(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 134 T2** 2007.12.20

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 955 062 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 134.3**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 107 148.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **29.07.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.11.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **18.04.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.12.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 47/10*** (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
923401 **31.07.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
O Connor, Barbara H., San Carlos, CA 94070, US;
O Eswein, James, Moss Beach, CA 94038, US

(54) Bezeichnung: **Wässrige Formulierung enthaltend Menschliches Wachstumshormon**

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] Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Formulierungen, die Human-Wachstumshormon (hGH) enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung und Verwendung derartiger Formulierungen. Im Speziellen betrifft die vorliegende Erfindung solche pharmazeutische Formulierungen mit erhöhter Stabilität als wässrige Zubereitung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Nach dem Stand der Technik bekannte Human-Wachstumsfaktor-Formulierungen sind alle lyophilisierten Präparate, die Rekonstitution erfordern. Pro Phiole besteht Protropin® hGH aus 5 mg hGH, 40 mg Mannit, 0,1 mg einbasigem Natriumphosphat, 1,6 mg zweibasigem Natriumphosphat, rekonstituiert auf pH 7,8 ("Physician's Desk Reference", Medical Economics Co., Orawell, NJ, S. 1049 (1992)). Pro Phiole besteht Humatrope® hGH aus 5 mg hGH, 25 mg Mannit, 5 mg Glycin, 1,13 mg zweibasigem Natriumphosphat, rekonstituiert auf pH 7,5 ("Physician's Desk Reference", S. 1266 (1992)).

[0003] Ein allgemeiner Überblick über Wachstumshormon-Formulierungen ist Pearlman et al., "Current Communications in Molecular Biology", D. Marshak und D. Liu (Hrsg.), S. 23–30, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989), zu entnehmen. Andere Publikationen von Interesse im Hinblick auf die Stabilisierung von Proteinen sind folgende.

[0004] Die US-A-4.297.344 offenbart die Stabilisierung der Blutgerinnungsfaktoren II und VIII, von Antithrombin III und Plasminogen gegen Wärme durch die Zugabe ausgewählter Aminosäuren, wie z.B. Glycin, Alanin, Hydroxyprolin, Glutamin und Aminobuttersäure, und eines Kohlenhydrats, wie z.B. eines Monosaccharids, eines Oligosaccharids oder eines Zuckeralakohols.

[0005] Die US-A-4.783.441 offenbart ein Verfahren zur Verhinderung der Denaturierung von Proteinen wie Insulin in wässriger Lösung an Grenzflächen durch Zugabe von bis zu 500 ppm oberflächenaktiver Substanzen, die eine Kette abwechselnder schwach hydrophiler und schwach hydrophober Zonen bei pH 6,8–8,0 umfassen.

[0006] Die US-A-4.812.557 offenbart ein Verfahren zur Stabilisierung von Interleukin-2 unter Einsatz von Human-Serumalbumin.

[0007] Die EP-A-0.303.746 offenbart die Stabilisierung wachstumfördernder Hormone mit Polyolen, die aus nicht-reduzierenden Zuckern, Zuckeralkoholen, Zuckersäuren, Pentaerythrit, Lactose, wasserlöslichen Dextranen und Ficoll bestehen, Aminosäuren, Polymeren von Aminosäuren mit einer geladenen Seitengruppe bei physiologischem pH und Cholinsalzen.

[0008] Die EP-A-0.211.601 offenbart die Stabilisierung wachstumsfördernder Hormone in einer Gelmatrix, die aus einem Blockcopolymer gebildet ist, das Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Einheiten enthält und ein mittleres Molekulargewicht von etwa 1.100 bis etwa 40.000 aufweist.

[0009] Die EP-A-0.193.917 offenbart eine biologisch aktive Retard-Zusammensetzung, die durch eine Wasserlösung eines Komplexes zwischen einem Protein und einem Kohlenhydrat gekennzeichnet ist.

[0010] Die AU-A-30771/89 offenbart die Stabilisierung von Wachstumshormon unter Einsatz von Glycin und Mannit.

[0011] Die US-Patent-Anmeldung Nr. 5.096.885 (die nicht zum Stand der Technik gehört) offenbart eine Formulierung von hGH zur Lyophilisierung, enthaltend Glycin, Mannit, ein nichtionisches Tensid und einen Puffer. Die vorliegende Erfindung stellt eine unerwarteterweise stabilisierte wässrige Formulierung ohne Glycin bereit.

[0012] Es gibt verschiedene Wege des Abbaus von hGH, insbesondere Desamidierung, Aggregation, Spaltung der Peptid-Hauptkette und Oxidation von Methioninresten. Viele dieser Reaktionen können beträchtlich verlangsamt werden, indem Wasser aus dem Protein entfernt wird. Die Entwicklung einer wässrigen Formulierung für hGH hat jedoch die Vorteile, dass sie Rekonstitutionsfehler vermeidet, wodurch die Dosierungsgenauigkeit erhöht wird, und auch die klinische Verwendung des Produktes vereinfacht, wodurch die Wirkung beim

Patienten verbessert wird. Daher besteht ein Ziel der vorliegenden Erfindung darin, eine wässrige hGH-Formulierung bereitzustellen, die für eine akzeptable Regulierung von Abbauprodukten sorgt, gegen heftiges Rühren (das Aggregation herbeiführt) stabil ist und gegen Mikrobenkontamination beständig ist (was Mehrwegverpackungen ermöglicht).

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Dementsprechend stellt die Erfindung in einem Aspekt eine stabile, wässrige, flüssige pharmazeutische Formulierung zur Lagerung für 6–18 Monate bei 2–8°C bereit, umfassend das menschliche Wachstumshormon, einen Puffer, der einen pH im Bereich von 5,5 bis 7 bereitstellt, 0,1 bis 1 Gew.-% eines nichtionischen Tensids, Mannit und Phenol als Konservierungsmittel.

Beschreibung der Zeichnungen

[0014] Fig. 1 ist ein Größenausschlusschromatogramm einer wässrigen Wachstumshormon-Formulierung, die für 28 Tage bei 40°C (d.h. thermisch beansprucht) und für ein Jahr bei 5°C (d.h. unter den empfohlenen Lagerbedingungen) gelagert wurde.

[0015] Fig. 2 ist ein Diagramm der Arrheniusraten-Analyse der Wachstumshormon-Aggregation in wässriger Formulierung.

[0016] Fig. 3 ist ein Anionenaustauschchromatogramm, das eine thermisch beanspruchte (40°C) hGH-Probe in wässriger Formulierung mit einer hGH-Probe in wässriger Formulierung vergleicht, die unter empfohlenen Bedingungen (2 bis 8°C) für ein Jahr gelagert wurde.

[0017] Fig. 4 ist ein Diagramm der Arrheniusraten-Analyse der hGH-Desamidierung in wässriger Formulierung.

[0018] Fig. 5 ist eine grafische Darstellung des Monomer-Prozentsatzes, der in den verschiedenen Formulierungen enthalten ist, wobei Mannit durch ein Neutralsalz ersetzt worden ist.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

A. Definitionen

[0019] Die folgenden Begriffe haben in der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen die folgenden nachstehend angeführten Bedeutungen.

[0020] Der Begriff "Human-Wachstumsfaktor" oder "hGH" bezeichnet Human-Wachstumshormon, das durch Verfahren wie Extraktion aus natürlichen Quellen und Reinigung sowie durch rekombinante Zellkultursysteme hergestellt wird. Seine Sequenz und seine Eigenschaften sind beispielsweise in "Hormone Drugs", Gueriguian et al., U.S.P. Convention, Rockville, MD, USA (1982), dargelegt. Die Begriffe schließen auch biologisch aktive Human-Wachstumshormon-Äquivalente mit ein, z.B. solche, die sich in einer oder mehreren Aminosäure(n) der Gesamtsequenz unterscheiden. Weiters sollen die in dieser Anmeldung verwendeten Begriffe Substitutions-, Deletions- und Insertions-Aminosäurevarianten von hGH oder posttranslationale Modifikationen abdecken. Zwei Spezies von Interesse sind die native Spezies mit 191 Aminosäuren (Somatropin) und die Spezies mit 192 Aminosäuren und N-terminalem Methionin (met) (Somatrem), die üblicherweise rekombinant erhalten werden.

[0021] Der Begriff "pharmazeutisch wirksame Menge" von hGH bezeichnet jene Menge, die bei einer Verabreichungstherapie für therapeutische Wirkung sorgt. Die Zusammensetzungen gemäß vorliegender Erfindung werden so hergestellt, dass sie hGH-Mengen von zumindest etwa 0,1 mg/ml, über etwa 10 mg/ml, vorzugsweise von etwa 1 mg/ml bis etwa 20 mg/ml, mehr bevorzugt von etwa 1 mg/ml bis etwa 5 mg/ml, enthalten. Zur Verwendung dieser Zusammensetzungen bei der Verabreichung an Menschen, die an Hypophysen-Zwergwuchs leiden, enthalten diese Zusammensetzungen beispielsweise etwa 0,1 mg/ml bis etwa 10 mg/ml, was der zur Zeit erwogenen Dosierung für die beabsichtigte Behandlung entspricht. Der Konzentrationsbereich ist für die Erfindung nicht entscheidend und kann vom Kliniker variiert werden.

B. Allgemeine Verfahren

[0022] Für die vorliegende Erfindung ist kein Glycin erforderlich. Glycin ist eine optionale Komponente der wässrigen Formulierung, wenn sie auch weniger vorteilhaft für die wässrigen Formulierungen gemäß vorliegender Erfindung als für jene Formulierungen ist, die zur späteren Rekonstitution lyophilisiert werden. Die Glycinmengen liegen im Bereich von 0 mg/ml bis etwa 7 mg/ml.

[0023] Nichtionogene Tenside umfassen Polysorbat, wie z.B. Polysorbat 20 oder 80 usw., und die Poloxamere, wie z.B. Poloxamer 184 oder 188, Pluronic®-Polyole und andere Ethylen/Polypropylen-Blockpolymere usw. Es werden jene Mengen verwendet, die wirksam sind, um eine stabile wässrige Formulierung bereitzustellen, und zwar im Bereich von 0,1 % (Gew./Vol.) bis 1 % (Gew./Vol.). Die Verwendung nichtionogener Tenside ermöglicht es, die Formulierung Scher- und Oberflächenspannungen auszusetzen, ohne Denaturierung des Proteins zu verursachen. Beispielsweise werden solche tensidhältigen Formulierungen in Aerosol-Vorrichtungen wie z.B. jenen eingesetzt, die bei Lungen-Verabreichung und nadellosen Strahlinjektionspistolen verwendet werden.

[0024] Zu den Puffern zählen Phosphat-, Tris-, Citrat-, Succinat-, Acetat- oder Histidinpuffer. Am meisten bevorzugt liegt der Puffer im Bereich von etwa 2 mM bis etwa 50 mM. Der bevorzugte Puffer ist ein Natriumcitratpuffer.

[0025] Phenol ist als Konservierungsstoff inkludiert, um das mikrobielle Wachstum zu verzögern und dadurch eine „Mehrfach-Verwendungs"-Verpackung von hGH zu ermöglichen. Der bevorzugte Konservierungsstoff ist 0,2–0,4 Gew.-% Phenol.

[0026] Geeignete pH-Bereiche, eingestellt mit Puffer, für wässrige hGH-Formulierungen liegen von 5,5 bis 7, am meisten bevorzugt bei 6,0. Vorzugsweise wird der Puffer-Konzentrationsbereich so gewählt, dass Desamidierung, Aggregation und Fällung von hGH minimiert werden.

[0027] Mannit ist in der wässrigen hGh-Formulierung enthalten. Die bevorzugte Mannit-Menge beträgt etwa 5 mg/ml bis etwa 50 mg/ml.

[0028] In den Beispielen wird eine wässrige Formulierung, welche die folgenden Komponenten umfasst, bei einem pH von 6,0 als Bezug zum Vergleich mit den beanspruchten Formulierungen verwendet, die Mannit umfassen. Eine lyophilisierte Formulierung nach dem Stand der Technik wird auch in diesen Studien verwendet.

Bestandteile	Menge (mq)
hGH	5
Natriumchlorid	8,8
Polysorbat 20	2,0
Natriumcitrate	2,5
Phenol	2,5
steriles Wasser	1 ml

[0029] Es versteht sich, dass die obigen Mengen in gewissen Bereichen, wie nachstehend detaillierter dargelegt, einigermaßen flexibel sind, und dass die Materialien innerhalb der Komponentenkategorien austauschbar sind. Das heißt, Polysorbat 80 oder ein Poloxamer kann Polysorbat 20 ersetzen, ein Succinat- oder Acetatpuffer könnte stattdessen eingesetzt werden, und alternative Konservierungsmittel und unterschiedliche pH-Werte könnten eingesetzt werden. Außerdem kann mehr als ein Puffer, Konservierungsmittel, Zucker, Neutralsalz oder nichtionogenes Tensid eingesetzt werden. Vorzugsweise ist die Formulierung isotonisch und steril.

[0030] Im Allgemeinen können die Formulierungen gemäß vorliegender Erfindung andere Komponenten in Mengen enthalten, welche die Herstellung stabiler Formen nicht beeinträchtigen, und in Mengen, die für wirksame, sichere, pharmazeutische Verabreichung geeignet sind. Beispielsweise können andere pharmazeutisch annehmbare Exzipienten, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung allgemein bekannt sind, einen Teil der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen bilden. Dazu gehören beispielsweise verschiedene Verdickungsmittel, zusätzliche Puffer, Gelierungsmittel, Oxidationshemmer, Co-Lösungsmittel und dergleichen; spezifische Beispiele dafür sind beispielsweise Trimethylaminsalze ("Tris-Puffer") und Dinatriumedetat.

VERSUCHSBEISPIELE

A. Testverfahren

[0031] Anionenaustausch-Chromatographie (HPIEC) wurde auf einer TSK-DEAE-5PW-Säule (1,0 × 7,5 cm) bei 45°C mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Säule wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 5,5, äquilibriert, das 10 % (Gew./Vol.) Acetonitril enthielt.

[0032] Die Elution erfolgte unter Einsatz eines 25 min Gradienten von 50–100 mM Kaliumphosphat, pH 5,5, mit konstanten 10 % (Gew./Vol.) Acetonitril. Die Säulenbeladung waren 83 µg Protein. Die Detektion erfolgte bei 230 nm.

[0033] Nicht-denaturierende Größenauschlusschromatographie wurde auf einer TSK-2000-SWXL-Säule in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,2, durchgeführt, das 150 mM Natriumchlorid enthielt. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min bei einer Säulenbeladung von 50–75 µg und Detektion bei 214 und 280 nm.

[0034] Denaturierende Größenauschlusschromatographie wurde auf einer Zorbax-GF250-Säule in 200 mM Natriumphosphat, pH 6,8–7,2/0,1 % SDS, durchgeführt. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min bei einer Säulenbeladung von 50–75 µg und Detektion bei 214 und 280 nm.

B. Herstellung der Formulierung

[0035] Allgemein wurden wässrige hGH-Formulierungsproben für die Analyse bei diesen Versuchsbeispielen durch Pufferaustausch auf einer Gelfiltrationssäule hergestellt. Der Elutionspuffer enthielt entweder Natriumchlorid oder Mannit, Puffer und das nichtionogene Tensid in ihren endgültigen Anteilen. Diese resultierende Lösung wurde auf eine gewünschte hGH-Konzentration verdünnt und das Konservierungsmittel zugesetzt. Die Lösung wurde unter Einsatz eines sterilisierten Membranfilters (0,2 µm Porengröße oder Äquivalent) filtriert und in sterile 3-cm^3-Glaphiolen Typ 1 gefüllt, mit Butylkautschuk-Stöpseln für wässrige Anwendungen und Aluminium-Flip-off-Kappen verstöpselt und abgedichtet.

[0036] Die in den Versuchsbeispielen verwendete wässrige hGH-Formulierung bestand aus 5,0 mg Somatropin (Genentech, Inc.), 45,0 mg Mannit, 2,5 mg Phenol, 2,0 mg Polysorbat 20 und 2,5 mg Natriumcitrat, pH 6,0, pro ml Lösung. Die in den Beispielen als Bezug für Vergleichszwecke verwendete lyophilisierte Formulierung bestand aus 5,0 mg Somatropin, 1,7 mg Glycin, 45,0 mg Mannit, 1,7 mg Natriumphosphat, 9 mg Benzylalkohol pro ml steriler Lösung nach der Rekonstitution.

C. Beispiel 1

Chemische Stabilität der wässrigen Formulierung

[0037] Phiolen der wässrigen hGH-Formulierung (Chargen 12738/55–102 und 12738/55–105) wurden entweder bei der empfohlenen Lagertemperatur von 2–8°C oder erhöhten Lagertemperaturen von 15°C oder 25°C inkubiert und dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten entfernt und auf Änderungen des pH, der Farbe und des Erscheinungsbildes sowie der Proteinkonzentration getestet. Außerdem wurden Proben bei 40°C inkubiert, um Abbaumuster unter extremen Belastungsbedingungen zu untersuchen. Die Abbaumuster für die wässrige Formulierung wurden auch mit den bekannten Abbaumustern für lyophilisiertes Wachstumshormon verglichen.

[0038] Nach Lagerung bei 2 bis 8°C für bis zu einem Jahr wies die wässrige Formulierung beträchtliche Veränderungen in pH-Wert, Farbe und Erscheinungsbild sowie Proteinkonzentration auf. Nicht-denaturierende Größenausschluss-HPLC, die an Proben durchgeführt wurde, die bis zu einem Jahr bei 2 bis 8°C gelagert wurden, zeigte keine nennenswerte Aggregation des Arzneimittelproduktes (**Fig. 1**). Dieses Ergebnis ist im Lichte der Lehren der US-A-5.096.885, wonach Glycin dazu beiträgt, die Aggregation im lyophilisierten Präparat zu verhindern, unerwartet.

[0039] Bei Temperaturen von über 8°C wurde im Zeitverlauf nur eine geringe oder keine Veränderung des pH-Werts oder der Proteinkonzentration beobachtet. Visuelle Untersuchung zeigte im Zeitverlauf eine Zunahme der Opaleszenz bei Proben, die bei 40°C gelagert wurden. Diese Veränderung war während der Lagerung bei 15 bis 25°C minimal und wurde bei Lagerung bei 2 bis 8°C nicht beobachtet.

[0040] Die Menge an Abbauprodukt wurde als Flächenprozentsatz der Gesamt-hGH-Fläche des Chromato-

gramms berechnet. Die Geschwindigkeitskonstante für jede Reaktion wurde dann berechnet, indem der Prozentsatz an Abbauprodukt von 100 % abgezogen, der $\log_{10}$ berechnet und über der Zeit in Tagen aufgetragen wurde. Der Anstieg einer an diese Daten angepassten Ausgleichsgeraden, diente als Reaktionskonstante (k). Arrheniusanalyse wurde durchgeführt, indem der natürliche Logarithmus (In) des absoluten Betrags jeder berechneten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei 15, 25 und 40°C als Funktion der inversen absoluten Temperatur aufgetragen und dann für 5°C extrapoliert wurde. Die Arrhenius- und Echtzeitgeschwindigkeits-Analyse (**Fig. 2**) von Daten aus der Größenausschluss-HPLC weisen darauf hin, dass das Ausmaß an Wachstumshormon-Aggregation nach 18 Monaten Lagerung unter 1 % (Gew./Vol.) beträgt.

[0041] Anionenaustausch-HPLC-Analyse, die an der bei 40°C gelagerten wässrigen hGH-Formulierung durchgeführt wurde, zeigte eine Zunahme der sauren Peaks über 28 Tage (**Fig. 3**). Drei dieser Peaks, die bei etwa 16, 17,5 und 26 min eluierten, wurden durch hGH-Desamidierung an den Positionen 149, 152 und 149 plus 152 erzeugt. Die Arrhenius- und Echtzeitgeschwindigkeits-Analyse (**Fig. 4**) von Daten aus diesem Verfahren wurden wie oben beschrieben aufgetragen und weisen darauf hin, dass die Menge an desamidiertem hGH in diesen Chargen nach 18 Monaten Lagerung bei 2 bis 8°C etwa 9 % (Gew./Vol.) beträgt. Dies umfasst eine Anfangsmenge von etwa 2,4 % (Gew./Vol.) desamidiertes hGH zum Zeitpunkt 0. Werte von nicht weniger als 15 % (Gew./Vol.) Desamidierung sind für andere hGH-Produkte bereichtet wurden (H. Larhammar et al., Int. J. Pharmaceutics 23, 13–23 (1985)). Obwohl die Desamidierungsrate im wässrigen Zustand schneller ist, wird diese Rate bei pH 6,0 und darunter minimiert.

D. Beispiel II

Physikalische Stabilität der wässrigen Formulierung

[0042] Jede von sechs Phiolen von lyophilisiertem Wachstumshormon wurde mit 1 ml bakteriostatischem Wasser zur Injektion (BWFI) U.S.P. rekonstituiert. Nach dem Auflösen wurde der Inhalt in 3 cm^3-Phiolen übertragen, mit Stöpsel und Kappe versehen, um die gleiche Konfiguration wie jene für die wässrige Formulierung bereitzustellen. Die sechs Phiolen der wässrigen hGH-Formulierung und sechs Phiolen rekonstituiertes lyophilisiertes hGH wurden mit 240 Stößen pro Minute unter Einsatz einer Hubeinstellung von 2,5 auf einem Glas-Col Shaker-in-the-Round horizontal kräftig durchgeschüttelt, was eine horizontale Verlagerung von 8 ± 1 cm für bis zu 24 h bei Raumtemperatur ergab, um die Auswirkungen der Agitation auf die physikalische Stabilität der wässrigen hGH-Formulierung zu bewerten. Alle 12 Proben wurden in einer Geraden auf dem Rüttler angeordnet, um zu gewährleisten, dass sie alle der gleichen Kraft für jede Formulierung ausgesetzt waren. Zwei Phiolen wurden für Tests nach 30 min, 6 h und 24 h entfernt.

[0043] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angeführt. Agitation erzeugte nur geringe Veränderung in der visuellen Klarheit der wässrigen Formulierung. Es gab keine Veränderung im Gehalt des Gesamt-Wachstumshormon-Monomers, wie durch einen nichtdenaturierenden Größenausschluss-HPLC-Test ermittelt. Dieser Test detektiert nichtkovalente Aggregate, die mit SDS in einem denaturierenden Größenausschluss-HPLC-Test vollständig dispergiert werden konnten.

[0044] Im Vergleich dazu zeigten diese Ergebnisse auch, dass das rekonstituierte lyophilisierte Produkt auch nach nur 30-minütigem Rütteln empfindlicher für die Behandlung war. Diese Empfindlichkeit ist typisch für alle zur Zeit verfügbaren hGH-Formulierungen mit Ausnahme der wässrigen Formulierung gemäß vorliegender Erfindung. Der Einschluss des nichtionogenen Tensids ist der wichtigste Faktor, der das Auftreten dieses Phänomens verhindert.

Tabelle I. Auswirkungen des Rührens bei Raumtemperatur auf wässrige hGH-Formulierungen gegenüber rekonstitutierten lyophilisierten Formulierungen

Probe	Farbe / Erscheinungsbild	% HPSEC-Monomer	% lösliches Protein	% Gesamt[1]-Monomer
ungerüttelt				
wässrig	klar / farblos	99,7	ND	ND
wässrig	klar / farblos	99,9	ND	ND
lyophilisiert	klar / farblos	99,0	100	99,0
lyophilisiert	klar / farblos	ND	ND	ND
gerüttelt, 0,5 h				
wässrig	sehr leicht opaleszierend / farblos	99,9	100	99,9
wässrig	sehr leicht opaleszierend / farblos	100,0	100	100,0
lyophilisiert	leicht opaleszierend / farblos	93,6	100	93,6
lyophilisiert	klar / farblos	92,8	100	92,8
gerüttelt, 6 h				
wässrig	leicht opaleszierend / farblos	99,9	100	99,9
wässrig	opaleszierend / farblos	99,8	100	99,8
lyophilisiert	stark opaleszierend / gelb bis braun	80,5	73	58,8
lyophilisiert	stark opaleszierend / gelb bis braun	72,7	61,7	44,9

Tabelle I(Fortsetzung)

Probe	Farbe / Erscheinungsbild	% HPSEC-Monomer	% lösliches Protein	% Gesamt[1]-Monomer
gerüttelt, 24 h				
wässrig	leicht opaleszierend / farblos	99,8	100	99,8
wässrig	klar / farblos	99,8	ND	ND
lyophilisiert	stark getrübt / gelb bis braun	60,6	21,5	13,0
lyophilisiert	stark getrübt / gelb bis braun	56,7	14,8	8,4

[1]Gesamtmonomer = (% Monomer × % lösliches Protein)/100

E. Beispiel III

Konservierungswirksamkeit in der wässrigen Formulierung

[0045] Proben der wässrigen hGH-Formulierung wurden bakteriellem Angriff bei verkürztem Einwirken unter Einsatz des Standard-U.S.P.-Tests unterzogen. In diesem Test wurde eine Suspension von entweder E.coli oder S.aureus einer Allquote der wässrigen hGH-Formulierung so zugesetzt, dass eine Endkonzentration der Bakterien zwischen 10^5 und 10^6 CFU/ml erhalten wurde. Lebensfähige Bakterien, die in den Röhren verblieben, wurden sofort und nach 4 und 24 h Inkubation bei 20 bis 25°C gezählt.

[0046] Die prozentuelle Änderung in der Konzentration der Mikroorganismen während des Einwirkenlassens wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\% \text{ Anfangstiter} = \frac{\text{Titer bei T=X h x 100}}{\text{Titer bei T=0}}$$

[0047] Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass bei zwei Bakterien-Spezies die Konzentrationen an lebensfähigen Bakterien nach 24 h auf weniger als 0,01 % der Anfangskonzentrationen reduziert waren.

F. BEISPIEL IV

Ersatz von Mannit durch Salz (Vergleichsbeispiele)

[0048] In diesem Versuch wurden wässrige hGH-Formulierungen verglichen, bei denen die Konzentrationen von Salz, Mannit und nichtionigenem Tensid variierten. Alle Formulierungen enthielten 5 mg/ml hGH/0,25 % (Gew./Vol.) Phenol/10 mM Natriumcitrat, pH 6,0. Die Proben wurden für 3 bis 4 Monate bei 2 bis 8°C gelagert. Fig. 5 zeigt den in den angegebenen Formulierungen vorhanden Monomerprozentsatz. Die nachstehende Tabelle gibt die Zusammensetzung jeder Formulierung an. Diese Ergebnisse zeigen die unerwartete Stabilität von hGH in einer Formulierung, in der Mannit durch ein Neutralsalz in Gegenwart eines Tensids ersetzt wurde.

Tabelle 3. In Fig. 5 gezeigte Formulierungen

Formulierung Nr.	Zusammensetzung
42	0,1 % (Gew./Vol.) Polysorbat 20 50 mM Mannit
47	0,1 % (Gew./Vol.) Poloxamer 188 0,1 M NaCl
51	0,5 % (Gew./Vol.) Polysorbat 20 50 mM Mannit
52	0,1 % (Gew./Vol.) Poloxamer 188 50 mM Mannit
53	0,1 % (Gew./Vol.) Poloxamer 184 50 mM Mannit
60	0,2 % (Gew./Vol.) Polysorbat 20 0,1 M NaCl
61	0,2 % (Gew./Vol.) Polysorbat 20 0,05 M NaCl
62	0,2 % (Gew./Vol.) Polysorbat 20 0,15 M NaCl
63	0,2 % (Gew./Vol.) Polysorbat 20 50 mM Mannit

Patentansprüche

1. Stabile, wässrige, flüssige pharmazeutische Formulierung für 6- bis 18-monatige Lagerung bei 2–8°C, umfassend Human-Wachstumshormon, einen Puffer, der für einen pH im Bereich von 5,5 bis 7 sorgt, 0,1 bis 1 Gew.-% eines nichtionischen Tensids, Mannit und Phenol als Konservierungsmittel.

2. Formulierung nach Anspruch 1, worin der Mannit in einer Menge von 5 bis 50 mg/ml enthalten ist.

3. Formulierung nach Anspruch 1, worin das Phenol in einer Menge von 0,2 bis 0,4 % (Gew./Vol.) enthalten ist.

4. Formulierung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Konzentration des Human-Wachstumshormons 1 bis 20 mg/ml beträgt.

5. Formulierung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Puffer ein Citrat-, Phosphat-, Tris-, Succinat-, Acetat- oder Histidinpuffer ist.

6. Formulierung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Pufferkonzentration 2 mM bis 50 mM beträgt.

7. Formulierung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das nichtionische Tensid Poloxamer oder Polysorbat ist.

8. Formulierung nach Anspruch 7, worin das Poloxamer Poloxamer 188 oder Poloxamer 184 ist oder das Polysorbat Polysorbat 20 oder Polysorbat 80 ist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

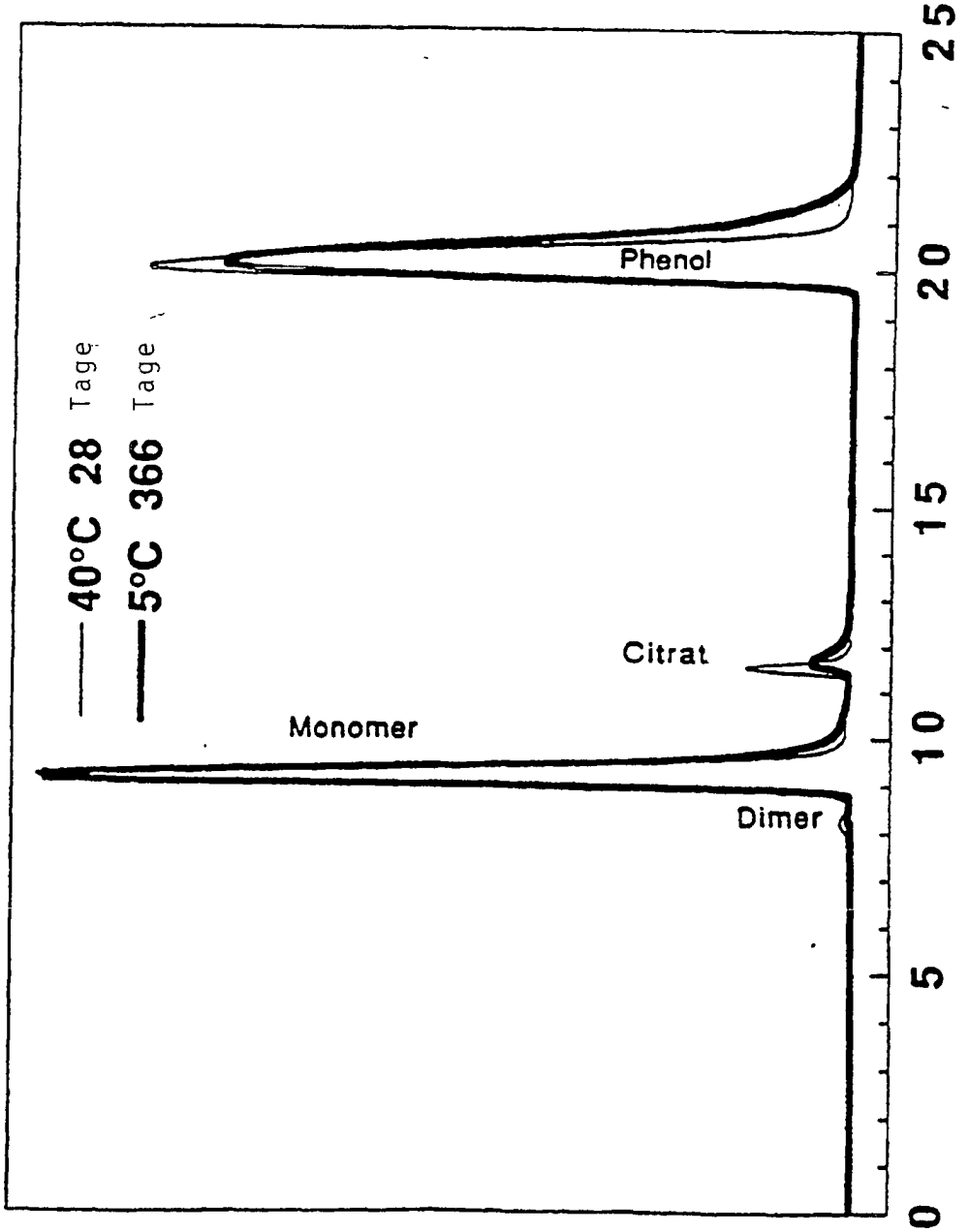


FIG. 1

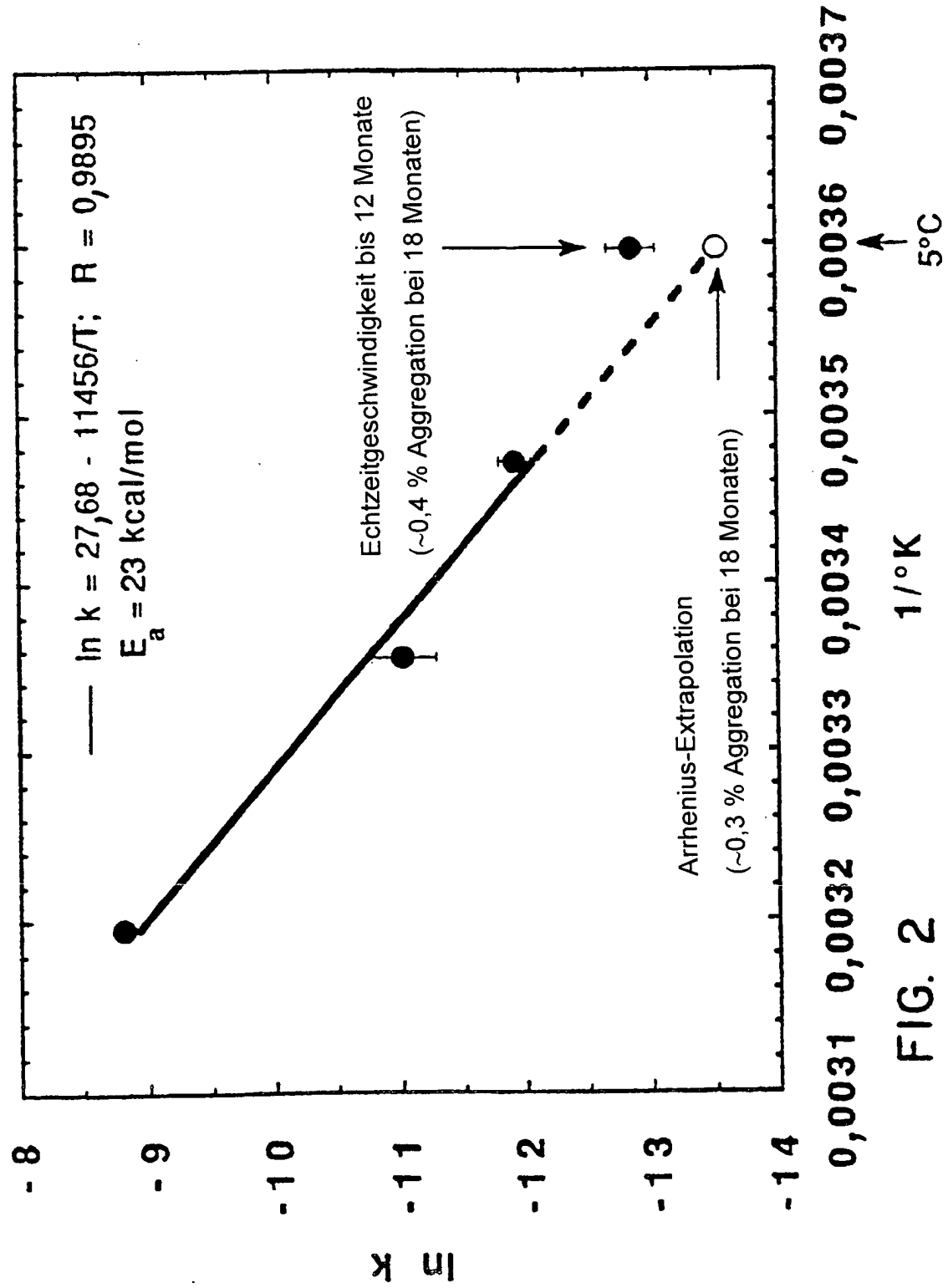

ln k = 27,68 - 11456/T; R = 0,9895
E_a = 23 kcal/mol
Echtzeitgeschwindigkeit bis 12 Monate
(~0,4 % Aggregation bei 18 Monaten)
Arrhenius-Extrapolation
(~0,3 % Aggregation bei 18 Monaten)
ln k
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
0,0031 0,0032 0,0033 0,0034 0,0035 0,0036 0,0037
1/°K
5°C

FIG. 2

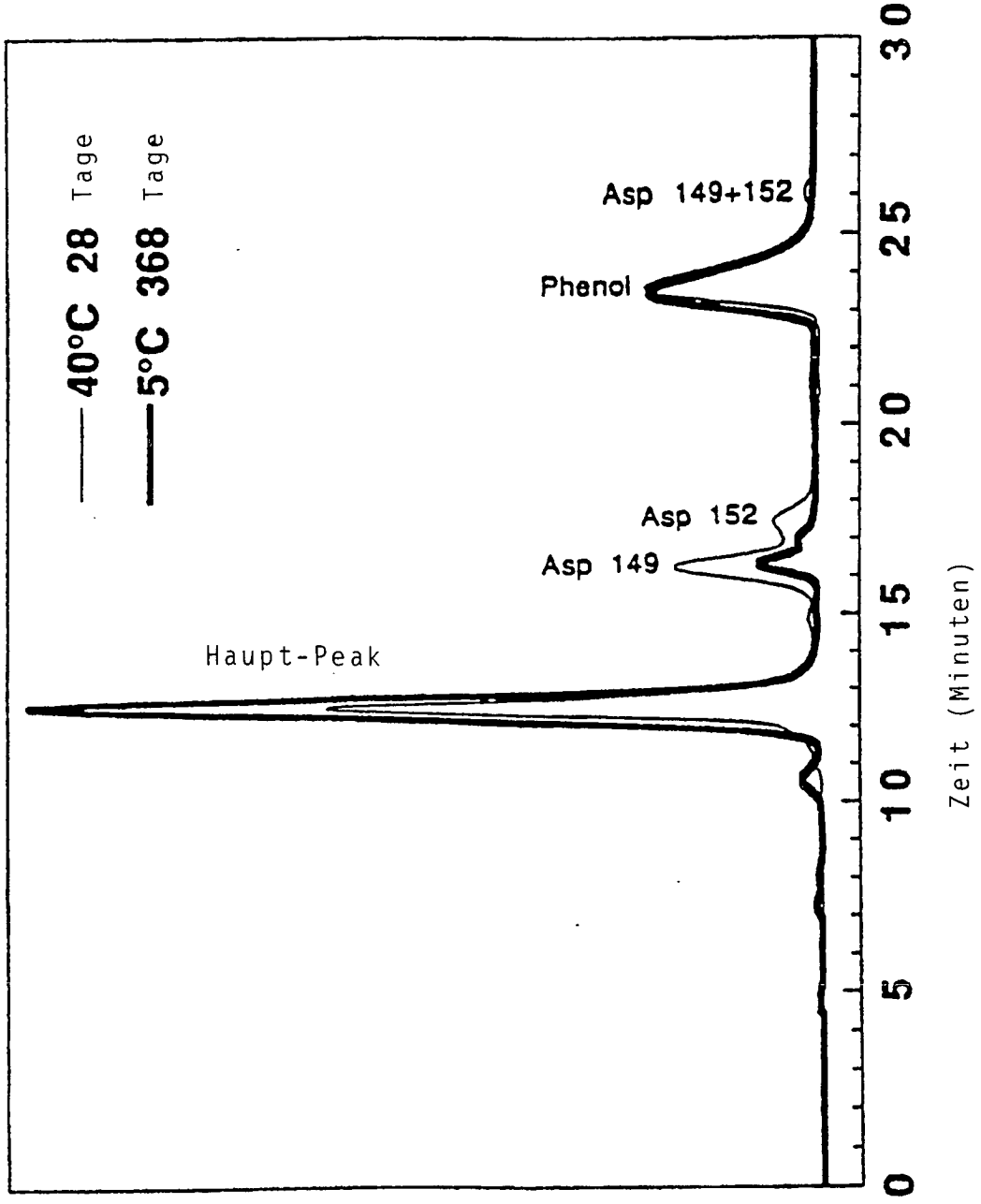

40°C 28 Tage
5°C 368 Tage
Asp 149+152
Phenol
Asp 152
Asp 149
Haupt-Peak
0
5
10
15
20
25
30
Zeit (Minuten)

FIG. 3

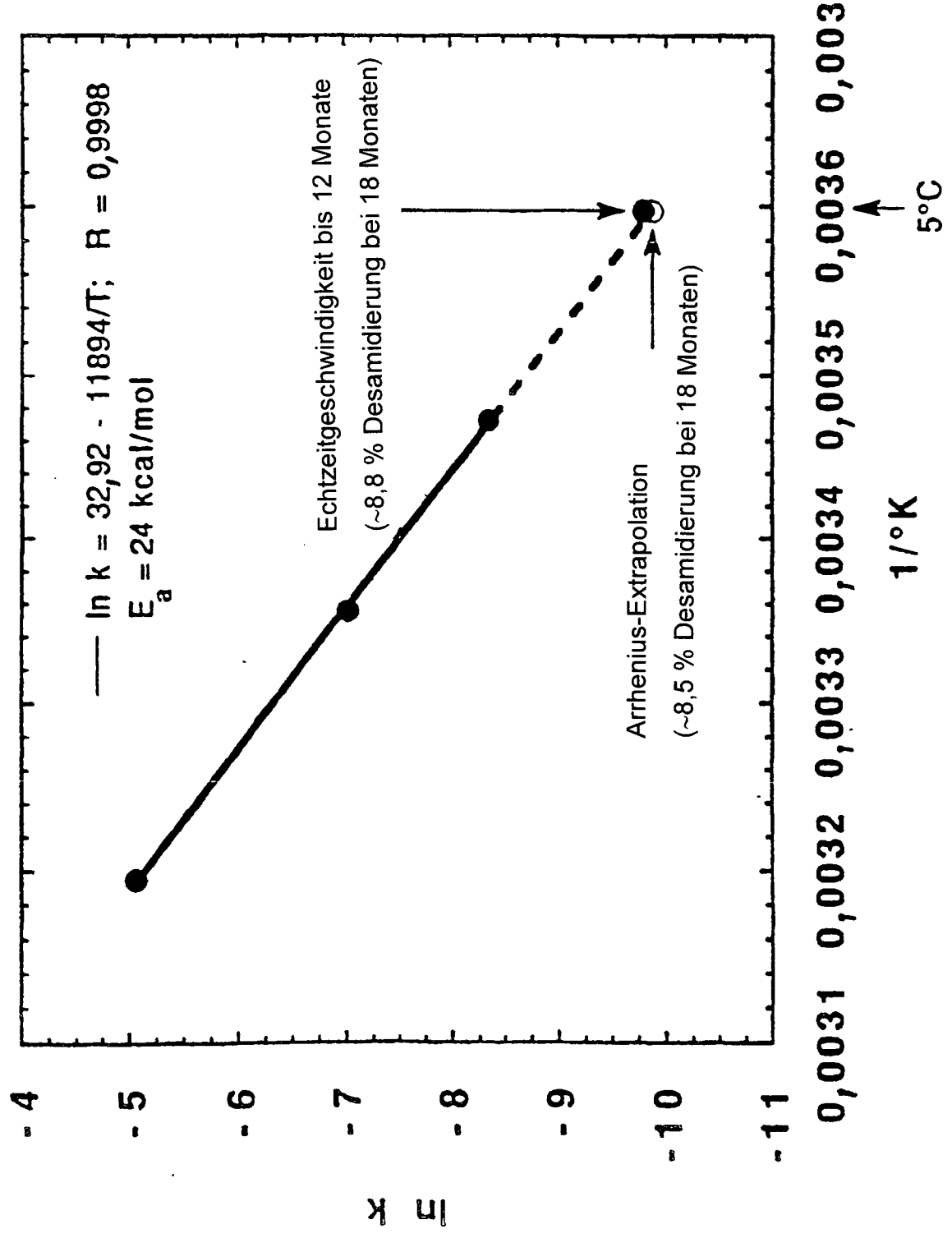

ln k = 32,92 - 11894/T; R = 0,9998
E_a = 24 kcal/mol
Echtzeitgeschwindigkeit bis 12 Monate
(~8,8 % Desamidierung bei 18 Monaten)
Arrhenius-Extrapolation
(~8,5 % Desamidierung bei 18 Monaten)
5°C
ln k
1/°K
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
-11
0,0031
0,0032
0,0033
0,0034
0,0035
0,0036
0,0037

FIG. 4

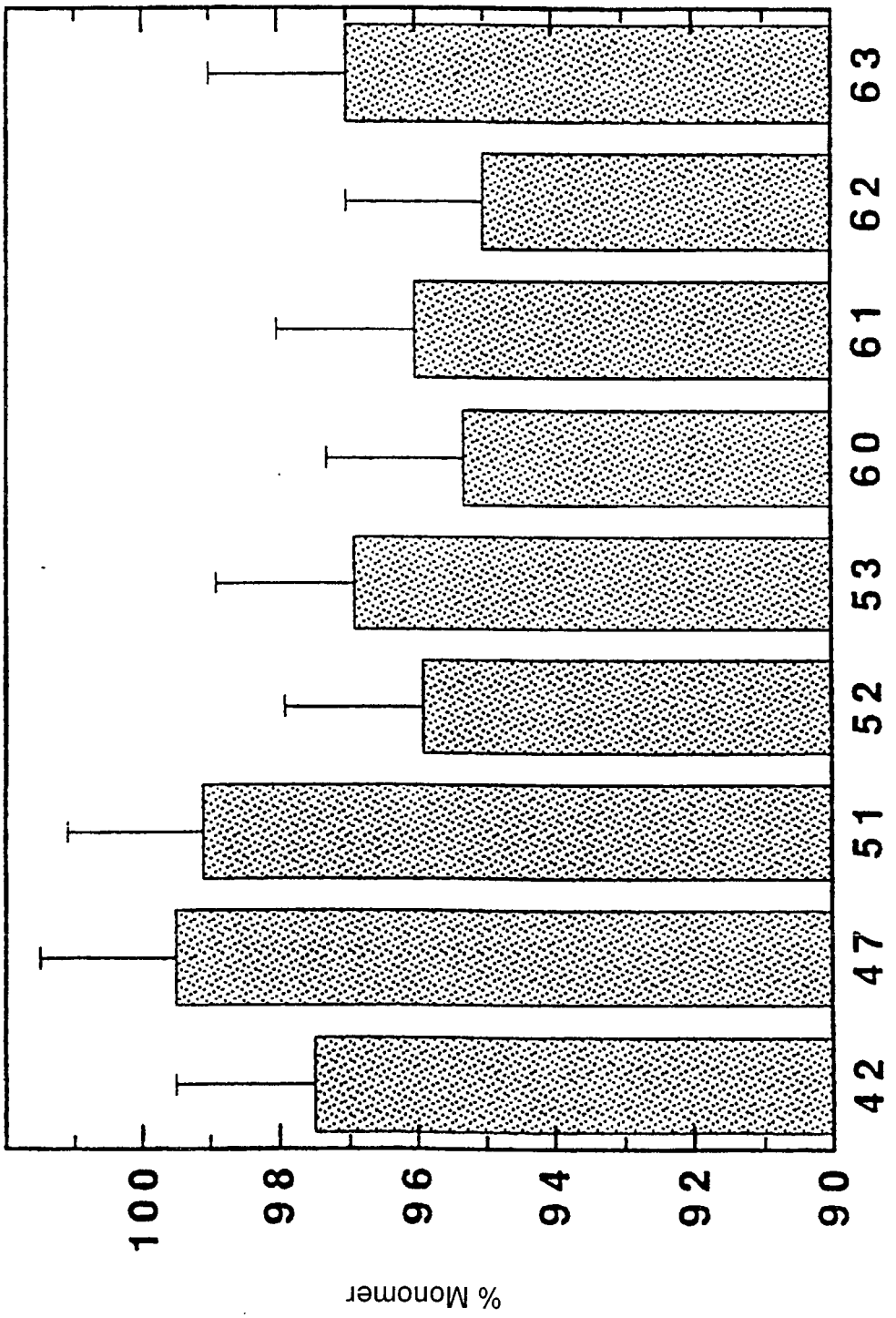

% Monomer
100
98
96
94
92
90
42
47
51
52
53
60
61
62
63
Formulierung

FIG. 5