



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2005 004 014 T2 2008.12.11**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 722 819 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2005 004 014.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2005/002583**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **05 727 232.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/094891**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.03.2005**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.10.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.11.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.12.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 47/12 (2006.01)**

**A61K 39/12 (2006.01)**

**A61K 39/02 (2006.01)**

**A61K 38/02 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**04450061 12.03.2004 EP**

(73) Patentinhaber:

**Intercell AG, Wien, AT**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(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**

(72) Erfinder:

**ZAUNER, Wolfgang, A-1030 Wien, AT; KRITSCH, Constantia, A-7100 Neusiedl, AT; HEINRICH-CSEH, Christa, A-1170 Vienna, AT; BERGER, Agnes, A-2540 Bad Vöslau, AT**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR SOLUBILISIERUNG VON PEPTID-MISCHUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Solubilisierung von Peptidmischungen.

**[0002]** Die Formulierung von Peptiden und Peptidmischungen zur pharmazeutischen Verwendung stellt in vielen Fällen eine große Herausforderung dar. Idealerweise sollte eine Formulierung bei Raumtemperatur oder zumindest bei 4°C für einen längeren Zeitraum (bis zu zwei Jahren) stabil sein. Besonders diese Langzeit-Stabilität ist in Lösung schwer zu erreichen, da viele Reaktionen an den funktionellen Gruppen der Seitenkette von Aminosäuren stattfinden, wie Oxidation (Tryptophan, Methionin, Cystein), Deaminierung (Glutamin, Asparagin) und Racemisierung. Zusätzlich kann je nach dem pH-Wert der endgültigen Formulierung auch eine Hydrolyse des Peptid-Gerüsts auftreten. Daher ist das Gefrier-trocknen ein bevorzugter Weg, um stabile Peptid-Formulierungen zu erhalten.

**[0003]** Die Solubilisierung einzelner Peptide stellt in der Labor-Praxis üblicherweise ein geringes Problem dar. Während hydrophyle Peptide üblicherweise in Wasser oder gepufferten wässrigen Lösungen gelöst werden, werden hydrophobe Peptide in Lösungen gelöst, die in vielen Fällen mindestens eine Komponente eines organischen Lösungsmittels enthalten. Die Solubilisierung einer Mischung von chemisch verschiedenen Peptiden ist wegen des Vorhandenseins einer Vielfalt hydrophiler (wasserlöslicher) und hydrophober (wasserunlöslicher) Peptide viel komplizierter.

**[0004]** Daher sind die Anforderungen an eine pharmazeutische Formulierung, die eine Peptidmischung enthält, mehrfache. Zuerst muss ein Lösungsmittel gefunden werden, das die Solubilisierung aller Peptide in der gewünschten Konzentration ermöglicht. Weiters muss das Lösungsmittel relativ ungiftig sein, so dass Spuren des restlichen Lösungsmittels im Produkt eine pharmazeutische Verwendung nicht verhindern. Schließlich sollte die Zusammensetzung zur Verlängerung der Lagerbeständigkeit einer Peptid-/Proteinmischung lyophilisierbar sein (Mischungen von z. B. Wasser und DMSO können nicht gefriergetrocknet werden).

**[0005]** Die Probleme, die sich während des Solubilisierens von Peptidmischungen ergeben, sind offensichtlich, wenn man das Lösungsverhalten einzelner Peptide in Betracht zieht. Die Zugabe von milden Alkali-Lösungen, die z. B.  $\text{NH}_4\text{OH}$  enthalten, erhöht die Löslichkeit saurer Peptide. Im Gegensatz dazu helfen mild saure Lösungen, die z. B. TFA enthalten, basische Peptide zu solubilisieren. Wasserlösliche Peptide können miteinander in Wechselwirkung treten, je nach ihrem jeweiligen Ladungszustand (z. B. werden oligo-kationische Peptide mit oligo-anionischen Peptiden interagieren, um ein unlösliches Salz zu bilden, das aus wässrigen Lösungen ausfällt). Stark hydrophobe Peptide werden regelmäßig in organischen Lösungsmitteln, wie DMSO, DMF, Acetonitril, Essigsäure oder in Mischungen von Wasser mit den zuvor erwähnten Lösungsmitteln gelöst. Weiters ist es dem Fachmann bekannt, dass Salze dazu neigen, eine Aggregation hydrophober Moleküle, insbesondere von Peptiden, zu fördern, worauf eine Konzentrations-abhängige Ausfällung folgt. Daher ist die Solubilisierung einer Peptidmischung, die verschiedene Arten von Peptiden enthält, ein Hauptproblem bei der Herstellung von z. B. pharmazeutischen Zusammensetzungen.

**[0006]** Das Europäische Patent EP 0 611 572 B1 offenbart ein Verfahren zur Solubilisierung eines Dekapeptids (Cetrorelix) durch Verwendung einer wässrigen Lösung, die 30% Essigsäure enthält. Vor dem Gefrier-trocknen wird diese Lösung mit Wasser weiter verdünnt, um eine Essigsäure-Endkonzentration von 3% zu erhalten. Die entsprechende US-Patentanmeldung US 2002/0198186 A1 dehnte das beschriebene Verfahren auf Peptide aus, die 3 bis 14 Aminosäuren enthalten. Jedoch sowohl das Europäische Patent als auch die US-Patentanmeldung offenbaren die Solubilisierung und Lyophilisation von nur einzelnen Peptiden und nicht von Mischungen aus zwei oder mehr Peptiden. Außerdem muss betont werden, dass das Verdünnen der Lösung auf 3% Essigsäure hydrophobe Peptide ausfällen wird, was zu einer trüben Suspension führt.

**[0007]** Andere allgemein verwendete Lösungsmittel für Peptide sind Dimethylsulfoxid (DMSO; vgl. z. B. Chen und Wetzell, Protein Science 10:887–891) und Dimethylformamid (DMF; vgl. z. B. de Groot et al., Molecular Cancer Therapeutics 1:901–911). Die von diesen Lösungsmitteln gelösten Peptide sind üblicherweise hydrophob und in Wasser schlecht löslich. Ungünstigerweise können Peptidlösungen, die DMSO oder DMF enthalten, nicht lyophilisiert und nicht direkt für medizinische Zwecke verwendet werden.

**[0008]** Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, Verfahren zur Solubilisierung von Peptidmischungen vorzusehen, die aus zwei oder mehr Peptiden zusammengesetzt sind, die sowohl aus hydrophilen als auch aus hydrophoben Peptiden bestehen. Ein anderes Ziel ist es, ein Verfahren zur Herstellung steriler und gegebenenfalls lyophilisierter pharmazeutischer Formulierungen, die Peptidmischungen enthalten, zur Verfügung zu stellen.

**[0009]** Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats vor, umfassend die Solubilisierung einer Peptidmischung, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidmischung mit einer wässrigen Lösung solubilisiert wird, welche mindestens eine organische Säure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und halogenierten oder hydroxylierten Formen davon enthält. Die Konzentration der organischen Säure in der wässrigen Lösung ist mindestens 10%. Um die Lagerbeständigkeit zu verlängern, kann die solubilisierete Peptidmischung weiters sterilisiert (durch Filtration, Bestrahlung, Hitzebehandlung, chemische Sterilisation oder andere Methoden) und lyophilisiert werden.

**[0010]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Peptidmischung hydrophile sowie hydrophobe Peptide. Natürlich ist das vorliegende Verfahren auch für Peptidmischungen verwendbar, die nur eine Art von Peptiden enthalten (insbesondere für Mischungen, die z. B. zwei oder mehr hydrophile Peptide enthalten).

**[0011]** Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthalten die Peptide, die durch eine wässrige Lösung gemäß der vorliegenden Erfindung gelöst sind, mindestens 6, vorzugsweise mindestens 8, mehr bevorzugt mindestens 10, insbesondere mindestens 12 Aminosäuren. Peptide sowie Polypeptide, die eine maximale Anzahl von 100 Aminosäuren enthalten, können gemäß der vorliegenden Erfindung gelöst werden.

**[0012]** Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Peptide durch ihre Löslichkeit charakterisiert. Peptide, die in einer wässrigen Lösung zu weniger als 100 µg/ml löslich sind, werden als hydrophob angesehen. Andererseits lösen sich hydrophile Peptide in einer gepufferten wässrigen Lösung in eine Konzentration über 100 µg/ml. Hydrophile Peptide können weiters unterteilt werden in kationische (> 20% basische Aminosäuren einschließlich Lysin, Arginin, Histidin), anionische (> 20% saure Aminosäuren, einschließlich Asparaginsäure, Glutaminsäure) und Hydroxyl-reiche Peptide (> 30% -OH-hältige Aminosäuren, wie Serin, Threonin, Tyrosin).

**[0013]** Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthält die Peptidmischung Peptide und/oder Polypeptide, die von Antigenen erhalten wurden. Vorzugsweise werden Peptide oder Polypeptide, die von einem viralen oder bakteriellen Pathogen oder von Pilzen oder Parasiten stammen, als solche Antigene verwendet (einschließlich derivatisierter Antigene oder glykosylierter oder lipidisierter Antigene oder Polysaccharide oder Lipide). Eine andere bevorzugte Quelle für Antigene sind Tumor-Antigene. Bevorzugte Pathogene sind ausgewählt aus Humanem Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis A- und B-Viren; Hepatitis C-Virus (HCV), Rous-Sarcoma-Virus (RSV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Influenza-Virus, Rotavirus, Staphylococcus aureus, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Vibrio cholerae, Plasmodium sp., (Pl. falciparum, Pl. vivax, etc.), Aspergillus sp. oder Candida albicans. Antigene können auch von Krebszellen exprimierte Moleküle (Tumor-Antigene) sein. Der Derivatisierungsprozess kann die Reinigung eines spezifischen Proteins aus den Pathogen-/Krebszellen, die Inaktivierung des Pathogens sowie die proteolytische oder chemische Derivatisierung oder Stabilisierung eines solchen Proteins inkludieren. Auf dieselbe Weise können auch Tumor-Antigene (Krebs-Vakzine) oder Autoimmun-Antigene gemischt werden, um eine Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung zu erhalten. Mit solchen Zusammensetzungen kann eine Tumor-Impfung oder eine Behandlung für Autoimmunerkrankungen durchgeführt werden.

**[0014]** Im Fall von Peptid-Antigenen ist die Verwendung von Peptid-Mimotopen/Agonisten/Superagonisten/Antagonisten oder Peptiden, die in bestimmten Positionen verändert sind, ohne die immunologischen Eigenschaften zu beeinträchtigen, oder Nicht-Peptid-Mimotope/Agonisten/Superagonisten/Antagonisten in der vorliegenden Erfindung inkludiert. Peptid-Antigene können auch Elongationen entweder am Carboxy- oder am Amino-Terminus des Peptid-Antigens enthalten, was die Wechselwirkung mit (einer) polykationischen Verbindung(en) oder (einer) immunstimulierenden Verbindung(en) erleichtert. Für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen können Peptid-Antagonisten angewendet werden.

**[0015]** Antigene können auch derivatisiert werden, so dass sie Moleküle inkludieren, die die Antigen-Präsentation und das Targeting von Antigenen auf Antigen-präsentierende Zellen verbessern.

**[0016]** Eine mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung erhaltene Zusammensetzung, insbesondere in Form eines Vakzins, kann weiters eine polykationische Verbindung, vorzugsweise ein polykationisches Polymer, mehr bevorzugt ein polykationisches Peptid, insbesondere Polyarginin, Polylysin oder ein antimikrobielles Peptid aufweisen.

**[0017]** Die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendende(n) polykationische(n) Verbindung(en) kann (können) jede polykationische Verbindung sein, die die charakteristische Wirkung gemäß der WO 97/30721

zeigt. Bevorzugte polykationische Verbindungen sind ausgewählt aus basischen Polypeptiden, organischen Polykationen, basischen Polyaminosäuren oder Mischungen davon. Diese Polyaminosäuren sollten eine Kettenlänge von mindestens 4 Aminosäureresten aufweisen. Besonders bevorzugt sind Substanzen, die Peptidbindungen enthalten, wie Polylysin, Polyarginin und Polypeptide, die mehr als 20%, insbesondere mehr als 50% basische Aminosäuren in einem Bereich von mehr als 8, insbesondere mehr als 20 Aminosäureresten oder Mischungen davon enthalten. Andere bevorzugte Polykationen und ihre pharmazeutischen Zusammensetzungen sind in WO 97/30721 (z. B. Polyethylenimin) und WO 99/38528 beschrieben. Vorzugsweise enthalten diese Polypeptide zwischen 20 und 500 Aminosäurereste, insbesondere zwischen 30 und 200 Reste. Diese polykationischen Verbindungen können chemisch oder rekombinant hergestellt werden oder können aus natürlichen Quellen stammen.

**[0018]** Kationische (Poly-)Peptide können auch polykationische antibakterielle mikrobielle Peptide sein. Diese (Poly-)Peptide können prokaryontischen oder tierischen oder pflanzlichen Ursprungs sein, oder sie können chemisch oder rekombinant hergestellt sein. Die Peptide können auch zur Klasse der Defensine gehören. Solche Wirtsverteidigungs-Peptide oder Defensine sind auch eine bevorzugte Form des polykationischen Polymers gemäß der vorliegenden Erfindung. Im Allgemeinen wird eine Verbindung, die als Endprodukt eine Aktivierung (oder Niederregulierung) des adaptiven Immunsystems, vorzugsweise durch APCs (einschließlich dendritische Zellen) vermittelt, ermöglicht, als polykationisches Polymer verwendet.

**[0019]** Polykationische Substanzen, die beim Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind von Cathelicidin abgeleitete antimikrobielle Peptide oder Derivate davon (WO 02/13857), insbesondere antimikrobielle Peptide, die von Säuger-Cathelicidinen stammen, vorzugsweise von Mensch, Rind oder Maus, oder neuroaktive Verbindungen, wie (humanes) Wachstumshormon (wie z. B. in der WO 01/24822 beschrieben).

**[0020]** Zu den polykationischen Verbindungen, die aus natürlichen Quellen stammen zählen HIV-REV oder HIV-TAT (abgeleitete kationische Peptide, Antennapedia-Peptide, Chitosan oder andere Derivate von Chitin) oder andere Peptide, die von diesen Peptiden oder Proteinen durch biochemische oder rekombinante Produktion abgeleitet wurden. Andere bevorzugte polykationische Verbindungen sind Cathelin oder verwandte oder abgeleitete Substanzen aus Cathelin, insbesondere Maus-, Rind- oder insbesondere humane Catheline und/oder Cathelicidine. Verwandte oder abgeleitete Cathelin-Substanzen enthalten die ganze oder Teile der Cathelin-Sequenz mit mindestens 15–20 Aminosäureresten. Derivatisierungen können die Substitution oder Modifikation der natürlichen Aminosäuren durch Aminosäuren, die nicht zu den 20 Standard-Aminosäuren gehören, inkludieren. Außerdem können weitere kationische Reste in solche Cathelin-Moleküle eingeführt werden. Es ist bevorzugt, dass diese Cathelin-Moleküle mit der Antigen/Vakzin-Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung kombiniert werden. Es zeigte sich jedoch überraschenderweise, dass diese Cathelin-Moleküle auch als Adjuvans für ein Antigen ohne Zusatz weiterer Adjuvantien wirksam sind. Es ist daher möglich, solche Cathelin-Moleküle als wirksame Adjuvantien in Vakzin-Formulierungen mit oder ohne weitere immunaktivierende Substanzen zu verwenden.

**[0021]** Eine andere bevorzugte, gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendende polykationische Substanz ist ein synthetisches Peptid, das mindestens 2 KLK-Motive getrennt durch einen Linker von 3 bis 7 hydrophoben Aminosäuren, insbesondere L, enthält (WO 02/32451).

**[0022]** Solche Peptidmischungen sind für die Formulierung von Vakzinen nützlich. Natürlich können auch Peptidmischungen, die Peptide enthalten, welche z. B. als Hormone wirken, mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung gelöst werden.

**[0023]** Die Peptide der Peptidmischung werden mittels chemischer Standardmethoden synthetisiert (z. B. Festphasensynthese gemäß Merrifield). Natürlich können die Peptide auch durch chemische oder enzymatische Fragmentierung rekombinant erzeugter oder nativer isolierter Proteine erhalten werden. Bei einer anderen Ausführungsform werden die Peptide direkt aus eukaryontischen und prokaryontischen Zellen isoliert. In allen drei Fällen wird manchmal eine zusätzliche Reinigung des interessierenden Peptids oder Polypeptids erforderlich sein, bevor sie lyophilisiert und zusammengemischt werden.

**[0024]** Je nach der Anwendung variiert die Anzahl der individuellen Peptide und insbesondere ihre Konzentration in der Mischung. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt die Konzentration der einzelnen Peptide im Bereich von 5 µg/ml bis 5 mg/ml, vorzugsweise von 50 µg/ml bis 4 mg/ml, mehr bevorzugt von 100 µg/ml bis 3 mg/ml.

**[0025]** Peptide werden häufig in pharmazeutischen Formulierungen verwendet, um z. B. als Hormone oder Vakzine benützt zu werden. Daher ist es ein grundlegendes Erfordernis, dass die in wässrigen Lösungen zur Solubilisierung von Peptiden verwendeten organischen Säuren pharmazeutisch akzeptabel sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die organischen Säuren Essigsäure und/oder Ameisensäure, die gegebenenfalls Acetonitril enthält.

**[0026]** Die Versuche zeigten, dass je nach der Zusammensetzung der Peptidmischung die Konzentration der organischen Säure in der wässrigen Lösung mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, vorzugsweise mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60% sein muss.

**[0027]** In einigen Fällen kann der Zusatz von Derivaten organischer Säuren (z. B. Acetonitril) zur wässrigen Lösung hilfreich sein für die Solubilisierung von Peptidmischungen, die eine größere Menge hydrophober Peptide enthalten. Auch organische Lösungsmittel, wie DMSO und DMF, tragen zu einer verbesserten Auflösung von Peptidmischungen, die erhöhte Konzentrationen hydrophober Peptide enthalten, bei. Wässrige Peptidmischungen, die DMSO und/oder DMF enthalten, können jedoch nicht gefriergetrocknet werden.

**[0028]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden Massemittel zur Peptidmischung zugegeben, wenn beabsichtigt ist, das Produkt zu lyophilisieren. Insbesondere bei niedrigen Peptidkonzentrationen ist die Bildung eines guten Lyophilisationskuchens nicht garantiert. Daher werden bei geringen Peptidmengen Massemittel zugegeben. Bevorzugte Massemittel sind Sorbit, Mannit, Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Mischungen davon.

**[0029]** Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die solubilierte Peptidmischung durch Filtration sterilisiert. Um eine vermehrte Rückgewinnung des Produkts zu erlangen und um die Filtration großer Mengen der Peptidmischung zu ermöglichen, müssen die enthaltenen Peptide vollständig gelöst sein und darf kein Gel gebildet werden.

**[0030]** Die solubilierte und gegebenenfalls sterilisierte Peptidmischung kann direkt oder nach dem Einfüllen in Phiolen lyophilisiert werden. Die Lyophilisation ist eine nützliche und wirkungsvolle Methode zur Verlängerung der Lagerbeständigkeit von Peptidmischungen, wie oben beschrieben. Mit den solubilierten Peptiden kann ein lyophilisiertes Präparat einer Mischung von Peptiden, die maximal 5% Restlösungsmittel (Wasser in wässrigen Systemen) und Spuren der organischen Säure enthält, erhalten werden, die in einer gepufferten wässrigen Lösung, die NaCl und/oder Sorbit enthält, innerhalb von 10 Minuten zu 95%, vorzugsweise 98%, insbesondere 99%, rekonstituierbar ist, was zu einer trüben Suspension oder klaren Lösung führt (je nach der Zusammensetzung der Peptidmischung). Eine solche rasche Rekonstitution ist besonders in Notfällen nötig, wo eine gebrauchsfertige Lösung innerhalb einiger weniger Minuten mit fast vollständiger Resolvatisierung der gesamten Dosis einer lyophilisierten Phiole vorhanden sein muss.

**[0031]** Die Erfindung ist weiters durch die folgenden Beispiele und die Zeichnungsfigur veranschaulicht, ohne auf diese eingeschränkt zu sein.

**[0032]** Die Figur zeigt die Lagerbeständigkeit einer Peptidmischung gemäß der vorliegenden Erfindung (A, B) im Vergleich zu Suspensionen gemäß dem Stand der Technik (C).

#### Beispiel 1: Gefriertrocknen einer Peptidmischung (5 TB Peptide plus Poly-L-Arginin)

**[0033]** Die Peptidmischung enthält 6 Peptide (vgl. Tabelle 1), die einen breiten Löslichkeitsbereich aufweisen. Die Peptide 1240 und 1242 sind wasserlöslich und können auch in DMSO gelöst werden. Peptid 1236 löst sich in DMSO nicht, löst sich aber langsam in Wasser. Die Peptide 1235 und 1241 sind hydrophob und lösen sich nur in DMSO.

**[0034]** Die Peptide 1236, 1240 und 1242 können sequentiell in Wasser gelöst werden, vorausgesetzt, dass der endgültige pH-Wert auf pH 8,5 eingestellt wird. Bei einem niedrigeren pH-Wert wird ein Gel gebildet, vermutlich infolge von Ladungs-Interaktionen und/oder der Bildung von Wasserstoffbindungen. Dieses Gel kann nicht sterilfiltriert werden, da es das Filter sofort blockiert. Nach Zugabe von Poly-L-Arginin (pR) zur wässrigen Lösung der drei Peptide bildet sich jedoch ein Niederschlag, der die Sterilfiltration der Lösung unmöglich macht.

**[0035]** Daher müssen, um eine Suspensionsformulierung zu erreichen, drei Stammlösungen hergestellt wer-

den: eine, die die Peptide 1236, 1240 und 1242 in einem Puffer bei pH 8,5 gelöst enthält, eine, die Poly-L-Arginin (pR) in einer NaCl-Lösung gelöst enthält, und eine, die die Peptide 1235 und 1241 in DMSO gelöst enthält. Jede Lösung kann sterilfiltriert werden. Die Kombination aus zweien von diesen drei Lösungen führt zur Bildung eines Niederschlags, was in einer trüben Suspension resultiert. Die mit diesem Verfahren erhaltene endgültige Formulierung kann nicht sterilfiltriert und kann nicht gefriergetrocknet werden, wenn sie 10% DMSO enthält.

**[0036]** Es wurde auch getestet, ob sich diese Peptide in DMSO, DMF, Dimethylacetamid, 0,1% Ameisensäure/Wasser, Formamid oder Wasser/Acetonitril-Mischungen lösen. Es stellte sich jedoch heraus, dass keines dieser regelmäßig verwendeten Lösungsmittel eine Lösung ergab, die sterilfiltriert werden konnte; das Blockieren des Filters zeigte, dass beträchtliche Mengen ungelöste Peptide in der Lösung zurückblieben.

**[0037]** Überraschenderweise wurde gefunden, dass 50% Essigsäure/Wasser ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für diese Peptidmischung ist (pR, 1235, 1236, 1240, 1241 und 1242), da es sowohl hydrophile als auch hydrophobe Peptide löst. Zusätzlich kann es, weil es selbst ein geladenes Molekül ist, auch zu ionischen Komplexen dissoziieren. Somit konnte 50% Essigsäure die oben erwähnte Mischung in den benötigten Konzentrationen lösen (1 mg/ml jedes Peptid, 2 und 4 mg/ml pR). Die Lösung konnte unter Verwendung eines Essigsäure-resistenten Filters (z. B. hydrophiles Teflon) sterilfiltriert werden. Außerdem frieren Mischungen aus Wasser und Essigsäure leicht und könnten unter Verwendung von Standard-Lyophilisationszyklen gefriergetrocknet werden.

**[0038]** Sehr überraschenderweise wies die gefriergetrocknete Mischung aus den fünf Peptiden (0,5 mg/Phiole) und Poly-L-Arginin (1 mg/Phiole) eine ausgezeichnete Stabilität auf. Selbst nach 4 Monaten bei 37°C lag der Peptidgehalt zwischen 96,1% und 100,5% des ursprünglichen Werts. Im Gegensatz dazu wies selbst eine optimierte Suspensions-Formulierung einen beträchtlichen Abbau nach 2 Monaten bei 37°C auf (< 90% Wiedergewinnung für Ipep 1240; < 75% Wiedergewinnung von Ipep 1236 und Ipep 1241), und zahlreiche Abbau-Peaks (fehlten in der Lyo-Formulierung) wurden in den Chromatogrammen beobachtet.

Tabelle 1 Peptidmischung I

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>
1235	IDELKTNSSLLTSILTYHVV
1236	TGSGAGIAQAAAGTVNI
1240	VSDLKSSTAVIPGYPVAGQV
1241	NFLLPDAQAAAAGFASK
1242	YNINISLPSYYPDQKSLNY

Beispiel 2: Solubilisierung von Peptidmischungen (HCV-Peptide plus Poly-L-Arginin):

**[0039]** Die Peptidmischung enthält die Peptide 83, 84, 87, 89, 1426 und pR als Immunisator („immunizer“) (vgl. Tabelle 2), wobei die Peptide 83 und 84 in Wasser und DMSO löslich sind, die Peptide 87 und 89 schlecht wasserlöslich sind, sich aber leicht in DMSO lösen, und das Peptid 1426 nur in DMSO löslich ist. Wie bei der Formulierung von Beispiel 1 ist es für die Herstellung einer Suspensionsformulierung notwendig, zuerst die Peptide 83 und 84 in einer wässrigen Pufferlösung zu lösen und die Peptide 87, 89 und 1426 in DMSO zu lösen. Nach der Sterilfiltration können die Lösungen vereinigt werden, um die endgültige Suspension zu bilden.

**[0040]** Wasser/Acetonitril-Mischungen sowie DMSO und DMF funktionierten nicht als Lösungsmittel und führten zu Suspensionen, die wegen des Blockierens des Filters nicht sterilfiltriert werden konnten. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass eine 50% Essigsäure/Wasser-Mischung alle Komponenten löste. Die erhaltene Peptidlösung, die die oben erwähnten Peptide enthielt, konnte ohne jegliches Blockieren des Filters leicht sterilfiltriert werden.

Tabelle 2 Peptidmischung II

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>
83	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL
84	GYKVLVLNPSVAAT

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>
87	DLMGYIPAV
89	CINGVCWTV
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA

**[0041]** Die folgenden Beispiele (Beispiele 2.1 bis 2.12, Tabellen 3 bis 14) zeigen, dass Peptidmischungen, die mindestens zwei Peptide mit variabler Länge und Aminosäurezusammensetzung enthalten, für die Solubilisierung gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet sind. Weiters zeigen die Tabellen die bekannten HLA-Klasse I- und -Klasse II-Epitope, die innerhalb der Peptide enthalten sind.

Beispiel 2.1:

Tabelle 3 Peptidmischung III

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
1835	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK	A2, A3, B7	DR11
87	DLMGYIPAV	A2	
1624	LEDRDRSELSPLLLSTTEW	B60	DR7
1846	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV	A2, A11, Cw7	DR1, 4, 7, 11
84	GYKVLVLNPSVAAT		DR1, 4, 7, 11
89	CINGVCWTV	A2	
1799	AAWYELTPAETTVRLR	B35	DR1, 4
1547	YLVAYQATVCARAQAPPPSWD	A2	DR1, 4, 7, 11
1827	TAYSQQTRGLLG	A24	DR1, 7, 11
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11
1798	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK	A2, A3, A11	DR1, 4, 7
1829	SMSYTWGALITP	A2, B7	DR1, 7, 11

## Beispiel 2.2:

Tabelle 4 Peptidmischung IV

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
1835	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK	A2, A3, B7	DR11
1846	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV	A2, A11, Cw7	DR1, 4, 7, 11
1799	AAWYELTPAETTVRLR	B35	DR1, 4
1827	TAYSQQTRGLLG	A24	DR1, 7, 11
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11
1798	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK	A2, A3, A11	DR1, 4, 7
1829	SMSYTWGALITP	A2, B7	DR1, 7, 11

## Beispiel 2.3:

Tabelle 5 Peptidmischung V

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
C134	TLLFNILGGWVAAQ	A2	DR1, 7, 11
1815	TVNYTIFKI	A11	
1006	MWNFISGIQYLAGLSTLPGN		

## Beispiel 2.4:

Tabelle 6 Peptidmischung VI

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
84	GYKVLVLNPSVAAT		DR1, 4, 7, 11
87	DLMGYIPAV	A2	
89	CINGVCWTV	A2	
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11



## Beispiel 2.5:

Tabelle 7 Peptidmischung VII

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
1051	YLLPRRGPR	A2	
84	GYKVLVLNPSVAAT		DR1, 4, 7, 11
87	DLMGYIPAV	A2	
89	CINGVCWTV	A2	
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11

## Beispiel 2.6:

Tabelle 8 Peptidmischung VIII

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
1006	MWNFISGIQYLAGLSTLPGN		
1827EX	GWRLAPITAYSQQTRGLLGCI	B8	

## Beispiel 2.7:

Tabelle 9 Peptidmischung IX

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
1604	VVCCSMSYTWGALITPC		
83	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPR	B8	
A130	DYPYRLWHYPCTVNF		
B46	AGAAWYELTPAETTV		

## Beispiel 2.8:

Tabelle 10 Peptidmischung X

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
B84	GSIGLGKVLVDILAG		DR1, 4
B96	LAGYGAGVAGALVAF		DR1, 4, 7, 11
1829	SMSYTWGALITP	A2, B7	DR1, 7, 11
A135	LWHYPCTVNFTIFKV		DR7
A130	DYPYRLWHYPCTVNF		DR1, 4
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11
1817	RMYVGGVEHRL		DR4
87EX	DLMGYIPLVGAPL	A2, 24	
1816	TINYTIFK	A11	

## Beispiel 2.9:

Tabelle 11 Peptidmischung XI

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
1650	VDYPYRLWHYPCTVNFTIFKVRMYVG-GVEHRL	Cw7, A2, A24, A11, A3	DR1, 4, 7, 11
1836	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKI	Cw7, A2, A24, A11	DR1, 4, 7, 11
1846	DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV	Cw7, A2, A24, A1, A11	DR1, 4, 7, 11
1651	VDYPYRLWHYPCTVNYTIFKIRMYVG-GVEHRL		
1800	DYPYRLWHYPCTVNYTIFKI	Cw7, A24, A11	DR7

Beispiel 2.10:

Tabelle 12 Peptidmischung XII

<b>Peptid-ID</b>	<b>Peptidsequenz</b>	<b>HLA Klasse I</b>	<b>HLA Klasse II</b>
1835	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK	A2, A3, B7	DR11
83	KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL	A2 B7	DR11
84EX	AYAAQGYKVLVLPNSVAAT	A24	DR1, 4, 7, 11
87EX	DLMGYIPLVGAPL	A2, A24	
89EX	GEVQVVSTATQSFLATCINGVCWTV	A2	DR 4, 7
1426	HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA	A2	DR1, 4, 7, 11

Beispiel 2.11:

Tabelle 13 Peptidmischung XIII

<b>Peptid-ID</b>	<b>Peptidsequenz</b>	<b>HLA Klasse I</b>	<b>HLA Klasse II</b>
C114	TAYSQQTRGLLGCIIV	A24, B8	DR1, 4, 7, 11
1798	IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK	A2, 24, 3, 11	DR1, 4, 7
1604	VVCCSMSYTWTGALITPC	A2, A24, B7	DR1, 4, 7, 11
1624	LEDNRSELSPLLLSTTEW	A1, 2, 3, 26	DR7

Beispiel 2.12:

Tabelle 14 Peptidmischung XIV

<b>Peptid-ID</b>	<b>Peptidsequenz</b>	<b>HLA Klasse I</b>	<b>HLA Klasse II</b>
1547	YLVAYQATVCARAQAPPSWD	A2	DR1, 4, 7, 11
A1A7	MSTNPKPQRKTKRNTNR	A11, B08, B27	
A122EX	LINTNGSWHINRTALNCNDSL	A2, 2, 3, B8	DR1, 4, 7, 11
A241	TTILGIGTVLDQAET	A2, A3	DR1, 4
B8B38	FDSSVLCECYDAGAAWYE	A1, 2, 3, 26	
C70EX	ARLIVFPDLGVRVCEKMALY	A2, A3, B27	

<i>Peptid-ID</i>	<i>Peptidsequenz</i>	<i>HLA Klasse I</i>	<i>HLA Klasse II</i>
C92	AFCSAMYVGDLCGSV	A2, B51	DR1, 4
C97	GVLFGLAYFSMVGW	A2, 3, 26, B2705, 51	DR1, 4, 7
C106	TRVPYFVRAQGLIRA	A3, 24, B7, B8, B2705	DR1, 4, 7
C134	TTLLFNILGGWVAAQ	A2	DR1, 7, 11

Beispiel 2: Stabilität von Peptidmischungen gemäß der vorliegenden Erfindung

**[0042]** Eine weitere Peptidmischung, die die folgenden 8 von HCV stammenden Peptide enthält, wurde vorgesehen:

Ipep 1827: TAYSQQTRGLLG  
 Ipep 1835: KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRK  
 Ipep 84: GYKVLVLNPSVAAT  
 Ipep 1799: AAWYELTPAETTVRLR  
 Ipep 1624: LEDRDRSELSPLLLSTTEW  
 Ipep 1846: DYPYRLWHYPCTVNFTIFKV  
 Ipep 1426: HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA  
 Ipep 1798: IGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFK

**[0043]** Wie bei den früheren Beispielen löste sich die Mischung der Peptide in wässrigen Lösungen nicht. Insbesondere interagierte Ipep 1798, obwohl es selbst wasserlöslich war, mit den anderen wasserlöslichen Peptiden Ipep 84 und 1835, was zur Ausfällung führte. Darüber hinaus interagierte Ipep 1624 höchstwahrscheinlich ionisch mit Ipep 1835 und mussten daher auch zur DMSO-Lösung zugegeben werden. Daher musste eine Mischung, die Ipep 84, Ipep 1835 und Ipep 1827 in wässrigem Puffer enthielt, und eine Mischung, die die anderen fünf Peptide in DMSO enthielt, hergestellt werden und in einem Verhältnis von 9:1 (V/V) gemischt werden, um die endgültige Suspension zu ergeben. Überraschenderweise war die gesamte Mischung in 30% und 50% Essigsäure löslich und konnte aus dieser Lösung gefriergetrocknet werden. Noch mehr überraschend erwies sich die endgültige Formulierung mindestens 6 Monate lang selbst bei einer Temperatur, die sogar 37°C hoch war, als stabil. Tatsächlich gab es kaum einen Unterschied zwischen einer Lagerung bei 5°C und bei 37°C. In beiden Fällen lag die Wiedergewinnung nach 6 Monaten zwischen 95% und 110% des anfänglichen Wertes (Fig. A und B). Im Gegensatz dazu wies eine Suspensionsformulierung, die bei Raumtemperatur gelagert wurde (als Vergleich zum Stand der Technik) einen höheren Grad an Abbau auf, hauptsächlich eine Oxidation von Ipep 1846 zu seinem Dimer (Fig. C). Die Rückgewinnung einiger anderer Peptide (Ipep 1426 und Ipep 1624) war jedoch nur 80%, was die Überlegenheit der Lyo-Formulierung zeigt (Fig. C im Vergleich zu A oder B).

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats umfassend die Solubilisierung einer Peptidmischung, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Peptidmischung mit einer wässrigen Lösung solubilisiert wird, welche mindestens eine organische Säure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und halogenierten oder hydroxylierten Formen davon enthält, wobei die Konzentration der organischen Säure in der wässrigen Lösung mindestens 10% ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidmischung mindestens drei, vorzugsweise mindestens vier, insbesondere mindestens fünf Peptide enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidmischung mindestens ein hydrophiles und/oder mindestens ein hydrophobes Peptid enthält.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide mindestens 6, vorzugsweise mindestens 8, mehr bevorzugt mindestens 10, insbesondere mindestens 12 Aminosäuren enthalten.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophilen Peptide bei einer Konzentration von mehr als 100 µg/ml in wässrigen Lösungen löslich sind.
6. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophoben Peptide bei einer Konzentration von weniger als 100 µg/ml in wässrigen Lösungen löslich sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidmischung Peptide oder Polypeptide aufweist, die von bakteriellen, viralen, fungalen, Parasiten- oder Tumor-assoziierten Antigenen oder Fragmenten davon erhalten wurden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Humanem Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis A- und B-Viren, Hepatitis C-Virus (HCV), Rous-Sarcoma-Virus (RSV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Influenza-Virus, Rotavirus, Staphylococcus aureus, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Vibrio cholerae, Plasmodium sp., Pl. falciparum, Pl. vivax, Aspergillus sp., Candida albicans und Tumor-Antigenen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidmischung eine polykationische Verbindung, vorzugsweise ein polykationisches Polymer, mehr bevorzugt ein polykationisches Peptid, insbesondere ein antimikrobielles Peptid oder ein Peptid, das mindestens zwei durch einen Linker von drei bis sieben hydrophoben Aminosäuren getrennte KKK-Motive enthält, aufweist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide chemisch synthetisierte Peptide sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide durch enzymatischen oder chemischen Abbau rekombinanter oder nativer Proteine erhalten werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide aus eukaryontischen oder prokaryontischen Organismen isoliert sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration jedes solubilisierten Peptids von 5 µg/ml bis 5 mg/ml, vorzugsweise von 50 µg/ml bis 4 mg/ml, mehr bevorzugt von 100 µg/ml bis 3 mg/ml variiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die organische Säure eine pharmazeutisch akzeptable organische Säure ist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die organische Säure Essigsäure und/oder Ameisensäure ist, die gegebenenfalls Acetonitril enthält.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der organischen Säure in der wässrigen Lösung mindestens 20%, vorzugsweise mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60% ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung zusätzlich mindestens ein Derivat einer organischen Säure, insbesondere Acetonitril enthält.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung zusätzlich mindestens ein organisches Lösungsmittel enthält.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung mindestens ein zusätzliches Massemittel enthält.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Massemittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Sorbit, Mannit, Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Mischungen davon.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die solubilisierete Peptidmischung durch Filtration sterilisiert wird.

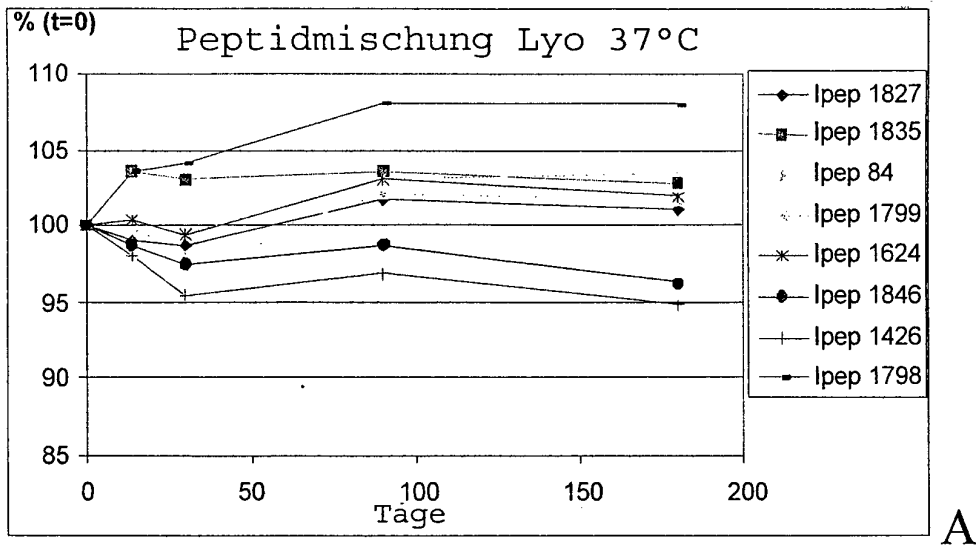
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die solubilisierete Peptidmischung lyophilisiert wird und in einer gepufferten wässrigen Lösung, enthaltend NaCl und/oder Sorbit, innerhalb von 10 Minuten zu > 95%, vorzugsweise 98%, insbesondere 99%, rekonstituierbar ist, was zu einer trüben Suspension oder klaren Lösung führt.

23. Wässrige Lösung einer Mischung von Peptiden, erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

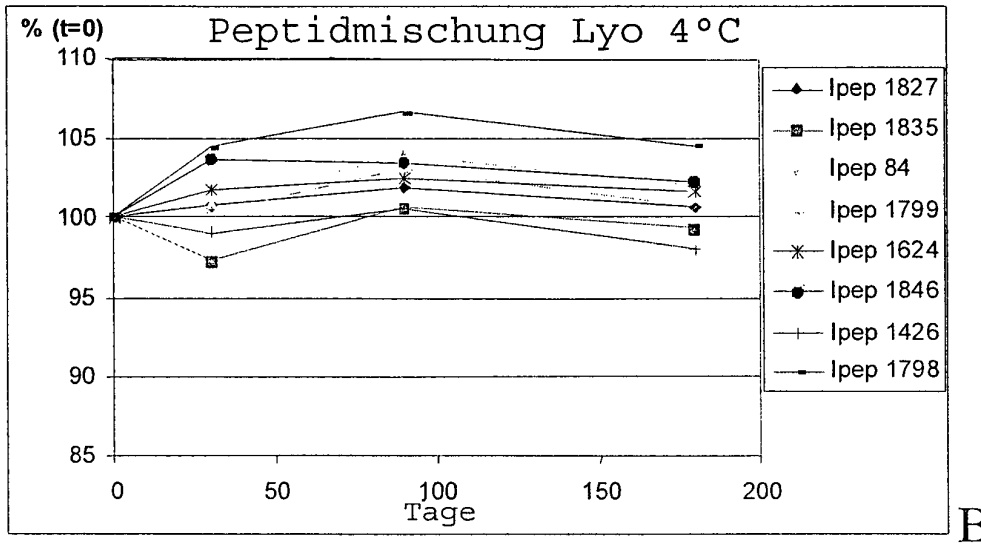
24. Wässrige Lösung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung ein Vakzin ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

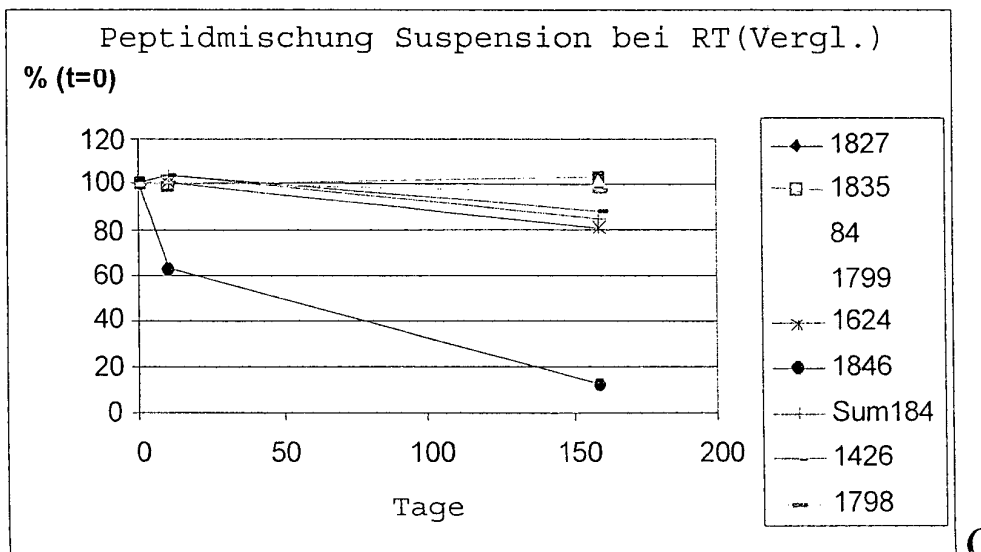
Anhängende Zeichnungen



A



B



C

Fig. 1