

(12) **Übersetzung der neuen europäischen
Patentschrift**

(97) Veröffentlichungsnummer: EP 1324776

(96) Anmeldenummer: 2001981824
(96) Anmeldetag: 04.10.2001
(45) Ausgabetag: 19.04.2022

(51) Int. Cl.: **A61K 47/02** (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(30) **Priorität:**
12.10.2000 US 240107 P beansprucht.
24.05.2001 US 293834 P beansprucht.

(97) **Veröffentlichungstag der Anmeldung:**
09.07.2003 Patentblatt 03/28

(97) **Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:**
16.09.2009 Patentblatt 09/38

(97) **Hinweis auf Einspruchsentscheidung:**
21.03.2018 Patentblatt 18/12

(84) **Benannte Vertragsstaaten:**
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI
LU MC NL PT SE TR

(56) **Entgegenhaltungen:**
Die Entgegenhaltungen entnehmen Sie bitte der
entsprechenden europäischen Druckschrift.

(73) **Patentinhaber:**
GENENTECH, INC.
SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080- 4990 (US)
NOVARTIS AG
4056 BASEL (CH)

(72) **Erfinder:**
LIU, JUN
PACIFICA, CA 94044 (US)
SHIRE, STEVEN J.
BELMONT, CA 94002 (US)

(74) **Vertreter:**
Häupl & Ellmeyer KG Patentanwaltskanzlei
1070 Wien (ÖSTERREICH)

(54) **NIEDERVISKOSE KONZENTRIERTE PROTEINFORMULIERUNGEN**

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft konzentrierte Proteinformulierungen mit reduzierter Viskosität, die zur subkutanen Verabreichung besonders geeignet sind. Weiters betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Reduzieren der Viskosität konzentrierter Proteinformulierungen.

Beschreibung des Standes der Technik

In den vergangenen zehn Jahren haben Fortschritte in der Biotechnologie es möglich gemacht, unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren eine Vielzahl von Proteinen für pharmazeutische Anwendungen zu produzieren. Da Proteine größer und komplexer sind als traditionelle organische und anorganische Arzneimittel (z.B. indem sie zusätzlich zu komplexen dreidimensionalen Strukturen mehrere funktionelle Gruppen aufweisen), wirft die Formulierung solcher Proteine außerordentliche Probleme auf. Eines der Probleme sind die erhöhten Viskositätswerte von Proteinformulierungen, besonders bei hoher Konzentration. Zur subkutanen Verabreichung wird wegen der Volumeneinschränkungen ($\leq 1,5$ ml) und Dosisanforderungen (für gewöhnlich ≥ 50 mg, vorzugsweise ≥ 100 mg) häufig die Lieferung hoher Proteinkonzentration benötigt. Soll beispielsweise ein Protein Patienten zu 2 mg/kg wöchentlich verabreicht werden, liegt die durchschnittliche wöchentliche Dosis bei 130 mg unter Annahme von 65 kg als durchschnittlichem Patientengewicht. Da Injektionsvolumen von mehr als 1,5 ml bei subkutaner Verabreichung schlecht verträglich sind, müsste die Proteinkonzentration bei einer wöchentlichen subkutanen Verabreichung ungefähr 100 mg/ml betragen (130 mg Protein in einem Volumen von weniger als 1,5 ml). Nichtsdestotrotz bringen hoch konzentrierte Proteinformulierungen mehrere Probleme mit sich. Ein Problem ist die Tendenz von Proteinen, während der Verarbeitung und/oder Lagerung Partikel zu bilden, was die Bearbeitung während der Weiterverarbeitung erschwert. Im Falle rekonstituierter Flüssigformulierungen wird dies für gewöhnlich durch Hinzufügen eines geeigneten Tensids (z.B. eines Polysorbats) wä-

rend der Gefriertrocknung oder nach der Gefriertrocknung während des Rekonstituierens der Formulierung umgangen. Zwar hat sich gezeigt, dass Tenside den Grad der Partikelbildung von Proteinen signifikant reduzieren, jedoch sprechen sie ein weiteres Problem, das mit dem Bearbeiten und Verabreichen konzentrierter Proteinformulierungen in Verbindung steht, nicht an. Auf Grund ihrer makromolekularen Beschaffenheit und ihres Potentials für intermolekulare Wechselwirkungen neigen Proteine dazu, bei hoher Konzentration viskose Lösungen zu bilden. Zudem werden viele Proteine in Gegenwart großer Mengen von Lyoprotectant, wie z.B. Zucker, gefriergetrocknet, um ihre Stabilität aufrechtzuerhalten. Der Zucker kann die intermolekularen Wechselwirkungen verstärken und die Viskosität erhöhen. Hochviskose Formulierungen sind schwer herzustellen, in eine Spritze zu bringen und subkutan zu injizieren. Gewaltanwendung beim Bearbeiten der viskosen Formulierungen führt zu überschüssiger Schäumung, und die resultierende Detergens-artige Wirkung von Schaum besitzt das Potential, das therapeutisch aktive Protein zu denaturieren und zu deaktivieren. Darüber hinaus erhöht viskose Lösung während des UF/DF-Vorgangs den Rückstau und erschwert die Gewinnung des Proteins. Dies kann zu beträchtlichem Verlust an Proteinprodukt führen. Dem bisherigen Stand der Technik fehlt eine befriedigende Lösung dieses Problems. Daher besteht Bedarf, ein Verfahren zum Reduzieren der Viskosität einer Formulierung, die hohe Proteinkonzentration enthält, zu entwickeln.

Stabile isotonische gefriergetrocknete Proteinformulierungen sind in der PCT-Veröffentlichung WO 97/04801, veröffentlicht am 13. Februar 1997, offenbart. Die offenbarten gefriergetrockneten Formulierungen können rekonstituiert werden, um flüssige Formulierungen mit hoher Proteinkonzentration ohne erkennbaren Stabilitätsverlust zu erzeugen. Die möglichen Schwierigkeiten in Zusammenhang mit der hohen Viskosität der rekonstituierten Formulierungen werden dabei jedoch nicht angesprochen.

Die Anmelder haben herausgefunden, dass die Herstellung von proteinhaltigen, gefriergetrockneten Formulierungen mit 100 mM NaCl-Verdünnungsmittel zu einer leicht hypertonischen Lösung führen kann. Zuvor war angenommen worden, dass

pharmazeutische Formulierungen auf physiologischem pH-Wert gehalten werden und isotonisch sein müssen. Diese Annahme beruhte zumindest teilweise auf der Auffassung, dass die Verabreichung hypertotonischer Formulierungen zu Dehydrierung führen könne und daher das Gewebe an der Injektionsstelle beschädigen könnte. Allerdings ist die Annahme einer Notwendigkeit absoluter Isotonie einer pharmazeutischen Formulierungen möglicherweise nicht ausreichend fundiert. Beispielsweise haben Zietkiewicz et al., Grzyby Drozdopodobne 23, 869-870 (1971), gezeigt, dass die absolute Isotonie der Arzneimittel nicht erforderlich ist. Es wurde festgestellt, dass es genügt, jene Arzneimittellösungen zu vermeiden, die die kritischen Grenzen der Hypertonie übersteigen. Gewebeschaden wurde beispielsweise nur dann beobachtet, wenn eine hypertotonische Lösung von 1.300 mOsmol/kg (etwa 650 mM NaCl) oder mehr subkutan oder intramuskulär an Versuchstiere verabreicht wurde. Folglich scheinen Formulierungen, die leicht hypertonisch oder außerhalb des physiologischen pH-Bereichs sind, keine Gefahr des Gewebeschadens an der Verabreichungsstelle darzustellen.

EP 0661060 beschreibt konzentrierte Immunglobulinpräparate mit geringer Osmolarität und niedriger Viskosität.

WO 97/04801 beschreibt stabile, isotonische, gefriergetrocknete Antikörperformulierungen.

Weiters haben die Anmelder herausgefunden, dass proteinhaltige Lösungen mit einem gesenkten (4,0 bis 5,3) oder erhöhten (6,5 bis 12,0) pH-Wert ebenfalls wirksam darin waren, die Viskosität von Proteinformulierungen mit hohen Konzentrationen zu reduzieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft das Bereitstellen einer Immunglobulinformulierung in hoher Konzentration mit reduzierter Viskosität, die leicht zu handhaben und zur subkutanen Verabreichung geeignet ist. Die vorliegende Erfindung betrifft weiters das Bereitstellen eines Verfahrens zum Reduzieren der Viskosität konzentrierter Immunglobulinformulierungen.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Senken der Viskosität konzentrierter Immunglobulinzusammensetzung durch Erhöhen der Gesamtionenstärke der Formulierung durch Zusatz von Salzen oder Pufferkomponenten, wie in den Ansprüchen definiert ist, ohne die Stabilität oder die biologische Aktivität signifikant zu beeinträchtigen. Dementsprechend betrifft die Erfindung Verfahren und Mittel zum Reduzieren der Viskosität konzentrierter Immunglobulinformulierungen, in erster Linie, um einfache Handhabung vor und während der Verabreichung an einen Patienten zu gewährleisten.

Die vorliegende Erfindung ist in den Ansprüchen definiert. In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine stabile flüssige Formulierung bereit, die ein Immunglobulin in einer Menge von zumindest etwa 80 mg/ml und ein Salz und/oder einen Puffer in einer Menge von zumindest etwa 100 mM umfasst und bei 25 °C eine kinematische Viskosität von etwa 50 mm²/s oder weniger aufweist, wobei das Immunglobulin der Antikörper rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 oder rhuMAb-E27 ist und wobei das Salz nicht Natriumchlorid ist, wie in den Ansprüchen dargelegt ist. Die Salze und/oder Puffer sind pharmazeutisch annehmbar und stammen von diversen bekannten (anorganischen und organischen) Säuren oder basenbildenden Metallen und Aminen. Alternativ dazu können die Salze und/oder Puffer von Aminosäuren stammen. In einem spezifischen Aspekt werden die Salze aus der aus Argininhydrochlorid, Natriumthiocyanat, Ammoniumthiocyanat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Calciumchlorid, Zinkchlorid und Natriumacetat bestehenden Gruppe ausgewählt. In einem weiteren Aspekt sind die Salze oder Puffer einwertig. In noch einem weiteren Aspekt enthält die Formulierung die oben stehenden Salze oder Pufferkomponenten in einer Menge von etwa 100 bis 200 mM und weist eine Viskosität von etwa 2 bis 30 mm²/s auf. In einer weiteren bestimmten Ausführungsform ist die Formulierung hypertensisch. In noch einem weiteren bestimmten Aspekt kann die Formulierung außerdem ein Tensid, wie z.B. Polysorbat, umfassen. Die Erfindung zieht auch eine rekonstituierte Formulierung in Betracht, die weiters ein Lyoprotectant, wie z.B. Zucker, um-

fasst. In wieder einem weiteren bestimmten Aspekt kann der Lyoprotectant-Zucker z.B. Saccharose oder Trehalose sein und kann in einer Menge von etwa 60 bis 300 mM vorliegen. In einem weiteren spezifischen Aspekt ist die Proteinkonzentration in der rekonstituierten Formulierung etwa 2- bis 40-mal höher als die Proteinkonzentration in dem Gemisch vor der Gefriertrocknung.

Die Erfindung stellt eine Formulierung mit hohen Konzentrationen von rhuMAbE-25, rhuMAbE-26 oder rhuMAbE-27 bereit, wie in den Ansprüchen dargelegt. Die Antikörper sind in der WO 99/1556 beschrieben. Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung können pharmazeutische Formulierungen, insbesondere Formulierungen zur subkutanen Verabreichung, sein.

In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verringerung der kinematischen Viskosität einer Formulierung bereit, die ein Immunglobulin in einer Menge von zumindest 80 mg/ml umfasst, umfassend das Zusetzen eines Salzes und/oder eines Puffers in einer Menge von zumindest 100 mM, wobei das Immunglobulin der Antikörper rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 oder rhuMAb-E27 ist und wobei das Salz nicht Natriumchlorid ist, wie in den Ansprüchen dargelegt ist. In einem spezifischen Aspekt wird die Viskosität bei 25 °C auf 50 mm²/s oder weniger verringert. In einem spezifischen Aspekt wird die Viskosität auf etwa 2 bis 30 mm²/s reduziert. In einem weiteren spezifischen Aspekt können die Salze oder Pufferkomponenten in einer Menge von zumindest etwa 100 mM, vorzugsweise etwa 100 bis 200 mM, besonders bevorzugt etwa 150 mM, zugesetzt werden. Die Salze und/oder Puffer sind pharmazeutisch annehmbar und stammen von verschiedenen bekannten (anorganischen oder organischen) Säuren mit „basenbildenden“ Metallen oder Aminen. Alternativ dazu können die Salze und/oder Puffer von Aminosäuren stammen. In noch einem weiteren spezifischen Aspekt sind die Salze und/oder Puffer einwertig. In wieder einem weiteren spezifischen Aspekt sind die Salze aus der aus Argininhydrochlorid, Natriumthiocyanat, Ammoniumthiocyanat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Calciumchlorid, Zinkchlorid und Natriumacetat bestehenden Gruppe ausgewählt. In wieder einem weiteren Aspekt enthält die Formulierung oben stehende Salz- oder Pufferkomponenten in einer Menge von etwa 100 bis 200 mM und weist

eine Viskosität von etwa 2 bis 30 mm²/s auf. In noch einem weiteren Aspekt weist das Immunglobulin in der Formulierung ein Molekulargewicht von zumindest etwa 15 bis 20 kD auf. In einer weiteren bestimmten Ausführungsform kann die Formulierung weiters ein Tensid, wie z.B. Polysorbat, umfassen. Die Erfindung zieht auch eine rekonstituierte Formulierung in Betracht, die außerdem ein Lyoprotectant, wie z.B. einen Zucker, umfasst. In einem bestimmten Aspekt kann der Lyoprotectant-Zucker z.B. Saccharose oder Trehalose sein und in einer Menge von etwa 60 bis 300 mM vorliegen. In einem spezifischen Aspekt kann die Formulierung mit einem Verdünnungsmittel, das den Puffer oder das Salz umfasst, rekonstituiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Proteinkonzentration in der rekonstituierten Formulierung etwa 2- bis 40-mal höher als die Proteinkonzentration im Gemisch vor der Gefriertrocknung.

Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Verringerung der Viskosität einer Immunglobulinformulierung bereit, wie in den Ansprüchen dargelegt. In einem spezifischen Aspekt wird das Verfahren verwendet, um eine rekonstituierbare Formulierung herzustellen, insbesondere solche, die nach dem Konzentrationsschritt (z.B. Gefriertrocknung) auf viel höhere Immunglobulinkonzentrationen konzentriert sind (z.B. 2- bis 40fach) als davor.

Solche Formulierungen sind zur subkutanen Verabreichung besonders nützlich.

Ebenfalls bereitgestellt ist ein Fertigartikel, der einen Behälter umfasst, in welchem eine Formulierung wie in den Ansprüchen definiert eingeschlossen ist.

Ebenfalls hierin beschrieben ist ein Verfahren zum Vermeiden der Selbstbindung von Proteinen in konzentrierten Flüssigformulierungen durch (1) Zusetzen eines Salzes oder einer Pufferkomponente in einer Menge von zumindest etwa 50 mM; oder (2) Ändern des pH-Werts durch Senken auf ($\approx 4,0$ bis $\approx 5,3$) oder Erhöhen auf ($\approx 6,5$ bis $\approx 12,0$). In einem spezifischen Aspekt ist die zu vermeidende Selbstbindung jene, die durch die Gegenwart von Zuckern (z.B. Saccharose oder Trehalose), die häufig als Lyoprotectants verwendet werden, induziert oder verschärft wurde. Demnach ist die-

ses Verfahren zum Vermeiden der Selbstbindung von rekonstituierten gefriergetrockneten Formulierungen besonders nützlich.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die Auswirkungen der Proteinkonzentration auf die Viskosität von rekonstituierter Formulierung, die den Anti-IgE-Antikörper rhuMAb E25, 16 mM Histidin, 266 mM Saccharose und 0,03 % Polysorbat 20 enthält, bei 25 °C.

Fig. 2. bildet die Auswirkungen der NaCl-Konzentration auf die Viskosität von rekonstituierter Formulierung, die 125 mg/ml Anti-IgE-Antikörper rhuMAb E25, 16 mM Histidin, 266 mM Saccharose, 0,03 % Polysorbat 20 und verschiedene Mengen NaCl enthält, bei 25 °C ab.

Fig. 3 zeigt die Auswirkungen diverser Salze auf die Viskosität von rekonstituierter Formulierung, die 40 mg/ml des Anti-IgE-Antikörpers rhuMAb E25, 10 mM Histidin, 250 mM Saccharose, 0,01 % Polysorbat 20 und diverse Mengen von Salzen enthält, bei 25 °C.

Fig. 4 zeigt die Auswirkungen der Pufferkonzentration auf die Viskosität einer Flüssigformulierung, die 80 mg/ml des Anti-IgE-Antikörpers rhuMAb E25, 50 mM Histidin, 150 mM Trehalose, 0,05 % Polysorbat 20 und diverse Mengen von Histidin-, Acetat- oder Succinatkomponenten enthält, bei 25 °C.

Fig. 5 zeigt die Auswirkungen der NaCl-Konzentration auf die Viskosität einer rekonstituierten Formulierung, die 21 mg/ml rhuMAb E26, 5 mM Histidin und 275 mM Saccharose enthält, bei 6 °C.

Fig. 6 zeigt die Auswirkungen des pH-Werts auf die Viskosität von Flüssigformulierungen, die 130 mg/ml rhuMAb E25 und 2 bis 17,5 mM Acetat oder Arginin mit und ohne 150 mM NaCl enthalten, bei 25 °C.

Fig. 7 zeigt die Auswirkungen des pH-Werts auf die Viskosität von rekonstituierten gefriergetrockneten Formulierungen, die 94 mg/ml rhuMAb E25, 250 mM Trehalose und 20 mM Histidin enthalten, bei 25 °C.

Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsform

I. Definitionen

Mit „Protein“ ist eine Sequenz von Aminosäuren gemeint, für die die Kettenlänge ausreicht, um die höheren Stufen von Tertiär- und/oder Quartärstruktur zu produzieren. So unterscheiden sich Proteine von „Peptiden“, die ebenfalls aminosäurebasierte Moleküle sind, aber keine solche Struktur aufweisen. Typischerweise weist ein Immunglobulin zur Verwendung hierin ein Molekulargewicht von zumindest etwa 15 bis 20 kD, vorzugsweise zumindest etwa 20 kD, auf.

Beispiele für Proteine umfassen Säugetierproteine, wie z.B. Wachstumshormon, einschließlich menschliches Wachstumshormon und Rinderwachstumshormon; Wachstumshormonfreisetzungsfaktor; Parathormon; Schilddrüse-stimulierendes Hormon; Lipoproteine; α -1-Antitrypsin; Insulin-A-Kette; Insulin-B-Kette; Proinsulin; Follikelstimulierendes Hormon; Calcitonin; luteinisierendes Hormon; Glucagon; Gerinnungsfaktoren wie z.B. Faktor VIIIc, Faktor IX, Gewebefaktor und von-Willebrands-Faktor; Anti-Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Protein C; atrialer natriuretischer Faktor; Lungentensid; ein Plasminogenaktivator, wie z.B. Urokinase oder Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA, z.B. Activase[®], TNKase[®], Retevase[®]); Bombazin; Thrombin; Tumornekrosefaktor- α und - β ; Enkephalinase; RANTES (reguliert bei Aktivierung, normalerweise T-Zellen-exprimiert und -sekretiert); menschliches Makrophagen-Entzündungsprotein (MIP-1- α); Serumalbumin, wie z.B. Humanserumalbumin; Müller-hemmende Substanz; Relaxin-A-Kette; Relaxin-B-Kette; Prorelaxin; Maus-Gonadotropin-assoziiertes Peptid; Dnase; Inhibin; Activin; Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF); Rezeptoren für Hormone oder Wachstumsfaktoren; ein Integrin; Protein A oder D; Rheumafaktoren; einen neurotrophen Faktor, wie z.B. der vom Knochen stammende neurotrophe Faktor (BDNF), Neurotrophin-3, -4, -5 oder -6

(NT-3, NT-4, NT-5 oder NT-6) oder ein Nervenwachstumsfaktor wie z.B. NGF- β ; den aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor (PDGF); den Fibroblastenwachstumsfaktor, z.B. aFGF und bFGF; den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF); den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF), z.B. TGF- α und TGF- β , umfassend TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 oder TGF- β 5; den insulinähnlichen Wachstumsfaktor-I und -II (IGF-I und IGF-II); Des(1-3)-IGF-I (Gehirn-IGF-I); den insulinähnlichen Wachstumsfaktor bindende Proteine; CD-Proteine, wie z.B. CD3, CD4, CD8, CD19 und CD20; Erythropoietin (EPO); Thrombopoietin (TPO); osteoinduktive Faktoren; Immuntoxine; ein knochenmorphogenetisches Protein (BMP); ein Interferon, wie z.B. Interferon- α , - β und - γ , koloniestimulierende Faktoren (CSFs), z.B. M-CSF, GM-CSF und G-CSF; Interleukine (ILs), z.B. IL-1 bis IL-10; Superoxiddismutase; T-Zellen-Rezeptoren; Oberflächenmembranproteine; der Zerfall beschleunigenden Faktor (DAF); ein virales Antigen, wie z.B. ein Abschnitt der AIDS-Hülle; Transportproteine; homing-Rezeptoren; Addressine; regulierende Proteine; Immunadhäsine; Antikörper; und biologisch aktive Fragmente oder Varianten der oben stehend aufgezählten Polypeptide.

Das formulierte Immunglobulin ist vorzugsweise im Wesentlichen rein und wünschenswerterweise im Wesentlichen homogen (d.h. frei von kontaminierenden Proteinen). „Im Wesentlichen reines“ Protein steht für eine Zusammensetzung, die zumindest etwa 90 Gew.-% des Proteins, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, vorzugsweise zumindest etwa 95 Gew.-%, umfasst. „Im Wesentlichen homogenes“ Protein steht für eine Zusammensetzung, die zumindest etwa 99 Gew.-% des Proteins, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zusammensetzung, umfasst.

Der Begriff „Antikörper“ wird im weitesten Sinne verwendet und deckt im Speziellen monoklonale Antikörper (einschließlich Vollängen-Antikörper mit einer Immunglobulin-Fc-Region), Antikörperzusammensetzungen mit polyepitopischer Spezifität, bispezifische Antikörper, Diabodies und einkettige Moleküle sowie Antikörperfragmente (z.B. Fab, F(ab')₂ und Fv) ab.

Die grundlegende 4-kettige Antikörpereinheit ist ein heterotetrameres Glykoprotein, das aus zwei identischen Leicht- (L-) Ketten und zwei identischen Schwer (H-) Ketten zusammengesetzt ist. Ein IgM-Antikörper besteht aus 5 der grundlegenden heterotetrameren Einheit neben einem zusätzlichen Polypeptid, das J-Kette genannt wird, und enthält 10 Antigenbindungsstellen, während IgA-Antikörper 2 bis 5 der grundlegenden 4-kettigen Einheit umfassen, die polymerisieren können und so mehrwertige Ansammlungen in Kombination mit der J-Kette bilden. Im Falle von IgGs beträgt die 4-kettige Einheit im Allgemeinen etwa 150.000 Dalton. Jede L-Kette ist mit einer H-Kette durch eine kovalente Disulfidbindung verbunden, während die beiden H-Ketten miteinander durch eine oder mehrere Disulfidbindungen, je nach Isotyp der H-Ketten, verbunden sind. Jede L- und jede H-Kette hat auch zwischen den Ketten Disulfidbrücken mit regelmäßigen Abständen. Jede H-Ketten weist an ihrem N-Terminus eine variable Domäne (V_H), gefolgt von drei konstanten Domänen (C_H) für jede der α - und γ -Ketten und vier C_H -Domänen für die μ - und ϵ -Isotypen auf. Jede L-Kette weist an ihrem N-Terminus eine variable Domäne (V_L) auf, gefolgt von einer konstanten Domäne an ihrem anderen Ende. Die V_L ist mit der V_H angeordnet, und die C_L ist mit der ersten konstanten Domäne der Schwereketten (C_{H1}) angeordnet. Es wird angenommen, dass bestimmte Aminosäurereste eine Schnittstelle zwischen den variablen Domänen der Leichtkette und der Schwereketten bilden. Die Paarung einer V_H und einer V_L zusammen bildet eine einzelne Antigenbindungsstelle. Für Struktur und Eigenschaften der verschiedenen Klassen von Antikörpern siehe z.B. Basic and Clinical Immunology, 8. Auflage, S. 71 und Kapitel 6, Daniel P. Sties, Abba I. Terr und Tristram G. Parslow (Hrsg.), Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, USA (1994).

Die L-Kette aus jeder beliebigen Wirbeltierspezies kann auf Grund der Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Domänen einer von zwei klar unterscheidbaren Arten, genannt Kappa und Lambda, zugeordnet werden. Je nach Aminosäuresequenz der konstanten Domäne ihrer Schwereketten (C_H) können Immunglobuline verschiedenen Klassen oder Isotypen zugeordnet werden. Es gibt fünf Klassen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM mit Schwereketten, die als α , δ , ϵ , γ bzw. μ bezeichnet werden. Die Klassen γ und μ werden auf der Basis relativ geringer Unterschiede in

CH-Sequenz und -Funktion weiters in Unterklassen unterteilt, Menschen z.B. exprimieren die folgenden Subklassen: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2.

Der Begriff „variabel“ bezieht sich auf den Umstand, dass unter den Antikörpern bestimmte Abschnitte der variablen Domänen sich in ihrer Sequenz stark unterscheiden. Die V-Domäne vermittelt die Antigenbindung und definiert die Spezifität eines bestimmten Antikörpers für sein bestimmtes Antigen. Die Variabilität ist jedoch nicht über die gesamte Spanne der variablen Domänen gleichmäßig verteilt. Stattdessen bestehen die V-Regionen aus relativ invarianten Strecken, genannt Gerüstregionen (FRs), mit etwa 15 bis 30 Aminosäureresten, getrennt durch kürzere Regionen mit extremer Variabilität, genannt „hypervariable Regionen“ oder manchmal „komplementaritätsbestimmende Regionen“ (CDRs), die jeweils eine Länge von ungefähr 9 bis 12 Aminosäuren aufweisen. Die variablen Domänen von nativen Schwer- und Leichtketten umfassen jeweils vier FRs, die im Wesentlichen eine β -Faltblattkonfiguration annehmen, verbunden durch drei hypervariable Regionen, die Schleifen bilden, die die β -Faltblattstruktur verbinden und in manchen Fällen Teile davon bilden. Die hypervariablen Regionen in jeder Kette werden in großer Nähe durch die FRs zusammengehalten und tragen mit den hypervariablen Regionen aus der anderen Kette zur Bildung der Antigenbindungsstelle von Antikörpern bei (siehe Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Auflage, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA (1991)). Die konstanten Domänen sind nicht unmittelbar an der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen beteiligt, weisen aber diverse Effektorfunktionen auf, wie z.B. die Beteiligung von antikörperabhängiger zellulärer Zytotoxizität (ADCC).

Der Begriff „hypervariable Region“ (auch bekannt als „komplementaritätsbestimmende Regionen“ oder CDRs) bezeichnet hierin verwendet die Aminosäurereste eines Antikörpers, die (für gewöhnlich drei oder vier kurze Regionen mit extremer Sequenzvariabilität) sich innerhalb der V-Regions-Domäne eines Immunglobulins befinden, die Antigenbindungsstelle bilden und die Hauptdeterminanten von Antigenespezifität sind. Es gibt mindestens zwei Methoden zum Identifizieren von CDR-Resten: (1) einen Ansatz, der auf Kreuz-Spezies-Sequenzvariabilität basiert (d.h. Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA (1991); und (2) einen Ansatz, der auf kristallografischen Studien von Antigen-Antikörper-Komplexen beruht (C. Chothia et al., J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). In dem Ausmaß, dass zwei Reste-Identifikationsverfahren Regionen der Überlappung, aber nicht identische Regionen definieren, können sie jedenfalls kombiniert werden und eine Hybrid-CDR definieren.

Der Ausdruck „monoklonaler Antikörper“ bezieht sich, wie hierin verwendet, auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gebildet wird, d.h. die einzelnen Antikörper, aus denen die Population besteht, sind identisch, mit der Ausnahme möglicher natürlich auftretender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können. Monoklonale Antikörper sind hochgradig spezifisch, da sie gegen eine einzelne antigene Stelle gerichtet sind. Weiters ist jeder monoklonale Antikörper im Gegensatz zu herkömmlichen (polyklonalen) Antikörper-Präparaten, die typischerweise unterschiedliche Antikörper umfassen, die gegen unterschiedliche Determinanten (Epitope) gerichtet sind, gegen eine einzelne Determinante auf dem Antigen gerichtet. Zusätzlich zu ihrer Spezifität sind die monoklonalen Antikörper von Vorteil, da sie durch die Hybridom-Kultur synthetisiert werden, unkontaminiert durch andere Immunglobuline. Das Attribut „monoklonal“ zeigt die Eigenschaft des Antikörpers als aus einer im Wesentlichen homogenen Population an Antikörpern erhalten und ist nicht als eine Produktion des Antikörpers durch ein spezifisches Verfahren erforderlich machend auszulegen. Die in Einklang mit der vorliegenden Erfindung zu verwendenden monoklonalen Antikörper können z.B. durch das Hybridomverfahren hergestellt werden, das zuerst von Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), beschrieben wurde, oder sie können durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 4.816.567). Die „monoklonalen Antikörper“ können z.B. ebenfalls aus Phagen-Antikörper-Bibliotheken unter Verwendung der in Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), beschriebenen Verfahren isoliert werden.

Die monoklonalen Antikörper umfassen hierin spezifisch „chimäre“ Antikörper (Immunglobuline), bei denen ein Abschnitt der Schwer- und/oder Leichtkette identisch

mit oder homolog zu entsprechenden Sequenzen in Antikörpern ist, die von einer spezifischen Spezies abstammen oder zu einer spezifischen Antikörperklasse oder -unterklasse gehören, während der Rest der Kette(n) identisch mit oder homolog zu entsprechenden Sequenzen in Antikörpern ist, die von einer anderen Spezies abstammen oder zu einer anderen Antikörperklasse oder -unterklasse gehören, sowie Fragmente solcher Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 (1984)).

Ein „intakter“ Antikörper ist einer, der eine Antigenbindungsstelle sowie eine C_L und zumindest die Schwerekettenomänen C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} umfasst.

Ein „Antikörperfragment“ umfasst einen Abschnitt eines intakten Antikörpers, vorzugsweise die Antigenbindungs- oder variable Region des intakten Antikörpers. Beispiele von Antikörperfragmenten umfassen Fab-, Fab'-, F(ab')₂- und Fv-Fragmente; Diabodies; lineare Antikörper (siehe US-Patent 5.641.870, Beispiel 2; Zapata et al., Protein Eng. 8 (10), 1057-1062 (1995)); einkettige Antikörpermoleküle; sowie multispezifische Antikörpermoleküle, die aus Antikörperfragmenten gebildet werden.

Papainverdau von Antikörpern produziert zwei identische Antigen-Bindungsfragmente, genannt „Fab“-Fragmente, und ein Rest-„Fc“-Fragment, dessen Namen seine Fähigkeit widerspiegelt, schnell zu kristallisieren. Das Fab-Fragment besteht aus einer ganzen L-Kette neben der variablen Regionsdomäne der H-Kette (V_H) und der ersten konstanten Domäne einer Schwerekette (C_{H1}). Jedes Fab-Fragment ist einwertig in Hinblick auf Antigenbindung, d.h. es hat eine einzige Antigenbindungsstelle. Die Pepsinbehandlung eines Antikörpers ergibt ein F(ab')₂-Fragment, das kurz gesagt zwei Disulfid-gebundenen Fab-Fragmenten mit unterschiedlicher Antigenbindungsaktivität entspricht und trotzdem in der Lage ist, Antigen zu vernetzen. Fab'-Fragmente unterscheiden sich von Fab-Fragmenten, indem sie einige zusätzliche Reste am Carboxy-Terminus der C_{H1} -Domäne, einschließlich eines oder mehrerer Cysteine aus der Antikörper-Gelenksregion, aufweisen. Fab'-SH ist hierin die Bezeichnung für Fab', worin der oder die Cysteinreste der konstanten Domänen eine freie Thiolgruppe

tragen. F(ab')₂-Antikörperfragmente wurden ursprünglich als Paare von Fab'-Fragmenten produziert, die Gelenkszysteine zwischen sich haben. Weitere chemische Paarungen von Antikörperfragmenten sind ebenfalls bekannt.

Das Fc-Fragment umfasst die Carboxy-terminalen Abschnitte beider H-Ketten, zusammengehalten durch Disulfide. Die Effektorfunktionen von Antikörpern werden durch Sequenzen in der Fc-Region bestimmt, die Region, die auch durch Fc-Rezeptoren (FcR) erkannt wird, die auf bestimmten Arten von Zellen zu finden sind.

„Fv“ ist das minimale Antikörperfragment, das eine vollständige Antigen-Erkennungs- und -Bindungsstelle aufweist. Diese Region besteht aus einem Dimer einer variablen Schwer- und Leicht-Kettenregionsdomäne in enger, nichtkovalenter Assoziierung. Aus der Faltung dieser zwei Domänen entspringen sechs hypervariable Schleifen (je 3 Schleifen aus der H- und L-Kette), die Aminosäurereste zur Antigenbindung liefern und dem Antikörper Antigenbindungsspezifität verleihen. Sogar eine einzelne variable Domäne (oder die Hälfte einer Fv, umfassend nur drei CDRs, die für ein Antigen spezifisch sind) besitzt jedoch die Fähigkeit, Antigen zu erkennen und zu binden, wenn auch mit geringerer Affinität als die gesamte Bindungsstelle.

„Einkettige Fv“, abgekürzt auch „sFv“ oder „scFv“, sind Antikörperfragmente, die die V_H- und V_L-Domänen von Antikörpern, verbunden in einer einzelnen Polypeptidkette, umfassen. Vorzugsweise umfasst das sFv-Polypeptid weiters einen Polypeptid-Linker zwischen den V_H- und V_L-Domänen, der es dem sFv ermöglicht, die gewünschte Struktur für die Antigen-Bindung zu bilden. Für eine Beschreibung von sFv siehe Pluckthun, in: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Band 113, 269-315, Rosenberg und Moore (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, USA (1994).

Der Ausdruck „Diabodies“ bezieht sich auf kleine Antikörperfragmente, die durch Konstruieren von sFv-Fragmenten (siehe obiger Absatz) mit kurzen Linkern (etwa 5-10 Reste) zwischen der V_H- und V_L-Domäne hergestellt wurden, sodass eine Paarung der V-Domänen zwischen den Ketten, jedoch nicht auf den Ketten erreicht wird, wodurch ein zweiwertiges Fragment, d.h. ein Fragment mit zwei Antigenbindungs-

stellen, erhalten wird. Bispezifische Diabodies sind Heterodimere von zwei „Crossover“-sFv-Fragmenten, in denen die V_H - und V_L -Domänen der zwei Antikörper auf unterschiedlichen Polypeptidketten vorhanden sind. Diabodies werden z.B. ausführlicher in EP 404.097; WO 93/11161; und Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993), beschrieben.

Ein Antikörper, der an ein bestimmtes Polypeptid oder ein Epitop auf einem bestimmten Polypeptid „spezifisch bindet“ oder „dafür spezifisch“ ist, ist einer, der an dieses bestimmte Polypeptid oder dieses Epitop auf einem bestimmten Polypeptid bindet, ohne wesentlich an ein anderes Polypeptid oder Polypeptidepitop zu binden.

„Humanisierte“ Formen nichtmenschlicher (z.B. muriner) Antikörper sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ oder andere Antigenbindungssubsequenzen von Antikörpern), meistens menschlichen Sequenzen, die eine Minimalsequenz enthalten, die von nichtmenschlichem Immunglobulin abstammt. Humanisierte Antikörper sind größtenteils menschliche Immunglobuline (Rezipientenantikörper), in denen Reste aus der hypervariablen Region (auch CDR) des Rezipientenantikörpers durch Reste aus der hypervariablen Region einer nichtmenschlichen Spezies (Donorantikörper), wie z.B. einer Maus, einer Ratte oder einem Kaninchen, mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In manchen Fällen werden Fv-Gerüst-Regions- (FR-) Reste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nichtmenschliche Reste ersetzt. Weiters können „humanisierte Antikörper“ wie hierin verwendet auch Reste umfassen, die weder im Rezipientenantikörper noch im Donorantikörper zu finden sind. Diese Modifikationen werden gemacht, um die Leistung des Antikörpers weiter zu verfeinern und zu optimieren. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Optimalfall auch zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise den eines menschlichen Immunglobulins. Für weitere Details siehe Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332; 323-329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992).

Antikörper-„Effektorfunktionen“ bezeichnen die biologischen Aktivitäten, die der Fc-Region (einer nativen Fc-Region oder Fc-Region mit Aminosäuresequenzvariante) eines Antikörpers zuzuordnen sind und je nach Antikörperisotyp variieren. Beispiele für Antikörper-Effektorfunktionen umfassen: C1q-Bindung und komplementabhängige Zytotoxizität; Fc-Rezeptor-Bindung; antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC); Phagozytose; Herabregulierung von Zelloberflächenrezeptoren (z.B. B-Zellen-Rezeptoren); und B-Zellen-Aktivierung.

„Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität“ oder ADCC bezeichnet eine Form von Zytotoxizität, worin an Fc-Rezeptoren (FcR), die auf bestimmten zytotoxischen Zellen (z.B. natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophilen und Makrophagen) vorhandenes, gebundenes sekretiertes Ig es diesen zytotoxischen Effektorzellen ermöglicht, spezifisch an eine Antigen-tragende Zielzelle zu binden und in weiterer Folge die Zielzelle mit Zytotoxinen abzutöten. Die Antikörper „bewaffnen“ die zytotoxischen Zellen und sind zum Töten der Zielzelle durch diesen Mechanismus notwendig. Die Hauptzellen zum Vermitteln von ADCC, die NK-Zellen, exprimieren lediglich Fc γ RIII, während Monozyten Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII exprimieren. Die Fc-Expression auf hämatopoietischen Zellen ist in Tabelle 3 auf Seite 464 von Ravetch und Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 457-92 (1991), zusammengefasst. Um die ADCC-Aktivität eines Moleküls von Interesse zu bestimmen, kann ein In-vitro-ADCC-Test wie der in US-Patent Nr. 5.500.362 oder 5.821.337 beschriebene durchgeführt werden. Nützliche Effektorzellen für solche Tests umfassen mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Alternativ oder zusätzlich dazu kann die ADCC-Aktivität des Moleküls von Interesse in vivo bestimmt werden, z.B. in einem Tiermodell wie dem in Clynes et al., *PNAS USA* 95, 652-656 (1998), offenbaren.

„Fc-Rezeptor“ oder „FcR“ beschreibt einen Rezeptor, der an die Fc-Region eines Antikörpers bindet. Der bevorzugte FcR ist ein menschlicher Nativsequenz-FcR. Außerdem ist ein bevorzugter FcR einer, der an IgG-Antikörper bindet (ein γ -Rezeptor) und Rezeptoren der Unterklassen Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII umfasst, darunter auch allelische Varianten und alternativ gespleißte Formen dieser Rezeptoren. Fc γ RII-

Rezeptoren umfassen FcγRIIA (einen „aktivierenden Rezeptor“) und FcγRIIB (einen „hemmenden Rezeptor“), die ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen, welche sich in erster Linie in ihren zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Der aktivierende Rezeptor FcγRIIA enthält ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM) in seiner zytoplasmatischen Domäne. Der hemmende Rezeptor FcγRIIB enthält ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Hemmungsmotiv (ITIM) in seiner zytoplasmatischen Domäne (siehe M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234 (1997)). FcRs werden in Ravetch und Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4, 25-34 (1994); und de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126, 330-41 (1995), besprochen. Weitere FcRs, umfassend auch solche, die in Zukunft identifiziert werden, sind vom Begriff „FcR“ hierin abgedeckt. Der Begriff umfasst auch den neonatalen Rezeptor, FcRn, der für den Transfer von mütterlichen IgGs an den Fötus verantwortlich ist. Guyer et al., *J. Immunol.* 117, 587 (1976), und Kim et al., *J. Immunol.* 24, 249 (1994).

„Menschliche Effektorzellen“ sind Leukozyten, die einen oder mehrere FcRs exprimieren und Effektorfunktionen ausüben. Vorzugsweise exprimieren die Zellen zumindest FcγRIII und erfüllen eine ADCC-Effektorfunktion. Beispiele für menschliche Leukozyten, die ADCC vermitteln, umfassen mononukleäre Zellen im peripheren Blut (PBMCs), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten, zytotoxische T-Zellen und Neutrophile; bevorzugt werden dabei PBMCs und MNK-Zellen. Die Effektorzellen können aus einer nativen Quelle isoliert sein, z.B. Blut.

„Komplementabhängige Zytotoxizität“ bzw. „CDC“ bezeichnet die Lyse einer Zielzelle in Gegenwart von Komplement. Die Aktivierung des klassischen Komplement-Signalwegs wird durch Bindung der ersten Komponente des Komplementsystems (C1q) an Antikörper (der geeigneten Unterklasse), die an ihr zugehöriges Antigen gebunden sind, initiiert. Zum Testen auf die Komplementaktivierung kann ein CDC-Test, etwa wie von Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202, 163 (1996), beschrieben, durchgeführt werden.

Eine „stabile“ Formulierung ist eine, in der das Protein darin im Wesentlichen seine physikalische und chemische Stabilität und Integrität bei Lagerung beibehält. Diverse Analyseverfahren zum Messen von Proteinstabilität sind im Fachgebiet verfügbar und werden in Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York, New York, USA (1991), und A. Jones, Adv. Drug Delivery Rev. 10, 29-90 (1993), besprochen. Stabilität kann bei einer ausgewählten Temperatur für einen ausgewählten Zeitraum gemessen werden. Zum schnellen Screening kann die Formulierung 2 Wochen bis 1 Monat lang bei 40 °C gehalten werden, wenn die zeitliche Stabilität gemessen wird. Soll die Formulierung bei 2 bis 8 °C gelagert werden, sollte sie im Allgemeinen bei 30 °C oder 40 °C mindestens 1 Monat lang und/oder bei 2 bis 8 °C mindestens 2 Jahre lang stabil sein. Wenn die Formulierung bei 30 °C gelagert werden soll, sollte sie im Allgemeinen bei 30 °C zumindest 2 Jahre lang und oder bei 40 °C zumindest 6 Monate stabil sein. Das Ausmaß der Aggregation nach Gefriertrocknung und Lagerung kann z.B. als Indikator der Proteinstabilität verwendet werden. Daher kann eine „stabile“ Formulierung eine sein, worin weniger als etwa 10 % und vorzugsweise weniger als etwa 5 % des Proteins als Aggregat in der Formulierung vorliegen. In anderen Ausführungsformen kann jeder beliebige Anstieg der Aggregatbildung nach Gefriertrocknung und Lagerung der gefriergetrockneten Formulierung bestimmt werden. Eine „stabile“ gefriergetrocknete Formulierung kann z.B. eine sein, worin der Aggregatanstieg in der gefriergetrockneten Formulierung weniger als etwa 5 % und vorzugsweise weniger als etwa 3 % beträgt, wenn die gefriergetrocknete Formulierung bei 2 bis 8 °C mindestens ein Jahr lang gelagert wird. In anderen Ausführungsformen kann die Stabilität der Proteinformulierung unter Verwendung eines Tests auf biologische Aktivität gemessen werden.

Eine „rekonstituierte“ Formulierung ist eine, die durch derartiges Auflösen einer gefriergetrockneten Proteinformulierung in einem Verdünnungsmittel hergestellt wurde, dass das Protein in der rekonstituierten Formulierung verteilt ist. Die rekonstituierte Formulierung ist zur Verabreichung (z.B. zur parenteralen Verabreichung) an einen mit dem Immunglobulin von Interesse zu behandelnden Patienten geeignet und kann

in bestimmten Ausführungsformen der Erfindung eine sein, die für die subkutane Verabreichung geeignet ist.

Eine „isotonische“ Formulierung ist eine, die im Wesentlichen denselben osmotischen Druck aufweist wie menschliches Blut. Isotonische Formulierungen weisen im Allgemeinen einen osmotischen Druck von etwa 250 bis 350 mOsm auf. Der Begriff „hypotonisch“ beschreibt eine Formulierung mit einem osmotischen Druck unterhalb von jenem des menschlichen Blutes. Dementsprechend wird der Ausdruck „hypertonisch“ verwendet, um eine Formulierung mit einem osmotischen Druck oberhalb von jenem des menschlichen Blutes zu beschreiben. Isotonie kann z.B. unter Verwendung eines Dampfdruck- oder Eisgefrier-Typ-Osmometers gemessen werden. Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung sind in Folge des Zusatzes von Salz und/oder Puffer hypertonisch.

Eine „pharmazeutisch annehmbare Säure“ umfasst anorganische und organische Säuren, die in der Konzentration und Art und Weise, womit sie formuliert sind, nicht toxisch sind. Geeignete anorganische Säuren umfassen z.B. Salz-, Perchlor-, Bromwasserstoff-, Iodwasserstoff-, Salpeter-, Schwefel-, Sulfon-, Sulfin-, Sulfanil-, Phosphor-, Kohlensäure etc. Geeignete organische Säuren umfassen Alkyl mit unverzweigten und verzweigten Ketten, aromatische, zyklische, cycloalipathische, arylalipathische, heterozyklische, gesättigte, ungesättigte, Mono-, Di- und Tricarbon-, darunter z.B. Ameisen-, Essig-, 2-Hydroxyessig-, Trifluoressig-, Phenylessig-, Trimethylessig-, t-Butylessig-, Anthranil-, Propan-, 2-Hydroxypropan-, 2-Oxopropan-, Propandi-, Cyclopentanpropion-, Cyclopentanpropion-, 3-Phenylpropion-, Butan-, Butandi-, Benzoe-, 3-(4-Hydroxybenzoyl)benzoe-, 2-Acetoxybenzoe-, Ascorbin-, Zimt-, Laurylschwefel-, Stearin-, Mucon-, Mandel-, Bernstein-, Embon-, Fumar-, Apfel-, Malein-, Hydroxymalein-, Malon-, Milch-, Zitronen-, Wein-, Glykol-, Glykon-, Glucon-, Brenztrauben-, Glyoxyl-, Oxal-, Methansulfon-, Bernstein-, Salicyl-, Phthal-, Palm-, Palmein-, Thiocyan-, Methansulfon-, Ethansulfon-, 1,2-Ethandisulfon-, 2-Hydroxyethansulfon-, Benzolsulfon-, 4-Chlorbenzolsulfon-, Naphthalin-2-sulfon-, p-Toluolsulfon-, Kampfersulfon-, 4-Methylbicyclo[2.2.2]oct-2-en-1-carbon-, Glucoheptonsäure, 4,4'-Methylenbis-3-(hydroxy-2-en-1-carbonsäure), Hydroxynaphtoesäure.

„Pharmazeutisch annehmbare Basen“ umfassen anorganische und organische Basen, die in der Konzentration und Art und Weise, womit sie formuliert sind, nicht toxisch sind. Geeignete Basen umfassen z.B. jene, die aus anorganischen basenbildenden Metallen, z.B. aus Lithium, Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Ammonium, Eisen, Zink, Kupfer, Mangan, Aluminium, gebildet wurden, N-Methylglucamin, Morpholin, Piperidin und organische nichttoxische Basen, wie z.B. primäres, sekundäres und tertiäres Amin, substituierte Amine, zyklische Amine und basische Ionenaustauschharze (z.B. $N(R')_4^+$ (wobei R' unabhängig voneinander H oder C_{1-4} -Alkyl ist, z.B. Ammonium, Tris)), z.B. Isopropylamin, Trimethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Tripropylamin, Ethanolamin, 2-Diethylaminoethanol, Trimethamin, Dicyclohexylamin, Lysin, Arginin, Histidin, Koffein, Procain, Hydrabamin, Cholin, Betain, Ethylendiamin, Glucosamin, Methylglucamin, Theobromin, Purine, Piperazin, Piperidin, N-Ethylpiperidin, Polyaminharze und dergleichen. Besonders bevorzugte organische nichttoxische Basen sind Isopropylamin, Diethylamin, Ethanolamin, Trimethamin, Dicyclohexylamin, Cholin und Koffein.

Zusätzliche pharmazeutisch annehmbare Säuren und Basen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, umfassen jene, die von den Aminosäuren, z.B. Histidin, Glycin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin und Asparagin, stammen.

„Pharmazeutisch annehmbare“ Puffer und Salze umfassen jene, die sowohl von Säuren- als auch von Basenadditionssalzen der oben stehenden Säuren und Basen stammen. Konkrete Puffer und/oder Salze umfassen Histidin, Succinat und Acetat.

Ein „Lyoprotectant“ ist ein Molekül, das, wenn es mit einem Protein von Interesse kombiniert wird, die chemische und/oder physikalische Instabilität des Proteins bei Gefriertrocknung und anschließender Lagerung signifikant verhindert oder reduziert. Beispielhafte Lyoprotectants umfassen Zucker und ihre entsprechenden Zuckeralkohole; eine Aminosäure, z.B. Mononatriumglutamat oder Histidin; ein Methylamin, wie z.B. Betain; ein lyotropes Salz, z.B. Magnesiumsulfat; ein Polyol, z.B. dreiwertige o-

der höhermolekulare Zuckeralkohole, z.B. Glycerin, Dextran, Erythrit, Glycerin, Arabit, Xylit, Sorbit und Mannit; Propylenglykol; Polyethylenglykol; Pluronic®; und Kombinationen daraus. Weitere beispielhafte Lyoprotectants umfassen Glycerin und Gelatine sowie die Zucker Mellibiose, Melezitose, Raffinose, Mannotriose und Stachyose. Beispiele für reduzierende Zucker umfassen Glucose, Maltose, Lactose, Maltulose, Isomaltulose und Lactulose. Beispiele für nichtreduzierende Zucker umfassen nichtreduzierende Glykoside von aus Zuckeralkoholen und sonstigen Polyalkoholen mit unverzweigten Ketten ausgewählten Polyhydroxyverbindungen. Bevorzugte Zuckeralkohole sind Monoglykoside, besonders jene Verbindungen, die durch Reduktion von Disacchariden, z.B. Lactose, Maltose, Lactulose und Maltulose, erhalten wurden. Die glykosidische Seitengruppe kann entweder glucosidisch oder galactosidisch sein. Weitere Beispiele für Zuckeralkohole sind Glucit, Maltit, Lactit und Isomaltulose. Das bevorzugte Lyoprotectant sind die nichtreduzierenden Zucker Trehalose oder Saccharose.

Bei der Herstellung der Formulierungen mit reduzierter Viskosität sollte bei der Verwendung der oben stehend aufgezählten Exzipienten sowie anderer Zusatzstoffe Sorgfalt an den Tag gelegt werden, besonders, wenn sie in hoher Konzentration zugesetzt werden, so dass die Viskosität der Formulierung nicht erhöht wird.

Das Lyoprotectant wird zu der vorgefriergetrockneten Formulierung in einer „gefrierschützenden Menge“ zugesetzt, was bedeutet, dass nach der Gefriertrocknung des Proteins in Gegenwart der gefrierschützenden Menge des Lyoprotectants das Protein seine physikalische und chemische Stabilität und Integrität bei Gefriertrocknung und Lagerung im Wesentlichen beibehält.

Das „Verdünnungsmittel“ von Interesse hierin ist eines, das pharmazeutisch annehmbar (sicher und nichttoxisch bei der Verabreichung an einen Menschen) und für die Herstellung einer Flüssigformulierung nützlich ist, z.B. eine nach der Gefriertrocknung rekonstituierte Formulierung. Beispiele für Verdünnungsmittel umfassen steriles Wasser, bakteriostatisches Wasser zur Injektion (BWF1), eine pH-gepufferte Lösung (z.B. phosphatgepufferte Salzlösung), sterile Salzlösung, Ringer-Lösung oder Dext-

rose-Lösung. In einer alternativen Ausführungsform können die Verdünnungsmittel wässrige Lösungen von Salzen und/oder Puffern umfassen.

Ein „Konservierungsmittel“ ist eine Verbindung, die zu den Formulierungen hierin zugesetzt werden kann, um die Wirkung der Bakterien zu reduzieren. Der Zusatz eines Konservierungsmittels kann beispielsweise die Herstellung einer Mehrfachverwendungs- (Mehrfachdosis-) Formulierung vereinfachen. Beispiele für mögliche Konservierungsmittel umfassen Octadecyldimethylbenzylammoniumchlorid, Hexamethoniumchlorid, Benzalkoniumchlorid (ein Gemisch aus Alkylbenzoldimethylammoniumchloriden, worin die Alkylgruppen langkettige Verbindungen sind) und Benzethoniumchlorid. Weitere Arten von Konservierungsmitteln umfassen aromatische Alkohole, wie z.B. Phenol-, Butyl- und Benzylalkohol, Alkylparabene, wie z.B. Methyl- oder Propylparaben, Catechol, Resorcinol, Cyclohexanol, 3-Pentanol und m-Cresol. Das hierin am meisten bevorzugte Konservierungsmittel ist Benzylalkohol.

Ein „Füllmittel“ ist eine Verbindung, die zu einem gefriergetrockneten Gemisch Masse hinzufügt und zur physikalischen Struktur des gefriergetrockneten Kuchens beiträgt (z.B. indem es die Produktion eines im Wesentlichen einförmigen gefriergetrockneten Kuchens erleichtert, der eine offene Porenstruktur beibehält). Beispielhafte Füllmittel umfassen Mannit, Glycin, Polyethylenglykol und Sorbit. Die Flüssigformulierungen der vorliegenden Erfindung, erhalten durch Rekonstitution einer gefriergetrockneten Formulierung, können solche Füllmittel enthalten.

„Behandlung“ betrifft sowohl die therapeutische Behandlung als auch Prophylaxe- oder Präventionsmaßnahmen. Individuen mit Behandlungsbedarf umfassen jene, die bereits an der Erkrankung leiden, ebenso wie jene, bei denen es die Erkrankung zu vermeiden gilt.

„Säugetier“ bezeichnet für Behandlungszwecke jedes beliebige als Säugetier klassifizierte Tier, z.B. Menschen, Haus- und Nutztiere sowie Zoo- oder Sporttiere, wie z.B. Hunde, Pferde, Kaninchen, Rinder, Schweine, Hamster, Mäuse, Katzen etc. Vorzugsweise ist das Säugetier menschlich.

Eine „Erkrankung“ ist jedes beliebige Leiden, das von einer Behandlung mit dem Protein profitieren würde. Dies umfasst chronische und akute Erkrankungen oder Krankheiten, z.B. jene pathologischen Leiden, die die Grundlage für die fragliche Erkrankung bei dem Säugetier bilden. Nichteinschränkende Beispiele hierin für zu behandelnde Erkrankungen umfassen Karzinome und Allergien.

Eine „therapeutisch wirksame Menge“ ist zumindest die minimale Konzentration, die erforderlich ist, um eine messbare Verbesserung oder Prävention einer bestimmten Erkrankung zu bewirken. Therapeutisch wirksame Mengen bekannter Proteine sind Fachleuten wohlbekannt, während die wirksamen Mengen der nachstehend gefundenen Proteine mittels gängiger Verfahren bestimmt werden können, die eindeutig innerhalb der Fähigkeiten geschulter Fachleute, z.B. herkömmlicher Ärzte, liegen.

„Viskosität“ kann wie hierin verwendet „kinematische Viskosität“ oder „absolute Viskosität“ sein. „Kinematische Viskosität“ ist ein Maß für den Widerstandsfluss einer Flüssigkeit unter dem Einfluss der Schwerkraft. Wenn zwei Flüssigkeiten von gleichem Volumen in identischen kapillaren Viskosimetern platziert und durch die Schwerkraft fließen gelassen werden, braucht eine viskose Flüssigkeit länger dafür, durch die Kapillare zu fließen, als eine weniger viskose Flüssigkeit. Wenn eine Flüssigkeit 200 Sekunden braucht, um ihren Fluss zu vollenden, und eine andere Flüssigkeit 400 Sekunden braucht, ist die zweite Flüssigkeit auf einer Skala der kinematischen Viskosität zweimal so viskos wie die erste. „Absolute Viskosität“, manchmal auch dynamische oder einfache Viskosität genannt, ist das Produkt der kinematischen Viskosität und der Flüssigkeitsdichte:

$$\text{Absolute Viskosität} = \text{Kinematische Viskosität} \times \text{Dichte}$$

Die Dimension der kinematischen Viskosität ist L^2/T , wobei L die Länge und T die Zeit ist. Gemeinhin wird kinematische Viskosität in Centistokes (cSt) angegeben. Die SI-Einheit der kinematischen Viskosität ist mm^2/s , was 1 cSt entspricht. Absolute Vis-

kosität wird in Centipoise-Einheiten (cP) angegeben. Die SI-Einheit der absoluten Viskosität ist die Millipascalsekunde (mPa·s), wobei 1 cP = 1 mPa·s ist.

II. Ausführungsformen der Erfindung

A. Proteinherstellung

Das zu formulierende Immunglobulinprotein kann durch jedes beliebige Verfahren produziert werden, wie z.B. durch das Züchten von Zellen, die mit einem Vektor, der die Nucleinsäure enthält, die für das Protein kodiert, transformiert oder transfiziert sind, wie Fachleuten wohlbekannt ist, oder durch Syntheseverfahren (wie z.B. Rekombinationsverfahren und Peptidsynthese oder eine Kombination aus diesen Verfahren), oder es kann aus einer endogenen Quelle des Proteins isoliert werden.

Die Herstellung des zu formulierenden Immunglobulinproteins durch das erfindungsgemäße Verfahren mit Rekombinationsmitteln kann durch Transfizieren oder Transformieren geeigneter Wirtszellen mit Expressions- oder Klonierungsvektoren und Züchten in herkömmlichem Nährmedium, das so modifiziert ist, dass es sich zum Induzieren von Promotoren, Auswählen von Transformanten oder Amplifizieren der für die gewünschten Sequenzen kodierenden Gene eignet, erfolgen. Die Kulturbedingungen, wie z.B. Medium, Temperatur, pH-Wert und dergleichen, können von Fachleuten ohne übermäßigen Aufwand ausgewählt werden. Im Allgemeinen sind Prinzipien, Arbeitsvorschriften und praktische Verfahren zur Maximierung der Produktivität von Zellkulturen in *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler (Hrsg.), IRL Press (1991), und Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, USA, zu finden. Transfektionsverfahren sind geschulten Fachleuten gemeinhin bekannt und umfassen z.B. CaPO₄- und CaCl₂-Transfektion, Elektroporation, Mikroinjektion etc. Geeignete Verfahren sind auch in Sambrook et al., s.o., beschrieben. Zusätzliche Transfektionsverfahren sind in Shaw et al., *Gene* 23, 315 (1983); WO 98/05859; Graham et al., *Virology* 52, 456-457 (1978); und US-Patent 4.399.216 beschrieben.

Die für das gewünschte Immunglobulinprotein zur Formulierung gemäß dem vorliegenden Verfahren kodierende Nucleinsäure kann in einen replizierbaren Vektor zur Klonierung oder Expression inseriert werden. Geeignete Vektoren sind öffentlich erhältlich und können die Form eines Plasmids, Cosmids, viralen Partikels oder Phagen annehmen. Die geeignete Nucleinsäuresequenz kann in den Vektor durch eine Vielzahl von Verfahren inseriert werden. Im Allgemeinen wird DNA unter Verwendung fachbekannter Verfahren in eine oder mehrere geeignete Restriktionsendonucleasestellen inseriert. Vektorkomponenten umfassen im Allgemeinen eines oder mehrere der Folgenden, ohne auf diese beschränkt zu sein: eine Signalsequenz, einen Replikationsstartpunkt, ein oder mehrere Markergene, ein Enhancerelement, einen Promotor und eine Transkriptionsterminationssequenz. Die Konstruktion geeigneter Vektoren, die eine oder mehrere dieser Komponenten enthalten, arbeitet mit gängigen Ligationsverfahren, die Fachleuten wohlbekannt sind.

Formen des zu formulierenden Immunglobulinproteins können aus Kulturmedium oder aus Wirtszellenlysaten gewonnen werden. Ist es membrangebunden, kann es unter Verwendung eines geeigneten Detergens oder durch enzymatische Spaltung von der Membran losgelöst werden. Die zur Expression eingesetzten Zellen können auch durch verschiedene physikalische oder chemische Mittel unterbrochen werden, wie z.B. Gefrier-Auftau-Zyklisierung, Beschallung, mechanische Unterbrechung oder Zelllyse-mittel.

Die Reinigung des zu formulierenden Immunglobulinproteins kann durch jedes beliebige fachbekannte Verfahren durchgeführt werden, wie z.B. Fraktionierung auf einer Ionenaustauschsäule, Ethanolpräzipitation, Umkehrphasen-HPLC, Chromatografie auf Silica oder Kationenaustauschharz (z.B. DEAE), Chromatofokussierung, SDS-PAGE, Ammoniumsulfatpräzipitation, Gelfiltration unter Verwendung von Protein-A-Sepharose-Säulen (z.B. Sephadex® G-75) zum Entfernen von Kontaminanten wie IgG und Metall chelatierende Säulen zum Binden von epitopmarkierten Formen.

B. Antikörperherstellung

(i) Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper werden im Allgemeinen in Tieren durch mehrfache subkutane (sc) oder intraperitoneale (ip) Injektion des betreffenden Antigens und eines Adjuvans gezüchtet. Es kann nützlich sein, das jeweilige Antigen an ein Protein zu konjugieren, das in der zu immunisierenden Spezies immunogen ist, z.B. Schlüssellocknapfschneckenhäemocyanin, Serumalbumin, Rinderthyreoglobulin oder Sojabohnentrypsinhemmstoff. Beispiele für Adjuvanzen, die eingesetzt werden können, umfassen Freundsches Komplett-Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl-Lipid-A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat). Die Immunisierungsvorschrift kann von Fachleuten ohne übermäßigen Aufwand ausgewählt werden.

Einen Monat später werden die Tiere mit 1/5 bis 1/10 der ursprünglichen Peptid- oder Konjugatmenge in Freundschem Komplett-Adjuvans durch subkutane Injektion an mehreren Stellen reimmunisiert. Sieben bis 14 Tage später wird den Tieren Blut abgenommen, und das Serum wird auf Antikörpertiter getestet. Die Tiere werden reimmunisiert, bis der Titer einen Plateauwert erreicht hat. Vorzugsweise wird das Tier mit dem Konjugat desselben Antigens reimmunisiert, das aber an ein anderes Protein und/oder durch ein anderes Vernetzungsreagens konjugiert ist. Konjugate können auch in rekombinanter Zellkultur als Proteinfusionen hergestellt werden. Auch Aggregationsmittel wie Alaun sind angemessen zu verwenden, um die Immunantwort zu verstärken.

(ii) Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten, d.h. die individuellen Antikörper, die die Population umfassen, sind identisch mit Ausnahme möglicher natürlich vorkommender Mutationen, die in geringeren Mengen vorhanden sein können. Daher weist das Attribut „monoklonal“ die Eigenschaft des Antikörpers aus, kein Gemisch aus einzelnen Antikörpern zu sein.

Monoklonale Antikörper können z.B. unter Verwendung von Hybridomverfahren, wie beispielsweise jenen, die zuerst von Kohler und Milstein, *Nature* 356, 495 (1975), beschrieben werden, hergestellt werden, oder sie können durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden.

Im Hybridomverfahren wird eine Maus oder ein anderes geeignetes Wirtstier, z.B. ein Hamster, wie oben stehend beschrieben immunisiert, um Lymphozyten hervorzu- bringen, die Antikörper produzieren oder zu produzieren in der Lage sind, die sich spezifisch an das zur Immunisierung verwendete Protein binden. Alternativ dazu können die Lymphozyten *in vitro* immunisiert werden. Lymphozyten werden anschließend unter Verwendung eines geeigneten Fusionierungsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, mit Myelomzellen fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103, Academic Press (1986)).

Das immunisierende Mittel umfasst typischerweise das zu formulierende Protein. Im Allgemeinen werden entweder Lymphozyten des peripheren Bluts („PBLs“), sofern Zellen menschlichen Ursprungs erwünscht sind, oder Milzzellen oder Lymphknoten- zellen verwendet, sofern nichtmenschliche Säugetierquellen erwünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mit einer sich unbegrenzt vermehrenden Zelllinie unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103, Academic Press (1986)). Sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind üblicherweise transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen von Nagetieren, Rindern und Menschen. Üblicherweise werden Ratten- oder Maus- myelomzelllinien verwendet. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kul- turmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen ent- hält, die das Wachstum oder Überleben der nicht fusionierten, sich unbegrenzt ver- mehrenden Zellen hemmen. Fehlt beispielsweise den Ausgangs-Myelomzellen das Enzym Hypoxanthin-guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT), so um- fasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin

und Thymidin („HAT-Medium“), Substanzen, die das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen unterbinden.

Bevorzugte Myelomzellen sind jene, die wirksam fusionieren, die stabile hochgradige Expression von Antikörper durch die ausgewählten, Antikörper produzierenden Zellen fördern und die auf ein Medium wie beispielsweise HAT-Medium empfindlich sind. Unter diesen sind die bevorzugten Myelomzelllinien Mausmyelomlinien, wie beispielsweise jenen, die von MOPC-21- und MPC-11-Maus-Tumoren abstammen, die beispielsweise beim Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, USA, und bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, erhalten werden können. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden auch für die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern beschrieben (Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, USA (1987)).

Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Produktion von monoklonalen Antikörpern, die gegen das Antigen gerichtet sind, getestet werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität von monoklonalen Antikörpern, die durch die Hybridomzellen produziert werden, durch Immunfällung oder durch einen In-vitro-Bindungstest, wie beispielsweise Radioimmuntest (RIA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA), bestimmt.

Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson et al., Anal. Biochem. 107, 220 (1980), bestimmt werden.

Nachdem die Hybridomzellen identifiziert wurden, dass sie Antikörper mit der gewünschten Spezifität, Affinität und/oder Aktivität produzieren, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels herkömmlicher Verfahren gezüchtet werden (Goding, s.o.). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen

beispielsweise D-MEM oder RPMI-1640-Medium. Zusätzlich dazu können die Hybridomzellen in vivo als Aszitestumoren in einem Tier gezüchtet werden.

Das immunisierende Mittel umfasst typischerweise das Epitopprotein, an das der Antikörper bindet. Im Allgemeinen werden entweder Lymphozyten des peripheren Bluts („PBLs“) verwendet, wenn Zellen menschlichen Ursprungs erwünscht sind, oder Milzzellen oder Lymphknotenzellen werden verwendet, wenn nichtmenschliche Säugetier-Quellen erwünscht sind. Die Lymphozyten werden dann unter Verwendung eines geeigneten Fusionierungsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, mit einer sich unbegrenzt vermehrenden Zelllinie fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103, Academic Press (1986).

Sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind üblicherweise transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen von Nagetieren, Rindern und Menschen. Üblicherweise werden Ratten- oder Mausmyelomzelllinien verwendet. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht fusionierten, sich unbegrenzt vermehrenden Zellen hemmen. Fehlt beispielsweise den Ausgangszellen das Enzym Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT), so umfasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin („HAT-Medium“), Substanzen, die das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen unterbinden.

Bevorzugte sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind jene, die wirksam fusionieren, die stabile hochgradige Expression von Antikörper durch die ausgewählten Antikörper produzierenden Zellen fördern und die auf ein Medium wie beispielsweise HAT-Medium empfindlich sind. Noch bevorzugtere, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind Maus-Myelomlinien, die beispielsweise beim Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, USA, und bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, erhältlich sind. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden auch für die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern beschrieben (Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984);

Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, USA (1987)).

Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Gegenwart von monoklonalen Antikörpern, die gegen das zu formulierende Protein gerichtet sind, getestet werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität von monoklonalen Antikörpern, die durch die Hybridomzellen produziert werden, durch Immundefällung oder durch einen In-vitro-Bindungstest, wie beispielsweise Radioimmuntest (RIA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA), bestimmt. Solche Verfahren und Tests sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson und Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980), bestimmt werden.

Nachdem die erwünschten Hybridomzellen identifiziert wurden, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels herkömmlicher Verfahren gezüchtet werden (Goding, s.o.). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ dazu können die Hybridomzellen in vivo als Aszites in einem Säugetier gezüchtet werden.

Die monoklonalen Antikörper, die durch die Subklone sekretiert werden, werden aus dem Kulturmedium, der Aszitesflüssigkeit oder vom Serum durch herkömmliche Immunglobulinreinigungungsverfahren, wie beispielsweise Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatografie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatografie, angemessen getrennt.

DNA, die für die monoklonalen Antikörper kodiert, kann leicht isoliert und unter Verwendung herkömmlicher Verfahren (z.B. unter Verwendung von Oligonucleotidsonden, die in der Lage sind, sich spezifisch an Gene zu binden, die für die schweren und leichten Ketten von Maus-Antikörper kodieren) sequenziert werden. Die Hybridomzellen dienen als eine bevorzugte Quelle für solche DNA. Nachdem sie isoliert wurde, kann die DNA in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszel-

len wie beispielsweise E.-coli-Zellen, Affen-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO-) Zellen oder Myelomzellen transfiziert werden, die sonst kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese von monoklonalen Antikörpern in den rekombinanten Wirtszellen zu erreichen. Überblicksartikel zu rekombinanter Expression in Bakterien von DNA, die für den Antikörper kodiert, umfassen Skerra et al., *Curr. Opin. in Immunol.* 5, 256-262 (1993), und Plückthun, *Immunol. Revs.* 130, 151-188 (1992).

In einer weiteren Ausführungsform können Antikörper aus Antikörper-Phagenbibliotheken, die unter Verwendung der in McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990), beschriebenen Verfahren erzeugt wurden, isoliert werden. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991), und Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), beschreiben die Isolierung von murinen bzw. menschlichen Antikörpern unter Verwendung von Phagenbibliotheken. Die jeweils nachfolgenden Veröffentlichungen beschreiben die Produktion von menschlichen Antikörpern mit hoher Affinität (nM-Bereich) durch Ketten-Shuffling (Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)) sowie kombinatorische Infektion und In-vivo-Rekombination als Strategie zum Konstruieren äußerst großer Phagenbibliotheken (Waterhouse et al., *Nuc. Acids Res.* 21, 2265-2266 (1993)). Zudem sind diese Verfahren gültige Alternativen zu herkömmlichen monoklonale-Antikörper-Hybridomverfahren zur Isolierung monoklonaler Antikörper.

Die DNA kann auch beispielsweise durch Substituieren der Kodiersequenz für menschliche Schwer- und Leichtketten-Konstantdomänen anstelle der homologen Maus-Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851 (1984)) oder durch kovalentes Binden der gesamten oder eines Teils der Kodiersequenz für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid an die Immunglobulin-Kodiersequenz modifiziert werden.

Solch ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid wird typischerweise anstelle der konstanten Domänen eines Antikörpers oder anstelle der variablen Domänen einer Antigenbindungsstelle eines Antikörpers eingesetzt, um einen zweiwertigen chimären Anti-

körper zu bilden, der eine Antigenkombinationsstelle mit Spezifität für ein Antigen und eine weitere Antigenkombinationsstelle mit Spezifität für ein anderes Antigen umfasst.

Es können auch in vitro unter Verwendung in der synthetischen Proteinchemie bekannter Verfahren, z.B. solchen, die mit Vernetzungsmitteln arbeiten, chimäre oder hybride Antikörper hergestellt werden. Immuntoxine z.B. können unter Verwendung einer Disulfidaustauschreaktion oder durch Bilden einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für zu diesem Zweck geeignete Reagenzien umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptobutyrimidat.

(iii) Humanisierte und menschliche Antikörper

Die dem Formulierungsverfahren unterzogenen Antikörper können weiters humanisierte oder menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen von nichtmenschlichen (z.B. Maus-) Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinlinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ oder andere Antigenbindungssubsequenzen von Antikörpern), die eine Mindest-Sequenz, abgeleitet aus nichtmenschlichem Immunglobulin, enthalten. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Rezipientenantikörper), in denen Reste aus einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Rezipienten durch Reste aus einer CDR einer nichtmenschlichen Spezies (Donorantikörper) wie Maus, Ratte oder Kaninchen mit der erwünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In manchen Fällen sind Fv-Gerüstreste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nichtmenschliche Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können auch Reste umfassen, die weder im Rezipientenantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen die gesamte von zumindest einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nichtmenschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulin-Konsensussequenz sind. Die humanisierten Antikörper umfassen vorzugsweise auch

zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins. Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992).

Verfahren zur Humanisierung nichtmenschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die in ihn aus einer Quelle eingeführt wurden, die nichtmenschlich ist. Diese nichtmenschlichen Aminosäurereste werden oft als „Import“-Reste bezeichnet, die typischerweise aus einer variablen „Import“-Domäne genommen werden. Humanisierung kann im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988)) oder durch Substituieren von Nagetier-CDRs oder -CDR-Sequenzen anstelle der entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durchgeführt werden. Demgemäß sind solche „humanisierten“ Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin wesentlich weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nichtmenschlichen Spezies substituiert wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in denen manche CDR-Reste und möglicherweise manche FR-Reste durch Reste aus analogen Stellen in Nagetierantikörpern ersetzt sind.

Die Wahl der beim Herstellen der humanisierten Antikörper zu verwendenden menschlichen variablen Domänen, sowohl der Leicht- als auch der Schwereketten, ist für das Reduzieren von Antigenität sehr wichtig. Nach der so genannten „Best-Fit“-Methode wird die Sequenz der variablen Domäne eines Nagetierantikörpers gegen die gesamte Bibliothek bekannter menschlicher Sequenzen variabler Domänen gescreent. Die menschliche Sequenz, die jener des Nagetiers am nächsten ist, wird dann als menschliches Gerüst (FR) für den humanisierten Antikörper angenommen. Sims et al., J. Immunol. 151, 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196, 901 (1987). Ein weiteres Verfahren arbeitet mit einem bestimmten Gerüst, das aus der Konsensussequenz aller menschlichen Antikörper einer bestimmten Untergruppe

von Leicht- oder Schwerketten abgeleitet ist. Dasselbe Gerüst kann auch für mehrere unterschiedliche humanisierte Antikörper verwendet werden. Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151, 2623 (1993).

Weiters ist wichtig, dass Antikörper unter Beibehaltung der hohen Affinität für das Antigen und anderer günstiger biologischer Eigenschaften humanisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden humanisierte Antikörper nach einem bevorzugten Verfahren durch einen Vorgang der Analyse der parenteralen Sequenzen und diverser konzeptueller humanisierter Produkte unter Verwendung von dreidimensionalen Modellen der parenteralen und der menschlichen Sequenzen hergestellt. Dreidimensionale Immunglobulinmodelle sind allgemein erhältlich und Fachleuten vertraut. Computerprogramme, die wahrscheinliche dreidimensionale Konformationsstrukturen ausgewählter Kandidaten-Immunglobulinsequenzen veranschaulichen und anzeigen, sind verfügbar. Die Betrachtung dieser Anzeigen erlaubt die Analyse der wahrscheinlichen Rolle der Reste im Funktionieren der Kandidaten-Immunglobulinsequenz, d.h. die Analyse von Resten, die die Fähigkeit der Kandidaten-Immunglobulinsequenz beeinflussen, ihr Antigen zu binden. Auf diese Weise können FR-Reste ausgewählt und aus der Rezipienten- und der Importsequenz kombiniert werden, so dass die gewünschte Antikörpereigenschaft, wie z.B. erhöhte Affinität für das oder die Zielantigen(e), erreicht wird. Im Allgemeinen sind die CDR-Reste direkt und besonders wesentlich am Beeinflussen der Antigenbindung beteiligt.

Alternativ dazu ist es mittlerweile möglich, transgene Tiere (z.B. Mäuse) zu produzieren, die nach der Immunisierung in der Lage sind, bei Abwesenheit endogener Immunglobulinproduktion ein Repertoire menschlicher Antikörper zu erzeugen. Es wurde z.B. beschrieben, dass die homozygote Deletion des Antikörper-Schwerketten-Bindungsregion-(J_H-)Gens in chimären und Keimbahn-Mutanten-Mäusen zur vollständigen Hemmung endogener Antikörperproduktion führt. Der Transfer der menschlichen Keimbahn-Immunglobulin-Genanordnung in solche Keimbahn-Mutanten-Mäuse führt nach einer Antigen-Exposition zu der Produktion menschlicher Antikörper. Siehe z.B. Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255

(1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993); Bruggerman et al., Year in Immuno. 7, 33 (1993). Menschliche Antikörper können auch aus Phagendisplaybibliotheken abgeleitet werden (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)).

Menschliche Antikörper können auch unter Verwendung diverser fachbekannter Verfahren, z.B. Phagendisplaybibliotheken, produziert werden. Hoogenboom und Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Die Verfahren von Cole et al. und Boerner et al. sind auch für die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern erhältlich (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77, Alan R. Liss (1985), und Boerner et al., J. Immunol. 147(1), 86-95 (1991)). Ebenso können menschliche Antikörper durch Einführen menschlicher Immunglobulinloci in transgene Tiere, z.B. Mäuse, bei denen die endogenen Immunglobulingene teilweise oder vollständig deaktiviert wurden, hergestellt werden. Bei Exposition ist die Produktion menschlicher Antikörper zu beobachten, die in jeder Hinsicht, einschließlich Genneuordnung, Assemblierung und Antikörperrepertoire, stark jenen gleichen, die in Menschen zu sehen sind. Dieser Ansatz ist z.B. in den US-Patenten Nr. 5.545.807; 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 und in den folgenden wissenschaftlichen Publikationen beschrieben: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996), und Lonberg und Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

(iv) Antikörperabhängige Enzymvermittelte Prodrugtherapie (ADEPT)

Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch in ADEPT verwendet werden, indem der Antikörper an ein Prodrug-aktivierendes Enzym konjugiert wird, das ein Prodrug (z.B. ein Peptidylchemotherapeutikum, siehe WO 81/01145) in ein aktives Anti-Krebs-Arzneimittel überführt. Siehe z.B. WO 88/07378 und US-Patent Nr. 4.975.278.

Die für ADEPT nützliche Enzymkomponente des Immunkonjugats umfasst jedes beliebige Enzym, das in der Lage ist, auf ein Prodrug so zu wirken, dass es in seine aktivere, zytotoxische Form überführt wird.

Enzyme, die im Verfahren dieser Erfindung nützlich sind, umfassen Glykosidase, Glucoseoxidase, menschliches Lysozym, menschliche Glucuronidase, alkalische Phosphatase, die zum Überführen von phosphathaltigen Prodrugs in freie Arzneimittel nützlich ist, Arylsulfatase, die zum Überführen sulfathaltiger Prodrugs in freie Arzneimittel nützlich ist; Cytosindeaminase, die zum Überführen von nicht-toxischem 5-Fluorcytosin in das Anti-Krebs-Arzneimittel 5-Fluoururacil nützlich ist; Proteasen, wie z.B. Serratia-Protease, Thermolysin, Subtilisin, Carboxypeptidasen (z.B. Carboxypeptidase G2 und Carboxypeptidase A) und Cathepsine (wie z.B. die Cathepsine B und L), die zum Überführen peptidhaltiger Prodrugs in freie Arzneimittel nützlich sind; D-Alanylcarboxypeptidasen, die zum Überführen von Prodrugs, die D-Aminosäure-Substituenten enthalten, nützlich sind; kohlenhydratspaltende Enzyme, wie z.B. β -Galactosidase und Neuraminidase, die nützlich sind, um glykosylierte Prodrugs in freie Arzneimittel umzuwandeln; β -Lactamase, die zum Überführen von Arzneimitteln, die mit β -Lactamen derivatisiert wurden, in freie Arzneimittel nützlich ist; sowie Penicillin-Amidasen, wie z.B. Penicillin-V-Amidase oder Penicillin-G-Amidase, die zum Überführen von Arzneimitteln, die an ihren Amin-Stickstoffen mit Phenoxyacetyl- bzw. Phenylacetylgruppen derivatisiert wurden, in freie Arzneimittel nützlich sind, ohne auf diese beschränkt zu sein. Alternativ dazu können Antikörper mit enzymatischer Aktivität, nach dem Stand der Technik auch als „Abzyme“ bekannt, verwendet werden, um die Prodrugs der Erfindung in freie aktive Arzneimittel umzuwandeln (siehe z.B. Massey, Nature 328, 457-458 (1987)). Antikörper-Abzym-Konjugate können, wie hierin beschrieben, für die Anlieferung des Abzyms zu einer Tumorzellpopulation hergestellt werden.

Die in dieser Erfindung verwendeten Enzyme können durch Verfahren, die nach dem Stand der Technik wohlbekannt sind, wie z.B. die Verwendung der oben beschriebenen heterobifunktionellen Vernetzungsreagenzien, kovalent an die Anti-IL-17- oder Anti-LIF-Antikörper gebunden werden. Alternativ dazu können Fusionsproteine, die

zumindest die Antigenbindungsregion eines Antikörpers der Erfindung umfassen, die an zumindest einen funktionell aktiven Abschnitt eines Enzyms der Erfindung gebunden ist, unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren konstruiert werden, die nach dem Stand der Technik wohlbekannt sind (siehe z.B. Neuberger et al., Nature 312, 604-608 (1984)).

(iv) Bispezifische und polyspezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper (BsAbs) sind Antikörper, die Bindungsspezifitäten für mindestens zwei verschiedene Epitope aufweisen. Solche Antikörper können von Voll-längen-Antikörpern oder Antikörperfragmenten (z.B. bispezifischen $F(ab')_2$ -Antikörpern) abgeleitet werden.

Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind im Fachgebiet bekannt. Die herkömmliche Produktion bispezifischer Voll-längen-Antikörper basiert auf der Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerkette-Leichtkette-Paaren, wobei diese beiden Ketten unterschiedliche Spezifitäten aufweisen. Millstein et al., Nature 305, 537-539 (1983). Wegen der zufälligen Sortierung von Immunglobulin-Schwer- und -Leichtketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein mögliches Gemisch aus 10 verschiedenen Antikörpermolekülen, wovon nur eines die richtige bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des richtigen Moleküls, die üblicherweise durch Affinitätschromatographieschritte vorgenommen wird, ist einigermaßen aufwändig, und die Produkterträge sind gering. Ähnliche Verfahren sind in WO 93/08829 und in Traun-ecker et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991), offenbart.

Variable Antikörperdomänen mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) können an Immunglobulin-Konstantdomänensequenzen fusioniert werden. Die Fusion findet vorzugsweise mit einer Immunglobulin-Schwerketten-Konstantdomäne statt, die zumindest zum Teil die Gelenks-, die CH2- und die CH3-Region umfasst. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerkettenregion (CH1), die die für die Leichtkettenbindung notwendige Stelle enthält, in zumindest einer der Fusionen anwesend ist. DNAs, die für die Immunglobulin-

Schwerketten-Fusionen und, falls erwünscht, die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in gesonderte Expressionsvektoren inseriert und in einen geeigneten Wirtsorganismus co-transfiziert. Für weitere Details zum Erzeugen bispezifischer Antikörper siehe z.B. Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

Einem anderen Ansatz folgend können variable Antikörperdomänen mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) an Immunglobulin-Konstantdomänensequenzen fusioniert werden. Die Fusion findet vorzugsweise mit einer Immunglobulin-Schwerketten-Konstantdomäne statt, die zumindest zum Teil die Gelenks-, die CH2- und die CH3-Region umfasst. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerkettenregion (CH1), die die für die Leichtkettenbindung notwendige Stelle enthält, in zumindest einer der Fusionen anwesend ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerketten-Fusionen und, falls erwünscht, die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in gesonderte Expressionsvektoren inseriert und in einen geeigneten Wirtsorganismus co-transfiziert. Dies gewährleistet größere Flexibilität beim Anpassen der gegenseitigen Anteile der drei Polypeptidfragmente in Ausführungsformen, wenn ungleiche Verhältnisse der drei bei der Konstruktion verwendeten Polypeptidketten die besten Erträge bieten. Es ist jedoch möglich, die kodierenden Sequenzen für zwei oder alle drei Polypeptidketten in einen Expressionsvektor zu inserieren, wenn die Expression von mindestens zwei Polypeptidketten in gleichen Verhältnissen zu hohen Erträgen führt oder wenn die Verhältnisse nicht von besonderer Signifikanz sind.

Einem weiteren, in WO 96/27011 beschriebenen Ansatz folgend kann die Schnittstelle zwischen einem Paar von Antikörpermolekülen so bearbeitet werden, dass der Prozentsatz der Heterodimere, die aus rekombinanter Zellkultur gewonnen werden, maximiert wird. Die bevorzugte Schnittstelle umfasst zumindest einen Teil der CH3-Region einer konstanten Domäne eines Antikörpers. In diesem Verfahren werden eine oder mehrere kleine Aminosäureseitenketten von der Schnittstelle des ersten Antikörpermoleküls mit längeren Seitenketten (z.B. Tyrosin oder Tryptophan) ersetzt. Zum Ausgleich werden an der Schnittstelle des zweiten Antikörpermoleküls „Lücken“ von identischer oder ähnlicher Größe wie die große(n) Seitenkette(n) geschaffen,

indem große Aminosäureseitenketten mit kleineren (z.B. Alanin oder Threonin) ersetzt werden. Dies stellt einen Mechanismus zur Erhöhung des Heterodimer-Ertrags gegenüber anderen unerwünschten Endprodukten, z.B. Homodimeren, bereit.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Ansatzes sind die bispezifischen Antikörper aus einer hybriden Immunglobulin-Schwerkette mit einer ersten Bindungsspezifität in einem Arm und einem hybriden Immunglobulin-Schwerkette-Leichtkette-Paar (das eine zweite Bindungsspezifität bereitstellt) im anderen Arm zusammengesetzt. Es wurde herausgefunden, dass diese asymmetrische Struktur die Trennung der gewünschten bispezifischen Verbindung von unerwünschten Immunglobulinkettenkombinationen erleichtert, da die Gegenwart einer Immunglobulin-Leichtkette in nur einer Hälfte des bispezifischen Moleküls eine einfache Art der Trennung gewährleistet. Diese Herangehensweise ist in WO 94/04690, veröffentlicht am 3. März 1994, offenbart. Für weitere Details zum Erzeugen bispezifischer Antikörper siehe z.B. Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

Bispezifische Antikörper umfassen auch vernetzte oder „heterokonjugierte“ Antikörper. Einer der Antikörper im Heterokonjugat kann beispielsweise an Avidin gebunden sein, der andere an Biotin. Solche Antikörper wurden z.B. für das Richten von Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen (US-Patent Nr. 4.676.980) und zur Behandlung der HIV-Infektion (WO 91/00360, WO 92/200373) vorgeschlagen. Heterokonjugierte Antikörper können unter Verwendung jedes beliebigen Vernetzungsverfahrens hergestellt werden. Geeignete Vernetzungsmittel sind im Fachgebiet wohlbekannt und neben einer Reihe von Vernetzungsverfahren in US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart.

Verfahren zum Erzeugen bispezifischer Antikörper aus Antikörperfragmenten wurden in der Literatur ebenfalls bereits beschrieben. Die folgenden Verfahren können auch zur Produktion zweiwertiger Antikörperfragmente verwendet werden, die nicht zwangsläufig bispezifisch sind. Aus *E. coli* gewonnene Fab'-Fragmente können z.B. *in vitro* chemisch gebunden werden, um zweiwertige Antikörper zu bilden. Siehe Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217-225 (1992).

Bispezifische Antikörper können als Vollängen-Antikörper oder Antikörperfragmente (z.B. bispezifische $F(ab')_2$ -Antikörper) hergestellt werden. Verfahren zum Erzeugen bispezifischer Antikörper aus Antikörperfragmenten wurden in der Literatur beschrieben. Beispielsweise können bispezifische Antikörper unter Verwendung chemischer Bindung hergestellt werden. Brennan et al., *Science* 229, 81 (1985), beschreiben ein Verfahren, worin intakte Antikörper proteolytisch gespalten werden, um $F(ab')_2$ -Fragmente zu erzeugen. Diese Fragmente werden in Gegenwart des Dithiolkompleierungsmittels Natriumarsenit reduziert, um benachbarte Dithiole zu stabilisieren und intermolekulare Disulfidbildung zu verhindern. Die entstandenen Fab'-Fragmente werden dann in Thionitrobenzoat- (TNB-) Derivate überführt. Eines der Fab'-TNB-Derivate wird dann in das Fab'-TNB-Derivat rücküberführt, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Die produzierten bispezifischen Antikörper können als Mittel zur selektiven Immobilisierung von Enzymen verwendet werden.

Fab'-Fragmente können unmittelbar aus *E. coli* gewonnen und chemisch gebunden werden, um bispezifische Antikörper zu bilden. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217-225 (1992), beschreiben die Produktion von vollständig humanisierten bispezifischen Antikörper- $F(ab')_2$ -Molekülen. Jedes Fab'-Fragment wurde gesondert aus *E. coli* sekretiert und gerichteter chemischer Bindung *in vitro* ausgesetzt, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Der so gebildete bispezifische Antikörper war in der Lage, an Zellen, die den ErbB2-Rezeptor überexprimieren, und an normale menschliche T-Zellen zu binden sowie die lytische Aktivität von menschlichen zytotoxischen Lymphozyten gegen menschliche Brusttumorziele auszulösen.

Diverse Verfahren zum Herstellen und Isolieren zweiwertiger Antikörperfragmente direkt aus rekombinanter Zellkultur wurden ebenfalls beschrieben. Zweiwertige Heterodimere wurden etwa unter Verwendung von Leucin-Zipern produziert. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5), 1547-1553 (1992). Die Leucin-Zipper-Peptide aus dem Fos- und dem Jun-Protein wurden durch Genfusion an die Fab'-Abschnitte zweier verschiedener Antikörper gebunden. Die Antikörperhomodimere wurden an der Gelenksregion reduziert, um Monomere zu bilden, und anschließend reoxidiert, um die

Antikörperheterodimere zu bilden. Die von Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993), beschriebene „Diabody“-Technologie stellt einen alternativen Mechanismus zum Herstellen von bispezifischen/zweiwertigen Antikörperfragmenten bereit. Die Fragmente umfassen eine variable Schwereketten-domäne (V_H), die mit einer variablen Leichtketten-domäne (V_L) mit einem Linker verbunden ist, der zu kurz ist, um die Paarung zwischen den beiden Domänen auf derselben Kette zuzulassen. Dementsprechend sind die V_H - und die V_L -Domäne eines Fragments gezwungen, mit der komplementären V_L - bzw. V_H -Domäne eines anderen Fragments eine Paarung einzugehen, wodurch zwei Antigenbindungsstellen gebildet werden. Auch von einer weiteren Strategie zum Herstellen bispezifischer/zweiwertiger Antikörperfragmente durch Verwendung einkettiger Fv- (sFv-) Dimere wurde berichtet. Siehe Gruber et al., J. Immunol. 152, 5368 (1994).

Antikörper mit mehr als zwei Wertigkeiten sind in Betracht gezogen. Trispezifische Antikörper beispielsweise können hergestellt werden. Tutt et al., J. Immunol. 147, 60 (1991).

Beispielhafte bispezifische Antikörper können an zwei verschiedene Epitope auf einem bestimmten Molekül binden. Alternativ dazu kann ein Anti-Protein-Arm mit einem Arm kombiniert werden, der an ein auslösendes Molekül auf einem Leukozyt, wie z.B. ein T-Zellen-Rezeptormolekül (z.B. CD2, CD3, CD28 oder B7), oder Fc-Rezeptoren für IgG (Fc γ R), wie z.B. Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16), bindet, um so die zellulären Verteidigungsmechanismen auf die Zelle, die das jeweilige Protein exprimiert, zu fokussieren. Bispezifische Antikörper können auch verwendet werden, um zytotoxische Mittel auf Zellen, die ein bestimmtes Protein exprimieren, zu positionieren. Solche Antikörper besitzen einen Proteinbindungsarm und einen Arm, der ein zytotoxisches Mittel oder einen Radionuclidchelator, wie z.B. EOTUBE, DPTA, DOTA oder TETA, bindet. Ein weiterer bispezifischer Antikörper von Interesse bindet das Protein von Interesse und bindet außerdem den Gewebefaktor (TF).

(v) Heterokonjugierte Antikörper

Heterokonjugierte Antikörper sind aus zwei kovalent verbundenen Antikörpern zusammengesetzt. Solche Antikörper wurden z.B. für das Richten von Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen (US-Patent Nr. 4.676.980) und zur Behandlung der HIV-Infektion (WO 91/00360, WO 92/200373 und EP 03089) vorgeschlagen. Es ist in Betracht gezogen, dass die Antikörper in vitro unter Verwendung in der synthetischer Proteinchemie bekannter Verfahren, einschließlich jener, die mit Vernetzungsmitteln arbeiten, hergestellt werden können. Immuntoxine beispielsweise können unter Verwendung einer Disulfidaustauschreaktion oder durch Bilden einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für zu diesem Zweck geeignete Reagenzien umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptobutyrimidat sowie die z.B. in US-Patent Nr. 4.676.980 offenbaren.

B. Herstellung von gefriergetrockneten Formulierungen

Obwohl die Formulierungen hierin nicht auf rekonstituierte gefriergetrocknete Formulierungen beschränkt sind, werden in einer bestimmten Ausführungsform die Immunglobulinproteine gefriergetrocknet und anschließend rekonstituiert, um die erfindungsgemäßen stabilen Flüssigformulierungen mit reduzierter Viskosität zu produzieren. In dieser bestimmten Ausführungsform wird nach der Herstellung des Immunglobulinproteins von Interesse, wie oben stehend beschrieben, eine „vorgefriergetrocknete Formulierung“ produziert. Die Menge an in der vorgefriergetrockneten Formulierung vorhandenem Immunglobulinprotein wird unter Berücksichtigung der gewünschten Dosisvolumina, der Verabreichungsart(en) etc. bestimmt. Die Einstiegskonzentration eines intakten Antikörpers kann beispielsweise von etwa 2 mg/ml bis etwa 50 mg/ml reichen, vorzugsweise von etwa 5 mg/ml bis etwa 40 mg/ml und besonders bevorzugt von etwa 20 bis 30 mg/ml.

Das zu formulierende Immunglobulinprotein liegt im Allgemeinen in Lösung vor. In den erfindungsgemäßen Formulierungen mit erhöhter Ionenstärke und reduzierter Viskosität beispielsweise kann das Protein in einer pH-gepufferten Lösung mit einem pH-Wert von etwa 4 bis 8 und vorzugsweise von etwa 5 bis 7 vorliegen. Die Puffer-

konzentration kann von etwa 1 mM bis etwa 20 mM, alternativ dazu von etwa 3 mM bis etwa 15 mM, reichen, z.B. je nach Puffer und erwünschter Tonizität der Formulierung (z.B. der rekonstituierten Formulierung). Beispielhafte Puffer und/oder Salze sind jene, die pharmazeutisch annehmbar sind und aus geeigneten Säuren, Basen und Salzen davon hergestellt werden können, wie z.B. jene, die als „pharmazeutisch annehmbare“ Säuren, Basen oder Puffer definiert sind.

In einer Ausführungsform wird ein Lyoprotectant zu der vorgefriergetrockneten Formulierung zugesetzt. Die Menge an Lyoprotectant in der vorgefriergetrockneten Formulierung ist im Allgemeinen derart, dass bei Rekonstitution die resultierende Formulierung isotonisch ist. Jedoch können auch hypertonsche rekonstituierte Formulierungen geeignet sein. Außerdem darf die Menge an Lyoprotectant nicht zu gering sein, damit eine nicht annehmbare Menge an Abbau/Aggregation des Proteins bei der Gefriertrocknung auftritt. Beispielhafte Lyoprotectantkonzentrationen in der vorgefriergetrockneten Formulierung betragen jedenfalls von etwa 10 nM bis etwa 400 nM, alternativ dazu von etwa 30 mM bis etwa 300 nM, alternativ dazu von etwa 50 mM bis etwa 100 mM. Beispielhafte Lyoprotectants umfassen Zucker und Zuckeralkohole, wie z.B. Saccharose, Mannose, Trehalose, Glucose, Sorbit, Mannit. Allerdings können unter bestimmten Umständen gewisse Lyoprotectants auch zu einer Erhöhung der Viskosität der Formulierung beitragen. Daher sollte Vorsicht an den Tag gelegt werden, indem bestimmte Lyoprotectants ausgewählt werden, die diese Wirkung verringern oder aufheben. Weitere Lyoprotectants sind im Rahmen der Definition von „Lyoprotectants“ weiter oben beschrieben.

Das Verhältnis von Protein zu Lyoprotectant kann für jede bestimmte Kombination aus Immunglobulinprotein oder Antikörper und Lyoprotectant unterschiedlich sein. Im Falle eines Antikörpers als ausgewähltes Protein und eines Zuckers (z.B. Saccharose oder Trehalose) als Lyoprotectant zum Erzeugen einer isotonischen rekonstituierten Formulierung mit einer hohen Proteinkonzentration kann das Molverhältnis zwischen Lyoprotectant und Antikörper von etwa 100 bis etwa 1500 mol Lyoprotectant zu 1 mol Antikörper und vorzugsweise von etwa 200 bis etwa 1000 mol Lyopro-

tectant zu 1 mol Antikörper, z.B. von etwa 200 bis etwa 600 mol Lyoprotectant zu 1 mol Antikörper, betragen.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann es wünschenswert sein, ein Tensid zu der vorgefriergetrockneten Formulierung hinzuzugeben. Alternativ oder zusätzlich dazu kann das Tensid zu der gefriergetrockneten Formulierung und/oder der rekonstituierten Formulierung hinzugegeben werden. Beispielhafte Tenside umfassen nichtionische Tenside, wie z.B. Polysorbate (z.B. Polysorbat 20 oder 80); Polyoxamere (z.B. Polyoxamer 188); Triton; Natriumoctylglykosid; Lauryl-, Myristyl-, Linoleyl- oder Stearylsulfobetain; Lauryl-, Myristyl-, Linoleyl- oder Stearylsarcosin; Linoleyl-, Myristyl-, oder Cetylbetain; Lauroamidopropyl, Cocamidopropyl-, Linolamidopropyl-, Myristamidopropyl-, Palmidopropyl- oder Isostearamidopropylbetain (z.B. Lauroamidopropyl); Myristamidopropyl, Palmidopropyl- oder Isostearamidopropyldimethylamin; Natriummethylcocoyl- oder Dinatriummethyloleylaureat; und die MONAQUA™-Serie (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey, USA), Polyethylglykol, Polypropylglykol und Copolymere von Ethylen- und Propylenglykol (z.B. Pluronic, PF68 etc.). Die zugesetzte Tensidmenge ist derart, dass sie die Partikelbildung des rekonstituierten Proteins reduziert und die Bildung von Partikeln nach der Rekonstitution minimiert. Das Tensid kann z.B. in der vorgefriergetrockneten Formulierung in einer Menge von etwa 0,001 bis 0,5 %, alternativ dazu von etwa 0,005 bis 0,05 %, vorliegen.

Bei der Herstellung der vorgefriergetrockneten Formulierung kann ein Gemisch aus dem Lyoprotectant (wie z.B. Saccharose oder Trehalose) und einem Füllmittel (z.B. Mannit oder Glycin) verwendet werden. Das Füllmittel kann die Produktion eines gleichförmigen gefriergetrockneten Kuchens ohne überschüssige Taschen darin etc. gewährleisten. Weitere pharmazeutisch annehmbare Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren, z.B. jene, die in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980), beschrieben sind, können in die vorgefriergetrocknete Formulierung (und/oder die gefriergetrocknete Formulierung und/oder die rekonstituierte Formulierung) aufgenommen werden, mit der Maßgabe, dass sie die gewünschten Eigenschaften der Formulierung nicht negativ beeinträchtigen. Annehmbare Träger,

Exzipienten oder Stabilisatoren sind für die Rezipienten in den angewandten Dosierungen und Konzentrationen nichttoxisch und umfassen: zusätzliche Puffer; Konservierungsmittel; Co-Lösungsmittel; Antioxidanzien, z.B. Ascorbinsäure und Methionin; Chelatbildner, wie z.B. EDTA; Metallkomplexe (z.B. Zn-Proteinkomplexe); biologisch abbaubare Polymere, wie z.B. Polyester; und/oder salzbildende Gegenionen, wie z.B. Natrium.

Die Formulierung hierin kann, falls es für die bestimmte behandelte Indikation notwendig ist, auch mehr als ein Immunglobulinprotein enthalten, besonders solche mit komplementären Aktivitäten, die das andere Protein nicht negativ beeinträchtigen. Es kann z.B. wünschenswert sein, zwei oder mehrere Antikörper bereitzustellen, die an den HER2-Rezeptor oder IgE in einer einzigen Formulierung binden. Solche Proteine sind gegebenenfalls in Kombination in Mengen vorhanden, die für den intendierten Zweck wirksam sind.

Die zur In-vitro-Verabreichung zu verwendenden Formulierungen müssen steril sein. Das ist mittels Filtration durch sterile Filtrationsmembranen vor oder nach der Gefrier-trocknung und der Rekonstitution leicht zu bewerkstelligen. Alternativ dazu kann die Sterilität des gesamten Gemischs z.B. durch etwa 30-minütige Autoklavierung der Bestandteile, mit Ausnahme des Proteins, bei etwa 120 °C erreicht werden.

Nachdem das Immunglobulinprotein, gegebenenfalls das Lyoprotectant und weitere fakultative Komponenten zusammengemischt wurden, wird die Formulierung gefrier-getrocknet. Zahlreiche verschiedene Gefriertrockner stehen für diesen Zweck zur Verfügung, z.B. die Gefriertrockner Hull50™ (Hull, USA) oder GT20™ (Leybold-Heraeus, Deutschland). Gefriertrocknung wird durch Gefrieren der Formulierung und anschließendes Sublimieren von Eis von dem gefrorenen Inhalt bei einer für erstes Trocknen geeigneten Temperatur vollzogen. Unter dieser Bedingung liegt die Produkttemperatur unterhalb des eutektischen Punkts oder der Kollapstemperatur der Formulierung. Typischerweise reicht die Lagerungstemperatur für das erste Trocknen von etwa -30 bis 25 °C (mit der Maßgabe, dass das Produkt während des ersten Trocknens gefroren bleibt) bei einem angemessenen Druck, der typischerweise von

etwa 50 bis 250 mTorr reicht. Die Formulierung, Größe und Art des Behältnisses, das die Probe enthält (z.B. der Glasphiole), sowie das Volumen der Flüssigkeit geben hauptsächlich die für das Trocknen erforderliche Zeit vor, die von wenigen Stunden bis hin zu mehreren Tagen (z.B. 40 bis 60 h) reichen kann. Gegebenenfalls kann je nach gewünschter Restfeuchtigkeit im Produkt auch eine zweite Trocknungsstufe durchgeführt werden. Die Temperatur, zu der die zweite Trocknung durchgeführt wird, reicht von etwa 0 bis 40 °C, in erster Linie abhängig von der Art und Größe des Behältnisses und der Art des eingesetzten Proteins. Die Lagerungstemperatur während der gesamten Wasserentzugsphase der Gefriertrocknung kann von etwa 15 bis 30 °C reichen (z.B. etwa 20 °C). Die Zeit und der Druck, die für die zweite Trocknung benötigt werden, sind, z.B. je nach Temperatur und anderen Parametern, jene, die einen geeigneten gefriergetrockneten Kuchen hervorbringen. Die Zeit der zweiten Trocknung wird von der gewünschten Restfeuchtmengemenge im Produkt vorgegeben und beträgt typischerweise mindestens etwa 5 h (z.B. 10 bis 15 h). Der Druck kann der gleiche sein wie der im ersten Trocknungsschritt angewandte. Die Gefrier-trocknungsbedingungen können je nach Formulierung und Phiolengröße abgewandelt werden.

C. Rekonstitution einer gefriergetrockneten Formulierung

Vor der Verabreichung an den Patienten wird die gefriergetrocknete Formulierung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel derart rekonstituiert, dass die Immunglobulinproteinkonzentration in der rekonstituierten Formulierung mindestens etwa 80 mg/ml, z.B. von 80 mg/ml bis etwa 400 mg/ml, alternativ dazu von etwa 80 mg/ml bis etwa 300 mg/ml, alternativ dazu von etwa 90 mg/ml bis etwa 150 mg/ml, beträgt. Solche hohen Proteinkonzentrationen in der rekonstituierten Formulierung gelten als besonders nützlich, wenn die subkutane Zufuhr der rekonstituierten Formulierung beabsichtigt wird. In bestimmten Ausführungsformen ist die Proteinkonzentration in der rekonstituierten Formulierung signifikant höher als jene in der vorgefriergetrockneten Formulierung. Z.B. kann die Proteinkonzentration in der rekonstituierten Formulierung etwa das 2- bis 40fache, alternativ dazu das 3- bis

10fache, alternativ dazu das 3- bis 6fache (z.B. zumindest das Dreifache oder zumindest das Vierfache), von jener der vorgefriergetrockneten Formulierung betragen.

Die Rekonstitution findet im Allgemeinen bei einer Temperatur von etwa 25 °C statt, um vollständige Hydratisierung zu gewährleisten, obwohl, falls erwünscht, andere Temperaturen angewandt werden können. Die für die Rekonstitution benötigte Zeit hängt z.B. von der Art des Verdünnungsmittels, der Menge an Exzipienten und Protein ab. Beispielhafte Verdünnungsmittel umfassen steriles Wasser, bakteriostatisches Wasser zur Injektion (BWHI), eine pH-gepufferte Lösung (z.B. phosphatgepufferte Salzlösung), sterile Salzlösung, Ringer-Lösung oder Dextroselösung. Das Verdünnungsmittel enthält gegebenenfalls ein Konservierungsmittel. Beispielhafte Konservierungsmittel sind oben stehend beschrieben, wobei aromatische Alkohole wie Benzyl- oder Phenylalkohol die bevorzugten Konservierungsmittel darstellen. Die eingesetzte Menge an Konservierungsmittel wird durch Testen verschiedener Konservierungsmittelkonzentrationen auf Kompatibilität mit dem Protein und Testen der Konservierungsmittelwirksamkeit bestimmt. Ist das Konservierungsmittel z.B. ein aromatischer Alkohol (z.B. Benzylalkohol), kann es in einer Menge von etwa 0,1 bis 2,0 % und vorzugsweise von etwa 0,5 bis 1,5 % vorliegen, besonders bevorzugt jedoch von etwa 1,0 bis 1,2 %.

Vorzugsweise weist die rekonstituierte Formulierung weniger als 6.000 Partikel pro Phiole mit einer Größe von $\geq 10 \mu\text{m}$ auf.

D. Verabreichung der Formulierung

Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung, einschließlich rekonstituierter Formulierungen, ohne auf diese beschränkt zu sein, können einem Säugetier mit Bedarf an einer Behandlung mit dem Immunglobulinprotein, vorzugsweise einem Menschen, in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren verabreicht werden, z.B. als intravenöse Verabreichung als Bolus oder durch kontinuierliche Infusion über einen gewissen Zeitraum, auf intramuskulärem, intraperitonealem, intrazerebrospinalem, subkuta-

nem, intraartikulärem, intrasynovialem, intrathekalem, oralem, topischem oder Inhalierungsweg.

Wie hierin beschrieben, kann die Formulierung dem Säugetier durch subkutane Verabreichung (d.h. unter die Haut) verabreicht werden. Zu solchen Zwecken kann die Formulierung unter Verwendung einer Spritze injiziert werden. Es stehen jedoch auch andere Vorrichtungen zur Verabreichung der Formulierung zur Verfügung, z.B. Injektionsvorrichtungen (z.B. die Vorrichtungen Inject-ease™ und Genject™); Injektorstifte (wie der GenPen™); nadellose Vorrichtungen (z.B. MediJector™ und BioJector™); und subkutane Patch-Zufuhrsysteme.

Die geeignete Dosierung („therapeutisch wirksame Menge“) des Immunglobulinproteins hängt z.B. von dem zu behandelnden Leiden, von der Schwere und dem Verlauf des Leidens, davon, ob das Protein zu Präventions- oder zu Therapiezwecken verabreicht wird, von vorangegangener Therapie, von der Krankengeschichte des Patienten und dem Ansprechen auf das Protein, von der Art des verwendeten Proteins und vom Ermessen des behandelnden Arztes ab. Das Immunglobulinprotein wird dem Patienten günstigenfalls zu einem Zeitpunkt oder eine Reihe von Behandlungen hindurch verabreicht und kann dem Patienten zu jedem Zeitpunkt ab der Diagnose verabreicht werden. Das Immunglobulinprotein kann als einzige Behandlung oder in Verbindung mit anderen Arzneimitteln oder Therapien, die zur Behandlung des fraglichen Leidens zweckdienlich sind, verabreicht werden.

Ist das Immunglobulinprotein der Wahl ein Antikörper, liegt eine mögliche Einstiegsdosierung zur Verabreichung an den Patienten bei etwa 0,1 bis 20 mg/kg, z.B. entweder in Form einer oder in Form mehrerer gesonderter Verabreichungen. Jedoch können auch andere Dosierungsschemata zweckdienlich sein. Der Fortschritt dieser Therapie ist durch herkömmliche Verfahren leicht zu überwachen.

Verwendungsformen einer Anti-IgE-Formulierung (z.B. rhuMAbE-25, rhuMAbE-26) umfassen beispielsweise die Behandlung oder Prophylaxe von IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen, Parasiteninfektionen, interstitieller Cystitis und Asthma. Eine

je nach zu behandelnder Krankheit oder Erkrankung therapeutisch wirksame Menge (z.B. von etwa 1 bis 15 mg/kg) des Anti-IgE-Antikörpers wird dem Patienten verabreicht.

E. Fertigartikel

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist ein Fertigartikel bereitgestellt, der die Formulierung, wie sie in den Ansprüchen definiert ist, enthält und vorzugsweise Anleitungen zu ihrer Verwendung bereitstellt. Der Fertigartikel umfasst ein Behältnis. Geeignete Behältnisse umfassen z.B. Flaschen, Phiolen (z.B. Zweikammernphiolen), Spritzen (z.B. Zweikammerspritzen) und Teströhrchen. Das Behältnis kann aus einer Vielzahl von Materialien, z.B. Glas oder Kunststoff, hergestellt sein. Das Behältnis enthält die in den Ansprüchen definierte Formulierung, und die Markierung auf oder in Verbindung mit dem Behältnis kann Hinweise zur Verwendung angeben. Die Markierung kann weiters den Hinweis enthalten, dass die Formulierung für die subkutane Verabreichung intendiert oder nützlich ist. Das die Formulierung fassende Behältnis kann eine Phiole zur Mehrfachverwendung sein, die wiederholte Verabreichungen (z.B. 2 bis 6 Verabreichungen) der Formulierung zulässt. Der Fertigartikel kann zudem weitere, vom Handels- und Benutzerstandpunkt aus wünschenswerte Materialien umfassen, z.B. weitere Puffer, Verdünnungsmittel, Filter, Nadeln, Spritzen und Packungsbeilagen mit Anleitungen zur Verwendung.

Die Erfindung ist unter Bezugnahme auf die nachstehenden Beispiele noch besser verständlich. Diese sollen allerdings nicht dahingehend ausgelegt werden, dass sie den Umfang der Erfindung einschränken. Beispiele, die nicht innerhalb des Schutzbereichs der Ansprüche liegen, dienen als Referenz.

BEISPIEL 1

Die Auswirkungen von Proteinkonzentrationen auf die Viskosität einer Formulierung eines rekombinanten monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers (rhuMAb E25) wurde bei 25 °C untersucht. Dieser Antikörper ist ein humanisierter monoklonaler Anti-IgE-

Antikörper, der von Genentech, Inc., als mögliches therapeutisches Mittel zum Behandeln von allergischer Rhinitis und allergischem Asthma entwickelt wurde (Presta et al., J. Immunol. 151(5), 2623-2632 (1993) (PCT/US 92/06860)). Der formulierte rhuMAb E25 wurde auf eine Endkonzentration von 40 mg/ml, 85 mM Saccharose, 5 mM Histidin, 0,01 % Polysorbat 20 formuliert und in 5-cm³-Phiolen gefüllt. Anschließend wurden die Proben innerhalb von 45 min von 5 °C auf -50 °C gefroren, woraufhin eine schrittweise Steigerung der Gefriertrockner-Lagerungstemperatur um 10 °C/h von -50 °C auf 25 °C erfolgte. Ein Trocknungsschritt wurde bei einer Lagerungstemperatur von 25 °C und einem Kammerdruck von 50 mTorr 39 h lang vollzogen. Der gefriergetrocknete rhuMAb E25 wurde mit SWFI rekonstituiert, um eine Lösung mit 125 mg/ml rhuMAb E25, 266 mM Saccharose, 16 mM Histidin, 0,03 % Polysorbat 20, zu erzeugen.

Die Viskosität der rekonstituierten Proben wurde in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-Viskosimeter (Industrial Research Glassware LTD) gemessen. Die Proben wurden bei ungefähr 8 ml mit einer Glaspipette gemessen und in ein Kapillar-Viskosimeter der Größe 50 für flüssige Proben mit kinematischer Viskosität von 0,8 bis 4 cs oder der Größe 200 für solche von 20 bis 100 cs gegeben. Die Probentemperatur von 25 °C wurde in einem Wasserbad mit einem digitalen Temperatursteuerungssystem aufrechterhalten. Das Viskosimeter wurde senkrecht in den Halter gelegt und in das Wasserbad eingesetzt, das auf einer festgelegten Temperatur gehalten wurde. Die Ausflusszeit wurde durch freies Fließenlassen der flüssigen Probe über markierte Stellen gemessen. Die kinematische Viskosität der flüssigen Probe in Centistokes wurde durch Multiplizieren der Ausflusszeit in Sekunden mit den Viskosimeterkonstanten (0,004 bei Größe 50 und 0,015 bei Größe 100) berechnet. Die Viskosität der E25-Lösung hängt stark von der Konzentration von Proteinmolekülen ab (Figur 1). Sie steigt exponentiell mit dem Anstieg der rhuMAb-E25-Konzentration. Bei 25 °C ist der rekonstituierte rhuMAb E25 zu 125 mg/ml etwa 80-mal viskoser als Wasser.

BEISPIEL 2

Der gefriergetrocknete rhuMAb E25 aus Beispiel 1 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl-Lösung rekonstituiert. Die Viskosität der rekonstituierten Lösung wurde bei 25 °C in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-Viskosimeter unter Verwendung desselben Verfahrens wie in Beispiel 1 beschrieben gemessen.

Die in Figur 2 gezeigten Ergebnisse lassen erkennen, dass der Zusatz von NaCl die Viskosität der Proteinformulierung signifikant reduzieren kann. Der rekonstituierte rhuMAb E25 mit 100 mM NaCl ergibt die Lösung, die etwa 4-mal weniger viskos ist als die mit SWFI rekonstituierte.

Die Herstellung einer gefriergetrockneten rhuMAb-E25-Formulierung mit 100 mM NaCl ergab eine leicht hypertonische Lösung. Wie zuvor berichtet, ist strikte Isotonie aber nicht absolut notwendig, insofern, dass Gewebeschaden nur bei extrem hohen Tonizitätswerten (1.300 mOsmol/kg) detektiert wurde.

Folglich erscheint die Verabreichung einer Formulierung mit höherer Salzkonzentration (100 mM bis 200 mM NaCl, was eine Osmolarität von ~600 bis ~700 mOsmol/kg für die aktuellen gefriergetrockneten rhuMAb-E25-Materialien ergibt), wie sie hierin in Betracht gezogen ist, zur Reduktion der Viskosität der Formulierung keine Gefahr des Gewebeschadens an der Verabreichungsstelle darzustellen.

BEISPIEL 3

Die Auswirkungen verschiedener Salze auf die Viskosität von rhuMAb-E25-Lösung wurden bei 25 °C untersucht. Der gefriergetrocknete rhuMAb-E25 wurde zunächst mit SWFI rekonstituiert, um eine Lösung mit 125 mg/ml rhuMAb E25, 266 mM Saccharose, 16 mM Histidin, 0,03 % Polysorbat 20 zu produzieren. Die Proben wurden anschließend mit 10 mM Histidin, 250 mM Saccharose, pH 6,0, auf eine Endkonzentration von 40 mg/ml verdünnt. Diverse konzentrierte Salze wurden dann zu der Lösung zugesetzt, um die Salz-Endkonzentration zu ergeben, die von 0 bis 200 mM reichte. Die Viskosität der Lösung wurde in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-

Viskosimeter unter Verwendung desselben Verfahrens wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt. Obwohl jedes Salz eine leicht unterschiedliche Auswirkung auf die Veränderung der Viskosität aufweist, scheinen sie alle einer ähnlichen Tendenz zu folgen, wonach die Viskosität der Lösung mit Zunahme der Pufferkonzentration und der Ionenstärke abnimmt.

BEISPIEL 4

Ebenfalls untersucht wurden die Auswirkungen verschiedener Puffer auf die Viskosität von rhuMAb-E25-Lösung bei 25 °C. Zu einer Flüssigformulierung, die 80 mg/ml rhuMAb E25, 50 mM Histidin, 150 mM Trehalose und 0,05 % Polysorbat 20 enthielt, wurden verschiedene Mengen Histidin-, Acetat- oder Succinatpufferkomponenten zugesetzt. Der pH-Wert der Probe wurde bei allen Präparaten bei ~6,0 gehalten. Die Viskosität der Lösung wurde in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-Viskosimeter unter Verwendung desselben Verfahrens wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

Wie in Figur 4 zu sehen ist, nimmt die Viskosität der entweder Histidin- oder Acetatpuffer enthaltenden Lösung mit zunehmender Pufferkonzentration bis 200 mM ab. Bei Succinatpuffer hingegen nimmt die Viskosität der Lösung nur bei einer geringen Pufferkonzentration (< 100 mM), nicht jedoch bei hoher Pufferkonzentration (> 200 mM) ab. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei anderen Puffern beobachtet, die negativ geladene mehrwertige Pufferkomponenten, wie z.B. Phosphat, Citrat und Carbonat, enthalten.

BEISPIEL 5

Dieses Beispiel arbeitete mit einer zweiten Generation von monoklonalem Anti-IgE-Antikörper, rhuMAb E26. Dieser monoklonale Antikörper ist homolog zu rhuMAb E 25 mit fünf Aminosäurerest-Unterschieden in der CDR-I-Region in der Leichtkette und ist in WO 99/01556 beschrieben. Der rekombinante rhuMAb E26 wurde auch in der

CHO-Zelllinie exprimiert und mit ähnlichen Chromatografieverfahren wie oben stehend für rhuMAb E25 beschrieben gereinigt. Die Proben wurden in 5 mM Histidin und 275 mM Saccharose mit einer rhuMAb-E25-Konzentration von 21 mg/ml formuliert. Die Viskosität der Proben wurde bei 6 °C in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-Viskosimeter unter Verwendung desselben Verfahrens wie in Beispiel 1 beschrieben gemessen.

Die Auswirkungen von NaCl auf die Viskosität von rhuMAb E26 sind in Figur 5 dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass der Anstieg der NaCl-Konzentration die Viskosität von rhuMAb-E26-Lösung wirkungsvoll reduzieren kann.

BEISPIEL 6

Die Auswirkungen des pH-Werts auf die Viskosität eines hochkonzentrierten monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers, rhuMAb E25, in Flüssigformulierungen wurden sowohl unter hypotonischen als auch isotonischen Bedingungen untersucht. Die hypotonischen Lösungen wurden durch Hinzugeben von geringen Mengen von 10 % Essigsäure oder 0,5 M Arginin in eine ungepufferte rhuMAb-E25-Lösung, die auf ~130 mg/ml in Milli-Q-Wasser konzentriert worden war, hergestellt. Die Endkonzentrationen von Puffer und Salz wurde insgesamt bei 17,5 mM gehalten. Die hypotonischen Lösungen wurden danach mit einem geringen Volumen von 5 M NaCl gemischt, um die isotonischen Lösungen mit einer NaCl-Endkonzentration um die 150 mM NaCl zu produzieren. Die Viskosität der Lösung wurde bei 25 °C in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-Viskosimeter unter Verwendung desselben Verfahrens wie in Beispiel 1 beschrieben gemessen. Wie in Figur 6 dargestellt, hängt die Viskosität der rhuMAb-E25-Lösung stark vom pH-Wert des Puffers ab, besonders in äußerst hypotonischen Lösungen. Der Zusatz von ionischen Spezies, wie z.B. NaCl, kann solche pH-Auswirkungen signifikant reduzieren.

BEISPIEL 7

Auch die Auswirkungen des pH-Werts auf die Viskosität eines rekonstituierten monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers, rhuMAb E25, wurden in Gegenwart anderer Exzipienten, wie z.B. Trehalose, untersucht. Der gefriergetrocknete rhuMAb E25 wurde mit SWFI rekonstituiert und anschließend gegen 20 mM Histidin, 250 mM Trehalose bei pH 5 dialysiert. Die Proteinkonzentration beträgt ungefähr 94 mg/ml. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M NaOH eingestellt. Die Viskosität der Lösung wurde bei 25 °C in einem Cannon-Fenske-Routine-Kapillar-Viskosimeter unter Verwendung desselben Verfahrens wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt. Die in Figur 7 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Viskosität des Antikörpers durch den pH-Wert der Lösung signifikant verändert werden kann.

Patentansprüche

1. Stabile flüssige Formulierung, die ein Immunglobulin in einer Menge von zumindest 80 mg/ml und ein Salz und/oder einen Puffer in einer Menge von zumindest 100 nM umfasst und eine kinematische Viskosität bei 25 °C von 50 mm²/s oder weniger aufweist, wobei das Immunglobulin der Antikörper rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 oder rhuMAb-E27 ist und wobei das Salz nicht Natriumchlorid ist.
2. Formulierung nach Anspruch 1, die umfasst:
 - (a) das Salz und/oder den Puffer in einer Menge von 100-200 nM; oder
 - (b) das Salz und/oder den Puffer in einer Menge von 200 nM.
3. Formulierung nach Anspruch 1, worin das Salz und/oder der Puffer herrühren von:
 - (a) einer organischen oder anorganischen Säure und einem basenbildenden Metall oder Amin; oder
 - (b) einer Aminosäure.
4. Formulierung nach Anspruch 3, worin:
 - (a) das basenbildende Metall aus der aus Alkalimetallen, Erdalkalimetallen, Al, Zn und Fe bestehenden Gruppe ausgewählt ist; oder
 - (b) das basenbildende Amin NR₄⁺ ist, worin R unabhängig H oder C₁₋₄-Alkyl ist.
5. Formulierung nach Anspruch 1, worin das Salz und/oder der Puffer von einer Aminosäure herrühren.
6. Formulierung nach Anspruch 1, worin das Salz aus der aus Natriumthiocyanat, Ammoniumthiocyanat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Calciumchlorid, Argininhydrochlorid, Zinkchlorid und Natriumacetat bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
7. Formulierung nach Anspruch 1, die:

- (a) eine kinematische Viskosität bei 25 °C von 40 mm²/s oder weniger aufweist; oder
- (b) eine kinematische Viskosität bei 25 °C von 30 mm²/s oder weniger aufweist; oder
- (c) eine kinematische Viskosität bei 25 °C von 20 mm²/s oder weniger aufweist; oder
- (d) eine kinematische Viskosität bei 25 °C von 10 bis 30 mm²/s aufweist.

- 8. Formulierung nach Anspruch 1, die weiters ein Lyoprotectant umfasst.
- 9. Formulierung nach Anspruch 8, wobei das Lyoprotectant ein Zucker ist.
- 10. Formulierung nach Anspruch 9, wobei der Zucker Saccharose oder Trehalose ist.
- 11. Formulierung nach Anspruch 9, die den Zucker in einer Menge von 60-300 nM umfasst.
- 12. Formulierung nach Anspruch 1, die weiters ein Tensid umfasst.
- 13. Formulierung nach Anspruch 1, die hypertonisch ist.
- 14. Formulierung nach Anspruch 1, die eine rekonstituierte Formulierung ist.
- 15. Formulierung nach Anspruch 14, wobei die Immunglobulinprotein-Konzentration in der rekonstituierten Formulierung 2- bis 40-mal höher ist als die Immunglobulinprotein-Konzentration im Gemisch vor der Lyophilisierung.
- 16. Formulierung nach Anspruch 1, die eine flüssige pharmazeutische Formulierung ist.
- 17. Formulierung nach Anspruch 16, die zur subkutanen Verabreichung dient.

18. Verfahren zur Verringerung der kinematischen Viskosität einer Formulierung, die ein Immunglobulin in einer Menge von zumindest 80 mg/ml umfasst, umfassend das Zusetzen eines Salzes und/oder eines Puffers in einer Menge von zumindest 100 nM, wobei das Immunglobulin der Antikörper rhuMAb-E25, rhuMAb-E26 oder rhuMAb-E27 ist und wobei das Salz nicht Natriumchlorid ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Salz aus der aus Natriumthiocyanat, Ammoniumthiocyanat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Calciumchlorid und Argininhydrochlorid bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Formulierung eine rekonstituierte Formulierung ist.

21. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Formulierung hypertonisch ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Proteinkonzentration in der rekonstituierten Formulierung 2- bis 40-mal höher ist als die Proteinkonzentration im Gemisch vor der Lyophilisierung.

23. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die bei 25 °C bestimmte kinematische Viskosität der Formulierung auf 50 mm²/s oder weniger verringert wird.

24. Fertigartikel, der einen Behälter umfasst, der eine Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 17 enthält.

25. Fertigartikel nach Anspruch 24, der weiters Anleitungen für die Verabreichung der Formulierung umfasst.

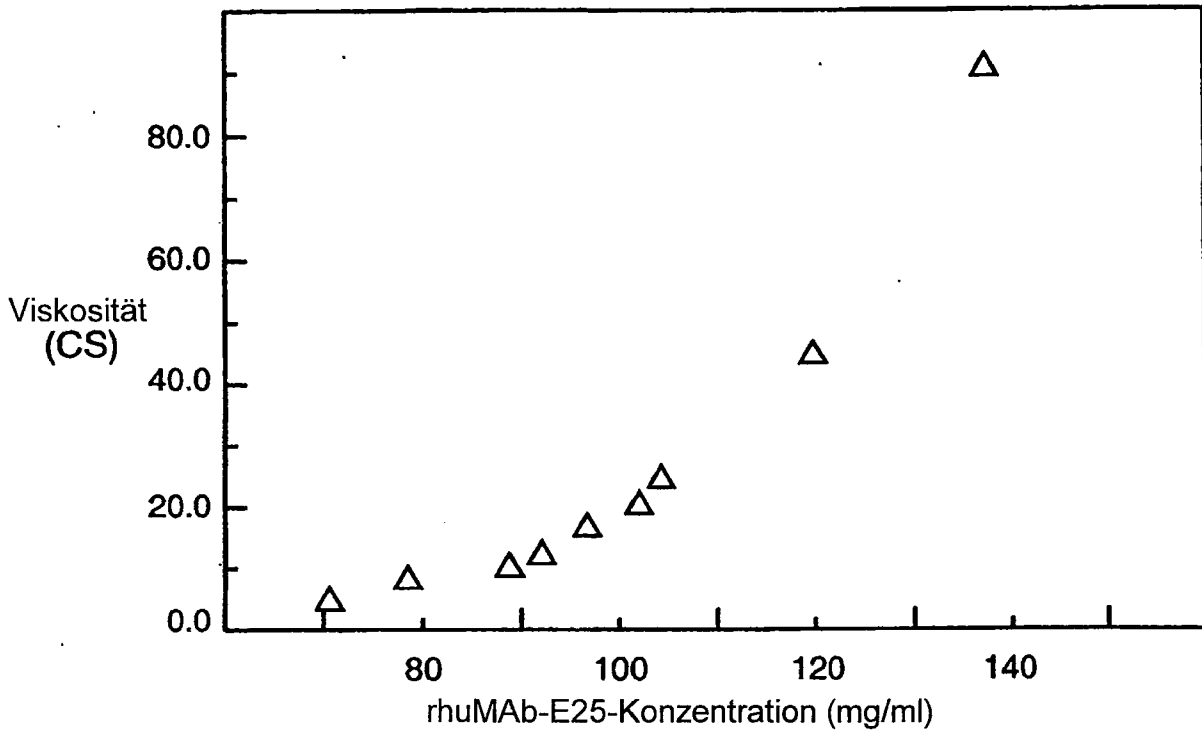


FIG._1

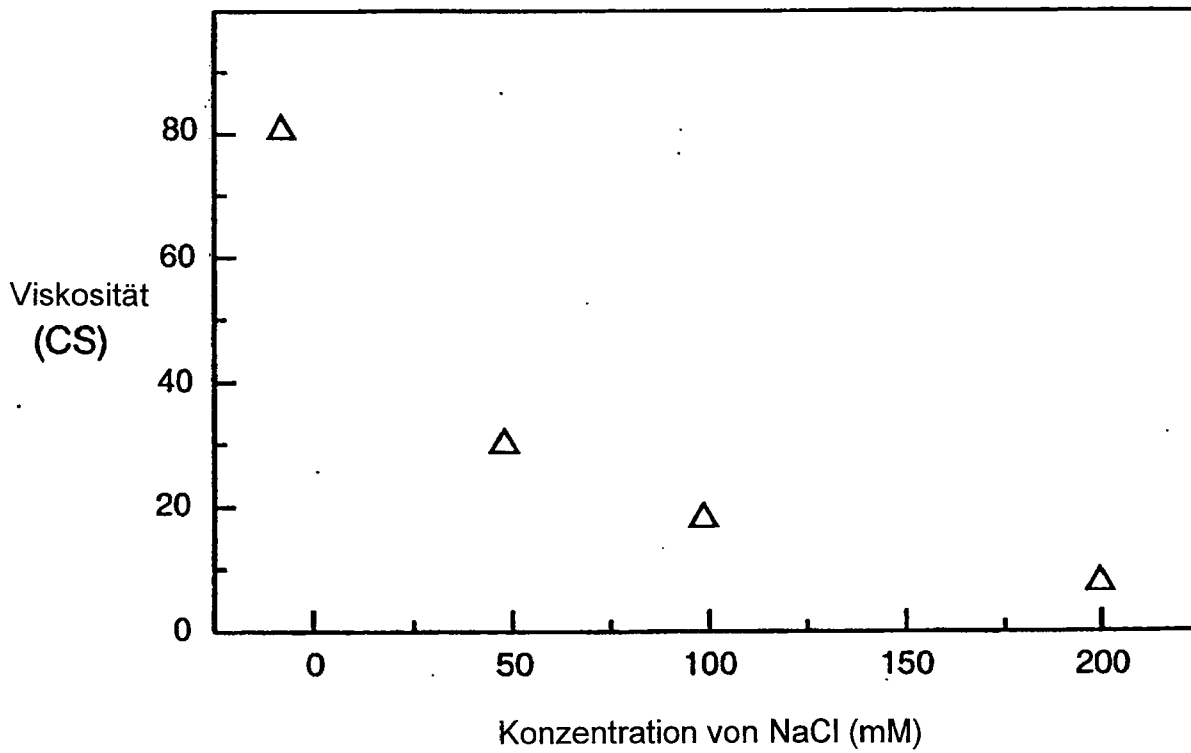


FIG._2

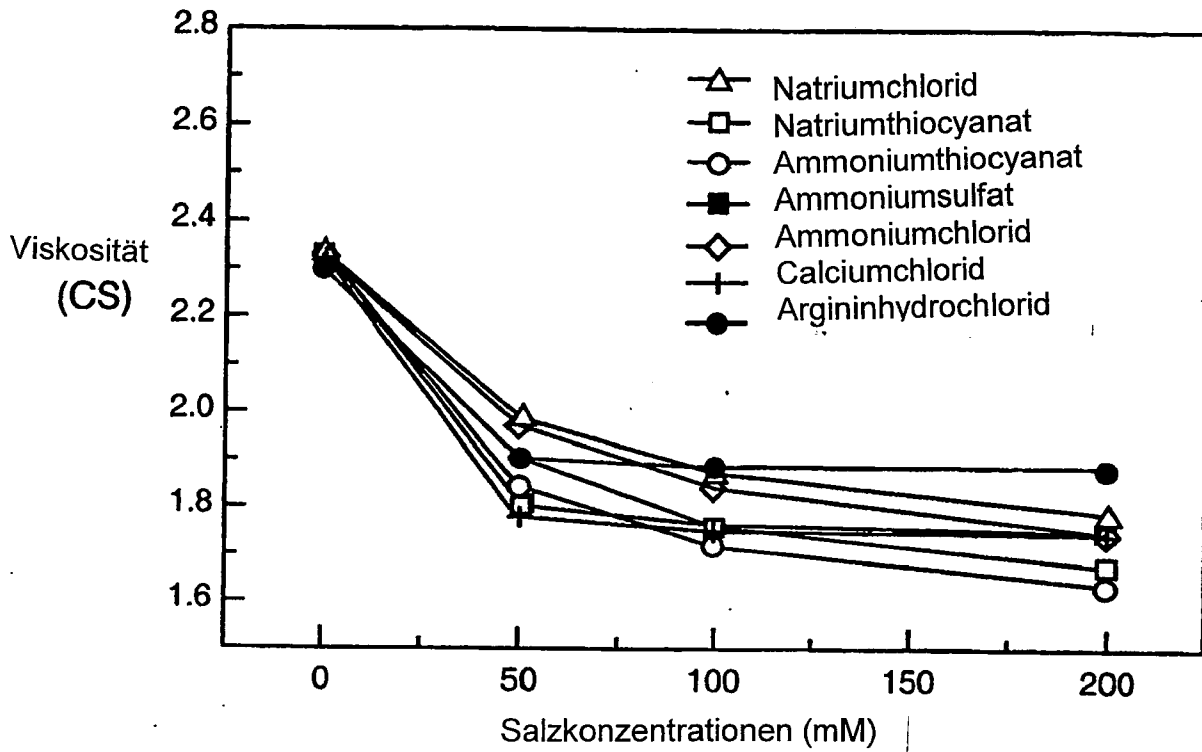


FIG. 3

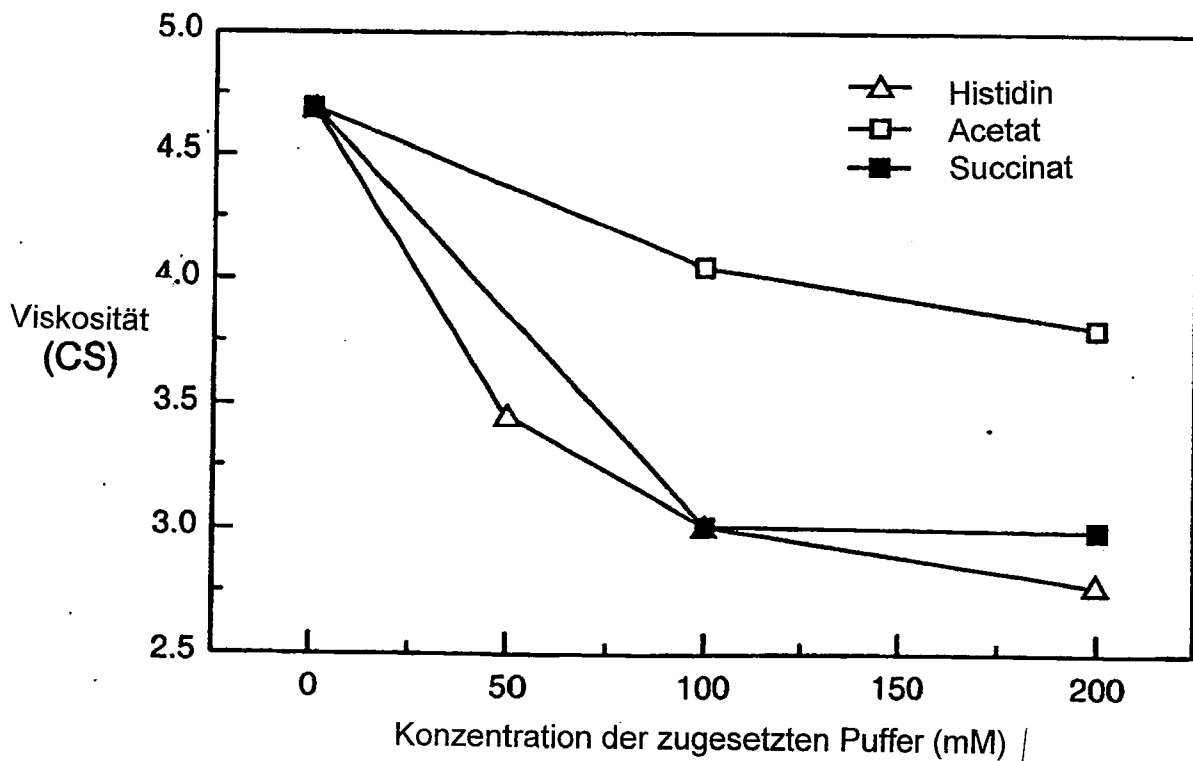
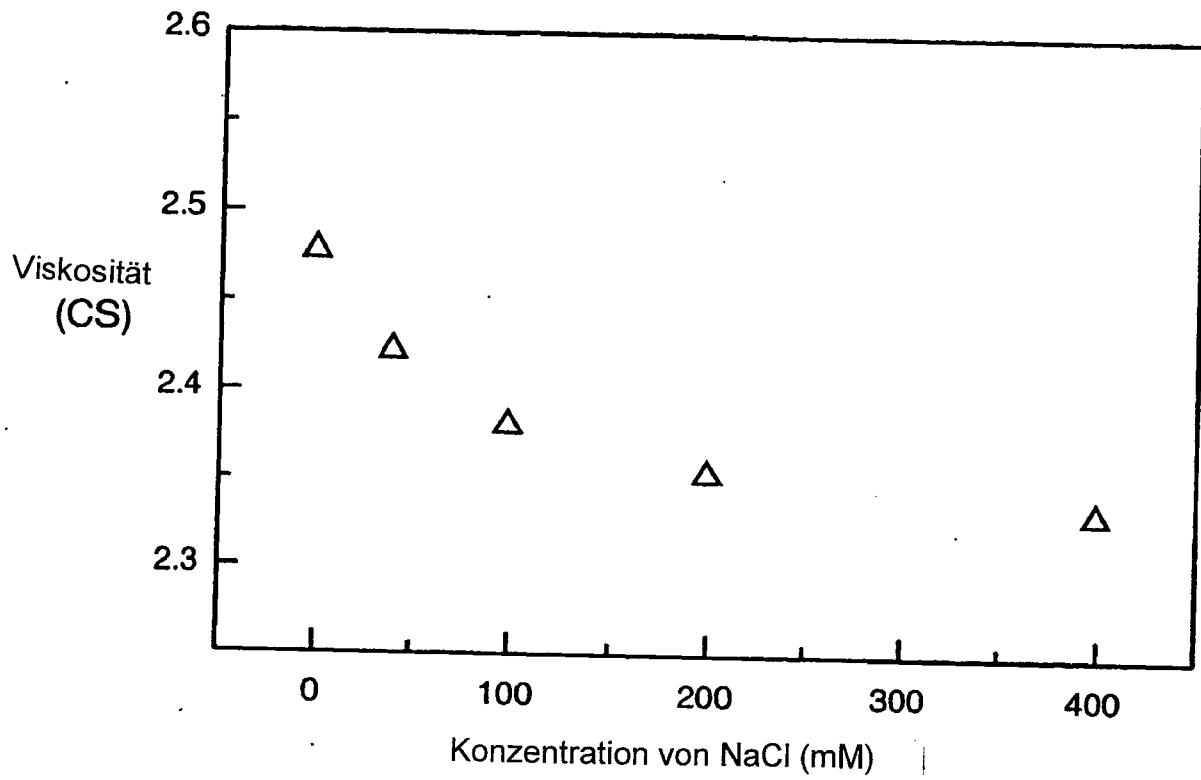
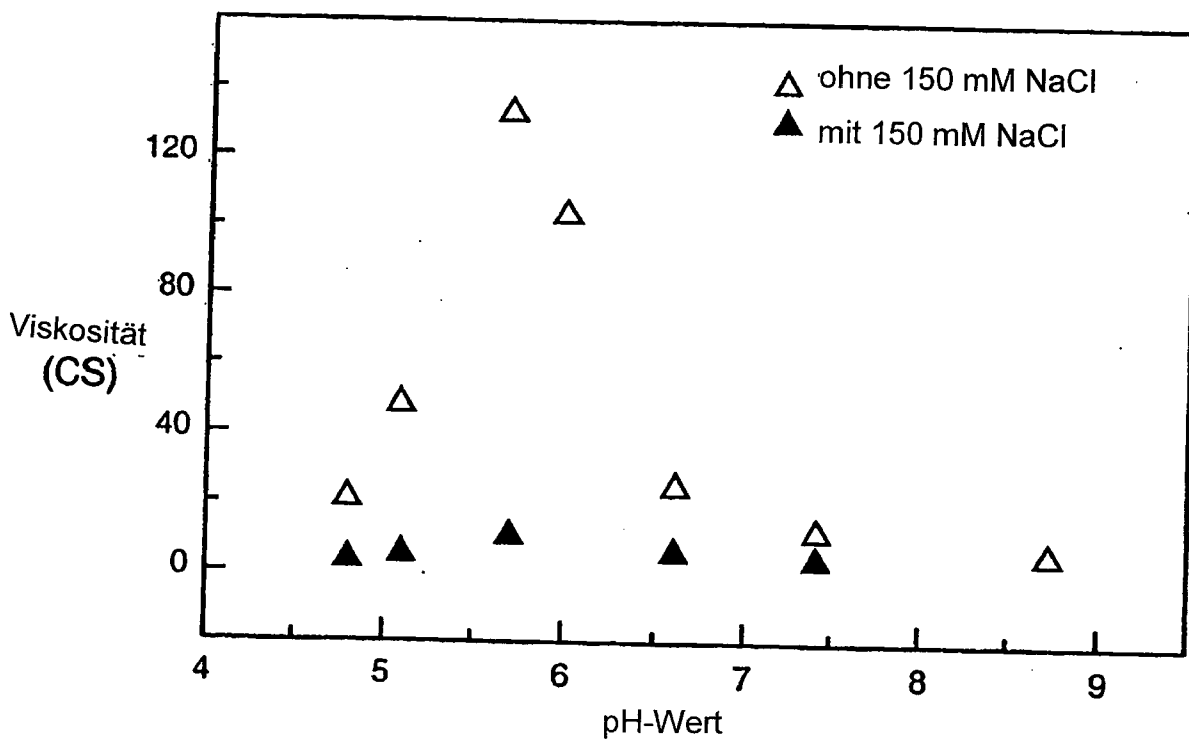


FIG. 4

**FIG._5****FIG._6**

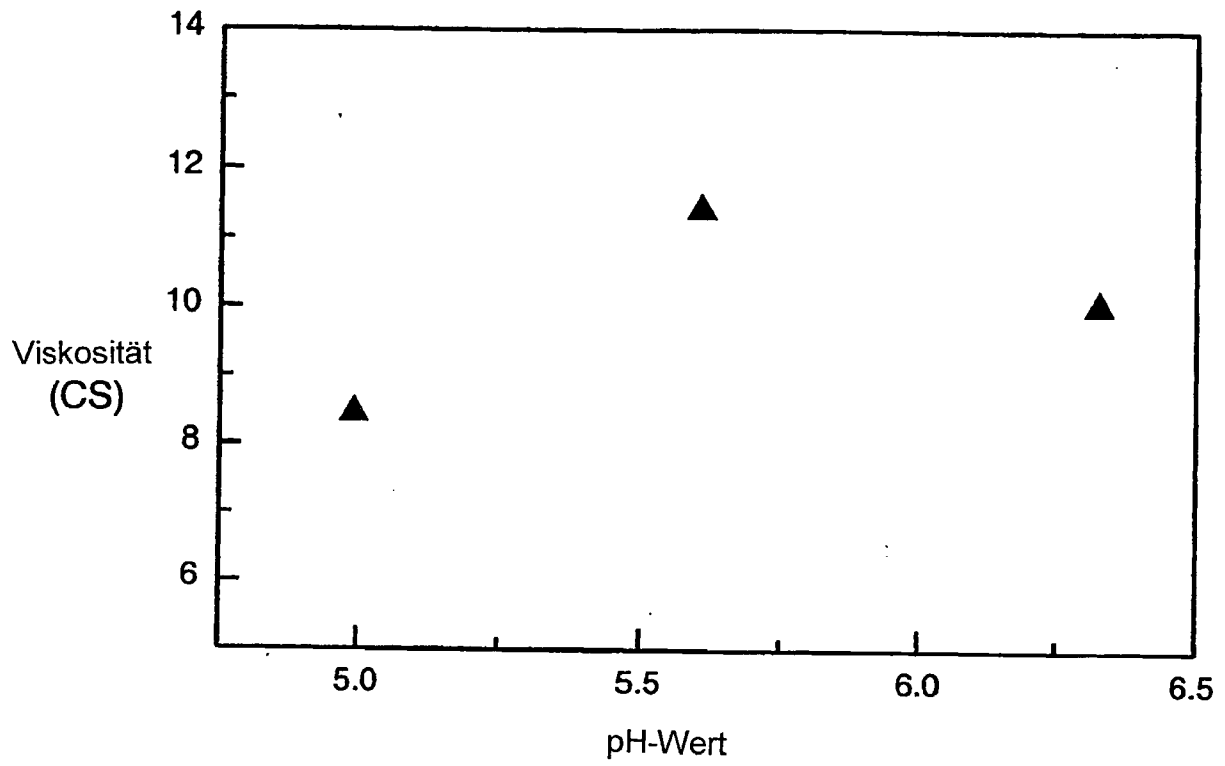


FIG. 7