



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 298 053 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 37/02
A 61 K 31:195
C 07 K 7:48

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 61 K / 344 215 4
(31) USSNO7/413,841

(22) 26.09.90
(32) 28.09.89

(44) 06.02.92
(33) US

(71) siehe (73)
(72) Goldstein, Gideon; Audhya, Tapan, US
(73) Immunobiology Research Institute, Inc., Route 22 East, P. O. Box 9 99 Annandale, New Jersey 08801, US
(74) Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Partner, Patentanwälte, Maximilianstraße 58, W - 8000 München 22, DE

(54) **Verfahren zum Herstellen einer stabilen Zubereitung eines pharmazeutischen Peptides**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen wäßriger Formulierungen von pharmakologisch erwünschten Peptiden. Das Verfahren erlaubt den Peptiden, ihre biologische Aktivität während einer Lagerung bei Raumtemperatur zu erhalten.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Erzeugen einer stabilen Zubereitung eines pharmazeutischen Peptides, umfassend das Stabilisieren einer Lösung des Peptides in einem physiologisch akzeptablen wäßrigen Puffer mit zwischen 0,1 bis 5 Vol.-% einer Aminosäure, wobei die biologische Aktivität der Peptidformulierung unter Raumtemperatur überschreitenden Temperaturbedingungen erhalten bleibt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäurekonzentration 2 Vol.-% beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäure aus der die Aminosäuren Glycin, Arginin, Lysin, Glutamin, Asparginsäure und Histidin umfassenden Gruppe ausgewählt sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Puffer Citratpuffer ist.
5. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäure Glycin ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Peptidzusammensetzung einen pH von zwischen 6,2 und 7,4 aufweist.
7. Stabile wäßrige Peptidformulierung, hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Peptidformulierung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Peptid Thymopentin ist.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Die vorliegende Erfindung betrifft stabile Formulierungen für Zubereitungen von niedrigdosierten Peptiden für die therapeutische Verwendung. Die Erfindung betrifft insbesondere eine Formulierung zum Stabilisieren von Thymopentin in einer niedrigen Konzentration.

Viele Peptide, insbesondere ungefähr drei bis ungefähr 20 Aminosäuren lange Peptide, sind in niedrigen Konzentrationen in wäßrigen Formulierungen instabil und neigen dazu, biologische Aktivität zu verlieren, während gleichzeitig die chemische Stabilität und die Struktur erhalten bleiben. Außerdem gibt es eine Anzahl größerer Peptide oder Polypeptide, die einem ähnlichen Aktivitätsverlust bei Verwendung in niedrigdosierten wäßrigen Konzentrationen unterliegen, beispielsweise Enkephalin, Tuftsin, Interleukin 2 und das Gehirneuropeptid Substanz P. Zur Zeit ist die einzig bekannte Art, die biologische Aktivität solcher Peptide in wäßrigen Formulierungen, die für injizierbare klinische Dosierungen geeignet sind, zu erhalten, die Lagerung in hohen Konzentrationen. Im allgemeinen sind für die Lagerung hoher Konzentrationen von mehr als 50 mg/ml strenge Kühlbedingungen, beispielsweise zwischen 2 und 8°C oder ungefähr 4°C, erforderlich. Niedrigere Konzentrationen, beispielsweise von weniger als 10 mg/ml, sind häufig selbst unter strengen Kühlbedingungen instabil.

Ein Beispiel eines Peptides, das einem solchen Verlust seiner biologischen Aktivität bei niedrigen Konzentrationen in wäßriger Formulierung unterliegt, ist Thymopentin, ein Pentapeptid von nachgewiesenem pharmakologischem Nutzen und nachgewiesener pharmakologischer Bedeutung. Siehe beispielsweise US-PS 4 190 646 und Goldstein, G., *Nature (London)* 247: 11-14 (1974); Basch, R. S. und Goldstein, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1474-1478 (1974); Scheid, M. P. et al., *J. Exp. Med.* 147: 1727-1743 (1978); Scheid, M. P. et al., *Science* 190: 1211-1213 (1975); Ranges, G. E. et al., *J. Exp. Med.* 156: 1057-1064 (1982); T. Audhya et al., *Biochem.* 20: 6195-6200 (1981); Venkatasubramanian, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3171-3174 (1986); Malaise M. G. et al., in „Immunoregulatory UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology“, eds. Goldstein, G., et al. (Liss, New York) (1986); Sunshine, G. H. et al., *J. Immunol.* 120: 1594-1599 (1978) und E. Rentz et al., *Arch. Geschwulstforsch.* 54(2): 113-118 (1948). Siehe ebenso US-PS 4 261 886; 4 361 673; 4 420 424 und 4 629 723. Auf diese Referenzen und Patente wird hiermit hinsichtlich ihrer Offenbarung von Thymopentin und den Verfahren zu seiner Herstellung Bezug genommen.

In Experimenten mit Thymopentin wurde beobachtet, daß die optimalen Dosen für Thymopentin in einer injizierbaren wäßrigen Formulierung für die Immunstimulation in Labortieren ungefähr 1 µg/kg Körpergewicht betragen. Für die Verwendung im Labor wurden diese Dosierungen unmittelbar vor der Verwendung hergestellt. Daran anschließende klinische Untersuchungen am Menschen wiesen darauf hin, daß sehr viel höhere Dosen, ungefähr 1 mg/kg Körpergewicht oder höher, erforderlich waren, um ein klinisch pharmakologisches Ergebnis in den Patienten hervorzurufen. Bei Zubereitungen von klinischen Mengen von Thymopentin in einer Dosierung von weniger als 10 mg/ml in wäßrigen Formulierungen wurde häufig festgestellt, daß sie biologisch inaktiv waren und so für einen Verlust der Wirksamkeit dieser Formulierungen geringer Konzentration in klinischen Studien verantwortlich waren.

Ein solcher Aktivitätsverlust bei einem pharmazeutisch verwendeten Peptid kann die therapeutische Behandlung eines Patienten beeinflussen, der ein bestimmtes pharmakologisch aktives Peptid benötigt. Ein Aktivitätsverlust in der Dosierungseinheit führt dazu, daß mit einer normalen Dosierungseinheit zu wenig aktives Peptid an den Patienten abgegeben wird. Daher wird die angemessene effektive Dosis des Peptides nicht an den Patienten abgegeben. Wenn der Aktivitätsverlust weniger als vollständig ist, macht es ein solcher variabler Verlust unmöglich, eine praktische pharmazeutische Dosierung genau zu bestimmen. Das einfache Erhöhen des Dosierungsspiegels des Peptides, um den Verlust zu kompensieren, ist praktisch nicht möglich, weil das Ausmaß des Verlustes unbekannt wäre und überschüssige Dosierungen der meisten Pharmazeutika ein erhöhtes Risiko ernsthafter Nebenwirkungen mit sich bringen. Solche ineffizienten Methoden zur Kompensation des Aktivitätsverlustes des Peptides erhöhen außerdem die Kosten des betroffenen Pharmazeutikums.

Eine zusätzliche Kühlung auf ungefähr 2 bis 8°C ist zum Erhalt der biologischen Aktivität gewisser Peptide und Polypeptide, einschließlich Thymopentins, erforderlich. Beispielsweise erfordern Thymopentinkonzentrationen von 50mg/ml eine Kühlung, um die Aktivität bis zu 2 Jahren und danach, dem herkömmlichen Industriestandard für stabile pharmazeutische Zubereitungen, zu erhalten.

Niedrigere Konzentrationen bleiben oft selbst mit Kühlung nicht aktiv. Die Notwendigkeit, diese Peptide in pharmazeutischen Dosierungen zu kühlen, erschwert die Herstellung, die Lagerung, den Transport und die Verwendung solcher Peptide ernsthaft. Beispielsweise kann eine mangelnde Kühlung oder eine Veränderung der Kühlungstemperatur während des Transportes solcher therapeutisch oder anders zu verwendenden Peptide oder während der Lagerung solcher Peptide, beispielsweise in Ländern, in denen geeignete klinische und pharmazeutische Gegebenheiten nicht verfügbar sind, die effektive Verwendung solcher Peptide selbst in höheren Konzentrationen verhindern.

Es besteht daher ein Bedarf für Verfahren zum Herstellen therapeutischer Peptide in einer wäßrigen Formulierung auf eine Weise, die die biologische Aktivität klinischer Mengen des Peptides bewahrt. In einer ersten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen biologisch aktiver wäßriger Formulierungen von therapeutisch aktiven Peptiden, die bei Raumtemperatur stabil sind.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen biologisch aktiver wäßriger Formulierungen niedriger Dosierung von therapeutisch aktiven Peptiden, die ihre biologische Aktivität beibehalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine stabile wäßrige Zubereitung eines erfindungsgemäß hergestellten Peptides. Als eine bevorzugte Ausführungsform stellt die Erfindung eine stabile wäßrige Zubereitung von Thymopentin zur Verfügung.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung detailliert erläutert.

Figurenbeschreibung

Fig. 1 ist eine graphische Aufzeichnung der Stabilität einer erfindungsgemäßen Thymopentinformulierung im Vergleich mit einer herkömmlichen Thymopentinformulierung, die ein Standardkonservierungsmittel enthält.

Fig. 2 ist eine Balkengraphik, die die Ergebnisse eines Stabilitätstests für Thymopentinformulierungen in Anwesenheit und in Abwesenheit von Aminosäuren unter variierenden Temperaturbedingungen bei der Lagerung zeigt.

Fig. 3 ist eine graphische Darstellung einer Untersuchung verschiedener Konzentrationen von Thymopentin in erfindungsgemäßen Formulierungen im Vergleich mit anderen Formulierungen unter erhöhten Lagerungstemperaturen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Stabilisieren wäßriger Zubereitungen von pharmakologisch erwünschten Peptiden. Das Verfahren verleiht Dosierungskonzentrationen von weniger als 10mg/ml von Peptiden, die normalerweise einen Verlust ihrer biologischen Aktivität selbst unter strengen Kühlungsbedingungen aufweisen, Stabilität. Weiterhin hat sich das Verfahren als nützlich für die Erhöhung der Stabilität über die Zeit bei großen Konzentrationen von mehr als 10mg/ml Peptid in wäßrigen Formulierungen erwiesen, ohne daß eine Kühlung erforderlich wäre. Nach diesem Verfahren können sowohl kleine Peptide mit einer Länge von zwischen 3 und 20 Aminosäuren als auch größere Peptide, die ebenso einen Aktivitätsverlust bei Lagerung erleiden oder gekühlt werden müssen, um ihre biologische Aktivität zu erhalten, hergestellt werden. Ein Beispiel für ein solches kleines Peptid, das einen biologischen Aktivitätsverlust erfährt, ist Thymopentin. Ein Beispiel eines größeren Peptides, das biologische Aktivität verliert, ist IL-2.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein ausgewähltes Peptid in einem herkömmlichen pharmazeutisch akzeptablen Puffer hergestellt. Da der Puffer für die Verwendung zum Herstellen eines therapeutischen Produktes, insbesondere für die Verwendung im Menschen, vorgesehen ist, muß er nichttoxisch und für die sichere Verwendung bei Menschen geeignet sein. Obwohl der Fachmann eine Anzahl von Puffern, die diese Qualifikation haben, auswählen kann, ist ein erfindungsgemäß bevorzugter Puffer der Citratpuffer. Andere erfindungsgemäß verwendbare Puffer umfassen Hepespuffer, Succinatpuffer, Histidin oder Maleatpuffer.

Weiterhin wird erfindungsgemäß das gepufferte Peptid bevorzugt bei einem geeignet kontrollierten pH hergestellt. Für Peptide wie Thymopentin liegt der pH-Wert für die Verabreichung an Menschen wünschenswerterweise im Bereich von ungefähr 6,8 bis ungefähr 7,4. Es können jedoch andere pH-Bedingungen angewendet werden und diese können mit dem ausgewählten Peptid variieren, wobei die durchschnittliche Ladung des Peptidmoleküls berücksichtigt wird. Die Auswahl eines geeigneten pH-Wertes für die wäßrige Lösung liegt im Bereich des Wissens des Fachmanns. Der pH kann mit geeigneten Säuren und Basen eingestellt werden, die für Menschen physiologisch sicher sind. Beispielsweise ist eine geeignete Base für solche pH-Einstellungen das Natriumhydroxid. Als Säure kann beispielsweise Salzsäure für die erfindungsgemäße pH-Einstellung verwendet werden. Erfindungsgemäß wird eine Lösung des ausgewählten Peptides, beispielsweise Thymopentin, in dem ausgewählten Puffer hergestellt. Es ist wünschenswert, daß die Lösung eine Konzentration von zwischen 1 µg bis 100mg Peptides pro ml eines geeigneten Puffers enthält. Für Thymopentin liegt der wünschenswerte Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100mg. Dem Fachmann ist bekannt, daß die in der Lösung gewählte Peptidkonzentration von dem ausgewählten Peptid abhängt, und daß die oben angegebenen Konzentrationsbereiche nicht für jedes Peptid, das durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisiert werden soll, kritisch sind. Die Auswahl anderer Konzentrationen für ausgewählte Peptide, abgesehen von Thymopentin, kann der Fachmann aus seinem Fachwissen treffen. Die Offenbarung ist nicht durch spezielle Konzentrationsbereiche beschränkt. Der entsprechenden Peptidlösung wird eine ausreichende Menge eines Aminosäuremoleküls zur Stabilisierung der Lösung zugefügt. Unter den für die Verwendung in diesem Verfahren bevorzugten Aminosäuren sind Glycin, Lysin, Arginin, Glutamin, Asparginsäure und Histidin. Die zur Zeit am stärksten bevorzugte Aminosäure für die Verwendung in diesem Verfahren ist Glycin. Obgleich die Erfindung nicht durch die Theorie eingeschränkt werden soll, wird gegenwärtig angenommen, daß die Ladungen auf den Aminosäuremolekülen die Stabilität der wäßrigen Formulierungen des Peptides steigern.

Die ausgewählte Aminosäure wird der verdünnten Lösung des Peptides in einer Konzentration von zwischen 0,1 bis 5 Gew.-% zugefügt. Ein bevorzugter Bereich ist zwischen 1 bis 3 Gew.-%. Gegenwärtig beträgt die am stärksten bevorzugte Konzentration der Aminosäure in der Thymopentinslösung 2 Gew.-%.

Die resultierende wäßrige Formulierung des ausgewählten Peptides ist nach Lagerung bei Umgebungs- oder Raumtemperatur, ungefähr 23°C, stabil. Kühlung ist nicht erforderlich, um die biologische Aktivität einer erfindungsgemäß hergestellten wäßrigen Peptidformulierung zu erhalten. Beispielsweise haben Stabilitätsstudien an erfindungsgemäß hergestellten Thymopentinformulierungen in einer Konzentration von 50 mg/ml gezeigt, daß diese Formulierungen mehr als 90 Tage bei 37°C oder Raumtemperatur stabil bleiben. Auf der Grundlage pharmazeutisch akzeptabler Standardtests wird angenommen, daß, da die Präparation bei 37°C drei Monate stabil war, solche Formulierungen zwei Jahre bei Raumtemperatur, 23°C, stabil sein werden.

Das erfindungsgemäße Stabilisierungsverfahren ist für die Verwendung zum Herstellen von Dosierungsformen einer Vielzahl therapeutischer Peptide, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, von Thymopentin, Thymoralin, Splenoralin, Wachstumshormon, Enkephalin und Tumornekrosefaktor geeignet. Die Auswahl und Größe des Peptides, das diesem Zubereitungsverfahren und der Stabilisierung unterworfen wird, ist für die Erfindung nicht kritisch. Daher ist das Verfahren nicht auf das besondere Peptid beschränkt, aber allgemein nützlich zum Überwinden biologischer Instabilität jedes Peptides oder Proteins in einer wäßrigen Formulierung, die für injizierbare Verabreichung geeignet ist. Die folgenden Beispiele erläutern das erfindungsgemäße Verfahren zum Herstellen stabiler wäßriger Peptidformulierungen eines beispielhaften Peptids, z. B. Thymopentin.

Beispiel 1

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Peptidformulierung werden die folgenden Bestandteile in einer Ansatzgröße von 20 l miteinander vereint:

1 000,0 g (50,0 mg/ml) Thymopentin, eingestellt auf den Peptidgehalt; 400,0 g (20,0 mg/ml, 2%) Glycin (USP); 176,0 g (8,8 mg/ml) Natriumcitrat (2H₂O, USP); und ungefähr 15 l Wasser für die Injektion (USP oder Ph. Eur.).

Das Verfahren zum Herstellen der Formulierung unter Verwendung der oben angegebenen Bestandteile ist wie folgt. Ungefähr 15 l Wasser zur Injektion werden in ein geeignetes Gefäß aus rostfreiem Stahl oder Glas eingeführt. Die 400 g Glycin werden zugefügt und gerührt, bis sie gelöst sind. Die 176,0 g Natriumcitrat (2H₂O) werden dann zugesetzt und die resultierende Mischung gerührt, bis die Lösung klar ist. Die angemessene Menge Thymopentin, ungefähr 1,163 g, eingestellt auf den Peptidgehalt, wird zugefügt, während weiterhin langsam gerührt wird, um ein Schäumen zu vermeiden, bis alles Thymopentin gelöst ist und die Lösung klar ist.

Der pH der resultierenden Lösung wird geprüft und auf pH 7,0–7,2 unter Verwendung von 1 N NaOH eingestellt. Wenn es nötig ist, kann der pH weiter mit 1 N HCl eingestellt werden.

Weiteres Wasser zur Injektion wird bis zu einem Volumen von 20 l zugefügt. Die Mischung wird gerührt, bis sie vollständig gemischt ist. Die Lösung wird unter Verwendung eines Millipore AP 15 Molekularsiebes (oder eines äquivalenten Filters, der in Wasser für die Injektion eingeweicht worden ist) vorgefiltert, um jede bakterielle Kontamination, Staub oder andere unlösliche Materialien aus der Lösung zu entfernen. Anschließend wird die vorgefilterte Mischung nochmals durch einen sterilen Dupore 0,22 Mikronfilter filtriert.

Als Kontrolle wird eine Zubereitung von Thymopentin nach dem oben angegebenen Verfahren hergestellt, mit der Ausnahme, daß der Lösung kein Glycin zugesetzt wird.

Beispiel 2

Um die Stabilität der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zu zeigen, werden die Thymopentinformulierungen aus Beispiel 1 und andere Formulierungen ungefähr 3 Monate bei 24°C und/oder 37°C in Ampullen gelagert, die 1,3 ml/Ampulle enthalten. Die Fig. 1 und 3 zeigen den Einfluß dieser Lagerzeiten und Bedingungen auf die Thymopentinzusammensetzungen. In periodischen Abständen während und nach der Lagerung werden die Formulierungen auf ihre biologische Aktivität mit einem Test unter Verwendung von zyklischem GMP getestet. Dieser Test ist dem Fachmann bekannt und in US-Patenten und anderen oben zitierten Literaturstellen für Thymopentin offenbart. Die resultierenden erfindungsgemäßen Formulierungen enthalten stabiles Thymopentin, das eine volle biologische Aktivität in diesem herkömmlichen Thymopentintest aufweist.

Der cGMP-Test mißt die Fähigkeit einer erfindungsgemäßen Peptidformulierung, an einen Zellmembranrezeptor intakter CEM-Zellen zu binden und die Produktion von zyklischem GMP selektiv zu stimulieren. Die CEM-Zelllinie war von der American Type Culture Collection in Rockville, Md. bezogen worden. Die CEM-Zellen wurden frisch ausgesät und 4 Tage wachsgelassen; die Ernte wurde nach T. Audhya et al., Arch. Biochem. Biophys. 234: 167–177 (1984) durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen und in RPMI 1640 bei einer Konzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert. Sie wurden 30 Minuten bei 37°C äquilibriert, bevor die Testpeptidformulierungen (25 µl) und Kontrollpeptidformulierungen zugesetzt wurden. Die Inkubation wurde in einem Schüttelwasserbad weitere 4 bis 5 Minuten fortgesetzt und dann durch Zufügen von 1 ml eiskalter 10%iger Trichloressigsäure (TCA) beendet.

Die Zellen wurden in TCA homogenisiert und beschallt, um zyklische Nukleotide freizusetzen. Die Suspension wurde bei $3000 \times g$ 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der resultierende Niederschlag wurde in 0,1 N NaOH gelöst, um den Proteingehalt zu bestimmen. TCA wurde aus der Fraktion des Überstandes durch 4malige Extraktion mit 5 ml wassergesättigtem Diethylether entfernt. Nach der letzten Extraktion wurden die verbleibenden Spuren von Ether durch 10 Minuten Erwärmen in einem 50°C Wasserbad entfernt. Nach dem Lyophilisieren wurde die Probe in 50 mM Acetatpuffer (pH 6,2) zum Radioimmuntest für zyklisches GMP rekonstruiert.

Für jede getestete Peptidformulierung wurde eine Schwellenaktivität bestimmt. Diese ist als die niedrigste Konzentration der Testformulierung definiert, die einen intrazellulären Spiegel von zyklischem GMP von mehr als zwei Standardabweichungen über der Kontrolle induziert. Die Kontrollen hatten intrazelluläre zyklische GMP-Werte von weniger als 0,5 Picomol/ml (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Die Testergebnisse wurden als positiv berücksichtigt, wenn der Spiegel von zyklischem GMP höher war als ein 2faches (2 Standardabweichungen) des Spiegels, der für die parallele Negativ-Kontrolle bestimmt worden war.

Die Fig. 1 bis 3 zeigen die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens für Thymopentin. In Fig. 1 wird die relative Stabilität einer Kontrolllösung von Thymopentin, die Methyl- und Propylparabene und eine Aminosäure enthält, mit der glycinhaltigen, konservierungsmittelfreien Formulierung, die in Beispiel 1 beschrieben ist, bei längerfristiger Lagerung bei 37°C verglichen.

Eine anfängliche Konzentration von 52 mg/ml Thymopentin, hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wurde mit einer Standardzubereitung von 50,7 mg/ml Thymopentin verglichen. In der 90tägigen Studie zeigte die erfindungsgemäße Formulierung eine Abnahme der biologischen Aktivität von 52 mg/ml auf ungefähr 50 mg/ml. Im Gegensatz dazu nahm die biologische Aktivität der Standardformulierungen von einer effektiven Dosis von 50,7 mg/ml auf eine effektive Dosis von 42 mg/ml ab.

Fig. 2 zeigt eine andere vergleichende Untersuchung der biologischen Aktivität einer nach Beispiel 1 hergestellten Thymopentinlösung in einer Konzentration von 1 mg/ml, wobei 2% Glycin in der Lösung vorhanden sind, verglichen mit einer Kontrolllösung von Thymopentin ohne darin enthaltene Aminosäuren. Die Stabilitätsuntersuchungen wurden über 3 Monate sowohl bei Raumtemperatur, beispielsweise 23°C, und bei einer erhöhten Temperatur von 37°C durchgeführt. Die erfindungsgemäßen Thymopentinlösungen wiesen bis zu 3 Monate und darüber hinaus bei beiden Lagerungstemperaturen Stabilität auf. Die Kontrolle ohne Aminosäuren war unter diesen Bedingungen zu allen Zeiten inaktiv.

Fig. 3 ist eine graphische Darstellung einer Biotestanalyse, die mit der erfindungsgemäß hergestellten Thymopentinlösung durchgeführt wurde. Drei Thymopentinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurden mit (a) 2% Glycin, (b) 5% Glycin, (c) humanem Serumalbumin und (d) ohne Zusatz hergestellt. Diese Lösungen wurden bei zwei Temperaturen, 24°C und 37°C, bis zu 3 Monaten gelagert. Die Lösungen wurden in periodischen Abständen während der Lagerungszeit mittels des cGMP-Tests untersucht. Alle diese Lösungen, mit Ausnahme der Kontrolle, waren bis zu 3 Monate bei beiden Lagerungstemperaturen stabil. Für Thymopentinlösung ohne Aminosäure oder humanes Serumalbumin wurde bei den Temperaturen dieses Tests mit dem cGMP-Test zu keinem Zeitpunkt biologische Aktivität nachgewiesen. Humanes Serumalbumin förderte die Stabilität der Thymopentinlösungen, ist aber aufgrund der Gefahr viraler Transmission in das Serum kein bevorzugter Stabilisator in therapeutischen Zusammensetzungen.

Der untere Teil der Graphik von Fig. 3 zeigt die Lagerung von erfindungsgemäß hergestellten Thymopentinlösungen bei variierenden Konzentrationen von Thymopentin und Glycin, aber unter den Bedingungen von dreimonatiger Lagerung und 37°C: (a) 0,05 mg/ml Thymopentin mit 3% Glycin; (b) 0,5 mg/ml Thymopentin mit 3% Glycin; (c) 5 mg/ml Thymopentin mit 2% Glycin und (d) 50 mg/ml Thymopentin mit 2% Glycin. Alle diese erfindungsgemäß hergestellten Zusammensetzungen blieben über die drei Monate Lagerungszeit stabil, wie durch die Aktivität in dem cGMP-Biotest bewiesen wurde.

Unzählige Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung gelten als in die obengegebene Beschreibung eingeschlossen und werden als für den Fachmann offensichtlich angesehen. Beispielsweise wird angenommen, daß obwohl Thymopentin das in den obengegebenen Beispielen untersuchte Peptid war und darüber berichtet wurde, andere Peptide mit diesem Verfahren ebenfalls behandelt werden können und ebenfalls ihre Aktivität unter harten Lagerungsbedingungen, beispielsweise erhöhten Temperaturen, beibehalten. Solche Modifikationen und Veränderungen der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren werden als vom Umfang der nachfolgenden Ansprüche umfaßt angesehen.

FIG. 1

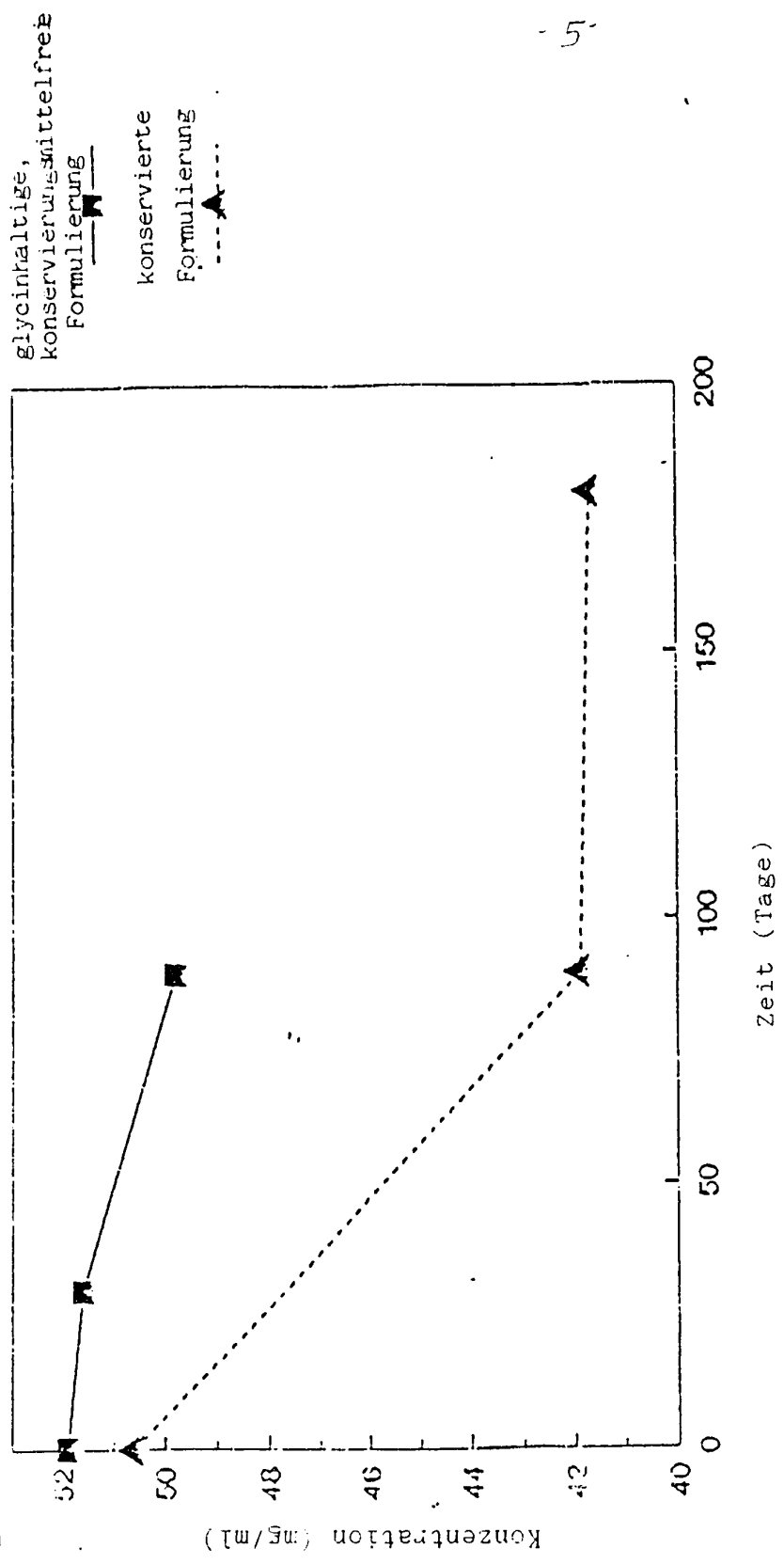


FIG. 2

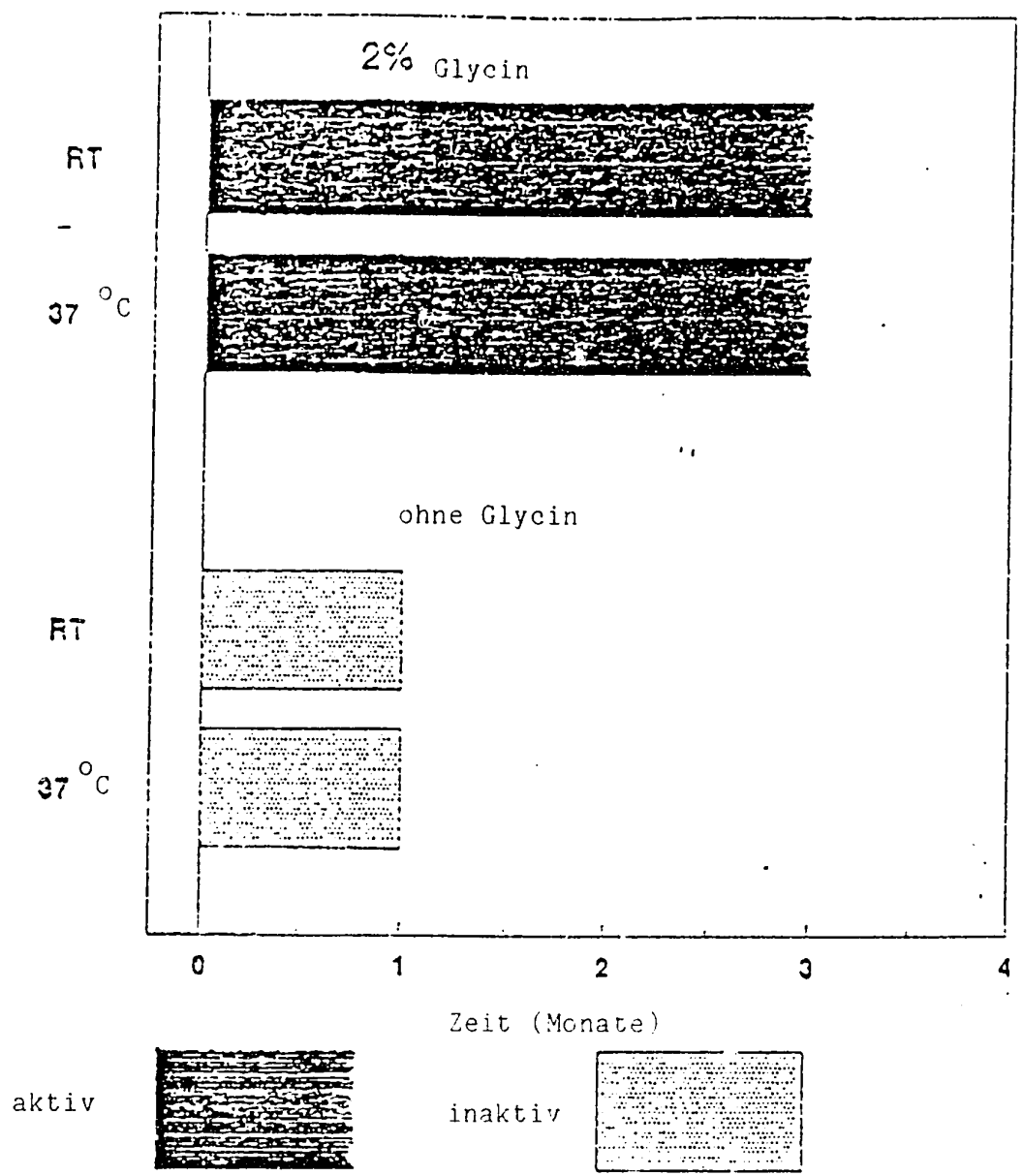


FIG. 3

Thymopentin

1 mg/ml

2% Glycin

24°C →

37°C →

5% Glycin

24°C →

37°C →

HSA

24°C →

37°C →

Kontrolle

⊗

0.05 mg/ml

37°C →

3% Glycin

0.5 mg/ml

37°C →

3% Glycin

5 mg/ml

37°C →

3% Glycin

50 mg/ml

37°C →

2% Glycin

0 1 2 3 4 5
Zeit (Monate)