

(19)



(11)

**EP 1 806 361 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**11.07.2007 Patentblatt 2007/28**

(51) Int Cl.:  
**C07K 14/505<sup>(2006.01)</sup> A61K 47/18<sup>(2006.01)</sup>**

(21) Anmeldenummer: **07106020.6**

(22) Anmeldetag: **10.03.2005**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR**

• **Hesse, Jan-Ole**  
**61231 Bad Nauheim (DE)**

(30) Priorität: **10.03.2004 DE 102004011663**

(74) Vertreter: **Neuefeind, Regina**  
**Maiwald Patentanwalts GmbH**  
**Elisenhof**  
**Elisenstrasse 3**  
**80335 München (DE)**

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en) nach Art. 76 EPÜ:  
**05707735.6 / 1 723 172**

(71) Anmelder: **Bioceuticals Arzneimittel AG**  
**61118 Bad Vilbel (DE)**

Bemerkungen:

Diese Anmeldung ist am 12 - 04 - 2007 als Teilanmeldung zu der unter INID-Kode 62 erwähnten Anmeldung eingereicht worden.

(72) Erfinder:  
• **Schumann, Christof**  
**35767 Breitscheid-Erdbach (DE)**

(54) **Erythropoietin-Flüssigformulierung**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft lagerstabile Erythropoietin-Flüssigformulierungen und Verfahren zu deren Herstellung. Insbesondere betrifft die Erfindung Erythropoietin-Flüssigformulierungen, die mindestens vier Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe beste-

hend aus Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin enthalten und in denen auf die Zugabe von Konservierungsmitteln, Harnstoff oder Humanserumalbumin verzichtet werden kann.

**EP 1 806 361 A1**

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft lagerstabile Erythropoietin-Flüssigformulierungen und Verfahren zu deren Herstellung. Insbesondere betrifft die Erfindung Erythropoietin-Flüssigformulierungen, die mindestens vier Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin enthalten und in denen auf die Zugabe von Konservierungsmitteln, Harnstoff oder Humanserumalbumin verzichtet werden kann.

**[0002]** Erythropoietin, kurz EPO genannt, ist ein Glykoprotein, das die Bildung von Erythrocyten im Knochenmark anregt. EPO wird hauptsächlich in den Nieren gebildet und gelangt von dort aus über den Blutkreislauf zu seinem Zielort. Bei Niereninsuffizienz produzieren die geschädigten Nieren zu wenig oder überhaupt kein EPO, was zur Folge hat, dass aus den Stammzellen des Knochenmarks zu wenig Erythrocyten hervorgehen. Diese renale Anämie kann durch Verabreichung von EPO in physiologischen Mengen, die die Bildung von Erythrocyten im Knochenmark stimulieren, behandelt werden. Das zur Verabreichung verwendete EPO kann entweder aus Humanurin gewonnen oder durch gentechnologische Methoden erzeugt werden. Da EPO im menschlichen Körper nur in geringen Spuren enthalten ist, ist die Isolierung von EPO aus der natürlichen Quelle für therapeutische Anwendungen praktisch unmöglich. Daher bieten gentechnische Methoden die einzige wirtschaftliche Möglichkeit, diesen Stoff in größeren Mengen zu produzieren.

**[0003]** Die rekombinante Herstellung von Erythropoietin ist seit der Identifizierung des humanen Erythropoietin-Gens im Jahr 1984 möglich. Seit Anfang der 90er Jahre sind verschiedene Arzneimittel entwickelt worden, die humanes Erythropoietin enthalten, das auf gentechnologischem Weg in eukaryontischen Zellen, vor allem in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) produziert wurde. Die Herstellung von rekombinantem humanem Erythropoietin ist beispielsweise beschrieben in EP-A-0 148 605 und EP-A-205 564.

**[0004]** EPO wird üblicherweise in flüssiger Form formuliert und wird als solche intravenös oder subkutan injiziert. Allerdings ergeben sich bei der Flüssigformulierung von EPO Probleme hinsichtlich der Stabilität. Diese sind möglicherweise auf eine Zerstörung der Erythropoietin-Moleküle durch katalytische Effekte der Oberfläche der zur Aufbewahrung dienenden Behältnisse zurückzuführen. Des Weiteren wird vermutet, dass eine Adsorption der EPO-Moleküle an die Gefäßwand eintritt und es hierdurch zu einem Verlust an Protein und Aktivität kommt. Daher wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze verfolgt, Flüssigformulierungen von EPO durch Zusatz verschiedener Stoffe zu stabilisieren. Zu diesen stabilisierenden Verbindungen gehören zum Beispiel polymere Substanzen wie Polyethylenglykol, Dextrane und Gelatine, sowie verschiedene Zucker und Zuckeralkohole, anorganische Salze und Thiolverbindungen. Häufig werden auch Serumproteine wie Humanserumalbumin (HSA) zugesetzt. Die Verwendung dieser Serumproteine ist allerdings aus allergener und immunologischer Sicht nicht wünschenswert.

**[0005]** In EP-A-0 306 824 wird die Verwendung verschiedener Aminosäuren als Stabilisatoren in EPO-Formulierungen beschrieben, wobei die Aminosäuren zusammen mit Harnstoff zur Stabilisierung des EPO eingesetzt werden. Zudem erfolgt die Lagerung der in EP-A-0 306 824 beschriebenen Formulierungen nicht in flüssiger Form, sondern als Lyophilisat, das unmittelbar vor der Anwendung mit Wasser rekonstituiert wird.

**[0006]** In EP-A-0 607 156 werden EPO-Formulierungen beschrieben, die dank der Gegenwart eines Konservierungsmittels stabil und haltbar sind.

**[0007]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine lagerstabile EPO-Zubereitung herzustellen, die in flüssiger Form über längere Zeit gelagert werden kann und die ohne Zusatzstoffe wie HSA, Harnstoff oder Konservierungsmittel auskommt. Auf diese Weise soll eine stabile EPO-Flüssigformulierung bereitgestellt werden, die möglichst jedes Risiko für die Verträglichkeit der Formulierung vermeidet.

**[0008]** Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch den Gegenstand des Anspruchs 1. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen definiert.

**[0009]** Es wurde gefunden, dass EPO-Zusammensetzungen, die eine bestimmte Kombination von Aminosäuren enthalten, auch bei Abwesenheit von HSA, Harnstoff oder polymeren Stabilisierungsmitteln in flüssiger Form über längere Zeit stabil gelagert werden können, ohne dass es zu signifikanten Stabilitätsverlusten kommt.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine lagerstabile Erythropoietin-Flüssigformulierung, die

- (i) mindestens vier Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin enthält,
- (ii) frei von Konservierungsmitteln, Harnstoff und Serumproteinen ist, und
- (iii) nicht aus einem Lyophilisat rekonstituiert wurde.

**[0011]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist zusätzlich die Aminosäure Glycin enthalten.

**[0012]** Die erfindungsgemäße Flüssigformulierung bietet nicht nur die Vorteile, dass sie auf potentiell immunogene Verbindungen verzichtet und insgesamt eine möglichst geringe Anzahl von verschiedenen Verbindungsklassen enthält, sondern sie erfordert auch in keiner Phase der Herstellung eine Lyophilisierung. Hierdurch werden zum einen die mit einer Lyophilisierung verbundenen Kosten eingespart, zum anderen werden die Risiken mechanischer Probleme, z.B.

wenn sich das Lyophilisat nicht in vollständiger oder ausreichender Weise rekonstituieren lässt, vermieden.

**[0013]** Unter dem Begriff "lagerstabil" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass der Gehalt an aktiven EPO-Molekülen nach dreimonatiger Lagerung der EPO-Flüssigformulierung bei 25°C immer noch 80% oder mehr der Ausgangskonzentration beträgt. Vorzugsweise beträgt der Restgehalt an EPO-Aktivität nach dreimonatiger Lagerung bei 25°C noch mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 95% der Ausgangsaktivität. Die Aktivität des Erythropoietins kann mittels üblicher Aktivitätstests, wie sie bereits für EPO im Stand der Technik beschrieben sind, bestimmt werden, siehe ergänzend auch Europäische Pharmacopoeia, 01/2002: 1316 (4. Auflage).

**[0014]** Unter dem Begriff "Flüssigformulierung" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass die Formulierung von Erythropoietin zusammen mit den anderen in der Formulierung enthaltenen Stoffen in keiner Phase des Herstellungsprozesses, also weder vor noch während oder nach dem Mischen der Stoffe, lyophilisiert wird und die Formulierung für die intravenöse oder subkutane Applikation als Injektions- oder Infusionslösung bestimmt ist.

**[0015]** Die erfindungsgemäße Formulierung enthält keine Aminosäuren, bei denen es sich nicht um Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Phenylalanin oder Glycin handelt. Bevorzugt enthält die Formulierung keine anderen Aminosäuren als Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Phenylalanin und Glycin. Insbesondere enthält die EPO-Formulierung gemäß der vorliegenden Erfindung keine basischen Aminosäuren. Ebenfalls enthält die Formulierung keine Aminoessigsäure. Die zwingende Abwesenheit von Serumproteinen oder anderen stabilisierenden Proteinen, von Harnstoff und Konservierungsmitteln in der erfindungsgemäßen Formulierung wurde bereits oben angesprochen.

**[0016]** Die Konzentration von Isoleucin und Leucin, soweit diese Aminosäuren in der Formulierung enthalten sind, beträgt jeweils 0,25 bis 1,5 g/l, bevorzugt 0,5 bis 1,25 g/l und besonders bevorzugt 1,0 g/l.

**[0017]** Die Konzentration von Glutaminsäure und Asparaginsäure, soweit diese Aminosäuren in der Formulierung enthalten sind, beträgt 0,1 bis 0,5 g/l, bevorzugt 0,2 bis 0,4 g/l und besonders bevorzugt 0,25 g/l.

**[0018]** Die Konzentration von Threonin, soweit diese Aminosäure in der Formulierung enthalten ist, beträgt 0,1 bis 0,5 g/l, bevorzugt 0,2 bis 0,4 g/l, besonders bevorzugt 0,25 g/l.

**[0019]** Die Konzentration von Phenylalanin, soweit diese Aminosäure in der Formulierung enthalten ist, beträgt 0,2 bis 1,0 g/l, bevorzugt 0,3 bis 0,8 g/l und besonders bevorzugt 0,5 g/l.

**[0020]** Die Konzentration von Glycin in der erfindungsgemäßen Formulierung beträgt, soweit diese Aminosäure in der Formulierung enthalten ist, 2,0 bis 10,0 g/l, bevorzugt 5,0 bis 8,0 g/l und besonders bevorzugt 7,5 g/l.

**[0021]** Das Erythropoietin, das sich zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Formulierungen eignet, ist rekombinantes Erythropoietin, hergestellt in eukaryontischen Zellen. Bevorzugt wird das rekombinante Erythropoietin in Säugerzellen, besonders bevorzugt in CHO-Zellen hergestellt, wie z.B. beschrieben in EP-A-0 205 564 und EP-A-0 148 605. Nach der Fermentation, die nach herkömmlichen Protokollen erfolgt, findet eine Aufreinigung des rekombinanten Erythropoietins mittels chromatographischer Methoden statt. Sowohl die Fermentierung als auch die Reinigung des Proteins sind ebenfalls im Stand der Technik beschrieben, z.B. in EP-A-0 830 376. Die Reinigung von Erythropoietin ist auch Gegenstand von EP-A-0 228 452, EP-A-0 428 267 und WO-A-03/045996. Aber auch andere übliche Reinigungstechniken und Abfolgen von Reinigungsschritten können angewandt werden.

**[0022]** Unter "Erythropoietin" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jedes Protein verstanden, das in der Lage ist, die Erythrocyten-Bildung im Knochenmark zu stimulieren und gemäß dem in der Europäischen Pharmacopoeia (Ph. Eur.; 01/2002:1316) beschriebenen Assay eindeutig als Erythropoietin identifiziert werden kann (Bestimmung der Aktivität in polycythämischen oder normocythämischen Mäusen). Bei dem Erythropoietin kann es sich um das wildtypische humane Erythropoietin oder um eine Variante davon mit einem oder mehreren Aminosäureaustauschen, -deletionen oder -additionen handeln. Ebenso kann es sich bei dem in der erfindungsgemäßen Formulierung enthaltenen Erythropoietin um ein Konjugat handeln, in dem das Protein in konjugierter Form z.B. mit Polymeren wie etwa Polyalkylenglykolen vorliegt, sog. PEGyliertes Erythropoietin.

**[0023]** Die erfindungsgemäße Formulierung enthält in einer bevorzugten Ausführungsform weder Zucker noch Zuckerkohole zur Stabilisierung. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die Formulierung keine polymeren Verbindungen als Stabilisierungsmittel enthält. Die Formulierung ist zudem frei von Konservierungsmitteln, wobei hierunter Substanzen verstanden werden, die üblicherweise als Konservierungsmittel zur Erhöhung der Haltbarkeit eingesetzt werden und in den dabei üblichen Konzentrationen bakterizid wirken. Insbesondere enthält die Formulierung keine Konservierungsmittel wie Chlorethon, Benzylalkohol, pChlor-m-Kresol und Pyrokohlensäure-Dialkylester und Benzalkoniumchlorid.

**[0024]** Der pH-Wert der Formulierung liegt nicht wesentlich über dem pH-Wert des Blutes, also möglichst nicht über 7,4. Der pH-Wert der Formulierung beträgt in der Regel zwischen 6,0 und 7,4, bevorzugt zwischen 6,5 und 7,4 und besonders bevorzugt zwischen 7,0 und 7,4. Der pH-Wert wird, falls eine Einstellung in den angestrebten pH-Bereich erforderlich ist, mit geeigneten Lösungen eingestellt, wenn eine Erniedrigung des pH-Werts angezeigt ist, mit sauren Lösungen, wenn eine Erhöhung erzielt werden soll, mit basischen Lösungen. Bevorzugt wird der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

**[0025]** Als Lösungsmittel wird bevorzugt reines Wasser für Injektionszwecke verwendet. Aber auch andere für phar-

mazeutische Zubereitungen geeignete und übliche Lösungsmittel können eingesetzt werden.

**[0026]** Bei dem eingesetzten Puffer kann es sich um jeden physiologisch verträglichen Puffer handeln, der es ermöglicht, in den für Injektions- bzw. Infusionslösungen erforderlichen Konzentrationen in dem oben angegebenen pH-Bereich zu puffern. Geeignete Puffer sind z.B. Phosphat, Citrat, Carbonat und HEPES. Die Verwendung eines Phosphatpuffers ist bevorzugt. Die Pufferverbindung bzw. -Verbindungen werden in einer Konzentration von etwa 20 bis 100 mM, bevorzugt 30 bis 80 mM und besonders bevorzugt 40 bis 60 mM eingesetzt.

**[0027]** Als weitere Komponente enthält die erfindungsgemäße Formulierung in einer bevorzugten Ausführungsform ein oberflächenaktives Mittel. Die Verwendung eines Detergens soll die Adsorption von EPO an die Gefäßwände verringern. Hierzu reichen in der Regel geringe Mengen eines Detergens aus. Grundsätzlich kann jedes physiologisch verträgliche Detergens im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Besonders geeignet sind Polyoxyethylensorbitanalkylester oder Sorbitantrioleat, wobei Polyoxyethylensorbitanalkylester besonders bevorzugt sind. Bei dem Polyoxyethylensorbitanalkylester handelt es sich bevorzugt um Polysorbat 20 und/oder Polysorbat 80, wobei Polysorbat 20 am meisten bevorzugt ist. Die Konzentration des Detergens beträgt zwischen 0,01 bis 1,0 g/l, bevorzugt zwischen 0,05 und 0,2 g/l und am meisten bevorzugt 0,1 g/l.

**[0028]** Weiterhin enthält die Formulierung in bevorzugten Ausführungsformen geringe Mengen eines physiologisch verträglichen Komplexbildners. Bei dem Komplexbildner handelt es sich zum Beispiel um Calciumsalze, Citrat oder EDTA. Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Calcium-enthaltende Salze, wie z.B. Calciumchlorid. Die Konzentration des Calciumsalzes beträgt zwischen 0,005 und 0,05 g/l, bevorzugt zwischen 0,008 und 0,012 g/l und besonders bevorzugt 0,01 g/l.

**[0029]** Zur Einstellung der Osmolalität kann jedes geeignete Salz eingesetzt werden. Bevorzugt wird hierzu Natriumchlorid verwendet. Dabei liegt die Konzentration des Natriumchlorids im Bereich von 0,5 bis 2,5 g/l, bevorzugt zwischen 1,0 und 2,0 g/l und besonders bevorzugt zwischen 1,3 und 1,6 g/l.

**[0030]** Die Osmolalität der Flüssigformulierung beträgt 200 bis 400 mosmol/kg, bevorzugt 250 bis 300 mosmol/kg und am meisten bevorzugt 260 bis 290 mosmol/kg.

**[0031]** Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht eine EPO-Flüssigformulierung vor, die neben dem Wirkstoff EPO die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Phenylalanin und Glycin sowie Calciumchlorid, Polysorbat, Phosphatpuffer und Natriumchlorid enthält, wobei weitere Inhaltsstoffe nicht vorhanden sind.

**[0032]** Die Wirksamkeit des verwendeten Erythropoietins sollte nicht unter 100.000 IE/mg liegen (siehe auch Europäische Pharmacopoeia, 01/2002:1316 (4. Auflage). Bevorzugt hat das EPO eine Aktivität von mindestens 110.000 IE/mg, besonders bevorzugt von mindestens 120.000 IE/mg.

**[0033]** Die Konzentration an Erythropoietin richtet sich nach der jeweils erwünschten Wirkstoffkonzentration in der Fertigspritze. Typische EPO-Konzentrationen liegen zwischen 1500 IE/ml bis 40.000 IE/ml, siehe z.B. Handelsprodukte NeoRecormon® und Erypo® in ROTE LISTE 2004.

**[0034]** Die Komponenten der Formulierung können von üblichen Quellen bezogen werden, z.B. von der Firma Sigma oder der Firma Merck.

**[0035]** Die Herstellung der Formulierung kann nach im Stand der Technik üblichen Methoden erfolgen.

**[0036]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen EPO-Flüssigformulierung. Dabei werden die oben genannten Bestandteile der Formulierung in einem wässrigen Puffer gelöst. Bei dem wässrigen Puffer handelt es sich, wie oben ausgeführt, vorzugsweise um einen Phosphatpuffer.

**[0037]** In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der Flüssigformulierung wird zunächst das Lösungsmittel, bevorzugt Wasser für Injektionszwecke, vorgelegt und anschließend Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat und Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat als Puffer, Calciumchlorid, Natriumchlorid und die eingesetzten Aminosäuren, bei denen es sich bevorzugt um Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure und Phenylalanin handelt, in dem Lösungsmittel gelöst. Nach vollständiger Auflösung der Bestandteile wird eine Lösung von Polysorbat (in dem jeweiligen Lösungsmittel) zugegeben. Schließlich wird im nächsten Schritt eine Lösung von Erythropoietin (in dem jeweiligen Lösungsmittel) zugegeben.

**[0038]** Während der Herstellung und am Ende der Herstellung wird der pH-Wert der Lösung bestimmt und falls erforderlich in den Bereich zwischen 7,0 und 7,4 korrigiert, unter Einsatz geeigneter Lösungen, insbesondere NaOH oder HCl.

**[0039]** Schließlich wird die fertige Flüssigformulierung in ein geeignetes Behältnis abgefüllt, in dem es bis zur Applikation gelagert wird. Bei dem Behältnis handelt es sich insbesondere um Fertigspritzen, Durchstichflaschen oder Ampullen.

**[0040]** Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie einzuschränken.

#### Beispiele

##### 1 . Erythropoietin-Flüssigformulierung

**[0041]** Herstellung einer Flüssigformulierung von Erythropoietin mit einer Wirkstoffstärke von 3.333 IE/ml.

EP 1 806 361 A1

Bestandteil	Gehalt pro Fertigspritze
EPO	3.333 IE/ml
Polysorbat 20	0,1 mg
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	1,43 mg
Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat	5,6 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 mg
Glycin	7,5 mg
Leucin	1,0 mg
Isoleucin	1,0 mg
Threonin	0,25 mg
Glutaminsäure	0,25 mg
Phenylalanin	0,5 mg
Natriumchlorid	1,43 mg
Natriumhydroxid 0,1 n*	q.s.
Salzsäure 0,1 n*	q.s.
Wasser	ad 1,0 ml
Stickstoff**	q.s.
* Zur pH-Wert-Einstellung	
** Zur Begasung der Lösung bei der Herstellung und Abfüllung	

**[0042]** Sämtliche Inhaltsstoffe weisen eine Qualität gemäß Europäischer Pharmacopoeia (Ph. Eur.) auf.

2. Herstellung einer Flüssigformulierung für Erythropoietin mit einer Wirkstoffstärke von 10.000 IE/ml

**[0043]** Die Gehalte der einzelnen Bestandteile pro Fertigspritze entsprechen mit Ausnahme des Gehalts an Erythropoietin denen in Beispiel 1. Der Gehalt an Erythropoietin beträgt in diesem Fall 10.000 IE/ml.

**[0044]** Die Formulierungen werden in Glasspritzen abgefüllt und als Fertigspritzen gelagert.

3. Herstellung einer EPO-Flüssigformulierung mit einer Ansatzgröße von einem Liter

**[0045]** Bei einer exemplarischen Ansatzgröße von 11, einem beispielhaften Proteingehalt von 1.000 µg/ml und einer Aktivität von 130.000 IE/mg Protein ergibt sich die in nachfolgender Tabelle angegebene Zusammensetzung (angenommene Dichte des Wirkstoffbulks: 1,008 g/l).

**[0046]** Dabei wird eine Wirkstofflösung hergestellt, enthaltend Erythropoietin, Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat und Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumchlorid und Wasser, deren Zusammensetzung in die Berechnung der einzuwiegenden Mengen der entsprechenden Bestandteile mit einfließt.

Ausgangsstoffe		
Ansatzmenge*	1 l = 1.006,7 g	1 l = 1.006,7 g
Wirkstoffstärke	3.333 IE/ml	10.000 IE/ml
Wirkstoffgehalt	25,6 µg/ml	76,9 µg/ml
Wirkstofflösung	25,64 g	76,97 g
Polysorbat 20	0,1 g	0,1 g
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat**	1,43 g	1,43 g
Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat**	5,6 g	5,6 g

## EP 1 806 361 A1

(fortgesetzt)

	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01g	0,01g
5	Glycin	7,5 g	7,5 g
	Leucin	1,0 g	1,0 g
	Isoleucin	1,0 g	1,0 g
	Threonin	0,25 g	0,25 g
10	Glutaminsäure	0,25 g	0,25 g
	Phenylalanin	0,5 g	0,5 g
	Natriumchlorid**	1,43 g	1,43 g
15	Natriumhydroxid 0,1 n***	q.s.	q.s.
	Salzsäure 0,1 n***	q.s.	q.s.
	Wasser**	984,9	984,9
20	Stickstoff	q.s.	q.s.
25	<p>* Die Ansatzgröße ergibt sich nach der eingesetzten Wirkstoffmenge und dem Proteingehalt, der mit Hilfe von RP-HPLC ermittelt wurde.</p> <p>** Einzuwiegende Menge. In die Mengenermittlung fließt der Gehalt der Hilfsstoffe der Wirkstofflösung mit ein.</p> <p>*** Zur pH-Wert-Einstellung, verbrauchte Menge fließt in die Mengenermittlung mit ein.</p>		

### 4. Verfahren zur Herstellung der EPO-Flüssigformulierung

**[0047]** 80% des Wassers für Injektionszwecke werden in den Ansatzbehälter vorgelegt. Die Temperatur des Wassers wird kontrolliert, sie soll unter 25°C betragen. Anschließend erfolgt vorsichtig unter Rühren und Stickstoffschutz die Zugabe der entsprechenden eingewogenen Mengen laut oben angegebener Zusammensetzung: Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Calciumchlorid, Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Phenylalanin und Natriumchlorid. Die Lösung wird bis zur vollständigen Auflösung aller Bestandteile zu einer homogenen Lösung, mindestens aber 15 Minuten gerührt. Anschließend wird das Polysorbat 20 in Form einer separat hergestellten Lösung in Wasser für Injektionszwecke in den Ansatzbehälter gegeben. Die Lösung wird mindestens 15 Minuten gerührt.

**[0048]** Zur pH-Wert-Einstellung werden im Ansatzbehälter Temperatur und pH-Wert des Ansatzes überprüft. Die Temperatur soll zwischen 18 und 25°C liegen. Der pH-Wert soll in einem Bereich von 7,0 - 7,4 liegen. Liegt der pH-Wert über 7,4, wird er mit 0,1 n Salzsäure eingestellt. Liegt der pH-Wert unter pH 7,0, wird die Korrektur mit 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung vorgenommen. Die Lösung im Ansatzbehälter wird 10 Minuten gerührt.

**[0049]** Nach Einstellung des pH-Wertes wird die entsprechende Menge des Erythropoietin-Proteins in den Ansatzbehälter gegeben.

**[0050]** Nochmals werden die Temperatur (Soll zwischen 18 und 25°C) und der pH-Wert des Ansatzes überprüft. Liegt der pH-Wert über 7,4 bzw. unter 7,0 wird mit 0,1 n Salzsäure resp. 0,1 n Natriumhydroxid-Lösung korrigiert.

**[0051]** Mit Wasser für Injektionszwecke wird auf das berechnete Endgewicht der Lösung im Ansatzbehälter aufgefüllt und anschließend mindestens 15 Minuten gerührt. Gegebenenfalls muss der pH-Wert noch einmal wie oben angegeben in den Bereich zwischen 7,0 und 7,4 korrigiert werden. Die fertige EPO-Flüssigformulierung wird in Fertigspritzen abgefüllt, die nach dem Befüllen mit Kolbenstopfen verschlossen werden.

### 5. Langzeitstabilität der erfindungsgemäßen EPO-Formulierungen

**[0052]** Die Langzeitstabilität der erfindungsgemäßen EPO-Formulierungen wurde im Vergleich zu dem BRP-Standard als Referenz überprüft. Der Test beruht darauf, dass bei der Lagerung von EPO-Lösungen Abbau- und Nebenreaktionen auftreten, die u.a. zur Oxidation von Methionin- und Cystein-Seitenketten führen können. Insbesondere Met54 von EPO wird häufig unter Bildung des entsprechenden Sulfoxids oxidiert. Dieses Methioninsulfoxid kann nach proteolytischem Verdau des EPO mit Trypsin durch eine rp-HPLC-Analyse detektiert werden. Der Anteil an Methionin-oxidierten Spezies ist dabei ein Indikator für die Lagerstabilität, d.h. je höher der Anteil, desto geringer die Lagerstabilität. Die Bestimmung

des Anteils an Methionin-oxidierten Spezies in den erfindungsgemäßen Formulierungen bei verschiedenen Lagertemperaturen (2-8°C, 25°C und 40°C) und verschiedenen Lagerzeiträumen (6 Wochen, 12 Wochen und 6 Monate) im Vergleich zu Formulierungen des Standes der Technik zeigte, dass die erfindungsgemäßen Formulierungen eine Stabilität aufweisen, die mit der der Flüssigformulierungen des Standes der Technik vergleichbar ist.

5

### Patentansprüche

10

1. Lagerstabile Erythropoietin-Flüssigformulierung, die

- (i) mindestens vier Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin enthält,
- (ii) frei von Konservierungsmitteln, Harnstoff und HSA ist, und
- (iii) nicht aus einem Lyophilisat rekonstituiert wurde.

15

2. Formulierung nach Anspruch 1, wobei des weiteren Glycin enthalten ist.

3. Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, weiter umfassend ein nichtionogenes Detergenz.

20

4. Formulierung nach Anspruch 3, wobei es sich bei dem Detergenz um einen Polyoxyethylensorbitanalkylester handelt.

25

5. Formulierung nach Anspruch 4, wobei es sich bei dem Polyoxyethylensorbitanalkylester um Polysorbat 20 oder Polysorbat 80 handelt.

6. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Osmolalität 250 mosmol/kg bis 300 mosmol/kg beträgt.

7. Formulierung nach Anspruch 6, wobei die Osmolalität mit Natriumchlorid eingestellt ist.

30

8. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, weiter enthaltend einen physiologisch verträglichen Puffer.

9. Formulierung nach Anspruch 8, wobei der Puffer ein Phosphatpuffer ist.

35

10. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 liegt.

11. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, weiter enthaltend Calciumionen.

12. Formulierung nach Anspruch 11, wobei die Calciumionen aus Calciumchlorid stammen.

40

13. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Konzentration von Isoleucin und Leucin, soweit enthalten, jeweils 0,25 bis 1,5 g/l beträgt.

14. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Konzentration von Glutaminsäure und Asparaginsäure, soweit enthalten, 0,1 bis 0,5 g/l beträgt.

45

15. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Konzentration von Threonin, soweit enthalten, 0,1 bis 0,5 g/l beträgt.

50

16. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Konzentration von Phenylalanin, soweit enthalten, 0,2 bis 1,0 g/l beträgt.

17. Formulierung nach einem der Ansprüche 2 bis 16, wobei die Konzentration von Glycin, soweit enthalten, 2,0 bis 10,0 g/l beträgt.

55

18. Verfahren zur Herstellung einer lagerstabilen Erythropoietin-Flüssigformulierung umfassend: Lösen der Bestandteile Erythropoietin, der Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Phenylalanin und Glycin sowie Calciumchlorid, Polyoxyethylensorbitanalkylester, Natriumchlorid in einem wässrigen Puffer, wobei die Formulierung in keiner Phase des Verfahrens lyophilisiert wird.

## EP 1 806 361 A1

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Bestandteile in der folgenden Reihenfolge gelöst werden:

- a) Calciumchlorid,
- b) Natriumchlorid,
- c) Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Phenylalanin und Glycin,
- d) Polyoxyethylensorbitanalkylester und
- e) Erythropoietin.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55





EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
D,A	EP 0 306 824 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15. März 1989 (1989-03-15)	1-17	INV. C07K14/505 A61K47/18
X	* Zusammenfassung * * Seite 4; Beispiel 1 * * Seite 12; Ansprüche 1-12 *	18,19	
A	WO 00/61169 A (ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC) 19. Oktober 2000 (2000-10-19) * das ganze Dokument *	1-19	
A	EP 0 909 564 A (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 21. April 1999 (1999-04-21) * das ganze Dokument *	1-19	
A	EP 0 178 665 A (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 23. April 1986 (1986-04-23) * das ganze Dokument *	1-19	
A	US 2003/162711 A1 (BJORN SOREN ET AL) 28. August 2003 (2003-08-28) * das ganze Dokument *	1-19	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			C07K A61K
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
München		23. Mai 2007	
		Prüfer	
		Grötzingler, Thilo	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 07 10 6020

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

23-05-2007

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0306824	A	15-03-1989	AU 2173988 A	27-04-1989
			CA 1330301 C	21-06-1994
			CN 1031801 A	22-03-1989
			CS 8805901 A2	13-12-1990
			DD 273004 A5	01-11-1989
			DE 3729863 A1	16-03-1989
			DK 483188 A	06-03-1989
			ES 2051806 T3	01-07-1994
			FI 884051 A	06-03-1989
			GR 3005454 T3	24-05-1993
			HK 89495 A	16-06-1995
			HU 47863 A2	28-04-1989
			IE 60310 B1	29-06-1994
			IL 87628 A	08-07-1993
			JP 1071818 A	16-03-1989
			JP 2057196 C	23-05-1996
			JP 7080782 B	30-08-1995
			LV 10178 A	20-10-1994
			MX 12880 A	01-12-1993
			NO 883926 A	06-03-1989
			NZ 225975 A	26-07-1991
			PH 25618 A	08-08-1991
			PL 274485 A1	17-04-1989
			PT 88417 A	31-07-1989
			RU 2043118 C1	10-09-1995
			RU 2100032 C1	27-12-1997
			US 4992419 A	12-02-1991
ZA 8806528 A	30-05-1989			
-----				
WO 0061169	A	19-10-2000	AR 029623 A1	10-07-2003
			AU 775041 B2	15-07-2004
			AU 4218600 A	14-11-2000
			BR 0010665 A	09-03-2004
			CN 1354669 A	19-06-2002
			EP 1181036 A1	27-02-2002
			HU 0201068 A2	28-08-2002
			JP 2002541208 T	03-12-2002
			MX PA01010208 A	21-07-2003
			NO 20014893 A	15-11-2001
			NZ 515380 A	31-10-2003
			PL 351837 A1	16-06-2003
			RU 2225221 C2	10-03-2004
			TR 200103788 T2	21-05-2002
			ZA 200109236 A	08-12-2003
			-----	
EP 0909564	A	21-04-1999	AT 330622 T	15-07-2006

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 07 10 6020

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

23-05-2007

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0909564	A		AU 722300 B2	27-07-2000
			AU 2407497 A	19-11-1997
			DE 69736177 T2	16-05-2007
			WO 9740850 A1	06-11-1997
			TW 518219 B	21-01-2003
			TW 240627 B	01-10-2005
			US 6120761 A	19-09-2000
			US 6277367 B1	21-08-2001
EP 0178665	A	23-04-1986	CA 1258629 A1	22-08-1989
			JP 61097229 A	15-05-1986
			US 4806524 A	21-02-1989
US 2003162711	A1	28-08-2003	US 2002077461 A1	20-06-2002

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente**

- EP 0148605 A [0003] [0021]
- EP 205564 A [0003]
- EP 0306824 A [0005] [0005]
- EP 0607156 A [0006]
- EP 0205564 A [0021]
- EP 0830376 A [0021]
- EP 0228452 A [0021]
- EP 0428267 A [0021]
- WO 03045996 A [0021]