

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/18 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480022551.2

[43] 公开日 2006 年 9 月 13 日

[11] 公开号 CN 1832754A

[22] 申请日 2004.7.27

[21] 申请号 200480022551.2

[30] 优先权

[32] 2003.8.6 [33] KR [31] 10-2003-0054260

[86] 国际申请 PCT/KR2004/001891 2004.7.27

[87] 国际公布 WO2005/014025 英 2005.2.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.6

[71] 申请人 希杰公司

地址 韩国首尔市

[72] 发明人 曹贞媛 郑顺观 具正 千准熙
安泰军 全银卿 高在敬 金太莹
白永玉 徐惠兰

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 赵蓉民 路小龙

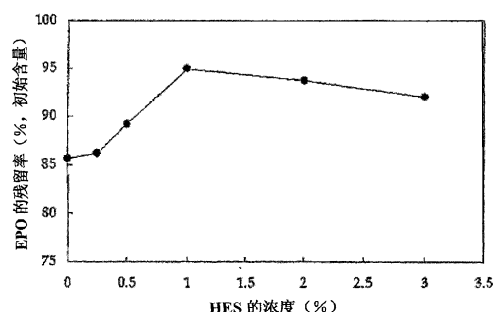
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

不含清蛋白的红细胞生成素制剂

[57] 摘要

本发明公开了红细胞生成素(EPO)的一种稳定药物溶液制剂,其包括一种不含血液衍生蛋白的稳定剂,从而使EPO活性维持一段延长的时间,而无病毒污染的危险。该稳定溶液制剂进一步包括非离子表面活性剂和张度剂,从而防止储存期间EPO损失并且便于对身体给药。



-
1. 一种红细胞生成素(EPO)溶液制剂, 其包括:
治疗有效量的EPO; 以及
不含清蛋白的稳定剂, 其选自羟乙基淀粉 (HES)和HES与氨基酸
5 的混合物。
2. 根据权利要求1所述的EPO溶液制剂, 其中所述HES的浓度为
0.1%到10%。
- 10 3. 根据权利要求1所述的EPO溶液制剂, 其中所述氨基酸选自谷氨酸, 谷氨酰胺, 甘氨酸或它们的盐, 及其混合物。
4. 根据权利要求1所述的EPO溶液制剂, 进一步包括非离子表面活性剂和张度剂。
- 15 5. 根据权利要求4所述的EPO溶液制剂, 其中所述非离子表面活性剂选自聚氧乙烯烷基醚, 聚氧乙烯脂肪酸酯, 聚氧乙烯烷基酚醚, 失水山梨糖醇脂肪酸酯, 聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯, 蔗糖脂肪酸酯, 以及聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物。
- 20 6. 根据权利要求4所述的EPO溶液制剂, 其中所述张度剂选自氯化钠, 甘露醇, 山梨醇及其混合物。

不含清蛋白的红细胞生成素制剂

技术领域

本发明一般涉及稳定的红细胞生成素（erythropoietin）(下文简称为“EPO”)溶液制剂，其不含血液衍生蛋白，因而具有长期储存稳定性
5 而无病毒污染的危险，并且通过包括一种稳定剂来保证生物活性，该稳定剂能够替换血液衍生成分，即清蛋白或精制明胶。

背景技术

EPO是一种糖蛋白激素，其属于包括集落刺激因子(CSF)的细胞因子类，而且主要在肾中产生，也有一些在肝脏中产生。EPO通过促进
10 祖红细胞（erythroid progenitor cell）的分化和增殖，在产生成熟红细胞中起主要作用。EPO因其作用具有各种应用，包括治疗与肾病有关的贫血症，要求移植骨髓的贫血症，以及与类风湿性关节炎有关的贫血症，与癌症或抗癌剂有关的贫血症，与AIDS有关的贫血症，并且被用来治疗患再生障碍性贫血症和慢性肾衰竭的病人。

15 为了治疗上述疾病，设计用于在市场上提供蛋白如EPO的稳定制剂的药物要求抑制在制备药物制剂期间发生的化学和物理变化，例如水解，二硫化物交换反应，变性，凝集和吸附，并且要求保持蛋白类药物的生物活性。

因此，人们致力于抑制EPO制剂的化学或物理变化，以及保持EPO
20 在长期储存期间的生物活性。为保持EPO蛋白类药物在长期储存期间的生物活性，可在EPO药物制剂中采用稳定剂。

例如，美国专利号4,879,272公开了一种采用人血清清蛋白，牛血清清蛋白，卵磷脂，葡聚糖，环氧乙烷-环氧丙烷共聚物，羟丙基纤维素，甲基纤维素，聚乙二醇氢化蓖麻油，聚乙二醇和类似物来防止水
25 溶液中的EPO变性和被吸收到容器壁内表面的方法。此外，该专利还

描述了作为吸附抑制剂的人血清清蛋白的浓度和由于吸附造成的EPO损失之间的关系。

如参考专利中所述，人或牛血清清蛋白，精制明胶和类似物通常被用作稳定剂，用于改善传统蛋白类药物制剂中蛋白的稳定性。然而，
5 由于人血清清蛋白在其来源上是依赖于捐献血液的血液产品，因此很难完全避免病毒污染的危险。

为了解决这个问题，人们致力于开发一种不采用血液衍生成分就能稳定作为蛋白类药物的EPO的方法。例如，美国专利号4,992,419公开了一种具有生物相容性和储存稳定性的EPO制剂，其包括EPO；生理
10 上相容的磷酸盐缓冲剂；5到50 g/L 豚；1到50g/L 氨基酸；以及0.05到5 g/L 非离子表面活性剂，其中所述的氨基酸选自L-甘氨酸，L-丙氨酸，L-精氨酸，L-亮氨酸，L-苯丙氨酸，L-谷氨酸，L-苏氨酸及其混合物；所述的非离子表面活性剂是多聚乙二醇（polymacrogol）类型，例如聚失水山梨糖醇月桂酸亚己酯（polyethylene sorbitan laurate），失水
15 山梨糖醇三油酸酯以及油酸聚乙二醇醚。该专利表明在无清蛋白的情况下可将EPO蛋白制成储存稳定的形式。

此外，美国专利号6,120,761揭示了一种用于制备EPO制剂的技术，该EPO制剂不含异质蛋白，例如人血清清蛋白或精制明胶，并通过将氨基酸，例如亮氨酸，丝氨酸，谷氨酸，精氨酸，组氨酸，和类似物
20 用作稳定剂，使EPO处于一种稳定形式。

国际专利申请WO 00/61169公开了另一种稳定的EPO制剂，其包括pH缓冲剂，山梨聚糖单-9-十八烷酸酯聚氧-1,2-乙烷二基衍生物（sorbitan mono-9-octadenoate polyoxy-1,2-ethanediyl derivative）和氨基酸。在这一应用中，一种优选的EPO药物制剂包括在磷酸盐缓冲剂体系
25 中作为稳定剂的聚山梨醇酯80和甘氨酸组合。

另一些努力在于对EPO以外的蛋白类药物进行稳定化处理。例如，国际专利申请WO 00/48635 (EP 1 154 796)公开了一种不含清蛋白的冻干的因子VIII组合物，其用于治疗由缺乏因子 VIII 导致的血友病A，

该组合物包括凝结因子，即因子VIII，其用作抗血友病因子。这一应用表明在无清蛋白存在的情况下，通过采用稳定剂和填充剂（bulking agent），例如氨基酸和糖，可制备血液成分的药物制剂。具体来说，除了因子VIII之外，可向制剂中加入以下成分：4%到10%的填充剂，选自甘露醇，甘氨酸和丙氨酸，或2%到6%的羟乙基淀粉（hydroxyethyl starch）（下文中简称为"HES"）作为填充剂；1%到4%的稳定剂，选自蔗糖，海藻糖，棉子糖和精氨酸；1 mM到5 mM 钙盐；100 mM到300 mM 氯化钠；以及 pH保持为约6到8的缓冲剂。

此外，如美国专利号5,358,708中所描述的，可采用蛋氨酸，组氨酸或其混合物作为稳定剂，使蛋白类药物例如干扰素，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSFs)或白细胞介素稳定化并延长其储存期。

美国专利号4,457,916公开了一种稳定肿瘤坏死因子(TNF)的方法，该肿瘤坏死因子是由巨噬细胞产生的蛋白，存在为水溶液或粉末形式，该方法基于采用选自下列的稳定剂：非离子表面活性剂，选自D-半乳糖，D-木糖，D-葡萄糖醛酸，海藻糖，葡聚糖和HES中的一种物质，及其混合物。通过采用这类选自非离子表面活性剂，具体的糖或与糖相关的化合物及其混合物的稳定剂，可将TNF制成水溶液或粉末形式，其可被储存一段延长的时间而不失活，且通过冷冻、融化，冻干以及加热预处理而变得稳定。

然而，当为了使EPO制剂稳定而对其进行冻干时，冻干增加了上述物理和化学问题的危险。即使解决了这些问题，EPO制剂的冻干还存在另一缺点，即制造成本过高。

因而，本发明人特意发明了一种可注射形式的稳定EPO溶液制剂，其不含血液衍生蛋白，因而不存在病毒污染的危险，并且通过采用EPO稳定剂，而具有长期储存稳定性并保证了生物活性，该EPO稳定剂能替代传统用于蛋白类制剂的稳定剂，清蛋白。

发明内容

本发明提供了一种可注射和稳定的红细胞生成素（erythropoietin）

(EPO)溶液制剂，通过利用不含血液来源蛋白的稳定剂，该制剂保持其活性一段延长的时间，而无病毒污染的危险，该制剂包括EPO，不含清蛋白的稳定剂，非离子表面活性剂，以及张度剂（tonicity agent）。

附图简述

- 5 图1示出了在40°C下储存一星期之后，EPO残留率和羟乙基淀粉(HES)浓度的关系图。

实施本发明的最佳方式

对本领域技术人员而言明显的是，不同蛋白在储存期间和不同条件下会因其化学性质的差异以不同的比率逐渐失活。

- 10 也就是说，用于蛋白稳定的物质对延长蛋白储存期的积极作用对不同蛋白并不相同。出于这一原因，用于实现储存稳定性的稳定剂的用量和类型会根据感兴趣的蛋白的类型而变化。此外，当对不同的蛋白采用同一稳定剂时，由于在储存期间蛋白在性质和浓度上的变化，因此该稳定剂对蛋白稳定有不同效果。

- 15 因此，本发明人意欲发现一种非蛋白稳定剂，其能够在储存期间使EPO稳定，从而提供一种稳定的EPO溶液制剂，该制剂能够使EPO的生物活性保持一段延长的时间，而无病毒污染的危险。

- 20 本发明人旨在实现上述目的而进行的透彻全面的研究导致了本发明，结果发现，采用HES和/或特定氨基酸作为稳定剂而获得了可注射和稳定的EPO溶液制剂，该制剂不含异质蛋白例如人血清清蛋白或精制明胶，因而无病毒污染危险，该制剂使EPO的生物活性保持一段延长的时间。

- 25 此处所用的术语"稳定"或"稳定化(剂)"意欲表示在特定的储存条件下储存一段预定时间的情况下，活性成分的损失一般低于10%。通常，在10°C下储存2年，在25°C下储存6个月，或在40°C下储存1或2星期的情况下，保持EPO残留率为90%或更高，优选约95%时，认为EPO制剂是稳定的。

EPO和其它蛋白类药物的储存稳定性对确保精确剂量，以及抑制EPO的抗原物质的可能产生是很重要的。认为，只要EPO未转化为组合中聚集体或片段形式的抗原化合物，对于实际给药，EPO在制备和/或储存期间的损失约10%是可接受的。

5 下文将更加详细地介绍本发明。

一方面，本发明提供了一种稳定的EPO溶液制剂，其包括治疗有效量的EPO，不含清蛋白的稳定剂，非离子表面活性剂以及张度剂。

在一个优选的方面中，本发明提供了一种稳定的EPO溶液制剂，其包括羟乙基淀粉 (HES)或HES和氨基酸的混合物作为稳定剂。

10 在上述方面中，本发明中采用的羟乙基淀粉 (HES) 优选使用的浓度为0.1%到10%，更优选为0.1%到3%。

本发明稳定的EPO溶液制剂还可包括另一稳定剂，氨基酸，其选自谷氨酸，谷氨酰胺，甘氨酸或它们的盐，及其混合物。

15 此外，本发明稳定的EPO溶液制剂中采用的非离子表面活性剂可选自聚氧乙烯烷基醚，聚氧乙烯脂肪酸酯，聚氧乙烯烷基酚醚，失水山梨糖醇脂肪酸酯，聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯，蔗糖脂肪酸酯，以及聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物。

更优选地，非离子表面活性剂可选自聚山梨醇酯20和80及其混合物。

20 此外，用于本发明EPO溶液制剂的张度剂可选自氯化钠，甘露醇，山梨醇及其混合物。

更优选地，所述张度剂是氯化钠。

在一个更优选的方面中，本发明稳定的EPO溶液制剂是溶解于本领域公知的生理上可接受的缓冲剂中的溶液制剂。

25 更优选地，该缓冲剂是注射用水。

对本领域技术人员显而易见的是，本发明的以上目的或其它目的，特征以及其它优点在以下详细描述、实施例以及附上的权利要求书中将能被更清楚地理解。

5 本发明中采用的EPO是采用任何方法从天然的或重组的来源或从这两者制备得到的。天然EPO可从血液或尿中提取。重组EPO可在遗传重组法转化的哺乳动物细胞培养物中制备。

本发明的EPO溶液制剂中含有治疗有效量的EPO。通常，治疗有效量的EPO为单次使用的小瓶中有约2,000到10,000国际单位(IU)。

10 本领域通常使用的EPO稳定剂是不含血液衍生成分如清蛋白和明胶的药学优选组合物，其例子有糖类，包括单糖和多糖，糖醇，环多醇，氨基酸，无机盐，有机盐，含硫还原剂，表面活性剂和螯合剂。其它有用的稳定剂可包括基本化合物例如精氨酸，胍或咪唑；聚合物例如聚乙烯-吡咯烷酮和聚乙二醇；以及二肽例如甘氨酸和甘氨酸-L-谷氨酸。

15 作为EPO 稳定剂，糖类可包括单糖，如甘露糖，葡萄糖，果糖和木糖；和多糖，如乳糖，麦芽糖，蔗糖，棉子糖和葡聚糖；而糖醇可包括甘露醇，山梨醇和甘油。环多醇可包括肌醇。

此外，作为EPO稳定剂的氨基酸包括甘氨酸，丙氨酸，赖氨酸，亮氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，组氨酸，脯氨酸和色氨酸的L和D异构体，
20 以及它们的盐。

EPO溶液制剂还可包括无机盐，例如，氯化钠，氯化钾，氯化钙，磷酸钠，磷酸钾，以及碳酸氢钠；有机盐，例如，柠檬酸钠，柠檬酸钾和醋酸钠；以及含硫还原剂，例如，谷胱甘肽，硫辛酸，巯基乙醇酸钠，硫甘油， α -单硫甘油以及硫代硫酸钠。

25 有用的表面活性剂包括非离子表面活性剂，其包括带有亲水性或疏水性部分的嵌段聚合物，如聚氧乙烯烷基醚，聚氧乙烯脂肪酸酯，聚氧乙烯烷基酚醚，失水山梨糖醇脂肪酸酯，聚氧乙烯失水山梨糖醇

脂肪酸酯和蔗糖脂肪酸酯；以及聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物，采用接枝共聚法合成的聚合物活化剂。

聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯包括以商品名Tween销售的聚山梨醇酯。此外，聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的商业可得例子包括以商品名Poloxamer或Pluronic销售的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物。

本发明可注射和稳定的EPO溶液制剂包括一种主稳定剂HES；另一种稳定剂，氨基酸；选自氯化钠，甘露醇，山梨醇及其混合物的张度剂；选自聚山梨醇酯20，聚山梨醇酯80及其混合物的非离子表面活性剂；以及注射用水。

更详细地，在本发明用作主稳定剂的HES是葡萄糖单元的高度支化聚合物，它是通过支链淀粉进行碱性羟乙基化作用而合成的。清蛋白是一种单分散性的胶体，分子量为69,000 g/mole，与用作血浆增量剂的血清蛋白不同的是，HES则是多分散性的胶体，其中聚合物的80%的分子量为30到2,400,000 g/mole。本发明中采用的HES是一种中等分子量的HES，其平均分子量为200,000 g/mole。

本发明稳定的EPO溶液制剂中所含用作主稳定剂的HES的优选使用浓度为0.1%到10%，更优选为0.1%到3%。

本发明稳定的EPO溶液制剂中采用的另一种稳定剂包括氨基酸和其盐，如钠盐钾盐和盐酸盐。

优选的氨基酸包括谷氨酰胺，甘氨酸，精氨酸，脯氨酸，谷氨酸，组氨酸，以及必需氨基酸，包括异亮氨酸，亮氨酸，赖氨酸，苯丙氨酸，蛋氨酸，苏氨酸，色氨酸和缬氨酸，以及它们的盐。上述氨基酸或它们的盐可被单独添加或组合两种或多种进行添加。

作为本发明另一种稳定剂的特别优选氨基酸有L-谷氨酸，L-谷氨酰胺，L-甘氨酸以及它们的盐。这些氨基酸和它们的盐可被单独添加或组合两种或多种进行添加。

加入本发明稳定的EPO溶液制剂中的氨基酸的用量范围为约1到

20 mg/ml, 优选约2到10 mg/ml。

用于本发明溶液制剂中的优选非离子表面活性剂是聚山梨醇酯20, 聚山梨醇酯80及其混合物。

用于本发明稳定EPO溶液制剂中的张度剂可选自氯化钠, 甘露醇,
5 山梨醇及其混合物。

本发明的稳定EPO溶液制剂通常被调整为pH值约5.0到8.0。优选的pH范围为约6.0到7.0。可采用选自氯化钠, 甘露醇, 山梨醇以及其它相应物质的张度剂的缓冲剂水溶液获得适当的pH条件。

本发明稳定的EPO溶液制剂可通常装在密封的和灭菌的塑料或玻
10 璃容器中。本发明的溶液制剂可以安瓿, 小瓶或一次性注射器中的规定剂量供应, 或者以多剂量形式例如注射袋或瓶供应。

在本发明中, 如下面的实施例中详细描述, EPO溶液制剂在40°C和25°C下预定的时间段内受到严格的加速稳定性测试。此后, 测定每一EPO溶液制剂中EPO的残留率, 用于选择和确定稳定剂。

15 更详细地, 制备出含有HES主稳定剂的EPO溶液制剂, 并将其在40°C和25°C下储存预定的一段时间。采用反相高性能液相色谱法(RP-HPLC)测定每种制剂中的EPO残留率。结果是, 含有HES, L-谷氨酰胺, L-谷氨酸和L-甘氨酸的溶液制剂中EPO的残留率高于其它溶液制剂, 从而确保了EPO的长期稳定性。

20 根据本发明的稳定剂HES能替代清蛋白, 具有较轻微的毒性, 可易于以低价获得, 并且无输液传播疾病的危险, 因此便于使用。就此, 本发明人发现, 采用本领域中可注射和通常用作血浆增量剂的HES, 悬浮剂以及抗冷冻剂, 制备出具有长期稳定性的EPO溶液制剂。

通过下面的实施例可以更好地理解本发明, 给出这些实施例仅仅是为了进行说明, 不应将它们解释成对本发明的限制。
25

实施例1: 各种浓度的HES对EPO稳定性的作用

- 为制备含有0-3% (0-30 g/L)HES而未加入特定氨基酸的EPO溶液，将0-3%HES溶于0.9 L注射用水中，并在70±5°C下搅拌20分钟以上，然后冷却到35°C。向各个冷却的溶液中加入氯化钠和聚山梨醇酯，使它们溶于溶液中。向各个溶液中加入额外的注射用水直至最终体积为1 L。
- 5 搅拌后，分别将各溶液调节至pH 6.9。然后，使各溶液过滤通过0.22-mm膜，并补充预定量的EPO。将得到的溶液填充到I型玻璃瓶中，从而制得了稳定的样品。EPO的用量范围为2,000到10,000 IU。

将制备的稳定样品储存在40°C下达一星期，采用RP-HPLC测定EPO的残留率。

- 10 发现合适浓度的HES对EPO有稳定化作用，因而确保了EPO的长期储存稳定性。结果示于下面的表1中。

表1
含有不同浓度HES的EPO溶液制剂的稳定性测试结果

	测试实施例					
组合物(mg/mL)	1	2	3	4	5	6
氯化钠	9	9	9	9	9	9
聚山梨醇酯80	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
羟乙基淀粉 (HES)	-	2.5	5	10	20	30
在40°C下储存一星期后的EPO残留率(%)	86	86	89	95	94	92

- 15 如表1和图1所示，在不含特定氨基酸但HES的浓度为1%到3%之间的稳定样品中EPO的残留率较高。在含1% HES的样品中观察到最高的EPO残留率。

实施例2：含HES和氨基酸的溶液的等渗压性对EPO稳定性的作用

- 20 根据本发明，利用纯水来制备可注射的EPO溶液制剂。为了使这些溶液制剂为等渗压的，0.5到10 g/L氯化钠，甘露醇，山梨醇或其他相应物质被加到每种溶液中。与实施例1中的相同，这些溶液制剂被调整成pH值为6.9。为了评价制剂的等渗压性对EPO稳定性的作用，下面

将根据与实施例1相同的方法，利用预定量的HES和各种量的氯化钠来制备EPO溶液，如表2所示。利用冰点渗透计(Gonotec GmbH)来测量每种所制样品的重量克分子渗透浓度。这些样品在40°C下储存两个星期，然后采用RP-HPLC测定EPO的残留率。结果示于下面的表2中。

5

表2
含有不同浓度NaCl的EPO溶液制剂的稳定性测试结果

组合物(mg/mL)	测试实施例				
	1	2	3	4	5
氯化钠	4.874	6.355	7.796	9	9.257
聚山梨醇酯80	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
羟乙基淀粉 (HES)	60	60	60	60	60
甘氨酸	5	5	5	5	5
重量克分子渗透浓度	248	298	347	386	395
在40°C下储存2星期后的EPO残留率(%)	90	94	96	88	89

如表2所示，当利用测试实施例2和3的NaCl浓度制备EPO溶液时，发现经测量具有298和347 mOsm重量克分子渗透浓度的EPO溶液分别具有相对较高的储存稳定性94%和96%。

10 实施例3：含有HES和谷氨酰胺的溶液中EPO的稳定性评价

为了研究含有作为稳定剂的HES和谷氨酸的溶液中EPO的稳定性，采用1% HES和8 mg/mL 谷氨酰胺，按照与实施例1相同的方法制备EPO溶液。将EPO溶液储存在 40°C/RH75%的恒温箱中达2星期，在25°C/RH60%的另一恒温箱中储存6个月。然后，采用 RP-HPLC法

15 (Waters Company)测定EPO溶液中EPO的残留率。结果示于下表3中。

表3
含有HES和谷氨酰胺的EPO溶液制剂的稳定性测试结果

羟乙基淀粉（hydroxyethyl starch）(HES)	10 mg/mL
聚山梨醇酯 80	0.5 mg/mL

氯化钠	6.5 mg/mL
谷氨酰胺	8 mg/mL
注射用水	剩余
在40°C下储存两星期后的EPO残留率(%)	91%
在25°C下储存6个月后的EPO残留率(%)	95%

结果是，当含有HES和谷氨酰胺的组合物在40°C和25°C的严格条件下储存时，与EPO的初始含量相比，EPO的残留率分别为95%和91%。

实施例4：含有HES和谷氨酸的溶液中EPO稳定性的评价

为了研究含有作为稳定剂的HES和谷氨酸的溶液中EPO的稳定性，
5 采用1% HES和8 mg/mL 谷氨酸，按照与实施例1相同的方法制备EPO溶液。将EPO溶液储存在 40°C/RH75%的恒温箱中达2星期，在25°C/RH60%的另一恒温箱中储存6个月。然后，采用 RP-HPLC法 (Waters Company)测定EPO溶液中EPO的残留率。结果示于下表4中。

表4

10 含有HES和谷氨酸的EPO溶液制剂的稳定性测试结果

羟乙基淀粉 (hydroxyethyl starch) (HES)	10 mg/mL
聚山梨醇酯 80	0.5 mg/mL
氯化钠	6.5 mg/mL
谷氨酸	8 mg/mL
注射用水	剩余
在40°C下储存两星期后的EPO残留率(%)	94%
在25°C下储存6个月后的EPO残留率(%)	96%

结果是，当含有HES和谷氨酸的组合物在40°C和25°C的严格条件下储存时，与EPO的初始含量相比，EPO的残留率分别为94%和96%。

实施例5：含有HES，谷氨酰胺和甘氨酸的溶液中EPO稳定性的评价

15 为研究含有作为稳定剂的HES，谷氨酰胺和甘氨酸的溶液中EPO

的稳定性，采用1% HES，8 mg/mL谷氨酰胺和2 mg/mL甘氨酸，按照与实施例1相同的方法制备EPO溶液。将EPO溶液储存在40°C/RH75%的恒温箱中达2星期，在25°C/RH60%的另一恒温箱中储存6个月。然后，采用 RP-HPLC法 (Waters Company)测定EPO溶液中EPO的残留率。结果示于下表5中。

表5

含有HES，谷氨酰胺和甘氨酸的EPO溶液制剂的稳定性测试结果

EPO	2,000 IU
羟乙基淀粉 (hydroxyethyl starch) (HES)	10 mg/mL
聚山梨醇酯 80	0.5 mg/mL
氯化钠	6.5 mg/mL
谷氨酰胺	8 mg/mL
甘氨酸	2 mg/mL
注射用水	剩余
在40°C下储存两星期后的EPO残留率(%)	96%
在25°C下储存6个月后的EPO残留率(%)	95%

结果是，当含有HES，谷氨酰胺和甘氨酸的组合物在40°C和25°C的严格条件下储存时，与EPO的初始含量相比，EPO的残留率分别为96%和95%。

前述实施例的目的仅在于阐释本发明，而不应理解为对本发明的限制。

工业应用性

如上所述，由于本发明的EPO溶液制剂不含异质蛋白例如人血清清蛋白或明胶，因此其具有优异的长期储存稳定性，而无病毒污染的危险。

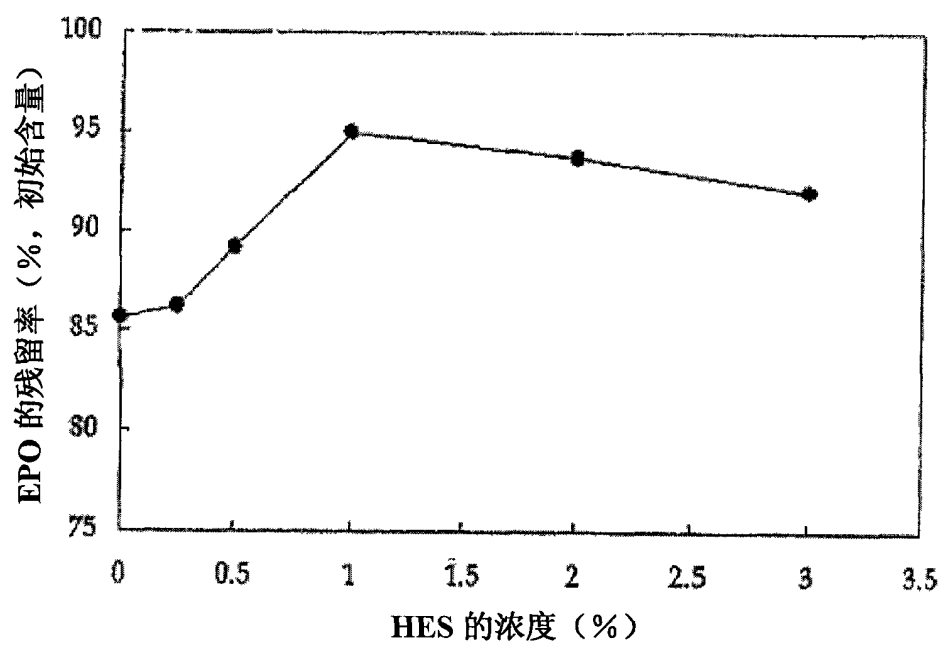


图 1