



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319895

C 07 K 14/505

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19972725	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.12.15 PCT/US95/16416
(22)	Inng.dag	1997.06.13	(85)	Videreføringsdag	1997.06.13
(24)	Løpedag	1995.12.15	(30)	Prioritet	1994.12.16, US, 357947
(41)	Alm.tilgj	1997.08.06			
(45)	Meddelt	2005.09.26			

(73)	Innehaver	Ortho Pharmaceutical Corp, P O Box 300, Raritan, NJ 08869-0602, US			
(72)	Oppfinner	Deepak B. Mehta, Bridgewater, NJ, US Diane Corbo, Flemington, NJ, US Khursid Iqbal, Warren, NJ, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av spraytørket rhEPO, samt tørr rhEPO fremsatt i henhold til denne metoden og sammensetning derav.		
(56)	Anførte publikasjoner	EP 178665 EP 613683		
(57)	Sammendrag			

En fremgangsmåte for fremstilling av stabilt, spraytørket rhEPO og rhEPO pulver produsert derved er beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av spraytørket erythropoietin og tørt erythropoietinpulver som derved blir produsert.

Erythropoietin (EPO) er et glykoprotein som primært blir syntetisert i nyrene og er
5 hovedregulatoren til produksjon av røde blodceller i kroppen. Kommersielt tilgjengelig
humant EPO blir produsert via rekombinante DNA-teknikker og er kjent som
rekombinant human EPO (rhEPO). rhEPO har en molekylmasse på omtrent 36.000
dalton, bestemt ved SDS-PAGE. Molekylmassen til proteinskjelettet er på 18,398 dalton
10 som indikerer at hele molekylet er sterkt glykosylert. Karbohydratresidene er viktig for
in vivo biologisk aktivitet.

Opprettholdelse av proteiner, så som rhEPO, i deres native tilstand i vandig oppløsning
eller i fast fase er en viktig utfordring for de arbeider innenfor området farmasøytiske
formuleringer. Eksistensen av et protein i nativ tilstand avhenger av
15 proteinkonsentrasjonen, temperaturen og naturen til oppløsningsmiddelet, ionestyrken
til bufferen osv. Forandringer i hvilke som helst av disse parametrene kan påvirke
stabiliteten til et protein i oppløsning eller fast fase.

Kommersielle preparater av rhEPO blir for tiden solgt som enten fortynnede vandige
20 oppløsninger eller i en lyofilisert form som blir anvendt for å danne en fortynnet vandig
oppløsning, og begge blir administrert til kroppen ved injeksjon. Konsentrasjonen til
rhEPO i disse preparatene er veldig lav og rhEPO blir fjernet fra kroppen relativt hurtig
etter administrering. I lys av denne begrensningen til preparatene er det nødvendig med
konsentrerte preparater av rhEPO, for eksempel preparater inneholdende høyere
25 mengder rhEPO som kan bli anvendt i alternative medikamentleveringssystemer. Vi
anvendte spraytørkningsteknikker for å danne slike preparater.

Spraytørking av farmasøytiske stoffer er kjent innenfor fagområdet. Se for eksempel
Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals", i Drug Dev. Ind. Pharm. 18
30 (11 & 12), 1169-1206 (1992). I tillegg til farmasøytiske stoffer med små molekyler er
forskjellig biologiske materialer blitt spraytørket og disse innbefatter, enzymer, sera,
plasma, mikroorganismer og gjær. Spraytørking er en nyttig teknikk på grunn av at det
kan omdanne et flytende farmasøytisk preparat til en fint, støvfritt eller agglomerrt
pulver i en fremgangsmåte i et trinn. Den grunnleggende teknikken omfatter følgende
35 fire trinn:

- a) atomisering av tilførselsoppløsningen til en spray;
- b) spray-luftkontakt;
- c) tørking av sprayen og
- d) separering av det tørkede produktet fra den tørkende luften.

5

Til tross for at det har vært kjent innenfor det farmasøytiske området har spraytørking for terapeutiske proteiner, så som rhEPO ikke ofte vært anvendt. En grunn for dette er bekymringen om at slike proteiner kan bli termisk degradert ved høye temperaturer som blir anvendt i spraytørkeprosessen. Dette er spesielt tilfelle for komplekse glykoproteiner, så som rhEPO, som i tillegg til deres polypeptidskjelett også har omfattende forgrenede karbohydratdeler som er nødvendig for biologisk aktivitet. Tilgjengeligheten av lyofilisering som et enkelt alternativ har videre styrt de som arbeider innenfor området bort fra anvendelse av spraytørking for terapeutiske proteiner. Spraytørking har derimot de fordelene i forhold til lyofilisering at de er mer økonomiske, hurtig og enkle å skalere opp. Spraytørkede pulvere er ofte mer mottagelige for ytterligere bearbeidning enn lyofiliserte pulvere.

Det er vanligvis upraktisk å konstruere formuleringer som bare er basert på lyofilisering av bulk medikamentet. Dette skyldes at mange polypeptider er relativt ustabile når de blir lyofilisert i lave konsentrasjoner og de kan absorbere til produktpakker og miste aktivitet. For å løse disse problemene baserer mange lyofiliserte farmasøytiske sammensetninger på anvendelse av faste fortynningsmidler, kryobeskyttelsesmidler eller bulkmidler for å øke mengden av fast materiale som er tilstede i løpet av lyofiliseringsprosessen. Som et resultat av dette inneholder det endelige lyofiliserte materialet en liten prosentandel (w/w) aktivt medikament blandet med en stor prosentandel av annet fast materiale.

I kontrast til dette tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å produsere et rhEPO pulver fra bulk rhEPO hvor pulveret produsert i ren eller vesentlig ren rhEPO eller har en høy prosentandel (w/w) rhEPO enn det som kan bli dannet ved anvendelse av tradisjonelle lyofiliseringsteknikker.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av stabilt, spraytørket rhEPO og rhEPO-pulver som derved blir produsert.

35

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter først tilveiebringning av en vandig oppløsning av rhEPO som har en konsentrasjon innenfor området på 20 mg/ml

til 100 mg/ml. Oppløsningen blir deretter atomisert til en spray og sprayen blir tørket med varm luft for å avdampe vannet fra sprayen. Tørket rhEPO som derved blir produsert blir deretter separert fra den tørkende luften.

5 Den opprinnelige vandige oppløsningen kan inneholde, i tillegg til rhEPO, eksipienter så som mannitol, glycin og/eller overflateaktivt middel. Den tørre rhEPO sammensetningen som blir produsert ifølge fremgangsmåten i foreliggende oppfinnelse omfatter rhEPO i en konsentrasjon innenfor området 4,0% til 100% (w/w) og har et
10 gjenværende fuktinnhold innenfor området på 3,0% til 5% (w/w). Størrelsen på partiklene til sammensetningen er innenfor området 2,0 mikroner til omtrent 6,0 mikroner.

En konsentrert rhEPO oppløsning på minst 20 mg/ml ble anvendt for spraytørring. Den konsentrerte vandige oppløsningen ble atomisert til fine dråper ved pumping av denne
15 gjennom en dyse med trykkbelastet luft. Dråpene gikk deretter inn i et tørkerom og vannet ble avdampet av den varme tørkeluften som strømmer samtidig med tilførselsoppløsningen. Når vannet blir avdampet blir fast rhEPO og eksipientene dersom de er tilstede separert fra de vandige dråpene. Tørket rhEPO ble båret av den tørkende luften samtidig med en syklonseparator for klargjøring, dvs.. tørket rhEPO ble
20 separert fra den tørkende luften, og det tørkede produktet ble samlet i samlingsbeholderen festet til bunnen av syklonseparatoren. Tørkeluften ble deretter avgitt gjennom en fin skrubbeinnretning inn i atmosfæren.

Som anvendt heri betyr begrepet "rhEPO" et hvilket som helst protein som har alle eller
25 deler av polypeptidskjelettet beskrevet for rhEPO i US-PS 4.703.008 og som har den biologiske egenskapen som forårsaker at benmargsceller øker produksjonen av retikulocytter og røde blodceller og øker hemoglobin syntesen eller jernopptaket. Det blir betraktet at biologiske aktive fragmenter, analoger eller kjemiske syntetiserte derivater av EPO kan bli anvendt i foreliggende oppfinnelse, i stedet for rhEPO, forutsatt at slike
30 fragmenter eller derivater har beholdt den biologiske aktiviteten til rhEPO. Visse EPO analoger er beskrevet i US-PS 4,703.008. Anvendelse av slike biologiske aktive EPO analoger, fragmenter eller derivater blir betraktet å være innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse.

35 Konsentrerte rhEPO pulvere produsert ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt i alternative medikamentleveringssystemer for å levere rhEPO. Et slikt system er et kontrollert frigjøringsleveringssystem som leverer rhEPO ved en forutbestemt rate i en

definert tidsperiode i legemet. Alternativt kan konsentrerte rhEPO pulvere bli rekonstituert med vann for injeksjon eller normalt saltvann for å danne vandige oppløsninger egnede for human terapeutisk anvendelse. Systemer med kontrollert frigjøring nevnt ovenfor innbefatter rhEPO plassert i et polymerisk materiale, vesikler eller en miniatyrrpumpe samt makromolekylære konjugater av rhEPO og andre polymeriske materialer. Disse systemene kan deretter bli anvendt som subdermale reservoar implantater av konsentrert rhEPO. Ikke-begrensede eksempler på disse systemene innbefatter matriser av faste hydrofobe polymerer som omgir rhEPO, så som ikke-degraderbare etylen-vinylacetatopolymere eller degraderbare melkesyre glykolsyrekopolymerer. Slike hydrofobe polymerer kan i tillegg ta form av mikrosfærer.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer stabilt rhEPO pulver. Som anvendt heri betyr "stabilt" at rhEPO opprettholder en biologisk aktivitet over tid og strukturen blir opprettholdt i dets native tilstand, dvs. blir ikke oksydert eller ellers degradert til andre kjemiske arter. Stabiliteten kan bli opprettholdt ved RIA, Western Blot og in vivo eller in vitro bioanalyser.

Foreliggende oppfinnelse omfatter tørr rhEPO fremstilt ifølge fremgangsmåten i krav 6, hvor nevnte rhEPO er 100% EPO (vekt/vekt) og inneholder mindre enn 2% aggregater bestemt ved Western blotanalyse etter 6 måneder ved lagring ved 5°C.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter rhEPO ifølge krav 1, i en konsentrasjon innenfor området på 4,0 % til 100 % (vekt/vekt) og som har et gjenværende fuktinnhold innenfor området på 3,0 % til 5,0 % (vekt/vekt).

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av spraytørket rhEPO, kjennetegnet ved å:

- a) tilveiebringe en vandig oppløsning av rhEPO som har en konsentrasjon på 20 mg/ml til 100 mg/ml, hvor den vandige løsningen av rhEPO ikke inneholder noen salter eller tilsetninger,
- b) atomisering av nevnte oppløsning til en spray;
- c) tørking av nevnte spray med varm tørkeluft for å avdampe vannet fra sprøyen; og

d) separere tørket rhEPO fra tørkeluften.

Følgende eksempler blir presentert for å illustrere foreliggende oppfinnelse.

5 EKSEMPEL 1

SPRAYTØRKEPROSESS FOR rhEPO

Dette eksemplet beskriver en fremgangsmåte for spraytørking anvendt for å produsere
10 amorf rhEPO eksklusivt i fast form eller sammen med inerte, farmasøytiske akseptable
eksipienter. Den på denne måten formulerte amorfe bulk rhEPO er stabilt i minst 6
måneder ved lagring ved 5°C (kjøleskap). Litteratur som beskriver spraytørking av
terapeutiske proteiner er begrenset og beskriver ikke stabiliteten til terapeutiske
15 proteiner i tørket form ved høyere konsentrasjoner, så som 25 % (w/w) og høyere. Se for
eksempel Mumenthaler et al, Pharm. Res. 11:12-20 (1994). Litteraturen gir ikke
tilstrekkelig bevis på stabiliteten til disse proteinene i fast form. Litteraturen viser
derimot utilfredsstillende stabilitet som kan skyldes eksipienter eller
bearbeidningsbetingelsene som er blitt anvendt. Visse uorganiske salter, aminosyrer,
overflateaktive midler osv er kjent for å stabilisere proteinene i oppløsningen.
20 Tilstedeværelse av citratsalter i bulk rhEPO kan derimot ikke gi stabilt spraytørket
rhEPO. Bulk rhEPO ble følgelig dialysert i vann for injeksjon før spraytørkingen. For å
oppnå et tilfredsstillende utbytte av produktet ved spraytørking ble dialyseringen fortsatt
helt til konsentrasjonen av rhEPO var innenfor området 20-100 mg/ml. Disse
konsentrerte bulk rhEPO oppløsningene i vann for injeksjon viste tilfredsstillende
25 stabilitet ved lagring ved 5°C i minst 6 måneder. En alternativ teknikk for fremstilling
av tørre proteiner, nemlig frysetørking, var ikke egnet for rhEPO på grunn av den
dårlige stabiliteten, uansett tilstedeværelse av citratsalter (se eksempel 2).

Fremgangsmåten for fremstilling av fast rhEPO og rhEPO pulver med eksipienter besto
30 av følgende to trinn:

- A. Dialysering og konsentrering av bulk rhEPO; og
- B. Spraytørking av dialysert bulk rhEPO.

A. Dialyse og konsentrasjon

Bulk rhEPO gitt i 20 mM citratbuffer ble dialysert for å fjerne all citrat og erstattet med vann for injeksjon. Dialysen ble utført som følger:

5

Bulk rhEPO (200 ml) i citratbuffer (omtrentlig kons. 2,0 mg/ml) ble tatt opp i en Amicon© dialyseringsinnretning utstyrt med en 10.000 molekylvekt spaltningsdialysemembran. Denne dialysecellen ble koblet til en rustfri stålbeholder inneholdende vann for injeksjon og beholderen ble koblet til en nitrogengasstank. Dialysen ble utført ved 10 30-40 psi og fortsatt helt til minst 2.000 ml dialysat var samlet. Den resulterende vandige oppløsning av rhEPO uten eventuell citrat ble deretter konsentrert til en endelig konsentrasjon på omtrent 20 til omtrent 100 mg/ml rhEPO. Den resulterende konsentrerte vandige oppløsning av rhEPO ble deretter lagret ved 5°C helt til den ble spraytørket. Den konsentrerte rhEPO oppløsningen ble også registrert for rhEPO stabilitet ved 15 5°C.

B. Spraytørking

Spraytørkingsprosessen besto av følgende trinn:

20

1. Atomisering av tilførselsoppløsningen;
2. Spray-luft kontakt;
3. Avdampning av oppløsningsmidlet;
4. Klaring av tørket fast stoff fra tørkegassene. En laboratorieskala spraytørker (Buchi©, modell 190) ble anvendt i prosessen.

25

1. Atomisering:

Vandig rhEPO oppløsning ble tilført til atomiseringsdysen (0,5 mm I.D.) ved romtemperatur ved anvendelse av en peristaltisk pumpe. Væsketilførselen ble atomisert til små dråper av høytrykksluft. En slik atomisering kan også bli oppnådd ved anvendelse av en roterende skive.

35

2. Spray-luftkontakt og avdampning

Når dråpene gikk inn i avdampningsrommet (105 mm I.D. x 450 mm L) ble vann avdampet av den varme tørkeluften som samtidig strømmer. Temperaturen til den

tørkede luften varierte fra 64-80°C. Når vannet blir avdampet separerte det faste stoffet fra den vandige oppløsningen i form av sfærer eller semi-sfærer. Tørkingen kan så bli utført ved motstrømsteknikken hvor den tørkede luften og tilførselsoppløsningen strømmer i motsatt retning.

5

3. Klaring:

Det tørkede pulveret ble båret av den tørkende luften samtidig til en sykklonseparator for klaring. I sykklonseparatoren ble den tørkede faste massen separert fra tørkeluften. Det tørkede produktet ble samlet i en oppsamlingsbeholder koblet i bunnen av sykklonseparatoren. Den tørkende luften (uten tørkeprodukt) ble sendt ut gjennom en fin skrubber inn i atmosfæren.

15

C. Kjemisk karakterisering

En kjent mengde av spraytørket rhEPO ble løst opp i vann for injeksjon. Denne vandige oppløsningen ble deretter analysert som følger:

20

1. Radioimmunanalyse (RIA):

25

Fremgangsmåten som ble anvendt var den ifølge Egrie et al, J Immunol Meth, 99:235-241 (1987). Denne metoden består av kompleksbinding av rhEPO med kaninpolyklonalt antistoff (dannet mot rhEPO). Dette ble oppnådd ved inkubering av rhEPO med kaninpolyklonalt antistoff over natt ved avkjølt temperatur. Inkubasjonen ble fortsatt i ytterligere en dag under de samme betingelsene etter tilsetning av ^{125}I -EPO. Antigenantistoffkomplekset ble presipitert av geiteanti-kaninantistoff, normal kaninserum og polyetylglykol. Det presipiterte komplekset ble vasket og mengden av bundet ^{125}I -EPO ble bestemt ved anvendelse av en gammateller. Denne prosedyren ble gjentatt for standard rhEPO oppløsninger av kjente konsentrasjoner og testprøveoppløsninger.

rhEPO konsentrasjonene til testprøven ble deretter beregnet ved sammenligning av gammatelleravlesninger med de til standard rhEPO oppløsninger.

30

2. Western Blot:

35

Fremgangsmåten anvendt var den som er beskrevet i Egrie et al. Immunobiol, 172:213-224 (1986). En 0,5 μg aliquot av denaturert rhEPO ble applisert på en standard (12,5 %) natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgel (SDS-PAGE). Elektroforesen ble utført og gelen

ble blottet på en nitrocellulosemembran ved anvendelse av en transferbuffer bestående av TRIS, glysin og metanol. Denne nitrocellulosemembranen ble blokkert med 5 % ikke-fettholdig melk i TRIS bufret saltvann. Det blokkerte nitrocelluloseblottet inneholdende rhEPO ble deretter konjugert med muse-anti-humant monoklonalt antistoff etterfulgt av geiteanti-musepolyklonalt antistoff. Dette komplekset ble deretter farget ved anvendelse av en alkalisk fosfatasekonjugatsubstratsett. Hvert blot inneholdt en standard rhEPO, standard rhEPO inneholdende en kjent mengde rhEPO aggregater og testprøver. Intensiteten til rhEPO standarden, og aggregatstandarden ble sammenlignet med testprøven.

10

3. Musebioanalyse:

En kjent mengde spraytørket rhEPO ble gjenopprettet i vann for injeksjon. Den biologiske aktiviteten til denne oppløsningen ble målt ved registrering av inkorporeringsraten av jern i exhypoksiske mus etter injisering av rhEPO oppløsningen. Fremgangsmåten anvendt var den ifølge Cotes et al, Nature, 191:1065-1067 (1961).

15

TABELL 1

20

Formuleringseksempler

Nr	Ingredienser	Formulering # (mengder i g)				
		I	II	III	IV	V
1.	rhEPO	0,0813	0,162	1,5	25	25
2.	Glysin	1,00	2,00	0	37,5	37,495
3.	Mannitol	1,00	2,00	0	37,5	37,495
4.	Tween®80	0,01	0	0	0	0,01
5.	WFI (q.s)	100	100	100	2000	2000

Anmerkning: WFI = vann for injeksjon.

Formulering nr II ble spraytørket ved to forskjellige innførselstemperaturer på 64 og 80°C.

25

Fem oppløsninger ble dannet ved oppløsning av eksipientene så som mannitol og glysin og/eller Tween®80 i rhEPO konsentrerte vandige oppløsninger en av gangen med svak aggitering. Når det gjelder formulering III ble ingen eksipienter tilsatt. Formuleringene

for disse oppløsningene er angitt ovenfor i tabell 1. Alle disse oppløsningene ble spraytørket ifølge spraytørkeparametrene som følger:

	Oppløsningstilførselsrate:	1 ml/min
5	Luftatomiseringsrate:	600-700 normliter/t
	Tørkelufrate:	32.000 til 45.000 liter/t
	Innførselstemperatur:	64-80°C
	Utførselstemperatur:	46-65°C

10 Etter spraytørkingen var det endelige faste rhEPO innholdet for formuleringene I og II omtrent 4 % (w/w), formulering III var 100 % w/w og formuleringene IV og V var 25 % (w/w) rhEPO. Gjenværende fuktinnhold varierte fra 3,0 % til 5,0 % (w/w) bestemt ifølge Karl-Fisher metoden (USP XXIII-NF XVII, side 1840-1843, metode 1a (1995)). Partikkelstørrelsen var 4,1 mikroner \pm 1,89 for spraytørket formulering III.

15

Preliminære eksperimenter ved anvendelse av bulk rhEPO inneholdende citratbuffer ga ikke stabilt spraytørket rhEPO med mannitol, glysin og/eller Tween®80. Dialysering av bulk rhEPO for å fjerne citratsaltene var vesentlig for spraytørking. For å oppnå et godt utbytte ved spraytørking på tilførselsoppløsningen ha et faststoffinnhold på minst 2 %.

20 Den dialyserte rhEPO oppløsningen ble derfor konsentrert til 20-100 mg/ml.

Det ble bestemt at Tween®80 ikke var nødvendig for å produsere stabil spraytørket rhEPO ved sammenligning av stabilitetsdata på formuleringene I og II og formuleringene IV og V. Seks måneders stabilitetsdata på ren rhEPO tyder på at mannitol og/eller glysin ikke behøver å være nødvendig for å produsere stabil spraytørket rhEPO. Mannitol og glysin ser ut til å virke som bulkmidler (som isotoniske/isosmotiske justeringsmidler) og kan bli anvendt for å endre rhEPO konsentrasjonen i den endelige spraytørkede rhEPO formuleringen.

30 Spraytørket rhEPO ifølge foreliggende oppfinnelse har fordeler i forhold til lyofilisert rhEPO. Som en sammenligning ble formuleringene I, II og III også lyofilisert (se eksempel 2). RIA data for lyofiliserte prøver lagret i 2 måneder ved 5°C varierte fra 73-78 % av merket form (LC). Disse lave EPO potensverdiene (bestemt ved RIA) ved en slik kort lagringsvarighet indikerer manglende stabilitet. Seks måneders lyofiliserte prøver viste mer enn 2 % EPO aggregater på SDS-PAGE etter gjennopprettingen. Dette indikerer manglende stabilitet av rekonstituert rhEPO. Spraytørkede formuleringer var 35 følgelig mer stabile enn frysetørkede formuleringer med samme sammensetning.

Stabilitetstabeller av spraytørkede formuleringer med numrene III og IV nevnt ovenfor er angitt nedenfor. I begge tilfellene ble prøvene lagret ved 5°C og tilstedeværelsen av rhEPO med mindre enn 2 % aggregater ble bekreftet ved hver måling med Western blot analyse.

TABELL 2

Stabilitetsdata for formulering # IV

TID	Ventet kons. (U/ml)	RIA (U/ml)	RIA (% LC)
0	31.500	35049	111
1	30.843	34188	111
2	30.121	29646	98
6	29.250	28521	97,5

TABELL 3

Stabilitetsdata for formulering # III

TID	Ventet kons. (U/ml)	RIA (U/ml)	RIA (% LC)
0	142.169	120339	84
1	123.164	96295	78
2	120.482	106523	88
3	125.542	109520	87
6	118.554	115441	97

EKSEMPEL 2**LYOFILISERINGSPROSESS FOR EPO**

20

Eksemplet beskriver en fremgangsmåte for lyofilisering anvendt for å produsere tørket rhEPO i ren form eller med en kombinasjon av farmasøytisk akseptable eksipienter. Stabiliteten til rhEPO som ble lyofilisert ble bestemt og resultatene er presentert neden-

for. Alle rhEPO preparatene anvendt i dette eksemplet ble også spraytørket som beskrevet ovenfor. RIO og Western blot prosedyrene ble utført vesentlig som beskrevet ovenfor for spraytørket rhEPO eksemplet.

- 5 En typisk lyofiliseringssyklus for frysetørring av rhEPO oppløsninger uten eksipienter begynte ved frysing av oppløsningen til omtrent -40°C og holding ved denne temperaturen i omtrent 3 timer for å forsikre at oppløsningen var fullstendig frossen. Når oppløsningen ble frosset var kondensatortemperaturen redusert til omtrent -50°C . Den primære tørkingen ble utført ved først å senke trykket i tørkerommet til omtrent 200 millitorr, og systemet ble stabilisert i omtrent 3 timer. Temperaturen ble deretter øket til omtrent -30°C i en rate på omtrent $0,1^{\circ}\text{C}$ pr minutt. Tørkingen (ved sublimering av is til vanddamp) ble fortsatt i omtrent 60 timer. Sekundær tørking ble utført ved øking av temperaturen til produktet til omtrent 15°C i en rate på omtrent $0,5^{\circ}\text{C}$ pr minutt. Trykket i tørkerommet ble ytterligere redusert fra omtrent 200 millitorr til omtrent 100 millitorr.
- 15 Den sekundære tørkefasen ble fortsatt i omtrent 16 timer for å forsikre fullstendig tørking. Etter den sekundære tørkingen ble beholderne satt lokk på og forseglet. De forseglede beholderne ble lagret ved omtrent 5°C helt til de ble fjernet for stabilitetstesting beskrevet nedenfor. For stabilitetstesting ble innholdet i beholderen gjenopprettet med vann, og analysert ved RIA og Western blot. Resultatene av stabilitetstesting ble oppstilt som en prosentandel av gjenværende rhEPO. Lavere prosentandeler av rhEPO som er igjen demonstrerer dårlig stabilitet. Western blot resultater bestemmer om rhEPO er i en nativ form eller i en denaturert, aggregert form. Prøver på rhEPO som har mer enn 2 % aggregater, sammenlignet med en 2 % aggregert rhEPO standard, blir bestemt å ha dårlig stabilitet. Resultatene av stabilitetstestene utført
- 25 på lyofilisert rhEPO i forskjellige formuleringer er presentert i tabell 4.

TABELL 4

Stabilitet som prosent markørkrav til EPO i
frysetørket formulering ved 5°C .

30

Formulering	RIA			Western Blot			
	Opprinnelig	1 mnd	2 mndr.	Opprinnelig	1 mnd	2 mndr	6 mndr
I	93,2	71,5	75,0	Tilstedeværelse av EPO bekreftet			mer enn 2 % aggregat
II	82,0	76,5	72,9	Mindre enn 2 % aggregat			
III	79,6	69,7	78,1				

Data vist i tabell 4 demonstrerer at lyofilisert rhEPO ikke forblir like stabil som spraytørket rhEPO. Spraytørring av rhEPO produserer følgelig et mer stabilt produkt sammenlignet med lyofilisering. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor stabilt spraytørket rhEPO som kan bli dannet uten tilsetning av eksipienter eller stabiliseringsmidler, så som cyclodekstriner, glysin, mannitol eller Tween 80. Et eksipientfritt preparat av rhEPO er ønskelig i visse medikamentleveringssystemer, så som levering via lungeveien, som vanligvis krever at medikamentet er så fritt for eksipienter som mulig.

P a t e n t k r a v

1.

Tørr rhEPO fremstilt ifølge fremgangsmåten i krav 6, hvor nevnte rhEPO er 100% EPO
5 (vekt/vekt) og inneholder mindre enn 2% aggregater bestemt ved Western blotanalyse
etter 6 måneder ved lagring ved 5°C.

2.

rhEPO-formulering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
10 25% (vekt/vekt) av rhEPO ifølge krav 1, 37,5% (vekt/vekt) mannitol og 37,5% (vekt/
vekt) glycin.

3.

rhEPO-formulering ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
15 det i tillegg inneholder et overflateaktivt middel.

4.

Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
rhEPO ifølge krav 1, i en konsentrasjon innenfor området på 4,0 % til 100 % (vekt/vekt)
20 og som har et gjenværende fuktinnhold innenfor området på 3,0 % til 5,0 % (vekt/vekt).

5.

Sammensetning ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at
størrelsen på partiklene er innenfor området på 2,0 mikron til 6,0 mikron.

25

6.

Fremgangsmåte for fremstilling av spraytørket rhEPO, k a r a k t e r i -
s e r t v e d å:

- 30 a) tilveiebringe en vandig oppløsning av rhEPO som har en konsentrasjon på 20 mg/
ml til 100 mg/ml, hvor den vandige løsningen av rhEPO ikke inneholder noen
salter eller tilsetninger,
- b) atomisering av nevnte oppløsning til en spray;
- 35 c) tørking av nevnte spray med varm tørkeluft for å avdampe vannet fra sprayen; og

d) separere tørket rhEPO fra tørkeluften.

7.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
oppløsningen blir atomisert ved å føre denne inn i en dyse under trykk.

8.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
spray og tørkeluften blir sendt igjennom tørkeren i samme retning.

9.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
tørket rhEPO blir separert i en cyclonseparator.

15 10.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
tørkingen blir utført innenfor et temperaturområde på 60°C til 85°C.