FORMULIERUNG FÜR BISPECIFIC T-CELL-ENGANGERS (BITES)

Einleitung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf stabile pharmazeutische Zusammensetzungen, die Polypeptide mit mindestens zwei Antigen-Bindedomänen enthalten und besonders geeignet sind für die subkutane Applikation. Die Erfindung stellt flüssige Zusammensetzungen bereit, welche die Bildung unerwünschter Polypeptid-Aggregate (Dimere und/oder Multimere) minimieren. Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin eine Methode zur Minimierung der Aggregation von Polypeptiden mit Antigen-Bindedomänen in flüssigen Zusammensetzungen bereit.

Stand der Technik

Die Notwendigkeit, Antikörper in Lösung zu stabilisieren, d.h. die Bildung von Dimeren und Multimeren (sog. High Molecular Weight oder HMW-Aggregaten) zu verhindern, um die therapeutische Wirksamkeit konstant zu halten, ist im Stand der Technik bekannt. WO2011061712 offenbart stabilisierte Antikörper-Formulierungen, die neben 25 – 250 mg/ml Antikörper 10-30 mM eines Puffers (bevorzugt Acetat, Succinat, Phosphat, Histidin oder Kombinationen hiervon), 1-15% eines Polyols sowie 0,001-0,05% eines Netzmittels enthalten. Der pH-Wert der Zusammensetzungen liegt zwischen 5-7,5.

WO2010148337(A1) („Lyophilized formulation for small modular immunopharmaceuticals") offenbart Zusammensetzungen so genannter Small Immunopharmaceutical Proteins (SMIP). Dies sind Konstrukte aus mehreren, fusionierten Domänen, wie z.B. einer Antigen-Bindedomäne, einer Immunglobulin-Gelenkregion und einer C_H2- oder C_H3-Region eines Ig-Moleküls oder einer hiervon abgeleiteten Region. Die Domänen der SMIPs bestehen aus Polypeptiden, die Produkte von Gensequenzen sind, die humaner, nicht-humaner oder artifizieller (mit Hilfe gentechnischer Methoden erzeugter) Herkunft sein können. SMIP-Proteine sind zwar bevorzugt monospezifisch, in der Anmeldung sind aber auch multispezifische Varianten offenbart, wie beispielsweise Scorpion-Moleküle. Diese enthalten SMIP-Proteine mit einer weiteren, C-terminalen Bindedomäne. Die Bindedomänen der Scorpion-Moleküle binden bevorzugt an unterschiedliche Zielstrukturen und eigenen sich daher als immunspezifische Therapeutika. WO2010148337(A1) offenbart stabile Formulierungen lyophylisierte Zusammensetzungen enthaltend ein SMIP, wobei weniger als 7% des SMIP in aggregierter Form vorliegt. Diese Formulierungen können weiterhin Pufferagentien, Stabilisatoren, Bulking Agentien, Netzmittel und weitere Hilfsstoffe enthalten. WO2009070642 A1 offenbart verschiedene Formulierungen des BiTE-Moleküls MT103, dessen erste Bindedomäne spezifisch an das T-Zellrezeptor-Antigen CD3 bindet, während die zweite spezifisch an das B-Zell-Antigen CD19 bindet. Die BiTE-Moleküle sind in den offenbarten Zusammensetzungen stabil bis zu einer Konzentration von maximal 300 µg/mL, bei einem pH-Wert von 7,0. Als Puffer wird

Citrat eingesetzt. Die Formulierungen eignen sich zur intravenösen und subkutanen Applikation. Die Bioverfügbarkeit nach subkutaner Applikation liegt bei 10-50%.

IgG-Antikörper besitzen große konstante Bereiche (C_{H1-3}-/ C_L-Regionen), die für einen Großteil ihrer physikochemischen Eigenschaften verantwortlich sind. IgG-Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität unterscheiden sich strukturell hauptsächlich im Bereich der hypervariablen Antikörperbindungsstellen (CDR1-CDR3) innerhalb der V_L- und V_H-Regionen. Die strukturellen und physikochemischen Unterschiede zwischen den einzelnen IgG-Varianten sind aufgrund der großen konstanten Bereiche relativ gering. Wie IgG-Antikörper enthalten die in WO2010148337 (A1) beschriebenen SMIP Moleküle Teile der konstanten Antikörperdomäne.

Dagegen unterscheiden sich BiTE-Moleküle mit unterschiedlicher Spezifität deutlich in ihren physikochemischen Eigenschaften. Als Fusionsprotein aus zwei single chain variablen Fragmenten (scFv) idR. unterschiedlicher Immunglobuline fehlen ihnen die konstanten C_{H1-3}-/ C_L-Regionen, so dass Unterschiede in den Antigen-Bindedomänen weitaus größere Teilbereiche der BiTE-Moleküle betreffen, als dies bei IgG-/oder SMIP Antikörpern der Fall ist. Desgleichen unterscheiden sich das BiTE Molekül MT103 und die BiTE Moleküle, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, grundsätzlich in ihrer molekularen Struktur. Während die Domänen bei MT103 in der Reihenfolge V_L-V_H-V_H-V_L angeordnet sind, ist die Anordnung bei BiTE Moleküle, die in der vorliegenden Erfindung bevorzugt verwendet werden in der Form V_H-V_L-V_H-V_L vor. Darüber hinaus unterscheiden sich die Sequenzen beider Moleküle an zahlreichen Positionen.

Diese Eigenschaften der BiTE-Moleküle sowie ihre geringe Größe bedingen deutliche Unterschiede im physikochemischen Verhalten unterschiedlicher BiTE-Moleküle. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, individuelle Formulierungen (zur Erhöhung der physikochemischen Stabilitäten) für jede einzelne Anwendung zu entwickeln, da die Formulierungen einzelner BiTEs oder ähnlicher Moleküle nicht oder nur eingeschränkt für alternative Anwendungen verwendet werden können.

In einer Ausführungsform sind die in den Zusammensetzungen enthaltenen Polypeptide sogenannte *Bispecific T-cell-engangers* (BiTEs). In einer spezifischen Ausführungsform besitzen BiTEs eine erste Bindedomäne, die spezifisch an die ε-Kette des T-Zellrezeptor-CD3-Komplexes bindet und eine zweite Bindedomäne, die spezifisch an das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) bindet. PSMA ist ein integrales Typ-II-Membranprotein, das hochspezifisch und bei Prostatakrebs verstärkt auf Prostata-Epithelzellen exprimiert wird. PSMA wird darüber hinaus von neu gebildeten Blutgefäßen solider Tumoren exprimiert. PSMA-BiTEs vermitteln somit einen direkten Kontakt zwischen cytotoxischen T-Zellen und diesen Zielzellen.

Aggregatbildung von Proteinen, wie z.B. BiTE-Molekülen, ist bei pharmazeutischen Anwendungen unerwünscht, z.B. kann die Wirksamkeit oder Verfügbarkeit eines biologischen Wirkstoffes durch Aggregatbildung verändert werden.

Daraus ergibt sich die Aufgabe eine Formulierung bereitzustellen, die es erlaubt, BiTE-Moleküle so zu stabilisieren, dass eine unerwünschte Aggregatbildung unterdrückt wird.

Die Lösung ist in der vorliegenden Anmeldung und in den Ansprüchen dargelegt und umfasst eine BiTE-Formulierung umfassend TRIS und Phosphat. In ihrer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Formulierung 50 mM Phosphat, 100 mM TRIS, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Dihydrat bei einem pH-Wert von 6,0 und ist in der Lage, Formulierungen mit PSMA-BiTE1-Molekülen gegenüber der Bildung von Aggregaten zu stabilisieren. Dies gilt für niedrige Konzentrationen im Bereich weniger µg/ml ebenso wie für hohe Konzentrationen von >2mg/ml. Der stabilisierende Effekt ist für den Fachmann überraschend, da z.B. das in WO2009070642 A1 verwendete Citrat, auch als Kombination aus 50 mM Citrat und 100 mM TRIS bei pH 6,0, diesen Effekt nicht zeigt. So lag der gemessene Dimeranteil bei einer vergleichbaren Zusammensetzung, die lediglich Citrat statt Phosphat enthielt, bei 7,0%. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung begrenzte den Dimeranteil dagegen auf 0,8% (vgl. Tabelle 6 und 7). Verantwortlich für den stabilisierenden Effekt der Zusammensetzungen ist der kombinierte Einsatz von TRIS und Phosphat. Um die BiTE-Moleküle auch gegenüber Scherkräften zu stabilisieren, ist ein Netzmittel wie Polysorbat 80 in einer Konzentration von mindestens 0,04 % erforderlich, da sonst der Dimeranteil zu groß wird (ca. 7,5%, siehe Tabelle 15). Um die Adsorption der PSMA-BiTE1-Moleküle an der Gefäßwandung von Injektionsspritzen, Infusionsbeuteln, etc. zu verhindern, reichen bereits 0,002% Polysorbat 80 aus.

Definitionen

Der hierin verwendete Begriff „Antikörper“ bezieht sich auf Immunglobulinmoleküle, die je zwei schwere (H) und zwei leichte (L) Polypeptidketten umfassen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede schwere Kette besteht aus einer variablen Region (V_H) und einer konstanten Region, die wiederum aus drei Domänen (C_H1, C_H2 und C_H3) besteht. Jede der leichten Ketten setzt sich aus einer variablen Region (V_L) und eine konstanten Region (C_L) zusammen. Die variablen Regionen sowohl der leichten als auch der schweren Ketten (V_H und V_L) sind weiter unterteilt, in je drei hypervariable Antikörperbindungsstellen (CDR1-CDR3) und insgesamt vier konservierte Bereiche zwischen den CDRs (FR1-FR4).

Der Begriff „monoklonaler Antikörper“ bezeichnet einen Antikörper, der aus einer Population von Antikörpern stammt, die bis auf kleinere, natürlich auftretende Mutationen oder post-translationale

Modifikationen identisch sind. Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern, wie sie im Rahmen der Immunantwort auftreten, sind monoklonale Antikörper gegen ein spezifisches Epitop gerichtet.

Ein „bi-spezifischer" oder „bi-funktionaler Antikörper" ist ein artifizieller, hybrider Antikörper mit zwei unterschiedlichen Paaren aus schwerer und leichter Kette sowie zwei unterschiedlichen Antigen-Bindungsstellen.

Eine Behandlung von Antikörpern mit Papain führt zu zwei identischen, Antigen-bindenden Fab-Fragmenten sowie dem kristallisierbaren Fc-Fragment. Ein „Fab-Fragment" besteht aus einer kompletten V_L-Kette und einem Teil der schweren Kette, nämlich der V_H-Domäne mit der variablen Region und der ersten konstanten Domäne C_H1. Jedes Fab-Fragment besitzt damit eine einzelne Antigen-Bindungsstelle. Das „Fc-Fragment" umfasst die carboxy-terminalen Teile beider schweren Ketten, verknüpft über Disulfidbrücken. Teile des Fc-Fragments werden von Fc-Rezeptoren anderer Zellen erkannt und bestimmen hierüber die Effektorfunktionen der Antikörper.

Pepsin spaltet Antikörper unterhalb der Disulfidbrücken, so dass die beiden Fab-Fragmente über die Gelenkregion verbunden bleiben und ein einzelnes „$F(ab')_2$-Fragment" entsteht. Dieses verfügt über beide Antigen-Bindungsstellen und ist daher wie der vollständige Antikörper in der Lage, Antigene zu vernetzen.

Der Begriff „Domäne" bezeichnet eine globuläre Region eines Proteins mit einer definierten und unabhängig gefalteten Struktur. Die leichten Ketten eines IgG-Antikörpers setzen sich aus zwei Domänen zusammen (je eine konstante und eine variable), die schweren Ketten aus vier Domänen (je drei konstante und eine variable). Die beiden variablen Regionen setzen sich aus je einer Domäne der schweren und einer Domäne der leichten Kette zusammen.

Der Begriff „Epitop" oder „Antigene Determinante" bezeichnet den Bereich eines Antigens, an den ein Antikörper (oder das Antigen-bindende Fragment hiervon) spezifisch bindet. Epitope können aus aufeinanderfolgenden Aminosäuren bestehen, oder aus nicht aufeinanderfolgenden, deren räumliche Nähe zueinander durch tertiäre Proteinfaltung zustande kommt.

Ein „Antigen" ist ein Molekül (z.B. ein Protein, Polypeptid, Peptid, Kohlenhydrat) mit einer „antigenen Determinante", an die ein Antikörper binden kann.

Der Begriff „Konformation" bezieht sich auf die Tertiärstruktur eines Proteins oder Polypeptids, z.B. eines Antikörpers, einer Antikörperlette, einer Domäne oder eines Teils hiervon.

Ein Antikörper, der ein bestimmtes Polypeptid oder ein Epitop auf einem bestimmten Polypeptid „spezifisch bindet", oder „spezifisch für" diese Struktur ist, bindet an alternative Strukturen erheblich weniger effektiv.

Der Begriff „scFv-Antikörper“ in dieser Anmeldung bezieht sich auf künstlich hergestellte Antikörperfragmente, bestehend aus kovalent gebundenen V_H und V_L Domänen eines Antikörpers. Beide Domänen liegen in einer einzigen Polypeptidkette vor und sind über einen Polypeptid-Linker aus mehreren Aminosäuren miteinander verbunden. Bis auf die Fc-vermittelten Effektorfunktionen bleiben bei scFv-Antikörpern alle Funktionen eines Antikörpers erhalten, insbesondere seine Selektivität und Affinität.

"Bispecific T-cell-enganger“ (BiTE)-Moleküle sind rekombinante Proteinkonstrukte aus zwei flexibel verbundenen Einzelketten-Antikörpern (scFv). Einer dieser scFv-Antikörper bindet spezifisch an ein ausgewähltes, durch die Zielzellen exprimiertes Tumorantigen, der zweite bindet spezifisch an CD3, eine Untereinheit des T-Zell-Rezeptorkomplexes auf T-Zellen. Die BiTE-Antikörper sind in der Lage, T-Zellen transient an Zielzellen zu binden und gleichzeitig die cytolytische Aktivität der T-Zellen zu aktivieren. Für die BiTE-vermittelte Aktivierung der T-Zellen sind weder spezifische T-Zellrezeptoren auf den T-Zellen erforderlich, noch MHC-I-Moleküle, Peptidantigene oder co-stimulatorische Moleküle auf der Zielzelle.

Die Begriffe „Stabilität“ und „stabil“ im Kontext von BiTE-Molekülen enthaltenden Verbindungen bezeichnen die Resistenz der Antikörper bzw. ihrer Fragmente gegenüber Aggregation, Degradation oder Fragmentierung unter den zu ihrer Herstellung, Zubereitung, Lagerung, Anwendung oder ihrem Transport gegebenen Bedingungen. „Stabile“ Formulierungen gemäß der vorliegenden Erfindung behalten ihre biologische Aktivität unter den gegebenen Herstellungs-, Zubereitungs-, Transport-, Anwendungs- und Lagerungsbedingungen.

In Lösung befindliche Proteine (z.B. BiTE-Moleküle) sind empfindlich gegenüber mechanischer Bewegung, wie sie während Herstellung, Abfüllung und Transport auftritt. Ab einer gewissen Bewegungsintensität aggregieren und/oder denaturieren die Moleküle. Flüssige, proteinhaltige Zusammensetzungen sind damit während mechanischer Bewegung einem sog. Schüttelstress ausgesetzt. Beim „Schüttel-Stresstest“ wird durch den kontrollierten Einsatz mechanischer (Schüttel-) Kräfte auf flüssige, proteinhaltige Zusammensetzungen das Aggregations- und Denaturierungsverhalten des gelösten Proteins in unterschiedlichen Zusammensetzungen analysiert.

Das Verhalten eines Proteins im Schüttel-Stresstest ist ein Hinweis auf dessen physikalische Stabilität gegenüber Scherkräften, wie sie z.B. bei der Aspiration und Injektion von Lösungen mit Kanülen oder auftreten.

„Lyophilisation“ bezeichnet ein Trocknungsverfahren, das auf dem Prinzip der Sublimation beruht. Die zu trocknende Substanz wird zunächst auf etwa -45°C heruntergekühlt, bevor anschließend ein Vakuum angelegt und die Substanz auf etwa -20°C erwärmt wird. Hierdurch sublimieren die

Eiskristalle direkt in den gasförmigen Zustand, ohne dass ein flüssiger Zwischenschritt durchlaufen wird. Die auf diese Weise getrocknete Substanz enthält nach einem Nachtrocknungsschritt (immer noch unter Vakuum) bei etwa 25°C weniger als 5% ihrer ursprünglichen Feuchtigkeit und wird als „Lyophilisat" bezeichnet.

Vor der Verabreichung an den Patienten wird das Lyophilisat „rekonstituiert", d.h. in einem pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmittel gelöst. Eine „rekonstituierte Formulierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung entsteht durch die Lösung einer lyophilisierten Antikörper-Formulierung in einem solchen Verdünnungsmittel. Der Antikörper liegt anschließend gelöst vor und kann dem Patienten verabreicht werden.

Als „Polyole" wird eine Gruppe organischer Verbindungen bezeichnet, die mehrere Hydroxygruppen (–OH) enthalten (Polyalkohol, mehrwertiger Alkohol). Polyole wie Sucrose oder Trehalose sind Zucker, die in der Lage sind, Antikörper zu stabilisieren und/oder die Osmolarität einer Zusammensetzung zu beeinflussen.

Um eine unerwünschte Degradierung oder Aggregation von Proteinen während der Lyophilisierung zu verhindern, werden sog. „Lyoprotektiva" hinzugefügt. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Zucker oder Zuckeralkohole wie Sucrose, Mannose, Trehalose, Glucose, Sorbitol, Mannitol. Im Kontext der vorliegenden Erfindung ist Trehalose das bevorzugt verwendete Lyoprotektivum.

Der Begriff „Netzmittel" hierin bezieht sich auf jedes Detergenz mit einer hydrophilen und einer hydrophoben Region und schließt nicht-ionische, kationische, anionische und zwitterionische Detergentien mit ein. Verwendbare Detergentien umfasse beispielsweise Polyoxyethylen-sorbitan-monooleat (auch bekannt als Polysorbat 80 oder TWEEN 80), Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (auch bekannt als Polysorbat 20 oder TWEEN 20), oder N-Laurylsarcosin. Für die hierin offenbarten Zusammensetzungen ist ein nicht-ionisches Netzmittel zu bevorzugen. Besonders bevorzugt für die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Polysorbat 80. Das Netzmittel kann verwendet werden in einer Konzentration von 0,002 % bis 0,1 %.

Der Begriff „Puffer" bezeichnet hierin eine gepufferte Lösung, deren pH-Wert sich nach Zugabe von sauren oder alkalischen Stoffen nur wenig ändert. Gepufferte Lösungen enthalten eine Mischung aus einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base oder einer schwachen Base und ihrer korrespondierenden Säure.

Der Begriff „Patient" bezieht sich auf menschliche oder tierische) Individuen, die eine vorbeugende oder therapeutische Behandlung erhalten.

Der Begriff „Behandlung“ hierin bezieht sich auf die Anwendung oder Gabe eines therapeutischen Stoffes an einen Patienten, oder auf die Anwendung oder Gabe eines therapeutischen Stoffes an ein isoliertes Gewebe oder an eine Zelllinie eines Patienten, der eine Krankheit leidet, ein Symptom einer Krankheit zeigt, oder eine Prädisposition für eine Krankheit hat, mit dem Ziel, die Krankheit, ihre Symptome oder die Prädisposition für die Krankheit zu heilen, zu verbessern, zu beeinflussen, abzustellen oder zu lindern.

Als „Effektive Dosis“ wird hierin die Wirkstoffmenge bezeichnet, mit der sich zumindest teilweise der gewünschte Effekt erzielen lässt. Eine „therapeutisch effektive Dosis“ ist demnach definiert als die Wirkstoffmenge, die ausreicht, um eine Krankheit zumindest teilweise zu heilen, oder durch sie verursachten Beeinträchtigungen des Patienten zumindest teilweise zu beheben. Die hierfür tatsächlich erforderlichen Mengen sind abhängig vom Schweregrad der Erkrankung sowie dem allgemeinen Immunstatus des Patienten.

Der Begriff “Bioverfügbarkeit“, wie hier verwendet, bezeichnet den prozentualen Anteil eines Wirkstoffes oder einer Arzneimitteldosis, die unverändert im systemischen Kreislauf zur Verfügung steht. Die Bioverfügbarkeit ist damit eine Messgröße dafür, wie schnell und in welchem Umfang der Wirkstoff resorbiert wird und am Wirkort zur Verfügung steht. Intravenös verabreichte Arzneimittel haben definitionsgemäß eine Bioverfügbarkeit von 100%.

Die absolute Bioverfügbarkeit ist die Bioverfügbarkeit einer auf beliebige (nicht-intravenöse) Weise verabreichten Substanz im Vergleich zur intravenösen Gabe bezeichnet, während sich die relative Bioverfügbarkeit aus dem Vergleich der Bioverfügbarkeiten bei einzelnen Darreichungsformen (z.B. oral vs. subkutan) ergibt.

Eine „isotonische Verbindung“ besitzt im Wesentlichen denselben osmotischen Druck wie menschliches Blut. Isotonische Verbindungen haben daher im Allgemeinen einen osmotischen Druck von etwa 250 bis 350 mOsm. Der Begriff „hypotonisch“ beschreibt Zusammensetzungen mit einem osmotischen Druck unterhalb dessen von menschlichem Blut, während „hypertonische“ Zusammensetzungen einen osmotischen Druck oberhalb dessen von menschlichem Blut aufweisen.

Der Begriff „Hochmolekulare Aggregate“ (synonym: „High Molecular Weight Aggregates“, oder „HMW“) bezeichnet Aggregate, die sich aus mindestens zwei Proteinmonomeren zusammensetzen.

Der hierin verwendete Begriff „Phosphate“ bezieht sich auf wasserlösliche, pharmakologisch unbedenkliche Salze der dreibasigen ortho-Phosphorsäure (H_3PO_4), wobei primäre (Hydrogen-) und sekundäre (Dihydrogen-) Phosphate bevorzugt sind. Bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen Natriumphosphate, besonders bevorzugt Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4).

Detaillierte Beschreibung

Die Erfindung betrifft die pharmazeutische Formulierung eines Bispecific T-cell-engager (BiTE) Moleküls, dadurch gekennzeichnet, dass sie Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und Phosphat umfasst.

BiTE Moleküle sind im Stand der Technik bekannt. BiTE Moleküle sind so gestaltet, dass sie transient zytotoxische T-Zellen für die Lyse bestimmter Targetzellen beteiligen (siehe Bäuerle et al. Curr Opin Mol Ther. 2009 Feb;11(1):22-30.). Sie sind besonders für die Krebstherapie geeignet.

Ein BiTE Molekül ist ein Polypeptid, welches zwei scFv Antikörperbindedomänen umfasst, wobei die erste scFv Bindedomäne an das humane CD3 epsilon binden kann und die zweite scFv Bindedomäne bindet ein weiteres zweites Oberflächenantigen. Bevorzugt sind humane Oberflächenantigene von Krebszellen. Besonders bevorzugte Oberflächenantigene sind humane Oberflächenproteine von Krebszellen. Die scFv Bindedomänen können chimäre, humanisierte oder humane Antikörperfragmente umfassen. Bevorzugt umfassen die scFv Bindedomänen humane oder humanisierte Antikörperfragmente.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten BiTE Moleküle unterscheiden sich von den BiTE Molekülen (z.B. MT103) wie sie z.B. in WO2009070642 A1 beschrieben sind, dadurch, dass die erste Bindedomäne an ein Epitop der humanen und Callithrix jacchus, Saguinus oedipus oder Saimiri sciureus CD3 epsilon Kette binden kann, wobei das Epitop Teil einer Aminosäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, 2, 3 und 4 und wobei das Epitop mindestens die Aminosäuresequenz Gln-Asp-Gly-Asn-Glu umfasst. Dies hat den Vorteil, dass präklinische Untersuchungen erleichtert sind, da z.B. pharmakokinetische oder toxikologische Studien in den genannten Versuchstieren durchgeführt werden können, deren Immunsystem dem des Menschen ähnlich ist. BiTE Moleküle mit diesen Charakteristika sind in z.B in WO2008119566 A2 oder WO2008119567 A2 offenbart.

In einer Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung also solche BiTE Moleküle, deren erste Bindedomäne an ein Epitop der humanen und Callithrix jacchus, Saguinus oedipus oder Saimiri sciureus CD3 epsilon Kette binden kann, wobei das Epitop Teil einer Aminosäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, 2, 3 und 4 und wobei das Epitop mindestens die Aminosäuresequenz Gln-Asp-Gly-Asn-Glu umfasst.

In SEQ ID NO: 5 ist die Aminosäuresequenz einer scFV Bindedomäne wiedergegeben, die die vorangegangen Kriterien erfüllt.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erste Bindedomäne des Polypeptides die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 5.

scFV umfassen die Aminosäuren einer variablen leichten (VL) und einer variablen schweren (VH) Antikörperkette. BITE Moleküle können in unterschiedlicher Orientierung aufgebaut werden. Das BiTE Molekül MT103 hat z.B. eine (VL-VH) Bindedomäne2-(VH-VL)Bindedomäne1 Anordnung der scFVs.

Es sind auch andere Orientierungen möglich, z.B. (VH-VL)Bindedomäne2-(VH-VL)Bindedomäne1.

In einer bevorzugten Ausführungsform hat das Polypeptid die Anordnung (VH-VL)Bindedomäne2-(VH-VL)Bindedomäne1.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hat das Polypeptid die Anordnung (VH-VL)Bindedomäne2-(VH-VL)Bindedomäne1, wobei (VH-VL)Bindedomäne1 die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 5 umfasst.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Bindedomäne an ein Zelloberflächenantigen binden kann. Ein Zelloberflächenantigen ist ein Antigen, welches von einem Bindeprotein, z.B. einem Antikörper oder einem scFv, gebunden werden kann, ohne dass die Zelle lysiert werden muss.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Bindedomäne des Polypeptides an ein Oberflächenantigen einer Krebszelle binden kann.

In einer weiteren Ausführungsform bindet die zweite Bindedomäne des Polypeptides an das humane Oberflächenantigen Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA, SWISS-PROT: FOLH1_HUMAN, accession no: Q04609). Solche BiTE-Moleküle sind z.B. in WO2010037836 A2 beschrieben.

In SEQ ID NO: 6 ist eine Bindedomäne beschrieben, die an PSMA bindet.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die zweite Bindedomäne des Polypeptides die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 6

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid, welches eine erste und eine zweite scFv Bindedomäne umfasst, wobei die erste Bindedomäne die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 5 umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung weiterhin TRIS und Phosphat umfasst.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung dadurch gekennzeichnet, dass die Bindedomänen des Polypeptides humane oder humanisierte scFv Antikörperfragmente umfassen.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung dadurch gekennzeichnet, dass die zweite PSMA-bindende Bindedomäne die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 6 umfasst.

In einer Ausführungsform umfasst das Polypeptid die Aminosäuresequenzen der ersten und zweiten Bindedomäne kodiert durch die Sequenzen wiedergegeben in SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6.

Ein Polypeptid, welches die Sequenzen wiedergegeben in SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6 umfasst ist in SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO:8 wiedergegeben.

Ein bevorzugtes Polypeptid umfasst die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 7.

Ein besonders bevorzugtes Polypeptid ist das PSMA-BiTE 1 Molekül, welches durch Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 8 kodiert wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 7 umfasst.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 8 umfasst.

In einer Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml, etwa 0,7 µg/ml, etwa 1 µg/ml, etwa 2 µg/ml, etwa 5 µg/ml, etwa 6 µg/ml, etwa 10 µg/ml, etwa 15 µg/ml, etwa 18 µg/ml, etwa 20 µg/ml, etwa 25 µg/ml, etwa 30 µg/ml, etwa 30 µg/ml, etwa 35 µg/ml, etwa 40 µg/ml, etwa 45 µg/ml, etwa 50 µg/ml, etwa 55 µg/ml, etwa 60 µg/ml, etwa 70 µg/ml, etwa 80 µg/ml, etwa 90 µg/ml, etwa 100 µg/ml, etwa 110 µg/ml, etwa 120 µg/ml, etwa 130 µg/ml, etwa 140 µg/ml, etwa 150 µg/ml, etwa 160 µg/ml, etwa 170 µg/ml, etwa 180 µg/ml, etwa 190 µg/ml, etwa 200 µg/ml, etwa 225 µg/ml, etwa 275 µg/ml, etwa 300 µg/ml, etwa 325 µg/ml, etwa 350 µg/ml, etwa 375 µg/ml, etwa 400 µg/ml, etwa 500 µg/ml, etwa 700 µg/ml, etwa 900 µg/ml, oder etwa 1000 µg/ml der oben genannten Polypeptide.

In einer Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung 0,5 µg/ml, 0,7 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 45 µg/ml, 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 90

µg/ml, 100 µg/ml, 110 µg/ml, 120 µg/ml, 130 µg/ml, 140 µg/ml, 150 µg/ml, 160 µg/ml, 170 µg/ml, 180 µg/ml, 190 µg/ml, 200 µg/ml, 225 µg/ml, 275 µg/ml, 300 µg/ml, 325 µg/ml, 350 µg/ml, 375 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 700 µg/ml, 900 µg/ml, oder 1000 µg/ml der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 1 mg/ml, etwa 1,3 mg/ml, etwa 1,5 mg/ml, etwa 1,8 mg/ml, etwa 2 mg/ml, etwa 2,3 mg/ml, etwa 2,5 mg/ml, etwa 2,8 mg/ml, etwa 3 mg/ml, etwa 3,5 mg/ml, etwa 4 mg/ml, etwa 5 mg/ml, etwa 6 mg/ml, etwa 7 mg/ml, etwa 8 mg/ml etwa 9 mg/ml oder etwa 10 mg/ml der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 1 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,8 mg/ml, 2 mg/ml, 2,3 mg/ml, 2,5 mg/ml, 2,8 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml 9 mg/ml oder 10 mg/ml der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 1 µg/ml, von etwa 1 µg/ml bis etwa 5 µg/ml, von etwa 5 µg/ml bis etwa 10 µg/ml, von etwa 10 µg/ml bis etwa 20 µg/ml, von etwa 20 µg/ml bis etwa 50 µg/ml, von etwa 50 µg/ml bis etwa 90 µg/ml, von etwa 90 µg/ml bis etwa 120 µg/ml, von etwa 120 µg/ml bis etwa 150 µg/ml, von etwa 150 µg/ml bis etwa 180 µg/ml, von etwa 180 µg/ml bis etwa 200 µg/ml, von etwa 200 µg/ml bis etwa 250 µg/ml, von etwa 250 µg/ml bis etwa 280 µg/ml, von etwa 280 µg/ml bis etwa 300 µg/ml, oder von etwa 300 µg/ml bis etwa 350 µg/ml der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung von 0,5 µg/ml bis 1 µg/ml, von 1 µg/ml bis 5 µg/ml, von 5 µg/ml bis 10 µg/ml, von 10 µg/ml bis 20 µg/ml, von 20 µg/ml bis 50 µg/ml, von 50 µg/ml bis 90 µg/ml, von 90 µg/ml bis 120 µg/ml, von 120 µg/ml bis 150 µg/ml, von 150 µg/ml bis 180 µg/ml, von 180 µg/ml bis 200 µg/ml, von 200 µg/ml bis 250 µg/ml, von 250 µg/ml bis 280 µg/ml, von 280 µg/ml bis 300 µg/ml, oder von 300 µg/ml bis 350 µg/ml der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung von etwa 350 µg/ml bis etwa 1 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 1,3 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 1,5 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 1,8 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 2 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 2,3 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 2,5 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 2,8 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 3,0 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 3,5 mg/ml, von etwa 350 µg/ml bis etwa 5 mg/ml, oder von etwa 350 µg/ml bis etwa 10 mg/ml, der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung von 350 µg/ml bis 1 mg/ml, von 350 µg/ml bis 1,3 mg/ml, von 350 µg/ml bis 1,5 mg/ml, von 350 µg/ml bis 1,8 mg/ml, von 350 µg/ml bis 2 mg/ml, von 350 µg/ml bis 2,3 mg/ml, von 350 µg/ml bis 2,5

mg/ml, von 350 µg/ml bis 2,8 mg/ml, von 350 µg/ml bis 3,0 mg/ml, von 350 µg/ml bis 3,5 mg/ml, von 350 µg/ml bis 5 mg/ml, oder von 350 µg/ml bis 10 mg/ml, der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung von 0,5 µg/ml bis 10 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 5 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 3,5 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 3,0 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 2,8 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 2,5 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 2,3 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 2,0 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 1,8 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 1,5 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 1,3 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 1,0 mg/ml, von 0,5 µg/ml bis 350 µg/ml, von 0,5 µg/ml bis 300 µg/ml, von 0,5 µg/ml bis 250 µg/ml, der BiTE-Moleküle.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 10 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 5 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 3,5 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 3,0 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2,8 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2,5 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2,3 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2,0 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 1,8 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 1,5 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 1,3 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 1,0 mg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 350 µg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 300 µg/ml, von etwa 0,5 µg/ml bis etwa 250 µg/ml, der BiTE-Moleküle.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine Kombination aus Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und Phosphat als puffernde, den pH-Wert beeinflussende Agenzien.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung TRIS in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder von etwa 100 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 200 mM, oder von etwa 250 mM, oder von etwa 300 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder von etwa 100 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung TRIS in einer Konzentration von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM, oder von 250 mM, oder von 300 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder

von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder von etwa 100 mM, oder von etwa 110 mM, oder von etwa 120 mM, oder von etwa 130 mM, oder von etwa 140 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 160 mM, oder von etwa 170 mM, oder von etwa 180 mM, oder von etwa 190 mM, oder von etwa 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Phosphat in einer Konzentration von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 110 mM, oder von 120 mM, oder von 130 mM, oder von 140 mM, oder von 150 mM, oder von 160 mM, oder von 170 mM, oder von 180 mM, oder von 190 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie TRIS in einer Konzentration von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM, oder von 250 mM, oder von 300 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie TRIS in einer Konzentration von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM, oder von 250 mM, oder von 300 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder

von etwa 100 mM, oder von etwa 110 mM, oder von etwa 120 mM, oder von etwa 130 mM, oder von etwa 140 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 160 mM, oder von etwa 170 mM, oder von etwa 180 mM, oder von etwa 190 mM, oder von etwa 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Phosphat in einer Konzentration von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 110 mM, oder von 120 mM, oder von 130 mM, oder von 140 mM, oder von 150 mM, oder von 160 mM, oder von 170 mM, oder von 180 mM, oder von 190 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM und Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder von etwa 100 mM, oder von etwa 110 mM, oder von etwa 120 mM, oder von etwa 130 mM, oder von etwa 140 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 160 mM, oder von etwa 170 mM, oder von etwa 180 mM, oder von etwa 190 mM, oder von etwa 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM und Phosphat in einer Konzentration von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 110 mM, oder von 120 mM, oder von 130 mM, oder von 140 mM, oder von 150 mM, oder von 160 mM, oder von 170 mM, oder von 180 mM, oder von 190 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder von etwa 100 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 200 mM, oder von etwa 250 mM, oder von etwa 300 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von etwa 20 mM, oder von etwa 30 mM, oder von etwa 40 mM, oder von etwa 50 mM, oder von etwa 60 mM, oder von etwa 70 mM, oder von etwa 80 mM, oder von etwa 90 mM, oder von etwa 100 mM, oder von etwa 150 mM, oder von etwa 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM sowie TRIS in einer Konzentration von von 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM, oder von 250 mM, oder von 300 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 10 mM, oder von 20 mM, oder von 30 mM, oder von 40 mM, oder von 50 mM, oder von 60 mM, oder von 70 mM, oder von 80 mM, oder von 90 mM, oder von 100 mM, oder von 150 mM, oder von 200 mM.

In einer bevorzugten Ausführungsform liegt der pH-Wert der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,0 bis etwa 7,0, oder in einem Bereich von etwa 5,0 bis etwa 6,5. Besonders bevorzugt liegt der pH-Wert der erfindungsgemäßen Zusammensetzung bei 6,0. Bevorzugt wird der pH-Wert der erfindungsgemäßen Zusammensetzung mit HCl eingestellt.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung zusätzlich ein Netzmittel. Beseispiele für netzmittel sind nicht-ionosche Netzmittel wie Polysorbate (z.B. Polysorbat 20 oder 80); Polyoxamere (z.B. Polyoxamer 188); Triton; Natriumoctylglycosid; Lauryl-, Myristyl-, Lonoleyl-, oder Stearylsulfobetain; Lauryl-, Myristyl-, Lonoleyl-, oder Stearylsarcosin; Lineolyl-, Myrisyl-, oder Cetylbetain; Lauroamidopropyl-, Cocamidopropyl-, lineoamidopropyl, Myristamidopropyl-, Palmidopropyl-, oder Isostearamidopropylbetain; Polyethylglycol; Polypropylglycol; und Kopolymere aus Ethylen und Propylenglycol (z.B. Pluronics, PF68). In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Netzmittel Polysorbat 80.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein Netzmittel in einer Konzentration von 0.002% bis 0.1%, bevorzugt von 0.04% bis 0.1%.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.002% bis 0.1%, bevorzugt von 0.04% bis 0.1%. Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04%.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung zusätzlich ein Lyoprotektivum. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung zusätzlich einen Zucker oder einen Zuckeralkohol als Lyoprotektivum. Bei dem Lyoprotektivum handelt es sich bevorzugt um Trehalose oder Trehalose Dihydrat. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung das Lyoprotektivum in einer Konzentration von 2% bis 10%, besonders bevorzugt von 4%.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Trehalose in einer Konzentration von 2% bis 10%, besonders bevorzugt von 4%.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 2% bis 10%, besonders bevorzugt von 4%.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 50 mM bis etwa 200 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 20 mM bis etwa 100 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 50 mM bis etwa 200 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 20 mM bis etwa 100 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 50µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 50µg/ml bis etwa 1 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 100µg/ml bis etwa 500 µg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Besonders bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Na_2HPO_4 in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose Dihydrat in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 50 mM bis etwa 200 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 20 mM bis etwa 100 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 50 mM bis etwa 200 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 0,5 µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 20 mM bis etwa 100 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 50µg/ml bis etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 50µg/ml bis etwa 1 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 100µg/ml bis etwa 500 µg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Phosphat in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung etwa 2 mg/ml der PSMA-BiTE1-Moleküle sowie TRIS in einer Konzentration von etwa 100 mM, Na_2HPO_4 in einer Konzentration von etwa 50 mM, Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0.04% und Trehalose in einer Konzentration von 4%, wobei der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Konzentrationsangaben in Prozent (%) beziehen sich auf die Massenkonzentration (Masse / Volumen).

Zusätzlich können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen noch weitere pharmazeutisch akzeptierte Zusätze enthalten (Remington's Pharmaceutical Sciences; 18. Ausgabe, Mack Publishing Co., Easton, PA, USA). Solche Zusätze sind z.B. Konservierungsstoffe oder Antioxidantien. Als Antioxidantien können z.B. Ascorbat, Methionin, Vitamin E, oder Natriummetabisulfit verwendet werden. Konservierungsstoffe sind z.B. Substanzen, die das Wachstum von Mikroorganismen unterdrücken oder verlangsamen. Eine solche Substanze ist z.B. Thimerosal.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Feststoffgemisch, das durch Lyophilisation der erfindungsgemäßen Zusammensetzung hergestellt, oder zumindest durch Lyophilisation dieser Zusammensetzung herstellbar ist.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Lyophilisat, herstellbar durch Gefriertrocknung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Lyophilisat, hergestellt durch Gefriertrocknung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung nach dem im Beispiel 16 beschriebenen Protokoll.

In einer weiteren Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Zusammensetzung bereitgestellt, indem das lyophilisierte Feststoffgemisch durch Lösung in einem geeigneten flüssigen Medium rekonstituiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Zusammensetzung bereitgestellt, indem das lyophilisierte Feststoffgemisch durch Lösung in Wasser, bevorzugt sterilem Wasser, rekonstituiert wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Erzeugnis, welches eine der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und bevorzugt auch eine Anleitung zum Gebrauch enthält. In einer Ausführungsform umfasst das Erzeugnis einen Behälter, der eine der oben aufgeführten Zusammensetzungen enthält. Verwendbare Behälter sind z.B. Flaschen, Ampullen, Röhrchen oder Spritzen. Die Behälter können z.B. aus Glas oder Kunststoff sein. Spritzen können eine Injektionsnadel, z.B. aus Metall, umfassen.

In einer Ausführungsform ist der Behälter eine Spritze. In einer weiteren Ausführungsform ist die Spritze in einer Injektionsvorrichtung enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Injektionsvorrichtung ein Autoinjektor. Ein Autoinjektor kann als ein Injektionsgerät beschrieben werden, welches nach Aktivierung seinen Inhalt ohne zusätzliche Handlung des Patienten oder einer anderen Person verabreicht. In der vorliegenden Erfindung ist die bevorzugte Verabreichung subkutan.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen weisen im Vergleich zu den im Stand der Technik verfügbaren Formulierungen für BiTE Moleküle eine erhöhte Stabilität und signifikant erhöhte Bioverfügbarkeit auf. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind aufgrund dieses Eigenschaftsprofils besonders zur parenteralen Applikation geeignet. Parenterale Applikationen sind unter anderem die intravenöse Injektion oder Infusion, intraarterielle Injektion oder Infusion (in eine Arterie), intramuskuläre Injektion, intrathekale Injektion, subkutane Injektion, intraperitoneale Injektion oder Infusion, intraossäre Applikation oder Injektion in ein Gewebe. Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur subkutanen Applikation geeignet. Eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Bioverfügbarkeit des Polypeptids nach subkutaner Gabe der Zusammensetzung >60% beträgt, bevorzugt ist dies die Bioverfügbarkeit in einem Cynomolgus Affen

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen besitzen wertvolle pharmakologische Eigenschaften und können zur Vorbeugung und Behandlung von Erkrankungen bei Menschen und Tieren verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind zur Behandlung von hyperproliferativen Erkrankungen beim Menschen und bei Säugetieren allgemein geeignet. Zu den hyperproliferativen Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eingesetzt werden können, zählt insbesondere die Gruppe der Krebs- und Tumorerkrankungen. Hierunter werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere die folgenden Erkrankungen verstanden, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein: Brustkarzinome und Brusttumore (ductale und lobuläre Formen, auch *in situ*), Atemwegstumore (kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinom), Hirntumore (z.B. des Hirnstamms und des Hypothalamus, Astrocytoma,

Medulloblastoma, Ependymoma sowie neuro-ectodermale und pineale Tumore), Tumore der Verdauungsorgane (Speiseröhre, Magen, Gallenblase, Dünndarm, Dickdarm, Rektum), Lebertumore (u.a. hepatozelluläres Karzinom, Cholangiokarzinom und gemischt-hepatozelluläres Cholangiokarzinom), Tumore des Kopf- und Halsbereiches (Larynx, Hypopharynx, Nasopharynx, Oropharynx, Lippen und Mundhöhle), Hauttumore (Plattenepithelkarzinom, Kaposi-Sarkom, malignes Melanom, Merkelzell-Hautkrebs und nicht-melanomartiger Hautkrebs), Tumore der Weichteile (u.a. Weichteilsarkome, Osteosarkome, maligne fibröse Histiozytome, Lymphosarkome und Rhabdomyosarkome), Tumore der Augen (u.a. intraokuläres Melanom und Retinoblastom), Tumore der endokrinen und exokrinen Drüsen (z.B. thyroide und parathyroide Drüsen, Bauchspeicheldrüse und Speicheldrüse), Tumore des Harntrakts (Blasen-, Penis-, Nieren-, Nierenbecken- und Harnleitertumore) sowie Tumore der reproduktiven Organe (Endometrium-, Zervix-, Ovarial-, Vaginal-, Vulva- und Uteruskarzinome der Frau sowie Prostata- und Hodenkarzinome des Mannes). Dazu gehören auch proliferative Bluterkrankungen in solider Form und als zirkulierende Blutzellen, wie Lymphome, Leukämien und myeloproliferative Erkrankungen, z.B. akute myeloide, akute lymphoblastische, chronisch-lymphozytische, chronisch-myelogene und Haarzell-Leukämie, sowie AIDS-korrelierte Lymphome, Hodgkin-Lymphome, Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, Burkitt-Lymphome und Lymphome im zentralen Nervensystem.

Bevorzugte Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eingesetzt werden können, sind Karzinome und/oder Metastasen die das PSMA Antigen exprimieren.

Eine besonders bevorzugte Erkrankung, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eingesetzt werden können, ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Prostatakarzinom, Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms und Weichteilmetastasen des Prostatakarzinoms.

Eine weiter besonders bevorzugte Erkrankung, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eingesetzt werden können, ist das Prostatakarzinom.

Diese gut beschriebenen Krankheiten des Menschen können mit vergleichbarer Ätiologie auch in anderen Säugetieren vorkommen und dort mit den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung behandelt werden.

Der Begriff "Behandlung" oder "behandeln" wird im Rahmen dieser Erfindung konventionell verwendet und bedeutet die Versorgung, Pflege und Betreuung eines Patienten mit dem Ziel, eine Krankheit oder gesundheitliche Abweichung zu bekämpfen, zu verringern, abzuschwächen oder zu erleichtern und die Lebensbedingungen zu verbessern, die durch diese Krankheit beeinträchtigt werden, wie beispielsweise bei einer Krebserkrankung.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in einem Verfahren zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen, unter Verwendung einer wirksamen Menge einer der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Behandlung und/oder Prävention eine parenterale Applikation der erfindungsgemäßen Zusammensetzung. Besonders bevorzugt ist die subkutane Applikation.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können allein oder bei Bedarf in Kombination mit einer oder mehreren anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, solange diese Kombination nicht zu unerwünschten und inakzeptablen Nebenwirkungen führt. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Arzneimittel, enthaltend mindestens eine der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und einen oder mehrere weitere Wirkstoffe, insbesondere zur Behandlung und/oder Prävention der zuvor genannten Erkrankungen. Beispielsweise können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung mit bekannten anti-hyperproliferativen, zytostatischen oder zytotoxischen Substanzen zur Behandlung von Krebserkrankungen kombiniert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorgenannten Zusammensetzungen in einem therapeutischen Verfahren, wobei die Zusammensetzung geeignet ist für parenterale Applikationsformen, wie die intravenöse Injektion oder Infusion, intraarterielle Injektion oder Infusion (in eine Arterie), intramuskuläre Injektion, intrathekale Injektion, subkutane Injektion, intraperitoneale Injektion oder Infusion, intraossäre Applikation oder Injektion in ein Gewebe.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorgenannten Zusammensetzungen in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung von zellproliferativen Erkrankungen der Prostata.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorgenannten Zusammensetzungen in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung von zellproliferativen Erkrankungen der Prostata, wobei die Zusammensetzung geeignet ist für die subkutane Applikation.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorgenannten Zusammensetzungen in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung von zellproliferativen Erkrankungen der Prostata, wobei die Zusammensetzung durch subkutane Applikation verabreicht wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Methode zur Stabilisierung von Polypeptiden, umfassend die Herstellung einer der vorgenannten Zusammensetzungen, die neben den Polypeptiden, mindestens TRIS und Phosphat enthält und einen pH-Wert von 6.0 besitzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, der die vorgenannten Zusammensetzungen umfasst.

Bevorzugte Verbindungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Verbindungen.

Ausführungsformen

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat wobei das Polypeptid zwei scFv Antikörperbindedomänen umfasst, wobei die erste scFv Bindedomäne an das humane CD3 epsilon binden kann.

In einer weiteren Ausführungsform der Zusammensetzung kann die zweite Bindedomäne des Polypeptids an ein Zelloberflächenantigen binden.

In einer weiteren Ausführungsform der Zusammensetzung umfasst das Polypeptid eine zweite Bindedomäne, die an ein Oberflächenantigen einer Krebszelle binden kann.

In einer weiteren Ausführungsform ist das Oberflächenantigen, an das die zweite Bindedomäne des Polypeptids binden kann das Prostata-Spezifische Membran-Antigen (PSMA).

In einer weiteren Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptid die Anordnung (VH-VL)Bindedomäne2-(VH-VL)Bindedomäne1.

In einer weiteren Ausführungsform der Zusammensetzung umfasst die erste Bindedomäne des Polypeptids die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 5.

In einer weiteren Ausführungsform der Zusammensetzung umfasst die zweite, PSMA-bindende Bindedomäne des Polypeptids die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 6.

In einer weiteren Ausführungsform der Zusammensetzung ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 7 umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 8 umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 5 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 3.5 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 3.0 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 2.5 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 2.0 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 1.8 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 1.5 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.35 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.3 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.25 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.2 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung das PSMA-BiTE1 in einer Konzentration von 50 µg/mL bis 1 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung das PSMA-BiTE1 in einer Konzentration von 50 µg/mL bis 500 µg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung das PSMA-BiTE1 in einer Konzentration von 100 µg/mL bis 500 µg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von etwa 2 mg/ml.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung TRIS in einer Konzentration von etwa 50 mM bis etwa 200 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 20 mM bis etwa 100 mM.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung 100 mM TRIS und 50 mM Phosphat.

In einer weiteren Ausführungsform liegt der pH-Wert der Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,0 bis etwa 7,0.

In einer weiteren Ausführungsform liegt der pH-Wert der Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,0 bis etwa 6,5.

In einer weiteren Ausführungsform liegt der pH-Wert der Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,5 bis etwa 6,5.

In einer weiteren Ausführungsform liegt der pH-Wert der Zusammensetzung bei etwa 6,0.

In einer weiteren Ausführungsform wird der pH-Wert der Zusammensetzung mit Salzsäure eingestellt.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich ein Netzmittel.

In einer weiteren Ausführungsform ist das Netzmittel Polysorbat 80.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich 0,002% bis 0,1% Polysorbat 80.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich 0,04% bis 0,1% Polysorbat 80.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich 0,04% Polysorbat 80.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich ein Lyoprotektivum.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung als Lyoprotektivum Trehalose oder bevorzugt Trehalose Dihydrat.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich 4% bis 10%Trehalose oder bevorzugt 4% bis 10% Trehalose Dihydrat.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Zusammensetzung zusätzlich etwa 4% Trehalose oder bevorzugt zusätzlich etwa 4% Trehalose Dihydrat.

In einer bevorzugten Ausführungsform hat die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 und umfasst 50 µg/mL bis 1 mg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Phosphat, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Dihydrat.

In einer bevorzugten Ausführungsform hat die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 und umfasst 50 µg/mL bis 500 µg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Phosphat, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Dihydrat.

In einer bevorzugten Ausführungsform hat die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 und umfasst 50 µg/mL bis 500 µg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Na_2HPO_4, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Dihydrat.

In einer weiteren Ausführungsform hat die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 und umfasst 50 µg/mL bis 1 mg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Phosphat, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose.

In einer weiteren Ausführungsform hat die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 und umfasst 50 µg/mL bis 500 µg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Phosphat, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose.

In einer weiteren Ausführungsform hat die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 und umfasst 50 µg/mL bis 500 µg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Na_2HPO_4, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptide nach Lyophylisierung und anschließender Rekonstitution und Lagerung (7 Tage bei 2-8°C und anschließend 16 Stunden bei 20°C+- 5°C; wie in Beispiel 21 beschrieben) ein Bioaktivität von mindestens 90%, bevorzugt von mindestens 96% aufweist (bevorzugt ermittelt durch zellbasiertem Aktivitätstest wie in Beispiel 21 beschrieben).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptide nach Lyophylisierung und Lagerung von 3 Monaten oder 12 Monaten ein Bioaktivität von mindestens

90%, bevorzugt von mindestens 96% aufweist (bevorzugt ermittelt durch zellbasiertem Aktivitätstest wie in Beispiel 21 beschrieben).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptide nach Lyophylisierung und Lagerung von 3 Monaten bei 6°C oder 12 Monaten bei 6°C eine Bioaktivität von mindestens 97% aufweist (bevorzugt ermittelt durch zellbasiertem Aktivitätstest wie in Beispiel 21 beschrieben).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptide nach Einwirkung von Scherstress durch Injektion mehr als 96 % monomer Gehalt (SEC) aufweist, (bevorzugt ermittelt nach Beispiel 18a).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptide nach Einwirkung von Scherstress durch langsame oder schnelle Injektion mittels einer Nadel nicht mehr als 4 % dimer und multimer Gehalt (SEC) aufweist, (bevorzugt ermittelt nach Beispiel 18a).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Zusammensetzung hat das Polypeptide nach Einwirkung von Scherstress durch langsame oder schnelle Injektion mittels einer Nadel (Gauge: 30 G, Nadellänge: 13 mm) nicht mehr als 4 % dimer und multimer Gehalt (SEC) aufweist, (bevorzugt ermittelt nach Beispiel 18a).

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst ein Feststoffgemisch, herstellbar durch Lyophilisation der flüssigen Zusammensetzung.

In einer weiteren Ausführungsform wird die Zusammensetzung durch Lösung des lyophilisierten erfindungsgemäßen Feststoffgemisches in einem geeigneten flüssigen Medium rekonstituiert.

In einer weiteren Ausführungsform beträgt die Bioverfügbarkeit des Polypeptids nach subkutaner Gabe der Zusammensetzung >60%.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Zusammensetzung Anwendung in einem therapeutischen Verfahren.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Zusammensetzung Anwendung in einem therapeutischen Verfahren, wobei dieses Verfahren die parenterale Applikation der Zusammensetzung umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Zusammensetzung Anwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Zusammensetzung Anwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen der Prostata.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Zusammensetzung Anwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen der Prostata, wobei das Verfahren die subkutane Applikation der Zusammensetzung umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung eine Methode zur Stabilisierung von Polypeptiden, umfassend die Herstellung einer Zusammensetzung, die neben den Polypeptiden mindestens TRIS und Phosphat enthält und einen pH-Wert von 6.0 besitzt.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung einen Kit, umfassend die vorbeschriebene Zusammensetzung.

Bevorzugte Ausführungsformen sind

1. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat wobei das Polypeptid zwei scFv Antikörperbindedomänen umfasst, wobei die erste scFv Bindedomäne an das humane CD3 epsilon binden kann.

2. Eine Zusammensetzung nach Ausführungsform 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Bindedomäne des Polypeptids an ein Zelloberflächenantigen binden kann.

3. Eine Zusammensetzung nach Ausführungsform 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid eine zweite Bindedomäne umfasst, die an ein Oberflächenantigen einer Krebszelle binden kann.

4. Eine Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Oberflächenantigen, das Prostata-Spezifische Membran-Antigen (PSMA) ist.

5. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid die Anordnung $(VH\text{-}VL)_{Bindedomäne2}$-$(VH\text{-}VL)_{Bindedomäne1}$ hat.

6. Eine Zusammensetzung nach einen der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Bindedomäne des Polypeptids die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 5 umfasst.

7. Eine Zusammensetzung nach einen der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite, PSMA-bindende Bindedomäne des Polypeptids die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 6 umfasst.

8. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 7 umfasst.

9. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 8 umfasst.

10. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 5 mg/ml enthält.

11. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 3.5 mg/ml enthält.

12. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 3.0 mg/ml enthält.

13. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 2.5 mg/ml enthält.

14. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 2.0 mg/ml enthält.

15. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 1.8 mg/ml enthält.

16. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 1.5 mg/ml enthält.

17. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.35 mg/ml enthält.

18. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.3 mg/ml enthält.

19. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.25 mg/ml enthält.

20. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 0.2 mg/ml enthält.

21. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das PSMA-BiTE1 in einer Konzentration von 50 µg/mL bis 1 mg/ml umfasst.

22. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das PSMA-BiTE1 in einer Konzentration von 50 µg/mL bis 500 µg/ml umfasst.

23. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das PSMA-BiTE1 in einer Konzentration von 100 µg/mL bis 500 µg/ml umfasst.

24. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von etwa 2 mg/ml enthält.

25. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung TRIS in einer Konzentration von etwa 50 mM bis etwa 200 mM sowie Phosphat in einer Konzentration von etwa 20 mM bis etwa 100 mM enthält.

26. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung 100 mM TRIS und 50 mM Phosphat enthält.

27. Eine Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,0 bis etwa 7,0 liegt.

28. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,0 bis etwa 6,5 liegt.

29. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 5,5 bis etwa 6,5 liegt.

30. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Zusammensetzung bei etwa 6,0 liegt.

31. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Zusammensetzung mit Salzsäure eingestellt wird.

32. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich ein Netzmittel enthält.

33. Eine Zusammensetzung nach einem der Ausführungsform 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Netzmittel Polysorbat 80 ist.

34. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich 0,002% bis 0,1% Polysorbat 80 enthält.

35. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich 0,04% bis 0,1% Polysorbat 80 enthält.

36. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich 0,04% Polysorbat 80 enthält.

37. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich ein Lyoprotektivum enthält. Bevorzugt enthält die Zusammensetzung 2 – 10 % eines Lyoprotektivums, besonders bevorzugt 4 %.

38. Eine Zusammensetzung nach Ausführungsform 37, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyoprotektivum Trehalose ist. Bevorzugt ist das Lyprotektivum Trehalose Diyhdrat.

39. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich 4% bis 10%Trehalose Diyhdrat enthält.

40. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich etwa 4% Trehalose Diyhdrat enthält.

41. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 hat und 50 µg/mL bis 1 mg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Phosphat, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Diyhdrat umfasst.

42. Eine Zusammensetzung nach einer der vorherigen Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 hat und 50 µg/mL bis 500 µg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Phosphat, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Diyhdrat umfasst.

43. Eine Zusammensetzung nach einer der vorherigen Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung einen pH Wert von 6 hat und 2 mg/ml PSMA-BiTE1, 100 mM TRIS, 50 mM Na_2HPO_4, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose Diyhdrat umfasst.

44. Ein Feststoffgemisch, herstellbar durch Lyophilisation einer flüssigen Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen.

45. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung durch Lösung eines lyophilisierten Feststoffgemisches nach Ausführungsform 44 in einem geeigneten flüssigen Medium rekonstituiert wird.

46. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei das Polypeptide nach Lyophylisierung und anschließender Rekonstitution und Lagerung (7 Tage bei 2-8°C und anschließend 16 Stunden bei 20°C+- 5°C; wie in Beispiel 21 beschrieben) ein Bioaktivität von mindestens 90%, bevorzugt von mindestens 96% aufweist (bevorzugt ermittelt durch zellbasiertem Aktivitätstest wie in Beispiel 21 beschrieben).

47. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei das Polypeptide nach Lyophylisierung und Lagerung von 3 Monaten oder 12 Monaten ein

Bioaktivität von mindestens 90%, bevorzugt von mindestens 96% aufweist (bevorzugt ermittelt durch zellbasiertem Aktivitätstest wie in Beispiel 21 beschrieben).

48. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei das Polypeptide nach Lyophylisierung und Lagerung von 3 Monaten bei 6°C oder 12 Monaten bei 6°C eine Bioaktivität von mindestens 97% aufweist (bevorzugt ermittelt durch zellbasiertem Aktivitätstest wie in Beispiel 21 beschrieben).

49. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei das Polypeptide nach Einwirkung von Scherstress durch Injektion mehr als 96 % monomer Gehalt (SEC) aufweist, (bevorzugt ermittelt nach Beispiel 18a).

50. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei das Polypeptide nach Einwirkung von Scherstress durch langsame oder schnelle Injektion mittels einer Nadel nicht mehr als 4 % dimer und multimer Gehalt (SEC) aufweist, (bevorzugt ermittelt nach Beispiel 18a).

51. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei das Polypeptide nach Einwirkung von Scherstress durch langsame oder schnelle Injektion mittels einer Nadel (Gauge: 30 G, Nadellänge: 13 mm) nicht mehr als 4 % dimer und multimer Gehalt (SEC) aufweist, (bevorzugt ermittelt nach Beispiel 18a).

52. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Bioverfügbarkeit des Polypeptids nach subkutaner Gabe der Zusammensetzung >60% beträgt.

53. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren .

54. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren, wobei dieses Verfahren die parenterale Applikation der Zusammensetzung umfasst.

55. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen.

56. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen der Prostata.

57. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen der Prostata, wobei das Verfahren die subkutane Applikation der Zusammensetzung umfasst.

58. Eine Methode zur Stabilisierung von Polypeptiden nach mindestens einem der Ausführungsformen 1 bis 9, umfassend die Herstellung einer Zusammensetzung, die neben den Polypeptiden mindestens TRIS und Phosphat enthält und einen pH-Wert von 6.0 besitzt.

59. Ein Kit, umfassend die Zusammensetzung gemäß einer der Ausführungsformen 1-57.

60. Eine Zusammensetzung nach einer der vorangehenden Ausführungsformen wobei die flüssige pharmazeutische Zusammensetzung ein wässrige pharmazeutische Zusammensetzung ist, bevorzugt eine sterile wässrige pharmazeutische Zusammensetzung.

61. Spritze enthaltend eine Zusammensetzung gemäß einer der vorangehenden Ausführungsformen.

Beispiele

Beispiel 1: Pufferscreening zur Verbesserung der Thermostabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle

Mithilfe der Differential-Scanning-Fluorimetrie (DSF) wurde der mittlere Schmelzpunkt (T_{m1}) der PSMA-BiTE1-Proteindomäne mit dem niedrigsten Molekulargewicht in unterschiedlichen Puffersystemen gemessen. Dieser ist ein Maß für die Stabilität des untersuchten Proteins in den verschiedenen Puffersystemen: Je höher der T_m-Wert, desto höher ist auch die Thermostabilität des Proteins. Je thermostabiler ein Protein ist, desto besser eignet es sich zur Herstellung stabiler pharmazeutischer Formulierungen.

Für das Pufferscreening wurden Standardpuffer in einem pH-Bereich von pH 5,0 bis 8,0 eingesetzt. Die PSMA-BiTE1-Konzentration der hergestellten Formulierungen betrug etwa 0,2 mg/ ml. Der mittlere Schmelzpunkt wurde mit der DSF-Methode ermittelt.

Tab. 1: PSMA-BITE1 (0,2 mg/ml) in verschiedenen Puffersystemen (50 mM)

pH	*Na_2HPO_4* Tm1 [°C]	*Citrat* Tm1 [°C]	*Histidin* Tm1 [°C]	*Glycin* Tm1 [°C]	*Lysin* Tm1 [°C]
5,0	61,2	63,6	-	-	-
5,5	63,5	63,1	60,8	-	-
6,0	63,4	63,5	61,4	60,2	61,6
6,5	63,8	64,6	60,7	58,7	61,5
7,0	63,3	-	60,4	60,7	61,4
7,5	63,1	-	57,7	61,4	61,4
8,0	63,0	-	59,3	-	-

Die auf Citrat und *Na_2HPO_4* basierenden Puffersysteme zeigten einen positiven Effekt im Hinblick auf die Erhöhung des Schmelzpunktes der PSMA-BiTE1-Proteindomämene. Die positiven Effekte von Citrat und *Na_2HPO_4* wurden in weiteren Versuchen weiterverfolgt.

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-basierte Puffer führten alleine nicht zu einer deutlichen Erhöhung des Proteinschmelzpunktes (Tab. 2).

Tab. 2: PSMA-BiTE1 (0,2 mg/ ml) in verschiedenen Puffersystemen (50 mM) (Fortsetzung von Tab. 1)

pH	*HEPES* Tm1 [°C]	*TRIS* Tm1 [°C]	*MOPS* Tm1 [°C]	*Acetat* Tm1 [°C]
6,5	-	61,7	62,5	61,9
7,0	62,2	61,4	61,8	-
7,5	61,4	-	62,6	-
8,0	61,4	-	62,4	-

Wie Tab. 1, zeigt auch Tab. 2 den mittels Differential-Scanning-Fluorimetrie ermittelten mittleren Schmelzpunkt (Tm) der PSMA-BiTE1-Proteindomäne mit dem niedrigsten Molekulargewicht in unterschiedlichen Puffersystemen. Die Tm-Werte lagen zwischen 57,7°C und 64,6°C. Über die Kombination verschiedener Puffersysteme waren keine höheren Tm Werte zu erreichen.

Das PSMA-BiTE1-Formulierungen in Phosphatpuffer bei pH 5,5-6,5 und in Citratpuffer bei pH 5,0-6,5 zeigten die höchsten Schmelzpunkte (Tm > 63,0°C nach DSF-Methode).

Beispiel 2: Der Einfluss nichtionischer Tenside auf die PSMA-BiTE1-Aggregatbildung

Die PSMA-BiTE1-Moleküle bildeten nach dem Schüttelstresstest in allen getesteten Puffersystemen Aggregate. Die Effizienz, mit der aggregierte PSMA-BiTE1-Moleküle eine T-Tellaktivierung bewirken, ist nicht oder nur eingeschränkt vorhersagbar, bzw. kontrollierbar. Daher war es zwingend notwendig einen Stabilisator zu finden, der die Aggregatbildung durch Schüttelstress oder die Einwirkung von Scherkräften verhindert. Im Schüttelstresstest zeigte sich, dass verschiedene nichtionische Tenside (z.B. Polysorbat 80 oder 20) die PSMA-BiTE1-Moleküle stabilisieren und eine Aggregation verhindern können. Tensidkonzentrationen zwischen 0,01 bis 0,04% (m/V) waren für die Stabilisierung ausreichend (siehe Tabelle 3-7).

Beispiel 3: PSMA-BiTE1-Dimer-Bildung in Anwesenheit mehrwertiger Kationen

Ein Anstieg des Anteils an PSMA-BiTE1-Aggregaten während der Aufkonzentrierung von PSMA-BiTE1-Formulierungen konnte durch Zusatz von nichtionischen Tensiden nicht verhindert werden.

Deshalb wurde die elektrostatische Stabilisierung der PSMA-BiTE1-Moleküle in Anwesenheit von mehrwertigen Kationen (z.B. Mg^{2+} und Ca^{2+}) untersucht. Mehrwertige Ionen haben einen direkten Einfluss auf das Oberflächenpotential gelöster Proteine und können so stabilisierend oder auch destabilisierend wirken.

Die PSMA-BiTE1-Moleküle ließen sich mit Hilfe von Magnesiumchlorid stabilisieren. Der Anteil an PSMA-BiTE1-Dimeren stieg nach der Aufkonzentrierung nur geringfügig und blieb unter <3% (Tabelle 3). Die Messung der Monomer- und Dimeranteile erfolgte über Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC).

Tab. 3: PSMA-BiTE1-Moleküle nach Aufkonzentrierung (in 50 mM Na_2HPO_4 und 50 mM Lysin, pH 7,3)

Zusätze während Aufkonzentrierung	Proteingehalt [mg/ ml]	Monomer [%]	Dimer [%]
-	2,04	95,7	4,3
0,04% (m/V) Polysorbat 20	2,09	91,2	8,8
100mM $MgCl_2$	2,13	98,1	1,9

SEC = Größenausschluss-Chromatographie

Allerdings ist die Zugabe von anorganischen Salzen in höheren Konzentrationen pharmazeutisch bedenklich, bzw. stellen diese Zusätze eine Herausforderung bei der Gefriertrocknung dar. Aus diesem Grund wurden alternative Hilfsstoffe gesucht, welche die PSMA-BiTE1-Moleküle stabilisieren und gleichzeitig pharmazeutisch unbedenklich sind.

Beispiel 4: Identifizierung alternativer Hilfsstoffe zur Stabilisierung der PSMA-BiTE1-Monomere

Eher zufällig wurden u. a. verschiedene Aminosäuren und deren Derivate in die Tests zur Stabilisierung der PSMA-BiTE1-Monomere in höheren Konzentrationen mit eingeschlossen. Aminosäuren und ihre Derivate sind keine anorganischen Salze und werden daher als pharmazeutisch unbedenklich eingestuft. Einige dieser Substanzen (z.B. Lysin) zeigten überraschenderweise einen positiven Einfluss auf die Stabilität der PSMA-BiTE1–Moleküle während und nach der Aufkonzentrierung (Tabelle 4).

Tab. 4: PSMA-BiTE1-*Moleküle nach Aufkonzentrierung bei pH 7,3*

Puffer	Protein-gehalt [mg/ ml]	SEC Monomer [%]	SEC Dimer [%]	DLS Median [nm]	Zustand nach Schüttel-stress
50mM Na_2HPO_4 + 50mM Lysin 0,02% (m/V) Polysorbat 20, 10% Trehalose Dihydrat	1,94	95,1	4,9	11	trübe
50mM Na_2HPO_4 + 100mM Lysin 0,04% (m/V) Polysorbat 20, 10% Trehalose Dihydrat	1,88	97,5	2,5	9	trübe
10mM Na_2HPO_4 + 50mM Lysin + 100mM Histidin 0,04% (m/V) Polysorbat 20, 10% Trehalose Dihydrat	2,15	92,4	7,6	10	Ok

SEC = Größenausschluss-Chromatographie; DLS = Dynamische Lichtstreuung; eine trübe Lösung nach Schüttelstress zeigt einen hohen Anteil an BiTE-Aggregaten an, eine klare oder geringfügig getrübte Lösung (Zustand „ok“) zeigt einen niedrigen Grad der Aggregation an.

Durch Zusatz von Lysin und Histidin in einem Phosphatpuffer ließen sich die PSMA-BiTE1-Moleküle aufkonzentrieren, ohne die Ausbildung inakzeptabler Dimer-Anteile (≥5%). Die Formulierungen, bei denen der Dimeranteil niedrig (<5%) war, destabilisierten jedoch während des Schüttelstresstests, was an der Eintrübung der Lösung erkennbar war (Ansätze 1 und 2; „trübe“ zeigt Aggregation an, „ok“ zeigt keine oder geringe Aggregation an).

Beispiel 5: Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Dimerbildung zu untersuchen, wurde eine Formulierung mit pH 6,0 hergestellt. Diese zeigte einen Dimeranteil, der vergleichbar mit denen der Formulierungen bei pH 7,3 war. Darüber hinaus war der Dimeranteil auch im Schüttelstress stabil, was sich an der fehlenden Eintrübung ablesen ließ (Tabelle 5). Der positive Einfluss von pH 6,0 wurde für die weitere Suche von geeigneten Stabilisatoren und Formulierungen verwendet.

Tab. 5: PSMA-BiTE1-*Moleküle nach Aufkonzentrierung bei pH 6,0*

Puffer bei pH 6,0	Protein-gehalt [mg/ ml]	SEC Monomer [%]	SEC Dimer [%]	DLS Median [nm]	Zustand nach Schüttel-stress
50mM Na_2HPO_4 + 50mM Lysin 0,04% (m/V) Polysorbat 20, 10% (m/V) Trehalose Dihydrat	1,62	95,7	4,3	8	ok

SEC = Größenausschluss-Chromatographie; DLS = Dynamische Lichtstreuung

Erstaunlich war die PSMA-BiTE1-Stabilität im Phosphatpuffer bei pH 6,0. Die Moleküle ließen sich in einer Formulierung umfassend 50mM Na_2HPO_4, 50mM Lysin 0,04% Polysorbat 20 und 10% Trehalose Dihydrat bei pH 6,0 plötzlich auf 1,6 mg/ ml aufkonzentrieren, ohne durch die Einwirkung von Schüttelstress zu aggregieren.

Beispiel 6: Untersuchung von Pufferkombinationen

In einem weiteren Versuch wurde ein möglicher synergistischer Effekt bzgl. einer Erhöhung der Stabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle durch Zusätze wie Arginin, TEA oder TRIS in Kombination mit Phosphat untersucht. Der niedrigste Anteil an PSMA-BiTE1-Dimeren von 0,8% trat bei der Pufferkombination 50 mM Na_2HPO_4, 100 mM TRIS bei pH 6,0 auf. Die Formulierung war auch nach Schüttelstress ausreichend stabil, was an der ausbleibenden Eintrübung der Lösung zu erkennen war (Tabelle 6). Überraschend war die stabilisierende Wirkung von TRIS, da der Zusatz von Arginin oder TEA, die beide bekannt sind für ihre stabilisierende (d.h. Aggregations-reduzierende) Wirkung bei Proteinen, bei den PSMA-BiTE-Molekülen keine stabilisierende Wirkung hatte.

Tab. 6: PSMA-BiTE1-*Moleküle nach Aufkonzentrierung mit verschiedenen Zusätzen bei pH 6,0*

Puffer bei pH 6,0	Protein-gehalt [mg/ ml]	SEC Monomer [%]	SEC Dimer [%]	DLS Median [nm]	Zustand nach Schüttel-stress
50mM Na_2HPO_4 0,04% (m/V) Polysorbat 80, 4% (m/V) Trehalose Dihydrat	1,82	96,4	3,3	13	ok
50mM Na_2HPO_4 + 100mM TRIS 0,04% (m/V) Polysorbat 80, 4% (m/V) Trehalose Dihydrat	1,81	99,2	0,8	12	ok
50mM Na_2HPO_4 + 100mM Arginin 0,04% (m/V) Polysorbat 80, 4% (m/V) Trehalose Dihydrat	2,20	96,2	3,5	15	ok
50mM Na_2HPO_4 + 100mM TEA 0,04% (m/V) Polysorbat 80, 4% (m/V) Trehalose Dihydrat	1,88	96,2	3,4	11	ok

SEC = Größenausschluss-Chromatographie; DLS = Dynamische Lichtstreuung

Wie in Beispiel 1 gezeigt, führte der Einsatz von Citratpuffer zu einer Erhöhung der Thermostabilität von PSMA-BiTE1-Molekülen. Nach Aufkonzentrierung der Ansätze lag der Dimeranteil jedoch in den Citrat-gepufferten Ansätzen wesentlich höher als in denjenigen mit Phosphatpuffer (Tabelle 7 im Vergleich zu Tabelle 6). Phosphatpuffer ist folglich besser geeignet als Citratpuffer, um die PSMA-BiTE1-Dimerbildung während der Aufkonzentrierung zu minimieren. Außerdem kann Citrat in einer Formulierung zu Glas-Delamination führen und sollte nicht mehr eingesetzt werden. *Tab. 7:* PSMA-BiTE1-Molekül*nach Aufkonzentrierung bei pH 6,0*

Puffer	Protein-gehalt [mg/ ml	SEC Monomer [%]	SEC Dimer [%]	DLS Median [nm]	Zustand nach Schüttel-stress
50mM Citrat 0,04% (m/V) Polysorbat 80, 4% (m/V) Trehalose Dihydrat	1,90	93,4	6,4	11	ok
50mM Citrat + 100mM TRIS 0,04% (m/V) Polysorbat 80, 4% (m/V) Trehalose Dihydrat	1,95	92,9	7,0	12	ok

SEC = Größenausschluss-Chromatographie; DLS = Dynamische Lichtstreuung

Beispiel 7: Thermostabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle in TRIS-Phosphat-Puffersystemen

Der mittlere Schmelzpunkt (T_{m1}) der PSMA-BiTE1-Proteindomäne mit dem niedrigsten Molekulargewicht der folgenden Formulierung wurde bestimmt:

0,2 mg/ml PSMA BiTE in 50 mM Na_2HPO_4, 100 mM TRIS, 0,04% Polysorbat 80, 4% Trehalose Dihydrat, pH 6,0 (mit HCl eingestellt). Mittels DSC wurde ein T_{m1} von 61,1°C gemessen.

Beispiel 8: Einfluss von Schüttelstress auf PSMA-BiTE1-Moleküle in Phosphat/TRIS Formulierungen

Generell werden BiTE-Moleküle durch Schüttelstress physikalisch destabilisiert, d.h. sie bilden Aggregate, die sich über die Dynamische Lichtstreuung (DLS) nachweisen lassen. Die

Aggregatbildung findet bereits bei niedrigen BiTE-Konzentrationen von etwa 0,2 mg/ ml statt. Bei einem Proteingehalt von unter 0,2 mg/ ml adsorbieren dagegen die BiTE-Moleküle vermehrt an der Gefäßwandung.

Durch Zugabe eines Tensids (z. B. Polysorbat 20 oder 80) konnte die Adsorption der PSMA-BiTE1-Moleküle an der Gefäßwandung (z.B. von Injektionsspritzen, Infusionsbeuteln, etc.) in einigen Puffersystemen (z. B. in Phosphat- und Lysin-basierten Puffern) verhindert werden, ebenso die Aggregatbildung im Ruhezustand. Polysorbat 80 muss in einer Konzentration von mindestens 0,002% in der Zusammensetzung vorliegen, um die Adsorption der PSMA-BiTE1-Moleküle zu verhindern.

Durch Lösung der PSMA-BiTE1-Moleküle in einem Phosphatpuffer mit Tensidzusatz bei pH 6,0 ließ sich die Bildung von Aggregaten sowohl im Ruhezustand als auch während der Einwirkung von Schüttelstress verhindern. Die genannte Formulierung (Phosphatpuffer mit Tensidzusatz bei pH 6,0) war dabei hinsichtlich der Minimierung der Aggregatbildung den Formulierungen mit Lysin überlegen.

Tab. 8: PSMA-BiTE1-Aggregatbildung nach Schüttelstress; alle Proben enthalten 0,2 mg/ ml PSMA-BiTE1-Moleküle und 0,02% (m/V) Polysorbat 80

	pH	Visuell	Gehalt [%]	DLS D50% [nm]
Na_2HPO_4	*6,0*	ok	103,2	9
	6,5	ok	78,6	2451*
	7,0	ok	52,9	1114*
	7,5	ok	66,5	8
Lysin	*6,5*	ok	68,5	2945*
Na_2HPO_4-Lysin-Histidin	*6,5*	ok	119,5	11
*Na_2HPO_4-TRIS***	*6,0*	ok	99,0	6

*Aggregate ** Monomer 99,6%; Dimer 0,4%

<u>Beispiel 9:</u> Konzentrationsabhängigkeit der PSMA-BiTE1-Aggregation

In Standardpuffersystemen stieg der Dimer- und Multimer-Anteil mit der Konzentration an PSMA-BiTE1-Molekülen an. Dimere und Multimere sind jedoch in Formulierungen für den therapeutschen Einsatz nur in einem geringen Rahmen akzeptabel, da sie den Wirkungsgrad der Formulierung und des therapeutischen Proteins beeinflussen und unerwünschte immunologische Effekte provozieren können. Typischerweise begrenzt man die Dimere auf einen Wert von max. 5% und versucht, diesen Wert möglichst zu unterschreiten. Multimere und Low Molecular Weight (LMW)-Fragmente sollen ebenfalls minimiert werden, bzw. gar nicht vorhanden sein. Das Monomer/Dimer Verhältnis wird, ebenso wie der Anteil an Multimeren und Low Molecular Weight-Fragmenten mit Size Exclusion Chromatographie (SEC) gemessen.

Mit dem Puffersystem umfassend 50 mM Na_2HPO_4 und 100 mM TRIS bei pH 6,0 konnte die Dimer- und Multimerbildung unter den PSMA-BiTE1-Molekülen während der Aufkonzentrierung ausreichend reduziert werden.

Mit Hilfe dieses Puffersystems war die Herstellung einer stabilen BiTE-Formulierung mit einem Gehalt von >2 mg/ml möglich (Tabelle 9).

Tab. 9: PSMA-BiTE1-*Moleküle in 50 mM Na_2HPO_4 und 100mM TRIS bei pH 6,0*

Protein-Gehalt [mg/ml]	0,321	0,333	0,530	0,883	1,308	1,330	2,138	3,228
Monomer [%]	98.17	98.30	97.89	95.15	98.33	95.95	96.28	96.97
Dimer [%]	0.58	0.42	1.18	1.71	1.14	1.92	2.26	2.03
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	1.24	1.28	0.93	3.14	0.53	2.14	1.45	1.00

LMW = Low Molecular Weight-Fragmente

Beispiel 10: Einfluss von Trehalose und Polysorbat auf die PSMA-BiTE1-Stabilität

Die Zugabe von Trehalose und Polysorbat führt nicht zu einer erhöhten Bildung von Dimeren, Multimeren, oder LMW-Fragmenten wie mittels SEC Messung bestimmt werden kann.

Beispiel 10a: Einfluss von Trehalose und Polysorbat auf die PSMA-BiTE1-Stabilität

Die Zugabe von Trehalose Dihydrat und Polysorbat führte nicht zu einer erhöhten Bildung von Dimeren, Multimeren, oder LMW-Fragmenten (Tabelle 10).

Tab. 10: PSMA-BiTE1-*Moleküle in 50 mM Na_2HPO_4 und 100mM TRIS bei pH 6,0 mit/ ohne Trehalose und Polysorbat 80*

Polysorbat 80 (% m/V)	-	*0.04%*	-	*0.04%*
Trehalose Dihydrat (% m/V)	-	-	*4%*	*4%*
Protein-Gehalt [mg/ ml]	1,209	1,235	1,191	1,217
SEC Monomer [%]	98,3	98,3	98,5	98,2
Dimer [%]	1,6	1,7	1,5	1,7
Multimer [%]	0,1	0,1	< 0,05	0,1
LMW [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

<u>Beispiel 11:</u> Lagerstabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle

Die Lagerstabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle lässt sich anhand der Zunahme des Anteils an Dimeren und/oder Multimeren in Abhängigkeit von der Lagerzeit bestimmen. Je schneller der Anteil dieser Aggregate ansteigt, desto geringer ist die Lagerstabilität.

Experimentell kann gezeigt werden, dass die PSMA-BiTE1-Moleküle in einer Konzentration von 90 µg/ml, 500µg/ml und 2 mg/ml für einen Zeitraum von 9 Tagen gegenüber Di- und/oder Multimerbildung stabil sind. Die Formulierungen werden in Injektionsspritzen bei etwa 2-8°C aufbewahrt, nach einer initialen Phase von 4 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur (etwa 20°C). Die Zusammensetzungen enthalten neben den PSMA-BiTE1-Molekülen 50 mM Na_2HPO_4, 100 mM TRIS, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose. Der Anteil an PSMA-BiTE1-Monomeren wird mittels SEC-HPLC gemessen und mit dem PSMA-BiTE1-Monomeranteil zu Beginn der Versuche (d.h. am Tag 0) verglichen.

<u>Beispiel 11a:</u> Lagerstabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle

Die Lagerstabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle lässt sich anhand der Zunahme des Anteils an Dimeren und/oder Multimeren in Abhängigkeit von der Lagerzeit bestimmen. Je schneller der Anteil dieser Aggregate ansteigt, desto geringer ist die Lagerstabilität.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die PSMA-BiTE1-Moleküle in einer Konzentration von 90 µg/ml, 500µg/ml und 2 mg/ml für einen Zeitraum von 9 Tagen gegenüber Di- und/oder Multimerbildung stabil waren (Tabelle 11). Die Formulierungen wurden in Injektionsspritzen bei etwa 2-8°C aufbewahrt, nach einer initialen Phase von 4 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur (etwa

20°C). Die Zusammensetzungen enthielten neben den PSMA-BiTE1-Molekülen 50 mM Na_2HPO_4, 100 mM TRIS, 0,04% Polysorbat 80 und 4% Trehalose dihydrat. Der Anteil an PSMA-BiTE1-Monomeren wurde mittels SEC-HPLC gemessen und mit dem PSMA-BiTE1-Monomeranteil zu Beginn der Versuche (d.h. am Tag 0) verglichen. Diese relative Reinheit betrug nach 9 Tagen bei Zusammensetzungen mit einer PSMA-BiTE1-Ausgangskonzentration von 90 µg/ml und 500µg/ml 100%, d.h. der Anteil der Monomere war über diese Zeit nicht gesunken. Die relative Reinheit bei den Zusammensetzungen mit 2 mg/ml PSMA-BiTE1-Molekülen betrug nach 9 Tagen 97%, was einer Abnahme der Monomere um etwa 3% absolut entspricht (von 97,58% am Tag 0 auf 94,81% am Tag 9).

Tab. 11: Bestimmung der Reinheit (d.h. des Monomeranteils) der PSMA-BiTE-Moleküle mittels SEC-HPLC über einen Zeitraum von 9 Tagen

Tag	PSMA-BiTE1-Konzentration [µg/ml]	Reinheit, Monomeranteil [%]					Relative Reinheit (Monomeranteil) im Vergleich zum T0 Wert				
		Test 1	Test 2	Test 3	Mittel	Standard-abweichung	VK [%]	Test 1	Test 2	Test 3	Mittel
0	90	98,30	98,21	98,20	**98,24**	0,06	0,1	-	-	-	-
2		98,35	98,39	98,37	**98,37**	0,02	0,0	100	100	100	100
7		98,59	98,53	98,40	**98,51**	0,10	0,1	100	100	100	100
9		98,37	98,36	98,39	**98,37**	0,02	0,0	100	100	100	100

Tag	PSMA-BiTE1-Konzentration [µg/ml]	Reinheit, Monomeranteil [%]					Relative Reinheit (Monomeranteil) im Vergleich zum T0 Wert				
		Test 1	Test 2	Test 3	Mittel	Standard abweichung	VK [%]	Test 1	Test 2	Test 3	Mittel
0	500	97,93	97,95	98,01	**97,96**	0,04	0,0	-	-	-	-
2		98,03	98,07	97,77	**97,96**	0,16	0,2	100	100	100	100
7		97,9	97,67	97,91	**97,83**	0,14	0,1	100	100	100	100

		0									
9		97,71	97,66	97,87	**97,75**	0,11	0,1	100	100	100	100

Tag	**PSMA-BiTE1-Konzentration [µg/ml]**	**Reinheit, Monomeranteil [%]**						**Relative Reinheit (Monomeranteil) im Vergleich zum T0 Wert**			
		Test 1	**Test 2**	**Test 3**	**Mittel**	**Standardabweichung**	**VK [%]**	**Test 1**	**Test 2**	**Test 3**	**Mittel**
0	2000	97,45	97,54	97,75	**97,58**	0,15	0,2	-	-	-	-
2		96,61	96,69	96,57	**96,62**	0,06	0,1	99	99	99	99
7		94,79	95,34	95,04	**95,06**	0,28	0,3	97	98	97	97
9		94,71	94,88	94,84	**94,81**	0,09	0,1	97	97	97	97

In anderen Versuchen zeigte sich in der flüssigen Formulierung mit einer PSMA- BiTE1-Konzentration von 2 mg/ml bei 2-8°C im Verlauf einer Woche ein moderater Anstieg des Dimer-Anteils um 2,5% (von 3% auf 5,5%), bei gleichzeitig stabilem Multimeranteil (Tabelle 12). Bei dieser Konzentration sind die PSMA-BiTE1-Moleküle damit ausreichend lange stabil, um annähernd verlustfreie Abfüllung und annähernd verlustfreien Gebrauch zu gewährleisten.

Für eine Langzeitlagerung (d.h. die Lagerung für einen Zeitraum erheblich länger als eine Woche) können PSMA-BiTE1-Lösungen zur Gewährleistung ihrer Stabilität jedoch entweder eingefroren (-80°C) oder lyophilisert werden. Eine Lyophilisation der PSMA-BITE1-enthaltenden Formulierungen war unter Erhalt der Bioaktivität war möglich, wie in Beispiel 17 gezeigt.

Tab. 12: Lagerstabilität der BiTE-Formulierung bei 2-8°C (PSMA-BiTE1-Konzentration 2mg/ml)

Lagerzeit [Tage]	SEC Monomer [%]	SEC Dimer[%]	SEC Multimer [%]
Start	96,4	3,0	0,6
0,25	96,2	3,2	0,6
0,5	96,0	3,4	0,6
0,75	95,9	3,6	0,5
1	95,8	3,7	0,5
3	95,7	4,0	0,4
7	94,2	5,5	0,4
15	93,7	6,1	0,2
28	92,6	7,2	0,2
65	90,7	9,2	0,2
94	90,3	9,5	0,2
161	88,2	11,3	0,5
251	87,8	11,7	0,5

Beispiel 12: Einfluss des pH-Wertes auf die PSMA-BiTE1-Stabilität

Grundsätzlich sind PSMA-BiTE1-Moleküle in der gewählten Formulierung mit TRIS, Phosphat (hier: Na_2HPO_4), Trehalose und Polysorbat in einem pH-Wertbereich zwischen pH 5,0 und 7,5 stabil. Bei einem pH-Wert oberhalb pH 6 nimmt allerdings der Dimeranteil nach dem Scherstress zu.

Beispiel 12a: Einfluss des pH-Wertes auf die PSMA-BiTE1-Stabilität

Grundsätzlich sind PSMA-BiTE1-Moleküle in der gewählten Formulierung mit TRIS, Phosphat (hier: Na_2HPO_4), Trehalose Dihydrat und Polysorbat in einem pH-Wertbereich zwischen pH 5,0 und 7,5 stabil. Bei einem pH-Wert oberhalb pH 6 nimmt allerdings der Dimeranteil (>2%) nach dem Scherstress zu (Tabelle 13).

Tab. 13: 2 mg PSMA-BiTE1-Moleküle pro ml in 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH [Variabel]; 4% (m/V)Trehalose Dihydrat, 0,04% (% m/V) Polysorbat 80

pH	*5,0*	*5,5*	*6,0*	*6,5*	*7,0*	*7,5*
Nach Herstellung						
Protein-Gehalt [mg/ ml]	2,01	2,02	2,11	1,90	2,13	2,20
DLS (D50%) [nm]	10	11	15	11	12	10
SEC Monomer [%]	98,62	97,88	98,48	97,74	98,58	98,53
Dimer [%]	1,22	1,81	1,36	1,96	1,42	1,47
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	0,15	0,31	0,16	0,30	< 0,05	< 0,05
Nach Scherstress						
Protein-Gehalt [mg/ ml]	2,00	2,01	2,11	1,90	2,13	2,20
Protein-Gehalt [%]	99,5	99,6	99,8	100,1	99,9	100,1
DLS (D50%) [nm]	10	15	12	10	-	-
SEC Monomer [%]	98,37	98,21	98,23	97,83	97,42	97,53
Dimer [%]	1,63	1,79	1,77	2,17	2,58	2,47
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Beispiel 13: Einfluss von TRIS und Phosphat auf die PSMA-BiTE1-Stabilität

In Untersuchungen hinsichtlich unterschiedlicher Pufferstärken in der Formulierung wurden gezeigt, dass die Pufferstärken in der Formulierung variiert werden können: einsetzbar hinsichtlich der Minimierung der PSMA-BiTE1-Dimer-Bildung sind 20 bis 100 mM Na_2HPO_4 und 50 bis 200mM TRIS bei pH 6,0. Alle Kombinationen erlauben ein Aufkonzentrieren und die Einwirkung von Scherstress.

Ohne TRIS ließen sich die PSMA-BiTE1-Moleküle nicht aufkonzentrieren und ohne Na_2HPO_4 stieg der Dimeranteil auf über >2% nach Einwirkung von Scherstress. Außerdem zeigte der Phosphatpuffer eine gute Pufferwirkung bei pH 6,0 und unterstützt die Thermostabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle.

Tab. 14: 2 mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle *in [Variabel] Na_2HPO_4, [Variabel] TRIS pH 6,0; 4% (m/V) Trehalose Dihydrat, 0,04% (m/V) Polysorbat 80*

Na_2HPO_4 [mM]	-	*20*	*50*	*50*	*50*	*100*
TRIS [mM]	*100*	*100*	*100*	*50*	*200*	*100*
Nach Herstellung						
Protein-Gehalt [mg/ ml]	2,23	2,08	2,11	2,19	2,17	2,07
DLS (D50%) [nm]	11	9	15	12	15	12
SEC Monomer [%]	98,11	98,78	98,48	99,22	99,01	99,19
Dimer [%]	1,57	1,22	1,36	0,78	0,99	0,81
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	0,31	< 0,05	0,16	< 0,05	< 0,05	0,30
Nach Scherstress						
Protein-Gehalt [mg/ ml]	2,22	2,08	2,11	2,20	2,16	2,08
Protein-Gehalt [%]	99,9	100,0	99,8	100,4	99,9	100,1
DLS (D50%) [nm]	-	-	12	13	13	12
SEC Monomer [%]	97,90	98,26	98,23	98,55	98,32	98,60
Dimer [%]	2,10	1,73	1,77	1,45	1,68	1,40
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

<u>Beispiel 14:</u> Einfluss verschiedener Netzmittel auf die PSMA-BiTE1-Stabilität

Verschiedene Polysorbate können die PSMA-BiTE1-Moleküle in der Formulierung gegen Scherstress stabilisieren. Mit Polysorbat 80 wurden jedoch die besten Ergebnisse erzielt. Andere Stabilisatoren wie z.B. Synperonic F68 hatten ebenfalls positive Effekte.

0,04% bis 0,10% *(m/V)* Polysorbat 80 hatte eine gute stabilisierende Wirkung auf die PSMA-BiTE1-Moleküle während des Scherstresses. 0,004% *(m/V)* Polysorbat waren hier nicht ausreichend, um eine inakzeptable Zunahme der Dimerbildung nach Einwirkung von Scherstress zu verhindern.

Tab. 15: 2 mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle *in 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% (m/V) Trehalose Dihydrat, [Variabel] Netzmittel*

Netzmittel	*Polysorbat 80*	*Polysorbat 20*	*Synperonic F68*	*Polysorbat 80*	*Polysorbat 80*
Netzmittel [%(m/V)]	*0,04*	*0,04*	*0,04*	*0,004*	*0,10*

Nach Herstellung					
Protein-Gehalt [mg/ ml]	2,11	2,13	2,10	2,13	2,08
DLS (D50%) [nm]	15	12	10	13	14
SEC Monomer [%]	98,48	97,92	98,59	98,47	98,36
Dimer [%]	1,36	2,08	1,24	1,36	1,46
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	0,16	< 0,05	0,16	0,17	0,17
Nach Scherstress					
Protein-Gehalt [mg/ ml]	2,11	2,11	2,10	1,98	2,07
Protein-Gehalt [%]	99,8	99,2	99,9	93,3	99,5
DLS (D50%) [nm]	12	14	10	3139	15
SEC Monomer [%]	98,23	96,54	-	92,54	98,09
Dimer [%]	1,77	3,46	-	7,46	1,91
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	-	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	< 0,05	< 0,05	-	< 0,05	< 0,05

Beispiel 15: Einfluss der PSMA-BiTE1-Konzentration auf die Stabilität der Formulierung

Mit der Formulierung 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% *(m/V)* Trehalose, 0,04% *(m/V)* Polysorbat 80 lassen sich PSMA-BiTE1 Konzentrationen bis 2 mg/ ml herstellen. Bei höheren PSMA-BiTE1 Konzentrationen steigt der Dimeranteil deutlich an. Inakzeptable Werte werden jedoch erst bei PSMA-BiTE-Konzentrationen von mehr als 4 mg/ml und nach der Einwirkung von Scherkräften gemessen (9,25% Dimere bei einer PSMA-BiTE-Konzentration von etwa 11,2 mg/ml).

Beispiel 15a: Einfluss der PSMA-BiTE1-Konzentration auf die Stabilität der Formulierung

Mit der Formulierung 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% *(m/V)* Trehalose Dihydrat, 0,04% *(m/V)* Polysorbat 80 ließen sich PSMA-BiTE1 Konzentrationen bis 2 mg/ ml herstellen. Bei höheren PSMA-BiTE1 Konzentrationen stieg der Dimeranteil deutlich an. Inakzeptable Werte wurden jedoch erst bei PSMA-BiTE-Konzentrationen von mehr als 4 mg/ml und nach der Einwirkung von Scherkräften gemessen (9,25% Dimere bei einer PSMA-BiTE-Konzentration von etwa 11,2 mg/ml).

Tab. 16: [Variabel] mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle *in 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% (m/V) Trehalose Dihydrat, 0,04% (m/V) Polysorbat 80*

PSMA-BiTE1 Konz. [mg/ml]	*0,4*	*2*	*4*	*11*
Nach Herstellung				
Protein-Gehalt [mg/ ml]	0,44	2,11	4,42	11,17

DLS (D50%) [nm]	12	15	17	18
SEC Monomer [%]	98,67	98,48	96,62	95,63
Dimer [%]	1,16	1,36	2,82	3,73
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	0,16	0,16	0,56	0,63
Nach Scherstress				
Protein-Gehalt [mg/ ml]	0,44	2,11	4,39	11,32
Protein-Gehalt [%]	99,8	99,8	99,2	101,3
DLS (D50%) [nm]	10	12	12	16
SEC Monomer [%]	99,53	98,23	96,32	90,75
Dimer [%]	0,47	1,77	3,68	9,25
Multimer [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
LMW [%]	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Beispiel 16: Lyophilisierung

Nach der Fertigstellung der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung wurde diese Lyophilisiert. Hierfür stehen zahlreiche Gefriertrocknungsanlagen zur Verfügung, wie z.B. der Genesis Super XL von SP Scientific. Gefriertrocknung wird erreicht durch das Einfrieren einer Substanz und die anschließende Sublimation des Eises ohne das Durchlaufen einer flüssigen Phase.

*Tab. 17: Programm zur Gefriertrocknung von **PSMA-BiTE** Formulierungen (Gesamtdauer: 42 h).*

	Ts [°C]	t [min]	Vakuum [µbar]	Rampe/ Halten
Einfrierphase				
1	Raumtemper	0	-	Halten
2	-45	30	-	Rampe
3	-45	240	-	Halten
Haupttrocknung				
1	-20	60	100	Rampe
2	-20	1000	100	Halten
Nachtrocknung				
1	25	60	10	Rampe
2	25	1140	10	Halten

"Rampe" = kontinuierliche Temperatur erhöhung oder -Senkung

In der Einfrierphase wurde das Produkt in einer „Rampe", d.h. kontinuierlich, innerhalb von 30 min. von Raumtemperatur auf -45°C abgekühlt. Damit die Produktlösung vollständig einfriert, wurde diese Temperatur für 240 min. gehalten.

Danach erfolgte die Haupttrocknungsphase. Bei einem Kammervakuum von 100 µbar wurde die Zusammensetzung innerhalb von 60 min. auf -20°C erwärmt. Diese Temperatur wird für 1000 min. gehalten; dann war die Haupttrocknung abgeschlossen. Für die anschließende Nachtrocknung

wurde die Zusammensetzung bei einem Vakuum von 10 µbar auf 25°C erwärmt. Diese Bedingungen wurden für 1140 min. gehalten, um das Restwasser bis auf ≤ 2% (Nachweis mittels Karl-Fischer-Titration) zu entfernen.

Am Ende des Trocknungsprozess wurde die Anlage belüftet und die Lyophilisationsgefäße verschlossen.

Beispiel 17a: Bioaktivität von PSMA-BiTE1-Lyophilisaten nach Langzeitlagerung und Rekonstituierung

Zusammensetzungen mit PSMA-BiTE1-Molekülen (Tabelle 18a) wurden als Lyophilisat bis zu 12 Monate bei 2-8°C und bei 25°C/60% relativer Luftfeuchte gelagert. Nach 3 und 12 Monaten wurde jeweils Lösung aus Lyophilisat rekonstituiert und im zellbasierten Aktivitätstest analysiert. Die Messungen (mittels CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay von Promega) ergaben eine unveränderte Bioaktivität, sowohl nach 6 als auch nach 12-monatiger Lagerung unter den genannten Bedingungen.

Darüber hinaus wurde die Lagerstabilität der rekonstituierten PSMA-BiTE1-Lösung analysiert. Die Lösung wurde nach Rekonstituierung zunächst 7 Tage im Kühlschrank (2-8°C) gelagert und anschließend 16 Stunden bei Raumtemperatur (+20 ± 5°C). Anschließend wurde auch hier die Bioaktivität der PSMA-BiTE1-Moleküle mittels zellbasiertem Aktivitätstest ermittelt. Sie betrug in rekonstituierter Lösung nach der genannten weiteren Lagerung 96%.

Die Bioaktivität der PSMA-BiTE1-Moleküle in der lyophilisierten Formulierung war folglich nach einer Lagerung über 6-12 Monate unter den genannten Lagerbedingungen stabil. Gleiches gilt für die aus diesem Lyophilisat rekonstituierte Lösung nach einer Lagerung für 7 Tage bei 2-8°C und 16 Stunden bei Raumtemperatur.

Beispiel 17b: Stabilität von zwei repräsentativen Chargen für Monomer (SEC und CGE), Bioaktivität (zellbasierter Aktivitätstest) und Partikeln (HIAC und MFI) von PSMA-BiTE1-Lyophilisaten nach Langzeitlagerung und Rekonstituierung

Zusammensetzungen mit PSMA-BiTE1-Molekülen (Tabelle 18 a) wurden als Lyophilisat bis zu 12 Monate bei 2-8°C und bei 25°C/60% relativer Luftfeuchte gelagert. Nach 3 und 12 Monaten wurde jeweils Lösung aus Lyophilisat rekonstituiert und u.a. im zellbasierten Aktivitätstest analysiert. Die Messungen (mittels CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay von Promega) ergaben unveränderte

Aktivitäten,sowie nur geringe Änderungen beim Monomer Anteil in der SEC und CGE, sowohl nach 3 als auch nach 12-monatiger Lagerung unter den genannten Bedingungen (Tabelle 18 b).

Weiterhin wurden Proteinpartikel im Größenbereich von >2 bis > 25 µm mittels Mikro Flow Imaging (MFI) und HIAC gemessen (Tabelle c). Die Werte blieben für beide Chargen während der Lagerzeit im Rahmen der Messgenauigkeit stabil.

Tabelle 18 a: Zusammensetzung des gefriergetrockneten Produktes. Jedes farblose Injektionsglasvial enthält ein Lyophilisat in der folgenden Zusammensetzung:

Zusammensetzung	Funktion	Menge in mg[a]	Menge in Prozent der Lösung vor der Gefriertrocknung
Wirkstoff			
PSMA-BITE1	Wirkstoff	2,60	0,2
Hilfstoffe			
$Na_2HPO_4*2H_20$	Puffersubstanz	11,57	0,89
TRIS	Puffersubstanz	15,73	1,21
Trehalose-dihydrat	Kryoprotektor	52,00	4
Polysorbat 80	Tensid	0,52	0,04
10% HCL	pH Einstellung	qs	qs

[a] die Mengen beinhalten 0.3 ml Overfill

Das Lyophilisat ist mit 1,2 ml Wasser für Injektionszwecke zu rekonstituieren. Die dann erhaltene Applikationslösung besitzt eine Konzentration von 2 mg/ml. Ein Vial enthält durch den Overfill 1,3 ml mit 2,6 mg PSMA-BITE1.

Tabelle 18b Stabilitäten zweier Chargen der erfindungsgemäßen Formulierung von PSMA-BITE1

Charge 1	SEC (Monomer)	CGE (reduziert)	CGE (nicht reduziert)	Bioaktivität

Start	97,3%	n.d	n.d	101%
3 Monates 6°C	n.d	n.d	n.d	n.d
3 Monate 25°C/60	n.d	n.d	n.d	n.d
12 Monate 6°C	96,9%	99,54%		122,3%
12 Monates 25°C/60	95,8%	99,51%	100%	100%

Charge 2	SEC (Monomer)	CGE (reduziert)	CGE (nicht reduziert)	Bioaktivität
Start	98,0%			92,8%
3 Monates 6°C	97,8%			136%
3 Monate 25°C/60	97,7%			131,2%
12 Monate 6°C	97%	100	100	123,5%
12 Monates 25°C/60	96,71%	100	100	112,7%

Tabelle 18c: **Stabilitäten zweier Chargen der erfindungsgemäßen Formulierung von PSMA-BITE1 (Proteinpartikel)**

Charge 1	HIAC				MFI			
	25µm	10µm	5µm	2µm	25µm	10µm	5µm	2µm
Start	0	3	24	552	4	61	823	7239

3 Monates 6°C	0	3	30	613	6	82	490	6697
3 Monate 25°C/60	0	9	45	614	1	18	257	4663
12 Monate 6°C	1	3	22	365	4	27	251	4788
12 Monates 25°C/60	2	113	540	2296	18	317	1109	7557

Charge 2	HIAC				MFI			
	25µm	10µm	5µm	2µm	25µm	10µm	5µm	2µm
Start	0	3	40	808	2	39	404	6248
3 Monates 6°C	0	2	22	483	3	23	287	5723
3 Monate 25°C/60	0	2	25	565	2	19	346	6247
12 Monate 6°C	1	4	94	777	2	11	148	3957
12 Monates 25°C/60	0	3	56	769	2	8	253	6469

Darüber hinaus wurde die Lagerstabilität der rekonstituierten PSMA-BiTE1-Lösung analysiert. Die Lösung wurde nach Rekonstituierung zunächst 7 Tage im Kühlschrank (2-8°C) gelagert und anschließend 16 Stunden bei Raumtemperatur (+20 ± 5°C). Anschließend wurde auch hier die Bioaktivität der PSMA-BiTE1-Moleküle mittels zellbasiertem Aktivitätstests ermittelt. Sie betrug in rekonstituierter Lösung nach der genannten weiteren Lagerung 96%.

Die Bioaktivität der PSMA-BiTE1-Moleküle in der lyophilisierten Formulierung war folglich nach einer Lagerung über 3 bis 12 Monate unter den genannten Lagerbedingungen im Rahmen der jeweiligen Messungenauigkeiten stabil. Auch die anderen Messparameter(SEC, Bioaktivität, MFI

und HIAC Daten) zeigen dieses Ergebnis. Gleiches gilt für die aus diesem Lyophilisat rekonstituierte Lösung nach einer Lagerung für 7 Tage bei 2-8°C und 16 Stunden bei Raumtemperatur.

Beispiel 18: Einfluss von Scherstress bei der Applikation mittels Injektionsspritze und Kanüle auf die PSMA-BiTE1-Dimerbildung

Zusammensetzung: 2,17 mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle, 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% Trehalose, 0,04% Polysorbat 80

Material: Einmalspritzen (BD 2ml), Kanülen (BD Microlance 30G1/2 (REF: 304000)) und Braunglas Vials (6R) und Cryo Tubes.

Durchführung:

30 Vials werden aufgetaut. 6 Vials werden als Startwerte verwendet. Für jeden Versuch werden 6 Vials verwendet, d.h. mit der Spritze/Kanüle entnommen und alle in ein Braunglas bzw. Cryotube injiziert.

Versuche:

1. Langsame Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein CryoTube (SpL Cryo)
2. Langsame Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein Braunglas (SpL Glas)
3. Schnelle Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein CryoTube (SpL Cryo)
4. Schnelle Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein Braunglas (SpL Glas)

Anschließend wird die Dimerbildung mittels Differential Scanning Fluorimetry (DSF) gemessen.

Beispiel 18a: Einfluss von Scherstress bei der Applikation mittels Injektionsspritze und Kanüle auf die PSMA-BiTE1-Dimerbildung

Zusammensetzung: 2,17 mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle, 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% Trehalose Dihydrat, 0,04% Polysorbat 80

Material: Einmalspritzen (BD 2ml), Kanülen (BD Microlance 30G1/2 (REF: 304000)) und Braunglas Vials (6R) und Cryo Tubes.

Durchführung: 30 Vials wurden aufgetaut. 6 Vials wurden als Startwerte verwendet. Für jeden Versuch wurden 6 Vials verwendet, d.h. mit der Spritze/Kanüle entnommen und alle in ein Braunglas bzw. Cryotube injiziert.

Versuche:

1. Langsame Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein CryoTube (SpL Cryo)
2. Langsame Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein Braunglas (SpL Glas)
3. Schnelle Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein CryoTube (SpL Cryo)
4. Schnelle Injektion der PSMA-BiTE1-Zusammensetzung in ein Braunglas (SpL Glas)

Tab. 19: PSMA-BiTE1-Dimerbildung nach Einwirkung von Scherstress durch Injektion

	Start	**SpL Cryo**	**SpL Glas**	**SpS Cryo**	**SpS Glas**
PSMA-BiTE1-	2,17	2,21	2,16	2,19	2,16
SEC Monomer [%]	96,6	96,5	96,4	96,4	96,4
SEC Dimer [%]	3,3	3,4	3,5	3,4	3,4
SEC Multimere	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Gemessen wurde die Dimerbildung mittels Differential Scanning Fluorimetry (DSF). Ein signifikanter Anstieg des Dimeranteils nach der Injektion der Zusammensetzung mittels Injektionsspritzen und Kanülen war nicht zu verzeichnen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die erfindungsgemäße Formulierung in allen Fällen stabil gegenüber der Einwirkung der erzeugten Scherkräfte ist.

Beispiel 19: Stabilität der PSMA-BiTE1-Lösung nach Rekonstitution (bis zu 28 Stunden bei 2-8°C) und bei 2 Verdünnungen und 2 Temperaturen (25°C) in 0.9° Kochsalzlösung für bis zu 8 Stunden.

Gemessen wurde der Monomer-, Dimer und Multimer Anteilmittels SEC Chromatographie.

Zusammensetzung: 2,0 mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle, 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% Trehalose Dihydrat, 0,04% Polysorbat 80

Material: 0,9% NaCl und Wasser für Injektionszwecke

Durchführung: 16 lyophilisierte PSMA-BiTE1 Vials wurden mittels Zugabe von 1,1 ml Wasser für Injektionszwecke (WFI) rekonstituiert. Davon wurden 8 Vials bei 2-8°C eingelagert und jeweils 4 Vials mit 0.9% NaCl Lösung auf die Konzentration 0.066 und 0.66 mg/ml verdünnt. Diese wurden bei 25°C inkubiert und zu den Zeitpunkten 0h, 2 h, 4h und 8h mittels SEC untersucht.

Tabelle 20: PSMA-BiTE1-Stabilität bei Verdünnung in 0.9% NaCl Lösung und Inkubation bei 25°C über bis zu 8 Stunden sowie bis zu 28 Stunden bei 2-8°C im Fall der rekonstituierten Lösung.

Probenbezeichnung		SEC		
	[h]	Multimere	Dimer	Monomer
2mg/ml reconst lyo Start RT	0	0,3	2,0	97,7
2mg/ml reconst lyo 1 h 2-8°C	1	0,2	2,1	97,7
2mg/ml reconst lyo 2 h 2-8°C	2	0,2	2,1	97,7
2mg/ml reconst lyo 4 h 2-8°C	4	0,2	2,2	97,6
2mg/ml reconst lyo 8 h 2-8°C	8	0,3	2,3	97,5
2mg/ml reconst lyo 12 h 2-8°C	12	0,3	2,4	97,3
2mg/ml reconst lyo 18 h 2-8°C	18	0,2	2,5	97,2
2mg/ml reconst lyo 28 h 2-8°C	28	0,3	2,8	97,0
0,0666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl Start RT	0	0,1	1,9	98,0
0,0666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl 1 h RT	1	0,1	1,5	98,4
0,0666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl 4 h RT	4	< 0,05	1,2	98,7
0,0666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl 8 h RT	8	< 0,05	1,1	98,8
0,666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl Start RT	0	0,2	2,2	97,6
0,666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl 1 h RT	1	0,2	2,2	97,6
0,666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl 4 h RT	4	0,3	2,2	97,5
0,666 mg/ml diluted in 0,9% NaCl 8 h RT	8	0,3	2,2	97,5

Die mittels WFI rekonstituierten Proben zeigen erwartungsgemäß wiederum die Zunahme an Dimer, die für eine 2 mg/ml Lösung bei 2-8°C erwartet werden kann. Die Abnahme an Monomer korreliert klar mit der Zunahme an Dimer und es entstehen keine Multimere.

Die Verdünnungen in 0,9% NaCl Lösung zeigen ein vergleichbares Ergebnis zu den Ergebnissen in PBS. Bei 0,666 mg/ml bleibt das Monomer-/ Dimer Verhältnis konstant und bei 0,066mg/ml kommt es wiederum zu einer Zunahme an Monomer.

Beispiel 20: Modellversuch zur Stabilität der PSMA-BITE1-Lösung bei subkutaner Applikation.

Dazu wurde die rekonstituierte PSMA-BiTE1-Lösung bei 2 Verdünnungen und 2 Temperaturen (25°C & 37°C) in PBS untersucht. Gemessen wurde der Monomer-, Dimer und Multimeranteil, sowie Bruchstücke (LMW) mittels SEC Chromatographie, sowie der Subvisisble Particles (SVP) mittels MFI.

Zusammensetzung: 2,0 mg/ml PSMA-BiTE1-Moleküle, 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% Trehalose Dihydrat, 0,04% Polysorbat 80

Material: PBS

Durchführung: Um die Stabilität der verdünnten PSMA-BITE-1 Lösungen unter Bedingungen der sc Anwendung zu bestimmen, wurden jeweils acht lyophilisierte PSMA-BiTE1 Vials mittels Zugabe von 1,1 ml WFI rekonstituiert. Mit PBS wurden jeweils 4 vials auf die Konzentration 0.066 und 0.66 mg/ml verdünnt. Diese wurden bei 25°C (Kontrolle) und 37°C inkubiert und zu den Zeitpunkten 0h, 2 h, 4h und 8h mittels SEC und MFI vermessen.

Tabelle 20.1: PSMA-BiTE1-Stabilität bei Verdünnung in PBS und Inkubation bei 25°C (Oben) und 37°C (Unten) über bis zu 8 Stunden

Verdünnung mit PBS bei 25°C

Probe	Verdünnung in PBS	Zeitpunkte	SEC [%]				MfI (Partikel/ Container)			
	C [mg/ml]	[h]	Multimere	Dimere	Monomer	LMW	≥2µm	≥5µm	≥10µm	≥25µm
1	0,0666	0	0,05	1,92	98,03	na				
2	0,0666	2	0,04	1,86	98,10	na				
3	0,0666	4	0,05	1,85	98,10	na				
4	0,0666	8	0,03	1,79	98,19	na	3336	2582	908	210
5	0,666	0	0,08	1,93	97,94	0,05				
6	0,666	2	0,07	1,95	97,93	0,06				
7	0,666	4	0,06	1,96	97,92	0,06				
8	0,666	8	0,05	1,99	97,90	0,06	5729	876	246	39
9	nur PBS	0	-	-	-	-	1410	534	168	30

Verdünnung mit PBS bei 37°C

Probe	Verdünnung in PBS	Zeitpunkte	SEC [%]				MfI (Partikel/ Container)			
	C [mg/ml]		Multimere	Dimere	Monomer	LMW	≥2µm	≥5µm	≥10µm	≥25µm
1	0,0666	0	0,05	1,95	98,00	na				
2	0,0666	2	0,02	1,58	98,40	na				
3	0,0666	4	na	1,30	98,70	na				

4	0,0666	8	0,02	0,97	99,02	na	726	198	82	24
5	0,666	0	0,10	1,96	97,88	0,06				
6	0,666	2	0,05	1,92	97,97	0,06				
7	0,666	4	0,05	1,89	97,99	0,07				
8	0,666	8	0,05	1,88	98,00	0,07	5731	928	294	42

Die Verdünnung mit PBS und Inkubation in PBS bei 37°C zeigt, dass das PSMA-BiTE1 Molekül unter diesen simulierten Bedingungen der subkutanen Anwendung stabil ist. Bei 0,66 mg/ml haben wir ein stabiles Monomer/ Dimerverhältnis bei beiden Inkubationstemperaturen. Bei 0,066 mg/ml sehen wir hingegen den Effekt, dass dar Dimeranteil sinkt und der Monomeranteil ansteigt. Dies ist ein Effekt der reversiblen Dimerbildung, die Konzentrations- und zeitabhängig ist. Bei den SVP sieht man eine Tendenz zu einer leichten Konzentrations-, Temperatur und zeitabhängigen Bildung von SVP, die aber kein Stabilitätsproblem darstellt. Damit ist die Eignung der Formulierung für eine subkutane Anwendung gezeigt.

<u>Beispiel 21:</u> Stabilität der PSMA-BiTE1 Verdünnungen in 0.9% NaCl Lösungen für Dose Range Finding Studien.

PSMA-BiTE1 Lyophilisate wurden mit 1,2 ml WFI rekonstituiert und mit 0.9%iger NaCl Lösung versetzt, die auf einen Polysorbat 80 Gehalt von 0,004% eingestellt wurde. Dies war erforderlich um Verluste in der Bioaktivität der stark verdünnten Lösungen zu vermeiden. Dazu wurde eine 1%ige Polysorbat 80 Lösung in einem 50mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) hergestellt. Diese Lösung wurde einer kommerziell verfügbaren 0,9%igen NaCl Lösung (z.B. Baxter Viaflo 250 ml) zugesetzt, um eine finale Konzentration von 0,004% zu erreichen. Mit dieser Lösung wurden Verdünnungen von PSMA-BiTE1 im Bereich von 0,05µg/ml bis 2000µg/ml in den folgenden Schritten:

- 0,05µg/ml
- 0,7 µg/ml
- 2 µg/ml
- 18 µg/ml
- 90 µg/ml
- 500 mg/ml
- 2000 µg/ml

hergestellt. Dazu wurden sterile, leere Infusionsbeutel (z.B. 150 ml Beutel von Impromediform GmbH, REF MF 1661)) verwendet, in denen die konditionierte Kochsalzlösung vorgelegt wurde. Dieser Lösung wurden entsprechende Mengen an rekonstituierter PSMA-BiTE1 Lösung zugesetzt

und durch Drehen des Beutels gemischt. 1 mL Aliquots wurden in 2 ml Spritzen (z.B. Injekt 2 ml/ Luer Lock Solo Braun (REF 46067001V) aufgezogen und mit Combi Stopfen von BBraun (REF 4495101) verschlossen.

Diese Spritzen wurden dann bei 2 bis 8°C für bis zu 9 Tagen im Kühlschrank gelagert. Diese Lagerung beinhaltete eine Lagerung bei RT (20°C +/- 5°C) für 4 oder 20 Stunden. Zur Messung wurde eine Injektionsnadel (BD Microlance 3 30G1/2“ 0,3*13 mm) für die subkutane Anwendung auf die Spritze aufgesetzt (REF 304000) und die Lösung dadurch in ein 2 ml vial (Glasart 1) ausgedrückt.

Die Bioaktivität der verdünnten Lösungen wurde in einem Zytotoxizitätsassay untersucht. Die Wiederfindung (Proteingehalt) wurde in einem (Elektrochemilumineszenz Assay) ECL Assay ermittelt.

Aufgrund eines eingeschränkten Messbereiches im ECL Assay mussten die Testlösungen wie folgt vor der Analyse in der konditionierten 0.9%igen Kochsalzlösung verdünnt werden:

- 0.05µg/ml : unverdünnt
- 0,7 µg{ml: 1 : 50
- 2 µg/ml: 1:200
- 18µg/ml: 1:1000

Tabellen 21 a und b zeigen die Ergebnisse der Lagerstudien der finalen Injektionslösungen im Bereich von 0.05 to 18 µg/mL PSMA-BiTE1 über eine Lagerzeit von 9 Tagen. Die Proteinkonzentration bleibt stabil für alle finalen Konzentrationen. Die relativen Konzentrationen (im Vergleich zu den T0 Werten) liegen im Bereich von 79% bis 117%. Auf der Basis früherer Erfahrungen mit dieser Substanzklasse, wurde ein Akzeptanzkriterium von ±40% to ±50% Unterschied zum T0 Wert ermittelt. Die gemessenen Daten liegen sehr gut in diesem Akzeptanzbereich.

Tabelle 21a: Bestimmung des Proteingehaltes mittels ECL Assay im Bereich von 0,05µg/ml bis 18µg/ml

Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]								
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch.	STDEV	CV [%]	Recovery [%]	Rel. Untersch. zum T0 Wert [%]
0	0,05	0,049	0,058	0,044	0,044	0,049	0,01	13	98	-
2		0,045	0,048	0,054	0,053	0,05	0	9	100	2
7		0,041	0,047	0,049	0,045	0,046	0	8	91	-7
9		0,037	0,042	0,041	0,035	0,039	0	8	77	-21
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]								
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch.	STDEV	CV [%]	Recovery [%]	Rel. Untersch. zum T0 Wert [%]
0	0,7	0,63	0,55	0,62	0,58	0,6	0,04	6	85	-
2		0,43	0,63	0,81	0,81	0,67	0,18	27	96	12
7		0,51	0,52	0,49	0,65	0,54	0,07	13	77	-9
9		0,67	-	0,53	0,5	0,57	0,09	17	81	-5
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]								
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch.	STDEV	CV [%]	Recovery [%]	Rel. Untersch. zum T0 Wert [%]
0	2	2,46	1,3	2,04	1,99	1,95	0,48	25	97	-
2		1,32	1,62	2,21	2,17	1,83	0,44	24	91	-6
7		1,14	1,74	1,46	2,02	1,59	0,38	24	79	-18
9		2,62	2,02	1,75	1,85	2,06	0,39	19	103	6
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Konzentration [µg/mL]								
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch.	STDEV	CV [%]	Recovery [%]	Rel. Untersch. zum T0 Wert [%]
0	18	11,37	9,44	11,74	9,6	10,54	1,19	11	59	-
2		11,11	-	12,12	13,61	12,28	1,26	10	68	17
7		6,75	9,77	12,92	10,85	10,07	2,58	26	56	-4
9		8,23	10,5	10,57	11,02	10,08	1,25	12	56	-4

Tabelle 21b: Bestimmung des relativen Konzentration mittels ECL Assay im Bereich von 0,05µg/ml bis 18 µg/ml

Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Relative Konz. im Vergleich zum T0 Wert [%]				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchschnitt
0	0,05	-	-	-	-	-
2		91	98	111	109	102
7		84	96	101	92	93
9		75	85	83	72	79
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Relative Konz. im Vergleich zum T0 Wert [%]				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchschnitt
0	0,7	-	-	-	-	-
2		71	106	136	136	112
7		86	87	82	108	91
9		113	-	88	84	95
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Relative Konz. im Vergleich zum T0 Wert [%]				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchschnitt
0	2	-	-	-	-	-
2		68	83	113	112	94
7		58	89	75	104	82
9		135	104	90	95	106
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	Relative Konz. im Vergleich zum T0 Wert [%]				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchschnitt
0	18	-	-	-	-	-
2		105	-	115	129	117
7		64	93	123	103	96
9		78	100	100	105	96

Verwendete Abkürzungen in Tabellen 21a und b:
BiTE: PSMA-BiTE 1 Molekül
A: Test
Durchsch: Durchschnitt
T0 Wert: Wert zum Zeitpunkt 0

Für die Anwendung im CytoTox-Glo Zytotoxizitäts Test mussten die Testlösungen wie folgt mit Testmedium verdünnt werden:

18 µg/ml: 1: 36
90 µg/ml 1 : 180
500 µg/ml 1 : 1000
2000 µg/ml 1 : 4000

Die biologische Aktivität des Testmaterials wird als "relative Bioaktivität" ausgedrückt. Diese bestimmt sich wie folgt:

Relative biologische Aktivität= EC50 (Reference Standard)
EC50 (Assay Control)

In Tabelle 22 ist aufgezeigt, dass die Bioaktivität der finalen Infusionslösungen mit 18µg/ml bis 2000µg/ml PSMA-BiTE1 über einen Lagerzeitraum von 9 Tagen stabil bleibt. Die relativen Bioaktivitäten bewegen sich während der 9 Lagerzeit von 9 Tagen, verglichen mit dem T0 Wert, in einem Bereich von 77% - 132%.

Damit liegen diese Ergebnisse sehr gut in einem zuvor bestimmten Akzeptanzbereich von 50% to 200% Bioaktivität.

Tabelle 22a: Bestimmung der relativen Potency mittels zellbasiertem Zytotox Assay im Bereich von 18 bis 2000 µg/ml.

Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Potency**						
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch	STDEV	CV [%]
0	18	0,87	1,08	0,75	-	0,9	0,17	19
2		1,1	0,88	0,85	-	0,94	0,14	15
7		0,82	-	-	-	0,82	-	-
9		0,56	0,83	-	-	0,7	0,19	27
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Potency**						
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch	STDEV	CV [%]
0	90	0,91	0,82	0,72	-	0,82	0,09	12
2		0,85	0,96	0,91	-	0,91	0,06	6
7		0,79	-	-	-	0,79	-	-
9		0,68	0,9	-	-	0,79	0,16	20
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Potency**						
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch	STDEV	CV [%]
0	500	0,81	0,92	0,93	0,89	0,89	0,05	6
2		1,35	1,18	0,99	-	1,17	0,18	15
7		0,94	1,09	-	-	1,01	0,1	10
9		0,99	0,94	-	-	0,96	0,03	3
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Potency**						
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch	STDEV	CV [%]
0	2000	0,87	1,12	0,64	0,71	0,84	0,21	25
2		0,79	1,24	1,25	0,84	1,03	0,25	24
7		0,74	0,91	-	-	0,83	0,12	15
9		0,97	0,94	-	-	0,96	0,02	2

Tabelle 22b: Bestimmung der relativen Bioaktivität im Vergleich zum T0 Wert mittels zellbasiertem Zytotox Assay im Bereich von 18 bis 2000 µg/ml.

Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Bioaktivität im Vergleich zum T0 Wert [%]**				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch
0	18	-	-	-	-	-
2		123	97	94	-	105
7		92	-	-	-	92
9		63	92	-	-	77
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Bioaktivität im Vergleich zum T0 Wert [%]**				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch
0	90	-	-	-	-	-
2		104	118	112	-	111
7		97	-	-	-	97
9		83	110	-	-	97
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Bioaktivität im Vergleich zum T0 Wert [%]**				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch
0	500	-	-	-	-	-
2		152	133	112	-	132
7		106	123	-	-	114
9		111	107	-	-	109
Tag	Nominal BiTE [µg/mL]	**Relative Bioaktivität im Vergleich zum T0 Wert [%]**				
		A 1	A 2	A 3	A 4	Durchsch
0	2000	-	-	-	-	-
2		95	148	149	100	123
7		88	109	-	-	99
9		116	113	-	-	115

Verwendete Abkürzungen in Tabelle 22:
BiTE: PSMA-BiTE 1 Molekül
A: Test
Durchsch: Durchschnitt
T0 Wert: Wert zum Zeitpunkt 0

Die Unterschiede in der Bioaktivität von verdünnten und über 9 Tagen gelagerten Lösungen waren nicht größer als ±33%, verglichen mit den T0 Werten. Es ist kein Trend ersichtlich, der einen deutlichen Verlust an Bioaktivität während der Lagerzeit erkennen ließ. Testlösungen mit 18 µg/mL PSMA-BiTE1 zeigen eine leichte Abnahme der Bioaktivität während der Lagerzeit, aber dieser Trend konnte nicht bestätigt werden, wenn man die Testlösungen der höheren Konzentrationen betrachtet.

Weiterhin zeigte die Konzentration von 18 µg/ml im ECL Assay keine Abnahme der Proteinkonzentration über die Lagerzeit.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Lagerung der finalen Injektionslösungen von PSMA-BiTE1 in einem Konzentrationsbereich von 18 – 2000 µg/mL kompatibel mit den angewandten Verdünnungsbedingungen und dem Lager- und Applikationssystem für bis zu 9 Tage bei einer Temperatur von +2-8°C, inklusive einer Zeit von bis zu 20 Stunden bei +20±5°C möglich ist.

Beispiel 22: Bioverfügbarkeit von PSMA-BiTE1 nach subkutaner Applikation

Mit der Formulierung 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% Trehalose, 0,04% Polysorbat 80 ist es möglich, eine hohe Bioverfügbarkeit nach subkutaner Applikation zu erzielen. Die s.c. Bioverfügbarkeit der PSMA–BiITE1-Moleküle wird in 4 weiblichen *Cynomolgus* Affen untersucht. Die Dosierung beträgt 45 µg/kg bei der s.c. Anwendung und wird mit einer i.v. Anwendung von 5 und 15 µg/kg Körpergewicht (BW) verglichen. Die Stammlösung mit 2 mg/mL wird mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Infusionsdauer der i.v. Anwendung beträgt 1 Stunde und die Infusionsrate beträgtg 1ml/ kg BW. Als Injektionsort wird eine oberflächliche Vene gewählt (*V. saphena parva*). Bei der s.c. Anwendung wird die Testlösung mit 0.15 mL/ kg BW in den lateralen Brustbereich injiziert. Die Blutspiegel werden mit einem ELISA Test untersucht. Dazu wird die ECL Technologie eingesetzt. Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) der Methode liegt bei 4µg/L.

Beispiel 22a: Bioverfügbarkeit von PSMA-BiTE1 nach subkutaner Applikation

Mit der Formulierung 50mM Na_2HPO_4, 100mM TRIS pH 6,0; 4% Trehalose Dihydrat, 0,04% Polysorbat 80 ist es möglich, eine Bioverfügbarkeit nach subkutaner Applikation von 66% zu erzielen. Die s.c. Bioverfügbarkeit der PSMA–BiITE1-Moleküle wurde in 4 weiblichen *Cynomolgus* Affen untersucht. Die Dosierung betrug 45 µg/kg bei der s.c. Anwendung und wurde mit einer i.v. Anwendung von 5 und 15 µg/kg Körpergewicht (BW) verglichen. Die Stammlösung mit 2 mg/mL wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Infusionsdauer der i.v. Anwendung betrug 1 Stunde und die Infusionsrate betrug 1ml/ kg BW. Als Injektionsort wurde eine oberflächliche Vene gewählt (*V. saphena parva*). Bei der s.c. Anwendung wurde die Testlösung mit 0.15 mL/ kg BW in den lateralen Brustbereich injiziert. Die Blutspiegel wurden mit einem ELISA Test untersucht. Dazu wurde die ECL Technologie eingesetzt. Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) der Methode lag bei 4µg/L.

Methoden

Herstellung der PSMA-BiTE-Moleküle

Herstellungsverfahren für BiTE Moleküle insbesondere für PSMA-BiTE Moleküle sind z.B. in WO2010037836 A2 beschrieben.

Zunächst wurde das PSMA-BiTE1 kodierende rekombinante BiTE-DNA-Konstrukt in einen geeigneten Expressionsvektor integriert und mit diesem stabil in eukaryotische CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen eingebracht. Die transfizierten CHO-Zellen wurden in einem Bioreaktor mit einem geeigneten Nährmedium kultiviert und das sezernierte Protein durch Filtration von den Zellen isoliert. Die Aufreinigung der BiTE-Moleküle umfasste einen Austausch der Puffersubstanzen gegen TRIS und Phosphat mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und die anschließende Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration und Diafiltration. Zusätzlich wurde ein Polyol (bevorzugt Trehalose) und ein Netzmittel (bevorzugt Polysorbat 80) hinzugegeben. Gelagert wurde die Zusammensetzung bei unter -60°C.

Differential-Scanning-Fluorimetrie (DSF)

Die Messungen zur Stabilität der PSMA-BiTE1-Moleküle (z.B. nach Scherstress) wurden mit einem 750 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Unterschiedliche PSMA-BiTE1-Konzentrationen (zwischen 0,15 und 0,005 mg/ ml) wurden in 96 well Platten (Mikrotiterplatten) mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. „Sypro® Orange 5000“) versetzt und in einem PCR System (750 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems) vermessen. Die Temperatur wurde von 20°C auf 90°C erhöht. Die Schmelzpunkte der Proteine wurden über eine Fluoreszenzdetektion ermittelt, die sich temperaturabhängig ergibt, wenn der fluoreszierende Farbstoff mit den hydrophoben Regionen des Proteins reagiert.

Dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

Ermittelt wurde die thermische Auffaltungstemperatur (T_m) der PSMA-BiTE1-Moleküle mittels DSC. Die Proben wurden hierfür von 20°C auf 105°C erwärmt und der Schmelzpunkt der Polypeptide mit einem Kalorimeter ermittelt. Es wurde ein VP-DSC Gerät von GE Healthcare eingesetzt.

Schüttelstress

Die Proben wurden gestresst, indem sie auf einem Laborschüttler (IKA, HS 260) in einer Temperierten Kammer (MMM, FrioCell 200) geschüttelt wurden. Der kritische Quality Parameter Aggregation wurde nach 24 Stunden bei 300 rpm und 20°C ermittelt.

Optische Kontrolle

Die Stabilität PSMA BITE Lösungen wurde nach dem Scherstress optisch kontrolliert, indem die Lösungen gegen einen dunklen Hintergrund gehalten und auf sichtbare Partikel oder Trübungen

untersucht wurden. Eine klare Lösung nach Schüttelstresstest deutet auf eine geringe bis abwesende Dimer- und/oder Multimerbildung hin, während eine sichtbare Trübung der Lösung mit einem hohen Anteil an Dimeren und/oder Multimeren korreliert.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung ist eine Methode zur Analyse des Streulichtes eines Lasers an einer gelösten bzw. suspendierten Probe. Gemessen wird dabei der hydrodynamische Radius, der wiederum Rückschlüsse auf den Aggregierungszustand der PSMA-BiTE1-Moleküle zulässt. Der hydrodynamische Radius wurde mit einem Horiba LB 550 (Retsch Technology) gemessen.

Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wurde spektrometrisch mit einem Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) bei 280 nm gemessen. Alle Proben wurden gegen die entsprechenden Placebo- bzw. Pufferlösungen vermessen.

Jede Probelösung wurde 3x in den Messbereich des Nanodrop Gerätes pipettiert (2µl) und jeweils doppelt vermessen, danach wurden diese Messwerte (n=6) gemittelt. Der Proteingehalt [mg/ml] wurde über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion (Abhängigkeit Absorption zu Proteingehalt) des Proteins aus den gemittelten Messwerten errechnet.

Elektrochemilumineszenz-Messung (ECL Assay)

Für diese Methode wurden SULFO-TAG™ Markierungen verwendet, die nach elektrochemischer Stimulation Licht emittieren. Die Stimulation erfolgte an den Oberflächen von Elektroden sogenannter MULTI-ARRAY Mikroplatten. Das emittierte Licht wurde bei ca. 620nm mit einem Detektor gemessen.

Die Messung basierte auf der „Sandwich"-Methode, bei der PSMA-BiTE1-Moleküle in Lösung mittels polyklonaler goat anti-PSMA-BiTE1-Antikörper auf einer Mikroplatte immobilisiert wurden. Penta-His-Biotin wurde dann an die immobilisierten BiTE-Moleküle gebunden und mittels SULFO-TAG™ -konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Die Proben wurden in einem Sektor Imager 2400 ausgelesen.

Größenausschluss-Chromatographie (size exclusion chromatography, SEC)

Zur Bestimmung der Anteile an Monomeren und Dimeren sowie der Low Molecular Weight (LMW)- und High Molecular Weight (HMW)-Anteile wurde eine Größenausschluss-

Chromatographie mithilfe einer HPLC Anlage durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor und die Berechnung erfolgte mittels Flächenprozentmethode. Als Säule wurde eine Standardsäule für die SEC von Proteinen verwendet, z.B. eine Tosoh Biosep TSK gel G3000 SWXL 5 µm, 300mm, Length x 7.8mm i.D. oder ein gleichwertiges Material.

Bestimmung von PSMA-BITE1-Konzentrationen im Serum nach i.v. und s.c. Gabe

Die Konzentration von PSMA-BITE1 im Serum von Cynomolgus Affen wurde mittels ELISA gemessen. Die Detektion erfolgte über Elektrochemolumineszenz. Die Detektionsgrenze (LLOQ) lag bei 0,98 µg/L, bei einer Präzision (Precision) von 3 bis 28% und einer Genauigkeit (Accuracy) von 70 bis 100%.

Zellbasierter Aktivitätstest

Der zellbasierte Zytotoxizitätsassay dient als Routineassay zur Bestimmung der relativen Aktivität von PSMA-BiTE1-Proben. Durch die bispezifische Bindung von PSMA-BiTE1 an human/cynomolgus CD3- und human/cynomolgus PSMA-positiven Zellen erfolgt nach Aktivierung der T-Zellen (Effektorzellen) die T-zellvermittelte Lyse der Zielzellen.

Der Nachweis der Zytotoxizität erfolgt mittels des lumineszenten CytoTox-Glo Cytotoxicity Assays von Promega. Als Messgröße dient hierbei die Menge des freigesetzten Lichtsignals, das mit der Anzahl sterbender Zellen korreliert. Weitere Aktivitätstests sind in WO2010037836 A2 beschrieben.

Zellbasierter Zytotoxizitätstest zur Bestimmung der relativen Aktivität der PSMA-BiTE1 - Proben

Geräte und Material

1. Sterilwerkbank
2. Zellinkubator
3. Mikroskop
4. Zellzählgerät z.B. Hemozytometer
5. 96-well U-Boden-Platten, klar (z.B. Greiner Bio-one)
6. 96-well Flachbodenplatten, weiß (z.B. Nunc, 3058078)
7. Zellkultur-Flaschen

8. Multiplattenmessgerät

Reagenzien

1. Effektor Zellen z.B. MC15

2. Zielzellen z.B. C4-2

3. 0.4 % Trypan – Blau

4. Penicillin – Streptomycin

5. L-Glutamin (200 mM)

6. Interleukin 2

7. Medium – MC15: Advanced RPMI 1640

8. fetales Kälberserum (FKS), z.B. Gibco 10270106

9. PBS, z.B. Gibco 20012

10. Medium – C4-2: RPMI 1640 mit L-Glutamine, z.B. Gibco 11835063

11. Nachweisreagenz z.B. CytoTox Glo, Promega G9291

Wachstumsmedien

Medium für MC 15 Zellen z.B.

900 ml Advanced RPMI 1640

+100 ml FKS

+10 ml Penicillin – Streptomycin

+10 ml L-Glutamin (200mM)

+10 - 20 µl [100-200 U/ml] Interleukin 2

Medium für C4 - 2 Zellen z.B.

900 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin

	+100 ml FKS +10 ml Penicillin Streptomycin
Assaymedium	Assaymedium, z.B. 900 ml RPMI 1640 mit L-Glutamine +100 ml FKS
Beginn der Zellkultur MC 15	Zellen für den Assay wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37 °C. Dann wurden die Zellen in 15 ml kaltem Medium resuspendiert und für 10 min. inkubiert. Dann wurden die Zellen für z.B. 7 Minuten bei 700g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 für ca. 3-4 Tage inkubiert.
Subkultivierung MC 15	Aliquote von lebenden Zellen aus der Kultur werden gezählt Zentrifugieren für 7 Minuten bei 170g Überstand verwerfen und das Pellet mit Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 0,5 x10^6 bis 1,5 x 10^6 Zellen/ml einstellen. Die Zellen sollten 2-3 mal in der Woche passagiert werden.
Beginn der Zellkultur C4 -2	Zellen für den Assay werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen erfolgt schnell bei 37 °C. Dann werden die Zellen in 20 ml Medium resuspendiert. Dann für z. B. 7 Minuten bei 700g zentrifugieren. Überstand verwerfen und das Pellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendieren. Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO_2 für ca. 3-4 Tage inkubiert.

Subkultivierung C4-2	Medium aus der Flasche entfernen und verwerfen Zellschicht vorsichtig mit 10ml PBS spülen 2-3 ml Trypsin hinzufügen und bei 37 °C inkubieren bis sich die Zellschicht löst (ca. 5-15min.). 10 ml Medium hinzufügen und Zellen lösen. Zentrifugieren für z.B. 7 Minuten bei 170g Überstand verwerfen und das Pellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendieren, Zellen zählen und mit Medium auf eine geeignete Dichte einstellen. Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO_2 für ca. 3-5 Tage inkubiert und sollten 1-2 mal in der Woche passagiert werden.
Vorbereitung der Zellen für den Test	Zellen lösen wie oben beschrieben. Effektorzellen (MC 15) auf eine Konzentration von 2 x 10E6 Zellen/ml in Assaymedium einstellen. Zielzellen (C4-2) auf eine Konzentration von 4 x 10E5 Zellen/ml in Assaymedium einstellen. Mische gleiche Volumina von Ziel- und Effektorzellen 1:1 (Zellgemisch)
Vorbereitung der Proben, Assaykontrolle und Referenzmaterial	Äquilibriere Probe(n), Assaykontrolle und Referenzmaterial (RF) auf Raumtemperatur, gut mischen und alle auf die gleiche erste Konzentration (V1; z.B. 500 ng/mL) mit Assaymedium einstellen. Anschließend eine seriellen Verdünnung (z.B. 1:6, n = 7) mit Assaymedium durchführen um ausgeglichene Dosis-Wirkungs-Kurven zu erhalten.
Test Durchführung	

Zugabe der Proben, Assaykontrolle und Referenzmaterial	Überführe Aliquote von Proben, Assaykontrolle und Referenzmaterial (z.B. 25 µL) in die entsprechenden Kavitäten einer 96-well Flachbodenplatten. Überführe das Zellgemisch (z.B. 50 µl) in jede Kavität einer 96-well Flachbodenplatten. Platte schütteln z.B. 1 min mit 400 rpm Platte für 16 - 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubieren
Bestimmung der Zytotoxizität und der relativen Aktivität	
Zugabe des Nachweisreagenzes und Messung	Verdünnung und Zugabe des Reagenzes sowie der nachfolgenden Messung werden in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers z.B. CytoTox – Glo, Promega durchgeführt. 15 µL Reagenz pro Kavität hinzufügen Platte schütteln z.B. 1 min mit 400 rpm ca. 15 min bei Raumtemperatur inkubieren Die Lumineszenz wird mit einem geeigneten Multiplattenmessgerät gemessen.
Auswertung	
Ausgleichskurve	Bestimme die mittleren Messwerte bei jeder Konzentration für die Wiederholungen der Proben, Assaykontrolle und

	Referenzmaterial. Zeichne eine Dosis-Wirkungskurve für jede Serie der Proben, Assaykontrolle und Referenzmaterial. Hierzu werden die mittleren Messwerte über den finalen Konzentrationen von BAY2010112 aufgetragen (z.B. 500000 pg/ml bis 1.79 pg/ml). Lege eine geeignete Ausgleichskurve durch die mittleren Messwerte der Konzentrationsniveaus der Proben, Assaykontrolle und Referenzmaterial.
Relative Aktivität (Bestimmung)	Das Aktivitätsverhältnis zwischen Probe und Referenzmaterial wird bestimmt und dokumentiert. Statistische Software kann verwendet werden.
Beurteilung	Die relative Aktivität der Probe im Vergleich zum Referenzmaterial, muss der Spezifikation entsprechen.

Konzentrationsbestimmung der PSMA-BiTE1-Polypeptide (UV/VIS-Spektroskopie)

Die Methode wird nach dem europäischem Arzneibuch durchgeführt (Ph. Eur., 2.2.25, UV-VIS-Spektroskopie bei 280 nm) und eignet sich auch für die Bestimmung der Konzentration anderer Moleküle.

Zunächst wurde experimentell der Extinktionskoeffizient der PSMA-BiTE1-Moleküle bestimmt. Dazu wurde die Extinktion von Lösungen mit bekannter PSMA-BiTE1-Konzentration bestimmt, wobei die Konzentrationen (in mol/l) anhand der molaren Masse der PSMA-BiTE1-Moleküle (1,8673 x 10^5 g/mol) eingestellt wurden. Anhand der Extinktion, der Schichtdicke und der Konzentration ließ sich der Extinktionskoeffizient e von PSMA-BiTE1-Molekülen berechnen, gemäß

e = A / c x d, wobei

A = Extinktion (bzw. Absorption, unter Vernachlässigung der Lichtstreuung) bei einer geeigneten Wellenlänge (hier 280nm)

c = Konzentration (mol/l)

d = Schichtdicke (mm).

Die Extinktionswerte wurden dann auf der Ordinate gegen die zugehörigen Konzentrationen auf der Abszisse aufgetragen, um eine Eichgerade zu erhalten. Mittels dieser Eichgeraden konnte anschließend anhand der Extinktion die Konzentration PSMA-BiTE1-Lösung direkt abgelesen werden.

Für die Erstellung der genannten Eichgeraden muss das LAMBERT-BEER'sche Gesetz auf die gemessene Lösung anwendbar sein, d.h. u.a. die absorbierende Substanz muss homogen in der Lösung verteilt sein, die Variation des Absorptionskoeffizienten innerhalb des gemessenen Spektralbereiches muss vernachlässigbar sein und die gemessene Lösung muss hinreichend niedrig konzentriert sein, so dass keine wechselwirkungsbedingte Abweichungen auftreten.

Mithilfe des Extinktionskoeffizienten eines Moleküls lässt sich anhand der gemessenen Extinktion (bzw. Absorption bei 280 nm) umgekehrt auch die Proteinkonzentration (in mol/l) berechnen, gemäß:

Proteinkonzentration [mol/l] = A x V / e x d, wobei

A	=	Absorption bei 280nm
d	=	Zellenlänge in cm (Standardzelle, 1.00 cm)
V	=	Verdünnung der Testlösung
e	=	Extinktionskoeffizient von PSMA-BiTE1 bei 280nm = 111315 M^{-1} x cm^{-1}.

Patentansprüche

1. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid, TRIS und Phosphat, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz wiedergegeben in SEQ ID NO: 8 umfasst, dadurch gekennzeichnet,

dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL bis 3.0 mg/ml, enthält,

dass die Zusammensetzung 100 mM TRIS und 50 mM Phosphat enthält,

dass der pH-Wert der Zusammensetzung bei etwa 6,0 liegt und

dass die Zusammensetzung 0,04% Polysorbat 80 enthält.

2. Eine Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich ein Lyoprotektivum enthält.

3. Eine Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung 2 -10% eines Lyoprotektivums enthält.

4. Eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyoprotektivum Trehalose oder Trehalose Dihydrat ist.

5. Eine Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zusätzlich etwa 4% Trehalose Dihydrat enthält.

6. Eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung das Polypeptid in einer Konzentration von 2mg/ml enthält.

7. Ein Feststoffgemisch, herstellbar durch Lyophilisation einer flüssigen Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche.

8. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung durch Lösung eines lyophilisierten Feststoffgemisches nach Anspruch 6 in einem geeigneten flüssigen Medium rekonstituiert wird.

9. Eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bioverfügbarkeit des Polypeptids nach subkutaner Gabe der Zusammensetzung >60% beträgt.

10. Eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren .

11. Eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren, wobei dieses Verfahren die parenterale Applikation der Zusammensetzung umfasst.

12. Eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen der Prostata.

13. Eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung hyperproliferativer Erkrankungen der Prostata, wobei das Verfahren die subkutane Applikation der Zusammensetzung umfasst.

14. Spritze enthaltend eine Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche.