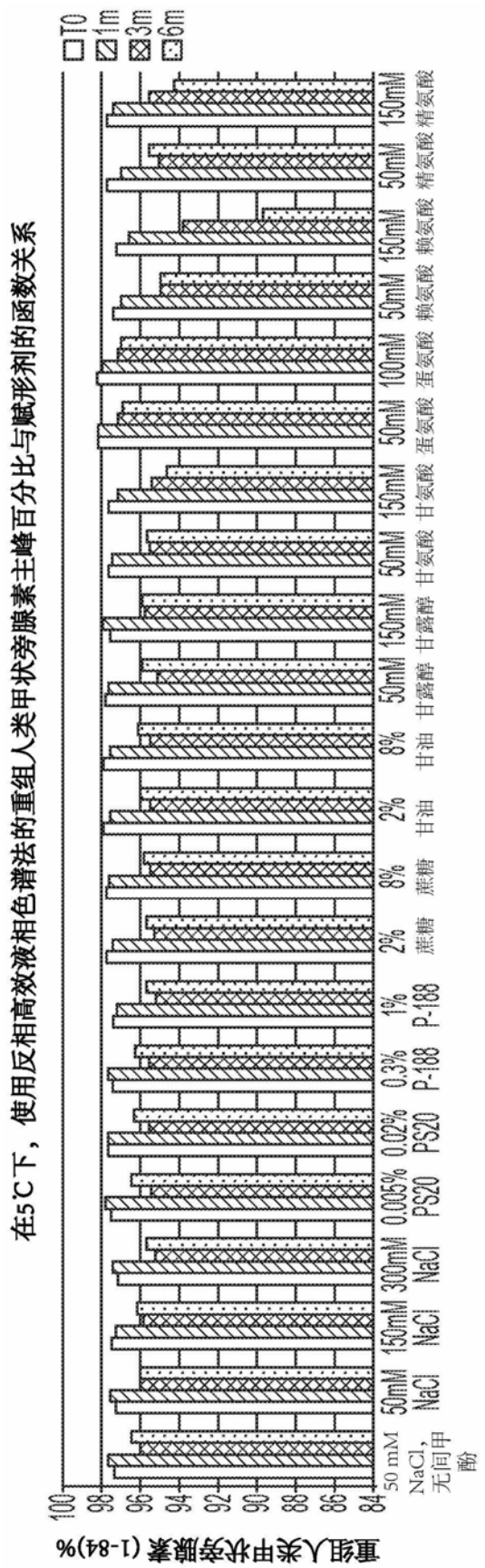

在5℃下，使用反相高效液相色谱法的重组人类甲状旁腺素主峰百分比与赋形剂的函数关系
重组人类甲状旁腺素 (1-84)%
T0
1m
3m
6m
100
98
96
94
92
90
88
86
84
50 mM NaCl, 无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图9C

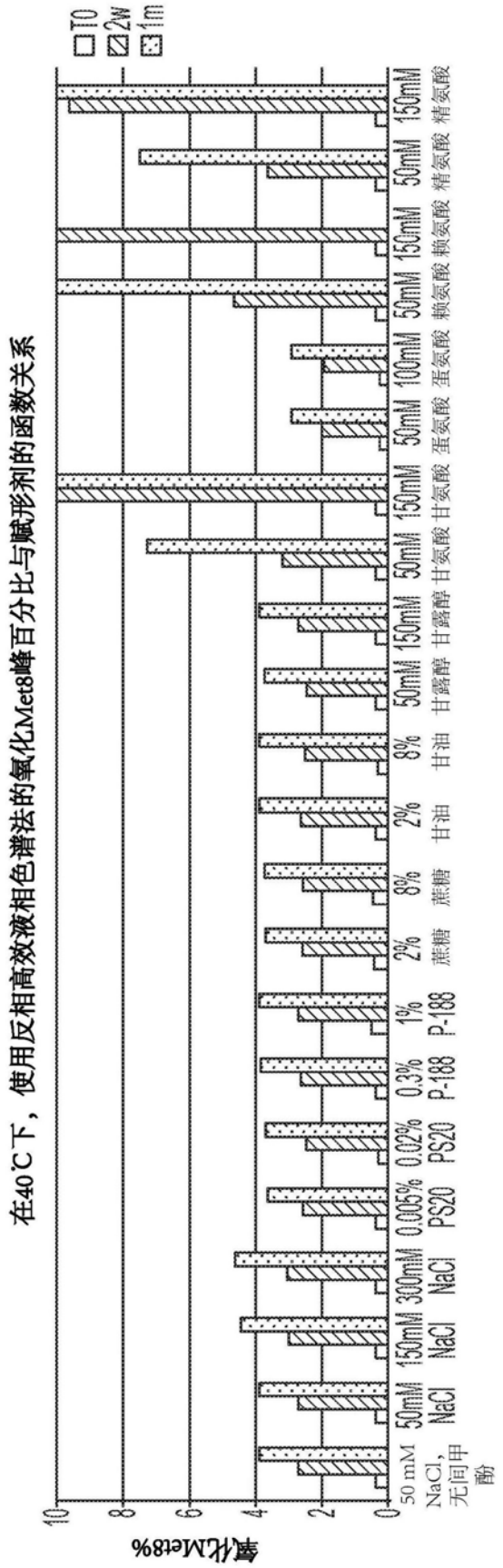

在40℃下，使用反相高效液相色谱法的氧化Met8峰百分比与赋形剂的函数关系
氧化Met8%
T0
2W
1m
50 mM NaCl, 无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图10A

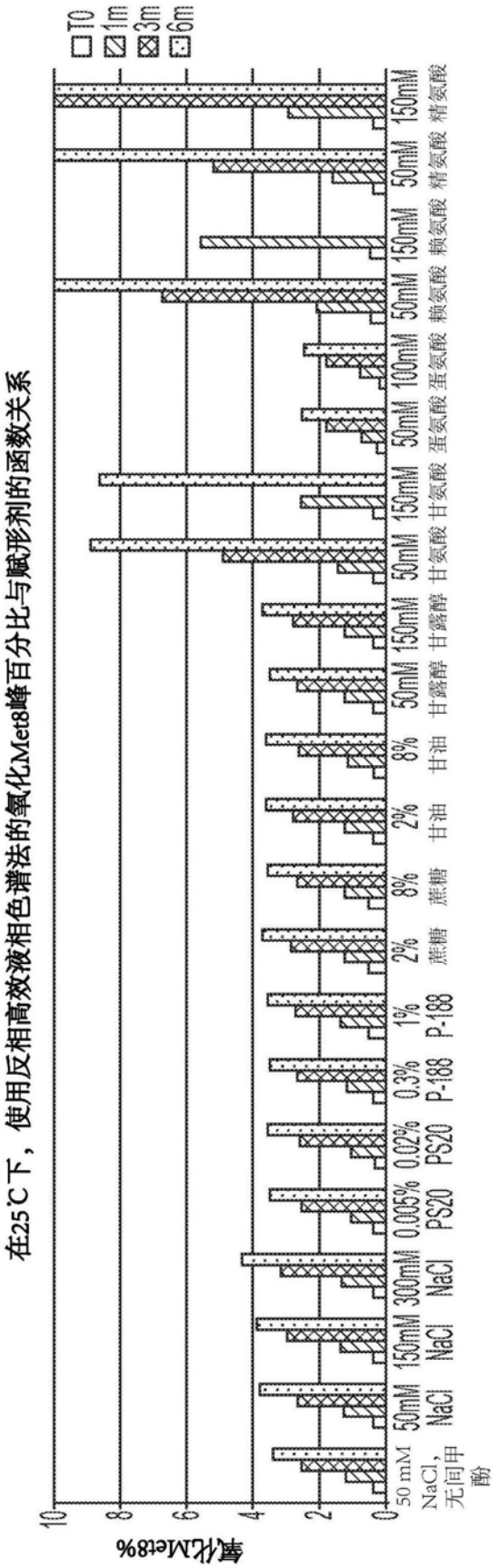

在25℃下，使用反相高效液相色谱法的氧化Met8峰百分比与赋形剂的函数关系
氧化Met8%
T0
1m
3m
6m
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图10B

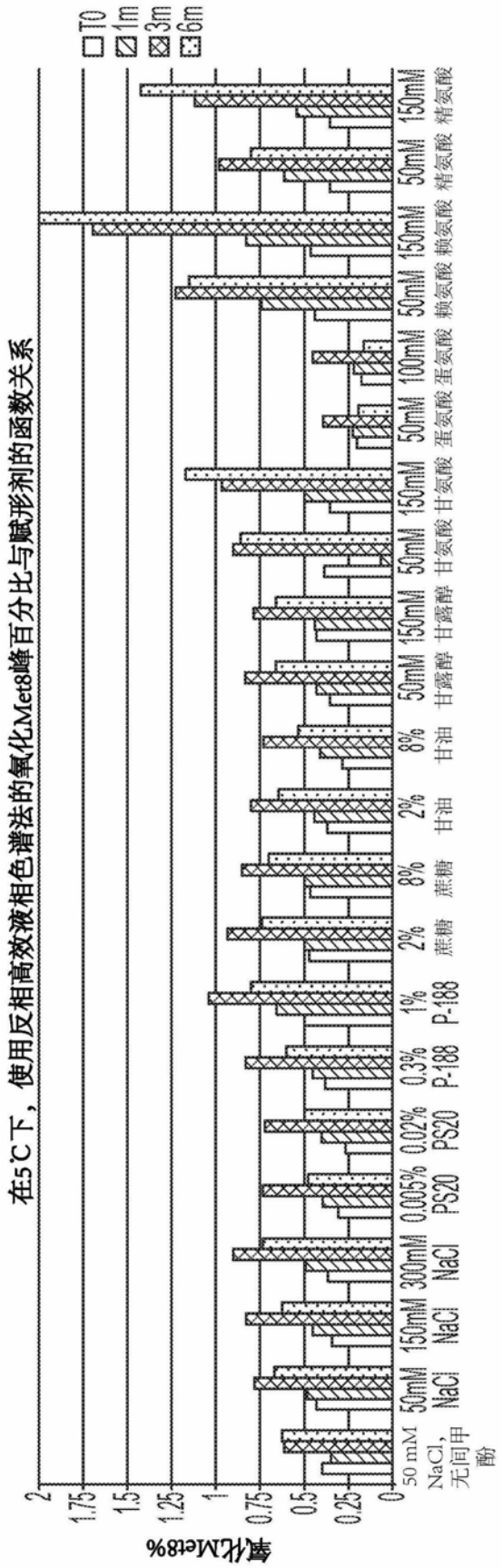

在5℃下，使用反相高效液相色谱法的氧化Met8峰百分比与赋形剂的函数关系
氧化Met8%
T0
1m
3m
6m
50 mM NaCl, 无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图10C

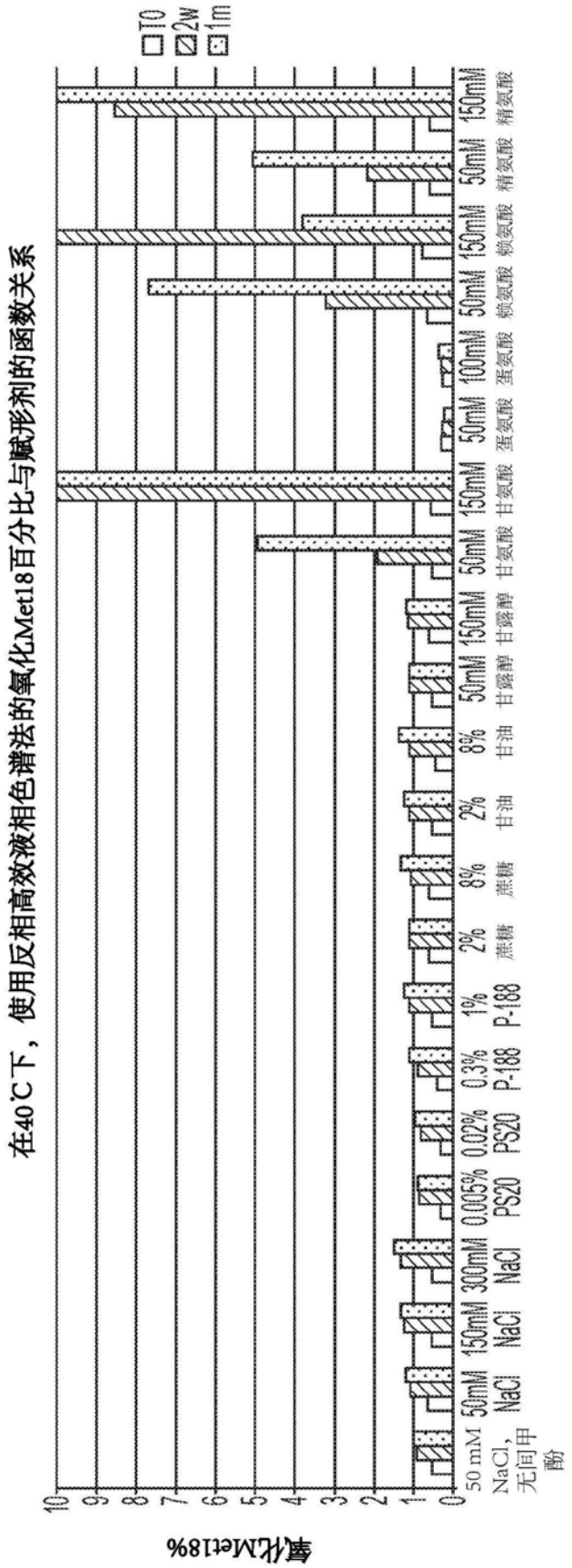

在40℃下，使用反相高效液相色谱法的氧化Met18百分比与赋形剂的函数关系
氧化Met18%
T0
2w
1m
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图11A

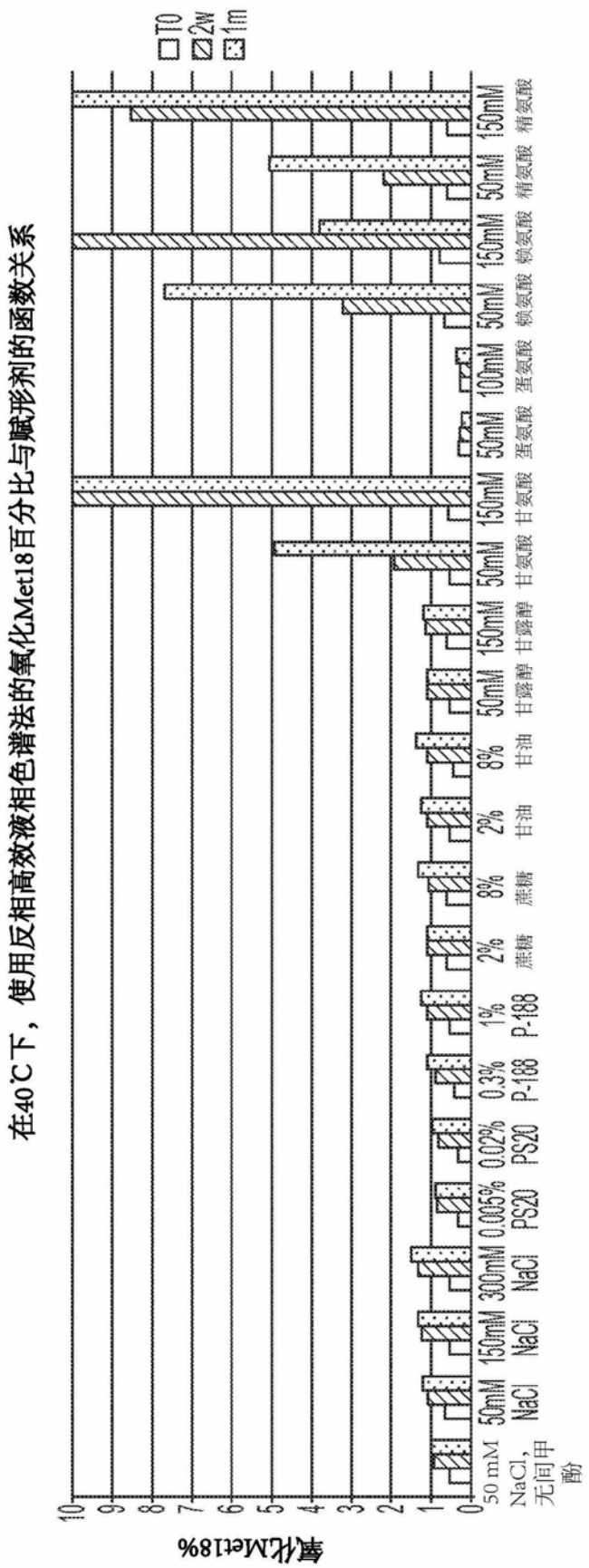

在40℃下，使用反相高效液相色谱法的氧化Met18百分比与赋形剂的函数关系
氧化Met18%
T0
2w
1m
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图11B

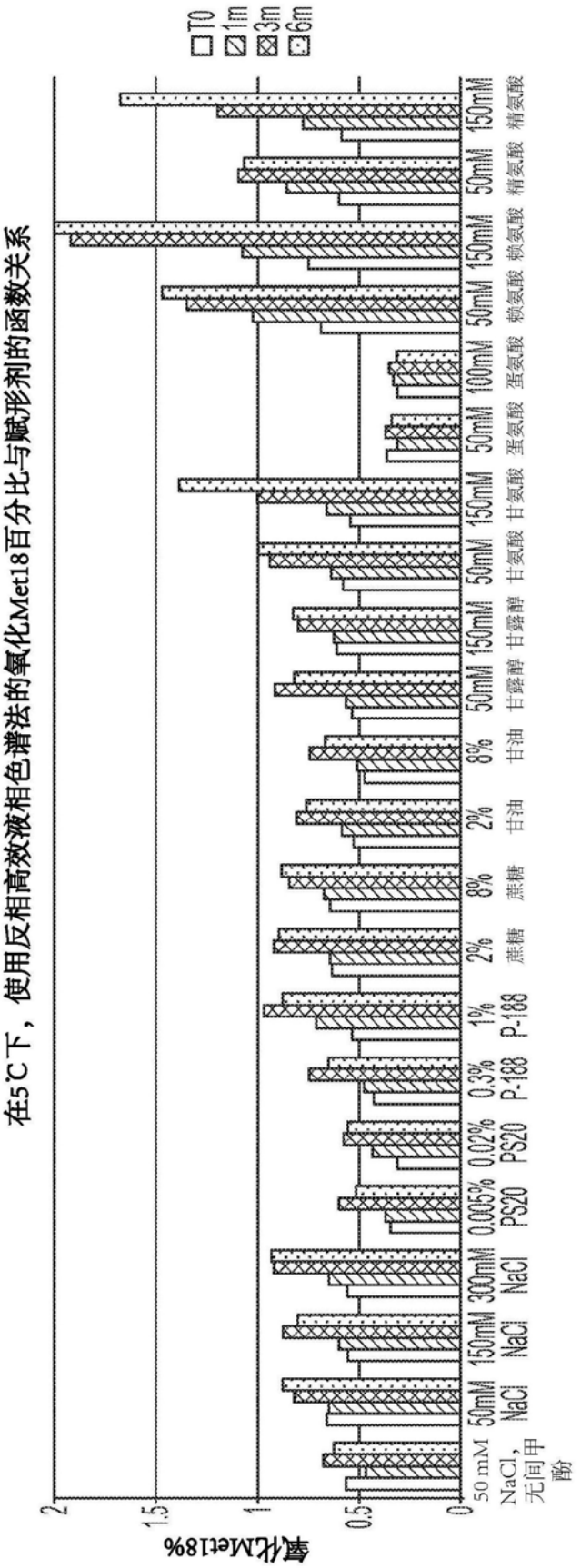

在5℃下，使用反相高效液相色谱法的氧化Met18百分比与赋形剂的函数关系
氧化Met18%
T0
1m
3m
6m
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图11C

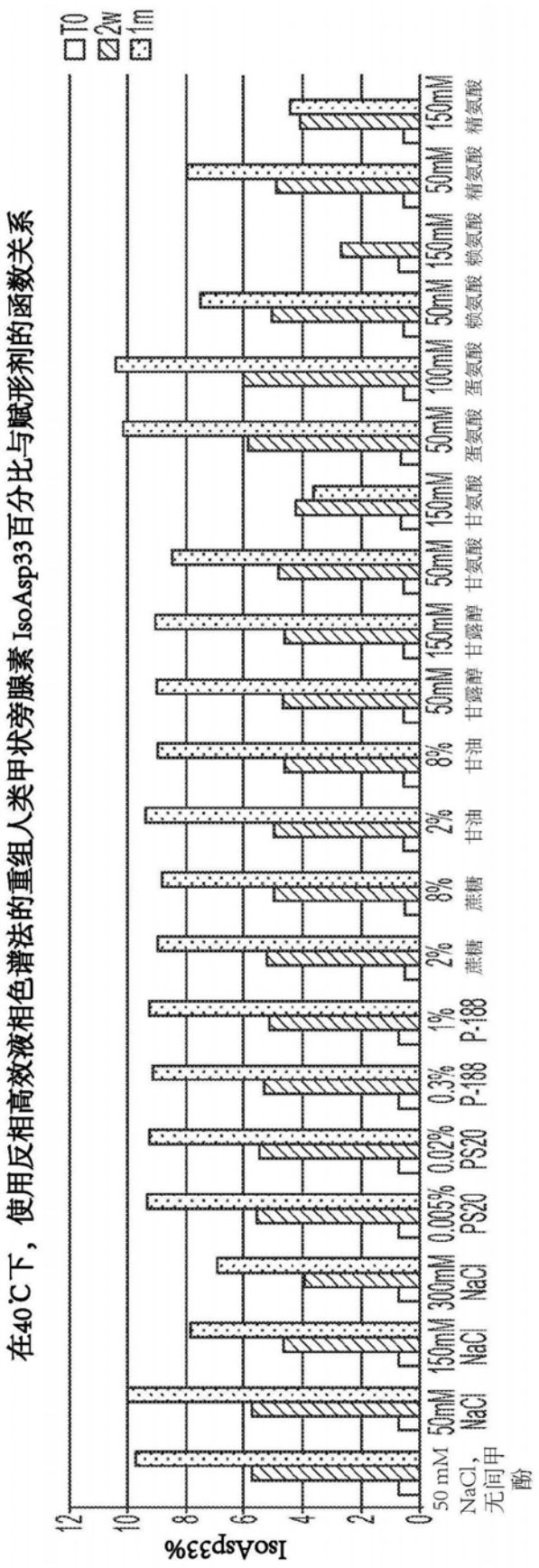

在40℃下，使用反相高效液相色谱法的重组人类甲状旁腺素 IsoAsp33百分比与赋形剂的函数关系
T0
2w
1m
IsoAsp33%
0
2
4
6
8
10
12
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图12A

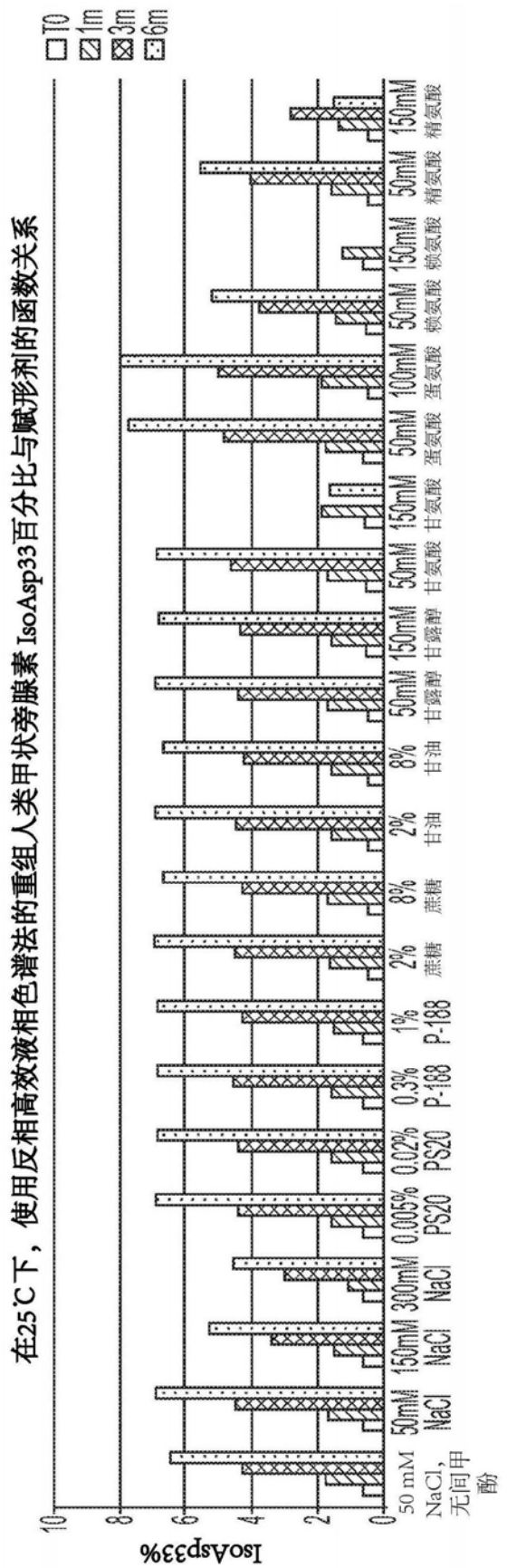

在25℃下，使用反相高效液相色谱法的重组人类甲状旁腺素 IsoAsp33百分比与赋形剂的函数关系
T0
1m
3m
6m
IsoAsp33%
0
2
4
6
8
10
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图12B

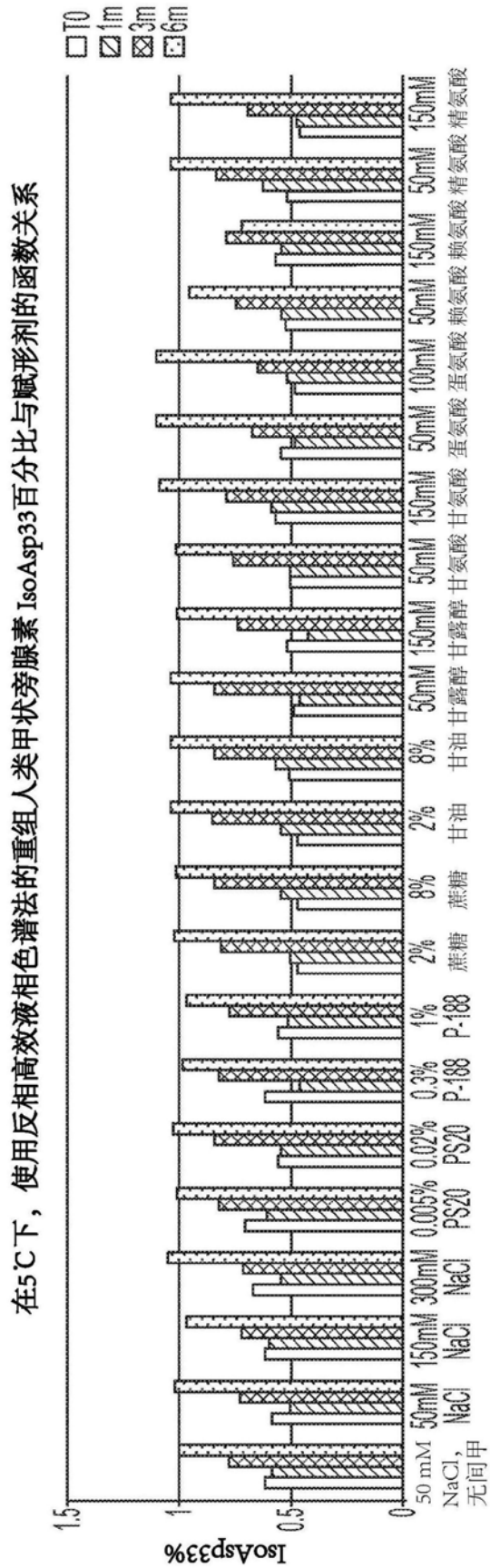
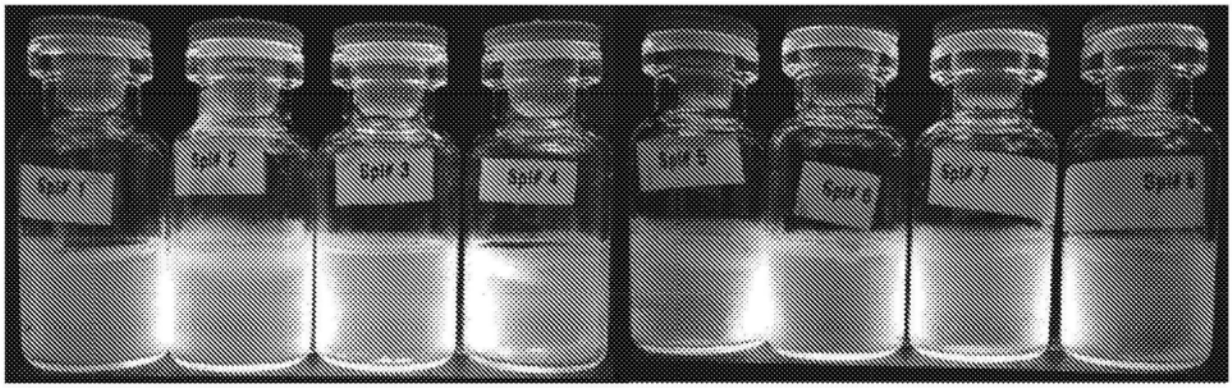

在5℃下，使用反相高效液相色谱法的重组人类甲状旁腺素 IsoAsp33百分比与赋形剂的函数关系
T0
1m
3m
6m
IsoAsp33%
1.5
1
0.5
0
50 mM NaCl，无间甲酚
50mM NaCl
150mM NaCl
300mM NaCl
0.005% PS20
0.02% PS20
0.3% P-188
1% P-188
2% 蔗糖
8% 蔗糖
2% 甘油
8% 甘油
50mM 甘露醇
150mM 甘露醇
50mM 甘氨酸
150mM 甘氨酸
50mM 蛋氨酸
100mM 蛋氨酸
50mM 赖氨酸
150mM 赖氨酸
50mM 精氨酸
150mM 精氨酸

图12C



Spl# 1: 30mM NaCl, 5%蔗糖	**Spl# 5:** 100mM NaCl, 8%蔗糖
Spl# 2: 50mM NaCl, 5%蔗糖	**Spl# 6:** 30mM NaCl, 8%蔗糖
Spl# 3: 75mM NaCl, 5%蔗糖	**Spl# 7:** 50mM NaCl, 8%蔗糖
Spl# 4: 100mM NaCl, 5%蔗糖	**Spl# 8:** 75mM NaCl, 8%蔗糖

图13