

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 635**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
C07K 14/635 (2006.01)
F26B 5/06 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61K 38/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 15181579 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3020409**

54 Título: **Preparación liofilizada que contiene PTH de alta pureza y método para producirla**

30 Prioridad:

07.06.2011 JP 2011127698

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.05.2020

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)
1-1-2 Yurakucho, Chiyoda-ku
Tokyo 100-0006, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIO, FUMIHIDE;
MAEJIMA, TAKUJI y
MITOME, YOSHIHIRO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 761 635 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación liofilizada que contiene PTH de alta pureza y método para producirla

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para producir una preparación liofilizada que contiene péptido PTH.

5 Antecedentes de la técnica

La hormona paratiroidea, junto con calcitoninas y vitaminas D, es una hormona que participa en la regulación de la concentración de calcio en la sangre. Por lo tanto, el péptido PTH se usa como diagnóstico de hipoparatiroidismo. También se sabe que la hormona paratiroidea acelera la absorción de calcio en el intestino al aumentar la producción activa de vitamina D3 en los riñones (referencia 1 no de patente). También se ha descrito un método para tratar la osteoporosis que aumenta la densidad del hueso esponjoso y no disminuye la densidad del hueso cortical de los pacientes con osteoporosis mediante la administración subcutánea de 100 o 200 unidades/tiempo de PTH una vez a la semana durante un periodo de 26 semanas a pacientes con osteoporosis (Referencia de patente 7).

Un método para combinar manitol u otro sacárido tal o gelatina u otra sustancia macromolecular tal como estabilizador se usa en general cuando se realiza un seguimiento de péptido PTH en una preparación liofilizada para disolver en el momento del uso (Referencias de patentes 1 y 2). También se conoce una composición farmacéutica liofilizada caracterizada por contener un monosacárido o disacárido y cloruro de sodio (Referencia de patente 3).

Cuando una preparación liofilizada tal como la anterior se fabrica asépticamente para producir un producto farmacéutico, las instalaciones ordinarias de producción farmacéutica utilizan áreas que logran un ambiente estéril mediante una corriente de aire aséptico de velocidad constante que ha pasado a través de filtros HEPA. Un proceso de fabricación en una instalación de producción farmacéutica en este entorno estéril consiste normalmente en una etapa para preparar una solución de principio activo, seguido de una etapa para filtrar de manera aséptica la solución y distribuirla en recipientes, una etapa para cargar los recipientes llenos en una cámara de liofilización y una etapa para sellar los recipientes (viales y similares) después de la etapa de liofilización.

Referencias de la técnica anterior**25 Referencias de patentes**

Referencia de patente 1: JP Kokai 63-60904

Referencia de patente 2: JP Kokai 2-111

Referencia de patente 3: JP Kokai 5-306235

Referencia de patente 4: JP Kokai 64-16799

30 Referencia de patente 5: WO02/002136

Referencia de patente 6: JP Kokai 2003-095974

Referencia de patente 7: JP Kokai 8-73376

Referencia de patente 8: WO00/10596

Referencia de patente 9: WO10/30670

35 Referencias no de patentes

Referencia no de patente 1: Current Osteoporosis Reports, Vol. 6, 12-16, 2008

Referencia no de patente 2: Journal of pharmaceutical sciences, vol. 98, n.º 12, p4485-4500, 2009

Referencia no de patente 3: ADVANCES IN ENZYMOLOGY, 32, 221-296, 1969

Referencia no de patente 4: J. Biol. Chem., vol. 266, 2831-2835, 1991

40 Referencia no de patente 5: M. Takei *et al.*, Peptide Chemistry 1980, 187-192, 1981

Sunday *et al.*, AAPS PHARMSCITECH, 27 de enero de 2011, páginas 304-311, describe el efecto de excipientes e ingeniería de partículas en la estabilidad biofísica de PTH (1-34) preparada como un polvo seco para inhalación.

El documento WO 2008/063279 describe la preparación de una proteína relacionada con la hormona PTH que implica la conservación de la proteína que comprende tratamiento con el dispositivo que comprende una cámara de secado con controles de temperatura variable, un condensador y un sistema de vacío para reducir la presión en la cámara de

secado.

El documento WO 2007/095288 describe un método para estabilizar una formulación inhalable que comprende péptidos o proteínas que contienen PTH en donde la proteína peptídica que contiene PTH se formula junto con al menos un antioxidante que inhibe la oxidación del al menos un péptido o proteína que contiene PTH.

5 Compendio de la invención

Problemas para resolver mediante la invención

El principio activo de un producto farmacéutico se obtiene mediante síntesis química a partir de materias primas, mediante aislamiento y refinación de un producto biológico, mediante producción por ingeniería genética y aislamiento y refinación del producto y similares. En general, es difícil obtener 100 % de pureza del principio activo farmacéutico producido debido a la pureza de las materias primas en sí mismas, reacciones incompletas, descomposición durante el aislamiento y el refinamiento y otros factores similares, en cualquier método, incluyendo recombinación genética. Por otro lado, ya que no se puede descartar la posibilidad de efectos indeseables en el diagnóstico y el tratamiento cuando los fármacos de diagnóstico y terapéuticos contienen más de la cantidad aceptable de impurezas, el hecho es que obtener un producto de alta pureza es un factor importante para producir un fármaco seguro y eficaz. Cuando se usan preparaciones que contienen péptido PTH en el tratamiento/prevención de la osteoporosis en particular, se puede decir que la alta pureza es especialmente necesaria para preparaciones que contienen péptido PTH debido a que la duración de la administración se extiende durante un largo periodo de tiempo.

Sin embargo, se descubrió que, cuando la preparación liofilizada que contiene el péptido PTH de la presente invención se fabrica a escala industrial mediante un proceso de producción normal tal como el anterior, se produce una preparación que contiene sustancias en las que se ha cambiado la estructura química del principio activo (péptido PTH) (denominado en lo sucesivo en el presente documento "análogos de PTH"). Especialmente a medida que aumenta la escala de producción, el problema planteado es que existe la preocupación de que la cantidad de análogos de PTH producidos aumente a un nivel esencialmente inaceptable a medida que aumenta el volumen de producción. Asimismo, la cantidad de análogos de PTH producidos no siempre es constante, sino que cambia dependiendo del tiempo y lugar de producción, de diferencias en el tiempo y similares. Ya que no se habían especificado los factores que conducen a la producción de estos análogos de PTH, un problema grave planteado en la práctica también era que las cantidades producidas no podían controlarse.

El fin de la presente invención es proporcionar una preparación liofilizada que contenga péptido PTH de alta pureza, es decir, en la que el contenido de análogos de PTH se mantiene en un nivel aceptablemente bajo. Otro fin de la presente invención es proporcionar un método para producir esta preparación liofilizada de alta pureza que contiene péptido PTH. Otro fin más de la presente invención es proporcionar un método de prueba para análogos de PTH para fines tales como comprobar la pureza de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH.

Medios usados para resolver los problemas mencionados anteriormente

Los presentes inventores estaban preocupados de que la cantidad de análogos de PTH producidos aumentaría a un nivel esencialmente inaceptable a medida que la escala de producción aumentaba y el volumen de producción crecía y lograba aislar y caracterizar estos análogos de PTH. También descubrieron que controlar la exposición de la solución que contenía péptido PTH y similares a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica inhibe y disminuye en gran medida la producción de estos análogos de PTH.

Sin estar ligado a la teoría, se supuso que, dadas las características estructurales de los análogos de PTH caracterizados como se ha mencionado anteriormente y el hecho de que la producción de estos análogos se inhibe y disminuye al controlar la exposición a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica, la causa de la producción de estos análogos de PTH son sustancias que tienen capacidad oxidante presente en ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica. Ciertamente, aparte de los de alta limpieza (grado A y similares), los ambientes aéreos en las instalaciones de producción farmacéutica pueden contener con frecuencia sustancias gaseosas que tienen capacidad oxidante. Concretamente, las instalaciones de producción farmacéutica son fumigadas y desinfectadas por formaldehído, ozono y otros agentes esterilizantes similares para lograr de manera más completa un entorno aséptico. Por lo tanto, también se puede llegar a pensar que gases que tienen capacidad oxidante tales como formaldehído y ozono pueden estar contenidos como restos de esta fumigación y desinfección. En ese sentido, el ozono está presente en una concentración de 0,001-0,02 ppm, aproximadamente 0,02-0,1 ppm dependiendo del tiempo, ubicación y estación, en la atmósfera independientemente de la fumigación y desinfección.

Los presentes inventores también confirmaron que la producción de los análogos de PTH dilucidados por la presente invención puede reproducirse poniendo en contacto el péptido PTH con aire que contiene ozono.

1. Un método para producir una preparación liofilizada que contiene PTH humana de alta pureza (1-34), comprendiendo el método

55 controlar la exposición de la solución que contiene PTH humana (1-34) a ozono contenido en ambientes aéreos en una instalación de producción de inyección estéril

ES 2 761 635 T3

durante una o más etapas, comenzando con la etapa de preparar una solución que contiene la PTH humana (1-34) hasta el final de la etapa para cargar en el medio de liofilización,

5 en donde "alta pureza" significa que la cantidad de un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 1,0 % o menos y que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos, en donde el análogo de PTH es uno o más de 1) a 11) de la siguiente manera:

1) análogo 1:

10 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 64 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (1-a) a (1-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(1-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(1-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(1-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

2) análogo 2:

15 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 36 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (2-a) a (2-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(2-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(2-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

20 (2-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

3) análogo 3:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (3-a) y (3-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

25 (3-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(3-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

4) análogo 4:

30 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (4-a) y (4-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(4-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(4-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

5) análogo 5:

35 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (5-a) y (5-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(5-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(5-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

6) análogo 6:

40 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 20 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (6-a) y (6-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(6-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(6-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

7) análogo 7:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (7-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

5 (7-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da;

8) análogo 8:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (8-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

10 (8-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da

9) análogo 9:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (9-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

15 (9-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

10) análogo 10:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (10-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

20 (10-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +16 Da; o

11) análogo 11:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 4 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (11-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

25 (11-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da,

en donde, el análogo de PTH es uno detectado como un pico diferente del péptido PTH, que es el principio activo en el cromatograma cuando una muestra de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se somete a HPLC.

30 2. El método expuesto en la reivindicación 1, en donde la exposición del producto liofilizado a ambientes aéreos en una instalación de producción de inyección estéril también se controla en la etapa para sellado de viales después de la liofilización.

3. Un método para producir una preparación liofilizada que contiene PTH humana de alta pureza (1-34) como un principio activo, comprendiendo el método

controlar la exposición de una solución que contiene PTH humana (1-34) a ozono contenido en ambientes aéreos en una instalación de producción de inyección estéril

35 antes de la liofilización y durante la carga en el medio de liofilización;

en donde "alta pureza" significa que la cantidad de un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH es 1,0 % o menos y que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos en la preparación; la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas; el ambiente aéreo es un ambiente en el que el aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA se mantiene como un flujo aéreo unidireccional hacia abajo desde arriba; y la velocidad del flujo aéreo 20 cm directamente debajo del filtro HEPA es 0,2-1,0 m/s, en donde el análogo de PTH es uno o más de 1) a 11) de la siguiente manera:

40 1) análogo 1:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 64 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (1-a) a (1-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(1-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

- (1-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- (1-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 2) análogo 2:
- 5 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 36 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (2-a) a (2-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (2-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
- (2-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- (2-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 10 3) análogo 3:
- óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (3-a) y (3-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (3-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
- 15 (3-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;
- 4) análogo 4:
- óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (4-a) y (4-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 20 (4-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da
- (4-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 5) análogo 5:
- 25 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (5-a) y (5-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (5-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- (5-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 6) análogo 6:
- 30 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 20 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (6-a) y (6-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (6-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- (6-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 7) análogo 7:
- 35 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (7-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (7-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da;
- 8) análogo 8:
- 40 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (8-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (8-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

9) análogo 9:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (9-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

5 (9-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

10) análogo 10:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (10-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

10 (10-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +16 Da; o

11) análogo 11:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 4 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (11-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

15 (11-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da,

en donde, el análogo de PTH es uno detectado como un pico diferente del péptido PTH, que es el principio activo en el cromatograma cuando una muestra de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se somete a HPLC.

Se ilustran:

20 [1] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza como un principio activo, en donde "alta pureza" significa al menos que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos; produciéndose la preparación liofilizada que contiene péptido PTH mediante un método caracterizado por que se controla la exposición de la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización a ambientes aéreos en una
25 instalación de producción farmacéutica.

[2] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [1] en donde el análogo de PTH es al menos uno o más entre

1) análogo 1:

30 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 64 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (1-a) a (1-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(1-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(1-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(1-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

35 2) análogo 2:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 36 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (2-a) a (2-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(2-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

40 (2-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(2-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

3) análogo 3:

45 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (3-a) y (3-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

ES 2 761 635 T3

- (3-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
(3-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;
- 4) análogo 4:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (4-a) y (4-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 5 (4-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
(4-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 5) análogo 5:
10 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (5-a) y (5-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (5-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
(5-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 15 6) análogo 6:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 20 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (6-a) y (6-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (6-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
20 (6-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 7) análogo 7:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (7-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 25 (7-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da;
- 8) análogo 8:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (8-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 30 (8-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;
- 9) análogo 9:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (9-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 35 (9-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 10) análogo 10:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (10-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 40 (10-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +16 Da; o
- 11) análogo 11:
óxido de péptido PTH que tiene un número másico 4 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (11-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

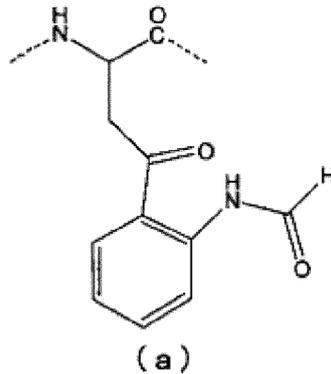
(11-a) número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da.

[3] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [1] en donde el análogo de PTH es al menos uno o más entre

1) análogo 1':

- 5 óxido de péptido PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y posición 18 de PTH humana (1-34) se han cambiado a restos de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la siguiente fórmula estructural (a);

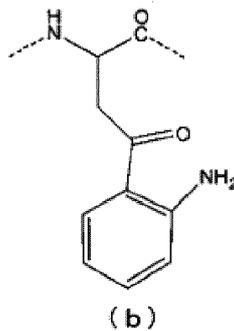
[Fórmula Química 1]



- 10 2) análogo 2':

óxido de péptido PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y posición 18 de PTH humana (1-34) se han cambiado a restos de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la siguiente fórmula estructural (b);

[Fórmula Química 2]



- 15 3) análogo 3':
 óxido de péptido PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y posición 18 de PTH humana (1-34) se han cambiado a restos de sulfóxido de metionina;

4) análogo 4':

- 20 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 8 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (a);

5) análogo 5':

- 25 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (a);

6) análogo 6':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (b);

5 7) análogo 7':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 8 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina;

8) análogo 8':

10 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina;

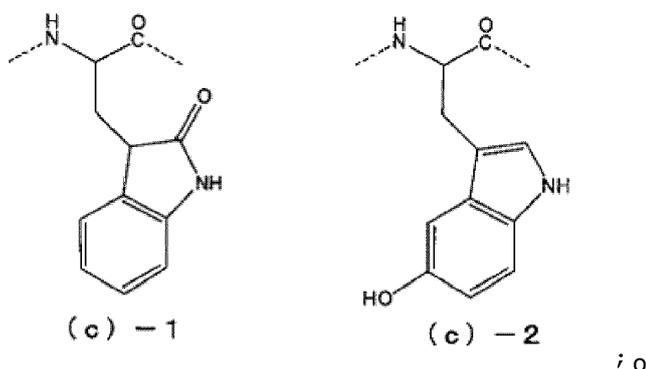
9) análogo 9':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (a);

10) análogo 10':

15 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de monóxido de triptófano mostrado por la siguiente fórmula estructural (c-1) o (c-2);

[Fórmula química 3]



11) análogo 11':

20 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (b).

25 [4] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [2] en donde alta pureza significa que la cantidad de al menos uno de los análogos anteriores 1 a 11 frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es de 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de los análogos anteriores de 1 a 11 frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos.

[5] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [3] en donde alta pureza significa que la cantidad de al menos uno de los análogos anteriores 1' a 11' frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es de 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de los análogos anteriores 1' a 11' frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos.

30 [6] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [1] a [5] en donde el péptido PTH es PTH humana (1-34).

[7] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [1] a [6] en donde la preparación liofilizada que contiene péptido PTH está alojada en un vial de vidrio.

35 [8] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [1] a [7], caracterizada por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla en una o más etapas cualesquiera seleccionadas de una etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH, una etapa de filtración aséptica, una etapa de distribución de solución de fármaco y una etapa para cargar en un medio de liofilización.

[9] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [8] caracterizada por producirse usando un método que también incluye control de exposición del producto liofilizado a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica en una etapa de sellado de viales después de liofilizar.

5 [10] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [1] a [9] caracterizada por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla en la etapa para cargar en el medio de liofilización.

[11] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [10] caracterizada por que la exposición anterior se controla mediante el uso de una cámara de liofilización equipada con un medio para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización.

10 [12] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [11] caracterizada por que el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que contienen la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga.

15 [13] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [11] en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se carga en y se descarga de este medio y el medio para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización es una cubierta de ajuste del flujo aéreo que puede cambiar el flujo aéreo en una dirección no dirigida desde esta abertura al interior de la cámara.

20 [14] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [10] caracterizada por que la etapa de carga controla la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte.

25 [15] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [10] en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga y purga del interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.

30 [16] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [10] en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio, estando esta abertura equipada con una cubierta de ajuste del flujo aéreo, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización cambiando la dirección de la cubierta de ajuste del flujo aéreo de modo que el aire no se dirija a la cámara y purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.

35 [17] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [10] a [16] en donde la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas.

40 [18] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [8] a [17] en donde el tiempo desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH hasta el final de la etapa para cargar en el medio de liofilización abarca tres o más horas y la producción se realiza usando un método para controlar la exposición de la solución que contiene péptido PTH a un ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica en una o más etapas durante el tiempo.

45 [19] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [14] a [18] en donde el gas inerte es gas nitrógeno.

50 [20] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza como un principio activo, la preparación liofilizada que contiene péptido PTH fabricada usando un método caracterizado por que la exposición de una solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla durante la carga en el medio de liofilización; en donde "alta pureza" significa al menos que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos; la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas; el ambiente aéreo es un ambiente que mantiene el flujo aéreo unidireccional de aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA hacia abajo desde arriba; y la velocidad del flujo aéreo 20 cm directamente debajo del filtro

HEPA es 0,2-1,0 m/s.

- 5 [21] Un método para producir una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose el método por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica se controla en una o más etapas desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH hasta el final de la etapa para cargar en un medio de liofilización.
- [22] El método expuesto en [21], en donde la exposición del producto liofilizado a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica también se controla en la etapa de sellado de viales después de la liofilización.
- 10 [23] El método expuesto en [21] o [22] caracterizado por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica se controla en la etapa de carga en un medio de liofilización.
- [24] El método expuesto en [23] caracterizado por que la exposición se controla usando una cámara de liofilización equipada con medios para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización.
- 15 [25] El método expuesto en [23] o [24] en donde la etapa para cargar en el medio de liofilización es una etapa que dura tres o más horas.
- [26] El método expuesto en [24] o [25] en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan y descargan, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga.
- 20 [27] El método expuesto en [24] o [25] en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se carga en y se descarga de este medio y el medio para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización es una cubierta de ajuste del flujo aéreo que puede cambiar el flujo aéreo en una dirección no dirigida desde esta abertura al interior de la cámara.
- 25 [28] El método expuesto en [23] o [25] caracterizado por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte.
- 30 [29] El método expuesto en [23] o [25] caracterizado por que el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan y descargan, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga y purga del interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.
- 35 [30] El método expuesto en [23] o [25] caracterizado por que el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y descargan de este medio, estando esta abertura equipada con una cubierta de ajuste del flujo aéreo, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización cambiando la cubierta de ajuste del flujo aéreo en una dirección en la que el flujo aéreo no se dirige a la cámara y purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.
- 40 [31] El método expuesto en cualquiera de [28] a [30] en donde el gas inerte es nitrógeno.
- 45 [32] El método expuesto en cualquiera de [21] a [31] en donde el recipiente que aloja la solución que contiene péptido PTH es un vial de vidrio.
- [33] El método expuesto en cualquiera de [21] a [32] en donde la PTH es PTH humana (1-34).
- 50 [34] El método expuesto en cualquiera de [21] a [33] en donde el ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica es un ambiente aéreo en el que 1) el aire es de grado A, 2) aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA que tiene la capacidad de atrapar partículas que tienen un tamaño de partícula de 0,3 µm con una eficacia de 99,97 % o más se mantiene como un flujo aéreo unidireccional hacia abajo desde arriba y 3) la concentración de ozono es 0,001-0,1 ppm.
- [35] El método expuesto en cualquiera de [21] a [34] en donde el ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica es un ambiente aéreo que contiene una concentración de formaldehído de 0,1 ppm o menos.

[36] El método expuesto en cualquiera de [21] a [35] en donde la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 1,0 % o menos y/o la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH.

5 [37] El método expuesto en cualquiera de [21] a [36] para controlar la producción de análogos de PTH 1 a 11 expuestos en [2].

[38] El método expuesto en cualquiera de [21] a [36] para controlar la producción de análogos de PTH 1' a 11' expuestos en [3].

[39] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH fabricado usando el método según cualquiera de [21]-[38].

10 [40] Un método para producir una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza como un principio activo, el método caracterizado por que la exposición de una solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla durante la carga en el medio de liofilización; en donde "alta pureza" significa al menos que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos en la preparación; la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas; el ambiente aéreo es un ambiente en el que el aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA se mantiene como un flujo aéreo unidireccional hacia abajo desde arriba; y la velocidad del flujo aéreo 20 cm directamente debajo del filtro HEPA es 0,2-1,0 m/s.

15
20 La presente invención también se refiere a un método de prueba que es importante para cumplir con las leyes y regulaciones y asegurar la compatibilidad de la preparación liofilizada que contiene péptido PTH como un producto farmacéutico. Este método de prueba se caracteriza por confirmar la presencia de uno o más o todos los análogos de PTH anteriores y/o determina las cantidades presentes. Los siguientes también están abarcados como aspectos y realizaciones preferidas.

25 [41] Un método para probar una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose el método por confirmar la presencia de al menos uno o más de los análogos de PTH 1 a 11 de [2] y/o determinar las cantidades presentes en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH.

[42] Un método para probar una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose el método por confirmar la presencia de al menos uno o más de los análogos de PTH 1' a 11' de [3] y/o determinar las cantidades presentes en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH.

30 [43] El método expuesto en [41] o [42] en donde la determinación de los análogos de PTH incluye calcular el área del pico correspondiente al análogo de PTH en un cromatograma cuando la absorción ultravioleta de una muestra derivada de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se mide por cromatografía líquida de alto rendimiento.

35 [44] El método expuesto en [43] que incluye el cálculo de la pureza del péptido PTH en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH comparando el área de un pico correspondiente a un análogo de PTH en un cromatograma y el área de pico correspondiente a péptido PTH o la suma del área de pico del péptido PTH y el área de pico de todos los demás análogos de PTH detectados en el mismo cromatograma cuando la absorbancia ultravioleta de una muestra procedente de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se mide mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

40 [45] El método expuesto en [44] que incluye el cálculo de la pureza del péptido PTH en una preparación liofilizada que contiene péptido PTH comparando el área de ese pico y el área de pico correspondiente al péptido PTH o la suma del área de pico de péptido PTH y el área de pico de todos los demás análogos de PTH detectados en el mismo cromatograma cuando se usan condiciones de cromatografía de modo que se detecten dos o más análogos de PTH cualesquiera como uno o más picos individuales en el cromatograma.

45 [46] El método expuesto en cualquiera de [41] a [45] para garantizar que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 1,0 % o menos y/o la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos en una preparación liofilizada que contiene péptido PTH.

[47] El método expuesto en cualquiera de [41] a [46] que incluye la detección del número másico de los análogos de PTH usando un espectrómetro de masas de cromatografía líquida de alto rendimiento.

50 [48] El método expuesto en cualquiera de [41] a [47] que incluye fraccionar una sustancia que da un pico único en el cromatograma e identificar el número másico de los fragmentos producidos al digerir esta sustancia usando tripsina.

[49] Un método para producir un producto farmacéutico que comprende una preparación liofilizada que contiene péptido PTH que incluye una etapa para llevar a cabo el método de prueba de cualquiera de [41] a [48].

Los siguientes aspectos también están destinados a preparaciones liofilizadas preferidas que contienen péptido PTH

de la presente invención.

5 [50] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose la preparación liofilizada que contiene péptido PTH por que al menos uno o más análogos de PTH es 1,0 % o menos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH y/o la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH.

[51] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose la preparación liofilizada que contiene péptido PTH por que cualquiera de los análogos de PTH respectivos es 1,0 % o menos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH y/o la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH.

10 [52] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesto en [50] o [51] en donde el análogo de PTH es un análogo expuesto en [2].

[53] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesto en [50] o [51] en donde el análogo de PTH es un análogo expuesto en [3].

15 [54] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesto en [52] en donde la cantidad de análogos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH está en al menos las siguientes relaciones:

la cantidad de análogo 1 es 0,04 % o menos;

la cantidad total de análogo 3 y análogo 4 es 0,11 % o menos;

la cantidad de análogo 5 es 0,26 % o menos;

20 la cantidad de análogo 7 es 0,33 % o menos;

la cantidad de análogo 8 es un porcentaje seleccionado arbitrariamente de 0,21-1,00 %; y

la cantidad de análogo 9 es 0,68 % o menos.

25 [55] Una preparación liofilizada que contiene péptido de PTH expuesto en [53] en donde la cantidad de análogos frente a la suma de la cantidad de péptido de PTH y la cantidad total de análogos de PTH está en al menos las siguientes relaciones:

la cantidad de análogo 1' es 0,04 % o menos;

la cantidad total de análogo 3' y análogo 4' es 0,11 % o menos;

la cantidad de análogo 5' es 0,26 % o menos;

la cantidad de análogo 7' es 0,33 % o menos;

30 la cantidad de análogo 8' es un porcentaje seleccionado arbitrariamente de 0,21-1,00 %; y

la cantidad de análogo 9' es 0,68 % o menos.

35 [56] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [52] en donde la cantidad de análogo 1, cantidad de análogo 2, cantidad total de análogo 3 y análogo 4, cantidad de análogo 5, cantidad de análogo 6, cantidad de análogo 7, cantidad de análogo 8, cantidad de análogo 9 y cantidad total de análogo 10 y análogo 11 son todas 1,0 % o menos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH.

[57] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en [53] en donde la cantidad de análogo 1', cantidad de análogo 2', cantidad total de análogo 3' y análogo 4', cantidad de análogo 5', cantidad de análogo 6', cantidad de análogo 7', cantidad de análogo 8', cantidad de análogo 9' y cantidad total de análogo 10' y análogo 11' son todas 1,0 % o menos frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH.

40 [58] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [50] a [57] en donde la preparación liofilizada que contiene péptido PTH es una preparación alojada en un recipiente de vidrio con tapón.

[59] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [50] a [58] en donde la preparación liofilizada que contiene péptido PTH es una preparación de vial de vidrio.

45 [60] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH según cualquiera de [50] a [59] en donde el péptido PTH es PTH humana (1-34)

La presente invención proporciona una preparación liofilizada que contiene PTH de alta pureza. De manera específica,

la producción de análogos de PTH que se ha caracterizado y confirmado que se producen en la preparación liofilizada que contiene PTH que no es deseable durante la fabricación farmacéutica se inhibe y disminuye en la presente invención. También se puede producir una preparación calificada como un producto farmacéutico confirmando y garantizando al mismo tiempo la calidad de la preparación liofilizada que contiene PTH de manera sencilla, rápida y precisa determinando los análogos de PTH.

Breve descripción de los dibujos

La [Figura 1] muestra los cromatogramas cuando se midió la absorbancia ultravioleta (214 nm) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) tomando como muestra un péptido PTH usado como materia prima de una preparación liofilizada de péptido PTH producida como un ejemplo de trabajo y ejemplo comparativo. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de absorción. El pico grande que aparece aproximadamente a los 20-21 minutos es PTH humana (1-34). "6 (número rodeado)" corresponde al análogo 7 (análogo 7') y "7 (número rodeado)" corresponde al análogo 8 (análogo 8').

La [Figura 2] muestra el cromatograma cuando se midió la absorbancia ultravioleta (214 nm) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) tomando como muestra una preparación liofilizada de péptido PTH producida como Ejemplo 1. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de absorción. El pico grande que aparece a los 21,157 min (tiempo de retención) es la PTH humana (1-34). "1 (número rodeado)" corresponde al análogo 1 (análogo 1'); "2 (número rodeado)" corresponde al análogo 2 (análogo 2'); "3 (número rodeado)" corresponde a una mezcla de análogo 3 y análogo 4' (mezcla de análogo 3' y análogo 4'); "4 (número rodeado)" corresponde al análogo 5 (análogo 5'); "6 (número rodeado)" corresponde al análogo 7 (análogo 7'); "7 (número rodeado)" corresponde al análogo 8 (análogo 8'); "8 (número rodeado)" corresponde al análogo 9 (análogo 9'); "9 (número rodeado)" corresponde a una mezcla de análogo 10 y análogo 11 (mezcla de análogo 10' y mezcla 11').

La [Figura 3] muestra el cromatograma cuando se midió la absorbancia ultravioleta (214 nm) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) tomando como muestra una preparación liofilizada de péptido PTH producida como Ejemplo comparativo 1. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de absorción. El pico grande que aparece a los 20,279 min (tiempo de retención) es la PTH humana (1-34). "5 (número rodeado)" corresponde al análogo 6 (análogo 6'); el significado de los otros números rodeados es el mismo que en la figura 2.

La [Figura 4] muestra el cromatograma cuando se midió la absorbancia ultravioleta (214 nm) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) tomando como muestra una preparación liofilizada de péptido PTH expuesta a ozono como en el Ejemplo de prueba 2. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de absorción. El pico grande que aparece a los 22,670 min (tiempo de retención) es la PTH humana (1-34). El significado de los números rodeados es el mismo que en la figura 2.

La [Figura 5] muestra la estructura de un compuesto de óxido de metionina.

La [Figura 6] muestra la estructura de una variante de triptófano.

La [Figura 7] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 1. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 8] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 2. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 9] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) de una mezcla de análogo 3 y análogo 4. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 10] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 5. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 11] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 6. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 12] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 7. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 13] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 8. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 14] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS) del análogo 9. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 15] muestra los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (LC/MS)

de una mezcla de análogos 10 y 11. El eje horizontal representa el tiempo (min) y el eje vertical representa la intensidad de detección.

La [Figura 16] es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de medios de liofilización preferidos de la presente invención.

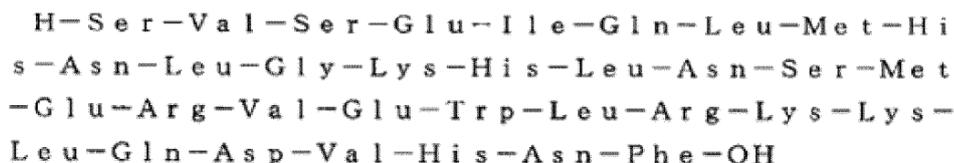
- 5 La [Figura 17] es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de medios de liofilización preferidos de la presente invención.

La presente invención se describirá ahora con más detalle.

(1) Péptido PTH

La expresión "péptido PTH" en la presente invención se usa como un término colectivo para PTH natural y sustancias de actividad fisiológica equivalente. La actividad fisiológica de PTH se caracteriza por actuar para elevar el calcio sérico. Los péptidos PTH preferidos abarcan PTH natural y péptidos parciales de los mismos, que pueden ser péptidos que tienen un peso molecular de aproximadamente 4000 a 10.000. Sin embargo, Los péptidos PTH son aquellos en donde ninguno de los restos de aminoácidos constituyentes se ha modificado químicamente en comparación con la forma natural; no incluyen los (2) análogos de PTH analizados posteriormente. Los ejemplos concretos de péptidos parciales incluyen PTH humana (1-34), PTH humana (1-35), PTH humana (1-36), PTH humana (1-37), PTH humana (1-38), PTH humana (1-84) y similares, todas las cuales tienen una secuencia de 34-84 aminoácidos. De manera específica, la PTH humana (1-34) es un péptido parcial de la secuencia de forma natural correspondiente a los números de aminoácidos 1-34 de PTH humana natural. Se prefieren PTH humana (1-34) y PTH humana (1-84) y se prefiere especialmente PTH humana (1-34). La secuencia de aminoácidos de PTH humana (1-34) es la siguiente:

20 [Fórmula química 4]



(SEQ ID NO: 4)

El péptido PTH de la presente invención también puede estar presente como una sal formada con uno o más ácidos orgánicos volátiles. Los ejemplos de ácidos orgánicos volátiles incluyen ácido trifluoroacético, ácido fórmico, ácido acético y similares. Como un ejemplo preferido, se puede proporcionar ácido acético, pero los ejemplos preferidos no se limitan a este. La relación de los dos cuando el péptido PTH libre y un ácido orgánico volátil forman una sal no está particularmente restringida mientras se forme una sal. Por ejemplo, ya que la PTH humana (1-34) tiene nueve restos de aminoácidos básicos y cuatro restos de aminoácidos ácidos en su molécula, teniendo en cuenta la formación de sales en estas moléculas, el resto de aminoácido básico 5 puede convertirse en un equivalente químico de ácido acético. Por ejemplo, si se usa un contenido de ácido acético representado por el peso de ácido acético $\times 100$ (%) / peso del péptido de PTH humana (1-34) como la cantidad de ácido acético, como una teoría, el equivalente químico de ácido acético frente a PTH humana libre (1-34) se convierte en aproximadamente 7,3 % (% en peso). En esta memoria descriptiva, la PTH humana libre (1-34) también se denomina en ocasiones "teriparatida", y el acetato de teriparatida también se denomina en ocasiones "acetato de teriparatida". El contenido de ácido acético en acetato de teriparatida no está particularmente restringido siempre que la teriparatida y el ácido acético formen una sal. Por ejemplo, puede ser 7,3 %, que es el equivalente químico teórico anterior, o superior, o puede ser de más del 0 % a menos del 1 %. Son ejemplos más concretos del contenido de ácido acético en acetato de teriparatida 1-7 %, preferiblemente 2-6 %.

Sin embargo, independientemente de si el péptido PTH de la presente invención es un compuesto libre o una sal del mismo, la cantidad de péptido PTH en la preparación de la presente invención, cantidad de diversos análogos de PTH, cantidad de mezcla de análogos de PTH y análogos de PTH totales se pueden determinar mediante pruebas de HPLC. Debe observarse que en este caso el péptido PTH y los análogos de PTH se determinan como compuestos libres.

(2) Análogos de PTH

La expresión "análogo de PTH" en la presente invención se define en sentido amplio como uno detectado como un pico diferente del péptido PTH que es el principio activo en el cromatograma cuando se somete una muestra de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH a HPLC. Por lo tanto, si se detectan como un pico diferente del péptido PTH original en el cromatograma, todas las sustancias químicas incluidas en este pico pueden considerarse juntas como un único "análogo de PTH" incluso cuando dos o más sustancias químicas separadas están presentes en la mezcla dentro del pico. Es decir, para fines de medición general y para confirmar la pureza de una preparación liofilizada, incluso una mezcla de múltiples sustancias químicas detectables como un solo pico en el cromatograma de HPLC se denomina exhaustivamente "análogo" y se realizan en general confirmación de pureza, cálculo de pureza y

similares con respecto a un solo pico que consiste en dicha mezcla como un "análogo" por conveniencia. En consecuencia, no existe ningún problema con respecto a una mezcla de múltiples sustancias químicas detectadas como un solo pico en HPLC en condiciones dadas exhaustivamente como un tipo de "análogo de PTH".

5 En la presente invención, los análogos de PTH que se ha descubierto que se producían durante la producción de una preparación liofilizada que contenía péptido PTH se caracterizaron como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Tabla 1: Caracterización de análogos de PTH

Análogo	Fragmento cambiado (digestión con tripsina)	Aminoácido cambiado	Resumen de cambios		Cambios estructurales estimados
			Cambio de masa	Naturaleza del cambio	
1	T1	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]
	T2	Met 18	16 Da	Oxidación	
	T3	Trp 23	32 Da	a)	
2	T1	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]
	T2	Met 18	16 Da	Oxidación	
	T3	Trp 23	4 Da	b)	
3	T1	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]
	T2	Met 18	16 Da	Oxidación	
4	T1	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación]
	T3	Trp 23	32 Da	a)	
5	T2	Met 18	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]
	T3	Trp 23	32 Da	a)	
6	T2	Met 18	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]
	T3	Trp 23	4 Da	b)	
7	T1	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]
8	T2	Met 18	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 18 [O]
9	T3	Trp 23	32 Da	a)	PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación]
10	T3	Trp 23	16 Da	c)	PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación]
11	T3	Trp 23	4 Da	b)	PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]

10 En la tabla 1 anterior, T1-T3 son fragmentos normales producidos cuando cada análogo es digerido por tripsina y son los siguientes cuando se enumeran basándose en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de PTH humana (1-34).

[Fórmula química 5]

T1: (correspondiente a las posiciones 1-13 de PTH humana (1-34) Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1)

15 T2: (correspondiente a las posiciones 14-20 de PTH humana (1-34) His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2)

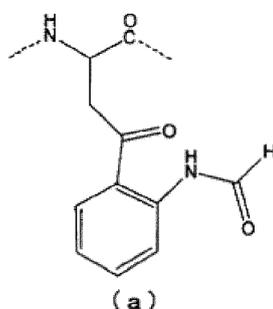
T3: (correspondiente a las posiciones 21-25 de PTH humana (1-34) Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3)

Los números de los aminoácidos modificados en la tabla 1 se expresan como los números de aminoácidos correspondientes de la secuencia de PTH humana (1-34). La misma notación se usa en esta memoria descriptiva a menos que se indique otra cosa.

20 En las estructuras estimadas de la tabla 1, PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación] (análogo 1') significa un análogo de PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y 18 de PTH humana

(1-34) son cada uno restos de sulfóxido de metionina, el resto correspondiente al triptófano de posición 23 es un resto mostrado por la siguiente estructura (a) (resto de oxidación de Trp 23 (a)) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

[Fórmula química 6]

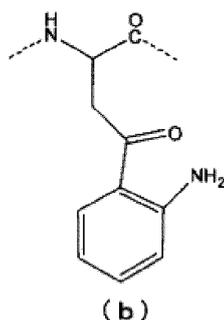


5

PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico] (análogo 2') significa un análogo de PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y 18 de PTH humana (1-34) son cada uno restos de sulfóxido de metionina, el resto correspondiente al triptófano de posición 23 es un resto mostrado por la siguiente estructura (b) (resto de oxidación de Trp 23 (b)) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

10

[Fórmula química 7]



15

De manera similar, PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] (análogo 3') significa un análogo de PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y 18 de PTH humana (1-34) son restos de sulfóxido de metionina y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original. PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación] (análogo 4') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 8 de PTH humana (1-34) es un resto de sulfóxido de metionina, el resto correspondiente al triptófano de posición 23 es un resto de oxidación de Trp 23 (a) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original. Asimismo, el análogo 3' y el análogo 4' tienden a detectarse como un solo pico, dependiendo de las condiciones de HPLC. En este caso, el análogo de PTH puede definirse como una mezcla de análogo 3' y análogo 4' como se ha analizado anteriormente.

20

PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación] (análogo 5') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) es un resto de sulfóxido de metionina, el resto correspondiente al triptófano de posición 23 es un resto de oxidación de Trp 23 (a) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

25

PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico] (análogo 6') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) es un resto de sulfóxido de metionina, el resto correspondiente al triptófano de posición 23 es un resto de oxidación de Trp 23 (b) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

30

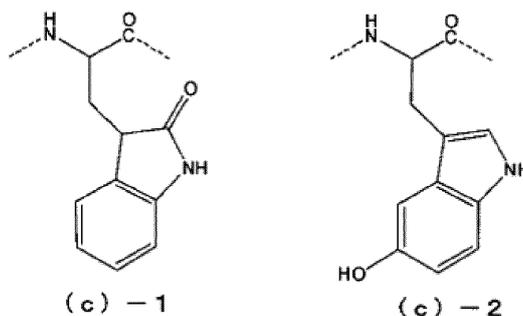
PTH humana (1-34)-Met 8 [O] (análogo 7') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 8 de PTH humana (1-34) es un resto de sulfóxido de metionina y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

PTH humana (1-34)-Met 18 [O] (análogo 8') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) es un resto de sulfóxido de metionina y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación] (análogo 9') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) es un resto de oxidación de Trp 23 (a) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

- 5 PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación] (análogo 10') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) es un resto mostrado por la siguiente estructura (c)-1 o (c)-2 (resto de oxidación de Trp 23 (c)) de resto y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original.

[Fórmula química 8]



- 10 PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación del ácido fórmico] (análogo 11') significa un análogo de PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) es un resto de oxidación de Trp 23 (b) y las otras estructuras son iguales que el péptido PTH original. Asimismo, el análogo 10' y el análogo 11' tienden a detectarse como un solo pico, dependiendo de las condiciones de HPLC. En este caso, el análogo de PTH puede definirse como una mezcla de análogo 10' y análogo 11' como se ha analizado anteriormente.

- 15 En los análogos anteriores 1' a 11', el péptido PTH cambia porque se introducen los restos de aminoácidos modificados producidos por la oxidación de metionina o triptófano. Por lo tanto, es lógico suponer que la producción de los análogos de PTH de la presente invención se inicia por contacto entre una sustancia que tiene capacidad oxidante y el péptido PTH. En esta memoria descriptiva, una "sustancia que tiene capacidad oxidante" significa una sustancia que tiene la capacidad de oxidar un aminoácido estructural del péptido PTH, especialmente metionina o triptófano. Dado que
20 una instalación de producción farmacéutica, como se ha analizado anteriormente, dichas sustancias capaces de oxidar metionina y triptófano que pueden estar contenidas en el aire en una instalación de producción farmacéutica son de interés como "sustancias que tienen capacidad oxidante" en la presente memoria descriptiva.

- 25 Asimismo, como resulta evidente a partir de lo anterior, la definición anterior de análogos de PTH se puede aplicar incluso cuando el péptido PTH contenido como principio activo es distinto de la PTH humana (1-34). Por ejemplo, cuando se usa PTH humana (1-84) como principio activo, el análogo 1' correspondiente también se puede expresar como PTH humana (1-84)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]. En este caso, el análogo puede especificarse como uno en el que los restos de metionina de posición 8 y 18 de PTH humana (1-84) son cada uno restos de sulfóxido de metionina, el resto de triptófano de posición 23 es un resto de oxidación de Trp 23 (a) y las otras estructuras son iguales que PTH humana (1-84).

30 (3) Detección y determinación de análogos de PTH

Los análogos de PTH en una preparación liofilizada que contiene PTH se pueden detectar o determinar produciendo una muestra mediante la disolución de la preparación en un disolvente adecuado (tampón fosfato que contiene cloruro de benzalconio o similar) y sometiendo esta muestra a HPLC en, por ejemplo, las siguientes condiciones.

<Condiciones de HPLC>

- 35 a) Detector: Absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 214 nm)
b) Columna: Tubo de acero inoxidable de 150 mm de longitud con un diámetro interno de 4,6 mm empaquetado con 3,5 µm de gel de sílice octadecilsililado para cromatografía líquida (Zorbax 300SB-C18 fabricado por Agilent Technologies o un producto equivalente)
c) Temperatura de la columna: Temperatura constante cercana a 40 °C
40 d) Fase móvil:

Fase móvil A: Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 900 ml de agua y llevarlo a 1000 ml añadiendo agua después de añadir ácido fosfórico para ajustar el pH a 2,3. Añadir 100 ml de acetonitrilo a estos 900 ml de líquido.

Fase móvil B: Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 900 ml de agua y llevarlo a 1000 ml añadiendo agua después de añadir ácido fosfórico para ajustar el pH a 2,3. Añadir 500 ml de acetonitrilo a 500 ml de este líquido.

e) Suministro de fase móvil: El control del gradiente de concentración se proporciona variando la relación de mezcla de la fase móvil A y la fase móvil B como se muestra en la tabla 2.

5 [Tabla 2]

Tabla 2: Control de gradiente de concentración

Tiempo después de la inyección de muestra (min)	Fase móvil A (% en volumen)	Fase móvil B (% en volumen)
0-5	100→65	0→35
5-35	65→60	35→40
35-45	60→0	40→100

f) Caudal: 1,0 ml/min

10 g) Tiempo de detección: 45 minutos después de la inyección de la solución de muestra. Sin embargo, esto es de la parte posterior del pico del disolvente.

15 Ya que el péptido PTH y análogos de PTH de la presente invención tienen absorbancia sustancial en la región ultravioleta, la supervisión de la absorción ultravioleta es ventajosa para su detección y determinación. La longitud de onda de medición no está particularmente restringida siempre que permita la detección del péptido PTH y análogos de PTH. Se pueden seleccionar una o más longitudes de onda, por ejemplo, en el intervalo de 210-360 nm, preferiblemente 210-280 nm y más preferiblemente 210-254 nm. Un ejemplo de una longitud de onda adecuada es 214 nm. Se puede producir un cromatograma basado en los valores medidos de esta absorción ultravioleta.

20 La cantidad de cada análogo de PTH y la cantidad de péptido PTH se puede determinar calculando cada área de pico (p. ej., mediante integración automática) en el cromatograma basado en el cromatograma obtenido realizando HPLC como se ha analizado anteriormente. La cantidad de cada análogo de PTH (%) y la cantidad total de análogos de PTH (%) se pueden determinar y comparar basándose en los valores calculados mediante las siguientes fórmulas 1 y 2. Asimismo, el "área de pico total" en las fórmulas es un valor determinado mediante la suma del área de pico del péptido PTH y las áreas de picos de todos los demás análogos de PTH detectados en el cromatograma. Por lo tanto, el "área de pico total" corresponde a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH". Además, a menos que se indique específicamente de otro modo, "%" tiene el significado de la siguiente fórmula en la presente invención.

<Fórmula 1>

Cantidad de cada análogo de PTH (%) = (área de pico de cada análogo/área de pico total)×100

<Fórmula 2>

Cantidad total de análogos de PTH (%) = (suma total de áreas de pico de cada análogo/área de pico total)×100

30 Asimismo, los análogos 3 y 4 (análogos 3' y 4') producidos a partir de PTH humana (1-34) se eluyen como un solo pico, como se ha mencionado anteriormente, cuando la HPLC se lleva a cabo en las condiciones anteriores. Ya que la consideración de este pico único como un análogo no afecta a los resultados cuando se usa para confirmar la pureza o medir la preparación en este caso, el pico mixto de los análogos 3 y 4 (análogos 3' y 4') puede considerarse como un análogo. Sucede lo mismo también para los análogos 10 y 11 (análogos 10' y 11').

35 La tabla 3 a continuación muestra un ejemplo de medición normal cuando se realizó HPLC en las condiciones anteriores en una muestra procedente de una preparación liofilizada que contiene PTH humana (1-34). Asimismo, la notación "tiempo de retención relativo aproximado" en la tabla se debe a que el tiempo de retención relativo también cambia en ocasiones según la columna usada o la velocidad de flujo de la fase móvil. No obstante, cada análogo puede identificarse y determinarse basándose en el patrón del cromatograma tomando este tiempo de retención relativo como criterio incluso en este caso.

40

[Tabla 3]

Tabla 3: Ejemplo de medición de HPLC

Análogo de PTH	Tiempo de retención relativa aproximado, tomando el tiempo de retención de PTH humana (1-34) como 1,00
(1) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]	0,49
(2) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	0,50
(3) Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación]	0,52
(4) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]	0,55
(5) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	0,57
(6) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]	0,60
(7) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]	0,66
(8) PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación]	0,69
(9) Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación] y PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	0,74

(4) Preparación liofilizada que contiene péptido PTH

- 5 Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones es una preparación liofilizada que contiene péptido PTH como principio activo.

10 En las reivindicaciones, una preparación liofilizada que contiene péptido PTH es una preparación liofilizada que contiene péptido PTH en donde la cantidad de un análogo de PTH en la preparación es 1,0 % o menos frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH" y/o la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 5,0 % o menos frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH". La definición de análogos de PTH se expone en las reivindicaciones.

15 Según las reivindicaciones, la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención es una preparación liofilizada que contiene péptido PTH en donde la cantidad de cualquiera de los análogos de PTH respectivos es 1,0 % o menos frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH" y/o la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 5,0 % o menos frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH". Asimismo, "1,0 % o menos" y "5,0 % o menos" significan que no está contenido absolutamente ningún análogo de PTH en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención o cuando está contenido ese % o menos.

20 Preferiblemente, la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención no contiene más del 1,0 % de al menos uno o más análogos de PTH frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH", y más preferiblemente no contiene más del 1,0 % de ningún análogo de PTH frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH". Además, cuando dos análogos dan un solo pico en el cromatograma, como se ha mencionado anteriormente, el pico único se considera un análogo y el análogo así considerado más preferiblemente no está contenido en una cantidad que supere el 1,0 % frente a la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH". La cantidad de cada análogo de PTH en la preparación es preferiblemente "1,0 % o menos", pero también se prefieren 0,9 % o menos, 0,8 % o menos, 0,7 % o menos y 0,6 % o menos son.

30 Un ejemplo de una preparación liofilizada adecuada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones aparece a continuación en la tabla 4. (Asimismo, la "cantidad total de PTH" en la tabla significa la "suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH").

[Tabla 4]

Tabla 4: Preparación liofilizada adecuada que contiene péptido PTH de la presente invención

Análogo de PTH	Contenido frente a cantidad total de PTH (%)
(1) PTH-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación] (p. ej., PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación])	0,04 % o menos, preferiblemente 0,03 % o menos
(3) Mezcla que contiene PTH-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación] (p. ej., Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación])	0,11 % o menos, preferiblemente 0,10 % o menos, lo más preferiblemente 0,03 % o menos
(4) PTH-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación] (p. ej., PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación])	0,26 % o menos, preferiblemente 0,20 % o menos, lo más preferiblemente 0,06 % o menos
(6) PTH-Met 8 [O] (p. ej., PTH humana (1-34)-Met 8 [O])	0,33 % o menos, preferiblemente 0,30 % o menos, lo más preferiblemente 0,23 % o menos
(7) PTH-Met 18 [O] (p. ej., PTH humana (1-34)-Met 18 [O])	Porcentaje arbitrario seleccionado de 1,01-2,00 % o menos, preferiblemente 1,00 % o menos, más preferiblemente 0,50 % o menos, lo más preferiblemente 0,36 % o menos
(8) PTH-Trp 23 [dioxidación] (p. ej., PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación])	0,68 % o menos, preferiblemente 0,50 % o menos, lo más preferiblemente 0,11 % o menos

5 Para explicar mejor la preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones, la preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones puede contener diversos aditivos. Los ejemplos de aditivos incluyen azúcares, aminoácidos, cloruro de sodio y similares. Cuando se usan azúcares como aditivos, se añade preferiblemente manitol, glucosa, sorbitol, inositol, sacarosa, maltosa, lactosa o trehalosa en una cantidad de 1 en peso o más (preferiblemente 50-1000 en peso) por peso de péptido PTH. Cuando se usan azúcares y cloruro de sodio como aditivos, se añade preferiblemente cloruro de sodio en una cantidad de 1/1000-1/5 en peso (preferiblemente de 1/100 a 1/10 en peso) por peso de azúcares.

(5) Recipiente de la preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones

15 El recipiente usado para la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención no está particularmente restringido, pero la preparación es preferiblemente una preparación liofilizada que contiene péptido PTH alojado en un recipiente de vidrio con tapón. El material del tapón no está particularmente restringido, pero se prefiere goma. El tapón preferiblemente se lava, se esteriliza y/o se seca.

20 La preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones alojadas en un recipiente de vidrio con tapón es, por ejemplo, una preparación liofilizada que contiene péptido PTH alojado en un vial de vidrio que tiene un tapón de goma (preparación de vial de vidrio), preparación de kit que comprende una preparación liofilizada que contiene péptido PTH alojado en un vial de vidrio que tiene un tapón de goma y una ampolla llena de manera estéril con solución acuosa para disolución, preparación del kit que comprende una preparación liofilizada que contiene péptido PTH y una jeringa precargada llena de manera estéril con solución acuosa para disolución o preparación de doble cámara de vidrio (están presentes dos cámaras en una jeringa, una cámara que contiene preparación liofilizada que contiene péptido PTH y la otra que contiene solución acuosa para disolución). Una preparación de vial de vidrio es la más preferida como la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención. Los ejemplos del material del tapón de goma incluyen goma de butilo clorado, goma de butilo normal, goma de butadieno, goma de isopreno, goma de silicona, elastómero y similares. Se prefiere vidrio de silicato como el vidrio.

(6) Producción de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH

30 Se produce una preparación liofilizada mediante un proceso que normalmente incluye cualquiera o todas las siguientes etapas, dependiendo de su uso. A menos que se indique otra cosa, la preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones también se puede producir según las siguientes etapas. Específicamente, el esquema de producción de la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención incluye al menos una etapa de preparación de solución que contiene principio activo y una etapa de liofilización explicada a continuación. Habitualmente, incluye una etapa de preparación de solución que contiene principio activo, etapa de carga y etapa de liofilización, y preferiblemente incluye una etapa de preparación de solución que contiene principio activo, etapa de filtración aséptica y distribución de solución farmacológica, etapa de carga, etapa de liofilización y

etapa de envasado.

1) Etapa de preparación de solución de principio activo

5 Esta etapa disuelve un compuesto a granel del principio activo y diversos aditivos según sea necesario en un disolvente (p. ej., agua para inyección). Pueden realizarse ajuste del pH de la solución, ajuste del volumen de la solución y similares según sea necesario. El tiempo necesario para esta etapa no está particularmente restringido siempre que esté dentro del intervalo aceptable para la producción industrial, pero puede ser de 0,5-5 horas, habitualmente aproximadamente 1-3 horas.

10 Cuando el péptido PTH como se cita en las reivindicaciones es el principio activo, es preferible disolver el péptido PTH a granel por adelantado y añadirlo a una solución en la que se han disuelto los diversos aditivos. Los ejemplos de aditivos incluyen excipientes, estabilizantes, adyuvantes de disolución, antioxidantes, analgésicos, agentes isotonicantes, reguladores del pH y conservantes.

2) etapa de filtración aséptica y distribución de solución farmacológica

15 Esta etapa incluye filtración aséptica de la solución que contiene principio activo preparada en la etapa anterior y llenar un recipiente adecuado para la realización de la etapa de liofilización explicada a continuación con esta solución aséptica filtrada (solución farmacológica).

20 En una etapa normal, se lleva a cabo filtración aséptica usando un filtro. Se pueden usar diversos productos comerciales como el filtro para filtración aséptica. El tamaño de poro del filtro es preferiblemente 0,2 µm o menos o 0,22 µm o menos. Los expertos en la técnica conocen bien equipamiento específico y similares para realizar filtración aséptica. Dicha filtración aséptica hace posible preparar una solución farmacológica para producir una preparación liofilizada para utilizar como producto farmacéutico.

25 Los especialistas en la técnica también conocen bien el llenado de solución farmacológica normal en esta etapa. Habitualmente, los recipientes individuales se llenan directamente con solución farmacológica después de filtración aséptica de la solución del principio activo. Como alternativa, se puede filtrar de manera aséptica una gran cantidad de solución de una vez y distribuirse posteriormente en recipientes adecuados para su uso en la siguiente etapa. Un ejemplo de estos recipientes es un vial de vidrio que se puede tapar con un tapón de goma o similar. El uso de dichos viales de vidrio es provechoso en la producción de una preparación en un vial de vidrio.

El tiempo necesario para esta etapa tampoco está particularmente restringido siempre que esté dentro del intervalo aceptable para la producción industrial, pero puede ser de 0,5-2 horas, habitualmente 0,5-1 hora, como la etapa de filtración y 3-10 horas, habitualmente 6-10 horas, como la etapa de llenado.

30 Asimismo, cuando la preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones se convierte en una preparación en un vial de vidrio, se puede llenar un vial de vidrio, por ejemplo, con aproximadamente 1 g (preferiblemente 0,3-3 g, más preferiblemente 0,5-0,6 g) de solución filtrada de manera aséptica que contiene péptido PTH.

3) Etapa de carga

35 La expresión etapa de carga significa aquí una serie de etapas por las que los recipientes llenos preparados como se ha descrito anteriormente se transportan (transfieren) al medio de liofilización usado en la siguiente etapa y se cargan y colocan en ese medio.

40 Los tapones de los recipientes llenos están habitualmente abiertos o parcialmente abiertos para secar al vacío la solución llena congelada en una etapa posterior en la producción de una preparación liofilizada. Un tapón abierto significa que el tapón está completamente abierto y un tapón parcialmente abierto significa que el tapón no está abierto pero no está cerrado. Esto hace posible secar al vacío la solución farmacológica en el recipiente después de congelar. Por ejemplo, cuando el producto es una preparación en un vial de vidrio, se crea un estado de tapón parcialmente abierto como anteriormente al tapar parcialmente el vial lleno usando un tapón de goma después de llenar el vial de vidrio con solución filtrada de manera aséptica (solución farmacológica). Cuando la preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención se prepara como una preparación en un vial de vidrio o similar, también se incluye una etapa para proporcionar tapado parcial de esta manera en esta etapa de carga.

50 Un medio de liofilización es un medio que hace posible secar la solución congelada al vacío. Un medio para producción industrial está preferiblemente provisto de una función de refrigeración adecuada para congelar la solución o preferiblemente provisto de una función para calentar adecuadamente el material para liofilizar durante este tratamiento para acelerar la liofilización. Ya que el material para liofilizar se carga en una cámara en un medio de liofilización normal adecuado para producción industrial, este medio tiene una puerta grande (también denominada "puerta grande" en lo sucesivo en el presente documento) que corresponde básicamente a toda su superficie frontal. Un medio de liofilización normal es una cámara de liofilización (también denominada "liofilizador") y se comercializan muchas formas de esta.

Para explicar esta etapa a modo de ejemplo, tomando una preparación en viales de vidrio como ejemplo de la preparación que se va a producir, un proceso mediante el cual los viales de vidrio llenos con solución farmacológica obtenida en la etapa anterior "2)" se tapan parcialmente y se transportan al medio de liofilización y cada vial se carga secuencialmente o una unidad de cantidad se carga junta al mismo tiempo en la cámara de liofilización y se coloca en la misma corresponde a esta etapa. Asimismo, cuando se indica aquí que cada vial se "carga secuencialmente", dependiendo del diseño de la instalación de producción farmacéutica, esto puede significar que cada vial se llena uno tras otro de forma continua mediante la etapa de distribución de solución de fármaco anterior y después secuencialmente cada vial se tapa parcialmente y se transfiere (transporta) al medio de liofilización. Habitualmente, sin embargo, ya que el proceso pasa a la siguiente etapa de liofilización después de que todos los viales que pueden tratarse a la vez por el medio de liofilización se hayan cargado en el medio de liofilización, cada uno de los viales transportados como se ha descrito anteriormente se introducen uno tras otro (es decir, "carga secuencial") y se coloca en el medio de liofilización hasta alcanzar la cantidad que se puede tratar de una vez. Sin embargo, en el caso de dicha "carga secuencial", la "etapa de carga" de la presente invención significa una etapa que comienza con un determinado (primer) vial después de que se haya completado la etapa de distribución de solución farmacológica hasta que el vial final para liofilizar junto con este (primer) vial (es decir, de una vez) se haya cargado y colocado en el medio de liofilización.

Cargar los viales "en una unidad de cantidad juntos al mismo tiempo" puede significar, por ejemplo, que hay múltiples bandejas en la cámara de liofilización y múltiples viales llenos de solución farmacológica se colocan juntos en cada bandeja cuando se colocan en la cámara de liofilización y en ocasiones estas bandejas se pueden mover hacia arriba y hacia abajo por conveniencia cuando se cargan los viales llenos de solución farmacológica. En este caso también, la "etapa de carga" de la presente invención significa una etapa que comienza con un determinado (primer) vial después de que se haya completado la etapa de distribución de solución farmacológica hasta que el vial final para liofilizar junto con este (primer) vial se haya cargado y colocado en el medio de liofilización. En cualquier caso, los viales llenos de solución farmacológica se dejan en un estado parcialmente abierto en esta etapa hasta que comience la siguiente etapa de liofilización y pueden exponerse al ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica explicada a continuación.

El tiempo necesario para esta etapa tampoco está particularmente restringido siempre que esté dentro del intervalo aceptable para la producción industrial, pero es de 3-10 horas, habitualmente aproximadamente 6-10 horas.

4) Etapa de liofilización

Esta es una etapa para sublimar agua del material congelado para que se seque a presión reducida mediante el medio de liofilización anterior. Cuando se produce una preparación liofilizada en viales de vidrio, los viales se pueden colocar en un estado abierto o parcialmente abierto a presión reducida (por ejemplo, con los viales parcialmente tapados) y sellados al final de la liofilización después de que el espacio en el vial se haya purgado con nitrógeno.

El tiempo necesario para esta etapa varía dependiendo de las capacidades del medio de liofilización, la cantidad de sustancia para liofilizar y similares, y debería estar dentro del intervalo aceptable para la producción industrial. Habitualmente, es de aproximadamente 24-72 horas.

5) Etapa de cierre

Esta etapa puede incluirse cuando se produce una preparación liofilizada en un vial de vidrio. De manera específica, es una etapa por la que los viales de vidrio liofilizados obtenidos en la etapa anterior "4)" se cierran mediante una tapa de aluminio por una máquina de taponado de tipo prensa o similar.

6) Etapa de envasado

Esta es una etapa que une una etiqueta a la preparación y la envasa en una caja de papel o similar.

Cuando se produce una preparación liofilizada como un producto farmacéutico, la instalación de producción debe ser una instalación que cumpla con las prácticas correctas de fabricación farmacéutica. Esta instalación cuenta con equipos de preparación de solución farmacológica, equipos de filtración aséptica y equipos (medios) de liofilización y, además de estos, equipos de producción de agua para inyección, equipo de llenado y taponado de viales, máquinas de tapado, etiquetadoras y similares para implementar las etapas explicadas anteriormente.

Cuando se produce una preparación liofilizada como un producto farmacéutico, todas las etapas anteriores 1)-6) o al menos desde el final de la etapa de filtración aséptica hasta el comienzo de la etapa de liofilización deberían llevarse a cabo en ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica. Es decir, el ambiente aéreo de la instalación de producción farmacéutica difiere del simple ambiente aéreo exterior. De manera específica, es necesario que el ambiente aéreo en una instalación para producción de una inyección estéril (farmacéutica) sea "un área crítica de alta limpieza (el contenido de micropartículas en suspensión de tamaño de 0,5 μm o más por m^3 de aire debe ser 3520 o menos tanto durante el tiempo de trabajo como durante el de descanso)". Esta calidad del aire corresponde al grado A (denominado clase 100 o ISO 5) según las normas de calidad del aire nacionales e internacionales de uso común actuales.

5 El ambiente aéreo en la instalación que produce una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención debería ser al menos equivalente al ambiente aéreo en la instalación de producción de inyección estéril anterior, más preferiblemente, un ambiente que mantiene un flujo unidireccional hacia abajo desde arriba de aire limpio que ha pasado a través de filtros HEPA capaces de atrapar partículas de 0,3 µm de tamaño con una eficacia de 99,97 % o más. La velocidad del flujo de aire es preferiblemente 0,2-1,0 m/s en una ubicación 20 cm por debajo del filtro HEPA y 0,1-0,8 m/s en la ubicación donde se lleva a cabo el trabajo de producción, más preferiblemente 0,4-0,7 m/s en una ubicación 20 cm por debajo del filtro HEPA y 0,3-0,5 m/s en la ubicación donde se lleva a cabo el trabajo de producción.

10 Para crear un ambiente aéreo más estéril en una instalación de producción farmacéutica, bacterias suspendidas en el aire y bacterias adheridas a la maquinaria, paredes, suelos y otras instalaciones similares se esterilizan usando ozono o formaldehído o productos químicos con capacidad oxidante, tales como peróxido de hidrógeno, ácido peracético, dióxido de cloro, glutaraldehído y similares, como desinfectantes. La concentración residual de formaldehído después de fumigación y esterilización por formaldehído generalmente debería mantenerse a 0,1 ppm o menos, preferiblemente 0,08 ppm o menos. Asimismo, con respecto a ozono, el ozono generalmente está presente incluso en el aire exterior en una concentración de 0,001-0,02 ppm como un valor diario promedio. En ocasiones, también están presentes concentraciones de aproximadamente 0,02-0,1 ppm temporalmente dependiendo del tiempo, la ubicación y la estación.

20 Como una realización de la presente invención, un método para producir una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se caracteriza por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH al ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica se controla durante el proceso del curso cuando es necesario un tiempo sustancial en el ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica como se ha descrito anteriormente al comienzo de la etapa para preparar una solución de péptido PTH (principio activo), especialmente desde el final de la etapa de distribución de la solución farmacológica hasta el comienzo de la etapa de liofilización de la solución farmacológica (es decir, etapa de carga).

25 En la presente invención, "exposición a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica está controlada" y "control de la exposición a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica" significan que al menos uno o más del fármaco a granel de péptido PTH, la solución que contiene péptido PTH y la preparación liofilizada de péptido PTH no tienen ningún contacto en absoluto con ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica y que este contacto está sustancialmente restringido (p. ej., tiempo y nivel de contacto). Por ejemplo, en el caso de un ambiente en el que el aire limpio que ha pasado a través de filtros HEPA como se ha descrito anteriormente se mantiene como un flujo unidireccional en una dirección hacia abajo desde arriba (denominado en lo sucesivo en el presente documento "flujo de aire"), esto incluye la provisión de un medio para controlar el tiempo en contacto con este flujo de aire y el caudal de aire en contacto. Aparecen ejemplos específicos a continuación.

(A) Medios para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con flujo de aire

35 Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores han descubierto que la generación de impurezas (análogos de PTH) en solución que contiene péptido PTH puede controlarse proporcionando medios para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire. Ya que el flujo del aire en la instalación se mantiene en una instalación de producción farmacéutica ordinaria, se puede deducir que una gran cantidad de aire que fluye a medida que el flujo de aire entra en contacto con la solución que contiene péptido PTH y que las sustancias gaseosas que tienen capacidad oxidante (ozono y similares) contenidas en este flujo de aire aumentan los análogos de PTH en la solución causando reacciones y similares con el péptido PTH en la solución.

40 Los medios para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire en la presente invención no están particularmente restringidos. Los ejemplos incluyen un medio para controlar la fluidez y el flujo del aire en las inmediaciones de la solución que contiene péptido PTH y un medio para purgar las inmediaciones de la solución que contiene péptido PTH con un gas inerte.

También se ha descubierto que es ventajoso proporcionar medios para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con flujo de aire en la etapa de carga en la cámara de liofilización.

50 Para explicar la realización anterior basada en un ejemplo no limitante, una cámara ordinaria de liofilización tiene una puerta en la superficie frontal para cargar los recipientes llenos con la solución para liofilizar. Esta puerta es con frecuencia una puerta (puerta grande) que puede cubrir la superficie frontal completa de la cámara de liofilización. La presente invención, sin embargo, en una parte de la puerta grande, proporciona adicionalmente una puerta pequeña de un tamaño que corresponde aproximadamente a una de las bandejas colocadas en la cámara de liofilización (con los recipientes llenos para liofilizar dispuestos encima) y se prefiere una cámara de liofilización que tenga una puerta pequeña que se pueda abrir y cerrar fácilmente para cargar los recipientes.

55 Un ejemplo más preferido es la cámara de liofilización anterior con una puerta pequeña que tiene puertas secundarias que se pueden abrir y cerrar fácilmente provistas de aberturas para cargar (también denominadas en lo sucesivo en el presente documento "aberturas de puerta pequeña") para crear unidades de puerta pequeña para abrir cuando se cargan y descargan los recipientes llenos con el material para liofilizar en la cámara de liofilización y un medio para

abrir la puerta secundaria solo durante la carga del recipiente sin dejarla constantemente abierta y cerrarla rápidamente después de la carga. Estas puertas secundarias se proporcionan divididas en 2-5 niveles entre las zonas correspondientes a las aberturas de puertas pequeñas para que solo se pueda abrir la unidad necesaria para la carga. Se prefieren puertas secundarias que hacen posible abrir solo la ubicación necesaria para cargar los recipientes y se prefiere la división en 2-3 niveles. Los ejemplos de puertas secundarias que se pueden abrir y cerrar fácilmente incluyen una puerta secundaria que proporciona una bisagra (bisagra) en la parte superior de la puerta secundaria y se instala en la abertura de la puerta pequeña, una puerta secundaria que se desliza hacia la derecha y hacia la izquierda, una puerta secundaria que se desliza hacia arriba y hacia abajo y similares.

Los ejemplos preferidos de otros medios para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH y similares con flujo de aire incluyen sellar el equipo para la preparación (tanque o recipiente y similares) después de que el péptido PTH se haya disuelto en el disolvente en la etapa de preparación de solución que contiene péptido PTH o purga del interior del recipiente utilizado para la preparación por un gas inerte durante la preparación.

El interior del equipo de preparación (tanque o recipiente y similares) en ocasiones se presuriza y la solución preparada que contiene péptido PTH se pasa a través de un filtro estéril y se proporciona al recipiente o tanque para distribución en la etapa de filtración aséptica y distribución de solución farmacológica. Otro ejemplo preferido de un medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con flujo de aire es usar un gas inerte como el gas para la presurización en este caso.

Otro ejemplo preferido de un medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire es purgar el aire dentro del equipo de distribución de solución farmacológica (tanque o recipiente y similares) con un gas inerte por adelantado en la etapa de filtración aséptica-distribución de solución farmacológica y para purgar el recipiente de vidrio que se va a llenar con la solución que contiene péptido PTH con un gas inerte por adelantado.

Como alternativa, otro ejemplo preferido de medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire es purgar el espacio dentro del recipiente de vidrio (parte que contiene aire y sin solución de fármaco) lleno de la solución que contiene péptido PTH con un gas inerte en la etapa de filtración aséptica-distribución de solución farmacológica.

Asimismo, los recipientes de vidrio llenos de la solución que contiene péptido PTH se transportan en ocasiones desde el equipo de distribución de filtración aséptica-solución farmacológica hasta cerca de la cámara de liofilización durante el tiempo después del final de la etapa de filtración aséptica-distribución de solución farmacológica hasta la carga de la solución que contiene péptido PTH alojado en los recipientes de vidrio abiertos o parcialmente abiertos en el medio de liofilización. La colocación del ambiente durante el transporte bajo un flujo de gas inerte también se puede proporcionar como un ejemplo preferido de un medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con flujo de aire en tales casos.

Como alternativa, se puede instalar una compuerta o cubierta de ajuste del flujo de aire (Figura 17) que puede cambiar el flujo del aire que fluye desde la abertura hacia la cámara para controlar la entrada de flujo de aire desde la abertura pequeña de la cámara de liofilización hacia la cámara de liofilización como un medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con flujo de aire. La forma de esta compuerta o tapa de ajuste del flujo de aire se puede seleccionar según sea apropiado para el tamaño del liofilizador y la abertura de puerta pequeña. Puede estar hecha de una lámina de vinilo, metal, resina o similar. Asimismo, controlar la entrada de flujo de aire desde la abertura de puerta pequeña de la cámara de liofilización a la cámara de liofilización significa que la entrada de flujo de aire se controla hasta el punto en que el contacto entre la solución que contiene péptido PTH y el flujo de aire está sustancialmente controlado, preferiblemente controlado de modo que la velocidad de entrada del flujo de aire desde la abertura de puerta pequeña sea de 0,2 m/s o menos, más preferiblemente 0,1 m/s o menos y lo más preferiblemente 0,0 m/s o menos. Este control se puede lograr mediante la colocación adecuada de una compuerta o tapa de ajuste del flujo de aire o similar cerca de la puerta pequeña.

Además del medio de purga usando gas inerte como se ha descrito anteriormente, el medio para purgar las inmediaciones de la solución que contiene péptido PTH con gas inerte puede ser un medio para purgar el aire dentro de la cámara de liofilización usada en la etapa de liofilización usando un gas inerte o medio para hacer que un gas inerte fluya desde el orificio de carga en la cámara de liofilización al cargar los recipientes de solución que contiene péptido PTH en la cámara de liofilización usada en la etapa de liofilización. El caudal del gas inerte durante la entrada es preferiblemente de 0,1-5 Nm³/min, más preferiblemente 0,2-3 Nm³/min y lo más preferiblemente 0,3-1 Nm³/min. Los ejemplos del gas inerte en la purga por un gas inerte incluyen nitrógeno y argón; se puede proporcionar nitrógeno como ejemplo preferido.

(B) Etapa que proporciona un medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire

El "medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire" de (A) anterior se puede proporcionar en todas o algunas etapas incluidos desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH hasta el comienzo de la etapa de liofilización de esta solución y puede proporcionarse desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH. Cuando el método para producir una

5 preparación liofilizada que contiene péptido PTH como un producto farmacéutico de la presente invención incluye una etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH, una etapa para cargar esta solución alojada en recipientes de vidrio abiertos o parcialmente abiertos en una cámara de liofilización y una etapa de liofilización, el medio de (A) anterior se puede proporcionar en algunas o todas las etapas para cargar esta solución alojada en recipientes de vidrio abiertos o parcialmente abiertos en una cámara de liofilización.

(C) Duración de la etapa que proporciona un medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire

10 La duración de la etapa que proporciona un "medio para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con el flujo de aire" de (A) anterior puede tener, por ejemplo, como el límite inferior, una hora o más, preferiblemente tres horas o más y más preferiblemente seis horas o más, y, como el límite superior, 20 horas o menos, preferiblemente 12 horas o menos, más preferiblemente 10 horas o menos y lo más preferiblemente nueve horas o menos. Los ejemplos de la duración de la etapa que proporciona un medio de (A) anterior incluyen 1-20 horas, preferiblemente 3-12 horas, más preferiblemente 6-10 horas y lo más preferiblemente 6-9 horas.

(7) Uso de la preparación liofilizada que contiene péptido PTH

15 La preparación liofilizada que contiene péptido PTH como se cita en las reivindicaciones puede contener una cantidad farmacéuticamente eficaz de péptido PTH y, por ejemplo, la preparación liofilizada se puede disolver en un disolvente adecuado en el momento del uso para preparar una inyección y usarse en el tratamiento de la osteoporosis.

(8) Método para controlar la producción de análogos de PTH en solución que contiene péptido PTH

20 El método para controlar la producción de análogos de PTH de la presente invención es un método que proporciona un medio para controlar el contacto de al menos uno del fármaco a granel de péptido PTH, solución que contiene péptido PTH y preparación liofilizada que contiene péptido PTH con sustancias que tienen capacidad oxidante, especialmente con aire que contiene estas sustancias. Un ejemplo preferido de un método para controlar la producción de análogos de PTH es proporcionar un medio para purgar el aire en contacto con la solución que contiene el péptido PTH mediante un gas inerte (preferiblemente nitrógeno). Un ejemplo más preferido es un método para controlar la producción de uno o más análogos cualesquiera de PTH entre los análogos 1 a 11 mencionados anteriormente y los análogos 1' a 11' por medios para controlar el contacto de la solución que contiene péptido PTH con flujo de aire o medio para purgar el aire en contacto con la solución que contiene péptido PTH mediante un gas inerte (preferiblemente nitrógeno).

30 Estos métodos de control de la producción pueden implementarse en instalaciones de producción de preparación liofilizada en ambientes aéreos en instalaciones de producción farmacéutica como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, su producción en la solución puede controlarse mediante un medio para controlar el contacto de la solución con el flujo de aire durante el transcurso del proceso durante un tiempo predeterminado o más largo desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH hasta el comienzo de la etapa de liofilización de esta solución. Las realizaciones preferidas de este medio son las mismas que las realizaciones preferidas de los métodos correspondientes para la producción de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de la presente invención.

Ejemplos

La presente invención se explica de manera más concreta a continuación mediante ejemplos, ejemplos de referencia y ejemplos de prueba sin limitar el alcance de la invención.

[Ejemplo 1]

40 Se colocaron aproximadamente 18 kg de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 50 l. Se pesó una cantidad de 540 g de sacarosa y 27 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, se añadieron 3541 mg de PTH humana (1-34) como acetato (lote A; 860 mg, lote B; 2591 mg, lote C; 90 mg) y se disolvieron. Después se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH añadiendo agua para inyección y corrigiendo el peso a 27 kg. La solución acuosa que contiene péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable de 50 l previamente lleno de nitrógeno. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2-0,4 m/s) en una instalación de producción farmacéutica, los viales de vidrio lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH filtrada de manera aséptica y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Se alinearon cada uno de aproximadamente 1000 viales en bandejas de acero inoxidable y las bandejas se transfirieron después delante de una cámara de liofilización fabricada por Ulvac (modelo: DFB, áreas de la bandeja: 24 m²) previamente lleno de nitrógeno en una zona de grado A. Mientras se purgaba el interior de la cámara de liofilización con nitrógeno, se abrió una puerta secundaria que coincidía con la anchura de las bandejas (una puerta equivalente a la puerta secundaria de la figura 16 instalada internamente en la cámara de liofilización comercial anterior), provista en la abertura cuando la puerta pequeña de la cámara de liofilización anterior estaba abierta, y la puerta secundaria se cerró rápidamente después de cargar la bandeja en la cámara de liofilización. Se repitió el mismo procedimiento y los viales parcialmente abiertos se cargaron en la cámara de liofilización durante aproximadamente nueve horas. La solución que contenía

PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno después haberse completado el secado, los viales se sellaron con tapones de goma y se taparon con tapas de aluminio, dando como resultado una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

[Ejemplo 2]

5 Se colocaron aproximadamente 10 kg de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 20 l. Se pesó una cantidad de 280 g de sacarosa y 14 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, el peso se corrigió a 14 kg añadiendo agua para inyección y se preparó una solución aditiva. Se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH pesando 1780 mg (lote D) de PTH humana (1-34) como acetato y disolviéndola en 13 kg de la solución aditiva. La solución acuosa que contiene péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable de 50 l previamente lleno de nitrógeno. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2-0,4 m/s) en una instalación de producción farmacéutica, los viales de vidrio lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH filtrada de manera aséptica y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Se alinearon cada uno de aproximadamente 1000 viales en bandejas de acero inoxidable y las bandejas se transfirieron después delante de una cámara de liofilización fabricada por Ulvac (modelo: DFB, áreas de la bandeja: 24 m²) previamente lleno de nitrógeno en una zona de grado A. Mientras se purgaba el interior de la cámara de liofilización con nitrógeno, se abrió una puerta secundaria que coincidía con la anchura de las bandejas (una puerta equivalente a la puerta secundaria de la figura 16 instalada internamente en la cámara de liofilización comercial anterior), provista en la abertura cuando la puerta pequeña de la cámara de liofilización anterior estaba abierta, y la puerta secundaria se cerró rápidamente después de cargar la bandeja en la cámara de liofilización. Se repitió el mismo procedimiento y los viales parcialmente abiertos se cargaron en la cámara de liofilización durante aproximadamente seis horas. La solución que contenía péptido PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno después haberse completado el secado, los viales se sellaron con los tapones de goma, se taparon con tapas de aluminio y se obtuvo una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

[Ejemplo 3]

Se colocaron aproximadamente 19 kg de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 30 l. Se pesó una cantidad de 460 g de sacarosa y 23 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, el peso se corrigió a 23 kg añadiendo agua para inyección y se preparó una solución de placebo. Se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH pesando 2979 mg (lote D) de PTH humana (1-34) como acetato y disolviéndola en 22 kg de la solución de placebo. La solución acuosa que contiene péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable previamente lleno de nitrógeno. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2-0,4 m/s) en una instalación de producción farmacéutica, los viales de vidrio lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH filtrada de manera aséptica y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Los viales parcialmente abiertos se transfirieron a una zona de grado A y todos los viales se cargaron durante aproximadamente seis horas en una cámara de liofilización fabricada por Ulvac (modelo: DFB, áreas de la bandeja: 22 m²) previamente llena de nitrógeno hecha de manera que el flujo de aire desde la abertura de la puerta pequeña no entre en la cámara de liofilización usando una lámina de vinilo (una lámina equivalente a la cubierta de ajuste de flujo de aire de la figura 17 instalada internamente en la cámara de liofilización anterior) capaz de cambiar el flujo del aire que fluye en la dirección opuesta a la abertura de la puerta pequeña de la cámara de liofilización. Asimismo, esta lámina de vinilo capaz de cambiar el flujo del aire también se instaló internamente en la cámara de liofilización comercial anterior; se extendió una lámina de vinilo de manera oblicua hacia abajo desde la parte superior de la abertura de la puerta pequeña y se impidió que el flujo de aire entrara desde la abertura cambiando la dirección del flujo de aire de arriba hacia abajo. La solución que contenía péptido PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno una vez que se hubo completado el secado, los viales se sellaron con los tapones de goma, se taparon con tapas de aluminio y se obtuvo una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

[Ejemplo 4]

Se colocaron aproximadamente 18 kg de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 50 l. Se pesó una cantidad de 540 g de sacarosa y 27 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, se añadieron 3525 mg de PTH humana (1-34) como acetato (lote C; 1880 mg, lote E; 1645 mg) y se disolvieron. Después se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH añadiendo agua para inyección y corrigiendo el peso a 27 kg. La solución acuosa que contiene péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable de 50 l previamente lleno de nitrógeno. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2 -0,4 m/s) y una concentración de formalina llevada a 0,08 ppm o menos en una instalación de producción farmacéutica, los viales de vidrio lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Se alinearon cada uno de aproximadamente 1000 viales en bandejas de acero inoxidable y las bandejas se

transfirieron después delante de una cámara de liofilización fabricada por Ulvac (modelo: DFB, áreas de la bandeja: 24 m²) previamente lleno de nitrógeno en una zona de grado A. Mientras se purgaba el interior de la cámara de liofilización con nitrógeno, se abrió una puerta secundaria que coincidía con la anchura de las bandejas (una puerta equivalente a la puerta secundaria de la figura 16 instalada internamente en la cámara de liofilización comercial anterior), provista en la abertura cuando la puerta pequeña de la cámara de liofilización anterior estaba abierta, y la puerta secundaria se cerró rápidamente después de cargar la bandeja en la cámara de liofilización. Se repitió la misma etapa y los viales parcialmente abiertos se cargaron en la cámara de liofilización durante aproximadamente ocho horas. La solución que contenía péptido PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno una vez que se hubo completado el secado, los viales se sellaron con los tapones de goma, se taparon con tapas de aluminio y se obtuvo una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

[Ejemplo 5]

Se colocaron aproximadamente 18 kg de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 50 l. Se pesó una cantidad de 540 g de sacarosa y 27 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, se añadieron 3566 mg de PTH humana (1-34) como acetato (lote H) y se disolvió. Después se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH añadiendo agua para inyección y corrigiendo el peso a 27 kg. La solución acuosa que contiene péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable de 50 l previamente lleno de nitrógeno. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2-0,4 m/s) y una concentración de formalina llevada a 0,08 ppm o menos en una instalación de producción farmacéutica, los viales de vidrio lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Se alinearon cada uno de aproximadamente 1000 viales en bandejas de acero inoxidable y las bandejas se transfirieron después delante de una cámara de liofilización fabricada por Ulvac (modelo: DFB, áreas de la bandeja: 24 m²) previamente lleno de nitrógeno en una zona de grado A. Mientras se purgaba el interior de la cámara de liofilización con nitrógeno, se abrió una puerta secundaria que coincidía con la anchura de las bandejas (una puerta equivalente a la puerta secundaria de la Figura 16 instalada internamente en la cámara de liofilización comercial anterior), provista en la abertura cuando la puerta pequeña de la cámara de liofilización anterior estaba abierta, y la puerta secundaria se cerró rápidamente después de cargar la bandeja en la cámara de liofilización. Se repitió la misma etapa y los viales parcialmente abiertos se cargaron en la cámara de liofilización durante aproximadamente siete horas. La solución que contenía péptido PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno una vez que se hubo completado el secado, los viales se sellaron con los tapones de goma, se taparon con tapas de aluminio y se obtuvo una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

[Ejemplo comparativo 1]

Se colocaron aproximadamente 5000 g de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 10 l. Se pesó una cantidad de 120 g de sacarosa y 6 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, se añadieron 909 mg de PTH humana (1-34) como acetato (lote F; 335 mg, lote G; 574 mg) y se disolvieron. Después se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH añadiendo agua para inyección y corrigiendo el peso a 6000 g. La solución acuosa que contenía péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2-0,4 m/s) en una instalación de producción farmacéutica, los viales lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Los viales parcialmente abiertos se transfirieron a una zona de grado A y todos se cargaron secuencialmente durante aproximadamente cuatro horas en una cámara de liofilización fabricada por Ulvac (modelo: DFB, áreas de la bandeja: 22 m²) que tiene una puerta pequeña. La solución que contenía péptido PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno una vez que se hubo completado el secado, los viales se sellaron con los tapones de goma, se taparon con tapas de aluminio y se obtuvo una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

[Ejemplo comparativo 2]

Se colocaron aproximadamente 2000 g de agua para inyección a aproximadamente 25 °C en un recipiente de acero inoxidable de 10 l. Se pesaron cantidades de 100 g de sacarosa y 5 g de cloruro de sodio en el recipiente y se disolvieron. A continuación, se añadieron 515 mg de PTH humana (1-34) como acetato (lote D) y se disolvió. Después se obtuvo una solución acuosa que contenía péptido PTH añadiendo agua para inyección y corrigiendo el peso a 4000 g. La solución acuosa que contenía péptido PTH obtenida se filtró de manera aséptica usando un filtro mientras se presurizaba con nitrógeno y se suministró a un tanque de llenado de acero inoxidable de 5 l. Dentro de una zona que tiene un ambiente de grado A (velocidad del aire de aproximadamente 0,2-0,4 m/s) en una instalación de producción farmacéutica, los viales lavados y secos se llenaron con 0,56 g de esta solución acuosa que contenía péptido PTH y se obtuvieron viales parcialmente abiertos usando tapones de goma lavados y secos. Los viales parcialmente abiertos se transfirieron a una zona de grado A y todos se cargaron secuencialmente durante aproximadamente tres horas en una cámara de liofilización que tiene una puerta pequeña (Kyowa Vacuum Engineering Co., Ltd. (modelo: RL, área de

la bandeja: 9 m²). La solución que contenía péptido PTH se congeló y se liofilizó para sublimar el agua a presión reducida. Después de purgar los interiores de los viales de vidrio con nitrógeno una vez que se hubo completado el secado, los viales se sellaron con los tapones de goma, se taparon con tapas de aluminio y se obtuvo una preparación liofilizada que contenía péptido PTH.

5 **[Ejemplo de prueba 1]**

El método de porcentaje de área que usa HPLC es un método sencillo para evaluar la pureza de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH y la cantidad de análogos. Una solución obtenida pesando 0,25 g de cloruro de benzalconio y llevándola a 50 ml mediante la adición de tampón de sulfato 50 mM (pH 2,3) actúa como tampón de carga. Cada preparación de los ejemplos y ejemplos comparativos se disuelve con 1 ml de solución salina fisiológica y una mezcla 9:1 de esta solución y el tampón de carga actúa como solución de muestra. Se prueba una cantidad de 100 µl de solución de muestra mediante HPLC en las siguientes condiciones. Asimismo, se usó cloruro de benzalconio para evitar que el péptido que es la diana de medición se adhiriera al instrumento y similares.

<Condiciones de prueba>

Detector: Absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 214 nm)

15 Columna: Tubo de acero inoxidable de 150 mm de longitud que tiene un diámetro interno de 4,6 mm empaquetado con 3,5 µm de gel de sílice octadecilsililado

Temperatura de la columna: Temperatura constante cercana a 40 °C

Fase móvil: Fase móvil A: Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 900 ml de agua y llevarlo a 1000 ml añadiendo agua después de añadir ácido fosfórico para ajustar el pH a 2,3. Añadir 100 ml de acetonitrilo a estos 900 ml de líquido.

20 Fase móvil B: Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 900 ml de agua y llevarlo a 1000 ml añadiendo agua después de añadir ácido fosfórico para ajustar el pH a 2,3. Añadir 500 ml de acetonitrilo a 500 ml de este líquido.

Suministro de fase móvil: El control del gradiente de concentración se proporciona variando la relación de mezcla de la fase móvil A y la fase móvil B de la siguiente manera.

Tiempo después de la inyección:

25 [Tabla 5]

Tabla 5: Control de gradiente de concentración

Tiempo después de la inyección de muestra (min)	Fase móvil A (% en volumen)	Fase móvil B (% en volumen)
0-5	100→65	0→35
5-35	65→60	35→40
35-45	60→0	40→100

Caudal: 1,0 ml/min

Temperatura de la muestra: Temperatura constante cercana a 5 °C

30 Tiempo de detección: 45 minutos después de la inyección de la solución de muestra. Sin embargo, esto es de la parte posterior del pico del disolvente.

Método de cálculo: La cantidad de cada análogo de PTH y la cantidad total del mismo se determinó realizando cromatografía líquida en las condiciones anteriores, midiendo cada área de pico mediante integración automática y realizando cálculos usando las Fórmulas 1 y 2. Asimismo, el área de pico total fue la suma total del área de todos los picos detectados realizando cromatografía líquida en las condiciones anteriores. En otras palabras, el área de pico total muestra la suma total de péptido PTH y todos los análogos de PTH en la preparación.

Fórmula 1: Cantidad de cada análogo de PTH (%) = (área de pico de cada análogo/área de pico total)×100

Fórmula 2: Cantidad total de análogos de PTH (%) = (suma total de áreas de pico de cada análogo/área de pico total)×100

40 <Resultados>

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos al evaluar la cantidad de análogos de la PTH humana (1-34) (fármaco a granel) usada en los ejemplos. La figura 1 muestra un gráfico de HPLC. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos

al evaluar la pureza de las preparaciones liofilizadas que contienen péptido PTH y la cantidad de análogos en el ejemplo de prueba. La figura 2 muestra un gráfico de HPLC del ejemplo 1 y la figura 3 muestra un gráfico de HPLC del ejemplo comparativo 1. La estructura de cada análogo en la tabla 6 se obtuvo por estimación usando el ejemplo de prueba 2 a continuación.

5 [Tabla 6]

Tabla 6: Cantidad de cada análogo (%) en PTH humana (1-34) usada como fármaco a granel

	A	B	C	D	E	F	G	H
Uso en ejemplos y ejemplos comparativos	Ej. 1	Ej. 1	Ej. 1, 4	Ej. 2, EjC 2	Ej. 4	EjC 1	EjC 1	Ej. 5
(1) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(2) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(3) Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(4) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(5) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(6) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]	0,08	0,07	0,11	0,05	0,05	0,14	0,17	0,06
(7) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]	0,13	0,09	0,16	0,06	0,07	0,21	0,23	0,09
(8) PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
(9) Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación] y PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ej.: Ejemplo; EjC.: Ejemplo comparativo								

[Tabla 7]

Tabla 7: Cantidad total de análogos (cantidad total) y cantidad de cada análogo (%)

	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4	Ej. 5	EjC. 1	EjC. 2
Cantidad total (%)	0,88	0,76	1,51	0,95	0,72	6,27	3,09
(1) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]	0,03	ND	ND	ND	ND	0,10	0,05
(2) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	0,02	ND	ND	ND	ND	0,07	ND
(3) Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación]	0,03	ND	ND	0,03	0,03	0,29	0,12
(4) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]	0,06	0,02	0,03	0,05	ND	0,69	0,27
(5) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	ND	ND	0,03	ND	ND	0,19	ND
(6) PTH humana (1-34)-Met 8 [O]	0,14	0,09	0,24	0,15	0,09	0,93	0,34
(7) PTH humana (1-34)-Met 18 [O]	0,19	0,15	0,36	0,25	0,10	1,42	1,08
(8) PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación]	0,09	0,04	0,10	0,11	0,04	0,74	0,69
(9) Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación] y PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]	0,05	ND	0,09	0,04	0,02	0,40	0,08
Ej.: Ejemplo; EjC.: Ejemplo comparativo							

10

[Ejemplo de prueba 2]

Se produjeron y fraccionaron análogos de PTH humana (1-34) y se analizaron las fracciones para estimar las estructuras de cada análogo obtenido en el ejemplo de prueba 1.

(1) Producción y fraccionamiento de cada análogo

5 Se pesó una cantidad de 4,00 g de sacarosa y 0,20 g de cloruro de sodio y se disolvió añadiendo agua para inyección para preparar una solución de placebo. La PTH humana (1-34) se pesó exactamente y se disolvió añadiendo 100 ml de solución de placebo para preparar una solución madre de reacción. Se produjo un ambiente con una concentración de ozono de aproximadamente 0,08 ppm por medidor de concentración de ozono usando un generador de ozono y un soplador (velocidad del viento inicial de aproximadamente 7,2 m/s) para hacer circular el ozono y hacer que la concentración sea uniforme en una bandeja que tiene una puerta de cristal de 40 cm de longitud × 90 cm de anchura × 100 cm de altura. Se distribuyeron aproximadamente 15 ml de la solución de reserva de reacción en cada vial de 20 ml. Se introdujo un agitador en el vial y se llevó a cabo degradación agitando al mismo tiempo con agitador hasta que la pureza fue de aproximadamente 20 % (en otras palabras, la cantidad total de análogos de PTH humana (1-34) fue de 80 %) por exposición (durante aproximadamente 20 horas) a una atmósfera de ozono de aproximadamente 0,08 ppm. Asimismo, la pureza se confirmó de acuerdo con las condiciones de prueba del ejemplo de prueba 1. La solución degradada se liofilizó y se tomó una solución disuelta con una cantidad adecuada de agua para inyección como solución de degradación forzada. Los análogos se fraccionaron en las siguientes condiciones usando esta solución.

<Condiciones de prueba>

20 Las condiciones de prueba distintas de las siguientes fueron iguales que las condiciones de prueba en el ejemplo de prueba 1.

<Condiciones diferentes del ejemplo de prueba 1>

Columna: Tubo de acero inoxidable de 250 mm de longitud que tiene un diámetro interno de 9,4 mm empaquetado con 5 µm de gel de sílice octadecilsililado

25 Caudal: 6,0 ml/min

Asimismo, no se observaron diferencias importantes en el patrón de cromatograma a pesar del hecho de que las condiciones anteriores diferían de las del ejemplo de prueba 1.

30 Se fraccionaron nueve análogos en las condiciones de cromatografía anteriores. Se desalaron y concentraron y los productos liofilizados se disolvieron en agua destilada para obtener cada análogo (compuesto no digerido). Cada análogo (compuesto no digerido) y la solución de degradación forzada se analizaron mediante HPLC en las condiciones de prueba del ejemplo de prueba 1 y se calculó el tiempo de retención relativo de cada análogo (compuesto no digerido), tomando el tiempo de retención de PTH humana (1-34) en la solución de degradación forzada como 1.

<Resultados>

35 Se confirmó la concordancia básicamente completa con el tiempo de retención relativo de cada análogo en la solución de degradación forzada. La tabla 8 muestra los resultados en los tiempos de retención relativos. La figura 4 muestra un cromatograma de la solución de degradación forzada. Los tiempos de elución de los picos de PTH humana (1-34) difieren ligeramente debido a las diferentes composiciones de las soluciones cargadas en las figuras 3 y 4, pero se supuso que los análogos correspondientes de las figuras 3 y 4 eran iguales dado que los patrones de elución y el porcentaje en peso de cada análogo eran iguales en cada gráfico. Basándose en estos resultados, la prueba de exposición al ozono aquí parece ser una prueba que reproduce sustancialmente las reacciones de producción de análogos de PTH desencadenadas cuando se produce solución que contiene péptido PTH en un ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica.

[Tabla 8]

45 Tabla 8: Comparación del tiempo de retención relativo de los picos relevantes de análogos (compuestos no digeridos) y solución de degradación forzada

	Análogo (compuesto no digerido)	Solución de degradación forzada
PTH humana (1-34)	--	1,00
Análogo (1)	0,43	0,42
Análogo (2)	0,44	0,43
Análogo (3)	0,46	0,46

	Análogo (compuesto no digerido)	Solución de degradación forzada
Análogo (4)	0,49	0,49
Análogo (5)	0,51	0,51
Análogo (6)	0,55	0,55
Análogo (7)	0,62	0,62
Análogo (8)	0,65	0,65
Análogo (9)	0,70	0,70

(2) Análisis de estimación estructural de cada análogo

5 Cada uno de los análogos anteriores (compuestos no digeridos) y el patrón humano de PTH (1-34) fueron digeridos por tripsina para producir análogos (compuestos digeridos) y solución de referencia (compuesto digerido). Diez de estas muestras fueron analizadas por LC/MS/MS en las siguientes condiciones.

<Condiciones de LC/MS/MS>

Detector: Absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 210 nm)

Columna: Tubo de acero inoxidable de 150 mm de longitud que tiene un diámetro interno de 1,5 mm empaquetado con 5 µm de gel de sílice octadecilsililado

10 Temperatura de la columna: Temperatura constante cercana a 40 °C

Fase móvil: Fase móvil A: Solución acuosa mixta que contiene ácido trifluoroacético (1:1000)

Fase móvil B: Acetonitrilo

Suministro de fase móvil: El control del gradiente de concentración se proporciona variando la relación de mezcla de la fase móvil A y la fase móvil B de la siguiente manera.

15 Tiempo después de la inyección:

[Tabla 9]

Tabla 9: Control de gradiente de concentración

Tiempo después de la inyección de muestra (min)	Fase móvil A (% en volumen)	Fase móvil B (% en volumen)
0-30	95→55	5→45
30-40	55	45

Caudal: 0,1 ml/min

20 Temperatura de la muestra: Temperatura constante cercana a 5 °C

Tiempo de detección: 45 minutos después de la inyección de la solución de muestra. Sin embargo, esto es de la parte posterior del pico del disolvente

Modo de ionización: ES+

Cada análogo (compuesto no digerido) fue analizado por LC/MS en las siguientes condiciones.

25 <Condiciones de prueba de LC/MS>

Las condiciones distintas a las siguientes fueron iguales que las condiciones de LC/MS/MS.

Suministro de fase móvil: El control del gradiente de concentración se proporciona variando la relación de mezcla de la fase móvil A y la fase móvil B de la siguiente manera.

Tiempo después de la inyección:

30

[Tabla 10]

Tabla 10: Control de gradiente de concentración

Tiempo después de la inyección de muestra (min)	Fase móvil A (% en volumen)	Fase móvil B (% en volumen)
0-30	85→55	15→45
30-40	55	45

<Resultados>

- 5 Los resultados del análisis estructural de los nueve análogos en el ejemplo de prueba 2 fueron los siguientes.

<PTH humana (1-34)>

La Tabla 11 muestra los fragmentos esperados de PTH humana (1-34) producidos por digestión con tripsina.

[Tabla 11]

Tabla 11: Fragmentos esperados de PTH humana (1-34)

N.º de fragmento	Estructura estimada	Secuencia de aminoácidos
T1	PTH (1-13)	Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys SEQ ID NO: 1
T2	PTH (14-20)	His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg SEQ ID NO: 2
T3	PTH (21-25)	Val-Glu-Trp-Leu-Arg SEQ ID NO: 3
T4	PTH (26)	Lys
T5	PTH (27)	Lys
T6	PTH (28-34)	Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe SEQ ID NO: 5

10

La Tabla 12 muestra los resultados de la medición de la masa de cada fragmento confirmado en LC/MS/MS de la solución de referencia (compuesto digerido). Los valores medidos de cada fragmento en la solución de referencia (compuesto digerido) se compararon con la masa calculada y se confirmó que se obtuvieron cinco fragmentos de estructura estimada en PTH humana (1-34).

15 [Tabla 12]

Tabla 12: Resultados de la medición de la masa de la solución de referencia (compuesto digerido)

Tiempo de retención	Masa medida	Masa calculada	Estructura estimada	N.º de fragmento
	Masa (mono.)	Masa (mono.)		
13,423	885,4984	885,4127	PTH (14-20)	T2
18,371	871,5030	871,4188	PTH (28-34)	T6
18,371	999,6100	999,5138	PTH (27-34)	T5-6
21,222	701,4508	701,3861	PTH (21-25)	T3
22,618	1454,8715	1454,7551	PTH (1-13)	T1

<Análogo 1>

- 20 El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,43 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 1 y la tabla 13 muestra los resultados de la medición de masa en LC/MS/MS del análogo 1 (compuesto digerido). Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en T2, +4 Da en T3 y +16 Da en T1 en el análogo 1 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

[Tabla 13]

Tabla 13: Resultados de la medición de la masa del análogo 1 (compuesto digerido)

Tiempo de retención (min)	Análogo 1	Solución de referencia		Diferencia en masa
	Masa (mono.)	Frag. N.º	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
9,578	901,4622	T2	885,4984	+16 Da
18,409	871,4731	T6	871,5030	0
18,409	999,5720	T5-6	999,6100	0
19,096	705,4228	T3	701,4508	+4 Da
19,323	1470,8297	T1	1454,8715	+16 Da

- 5 La tabla 14 muestra los resultados obtenidos mediante análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. Como resultado de la comparación con la solución de referencia (compuesto digerido), se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en Met 18 en T2, +4 Da en Trp 23 en T3 y +16 Da en Met 8 en T1.

[Tabla 14]

Tabla 14: Resultados del análisis de MS/MS del análogo 1 (compuesto digerido)

N.º de fragmento	Masa observada en el espectro de MS/MS		Estructura estimada	Aminoácido con cambio de masa
	Análogo 1	Solución de referencia		
	(mono.)	(mono.)		
T2	304,1896	304,1960	PTH (19-20)	Met 18 +16 Da
	434,2278	--	PTH (18-20) +16 Da	
	--	418,2120	PTH (18-20)	
T3	271,2070	271,2085	PTH (24-25)	Trp 23 +4 Da
	478,2979	--	PTH (23-25) +4 Da	
	--	474,3203	PTH (23-25)	
T1	568,3508	568,3636	PTH (9-13)	Met 8 +16 Da
	715,3823	--	PTH (8-13) +16 Da	
	--	699,4180	PTH (8-13)	

- 10 La tabla 15 muestra los resultados obtenidos comparando la masa del análogo 1 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con el valor calculado de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 1 (compuesto no digerido) se confirmaron picos de +64 Da y +36 Da en comparación con la masa calculada y el pico de +64 Da parecía ser el pico principal basándose en el tamaño de los picos, como se muestra en la figura 7. El peso molecular del compuesto no digerido es de aproximadamente 4000 Da, pero ya que la masa de un ion multivalente se obtiene como el valor medido en LC/MS, se anticipó un error de aproximadamente ±1 Da en el proceso de cálculo de la masa del compuesto no digerido a partir de la masa del ion multivalente. Se enumeran valores corregidos entre paréntesis para las diferencias estimadas en masa cuando surgió un error en el análisis estructural. Lo mismo sucede en análisis estructurales posteriores.

[Tabla 15]

20 Tabla 15: Resultados de la medición de la masa del análogo 1 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención (min)	Masa medida Masa (mono.)	Masa calculada Masa (mono.)	Diferencia en masa (F=0, 4/5)
19,749	4179,3280	4115,1309	+64 Da
20,130	4151,3674	4115,1309	+36 Da

Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que la PTH humana (1-34) +36 Da = (Met 18 +16 Da) + (Trp 23 +4 Da) + (Met 8 +16 Da). La estructura de la forma cambiada en +4 Da en Trp es b) en la figura 6 y se

esperaba que el cambio en la masa de su precursor a) fuera +32 Da. Se suponía que Trp 23 había cambiado de a) a b) en el transcurso de la digestión con tripsina y otros procedimientos similares y se estimó que el pico principal del análogo 1 (compuesto no digerido) era PTH humana (1-34) +64 Da = (Met 18 +16 Da) + (Trp 23 +32 Da) + (Met 8 +16 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 1 era PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación].

<Análogo 2>

El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,44 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 2 y la tabla 16 muestra los resultados de la medición de masa en LC/MS/MS del análogo 2 (compuesto digerido). Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en T2, +4 Da en T3 y +16 Da en T1 en el análogo 2 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

[Tabla 16]

Tabla 16: Resultados de la medición de la masa del análogo 2 (compuesto digerido)

Tiempo de retención	Análogo 2	Solución de referencia		Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Frag. N.º	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
9,58	901,4695	T2	885,4984	+16 Da
18,348	871,4788	T6	871,5030	0
18,348	999,5874	T5-6	999,6100	0
19,059	705,4333	T3	701,4508	+4 Da
19,222	1470,8492	T1	1454,8715	+16 Da

Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en Met 18 en T2, +4 Da en Trp 23 en T3 y +16 Da en Met 8 en T1, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. La tabla 17 muestra los resultados de la comparación de la masa del análogo 2 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 2 (compuesto no digerido), se confirmaron picos de +24 Da y +92 Da en comparación con las masas calculadas, pero la fiabilidad de estas masas confirmadas parecía ser baja ya que básicamente no se formó ninguna forma de pico, como se muestra en la figura 8, y no se pudieron obtener masas que respalden los resultados del análisis de MS/MS.

[Tabla 17]

Tabla 17: Resultados de la medición de la masa del análogo 2 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
20,092	4139,2866	4115,1309	+24 Da
20,632	4207,3668	4115,1309	+92 Da

Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que el análogo 2 había experimentado al menos cambios en la masa de PTH humana (1-34) +36 Da = (Met 18 +16 Da) + (Trp 23 +4 Da) + (Met 8 +16 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 2 era PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico].

<Análogos 3 y 4>

El pico que muestra un tiempo de retención = 0,46 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se obtuvo de una mezcla de los análogos 3 y 4, como se explica a continuación. La tabla 18 muestra los resultados de la medición de la masa en LC/MS/MS de una mezcla de los análogos 3 y 4 (compuesto digerido). Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en T2, +4 Da en T3 y +16 Da en T1 en la mezcla de análogos 3 y 4 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido). También se confirmaron fragmentos T2 y T3 no asociados con cambios en la masa.

[Tabla 18]

Tabla 18: Resultados de la medición de la masa de una mezcla de análogos 3 y 4 (compuesto digerido)

Tiempo de retención (min)	Análogo 3	Solución de referencia		Diferencia en masa (F=0, 4/5)
	Masa (mono.)	Frag. N.º	Masa (mono.)	
9,813	901,4778	T2	885,4984	+16 Da
13,475	885,4846	T2	885,4984	0
18,326	871,4844	T6	871,5030	0
18,326	999,5800	T5-6	999,6100	0
18,959	705,4266	T3	701,4508	+4 Da
19,223	1470,8373	T1	1454,8715	+16 Da
21,195	701,4322	T3	701,4508	0

5 Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en Met 18 en T2, +4 Da en Trp 23 en T3 y +16 Da en Met 8 en T1, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. La tabla 19 muestra los resultados de la comparación de la masa de una mezcla de análogos 3 y 4 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En la mezcla de análogos 3 y 4 (compuesto no digerido), se confirmaron picos de +32 Da, +48 Da y +20 Da en comparación con las masas calculadas y +32 Da y +48 Da en una relación aproximada de 1:1 parecían ser el pico principal basándose en tamaño de los picos, como se muestra en la figura 9.

[Tabla 19]

Tabla 19: Resultados de la medición de la masa de una mezcla de análogos 3 y 4 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención (min)	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa (F=0, 4/5)
	Masa (mono.)	Masa (mono.)	
21,062	4147,3692	4115,1309	+32 Da
21,539	4163,3747	4115,1309	+48 Da
21,843	4135,3897	4115,1309	+20 Da

15 En el cromatograma de LC/MS/MS de una mezcla de análogos 3 y 4 (compuesto digerido), T2 +16 Da: T2 y T3 +4 Da: T3 estaban presentes cada uno en una relación de aproximadamente 1:1, y T2 +16 Da: T3 +4 Da: T1 +16 Da estaban presentes en una relación de aproximadamente 1:1:2. Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que la PTH humana (1-34) +32 Da = (Met 18 +16 Da) + (Met 8 +16 Da) y la PTH humana (1-34) +20 Da = (Trp 23 +4 Da) + (Met 8 +16 Da). Con respecto a esto último, se suponía que Trp 23 había experimentado un cambio de a) a b) en el transcurso de la digestión con tripsina y otros procedimientos similares, de la misma manera que el análogo 1, y se estimó que la PTH humana (1-34) +48 Da = (Trp 23 +32 Da) + (Met 8 +16 Da). Se estimó que los análogos 3 y 4 eran PTH humana (1-34) +32 Da y PTH humana (1-34) +48 Da, respectivamente. En otras palabras, se estimó que el pico que tenía un tiempo de retención relativo = 0,46 en la tabla 8 era un pico de una mezcla que contenía PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación].

<Análogo 5>

25 El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,49 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 5 y la tabla 20 muestra los resultados de la medición de masa en LC/MS/MS del análogo 5 (compuesto digerido). Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en T2 y +4 Da en T3 en el análogo 5 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

30

[Tabla 20]

Tabla 20: Resultados de la medición de la masa del análogo 5 (compuesto digerido)

Tiempo de retención	Análogo 4 [sic]	Solución de referencia		Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Frag. N.º	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
9,587	901,4664	T2	885,4984	+16 Da
18,321	871,4904	T6	871,5030	0
18,321	999,5957	T5-6	999,6100	0
19,012	705,4388	T3	701,4508	+4 Da
22,561	1454,8492	T1	1454,8715	0

5 Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en Met 18 en T2 y +4 Da en Trp 23 en T3, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. La tabla 21 muestra los resultados de la comparación de la masa del análogo 5 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 5 (compuesto no digerido), se confirmaron picos de +48 Da y +20 Da en comparación con las masas calculadas y +48 Da parecía ser el pico principal basándose en el tamaño de los picos, como se muestra en la figura 10.

10 [Tabla 21]

Tabla 21: Resultados de la medición de la masa del análogo 5 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
22,081	4163,3763	4115,1309	+48 Da
22,514	4135,3902	4115,1309	+20 Da

15 Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que la PTH humana (1-34) +20 Da = (Met 18 +16 Da) + (Trp 23 +4 Da). Se suponía que Trp 23 había experimentado un cambio de a) a b) en el transcurso de la digestión con tripsina y otros procedimientos similares, de la misma manera que el análogo 1. Se estimó que el pico principal del análogo 5 (compuesto no digerido) era PTH humana (1-34) +48 Da = (Met 18 +16 Da) + (Trp 23 +32 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 5 era PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación].

<Análogo 6>

20 El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,51 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 6 y la tabla 22 muestra los resultados de la medición de masa en LC/MS/MS del análogo 6 (compuesto digerido). Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en T2 y +4 Da en T3 en el análogo 6 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido). También se confirmaron fragmentos T1 en los que no hubo ningún cambio en la masa.

25 [Tabla 22]

Tabla 22: Resultados de la medición de la masa del análogo 6 (compuesto digerido)

Tiempo de retención	Análogo 5 [sic]	Solución de referencia		Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Frag. N.º	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
9,589	901,4699	T2	885,4984	+16 Da
18,332	871,4912	T6	871,5030	0
18,332	999,5869	T5-6	999,6100	0
19,032	705,4321	T3	701,4508	+4 Da
22,583	1454,8536	T1	1454,8715	0

Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en Met 18 en T2 y +4 Da en Trp 23 en T3, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en

la masa. La tabla 23 muestra los resultados de la comparación de la masa del análogo 6 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 6 (compuesto no digerido), se confirmó un pico de +20 Da en comparación con la masa calculada.

[Tabla 23]

5 Tabla 23: Resultados de la medición de la masa del análogo 6 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
22,580	4135,6585	4115,1309	+21 Da (+20 Da)

Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que el análogo 6 era PTH humana (1-34) +20 Da = (Met 18 +16 Da) + (Trp 23 +4 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 6 era PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico].

10 <Análogo 7>

El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,55 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 7 y la tabla 24 muestra los resultados de la medición de masa en LC/MS/MS del análogo 7 (compuesto digerido). Se confirmó un cambio en la masa de +16 Da en T1 en el análogo 7 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

15 [Tabla 24]

Tabla 24: Resultados de la medición de la masa del análogo 7 (compuesto digerido)

Tiempo de retención	Análogo 6 [sic]	Solución de referencia		Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Frag. N.º	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
13,405	855,4859	T2	885,4984	0
18,374	871,4885	T6	871,5030	0
18,374	999,5920	T5-6	999,6100	0
19,296	1470,8591	T1	1454,8715	+16 Da
21,225	701,4354	T3	701,4508	0

20 Se confirmó un cambio en la masa de +16 Da en Met 8 en T1, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. La tabla 25 muestra los resultados de la comparación de la masa del análogo 7 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 7 (compuesto no digerido), se confirmó un pico de +16 Da en comparación con la masa calculada.

[Tabla 25]

Tabla 25: Resultados de la medición de la masa del análogo 7 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
22,353	4131,7101	4115,1309	+17 Da (+16 Da)

25 Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que el análogo 7 era PTH humana (1-34) +16 Da = (Met 8 +16 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 7 era PTH humana (1-34)-Met 8 [O].

<Análogo 8>

30 El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,62 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 8 y la tabla 26 muestra los resultados de la medición de la masa en LC/MS/MS del análogo 8 (compuesto digerido). Se confirmó un cambio en la masa de +16 Da en T2 en el análogo 8 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

[Tabla 26]

Tabla 26: Resultados de la medición de la masa del análogo 8 (compuesto digerido)

Tiempo de retención (min)	Análogo 7 [sic] Masa (mono.)	Solución de referencia		Diferencia en masa (F=0, 4/5)
		Frag. N.º	Masa (mono.)	
9,709	901,4782	T2	885,4984	+16 Da
18,356	871,4903	T6	871,5030	0
18,356	999,5916	T5-6	999,6100	0
21,228	701,4383	T3	701,4508	0
22,636	1454,8592	T1	1454,8715	0

- 5 Se confirmó un cambio en la masa de +16 Da en Met 18 en T2, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. La tabla 27 muestra los resultados de la comparación de la masa del análogo 8 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 8 (compuesto no digerido), se confirmó un pico de +16 Da en comparación con la masa calculada, como se muestra en la figura 13.

[Tabla 27]

- 10 Tabla 27: Resultados de la medición de la masa del análogo 8 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención (min)	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa (F=0, 4/5)
	Masa (mono.)	Masa (mono.)	
23,129	4131,7286	4115,1309	+17 Da (+16 Da)

Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que el análogo 8 era PTH humana (1-34) +16 Da = (Met 18 +16 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 8 era PTH humana (1-34)-Met 18 [O].

<Análogo 9>

- 15 El análogo que muestra un tiempo de retención = 0,65 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se tomó como el análogo 9 y la tabla 28 muestra los resultados de la medición de masa en LC/MS/MS del análogo 9 (compuesto digerido). Se confirmó un cambio en la masa de +4 Da en T3 en el análogo 9 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

[Tabla 28]

- 20 Tabla 28: Resultados de la medición de la masa del análogo 9 (compuesto digerido)

Tiempo de retención (min)	Análogo 8 [sic] Masa (mono.)	Solución de referencia		Diferencia en masa (F=0, 4/5)
		Frag. N.º	Masa (mono.)	
13,392	885,4876	T2	885,4984	0
18,329	871,4896	T6	871,5030	0
18,329	999,5977	T5-6	999,6100	0
19,023	705,4405	T3	701,4508	+4 Da
22,567	1454,8638	T1	1454,8715	0

- 25 Se confirmó un cambio en la masa de +4 Da en Trp 23 en T3, de la misma manera que en el análogo 1, como resultado del análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. La tabla 29 muestra los resultados de la comparación de la masa del análogo 9 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En el análogo 9 (compuesto no digerido), se confirmaron picos de +32 Da y +4 Da en comparación con la masa calculada y +32 Da parecía ser el pico principal basándose en el tamaño de los picos, como se muestra en la figura 14.

[Tabla 29]

Tabla 29: Resultados de la medición de la masa del análogo 9 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención (min)	Masa medida Masa (mono.)	Masa calculada Masa (mono.)	Diferencia en masa (F=0, 4/5)
23,729	4147,8250	4115,1309	+33 Da (+32 Da)
24,087	4119,8303	4115,1309	+5 Da (+4 Da)

5 Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, se estimó que la PTH humana (1-34) +4 Da = (Trp 23 +4 Da). Se suponía que Trp 23 había experimentado un cambio de a) a b) en el transcurso de la digestión con tripsina y otros procedimientos similares, de la misma manera que el análogo 1. Se estimó que el pico principal del análogo 9 (compuesto no digerido) era PTH humana (1-34) +32 Da = (Trp 23 +32 Da). En otras palabras, se estimó que el análogo 9 era PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación].

<Análogos 10 y 11>

10 El pico que muestra un tiempo de retención = 0,70 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 se obtuvo de una mezcla de los análogos 10 y 11, como se explica a continuación. La tabla 30 muestra los resultados de la medición de la masa en LC/MS/MS de una mezcla de los análogos 10 y 11 (compuesto digerido). Se confirmaron cambios en la masa de +16 Da en +4 Da en T3 como fragmentos separados en la mezcla de análogos 10 y 11 (compuesto digerido) en comparación con los valores medidos de los fragmentos relevantes en la solución de referencia (compuesto digerido).

15

[Tabla 30]

Tabla 30: Resultados de la medición de la masa de una mezcla de análogos 10 y 11 (compuesto digerido)

Tiempo de retención (min)	Análogo 9 [sic] Masa (mono.)	Solución de referencia		Diferencia en masa (F=0, 4/5)
		Frag. N.º	Masa (mono.)	
13,449	885,4893	T2	885,4984	0
18,337	871,4925	T6	871,5030	0
18,337	999,5985	T5-6	999,6100	0
18,821	717,4391	T3	701,4508	+16 Da
19,032	705,4407	T3	701,4508	+4 Da
22,563	1454,8634	T1	1454,8715	0

20 La tabla 31 muestra los resultados obtenidos mediante análisis de MS/MS de fragmentos que se ha confirmado que tienen cambios en la masa. Se confirmó un cambio en la masa de +16 Da en Trp 23 en un T3 como resultado de la comparación con la solución de referencia (compuesto digerido). Se esperaba que la estructura de la forma cambiada de +16 Da en Trp fuera c) en la figura 6. Aunque no se pudieron obtener datos que permitieran especificar los aminoácidos modificados en el otro T3, se estimó un cambio en la masa de +4 Da en Trp 23 a partir de los resultados del análisis de los análogos 1-8.

25 [Tabla 31]

Tabla 31: Resultados del análisis de MS/MS de una mezcla de los análogos 10 y 11 (compuesto digerido)

N.º de fragmento	Masa observada en el espectro de MS/MS		Estructura estimada	Aminoácido con cambio de masa
	Análogo 9 [sic]	Solución de referencia		
	(mono.)	(mono.)		
T3	271,2131	271,2085	PTH (24-25)	Trp 23 +16 Da
	490,3079	--	PTH (23-25) +16 Da	
	--	474,3203	PTH (23-25)	

La tabla 32 muestra los resultados de la comparación de la masa de una mezcla de análogos 10 y 11 (compuesto no digerido) obtenido por LC/MS con la masa calculada de 4115,1309 de PTH humana (1-34). En la mezcla de análogos 10 y 11 (compuesto no digerido), se observaron picos de +16 Da y +4 Da en comparación con las masas calculadas, como se muestra en la figura 15.

5 [Tabla 32]

Tabla 32: Resultados de la medición de la masa de una mezcla de análogos 10 y 11 (compuesto no digerido)

Tiempo de retención	Masa medida	Masa calculada	Diferencia en masa
(min)	Masa (mono.)	Masa (mono.)	(F=0, 4/5)
22,956	4131,7912	4115,1309	+17 Da (+16 Da)
24,151	4119,8118	4115,1309	+5 Da (+4 Da)

10 Basándose en los resultados del análisis de MS/MS, estos fueron atribuidos como PTH humana (1-34) +16 Da = (Trp 23 +16 Da) y PTH humana (1-34) +4 Da = (Trp 23 +4 Da), y se estimó que el pico que mostraba un tiempo de retención = 0,70 en la columna "Análogos (compuestos no digeridos)" en la tabla 8 era una mezcla de los análogos 10 y 11. En otras palabras, se estimó que el análogo 10 era PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación] y se estimó que el análogo 11 era PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico].

<Compendio del análisis estructural>

15 La tabla 33 muestra el tiempo de retención relativo y los resultados de estructura estimados de cada análogo. La figura 5 muestra la oxidación de los restos de metionina en la tabla y la figura 6 muestra a), b) y c) en la tabla. El tiempo de retención relativo de cada análogo en la tabla muestra el tiempo de retención relativo tomando el tiempo de retención de PTH humana (1-34) como 1.

[Tabla 33]

Tabla 33: Tiempo de retención relativo y estructura estimada de cada análogo

N.º	Tiempo de retención relativo	Aminoácido cambiado	Compendio de cambio		Nombre del análogo
			Cambio de masa	Naturaleza del cambio	
(1)	0,42	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]
		Met 18	16 Da	Oxidación	
		Trp 23	32 Da	a)	
(2)	0,43	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]
		Met 18	16 Da	Oxidación	
		Trp 23	4 Da	b)	
(3)	0,46	Met 8	16 Da	Oxidación	Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Met 18 [O] y PTH humana (1-34)-Met 8 [O]-Trp 23 [dioxidación]
		Met 18	16 Da	Oxidación	
	0,46	Met 8	16 Da	Oxidación	
		Trp 23	32 Da	a)	
(4)	0,49	Met 18	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación]
		Trp 23	32 Da	a)	
(5)	0,51	Met 18	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 18 [O]-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]
		Trp 23	4 Da	b)	
(6)	0,55	Met 8	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 8 [O]
(7)	0,62	Met 18	16 Da	Oxidación	PTH humana (1-34)-Met 18 [O]
(8)	0,65	Trp 23	32 Da	a)	PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación]
(9)	0,7	Trp 23	16 Da	c)	Mezcla que contiene PTH humana (1-34)-Trp 23 [monoxidación] y PTH humana (1-34)-Trp 23 [dioxidación-eliminación de ácido fórmico]
	0,7	Trp 23	4 Da	b)	

20

Aplicabilidad industrial

Ya que la presente invención proporciona una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza, La presente invención se puede usar en la industria de fabricación farmacéutica.

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

- 5 1: Puerta grande
 2: Puerta pequeña
 3: Puerta secundaria (abierta)
 4: Puerta secundaria (cerrada)
 5: Cubierta de ajuste de flujo de aire

10 Realizaciones de la invención

[Realización 1] Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza como principio activo, en donde "alta pureza" significa al menos que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos; produciéndose la preparación liofilizada que contiene péptido PTH mediante un método caracterizado por que se controla la exposición de la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica.

[Realización 2] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 1 en donde el análogo de PTH es al menos uno o más entre

- 20 1) análogo 1:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 64 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (1-a) a (1-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(1-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

- 25 (1-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(1-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

- 2) análogo 2:

30 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 36 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (2-a) a (2-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(2-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(2-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(2-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

- 3) análogo 3:

35 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (3-a) y (3-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(3-a) número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da y

(3-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

- 40 4) análogo 4:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (4-a) y (4-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(4-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,

(4-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

5) análogo 5:

5 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (5-a) y (5-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(5-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(5-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

6) análogo 6:

10 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 20 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (6-a) y (6-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(6-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

(6-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

7) análogo 7:

15 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (7-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(7-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da;

8) análogo 8:

20 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (8-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(8-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

9) análogo 9:

25 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (9-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(9-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

10) análogo 10:

30 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (10-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(10-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +16 Da; o

11) análogo 11:

35 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 4 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (11-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

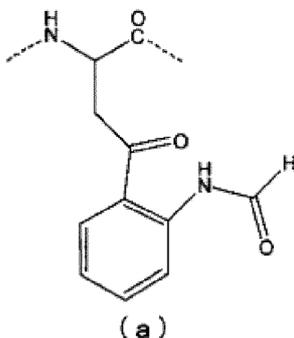
(11-a) número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da.

40 **[Realización 3]** Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesto en la realización 1 en donde el análogo de PTH es al menos uno o más entre

1) análogo 1':

óxido de péptido PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y posición 18 de PTH humana (1-34) se han cambiado a restos de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la siguiente fórmula estructural (a);

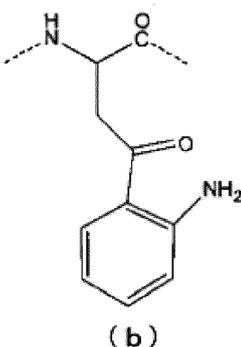
[Fórmula química 1]



2) análogo 2':

- 5 óxido de péptido PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y posición 18 de PTH humana (1-34) se han cambiado a restos de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la siguiente fórmula estructural (b);

[Fórmula química 1]



3) análogo 3':

- 10 óxido de péptido PTH en el que los restos correspondientes a la metionina de posición 8 y posición 18 de PTH humana (1-34) se han cambiado a restos de sulfóxido de metionina;

4) análogo 4':

- 15 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 8 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (a);

5) análogo 5':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (a);

20 6) análogo 6':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina y el resto correspondiente al triptófano de posición 23 se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (b);

7) análogo 7':

- 25 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 8 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina;

8) análogo 8':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente a la metionina de posición 18 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de sulfóxido de metionina;

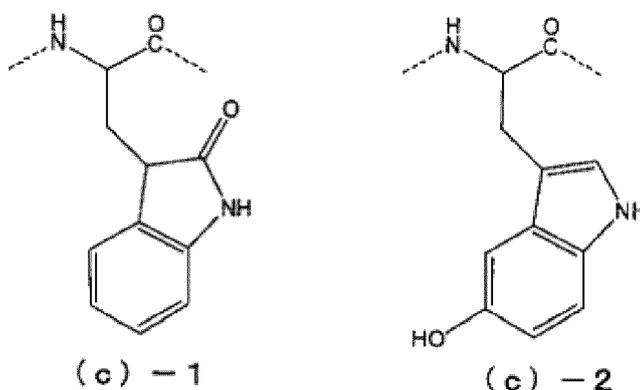
9) análogo 9':

5 óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (a);

10) análogo 10':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto de monóxido de triptófano mostrado por la siguiente fórmula estructural (c-1) o (c-2);

10 [Fórmula química 3]



o

11) análogo 11':

óxido de péptido PTH en el que el resto correspondiente al triptófano de posición 23 de PTH humana (1-34) se ha cambiado a un resto mostrado por la fórmula estructural anterior (b).

15 **[Realización 4]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesto en la realización 2 en donde alta pureza significa que la cantidad de al menos uno de los análogos anteriores 1 a 11 frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es de 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de los análogos anteriores 1 a 11 frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos.

20 **[Realización 5]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 3 en donde alta pureza significa que la cantidad de al menos uno de los análogos anteriores 1' a 11' frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es de 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de los análogos anteriores de 1' a 11' frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos.

25 **[Realización 6]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 1 a 5 en donde el péptido PTH es PTH humana (1-34).

[Realización 7] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 1 a 6 en donde la preparación liofilizada que contiene péptido PTH se aloja en un vial de vidrio.

30 **[Realización 8]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 1 a 7, caracterizada por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla en una o más etapas cualesquiera seleccionadas de una etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH, una etapa de filtración aséptica, una etapa de distribución de solución de fármaco y una etapa para cargar en un medio de liofilización.

35 **[Realización 9]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 8 caracterizada por producirse usando un método que también incluye control de exposición del producto liofilizado a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica en una etapa de sellado de viales después de liofilizar.

[Realización 10] La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 1 a 9 caracterizada por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos dentro de una

instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla en la etapa para cargar en el medio de liofilización.

5 **[Realización 11]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesto en la realización 10 caracterizada por que la exposición anterior se controla mediante el uso de una cámara de liofilización equipada con un medio para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización.

10 **[Realización 12]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 11 caracterizada por que el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga.

15 **[Realización 13]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 11 en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio y el medio para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización es una cubierta de ajuste del flujo aéreo que puede cambiar el flujo de aire en una dirección no dirigida desde esta abertura al interior de la cámara.

20 **[Realización 14]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 10 caracterizada por que la etapa de carga controla la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte.

25 **[Realización 15]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 10 en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga y purga del interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.

30 **[Realización 16]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en la realización 10 en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descargan de este medio, estando esta abertura equipada con una cubierta de ajuste del flujo aéreo, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización cambiando la dirección de la cubierta de ajuste del flujo aéreo de modo que el aire no se dirija a la cámara y purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.

35 **[Realización 17]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 10 a 16 en donde la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas.

40 **[Realización 18]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 8 a 17 en donde en donde el tiempo desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH hasta el final de la etapa para cargar en el medio de liofilización abarca tres o más horas y la producción se realiza usando un método para controlar la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica en una o más etapas durante el tiempo.

45 **[Realización 19]** La preparación liofilizada que contiene péptido PTH expuesta en cualquiera de las realizaciones 14 a 18 en donde el gas inerte es gas de nitrógeno.

50 **[Realización 20]** Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza como principio activo, la preparación liofilizada que contiene péptido PTH fabricada usando un método caracterizado por que la exposición de una solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla durante la carga en el medio de liofilización; en donde "alta pureza" significa al menos que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos; la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas; el ambiente aéreo es un ambiente que mantiene el flujo aéreo unidireccional de aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA hacia abajo desde arriba; y la velocidad del flujo aéreo 20 cm directamente debajo del filtro HEPA es 0,2-1,0 m/s.

[Realización 21] Un método para producir una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose el

método por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica se controla en una o más etapas desde el comienzo de la etapa para preparar una solución que contiene péptido PTH hasta el final de la etapa para cargar en el medio de liofilización.

5 **[Realización 22]** Método expuesto en la reivindicación 21 en donde la exposición del producto liofilizado a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica también se controla en la etapa de sellado de viales después de la liofilización.

[Realización 23] El método expuesto en la realización 21 o 22 caracterizado por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica se controla en la etapa de carga en el medio de liofilización.

10 **[Realización 24]** El método expuesto en la realización 23 caracterizado por que la exposición se controla usando una cámara de liofilización equipada con medios para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización.

[Realización 25] El método expuesto en la realización 23 o 24, en donde la etapa para cargar en el medio de liofilización es una etapa que dura tres o más horas.

15 **[Realización 26]** El método expuesto en la reivindicación 24 o 25 en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria que se puede abrir y cerrar fácilmente, provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y descargan de este medio, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga.

20

[Realización 27] El método expuesto en las realizaciones 24 o 25 en donde el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y se descarga de este medio y el medio para controlar la entrada de aire en una instalación de producción farmacéutica en el medio de liofilización es una cubierta de ajuste del flujo aéreo que puede cambiar el flujo aéreo en una dirección no dirigida desde esta abertura al interior de la cámara.

25

[Realización 28] El método expuesto en la realización 23 o 25 caracterizado por que la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte.

30

[Realización 29] El método expuesto en las realizaciones 23 o 25 caracterizado por que el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una puerta secundaria fácil de abrir y cerrar provista en una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan y descargan, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización abriendo esta puerta secundaria solo durante la carga del recipiente y cerrando rápidamente la puerta secundaria después de la carga y purga del interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.

35

[Realización 30] El método expuesto en la realización 23 o 25, caracterizado por que el medio de liofilización es una cámara de liofilización que tiene una abertura creada en una unidad de puerta pequeña abierta cuando los recipientes que alojan la solución que contiene péptido PTH antes de la liofilización se cargan en y descargan de este medio, estando la abertura equipada con una cubierta de ajuste del flujo aéreo, controlando de este modo la exposición de la solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización cambiando la cubierta de ajuste del flujo aéreo en una dirección en la que el flujo aéreo no se dirige a la cámara y purgando el interior del medio de liofilización con un gas inerte en la etapa de carga.

40

45 **[Realización 31]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 28 a 30 en donde el gas inerte es nitrógeno.

[Realización 32] El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 31 en donde el recipiente que aloja la solución que contiene péptido PTH es un vial de vidrio.

[Realización 33] El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 32 en donde la PTH es PTH humana (1-34).

50 **[Realización 34]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 33 en donde el ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica es un ambiente aéreo en el que 1) el aire es de grado A, 2) aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA que tiene la capacidad de atrapar partículas que tienen un tamaño de partícula de 0,3 µm con una eficacia de 99,97 % o más se mantiene como un flujo aéreo unidireccional hacia abajo desde arriba y 3) la concentración de ozono es 0,001-0,1 ppm.

- [Realización 35]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 34 en donde el ambiente aéreo en una instalación de producción farmacéutica es un ambiente aéreo que contiene una concentración de formaldehído de 0,1 ppm o menos.
- 5 **[Realización 36]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 35 en donde la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 1,0 % o menos y/o la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH.
- [Realización 37]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 36 para controlar la producción de análogos de PTH 1 a 11 expuestos en la realización 2.
- 10 **[Realización 38]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 36 para controlar la producción de análogos de PTH 1' a 11' expuestos en la realización 3.
- [Realización 39]** Una preparación liofilizada que contiene péptido PTH fabricado usando el método expuesto en cualquiera de las realizaciones 21 a 38.
- 15 **[Realización 40]** Un método para producir una preparación liofilizada que contiene péptido PTH de alta pureza como principio activo, el método caracterizado por que la exposición de una solución que contiene péptido PTH a ambientes aéreos en una instalación de producción farmacéutica antes de la liofilización se controla durante la carga en el medio de liofilización; en donde "alta pureza" significa al menos que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 1,0 % o menos y/o que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos en la preparación; la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas; el ambiente aéreo es un ambiente en el que el aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA se mantiene como un flujo aéreo unidireccional hacia abajo desde arriba; y la velocidad del flujo aéreo 20 cm directamente debajo del filtro HEPA es 0,2-1,0 m/s.
- 20 **[Realización 41]** Un método para probar una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose el método por confirmar la presencia de al menos uno o más de los análogos de PTH 1 a 11 de la realización 2 y/o determinar las cantidades presentes en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH.
- 25 **[Realización 42]** Un método para probar una preparación liofilizada que contiene péptido PTH, caracterizándose el método por confirmar la presencia de al menos uno o más de los análogos de PTH 1' a 11' de la realización 3 y/o determinar las cantidades presentes en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH.
- 30 **[Realización 43]** El método expuesto en las realizaciones 41 o 42 en donde en donde la determinación de los análogos de PTH incluye calcular el área del pico correspondiente al análogo de PTH en un cromatograma cuando la absorción ultravioleta de una muestra derivada de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se mide por cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 35 **[Realización 44]** El método expuesto en la realización 43 que incluye el cálculo de la pureza del péptido PTH en la preparación liofilizada que contiene péptido PTH comparando el área de un pico correspondiente a un análogo de PTH en un cromatograma y el área de pico correspondiente al péptido PTH o la suma del área de pico de péptido PTH y el área de pico de todos los demás análogos de PTH detectados en el mismo cromatograma cuando la absorbancia ultravioleta de una muestra procedente de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se mide mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 40 **[Realización 45]** El método expuesto en la realización 44 que incluye el cálculo de la pureza del péptido PTH en una preparación liofilizada que contiene péptido PTH comparando el área de ese pico y el área de pico correspondiente al péptido PTH o la suma del área de pico de péptido PTH y el área de pico de todos los demás análogos de PTH detectados en el mismo cromatograma cuando se usan condiciones de cromatografía de modo que se detecten dos o más análogos de PTH cualesquiera como uno o más picos individuales en el cromatograma.
- 45 **[Realización 46]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 41 a 45 para garantizar que la cantidad de al menos un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 1,0 % o menos y/o la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de péptido PTH y la cantidad total de análogos de PTH es de 5,0 % o menos en una preparación liofilizada que contiene péptido PTH.
- 50 **[Realización 47]** El método expuesto en cualquiera de las realizaciones 41 a 46 que incluye la detección del número másico de los análogos de PTH usando un espectrómetro de masas de cromatografía líquida de alto rendimiento.
- [Realización 48]** El método establecido en cualquiera de las realizaciones 41 a 47 que incluye fraccionar una sustancia que da un pico único en el cromatograma e identificar el número másico de los fragmentos producidos al digerir esta sustancia usando tripsina.
- [Realización 49]** Un método para producir un producto farmacéutico que comprende una preparación liofilizada que

contiene péptido PTH que incluye una etapa para llevar a cabo el método de prueba de cualquiera de las realizaciones 41 a 48.

Listado de secuencias

- <110> Asahi Kasei Pharma Corporation
- 5 <120> Preparación liofilizada que contiene PTH de alta pureza y método para producirla
- <130> EP90856IHVGSpau
- <140> pendiente de cesión
- <141> 2012-05-31
- <150> EP12796142.3
- 10 <151> 2012-05-31
- <150> PCT/JP2012/064229
- <151> 2012-05-31
- <150> 2011-127698
- <151> 2011-06-07
- 15 <160> 5
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fragmento de hPTH(1-34) digerido con tripsina
- <400> 1
- Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys
- 1 5 10
- 25 <210> 2
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Fragmento de hPTH(1-34) digerido con tripsina
- <400> 2
- His Leu Asn Ser Met Glu Arg
- 1 5
- <210> 3
- <211> 5
- 35 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fragmento de hPTH(1-34) digerido con tripsina
- <400> 3
- Val Glu Trp Leu Arg
- 1 5
- 40 <210> 4
- <211> 34
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> hPTH(1-34)

ES 2 761 635 T3

<400> 4

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 5

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de hPTH(1-34) digerido con tripsina

<400> 5

Leu Gln Asp Val His Asn Phe

10 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una preparación liofilizada que contiene PTH humana de alta pureza (1-34), comprendiendo el método
- 5 controlar la exposición de la solución que contiene PTH humana (1-34) a ozono contenido en ambientes aéreos en una instalación de producción de inyección estéril
- durante una o más etapas, comenzando con la etapa de preparar una solución que contiene la PTH humana (1-34) hasta el final de la etapa para cargar en el medio de liofilización,
- 10 en donde "alta pureza" significa que la cantidad de un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH en la preparación es 1,0 % o menos y que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos, en donde el análogo de PTH es uno o más de 1) a 11) de la siguiente manera:
- 1) análogo 1:
- 15 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 64 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (1-a) a (1-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (1-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
- (1-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- (1-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 2) análogo 2:
- 20 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 36 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (2-a) a (2-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (2-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
- (2-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- 25 (2-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 3) análogo 3:
- óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (3-a) y (3-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- 30 (3-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
- (3-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;
- 4) análogo 4:
- 35 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (4-a) y (4-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (4-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
- (4-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 5) análogo 5:
- 40 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (5-a) y (5-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,
- (5-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
- (5-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;
- 6) análogo 6:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 20 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (6-a) y (6-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

(6-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y

5 (6-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

7) análogo 7:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (7-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

10 (7-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da;

8) análogo 8:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (8-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

15 (8-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

9) análogo 9:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (9-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

20 (9-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

10) análogo 10:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (10-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

25 (10-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +16 Da; o

11) análogo 11:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 4 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (11-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

30 (11-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da,

en donde, el análogo de PTH es uno detectado como un pico diferente del péptido PTH, que es el principio activo en el cromatograma cuando una muestra de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se somete a HPLC.

35 2. El método expuesto en la reivindicación 1, en donde la exposición del producto liofilizado a ambientes aéreos en una instalación de producción de inyección estéril también se controla en la etapa para sellado de viales después de la liofilización.

3. Un método para producir una preparación liofilizada que contiene PTH humana de alta pureza (1-34) como un principio activo, comprendiendo el método

controlar la exposición de una solución que contiene PTH humana (1-34) a ozono contenido en ambientes aéreos en una instalación de producción de inyección estéril

40 antes de la liofilización y durante la carga en el medio de liofilización;

en donde "alta pureza" significa que la cantidad de un análogo de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH es 1,0 % o menos y que la cantidad total de análogos de PTH frente a la suma de la cantidad de PTH humana (1-34) y la cantidad total de análogos de PTH es 5,0 % o menos en la preparación; la etapa de carga es una etapa que dura tres o más horas; el ambiente aéreo es un ambiente en el que el aire limpio que ha pasado a través de un filtro HEPA se mantiene como un flujo aéreo unidireccional hacia abajo desde arriba; y la velocidad del flujo aéreo 20 cm directamente debajo del filtro HEPA es 0,2-1,0 m/s, en donde el análogo de PTH es uno o más de 1) a 11) de la siguiente manera:

45

1) análogo 1:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 64 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (1-a) a (1-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- 5 (1-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
 (1-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
 (1-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

2) análogo 2:

10 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 36 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (2-a) a (2-c) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- (2-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
 (2-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
 (2-c) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

15 3) análogo 3:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (3-a) y (3-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- (3-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
 20 (3-b) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

4) análogo 4:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (4-a) y (4-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- 25 (4-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da,
 (4-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

5) análogo 5:

30 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 48 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (5-a) y (5-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- (5-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
 (5-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

6) análogo 6:

35 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 20 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce productos de digestión correspondientes a los siguientes fragmentos (6-a) y (6-b) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- (6-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da y
 (6-b) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

7) análogo 7:

40 óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (7-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

- (7-a) Número másico de Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys (SEQ ID NO: 1) +16 Da;

8) análogo 8:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (8-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

5 (8-a) Número másico de His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) +16 Da;

9) análogo 9:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 32 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (9-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

10 (9-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da;

10) análogo 10:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 16 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (10-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

15 (10-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +16 Da; o

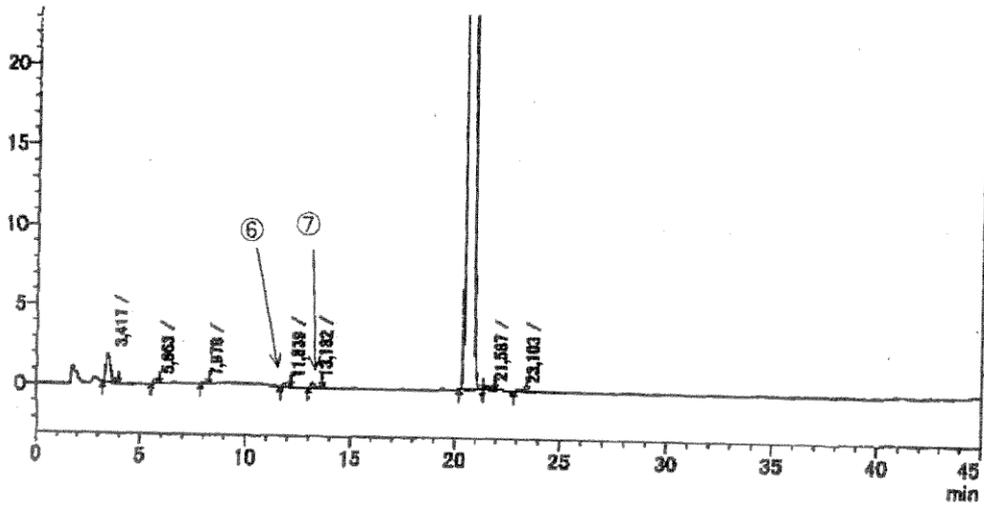
11) análogo 11:

óxido de péptido PTH que tiene un número másico 4 Da mayor que el número másico del péptido PTH contenido en la preparación y que produce un producto de digestión correspondiente al siguiente fragmento (11-a) cuando el análogo es digerido por tripsina,

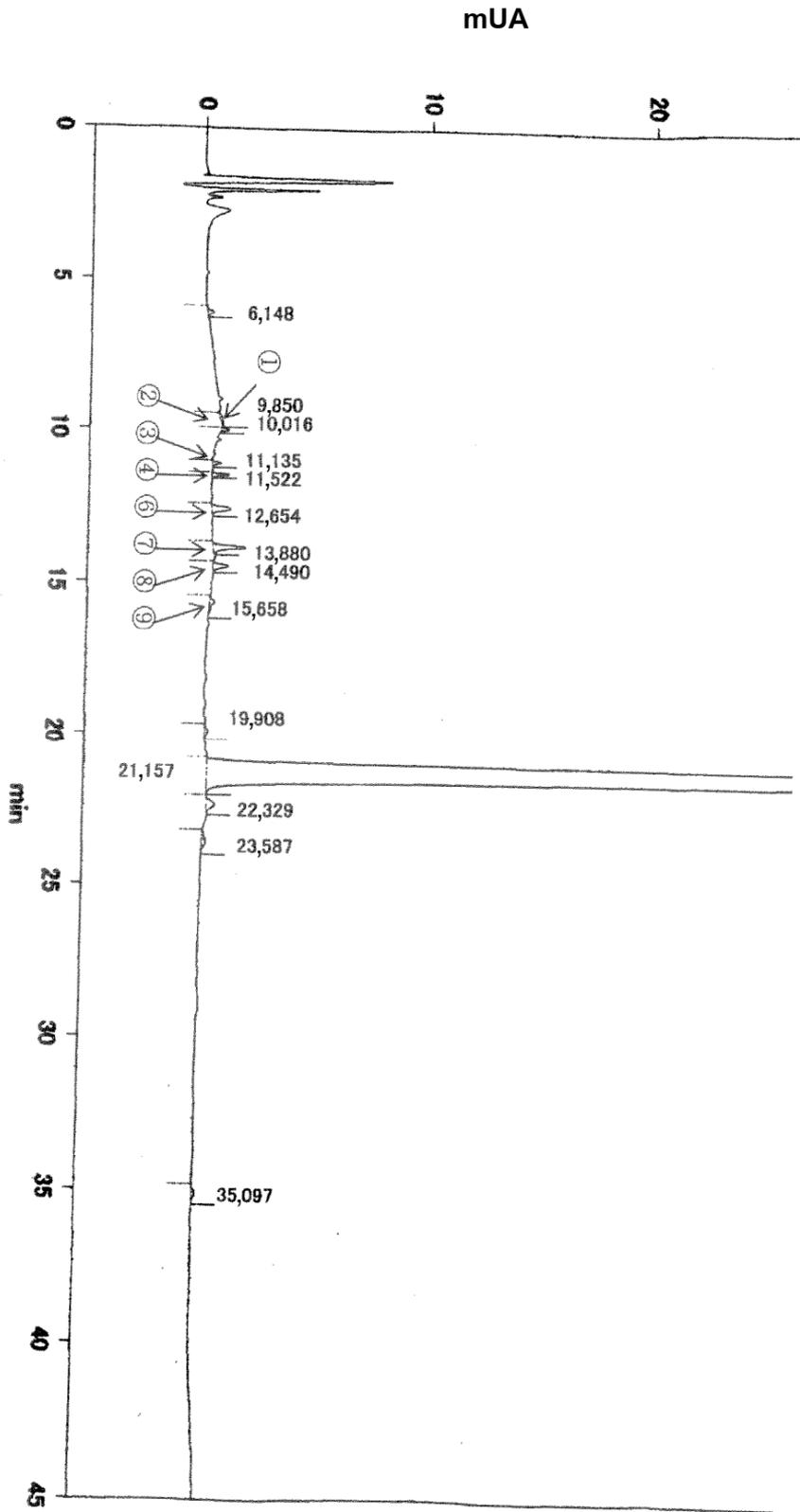
20 (11-a) Número másico de Val-Glu-Trp-Leu-Arg (SEQ ID NO: 3) +4 Da,

en donde, el análogo de PTH es uno detectado como un pico diferente del péptido PTH, que es el principio activo en el cromatograma cuando una muestra de una preparación liofilizada que contiene péptido PTH se somete a HPLC.

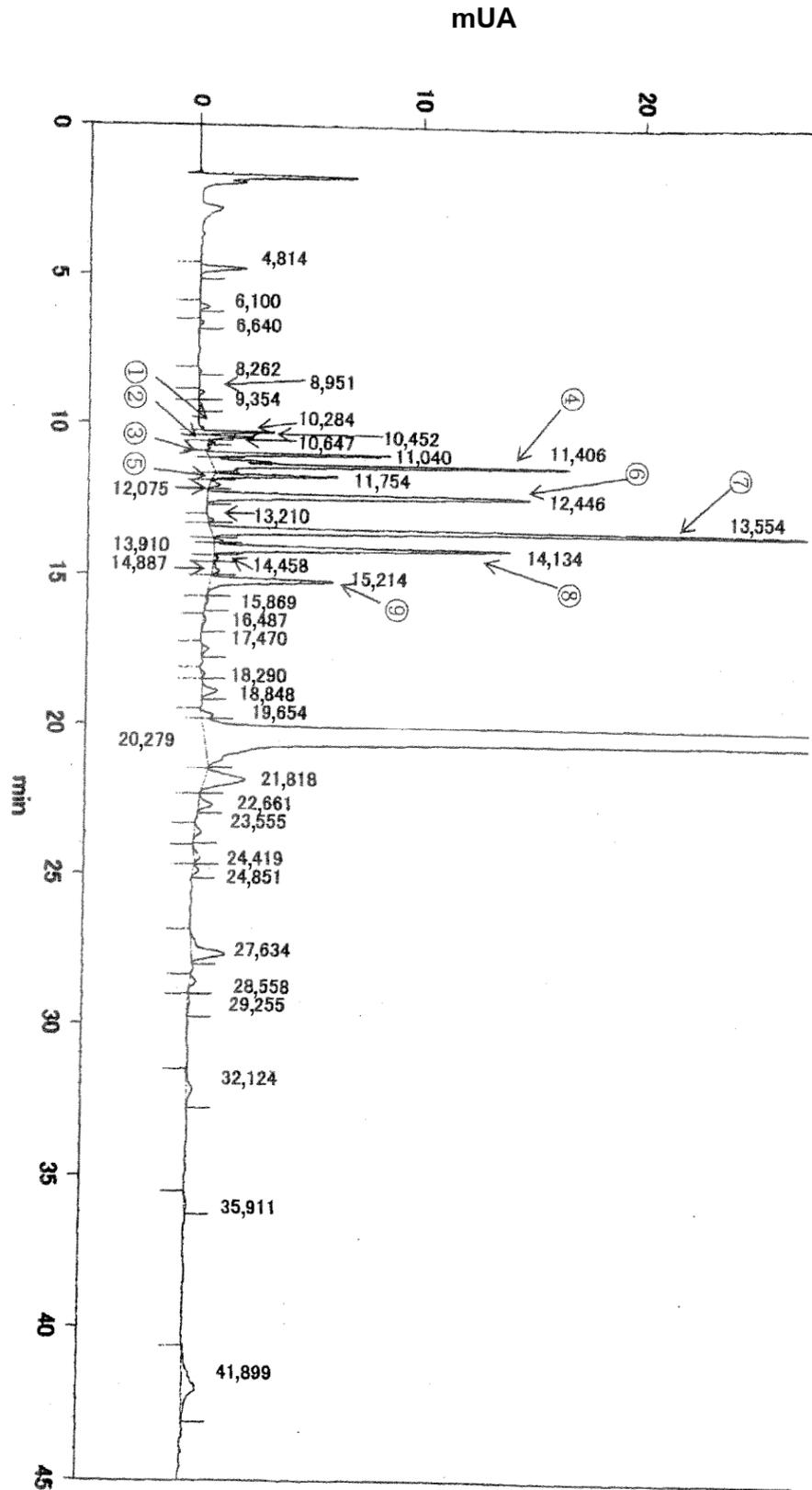
[Figura 1]



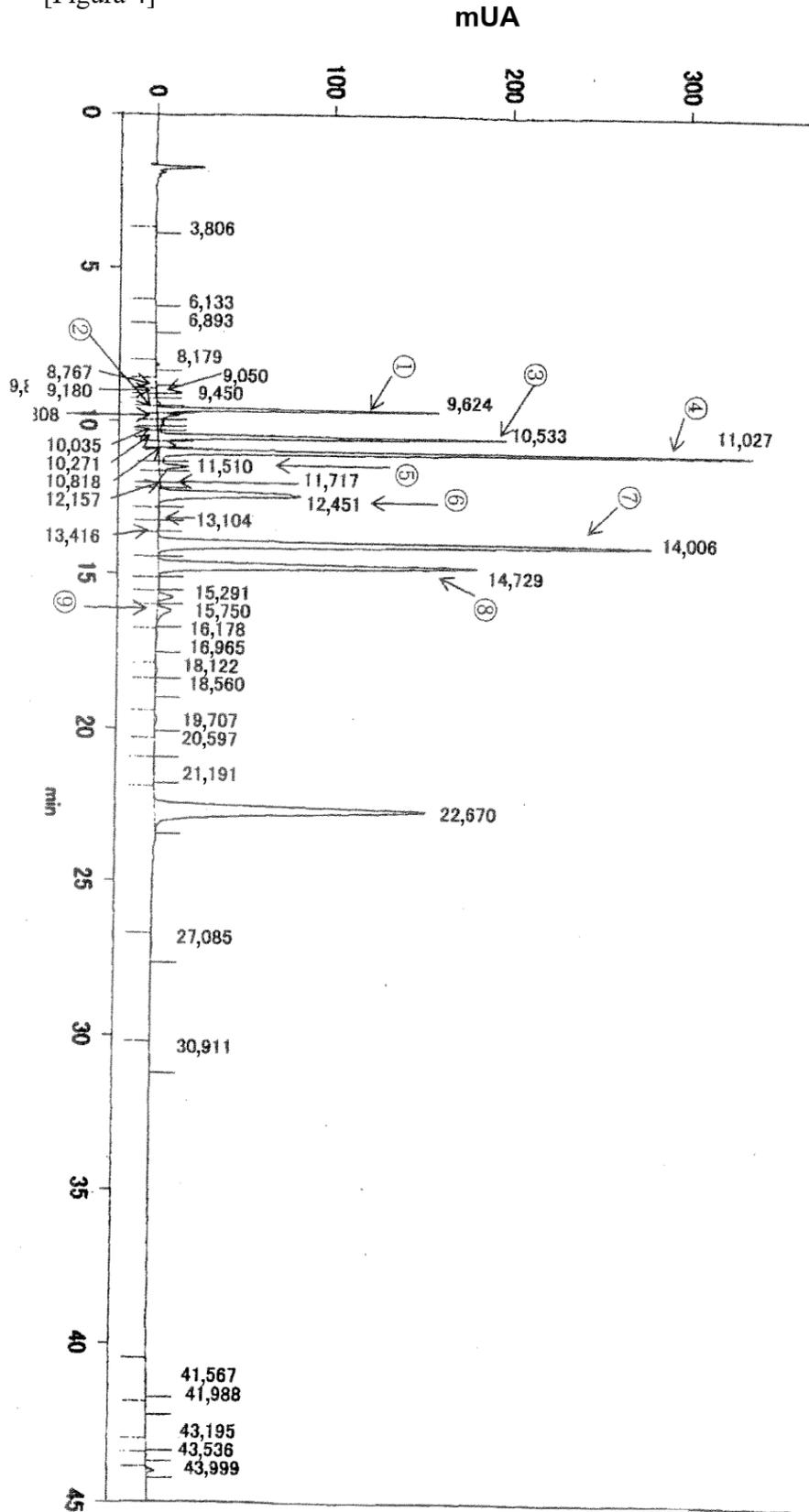
[Figura 2]



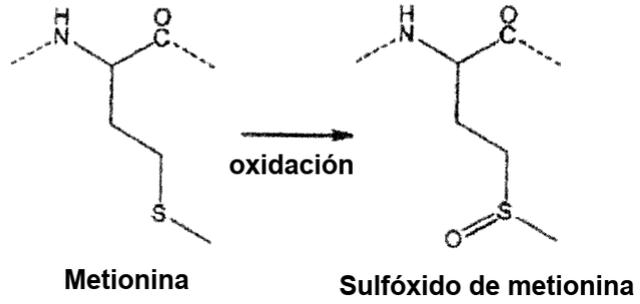
[Figura 3]



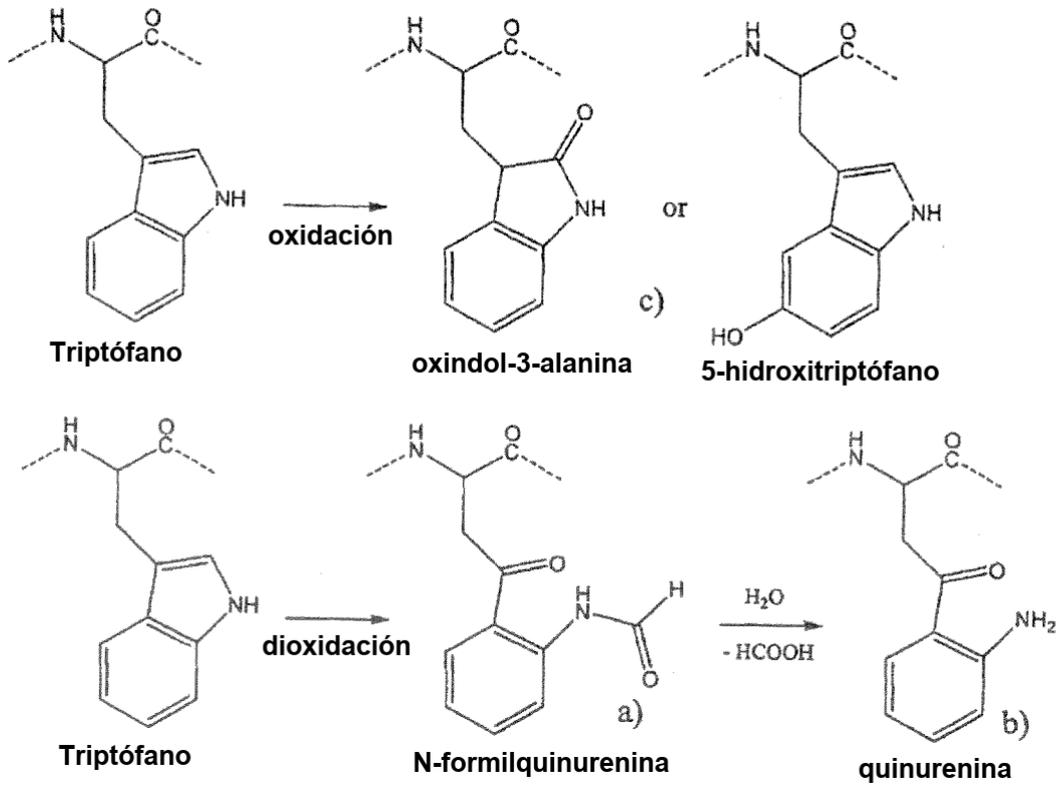
[Figura 4]



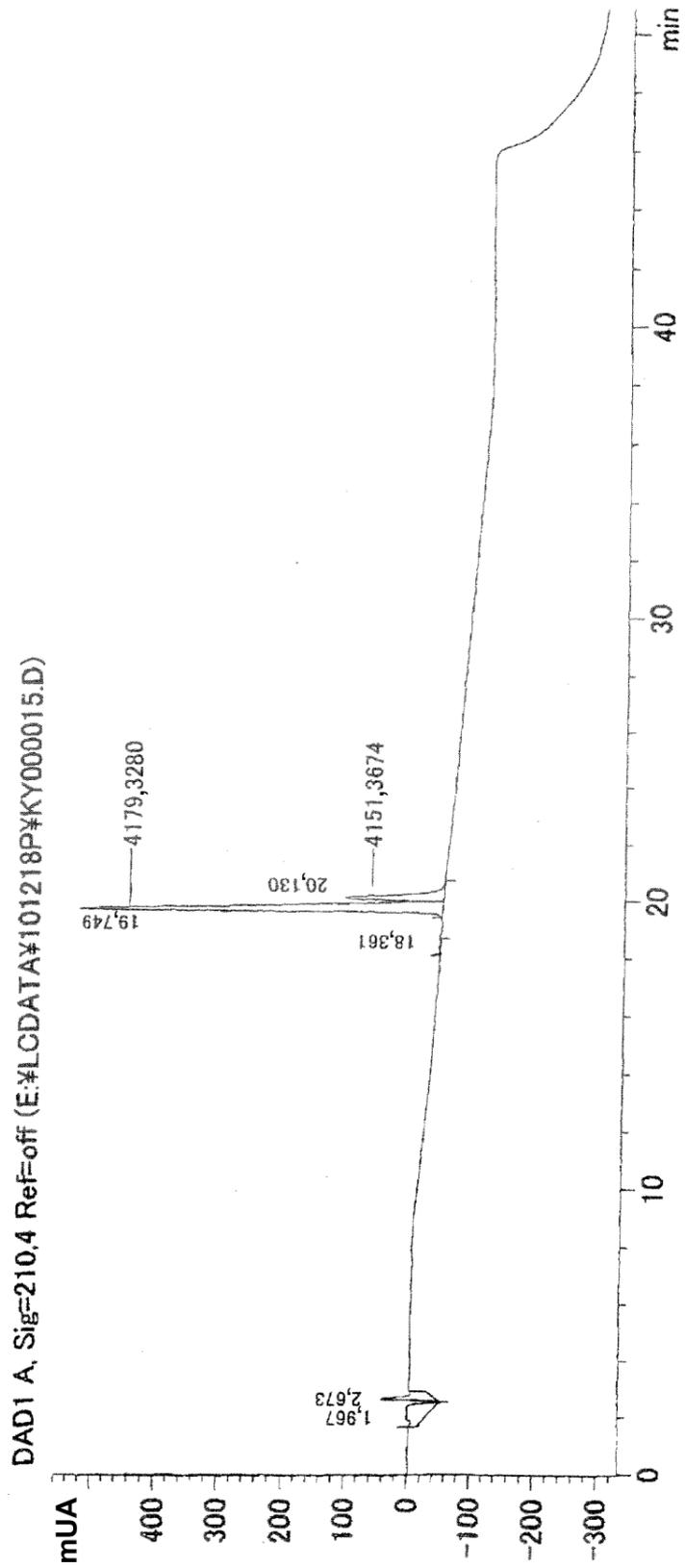
[Figura 5]



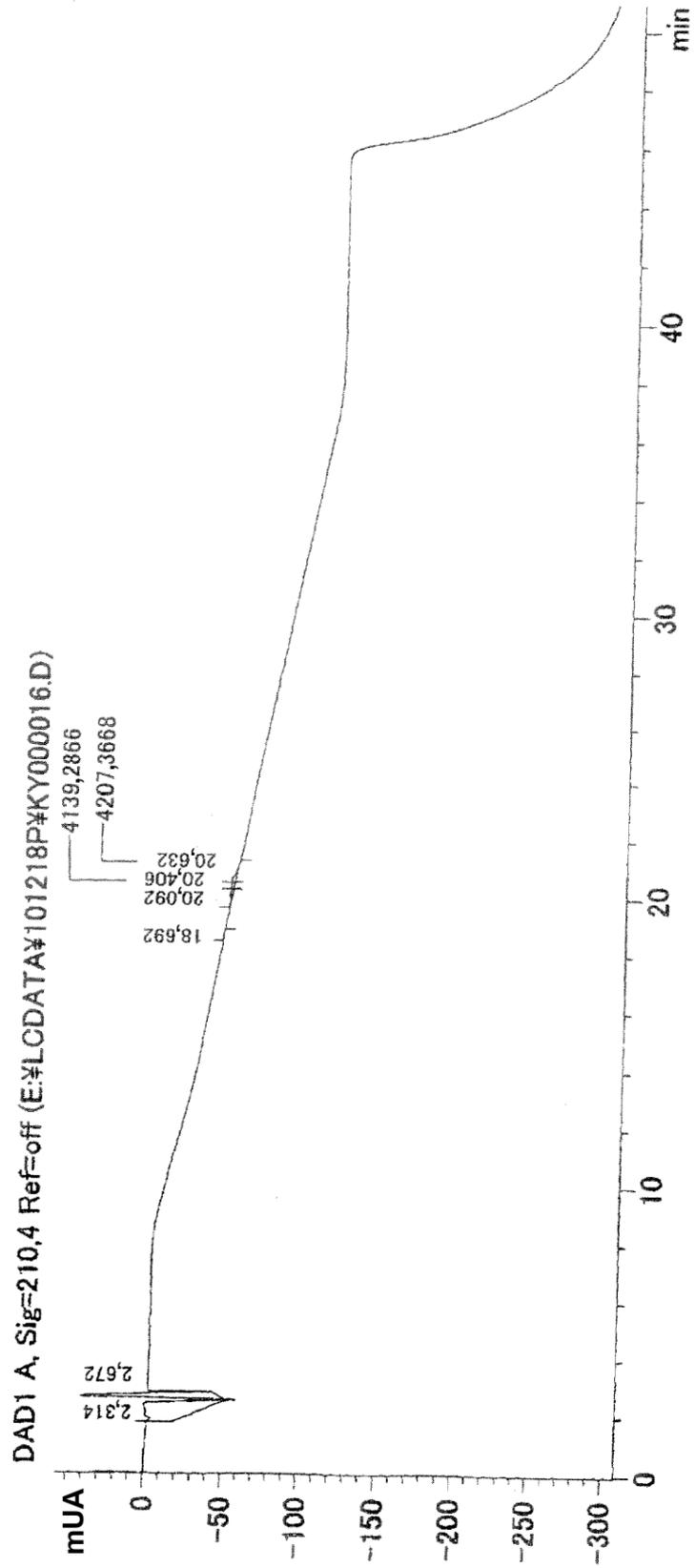
[Figura 6]



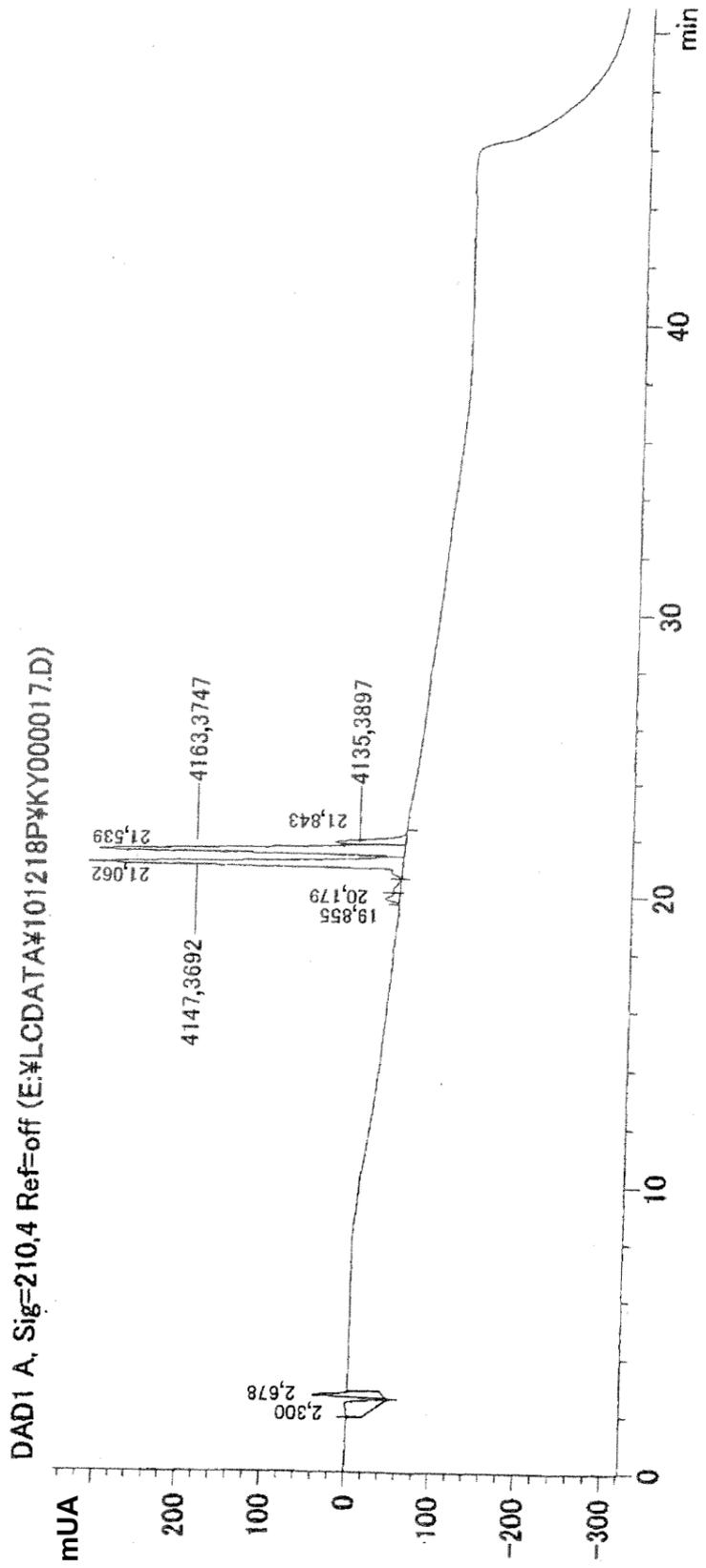
[Figura 7]



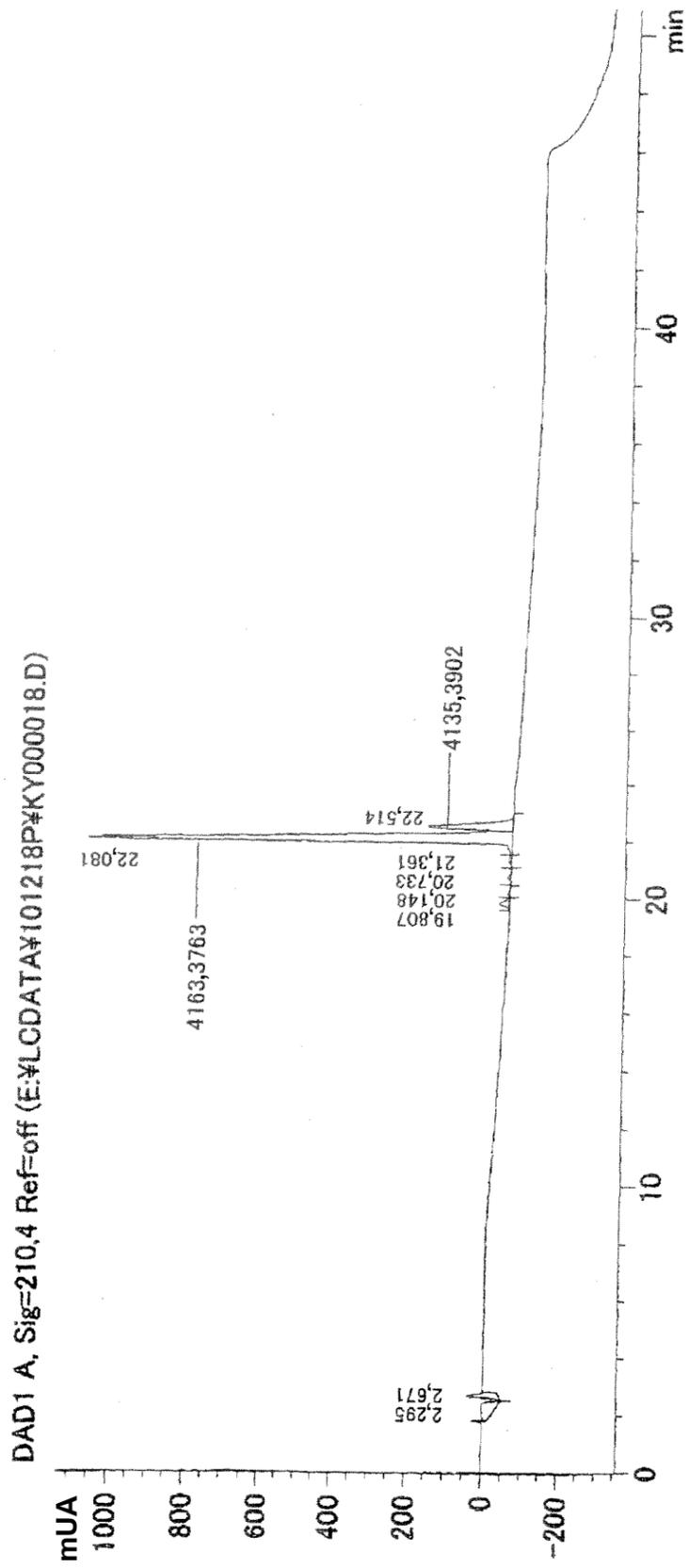
[Figura 8]



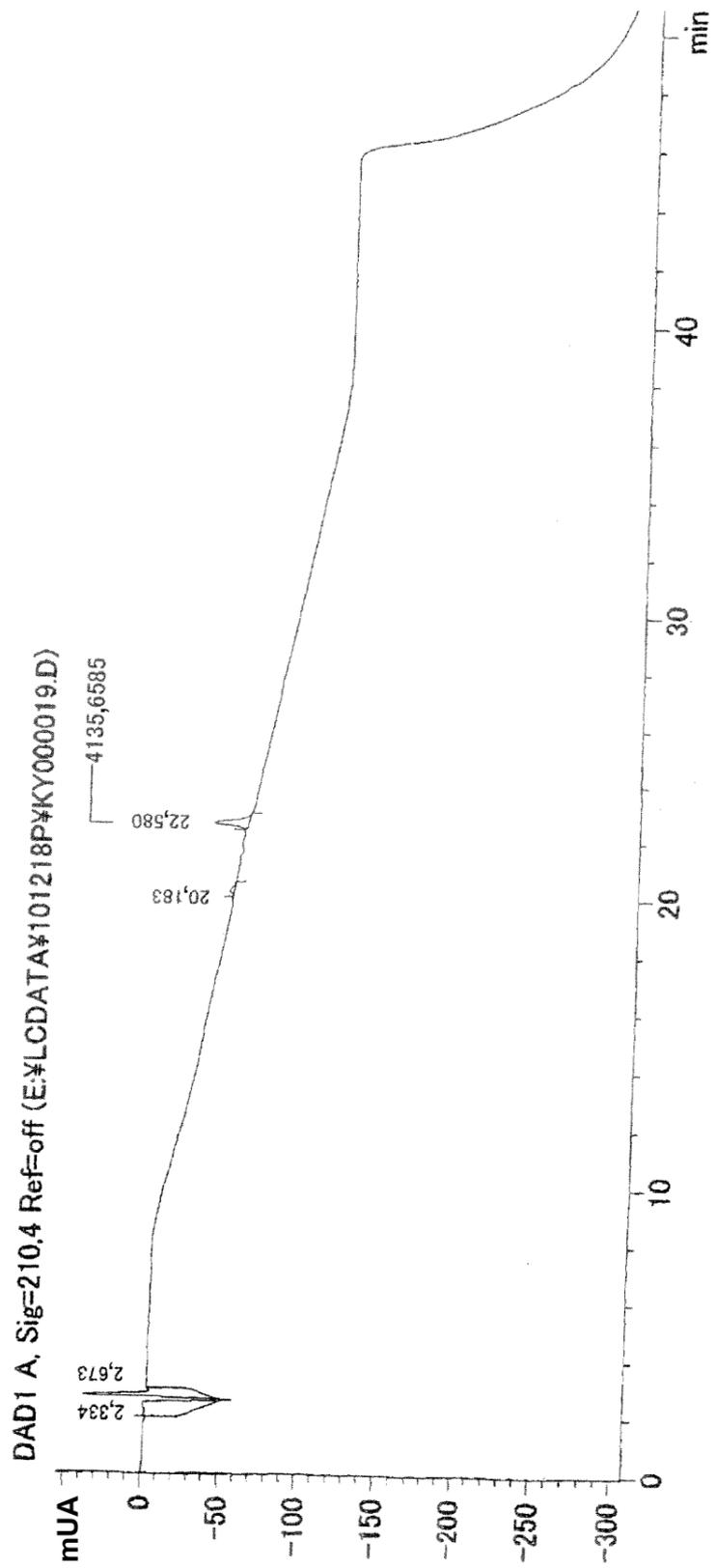
[Figura 9]



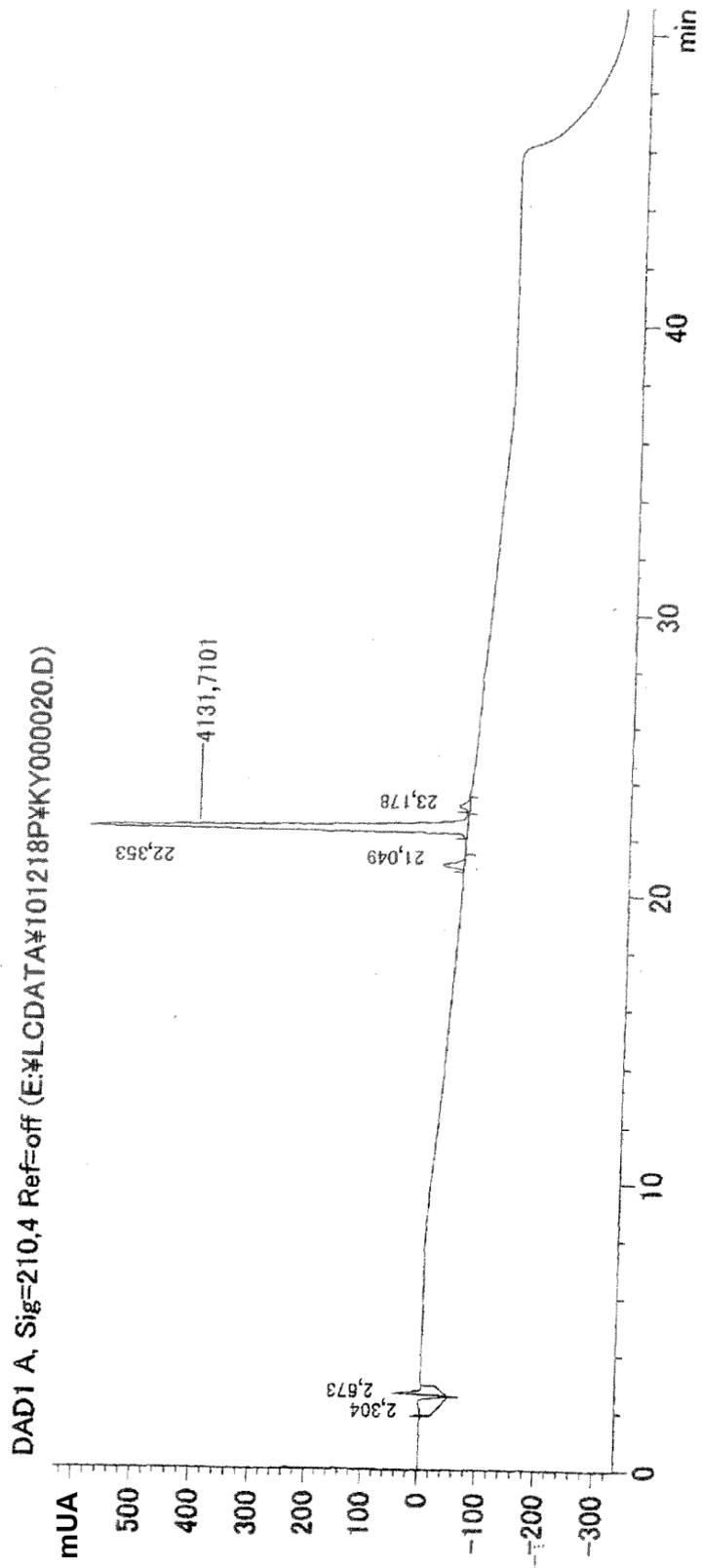
[Figura 10]



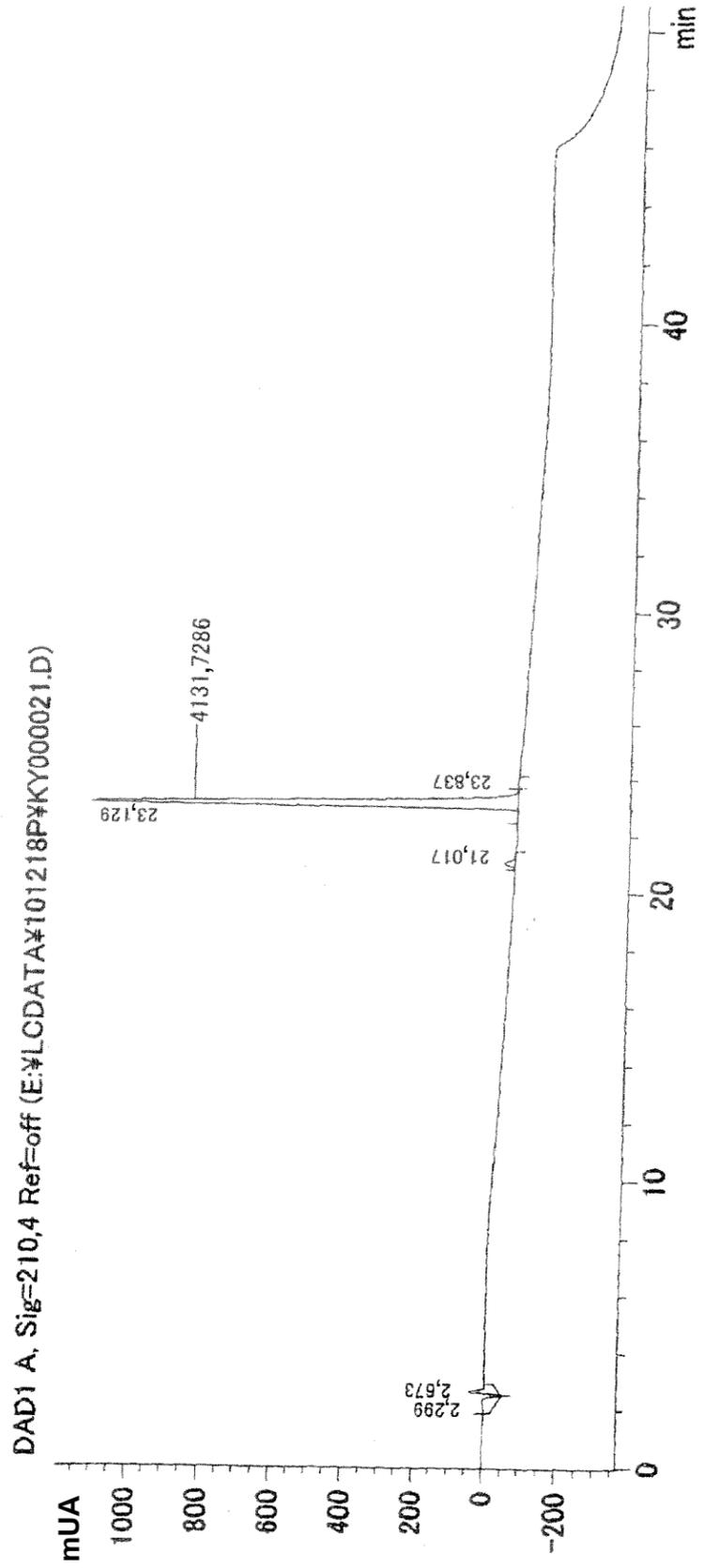
[Figura 11]



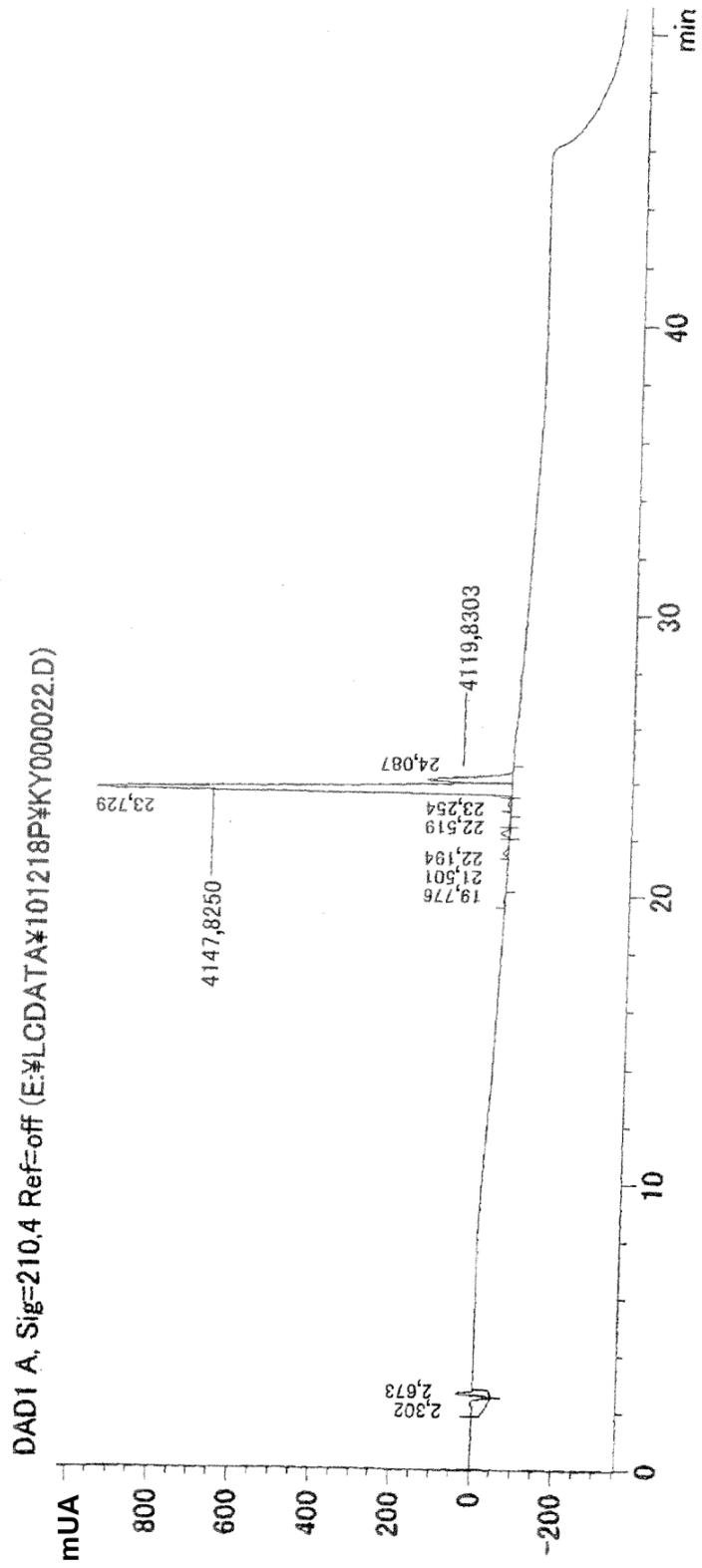
[Figura 12]



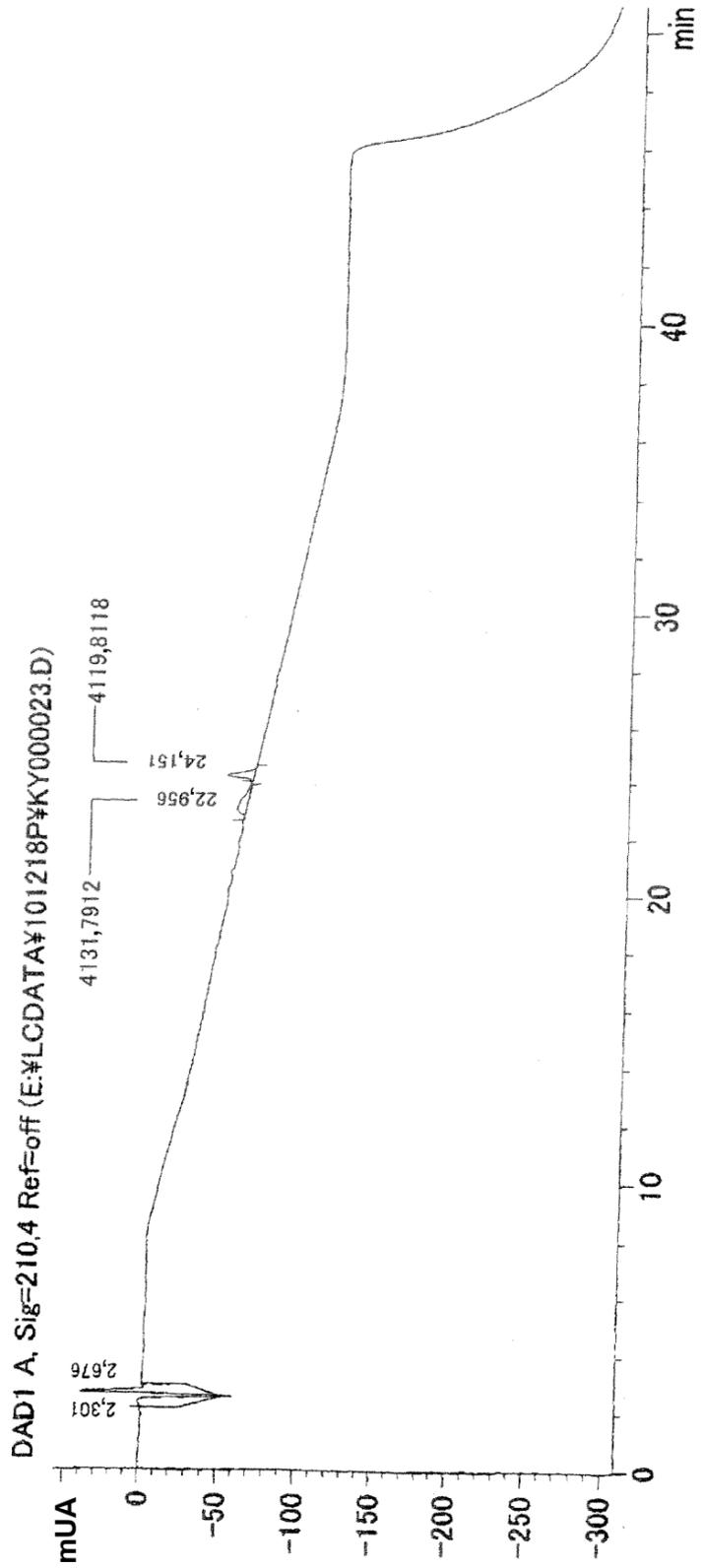
[Figura 13]



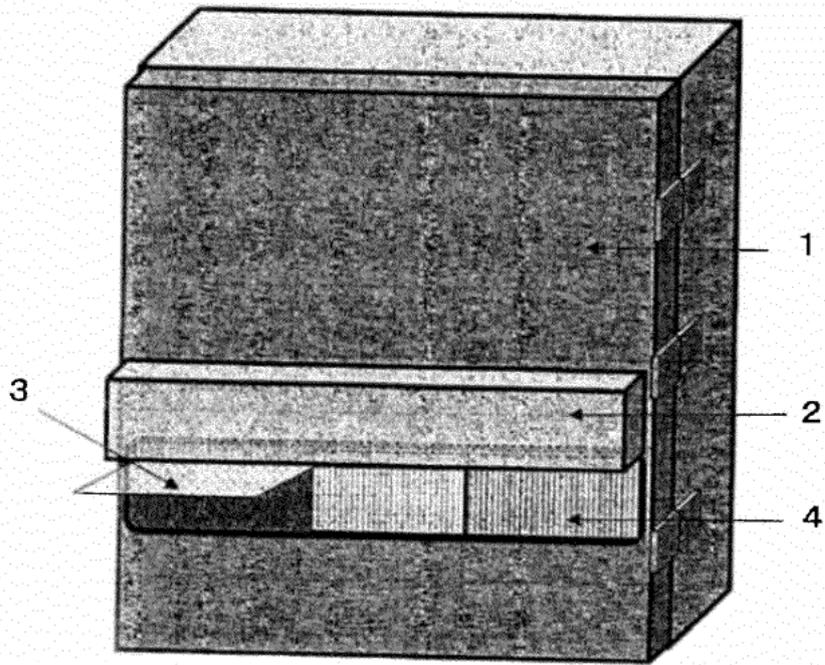
[Figura 14]



[Figura 15]



[Figura 16]



[Figura 17]

