



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **178687**

(13) **B**

(51) Int Cl<sup>6</sup> **A 61 K 38/18**

// **A 61 K 33:14, 31:195, 31:17**

## Styret for det industrielle rettsvern

---

(21) Søknadsnr	883926	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	02.09.88	(85) Videreføringssdag	
(24) Løpedag	02.09.88	(30) Prioritet	05.09.87, DE, 3729863
(41) Alm. tilgj.	06.03.89		
(44) Utlegningsdato	05.02.96		

(71) Patentsøker	Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim, DE
(72) Oppfinner	Heinrich Woog, Laudenbach, DE Werner Gruber, Birkenau, DE Hans-Jörg Markl, Ellerstadt, DE Fritz Demmer, Hirschberg-Leutershausen, DE
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Oslo

---

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av forenlige, lagringsstabile erythropoietinpreparater**

(56) **Anførte publikasjoner** EP 178665

(57) **Sammendrag** Fremgangsmåte for fremstilling av forenlige, lagringsstabile humanproteinpreparater som inneholder et humanprotein, særlig erythropoietin, fysiologisk forenlig buffer samt eventuelt kompleksdanner, isotoni-innstillende middel, kalsiumklorid og andre vanlige stoffer for injeksjonsformål. Først fremstilles en oppløsning av 5 - 50 g/l urea, 1 - 50 g/l aminosyre og 0,05 - 5 g/l ikke-ionogent fuktemiddel, til denne oppløsning tilsettes vanlige hjelpestoffer og deretter tilblandes humanproteinet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av forenlige, lagringsstabile erythropoietinpreparater.

Erythropoietin (EPO) er et glycoprotein som stimulerer dannelsen av hemoglobin henholdsvis erythrocytter i benmargen. Dette lipoprotein dannes hovedsakelig i nyrene, befinner seg i svært små mengder i serum og utskilles delvis under fysiologiske betingelser i urinen.

Mangel på EPO ved nyreinsuffisiens fører med seg en renal anemi. Ved tilførsel av EPO i fysiologiske mengder, dvs. noen mikrogram, i én eller flere doseringer, kan dannelsen av erythrocytter i slike tilfeller igjen settes i gang. Ettersom kroppen reagerer følsomt allerede på små doseendringer, må doseringen være nøyaktig reproducerbar. Vanligvis injiseres EPO som vandig oppløsning, enten i.m. eller i.v., eller tilføres over neseslimhinnen som spray.

Det er dog kjent at EPO, og da både det produkt som først og fremst utvinnes fra humanurin (Miyake et al., Biol. Chem. Vol. 25, 5558-5564 1977) og også de genteknologisk frembragte produkter (WO 85-02610) ikke er stabile i vandig oppløsning, og at det selv ved en oppbevaring ved  $-80^{\circ}\text{C}$  opptrer store aktivitetstap. Disse to produktene adskiller seg noe fra hverandre i glycosyleringsmønsteret og i aktiviteten, idet en direkte sammenligning med den EPO som finnes i serumet hittil ikke er kjent.

Disse aktivitetstap kan på den ene side tilbakeføres til en forstyrrelse av EPO gjennom katalytisk virkning fra overflaten på de ampuller som tjener til oppbevaring, gjennom spor av tungmetaller, luftoxygen, etc., men på den annen side også gjennom en festing av EPO-molekyler til beholderveggen, hvorved også en delvis denaturering kan inntre. Ettersom det, som nevnt ovenfor, i hver doseringsenhet bare finnes noen få mikrogram, kan tapet gjennom adsorpsjon være betydelig allerede etter kort oppbevaringstid.

I EP-A 178 576 er det derfor blitt beskrevet hvordan denne festing til beholderveggen kan inhiberes gjennom tilsetning av polymere forbindelser, som human- eller storfe-serumalbumin, lecithin, dextran, cellulose, polyethylen-

- glycol, etc., og hvorved det oppnåes en gjenfinning av EPO på 75 - 98% etter ca. 2 timers lagring ved 20°C, i forhold til bare 16% uten slik tilsetning. Derved ble riktignok bare gjenfinningen av en radioaktiv markør (<sup>14</sup>C) målt, slik at forsøket ikke sier noenting om stabiliseringen av EPO mot nedbrytning.

Ifølge våre funn oppnåes imidlertid ikke en langtidsstabilisering med slike midler, dvs. at EPO-aktiviteten i mustesten avtar sterkt, og dessuten kan disse midler fremkalle immunogene reaksjoner ved injeksjonen.

Fra EP-A 178 665 er det videre kjent "stabilisatorer", særlig for frysetørkede EPO-preparater. Ved siden av de polymere stoffene PEG 4000, gelatin og dextran 40, er det nevnt forskjellige sukkere og sukkeralkoholer, aminosyrer, uorganiske salter og thiolforbindelser. Blandinger av disse stoffene med humanserumalbumin, gelatin og dextran er like-  
så nevnt. Også i dette litteratursted bestemmes bare gjenfinningen av radioaktivitet etter 2 måneders lagring av de frysetørkede produkter. Denne er angitt til å være 87 - 99%, i motsetning til 60% uten tilsetning. Etersom det lyofiliserte materiale benyttes som standard direkte etter fremstillingen, er det ikke angitt hvor høyt aktivitetstapet ved fremstillingen av preparatet er. Også disse preparatene oppviser et høyt virkningstap i mustesten.

Således var oppgaven å finne frem til et godt forenlig EPO-preparat som er lagerstabil, dvs. bevarer aktiviteten in vivo, ikke fører til adsorpsjon på ampulle- eller sprøyteveggene og lett kan bringes i en injiserbar form.

På overraskende måte ble denne oppgave løst gjennom fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av forenlig, lagringsstabile erythropoietinpreparater som inneholder erythropoietin, fysiologisk forenlig buffer samt eventuelt kompleksdanner, isotoni-innstillende middel, kalsiumklorid og andre stoffer som er vanlige for injeksjonsformål, som er kjennetegnet ved at man først fremstiller en oppløsning av 5-50 g/l urea, 1-50 g/l aminosyre og 0,05-5 g/l ikke-ionogent fuktemiddel, tilsetter vanlige hjelpestoffer til denne oppløsning og deretter tilblender erythropoietinet. Som våre forsøk

har vist, har de enkelte stoffene ikke disse egenskaper, eller bare i mindre omfang.

Avgjørende for stabiliseringen er tilsetningen av urea og forskjellige aminosyrer. Urea tilsettes i 5 - 50 g/liter, fortrinnsvis 10 - 15 g/liter. Som aminosyrer nevnes eksempelvis L-glycin, alanin, arginin, L-leucin, L-isoleucin, 2-fenylalanin, glutaminsyre eller L-threonin. Blandinger av de forskjellige aminosyrer synes å ha en særlig fordelaktig effekt. Disse tilsettes i mengder på 0,5 - 50 g/liter, fortrinnsvis 1 - 20 g/liter, idet totalmengden fortrinnsvis skal utgjøre 5 - 25 g/liter.

Videre er en fysiologisk forenlig buffer nødvendig, som i de for injeksjonsoppløsninger nødvendige lave konsentrasjoner (ca. 20 - 100 mmol/liter) innstiller det for EPO nødvendige pH-område på 6,5 - 7,4, særlig 7,0 - 7,2. Foruten fosfatbufferer er også glycinat, carbonat, citrat og andre brukbare, idet foruten natriumion, også kalium- eller ammoniumioner kan tjene som motion. En bufning bevirkes i tillegg gjennom de tilstedeværende aminosyrer.

Festing av EPO til ampulleveggene og sprøytene nedsettes vesentlig gjennom tilsetning av små mengder av en detergent. Eppersom preparatet i overveiende grad skal injiseres, må dette stoffet være fysiologisk, særlig i.v., akseptabelt. Konsentrasjoner på 0,05 - 5 g/liter, særlig 0,1 - 0,5 g, har hevdet seg. Ikke-ionogene fuktemidler, som de forskjellige poly-makrogol-typer, særlig polyethylensorbitanlaurat ("Tween 20 eller 80") eller sorbitantrioleat ("Span 35 eller 80") eller glycerol-oleylsyrepolyglycoether ("Labrafil"), har vist seg fordelaktig for dette formål, andre akseptable stoffer kan imidlertid på samme måte anvendes.

For å forminske innflytelsen av tungmetallioner, som helt uunngåelig slipper til ved opparbeidelsen, f.eks. fra de anvendte metallapparater, på EPO, har det videre vist seg fordelaktig å tilsette oppløsningen 0,01 - 5 g/liter av et oppløselig kalsiumsalt, fortrinnsvis 0,02 - 0,2 g/liter kalsiumklorid. Andre fysiologisk akseptable kompleksdannere, f.eks. citrat, EDTA, NTA, panthotenat, kan likeså tilsettes.

Som oppløsningsmiddel anvendes rent vann for injeksjons-

formål, som tilsettes 0,5 - 10 g/liter natriumklorid eller tilsvarende stoffer, som mannitol, sorbitol, etc., for innstilling av isotonisiteten.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen oppløses alle hjelpestoffer i den nødvendige mengde vann, EPO-preparatet, som skal ha en aktivitet på ca. 100.000 til 200.000 enheter/milligram protein, tilblandes, det sterilfiltreres i passende ampuller, nedfryses og lyofiliseres skånsomt ved lave temperaturer. De erholdte preparater er holdbare under nitrogen i 2 år ved 0°C, og i 1 år ved værelsetemperatur. Ved rekondisjonering med vann oppløses de i løpet av få sekunder uten å bli turbide, og kan så injiseres enten direkte intravenøst eller intramuskulært, eller innsprøytes etter fortykning med isotone oppløsninger (f.eks. koksaltoppløsning).

Nedfrysingsprosessen har en særlig betydning. Hjelpstoffene utvelges med hensyn til type og mengde slik at det autektiske punkt for oppløsningen som skal nedfryses, ligger mellom -50 og -30°C. Ved hjelp av et datamaskinstyrt optimaliseringsprogram, kom man frem til de følgende optimale betingelser for de 3 lyofiliseringsfasene:

Innfrysningstid: 12 - 14 timer ved - 40°C

Hovedtørking: Saltoppløsningstemperatur +10°C, trykk 10<sup>-1</sup> mbar, tid 48 - 60 timer

Ettertørking: Saltoppløsningstemperatur +20°C, trykk 10<sup>-3</sup> mbar, tid 4 - 6 timer.

Her er det vesentlig, ved hjelp av en  $\Delta p$ -måleinnretning, samt en konduktivitetmåling, å bedømme når hovedtørkingen er avsluttet, slik at produktet som skal lyofiliseres ikke oppvarmes for hurtig og en opptining av den nedfryste oppløsning og det dermed forbundne aktivitetstap unngås.

De tilsatte hjelpestoffer er utvalgt slik at det fås en ensartet strukturert tilstand hos lyofiliserende islegemer, og at det under lyofiliseringen fås en porøs struktur (kake) hvorfra en optimal sublimasjon av is er mulig, fremfor alt også mot slutten av hovedtørkingen. Etter-

tørkingen skjer som nevnt ovenfor ved bare +20°C og i løpet av 4 - 6 timer. Denne skånsomme behandling er viktig ettersom det ellers skjer et tap av aktivitet hos det lyofiliserende materiale.

5 Som regel har det således lyofiliserte produktet vanninnhold på ca. 2 - 5% etter Karl Fischer. Dette restvanninnhold avhenger av type og mengde av hjelpestoffer som er tatt med i den angjeldende oppskrift.

De vandige oppløsninger av stabilisert EPO kan også  
10 fylles direkte i ampuller og uten lyofilisering bringes i handelen som bruksverdig form. Holdbarheten forkortes imidlertid derved med ca. 1 år ved 0°C og noen måneder ved værelsetemperatur i forhold til lyofilisatet.

Eksemplene nedenunder skal belyse det ovenfor beskrevne  
15 nærmere:

#### Eksempel 1

#### Erythropoietin 2000 enheter injeksjonstørrstoff

(blanding for 35.000 flasker)

20 Hjelpestoffene ble oppløst i en steril 100 liter V2A-dobbelmantelbeholder forsynt med røreverk:

	Urea	700,0 g
	Natriumklorid	70,0 g
25	Tween 20	7,0 g
	Natriumdihydrogenfosfat x 1H <sub>2</sub> O	38,4 g
	Dinatriumhydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	350,0 g
	Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	8,4 g
	L-glycin	105,0 g
30	L-leucin	140,0 g
	L-iso-leucin	140,0 g
	L-threonin	35,0 g
	L-glutaminsyre	35,0 g
	L-fenylalanin	70,0 g
35	Vann for injeksjonsformål	70,0 l

Til 30 l av denne hjelpestoffoppløsning ble 214,3 ml av et erythropoietin- råstoffparti med en EPO-titer på

140.000 enheter/liter ml tilsatt og fylt opp til sluttvolumet på 35 l, og grundig omrørt. Filtreringssystemet ble spylt med den gjenværende hjelpestoffoppløsning. Oppløsningen av blandingen ble sterilfiltrert over et membranfilter med 0,2 µm porebredde. Den sterilfiltrerte oppløsning ble fylt på 1 ml injeksjonsflasker under aseptiske betingelser og frysetørket under følgende kriterier i et lyofiliseringsanlegg:

Innfrysningstid: 12 - 14 timer ved  $-40^{\circ}\text{C}$

10 Hovedtørking: Saltoppløsningstemperatur  $+10^{\circ}\text{C}$ , trykk  $10^{-1}$  mbar, tid 48 - 60 timer

Ettertørking: Saltoppløsningstemperatur  $+20^{\circ}\text{C}$ , trykk  $10^{-3}$  mbar, tid 4 - 6 timer.

15 Det ble derved erholdt et voluminøst, åpenporet injeksjonstørrstoff som er holdbart i minst 2 år i kjøleskap og 1 år ved værelsetemperatur, og som oppløses i løpet av noen timer i 2 ml vann for injeksjonsformål uten uklarhetsdannelse og fri for partikler.

20 Eksempel 2

Erythropoietin-lyofilisat 200 enheter

(Blanding for 35.000 flasker)

Erythropoietin	46,7 ml = 7 Mio-enheter
Natriumklorid	100,0 g
25 Tween 20	10,0 g
Natriumdihydrogenfosfat x $1\text{H}_2\text{O}$	155,0 g
Dinatriumhydrogenfosfat x $2\text{H}_2\text{O}$	500,0 g
Kalsiumklorid x $2\text{H}_2\text{O}$	10,0 g
Urea	1000,0 g
30 L-leucin	150,0 g
L-threonin	120,0 g
Fenylalanin	165,0 g
Vann for injeksjonsformål	70,0 l

35 Hjelpestoffene ble oppløst i 70 l vann for injeksjonsformål og deretter oppdelt i to porsjoner à 35 l ble tilsatt den nødvendige mengde EPO-aktivstoff. De andre 35 l ble anvendt til spyling av filtreringssystemet. Oppløsningen

- av blandingen ble sterilfiltrert over et membranfilter med 0,2 µm porebredde. Den sterilfiltrerte oppløsning ble fylt i 1 ml injeksjonsflasker under aseptiske betingelser, og lyofilisert under de samme kriterier som angitt i eksempel 1.
- 5 Det ble erholdt et hvitt, porøst, i 2 ml vann godt oppløselig lyofilisat som kan lagres i 2 år i kjøleskap eller 1 år ved værelsetemperatur uten store aktivitetstap.

### Eksempel 3

#### 10 Erythropoietin-lyofilisat 1000 enheter

(Blanding for 35.000 flasker)

Erythropoietin	233,33 ml = 35 Mio-enheter
Natriumklorid	100,0 g
Tween 20	12,0 g
15 Natriumdihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	140,0 g
Dinatriumhydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	450,0 g
Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	10,0 g
Urea	700,0 g
L-glycin	1050,0 g
20 L-leucin	92,0 g
Glutaminsyre	103,0 g
Fenylalanin	115,5 g
Vann for injeksjonsformål	70,0 l

- 25 Hjelpstoffene ble oppløst i 70 l vann for injeksjonsformål, og deretter oppdelt i to porsjoner à 35 l. De første 35 l ble tilsatt den nødvendige mengde EPO-aktivstoff. De andre 35 l ble anvendt til spyling av filtreringssystemet. Oppløsningen av blandingen ble sterilfiltrert over et membranfilter med 0,2 µm porestørrelse. Den sterilfiltrerte oppløsning ble fylt i 1 ml injeksjonsflasker under aseptiske betingelser og lyofilisert under de samme kriterier som angitt i eksempel 1. Det ble derved erholdt et hvitt, porøst, i 2 ml vann godt oppløselig lyofilisat som kan lagres i 2 år
- 35 i kjøleskap eller 1 år ved værelsetemperatur uten store aktivitetstap.

Eksempel 4Erythropoietin-lyofilisat 500 enheter

(Blanding for 35.000 flasker)

	Erythropoietin	116,67 ml = 17,5 Mio-enheter
5	Natriumklorid	70,0 g
	Tween 20	7,0 g
	Natriumdihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	38,5 g
	Dinatriumhydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	490,0 g
	Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	5,6 g
10	Urea	840,0 g
	L-leucin	92,4 g
	Glutaminsyre	105,0 g
	Fenylalanin	119,0 g
	Vann for injeksjonsformål	70,1 l

15

Hjelpestoffene ble oppløst i 70 l vann for injeksjonsformål og deretter oppdelt i to porsjoner à 35 l. De første 35 l ble tilsatt den nødvendige mengde EPO-aktivstoff. De andre 35 l ble anvendt til spyling av filtreringssystemet.

20 Oppløsningen av blandingen ble sterilfiltrert over et membranfilter med 0,2 µm porestørrelse. Den sterilfiltrerte oppløsning ble fylt i 1 ml injeksjonsflasker under aseptiske betingelser, og lyofilisert under de samme kriterier som angitt i eksempel 1. Det ble derved erholdt et hvitt, porøst,

25 i 2 ml vann godt oppløselig lyofilisat som kan lagres i 2 år i kjøleskap eller 1 år ved værelsetemperatur uten store aktivitetstap.

Eksempel 530 Erythropoietin-lyofilisat 750 enheter

(Blanding for 35.000 flasker)

	Erythropoietin	175,0 ml = 26,25 Mio-enheter
	Natriumklorid	100,0 g
	Tween 20	12,0 g
35	Natriumdihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	140,0 g
	Dinatriumhydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	450,0 g
	Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	10,0 g
	L-glycin	1250,0 g

L-isoleucin	98,0 g
Glutaminsyre	130,0 g
Fenylalanin	145,0 g
Vann for injeksjonsformål	70,0 g

5

Hjelpestoffene ble oppløst i 70 l vann for injeksjonsformål, og deretter oppdelt i to porsjoner à 35 liter. De første 35 l ble tilsatt den nødvendige mengde EPO-aktivstoff. De andre 35 l ble anvendt til spyling av filtreringssystemet.

10 Oppløsningen av blandingen ble sterilfiltrert over et membranfilter med 0,2 µm porestørrelse. Den sterilfiltrerte oppløsning ble fylt i 1 ml injeksjonsflasker under aseptiske betingelser, og lyofilisert under de samme kriterier som angitt i eksempel 1. Det ble derved erholdt et hvitt, porøst, 15 i 2 ml vann godt oppløselig lyofilisat som kan lagres i 2 år i kjøleskap eller 1 år ved værelsetemperatur uten store aktivitetstap.

#### Eksempel 6

20 For å teste virkningen av forskjellige stabiliseringsmidler, ble en standard oppskrift med 1000 enheter EPO/ml som inneholdt urea som hovedstabiliseringsmiddel, tilsatt polyvinylpyrrolidon/protein henholdsvis forskjellige aminosyrer, og produktet ble lyofilisert. Resultatene er opp- 25 summert i tabell 1.

Stabiliteten til EPO ble bestemt etter 6 ukers lagring av lyofilisatet ved 35°C, henholdsvis 0°C, i musemilttesten etter forskriften til G. Krystal i Exp. Hematol. 11, 649-660 (1983), som følger:

30 B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub>-mus, hunkjønn, vekt ca. 20 g (Zentralinstitut für Versuchstierkunde, Hannover) ble injisert på to på hverandre følgende dager med 60 ml/kg fenylhydrazinhydroklorid i.p. Etter tre ytterligere dager ble milten tatt ut, miltcellene ble oppslemmet i sterilt komplettmedium (Dulbecco 35 modifisert Eagle's medium + 584,0 mg/l L-glutamin + 0,1 mmol/l 2-mercaptoethanol + 20% kalvefosterserum) og fortynnet til 4 x 10<sup>6</sup> kjerneholdige celler/ml. Suspensjonen, som på forhånd ble tilsatt teststoffet, henholdsvis EPO-standarden,

i de passende konsentrasjoner oppløst i BSA-buffer, ble fordelt på mikrotiterplater (0,2 ml/fordypning). Etter inkubasjon (22 timer, 37°C, luft +15% CO<sub>2</sub>) ble 20 µl <sup>3</sup>H-methyl-thymidin-oppløsning med 1 µCi tilsatt pr. fordypning og inkubert i nye 2 timer ved 37°C. Deretter ble innholdet overført ved hjelp av en celle-innhøster og vasket med destillert vann. Opptaket av <sup>3</sup>H-thymidin ble bestemt med en β-scintillasjonsteller og evaluert mot standardpreperatet.

Som arbeidsstandard ble "P009-EPO-standarden" fra Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts, USA, som inneholder 112 enheter EPO/ml (og 503 ng protein/ml) (avstemt mot EPO-referansestandarden til WHO "International Reference Preparation of erythropoietin, Human, Urinary for Bioassay (2. I.R.P., opprettet 1971)"), anvendt. Standardkonsentrasjonene lå i området 10 - 100 mU/ml.

Lyofilisatene som skulle testes for sin EPO-aktivitet ble deretter oppløst i 2 ml vann pr. ampulle for injeksjonsformål, den videre fortykning skjedde, likeens som ved arbeidsstandarden, med BSA-buffer (8,75 g NaCl, 1,95 g CaCl x 2H<sub>2</sub>O, 1,00 g BSA (bovint serumalbumin), vann for injeksjonsformål ad 1 liter). <sup>3</sup>H-methyl-thymidin (spesifikk aktivitet: 2 Ci/mmol) ble erholdt fra New England Nuclear.

#### Eksempel 7

På lignende måte som i eksempel 6 ble en noe forandret hovedoppskrift tilsatt urea og forskjellige aminosyrer, henholdsvis blandinger av aminosyrer. For sammenligning ble to mannitol-holdige oppskrifter, som svarer til EP 178 665, også testet. Resultatene er oppsummert i tabell 2.

Tabell 1

Sammensetning mg/flaske	1 819892 G	a 819893 H	b 819894 I	ab 819895 K
5 Erythropoietin	1000 U	1000 U	1000 U	1000 U
Urea	10,0	10,0	10,0	10,0
Natriumklorid	9,0	4,0	9,0	1,0
10 Tween 20	0,1	0,1	0,1	0,1
Na-dihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	0,55	0,55	0,55	0,55
Di-Na-hydrogen- fosfat x 2H <sub>2</sub> O	5,0	5,0	5,0	5,0
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	0,08	0,08
15 Kollidon 12 PF	5,0	—	5,0	—
Gelafundin	1,0	1,0	—	—
L-glycin	—	15,0	—	15,0
20 L-leucin	—	—	2,0	2,0
L-isoleucin	—	—	2,0	2,0
L-threonin	—	—	0,5	0,5
L-glutaminsyre	—	—	0,5	0,5
25 L-fenylalanin	—	—	1,0	1,0
Vann	ad 1,0 ml	ad 1,0 ml	ad 1,0 ml	ad 1,0 ml
Stabilitet, 25°C	493	869	934	1128
30 Stabilitet, 0°C	985	1114	1144	1205

Tabell 2

Forsøksnr.	895	896	897	898	899	900	901	902	903
<u>Sammenstilling i mg/ml</u>									
EPO, parti: P007	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U
Natriumklorid	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tween 20	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Na-dihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Di-Na-hydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	10	-	10	-	10	-	10	-
L-glycin	15,0	-	15	-	15	-	15	-	15
L-leucin (1/100 mmolar)	-	-	1,32	1,32	-	-	1,32	1,32	-
L-isoleucin	1,32	1,32	-	-	1,32	1,32	-	-	1,32
L-threonin	-	-	-	-	1,2	1,2	1,2	1,2	-
Glutaminsyre	1,47	1,47	1,47	1,47	-	-	-	-	1,47
Fenylalanin	-	-	-	-	-	-	-	-	1,65
Arginin	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,0	1,0	-	1,0	2	2	2	2	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Vann p.i. ad	1,0 ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml
Stabilitet, 25°C	164	185	150	234	170	229	226	226	229
Stabilitet, 0°C	182	203	203	242	208	234	232	230	230

Tabell 2 (forts.)

Forsøksnr.	904	905	906	907	908	909	910	911	912
<u>Sammensetning i mg/ml</u>									
EPO, parti: P007	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U	250 U
Natriumklorid	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tween 20	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Na-dihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Di-Na-hydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	10	-	10	-	10	-	10	-	10
L-glycin	-	15	-	15	-	15	-	15	15
L-leucin (1/100 mmolar)	-	1,32	-	1,32	-	1,32	-	1,32	2
L-isoleucin	1,32	-	-	1,32	-	1,32	-	1,32	2
L-threonin	-	-	-	1,2	-	1,2	-	1,2	-
Glutaminsyre	1,47	1,47	1,47	-	-	-	-	0,5	-
Fenylalanin	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,0	-
Arginin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	1	-	1	-	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	5	7	5	-	-	-	-	-	-
Vann p.i. ad	1,0 ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml
Stabilitet, 25°C	205	221	258	205	216	171	-	256	175
Stabilitet, 0°C	167	220	291	188	210	197	240	234	218

Tabell 2 (forts.)

Forsøksnr.	982	576	575
<u>Sammenstilling i mg/ml</u>			
EPO, parti: P007	250 U	250 U	250 U
Natriumklorid	1,0	4	4
Tween 20	0,1	0,1	0,5
Na-dihydrogenfosfat x H <sub>2</sub> O	0,55	0,55	0,55
Di-Na-hydrogenfosfat x 2H <sub>2</sub> O	5,0	5,0	5,0
Kalsiumklorid x 2H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	0,08
Mannitol	-	20	30
Urea	10	-	-
L-glycin	-	10	-
L-leucin (1/100 mmolar)	-	-	-
L-isoleucin	-	-	-
L-threonin	-	-	-
Glutaminsyre	-	-	-
Fenylalanin	-	-	-
Arginin	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	-	-	-
Vann p.i. ad	1,0ml	1,0ml	1,0ml
Stabilitet, 25°C	120	134	97
Stabilitet, 0°C	195	172	178

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av forenlige, lag-  
5 ringsstabile erythropoietinpreparater som inneholder erythro-  
poietin, fysiologisk forenlig buffer samt eventuelt kompleks-  
danner, isotoni-innstillende middel, kalsiumklorid og andre  
stoffer som er vanlige for injeksjonsformål,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at man først fremstiller  
10 en oppløsning av 5-50 g/l urea, 1-50 g/l aminosyre og 0,05-  
5 g/l ikke-ionogent fuktemiddel, tilsetter vanlige hjelpe-  
stoffer til denne oppløsning og deretter tilblender erythro-  
poietinet.
- 15 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren er en  
blanding som inneholder L-glycin, L-alanin, L-arginin, L-  
leucin, L-isoleucin, L-2-fenylalanin, L-glutaminsyre og/eller  
L-threonin.
- 20 3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det som fuktemiddel  
anvendes polyethylensorbitanlaurat.
- 25 4. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-3,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet fremstilles  
i lyofilisert form.
5. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-4,  
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet fremstilles  
i flytende, sprøyteegnet form.
6. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-5,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at hver injeksjonsdose-  
35 enhet à 1-5 ml inneholder 100-1 million enheter erythro-  
poietin.
7. Fremgangsmåte for fremstilling av et erythropoietin-  
preparat ifølge et av kravene 1-6,

k a r a k t e r i s e r t v e d at hver injeksjonsdose-  
enhet à 1-5 ml inneholder 100-20.000 enheter erythropoietin.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av et erythropoietin-  
5 preparat ifølge et av kravene 1-7,

k a r a k t e r i s e r t v e d at alle hjelpestoffene  
først oppløses i vann, erythropoietinet tilsettes, blandingen  
sterilfiltreres i ampuller og lyofiliseres skånsomt ved under  
-20 °C.

10

9. Fremgangsmåte for fremstilling av et erythropoietin-  
preparat ifølge et av kravene 1-7,

k a r a k t e r i s e r t v e d at alle hjelpestoffene  
først oppløses i vann, erythropoietinet tilsettes og bland-  
15 ingen fylles i ampuller.

20

25

30

35