



①⑨



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①① CH 685 600 A5

⑤① Int. Cl.⁶: A 61 K 38/23**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①② **PATENTSCHRIFT** A5

②① Gesuchsnummer: 2194/92

②② Anmeldungsdatum: 13.07.1992

③① Priorität(en):
15.07.1991 GB 9115202
14.01.1992 GB 9200748

②④ Patent erteilt: 31.08.1995

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.08.1995⑦③ Inhaber:
Sandoz AG, Basel⑦② Erfinder:
Azria, Moise, Dr., Basel
Fricker, Gert, Dr., Staufeu (DE)
Vonderscher, Jacky, Dr., Riedisheim (FR)⑤④ **Peptid-Zubereitungen mit hypocalcämischer Wirkung.**

⑤⑦ Eine transmurkosale pharmazeutische Zubereitung
enthaltend ein pharmakologisch wirksames Calcitonin
Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(-desoxy-
fructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32), das, wenn transmurko-
sal z.B. oral verabreicht wird, eine starke hypocalcämische
Wirkung besitzt.



Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide mit hypocalcämischer Wirkung (Calcitonine).

Wie im allgemeinen mit Peptiden, ist die Entwicklung von geeigneten und wirksamen Formulierungen zur Verabreichung von Calcitoninen mit vielen Problemen behaftet. Als Peptide werden Calcitonine nach oraler Verabreichung leicht durch Magensäfte zersetzt. Überdies passieren sie die Schleimhäute im Körper, ob im Magen, im Darm, Mund, Nase oder dem Rectum nur mit grosser Schwierigkeit und Wirkungslosigkeit (transmucosal).

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Zubereitungen enthaltend ein Calcitonin als pharmakologisch aktive Substanz, die nach transmucosaler Verabreichung eine erhöhte hypocalcämische Wirkung im Blut hat.

In einer Hinsicht betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend Isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys (For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32), das nach transmucosaler Verabreichung an Rhesusaffen von 5-7 kg Körpergewicht, hypocalcämische Wirkungen im Blut von mindestens -9%, z.B. -15%, -21% oder -25% bewirkt. Die Erfindung basiert auf den in den Beispielen beschriebenen Resultaten.

Die Wirkungen sind stärker als die bisher publizierten für Calcitonin-Zubereitungen für dieselben Verabreichungsarten und sind daher neu. Als transmucosale Verabreichung ist die orale Verabreichung bevorzugt, die nasale und rektale Verabreichung sind ebenfalls wirksam.

Die Entdeckung der starken hypocalcämischen Wirkungen ermöglicht es, Calcitonin enthaltende Zubereitungen transmucosal zu verabreichen. Das war bislang, wegen der niedrigen Stabilität der aktiven Verbindung und/oder der Resorptionsfähigkeit der bekannten Zubereitungen, nicht möglich.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zubereitungen enthaltend Isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys (For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32), die wenn oral verabreicht in Mengen, die 0.1, 0.5, 1 oder 10 mg des aktiven Wirkstoffes entsprechen, an einen Rhesusaffen von 5-7 kg Körpergewicht hypocalcämische Wirkungen im Blut von mindestens -9%, z.B. -15%, -21% bzw. -25%, aufweisen.

Die Substanz hat die Formel N-alpha-Isocaproyl-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys-(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Lys(1-deoxy-D-fructosyl)-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ (For = Formyl). Die Formel Isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32) ist die abgekürzte Form; die Verbindung ist im Folgenden als Verbindung A bezeichnet.

Die Verbindung A und ihre Eigenschaften, ist in der publizierten UK Patentanmeldung 2 218 102 A beschrieben, deren Inhalt hier durch Bezugnahme aufgenommen ist. Ihre Herstellung ist im Beispiel 11 dieser Anmeldung beschrieben. Die Verbindung A ist angezeigt zur Anwendung bei Paget' Krankheit, Hypercalcämia und Osteoporose.

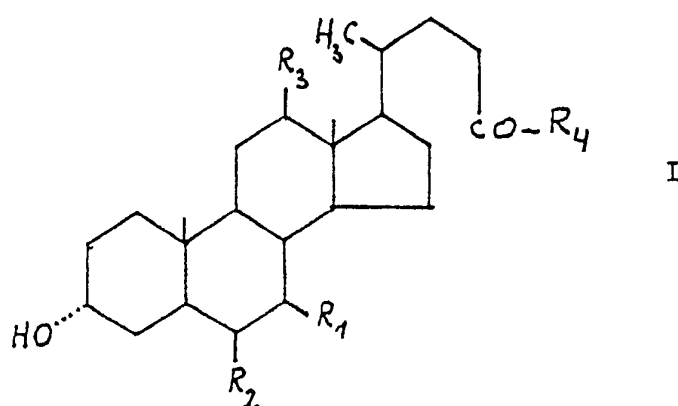
Zur Anwendung in der vorliegenden Erfindung kann die Verbindung A in freier Form oder in Form eines pharmazeutisch verträglichen Salzes oder Komplexes oder Solvats vorliegen. Solche Salze und Komplexe sind bekannt und besitzen einen der freien Form äquivalenten Grad an Aktivität und Tolerabilität. Geeignete Säureadditionssalze zur Anwendung gemäss der Erfindung umfassen z.B. Acetate.

Die Verbindung A unterscheidet sich von dem bekannten Salmcalcitonin in der Struktur und chemischen Eigenschaften. Sie ist um 4 Aminosäurereste kürzer und hat nicht die cyclische Disulfid-Struktur, die typisch ist für natürliche Calcitonine.

Das pharmakologische Profil der Verbindung A gleicht nicht dem des Salmcalcitonin, beide Verbindungen verursachen jedoch z.B. eine hypocalcämische Wirkung nach Injektion. Wir haben jetzt gefunden, dass die Verbindung A genug wirksam ist, um zur Anwendung in pharmazeutischen Zubereitungen, z.B. für nasale Verabreichung oder, wenn ein Resorptionsförderer vorhanden ist, zusätzlich für orale (gastrische) oder rektale Verabreichung, zu gelangen.

In einer anderen Hinsicht betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zubereitungen enthaltend Isocaproyl-[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32) zusammen mit einer Gallensäure oder dessen Salz, z.B. einem Metall- oder einem Ammoniumsalz, z.B. von einer basischen Aminosäure.

Die Gallensäure oder dessen Salz fördert die transmucosale Resorption. Die bevorzugten Gallensäuren sind diejenigen der Formel I



20 worin

R_1 für α - oder β -OH

R_2 für H oder OH

R_3 für H oder α -OH

R_4 für OH oder

25 NH. R_5 , worin R_5 für $-\text{CH}_2\text{COOH}$ oder $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ stehen.

Die Gallensäuren sind bekannt.

Bevorzugte Gallensäuren sind diejenigen der Formel I, worin

30 $R_1 = \alpha\text{-OH}$

$R_2 = \text{H}$

$R_3 = \alpha\text{-OH}$

$R_4 = \text{NHR}_5$ oder OH

35 Wenn R_5 für $-\text{CH}_2\text{COOH}$ steht, dann ist die Säure Glycocholsäure;

wenn R_5 für $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ steht, dann ist die Säure Taurocholsäure.

Weitere bevorzugte Säuren sind diejenigen, worin

40 $R_1 = \alpha\text{- oder } \beta\text{-OH}$

$R_2 = \text{H}$

$R_3 = \text{H}$

$R_4 = \text{OH}$

45 Wenn $R_1 = 7\alpha\text{-OH}$, dann ist die Säure Chenodeoxycholsäure; wenn $R_1 = 7\beta\text{-OH}$, dann ist die Gallensäure Ursodeoxycholsäure.

Wenn

50 $R_1 = \alpha\text{-OH}$

$R_2 = \text{H}$

$R_3 = \alpha\text{-OH}$ und

$R_4 = \text{OH}$, dann liegt Cholsäure vor.

Die bevorzugten Gallensäuren sind Chenodeoxycholsäure und Taurocholsäure. Die Metallsalze sind vorzugsweise Alkalimetallsalze, z.B. das Natrium Salz.

55 Die basischen Aminosäuren sind vorzugsweise Arginin, Ornithin, Lysin oder Deltahydroxylysin.

Bevorzugte Säureadditionssalze sind Salze von Taurocholsäure oder Chenodeoxycholsäure mit Lysin (Tauro-Lys oder Cheno-Lys).

Das Taurocholsäure-Lysinat ist eines der am meisten bevorzugten Salze.

Wir haben nun gefunden, dass z.B. das Taurocholsäure-Lysinat besonders geeignet ist, um die hypocalcämische Wirkung der Verbindung A zu fördern.

60 Aufgrund der Resultate des Beispiels 2 und der Tabelle I betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys-(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin- (5-32) als aktiven Wirkstoff und eine Gallensäure, die, wenn oral verabreicht in einer Menge, die 3 mg des aktiven Wirkstoffes entspricht, an einen Rhesusaffen von

65

5–7 kg Körpergewicht, eine relative hypocalcämische Bioaktivität (Wirksamkeit) von mindestens 200% aufweist, im Vergleich zu der gleichen Zubereitung ohne Gallensäure, die definitionsgemäss eine relative Bioaktivität von 100% aufweist, gemessen während 24 Stunden nach der Verabreichung.

Die Bestimmung der relativen hypocalcämischen Wirksamkeit erfolgt durch Vergleich der Fläche unter der Kurve, (AUC = «area under the curve»), die die hypocalcämische Wirkung gemessen während 24 Stunden nach oraler Verabreichung der erfindungsgemässen Zubereitung anzeigt und der AUC der Referenz-Zubereitung ohne Resorptionsförderer unter denselben Bedingungen.

Die erhöhte hypocalcämische Wirkung ist z.B. durch den erhöhten Plasmaspiegel der Verbindung A verursacht. Die AUC des Plasmaspiegels können ebenfalls berechnet werden.

Aufgrund der Versuche des Beispiels 2 und der erhaltenen Resultate in Tabelle II betrifft die vorliegende Erfindung, ebenfalls bevorzugt, eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5–32) als aktiven Wirkstoff und eine Gallensäure, die, wenn oral verabreicht in einer Menge, die 3 mg des aktiven Wirkstoffes entspricht, an einen Rhesusaffen von 5–7 kg Körpergewicht, eine relative hypocalcämische Bioaktivität (Wirksamkeit) von mindestens 200% aufweist, im Vergleich zu der gleichen Zubereitung ohne Säureadditionssalz, die definitionsgemäss eine relative Bioaktivität von 100% aufweist, gemessen während 24 Stunden nach der Verabreichung.

Der Plasmaspiegel der Verbindung A wurde ebenfalls bestimmt im Beispiel 4 in einer Zubereitung enthaltend zusätzlich einen Resorptionsförderer nach oraler Verabreichung, und verglichen mit dergleichen Zubereitung, jedoch ohne Resorptionsförderer und intravenös verabreicht. In diesem Versuch wird die absolute Bioverfügbarkeit berechnet.

Aufgrund der Resultate der Tabelle III, betrifft die vorliegende Erfindung als weitere bevorzugte Zubereitung eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5–32) als aktiven Wirkstoff und einen Resorptionsförderer, die, wenn oral verabreicht in einer Menge, die 200 Mikrogramm des aktiven Wirkstoffes entsprechen, an Wistar Ratten von 280–300 g Körpergewicht, eine absolute Bioverfügbarkeit von mindestens 1500% in ng.h/ml aufweist, im Vergleich zu der gleichen Zubereitung ohne Resorptionsförderer, die definitionsgemäss eine absolute Bioverfügbarkeit von 100% aufweist, gemessen während 5 Stunden nach der Verabreichung.

Basierend auf den Resultaten des Beispiels 3, Absatz 1, ergibt sich die Folgerung, dass die Verbindung A durch die Nase ohne Resorptionsförderer sowie oral mit einem Resorptionsförderer, wie im Beispiel 1 beschrieben, resorbiert werden kann.

Im Beispiel 3 ist eine pharmazeutische Zubereitung beschrieben, die, wenn nasal verabreicht in einer Menge entsprechend 80 Mikrogramm Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5–32) an einen Rhesusaffen von 5–7 kg Körpergewicht, eine relative Bioverfügbarkeit von mindestens 200% aufweist, im Vergleich zu einer Referenzlösung enthaltend Salmcalcitonin als aktiven Wirkstoff, die definitionsgemäss eine relative Bioverfügbarkeit von 100% hat, gemessen während 8 Stunden nach Verabreichung.

In der UK Patent Anmeldung 2 218 098 A wurde offenbart, dass pharmazeutische Zubereitungen, die ein Salmcalcitonin und Taurochoisäure-Lysinat enthalten, eine erhöhte lokale Tolerabilität aufweisen, wenn sie nasal verabreicht werden. Diese hatten eine Bioverfügbarkeit derselben Grössenordnung wie diejenigen, die durch nasale Verabreichung von Zubereitungen enthaltend Salmcalcitonin und den bereits bekannten Resorptionsförderer Natriumtaurocholat.

Dennoch konnte aufgrund dieser Publikation nicht erwartet werden, dass eine Zubereitung mit so guter hypocalcämischer Aktivität, guter Tolerabilität und geringer Nahrungswechselwirkung erhalten werden konnte, wie diejenige der erfindungsgemässen Zubereitung.

Zusätzlich konnte nicht erwartet werden, dass mit der Verbindung A, die chemisch sehr verschieden von Salmcalcitonin ist, so gute Resultate der transmucosalen Penetration und Bioverfügbarkeit erzielt werden konnten.

Die pharmazeutischen Zubereitungen können in üblicher Weise hergestellt werden, unter Verwendung von geeigneten Hilfsstoffen je nach der erwogenen Verabreichungsart, z.B. oral, nasal oder rectal.

Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein entsprechendes Calcitonin mit Hilfsstoffen verarbeitet und, falls eine Erhöhung der Resorption erwünscht ist, z.B. für die orale Verwendung der Zubereitung, mit einer Gallensäure oder dessen Salz, z.B. einem Metallsalz oder einem basischen Aminosäuresalz.

Zweckmässigerweise werden diese Zubereitungen nach üblichen Verfahren hergestellt und liegen in üblichen Formen z.B. als Kapseln, Tabletten, Suppositorien, dispergierbare Pulver, Sirup, Elixir, Suspensionen oder Lösungen vor, für z.B. enterale Verabreichung. Geeignete pharmazeutische Verdünnungsmittel oder Träger sind in den Beispielen beschrieben. Diese können z.B. sein Wasser, Lactose sowie geeignete Konservierungsmittel, Suspendierungsmittel, Bindemittel, Gleitmittel, um ein elegantes und schmackhaftes pharmazeutisches Präparat zur Verfügung zu stellen.

Wenn ein flüssiger Träger in der nasalen Zubereitung der Erfindung vorhanden ist, zum Beispiel in der flüssigen Zubereitung der Erfindung, ist er bevorzugt wässrig, kann aber auch ausgewählt sein aus physiologisch annehmbaren nicht-wässrigen Lösungsmitteln, die geeignet sind zum Aufbringen auf die Nasenschleimhaut. Bevorzugt ist der flüssige Träger Wasser, wässrige Kochsalzlösung, zum Beispiel physiologische Kochsalzlösung, oder ein wässriger Puffer.

Wenn ein fester Träger vorhanden ist, d.h. bei den festen Nasalzubereitungen der Erfindung, kann er zum Beispiel wasserunlöslich, schlecht wasserlöslich, wasserabsorbierend, in Wasser quellbar, gelbildend oder wasserlöslich sein. Beispiele solcher Träger umfassen zum Beispiel synthetische oder halbsynthetische Polymere, die gegebenenfalls vernetzt sind, wie Polyacrylate, zum Beispiel Natrium-, Kalium- oder Ammoniumpolyacrylate, Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Copolymere von Milch- und Glykolsäuren, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat, Copolymere von Vinylalkohol und Acetat, Carboxyvinylpolymer, Polyvinylpyrrolidon und Polyethylenglykol; Cellulosen wie Cellulose, mikrokristalline Cellulose und α -Cellulose, und Cellulosederivate, wie Methylcellulose, Ethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und Ethylhydroxyethylcellulose; Dextrine wie α -, β - oder γ -Cyclodextrin, Dimethyl- β -cyclodextrin, Dextrin; Stärken wie native Stärken und ihre Derivate, zum Beispiel Hydroxyethyl- oder Hydroxypropylstärke und Carboxymethylstärke; Polysaccharide wie Dextran, vernetzte Dextrane, Pullulan, Alginsäure und deren Salze, Hyaluronsäure und deren Salze, Pektinsäure und deren Salze, Phytinsäure und Phytin; Saccharosen wie D-Mannit, Glucose, Lactose, Fructose, Inosit, Saccharose und Amylose; Aminosäuren wie Glycin und Taurin; Polyaminosäuren wie Polyglutaminsäure, Polyaspartinsäure, Polyglycin und Poly-leucin; Proteine wie Kasein, Gelatine, Gelatinederivate wie Succinylgelatine, Chitin und Chitosan; Gummis wie Gummi arabicum, Tragant-Gummi und Glucomannan und Phospholipide; und deren Mischungen. Diese Träger können ebenfalls in den oralen Zubereitungen der Erfindung vorhanden sein. Bevorzugte Träger sind solche, die den Kontakt der nasalen Zubereitung mit der Nasenschleimhaut verbessern oder die Diffusion des Arzneimittels von der nasalen Zubereitung in die Nasenschleimhaut erleichtern, zum Beispiel die die Aufenthaltszeit der nasalen Zubereitung verlängern und/oder den Abstand zwischen dem Arzneimittel oder der Zubereitung und der Schleimhaut vermindern.

Bevorzugte feste Träger sind Polyacrylate, Natriumcarboxymethylcellulose, Stärken und ihre Derivate, Alginsäure und deren Salze, Hyaluronsäure und deren Salze, Pektinsäure und deren Salze, Gelatine und ihre Derivate, Gummis, Polymilchsäure und ihre Copolymere, Polyvinylacetat, die Cellulosen und ihre Derivate, beschichtete Cellulosen, vernetzte Dextrane, bevorzugter Polymilchsäure und ihre Copolymeren, Polyvinylacetat, Cellulosen und deren Derivate, beschichtete Cellulosen und vernetzte Dextrane. Besonders bevorzugt ist mikrokristalline Cellulose.

Die flüssigen Zubereitungen der Erfindung haben zum Beispiel aus Stabilitätsgründen vorzugsweise ein leicht saures pH, zum Beispiel von 3.7. Der erforderliche Grad an Acidität kann in üblicher Weise erreicht werden, zum Beispiel durch Zugabe eines Puffermittels, oder einer Säure wie HCl oder einer anderen geeigneten Mineralsäure oder organischen Säure, zum Beispiel Phosphorsäure.

Flüssige und feste Zubereitungen der Erfindung können auch weitere Additive enthalten, zum Beispiel Antioxidantien, Konservierungsmittel wie Benzalkoniumchlorid, ein Alkyl-p-hydroxybenzoat (Paraben) wie Methyl-p-hydroxybenzoat und Propyl-p-hydroxybenzoat, oder Natriummethylmercurithiosalicylat (Thiomersal).

Die weiteren betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung, die für die nasale Verabreichung geeignet ist und die Verbindung A in Abwesenheit eines Resorptionsförderers enthält.

Unter Förderer wird eine Verbindung verstanden, die dazu dient, die Resorption über die Nasenschleimhaut zu erhöhen, zum Beispiel durch Wechselwirkung mit den Komponenten der Schleimhautmembran und/oder durch Erhöhung der Permeabilität der Schleimhautmembran.

Geeignete Förderer umfassen zum Beispiel Cholinester, zum Beispiel die in EP-A 214 898 offenbarten Acylcarnitine, zum Beispiel die in EP-A 215 697 offenbarten Aldosen und Glucosamine, Ascorbate und Salicylate, zum Beispiel die in EP-A 37 943 offenbarten α -Cyclodextrin, zum Beispiel das in EP-A 94 157 offenbarte Pyroglutamatester, zum Beispiel die in EP-A 173 990 offenbarten Komplexierungsmittel, zum Beispiel die in US-PS 4 476 116 offenbarten Polyacrylsäuregelbasis, Natriumglycyrhizinat, Natriumcaprat, Ammoniumtartrat, ein Glycyrhizinat, zum Beispiel Natrium- oder Ammoniumglycyrhizinat, zum Beispiel das in EP-A 327 756 offenbarte Glycin oder γ -Aminolävulinsäure ein.

Die Teilchengrösse der Komponenten einschliesslich der Träger, zum Beispiel des Celluloseträgers, in den festen nasalen Zubereitungen der Erfindung kann im Bereich von 5 bis 500 μ , vorzugsweise 10 bis 250 μ , insbesondere 20 bis 200 μ liegen.

Die flüssige Zubereitungen der Erfindung können hergestellt werden, indem die Verbindung A in innige Mischung mit dem flüssigen Träger, gegebenenfalls zusammen mit den weiteren Bestandteilen gebracht wird.

Die feste nasale Zubereitung der Erfindung kann in üblicher Weise hergestellt werden. Die Verbindung A kann mit den Trägerteilchen, zum Beispiel einem Polymer oder einem Celluloseprodukt in üblicher Weise vermischt werden, gegebenenfalls mit weiteren Bestandteilen, wie sie oben angegeben sind, z.B. einem Resorptionsförderer oder einem oberflächenaktiven Mittel wie angegeben. Die Verbindung A kann in Lösung sein, z.B. in wässriger oder alkoholischer Lösung, wenn es mit den Trägerteilchen vermischt und das Lösungsmittel verdampft wird, z.B. durch Gefriertrocknen oder Sprühtrocknen. Ein solches Trocknen kann unter üblichen Bedingungen durchgeführt werden. Alternativ kann die Mischung verdichtet oder granuliert werden und dann pulverisiert und/oder gesiebt werden.

Die pharmazeutischen Zubereitungen der Erfindung werden zweckmässigerweise hergestellt für orale oder nasale Verabreichung.

Die genaue Dosis der Verbindung A, Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-

salmcalcitonin-(5-32) kann in konventionellen Tier- oder klinischen Versuchen ermittelt werden. Z.B. kann die Dosis durch vergleichende Bioverfügbarkeitsversuche mit anderen Formulierungen mit einem bekanntem therapeutischen Effekt bestimmt werden. Die Dosis wird so gewählt, dass sie im steady state Plasmaspiegel des Arzneimittels liefert, die vergleichbar sind zu therapeutisch wirksamen Spiegeln.

Im allgemeinen beträgt die Dosis der Verbindung A mit dem Gallensäuresalz für orale oder rektale Verabreichung die Hälfte bis ein Zehntel der Dosis der Verbindung A in einer vergleichbaren Formulierung für dieselbe Verabreichungsart, jedoch ohne Resorptionsförderer.

Angezeigte Tagesdosen von Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32) betragen von etwa 2 Mikrogramm bis etwa 30 mg, z.B. von 0.1 bis 20 mg für orale oder rektale oder nasale Anwendung.

Zweckmässigerweise liegen die Zubereitungen in einer Einzeldosis vor oder sie können zu Einzeldosisformen zerteilt werden, jede Dosis enthaltend, vorzugsweise für orale Anwendung, z.B. von etwa 0.1 bis 300 mg, vorzugsweise von 50 bis 200 mg, insbesondere bis etwa 100 mg Gallensäure, wobei die exakte Menge von z.B. der Verabreichungsart abhängt. Zweckmässigerweise beträgt das Gewichtsverhältnis von Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32) zu dem Säureadditionssalz der Erfindung z.B. von etwa 1:1 bis etwa 1:5000, z.B. vorzugsweise 1:2 bis 1:2000 für orale oder rektale Verabreichung.

Der Resorptionsförderer, z.B. die Gallensäure wird z.B. in einer Menge von 0.1 bis 10, vorzugsweise von 0.7 bis 1.5 Gew.-% als Bestandteil in nasalen Zubereitungen verwendet, in oralen und rektalen Zubereitungen speziell in einer Menge von 1 bis 75 und in oralen Zubereitungen insbesondere in einer Menge von 20 bis 75, z.B. 40 bis 75 Gew.-% verwendet.

Die Dosis von der Verbindung A die mit der erfindungsgemässen Zubereitung verabreicht wird, hängt natürlich von der Art der zu behandelnden Erkrankung, der gewünschten Dosisfrequenz und dem gewünschten Ergebnis ab.

Die Erfindung betrifft insbesondere eine pharmazeutische Zubereitung gemäss der Erfindung zur Anwendung in der Behandlung von Paget' Krankheit, Hypercalcämie oder Osteoporose.

Beispiel 1:

Kapseln für orale Verabreichung

1A	mg
Verbindung A	0.1 bis 20
Taurocholsäure-Lysinat	100
Mikrokristalline Cellulose	50
Lactose	50

Kapseln gemäss Beispiel 1A enthaltend 0.1, 0.5, 1, 2 und 10 mg der Verbindung A und eine Placebo-Kapsel werden an jedes Mitglied einer Gruppe von Rhesusaffen mit einem ungefähren Körpergewicht von 5-7 kg in 6 getrennten Versuchen verabreicht. Die Tiere haben 1 Tag vor der Behandlung gefastet.

Die Spiegel des ionisierenden Calciums im Blut wurden nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 und 24 Stunden gemessen.

Das Calcium wurde mit einem Ionisierenden Calcium Analysiergerät (ICA 2 Radiometer) gemäss der Methode beschrieben in Selected Short Communications präsentiert am Internationalen Symposium «Calcitonin 1984», Mailand, 2-4 Oktober 1984, Current Clinical Practical Series 42, Excerpta Medica.

Die Resultate in Fig. 1 graphisch dargestellt, zeigen die gute hypocalcämische Wirkung der Verbindung A, verwendbar z.B. in der Behandlung von Osteoporose. «n» bedeutet die Tierzahl im Versuch.

In einem anderen Versuch wurde die Veränderung des Gesamtcalciumgehalts im Blut an Affen nach oraler Verabreichung von einer Kapsel gemäss Beispiel 1A enthaltend 1 mg Verbindung A und einer Placebokapsel bestimmt.

Derselbe Versuch wurde mit Kapseln ohne Taurocholsäure-Lysinat durchgeführt.

Es wurde festgestellt, dass die Verbindung A in Anwesenheit von Taurocholsäure-Lysinat eine stärkere hypocalcämische Wirkung bewirkt (Fig. 2).

Die Resultate zeigen, dass pharmazeutische Zubereitungen enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32) wenn sie an Rhesusaffen von 5-7 kg Körpergewicht in Mengen, die 0.1; 0.5; 1 oder 10 mg des aktiven Wirkstoffs entsprechen, oral verabreicht werden, eine hypocalcämische Wirkung von -9%; -15%; -21% bzw. -25% bewirken.

Die hypocalcämische Wirkung ist die Wirkung auf die ionisierten Calciumblutspiegel.

Beispiel 2:Kapseln für orale Verabreichung

5 Die folgenden Zubereitungen wurden in der im Beispiel 1 beschriebenen Weise verglichen.

	<u>2A</u>	mg
	Verbindung A	3
10	Taurocholsäure-Lysinat	200
	Mikrokristalline Cellulose	50
	Magnesium Stearat	25
15	Lactose	25

	<u>2B</u>	mg
	Verbindung A	3
20	Chenodeoxycholsäure-Lysinat	200
	Mikrokristalline Cellulose	50
	Magnesium Stearat	25
25	Lactose	25

	<u>2C</u>	mg
	Verbindung A	3
	Taurocholsäure-Lysinat	200
	Stärke Mikrosphären	50
35	Mikrokristalline Cellulose	50
	Magnesium Stearat	25
	Lactose	25

	<u>2D</u>	mg
	Verbindung A	3
45	Chenodeoxycholsäure-Lysinat	200
	Stärke Mikrosphären	50
	Mikrokristalline Cellulose	50
50	Magnesium Stearat	25

Placebo Zubereitung (Kapsel)

		mg
55	Verbindung A	3
	Mikrokristalline Cellulose	100

60 Es hat sich gezeigt, dass nach oraler Verabreichung der Zubereitungen an Rhesusaffen, die hypocalcämische Wirkung nach co-Verabreichung mit Taurocholsäure-Lysinat und mit Chenodeoxycholsäure-Lysinat von derselben Grössenordnung ist. Das erstgenannte Salz hatte eine stärkere Wirkung. Die Stärke-Mikrosphären steigern in Kombination mit beiden Salzen etwas die Wirkung, wie den Zahlenwerten der Tabelle I und II zu entnehmen ist.

65 Die erhaltenen Resultate zeigen, dass die oralen Formulierungen enthaltend Taurocholsäure-Lysinat oder Chenodeoxycholsäure-Lysinat relative hypocalcämische Bioaktivitäten von 567 bzw. 534% und re-

relative Bioverfügbarkeiten (Plasmaspiegel) der Verbindung A von 586 bzw. 453% im Vergleich zu der Zubereitung der Verbindung A ohne Cholsäure-Additionssalz (Placebo) (die definitionsgemäss 100% be- trägt) aufweisen.

In diesen Versuchen wurden die Plasmaspiegel der Verbindung A unter Verwendung eines spezifischen RIA gemessen.

Beispiel 3:

Nasale Zubereitungen

Die hypocalcämische Wirkung auf ionisiertes Calcium der folgenden Zubereitungen wurde wie im Beispiel 1 beschrieben gemessen.

3A

Spray Lösung

Verbindung A 440 oder 4400 oder 8800 Mikrogramm

Natriumchlorid 7.5 mg

Benzalkoniumchlorid 0.1 mg

HCl 0.1N ad pH 3.7 9.5 mg

Dest. Wasser 1.0 ml

N₂ Gas q.s.

(etwa 40, 400 oder 800 Mikrogramm/Aktivierung)

3B

Pulver

Verbindung A 40 Mikrogramm

Mikrokristalline Cellulose 30 mg

(etwa 40 Mikrogramm/Kapsel)

Referenz

Salmcalcitonin (SCT) Spray Lösung

Salmcalcitonin (SCT) 440 Mikrogramm (= 2200 I.U.)

Natriumchlorid 7.5 mg

Benzalkoniumchlorid 0.1 mg

HCl 0.1 N ad pH 3.7 q.s.

Dest. Wasser ad 1.0 ml

N₂ Gas q.s.

etwa 40 Mikrogramm = 200 IU/Aktivierung)

Placebo Spray Lösung

Natriumchlorid 7.5 mg

Benzalkoniumchlorid 0.1 mg

HCl 0.1 N ad pH 3.7 q.s.

Dest. Wasser 1.0 ml

N₂ Gas q.s.

(etwa 90 Mikroliter/Aktivierung)

1. Die erhaltenen Resultate nach Verabreichung der Spraylösung 3A in steigenden Mengen sind in Fig. 3 graphisch dargestellt. Sie zeigen die gute hypocalcämische Wirkung der Verbindung A hinunter auf -21% im Vergleich zum Placebo.

2. Durch Messung des ionisierten Calciums der Zubereitungen 3A, 3B und der Referenz-Spraylösung über 24 Stunden wurde insgesamt eine Bioaktivität (Hypocalcämie) von 555% der Zubereitung 3A und von 760% der Zubereitung 3B, im Vergleich mit 100% der Referenz-Lösung (SCT) nach Verabreichung von 80 Mikrogramm (40 Mikrogramm in jedes Nasenloch) an Rhesusaffen von 5-7 kg Körpergewicht berechnet.

3. Durch Messung der Plasmaspiegel der Verbindung A der Zubereitungen 3A und 3B sowie des SCT Spiegels in der Referenz-Spray Lösung über 8 Stunden wurde eine relative Bioverfügbarkeit von 316% der Zubereitung 3A und von 702% der Zubereitung 3B, verglichen mit 100% von SCT der Referenz-Lösung, nach Verabreichung von 80 Mikrogramm der Verbindung A an Rhesusaffen von 5-7 kg Körpergewicht, gemessen.

Beispiel 4:

Mengen von 500 Mikroliter Salzlösung enthaltend 200 Mikrogramm der Verbindung A entweder ohne (Referenz) oder mit einer bestimmten Menge eines Resorptionsförderers wurden an männliche Wistar Ratten (n = 6) von 280-300 g Körpergewicht durch orale Intubierung verabreicht.

Blutproben von 0.7 ml wurden von der Vena Jugularis von jedem bewussten Tier 15 Minuten vor und 10, 30, 60, 120, 180 und 300 Minuten nach Arzneimittel Verabreichung entnommen. Alle Proben wurden analysiert mit Hilfe eine Radioimmunoassayverfahrens für Salmcalcitonin nach der Bestimmung der cross reactivity der Verbindung A. Der Wirkstoffgehalt wird mit HPLC-Analyse verfolgt.

Die absoluten Bioverfügbarkeiten (BV) nach oraler Verabreichung wurden gemäss der folgenden Gleichung

$$BV (\%) = \frac{\text{Mittel- AUC}^\circ (0-5 \text{ hrs}) (p.o.) \times \text{Dosis (i.v.)}}{\text{Mittel- AUC}^\circ (0-5 \text{ hrs}) (i.v.) \times \text{Dosis (p.o.)}} \times 100$$

bestimmt.

Die berechneten pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle III, in Abhängigkeit von den verwendeten Resorptionsförderern angegeben.

Aus Tabelle III, Beispiel 4A, ist ersichtlich, dass die absolute Bioverfügbarkeit der Verbindung A mit dem Resorptionsförderer 3930% beträgt, verglichen mit 100% der Referenzzubereitung enthaltend die Verbindung A ohne einen Resorptionsförderer.

Während die Bioverfügbarkeit der Verbindung A mit Taurocholsäure-Lysinat (Beispiel 4C) besser ist als die mit Chenodeoxycholsäure-Lysinat (Beispiel 4B), ist die Resorptionsaktivität der Chenodeoxycholsäure in Form des Natriumsalzes besser in Kombination mit Lysin.HCl (Beispiel 4A).

Das Gemisch von 1 Gew.-% Natriumchenodeoxycholat mit 1% Lysin.HCl ist theoretisch äquivalent zu einem Gemisch von 2.4 g Mol Chenodeoxycholsäure-Lysinat mit 3.1 g Mol Lysin.HCl, das bedeutet, dass im Vergleich mit Beispiel 4B, die Anwesenheit von zusätzlichem Lysin einen stark erhöhenden Einfluss auf die Resorption hat.

Es ist also möglich, die Bioverfügbarkeit der Verbindung A in Anwesenheit von einer Gallensäure zu erhöhen, ungeachtet, ob das Säureadditionssalz der Gallensäure mit der basischen Aminosäure anwesend ist oder ob beide Säuren, in äquivalenten Mengen, die zur Bildung eines Säureadditionssalzes erforderlich sind, anwesend sind.

Aus Tabelle III, Beispiel 4D ist ersichtlich, dass auch das Natriumchenodeoxycholat eine günstige Wirkung hat. Nach oraler Verabreichung kann dieses Salz in dem sauren Medium des Magens in die freie Chenodeoxycholsäure überführt werden.

Chenodeoxycholsäure ist, im Gegensatz zu Taurocholsäure, wenig löslich in dem sauren Medium des Magens. Die Verbindung A wird in einem sauren Medium aus der sie enthaltenden Zubereitung freigesetzt, langsam, wenn die Zubereitung ebenfalls Chenodeoxycholsäure oder ihr Natriumsalz enthält, und langsamer als mit Taurocholsäure oder ihrem Natriumsalz.

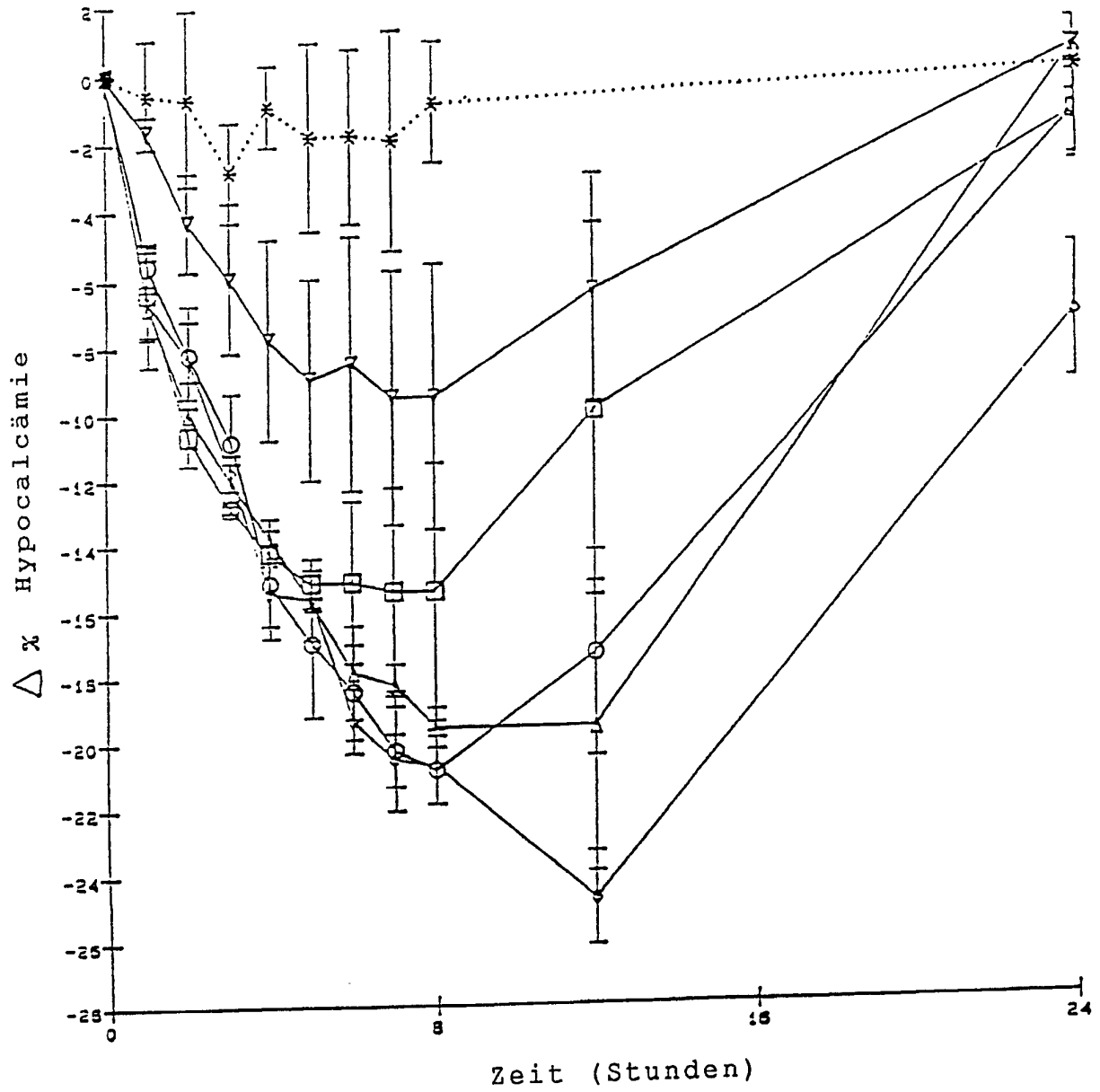
Die Verbindung A kann daher im sauren Medium des Magens in Kombination mit Chenodeoxycholsäure oder ihrem Natriumsalz besser gegen zersetzende Angriffe geschützt sein als mit Taurocholsäure oder dessen Natriumsalz.

Vom Schutz der Verbindung A her betrachtet ist die Chenodeoxycholsäure oder ihr Alkalimetallsalz der bevorzugte Resorptionsförderer für orale Verabreichung.

Patentansprüche

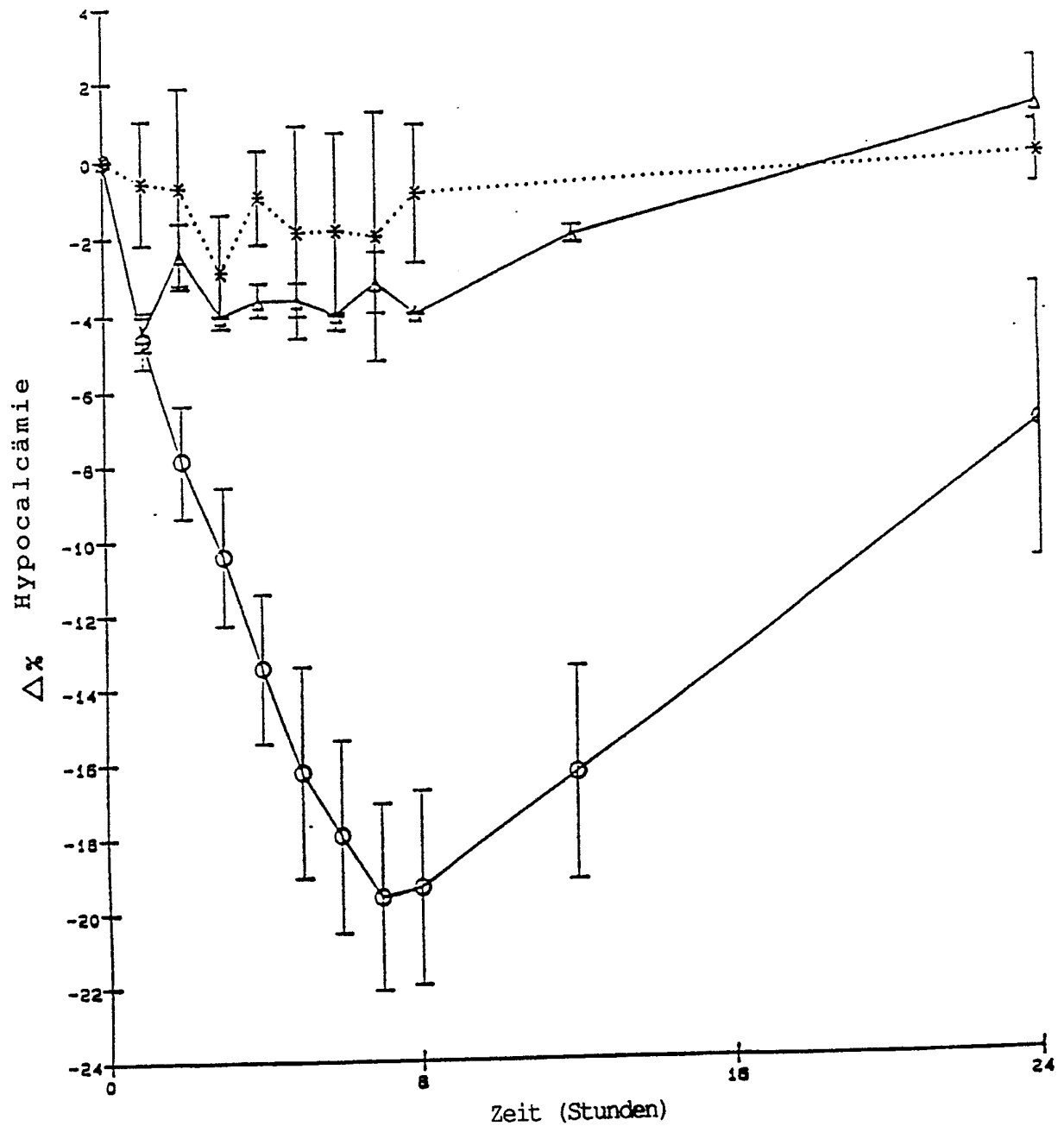
1. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32), die nach transmucosaler Verabreichung an Rhesusaffen von 5-7 kg Körpergewicht eine hypocalcämische Wirkung im Blut von mindestens -9% besitzt.
2. Zubereitung gemäss Anspruch 1 in fester Form.
3. Zubereitung gemäss Anspruch 2 enthaltend mikrokristalline Cellulose.
4. Zubereitung gemäss Anspruch 1 geeignet für nasale Verabreichung.
5. Zubereitung enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lys(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32) und eine Gallensäure oder ihr Salz.
6. Zubereitung gemäss Anspruch 5, worin die Säure Taurocholsäure ist.
7. Zubereitung gemäss Anspruch 5, worin die Säure Chenodeoxycholsäure ist.
8. Zubereitung gemäss Anspruch 5, worin das Salz ein Salz einer Aminosäure ist.
9. Zubereitung gemäss Anspruch 8, worin die Aminosäure Lysin ist.
10. Zubereitung gemäss Anspruch 5, worin das Salz ein Metallsalz ist.
11. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 und 5, geeignet für orale Verabreichung.
12. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 und 5, geeignet für rektale Verabreichung.
13. Zubereitung geeignet für nasale Verabreichung, enthaltend Isocaproyl[Ala⁷, Aib^{10,17}, Lis(For)^{11,18}, Lys(desoxyfructosyl)²⁴]-salmcalcitonin-(5-32), in Abwesenheit eines Resorptionsförderers.
14. Zubereitung gemäss Anspruch 13 in flüssiger Form, enthaltend Benzalkoniumchlorid.
15. Zubereitung gemäss einem der vorhergehenden Ansprüche, enthaltend 2 Mikrogramm bis 30 mg Calcitonin pro Einzeldosis.
16. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung gemäss einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, das man ein entsprechendes Calcitonin mit Hilfsstoffen und, falls eine resorptionsfördernde Wirkung gewünscht ist, mit einer Gallensäure oder ihrem Salz verarbeitet.

Fig. 1



.....*..... placebo (n=4)
 —▽— 0.1mg oral (n=4)
 —□— 0.5mg oral (n=4)
 —○— 1 mg oral (n=4)
 —△— 2 mg oral (n=2)
 —◇— 10 mg oral (n=4)

Fig. 2

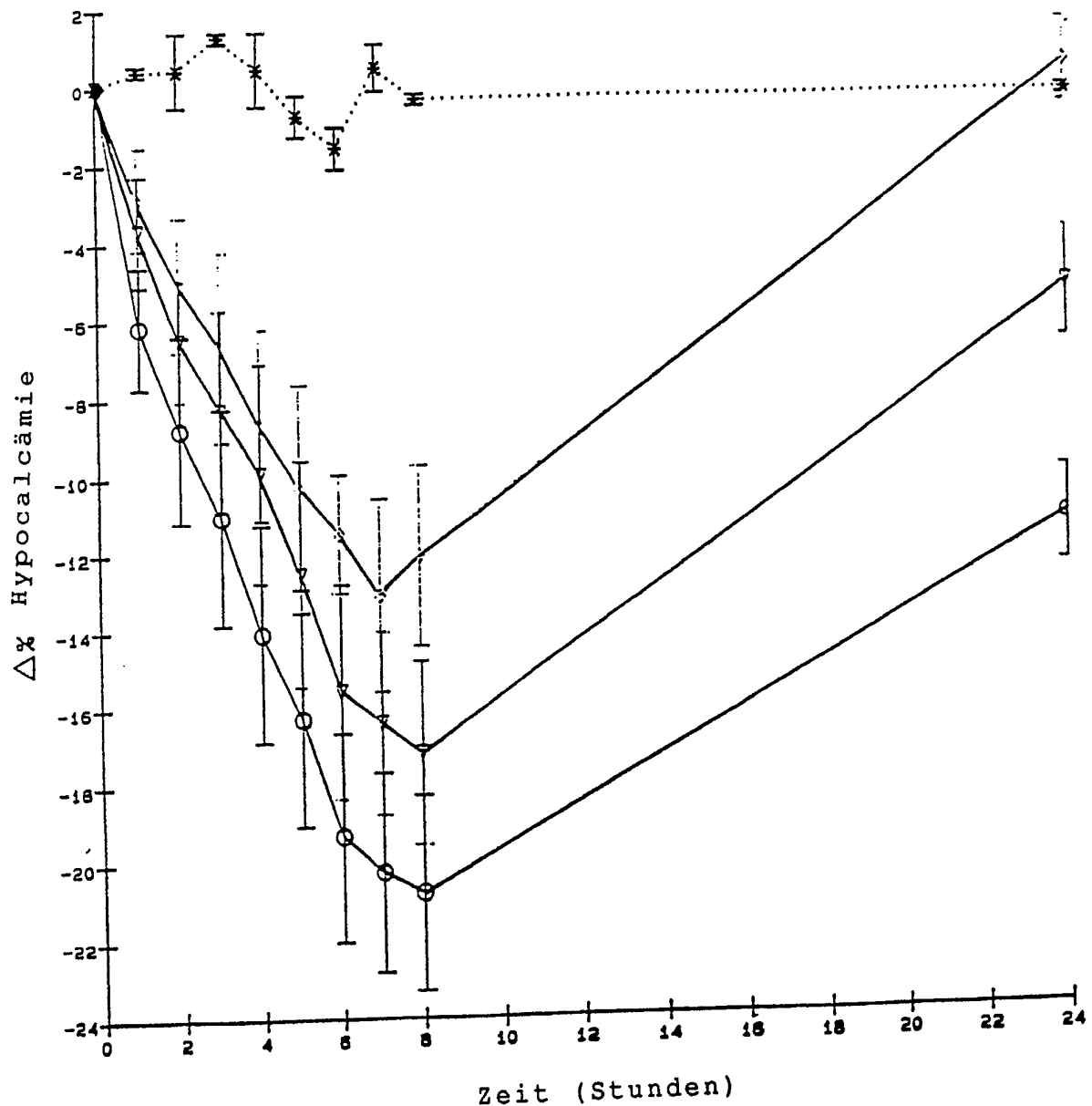


.....*..... Placebo mit Taurocholsäure-Lysin (n=4)
 —Δ— 1mg A ohne Taurocholsäure-Lysin (n=2)
 —○— 1mg A mit Taurocholsäure-Lysin (n=4)

Fig. 3

Dosis-Wirkungs-Beziehung

Veränderungen des ionisierten Calciums im Blut des
Rhesusaffen nach intranasaler Verabreichung (n = 4)
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwerts)



.....*.....Placebo 180 µl (90 µl in jedes Nasenloch) (n = 2)
 ---Δ--- A 80 µg (40 µg in jedes Nasenloch)
▽--- A 800 µg (400 µg in jedes Nasenloch)
 ---○--- A 1600 µg (800 µg in jedes Nasenloch)

Tabelle I

Hypocalcämische Aktivität am Rhesusaffen nach oraler Verabreichung von 3 mg A in Kapsel mit verschiedenen Formulierungen (n = 4)

Dosierungsform	Wichtigste biokinetische Parameter				
	Mittelwert der hypocalc. max (A%)	Mittelwert der T max (Stunden)	Hypocalc. max der Mit- telkurve (A%)	T max der Mittelkurve (Stunden)	AUC 0-24 h (A% *h)
mit Tauro-Lys. (2A)	-17.8	10	-16.4	8	-258.9
mit Cheno-Lys. (2B)	-17.1	8.8	-16.7	8	-253.1
mit Tauro-Lys. + Stärke Mikrosph. (2C)	-19.6	12	-19.6	12	-295.6
mit Cheno-Lys. + Stärke Mikrosph. (2D)	-18.5	10.8	-16.3	8	-278.3
mit mikrokristalliner Cellulose (Referenz)	-7.2	3	-6.4	4	-52.1
					100 (definitionsgemäss)

Relative
Bioverfügbarkeit
(%)

Tabelle II

Plasmaspiegel im Rhesusaffen nach oraler Verabreichung von 3 mg A in Kapsel mit verschiedenen Formulierungen
(n = 4)

Dosierungsform	Wichtigste biokinetische Parameter					
	Mittelwert von C _{max} ng/ml	Mittelwert der T _{max} (Stunden)	C _{max} der Mittelkurve (ng/ml)	T _{max} der Mittelkurve (Stunden)	AUC 0-24 h (ng * h/ml)	Relative Bioverfügbarkeit (%)
mit Tauro-Lys. (2A)	0.470	0.875	0.325	1	0.999	377
mit Cheno-Lys. (2B)	0.278	1.375	0.275	1.5	0.798	301
mit Tauro-Lys. + Stärke Mikrosph. (2C)	0.539	1	0.430	1	1.552	586
mit Cheno-Lys. + Stärke Mikrosph. (2D)	0.401	1.625	0.339	1	1.201	453
mit mikrokristalline Cellulose (Referenz)	0.150	1.5	0.090	1.5	0.265	100 (definitionsgemäss)

Tabelle III

Plasmaspiegel in der Ratte nach oraler Verabreichung von 200 Mikrogramm A

Form (Dosis: 200 µg A/Ratte in 500 Mikroliter Salzlösung)	AUC ⁰ 5h ng h/ml	CV %	C _{max} ng/ml	CV %	T _{max} h	CV %	Absolute Bioverfüg- barkeit %	Faktor
4A + 1% Natrium- chenodeoxycholat + 1% Lysin.HCl	10.09	101	8.27	79	0.48	157	2.36	3930%
4B + 1% Chenodeoxy- cholsäure-Lysinat	2.32	67	2.32	60	0.48	157	0.55	920%
4C + 1% Taurochol- säure-Lysinat	6.20	133	2.92	126	0.36	93	1.18	1970%
4D 0.5% Natrium- chenodeoxycholat	7.08	163	4.35	113	0.17	0	1.73	2880%
Referenz	1.40	101	0.53	53	0.96	143	0.06	100% (definitionsgemäß)

CV = Variabilitätskoeffizient