



HU000231064B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **231 064**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 02523**(22) A bejelentés napja: **2000. 08. 25.**(51) Int. Cl.: **A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/32** (2006.01)(40) A közzététel napja: **2002. 12. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2020. 04. 28.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 00/23391

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0115730

(30) Elsőbbségi adatok:

60/151,018	1999. 08. 27.	US
60/213,822	2000. 06. 23.	US

(73) Jogosult(ak):

**Genentech, Inc., South San Francisco,
Kalifornia (US)**

(72) Feltaláló(k):

Baughman, Sharon Ann, Redwood City, Kalifornia (US)
Shak, Steven, Burlingame, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

Szakács és Tálas Ügyvédi Iroda, Budapest
DANUBIA Szabadalmi és Jogi Iroda Kft,
Budapest(54) **Anti-ErbB2 antitestek adagolási sémái és alkalmazásuk rákos betegségek kezelésére**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest felhasználása képezi olyan gyógyszer előállítására, amely az ErbB2 receptor túlzott termelődésével jellemezhető emlőrákkal diagnosztizált humán páciens kezelésére szolgál.

A találmány értelmében a kezelés során a páciensnek az anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest 8 mg/kg testtömeg kezdeti dózisát adják be intravénásan, majd több későbbi 6 mg/kg testtömeg dózist adagolnak az antitestből intravénásan a páciensnek, és a későbbi dózisok beadása között 3 hét időkülönbséget tartanak. A találmány szerint a páciensnek egy kemoterápiás szer hatékony mennyisége is beadható.

Anti-ErbB2 antitestek adagolási sémái és alkalmazásuk rákos betegségek kezelésére

A találmány tárgyát ErbB2-receptor túlzott mértékű termelődésével jellemezhető rendellenességek vagy epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) termelődésével jellemezhető rendellenesség kezelési eljárásai képezik, melyek során a rendellenességtől szenvedő embernek vagy állatnak ErbB2-receptort megkötő antitest gyógyászati szempontból hatásos mennyiségét adagoljuk. Közelebbről, a találmány tárgyát ErbB2 túlzott mértékű termelődésével vagy EGFR termelésével jellemezhető rák kialakulására fogékony vagy ilyen rákkal diagnosztizált emberek kezelési eljárása képezi, melynek során egy anti-ErbB2 antitestet intravénás és/vagy szubkután módon, kezdőlökés dózis ("front loading") alkalmazásával adagolunk. Szintén a találmány tárgyát képezi egy eljárás rák - anti-ErbB2 antitest és kemoterápiás hatóanyag (például, taxoid) kombinálásával - emberben történő kezelésére. Taxoidként, többek között, paclitaxel vagy docetaxel alkalmazható. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás rák - anti-ErbB2 antitest és kemoterápiás hatóanyag (például, többek között, anthraciklin-származék) kombinálásával - emberben történő kezelésére. Az anti-ErbB2 antitest és anthraciklin-származék kombinálásával végzett

kezelés során, adott esetben, kardioprotektáns hatásos mennyisége is alkalmazható. A találmány tárgyát képezi továbbá az anti-ErbB2 antitestek ritka adagolási sémája.

A növekedési faktorokat és növekedési faktor receptorokat kódoló proto-onkogénekről megállapították, hogy fontos szerepet játszanak különféle humán malignáns betegségek (pl. az emlőrák) patogenezisében. Az találták, hogy a humán ErbB2-gén (*erbB2*, más néven *her2* vagy *c-erbB-2*), amely egy 185 kD-os - az epidermális növekedési faktor receptorral (EGFR) rokonságban álló - transzmembrán glikoprotein-receptort ($p185^{HER2}$) kódol, a humán emlőrákos esetek kb. 25-30 %-ában túlzott mértékben expresszálódik [Slamon és mtsai.: Science 235, 177 (1987); Slamon és mtsai.: Science 244, 707 (1989)].

Többféle bizonyíték is alátámasztja az ErbB2-nek az ErbB2-t túlzott mértékben expresszáló tumorerogok patogenezisében és klinikai agresszivitásában játszott közvetlen szerepét. Kimutatták, hogy az ErbB2 nem neopláziás sejtekbe történő bejuttatása a sejtek malignáns átalakulását eredményezi [Hudziak és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7159 (1987); DiFiore és mtsai.: Science 237, 78 (1987)]. HER2-t termelő transzgenikus egerekről megállapították, hogy emlőtumorerogok fejlődnek ki bennük [Guy és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10578 (1992)].

Korábban humán *erbB2*-proteintermék és - az *erbB2*-gén patkányeredetű megfelelője (*neu*) által kódolt - proteinek elleni antitesteket is feltártak. Drebin és mtsai. [Cell 41, 695 (1985)] patkányeredetű *neu*-géntermék elleni IgG2a

monoklonális antitestet írtak le. Ez az antitest (7.16.4) a B104-1-1 sejteken (neu proto-onkogénnel transzfektált NIH-3T3 sejtek) a p185 sejtefelületi termelődésének gátlását eredményezi. Drebin és mtsai.: [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9129 (1986)] kimutatták, hogy a 7.16.4 antitest gátolja a csupasz ("nude") egerekbe ültetett - neu-onkogénnel transzformált - NIH-3T3-sejtek és a patkányeredetű neuroblastoma-sejtek (amelyekből a neu-onkogént eredetileg izolálták) tumorogén szaporodását. Drebin és mtsai. [Oncogene 2, 387 (1988)] patkányeredetű neu-géntermék elleni antitestek előállítását írták le. Valamennyi antitestről kimutatták, hogy neu-onkogénnel transzformált, lágy agarban szuszpendált sejtekre citosztatikus hatást gyakoroltak. Az IgM, IgG2a és IgG2b izotípusú antitestek - komplement jelenlétében - a neu-onkogénnel transzformált sejtek jelentős mértékű *in vitro* lízisét közvetítették, miközben ugyanezen sejtek esetében az antitestek egyike sem közvetített nagymértékű antitest-dependens celluláris citotoxicitást (ADCC). Drebin és mtsai. [Oncogene 2, 387 (1988)] beszámoltak arról is, hogy a p185-molekula két külön régiójával reaktív antitestek elegyei a csupasz egerekbe implantált - neu-onkogénnel transzformált - NIH-3T3-sejtekre szinergikus tumorelles hatást fejtettek ki. Az anti-neu antitestek biológiai hatásainak áttekintését illetően ld. Myers és mtsai.: Meth. Enzym. 198, 277 (1991); valamint a WO 94/22478 számú nemzetközi közzétételi iratot.

Hudziak és mtsai. [Mol. Cell. Biol. 9(3), 1165 (1989)] anti-ErbB2 antitestek sorozatának létrehozását írták le,

mely antitesteket az SK-BR-3 humán emlőtumor-sejtvonal alkalmazásával karakterizálták. Az SK-BR-3 sejtek - antitestekkel történő érintkeztetés utáni - relatív proliferációját az egyrétegű sejttenyészetek 72 óra elteltével végzett kristályibolya festésével határozták meg. E vizsgálati eljárásban a maximális gátlást a 4D5-antitesttel kapták, amely a sejtek proliferációját 56 %-ban gátolta. A szóban forgó antitest-sorozat egyéb tagjai (pl. 7C2 és 7F3) e vizsgálati eljárásban kisebb mértékben gátolták a sejtproliferációt. Megállapították továbbá, hogy a 4D5-antitest a p185^{erbB2}-t túlzott mértékben termelő emlőtumor-sejtvonalakat szenzitizálja a TNF citotoxikus hatásaira. [ld. még a WO 89/06692 számú nemzetközi közzétételi iratot]. A Hudziak és mtsai. által leírt anti-ErbB2 antitestek további karakterizálását illetően ld. Fendly és mtsai.: Cancer Research 50, 1550 (1990); Kotts és mtsai.: In Vitro 26(3), 59A (1990); Sarup és mtsai.: Growth Regulation 1, 72 (1991); Shepard és mtsai.: J. Clin. Immunol. 11(3), 117 (1991); Kumar és mtsai.: Mol. Cell. Biol. 11(2), 979 (1991); Lewis és mtsai.: Cancer Immunol. Immunother. 37, 255 (1993); Pietras és mtsai.: Oncogene 9, 1829 (1994); Vitetta és mtsai.: Cancer Research 54, 5301 (1994); Sliwkowski és mtsai.: J. Biol. Chem. 269(20), 14661 (1994); Scott és mtsai.: J. Biol. Chem. 266, 14300 (1991); D'Souza és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 7202 (1994).

Tagliabue és mtsai. [J. Cancer 47, 933 (1991)] két - ErbB2-t túlzott mértékben termelő tüdő adenocarcinoma sejtvonalra (Calu-3) kifejtett reaktivitásuk alapján kiszelek-

tált - antitestet írtak le. Az egyik antitest (MGR3) internalizáló hatású, az ErbB2 foszforilációját indukálja, és gátolja a tumorsejtek *in vitro* szaporodását.

McKenzie és mtsai.: [Oncogene 4, 543 (1989)] különféle epítóp-specifitású anti-ErbB2 antitestek sorozatát hozták létre, köztük a TAl-antitestet, amely az ErbB2 gyorsabb endocitózist indukálja [ld. Maier és mtsai.: Cancer Res. 51, 5361 (1991)]. Bacus és mtsai. [Molecular Carcinogenesis 3, 350 (1990)] leírták, hogy a TAl-antitest indukálta az AU-565 és MCF-7 emlőrák-sejtvonalak érését (előbbi az erbB2-gént túlzott mértékben expresszálja, utóbbi pedig nem). Bebizonyosodott, hogy e sejtek szaporodásának és érett fenotípusuk megszerzésének gátlása az ErbB2-receptor sejtfelületen tapasztalható csökkent mennyiségével és a citoplazmában megfigyelhető, átmeneti fokozott mennyiségével függ össze.

Stancovski és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8691 (1991)] anti-ErbB2 antitestek sorozatát hozták létre, az antitesteket intraperitoneálisan csupasz egerekbe injektálták, majd meghatározták - erbB2-gén túlzott mértékben történő expresszáltatása céljából transzformált - egérreredű fibroblasztok tumoros szaporodására gyakorolt hatásukat. Az N28-as monoklonális antitest az ErbB2-receptor jelentős mértékű foszforilációját indukálta, míg a többi négy antitest foszforiláció-indukáló aktivitása kisebb vagy nulla volt. Az anti-ErbB2 antitestek SKBR3-sejtek proliferációjára gyakorolt hatását is értékelték. Az SKBR3-sejtproliferációs tesztben két antitest (N12 és N29) a

sejtproliferáció - kontrollhoz viszonyított - csökkenését eredményezte. Stancovskival és munkatársaival együtt értékeltük a különböző antitestek *in vitro* sejtlízist - komplement-dependens citotoxicitás (CDC) és antitest-közvetítette sejtdependens citotoxicitás (ADCC) útján - indukáló képességét is, és arra a következtetésre jutottunk, hogy az antitestek inhibitor-funkciója különösebb mértékben nem tulajdonítható sem a CDC-nek, sem az ADCC-nek.

Bacus és mtsai. [Cancer Research 52, 2580 (1992)] az előző bekezdésben említett, Bacus és mtsai. (1990) és Stancovski és mtsai. (1991) által leírt antitestek további karakterizálását is elvégezték. Stancovski és mtsai. intraperitoneális vizsgálatait kiterjesztve, az antitestek - humán ErbB2-t túlzott mértékben termelő egérez eredetű fibroblasztokat hordozó - csupasz egereknek történő intravénás beadás utáni hatását vizsgálták. Ahogy azt korábbi kísérletükben megfigyelték, az N28-antitest felgyorsította a tumornövekedést, míg az N12- és N29-antitest jelentős mértékben gátolta az ErbB2-t termelő sejtek szaporodását. Az N24-antitest esetében részleges tumorgátlást is megfigyeltek. Bacus és mtsai. tesztelték az antitestek azon képességét, hogy az ErbB2-t túlzott mértékben termelő AU-565 és MDA-MB453 humán emlőrák-sejtvonalakban, illetve az ErbB2-t kis mennyiségben tartalmazó MCF-7 humán emlőrák-sejtvonalban érett fenotípust indukálnak-e. Bacus és mtsai. összefüggést találtak az *in vivo* tumornövekedés-gátlás és a celluláris differenciáció között; a tumornövekedést stimuláló N28-antitest nem volt hatással a differenciációra, míg

az N12-es, N29-es és N24-es antitest tumornövekedést gátló hatása összhangban volt az általuk indukált differenciáció mértékével.

Xu és mtsai. [Int. J. Cancer 53, 401 (1993)] anti-ErbB2 antitesteket epitópkötő specifitásukra, valamint azon képességükre teszteltek, hogy - külön-külön vagy kombinációban - gátolják-e az SKBR3-sejtek lehorgonyzás-független és lehorgonyzás-dependens szaporodását; módosítják-e a sejtfelületi ErbB2-termelődést, és gátolják-e a ligandum-stimulálta, lehorgonyzás-független sejtszaporodást [ld. még a WO 94/00136 számú nemzetközi közzétételi iratot, valamint, az anti-ErbB2 antitestek kombinációit illetően: Kasprzyk és mtsai.: Cancer Research 52, 2771 (1992)]. Egyéb anti-ErbB2 antitestek leírását ld. Hancock és mtsai.: Cancer Research 51, 4575 (1991); Shawver és mtsai.: Cancer Research 54, 1367 (1994); Arteaga és mtsai.: Cancer Research 54, 3758 (1994); Harwerth és mtsai.: J. Biol. Chem. 267, 15160 (1992)].

Az ErbB2 elleni egéreredetű 4D5-antitest rekombináns humanizált változata (xHuMab HER2, HERCEPTIN® vagy HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest) klinikai tesztekben aktívnak bizonyult olyan metasztázisos emlőrákos betegekben, akikben az ErbB2 túlzott mértékben termelődött, és akiket korábban rákellenes terápiával kezeltek [Baselga és mtsai.: J. Clin. Oncol. 14, 737 (1996)]. A HERCEPTIN® ajánlott kezdődózisa 90 perces infúzióban adagolva 4 mg/kg, ajánlott heti fenntartó dózisa pedig 2 mg/kg, amely abban az esetben, ha a páciens jól tolerálta a kezdődózist, 30 perces

infúzióval adható be.

Az ErbB2 túltermelődése általában - elsősorban a hó-
nalji nyirokcsomókat érintő elsődleges betegségben szenvedő
páciensek esetében - gyenge prognózis előjeleként tekinthe-
tő [Slamon és mtsai.: (1987) és (1989), ld. fentebb; Ravdin
és Chamness: Gene 159, 19 (1995)]; Hynes és Stern: Biochim.
Biophys. Acta 1198, 165 (1994)], és hormonterápiákra és ke-
moterápiákra vonatkozó érzékenységgel és/vagy rezisztenciá-
val áll összefüggésben; pl. CMD (ciklofoszfamid,
methotrexate és fluoruracil) és antraciklinek [Baselga és
mtsai.: Oncology 11 (3 Suppl. 1) 43 (1997)]. Mindazonáltal,
annak ellenére, hogy az ErbB2-túltermelődés gyenge prognó-
zisa enged következtetni, a taxánokkal végzett kezelésre
klínikailag reagáló HER2-pozitív páciensek esélye több,
mint háromszorosa volt a HER2-negatív páciensekének (ld. a
fentebb idézett cikket). Kimutatták, hogy az rhuMab HER2
antitest - HER2-t nagy mennyiségben termelő - BT-474-es hu-
mán emlő-adenocarcinoma sejtekkel injektált - csupasz ege-
rekben fokozza a paclitaxel (TAXOL®) és a doxorubicin emlő-
rák-xenograftok elleni aktivitását [Baselga és mtsai.:
Breast Cancer, Proceedings of ASCO, 13. szám, 53-as kivonat
(1994)].

A találmány szerinti megoldás azon a felismerésen ala-
pul, hogy hatékony maradék („trough”) cél-vérsavó-
koncentráció - anti-ErbB2 antitestek kezdődózisának vagy
dózisainak, majd azt követően az antitest azonos vagy ki-
sebb dózisainak adagolásával (lökésterápia) - korai eléré-
sén alapuló kezelés hatékonyabb a hagyományos kezeléseknél.

Az antitest hatásos maradék cél-vérsavó-koncentrációját négy hét alatt vagy hamarabb; előnyösen három hét alatt vagy hamarabb, még előnyösebben két hét alatt vagy hamarabb, legelőnyösebben egy hét alatt vagy hamarabb (pl. egy nap alatt vagy még hamarabb) érjük el. Ezután az antitest cél-vérsavó-koncentrációját a kezelés hátralévő szakaszában (vagy a betegség tüneteinek mérséklődéséig) azonos vagy kisebb fenntartó dózisok adagolásával tartjuk szinten.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás ErbB2-receptor túlzott mértékű termelődésével jellemezhető rendellenességre fogékony vagy azzal diagnosztizált ember kezelésére, melynek során a páciensnek szubkután anti-ErbB2 antitest hatásos mennyiségét adagoljuk. A kezdődózist (vagy dóziso-
kat), valamint a fenntartó dózis(oka)t előnyösen szubkután adagoljuk. Adott esetben, amennyiben a páciens anti-ErbB2 antitestre vonatkozó toleranciája ismeretlen, a kezdődózist intravénás infúzióval adjuk be, majd - ha a páciens antitestre vonatkozó toleranciája elfogadhatónak bizonyul - a fenntartó dózisokat szubkután adagoljuk.

A találmány szerinti megoldás értelmében a kezelési eljárás során az anti-ErbB2-antitest hozzávetőleg 4 mg/kg vagy nagyobb, előnyösen hozzávetőleg 5 mg/kg vagy nagyobb kezdődózisát adjuk be. A maximális kezdődózis vagy egy későbbi dózis nem haladja meg az 50 mg/kg-ot, előnyösen a 40 mg/kg-ot, még előnyösebben a 30 mg/kg-ot. Az adagolást intravénásan vagy szubkután, előnyösen intravénás infúzióval vagy bolus injekcióval, még előnyösebben szubkután bolus injekcióval végezzük. A kezdődózist a maradék cél-

vérsavó-koncentráció négy héten belüli, előnyösen három héten belüli, még előnyösebben két héten belüli, legelőnyösebben egy héten belüli (pl. egy nap vagy még rövidebb idő alatt) eléréséhez elegendő egy vagy több alkalommal adjuk be.

A találmány szerinti megoldás értelmében a kezdődózis(ok) után - az antitest hatásos célkoncentrációjának megfelelő vagy azt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációjának fenntartásához megfelelő időközönként - az antitest azonos vagy kisebb követő dózisait adagoljuk. A kezdődózis vagy követő dózis nem haladja meg az 50 mg/kg-ot, és mindegyik követő dózis legalább 0,01 mg/kg nagyságú. A hatóanyag beadott mennyisége előnyösen elégséges ahhoz, hogy a maradék cél-vérsavó-koncentráció fenntartásához a beadási ciklusok közötti intervallum legalább egy hét legyen. A maradék vérsavó-koncentráció a kezelés során előnyösen nem haladja meg a 2500 µg/ml-t, és nem kisebb 0,01 µg/ml-nél. A találmány szerinti "lökésdózisos" kezelési eljárás előnye a fokozott hatékonyság, ami a hatóanyag vérsavóban mért célkoncentrációjának (cél-vérsavó-koncentráció) a kezelés korai fázisában történő elérésnek köszönhető. A fenntartó dózis találmány szerinti szubkután adagolásának előnye, hogy a páciens és az egészségügyi dolgozók számára kényelmes, továbbá csökkenti a kezelés időtartamát és költségét. A kezdődózist (vagy a kezdődózis-sorozat utolsó dózisát) az első követődózistól négy hét vagy kevesebb, előnyösen három hét vagy kevesebb, még előnyösebben két hét vagy kevesebb, legelőnyösebben egy hét vagy kevesebb idő

választja el.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint az anti-ErbB2 antitest kezdődózis - intravénás vagy szubkután adagolással, pl. intravénás infúzióval vagy szubkután bolus injekcióval beadva - 6 mg/kg, 8 mg/kg vagy 12 mg/kg. A szubkután fenntartó dózis - intravénás infúzióval, intravénás bolus injekcióval, szubkután infúzióval vagy szubkután bolus injekcióval adagolva - 2 mg/kg/hét. A kezdődózis és a fenntartó dózisok beadási módját a kezelt állat vagy ember antitest bejuttatását toleráló képessége alapján választjuk ki. Amennyiben a páciens jól tolerálja az antitestet, az infúziós adagolás időtartama csökkenthető. E megvalósítási mód értelmében az adagolási mód kiválasztása valamennyi találmány szerinti hatóanyag-adagolási sémára alkalmazható.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint az anti-ErbB2 antitest 12 mg/kg-os kezdődózisát adagoljuk, majd három hetenként 6 mg/kg-os fenntartó dózisokat adunk be.

Egy további megvalósítási mód szerint az anti-ErbB2 antitest 8 mg/kg-os kezdődózisát és - három hetenként - 6 mg/kg-os fenntartó dózisait adagoljuk.

Egy másik megvalósítási mód értelmében az anti-ErbB2 antitest 8 mg/kg-os kezdődózisát, majd heti egyszeri 8 mg/kg-os vagy két-három hetenként 8 mg/kg-os fenntartó dózisát adagoljuk.

A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében a kezelés 1., 2. és 3. napján az anti-ErbB2 antitest legalább 1 mg/kg-os, előnyösen 4 mg/kg-os kezdődózisait adagoljuk,

fenntartó dózisként pedig három hetente 4 mg/kg-os dózist adunk be.

Egy következő megvalósítási mód szerint az anti-ErbB2 antitest 4 mg/kg-os kezdődózisát, majd hetente kétszer (három napos időközönként) 2 mg/kg-os fenntartó dózist adunk be.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében ciklikus adagolást alkalmazunk, melynek során az anti-ErbB2 antitestet három hétig hetente két-három alkalommal adjuk be. Az egyik megvalósítási mód szerint az egyes dózisek (emberek kezelése esetén) hozzávetőleg 25 mg/kg-osak, előnyösen hozzávetőleg 10 mg/kg-osak. Ezt a három hetes ciklust előnyösen a betegség tüneteinek enyhítéséhez szükséges ideig ismételjük.

Egy további megvalósítási mód értelmében olyan adagolási ciklust folytatunk, melynek során az anti-ErbB2 antitestet öt napon keresztül naponta egyszer adagoljuk. Ezt az adagolási ciklust a betegség tüneteinek enyhítéséhez szükséges ideig ismételjük.

A találmány szerinti eljárás előnyösen - ErbB2-receptor túltermelésével jellemezhető - jóindulatú vagy malignáns tumor (például, emlőrák, pikkelysejtes rák, kis sejtes és nem kis sejtes tüdőrák, gastrointestinalis rák, hasnyálmirigy-rák, glioblastoma, méhnyakrák, petefészekrák, májrák, húgyhólyagrák, hepatoma, vastagbélrák, vastag- és végbélrák, endometrium-carcinoma, nyálmirigy-carcinoma, veserák, májrák, prosztatarák, szeméremtest-rák, pajzsmirigy-rák, máj-carcinoma, valamint különféle típusú fej- és nyak-

rákok) kezelésére alkalmazható. A találmány szerinti eljárás kemoterápiás hatóanyag (amely nem anthraciklin, pl. doxorubicin vagy epirubicin) adagolását is magában foglalhatja. Kemoterápiás hatóanyagként előnyösen taxoidot, például, taxolt pl. TAXOL®-t (paclitaxel) vagy TAXOL®-származékot alkalmazunk.

A találmány szerinti megoldás értelmében előnyösen alkalmazható anti-ErbB2 antitestek az ErbB2-receptor extracelluláris doménjéhez (előnyösen az ErbB2 extracelluláris domén-szekvenciáján belüli 4D5- vagy 3H4-epitóphoz) kötődnek. Még előnyösebben, antitestként 4D5-antitestet, legelőnyösebben annak humanizált változatát alkalmazzuk. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös, további, ErbB2-t megkötő antitestek közé tartoznak, többek között, a 7C2, 7F3 és 2C4 antitestek (előnyösen humanizált alakban).

A találmány szerinti eljárás különösen alkalmas - ErbB2-receptor túlzott mértékű termelődésével jellemezhető - emlőrák vagy petefészekrák kezelésére.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy kezelési eljárás, melynek során egy anti-ErbB2 antitest ritka adagolási sémáját alkalmazzuk. Közelebbről, eljárást tárunk fel rák (pl. egy ErbB2-receptor túlzott mértékű termelődésével jellemezhető rák) emberben történő kezelésére, melynek során a páciensnek egy anti-ErbB2 antitest első dózisát, majd legalább egy következő dózisát adjuk be, mely következő dózist az első dózis beadása után legalább két héttel (pl. kb. két hét és kb. két hónap közötti időkülönbséggel), és adott

esetben az első dózis beadása után legalább kb. három héttel (pl. kb. három hét és kb. hat hét közötti időkülönbséggel) adjuk be. Például, az antitestet kb. három hetente, összesen kb. 2-20 alkalommal (pl. kb. hat alkalommal) adjuk be a páciensnek. Az első dózis és a következő dózis nagysága kb. 2 mg/kg-tól kb. 16 mg/kg-ig (például, kb. 4 mg/kg-tól kb. 12 mg/kg-ig, adott esetben kb. 6 mg/kg-tól kb. 12 mg/kg-ig) terjedhet. Általában az antitest két vagy több (pl. kb. 2-10) későbbi dózisát adjuk be a betegnek, az egyes beadások között legalább kb. két hetes (pl. kb. két héttől kb. két hónapig terjedő) időközzel, adott esetben legalább kb. három hetes (pl. kb. három héttől kb. hat hétig terjedő) időközzel. A két vagy több későbbi dózis nagysága kb. 2 mg/kg-tól kb. 16 mg/kg-ig, vagy kb. 4 mg/kg-tól kb. 12 mg/kg-ig, vagy kb. 6 mg/kg-tól kb. 12 mg/kg-ig terjedhet. Szintén a találmány tárgyát képezi egy termék, amely egy tartályból és az abban lévő, anti-ErbB2 antitestet tartalmazó készítményből áll, tartalmaz továbbá egy beteg tájékoztatót, amely az antitest találmány szerinti adagolásával kapcsolatos tudnivalókról ad felvilágosítást.

A találmány szerinti adagolási eljárások egyéb anti-ErbB antitestekre (pl. epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), ErbB3 vagy ErbB4 elleni antitestekre) is alkalmazhatók. Ennek megfelelően, eljárást tárunk fel rák kezelésére emberben, melynek során a páciensnek egy anti-ErbB antitest hatásos mennyiségét adagoljuk. Az eljárás során a páciensnek az anti-ErbB antitest legalább kb. 5 mg/kg kezdődózisát adjuk be, majd több későbbi - a kezdődózissal

azonos vagy annál kisebb - dózist adagolunk. Más módon, vagy ezen túlmenően, feltárunk egy eljárást rák emberben történő kezelésére, melynek során a betegnek egy anti-ErbB antitest első dózisát adjuk be, majd az antitest legalább egy későbbi dózisát adagoljuk, mely későbbi dózist az első dózis beadása után legalább két héttel adjuk be. A találmány szerinti megoldás értelmében feltárunk továbbá egy terméket, amely egy tartályból és az abban lévő, anti-ErbB antitestet tartalmazó készítményből áll, tartalmaz továbbá egy beteg tájékoztatót, amely az antitest találmány szerinti adagolásával kapcsolatos tudnivalókról ad tájékoztatást.

A találmány egy következő szempontja értelmében feltárunk egy terméket, amely egy tartályból és az abban lévő, anti-ErbB2 antitestet tartalmazó készítményből áll, és adott esetben, tartalmaz egy - tartályra helyezett vagy ahhoz mellékelte - címkét is, amely arról ad felvilágosítást, hogy a készítmény ErbB2-receptor túltermelődésével jellemezhető állapot kezelésére alkalmazható, tartalmaz továbbá egy beteg tájékoztatót, amely felvilágosítást nyújt arról, hogy a készítmény anthraciklin típusú kemoterápiás hatóanyaggal kombinálva nem alkalmazható. A találmány szerinti megoldás értelmében a beteg tájékoztató tartalmazza az anti-ErbB2 antitest adagolási útmutatóját is, amely szerint 5 mg/kg-os kezdődózis után azonos vagy kisebb dózisú követő dózis(oka)t kell adagolni. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a beteg tájékoztató további útmutatást nyújt arról, hogy az anti-ErbB2 antitest legalább egy dózisát - előnyösen a kezdődózist követő dózisok mindegyikét,

legelőnyösebben valamennyi dózist - szubkután kell adagolni.

A találmány egy következő szempontja értelmében eljárást tárunk fel ErbB2 termelésével jellemezhető rák emberben történő kezelésére, melynek során a páciensnek egy anti-ErbB2 antitest és egy kemoterápiás hatóanyag hatásos mennyiségeit adagoljuk. Ezen eljárás egy előnyös megvalósítási módjában kemoterápiás hatóanyagként taxoidot, például, többek között, paclitaxelt vagy docetaxelt alkalmazunk. Egy másik megvalósítási módban kemoterápiás hatóanyagként anthraciklin-származékot (például, többek között, doxorubicint vagy epirubicint) alkalmazunk. Egy további megvalósítási mód szerint az anti-ErbB2 antitesttel és anthraciklin-származékkal végzett kezelés során a páciensnek kardioprotektánst is adagolunk. Egy másik megvalósítási módban a páciensnek az anti-ErbB2 antitesttel együtt nem adunk be anthraciklin-származékot. A betegnek egy vagy több további kemoterápiás hatóanyagot is adagolhatunk. A szóban forgó eljárást előnyösen olyan rák kezelésére alkalmazzuk, amelyre ErbB2 túlzott mértékű termelődése jellemző.

A találmány egy további szempontja értelmében feltárunk egy terméket, amely tartalmaz egy tartályt, az abban lévő, anti-ErbB2 antitestet tartalmazó készítményt, valamint egy beteg tájékoztatót, amely a készítmény felhasználójának útmutatást nyújt az anti-ErbB2 antitestet tartalmazó készítmény és egy kemoterápiás hatóanyag páciensnek történő adagolásáról. Egy másik megvalósítási mód szerint a kemoterápiás hatóanyag anthraciklintől eltérő kemoterápiás ható-

anyag, előnyösen taxoid, pl. TAXOL®. Egy további megvalósítási mód értelmében a kemoterápiás hatóanyag anthraciklin, például, többek között, doxorubicin vagy epirubicin. Egy másik megvalósítási mód szerint a kemoterápiás hatóanyag egy anthraciklin, és a beteg tájékoztató a felhasználónak kardioprotektáns adagolásáról is utasítást ad.

A találmány szerinti eljárások és készítmények anti-ErbB2 antitestet tartalmaznak, és humanizált anti-ErbB2 antitestet foglalnak magukban. Ilyenformán, a találmány szerinti megoldás további szempontjai értelmében feltárunk egy ErbB2-t megkötő antitestet tartalmazó készítményt, valamint az ErbB2-t megkötő antitest alkalmazását ErbB2 termelésével jellemezhető rák (pl. ErbB2 túlzott mértékű termelésével jellemezhető rák) kezelésére. Ilyen antitestként előnyösen 4D5 monoklonális antitestet pl. humanizált 4D5-antitestet [előnyösen huMAb4D5-3 antitestet (HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest)] vagy 2C4 monoklonális antitestet, pl. humanizált 2C4-antitestet alkalmazunk. Antitestként ép antitestet (pl. ép IgG1-et) vagy antitest-fragmenst (pl. Fab-fragmenst, F(ab')₂-fragmenst, diatestet, stb.) alkalmazhatunk. A humanizált 2C4 anti-ErbB2 antitest könnyű és nehéz láncának variábilis régióit az 5/A, illetve 5/B ábrán mutatjuk be.

A következőkben az ábrák rövid leírását ismertetjük.

Az 1. ábrán az ErbB2 extracelluláris doménjének - csonkított mutáns analízissel és helyspecifikus mutagenézissel [ld. Nakamura és mtsai.: J. of Virology 67(10), 6179 (1993); Renz és mtsai.: J. Cell Biol. 125(6), 1395 (1994)] végzett - epitóp-térképezését mutatjuk be. A

proliferációt gátló 4D5 és 3H4 monoklonális antitest a transzmembrán-domén melletti pozícióhoz kötődik. A különböző ErbB2-ECD csonkításos mutánsokat és pontmutánsokat polimeráz-láncreakció alkalmazásával, cDNS-ből hoztuk létre. Az ErbB2-mutánsokat emlős expressziós plazmíd alkalmazásával gD fúziós proteineként termeltettük. Ez az expressziós plazmíd citomegalovírus-promótert és erősítő-szekvenciát és SV40 terminációs és poliadenilációs szignálokat tartalmaz (az inszertált cDNS-től 3'-irányban). A plazmíd-DNS-t 293-as sejtekbe transzfektáltuk, majd a transzfekció után egy nappal a sejteket - 1 % dializált magzati borjúsérumot és 25 μ Ci 35 S-metionint és 25 μ Ci 35 S-ciszteint tartalmazó, metionin- és cisztein-mentes, alacsony glükóztartalmú DMEM-tápközegben - egy éjszakán át metabolikus jelölésnek vetettük alá. A felülúszókat összegyűjtöttük, anti-ErbB2 monoklonális antitesteket vagy kontroll antitesteket adtunk hozzájuk, és 4 °C-on 2-4 óra hosszát inkubáltuk. A komplexeket precipitáltuk, 10-20 % Tricin-SDS gradiens gélre vittük, és 100 V feszültséggel elektroforézist végeztünk. A gél elektroblot módszerrel membránra másoltuk és autoradiográfiásan analizáltuk. A 3H4-epitópot a 8. azonosítószámú szekvenciaként, a 4D5-epitópot a 9. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be.

A 2. ábrán az ErbB2 1. doménjének aminosav-szekvenciáját (1. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be. A félkövér betűtípussal szedett aminosavak a 7C2 és 7F3 monoklonális antitest által felismert epitóp (azaz a "7C2/7F3-epitóp - deléciós térképezéssel meghatározott -

elhelyezkedését jelzik (ld. 2. azonosítószámú szekvencia).

A 3. ábrán HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 4 mg/kg-os kezdődózisával, majd hetente adott 2 mg/kg-os fenntartó dózisával kezelt - ErbB2-t túlzott mértékben termelő - páciensekben az anti-ErbB2 antitest (HERCEPTIN®) maradék vérsáv-koncentrációja hétről-hétre történő alakulásának grafikonját mutatjuk be. Az egyes időpontokban a páciensek számát "n"-nel jelöljük (üres négyzetek).

A 4/A ábrán HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitesttel kezelt egerekben a tumortérfogat idő függvényében történő változásának linearizált grafikonját mutatjuk be. A 4/B ábrán a 4/A ábrán bemutatott adatok féllogaritmikus diagramja látható, melyen jobban látható a különböző módon kezelt állatokban megfigyelt tumortérfogat változékonysága.

Az 5/A ábrán az egéreredetű 2C4 monoklonális antitest könnyű lánc variábilis (V_L) doménje aminosav-szekvenciájának (10. azonosítószámú szekvencia, 5/A ábra), az 5/B ábrán pedig az egéreredetű 2C4 monoklonális antitest nehéz lánc variábilis (V_H) doménje aminosav-szekvenciájának (11. azonosítószámú szekvencia) a humanizált 574-es Fab-változat V_L és V_H doménjével (12., illetve 13. azonosítószámú szekvencia), valamint humán V_L és V_H konszenzus vázrégiókkal (hum $\kappa 1$ = könnyű lánc kappa 1. alcsoport; humIII = nehéz lánc III. alcsoport; 14., ill. 15. azonosítószámú szekvencia) végzett összehasonlítását mutatjuk be. A csillagok az 574-es humanizált Fab-változat és az egéreredetű 2C4 monoklonális antitest közötti, illetve az 574-es humanizált Fab-változat és a humán vázrégió közötti különbségeket jel-

zik. A komplementaritást meghatározó régiókat (CDR-ek) zárójelbe tettük. Az 574-es humanizált Fab-változat (amely ArgH71Val, AspH73Arg és IleH69Leu szubsztitúciókat hordoz) kötési tulajdonságai az eredeti kimérikus 2C4 Fab-fragmens kötési tulajdonságainak megfelelően vannak helyreállítva. A humanizált antitest kötődési tulajdonságainak további finomítása vagy javítása érdekében további vázrégió- és/vagy CDR-aminosavak (pl. L2, L54, L55, L56, H35 és/vagy H48) módosíthatók, pl. helyettesíthetők, a következők szerint: IleL2Thr, ArgL54Leu, TyrL55Glu, ThrL56Ser, AspH35Ser és ValH48Ile. Más módon, vagy ezen túlmenően, a humanizált antitest affinitása és/vagy egyéb biológiai aktivitásai affinitás-fejlesztéssel tovább javítható(k) vagy finomítható(k).

A következőkben a találmány előnyös megvalósítási módjait ismertetjük részletesen.

1) Definíciók

Az "ErbB-receptor" vagy "ErbB" kifejezésen olyan tirozin kináz receptor-proteint értünk, amely az ErbB-receptorcsaládba tartozik. Az ErbB-receptorok közé tartoznak a következők: EGFR, HER2, ErbB3 és ErbB4, valamint a TEGFR (ld. 5 708 156 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), és e család még azonosításra váró tagjai. Az ErbB-receptor általában a következő komponensekből áll: extracelluláris domén, amely ErbB-ligandumhoz kötődhet; lipofil transzmembrán domén; konzervált intracelluláris

tirozin kináz domén; és C-terminális szignáldomén, amely több foszforilálható tirozint tartalmaz. Az ErbB-receptor "natív szekvenciájú" ErbB-receptor vagy annak funkcionális származéka (pl. aminosav-szekvencia-változata) egyaránt lehet. Az ErbB-receptor előnyösen natív szekvenciájú humán ErbB-receptor.

Az "ErbB1", "epidermális növekedési faktor receptor" és "EGFR" kifejezések - melyek egymás szinonimáiként alkalmazhatók - az EGFR-re vonatkoznak [melynek leírását ld. pl. Carpenter és mtsai.: Ann. Rev. Biochem. 56, 881 (1987)], ideértve ezek természetben előforduló mutáns alakjait [pl. deléció EGFR-mutáns; ld. Humphrey és mtsai.: PNAS (USA) 87, 4207 (1990)]. Az *erbB1* kifejezés az EGFR-proteint kódoló gént jelenti. Az EGFR-hez kötődő antitestek példái közé tartoznak a következők MAb 579 (579-es monoklonális antitest; ld. ATCC CRL HB 8506); MAb455 (ATCC CRL HB8507); MAb255 (ATCC CRL 8508); MAb528 (ATCC CRL 8509; ld. 4 943 533 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); valamint ezek változatai, pl. a kimérikus 225-ös monoklonális antitest (C225) és az újjáalakított humán 225-ös monoklonális antitest (H225; ld. WO 96/40210 számú nemzetközi közzétételi irat).

Az "ErbB3" és "HER3" kifejezés receptor-polipeptidre [ld. 5 183 884 és 5 480 968 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, valamint Kraus és mtsai.: PNAS (USA) 86, 9193 (1989)], illetve ezek változataira vonatkozik. A HER3-hoz kötődő antitestek példáinak leírását illetően ld. 5 968 511 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást

(pl. 8D8-antitest, ATCC HB 12070; illetve humanizált változatai).

Az "ErbB4" és "HER4" kifejezés receptor-polipeptidre vonatkozik [amelynek leírását ld. pl. az 599 274 számú európai szabadalmi bejelentést; valamint Plowman és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1746 (1993); Plowman és mtsai.: Nature 366, 473 (1993)], valamint izoalakjaira vonatkozik (pl. a WO 99/19488 számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt HER4-izoalakok).

A "ErbB2", "HER2" és "c-Erb-B2" kifejezések - melyeket egymás szinonimáiként alkalmazunk - humán HER2-proteinre vonatkoznak, míg az "erbB2", "c-erb-B2" és "her2" kifejezéseken a szóban forgó proteint kódoló humán gént értjük. A humán erbB2-gén és ErbB2-protein leírását illetően ld. pl. Semba és mtsai.: PNAS (USA) 82, 6497 (1985) és Yamamoto és mtsai.: Nature 319, 230 (1986). Az ErbB2 négy domént (1-4. domének) tartalmaz.

A "4D5-epitóp" az ErbB2 extracelluláris doménjének azon régiója, amelyhez a 4D5-antitest (ATCC CRL 10463) kötődni képes. Ez az epitóp közel van az ErbB2 transzmembrán doménjéhez. A 4D5-epitóphoz kötődő antitestek azonosítása céljából szokványos keresztblokkolási tesztet végezhetünk [ld. pl. Harlow és Lane (szerk.): "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Más módon, epitóp-térképezést végezhetünk (ld. 1. ábra) annak meghatározása céljából, hogy az antitest kötődik-e az ErbB2 4D5-epitópjához; például, az ErbB2-protein extracelluláris doménjében (a kb. 529. aminosavtól, pl. 561. aminosavtól a

kb. 625. aminosavig terjedő régióban) egy vagy több aminosavhoz.

A "3H4-epitóp" az ErbB2 extracelluláris doménjének azon régiója, amelyhez a 3H4-antitest kötődni képes. Ez az epitóp az ErbB2 extracelluláris doménje aminosav-szekvenciájának kb. 541-599. aminosavait foglalja magában (ld. 1. ábra).

A "7C2/7F3-epitóp" az ErbB2 extracelluláris doménje N-terminálisának azon régiója, amelyhez a 7C2- és/vagy 7F3-antitest (mindkettő az ATCC-nél letétbe helyezve, ld. lentebb) kötődni képes. A 7C2/7F3-epitóp-hoz kötődni képes antitestek azonosítása céljából szokványos keresztblokkolási tesztet végezhetünk (ld. pl. Harlow és Lane fentebb idézett műve). Más módon, epitóp-térképezést végezhetünk annak meghatározása céljából, hogy az antitest kötődik-e az ErbB2 7C2/7F3-epitópjához, pl. az ErbB2 kb. 22. aminosavától kb. 53. aminosaváig terjedő régióban egy vagy több aminosavhoz (ld. 2. azonosítószámú szekvencia).

A "sejthalált indukál" vagy "sejthalál indukálására képes" kifejezések egy antitest - életképes sejtet életképtelenné tevő - képességére vonatkoznak. A szóban forgó "sejt" ErbB2-receptort termelő sejt, elsősorban ErbB2-receptort túlzott mértékben termelő sejt. Az ErbB2-t "túlzott mértékben termelő" sejt kifejezésen olyan sejtet értünk, amely az ErbB2-receptort lényegesen nagyobb mennyiségben termel, mint az ugyanazon szövettípus nem rákos sejtjeire jellemző normális mennyiség. A szóban forgó sejt előnyösen ráksejt, pl. emlőrák, petefészekrák, gyomorrák,

endometriumrák, nyálmirigyrák, tüdőrák, veserák, vastagbélrák, pajzsmirigyrák, hasnyálmirigyrák, prosztatatarák vagy húgyhólyagrák-sejt. *In vitro* a sejt SK-BR-3, BT474, Calu3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 vagy SKOV3 sejt lehet. *In vitro* a sejthalál - az antitest-dependens sejtközvetítette citotoxicitás (ADCC) és a komplement-dependens citotoxicitás (CDC) által indukált sejthalál megkülönböztetése érdekében - komplement és immun-effektor sejtek hiányában határozható meg. Ilyenformán, a sejthalál kimutatási tesztje hővel inaktivált szérum alkalmazásával (vagyis komplement hiányában) és immun-effektor sejtek hiányában hajtható végre. Annak megállapítása céljából, hogy a molekula képes-e sejthalált indukálni, a sejtmembrán épségének - propidium-jodid (PI), trypan-kék [ld. Moore és mtsai.: Cytotechnology 17, 1 (1995)] vagy 7AAD felvétele alapján meghatározott - károsodását a kezeletlen sejtekéhez viszonyítva értékelhetjük. Az előnyös, sejthalált indukáló antitestek azok, amelyek PI-felvételi teszt során BT474-sejtekben PI-felvételt képesek indukálni.

Az "apoptózist indukál" vagy "apoptózis indukálására képes" kifejezések egy antitest programozott sejthalált indukáló képességére vonatkoznak, amely standard apoptózis-tesztekkel - pl. annexin-V megkötése, DNS fragmentáció, sejtzsugorodás, endoplazmatikus retikulum tágulása, sejt feldarabolódás és/vagy membránvezikulák (ún. apoptózis testek) képződése alapján - határozható meg. A szóban forgó sejt általában ErbB2-receptort termelő sejt, elsősorban ErbB2-receptort túlzott mértékben termelő sejt. A szóban

forró sejt előnyösen tumorsejt, pl. emlőrák, petefészekrák, gyomorrák, endometriumrák, nyálmirigyrák, tüdőrák, veserák, vastagbélrák, pajzsmirigyrák, hasnyálmirigyrák, prosztataraák vagy húgyhólyagraák-sejt. *In vitro* a sejt SK-BR-3, BT474, Calu3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 vagy SKOV3 sejt lehet. Az apoptózissal kapcsolatos celluláris események értékelésére különféle eljárások állnak rendelkezésre. Például, annexin-kötés alapján foszfatidil-szerin (PS) transzlokáció mérhető; DNS-létrázás alapján DNS-fragmentáció; és hipodiploid sejtek számának növekedése alapján DNS-fragmentációval együttes sejtmag/kromatin kondenzáció értékelhető. Az apoptózist indukáló molekula előnyösen olyan molekula, amely BT474-sejtek alkalmazásával végzett annexin-kötési tesztben - a kezeltlen sejtekhez viszonyítva - kb. 2-50-szeres, előnyösen kb. 5-50-szeres, legelőnyösebben kb. 10-50-szeres annexin-indukciót eredményez.

Bizonyos esetekben a pro-apoptózisos antitest olyan molekula, amely gátolja az ErbB2/ErbB3-komplex HRG-közvetítette kötődését/aktiválását (pl. 7F3-antitest). Más esetekben az ilyen antitest nem blokkolja jelentős mértékben az ErbB2/ErbB3-komplex HRG-közvetítette aktiválását (pl. 7C2-antitest). Ezen túlmenően, az antitest anélkül is indukálhat apoptózist (mint pl. a 7C2-antitest), hogy az S-fázisban lévő sejtek százalékos arányának nagymértékű csökkenését okozná (pl. az ilyen sejtek százalékos arányát a kontrollhoz képest csak 0-10 %-kal csökkentő molekula).

A szóban forgó antitest specifikusan kötődhet a humán ErbB2-höz (mint pl. a 7C2-antitest), ugyanakkor, egyéb pro-

teinekkel (pl. az erbB1-, erbB3- és/vagy erbB4-gén által kódolt proteinekkel) lényegében nem lép keresztreakcióba. Bizonyos esetekben az antitest lényegében nem lép keresztreakcióba a patkányeredetű neu-proteinnel [ld. pl. Schechter és mtsai.: Nature 312, 513 (1984); és Drebin és mtsai.: Nature 312, 545 (1984)]. Ilyen esetekben az antitest e proteinekhez történő kötődésének (pl. endogén receptorhoz történő sejtfelületi kötődés) mértéke kisebb, mint a fluoreszcencia-aktiválósos sejtosztályozási (FACS) analízissel vagy radioimmunprecipitációval (RIA) meghatározott érték kb. 10 %-a.

Ahogy itt használjuk, a "heregulin" (HRG) kifejezés olyan peptidet jelent, amely aktiválja az ErbB2-ErbB3 és ErbB2-ErbB4 komplexet (vagyis a komplexben lévő tirozinokhoz kötődve azok foszforilációját indukálja). A heregulin-gén kódol [ld. 5 641 869 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás vagy]. A különféle heregulin-poliipeptidek leírását illetően ld. pl. Holmes és mtsai.: Science 256, 1205 (1992); WO 92/20798 számú nemzetközi közlési irat; Wen és mtsai.: Mol. Cell. Biol. 14(3), 1909 (1994); és Marchionni és mtsai.: Nature 362, 312 (1993)]. A heregulin kifejezés jelentése kiterjed a természetben előforduló HRG-poliipeptid biológiailag aktív fragmenseire és/vagy aminosav-szekvencia változataira is, pl. EGF-szerű domén fragmensére (HRG β ₁₁₇₇₋₂₄₄).

Az "ErbB2-ErbB2 proteinkomplex" és "ErbB2-ErbB4 proteinkomplex" kifejezésen az ErbB2-receptor ErbB2-, illetve ErbB4-receptorral - nem kovalens kötéssel kapcsolt -

oligomereit értjük. Az ilyen komplexek akkor jönnek létre, ha egy mindkét ErbB-receptort termelő sejtet HRG-vel érintkeztetünk, majd immunprecipitációval izolálhatók és SDS-PAGE vizsgálati eljárással analizálhatók [ld. pl. Sliwkowski és mtsai.: J. Biol. Chem. 269(20), 14661 (1994)].

Az "antitestek" és "immunglobulinok" (Ig-k) azonos strukturális sajátosságú glikoproteinek. Míg az antitestek egy specifikus antigénre kötési specifitást mutatnak, az immunglobulin kifejezés jelentése az antitesteket és az antigén-specifitás nélküli antitest-szerű molekulákat egyaránt magában foglalja. Az utóbbi típusba tartozó polipeptideket, például, a nyirokrendszer kis mennyiségben, a myelomák fokozott mennyiségben termelik.

A "natív antitestek" és "natív immunglobulinok" rendszerint kb. 150 000 Dalton molekulatömegű heterotetramer glikoproteinek, amelyek két azonos könnyű (L) láncból és két azonos nehéz (H) láncból állnak. Mindkét könnyű lánc egy kovalens diszulfid-híddal kapcsolódik a nehéz lánchoz, míg a különböző immunglobulin-izotípusokban a nehéz láncok között eltérő számú diszulfid-kötés található. A nehéz és könnyű láncokban, egymástól szabályos távolságokra, láncon belüli diszulfid-kötések helyezkednek el. Mindkét nehéz lánc egyik végén variábilis domén (V_H) található, melyet számos konstans domén követ. A könnyű láncok egyik végén variábilis domén (V_L), másik végén konstans domén helyezkedik el; a könnyű lánc konstans doménje a nehéz lánc első konstans doménjével, míg a könnyű lánc variábilis doménje a

nehéz lánc variábilis doménjével illeszkedik. Úgy tartják, hogy a nehéz és a könnyű lánc variábilis doménjei között bizonyos aminosavak határfelületet képeznek.

Az antitestekkel összefüggésben használt "variábilis" kifejezés arra vonatkozik, hogy a variábilis domén bizonyos részeinek aminosav-szekvenciája az egyes antitestekben nagymértékben eltér egymástól, és ezek a szakaszok felelősek az adott antitest adott antigénre vonatkozó specifikusáért. Mindazonáltal, a variabilitás az antitest variábilis doménjeiben nem egyenletesen oszlik meg, hanem három szakaszra koncentrálódik: ezek az úgynevezett hipervariábilis régiók, amelyek a könnyű lánc és a nehéz lánc variábilis doménjeiben egyaránt megtalálhatók. A variábilis domén nagyobb mértékű konzerváltságot mutató szakaszait vázrégióknak (FR) nevezzük. A natív antitestek nehéz és könnyű láncainak variábilis doménjei egyenként négy vázrégiót tartalmaznak (melyek többnyire β -redős konfigurációt vesznek fel), és ezeket három komplementaritást meghatározó régió (CDR) köti össze, melyek hurkokat képeznek, és ezek a hurkok kötik össze a β -redős struktúrát (és néhány esetben annak részét is képezik). Az egyes láncokban a vázrégiók szorosan összetartják a komplementaritást meghatározó régiókat, melyek - a másik láncban lévő komplementaritást meghatározó régiókkal együtt - az antitest antigénkötő helyeinek létrehozásában játszanak szerepet [ld. Kabat és mtsai.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. kiadás, 647-669. old., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]. A konstans

domének közvetlenül nem játszanak közre az antitest antigénhez történő kötődésében, azonban különféle effektor-funkciókat töltenek be - pl. az antitest részvétele az antitest-dependens celluláris citotoxicitásban (ADCC).

Az antitestek papainos emésztése két azonos antigénkötő fragmenst (Fab-fragmensek, melyek egy-egy antigénkötő helyet tartalmaznak), valamint egy maradék Fc-fragmenst eredményez, amelynek neve kristályosodási hajlamára ("crySTALLIZE") utal. A pepszines kezelés $F(ab')_2$ -fragmenst eredményez, amelynek két antigénkötő helye van, és képes az antigén keresztkötésére.

Az "Fv-fragmens" az a minimális méretű antitest-fragmens, amely még komplett antigén-felismerő és antigénkötő helyet tartalmaz. Ez a régió egy nehéz lánc és egy könnyű lánc variábilis domén - szoros, nem kovalens kötésű - dimeréből áll. Erre a konfigurációra jellemző, hogy a két variábilis domén három-három hipervariábilis régiója interakcióba lép, antigénkötő helyet meghatározva ezáltal a V_H - V_L dimer felületén. A hat hipervariábilis régió - együttesen - az antitest számára antigénkötő specifikitást biztosít. Mindazonáltal, egyetlen variábilis doménnek (vagy egy Fv-fragmens felének, amely csak három - antigénre specifikus - hipervariábilis régiót tartalmaz) is megvan az a képessége, hogy felismerje és megkösse az antigént, ha kisebb affinitással is, mint a teljes kötőhely megléte esetén.

A Fab-fragmens a könnyű lánc konstans doménjét és a nehéz lánc első konstans doménjét (CH1) is tartalmazza. A Fab'-fragmensek annyiban térnek el a Fab-fragmensektől,

hogy a nehéz lánc CH1-doménjének C-terminálisán néhány plusz aminosavat tartalmaznak, köztük az antitest csukló ("hinge") régiójának egy vagy több ciszteinjét. A "Fab'-SH" olyan Fab'-fragmens, amelyben a konstans domén ciszteinje(i) legalább egy szabad tiocsoportot tartalmaz(nak). Az F(ab')₂-fragmensek eredetileg két Fab'-fragmensből jönnek létre, melyek között ciszteinek helyezkednek el. Az antitest-fragmensek egyéb kémiai kapcsolási módjai is ismeretesek.

Az gerincesekből származó antitestek (immunglobulinok) "könnyű láncai" - konstans doménjeik aminosav-szekvenciája alapján - két jól elkülöníthető típus valamelyikébe sorolhatók; ez a két típus a kappa (κ) és a lambda (λ).

Az immunglobulinok - nehéz láncuk konstans doménjének aminosav-szekvenciájától függően - különböző "osztályokba" sorolhatók. Az immunglobulinok öt fő osztálya létezik: IgA, IgD, IgE, IgG és IgM, melyek közül több további "alosztályokra" (izotípusokra) osztható, pl. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA és IgA2. A különböző immunglobulin-osztályoknak megfelelő nehéz lánc konstans domének elnevezése a következő: α , δ , ϵ , γ , illetve μ . A különféle Ig-osztályok alegység-szerkezete és háromdimenziós konfigurációja szakember számára jól ismert.

A találmány leírásában az "antitest" kifejezést legtágabb értelmében használjuk, s jelentése kiterjed az ép monoklonális antitestekre, poliklonális antitestekre, a legalább két ép antitestből álló multispecifikus antitestekre (pl. bispecifikus antitestek), valamint az antitest-

fragmensekre, feltéve, hogy azok rendelkeznek a kívánt biológiai aktivitással.

Ahogy itt használjuk, a "monoklonális antitest" kifejezésen lényegében homogén antitest-populációból származó antitestet értünk, vagyis a populációt alkotó egyes antitestek - az esetlegesen kis mennyiségben előforduló természetes mutációktól eltekintve - azonosak. A monoklonális antitestek rendkívül specifikusak: egyetlen antigénhatású hely ellen irányulnak. Ezen túlmenően, ellentétben a poliklonális antitestek készítményeivel, amelyek különböző determinánsok (epitópok) elleni különböző antitesteket tartalmaznak, minden egyes monoklonális antitest az antigén egyetlen determinánsa ellen irányul. A monoklonális antitestek - specifikitásukon túlmenően - azért is előnyösek, mert hibridóma-tenyésztésben, más immunglobulinoktól mentesen szintetizálhatók. A "monoklonális" jelző az antitest azon sajátására utal, hogy antitestek lényegében homogén populációjából nyerhető, és nem utal arra, hogy az antitest bármilyen konkrét eljárással lenne előállítható. Például, a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazandó monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással vagy rekombináns DNS-technikák (ld. pl. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) alkalmazásával állíthatók elő. A monoklonális antitestek fág antitest-könyvtárakból is izolálhatók, például, a Clackson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)] és Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] által leírt technikák alkalmazásával.

A monoklonális antitestek konkrét példái közé tartoznak a "kimérikus" antitestek, amelyekben a nehéz és/vagy könnyű lánc egy része azonos vagy homológ egy adott fajból származó - vagy egy adott antitest-osztályhoz vagy -alosztályhoz tartozó - antitestek megfelelő szekvenciáival, míg a lánc(ok) többi része azonos vagy homológ egy másik fajból származó - vagy egy másik antitest-osztályba vagy -alosztályba tartozó - antitestek megfelelő szekvenciáival. A monoklonális antitestek közé tartoznak az ilyen kiméra antitestek fragmensei, feltéve, hogy képesek a kívánt biológiai aktivitás kifejtésére [4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Morrison és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984)].

A nem humán (pl. rágcsálóeredetű) antitestek "humanizált" alakjai olyan kimérikus immunglobulinok, immunglobulin-láncok vagy -fragmensek (pl. Fv-, Fab-, Fab'-, F(ab')₂-fragmensek vagy egyéb antigénköötő rész-szekvenciák), amelyek minimális mennyiségű, nem humán immunglobulinból származó szekvenciát tartalmaznak. A humanizált antitestek többnyire olyan humán immunglobulinok (recipiens antitest), amelyekben a recipiens antitest komplementaritást meghatározó régiójának aminosavai egy nem humán fajból (pl. egérből, patkányból vagy nyúlból) származó antitest (donor antitest) komplementaritást meghatározó régiójának aminosavaival vannak helyettesítve. Néhány esetben a humán immunglobulin vázrégiójának (FR) aminosavai nem humán immunglobulin megfelelő aminosavaival vannak helyettesítve. Ezenfelül, a humanizált antitestek olyan aminosava-

kat is tartalmazhatnak, amelyek nem találhatók meg sem a recipiens antitestben, sem az importált CDR- vagy vázszekvenciákban. Ezek a módosítások az antitest további finomítása céljából hajthatók végre. A humanizált antitest általában egy - jellemzően két - variábilis domén lényegében egészét tartalmazza, mely(ek)ben a komplementaritást meghatározó régiók mindegyike vagy lényegében mindegyike megfelel egy nem humán immunglobulin CDR-régióinak, és a vázrégiók mindegyike vagy lényegében mindegyike megfelel egy humán immunglobulin-szekvencia vázrégiójának. A humanizált antitest, adott esetben, egy immunglobulin (jellemzően egy humán immunglobulin) konstans régiójának legalább egy részét is tartalmazza. További részleteket illetően ld. Jones és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Presta: Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593 (1992). A humanizált antitestek közé tartoznak az ún. "főemlősített" (PRIMATIZED™) antitestek, amelyek antigénkötő régiója - makákók adott antigénnel végzett immunizálásával előállított - antitestből származik.

Az "egyláncú Fv-fragmens" vagy "scFv-fragmens" olyan antitest-fragmens, amely egy antitest V_H és V_L doménjeit tartalmazza, oly módon, hogy ezek a domének egyetlen polipeptid-láncon helyezkednek el. Az Fv-polipeptid a V_H és V_L domén között előnyösen egy kapcsoló ("linker") polipeptidet tartalmaz, amely az scFv számára lehetővé teszi az antigénkötéshez szükséges szerkezet kialakítását. Az scFv-fragmensek összefoglaló leírását illetően ld. Plückthun: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" 113,

269 (1994).

A "diatest" kifejezés olyan kis méretű, két antigénkötő helyet tartalmazó antitest-fragmensre vonatkozik, amely nehéz lánc variábilis domént (V_H) könnyű lánc variábilis doménhez (V_L) kapcsolva, egyazon peptidláncon (V_H - V_L) tartalmaz. Az azonos láncon lévő két domén közötti párosodáshoz túl rövid kapcsolópeptid beiktatása révén a domének arra vannak kényszerítve, hogy egy másik lánc komplementer doménjeivel párosodjanak, és így képezzenek két antigénkötő helyet. A diatestek részletesebb leírását ld. pl. EP 404 097 számú európai szabadalmi leírás; WO 93/11161 számú nemzetközi közzétételi irat; és Hollinger és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 (1993).

Az "izolált" antitest kifejezésen egy - természetes környezetében megtalálható - komponenstől elválasztott és/vagy elkülönített antitestet értünk. A természetes környezetben megtalálható szennyező komponensek az antitest diagnosztikai vagy gyógyászati felhasználását akadályoznák; az ilyen komponensek közé tartoznak az enzimek, hormonok és egyéb - proteinszerű vagy nem proteinszerű - oldott anyagok. A találmány előnyös megvalósítási módjai értelmében az antitest tisztításának mértéke a következő: (1) a Lowry-eljárással végzett meghatározás szerint 95 m/m%-nál nagyobb, legelőnyösebben 99 m/m%-nál nagyobb; (2) forgócsészés ("spinning cup") szekvenátor alkalmazásával legalább 15 aminosavas N-terminális vagy belső aminosav-szekvencia kinyeréséhez szükséges tisztaság; vagy (3) redukáló vagy nem redukáló feltételekkel végzett SDS-PAGE-analízissel

(Coomassie-kék vagy, előnyösen, ezüstoffestés alkalmazásával) homogenitásnak megfelelő tisztaság. Az izolált antitest kifejezés jelentése kiterjed a rekombináns sejtekben *in situ* megtalálható antitestre, mivel az ilyen sejtekben az antitest természetes környezetének legalább egy komponense hiányzik. Mindazonáltal, az izolált antitesteket általában legalább egy tisztítási lépést követően kapjuk.

Ahogy a leírásban használjuk, a "mentőreceptor kötő epitóp" kifejezésen egy IgG-molekula (pl. IgG₁, IgG₂, IgG₃ vagy IgG₄) Fc-régiójának olyan epitópját értjük, amely az IgG-molekula vérsavóban mérhető *in vivo* felezési idejének növeléséért felelős.

A "kezelés" kifejezésen terápiás célú, illetve megelőzési célú (profilaktikus) kezelést értünk. A kezelésre szoruló páciensek közé tartoznak a már rendellenességtől szenvedők, illetve azok, akiknél a rendellenesség kifejlődésének megelőzésére van szükség.

A találmány céljaira az "emlős" kifejezésen az emlősök osztályába sorolt állatokat értjük, ideértve az embert, a háziállatokat és gazdasági haszonállatokat, állatkerti állatokat, sportolási, ill. kedvtelési célból tartott állatokat (pl. kutyák, lovak, macskák, szarvasmarhák, stb.). Az emlős kifejezésen előnyösen embert értünk.

A "rendellenesség" kifejezés olyan állapotot jelent, amelyre az anti-ErbB2 antitesttel végzett kezelés jótékony hatású. Az ilyen rendellenességek közé krónikus és akut rendellenességek vagy betegségek tartoznak, ideértve azon kóros állapotokat is, amelyek az emlőst hajlamossá teszik a

szóban forgó rendellenesség kialakulására. A találmány szerinti megoldás értelmében kezelhető rendellenességek példái közé tartoznak, többek között, a következők: jóindulatú és malignáns tumorok; leukózisok és malignáns lymphoid betegségek; valamint egyéb rendellenességek, mint pl. idegsejt-, gliasejt-, asztrocita-, hipotalamusz-, mirigy-, makrofág-, epithelsejt-, stroma-, blasztocöl-, gyulladásos, angiogén és immunológiai rendellenességek

A "terápiás szempontból hatásos mennyiség" kifejezésen egy hatóanyag azon mennyiségét értjük, proliferációt gátló hatás kifejtésére képes. A terápiás szempontból hatásos mennyiség előnyösen apoptózist indukáló aktivitású, és sejthalált - előnyösen jóindulatú vagy malignáns tumorsejtek pusztulását - képes indukálni. A hatékonyság, a kezelni kívánt állapottól függően, szokványos módszerekkel mérhető. Rákkerápia esetében a hatékonyság, például, a betegség progressziós idejének (TTP) mérésével és/vagy a reakció ráta (RR) mérésével határozható meg (ld. 1. példa). A terápiás szempontból hatásos mennyiség cél-vérsavó-koncentrációt (pl. maradék vérsavó-koncentrációt) is jelent, amely bizonyos ideig fennmaradva hatásosnak bizonyult a betegség tüneteinek enyhítésére.

A "rák" és "rákos" kifejezések emlősök olyan fiziológiai állapotára vonatkoznak, amelyek szabályozatlan sejt-szaporodással jellemezhetők. A rákok példái közé tartoznak, többek között, a carcinomák, limfomák, blastomák, sarcomák, leukémiák, valamint a leukózisok és a limfoid malignáns betegségek. A rákok konkrét példái közé tartozik pikkelysejt-

tes rák, kis sejtes és nem kis sejtes tüdőrák, gastro-intestinalis rák, hasnyálmirigy-rák, glioblastoma, méhnyakrák, petefészekrák, májrák, húgyhólyagrák, hepatoma, emlőrák, vastagbélrák, vastag- és végbélrák, endometrium-carcinoma, nyálmirigy-carcinoma, veserák, májrák, prosztatatarák, szeméremtest-rák, pajzsmirigyrák, máj-carcinoma, valamint különféle típusú fej- és nyakrákok.

Ahogy a leírásban használjuk, a "citotoxikus hatóanyag" kifejezésen olyan anyagot értünk, amely gátolja a sejtek működését és/vagy azok elpusztítását eredményezi. A citotoxikus hatóanyagok közé tartoznak a radioaktív izotópok (pl. I^{131} , I^{125} , Y^{90} és Re^{186}); a kemoterápiás hatóanyagok; valamint a toxinok, pl. a kis molekulájú toxinok és az enzimatikusan aktív toxinok, melyek bakteriális, gomba-, növényi vagy állati eredetűek lehetnek (ideértve az ilyen toxinok fragmenseit is).

A "kemoterápiás hatóanyag" kifejezésen rák kezelésére alkalmas vegyületet értünk. A kemoterápiás hatóanyagok példái közé tartoznak a következők: alkilezőszerek, pl. thiotepa és ciklofoszfamid (CYTOXANTM); alkilszulfonátok, pl. buszulfán, improszulfán és piposzulfán; aziridinek, pl. benzodopa, carboquon, meturedopa és uredopa; etilénimineket és metilamelaminok, pl. altretamin, trietilénmelamin, trietilénfoszforamid, trietilén-tiofoszforamid és trimetilolomelamin; nitrogén-mustárok, pl. klórambucil, klórnafazin, chlofoszfamid, esztramusztin, ifoszfamid, meklóretamin, meklóretamin-oxid-hidroklorid, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimusztin, trofoszfamid,

uracil-mustár; nitrosureák, pl. carmustin, chlorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; antibiotikumok, pl. aclacinomicinek, actinomicin, authramicin, azaszerin, bleomicinek, cactinomicin, calicheamicin, carabicin, carminomicin, carzinofilin, chromomicinek, dactinomycin, aunorubicin, doxorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomicin, mitomicinek, mikofenolsav, nogalamicin, olivomicinek, peplomicin, potfiomicin, puromicin, quelamicin, rodoxubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolitok, pl. methotrexát és 5-fluoruracil (5-FU); folsav-analógok, pl. denopterin, methotrexát, pteropterin, trimetrexát; purin-analógok, pl. fludarabin, 6-merkaptopurin, tiamiprin, tioguanin; pirimidin-analógok, pl. ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, didezoxiuridindoxifluridin, enocitabin, floxuridin, 5-FU; androgének, pl. calusteron, dromostanolon-propionát, epitiostanol, mepitiostan, testolakton; mellékvese-hormon elleni hatóanyagok, pl. aminoglutatimid, mitotan, trilostan; folsav-kiegészítők, pl. frolinsav; aceglaton; aldofoszfamid-glikozid; aminolevulinsav; amsacrin; bestrabucil; bisantren; edatraxát; defofamin; demecolcin; diaziquon; elfornitin; elliptinum-acetát; etoglucid; gallium-nitrát; hidroxikarbamid; leninan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podofillinsav; 2-etilhidrazid; prokarbazin; PSK; razozán; sizofiran;

spirogermánium; tenuazonsav; triaziquon; 2,2',2''-triklór-trietilamin; uretán; vindezin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitozin; arabinozid (Ara-C); ciklofoszfamid; tiotepa; taxoidok, pl. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ, USA) és doxataxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Franciaország); chlorambucil; gemcitabin; 6-tioguanin; markaptopurin; methotrexát; platina-analógok, pl. cisplatin és carboplatin; vinblasztin; platina; etoposid (VP-16); ifoszfamid; mitomicin-C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposid; daunomicin; aminopterín; xeloda; ibandronát; CPT-11; topoizomeráz inhibitor RFS 2000; difluor-metilornitin (DMFO); retinasav; esperamicinek; capecitabin; valamint a felsorolt vegyületek gyógyászati szempontból elfogadható sói, savai és származékai. A kemoterápiás hatóanyagok közé tartoznak az anti-hormonális hatóanyagok, amelyek a hormonok tumorokra kifejtett hatását szabályozzák vagy gátolják; ilyenek pl. az anti-ösztrogének, pl. a tamoxifen, raloxifen, aromatázgátló 4(5)-imidazolok, t-hidroxitamoxifen, trioxifén, keoxifén, LY117018, onapriston és toremifén (Fareston); és anti-androgének, pl. flutamid, nilutamid, bicalutamid, leuprolid és goserelin; valamint a felsoroltak gyógyászati szempontból elfogadható sói, savai és származékai.

Ahogy itt használjuk, a "sejtszaporodást gátló hatóanyag" kifejezés olyan vegyületre vagy készítményre vonatkozik, amely *in vitro* vagy *in vivo* gátolja egy sejt - elsősorban ErbB2-receptort termelő ráksejt - szaporodását.

Ilyenformán, a szaporodást gátló hatóanyag jelentős mértékben csökkentheti az S-fázisban lévő ErbB2-termelő sejtek százalékos arányát. A szaporodást gátló hatóanyagok jellemző példái közé tartoznak a sejtciklus előrehaladását (az S-fázistól eltérő ponton) blokkoló hatóanyagok, például, a G1-fázisban vagy az M-fázisban történő megrekedést indukáló anyagok. A klasszikus M-fázis blokkolók közé tartoznak a vinca-vegyületek (pl. vincristin és vinblastin), a taxánok és topo-II-inhibitorok, pl. doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposid és bleomycin. A G1-fázist feltartóztató hatóanyagok S-fázisban történő blokkolásba is átnyúlhatnak, mint pl. a DNS-alkilező szerek (pl. tamoxifen, prednison, dacarbazin, mechlorethamin, cisplatin, methotrexat, 5-fluoruracil és ara-C. További részleteket illetően ld. "The Molecular Basis of Cancer", szerk.: Mendelsohn és Israel, 1. fejezet, Murakami és Matsui.: "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (WB Saunders; Philadelphia, 1995), különös tekintettel a 13. oldalra. Erre a célra a 4D5-antitest (és funkcionális megfelelői) szintén alkalmazhatók.

A "doxorubicin" egy anthraciklin típusú antibiotikum, amelynek teljes kémiai neve a következő: (8S-cisz)-10-[(3-amino-2,3,6-tridezoxi- α -L-lixo-hexopiranozil)-oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxil-acetil)-1-metoxi-5,12-naftacéndion.

A "citokin" kifejezés egy adott sejtpopuláció által kiválasztott - intercelluláris mediátorként más sejtekre ható - proteinek általános elnevezése. Az ilyen citokinek

jellemző képviselői a limfokinek, monokinek és a szokványos polipeptid hormonok. A citokinek közé tartoznak a növekedési hormonok, mint pl. a humán növekedési hormon, a humán növekedési hormon N-metionil-származéka, és a szarvasmarha növekedési hormon; parathyroid hormon; tiroxin; inzulin; proinzulin; relaxin; prorelaxin; glikoprotein hormonok, pl. follikulusz-stimuláló hormon (FSH), pajzsmirigy-stimuláló hormon (TSH) és luteinizáló hormon (LH); májeredetű növekedési faktor; fibroblaszt növekedési faktor; prolaktin; méhlepény-eredetű laktogén; tumornekrozis faktor- α és - β ; müllerianosist gátló szubsztancia; egéreredetű gonadotropin-asszociált peptid; inhibin; aktivin; vascularis endothelialis növekedési faktor; integrin; trombopoietin (TPO); idegsejt növekedési faktorok, pl. NGF- β ; vérlemezke-eredetű növekedési faktor; transzformáló növekedési faktorok (TGF-ek), pl. TGF- α és TGF- β ; inzulinszerű növekedési faktor-I és -II; eritropoietin (EPO); oszteoinduktív faktorok; interferonok, pl. interferon- α , - β és - γ ; kolonizációt stimuláló faktorok (CSF-ek), pl. makrofág-eredetű CSF (M-CSF), granulocita-makrofág-eredetű CSF (GM-CSF), és granulocita-eredetű CSF (G-CSF); interleukinek (IL-ek), pl. IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; továbbá egyéb polipeptid-faktorok, pl. LIF és kit-ligandum (KL). Ahogy a leírásban használjuk, a "citokinek" kifejezés jelentése természetes forrásokból vagy rekombináns sejttenyészetből származó proteinek (illetve a natív szekvenciájú citokinek biológiai aktivitású ekvivalenseire) egyaránt kiterjed.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, a "pro-drog" kifejezésen egy gyógyászatiilag aktív vegyület prekursorát vagy származékát értjük, amely a tumorsejtekre az eredeti hatóanyagnál (drognál) kevésbé citotoxikus, és enzimati- kusan a nagyobb aktivitású eredeti alakká aktiválható, il- letve alakítható [ld. pl. Wilman: Biochemical Society Transactions 14, 375 (1986); és Stella és mtsai.: "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", a "Directed Drug Delivery" című kiadvány (szerk.: Borchardt és mtsai., Humana Press) 247-267. oldalain (1985)]. A ta- lálmány szerinti pro-drogok közé tartoznak, többek között, a következők: foszfáttartalmú pro-drogok, tiofoszfát- tartalmú pro-drogok, szulfáttartalmú pro-drogok, peptidtartalmú pro-drogok, D-aminosavval modifikált pro- drogok, glikozilált pro-drogok, β -laktám-tartalmú pro- drogok, adott esetben szubsztituált fenoxi-acetamid- tartalmú pro-drogok, adott esetben szubsztituált fenil- acetamid-tartalmú pro-drogok, 5-fluorcitozin és egyéb 5- fluoruridin pro-drogok, amelyek nagyobb aktivitású, szabad citotoxikus drogokká alakíthatók. A találmány szerinti fel- használás céljából pro-drog alakká derivatizálható citotoxikus drogok példái közé tartoznak, többek között, a fentebb említett kemoterápiás hatóanyagok.

A "szilárd fázis" kifejezésen olyan nem vizes közeget értünk, amelyhez a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazott antitestek kötődni képesek. Az ilyen szilárd fázisok példái közé tartoznak a részben vagy egészben üveg- ből (pl. szabályozott pórusméretű üvegből), poliszacha-

ridokból (pl. agarózból), poliakrilamidokból, polisztirolból, polivinilalkoholból vagy szilikonokból készített szilárd fázisok. A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban, a szövegösszefüggéstől függően, a szilárd fázis egy vizsgálati tálca ürege, más esetekben tisztítóoszlop (pl. affinitás-kromatográfás oszlop) lehet. A szilárd fázis jelentése kiterjed a különálló részecskékből álló, nem folytonos szilárd fázisokra is [ld. pl. 4 275 149 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás].

A "liposzóma" kifejezésen kisméretű vezikulát értünk, amely különféle típusú lipidekből, foszfolipidekből és/vagy felületaktív anyagokból áll, és hatóanyagok (pl. találmány szerinti anti-ErbB2 antitestek és, adott esetben, kemoterápiás hatóanyag) emlősnek történő adagolására alkalmazhatók. A liposzóma komponensei rendszerint kettős réteg formátumban vannak elrendeződve (hasonlóan a biológiai membránok lipidelrendeződéséhez).

A "beteg tájékoztató" kifejezésen gyógyászati termékekhez általánosan mellékelte útmutatót értünk, amely a gyógyászati termék alkalmazására vonatkozó indikációkat, a gyógyszer dozírozását, adagolási módját, ellenjavallatait és/vagy figyelmeztetéseket tartalmaz.

A "vérsavó-koncentráció", "vérsavó hatóanyag-koncentráció" vagy "vérsavó HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest-koncentráció" kifejezéseken egy hatóanyag (pl. HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest) - a hatóanyaggal kezelt állat vagy ember vérsavójában mért - koncentrációját értjük. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációját elő-

nyösen immuneszttel (például, a leírásban ismertetett módon végrehajtott ELISA-teszttel) határozzuk meg.

A "csúcs vérsavó-koncentráció" kifejezés a hatóanyag állatnak vagy embernek történő beadása után rövid idővel (miután a hatóanyag a vérkeringésben már eloszlott, de a szövetekben eloszlása, metabolizmusa vagy kiválasztása még nem következett be) mérhető maximális vérsavó hatóanyag-koncentrációra vonatkozik.

A "maradék vérsavó-koncentráció" kifejezésen azt a vérsavó hatóanyag-koncentrációt értjük, amely több dózis adagolása esetén egy előző dózis beadása után, és közvetlenül a következő dózis beadása előtt mérhető. A maradék vérsavó-koncentráció általában a sorozatos hatóanyag-adagolás során tapasztalható minimális fennmaradó hatásos hatóanyag-koncentrációnak felel meg. A maradék vérsavó-koncentrációt gyakran - a hatékonyság szempontjából - minimális vérsavó-koncentrációként célozzuk meg, mivel azt a vérsavó-koncentrációt reprezentálja, amelynél (a kezelési séma részeként) egy következő hatóanyag-dózis kerül beadásra. Ha a hatóanyagot intravénásan adagoljuk, a maradék vérsavó-koncentráció legelőnyösebben a kezdeti lökésdózisos hatóanyag-beadáستól egy napon belül érjük el. Szubkután adagolás esetén a csúcs vérsavó-koncentrációt előnyösen három nap alatt vagy még rövidebb idő alatt érjük el. A találmány szerinti megoldás értelmében a maradék vérsavó-koncentrációt - az említett hatóanyag-adagolási módszerek bármelyikének alkalmazása esetén - előnyösen négy vagy kevesebb hét alatt, előnyösen három vagy kevesebb hét alatt,

előnyösebben két hét vagy még rövidebb idő alatt, legelőnyösebben egy hét vagy még rövidebb idő alatt érjük el.

Az "intravénás infúzió" kifejezésen a hatóanyagnak egy állat vagy ember vénájába - általában öt percnél hosszabb ideig, előnyösen kb. 30-90 percig - történő adagolását értjük (bár a találmány szerinti megoldás értelmében az intravénás infúzió akár tíz óra hosszát is adagolható).

Az "intravénás bolus" kifejezésen a hatóanyagnak egy állat vagy ember vénájába történő - hozzávetőleg 15 perc vagy rövidebb, előnyösen 5 perc vagy rövidebb időtartamú - adagolását értjük.

A "szubkután adagolás" kifejezésen a hatóanyag megfelelő tartályból állat vagy ember bőre alá (előnyösen a bőr és az alatta lévő szövet közötti zsebbe) történő, viszonylag lassú, hosszú időtartamú adagolását értjük. A "zseb" a bőr összezsíródásával és az alatta lévő szövetről történő felemelésével hozható létre.

A "szubkután infúzió" kifejezésen a hatóanyag megfelelő tartályból állat vagy ember bőre alá (előnyösen a bőr és az alatta lévő szövet közötti zsebbe) történő, viszonylag lassú, hosszú (például, 30 perc vagy rövidebb, vagy 90 perc vagy rövidebb) időtartamú adagolását értjük. Az infúziós adagolást, adott esetben, az állat vagy ember bőre alá ültetett hatóanyag-pumpa alkalmazásával végezzük, mely pumpa a hatóanyag előre meghatározott mennyiségét előre meghatározott ideig (pl. 30 percig, 90 percig vagy a kezelési séma idejének megfelelő ideig) adagolja.

A "szubkután bolus" kifejezésen a hatóanyag állat vagy

ember bőre alá történő - előnyösen kb. 15 percnél rövidebb, még előnyösebben 5 percnél rövidebb, legelőnyösebben 60 másodpercnél rövidebb ideig tartó - adagolását értjük. Az adagolást előnyösen a bőr és az alatta lévő szövet közötti zsebbe végezzük, amely a bőr összecsiszításával és az alatta lévő szövetről történő felemelésével hozható létre.

A hatóanyag-adagolás vonatkozásában a "kezdőlökés dózis" vagy "lökésterápia" ("front loading") kifejezésen azt értjük, hogy egy kezdeti nagyobb dózis beadása után, meghatározott időközönként, azonos vagy kisebb dóziseket adagolunk. A kezdeti nagyobb dózis vagy dózisek azt eredményezik, hogy az állatban vagy emberben a vérsavó hatóanyag-koncentrációja korábban éri el a hatékony cél-vérsavó-koncentrációt. A találmány szerinti megoldás értelmében a lökésterápiát úgy hajtjuk végre, hogy az állatnak vagy páciensnek olyan kezdődózist vagy kezdődózis-sorozatot adagolunk (három héten át vagy rövidebb ideig), miáltal a hatóanyag koncentrációja meghatározott maradék cél-vérsavó-koncentrációra áll be. A kezdeti -feltöltési dózist vagy dózissorozatot két hét vagy rövidebb idő alatt, előnyösebben egy hét vagy rövidebb idő alatt (pl. egy nap alatt vagy még rövidebb idő alatt) adjuk be. Amennyiben kezdődózisként dózissorozatot adagolunk, az egyes dózisek beadása között legalább három órának, de legfeljebb három hétnek, előnyösen legfeljebb két hétnek, még előnyösebben legalább egy hétnek, legelőnyösebben legfeljebb egy napnak kell eltelnie. Az antitest-hatóanyag (pl. anti-ErbB2 antitest, pl. HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest) elleni zavaró immunreakció

elkerülése érdekében, olyan páciensekben, akiket korábban az antitesttel nem kezeltek, az antitest kezdődózisát előnyösen intravénás infúzióval adagoljuk. A találmány szerinti megoldás értelmében a kezdő és fenntartó dózisok lökés-terápiás hatóanyag-bejuttatását infúziós vagy bolus adagolással (intravénásan vagy szubkután) végezzük.

Az anti-ErbB2 antitestekre vonatkozó publikált információkat illetően ld. a következő szabadalmi leírásokat és közzétett szabadalmi bejelentéseket: PCT/US89/00051 (1989. január 5.); PCT/US89/02697 (1990. május 18.); EU 0474727 (1997. július 23.); DE 69031120.6 (1997. július 23.); PCT/US89/18385 (1997. október 9.); SA 97/9185 (1997. október 14.); US 5677171 (1997. október 14.); US 5720937 (1998. február 24.); US 5720954 (1998. február 24.); US 5725856 (1998. március 10.); US 5770195 (1998. június 23.); US 5772997 (1998. június 30.); PCT/US98/2626 (1998. december 10.); és PCT/US99/06673 (1999. március 26.); melyeket teljes terjedelmükben a kitanítás részének tekintünk.

II.) Anti-ErbB2 antitestek előállítása

A következőkben a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazott antitestek előállításának jellemző technikáit ismertetjük. Az antitestek termeltetésére ErbB2-antigénként, például, az ErbB2 extracelluláris doménjének szolubilis alakját vagy annak - kívánt építópót tartalmazó - részét alkalmazzuk. Más módon, antitestek termeltetésére sejtfelületükön ErbB2-t termelő sejtek alkalmazhatók [pl.

ErbB2 túltermelése céljából transzformált NIH-3T3-sejtek vagy carcinoma-sejtvonal, pl. SK-BR-3-sejtek; ld. Stancovski és mtsai.: PNAS (USA) 88, 9691 (1991)]. Az ErbB2 - antitestek létrehozására alkalmas - egyéb alakjai szakember számára jól ismertek.

(i) Poliklonális antitestek

A poliklonális antitesteket előnyösen állatokban, a megfelelő antigén és adjuváns többszöri szubkután (s.c.) vagy intraperitoneális (i.p.) injektálásával termeltetjük. A releváns antigént előnyös lehet olyan proteínhez konjugálni, amely az immunizálni kívánt fajban immunogén hatású. Az ilyen proteinek példái a "keyhole limpet" hemocianin, a szérumalbumin, a szarvasmarha-eredetű thyroglobulin és a szójabab tripszín-inhibitor. A konjugálás bifunkciós vagy derivatizáló ágens alkalmazásával történhet, például, maleimidobenzoil-szulfoszukcinimid-észter (konjugálás cisteineken keresztül), N-hidroxiszukcinimid (konjugálás lizineken keresztül), glutáraldehid, borostyánkősav-anhidrid, SOCl_2 vagy $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (amelyben R és R^1 jelentése egymástól eltérő alkilcsoport) alkalmazásával.

Az állatokat az antigén, az immunogén konjugátumok vagy származékok ellen úgy immunizáljuk, hogy a protein vagy a konjugátum, például, 100 μg -ját (nyulak esetében), illetve 5 μg -ját (egerek esetében) háromszoros térfogatú Freund-féle komplett adjuvánssal elegyítjük, és az oldatot intradermálisan az állat testének több pontjába injektál-

juk. Egy hónap elteltével az állatoknak - több helyre adott szubkután injekcióval - a peptid vagy konjugátum eredeti mennyiségének $1/5-1/10$ -ével (Freund-féle komplett adjuvánsban) emlékeztetőoltást adunk. 7-14 nappal később az állatokból vért veszünk, és a vérsavóban meghatározzuk az antitest-titert. Az emlékeztetőoltásokat addig ismételjük, míg az antitest-titer platót nem ér el. Az állatoknak az emlékeztetőoltást előnyösen azonos antigén (de eltérő proteinnel és/vagy eltérő keresztkötő reagenssel képzett) konjugátumával végezzük. A konjugátumok rekombináns sejtenyészeten, fúziós proteineként is előállíthatók. Az immunreakció serkentésére aggregációt elősegítő hatóanyagok (pl. alumínium-hidroxid, "alum") is alkalmazhatók.

(ii) Monoklonális antitestek

A monoklonális antitestek lényegében homogén antitestek populációjából származnak, vagyis a populációt alkotó egyes antitestek egymással azonosak (a minimális mennyiségben esetlegesen előforduló természetes mutációktól eltekintve). Ilyenformán, a "monoklonális" jelző az antitestek azon tulajdonságára vonatkozik, hogy nem különböző antitestek elegyeként léteznek.

A monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással, valamint rekombináns DNS-technikák (4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) alkalmazásával állíthatók elő.

A hibridóma-eljárás során egeret vagy egyéb alkalmas gazdaállatot (pl. hörcsögöt) a fentebb leírtak szerint immunizálunk, hogy olyan limfociták termelődését váltsuk ki, amelyek az immunizálásra alkalmazott proteinhez specifikusan kötődő antitesteket termelnek (illetve azok termelésére képesek). Más módon, a limfocitákat in vitro immunizálhatjuk. Ezt követően a limfocitákat megfelelő fuzionáltató ágens (pl. polietilén-glikol) alkalmazásával myelomasejtekhez fuzionáltatjuk, miáltal hibridómasejteket kapunk [Godíng: "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", 59-103. old., Academic Press (1986)].

Az így létrehozott hibridómasejteket megfelelő - előnyösen a fuzionálatlan kiindulási myelomasejtek szaporodását és túlélését gátló egy vagy több anyagot tartalmazó - tenyésztő tápközegben szaporítjuk. Például, ha a kiindulási myelomasejtekből hiányzik a hipoxanthin guanin foszforibozil transzferáz enzim (HGPRT vagy HPRT), a hibridómák tenyésztésére rendszerint hipoxanthint, aminopterint és timidint tartalmazó tápközeget (HAT-tápközeg) alkalmazunk, amely gátolja a HGPRT-deficiens sejtek szaporodását.

A fuzionáltatásra előnyösen olyan myelomasejteket alkalmazunk, amelyek hatékonyan fuzionálhatók; elősegítik a kiválasztott antitest-termelő sejtek stabil és nagymértékű antitest-termelését; és valamely tápközegre (pl. HAT-tápközegre) érzékenyek. Ezek közül előnyösen egérs eredetű myelomasejteket alkalmazunk; ilyenek például a MOPC-21 és MPC-11 egértumorokból származó sejtvonalak (Salk Institute

Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornia, USA) és az SP-2 vagy X63-Ag8-653 sejtek (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). Humán monoklonális antitestek termelésére humán myelomasejtek és egér/humán heteromyelomasejtek alkalmazását is leírták [ld. Kozbor: J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur és mtsai.: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", 51-63. old., Marcel Dekker, Inc., New York (1987)]].

A tenyésztő tápközeget (amelyben a hibridómasejteket szaporítottuk) az antigén elleni monoklonális antitestek termelődésére vizsgáljuk. A hibridómasejtek által termelt monoklonális antitestek kötési specifikitását előnyösen immunprecipitációval vagy *in vitro* kötődési teszttel - pl. radioimmun-teszttel (RIA) vagy enzimmötött immunszorbens vizsgálati eljárással (ELISA) - határozzuk meg.

A monoklonális antitest kötési affinitása, például, a Munson és mtsai. [Anal. Biochem. 107, 220 (1980)] által leírt Scatchard-analízissel határozható meg.

A kívánt specifikitású, affinitású és/vagy aktivitású antitesteket termelő hibridómasejtek azonosítása után a klónokat limitáló hígítással szubklónozzhatjuk és szokványos eljárásokkal szaporíthatjuk [ld. Goding: "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", 59-103. old. (Academic Press, 1986)]. Az e célra alkalmas tenyésztő tápközegek példái közé tartozik a D-MEM és az RPMI-1640 tápközeg. Más módon, a hibridómasejtek hasúri tumorokként állatokban *in vivo* is szaporíthatók.

A szubklónok által kiválasztott monoklonális antites-

teket előnyösen hagyományos immunglobulin-tisztítási technikák (pl. protein-A Sepharose, hidroxilapatit-kromatográfia, gélelektroforézis, dialízis vagy affinitási kromatográfia) alkalmazásával választjuk el a tenyésztő tápközegtől, hasúri folyadéktól vagy vérsavótól.

A monoklonális antitesteket kódoló DNS-ek szokványos eljárásokkal egyszerűen izolálhatók és szekvenálhatók (pl. specifikusan az egérreredetű antitestek nehéz, ill. könnyű láncát kódoló génekhez hibridizáló oligonukleotid-próbák alkalmazásával). Az ilyen DNS-ek előnyös forrásául hibridómasejtek szolgálnak. Izolálás után a DNS-t expressziós vektorokba inszertálhatjuk, és a vektorokkal gazdasejteket - pl. *E. coli* sejteket, majomeredetű COS-sejteket, kínai hőrccsög petefészek (CHO) sejteket vagy myelomasejteket (melyek egyébként immunglobulin-proteint nem termelnek) - transzfektálhatunk, miáltal a rekombináns gazdasejtekben monoklonális antitestek termelődnek. Az antitestet kódoló DNS baktériumokban rekombináns módszerekkel történő előállítását illetően ld. pl. Skerra és mtsai.: *Curr. Opinion in Immunol.* 5, 256 (1993); Plückthun: *Immunol. Revs.* 130, 151 (1992).

A találmány egyéb megvalósítási módjainak megfelelően az antitestek vagy antitest-fragmensek a McCafferty és mtsai. [*Nature* 348, 552 (1990)] által leírt technikák alkalmazásával létrehozott antitest-fádkönyvtárakból izolálhatók. Clarkson és mtsai. [*Nature* 352, 624 (1991)] és Marks és mtsai. [*J. Mol. Biol.* 222, 581 (1991)] egérreredetű, illetve humán antitestek fádkönyvtárak alkalmazásával történő

izolálását írták le. Később ismertették a nagy (nM nagyságrendű) affinitású humán antitestek lánc-kombinálással ("chain-shuffling") történő előállítását [ld. Marks és mtsai.: *Bio/Technology* 10, 779 (1992)]. Ezen túlmenően, a kombinatorikus infekciót és *in vivo* rekombinációt, mint a nagyon nagyméretű fágkönyvtárak előállításának stratégiáját írták le [Waterhouse és mtsai.: *Nucl. Acids Res.* 21, 2265 (1993)]. Ilyenformán, ezek a technikák a monoklonális antitestek izolálásának hagyományos hibridóma-technikáinak működőképes alternatívái.

Az antitestet kódoló DNS, például, úgy módosítható, hogy a humán nehéz és könnyű lánc konstans doménjeinek kódolószekvenciájával egéreredetű antitestek homológ szekvenciáit helyettesítjük [4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Morrison és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851 (1984)], vagy az immunglobulin kódolószekvenciájához kovalens kötéssel egy nem immunglobulin-polipeptid kódolószekvenciájának egészét vagy részét kapcsoljuk.

Az ilyen nem immunglobulin-polipeptidekkel rendszerint az antitestek konstans doménjeit helyettesítjük, vagy más módon, egy antitest egy antigén-kombinálódási helyének variábilis doménjeit helyettesítjük velük, hogy olyan bivalens kiméra antitestet hozzunk létre, amely egy bizonyos antigénre specifikus antigén-kombinálódási helyet, valamint egy másik antigénre specifikus antigén-kombinálódási helyet tartalmaz.

(iii) Humanizált és humán antitestek

A nem humán antitestek humanizálási eljárásainak leírása az idevonatkozó szakirodalomban megtalálható. A humanizált antitest előnyösen egy vagy több, nem humán forrásból származó aminosavat tartalmaz. Ezeket a nem humán aminosavakat gyakran "import" aminosavaknak nevezzük, melyek rendszerint egy "import" variábilis doménből származnak. Az antitestek humanizálását lényegében Winter és mtsai. eljárásával hajtjuk végre [Jones és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Verhoyen és mtsai.: Science 239, 1534 (1988)], oly módon, hogy egy humán antitest megfelelő szekvenciáit rágcslóeredetű antitestből származó komplementaritást meghatározó régiókkal (CDR) vagy CDR-szekvenciákkal helyettesítjük. Ennek megfelelően, az ilyen "humanizált" antitestek kimérikus antitestek (ld. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), amelyekben az antitest - teljes humán variábilis doménnél lényegesen kisebb - része van helyettesítve egy nem humán fajból származó, megfelelő szekvenciával. A gyakorlatban a humanizált antitestek rendszerint olyan humán antitestek, amelyekben a hipervariábilis régió néhány aminosava - és esetleg a vázrégió (FR) néhány aminosava - rágcslóeredetű antitestek analóg pozícióiból származó aminosavakkal van helyettesítve.

Az antigenitás csökkentése szempontjából nagy jelentősége van a humanizált antitestek létrehozására alkalmazandó (nehéz és könnyű láncból származó) humán variábilis domének kiválasztásának. Az úgynevezett "legjobb egyezés" módszer szerint egy rágcslóeredetű antitest variábilis doménjének

szekvenciáját ismert humán variábilis domének szekvenciáit tartalmazó teljes könyvtárral szemben szelektáljuk. A rágcsálóeredetű szekvenciával legközelebbi egyezést mutató humán szekvenciát a humanizált antitest humán vázrégiójának (FR) fogadjuk el [Sims és mtsai.: J. Immunol. 151, 2296 (1993); Chothia és mtsai.: J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)]. Egy másik módszer szerint a könnyű vagy nehéz láncok tekintetében egy adott alcsoportba összes humán antitest konszenzus-szekvenciájából származó vázrégiót alkalmazunk. Több különböző humanizált antitesthez ugyanaz a vázrégió használható [Carter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992); Presta és mtsai.: J. Immunol. 151, 2623 (1993)].

Lényeges továbbá, hogy az antitestek a humanizálást követően is megtartsák az antigénre vonatkozó affinitásukat és egyéb kedvező biológiai tulajdonságaikat. Ennek érdekében, az egyik előnyös eljárás szerint, a humanizált antitesteket a kiindulási szekvenciák és a különböző lehetséges humanizált termékek - háromdimenziós modellek felhasználásával végzett - analizálását követően állítjuk elő. Az immunglobulinok háromdimenziós modelljei széles körben hozzáférhetők és szakember számára jól ismertek. Számítógépes programok állnak rendelkezésre a kiválasztott lehetséges immunglobulin-szekvenciák valószínű háromdimenziós konformációs struktúráinak illusztrálására és megjelenítésére. Az így megjelenített struktúrák tanulmányozása elősegíti az egyes aminosavaknak a lehetséges immunglobulin-szekvencia működésében betöltött szerepének vizsgálatát, azaz a lehet-

séges immunglobulin antigénhez kötődő képességét befolyásoló aminosavak vizsgálatát. Ezen a módon kiválaszthatók a vázrégió aminosavai, és a recipiens és import szekvenciákból úgy kombinálhatók, hogy a kívánt antitest-tulajdonságokat (pl. a célantigén(ek)re vonatkozó fokozott affinitás) kapjuk. A komplementaritást meghatározó régió aminosavai általában közvetlenül és jelentős mértékben játszanak szerepet az antigénkötés befolyásolásában.

Más módon, lehetőség van olyan transzgenikus állatok (pl. egerek) létrehozására, amelyek immunizálást követően - endogén immunglobulin-termelődés nélkül - képesek a humán antitestek teljes repertoárjának termelésére. Például, leírták, hogy kiméra és csíravonal-mutáns egerekben az antitest nehéz lánc kapcsolódási régiójának (J_H) génjében bekövetkezett homozigóta deléció az endogén antitest-termelődés teljes gátlását eredményezi. A humán csíravonal-eredetű immunglobulin-gének ilyen csíravonal-mutáns egerekbe történő bejuttatása - antigén-stimulus hatására - humán antitestek termelődését eredményezi [ld. pl. Jakobovits és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551 (1993); Jakobovits és mtsai.: Nature 362, 255 (1993); Bruggermann és mtsai.: Year in Immuno. 7, 33 (1993)]. A humán antitestek fágon való megjelenítési ("phage-display") könyvtárakból is származtathatók [ld. Hoogenboom és mtsai.: J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks és mtsai.: J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)].

(iv) Antitest-fragmensek

Az antitest-fragmensek előállítására különféle technikákat fejlesztettek ki. Ezek a fragmensek, hagyományos módon, ép antitestek proteolitikus emésztésével hozhatók létre [ld. Morimoto és mtsai.: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24, 107 (1992); és Brennan és mtsai.: *Science* 229, 81 (1985)], azonban e fragmensek rekombináns gazdasejtek alkalmazásával közvetlenül is termeltethetők. Például, az antitest-fragmensek a fentebb leírt antitest fág-könyvtárakból izolálhatók. Más módon, a Fab'-SH fragmensek *E. coli*-ból közvetlenül kinyerhetők, és kémiai kapcsolással F(ab')₂-fragmensekké alakíthatók [Carter és mtsai.: *Bio/Technology* 10, 163 (1992)]. Egy másik lehetőség szerint az F(ab')₂-fragmensek közvetlenül rekombináns gazdasejt-tenyészetből izolálhatók. Az antitest-fragmensek előállításának egyéb technikái szakember számára jól ismertek. Más megvalósítási módokban a kiválasztott antitest egyláncú Fv-fragmens (scFv; ld. WO 93/16185 számú nemzetközi közzétételi irat)

(v) Bispecifikus antitestek

A bispecifikus antitestek olyan antitestek, amelyek legalább két különböző epitópra specifikusak. A jellemző bispecifikus antitestek az ErbB2-protein két különböző epitópjához képesek kötődni. Például, az egyik kar az ErbB2 1. doménjében lévő epitóphoz (pl. 7C2/7F3-epitóphoz), a másik kar pedig az ErbB2 egy másik epitópjához (pl. a 4D5-epitóphoz) kötődik. Más bispecifikus antitestekben az ErbB2

kötőhely EGFR-t, ErbB3-at és/vagy ErbB4-et megkötő kötőhely-lyel van kombinálva. Más módon, egy ErbB2-t megkötő kar olyan antitest-karral kombinálható, amely leukocitán lévő trigger-molekulához - pl. T-sejt-receptor molekulához (pl. CD2 vagy CD3) vagy IgG Fc-receptorához (FcγR), pl. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) és FcγRIII (CD16) - kötődik, miáltal a celluláris védekező mechanizmus az ErbB2-t termelő sejtre összpontosítható. A bispecifikus antitestek arra is alkalmazhatók, hogy a citotoxikus hatóanyagokat az ErbB2-t termelő sejtekre lokalizáljuk. Az ilyen antitestek ErbB2-t megkötő karból, illetve a citoxikus hatóanyaghoz (pl. szaporinhoz, anti-interferon-α-hoz, vinca-alkaloidhoz, ricin A-lánchoz, methotrexáthoz vagy radioaktív izotópos hapténhez) kötődő karból állnak. A bispecifikus antitestek teljes hosszúságú antitestként vagy antitest-fragmensként állíthatók elő (pl. F(ab')₂ bispecifikus antitestek).

A bispecifikus antitestek előállítási eljárásai szakember számára jól ismertek. A teljes hosszúságú bispecifikus antitestek szokványos előállítási módja két immunglobulin nehéz lánc/könnyű lánc pár együttes expresszáltatásán alapul [a két lánc különböző specifitású; Millstein és mtsai.: *Nature* 305, 537 (1983)]. Az immunglobulin nehéz és könnyű láncainak véletlenszerű választéka miatt e hibridómák (kvadrómák) potenciálisan tíz különböző antitest-molekula elegyét termelik, melyek közül csupán egy rendelkezik a megfelelő bispecifikus szerkezettel. A megfelelő molekula - általában affinitási kromatográfiával végzett - tisztítása igen munkaigényes, és a kitermelési szá-

zaléka alacsony. Hasonló eljárások leírását illetően ld. a WO 93/08829 számú nemzetközi közzétételi iratot, valamint Traunacker és mtsai.: EMBO J. 10, 3655 (1991).

Egy másik lehetőség szerint az antitestek kívánt kötési specifitású variábilis doménjeit (antitest-antigén kombinálódási helyek) immunglobulin konstans domén szekvenciáihoz fuzionáljuk. A fúziót előnyösen egy immunglobulin nehéz lánc konstans doménjével valósítjuk meg, amely a csukló- ("hinge"), CH2- és CH3-régió legalább egy részét tartalmazza. Előnyös, ha a konstans domén tartalmazza - a könnyű lánchoz történő kötődéshez szükséges helyet magában foglaló - első nehéz lánc konstans régiót (CH1). Az immunglobulin nehéz lánc fúziókat - és kívánt esetben az immunglobulin nehéz láncot - kódoló DNS-eket külön expressziós vektorokba inszertáljuk, és azokat együttesen megfelelő gazdaorganizmusba transzfektáljuk. Ez nagy rugalmasságot biztosít a három polipeptid relatív arányának beállításában, azon megvalósítási módokban, ahol az optimális hozam elérése érdekében a konstrukcióban a három különböző polipeptid-láncot nem azonos arányokban alkalmazzuk. Mindazonáltal, lehetőség van arra is, hogy két vagy mindhárom polipeptid-lánc kódolószekvenciáját egyazon expressziós vektorba inszertáljuk (olyan esetekben, ha legalább két polipeptid-lánc azonos arányban történő expressziója eredményezi a nagy hozamot vagy ha a láncok relatív arányának nincs különösebb jelentősége).

E megoldás egy előnyös megvalósítási módja értelmében a bispecifikus antitestek - az egyik karon - hibrid immun-

globulin nehéz láncból (első kötő-specifitás) és - a másik karon - egy hibrid immunglobulin nehéz lánc/könnyű lánc párból (második kötő-specifitást biztosítva) állnak. Azt találtuk, hogy ez az asszimmetrikus struktúra elősegíti a kívánt bispecifikus vegyület nem kívánatos immunglobulin-lánckombinációktól történő elválasztását, mivel az immunglobulin könnyű láncnak a bispecifikus molekula csupán egyik felében való jelenléte egyszerű elkülönítést tesz lehetővé. E megoldás leírását ld. a WO 94/04690 számú nemzetközi közzétételi iratot. A bispecifikus antitestek előállításának további részleteit illetően ld. pl. Suresh és mtsai.: *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

Egy másik megoldás (ld. WO 96/27011 számú nemzetközi közzétételi irat) szerint a rekombináns sejttenyészetből kinyerhető heterodimerek százalékos arányának maximalizálása érdekében antitest-molekula pár közötti határfelület alakítható ki. Az előnyös határfelület egy antitest konstans doménje C₃-doménjének legalább egy részét tartalmazza. Az eljárás során az első antitest-molekula határfelületéből egy vagy több kisméretű aminosav-oldalláncot nagyobb oldallánccal (pl. tirozin vagy triptofán) helyettesítünk. A második antitest-molekula határfelületén a nagy oldallánc(ok)éval azonos vagy hasonló méretű kompenzáló "üregeket" hozhatunk létre, oly módon, hogy a nagyobb aminosav-oldalláncokat kisebbekre (pl. alaninra vagy treoninra) cseréljük. Ez a mechanizmus a heterodimer jobb hozamát biztosítja (a nem kívánatos végtermékekhez, pl. homodimerekhez viszonyítva).

A bispecifikus antitestek közé tartoznak a keresztkötéses vagy "heterokonjugált" antitestek is. Például, a heterokonjugátum egyik antitest-komponense avidinhoz, a másik biotinhoz lehet konjugálva. Az ilyen antitestek, például, az immunrendszer nemkívánatos sejtek ellen történő irányítására (ld. 4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), illetve HIV-fertőzés kezelésére alkalmazhatók (ld. WO 91/00360 és WO 92/200373 számú nemzetközi közlési irat, valamint EP 03089 számú európai szabadalmi leírás). A heterokonjugált antitestek tetszőleges keresztkötési eljárással állíthatók elő. Az alkalmas keresztkötésképző reagensek szakember számára jól ismertek (ld. a 4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást, amelyben több keresztkötési technikát is feltártak).

A bispecifikus antitestek antitest-fragmensekből történő előállításának technikái a szakirodalomból szintén jól ismertek. Például, a bispecifikus antitestek előállíthatók kémiai kapcsolás alkalmazásával. Brennan és mtsai. [Science 229, 81 (1985)] eljárásában az intakt antitesteket proteolitikusan emésztve $F(ab')_2$ -fragmenseket hoznak létre, majd ezeket a fragmenseket - a vicinális ditiolok stabilizálása és az intermolekuláris diszulfid-képződés megakadályozása érdekében ditiol komplexáló ágens (nátrium-arzenit) jelenlétében redukálják. Az így kapott Fab' -fragmenseket tio-nitrobenzoát (TNB) származékokká alakítják, majd az Fab' -TNB származékok egyikét merkapto-etilaminnal végzett redukcióval visszalakítják Fab' -tiollá, és azt a másik Fab' -TNB származék ekvimoláris mennyiségével elegyítik, mi-

által a bispecifikus antitesthez jutnak. Az így létrehozott bispecifikus antitestek enzimek szelektív immobilizálására alkalmazhatók.

Az utóbbi években lehetővé vált a Fab'-SH fragmensek *E. coli* sejtekből történő közvetlen kinyerése. E fragmensek kémiai kapcsolásával bispecifikus antitestek hozhatók létre. Shalaby és mtsai. [J. Exp. Med. 175, 217 (1992)] teljesen humanizált bispecifikus antitest F(ab')₂ molekula előállítását tárták fel. Mindként Fab'-fragmenst külön-külön *E. coli*-val termeltették, és a bispecifikus antitestet irányított *in vitro* kémiai kapcsolással hozták létre. Az általuk előállított bispecifikus antitest ErbB2-receptort túlszított mennyiségben termelő sejtekhez és normál humán T-sejtekhez képes kötődni, és képes kiváltani a humán citotoxikus limfociták humán emlőtumor sejtek elleni lítikus aktivitását.

A bispecifikus antitestek fragmenseinek közvetlenül rekombináns sejttenyészetekben történő előállítására és izolálására különféle eljárásokat tártak fel. Például, Kostelny és mtsai. [J. Immunol. 148(5), 1547 (1992)] "leucin-cipzárok" alkalmazásával bispecifikus antitesteket állítottak elő. Az Fos- és Jun-proteinből származó "leucin-cipzár" peptideket génfúzió alkalmazásával két különböző antitest Fab'-fragmenséhez kapcsolták. Az antitest-homodimereket a csukló-régiónál redukálva monomereket kaptak, majd ezeket visszaoxidálva antitest-heterodimereket hoztak létre. Ez az eljárás antitest-homodimerek előállítására is alkalmazható. A Hollinger és mtsai. [Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90, 6444 (1993)] által feltárt "diatest" technika a bispecifikus antitest-fragmensek előállításának alternatív mechanizmusát reprezentálja. Az ilyen fragmensek egy nehéz lánc variábilis domént (V_H) egy könnyű lánc variábilis doménhez (V_L) kapcsolva tartalmazznak, olyan kapcsolószekvencián keresztül, amely túl rövid ahhoz, hogy az ugyanazon láncon lévő két domén között párosodás következzen be. Ennek megfelelően, az egyik fragmens V_H - és V_L -doménje kényszerítve van, hogy a másik fragmensben lévő komplementer V_L - és V_H -doménnel alkosson párt, miáltal két antigénkötő hely képződik. A bispecifikus antitest-fragmensek előállításának egy másik, egyláncú Fv-dimerek alkalmazásán alapuló módszerét Gruber és mtsai. tárták fel [J. Immunol. 152, 5368 (1994)].

A találmány szerinti megoldás értelmében kettőnél több értékű antitestek is alkalmazhatók. Például, előállíthatók trispecifikus antitestek is [ld. Tutt és mtsai.: J. Immunol. 147, 60 (1991)].

(vi) Kívánt tulajdonságú antitestek szelektálása

Az antitestek előállításí módszereit a fentiekben tárgyaltuk. A létrehozott antitesteket az alábbi tulajdonságokra szelektálhatjuk.

A sejthalált indukáló antitestek szelektálása céljából a sejtmembrán épségének csökkenését - propidium-jodid (PI), trypan-kék vagy 7AAD felvétele alapján - kontroll sejtekéhez viszonyítva értékeljük. Előnyösen BT474-sejtek alkalma-

zásával végzett PI-felvételi tesztet végzünk. E teszt során BT474-sejteket (American Type Culture Collection, Rockville, MD) Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközeg (DMEM) és Ham-féle F12-tápközeg 1:1 arányú - 10 % hőinaktivált magzati borjúszérummal (FBS, Hyclone) és 2 mM L-glutaminnal kiegészített - elegyében tenyésztjük (így a tesztet komplement és immun-effektor sejtek hiányában végezzük). A BT474-sejteket 100 x 20 mm-es csészékben helyez-zük el (csészénként 3×10^5 sejt), és egy éjszakán át hagy-juk letapadni. Ezután a tápközeget eltávolítjuk és friss tápközeggel vagy a megfelelő monoklonális antitest 10 µg/ml-ét tartalmazó tápközeggel helyettesítjük. A sejteket három napig inkubáljuk. Az egyes kezelések után az egyréte-gű sejttenyészeteket foszfátpufferelt sóoldattal (PBS) mos-suk, és a sejteket tripszines kezeléssel leválasztjuk a csészék faláról. Ezt követően a sejteket 4 °C-on 1200-as percenkénti fordulatszámmal 5 percig centrifugáljuk, a sejtüledéket 3 ml jéghideg Ca^{2+} -kötő pufferben (10 mM HEPES, pH = 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2) újraszuszpen-dáljuk, és a sejtcsomók eltávolítása érdekében 35 mm-es szűrővel lezárt 12 x 75-ös kémcsövekbe szortírozzuk (kémcsövenként 1 ml; kezelési csoportonként 3 kémcső). A kémcsövekbe ezután propidium-jodidot (PI; 10 µg/ml) adunk. A mintákat FACSCAN áramlási citométer és FACSCONVERT CellQuest szoftver (Becton Dickinson) alkalmazásával vizs-gáljuk. Azokat az antitesteket választjuk ki, amelyek a PI-felvétel alapján statisztikailag szignifikáns szintű sejt-halált indukálnak.

Az apoptózist indukáló antitestek szelektálása céljából - BT474-sejtek alkalmazásával - annexin-kötési tesztet végezhetünk. A BT474-sejteket az előző bekezdésben leírtak szerint tenyésztjük és oltjuk csészékbe. A tápközeget ezután eltávolítjuk, majd friss tápközeggel vagy a megfelelő monoklonális antitest 10 µg/ml-ét tartalmazó tápközeggel helyettesítjük. Három napos inkubálás után az egyrétegű sejttenyészeteket foszfátpufferelt sóoldattal (PBS) mossuk és tripszines kezeléssel leválasztjuk a csészék faláról. Ezt követően a sejteket centrifugáljuk, Ca^{2+} -kötő pufferben újrassuszpendáljuk, és a fentebb leírtak szerint kémcsövekbe szortírozzuk. A kémcsövekbe ezután jelölt annexint (pl. annexin V-FTIC; 1 µg/ml) adunk. A mintákat FACSCAN áramlási citométer és FACSCONVERT CellQuest szoftver (Becton Dickinson) alkalmazásával vizsgáljuk. A kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns szintű annexin-kötődést indukáló antitesteket apoptózist indukáló antitestekként azonosítjuk.

Az annexin-kötési teszten kívül BT474-sejtek alkalmazásával végzett DNS-festési teszteket is végezhetünk. E teszthez az előző két bekezdésben leírtak szerint a kérdéses antitesttel kezelt BT474-sejteket 9 µg/ml HOECHST 33342-vel 37 °C-on két óra hosszat kezeltük, majd EPICS ELITE áramlási citométerrel (Coulter Corporation), MODFIT LT szoftver (Verity Software House) alkalmazásával analizáltuk. E teszt alkalmazásával az apoptózisos sejtek százalékos arányában - a kezeltetlen sejtekhez képest - kétszeres vagy nagyobb (előnyösen háromszoros vagy nagyobb) változást

(az apoptózisos sejtek egészen 100 %-áig) indukáló antitesteket pro-apoptózisos antitestekként azonosítjuk.

Egy szóban forgó antitest által megkötött ErbB2-antigén epitópjához kötődő antitestek kisselektálása céljából rutinszerű keresztblokkolási kísérletet végezhetünk [ld. "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, szerk.: Harlow és Lane (1988)]. Más módon, vagy ezen túlmenően, szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával epitóptérképezést végezhetünk.

Sejttenyészetben lévő SKBR3-sejtek szaporodását 50-100 %-os arányban gátló anti-ErbB2 antitestek azonosítása céljából a WO 89/06692 számú nemzetközi közzétételi iratban leírt SKBR3-tesztet alkalmazhatjuk. E vizsgálati eljárásban az SKBR3-sejteket - 10 % magzati borjúsérummal, glutaminnal és penicillinnel/sztreptomocinnal kiegészített - 1:1 arány F12/DMEM-tápközegben szaporítjuk, majd 35 mm-es sejttenyésztő csészékbe egyenként 20 000 sejtet szélesztettünk (2 ml/csésze). A csészékhez az anti-ErbB2 antitest 2,5 µg/ml-ét adjuk, majd hat nap elteltével - elektronikus COULTER™ sejtszámláló alkalmazásával - meghatároztuk a sejtszámot (a kezeltetlen sejtek számához viszonyítva). Az SKBR3-sejtek szaporodásának 50-100 %-os gátlását eredményező antitesteket apoptózist indukáló antitestekkel történő kombinálásra alkalmas antitestekként azonosítjuk.

(vii) Effektor-funkció módosítása

A találmány szerinti antitestet effektor-funkciója vonatkozásában is módosíthatjuk, például, az antitest rák kezelésben kifejtett hatékonyságának növelése céljából. Például, antitest Fc-régiójába ciszteín(eke)t építhetünk be, ami e régióban lehetővé teszi a láncok közötti diszulfidhíd-képződést. Az így létrehozott homodimer antitest javított internalizációs képességű és/vagy fokozott mértékű komplement-közvetítette sejtpusztítást és antitest-dependens celluláris citotoxicitást (ADCC) fejt ki [ld. Caron és mtsai.: J. Exp. Med. 176, 1191 (1992); és Shopes: J. Immunol. 148, 2918 (1992)]. Wolff és mtsai. [Cancer Research 53, 2560 (1993)] leírása szerint, heterodifunkciós keresztkötésképzők alkalmazásával, megnövelt tumorellenes aktivitású homodimer antitestek is előállíthatók. Más módon, kifejleszthetünk olyan antitestet, amely két Fc-régiót tartalmaz, ezáltal fokozott mértékű komplement lízist és ADCC-aktivitást mutat [ld. Stevenson és mtsai.: Anti-Cancer Drug Design 3, 219 (1989)].

(viii) Immunkonjugátumok

A találmány szerinti megoldás értelmében az antitestek immunkonjugátumai is alkalmazhatók, amelyekben az antitest citotoxikus hatóanyaghoz, pl. kemoterápiás hatóanyaghoz, toxinhoz (pl. kis molekulájú toxin vagy enzimatiszus aktivitású toxin, amely lehet bakteriális, gombaeredetű, növényi vagy állati eredetű, ideértve az ilyen toxinok fragmenseit és/vagy változatait is) vagy radioaktív izotópokhoz vannak

konjugálva (utóbbiak a radiokonjugátumok).

Az ilyen immunkonjugátumok létrehozására alkalmas kemoterápiás hatóanyagokat fentebb ismertettük. A konjugálásra alkalmazható, enzimatikusan aktív toxinok és fragmenseik közé tartozik a diftéria-toxin A-lánca, a diftéria-toxin nem kötő aktív fragmensei, az exotoxin A-lánca (*Pseudomonas aeruginosa*-ból), ricin A-lánca, abrin A-lánca, modeccin A-lánca, α -sarcin, *Aleurites fordii* proteinek, dianthin-proteinek, *Phytolacca americana* proteinek (PAPI, PAPII és PAP-S), *Momordica charantia* inhibitor, curcin, crotin, *Saponaria officinalis* inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, fenomicin, enomicin és a tricothecének. A radiokonjugált anti-ErbB2 antitestek létrehozására számos radioaktív izotóp alkalmazható, mint pl. a Bi^{212} , I^{131} , In^{111} , Y^{90} és Re^{186} .

Az antitest citotoxikus hatóanyaggal alkotott konjugátumai különféle difunkciós proteinkapcsoló ágensek alkalmazásával hozhatók létre, melyek példái a következők: N-szukcinimidil-3-(2-piridil-ditiol)-propionát (SPDP), szukcinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxilát, iminotiolán (IT), difunkciós imidoészter származékok (pl. dimetil-apimidát-HCl), aktív észterek (pl. diszukcinimidil-szuberát); aldehidek (pl. glutáraldehid), diazidovegyületek [pl. di-(p-azido-benzoil)-hexándiamin], di-diazonium-származékok [pl. di-(p-diazonium-benzoil)-etiléndiamin], diizocianátok (pl. toluol-2,6-diizocianát) és difluor-vegyületek (pl. 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzol). Például, ricin immunotoxin előállítására a Vitetta és

mtsai. [Science 238, 1098 (1987)] által leírt eljárás alkalmazható. Radionukleotid antagonistához történő konjugálására alkalmazható kelátképző szerek egyik jellemző példája a karbon-14-jelzett 1-izotiocianatobenzil-3-metildietilén-triamin-pentaecetsav (MX-DTPA; ld. WO 94/11026 számú nemzetközi közzétételi írat).

Egy további megvalósítási mód értelmében az antitestet receptorhoz (pl. sztreptavidinhez) konjugálhatjuk. Az ilyen receptor a tumor előzetes megcélzására alkalmazható, oly módon, hogy az antitest-receptor konjugátumot beadjuk a páciensnek, majd a nem kötődött konjugátumot megfelelő tisztító ágens alkalmazásával eltávolítjuk a keringésből, és ezután a páciensnek citotoxikus hatóanyaggal (pl. radionukleotid) konjugált ligandumot (pl. avidint) adunk be.

(ix) Immunliposzómák

Az anti-ErbB2 antitestek liposzómákba foglalt alakban is előállíthatók. Az antitestet tartalmazó liposzómák szakember számára jól ismert eljárásokkal állíthatók elő [ld. pl. Epstein és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688 (1985); Hwang és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030 (1980); 4 485 045 és 4 544 545 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; és WO 97/38731 számú nemzetközi közzétételi írat]. Az 5 013 556 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban megnövelt keringési idejű liposzómákat tártak fel.

A különösen előnyös liposzómák foszfatidilkolint, ko-

leszterint és PEG-gel derivatizált foszfatidil-etanolamint (PEG-PE) tartalmazó lipidkészítmény alkalmazásával végzett - reverz fázisú lepárlási eljárással állíthatók elő. A liposzómákat meghatározott pórusméretű filtereken átpréselve kívánt átmérőjű liposzómákhoz juthatunk. A találmány szerinti antitest Fab'-fragmensei diszulfid kicserélődési reakcióval, Martin és mtsai. [J. Biol. Chem. 257, 286 (1982)] leírása szerint konjugálhatók a liposzómákhoz. A liposzómába adott esetben kemoterápiás hatóanyagot foglalhatunk [ld. Gabizon és mtsai.: J. National Cancer Inst. 81(19), 1484 (1989)].

(x) Antitest-dependens enzimközvetítette pro-drog terápia (ADEPT)

A találmány szerinti antitestek antitest-dependens enzimközvetítette pro-drog terápiában (ADEPT) is alkalmazhatók, oly módon, hogy az antitestet pro-drog-aktiváló enzimmel konjugáljuk, amely egy pro-drogot (pl. peptidil kemoterápiás hatóanyagot; ld. WO 81/01145 számú nemzetközi közzétételi irat) aktív rákellenes hatóanyaggá alakít át (ld. pl. WO 88/07378 számú nemzetközi közzétételi irat és 4 975 278 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

Az ADEPT céljára alkalmas konjugátumok enzim komponenseként olyan enzim alkalmazható, amely egy pro-drogot aktívabb, citotoxikus alakká képes átalakítani.

A találmány szerinti eljárásban hasznosan alkalmazható enzimek közé tartoznak, többek között, a következők: alka-

likus foszfátáz, amely foszfát-tartalmú pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmas; arilszulfatáz, amely szulfát-tartalmú pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmas; citozin dezamináz, amely nem toxikus 5-fluorcitozin rákellenes hatóanyaggá (5-fluoruracillá) történő átalakítására alkalmas; proteázok, pl. *Serratia* proteáz, termolizin, szubtilizin, karboxipeptidázok és chatepszinek (pl. chatepszin-B és -L), melyek peptid-tartalmú pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak; D-alanil-karboxipeptidázok, melyek D-aminosav szubsztituenseket tartalmazó pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak; szénhidrát-hasító enzimek, pl. β -galaktozidáz és neuraminidáz, melyek glikozilált pro-drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak; β -laktamáz, amely β -laktámokkal derivatizált drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmas; és penicillin amidázok, pl. penicillin-V amidáz vagy penicillin-G amidáz, melyek amin-nitrogénatomjukon fenoxi-acetil-, illetve fenil-acetilcsoporttal derivatizált drogok szabad drogokká történő átalakítására alkalmasak. Más módon, a találmány szerinti pro-drogok aktív szabad drogokká történő átalakítására enzimátikus aktivitású antitestek, ún. "abzimek" is alkalmazhatók [ld. pl. Massey: *Nature* 328, 457 (1987)]. Az antagonista-abzim konjugátumok a leírásban az abzim tumorsejt-populációba történő bejuttatásánál ismertett módon állíthatók elő.

A találmány szerinti enzimek a szakirodalomból jól ismert eljárások (pl. heterodifunkciós keresztkötő reagensek)

alkalmazásával, kovalens kötéssel kapcsolhatók az anti-ErbB2 antitestekhez. Más módon, szakember számára jól ismert rekombináns DNS-technikák alkalmazásával olyan fúziós proteinek hozhatók létre, amelyek egy találmány szerinti antitestnek legalább az antigénkötő régióját egy találmány szerinti enzim legalább egy funkcionálisan aktív részéhez kapcsolva tartalmazzák [ld. pl. Neuberger és mtsai.: Nature 312, 604 (1984)].

(xi) Antitest/mentőreceptor ("salvage receptor") kötő
epitóp fúziók

A találmány bizonyos megvalósítási módjai szerint (például, tumor-penetráció fokozása céljából) a teljes antitest helyett antitest-fragmens alkalmazása lehet kívánatos. Ilyen esetekben szükség lehet az antitest-fragmens -vérsavóban mérhető felezési idejének növelése érdekében történő - módosítására. Ennek érdekében az antitest-fragmensbe, például, mentőreceptor kötő epitópot foglalunk (pl. az antitest-fragmens megfelelő régiójának mutagenézisével vagy oly módon, hogy az epitópot egy peptidbe foglaljuk, amelyet azután az antitest-fragmens N- vagy C-terminálisára (vagy közepére) fuzionáltatunk (pl. DNS- vagy peptid-szintézissel).

A fokozott *in vivo* felezési idejű antitest-változat előállításának szisztematikus eljárása több lépésből áll. Az első lépésben azonosítjuk egy IgG-molekula Fc-régiója mentőreceptor kötő epitópjának szekvenciáját és konformáci-

óját, majd ennek megtörténte után a kérdéses antitest szekvenciáját úgy módosítjuk, hogy az azonosított kötőepitóp szekvenciáját és konformációját tartalmazza. A szekvencia mutagenézise után az antitest-változatot annak megállapítása érdekében teszteljük, hogy *in vivo* felezési ideje az eredeti antitestéhez képest növekedett-e. Ha az antitest-változat *in vivo* felezési ideje nem bizonyult hosszabbnak, szekvenciáját további módosításnak vetjük alá, hogy az azonosított kötőepitóp szekvenciáját és konformációját tartalmazza. A módosított antitestet ismét *in vivo* felezési idejének meghatározása céljából teszteljük, és ezt addig folytatjuk, míg olyan molekulát nem kapunk, amely a kiindulási antitesténél nagyobb *in vivo* felezési idővel bír.

A kérdéses antitestbe fentiek szerint beépített mentőreceptor kötő epitóp bármely ilyen epitóp lehet, és a konkrét epitóp kiválasztása, például, a módosítani kívánt antitest típusától függ. Az epitóp beépítését úgy hajtjuk végre, hogy a kérdéses antitest továbbra is képes legyen kifejtetni az itt leírt biológiai aktivitásait.

Az epitóp előnyösen olyan régiót képez, amelyben egy Fc-domén egy vagy két hurokjából származó egy vagy több (még előnyösebben, három vagy több) tetszőleges aminosav az antitest-fragmens analóg pozícióiba van átültetve. Még előnyösebben, az epitóp az Fc-régió (például, egy IgG Fc-régiója) CH2-doménjéből származik, és az antitest CH1-, CH3- vagy V_H-régiójába (vagy ezek közül több régióba) van átültetve. Más módon, az epitóp az Fc-régió CH2-doménjéből való, és az antitest-fragmens C_L- vagy V_L-régiójába van át-

ültetve.

A találmány egyik legelőnyösebb megvalósítási módja szerint a mentőreceptor kötő epitóp a PKNSSMISNTP szekvenciát (5'→3') (3. azonosítószámú szekvencia) tartalmazza, és adott esetben tartalmaz egy másik szekvenciát is, a következők közül: HQSLGTQ (4. azonosítószámú szekvencia); HQNLSDGK (5. azonosítószámú szekvencia); HQNISDGGK (6. azonosítószámú szekvencia); VISSHLGQ (7. azonosítószámú szekvencia), különösen abban az esetben, ha az antitest-fragmens Fab- vagy F(ab')₂-Fragmens. Egy második legelőnyösebb megvalósítási mód szerint a mentőreceptor kötő epitóp olyan polipeptid, amely a következő szekvenciá(ka)t (5'→3') tartalmazza: HQNLSDGK (5. azonosítószámú szekvencia); HQNISDGGK (6. azonosítószámú szekvencia); VISSHLGQ (7. azonosítószámú szekvencia); és a PKNSSMISNTP szekvencia (3. azonosítószámú szekvencia).

(xii) Az anti-ErbB2 antitestet tisztítása

A találmány szerinti antitest - rekombináns technikák alkalmazásával - intracellulárisan, periplazmikus térben vagy közvetlenül a tápközegbe kiválasztva termeltethető. Ha az antitestet intracellulárisan termeltetjük, első lépésként a tápközegből centrifugálással vagy ultraszűréssel eltávolítjuk a szemcsés üledéket (amely a gazdas sejtekből vagy az emésztett törmelékből áll). Carter és mtsai. [Bio/Technology 10, 163 (1992)] eljárást írtak le *E. coli* sejtek periplazmikus terébe kiválasztott antitestek izolá-

lására. Ennek során a sejtmasszát nátrium-acetát (pH = 3,5), EDTA és fenil-metil-szulfonilfluorid (PMSF) jelenlétében kb. 30 perc alatt felolvasztjuk. A sejttöledék centrifugálással eltávolítható. Amennyiben az antitest a tápközegbe van kiválasztva, az ilyen expressziós rendszerek alkalmazásával kapott felülúszókat először általában kereskedelmi forgalomban beszerezhető proteín-betöményítő szűrővel (pl. Amicon vagy Millipore Pellicon ultrafiltrációs egység) bekonzentráljuk. E lépések során a proteolízis gátlása céljából proteáz-inhibítort (pl. PMSF) alkalmazhatunk, és az esetleges szennyező mikroorganizmusok szaporodásának gátlására antibiotikumok alkalmazhatók.

A sejtekből előállított antitest-készítmény, például, hidroxilapatit-kromatográfiával, gélelektroforézissel, dialízissel vagy affinitási kromatográfiával tisztítható, melyek közül előnyösen az affinitási kromatográfiát alkalmazhatjuk. A protein-A affinitási ligandumként történő alkalmazása az antitestben lévő Ig-Fc-régió fajtájától és izotípusától függ. A protein-A a humán $\gamma 1$, $\gamma 2$ vagy $\gamma 4$ nehéz láncokon alapuló antitestek tisztítására alkalmazható [Lindmark és mtsai.: J. Immunol. Meth. 62, 1 (1983)]. A protein-G valamennyi egér izotípushoz, valamint a humán $\gamma 3$ -hoz ajánlott [Guss és mtsai.: EMBO J. 5, 1567 (1986)]. Az affinitási ligandumot leggyakrabban agarózhoz kapcsoljuk, de más ágyazóanyagok is alkalmazhatók. A mechanikailag stabil ágyazóanyagok - pl. szabályozott pórusméretű üveg vagy poli(sztírol-divinil)-benzol - nagyobb átfolyási sebességet és rövidebb feldolgozási időt tesznek lehetővé, mint az

agaróz. Ha a polipeptid-változat C₁₈-domént tartalmaz, a tisztításra Bakerbond ABXTM gyantát (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) alkalmazhatunk. Az antitest tisztítására - a kinyerni kívánt antitesttől függően - egyéb protein-tisztítási technikák is alkalmasak, mint pl. az ioncserélő oszlopon végzett frakcionálás, etanolos precipitáció, reverz fázisú, nagyteljesítményű folyadékkromatográfia, szilikagél-kromatográfia, Heparin-SepharoseTM kromatográfia, anion- vagy kationcserélő gyantán (pl. poliaszparaginsav-oszlopon) végzett kromatográfia, kromatofókusztálás, SDS-PAGE és ammónium-szulfátos precipitáció.

Az előzetes tisztítási lépés(ek)e(t) követően a kívánt polipeptid-változatot és szennyezőanyagokat tartalmazó elegyet - előnyösen kis sókoncentráció (pl. 0-0,25 M) mellett - alacsony pH-n végzett hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának vetjük alá, melynek során kb. 2,5-4,5-es pH-jú eluáló puffert alkalmazunk.

III) A vérsavó anti-ErbB2 antitest koncentrációjának meghatározása

A következő, példaként szolgáló teszt specifikus rhuMab HER2 (humanizált anti-p185^{HER2} monoklonális antitest, pl. HERCEPTIN[®] anti-ErbB2 antitest) jelenlétének és mennyiségének emlőszek testfolyadékában (pl. vérsavóban, amnionfolyadékban, tejben, köldökzsínór-szérumban, szemcsarnokvízben és -gélben) történő meghatározására alkalmas.

rhuMab HER2 (humanizált anti-p185^{HER2} monoklonális antitest)

tálcán végzett kötési aktivitási tesztje

A szóban forgó teszt példájaként az rhuMab HER2 tesztjét ismertetjük, amely nem jelenti a találmány oltalmi körének korlátozását. Az rhuMab HER2 standardizált készítményét (Genentech, Inc., South San Francisco, CA), a kontrollokat és a vérsavó-mintákat teszt-diluendummal (PBS; 0,5 % BSA; 0,05 % Poliszorbát-20; 0,01 % Thimerosal) hígítottuk. A standardizált rhuMab HER2 hígításait úgy készítettük el, hogy lefedjék a standard görbe készítéséhez szükséges koncentráció-tartományt. A mintákat úgy hígítottuk, hogy a standard görbén belül legyenek.

Mikrotiter-tálca üregeibe bevonóantigén bevonópufferben készített oldatának [0,05 M nátrium-karbonát pufferben oldott rekombináns p185^{HER2} (Genentech, Inc.)] alikvotjait adagoltuk, és a tálcát 12-72 óra hosszat 2-8 °C-on inkubáltuk. A bevonóoldat eltávolítása után mindegyik üreget vízzel hatszor mostuk, majd a felesleges víz eltávolítása érdekében leitatattuk.

Az egyes üregekhez a teszt-diluendum alikvotjait adtuk, és rázatás mellett környezeti hőmérsékleten 1-2 óra hosszat inkubáltuk, majd az üregeket az előző lépés szerint mostuk.

A hígított standard, kontroll és minta alikvotjait hozzáadtuk az üregekhez, és környezeti hőmérsékleten, rázatás mellett egy óra hosszat inkubáltuk (hogy elősegítsük az antitest bevonóantigénhez történő kötődését). Ezt követően az üregeket az előzőek szerint, vízzel mostuk.

Tormaperoxidázhoz konjugált kecskeeredetű anti-humán IgG Fc-régiót (Organon Teknika, katalógusszám: 55253 vagy megfelelője) teszt-diluendumban hígítottunk, oly módon, hogy optikai denzitása a legnagyobb és legkisebb optikai denzitású standard közötti tartományban legyen. Az üregekhez hozzáadtuk a HRP-konjugátum oldatának alikvotjait, és környezeti hőmérsékleten, rázatás mellett egy óra hosszat inkubáltuk, majd az üregeket az előzőek szerint, vízzel mostuk.

Ezt követően mindegyik üreghez szubsztrátoldat [12,5 ml - 4 mM H_2O_2 -t tartalmazó - foszfátpufferelt sóoldatban oldott o-feniléndiamin (OPD; 5 mg-os tabletták; Sigma P6912 vagy megfelelője] alikvotjait adtuk, és a tálcát a színfejlődés elősegítése érdekében, környezeti hőmérsékleten, sötétben megfelelő ideig (kb. 8-10 percig) inkubáltuk. A reakciót 4,5 N kénsav hozzáadásával leállítottuk, és meghatároztuk az optikai denzitást (kimutatási abszorbanancia 490-492 nm-nél; vonatkoztatási abszorbanancia 405 nm-nél). A standard görbe adatait grafikonon ábrázoltuk, és a standard görbe alapján meghatároztuk a kontrollok és a minták eredményeit.

IV) Gyógyászati készítmények

A találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazott antitestek tárolásra alkalmas gyógyászati készítményekbe foglalása céljából kívánt tisztaságú antitestet és - adott esetben - fiziológiai szempontból elfogadható hordozókat,

kötőanyagokat és stabilizálószerkeket [ld. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. kiadás, szerk.: Osol (1980)] elegyítünk (liofilizátum vagy vizes oldat alakjában). Az erre a célra alkalmas hordozók, kötőanyagok és stabilizálószerke az alkalmazott dózisokban és koncentrációkban nem lehetnek toxikusak a páciensre. Az ilyen anyagok a következők: pufferek (pl. foszfát, citrát és egyéb szerves savak); antioxidánsok [pl. oktadecil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, hexamethonium-klorid, benzalkonium-klorid, benzethonium-klorid, fenil, butil- vagy benzilalkohol, alkilparabének (pl. metil- vagy propilparabén), catechol, rezorcinol, ciklohexanol, 3-pentanol és m-krezol]; kis molekulatömegű (legfeljebb kb. 10 aminosavas) polipeptidek; proteinek (pl. szérumalbumin, zselatin vagy immunglobulinok); hidrofíl polimerek (pl. polivinilpirrolidon); aminosavak (pl. glicin, glutamin, aszparagin, hisztidin, arginin vagy lizin); monoszacharidok, diszacharidok és egyéb szénhidrátok (pl. glükóz, mannóz vagy dextrinek); kelátképzők (pl. EDTA); cukrok (pl. szacharóz, mannitol, trehalóz vagy szorbitol); sóképző ellenionok (pl. nátrium); fémkomplexek (pl. Zn-protein komplexek); és/vagy nemionos felületaktív anyagok [pl. TweenSM, PluronicSM vagy polietilén-glikol (PEG)]. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös liofilizált anti-ErbB2 antitest-készítményeket a WO 97/04801 számú nemzetközi közzétételi iratban tárták fel (melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk).

A szóban forgó gyógyászati készítmény - az adott indi-

kációtól függően - egynél több (előnyösen egymás hatását károsan nem befolyásoló, komplementer aktivitású) hatóanyagot is tartalmazhat. Például, az ilyen készítmény tartalmazhat olyan antitesteket is, amelyek képesek megkötni az EGFR-t, ErbB2-t (pl. az ErbB2 egy másik epítópját), ErbB3-at, ErbB4-et vagy vaszkuláris endothelialis növekedési faktort (VEGF). Más módon, vagy ezen túlmenően, a készítmény tartalmazhat citotoxikus hatóanyagot, kemoterápiás hatóanyagot, citokint, sejtszaporodást gátló hatóanyagot, anti-hormonális hatóanyagot, EGFR-re irányuló hatóanyagot, angiogenezist gátló hatóanyagot és/vagy kardioprotektánst is. Az ilyen molekulák, alkalmas módon, a kívánt cél eléréshez megfelelő kombinációban és mennyiségben lehetnek jelen a készítményben.

Az aktív összetevők mikrokapszulába is foglalhatók, amely, például, koacervációs technikával (hidroximetilcellulóz vagy zselatin mikrokapszula) vagy határfelületi polimerizációval állítható elő [poli(metil-metakrilát)-mikrokapszula]. Más módon, az aktív összetevők kolloidális célbajuttató-rendszerekbe (pl. liposzómák, albumin-mikrogömbök, mikroemulziók, nanoszemcsék és nanokapszulák) vagy makroemulziókba foglalhatók. Az ilyen technikák leírását ld.: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. kiadás, szerk.: Osol (1980)].

Az *in vivo* adagolásra szánt készítményeknek sterilnek kell lenniük. A sterilizálás steril szűrőmembránokon végzett szűréssel egyszerűen végrehajtható.

A találmány szerinti megoldás értelmében tartós ható-

anyag-kibocsátású készítmények is előállíthatók. Az ilyen készítmények jellemző példái közé tartoznak az antitestet tartalmazó, szilárd hidrofób polimerekből készített félig-áteresztő ágyazóanyagok, amelyek pl. filmek vagy mikrokapszulák formájában állíthatók elő. A tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító ágyazóanyagok példái a következők: poliészterek; hidrogélek [pl. poli(2-hidroxi-etil-metakrilát) vagy polivinilalkohol]; polilaktidok (3 773 919 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); L-glutaminsav és γ -etil-L-glutamát kopolimerei; lebonthatatlan etilén-vinilacetát kopolimerek; lebontható tejsav-glikolsav kopolimerek (pl. LUPRON DEPOTTM, amely tejsav-glikolsav kopolimerből és leuprolid-acetátból álló, injektálható mikrogömb készítmény); és poli-D-(-)-3-hidroxi-vajsav. Míg az olyan polimerek, mint az etilén-vinilacetát és tejsav-glikolsav kopolimer a molekulák 100 napnál hosszabb időtartamú felszabadulását biztosítják, bizonyos hidrogélek a proteinek rövidabb idő alatt bocsátják ki. Ha a kapszulába foglalt antitestek hosszú ideig maradnak a szervezetben, 37 °C-on a nedvesség hatására denaturálódhatnak és aggregálódhatnak, ami a biológiai aktivitás elvesztését és az immunogenitás esetleges változását eredményezheti. Az antitestek stabilizálására, az adott aggregációs mechanizmustól függően, különféle stratégiák állnak rendelkezésre. Például, ha az aggregáció tio-diszulfid kicserélődés következtében létrejött intermolekuláris diszulfidhíd eredményeként következik be, a stabilizáció a szulfhidril-gyökök módosításával, savas ol-

datból történő liofilizálással, a nedvességtartalom szabályozásával (megfelelő adalékok alkalmazásával), és specifikus polimer-ágyazóanyag készítmények kifejlesztésével valósítható meg.

V) Anti-ErbB2 antitestekkel végzett kezelés

A találmány szerinti megoldás értelmében az anti-ErbB2 antitestek az ErbB2-receptor túlzott mértékű termelődésével és/vagy aktiválásával jellemezhető állapotok kezelésére alkalmazhatók, melyek jellemző példái közé tartoznak a következők: jóindulatú és malignáns tumorok (pl. veserák, májrák, húgyhólyagrák, emlőrák, gyomorrák, petefészfekrák, vastag- és végbélrák, prosztatatarák, tüdőrák, szeméremtestrák, pajzsmirigyrák, máj-carcinomák, sarcomák, glioblastomák, és különféle fej- és nyaktumorok); leukózisok és limfoid malignáns betegségek; valamint egyéb rendellenességek, mint pl. idegsejt-, gliasejt-, asztrocita-, hipotalamusz-, mirigy-, makrofág-, epithelsejt-, stroma-, blasztocöl-, gyulladásos, angiogén és immunológiai rendellenességek.

A találmány szerinti antitesteket ismert módszerekkel, például, intravénás (pl. bolus injekcióval vagy folyamatos infúzióval), intramuszkuláris, intraperitoneális, intracerebrospinalis, szubkután, intraarticularis, intrasynovialis, intrathecalis, orális, topikus vagy inhalációs adagolással adjuk be a pácienseknek, mely adagolási módok közül az intravénás és a szubkután adagolást részesítjük

előnyben.

A találmány szerinti kezelési eljárás során egy anti-ErbB2 antitestet állatnak vagy embernek adagolunk, majd meghatározott időközönként azonos vagy kisebb dózisokat adunk be, hogy egy cél-vérsavó-koncentrációt érjünk el és tartsunk meg a kezelés ideje alatt. A fenntartó dózisok adagolását előnyösen bolus adagolással, előnyösen szubkután bolus adagolással hajtjuk végre, ami a kezelést mind a páciens, mind az egészségügyi dolgozók számára kényelmessé és költségtakarékossá teszi.

Ha az antitest kemoterápiás hatóanyaggal (az antraciklinek kivételével) együttes adagolására van szükség, a kombinált adagolás lehet együttes adagolás (külön készítmények vagy egyetlen gyógyászati készítmény alkalmazásával), továbbá lehet egymás utáni adagolás (bármely sorrendben), melynek során megfelelő időt biztosítunk arra, hogy mindkét (vagy valamennyi) aktív hatóanyag kifejthesse biológiai aktivitását. Az ilyen kemoterápiás hatóanyagok előkészítését és dozírozását a gyártó útmutatásai szerint végezhetjük, illetve a kezelőorvos kísérleti úton határozhatja meg. A kemoterápiás hatóanyagok előkészítését és dozírozását illetően ld.: "Chemotherapy Service", szerk.: M.C. Perry, Williams és Wilkins, Baltimore, MD (1992). A kemoterápiás hatóanyagot az antitest beadása előtt vagy után (vagy azzal egyidejűleg) adagolhatjuk. Az antitest ösztrogénellenes vegyülettel (pl. tamoxifen) vagy progeszteronellenes vegyülettel (pl. onapriston; ld. EP 618 812) is kombinálható (az ilyen molekulák ismert dózisaival).

Az anti-ErbB2 antitesteket előnyös lehet egyéb tumor-asszociált antigének elleni antitestekkel (pl. EGFR-hez, ErbB3-hoz, ErbB4-hez vagy VEGF-hez kötődő antitestekkel) együttesen adagolni. Más módon, vagy ezen túlmenően, a páciensnek két vagy több anti-ErbB2 antitestet is adagolhatunk. Bizonyos esetekben előnyös egy vagy több citokin adagolása is. Az anti-ErbB2 antitestet sejtszaporodást gátló hatóanyaggal együtt is adagolhatjuk. Például, először a sejtszaporodást gátló hatóanyagot, majd az anti-ErbB2 antitestet adjuk be, de a kettőt beadhatjuk egyidejűleg is, vagy más módon, elsőként az anti-ErbB2 antitestet adagoljuk. A sejtszaporodást gátló hatóanyag dózisait a gyógyászati gyakorlatban jelenleg alkalmazott dózisoknak megfelelően állapítjuk meg, illetve, az adott hatóanyag és az anti-ErbB2 antitest kombinált (szinergikus) hatásának függvényében csökkentett dózisokat alkalmazhatunk.

A fenti terápiás sémák mellett a páciens - a rákos sejtek eltávolítása érdekében - sebészeti beavatkozásnak és/vagy sugárkezelésnek is alávetethetjük.

Egy betegség megelőzése vagy kezelése céljából az antitest megfelelő adagolása a kezelni kívánt betegség típusától, a betegség súlyosságától vagy lefolyásának menetétől, a kezelés profilaktikus vagy terápiás természetétől, a korábban végzett gyógykezelésektől, a páciens klinikai történetétől és antitestre adott reakciójától, valamint a kezelőorvos saját megítélésétől függően határozható meg. Az antitestet, alkalmas módon, egy alkalommal vagy kezeléssorozat részeként adagoljuk. Amennyiben kezeléssorozatról van

szó, a kezdődózis(ok)ot napi vagy heti időközönként adagolt fenntartó dózisok követik. A fenntartó dózisok azonos vagy kisebb mennyiségű antitest bejuttatását eredményezik, mint a kezdődózis(ok).

Az antitestet - a betegség típusától és súlyosságától függően - kb. 1 µg/kg-tól 15 mg/kg-ig terjedő kezdődózisban (pl. 0,1-20 mg/kg) adagoljuk, függetlenül attól, hogy egy vagy több alkalommal végzett beadást vagy folyamatos infúziós adagolást végzünk. A jellemző napi dózis - a fenti tényezőktől függően - kb. 1 µg/kg-tól 100 mg/kg-ig vagy még tovább terjedhet. A több napon keresztül vagy még hosszabb ideig végzett, ismételt adagolás esetén a kezelést - az adott állapottól függően - addig folytatjuk, míg a betegség tüneteinek kívánt mérséklődése nem következik be. A terápia folyamata hagyományos technikák és tesztek alkalmazásával egyszerűen nyomon követhető.

A találmány értelmében az anti-ErbB2 antitest adagolási sémája szerint 6 mg/kg-os, 8 mg/kg-os vagy 12 mg/kg-os - intravénás vagy szubkután infúzióval adagolt - kezdődózsit alkalmazunk, majd intravénás infúzióval, intravénás bolus injekcióval, szubkután infúzióval vagy szubkután bolus injekcióval 2 mg/kg-os heti fenntartó dózsit adagolunk. Amennyiben az antitest a páciens számára jól tolerálható, az infúzió időtartamát csökkenthetjük.

Más módon, az anti-ErbB2 antitest 12 mg/kg-os kezdődózsisa után - három hetenként egyszer - 6 mg/kg-os fenntartó dózsit adagolunk.

Egy másik adagolási séma szerint az anti-ErbB2 anti-

test 8 mg/kg-os kezdődózisát, azt követően pedig - három hetente egyszer - 6 mg/kg-os fenntartó dózisait adagoljuk.

Egy további adagolási séma értelmében az anti-ErbB2 antitest 8 mg/kg-os kezdődózisát, majd heti egyszeri 8 mg/kg-os vagy két-három hetenként 8 mg/kg-os fenntartó dózisát adagoljuk.

Egy alternatív adagolási séma során a kezelés 1., 2. és 3. napján az anti-ErbB2 antitest 4 mg/kg-os kezdődózisát adagoljuk, fenntartó dózisként pedig három hetente 6 mg/kg-os dózist adunk be.

Más módon, az anti-ErbB2 antitest 4 mg/kg-os kezdődózisát, majd hetente kétszer (három napos időközönként) 2 mg/kg-os fenntartó dózist adunk be.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében ciklikus adagolást alkalmazunk, melynek során az anti-ErbB2 antitestet három hétig hetente két-három alkalommal adjuk be. Ezt a három hetes ciklust előnyösen a betegség tüneteinek enyhítéséhez szükséges ideig ismételjük.

Egy további megvalósítási mód értelmében olyan adagolási ciklust folytatunk, melynek során az anti-ErbB2 antitestet öt napon keresztül naponta egyszer adagoljuk. Ezt az adagolási ciklust a betegség tüneteinek enyhítéséhez szükséges ideig ismételjük. Az adagolási sémákról és dózisokról további információkat a példákban ismertetünk.

VI) Termékek

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében

ben a fentebb említett betegségek és rendellenességek kezelésére alkalmas anyagokat tartalmazó terméket tárunk fel. A találmány szerinti termék tartályból, címkéből és betegtejékoztatóból áll. Az ilyen tartályok, például, palackok, fiolák, fecskendők és hasonlóak lehetnek, és különféle anyagokból (pl. üvegből vagy műanyagból) készülhetnek. A tartály az adott betegség kezelésére hatásos készítményt tartalmaz, és steril nyílással lehet ellátva (pl. szubkután injekciós tűvel átszúrható dugóval lezárt intravénás oldattal vagy fiola). A készítmény legalább egy aktív hatóanyagként anti-ErbB antitestet tartalmaz. A tartályon lévő (vagy ahhoz mellékelte) címke arról ad felvilágosítást, hogy a készítmény milyen betegség kezelésére alkalmazható. A találmány szerinti termék tartalmazhat egy második tartályt is, amely gyógyászati szempontból elfogadható hordozót (pl. foszfátpufferelt sóoldatot, Ringer-oldatot vagy dextróz-oldatot) tartalmaz. A termék egyéb, kereskedelmi és felhasználói szempontból hasznos anyagokat is tartalmazhat, így pl. további puffereket, diluendókat, szűrőket, tűket és fecskendőket. Ezenfelül, a termék tartalmazhat egy betegtejékoztatót is, amelyen fel van tüntetve, hogy a készítmény, például, nem alkalmazható anthraciklin-típusú kemoterápiás hatóanyaggal (pl. doxorubicinnal vagy epirubicinnal) együtt.

VIII) Anyagok letétbe helyezése

Az alábbi hibridóma-sejtvonalakat az American Type

Culture Collection-nél (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, CA 20110-2209, USA) helyeztük letétbe:

<u>Antitest elnevezése</u>	<u>ATCC nyilv. szám</u>	<u>Letétbe helyezés dátuma</u>
7C2	ATCC HB-12215	1996. okt. 17.
7F3	ATCC HB-12216	1996. okt. 17.
4D5	ATCC CRL 10463	1990. május 24.
2C4	ATCC HB-12697	1999. ápr. 8.

A találmány szerinti megoldást a következőkben kísérleti példák bemutatásán keresztül szemléltetjük.

1. példa

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest előállítása és hatékonyságának vizsgálata

Anti-ErbB2 monoklonális antitest

Az ErbB2 extracelluláris doménje elleni egérs eredetű 4D5 (IgG₁ κ) monoklonális antitestet a Fendly és mtsai. [Cancer Research 50, 1550 (1990)] által leírt eljárással (WO 89/06692 számú nemzetközi közzétételi irat) állítottuk elő. Röviden összefoglalva: Hudziak és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7158 (1987)] által leírt módon előállított NIH-3T3/HER-2-3₀₀ sejteket (melyek sejtenként hozzávetőleg 1×10^5 ErbB2-molekulát termelnek) 25 mM EDTA-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban (PBS) összegyűjtöttünk,

és az így kapott sejtszuszpenzióval BALB/c-egereket immunizáltunk. Az egereknek a 0., 2., 5. és 7. héten intraperitoneális (i.p.) injektálással 0,5 ml PBS-ben 10^7 sejtet adagoltunk. A ^{32}P -izotóppal jelölt ErbB2-receptort immunprecipitáló antiszérumot termelő egereket a 9. és 13. héten intraperitoneálisan - búzacsíra-agglutinin/Sepharose (WGA) gyantán tisztított - ErbB2 membránkivonattal oltottuk. Ezt követően az egereknek intravénásan 0,1 ml ErbB2-készítményt adtunk be, és a lépsejteket (szplenocitákat) egérereredetű X63-Ag8.653 myeloma-sejtvonallal fuzionáltattuk. A hibridómák felülűszoját ELISA-teszttel és radioimmunprecipitációval ErbB2-kötődésre teszteltük. Izotípus-azonos kontrollként MOPC-21-et (IgG1; Cappell, Durham, NC) alkalmaztunk.

A kezelést az egérereredetű 4D5-antitest humanizált változatával (HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest) végeztük. A humanizált antitest létrehozásához az egérereredetű 4D5-antitest komplementaritást meghatározó régióit konszenzus humán IgG₁ antitest-vázába inszertáltuk [Carter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992)]. A létrehozott, humanizált anti-ErbB2 monoklonális antitest nagy affinitást mutat a p185^{HER2}-re ($[K_d] = 0,1 \text{ nmol/L}$), továbbá - *in vitro* és humán xenograftokban - jelentős mértékben gátolja a p185^{HER2}-t nagy mennyiségben termelő emlőrák-sejtek szaporodását; antitest-dependens celluláris citotoxicitást (ADCC) indukál; és önállóan alkalmazott hatóanyagként klinikailag aktívnak bizonyult az ErbB2 túlzott mértékű termelődésével jellemezhető - előzetesen intenzív terápiával kezelt -

metasztázisos emlőrák kezelésére. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitestet nagy mennyiségben tenyésztett, génsebészetiileg manipulált CHO-sejtvonallal termeltettük, amely az antitestet a tenyésztő tápközegekbe választja ki. Az antitestet a CHO-sejtek tenyésztő tápközegeiből standard kromatográfiával és szűréssel tisztíthatjuk. Az e kísérletben alkalmazott antitest-tételek mindegyikét azonosságukra, tisztaságukra és hatékonyságukra, valamint arra teszteltük, hogy megfelelnek-e a "Food and Drug Administration" sterilitásra és biztonságra vonatkozó követelményeinek.

Alkalmassági kritériumok

A kísérletben való részvételhez a pácienseknek meg kell felelniük a következő követelményeknek:

- Metasztázisos emlőrákban szenvednek;
- ErbB2 (HER2) onkogén túlzott mértékű expressziója [immunhisztokémiai vagy fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) meghatározva 2+ vagy 3+ szinten]. Az ErbB2 tumorban történő termelődése - a páciensek paraffinba ágyazott tumordarabjaiból készített vékony metszet-sorozatok immunhisztokémiai vizsgálatával, Slamon és mtsai. leírása szerint (1987 és 1989; ld. fentebb) határozható meg. Elsődleges detektáló antitestként egérreredetű 4D5 monoklonális antitestet alkalmaztunk, amely a kezeléshez alkalmazott humanizált antitestével azonos komplementaritást meghatározó régiókat (CDR) tartalmaz. A tumorokat akkor tekintettük ErbB2-t túlzott mértékben termelőnek, ha a tumorsejtek leg-

alább 25 %-a jellegzetes membránfestődést mutatott a p185^{HER2}-re.

- Radiográfiás módszerekkel, fizikai vizsgálattal vagy fényképek alapján kétdimenziósan mérhető betegség (ideértve a litikus csontléziókat). A "mérhető betegséget" két, egymásra merőleges átmérőben fizikai vizsgálattal, röntgenfilmen, CT-vel, MRI-vel, ultrahanggal vagy fényképes elemzéssel reprodukálhatóan mérhető tömegként definiáljuk. Az oszteoblasztos metasztázisokat, mellúri folyadékgyülemeket és hasúri folyadékot nem tekintettük mérhetőnek. A mérhető léziók legnagyobb kiterjedésének legalább 1 cm-esnek kell lennie. A metasztázisos betegség értékelhető helyeinek számbavételét és az értékelhető helyekben (pl. tüdőben) lévő léziók számát megfelelő esetleírási úrlapon kell regisztrálni. Ha nagy számú tüdő- vagy májlézió van jelen, az adott helyen a hat legnagyobb kiterjedésű léziót vettük számításba.

- A páciensnek képesnek kell lennie egy írásos hozzájárulási nyilatkozat megértésére és aláírására;

- Legalább 18 éves nők;

- Vér-, vese-, máj- és anyagcsere-funkciók laboratóriumi értékelése alapján citotoxikummal végzett kemoterápiára (az antitesttel végzett kezelés mellett) alkalmas személyek.

Kizáró okok

- Metasztázisos emlőrák elleni előzetes citotoxikus kemoterápia;

- Metasztázisos betegség előzetes hormonkezelése (pl.

tamoxifenrel) vagy citotoxikus terápiája;

- Az emlőrákkal együtt előforduló malignáns betegség, amelyet kúraszerűen nem kezeltek;
- Karnofsky-skálán 60 %-nál kisebb teljesítmény-státusz;
- Terhes vagy szoptató nők; szülőképes nők, ha csak nem használnak a vizsgálatot végzők által meghatározott, hatékony fogamzásgátlót;
- Két oldali emlőrák (ha mindkét elsődleges tumor 2+ vagy 3+ szintű HER2-túltermelődést, vagy ha a metasztázisos hely 2+ vagy 3+ szintű HER2-túltermelődést mutat);
- A kísérlet megkezdése előtt 30 napon belül kutatási stádiumban lévő vagy nem engedélyezett hatóanyagok alkalmazása;
- Klinikailag nem stabil vagy nem kezelt agyi metasztázisok (melyek, például, sugárterápiát igényelnek).

A fenti kritériumok alapján 469 pácienszt választottunk ki és vontunk be a vizsgálatba. A páciensek felét véletlenszerűen további HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest adagolására választottuk ki.

Adagolás és dozírozás

Anti-ErbB2 antitest

A pácienseknek a 0. napon, 90 percen keresztül a humanizált anti-ErbB2 antitest (HERCEPTIN®; H) 4 mg/kg dózist adagoltuk. A 7. naptól kezdődően a pácienseknek intravénásan, 90 percen keresztül hetenként 2 mg/kg antitestet adagoltunk.

Kemoterápia

A pácienseknek minimum hat cikluson keresztül két kemoterápiás séma egyikét alkalmaztuk (feltéve, hogy betegségük nem volt progresszív): a) ciklofoszfamid és doxorubicin (AC), ha a páciensek a hatásjavító beállítás során nem kaptak anthraciklin-terápiát; vagy b) paclitaxel (TAXOL®; T), ha a páciensek a hatásjavító beállítás során anthraciklin-terápiát kaptak. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest kezdődózisát a kemoterápiás séma első ciklusa előtt 24 órával adtuk be. Ha az antitest kezdődózisa a páciens számára jól tolerálható volt, következő dózisait közvetlenül a kemoterápiás hatóanyag adagolása előtt adtuk be. Ha az antitest első dózisát a páciens nem tolerálta megfelelően, a későbbi infúziókat a kemoterápia megkezdése előtt 24 órával adtuk be. A páciensek hat cikluson keresztül kapták a kemoterápiát, ha - a kezelőorvos véleménye szerint - a kezelés javította állapotukat.

A ciklofoszfamidot (600 mg/m^2) intravénás bolusként (legalább 3 percen át) vagy infúzióval, maximálisan két óra alatt adtuk be.

A doxorubicint (60 mg/m^2) vagy epirubicint (75 mg/m^2) intravénás bolusként (legalább 3-5 percen át) vagy infúzióval, maximálisan két óra alatt, a szokványos gyakorlatnak megfelelően adtuk be a pácienseknek.

A paclitaxelt (TAXOL®) intravénás infúzióval, 3 óra hosszat, 175 mg/m^2 dózisban adagoltuk. Valamennyi, paclitaxellel kezelt páciensnek előzőleg a következő ható-

anyagokat adagoltuk: dexametazon vagy megfelelője (kétszer 20 mg, a paclitaxel beadása előtt 12, illetve 6 órával); difenhidramin vagy megfelelője (50 mg, a paclitaxel beadása előtt 30 perccel, intravénásan adagolva); dimetidin vagy más H_2 -blokkoló (300 mg, a paclitaxel beadása előtt 30 perccel, intravénásan adagolva).

Reakció kritériumok

Progresszív betegség: bármely mérhető lézió 25 %-os vagy nagyobb növekedésének objektív bizonyítéka. A progresszív betegségek közé tartoznak azok az esetek is, amelyeknél új léziók jelennek meg. A csontléziók esetében a progressziót a síkfilmen, CT-vel vagy MRI-vel objektíven mért 25 %-os növekedése; nem törésből származó, új tüneti sérülések megjelenése; vagy palliatív radioterápia szükségessége.

Teljes reakció: az összes, radiográfiásan és/vagy vizuálisan látható tumor eltűnése minimum négy hétre. A bőr és mellkasfal teljes reakcióját biopsziával kell igazolni.

Részleges reakció: az összes mérhető tumor mérőleges átmérői szorzatainak összegében legalább 50 %-os csökkenés, amely legalább négy hétig megmarad. Új léziók nem jelenhetnek meg, és egyik lézió mérete sem növekedhet.

Kismértékű reakció: az összes mérhető tumor mérőleges átmérői szorzatainak összegében 25-49 %-os csökkenés. Új léziók nem jelenhetnek meg, és egyik lézió mérete sem növekedhet.

Stabil betegség: a mérhető léziók méretében 25 %-nál nagyobb változás nem tapasztalható. Új léziók nem jelenhetnek meg.

A betegség progressziójáig eltelt időt (TTP) a terápia elkezdésétől a progresszióig számítottuk. A reakció-ráták konfidenciahatárait a Fleiss által leírt egzakt módszerrel számítottuk ki [ld. Fleiss: "Statistical for Rates and Proportions", 2. kiadás, 13-17. old., Wiley & Sons, New York, NY (1981)].

Eredmények

10,5 hónapos átlagos megfigyelési idő alatt a betegség progressziójának (TTP, hónapokban) és a reakció-ráta (RR) mérésével a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest kemoterápiás hatásának jelentős mértékű fokozódását állapítottuk meg, anélkül, hogy a súlyos zavaró események (ZE) előfordulási aránya növekedett volna.

1. táblázat

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest hatékonysága

	Páciensek száma	TTP (hónap)	RR (%)	ZE (%)
CRx	234	5,5	36,2	66
CRx+H	235	8,6*	62,00**	69
AC	145	6,5	42,1	71
AC+H	146	9,0	64,9	68
T	89	4,2	25,0	59
T+H	89	7,1	57,3	70

* $p < 0,001$ ("log-rank" tesztrel); ** $p < 0,01$ (khi-négyzet tesztrel); CRx: kemoterápia; AC: anthraciklin/ciklofoszfamid kezelés; H: HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest; T: TAXOL®

Az anthraciklinnel és HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitesttel végzett kombinált kezelés gyakrabban eredményezett a csak anthraciklinnel végzett kezelés által okozotthoz hasonló szívizom-rendellenességet (18 %; 3/4 súlyosságú), mint a csak anthraciklinnel (3 %), TAXOL®-lal (0 %) vagy TAXOL®-lal és HERCEPTIN®-nel együttesen végzett kezelés (2 %).

Ezek az adatok azt jelzik, hogy az anti-ErbB2 antitesttel végzett kezelés kemoterápiával történő kombinálása jelentős mértékben fokozza a jótékony klinikai hatást (amit a reakció-ráta és a betegség progressziójának vizsgálata alapján). Mindazonáltal - a doxorubicin és epirubicin szívre gyakorolt mellékhatásai miatt - az anthraciklinek anti-

ErbB2 antitesttel együttes alkalmazása ellenjavallott. Az eredmények - figyelembe véve a kockázatokat és előnyöket -, azt mutatják, hogy olyan esetekben, ahol kombinált kezelésre van szükség, a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest és a paclitaxel (TAXOL®) kombinált alkalmazása előnyös.

2. példa

Az anti-ErbB2 antitest (HERCEPTIN®) farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságai

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitestet az 1. példában felsorolt kritériumok alapján kiválasztott pácienseknek intravénás infúzióval adagoltuk. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 4 mg/kg-os kezdődózisának beadása után több héten át hetente 2 mg/kg-os intravénás HERCEPTIN® dózisokat adagoltunk. Ezt a kezelési sémát 213 pácienssel kezdtük, és nyolc héten túl vérsavó hatóanyag-koncentrációt kevesebb, mint 90 páciensnél találtunk (a betegség gyors progresszióját mutató pácienseket szelektíven kihagytuk a kísérletből). A kezelést elkezdő 213 páciens közül a 12. hétre 80 páciensnél, a 16. hétre 77 páciensnél, a 20. hétre 44 páciensnél, a 24. hétre 51 páciensnél, a 28. hétre 25 páciensnél, a 32. hétre 23 páciensnél, és a 36. hétre 37 páciensnél kaptunk maradék vérsavó-koncentráció adatokat.

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest maradék vérsavó-koncentrációja a kezelés 0-36. heteiben

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest maradék vérsavó-

koncentrációját ($\mu\text{g/ml}$, átlag $\pm$ szórás) az idő függvényében ábrázoltuk (a 2. héttől a 36. hétig terjedő időszakban; ld. 3. ábra, sötét körök). A páciensek száma meglehetősen állandó volt, mivel a kísérletből a betegség gyors progressziója miatt kizárt páciensek adatait kihagytuk az analízisből. A maradék vérsavó-koncentráció a 12. hétig emelkedett, majd platózott.

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest maradék vérsavó-koncentrációja a kezelés 1-8. heteiben

A kiindulási 213 páciens közül 212-re rendelkezésre álltak bizonyos HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentráció adatok. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest első infúzióját tükröző maradék és csúcs vérsavó-koncentráció adatok a 212 páciens közül 195-re álltak rendelkezésre. A hetedik infúzióra a 212 páciens közül 137-re volt maradék vérsavó-koncentráció adatunk, míg a 212 páciens közül 114-re állt rendelkezésre csúcs vérsavó-koncentráció adat. A 2. táblázatban a maradék és csúcs vérsavó-koncentrációk - kezelés első nyolc hetére vonatkozó - statisztikájának összegzését mutatjuk be. A csúcs vérsavó-koncentráció meghatározásához a vérmintákat röviddel a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest beadása után vettük, míg a maradék vérsavó-koncentráció meghatározásához a következő dózis beadása előtt (azaz egy héttel később) vettünk mintákat. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációját az itt leírt módon határoztuk meg.

2. táblázat

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest maradék és csúcs vérsavó-koncentrációja (µg/ml) a kezelés első 8 hetében

	Dózis	n	Átlag	Szórás	Minimum	Maximum
Csúcs	1.	195	100,3	35,2	30,7	274,6
Maradék		195	25,0	12,7	0,16	60,7
Csúcs	2.	190	74,3	31,3	20,8	307,9
Maradék		167	30,4	16,0	0,2	74,4
Csúcs	3.	167	75,3	26,8	16,1	194,8
Maradék		179	33,7	17,9	0,2	98,2
Csúcs	4.	175	80,2	26,9	22,2	167
Maradék		132	38,6	20,1	0,2	89,4
Csúcs	5.	128	85,9	29,2	27,8	135,8
Maradék		141	42,1	24,8	0,2	148,7
Csúcs	6.	137	87,2	32,2	28,9	213,1
Maradék		115	43,2	24,0	0,2	109,9
Csúcs	7.	114	89,7	32,5	16,3	187,8
Maradék		137	48,8	24,9	0,2	105,2
Csúcs	8.	133	95,6	35,9	11,4	295,6

A 2. táblázatban bemutatott adatok azt mutatják, hogy a maradék vérsavó-koncentráció az idő előrehaladásával fokozódik. A számos vizsgált páciens közül 18 volt olyan, akiben a maradék vérsavó-koncentráció - a 2. héttől 8. hétig terjedő időszakban - nem haladta meg a 20 µg/ml-t. E kísérletekben - korábbi, állatokban végzett farmakológiai vizsgálatok és klinikai kísérletekben végzett próbavizsgálatok alapján - névlegesen a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest

20 µg/ml-es maradék vérsavó-koncentrációját céloztuk meg.

A páciens reakció státuszát a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációjához viszonyítva értékeltük. Erre a célra különböző időpontokra és reakció-státuszokra kiszámítottuk az átlagos vérsavó-koncentrációt (a maradék és csúcs koncentrációk átlaga). A 2. és 8. hét között a vérsavó-koncentráció növekedése a kezelésre reagáló páciensekben nagyobbak bizonyult, mint a nem reagáló páciensekben, ami arra utal, hogy összefüggés áll fenn a reakció-státusz és a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációja között. A 2. héten mért maradék vérsavó-koncentráció és a 7. és 8. héten mért maradék vérsavó-koncentrációk átlaga - reakció-státusszal összefüggésben végzett - statisztikai analízise (variancia-analízis) azt mutatta, hogy igen jelentős összefüggés tapasztalható a reakció-státusz és a 7. és 8. héten mért átlagos maradék vérsavó-koncentráció között ($p < 0,001$). Az eredmények azt mutatták, hogy a reagálók és nem reagálók között nagy különbség mutatkozik a maradék vérsavó-koncentrációban (a 7. és 8. hét átlagos maradék vérsavó-koncentrációjában); a maradék koncentrációk a reagáló páciensekben 60 ± 20 µg/ml, míg a nem reagálóknál 44 ± 25 µg/ml volt (átlag $\pm$ szórás). A HER2 túltermelődésének mértéke és a metasztatizáló helyek típusa a maradék vérsavó-koncentrációk jelentős különbségével volt összefüggésben. A 2. héten a 2+ mértékű HER2-túltermelődést mutató páciensek maradék vérsavó-koncentrációja ($n = 40$; átlag = 28,8 µg/ml; szórás = 10,4) sokkal nagyobb volt, mint a HER2-t 3+ mértékben túltermelő

páciensekben megfigyelt maradék vérsavó-koncentráció ($n = 155$; átlag = $24,1 \mu\text{g/ml}$; szórás = $13,1$). Ez a különbség a 7. és 8. hét átlagos maradék vérsavó-koncentrációjában már nem volt statisztikailag szignifikáns. A 2. héten a felületi betegség jeleit mutató páciensekben lényegesen nagyobb maradék vérsavó-koncentrációkat figyeltünk meg ($n = 12$; átlag = $34,1 \mu\text{g/ml}$; szórás = $12,0$), mint a belső részeket érintő betegséget mutató páciensekben ($n = 138$; átlag = $24,4 \mu\text{g/ml}$; szórás = $12,6$). Ez a különbség az átlagos maradék vérsavó-koncentrációban a 7. és 8. hétre szignifikáns volt. Az eredmények azt jelzik, hogy a maradék vérsavó-koncentráció 2. és 7/8. hét közötti növekedése különböző betegség-profilú páciensekre egyaránt megfigyelhető.

Egy következő, hasonlóan tervezett kísérletben emlőrákos nőket 8 mg/kg feltöltő dózissal, majd hetente 4 mg/kg fenntartó dózisokkal kezeltünk. Ezen előzetes humán vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a 8 mg/kg feltöltő dózissal és heti 4 mg/kg fenntartó dózissal végzett kezelési séma hatásos volt a betegek tumortérfogatának csökkentésére.

Az e példában leírt eredmények azt mutatják, hogy a cél-vérsavó-koncentráció gyorsabb elérését biztosító lökésterápiás antitest-adagolás javított gyógyászati eredménnyel áll összefüggésben.

3. példa

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest intravénás bolus és szubkután infúziós adagolása egerekben hatásosan csökkenti a tumortérfogatot

Ebben a példában a humanizált anti-ErbB2 antitest (HERCEPTIN®; előállítását ld. az 1. példában) infúziós és bolus adagolásának hatékonyságát (intravénás vagy szubkután injekcióval) vizsgáltuk. A vizsgálat célja annak kiderítése volt, hogy a szubkután adagolás megvalósítható-e, és hogy a kényelmes szubkután bolus adagolás hatásos-e a HER2-gént túlzott mértékben expresszáló sejtvonallal beoltott állatok metasztázisos emlőrákjának kezelésére. Az alábbiakban részletezett eredmények azt mutatják, hogy az intravénás (i.v.) és szubkután (s.c.) infúziós és bolus adagolás alkalmas kezelési módszert reprezentál.

A HER2-gént természetétől fogva túlzott mértékben expresszáló humán emlőrák-sejtvonalat (BT-474M1, amely BT-474-sejtekből származik, ATCC HTB-20) magában foglaló csupasz egér xenograft modellben végzett kísérletben az tumortérfogatot az intravénás bolus és szubkután infúziós adagolás függvényében hasonlítottuk össze. Az első kísérlethez 7-9 hetes, thymus nélküli csupasz nu/nu nőstény egerekbe (Taconic Inc., Germantown, NY) - tumorfejlődés indukálása céljából - szubkután 3×10^5 BT474M1-sejtet (Matrigel™-ben szuszpendálva) injektáltunk. Amikor a tumorcsomók kb. 100 mm^3 térfogatúak lettek, az állatokat véletlenszerűen négy kezelési csoportra osztottuk. Az egyes

csoportokba tartozó egereket a 3. táblázatban leírtak szerint kezeltük.

3. táblázat

Kezelési csoportok és dózisok az intravénás bolus és szubkután infúziós adagolás összehasonlításához

Csoport, dózis, antitest	Cél vérsavó konc. (µg/ml)	Adagolás	Kezdődózis (mg/kg)	Fenntartó dózis
1., kontroll rhuMAb E25	20	i.v. kezdő- dózis és s.c. infúzió	2,20	0,250 mg/ml (infúzió)
2., kis dó- zisú s.c., rhuMAbHER2	1	i.v. kezdő- dózis és s.c. infúzió	0,313	0,050 mg/ml (infúzió)
3., nagy dózisú s.c. rhuMAbHER2	20	i.v. kezdő- dózis és s.c. infúzió	6,25	1,00 mg/ml (infúzió)
4., több i.v. dózis, rhuMAbHER2	20 (maradék)	i.v. kezdő- és fenntar- tó dózis	4,00	2 mg/kg/hét (i.v. bolus)

Az infúziós koncentrációt úgy számítottuk ki, hogy Alzet[®] ozmotikus minipumpa (Alza Corp., Palo Alto, CA) alkalmazásával elérjük a cél-vérsavó-koncentrációt.

Az állatoknak az antitest adagolásának megkezdése előtt 9 nappal - a beültetett tumorsejtek szaporodásának elősegítése céljából - szubkután tartós kibocsátású ösztrogén-labdacsot helyeztünk be. Az állatokat a kezelés megkezdése előtt nyolc nappal beoltottuk a BT474M1-sejtekkel, és a tumorokat hagytuk növekedni. Ezt követően az állatoknak nem releváns (HER2-receptorra nem specifikus, de monoklonális IgG antitest-osztályba tartozó) E25-antitestet vagy HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitestet adtunk be (ld. 3. táblázat). A dózismagyságot úgy választottuk meg, hogy szubkután pumpával végzett adagolással vagy intravénás bolus injekcióval 1 µg/ml-es vagy 20 µg/ml-es cél-vérsavó-koncentrációt érjünk el. A kísérleti csoportok kezelését a 35. napig folytattuk. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációját hetente (közvetlenül a 4. csoportnak végzett adagolás előtt) mértük. Az egyes mérési időpontokban mindegyik csoportból három egér vérmintáit használtuk. Az anti-ErbB2 antitest koncentrációját standard technikák szerint, a leírásban ismertetett módon határoztuk meg. A tumortérfogatokat az adagolás megkezdése előtt két nappal, majd a 6. naptól a 35. napig hetente kétszer mértük. A tumorok három dimenziós kiterjedését, valamint térfogatát (mm³) mértük. Az antitest hatékonyságát a tesztállatokban mért tumortérfogatok kezeletlen kontroll állatokban mért tumortérfogathoz viszonyítva, statisztikai összehasonlítással (ANOVA) határoztuk meg.

Ahogy a 4. táblázatban látható, a BT474M1-tumorsejteket hordozó egerek HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest megadott ada-

golási módszerekkel végzett kezelése jelentős mértékben gátolta a tumorok növekedését. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitesttel kezelt csoportok a kontroll csoporthoz viszonyítva egyformán hasonló tumornövekedés-gátlást mutattak. Dózisreakciót nem tapasztaltunk.

4. táblázat

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest s.c. infúziós és i.v. bolus adagolásának összehasonlítása

Kezelési csop.	Tumortérfogat (mm ³) a 35. napon (n=14)	Tumortérfogat (görbe alatti terület 6-35. nap, n=13)	HERCEPTIN® vérsavó-konc. (µg/ml) a 27. napon, n=3
Kontroll, s.c. infúzió	764 ± 700	5650 ± 4700	4,16 ± 1,94
s.c. infúzió (kis dózis)	80,6 ± 158	1610 ± 1250	2,11 ± 1,74
s.c. infúzió (nagy dózis)	31 ± 75,6	1440 ± 1140	22,1 ± 5,43
i.v. bolus dó- zis*	49,7 ± 95,7	2150 ± 1480	21,7 ± 17,1**

* 4,0 mg/kg kezdődózis és 2,0 mg/kg/hét fenntartó dózis;

** közvetlenül a fenntartó dózis beadása előtt mért maradék vérsavó-koncentráció.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a hozzávetőleg 2 µg/ml-es vérsavó-koncentráció fenntartása ugyanolyan hatásos volt, mint a 20 µg/ml-es koncentráció. A szubkután in-

fúzióval végzett adagolás ugyanolyan hatásos volt, mint az intravénás bolus, és hasonló maradék vérsavó-koncentrációt eredményezett. Ezen túlmenően, az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált dózis-szintek e modellben a dózis-reakció görbe csúcsán vannak, és a szubkután adagolás hatásos az emlőtumorok kezelésére. Ennek megfelelően, a fenntartó dózisok szubkután adagolása alkalmas a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitesttel végzett kezelési sémához.

4. példa

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest intravénás bolus és szubkután bolus adagolása egerekben hatásosan csökkentti a tumortérfogatot

A szubkután bolus adagolás mind a páciens, mind az egészségügy számára kényelmes és költségtakarékos adagolási módszer. Az e példában leírt kísérlet eredményei azt jelzik, hogy a szubkután bolus adagolás - egerek emlőtumor-méretének csökkentésében - ugyanolyan hatásos, mint az intravénás bolus adagolás.

A kísérletet a 3. példában az intravénás bolus és szubkután infúziós adagolás összehasonlításához leírtak szerint állítottuk fel. A tumorsejtek injektálása előtt egy nappal az állatok bőre alá tartós hatóanyag-kibocsátású ösztrogén-implantátumot ültettünk be (ld. 3. példa). A tumorsejtek injektálása után hat nappal megmértük a tumor kiindulási méretét. A tumorsejtek injektálása után hét nappal beadtuk a kontroll antitest vagy a HERCEPTIN® anti-

ErbB2 antitest első dózisát. A kezelési csoportokat, az adagolás módját, a kezdődózis és fenntartó dózisok nagyságát az 5. táblázatban mutatjuk be. Az állatokat négy héten át hetente egyszer kezeltük.

5. táblázat

Az intravénás bolus és szubkután bolus adagolás összehasonlítására alkalmazott kezelési csoportok és dózisok

Csoport	Adagolási mód	Kezdődózis (mg/kg)	Fenntartó dózis (mg/kg/hét)	n
1. kontroll (rhuMAb E25)	i.v.	8	4	10
2. (rhuMAb HER2)	i.v.	2	1	10
3. (rhuMAb HER2)	i.v.	4	2	10
4. (rhuMAb HER2)	i.v.	8	4	10
5. (rhuMAb HER2)	s.c.	4	2	10

n = állatok száma csoportonként

Az egereket az 5. táblázatban leírtak szerint, a 3. példában leírt eljárások alkalmazásával kezeltük. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációját - a heti intravénás fenntartó dózisok beadása előtt (a leírásban ismertetett módon, standard technikák alkalmazásával) - hetente mértük. A kontroll E25-antitest vérsavó-

koncentrációját standard immuneszttel határoztuk meg. A 6. táblázatban a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavóban mért koncentrációjának idő függvényében történő növekedését mutatjuk be.

6. táblázat

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest vérsavó-koncentrációja intravénás, illetve szubkután bolus adagolás esetén

Kezelési csoport	0. nap (átlag ± szórás)	7. nap (átlag ± szórás)	14. nap (átlag ± szórás)	21. nap (átlag ± szórás)
1. (kontroll rhUMAbE25, i.v., 4 mg/kg)	0 ± 0	25,9±8,29	34,6±11,2	38,5±14,4
2. (rhUMAbHER2, i.v., 1 mg/kg)	0 ± 0	4,96±3,79	8,55±5,83	8,05±4,67
3. (rhUMAbHER2, i.v., 2 mg/kg)	0 ± 0	13,4±9,24	13,9±12,0	22,6±9,21
4. (rhUMAbHER2, i.v., 4 mg/kg)	0 ± 0	29,6±13,5	37,7±14,4	46,2±13,8
5. (rhUMAbHER2, s.c., 2 mg/kg)	0 ± 0	12,5±7,33	16,9±10,2	17,6±10,7

n = 10 a 0., 7. és 14. napon; a 21. napon n = 9.

A 7. táblázatban az intravénás bolus adagolás és a szubkután bolus adagolás - 6. táblázatban bemutatott vérsavó antitest-koncentrációkat elérő 1-5. csoportokban megfigyelt - relatív hatékonyságát mutatjuk be. A hatékonyságot

a tumortérfogat csökkenése alapján határoztuk meg. A tumortérfogatot hetente kétszer mértük.

7. táblázat

A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest tumortérfogat változása
alapján meghatározott hatékonysága intravénás bolus és
szubkután bolus adagolás esetén; átlag (szórás)

Kezelési csoport	Tumortérfogat (mm ³)			Görbe alatti terület (tumortérf., mm ³) 6-31. napon*	Tumornöve- kedési se- besség log(TM+1)
	(adagolás FD)	6. napon	28. napon	31. napon	
1. i.v. kontroll		321 (190)	1530 (1040)	1630 (1170)	13600 (7230) 0,0660 (0,0200)
2. (i.v. Herceptin 1 mg/kg)		297 (130)	175 (215)	151 (188)	4690 (1400) -0,0505 (0,142)
3. (i.v. Herceptin 2 mg/kg)		269 (129)	75,7 (92,4)	73,6 (84,5)	3510 (1220) -0,0608 (0,110)
4. (i.v. Herceptin 4 mg/kg)		272 (117)	25,3 (75,9)	25,8 (72,9)	2880 (1230) -0,0810 (0,0859)
5. (s.c. Herceptin 2 mg/kg)		268 (117)	76,2 (98,8)	90,4 (105)	3230 (1440) -0,0304 (0,104)

$N = 10$ (minden adatpontra); TM = tumorméret; i.v. = intravénás; s.c. = szubkután; FD = fenntartó dózis;

* a 17. napot - mérési hiba miatt - kihagytuk; a görbe alatti terület a tumortérfogat vs. idő görbe alatti terület;

A tumornövekedési sebességet a 21-31. napokra számítottuk ki; $\log(TM+1)$.

A 4/A és 4/B ábrán a tumortérfogat idő függvényében történő változásának grafikonjait mutatjuk be, mely adatok közül néhányat a 7. táblázatban is feltüntettünk. A 4/A ábrán a tumortérfogat idő függvényében készített lineáris grafikonja, a 4/B ábrán pedig ugyanezen adatok féllogaritmikus grafikonja látható (amelyen a tumortérfogat változása jobban nyomon követhető). A 7. táblázatban, illetve a 4/A és 4/B ábrán szemléltetett adatok azt jelzik, hogy - bár a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitesttel kezelt csoportok között dóziszfüggő reakciót nem figyeltünk meg - a szubkután bolus adagolás ugyanolyan hatásos, mint az intravénás bolus adagolás, és hasonló maradék vérsavó-koncentráció elérését eredményezi.

5. példa

Anti-ErbB2 antitest intravénás és szubkután adagolási sémái

A találmány szerinti megoldás értelmében az anti-ErbB2 antitest (pl. HERCEPTIN®) adagolási sémája szerint a hatóanyag nagyobb kezdőlökéss dóziszát alkalmazzuk, ami a célvérsavó-koncentráció kb. 4 hét vagy még rövidebb idő alatt

(előnyösen 3 hét vagy még rövidebb idő alatt, még előnyösebben két hét vagy még rövidebb idő alatt, legelőnyösebben egy hét vagy még rövidebb idő alatt) történő elérését teszi lehetővé. A találmány értelmében a kezdődózis beadása után további - azonos vagy kisebb nagyságú - dózisokat adagolunk, amelyek fenntartják a hatóanyag megcélzott vérsavó-koncentrációját. A találmány szerinti eljárások előnye, hogy a fenntartó dózisok ritkábban adagolhatók és/vagy szubkután injekcióval adhatók be, ami a találmány szerinti kezelési sémákat egyszerűvé és költségtakarékosná teszik mind a páciens, mind az antitest beadását végző egészségügyi dolgozók számára. Ezen túlmenően, a fenntartó szubkután adagolási séma intravénás beadással megszakítható (pl. infúzióval), ha a páciens kemoterápiájához az egyéb hatóanyagok intravénás injekcióval történő beadására van szükség.

A következő adagolási sémák teszteléséhez az 1. példában felsorolt kritériumok alapján embereket választottunk ki. A kezdődózisok száma egy vagy több lehet, amely(ek) lehetővé teszi(ek) a hatásos cél-vérsavó-koncentráció kb. négy hét vagy rövidebb, előnyösen három hét vagy rövidebb, még előnyösebben két hét vagy rövidebb, legelőnyösebben egy hét vagy rövidebb idő (pl. egy nap vagy még rövidebb idő) alatt történő elérését. Fenntartó dózisként a betegség tüneteinek enyhítéséhez (pl. a tumortérfogat csökkentéséhez) szükséges egy vagy több dózist adagolunk. A fenntartó dózisok nagysága a kezdődózis vagy -dózisok nagyságával azonos vagy annál (azoknál) kisebb lehet, ami megfelel a HERCEPTIN® anti-

ErbB2 antitest találmány szerinti - nagyobb kezdőlökést eredményező - adagolási sémájának. A megadott specifikus adagolási sémák a találmány szerinti megoldásra jellemzők, de nem jelentik a találmány oltalmi körének korlátozását.

Az első kísérletben a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 6 mg/kg-os, 8 mg/kg-os vagy 12 mg/kg-os kezdődózisát intravénás vagy szubkután injekcióval adtuk be a pácienseknek. A kezdődózisokat (feltöltő dózisok) intravénás infúzióval vagy bolus injekcióval, előnyösen szubkután bolus injekcióval adtuk be. A HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 10-20 µg/ml-es cél maradék vérsavó-koncentrációját érték el (a kezelési csoport összes tagjára számított átlag), és ezt a kezdődózissal azonos vagy annál nagyobb dózisú anti-ErbB2 antitest adagolásával tartottuk fenn. Az egyik módszer szerint a cél maradék vérsavó-koncentrációt - elérése után - a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest heti egyszeri 2 mg/kg-os dózisának legalább nyolc héten át intravénásan vagy szubkután történő adagolásával tartottuk fenn. Más módon, a fenti vagy bármely, találmány szerinti adagolási séma esetén, a fenntartó dózisok folyamatos szubkután infúzióval vagy szubkután pumpa alkalmazásával is adagolhatók.

Egy következő eljárás szerint intravénás injekcióval (infúzió vagy bolus injekció) vagy szubkután bolus injekcióval a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 8 mg/kg-os kezdőlökés dózisát adagoljuk. Ezt követően - a teljes kezelési csoportra átlagosan kb. 10-20 µg/ml maradék vérsavó-koncentráció fenntartása céljából - három hetente egyszer, intravénás bolus injekcióval, intravénás infúzióval,

szubkután infúzióval vagy szubkután bolus injekcióval az antitest 6 mg/kg-os dózisát adagoljuk.

Egy másik eljárás szerint intravénás injekcióval (infúzió vagy bolus injekció) vagy szubkután bolus injekcióval a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 12 mg/kg-os kezdőlőkés dózisát adagoljuk. Ezt követően - kb. 10-20 µg/ml maradék vérsavó-koncentráció fenntartása céljából - három hetente egyszer, intravénás bolus injekcióval, intravénás infúzióval, szubkután infúzióval vagy szubkután bolus injekcióval az antitest 6 mg/kg-os dózisát adagoljuk.

Egy további eljárás szerint intravénás infúzióval vagy bolus injekcióval - vagy előnyösen szubkután bolus injekcióval vagy infúzióval - a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 8 mg/kg-os kezdőlőkés dózisát adagoljuk. Ezt követően - a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest kb. 10-20 µg/ml maradék vérsavó-koncentrációjának fenntartása céljából - hetente 8 mg/kg-os vagy 2-3 hetente 8 mg/kg-os fenntartó dózist adagolunk. A fenntartó dózisokat intravénás infúzióval vagy bolus injekcióval, vagy - előnyösen - szubkután infúzióval vagy bolus injekcióval adagoljuk.

Egy következő eljárás szerint a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest kezdőlőkés dózisát intravénás vagy szubkután injekciók sorozatával adjuk be, például, az 1., 2. és 3. napon egyszeri, legalább 1-1 mg/kg-os dózis injektálásával (összesen 4 mg/kg-nál nagyobb kezdődózis), majd a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest maradék cél-vérsavó-koncentrációjának (pl. 10-20 µg/ml) fenntartása érdekében, három hetenként 6 mg/kg-os fenntartó dózisokat adunk be. A

fenntartó dózisokat intravénás infúzióval vagy bolus injekcióval, vagy - előnyösen - szubkután infúzióval vagy szubkután bolus injekcióval adagoljuk.

Egy következő eljárásban a lökésterápiát öt egymást követő napon, naponta legalább 1 mg/kg, előnyösen 4 mg/kg dózisú intravénás infúzióval végezzük, majd ezt az adagolási ciklust a betegség tüneteinek enyhítéséhez szükséges ismétléssel folytatjuk. A kezdődózis vagy -dózisok beadása után a következő dózisokat szubkután infúzióval vagy bolus injekcióval (ha a páciens jól tolerálja) adagoljuk. A szubkután adagolás mind a páciens, mind az egészségügyi dolgozók számára kényelmes és költségtakarékos módszer.

Egy másik eljárás szerint a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitestet kezdetben három hétig, hetente legalább két intravénás infúzióval adagoljuk, és e ciklust a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest hatásos maradék vérsavó-koncentrációjának fenntartását eredményező ismétléssel folytatjuk. Az antitestet legalább 4 mg/kg, előnyösen legalább 5 mg/kg dózissal adagoljuk. A fenntartó dózisokat intravénásan vagy szubkután adjuk be.

Amennyiben a páciens (állat vagy ember) a kezdődózis adagolása során és azt követően jól tolerálja az antitestet, a későbbi dózisokat szubkután adagolhatjuk, ami a páciens és az egészségügyi dolgozók számára egyaránt nagyobb kényelmet és költségtakarékosságot biztosít.

Állatkísérletekben a 4 mg/kg-nál nagyobb (előnyösen 5 mg/kg-nál nagyobb), intravénás vagy szubkután injekcióval beadott kezdődózis után hetente kétszer (három napos idő-

közönként) 2 mg/kg dózisú szubkután bolus injekciókat adagoltunk (kb. 10-20 g/ml maradék vérsavó-koncentrációt biztosítva). Ha ismeretes, hogy a páciens (állat vagy ember) jól tolerálja az antitestet, a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest kezdődózisát, adott esetben, előnyösen szubkután bolus injekcióval adjuk be, és a fenntartó dózisokat szintén szubkután injektálással adagoljuk.

A cél-vérsavó-koncentrációkat az állatmodellek és a humán kísérletek összehasonlítása céljából adtuk meg; klinikai alkalmazásra eltérő cél-vérsavó-koncentrációk lehetnek szükségesek. A találmány leírása alapján a felhasználó kiválaszthatja a hatásos maradék cél-vérsavó-koncentrációt biztosító lökésterápiás hatóanyag-adagolási sémát.

A találmány szerinti eljárásokban a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest, adott esetben, a betegség tüneteinek enyhítése céljából, kemoterápiás hatóanyaggal (az anthraciklin-származékok kivételével) kombinálva is adagolható. A kemoterápiás hatóanyagot a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitesttel együtt vagy külön, és eltérő adagolási séma szerint adagolhatjuk. Például, a találmány oltalmi körébe tartozik a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest TAXOL®-al kombinált, szubkután adagolása. Ezen túlmenően, a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest 6 mg/kg dózisának intravénás vagy szubkután injektálását, majd - fenntartó dózisként - három hetenként 6 mg/kg-os dózisának intravénás vagy szubkután injektálását kemoterápiás hatóanyag, így például, taxoid (pl. három hetenként 175 mg/m² paclitaxel) vagy anthraciklin-származék (pl. három hetenként 60 mg/m² doxorubicin vagy 75 mg/m²

epirubicin) adagolásával kombináljuk. Adott esetben - anthraciklin-származék alkalmazása esetén - a páciensnek kardioprotektánst is adagolunk (pl. három hetente 600 mg/m² ciklofoszfamid). Egy másik kombinált terápia során az anti-ErbB2 antitestet 4 mg/kg-nál nagyobb, előnyösen 5 mg/kg-nál nagyobb, még előnyösebben legalább 3 mg/kg feltöltő dózisban adagoljuk, és a feltöltő dózis után hetente legalább 2 mg/kg-os, előnyösen három hetente 6 mg/kg-os fenntartó dózist adagolunk. A kombinált terápia során az anti-ErbB2 antitesttel végzett kezelés során taxoidot adagolunk. A találmány egyik megvalósítási módja értelmében taxoidként paclitaxelt alkalmazunk, amelyet hetente 70-100 mg/m² dózisban adagoljuk. A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében taxoidként docetaxelt adagolunk (30-70 mg/m²/hét dózisban).

6. példa

HERCEPTIN® három hetenkénti intravénás adagolása paclitaxellel kombinálva

Jelenleg a HERCEPTIN® ajánlott dózisa hetente egyszer 2 mg/kg. A pácienseknek a heti egyszeri adagolás helyett a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitestet három hetenként, paclitaxellel (három hetente 175 mg/m²) együtt adagolhatjuk. Az ajánlott kezelési séma szimulációja arra enged következtetni, hogy a maradék vérsavó-koncentráció 17 mcg/ml lesz, ami a HERCEPTIN® korábbi intravénás klinikai kísérleteiben elért maradék cél-vérsavó-koncentráció tartományába

(10-20 mcg/ml) esik. Az első 12 páciens PK-paramétereinek megállapítása után, ha az adagolást elégtelennek érezzük, a dózist a többi 12 páciensnél három hetenkénti 8 mg/kg-ra emeljük.

A kísérletben a következő követelményeknek eleget tevő páciensek vehetnek részt:

- 1) Legalább 18 éves nők;
- 2) Szövettanilag igazolt, ErbB2-t túlzott mértékben termelő metasztázisos emlőrák;
- 3) Metasztázisos betegséggel újonnan diagnosztizált páciensek;
- 4) Legalább 70 %-os Karnofsky-féle teljesítmény-státusz;
- 5) Írásos beleegyezés a kísérletek megkezdése előtt, azzal, hogy a páciensnek joga van a kísérletből bármikor kiválni, anélkül, hogy annak káros következményei lennének.

Kizáró okok:

- 1) Terhes vagy szoptató nők;
- 2) Szülőképes korú nők, ha csak nem sebészetileg sterilek; vagy nem használnak hatékony fogamzásgátlót, például, orális fogamzásgátlót, méhbe helyezett eszközt vagy spermicid zselével kombinált pesszáriumot;
- 3) Központi idegrendszert érintő metasztázisok klinikai vagy radiológiai bizonyítéka;
- 4) Körtörténetben bármely jelentős szívbetegség előfordulása;
- 5) $LVEF \leq 50$ %;
- 6) Nem volt előzetes taxán-terápia;
- 7) A következő, rendellenes hematológiai értékek bármelyi-

kének megléte:

- 9 g/dl-nél kisebb Hb-érték;
- $3,0 \times 10^9$ /L-nél kisebb vörösvértest-szám;
- $1,5 \times 10^9$ /L-nél kisebb granulocita-szám;
- 100×10^9 /L-nél kisebb trombocita-szám;

8) A következő, rendellenes májfunkció-eredmények bármelyikének megléte

- szérumbilirubin szint nagyobb, mint a normális szint felső határának (ULN) 1,5-szerese;

- ALT és/vagy AST szint nagyobb, mint $2,5 \times \text{ULN}$ (máj- vagy csont-metasztázisok esetében $4,0 \times \text{ULN}$ értéknél nagyobb);

- Alkalikus foszfatáz szint nagyobb, mint $2,5 \times \text{ULN}$ (máj- vagy csont-metasztázisok esetében $4,0 \times \text{ULN}$ értéknél nagyobb);

9) A következő, rendellenes vesefunkció-eredmény megléte:

- szérum-kreatinin nagyobb, mint $1,5 \times \text{ULN}$

10) Kórtörténetben egyéb súlyos betegségek, amelyek eleve kizárják a páciens kutatási célú vizsgálatban való részvételét.

HERCEPTIN®

Feltöltő dózis és adagolási séma: 8 mg/kg, első dózis;

Fenntartó dózis és adagolási séma: 6 mg/kg, három hetente.

Paclitaxel

175 mg/m², i.v. három hetente x hat ciklus (3 órás infúzióként).

Megjegyzés: A kezelés első ciklusában a paclitaxelt a HERCEPTIN® beadása előtt 6 órával adjuk be, hogy meghatá-

rozhasseuk a csak paclitaxel adagolására vonatkozó PK-paramétereket. A HERCEPTIN®-t a paclitaxel beadása után 6 órával, csak az első ciklusban adagoljuk. A következő kezelési ciklusokban a HERCEPTIN®-t a paclitaxel beadása előtt adjuk be.

E vizsgálat teljes időtartama 18 hét. A kísérleti személyek maximum hat teljes HERCEPTIN®-dózist kapnak. Miután az utolsó páciens is megkapta az utolsó paclitaxel-dózist, az biztonsági és farmakokinetikai analízishez történő min- tagyűjtést beszüntetjük és a kísérletet lezárjuk. A kísér- letben résztvevők - a vizsgálatot végző személy döntése alapján - tovább kaphatják a HERCEPTIN® +/- paclitaxel te- rápiát.

Úgy véljük, hogy - a HERCEPTIN® anti-ErbB2 antitest dózisainak ritka adagolásának ellenére - a fent leírt keze- lési séma hatásos a metasztázisos emlőrák kezelésére.

Bár a találmány fentiekben ismertetett konkrét szem- pontjait és megvalósítási módjait elegendőnek tartjuk a ta- lálmány céljainak és előnyeinek megvalósításához, tudni kell, hogy ezek csupán a találmány jelenleg előnyös megva- lósítási módjait szemléltetik, és semmiképpen nem jelentik a találmány oltalmi körének korlátozását. A leírásban emlí- tett valamennyi hivatkozást teljes terjedelmében a kitaní- tás részének tekintjük.

Szekvencialista

Szekvenciák száma: 15

<210> 1
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	1	5	10	15
Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	20	25	30	
Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	35	40	45	
Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	50	55	60	
Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	65	70	75	
Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	80	85	90	
Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	95	100	105	
Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	110	115	120	
Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln	125	130	135	
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	140	145	150	
Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	155	160	165	

Ala

<210> 2
<211> 32
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro
1 5 10 15

Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln
20 25 30

Gly Cys

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> mesterséges

<220>

<221> mesterséges

<222> 1-11

<223>

<400> 3

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> mesterséges

<220>

<221> mesterséges

<222> 1-7

<223>

<400> 4

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> mesterséges

<220>

<221> mesterséges

<222> 1-8

<223>

<400> 5

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> mesterséges

<220>

<221> mesterséges

<222> 1-8

<223>

<400> 6

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> masterséges

<220>

<221> masterséges

<222> 1-8

<223>

<400> 7

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5

<210> 8

<211> 59

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
1 5 10 15

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
20 25 30

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
35 40 45

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg
50 55

<210> 9

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr
1 5 10 15

Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
20 25 30

Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys
35 40 45

Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu
50 55 60

Gly Ala Cys Gln Pro
65

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 10

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val

1	5	10	15
Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser	20	25	30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys	35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp	50	55	60
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile	65	70	75
Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	80	85	90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu	95	100	105
Ile Lys			

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11	
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly	15
1	5
Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr	30
20	25
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	45
35	40
Gln Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr	60
50	55
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser	75
65	70
Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp	90
80	85
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr	105
95	100
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	115
110	115

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> mesterseges

<400> 12	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	15
1	5
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser	30
20	25

Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> mesterséges

<220>
 <221> mesterséges
 <222> 1-119
 <223> Fab 574 VH

<400> 13	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10					15
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
					20					25					30
	Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
					35					40					45
	Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
					50					55					60
	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser
					65					70					75
	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					80					85					90
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
					95					100					105
	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
					110					115					

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> mesterséges

<400> 14	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
	1				5					10					15
	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
					20					25					30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> mesterséges

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
 95 100 105
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

Szabadalmi igénypontok

1. Anti-ErbB2 huMAB 4D5-8 antitest felhasználása olyan gyógyszer előállítására, amely az ErbB2 receptor túlzott termelődésével jellemezhető emlőrákkal diagnosztizált humán páciens kezelésére szolgál, ahol a kezelés során a páciensnek az anti-ErbB2 huMAB 4D5-8 antitest 8 mg/kg testtömeg kezdeti dózisát adjuk be intravénásan, majd több későbbi 6 mg/kg testtömeg dózist adagolunk az antitestből intravénásan a páciensnek, és a későbbi dózisok beadása között 3 hét időkülönbséget tartunk.

2. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, ahol a kezdeti dózist három hét múlva követi az első későbbi dózis.

3. A 2. igénypont szerinti felhasználás, ahol az intravénás beadást intravénás infúzióval végezzük.

4. A 3. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAB 4D5-8 antitest 10 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

5. A 3. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAB 4D5-8 antitest 20 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

6. A 2. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAB 4D5-8 antitest 10 µg/ml ér-

tékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

7. A 2. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest 20 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

8. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, ahol az intravénás beadást intravénás infúzióval végezzük.

9. A 8. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest 10 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

10. A 8. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest 20 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

11. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest 10 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

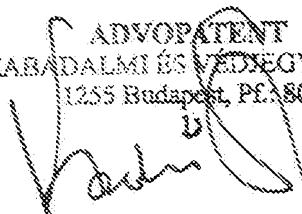
12. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, ahol a későbbi dózisok az anti-ErbB2 huMAb 4D5-8 antitest 20 µg/ml értékű vagy ezt meghaladó maradék vérsavó-koncentrációját tartják fenn.

13. Az 1.-12. igénypont bármelyike szerinti felhasználás, ahol egy kemoterápiás szer hatékony mennyiségét is beadjuk.

14. A 13. igénypont szerinti felhasználás, ahol kemoterápiás szerként paklitaxelt vagy docetaxelt alkalmazunk.

A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDELMI IRODA
1255 Budapest, Pf. 80.



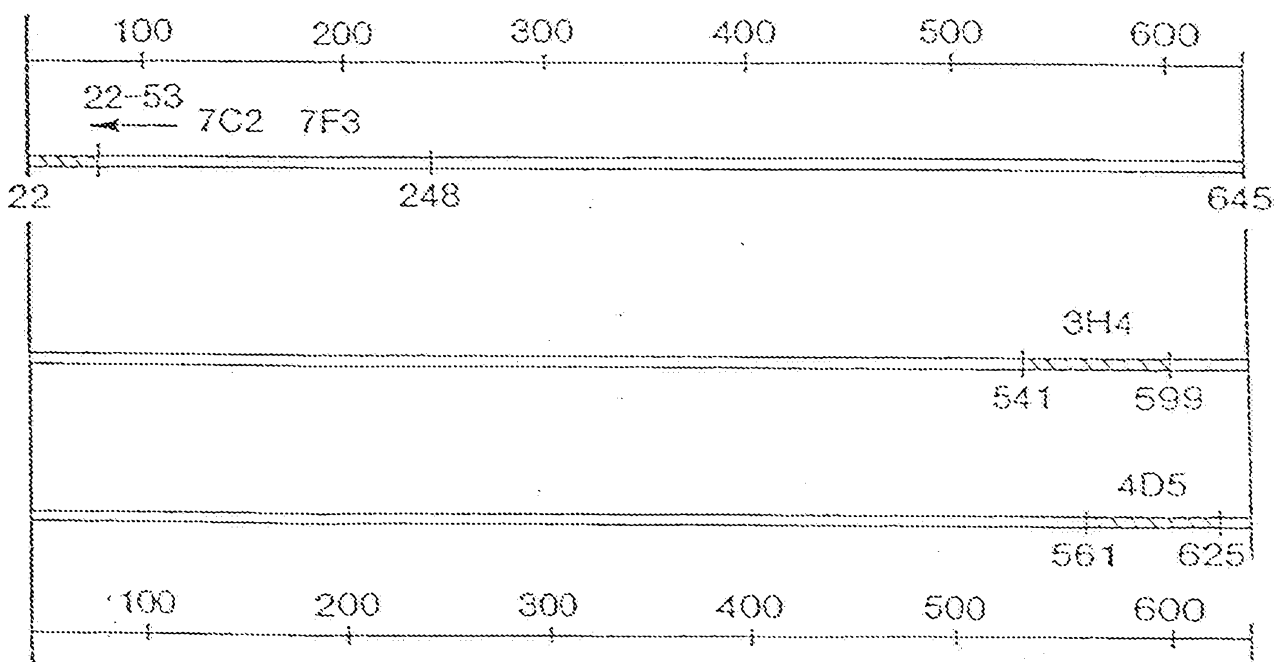
1. ÁBRA

541-599. aminosavak

529-625. aminosavak

22-53. aminosavak

22-53. aminosavak



3H4-építőp (58 aminosav, 8. azonosítószámú szekvencia)

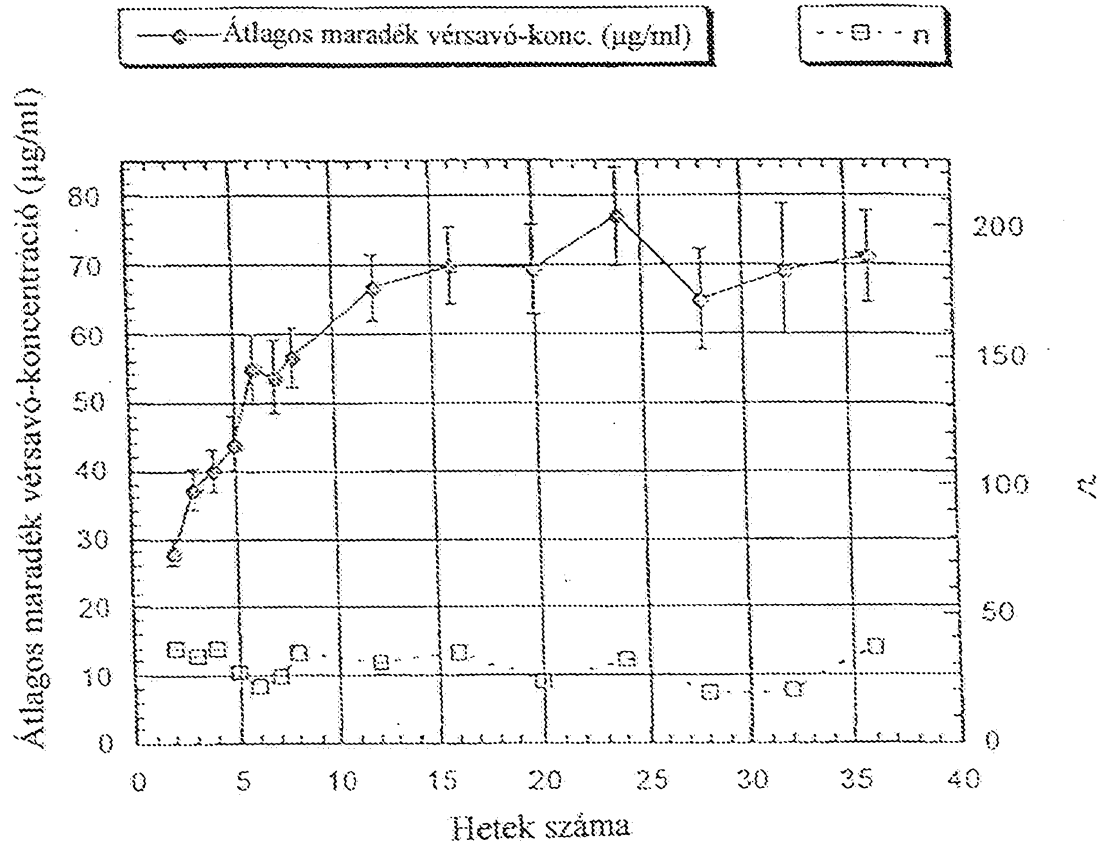
VEECRVLQGLPPEYVTGPHCLPCHPECQPQNGSVTCFGEADQCVACAHYKDPFFCVAR
 | |
 541 599

4D5-építőp (64 aminosav, 9. azonosítószámú szekvencia)

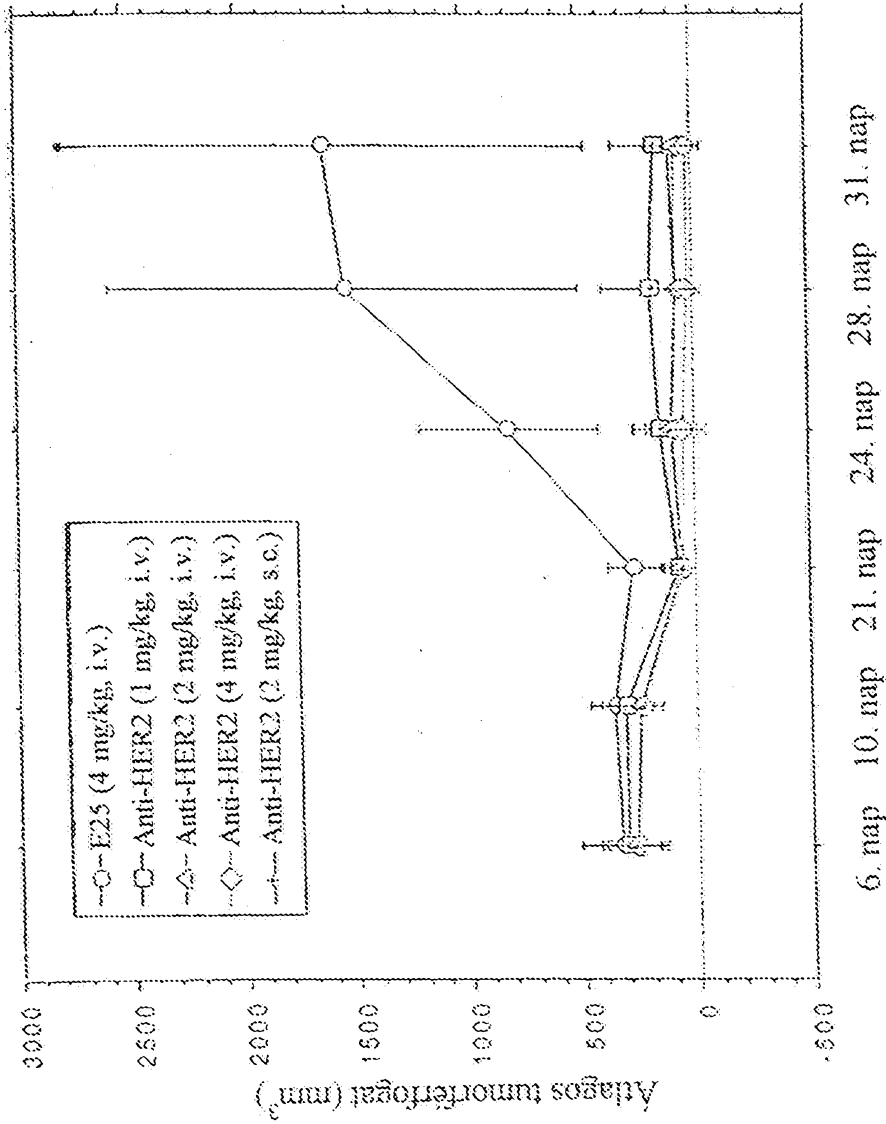
LPCHPECQPQNGSVTCFGEADQCVACAHYKDPFFCVARPCPSGVKPDLSYMPDWKFPDEEGACQP
 | |
 561 625

1 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPA
38 SPETHLDMLRHLYQGCQVVOGNLELTYPNASLSFL
75 ODIOEVOGYVLI AHNOVROVPLQRLRIVRGTO LFEDN
112 YALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELOLRSLTEI
149 LKGGVLIORNPOLCYODTILWKDIFHKNNOLALTLD
186 TNRSRA

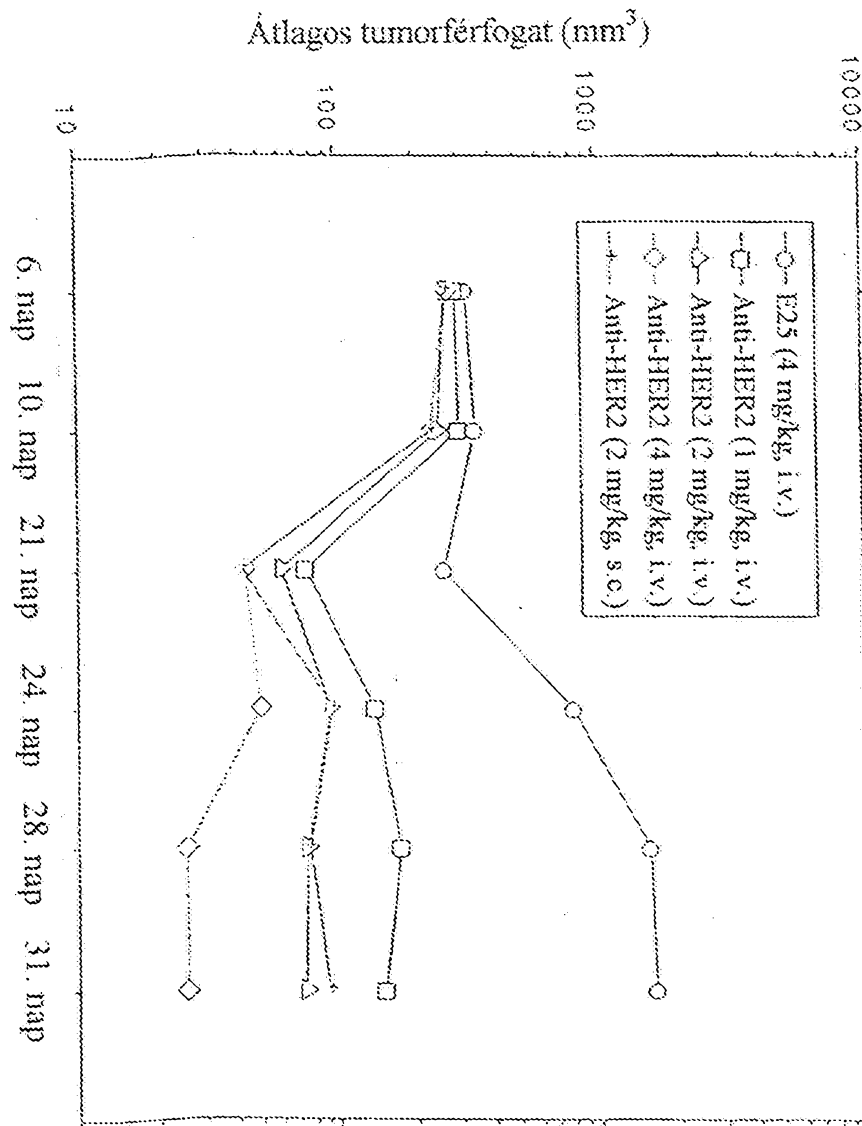
2. ÁBRA



3. ÁBRA



4/A ÁBRA



4/B ÁBRA

5/A ÁBRA: Könnyű lánc variábilis régió

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQORP	
	** **** *	*	*	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRK	
		* ** ***		
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQRK	

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTFTETISSVQA		
	** *	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		
	* *****			
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP		

	90	100
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGKLEIK (SEQ ID NO:10)
	* *	*
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGQKVEIK (SEQ ID NO:12)
	**** *	
hum KI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQKVEIK (SEQ ID NO:14)

5/B ÁBRA: Nehéz lánc variábilis régió

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** * * **** *		*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		**** *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSNTLYL		
	***** * *			
hum III	PGKGLEWVA [VISGOGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSENTLYL		

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:11)
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:13)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:15)