



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 33 658 T2** 2007.11.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 189 634 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 33 658.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/17423**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 939 992.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/000238**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.03.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

141315 P 25.06.1999 US

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

SLIWKOWSKI, Mark X., San Carlos, CA, US

(54) Bezeichnung: **BEHANDLUNG VON PROSTATA-KREBS MIT ANTI-ERBB2 ANTIKÖRPERN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Behandlung von Prostatakrebs mit Anti-ErbB2-Antikörpern.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die ErbB-Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen sind wichtige Vermittler von Zellwachstum, Differenzierung und Überleben. Die Rezeptorfamilie umfasst vier gesonderte Mitglieder, einschließlich Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR oder ErbB1), HER2 (ErbB2 oder p185^{neu}), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4 oder tyro2).

[0003] EGFR, kodiert durch das erbB1-Gen, ist kausal mit humaner Malignität in Zusammenhang gebracht worden. Im Besonderen ist erhöhte Expression von EGFR bei Brust-, Blasen-, Lungen-, Kopf-, Hals- und Magenkrebs wie auch in Glio-Blastomen beobachtet worden. Erhöhte EGFR-Rezeptorexpression in denselben Tumorzellen ist oft mit erhöhter Produktion des EGFR-Liganden, dem transformierenden Wachstumsfaktor Alpha (TGF- α), assoziiert und führt über einen autokrinen Stimulations-Stoffwechselweg zu Rezeptoraktivierung. Baselga und Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64, 127-154 (1994). Monoklonale Antikörper gegen EGFR oder dessen Liganden, TGF- α und EGF, sind als therapeutische Mittel zur Behandlung solcher Malignitäten evaluiert worden. Siehe z.B. Baselga und Mendelsohn (s.o.); Masui et al., *Cancer Research* 44, 1002-1007 (1984); und Wu et al., *J. Clin. Invest.* 95, 1897-1905 (1995).

[0004] Das zweite Mitglied der ErbB-Familie, p185^{neu}, ist ursprünglich als das Produkt des transformierenden Gens aus Neuroblasten chemisch behandelter Ratten identifiziert worden. Die aktivierte Form des neu-Proto-Oncogens resultiert aus einer Punktmutation (Valin zu Glutaminsäure) in der Transmembran-Region des kodierten Proteins. Amplifizierung des humanen Analogons von neu wird bei Brust- und Eierstockkrebs beobachtet und korreliert mit einer schlechten Prognose (Slamon et al., *Science* 235, 177-182 (1987); Slamon et al., *Science* 244, 707-712 (1989); und US Patent Nr. 4.968.603). Bis heute ist für humane Tumoren von keiner Punktmutation analog zu der im neu-Proto-Oncogen berichtet worden. Überexpression von ErbB2 (häufig aber nicht einheitlich auf Gen-Amplifizierung zurückzuführen) ist auch bei anderen Karzinomen, einschließlich Karzinomen von Magen, Endometrium, Speicheldrüse, Lunge, Niere, Dickdarm, Schilddrüse, Pankreas und Blase, beobachtet worden. Siehe unter anderem King et al., *Science* 229, 974 (1985); Yokota et al., *Lancet* 1, 765-767 (1986); Fukushima et al., *Mol. Cell. Biol.* 6, 955-958 (1986); Geurin et al., *Oncogene Res.* 3, 21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene* 4, 81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.* 51, 1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.* 38, 364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.* 49, 6605 (1989); Kern et al., *Cancer Res.* 50, 5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.* 49, 6005 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.* 3, 354-357 (1990); Aasland et al., *Br. J. Cancer* 57, 358-363 (1988); Williams et al., *Pathobiology* 59, 46-52 (1991); und McCann et al., *Cancer* 65, 88-92 (1990). ErbB2 kann bei Prostatakrebs überexprimiert werden (Gu et al., *Cancer Lett.* 99, 185-9 (1996); Ross et al., *Hum. Pathol.* 28, 827-33 (1997); Ross et al., *Cancer* 79, 2162-70 (1997); und Sadasivan et al., *J. Urol.* 150, 126-31 (1993)). Antikörper gegen das Ratten-p185^{neu} und Human-ErbB2-Protein-Produkte sind beschrieben worden. Drebin und Mitarbeiter haben Antikörper gegen das Ratten-neu-Genprodukt, p185^{neu}, hergestellt. Siehe z.B. Drebin et al., *Cell* 41, 695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198, 277-290 (1991); und WO 94/22478. Drebin et al., *Oncogene* 2, 273-277 (1988), berichten, dass gegen zwei gesonderte p185^{neu}-Regionen reaktive Antikörpermischungen zu synergistischen Anti-Tumor-Effekten auf neu-transformierte, in nackte Mäuse implantierte NIH-3T3-Zellen führen. Siehe auch US-Patent 5.824.311, erteilt am 20. Oktober 1998.

[0005] Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3), 1165-1172 (1989), beschreiben die Bildung eines Panels von Anti-ErbB2-Antikörpern, die unter Verwendung der Human-Brusttumor-Zelllinie SKBR3 charakterisiert wurden. Relative Zellproliferation der SKBR3-Zellen nach Einwirken der Antikörper wurde mittels Kristallviolett-Färbung der Monoschichten nach 72 Stunden bestimmt. Mit diesem Assay wurde maximale Inhibierung mit dem als 4D5 bezeichneten Antikörper erhalten, der die Zellproliferation um 56% inhibierte. Andere Antikörper dieser Liste verminderten in diesem Assay die Zellproliferation in einem geringeren Ausmaß. Weiters wurde gefunden, dass der Antikörper 4D5 ErbB2-überexprimierende Brusttumor-Zelllinien für die zytotoxischen Effekte von TNF- α sensibilisiert. Siehe auch US-Patent Nr. 5.677.171, erteilt am 14. Oktober 1997. Die bei Hudziak et al. diskutierten Anti-ErbB2-Antikörper werden weiter charakterisiert von Fendly et al., *Cancer Research* 50, 1550-1558 (1990); Kotts et al., *In Vitro* 26(3), 59A (1990); Sarup et al., *Growth Regulation* 1, 72.82 (1991); Shepard et al., *Clin. Immunol.* 11(3), 117-127 (1991); Kumar et al., *Mol. Cell. Biol.* 11(2), 979-986 (1991); Lewis et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 37, 255-263 (1993); Pietras et al., *Oncogene* 9, 1829-1838 (1994); Vitetta

et al., Cancer Research 54, 5301-5309 (1994); Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20), 14661-14665 (1994); Scott et al., J. Biol. Chem. 266, 14300-5 (1991); D'souza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 7202-7206 (1994); Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996); und Schaefer et al., Oncogene 15, 1385-1394 (1997).

[0006] Eine rekombinante, humanisierte Version des murinen Anti-ErbB2-Antikörpers 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 oder HERCEPTIN®; US-Patent Nr. 5.821.337) ist in Patienten mit ErbB2-überexprimierenden metastasierenden Brustkrebsen, die eine umfassende Vor-Anti-Krebstherapie erhalten haben, klinisch aktiv (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14, 737-744 (1996)). HERCEPTIN® erhielt die Marktzulassung von der Food and Drug Administration am 25. September 1998 für die Behandlung von Patienten mit metastasierendem Brustkrebs, deren Tumoren das ErbB2-Protein überexprimieren.

[0007] WO 99/31140 betrifft die Behandlung von durch Überexpression von ErbB2 charakterisierten Leiden. Genauer gesagt die Behandlung von menschlichen Patienten, die für Krebs anfällig sind oder an einem solchen leiden, bei dem ErbB2 überexprimiert wird, und zwar mit einer Kombination aus einem Anti-ErbB2-Antikörper und einem Chemotherapeutikum, das kein Anthracyclin ist, z.B. Doxorubicin oder Epirubicin.

[0008] Andere Anti-ErbB2-Antikörper mit verschiedensten Eigenschaften wurden beschrieben von Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47, 933-937 (1991); McKenzie et al., Oncogene 4, 543-548 (1989); Maier et al., Cancer Res. 51, 5361-5369 (1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3, 350-362 (1990); Stancovski et al., PNAS (USA) 88, 8691-8695 (1991); Bacus et al., Cancer Research 52, 2580-2589 (1992); Xu et al., Int. J. Cancer 53, 401-408 (1993); WO 94/00136; Kasprzyk et al., Cancer Research 52, 2771-2776 (1992); Hancock et al., Cancer Res. 51, 4575-4580 (1991); Shawver et al., Cancer Res. 54, 1367-1373 (1994); Arteaga et al., Cancer Res. 54, 3758-3765 (1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267, 15160-15167 (1992); US-Patent Nr. 5.783.186; und Klapper et al., Oncogene 14, 2099-2109 (1997).

[0009] Ein gegen ErbB2 gerichteter intrazellulärer scFv-Antikörper wurde verwendet, um die Membranexpression dieses Rezeptors in den Zelllinien DU145, LNCaP und PC3 herabzuregulieren (Myers et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 37(0), 342, Nr. 2334 (1996)).

[0010] In Skrepnik et al., J. Urology 161, 984-989 (1999), wurden subkutane Xenotransplantate in Mäusen, die aus den Zelllinien DU145 und PC3 gezüchtet worden waren, unter Einsatz eines Oncotoxins behandelt. Das Oncotoxin umfasste einen Anti-ErbB2-Antikörper, der innerhalb einer einkettigen Antikörperdomäne enthalten war, die an einen Teil des Pseudomonas-Exotoxins A gebunden war, wodurch Proteinsynthese in Target-Zellen gehemmt wurde.

[0011] Ein bispezifischer Antikörper (MDX-H210), der eine Erkennungsstelle für ErbB2 in Kombination mit GM-CSF enthielt, wurde in einem klinischen Phase-II-Test zur Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt (James et al., Brit. J. Cancer 78(2), 19, 056 (1998)).

[0012] Homologie-Screening führte zur Identifizierung von zwei anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Familie; ErbB3 (US-Pat. Nr. 5.183.884 und 5.480.968; wie auch Kraus et al., PNAS (USA) 86, 9193-9197 (1989)) und ErbB4 (europäische Patentanmeldung Nr. 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1746-1750 (1993); und Plowman et al., Nature 366, 473-475 (1993)). Beide dieser Rezeptoren zeigen erhöhte Expression bei zumindest einigen Brustkrebs-Zelllinien.

[0013] Die ErbB-Rezeptoren werden im Allgemeinen in verschiedensten Kombinationen in Zellen gefunden, und es wird angenommen, dass Hetero-Dimerisierung die Diversität zellulärer Antworten auf eine Vielzahl von ErbB-Liganden steigert (Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment 35, 115-132 (1995)). EGFR wird von sechs verschiedenen Liganden gebunden: Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF), transformierendem Wachstumsfaktor Alpha (TGF- α), Amphiregulin, Heparin-bindendem Epidermis-Wachstumsfaktor (HB-EGF), Betacellulin und Epregrulin (Groenen et al., Growth Factors 11, 235-257 (1994)). Eine Familie von Heregulin-Proteinen, resultierend vom alternativen Spleißen eines einzelnen Gens, sind Liganden für ErbB3 und ErbB4. Die Heregulin-Familie umfasst Alpha-, Beta- und Gamma-Hereguline (Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992); US-Patent Nr. 5.641.869; und Schaefer et al., Oncogene 15, 1385-1394 (1994)); neu-Differenzierungsfaktoren (NDFs), Glia-Wachstumsfaktoren (GGFs); Acetylcholin-Rezeptor-induzierende Aktivität (ARIA); und sensorischer und motorischer Neuron-abgeleiteter Faktor (SMDF). Für einen Überblick siehe Groenen et al., Growth Factors 11, 235-257 (1994); G. Lemke, Molec. & Cell. Neurosci. 7, 247-262 (1996) und Lee et al., Pharm. Rev. 47, 51-85 (1995). Kürzlich wurden drei zusätzliche ErbB-Liganden identifiziert; Neuregulin-2 (NRG-2), der entweder ErbB3 oder ErbB4 binden soll (Chang et al., Nature 387, 509-512 (1997); und Carraway et al., Nature 387, 512-516 (1997)); Neuregulin-3, das ErbB4 bindet (Zhang et al., PNAS (USA) 94(18), 9562-7

(1997); und Neuregulin-4, das ErbB4 bindet (Harari et al., *Oncogene* 18, 2681-89 (1999)). HB-EGF, Betacellulin und Epiregulin binden ebenfalls an ErbB4.

[0014] Während EGF und TGF- α nicht an ErbB2 binden, stimuliert EGF EGFR und ErbB2, um ein Heterodimer zu bilden, das EGFR aktiviert und zu Transphosphorylierung von ErbB2 im Heterodimer führt. Dimerisierung und/oder Transphosphorylierung scheinen die ErbB2-Tyrosinkinase zu aktivieren. Siehe Earp et al. (s.o.). Ebenso wird ein aktiver Signal-Komplex gebildet, wenn ErbB3 mit ErbB2 co-exprimiert wird, und Antikörper gegen ErbB2 sind in der Lage, diesen Komplex zu zerstören (Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.* 269(20), 14661-14665 (1996)). Zusätzlich dazu wird die Affinität von ErbB3 für Heregulin (HRG) auf einen höheren Affinitätszustand gesteigert, wenn es mit ErbB2 co-exprimiert wird. Siehe auch Levi et al., *Journal of Neuroscience* 15, 1329-1340 (1995); Morrissey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1431-1435 (1995); und Lewis et al., *Cancer Res.* 56, 1457-1465 (1996), bezüglich des ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes. ErbB4 bildet wie ErbB3 einen aktiven Signalkomplex mit ErbB2 (Carraway und Cantley, *Cell* 78, 5-8 (1994)).

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 offenbart ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs (z.B. androgenunabhängigem Prostatakrebs) beim Menschen bereit. Der Antikörper blockiert die Bindung eines monoklonalen Antikörpers 2C4 an ErbB2 und vorzugsweise auch die TGF- α -Aktivierung von mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK).

[0016] Die Erfindung stellt weiters die Verwendung eines Chemotherapeutikums (z.B. eines Taxans) und eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 offenbart ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs beim Menschen bereit. Der Antikörper blockiert die Bindung eines monoklonalen Antikörpers 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, an ErbB2.

[0017] Die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der ErbB2 bindet, kann verwendet werden, um androgenabhängigen Prostatakrebs bei einem Menschen zu behandeln, und führt gegebenenfalls zu einem erhöhten prostataspezifischen Antigen-(PSA-) Index im Menschen. Der Antikörper blockiert wie der monoklonale Antikörper 2C4 (z.B. humanisierter 2C4) die Ligandenaktivierung eines ErbB2-Rezeptors. Dem Menschen kann außerdem ein Chemotherapeutikum, vorzugsweise ein Taxan, verabreicht werden.

[0018] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Fabrikat bereit, das einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung umfasst, worin die Zusammensetzung einen Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 offenbart ist, und weiters eine Packungsbeilage umfasst, in der angegeben ist, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatakrebs, z.B. androgenabhängigem Prostatakrebs, eingesetzt werden kann, worin der Antikörper die Bindung eines monoklonalen Antikörpers 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, an ErbB2 blockiert. Gegebenenfalls gibt die Packungsbeilage weiters die Behandlung des Patienten mit einem Chemotherapeutikum, wie z.B. Taxan, an.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0019] Die [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) beschreiben die Epitop-Kartierung der Reste 22-645 innerhalb der extrazellulären Domäne (ECD) von ErbB2 (Aminosäuresequenz, einschließlich Signalsequenz, gezeigt in [Fig. 1A](#); Seq.-ID Nr. 13), wie bestimmt mittels Trunktations-Mutanten-Analyse und ortsgerichteter Mutagenese (Nakamura et al., *J. of Virology* 67(10), 6179-6191 (1991); und Renz. et al., *J. Cell. Biol.* 125(6), 1395-1406 (1994)). Die verschiedenen ErbB2-ECD-Trunktationen oder -Punktmutationen wurden unter Verwendung von Polymerkaskettenreaktionstechnologie aus cDNA hergestellt. Die ErbB2-Mutanten wurden als gD-Fusionsproteine in einem Säugetier-Expressionsplasmid exprimiert. Dieses Expressionsplasmid verwendet den Cytomegalievirus-Promotor/Enhancer mit SV40-Terminations- und -Polyadenylierungs-Signalen, die stromabwärts der inserierten cDNA lokalisiert ist. Plasmid-DNA wurde in 293-Zellen transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht metabolisch markiert, und zwar in Methionin- und Cystein-freiem, Glucosearmem DMEM, enthaltend 1% dialysiertes Fetal-Rinderserum und jeweils 25 μ Ci 35 S-Methionin und 35 S-Cystein. Über-

stände wurden gesammelt, und es wurden entweder die monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper oder Kontroll-Antikörper zu dem Überstand zugesetzt und 2–4 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Die Komplexe wurden präzipitiert, auf ein 10–20% Tricin-SDS-Gradientengel aufgetragen und Elektrophorese bei 100 V unterworfen. Das Gel wurde auf eine Membran elektrogeblottet und mittels Autoradiographie analysiert. Wie in [Fig. 1B](#) gezeigt, binden die Antikörper 7C2, 7F3, 2C4, 7D3, 3E8, 4D5, 2H11 und 3H4 verschiedenste ErbB2-ECD-Epitope.

[0020] Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen den Effekt der monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper 2C4 und 7F3 auf die rHRGβ1-Aktivierung von MCF7-Zellen. [Fig. 2A](#) zeigt Dosis-Antwort-Kurven von 2C4- oder 7F3-Inhibierung von HRG-Stimulation der Tyrosin-Phosphorylierung. [Fig. 2B](#) zeigt Dosis-Antwort-Kurven für die Inhibierung von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄-Bindung and MCF7-Zellen durch 2C4 und 7F3.

[0021] [Fig. 3](#) beschreibt die Inhibierung der spezifischen Bindung von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄ an ein Panel von humanen Tumor-Zelllinien durch die monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper 2C4 oder 7F3. Monoklonale Antikörper-Kontrollen sind Isotypen-übereinstimmende, murine monoklonale Antikörper, die die rHRG-Bindung nicht blockieren. Unspezifische Bindung von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄ wurde aus parallelen Inkubationen, durchgeführt in Gegenwart von 100 nM rHRGβ1, bestimmt. Werte für unspezifische Bindung von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄ waren unter 1% für alle getesteten Zelllinien.

[0022] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) zeigen den Effekt der monoklonalen Antikörper 2C4 und 4D5 auf die Proliferation von MDA-MB-175- ([Fig. 4A](#)) und SK-BR-3- ([Fig. 4B](#)) Zellen. MDA-MB-175- und SK-BR-3-Zellen wurden in 96-Napf-Platten geimpft und 2 Stunden lang anhaften gelassen. Das Experiment wurde in 1% Serum enthaltendem Medium durchgeführt. Anti-ErbB2-Antikörper oder Medium alleine wurden zu den Zellen zugesetzt und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde rHRGβ1 (1 nM) oder Medium alleine zugesetzt, und die Zellen wurden 4 Tage lang inkubiert. Monoschichten wurde gewaschen und mit 0,5% Kristallviolett gefärbt/fixiert. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

[0023] Die [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) zeigen den Effekt von monoklonalem Antikörper 2C4, HERCEPTIN®-Antikörper oder einem Anti-EGFR-Antikörper auf die Heregulin-(HRG-) abhängige Assoziierung von ErbB2 mit ErbB3 in niedrige/normale ErbB2-Ausmaße ([Fig. 5A](#)) exprimierenden MCF7-Zellen und hohe Ausmaße von ErbB2 ([Fig. 5B](#)) exprimierenden SK-BR-3-Zellen; siehe Beispiel 2 unten.

[0024] Die [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) vergleichen die Aktivitäten von intaktem murinem monoklonalem Antikörper 2C4 (mu-2C4) und einem chimären 2C4-Fab-Fragment. [Fig. 6A](#) zeigt die Inhibierung der ¹²⁵I-HRG-Bindung an MCF7-Zellen durch den chimären 2C4-Fab- oder intakten murinen monoklonalen Antikörper 2C4. MCF7-Zellen wurden in 24-Napf-Platten (1 × 10⁵ Zellen/Napf) inokuliert und 2 Tage lang auf ungefähr 85% Konfluenz gezüchtet. Bindungsexperimente wurden wie in Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996), beschrieben durchgeführt. [Fig. 6B](#) beschreibt die Inhibierung der rHRGβ1-Aktivierung der p180-Tyrosin-Phosphorylierung in MCF7-Zellen, die wie in Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996), durchgeführt wurde.

[0025] Die [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) beschreiben Anordnungen der Aminosäure-Sequenzen von variablen Leicht-(V_L) ([Fig. 7A](#)) und variablen Schwereketten-Domänen (V_H) ([Fig. 7B](#)) des murinen monoklonalen Antikörpers 2C4 (Seq.-ID Nr. 1 bzw. 2); V_L- und V_H-Domänen der humanisierten Fab-Version 574 (Seq.-ID Nr. 3 bzw. 4) und humanen V_L- und V_H-Konsensus-Gerüsten (hum-κ1, leichte Kappa-Untergruppe I; humIII, schwere Untergruppe III) (Seq.-ID Nr. 5 bzw. 6). Sternchen identifizieren Unterschiede zwischen der humanisierter Fab-Version 574 und dem murinen monoklonalen Antikörper 2C4 oder zwischen der humanisierten Fab-Version 574 und dem Humangerüst. Komplementarität bestimmende Regionen (CDRs) sind in eckigen Klammern gezeigt.

[0026] Die [Fig. 8A](#) bis C zeigen die Bindung von chimären Fab-2C4 (Fab.v1) und mehreren humanisierten 2C4-Varianten an die extrazelluläre ErbB2-Domäne (ErbB2-ECD), wie bestimmt mittels ELISA in Beispiel 3.

[0027] [Fig. 9](#) ist eine Bandgrafik der V_L- und V_H-Domänen des monoklonalen Antikörpers 2C4 mit markiertem weißem CDR-Grundgerüst (L1, L2, L3, H1, H2, H3). V_H-Seitenketten, mittels Mutagenese während Humanisierung evaluiert (siehe Beispiel 3, Tabelle 2), sind ebenfalls gezeigt.

[0028] [Fig. 10](#) beschreibt den Effekt von monoklonalem Antikörper 2C4 oder HERCEPTIN® auf EGF-, TGF-α- oder HRG-vermittelte Aktivierung von Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK).

[0029] [Fig. 11A](#) bis H zeigen die Reaktion von Xenotransplantat-Tumoren auf eine Behandlung mit HERCEPTIN® (H, ■), einer Kontrolle (C, O), TAXOL® (T, ▲) und einer Kombination aus HERCEPTIN®/TAXOL® (H/T, ◇). Die Reaktion der androgenunabhängigen Tumoren CWR22R und CWRSA6 ([Fig. 11A](#) bzw. B) und der androgenabhängigen Tumoren CWR22 und LNCaP ([Fig. 11C](#) bzw. D) auf HERCEPTIN® und auf eine Kontrolle sind dargestellt. Die Reaktion der Tumoren auf HERCEPTIN®, TAXOL®, HERCEPTIN®/TAXOL® und eine Kontrolle sind in [Fig. 11E](#) (CWR22); [Fig. 11F](#) (LNCaP); [Fig. 11G](#) (CWR22R); und [Fig. 11H](#) (CWRSA6) dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- SF angegeben.

[0030] [Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#) zeigen die relative prostataspezifische Antigen-(PSA-) Index-Reaktion von Tieren mit androgenabhängigen Prostatakrebs-Xenotransplantaten, die mit HERCEPTIN® behandelt wurden. In [Fig. 12A](#) wurde der PSA-Index vor der Behandlung und 9 bzw. 21 Tage nach Beginn der Behandlung im LNCaP-Xenotransplantatmodell gemessen und in Bezug auf die Werte vor der Behandlung ausgedrückt. In [Fig. 12B](#) wurde der PSA-Index vor der Behandlung und 9 bzw. 21 Tage nach Beginn der Behandlung im CWR22-Xenotransplantatmodell gemessen und in Bezug auf die Werte vor der Behandlung ausgedrückt. Die Ergebnisse sind als mittleres relatives PSA +/- SF angegeben.

[0031] [Fig. 13](#) zeigt die Reaktion des androgenabhängigen Tumors CWR22 auf eine Therapie mit einem Kontrollantikörper (C, ▲), HERCEPTIN® (H, O) oder einem monoklonalen Antikörper 2C4 (2, ■). Die Verabreichung von 2C4 ist durch * gekennzeichnet; die Verabreichung von HERCEPTIN® durch +.

[0032] [Fig. 14](#) zeigt die Reaktion des androgenabhängigen Tumors CWR22 auf eine Therapie mit TAXOL® alleine (T, O), einem monoklonalen Antikörper 2C4 alleine (2, ■) oder einer Kombination aus einem monoklonalen Antikörper 2C4 und TAXOL® (2/T, ▲). Die Verabreichung von 2C4 ist durch * gekennzeichnet; die Verabreichung von TAXOL® (6,25 mg/kg) durch +.

[0033] [Fig. 15](#) zeigt die Reaktion des androgenunabhängigen Tumors CWR22R auf eine Therapie mit einem Kontrollantikörper (C, ▲), HERCEPTIN® (H, O) oder einem monoklonalen Antikörper 2C4 (2, ■). Die Verabreichung eines monoklonalen Antikörpers 2C4 ist durch + gekennzeichnet; die Verabreichung von HERCEPTIN® durch +.

[0034] [Fig. 16](#) zeigt die Reaktion des androgenunabhängigen Tumors CWR22R auf eine Therapie mit TAXOL® alleine (T, O), einem monoklonalen Antikörper 2C4 alleine (2, ■) oder einer Kombination aus einem monoklonalen Antikörper 2C4 und TAXOL® (2/T, ▲). Die Verabreichung von 2C4 ist durch * gekennzeichnet; die Verabreichung von TAXOL® (6,25 mg/kg) durch +.

[0035] [Fig. 17](#) zeigt die Reaktion des androgenunabhängigen Tumors CWRSA6 auf eine Therapie mit einem Kontrollantikörper (C, ▲), HERCEPTIN® (H, O) oder einem monoklonalen Antikörper 2C4 (2, ■). Die Verabreichung eines monoklonalen Antikörpers 2C4 ist durch + gekennzeichnet; die Verabreichung von HERCEPTIN® durch +.

[0036] [Fig. 18](#) zeigt die Reaktion des androgenunabhängigen Tumors CWRSA6 auf eine Therapie mit TAXOL® alleine (T, O), einem monoklonalen Antikörper 2C4 alleine (2, ■) oder einer Kombination aus einem monoklonalen Antikörper 2C4 und TAXOL® (2/T, ▲). Die Verabreichung von 2C4 ist durch * gekennzeichnet; die Verabreichung von TAXOL® (6,25 mg/kg) durch +.

[0037] [Fig. 19](#) zeigt die relative TGF- α -mRNA-Expression durch CWR22R- oder CWR22-Zellen, bestimmt durch quantitative Echtzeit-PCR.

[0038] [Fig. 20](#) zeigt die relative HB-EGF-mRNA-Expression durch CWR22R- oder CWR22-Zellen, bestimmt durch quantitative Echtzeit-PCR.

[0039] [Fig. 21](#) zeigt die Wirkung der Behandlung mit einem monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper auf das Wachstum von Prostatakrebs-Xenotransplantaten. Das Tumorstadium wurde am Ende der einzelnen Experimente in Bezug auf Kontrolltumoren normalisiert, als Kontrolltiere getötet wurden. Die für CWR22 angeführten Werte entsprechen Tag 23 nach der Bildung eines fühlbaren Tumors; für LNCaP Tag 51; für CWR22R Tag 22; für CWR22SA6 Tag 33.

[0040] [Fig. 22](#) zeigt die Wirkung der Behandlung mit einem monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper auf den PSA-Index. Der PSA-Index ist definiert als die Menge von Serum-PSA, in Bezug auf das Tumorstadium normalisiert.

[0041] [Fig. 23](#) bewertet die Aktivität eines rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörpers (rhuMAb 2C4), eines pegylierten Fab-Fragments davon und eines murinen 2C4 auf das androgenunabhängige CWR22R-Prostata-Xenotransplantat.

[0042] [Fig. 24](#) zeigt die Dosiswirkung von rhuMAb 2C4 auf das androgenunabhängige CWR22R-Prostata-Xenotransplantat.

[0043] [Fig. 25](#) zeigt die Dosiswirkung von rhuMAb 2C4 auf das androgenunabhängige MSKPC6-Prostata-Xenotransplantat.

[0044] [Fig. 26](#) zeigt die 2C4- und 7C2-Dosiswirkung in einem androgenabhängigen Prostata-Xenotransplantat (CWR22).

[0045] [Fig. 27](#) zeigt das Tumervolumen in CWR22R-Xenotransplantaten, die mit TAXOL® und Anti-ErbB2-Antikörpern 2C4 und 7C2 behandelt wurden.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

I. Definitionen

[0046] Ein "ErbB-Rezeptor" ist eine Rezeptorprotein-Tyrosinkinase, die zur ErbB-Rezeptorfamilie gehört und EGFR-, ErbB2-, ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren umfasst sowie in Zukunft zu identifizierende, andere Mitglieder dieser Familie. Der ErbB-Rezeptor wird im Allgemeinen umfassen: eine extrazelluläre Domäne, die an einen ErbB-Liganden binden kann; eine lipophile Transmembran-Domäne; eine konservierte intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne; und eine carboxylterminale, mehrere phosphorylierbare Tyrosinreste tragende Signaldomäne. Der ErbB-Rezeptor kann ein "Nativsequenz"-ErbB-Rezeptor oder eine "Aminosäuresequenz-Variante" davon sein. Vorzugsweise ist der ErbB-Rezeptor der humane Nativsequenz-ErbB-Rezeptor.

[0047] Die Begriffe "ErbB1", "Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor" und "EGFR" werden hierin austauschbar verwendet und betreffen EGFR, wie offenbart z.B. in Carpenter et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 881-914 (1987), umfassend deren natürlich auftretenden Mutantenformen (z.B. eine Deletionsmutante EGFR, wie bei Humphrey et al., PNAS (USA) 87, 4207-4211 (1990)). erbB1 betrifft das Gen, das für das EGFR-Protein-Produkt kodiert.

[0048] Die Ausdrücke "ErbB2" und "HER2" werden hierin austauschbar verwendet und betreffen das humane HER2-Protein, beschrieben z.B. in Semba et al., PNAS (USA) 82, 6497-6501 (1985); und Yamamoto et al., Nature 319, 230-234 (1986) (Genbank-Zugangsnummer X03363). Der Begriff "erbB2" betrifft das Gen, welches für humanes ErbB2 kodiert, und "neu" betrifft das Gen, welches für Ratten-p185^{neu} kodiert. Bevorzugtes ErbB2 ist humanes Nativsequenz-ErbB2.

[0049] "ErbB3" und "HER3" betreffen das Rezeptor-Polypeptid, wie offenbart in z.B. US-Patent Nr. 5.183.884 und 5.480.968 sowie auch Kraus et al., PNAS (USA) 86, 9193-9197 (1989).

[0050] Die Begriffe "ErbB4" und "HER4" betreffen hierin das Rezeptor-Polypeptid wie offenbart in z.B. der EP-Patentanmeldung Nr. 559.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 1746-1750 (1993); und Plowman et al., Nature 366, 473-475 (1993), einschließlich dessen Isoformen, wie z.B. offenbart in WO 99/19488, publiziert am 22. April 1999.

[0051] Mit "ErbB-Ligand" ist ein Polypeptid gemeint, das an den ErbB-Rezeptor bindet und/oder diesen aktiviert. Das der hierin speziell interessierende ErbB-Ligand ist ein humaner Nativsequenz-ErbB-Ligand, wie z.B. Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem. 247, 7612-7621 (1992)); transformierender Wachstumsfaktor Alpha (TGF- α) (Marquardt et al., Science 223, 1079-1082 (1984)); Amphiregulin, auch bekannt als Schwanoma- oder autokriner Keratinocyten-Wachstumsfaktor (Shoyab et al., Science 243, 1074-1076 (1989); Kimura et al., Nature 348, 257-260 (1990); und Cook et al., Mol. Cell. Biol. 11, 2547-2557 (1991)); Betacellulin (Shing et al., Science 259, 1604-1607 (1993); und Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190, 1173 (1993)); Heparin-bindender Epidermis-Wachstumsfaktor (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251, 936-939 (1991)); Epiregulin (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270, 7495-7500 (1995); und Komurasaki et al., Oncogene 15, 2841-2848 (1997)); ein Heregulin (siehe unten); Neuregulin-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387, 512-516 (1997)); Neuregulin-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl.

[0052] Acad. Sci. 94, 9562-9567 (1997)); Neuregulin-4 (NRG-4) (Harari et al., Oncogene 18, 2681-89 (1999)) oder Cripto (CR-1) (Kannan et al., J. Biol. Chem. 272(6), 3330-3335 (1997). ErbB-Liganden, die EGFR binden, umfassen EGF, TGF- α , Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF und Epiregulin. ErbB-Liganden, die ErbB3 binden, umfassen Hereguline. ErbB-Liganden, die in der Lage sind, ErbB4 zu binden, umfassen Betacellulin, Epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 und Hereguline.

[0053] "Heregulin" (HRG), wenn hierin verwendet, betrifft ein Polypeptid, das durch das Heregulin-Genprodukt kodiert wird, wie offenbart in US-Patent Nr. 5.641.869 oder Marchionni et al., Nature 362, 312-318 (1993). Beispiele für Hereguline umfassen Heregulin- α , Heregulin- β 1, Heregulin- β 2 und Heregulin- β 3 (Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992); und US-Patent Nr. 5, 641,869); neu-Differenzierungsfaktor (NDF) (Peles et al., Cell 69, 205-216 (1992)); Acetylcholin-Rezeptor-induzierende Aktivität (ARIA) (Falls et al., Cell 72, 801-815 (1993)); Glia-Wachstumsfaktoren (GGFs) (Marchionni et al., Nature 362, 312-318 (1993)); sensorisches und motorisches Neuronabgeleiteter Faktor (SMDf) (Ho et al., J. Biol. Chem. 270, 14523-14532 (1995)); γ -Heregulin (Schaefer et al., Oncogene 15, 1385-1394 (1997)). Der Begriff inkludiert biologisch aktive Fragmente und/oder Aminosäuresequenz-Varianten eines Nativequenz-HRG-Polypeptids, wie z.B. ein EGF-artiges Domänen-Fragment davon (z.B. HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄).

[0054] Ein "ErbB-Hetero-Oligomer" ist hierin ein nicht-kovalent assoziiertes Oligomer, umfassend mindestens zwei verschiedene ErbB-Rezeptoren. Solche Komplexe können gebildet werden, wenn eine Zelle, die zwei oder mehrere ErbB-Rezeptoren exprimiert, einem ErbB-Liganden ausgesetzt wird, und kann mittels Immunpräzipitation isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert werden, wie z.B. in Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20), 14661-14665 (1994), beschrieben ist. Beispiele solcher ErbB-Hetero-Oligomere umfassen EGFR-ErbB2-, ErbB2-ErbB3- und ErbB3-ErbB4-Komplexe. Überdies können die ErbB-Hetero-Oligomere zwei oder mehrere ErbB2-Rezeptoren, kombiniert mit einem verschiedenen ErbB-Rezeptor, wie z.B. ErbB3, ErbB4 oder EGFR, beinhalten. Andere Proteine, wie z.B. eine Cytokin-Rezeptor-Untereinheit (z.B. pg130), können im Hetero-Oligomer umfasst sein.

[0055] Mit "Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors" ist Signalübertragung gemeint (z.B. jene, die von einer intrazellulären Kinase-Domäne eines ErbB-Rezeptors verursacht wird, die Tyrosin-Reste im ErbB-Rezeptor oder ein Substrat-Polypeptid phosphoryliert), vermittelt durch ErbB-Ligandenbindung an ein ErbB-Hetero-Oligomer, umfassend den ErbB-Rezeptor von Interesse. Im Allgemeinen wird dies die Bindung eines ErbB-Liganden an ein ErbB-Hetero-Oligomer beinhalten, was eine Kinase-Domäne von einer oder mehrerer der ErbB-Rezeptoren im Hetero-Oligomer aktiviert und so zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in einem oder mehreren der ErbB-Rezeptoren und/oder zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in (einem) zusätzlichen Substrat-Polypeptid(en) führt. ErbB-Rezeptor-Aktivierung kann mittels verschiedener Phosphorylierungs-Tests quantifiziert werden.

[0056] Ein "Nativequenz"-Polypeptid ist eines, das dieselbe Aminosäuresequenz wie ein von der Natur hergeleitetes Polypeptid (z.B. ErbB-Rezeptor oder ErbB-Ligand) besitzt. Solche Nativequenz-Polypeptide können aus der Natur isoliert oder auf rekombinante oder synthetische Weise hergestellt werden. Folglich kann ein Nativequenz-Polypeptid die Aminosäuresequenz eines natürlich auftretenden humanen Polypeptids, eines murinen Polypeptids oder eines Polypeptids von jeder anderen Säugetier-Spezies besitzen.

[0057] Der Begriff "Aminosäuresequenz-Variante" betrifft Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, die sich in einem gewissen Ausmaß von einem Nativequenz-Polypeptid unterscheiden. Normalerweise werden Aminosäuresequenz-Varianten zumindest 70% Homologie mit zumindest einer Rezeptor-Bindungsdomäne eines nativen ErbB-Liganden oder mit zumindest einer Liganden-Bindungsdomäne eines nativen ErbB-Rezeptors aufweisen, und vorzugsweise werden sie zumindest zu 80%, stärker bevorzugt zumindest zu 85%, homolog zu solchen Rezeptor- oder Liganden-Bindungsdomänen sein. Die Aminosäuresequenz-Varianten besitzen an bestimmten Stellen Substitutionen, Deletionen und/oder Insertionen innerhalb der Aminosäuresequenz der nativen Aminosäuresequenz.

[0058] "Homologie" wird definiert als der Prozentanteil von identischen Resten in der Aminosäuresequenz-Variante, nach gegebenenfalls erforderlicher Ausrichtung der Sequenzen und Einführung von Leerstellen, um die maximalen %-Homologie zu erzielen. Verfahren und Computerprogramme für die Ausrichtung sind gut fachbekannt. Ein solches Computerprogramm ist "Align 2", verfasst von Genentech, Inc., das mit Benutzer-Dokumentation im United States Copyright Office, Washington, DC 20559, am 10. Dezember 1991 hinterlegt wurde.

[0059] Der Begriff "Antikörper" wird hierin im weitesten Sinne verwendet und umfasst im Speziellen monok-

lonale Antikörper, polyklonale Antikörper, multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper), die aus mindestens zwei intakten Antikörpern gebildet werden, und Antikörperfragmente, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen.

[0060] Der Begriff "monoklonaler Antikörper", wie er hierin verwendet wird, betrifft einen Antikörper, der aus einer Population im Wesentlichen homogener Antikörper erhalten wird, d.h. die einzelnen in der Population enthaltenen Antikörper sind identisch, abgesehen von natürlich auftretenden Mutationen, die in geringem Ausmaß vorhanden sein können. Monoklonale Antikörper sind höchst spezifisch und sind gegen eine einzelne Antigen-Stelle gerichtet. Weiters ist jeder monoklonale Antikörper, im Gegensatz zu polyklonalen Antikörper-Präparaten, die verschiedene Antikörper gegen verschiedene Determinanten (Epitope) beinhalten, gegen eine einzelne Determinante am Antigen gerichtet. Zusätzlich zu ihrer Spezifität sind monoklonale Antikörper in der Weise vorteilhaft, dass sie unkontaminiert durch andere Antikörper synthetisiert werden können. Die nähere Bestimmung "monoklonal" bezeichnet den Charakter des Antikörpers als von einer im Wesentlichen homogenen Population von Antikörpern herstammend und ist nicht dahingehend auszulegen, dass die Produktion des Antikörpers ein bestimmtes Verfahren erfordert. Beispielsweise können die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendenden monoklonalen Antikörper mit dem erstmals von Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), beschriebenen Hybridom-Verfahren oder mittels DNA-Rekombinationsverfahren (siehe z.B. US-Patent Nr. 4.816.567) hergestellt werden. Die "monoklonalen Antikörper" können beispielsweise auch von Phagen-Antikörperbibliotheken unter Verwendung der in Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), beschriebenen Techniken isoliert werden.

[0061] Die monoklonalen Antikörper umfassen hierin insbesondere "chimäre" Antikörper, in denen ein Teil der schweren und/oder leichten Kette identisch mit oder homolog zu entsprechenden Sequenzen in Antikörpern sind, die von einer bestimmten Spezies hergeleitet sind oder zu einer bestimmten Antikörper-Klasse oder -Unterklasse gehören, während die verbleibende(n) Ketten(n) identisch mit oder homolog zu entsprechenden Antikörper-Sequenzen ist/sind, die von einer anderen Spezies hergeleitet sind oder zu einer anderen Antikörper-Klasse oder -Unterklasse gehören, sowie Fragmente solcher Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen (US-Patent Nr. 4.816.567; und Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 (1984)). Chimäre Antikörper von Interesse umfassen hierin "primatisierte" Antikörper, beinhaltend antigenbindende Sequenzen variabler Domänen, die von einem nichthumanen Primaten (z.B. Altwelt-Affen, Menschenaffen) herrühren, und humane Konstantregion-Sequenzen.

[0062] "Antikörperfragmente" umfassen einen Teil eines intakten Antikörpers, vorzugsweise dessen antigenbindende oder variable Region. Beispiele von Antikörperfragmenten umfassen Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, und Fv-Fragmente; Diakörper; lineare Antikörper; Einzelketten-Antikörper-Moleküle und multispezifische, aus Antikörperfragment(en) gebildete Antikörper.

[0063] Ein "intakter" Antikörper ist einer, der sowohl ein antigenbindende variable Region als auch eine konstante Leichtketten-Domäne (C_L) und konstante Schwereketten-Domänen C_H1, C_H2, und C_H3 umfasst. Die konstanten Domänen können konstante Nativsequenz-Domänen (z.B. humane konstante Nativsequenz-Domänen) oder deren Aminosäuresequenz-Varianten sein. Vorzugsweise hat der intakte Antikörper eine oder mehrere Effektorfunktionen.

[0064] Antikörper-"Effektorfunktionen" betreffen jene biologischen Aktivitäten, die der Fc-Region (einer Nativsequenz-Fc-Region oder Aminosäuresequenz-Varianten-Fc-Region) eines Antikörpers zuzuordnen sind. Beispiele von Antikörper-Effektorfunktionen umfassen C1q-Bindung; komplementabhängige Zytotoxizität; Fc-Rezeptorbindung; Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC); Phagozytose; Down-Regulierung von Oberflächen-Rezeptoren (z.B. B-Zellen-Rezeptor; BCR) usw.

[0065] In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz der konstanten Domäne ihrer schweren Ketten können intakte Antikörper verschiedenen "Klassen" zugeordnet werden. Es gibt fünf Hauptklassen intakter Antikörper: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, und mehrere von diesen können in "Unterklassen" (Isotypen) unterteilt werden, z.B. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA und IgA2. Die konstanten Schwereketten-Domänen, die den verschiedenen Antikörperklassen entsprechen, heißen α, δ, ε, γ bzw. μ. Die Strukturen der Untereinheiten und dreidimensionale Konfigurationen der verschiedenen Immunglobulin-Klassen sind gut bekannt.

[0066] "Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität" und "ADCC" betreffen eine zellvermittelte Reaktion, in der unspezifische zytotoxische Zellen, die Fc-Rezeptoren (FcRs) (z.B. natürliche Killerzellen (NK), Neutrophile und Makrophagen) exprimieren, an eine Zielzelle gebundene Antikörper erkennen und darauf folgend Lyse der Zielzelle verursachen. Die primären ADCC-vermittelnden Zellen, NK-Zellen, exprimieren ausschließ-

lich FcγRIII, wogegen Monozyten FcγRI, FcγRII und FcγRIII exprimieren. FcR-Expression an hämapoetischen Zellen ist in Tabelle 3 auf Seite 464 in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 457-92 (1991), zusammengefasst. Um die ADCC-Aktivität eines Moleküls von Interesse zu bewerten, kann ein In-vitro-ADCC-Assay, wie z.B. der in US-Patent Nr. 5.500.362 oder 5.821.337 beschriebene, ausgeführt werden. Nützliche Effektorzellen für solche Tests umfassen mononucleare Peripherblutzellen (PBMC) und natürliche Killerzellen (NK). Alternativ oder zusätzlich dazu kann ADCC-Aktivität des Moleküls von Interesse in vivo beurteilt werden, z.B. in einem Tiermodell wie dem offenbart in Clynes et al., *PNAS (USA)* 95, 652-656 (1998).

[0067] "Human-Effektorzellen" sind Leukozyten, die eine oder mehrere FcRs exprimieren und Effektorfunktionen ausführen. Vorzugsweise exprimieren die Zellen zumindest FcγRIII und verrichten die ADCC-Effektorfunktion. Beispiele humaner Leukozyten, die ADCC vermitteln, umfassen mononucleare Peripherblutzellen (PBMC), natürliche Killerzellen (NK), Monozyten, zytotoxische T-Zellen und Neutrophile; wobei PBMCs und NK-Zellen bevorzugt werden. Die Effektorzellen können aus einer ihrer natürlichen Quellen, z.B. aus Blut oder PBMCs, wie hierin beschrieben isoliert werden.

[0068] Die Begriffe "Fc-Rezeptor" oder "FcR" werden verwendet, um einen Rezeptor zu beschreiben, der an die Fc-Region eines Antikörpers bindet. Der bevorzugte FcR ist ein humaner Nativequenz-FcR. Außerdem ist ein bevorzugter FcR einer, der an IgG-Antikörper (ein Gamma-Rezeptor) bindet, und umfasst Rezeptoren der FcγRI-, FcγRII- und FcγRIII-Unterklassen, einschließlich allelischer Varianten und alternativ gespleißter Formen dieser Rezeptoren. FcγRII-Rezeptoren umfassen FcγRIIA (ein "aktivierender Rezeptor") und FcγRIIB (ein "inhibierender Rezeptor"), die ähnliche Aminosäure-Sequenzen besitzen, die sich primär in deren Cytoplasma-Domänen unterscheiden. Aktivierender Rezeptor FcγRIIA enthält ein Immunrezeptor-Tyrosinbasierendes-Aktivierungsmotiv (ITAM) in dessen Cytoplasma-Domäne. Inhibierender Rezeptor FcγRIIB enthält ein Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes-Inhibierungsmotiv (ITIM) in dessen Cytoplasma-Domäne (siehe Übersichtsartikel M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234 (1997)). Übersichtsartikel über FcRs sind Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 457-92 (1991); Capel et al., *Immunoemethods* 4, 25-34 (1994); und de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126, 330-41 (1995). Andere FcRs, einschließlich jene in Zukunft zu identifizierende, werden hierin durch den Begriff "FcR" umfasst. Der Begriff umfasst auch den neonatalen Rezeptor, FcRn, der für den Transfer maternaler IgGs in den Fetus verantwortlich ist (Guyer et al., *J. Immunol.* 117, 587 (1976) und Kim et al., *J. Immunol.* 24, 249 (1994)).

[0069] "Komplement-abhängige Zytotoxizität" oder "CDC" betrifft die Fähigkeit eines Moleküls, in Gegenwart von Komplement ein Ziel zu lysieren. Der Stoffwechselweg der Komplement-Aktivierung wird durch die Bindung der ersten Komponente der Komplementsystems (C1q) an ein Molekül (z.B. einen Antikörper), komplexiert mit einem zugehörigen Antigen, initiiert. Zur Beurteilung von Komplement-Aktivierung kann ein CDC-Assay, wie z.B. in Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202, 163 (1996) beschrieben, durchgeführt werden.

[0070] "Native Antikörper" sind gewöhnlich heterotetramere Glykoproteine von ungefähr 150.000 Dalton, zusammengesetzt aus zwei identischen leichten (L) Ketten und zwei identischen schweren (H) Ketten. Jede leichte Kette ist über eine kovalente Disulfidbindung an eine schwere Kette gebunden, während die Anzahl von Disulfidbrücken unter den schweren Ketten verschiedener Immunglobulin-Isotypen variiert. Jede schwere und leichte Kette besitzt in regelmäßigen Abständen auch Interketten-Disulfidbrücken. Jede schwere Kette hat an einem Ende eine variable Domäne (V_H), gefolgt einer Anzahl konstanter Domänen. Jede leichte Kette hat an einem Ende eine variable Domäne (V_L) und eine konstante Domäne am anderen Ende. Die konstante Domäne der leichten Kette ist mit der ersten konstanten Domäne der schweren Kette ausgerichtet, und die variable Leichtketten-Domäne ist mit der variablen Domäne der schweren Kette ausgerichtet. Es wird angenommen, dass bestimmte Aminosäurereste eine Schnittstelle zwischen den Domänen der leichten Kette und schweren Kette bildet.

[0071] Der Begriff "variabel" betrifft die Tatsache, dass sich bestimmte Teile der variablen Domänen von Antikörpern in ihrer Sequenz stark unterscheiden und für die Bindung und Spezifität jedes einzelnen Antikörpers für ihr spezielles Antigen gebraucht werden. Die Variabilität ist jedoch über die variablen Domänen von Antikörpern nicht gleichmäßig verteilt. Sie ist in drei Segmenten der variablen Domänen, genannt hypervariable Regionen, von sowohl leichter als auch schwerer Kette konzentriert. Die stärker konservierten Teile der variablen Domänen heißen Gerüst-Regionen (FRs). Jede der variablen Domänen von nativen schweren und leichten Ketten beinhalten vier FRs, die größtenteils eine β -Faltblattkonfiguration einnehmen, durch drei hypervariable Regionen verbunden sind, die Schleifen bilden, die die β -Faltblattstruktur verbinden und in manchen Fällen bilden. Die hypervariablen Regionen in jeder Kette werden durch die FRs in unmittelbarer Nähe zusammengehalten und tragen mit den hypervariablen Regionen der anderen Kette zur Bildung der Antigen-bindenden

den Stelle von Antikörpern bei (siehe Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Auflage, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, M. D., USA (1991)). Die konstanten Domänen sind nicht direkt an der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen beteiligt, zeigen jedoch verschiedene Effektorfunktionen, wie z.B. Beteiligung des Antikörpers in Antikörper-abhängiger Zellzytotoxizität (ADCC).

[0072] Der Begriff "hypervariable Region", wenn hierin verwendet, betrifft die Aminosäurereste eines Antikörpers, die für die Antigenbindung verantwortlich sind. Die hypervariable Region umfasst im Allgemeinen Aminosäurereste einer Komplementarität bestimmenden Region oder "CDR" (z.B. Reste 24-34 (L1), 50-56 (L2) und 89-97 (L3) in der variablen Domäne der leichten Kette und 31-35 (H1), 50-65 (H2) und 95-102 (H3) in der variablen Domäne der schweren Kette; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Auflage, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, M. D., USA (1991)) und/oder jene Reste einer "hypervariablen Schleife" (z.B. Reste 26-32 (L1), 50-52 (L2) und 91-96 (L3) in der variablen Domäne der leichten Kette und 26-32 (H1), 53-55 (H2) und 96-101 (H3) in der variablen Domäne der schweren Kette; Chothia und Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). "Gerüst-Regionen" oder "FR"-Reste sind jene Reste der variablen Domäne, die nicht die Reste der hierin definierten hypervariablen Domänen sind.

[0073] Papain-Verdau von Antikörpern führt zu zwei identischen Antigen-bindenden Fragmenten, genannt "Fab"-Fragmente, jedes mit einer einzelnen Antigen-bindenden Stelle, und ein Rest-"Fc"-Fragment, dessen Name die Fähigkeit widerspiegelt, leicht zu kristallisieren. Pepsin-Behandlung führt zu einem $F(ab)_2$ -Fragment, das zwei Antigen-bindende Stellen besitzt und immer noch in der Lage ist, Antigen zu vernetzen.

[0074] "Fv" ist das minimale Antikörper-Fragment, welches eine vollständige Antigen-Erkennungs- und Antigen-Bindungsstelle enthält. Diese Region besteht aus einem Dimer von variabler Domäne einer schweren Kette und einer leichten Kette in enger, nicht-kovalenter Assoziierung. Es ist diese Konfiguration, bei der die drei hypervariablen Regionen jeder variablen Domäne interagieren, um eine Antigen-Bindungsstelle an der Oberfläche des V_H - V_L -Dimers zu definieren. Gemeinsam verleihen die sechs hypervariablen Regionen dem Antikörper seine Antigen-bindende Spezifität. Jedoch hat sogar eine einzelne variable Domäne (oder die Hälfte eines Fv, nur drei für ein Antigen spezifische hypervariable Regionen umfassend) die Fähigkeit, Antigen zu erkennen und zu binden, wenn auch mit einer niedrigeren Affinität als die gesamte Bindungsstelle.

[0075] Das Fab-Fragment enthält auch die konstante Domäne der leichten Kette und die erste konstante Domäne (CH1) der schweren Kette. Fab'-Fragmente unterscheiden sich von Fab-Fragmenten durch den Zusatz einiger Reste am Carboxy-Terminus der CH1-Domäne der schweren Kette und enthalten eine oder mehrere Cysteine der Antikörper-Hinge-Region. Fab'-SH ist hierin die Bezeichnung für Fab', in dem der/die Cystein-Rest(e) der konstanten Domänen zumindest eine freie Thiolgruppe trägt/tragen. $F(ab)_2$ -Antikörper-Fragmente wurden ursprünglich als Paare von Fab'-Fragmenten produziert, die Hinge-Cysteine zwischen ihnen besitzen. Andere chemische Bindungen von Antikörper-Fragmenten sind auch bekannt.

[0076] Die "leichten Ketten" von Antikörpern jeglicher Wirbeltier-Spezies können einer von zwei klar unterscheidbaren, genannt Kappa (κ) und Lambda (λ), basierend auf den Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Regionen zugeordnet werden.

[0077] "Einzelketten-Fv"- oder "scFv"-Antikörper-Fragmente umfassen die V_H - und V_L - Domänen von Antikörpern, worin diese Domänen in einer einzelnen Polypeptidkette vorhanden sind. Vorzugsweise beinhaltet das Fv-Polypeptid weiters einen Polypeptid-Linker zwischen den V_H - und V_L - Domänen, die es scFv ermöglichen, die gewünschte Struktur für Antigen-Bindung zu bilden. Für einen Überblick über scFv siehe Plückthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", Bd. 13, Rosenberg und Moore (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, Seiten 269-315 (1994). Anti-ErbB2-Antikörper-scFv-Fragmente werden beschrieben in WO 93/16185; US-Patent Nr. 5.571.894 und US-Patent Nr. 5.587.458.

[0078] Der Begriff "Diakörper" betrifft kleine Antikörper-Fragmente mit zwei Antigen-bindenden Stellen, wobei die Fragmente eine variable schwere Domäne (V_H), verbunden mit einer variablen leichten Domäne (V_L) in derselben Polypeptidkette (V_H - V_L), umfassen. Bei Verwendung eines Linkers, der zu klein ist, um die Paarung der beiden Domänen an derselben Kette zu erlauben, sind die Domänen gezwungen, mit komplementären Domänen einer anderen Kette zu paaren, um zwei Antigen-Bindungsstellen zu erzeugen. Diakörper werden vollständiger beschrieben in z.B. der EP-A-404.097; WO 93/11161; und bei Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993).

[0079] "Humanisierte" Formen nicht-humaner (z.B. Nagetier-) Antikörper sind chimäre Antikörper, die von nicht-humanem Immunglobulin hergeleitete Minimal-Sequenz enthalten. Humanisierte Antikörper sind über-

wiegend Human-Immunglobuline (Empfänger-Antikörper), in denen Reste einer hypervariablen Region des Empfängers durch Reste einer hypervariablen Region einer nicht-humanen Spezies (Spender-Antikörper), wie z.B. Maus, Ratte, Kaninchen oder nicht-humaner Primat, mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt ist. In einigen Fällen werden Gerüst-Region-Reste (FR) des Human-Immunglobulins durch entsprechende nicht-humane Reste ersetzt. Weiters können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die im Empfänger-Antikörper oder im Spender-Antikörper nicht vorhanden sind. Diese Modifizierungen werden durchgeführt, um die Leistungsfähigkeit der Antikörper weiter zu verfeinern. Im Allgemeinen wird der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von mindestens einer und typischerweise zwei variablen Domänen umfassen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der hypervariablen Schleifen denen eines nicht-humanen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle FRs jene einer Human-Immunglobulin-Sequenz sind. Der humanisierte Antikörper wird optional auch zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulin-Region (Fc), typischerweise den eines Human-Immunglobulins, umfassen. Für weitere Details siehe Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); und Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 593-596 (1992).

[0080] Humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper umfassen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb-4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 und huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) wie beschrieben in Tabelle 3 von US-Patent Nr. 5.821.337; humanisiertes 520C9 (WO 93/21319) und humanisiertes 2C4 wie hierin unten beschrieben.

[0081] Ein "isolierter" Antikörper ist einer, der aus einem Bestandteil seiner natürlichen Umgebung identifiziert und getrennt und/oder gewonnen worden ist. Kontaminierende Bestandteile seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, die diagnostische oder therapeutische Anwendungen des Antikörpers stören würden, und können Enzyme, Hormone und andere proteinhaltige und nicht-proteinhaltige Lösungen umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen wird der Antikörper gereinigt, und zwar (1) zu mehr als 95 Gewichts-% von Antikörper, wie mittels Lowry-Methode bestimmt, und insbesondere zu mehr als 99 Gewichts-%, (2) in einem Ausmaß, das ausreicht, um mittels Verwendung eines Rotierbecher-Sequenzierers zumindest 15 Reste der N-terminalen oder internen Aminosäuresequenz zu erhalten, oder (3) zu Homogenität mittels SDS-PAGE unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen unter Verwendung von Coomassie-Blau oder, vorzugsweise, Silberfärbung. Isolierter Antikörper umfasst den Antikörper in situ innerhalb rekombinanter Zellen, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umgebung des Antikörpers nicht vorhanden sein wird. Gewöhnlich wird isolierter Antikörper mittels zumindest eines Reinigungsschritts hergestellt.

[0082] Ein Antikörper, der an ein Antigen von Interesse "bindet", z.B. ErbB2-Antigen, ist in der Lage, das Antigen mit ausreichender Affinität zu binden, so dass der Antikörper nützlich ist als therapeutisches Mittel zum Angriff auf eine Antigen-exprimierende Zelle. Wenn der Antikörper einer ist, der ErbB2 bindet, wird er gewöhnlich, im Gegensatz zu anderen ErbB-Rezeptoren, ErbB2 bevorzugt binden und kann einer sein, der nicht signifikant mit anderen Proteinen, wie z.B. EGFR, ErbB3 oder ErbB4, kreuzreagiert. In solchen Ausführungsformen wird das Ausmaß der Bindung des Antikörpers an diese Nicht-ErbB2-Proteine (z.B. Zelloberflächen-Bindung an endogenen Rezeptor) weniger als 10% betragen, wie bestimmt mittels Fluoreszenzaktivierter Zellsortierungs-Analyse (FACS) oder Radioimmunpräzipitation (RIA). Manchmal wird der Anti-ErbB2-Antikörper mit dem Ratten-neu-Protein nicht signifikant kreuzreagieren, wie z.B. beschrieben in Schaefer et al., *Nature* 312, 513 (1984), und Drebin et al., *Nature* 312, 545-548 (1984).

[0083] Ein Antikörper, der Liganden-Aktivierung eines Erb-Rezeptors "blockiert", ist einer, der eine solche, wie hierin oben definierte Aktivierung herabsetzt oder verhindert, wobei der Antikörper in der Lage ist, die Liganden-Aktivierung des ErbB-Rezeptors im Wesentlichen effizienter zu blockieren als der monoklonale Antikörper 4D5, z.B. ungefähr genauso effektiv wie die monoklonalen Antikörper 7F3 oder 2C4 oder deren Fab-Fragmente, und vorzugsweise ungefähr genauso effektiv wie die monoklonalen Antikörper 2C4 oder ein Fab-Fragment davon. Beispielsweise kann der Antikörper, der die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, einer sein, der in der Blockierung einer ErbB-Hetero-Oligomer-Bildung ungefähr 50–100% effektiver ist als 4D5. Die Blockierung der Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors kann auf jegliche Weise erfolgen, z.B. durch Interferieren mit: Liganden-Bindung an einen ErbB-Rezeptor, ErbB-Komplexbildung, Tyrosinkinase-Aktivität eines ErbB-Rezeptors in einem ErbB-Komplex und/oder Phosphorylierung von Tyrosinkinase-Reste(n) in einem oder durch einen ErbB-Rezeptor. Beispiele solcher Antikörper, die die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockieren, umfassen monoklonale Antikörper 2C4 und 7F3 (welche die HRG-Aktivierung von ErbB2/ErbB3- und ErbB2/ErbB4-Hetero-Oligomeren blockieren; und EGF, TGF- α , Amphiregulin, HB-EGF und/oder Epiregulin-Aktivierung eines EGFR/ErbB2-Hetero-Oligomers); und L26-, L96- und L288-Antikörper (Klapper et al., *Oncogene* 14, 2099-2109 (1997)), welche EGF- und NDF-Bindung an T47D-Zellen, die EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 exprimieren, blockieren.

[0084] Ein Antikörper mit einem "biologischen Charakteristikum" eines bezeichneten Antikörpers, wie z.B. der als 2C4 bezeichnete monoklonale Antikörper, ist einer, der eine oder mehrere der biologischen Charakteristika jenes Antikörpers besitzt, der ihn von anderen Antikörpern, die an dasselbe Antigen binden (z.B. ErbB2), unterscheiden. Beispielsweise kann ein Antikörper mit einem biologischen Charakteristikum von 2C4 die HRG-Aktivierung eines ErbB-Hetero-Oligomers, umfassend ErbB2 und ErbB3 oder ErbB4, blockieren; kann EGF-, TGF- α -, HB-EGF-, Epiregulin- und/oder Amphiregulin-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors, umfassend EGFR und ErbB2, blockieren; kann EGF-, TGF- α - und/oder HRG-vermittelte Aktivierung von MAPK blockieren; und/oder kann dasselbe Epitop in der extrazellulären Domäne von ErbB2 binden, wie jenes, das von 2C4 gebunden wird (z.B. der die Bindung von monoklonalem Antikörper 2C4 an ErbB2 blockiert).

[0085] Wenn nicht anders angegeben betrifft der Ausdruck "monoklonaler Antikörper 2C4" einen Antikörper, der Antigen-bindende Reste des murinen 2C4-Antikörpers oder davon hergeleitete Antigen-bindende Reste der untenstehenden Beispiele besitzt. Beispielsweise kann der monoklonale Antikörper 2C4 der murine monoklonale Antikörper 2C4 oder eine Variante davon sein, wie z.B. humanisierter Antikörper 2C4, der Antigen-bindende Aminosäurereste des murinen monoklonalen Antikörpers 2C4 besitzt. Beispiele humanisierter 2C4-Antikörper werden im untenstehenden Beispiel 3 bereitgestellt. Wenn nicht anders bezeichnet betrifft der Ausdruck "rhUMAb2C4", wenn hierin verwendet, einen Antikörper, umfassend die variablen leichten (VL) und variablen schweren (V_H) Sequenzen der Seq.-ID Nummern 3 bzw. 4, fusioniert an Sequenzen humaner konstanter leichter und schwerer Regionen von IgG1 (Nicht-A-Allotyp), optional exprimiert durch eine Chinahamster-Eierstock-(CHO-) Zelle.

[0086] Wenn nicht anders angegeben betrifft der Begriff "monoklonaler Antikörper 4D5" einen Antikörper, der Antigen-bindende Reste von murinem Antikörper 4D5 (ATCC CRL 10463) oder davon abgeleitete Antigen-bindende Reste besitzt. Beispielsweise kann der monoklonale Antikörper 4D5 eine muriner monoklonaler Antikörper 4D5 oder eine Variante davon sein, wie z.B. ein humanisiertes 4D5, besitzend Antigenbindende Reste von murinem monoklonalem Antikörper 4D5. Beispiele humanisierter 4D5-Antikörper umfassen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, hu-MAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 und huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®]) wie in US-Patent Nr. 5.821.337, wobei huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®]) ein bevorzugter humanisierter 4D5-Antikörper ist.

[0087] Ein "wachstumshemmendes Mittel", wenn hierin verwendet, betrifft eine Verbindung oder Zusammensetzung, die das Wachstum einer Zelle inhibiert, im Besonderen einer ErbB-exprimierenden Krebszelle in vitro oder in vivo. Folglich kann das wachstumshemmende Mittel eines sein, das den Prozentsatz an ErbB-exprimierenden Zellen in der S-Phase signifikant reduziert. Beispiele von wachstumshemmenden Mitteln umfassen Mittel, die die Zellzyklus-Progression blockieren (an einer anderen Stelle als die S-Phase), wie z.B. Mittel, die G1-Stillstand oder M-Phasen-Stillstand induzieren. Klassische M-Phasen-Blocker umfassen Vincas-(Vincristin und Vinblastin), Taxan- und Topo-II-Inhibitoren, wie z.B. Doxorubicin, Epirubicin, Daunorubicin, Etoposid und Bleomycin. Jene Mittel, die G1 hemmen, ergießen sich auch in den S-Phasen-Stillstand, z.B. DNA-alkylierende Mittel wie z.B. Tamoxifen, Prednison, Dacarbazin, Mechlorethamin, Cisplatin, Methotrexat, 5-Fluoruracil und ara-C. Weiterführende Informationen finden sich in "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn und Israel (Hrsg.), Kapitel 1, betitelt "Cell cycle regulation, oncogeneses, and antineoplastic drugs" von Murakami et al. (WB Saunders, Philadelphia (1995)), speziell Seite 13.

[0088] Beispiele von "wachstumshemmenden" Antikörpern sind jene, die an ErbB2 binden und das Wachstum von ErbB2-überexprimierenden Krebszellen inhibieren. Bevorzugte wachstumshemmende Anti-ErbB2-Antikörper inhibieren das Wachstum von SK-BR-3-Brusttumorzellen in Zellkultur zu mehr als 20% und bevorzugt zu mehr als 50% (z.B. von ungefähr 50% bis zu ungefähr 100%) bei einer Antikörper-Konzentration von ungefähr 0,5 bis 30 $\mu\text{g/ml}$, wobei die Wachstumshemmung bestimmt wird, nachdem die SK-BR-3-Zellen sechs Tage den Antikörpern ausgesetzt worden sind (siehe US-Patent Nr. 5.677.171, erteilt am 14. Oktober 1997). Der SK-BR-3-Zellen-Wachstumshemmungs-Assay wird in diesem Patent und hierin unten näher im Detail beschrieben.

[0089] Ein Antikörper, der "Zelltod induziert", ist einer, der eine lebensfähige Zelle zu einer lebensunfähigen Zelle macht. Die Zelle ist im Allgemeinen eine, die den ErbB2-Rezeptor exprimiert, besonders wenn die Zelle den ErbB2-Rezeptor überexprimiert. Vorzugsweise ist die Zelle eine Krebszelle, z.B. Brust-, Eierstock-, Magen-, Endometrium-, Speicheldrüsen-, Lungen-, Nieren-, Dickdarm-, Schilddrüsen-, Pankreas- oder Blasen-Zelle. In vitro kann die Zelle eine SK-BR-3-, BT474-, Calu 3-, MDA-MB-453-, MDA-MB-361 oder SKOV3-Zelle sein. In-vitro-Zelltod kann in Abwesenheit von Komplement und Immuneffektor-Zellen bestimmt werden, um Zelltod, induziert durch Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC), zu unterscheiden. Folglich kann der Zelltod-Assay unter Verwendung von

hitzeinaktiviertem Serum (d.h. in Abwesenheit von Komplement) und in Abwesenheit von Immuneffektor-Zellen durchgeführt werden. Um zu bestimmen, ob der Antikörper fähig ist, Zelltod zu induzieren, kann der Verlust von Membran-Integrität, beurteilt durch Aufnahme von Propidium-Iodid (PI), Trypanblau (siehe Moore et al., Cytotechnology 17, 1-11 (1995)) oder 7ADD, in Relation zu unbehandelten Zellen bewertet werden. Bevorzugte Zelltod-induzierende Antikörper sind jene, die im PI-Aufnahme-Assay die Aufnahme von PI in BT474-Zellen induzieren (siehe unten).

[0090] Ein Antikörper, der "Apoptose induziert", ist einer, der programmierten Zelltod induziert, wie bestimmt durch Bindung von Annexin V, Fragmentierung von DNA, Zellschrumpfung, Erweiterung des endoplasmatischen Retikulums, Zellfragmentierung und/oder Bildung von Membran-Vesikeln (genannt Apoptosekörper). Die Zelle ist gewöhnlich eine, die den ErbB2-Rezeptor überexprimiert. Vorzugsweise ist die Zelle eine Tumorzelle, z.B. Brust-, Eierstock-, Magen-, Endometrium-, Speicheldrüsen-, Lungen-, Nieren-, Dickdarm-, Schilddrüsen-, Pankreas- oder Blasen-Zelle. In vitro kann die Zelle eine SK-BR-3-, BT474-, Calu 3-Zelle, MDA-MB-453-, MDA-MB-361 oder SKOV3-Zelle sein. Verschiedene Methoden stehen zur Evaluierung von zellulären Ereignissen, die mit Apoptosen assoziiert sind, zur Verfügung. Beispielsweise kann Phosphatidylserin-(PS-) Translokation mittels Annexin-Bindung gemessen werden; DNA-Fragmentierung kann über DNA-Laddering evaluiert werden; und Nucleo-/Chromatin-Kondensation zusammen mit DNA-Fragmentierung kann durch jede Zunahme hypodiploider Zellen evaluiert werden. Vorzugsweise ist der Antikörper, der Apoptose induziert, einer, der in einem Annexin-Bindungs-Assay, unter Verwendung von BT474-Zellen (siehe unten), relativ zu unbehandelten Zellen zu ungefähr 2- bis 50facher, bevorzugt ungefähr 5- bis 50facher und insbesondere ungefähr 10- bis 50-facher, Induktion von Annexin-Bindung führt. Gelegentlich wird der Pro-apoptotische Antikörper einer sein, der die ErbB-Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors (z.B. 7F3-Antikörper) weitergehend blockiert; d.h. der Antikörper teilt ein biologisches Charakteristikum mit monoklonalem Antikörper 2C4. In anderen Situationen ist der Antikörper einer, der die ErbB-Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors (z.B. 7C2) nicht signifikant blockiert. Weiters kann der Antikörper einer wie 7C2 sein, der, während er Apoptose induziert, eine starke Abnahme des Prozentanteils von S-Phasen-Zellen nicht induziert (z.B. einer, der den Prozentsatz dieser Zellen im Vergleich zur Kontrolle um nur ungefähr 0–10% herabsetzt).

[0091] Das "Epitop 2C4" ist diejenige Region in der extrazellulären Domäne von ErbB2, an die der Antikörper 2C4 bindet. Um Antikörper zu screenen, die an das 2C4-Epitop binden, kann ein Cross-Blocking-Routine-Assay durchgeführt werden, wie er in "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow und David Lane (1988), beschrieben wird. Alternativ dazu kann Epitop-Kartierung durchgeführt werden, um zu beurteilen, ob der Antikörper an das 2C4-Epitop von ErbB2 bindet (z.B. ein beliebiger oder mehrere Rest(e) in der Region von ungefähr Rest 22 bis inklusive ungefähr Rest 584 von ErbB2; siehe die [Fig. 1A–B](#)).

[0092] Das "Epitop 4D5" ist diejenige Region in der extrazellulären Domäne von ErbB2, an die der Antikörper 4D5 (ATCC CRL 10463) bindet. Dieses Epitop ist nahe der Transmembrandomäne von ErbB2. Um Antikörper zu screenen, die an das 4D5-Epitop binden, kann ein Cross-Blocking-Routine-Assay durchgeführt werden, wie er in "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow und David Lane (1988), beschrieben wird. Alternativ dazu kann Epitop-Kartierung durchgeführt werden, um zu beurteilen, ob der Antikörper an das 4D5-Epitop von ErbB2 bindet (z.B. ein beliebiger oder mehrere Rest(e) in der Region von ungefähr Rest 529 bis inklusive ungefähr Rest 625 von ErbB2; siehe die [Fig. 1A–B](#)).

[0093] Das "Epitop 3H4" ist diejenige Region in der extrazellulären Domäne von ErbB2, an die der Antikörper 3H4 bindet. Dieses Epitop umfasst die Reste von ungefähr 541 bis inklusive ungefähr 599 in der Aminosäuresequenz der extrazellulären ErbB2-Domäne; siehe die [Fig. 1A–B](#).

[0094] Das "Epitop 7C2/7F3" ist die Region am N-Terminus der extrazellulären Domäne von ErbB2, an die die 7C2- und/oder 7F3-Antikörper (beide bei der ATCC hinterlegt, siehe unten) binden. Um Antikörper zu screenen, die an das 7C2/7F3-Epitop binden, kann ein Cross-Blocking-Routine-Assay durchgeführt werden, wie er in "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow und David Lane (1988), beschrieben wird. Alternativ dazu kann Epitop-Kartierung durchgeführt werden, um herauszufinden, ob der Antikörper an das 7C2/7F3-Epitop von ErbB2 bindet (z.B. ein beliebiger oder mehrere Rest(e) in der Region von ungefähr Rest 22 bis ungefähr Rest 53 von ErbB2; siehe die [Fig. 1A–B](#)).

[0095] "Behandlung" betrifft sowohl therapeutische Behandlung als auch prophylaktische und präventive Maßnahmen. Jene, die eine Behandlung benötigen, umfassen jene, bei denen die Störung schon vorliegt, wie auch jene, bei denen die Störung verhindert werden soll. Daher kann das hierin zu behandelnde Säugetier mit der Störung diagnostiziert worden sein oder kann für die Störung prädisponiert oder anfällig sein.

[0096] "Säugetier" zum Zwecke von Behandlung betrifft jedes Tier, das als Säugetier klassifiziert ist, einschließlich Menschen, Haus- und Nutztiere, Tiergärten-, Sport- und Haustiere, wie z.B. Hunde, Pferde, Katzen, Kühe, usw. Bevorzugt ist das Säugetier der Mensch.

[0097] Der Begriff "therapeutisch wirksame Menge" betrifft eine Menge eines Medikaments, die zur Behandlung einer Krankheit oder Störung in einem Säugetier effektiv ist. Im Falle von Krebs kann die therapeutisch wirksame Menge des Medikaments die Anzahl von Krebszellen herabsetzen; die Tumorgroße herabsetzen; die Infiltration von Krebszellen in periphere Organe inhibieren (d.h. in gewissem Ausmaß verlangsamen und bevorzugt stoppen); das Tumor-Wachstum in gewissem Ausmaß inhibieren; und/oder in gewissem Ausmaß ein oder mehrere mit dem Krebs assoziierte Symptome erleichtern. In dem Ausmaß, in dem das Medikament das Wachstum verhindert und/oder vorhandene Krebszellen abtötet, kann es zytostatisch und/oder zytotoxisch sein. Zur Krebstherapie kann die Effizienz beispielsweise gemessen werden, indem die Zeit zur Krankheits-Progression (TTP) beurteilt und/oder die Reaktionsrate (RR) bestimmt wird.

[0098] Die Begriffe "Krebs" und "krebsartig" betreffen oder beschreiben den physiologischen Zustand in Säugetieren, der typischerweise durch unkontrolliertes Zellwachstum charakterisiert ist. Beispiele für Krebs umfassen (sind aber nicht beschränkt auf) Karzinome, Lymphome, Blastome, Sarcome und Leukämie oder lymphatische Malignitäten. Speziellere Beispiele für solche Krebsformen umfassen Plattenepithelkarzinom, Lungenkrebs, Plattenepithelkarzinom der Lunge, Krebs des Peritoneum, Leberzellenkrebs, Magenkrebs einschließlich Magen-Darm-Krebs, Pankreaskrebs, Glioblastom, Zervikalkrebs, Eierstockkrebs, Leberkrebs, Blasenkrebs, Hepatom, Brustkrebs, Dickdarmkrebs, Rektalkrebs, Kolon-Rektum-Krebs, Endometrium- oder Uterus-Karzinom, Speicheldrüsenkrebs, Nieren- oder Renalkrebs, Prostatakrebs, Vulvakrebs, Schilddrüsenkrebs, Leberkarzinom, Analkrebs, Peniskrebs sowie Kopf- und Halskrebs.

[0099] Ein "ErbB-exprimierender Krebs" ist einer, der Zellen beinhaltet, an deren Oberfläche ErbB-Proteine vorhanden sind. Ein "ErbB2-exprimierender Krebs" ist einer, der ausreichende Ausmaße von ErbB2 an der Oberfläche seiner Zellen produziert, so dass ein Anti-ErbB2-Antikörper daran binden und in Bezug auf den Krebs einen therapeutischen Effekt haben kann.

[0100] Ein Krebs, der durch "durch übermäßige Aktivierung" eines ErbB-Rezeptors charakterisiert ist, ist einer, bei dem das Ausmaß der ErbB-Rezeptor-Aktivierung in Krebszellen das Ausmaß der Aktivierung dieses Rezeptors in nicht-krebsartigen Zellen desselben Gewebes signifikant übersteigt. Solch übermäßige Aktivierung kann aus der Überexpression des ErbB-Rezeptors und/oder höher als normale, für die Aktivierung des ErbB-Rezeptors in den Krebszellen verfügbare Ausmaße eines ErbB-Liganden resultieren. Solche übermäßigen Aktivierungen können verursachen und/oder verursacht werden durch den malignen Zustand einer Krebszelle. In einigen Ausführungsformen wird der Krebs diagnostischen oder prognostischen Tests unterworfen, um zu bestimmen, ob eine Amplifizierung und/oder Überexpression eines ErbB-Rezeptors auftritt, die zu einer solch übermäßigen Aktivierung des ErbB-Rezeptors führt. Alternativ oder zusätzlich dazu kann der Krebs einem diagnostischen oder prognostischen Test unterzogen werden, um festzustellen, ob eine Amplifizierung und/oder Überexpression eines ErbB-Rezeptors im Krebs auftritt, die zur übermäßigen Aktivierung des ErbB-Rezeptors beiträgt. In einer Untergruppe solcher Krebsformen könnte die übermäßige Aktivierung des Rezeptors von einem autokrinen Stimulations-Stoffwechselweg herrühren.

[0101] In einem "autokrinen" Stimulationsweg tritt Selbst-Stimulation auf, und zwar weil Krebszellen sowohl den ErbB-Liganden als auch seinen zugehörigen ErbB-Rezeptor produzieren. Beispielsweise kann der Krebs EGFR und auch einen EGFR-Liganden (z.B. EGF, TGF- α oder HB-EGF) exprimieren oder überexprimieren. In einer anderen Ausführungsform kann der Krebs ErbB2 exprimieren oder überexprimieren und auch ein Heregulin (z.B. γ -HRG) exprimieren oder überexprimieren.

[0102] Ein Krebs, der einen ErbB-Rezeptor "überexprimiert", ist einer, der an seiner Oberfläche, im Vergleich zu nicht-krebsartigen Zellen desselben Gewebetyps, signifikant höhere Mengen eines ErbB-Rezeptors, wie z.B. ErbB2, aufweist. Eine solche Überexpression kann durch Genamplifikation oder erhöhte Transkription oder Translation verursacht sein. ErbB-Rezeptor-Überexpression kann in einem diagnostischen oder prognostischen Test bestimmt werden, indem erhöhte Ausmaße eines an der Oberfläche einer Zelle vorhandenen ErbB-Proteins evaluiert wird (z.B. über einen Immunhistochemie-Assay; IHC). Alternativ oder zusätzlich dazu kann man das Ausmaß von ErbB-kodierender Nucleinsäure in der Zelle messen, z.B. über In-situ-Fluoreszenz-Hybridisierung (FISH; siehe WO 98/45479, publiziert im Oktober 1998), Southern-Blotting, oder Polymerase-Kettenreaktions-(PCR-) Techniken, wie z.B. quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR). Man kann ErbB-Rezeptor-Überexpression auch untersuchen, indem man abgeworfenes Antigen (z.B. extrazelluläre ErbB-Domäne) in einer biologischen Flüssigkeit wie z.B. Serum misst (siehe z.B. US-Patent Nr. 5.933.294, erteilt am 12. Juni

1990; WO 91/05264, publiziert am 18. April 1991; US-Patent Nr. 5.401.638, erteilt am 28. März 1995; und Sias et al., J. Immunol. Methods 132, 73-80 (1990)). Abgesehen von den obigen Tests stehen dem erfahrenen Praktiker verschiedene In-vivo-Tests zur Verfügung. Beispielsweise kann man Zellen innerhalb des Körpers eines Patienten einem Antikörper aussetzen, der optional mit einem detektierbaren Marker, z.B. einem Radioisotop, markiert ist, und die Bindung des Antikörpers an Zellen im Patienten kann z.B. mittels externem Scanning der Radioaktivität oder mittels Analyse einer nach Antikörper-Exposition des Patienten entnommenen Biopsie evaluiert werden.

[0103] Umgekehrt ist ein Krebs, der "nicht durch Überexpression eines ErbB2-Rezeptors" charakterisiert ist, einer, der in einem diagnostischen Test, im Vergleich zu einer nicht-krebsartigen Zelle desselben Gewebetyps, keine höheren als die normalen Ausmaße von ErbB-Rezeptor exprimiert.

[0104] Ein Krebs, der einen ErbB-Liganden "überexprimiert", ist einer, der im Vergleich zu einer nicht-krebsartigen Zelle desselben Gewebetyps signifikant höhere Ausmaße dieses Liganden exprimiert. Eine solche Überexpression kann durch Genamplifikation oder erhöhte Transkription oder Translation verursacht sein. Überexpression des ErbB-Liganden kann diagnostisch mittels Evaluierung des Liganden-Levels (oder der kodierenden Nucleinsäure) in Patienten, z.B. in einer Tumor-Biopsie, oder mittels verschiedener diagnostischer Tests, wie z.B. die oben beschriebenen IHC-, FISH-, Southern-Blotting-, PCR- oder In-vitro-Tests, bestimmt werden.

[0105] Ein "Hormon-unabhängiger" Krebs ist einer, bei dem seine Proliferation von der Anwesenheit eines Hormons, das an einen durch Krebszellen exprimierten Rezeptor bindet, unabhängig ist. Solche Krebsformen untergehen keine klinische Rückbildung bei Anwendung pharmakologischer oder operativer Strategien, die die Hormonkonzentration im oder in der Nähe des Tumors herabsetzen. Beispiele Hormon-unabhängiger Krebsformen umfassen androgenunabhängigen Prostatakrebs, Östrogen-unabhängigen Brustkrebs, Endometrium-Krebs und Eierstock-Krebs. Solche Krebsformen können als Hormon-abhängige Tumoren beginnen und im Anschluss an Anti-Hormon-Therapie von einem Hormon-empfindlichen Stadium zu einem Hormon-resistenten Tumor fortschreiten.

[0106] Der Begriff "zytotoxisches Mittel", wie hierin verwendet, betrifft eine Substanz, die die Funktion von Zellen inhibiert oder verhindert und/oder die Zerstörung von Zellen verursacht. Der Begriff intendiert die Umfassung von radioaktiven Isotopen (z.B. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² und radioaktiven Lu-Isotopen), chemotherapeutischen Mitteln und Toxinen, wie z.B. Kleinmolekül-Toxine oder enzymatisch aktive Toxine bakterieller, pilzlicher, pflanzlicher oder tierischer Herkunft, einschließlich derer Fragmente und/oder Varianten.

[0107] Ein "chemotherapeutisches Mittel" ist eine chemische Verbindung, die zur Behandlung von Krebs zweckdienlich ist. Beispiele chemotherapeutischer Mittel umfassen Alkylierungsmittel wie z.B. Thiotepa und Cyclophosphamid (CYTOXANTM); Alkylsulfonate wie z.B. Busulfan, Improsulfan und Pipsulfan; Aziridine wie z.B. Benzodopa, Carboquon, Meturedopa und Uredopa; Ethylenimine und Methylamelamine einschließlich Al-tretamin, Triethylenmelamin, Triethylenphosphoramid, Triethylthiophosphoramid und Trimethylolomelamin; Stickstofflos wie z.B. Chlorambucil, Chlornaphazin, Cholophosphamid, Estramustin, Ifosfamid, Mechlorethamin, Mechlorethaminoxid-Hydrochlorid, Melphalan, Novembichin, Phenesterin, Prednimustin, Trofosfamid, Uracil-Lost; Nitrosoharnstoffe wie z.B. Carmustin, Chlorozotocin, Fotemustin, Lomustin, Nimustin, Ranimustin; Antibiotika wie z.B. Aclacinomycin, Actinomycin, Authramycin, Azaserin, Bleomycine, Cactinomycin, Caliche-amicin, Carabycin, Carminomycin, Carzinophilin, Chromomycin, Dactionmycin, Daunorubicin, Detorubicin, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin, Doxorubicin, Epirubicin, Esorubicin, Idarubicin, Marcellomycin, Mitomycin, Myco-phenolsäure, Nogalamycin, Olivomycine, Peplomycin, Potfiromycin, Puromycin, Quelamycin, Rodorubicin, Streptonigrin, Streptozocin, Tubercidin, Ubenimex, Zinostatin, Zorubicin; Anti-Metaboliten wie z.B. Methotrexat und 5-Fluoruracil (5-FU); Folsäure-Analoga wie z.B. Denopterin, Methotrexat, Pteropterin, Trimetrexat; Pu-rin-Analoga wie z.B. Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin, Thioguanin; Pyrimidin-Analoga wie z.B. Ancita-bin, Azacitidin, 6-Azauridin, Carmofur, Cytarabin, Didesoxyuridin, Doxifluridin, Enocitabin, Floxuridin, 5-FU; An-drogene wie z.B. Calusteron, Dromostanolon-Propionat, Epitiostanol, Mepitiostan, Testolacton; Anti-Adrenale wie z.B. Aminoglutethimid, Mitotan, Trilostan; Folsäure-Ergänzer wie z.B. Frolinsäure; Aceglaton; Aldophos-phamidglykosid; Aminolevulinsäure; Amsacrin; Bestrabucil; Bisantren; Edatraxat; Defofamin; Demecolcin; Di-aziquon; Elfortin; Elliptiniumacetat; Etoglucid; Galliumnitrat; Hydroxyharnstoff; Lentinan; Lonidamin; Mitogu-azon; Mitoxantron; Mopidamol; Nitracrin; Pentostatin; Phenamet; Pirarubicin; Podophyllinsäure; 2-Ethylhydra-zid; Procarbazine; PSK[®]; Razoxan; Sizofiran; Spirogermanium Tenuazonsäure; Triaziquon; 2,2',2"-Trichlortriet-hylamin; Urethan; Vindesin; Dacarbazin; Mannomustin; Mitobronitol; Mitolactol; Pipobroman; Gacytosin; Ara-binosid ("Ara-C"); Cyclophosphamid; Thiotepa; Taxane, z.B. Paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Onco-

logy, Princeton, NJ) und Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); Chlorambucil; Gemcitabin; 6-Thioguanin; Mercaptopurin; Methotrexat; Platin-Analoga wie z.B. Cisplatin und Carboplatin; Vinblastin; Platin; Etoposid (VP-16); Ifosfamid; Mitomycin C; Mitoxantron; Vincristin; Vinorelbin; Navelbin; Novantron; Teniposid; Daunomycin; Aminopterin; Xeloda; Ibandronat; CPT-11; Topoisomerase-Inhibitor RFS 2000; Difluormethylornithin (DMFO); Retinsäure; Esperamicin; Capecitabin und pharmazeutisch vertretbare Salze, Säuren oder Derivate aller obenstehenden Substanzen. Ebenso sind in dieser Definition Anti-Hormon-Mittel eingeschlossen, die die Hormonwirkung auf Tumoren regulieren oder inhibieren, wie z.B. Anti-Östrogene, einschließlich z.B. Tamoxifen, Raloxifen, Aromatase-inhibierende 4(5)-Imidazole, 4-Hydroxytamoxifen, Trioxifen, Keoxifen, LY117018, Onapriston und Toremifen (Fareston); und Anti-Androgene wie z.B. Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid, Leuprolid und Goserelin; und pharmazeutisch vertretbare Salze, Säuren oder Derivate aller obenstehenden Substanzen.

[0108] Der Begriff "Cytokin" ist ein allgemeiner Begriff für Proteine, die von einer Zellpopulation freigesetzt werden und als intrazelluläre Mediatoren auf andere Zellen einwirken.

[0109] Beispiele für solche Cytokine sind Wachstumshormone, wie z.B. humanes Wachstumshormon, humanes N-Methionyl-Wachstumshormon und Rinder-Wachstumshormon; Parathormon; Thyroxin; Insulin; Proinsulin; Relaxin; Prorelaxin; Glykoproteinhormone wie z.B. follikelstimulierendes Hormon (FSH); Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH), Luteinisierungshormon (LH); Leber-Wachstumsfaktor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor; Prolactin; Plazentalaktogen; Tumornekrosefaktor- α und - β ; Mullerian-inhibierende Substanz; Maus-Gonadotropin-assoziiertes Peptid; Inhibin; Activin; Gefäßendothel-Wachstumsfaktor; Integrin; Thrombopoietin (TPO); Nerven-Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF- β ; Blutplättchen-Wachstumsfaktor; transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs) wie z.B. TGF- α und TGF- β ; insulinartiger Wachstumsfaktor-I und -II; Erythropoietin (EPO); osteoinduzierende Faktoren; Interferone wie z.B. Interferon- α , - β und - γ ; koloniestimulierende Faktoren (CSFs) wie z.B. Makrophagen-CSF (M-CSF); Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF); und Granulozyten-CSF (G-CSF); Interleukine (ILs) wie z.B. IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; ein Tumornekrosefaktor wie z.B. TNF- α oder TNF- β und andere Polypeptidfaktoren, einschließlich LIF und Kit-Ligand (KL). Wie hierin verwendet, umfasst der Begriff Cytokine Proteine natürlicher Quellen oder von rekombinanten Zellkulturen und biologisch aktive Äquivalente der Nativequenz-Cytokine.

[0110] Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff "auf EGFR-abzielendes Medikament" eine therapeutische Verbindung, die an einen EGFR-Rezeptor bindet und optional EGFR-Rezeptor-Aktivierung inhibiert. Beispiele für solche Mittel umfassen Antikörper und kleine Moleküle, die an EGFR binden. Beispiele von Antikörpern, die an EGFR binden, umfassen MAb579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (siehe US-Patent Nr. 4.943.533, Mendelsohn et al.) und deren Varianten, wie z.B. chimärisiertes 225 (C225) und neugeformtes Human-225 (H225) (siehe WO96/40210, Imclone Systems Inc.); Antikörper, die Typ-II-Mutanten-EGFR binden (US-Patent Nr. 5.212.290); humanisierte und chimäre Antikörper, die EGFR binden, wie beschrieben in US-Patent Nr. 5.891.996; und humane Antikörper, die EGFR binden (siehe WO98/50433, Abgenix). Der Anti-EGFR-Antikörper kann mit einem zytotoxischen Mittel konjugiert werden und so ein Immunkonjugat bilden (siehe EP 659.439 A2, Merck Patent GmbH). Beispiele kleiner Moleküle, die EGFR binden, umfassen ZD1839 (Astra Zeneca), CP-358774 (OSI/Pfizer) und AG1478.

[0111] Ein "anti-angiogenes Mittel" betrifft eine Verbindung, die die Entwicklung von Blutgefäßen blockiert oder in gewissem Ausmaß damit interferiert. Der anti-angiogene Faktor kann beispielsweise ein kleines Molekül oder Antikörper sein, das an einen Wachstumsfaktor oder Wachstumsfaktor-Rezeptor, beteiligt an der Förderung von Angiogenese, bindet. Der hierin bevorzugte angiogene Faktor ist ein Antikörper, der an den Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) bindet.

[0112] Der Begriff "Prodrug" wie in dieser Anmeldung verwendet betrifft einen Vorläufer oder eine derivatisierte Form einer pharmazeutisch aktiven Substanz, die auf Tumorzellen weniger toxisch wirkt als das Stamm-Medikament und enzymatisch aktiviert oder zur aktiveren Stammform umgesetzt werden kann. Siehe z.B. Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions 14, Seiten 375-382, 615th Meeting Belfast (1986), und Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (Hrsg.), Seiten 247-267, Humana Press (1985). Die Prodrugs dieser Erfindung umfassen (sind aber nicht beschränkt auf) Phosphat-enthaltende Prodrugs, Thiophosphatenthaltende Prodrugs, Sulfat-enthaltende Prodrugs, Peptid-enthaltende Prodrugs, D-Aminosäure-modifizierte Prodrugs, glykosylierte Prodrugs, β -Lactam-enthaltende Prodrugs, optional substituierte Phenoxyacetamid-enthaltende Prodrugs oder optional substituierte Phenylacetamid-enthaltende Prodrugs, 5-Fluorcytosin- und andere 5-Fluoruridin-Prodrugs, die zu dem aktiveren freien zytotoxischen Medikament umgesetzt werden können. Beispiele für zytotoxische Medikamente, die zu einer Prodrug-Form zur Verwendung in dieser Erfindung derivatisiert wer-

den können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, jene oben beschriebenen chemotherapeutischen Mittel.

[0113] Ein "Liposom" ist ein kleines Vesikel, zusammengesetzt aus verschiedenen Arten von Lipiden, Phospholipiden und/oder Tensid, das für die Zufuhr des Medikaments (z.B. die hierin offenbarten Anti-ErbB2-Antikörper und, optional, ein chemotherapeutisches Mittel) in ein Säugetier zweckmäßig ist. Die Verbindungen der Liposomen sind gewöhnlich als Doppelschicht angeordnet, ähnlich der Lipidanordnung in biologischen Membranen.

[0114] Der Begriff "Packungsbeilage" wird verwendet in Bezug auf Anweisungen, die üblicherweise den Handelsverpackungen therapeutischer Produkte beiliegen und die Informationen über Indikationen, Verwendung, Dosierung, Verabreichung, Gegenindikationen und/oder Warnungen über die Verwendung solcher therapeutischen Produkte enthalten.

[0115] Ein "Kardioprotektor" ist eine Verbindung oder Zusammensetzung, die Myokard-Dysfunktion (d.h. Kardiomyopathie und/oder kongestive Herzinsuffizienz) verhindert oder herabsetzt, die mit der Verabreichung eines Medikaments, wie z.B. Anthracyclin Antibiotikum und/oder eines Anti-ErbB2-Antikörpers, an einen Patienten assoziiert ist. Der Kardioprotektor kann beispielsweise Radikal-vermittelte kardiotoxische Effekte blockieren oder herabsetzen und/oder Schäden durch oxidativen Stress verhindern oder herabsetzen. In der vorliegenden Definition umfasste Beispiele von Kardioprotektor sind das Eisen-chelatierende Mittel Dexrazoxan (IC-RF-187) (Seifert et al., *Annals of Pharmacology* 28, 1063-1072 (1994)); ein Lipid-herabsetzendes Mittel und/oder Antioxidans wie z.B. Probucol (Singal et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 1055-1063 (1995)); Amifostin (Aminothiol-2-[(3-aminopropyl)amino]ethanthiol-dihydrogenphosphatester, auch WR-2721 genannt, und dessen dephosphorylierte Zellaufnahmeform, genannt WR-1065) und S-3-(3-Methylaminopropylamino)thiophosphorsäure (WR-151327), siehe Green et al., *Cancer Research* 54, 738-741 (1994); Digoxin (M.R. Bristow, In: M.R. Bristow (Hrsg.), *Drug Induced Heart Disease*, New York, Elsevier, Seiten 191-215 (1980)); Beta-Blocker wie z.B. Metoprolol (Hjalmarson et al., *Drugs* 47, Suppl 4, 31-9 (1994), und Shaddy et al., *Am. Heart J.* 129, 197-9 (1995)); Vitamin E; Ascorbinsäure (Vitamin C); Radikalfänger wie z.B. Oleanolsäure, Ursolsäure und N-Acetylcystein (NAC); Spin-Trapping-Verbindungen wie z.B. α -Phenyltert-butylnitron (PBN); (Paracchini et al., *Anticancer Res.* 13, 1607-1612 (1993)); Seleno-organische Verbindungen wie z.B. P251 (Elbesen); und ähnliche.

II. Herstellung von Anti-ErbB2-Antikörpern

[0116] Es folgt eine Beschreibung beispielhafter Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gemäß vorliegender Erfindung. Das zur Herstellung von Antikörpern zu verwendende ErbB2-Antigen kann z.B. eine lösliche Form der extrazellulären Domäne von ErbB2 oder ein das gewünschte Epitop enthaltender Teil davon sein. Alternativ dazu können Zellen, die an ihrer Zelloberfläche ErbB2 exprimieren (z.B. NIH-3T3-Zellen, transformiert zur Überexpression von ErbB2; oder eine Karzinom-Zelllinie wie z.B. SK-BR-3-Zellen, siehe Stancovski et al., *PNAS (USA)* 88, 8691-8695 (1991)), verwendet werden, um Antikörper zu generieren. Andere zur Generierung von Antikörpern geeignete ErbB2-Formen sind für den Fachkundigen offensichtlich.

(i) Polyklonale Antikörper

[0117] Polyklonale Antikörper werden bevorzugt in Tieren durch subkutane (sc) oder intraperitoneale (ip) Injektionen des relevanten Antigens und eines Adjuvans hergestellt. Es kann zweckmäßig sein, das relevante Antigen an ein Protein zu koppeln, das in der zu immunisierenden Spezies immunogen wirkt, z.B. Keyhole-Limpet-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin oder Sojabohnen-Trypsininhibitor, unter Verwendung eines bifunktionellen oder derivatisierenden Mittels, beispielsweise Maleinimidobenzoylsulfosuccinimidester (Konjugation über Cystein-Reste), N-Hydroxysuccinimid (über Lysin-Reste), Glutaraldehyd, Bernsteinsäureanhydrid, SOCl_2 oder $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, wobei R und R^1 verschiedene Alkylgruppen sind.

[0118] Tiere werden gegen das Antigen, Immunogen-Konjugate oder Derivate immunisiert, indem z.B. 100 μg oder 5 μg (für Kaninchen bzw. Mäuse) des Proteins oder Konjugats mit 3 Volumina Freundschem komplettem Adjuvans kombiniert werden und die Lösung intradermal an mehreren Stellen injiziert wird. Einen Monat später werden die Tiere mit 1/5 bis 1/10 der ursprünglichen Menge Peptid oder Konjugat in Freundschem komplettem Adjuvans durch subkutane Injektion an mehreren Stellen geboostet. Sieben bis 14 Tage später wird den Tieren Blut abgenommen und das Serum auf Antikörper-Titer getestet. Die Tiere werden bis zum Erreichen des Titer-Plateaus geboostet. Vorzugsweise wird das Tier mit dem Konjugat desselben Antigens geboostet, jedoch konjugiert an ein anderes Protein und/oder über ein anderes vernetzendes Reagens. Konjugate können

auch in rekombinanter Zellkultur als Fusionsproteine hergestellt werden. Ebenso sind aggregierende Mittel wie Alaun zur Verstärkung der Immunantwort in geeigneter Weise verwendbar.

(ii) Monoklonale Antikörper

[0119] Monoklonale Antikörper werden aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten, d.h. die in der Population enthaltenen, einzelnen Antikörper sind bis auf mögliche, natürlich auftretende Mutationen, die in geringer Menge vorhanden sein können, identisch. Folglich weist die nähere Bestimmung "monoklonal" auf den Charakter des Antikörpers als nicht aus einer Mischung getrennter Antikörper bestehend hin.

[0120] Beispielsweise können monoklonale Antikörper mit dem Hybridom-Verfahren, das zuerst von Kohler et al., Nature 256, 495 (1995), beschrieben worden ist, oder mittels DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden (US-Patent Nr. 4.816.567).

[0121] In der Hybridom-Methode wird eine Maus oder ein anderes geeignetes Wirtstier, wie z.B. Hamster, wie hierin oben beschrieben immunisiert, um Lymphozyten hervorzurufen, die Antikörper produzieren oder dazu fähig sind, die spezifisch an das für die Immunisierung verwendete Protein binden. Alternativ dazu können Lymphozyten in vitro immunisiert werden. Lymphozyten werden unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, mit Myelom-Zellen fusioniert, um die Hybridom-Zelle zu bilden (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Seiten 59-103, Academic Press (1986)).

[0122] Die so hergestellten Hybridomzellen werden in eine geeignetes Kulturmedium, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben von nicht-fusionierten Myelom-Elternzellen inhibieren, inokuliert und gezüchtet. Beispielsweise wird das Medium für die HybridomE, wenn der parentalen Myelomzelle das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) enthalten. Diese Substanzen verhindern das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen.

[0123] Bevorzugte Myelomzellen sind jene, die effizient fusionieren, stabile High-Level-Produktion von Antikörper durch selektierte Antikörper-produzierende Zellen unterstützen und für ein Medium wie z.B. HAT-Medium empfindlich sind. Unter diesen bevorzugten Myelom-Zelllinien sind murine Myelom-Linien, wie z.B. jene, die von MOPC-21- und MPC-11-Maustumoren hergeleitet sind und vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, erhältlich sind, und SP-2- oder X63-Ag8-653-Zellen, die von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, erhältlich sind. Human-Myelom- und Maus-Human-Heteromyelom-Zelllinien sind ebenfalls für die Produktion humaner monoklonaler Antikörper beschrieben worden (Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); und Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Seiten 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987)).

[0124] Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen wachsen, wird auf die Produktion monoklonaler Antikörper gegen das Antigen getestet. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität der durch Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörper mittels Immunpräzipitation oder einem In-vitro-Bindungstest, wie z.B. Radioimmunassay (RIA) oder Enzym-gebundenen Immunadsorptions-Assay (ELISA), bestimmt.

[0125] Die Bindungsaffinität monoklonaler Antikörper kann beispielsweise mittels der Scatchard-Analyse von Munson et al., Anal. Biochem. 107, 220 (1980), bestimmt werden.

[0126] Nach der Identifizierung von Hybridomzellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität, Affinität und/oder Aktivität produzieren, können die Klone mittels Grenzverdünnungs-Verfahren subkloniert und mittels Standardmethoden gezüchtet werden (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Seiten 59-103, Academic Press (1986)). Geeignete Kulturmedien zu diesem Zweck umfassen z.B. D-MEModer RPMI-1640-Medium. Zusätzlich dazu können die Hybridomzellen in vivo als Ascites-Tumoren in einem Tier gezüchtet werden.

[0127] Die von den Subklonen sekretierten monoklonalen Antikörper werden in geeigneter Weise von Kulturmedium, Ascites-Flüssigkeit oder Serum getrennt, und zwar mittels konventioneller Antikörper-Reinigungsprozeduren, wie z.B. Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatit-Chromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie.

[0128] DNA, die für monoklonale Antikörper kodiert, kann mittels konventioneller Verfahren (z.B. unter Ver-

wendung von Oligonucleotid-Sonden, die in der Lage sind, spezifisch an Gene zu binden, die für leichte und schwere Ketten von murinen Antikörpern kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Die Hybridomzellen dienen als bevorzugte Quelle solcher DNA. Einmal isoliert, kann die DNA in Expressionsvektoren gesetzt werden, die dann in Wirtszellen, wie z.B. E. coli-Zellen, Simian-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock (CHO-) Zellen oder Myelomzellen, die keine Antikörperproteine produzieren, transfiziert werden, um die Synthese monoklonaler Antikörper in der rekombinanten Wirtszelle zu erhalten. Übersichtsartikel über rekombinante Expression von DNA, die für den Antikörper kodiert, in Bakterien umfassen Skerra et al., Curr. Opin. in Immunol. 5, 256-262 (1993), und Plückthun, Immunol. Revs. 130, 151-188 (1992).

[0129] In einer weiteren Ausführungsform können monoklonale Antikörper oder Antikörper-Fragmente unter Verwendung der in McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990), beschriebenen Techniken aus Antikörper-Phagen-Bibliotheken isoliert werden. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), beschreiben die Isolierung von murinen bzw. humanen Antikörpern unter Verwendung von Phagen-Bibliotheken. Nachfolgende Publikationen beschreiben die Produktion humaner Antikörper hoher Affinität (nM-Bereich) mittels Ketten-Shuffling (Marks et al., Bio/ Technology 10, 779-783 (1992)) wie auch kombinatorische Infektion und In-vivo-Rekombination als Strategie zur Konstruktion großer Phagen-Bibliotheken (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21, 2265-2266 (1993)). Folglich sind diese Techniken entwicklungsfähige Alternativen zu traditionellen Hybridom-Techniken für monoklonale Antikörper zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern.

[0130] Die DNA kann auch modifiziert werden, beispielsweise durch Substitution der kodierenden Sequenz humaner Schwerketten- und Leichtketten-Konstantdomänen anstelle der homologen murinen Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567 und Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1994)) oder durch kovalente Verbindung der gesamten oder eines Teils der für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid kodierenden Sequenz mit der für Immunglobulin kodierenden Sequenz.

[0131] Typischerweise werden die konstanten Domänen eines Antikörpers durch solche Nicht-Immunglobulin-Peptide substituiert, oder sie substituieren die variable Domäne einer Antigen-bindenden Stelle eines Antikörpers, um einen chimären, bivalenten Antikörper zu erzeugen, der eine antigenbindende Stelle mit Spezifität für ein Antigen und eine andere antigenbindende Stelle mit Spezifität für ein anderes Antigen beinhaltet.

(iii) Humanisierte Antikörper

[0132] Verfahren zur Humanisierung nicht-humaner Antikörper sind im Fach beschrieben worden. Bevorzugt besitzt ein humanisierter Antikörper eine oder mehrere eingeführte Aminosäurereste, die von einer nicht-humanen Quelle herrühren. Diese nichthumanen Aminosäurereste werden oft als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise von einer variablen "Import"-Domäne genommen sind. Humanisierung kann im Wesentlichen nach der Methode von Winter und Mitarbeiter (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239, 1534-1536 (1988)) durchgeführt werden, und zwar durch Substitution der hypervariablen Sequenzen für die entsprechenden Sequenzen eines humanen Antikörpers. Demgemäß sind solche "humanisierten" Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin wesentlich weniger als eine intakte humane variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-humanen Spezies substituiert worden ist. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise humane Antikörper mit einigen Resten in der hypervariablen Region, und möglicherweise sind einige FR-Reste durch Reste analoger Stellen von Nager-Antikörpern substituiert.

[0133] Die Auswahl der für die Herstellung humanisierter Antikörper zu verwendenden humanen variablen Domänen, sowohl leicht als auch schwer, ist sehr wichtig, um die Antigenität zu vermindern. Gemäß der so genannten "Best-Fit"-Methode wird die Sequenz der variablen Domäne eines Nager-Antikörpers gegen die gesamte Bibliothek bekannter Sequenzen humaner variabler Domänen gescreent. Die humane Sequenz, die der des Nagers am ähnlichsten ist, wird dann als die humane Gerüstregion (FR) für den humanisierten Antikörper akzeptiert (Sims et al., J. Immunol. 151, 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)). Ein weiteres Verfahren verwendet eine bestimmte Gerüstregion, hergeleitet von der Konsensus-Sequenz aller humaner Antikörper oder einer bestimmten Untergruppe leichter und schwerer Ketten. Dasselbe Gerüst kann für mehrere verschiedene humanisierte Antikörper verwendet werden (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151, 2623 (1993)).

[0134] Weiters ist wichtig, dass die Antikörper unter Beibehaltung hoher Affinität für das Antigen und anderer günstiger biologischer Eigenschaften humanisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden humanisierte Antikörper gemäß einer bevorzugten Methode durch einen Prozess von Analyse parentaler Sequenzen und

verschiedener konzeptueller, humanisierter Produkte, unter Verwendung dreidimensionaler Modelle der parentalen und humanisierten Sequenzen, hergestellt. Dreidimensionale Immunglobulin-Modelle sind allgemein erhältlich und dem Fachkundigen geläufig. Computerprogramme sind erhältlich, die wahrscheinliche dreidimensionale Konformationen ausgesuchter Immunglobulin-Kandidatsequenzen veranschaulichen und darstellen.

[0135] Die Prüfung dieser Darstellungen erlaubt die Analyse der wahrscheinlichen Rolle von Resten, die die Fähigkeit des Immunglobulin-Kandidaten beeinflussen, an sein Antigen zu binden. Auf diese Weise können FR-Reste aus den Rezipienten- und Import-Sequenzen ausgewählt und kombiniert werden, so dass das gewünschte Antikörper-Charakteristikum, wie z.B. erhöhte Affinität für das/die Zielantigen(e), erzielt werden kann. Im Allgemeinen sind die Reste der hypervariablen Regionen direkt und höchst signifikant an der Beeinflussung der Antigenbindung beteiligt.

[0136] Unten angeführtes Beispiel 3 beschreibt die Produktion von exemplarischen humanisierten Anti-ErbB2-Antikörpern, die ErbB2 binden und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockieren. Der humanisierte Antikörper von besonderem Interesse hierin blockiert EGF-, TGF- α - und/oder HRG-vermittelte Aktivierung von MAPK genauso effektiv wie muriner monoklonaler Antikörper 2C4 (oder ein Fab-Fragment davon) und/oder bindet ErbB2 im Wesentlichen genauso effektiv wie muriner monoklonaler Antikörper 2C4 (oder ein Fab-Fragment davon). Der humanisierte Antikörper hierin kann beispielsweise Reste der nicht-humanen hypervariablen Region, eingebaut in eine humane variable schwere Domäne, enthalten und kann weiters eine Gerüstregion-(FR-) Substitution an einer Position enthalten, ausgesucht aus einer Gruppe bestehend aus 69H, 71H und 73H, unter Verwendung des Nummerierungs-Systems variabler Domänen von Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. Auflage, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA (1991). In einer Ausführungsform beinhaltet der humanisierte Antikörper FR-Substitutionen an zwei oder allen der Positionen 69H, 71H und 73H.

[0137] Ein exemplarischer humanisierter Antikörper hierin von Interesse beinhaltet die Komplementaritäts-bestimmenden Reste GFTFTDYTMX der variablen schweren Domäne, wobei X bevorzugt D oder S (Seq.-ID Nr. 7) ist; DVNPNSGGSIYNQRFKG (Seq.-ID Nr. 8) und/oder NLGPSFYFDY (Seq.-ID Nr. 9), optional beinhaltend Aminosäuremodifikationen dieser CDR-Reste, z.B. wo die Modifikationen die Affinität des Antikörpers im Wesentlichen erhalten oder verbessern. Beispielsweise besitzt die Antikörper-Variante von Interesse ungefähr eine bis ungefähr sieben oder ungefähr fünf Aminosäuresubstitutionen in den obigen variablen schweren CDR-Sequenzen. Solche Antikörper-Varianten können durch Affinitäts-Reifung, z.B. wie unten beschrieben, hergestellt werden. Der insbesondere bevorzugte humanisierte Antikörper beinhaltet die variable Schwerketten-Domänen-Aminosäuresequenz der Seq.-ID Nr. 4.

[0138] Der humanisierte Antikörper kann die Komplementaritäts-bestimmenden Reste KASQDVSIGVA (Seq.-ID Nr. 10) der variablen leichten Domäne beinhalten; weiters SASYX¹X²X³, wobei X¹ bevorzugt R oder L ist, X² bevorzugt Y oder E ist und X³ bevorzugt T oder S ist (Seq.-ID Nr. 11); und QQYYIYPYT (Seq.-ID Nr. 12), z.B. zusätzlich zu jenen CDR-Resten der variablen schweren Domäne im vorangegangenen Absatz. Solche humanisierte Antikörper können optional Aminosäuremodifikationen der obigen CDR-Reste beinhalten, z.B. wo die Modifikationen die Affinität des Antikörpers im Wesentlichen erhalten oder verbessern. Beispielsweise kann die Antikörper-Variante von Interesse ungefähr eine bis ungefähr sieben oder ungefähr fünf Aminosäuresubstitutionen in den obigen variablen leichten CDR-Sequenzen besitzen. Solche Antikörper-Varianten können durch Affinitäts-Reifung, z.B. wie unten beschrieben, hergestellt werden. Der insbesondere bevorzugte humanisierte Antikörper beinhaltet die variable Leichtketten-Domänen-Aminosäuresequenz der Seq.-ID Nr. 3.

[0139] Die vorliegende Anmeldung erwägt auch affinitätsgereifte Antikörper, die ErbB2 binden und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockieren. Der parentale Antikörper kann ein humaner Antikörper oder ein humanisierter Antikörper sein, z.B. einer, der die variablen leichten und/oder schweren Sequenzen der Seq.-ID Nr. 3 bzw. 4 umfasst (d.h. Variante 574). Der affinitätsgereifte Antikörper bindet bevorzugt an den ErbB2-Rezeptor mit einer Affinität, die jene von murinem 2C4 oder Variante 574 übertrifft (z.B. von ungefähr zwei- bis ungefähr fünffach, bis ungefähr 100fach oder ungefähr 1000fach verbesserter Affinität, wie z.B. bewertet mittels einem ErbB2-Extrazellulär-Domänen-(ECD-) ELISA). Beispielhafte variable schwere CDR-Reste für Substitution umfassen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 oder Kombinationen von zwei oder mehreren davon (z.B. zwei, drei, vier, fünf, sechs oder sieben dieser Reste). Beispiele von variablen leichten CDR-Resten für Veränderung umfassen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 oder Kombinationen von zwei oder mehreren davon (z.B. zwei, drei, vier, fünf, oder bis zu ungefähr zehn dieser Reste).

[0140] Verschiedene Formen des humanisierten oder affinitätsgereiften Antikörpers werden erwogen. Bei-

spielsweise kann der humanisierte Antikörper oder affinitätsgereifte Antikörper ein Antikörperfragment sein, wie z.B. Fab, das optional mit einem oder mehreren zytotoxischen Mittel konjugiert ist, um ein Immunkonjugat zu generieren. Alternativ dazu kann der humanisierte Antikörper oder affinitätsgereifte Antikörper ein intakter Antikörper sein, wie z.B. ein intakter IgG1-Antikörper.

(iv) Humane Antikörper

[0141] Als Alternative zur Humanisierung können humane Antikörper generiert werden. Beispielsweise ist es nun möglich, transgene Tiere (z.B. Mäuse) zu produzieren, die in der Lage sind, bei Immunisierung ein volles Repertoire humaner Antikörper in Abwesenheit von endogener Immunglobulin-Produktion zu produzieren. Beispielsweise ist beschrieben worden, dass die homozygote Deletion der Schwereketten-verbindenden Region (J_H) von Antikörpern in chimären und Keimbahn-Mutantenmäusen zur vollständigen Inhibierung endogener Antikörper-Produktion führt. Transfer der humanen Keimbahn-Immunglobulin-Genreihe in solche Keimbahn-Mutanten-Mäuse wird bei Antigen-Exposition zur Produktion von humanen Antikörpern führen. Siehe z.B. Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7, 33 (1993); und die US-Patente Nr. 5.591.669, 5.589.369 und 5.545.807.

[0142] Alternativ dazu kann Phagen-Display-Technologie (McCafferty et al., Nature 348, 552-553 (1990)) verwendet werden, um humane Antikörper und Antikörper-Fragmente aus dem Repertoire von Genen der variablen (V) Immunglobulin-Domänen nicht-immunisierter Spender in vitro herzustellen. Gemäß dieser Technik werden Antikörper-V-Domänen-Gene im Raster kloniert, und zwar entweder in ein bedeutendes oder in ein untergeordnetes Hüllprotein-Gen eines filamentösen Bakteriophagen, wie z.B. M13 oder fd, und zeigen sich als funktionelle Antikörper-Fragmente an der Oberfläche des Phagen-Partikels. Da das filamentöse Phagen-Partikel eine Einzelstrang-DNA-Kopie des Phagen-Genoms enthält, führen die auf den funktionellen Eigenschaften des Antikörpers basierenden Selektionen auch zur Selektion des Gens, das für den Antikörper kodiert, der diese Eigenschaften aufweist. Folglich ahmt der Phage einige der Eigenschaften der B-Zelle nach. Phagen-Display kann in verschiedensten Formaten durchgeführt werden; für einen Überblick siehe z.B. Kevin S. Johnson und David J. Chriswell, Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Mehrere Quellen von V-Gen-Segmenten können für Phagen-Display verwendet werden. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), isolierten mannigfaltige Reihen von Anti-Oxazolone-Antikörper aus einer kleinen Zufalls-kombinatorischen Bibliothek von V-Genen, hergeleitet von der Milz immunisierter Mäuse. Ein Repertoire von V-Genen kann aus nicht-immunisierten humanen Spendern konstruiert werden, und es können Antikörper gegen eine mannigfaltige Reihe von Antigenen isoliert werden, im Wesentlichen unter Befolgung der von Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), oder Griffith et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993), beschriebenen Techniken. Siehe auch die US-Patente Nr. 5.565.332 und 5.573.905.

[0143] Wie oben diskutiert können humane Antikörper auch durch in-vitro-aktivierte B-Zellen generiert werden (siehe die US-Patente Nr. 5.567.610 und 5.229.275).

[0144] Humane Anti-ErbB2-Antikörper werden beschrieben in US-Patent Nr. 5.772.997, erteilt am 30. Juni 1998, und in der WO97/00271, publiziert am 3. Jänner 1997.

(v) Antikörper-Fragmente

[0145] Verschiedenste Techniken sind zur Produktion von Antikörper-Fragmenten entwickelt worden. Traditionell sind diese Fragmente vom proteolytischen Verdau intakter Antikörper hergeleitet (siehe z.B. Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24, 107-117 (1992), und Brennan et al., Science 229, 81 (1985)). Diese Fragmente können jedoch heute direkt durch rekombinante Wirtszellen produziert werden. Beispielsweise können die Antikörper-Fragmente aus den oben diskutierten Phagen-Bibliotheken isoliert werden. Alternativ dazu können Fab'-SH-Fragmente direkt aus E. coli gewonnen und chemisch gekoppelt werden, um $F(ab')_2$ -Fragmente zu liefern (Carter et al., Bio/Technology 10, 163-167 (1992)). Gemäß einem anderen Ansatz können $F(ab')_2$ -Fragmente direkt aus rekombinanten Wirtszellenkulturen isoliert werden. Andere Techniken für die Produktion von Antikörper-Fragmenten werden dem fachkundigen Praktiker offensichtlich sein. In anderen Ausführungsformen ist der Antikörper der Wahl ein Einzelketten-Fv-Fragment (scFv). Siehe WO 93/16185; US-Patent Nr. 5.571.894 und US-Patent Nr. 5.587.458. Das Antikörper-Fragment kann auch ein "linearer Antikörper" sein, z.B. wie beispielsweise beschrieben in US-Patent Nr. 5,641,870. Solche lineare Antikörper können monospezifisch oder bispezifisch sein.

(vi) Bispezifische Antikörper

[0146] Bispezifische Antikörper sind Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Epitope besitzen. Exemplarische bispezifische Antikörper könnten an zwei verschiedene Epitope des ErbB2-Proteins binden. In anderen solcher Antikörper kann eine ErbB2-Bindungsstelle mit Bindungsstelle(n) für EGFR, ErbB3 und/oder ErbB4 kombiniert sein. Alternativ dazu kann ein Anti-ErbB2-Arm kombiniert sein mit einem Arm, der an ein auslösendes Molekül auf einem Leukozyten bindet, wie z.B. ein T-Zellen-Rezeptormolekül (z.B. CD2 oder CD3), oder Fc-Rezeptoren für IgG (FcγR), wie z.B. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), um die zellulären Abwehrmechanismen auf die ErbB2-exprimierende Zelle zu konzentrieren. Bispezifische Antikörper können auch verwendet werden, um zytotoxische Mittel gegen ErbB2-exprimierende Zellen zu lokalisieren. Diese Antikörper besitzen einen ErbB2-bindenden Arm und einen Arm, der ein zytotoxisches Mittel bindet (z.B. Saporin, Anti-Interferon-α, Vinca-Alkaloid, Ricin-A-Kette, Methotrexat oder Radioisotop-Hapten). Bispezifische Antikörper können als Vollängen-Antikörper oder Antikörper-Fragmente (z.B. bispezifischer F(ab')₂-Antikörper) produziert werden.

[0147] WO 96/16673 beschreibt einen bispezifischen Anti-ErbB2/Anti-FcγRIII-Antikörper, und US-Patent Nr. 5.837.234 offenbart einen bispezifischen Anti-ErbB2/Anti-FcγRI-Antikörper. Ein bispezifischer Anti-ErbB2/Fca-Antikörper wird in WO98/02463 gezeigt. US-Patent Nr. 5.821.337 unterrichtet von einem bispezifischen Anti-ErbB2/Anti-CD3-Antikörper.

[0148] Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind fachbekannt. Traditionelle Produktion von bispezifischen Vollängen-Antikörpern basiert auf die Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerketten/Leichtketten-Paaren, wobei die beiden Ketten verschiedene Spezifitäten besitzen (Millstein et al., Nature 305, 537-539 (1983)). Wegen der Zufallsverteilung von schweren und leichten Immunglobulin-Ketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) eine mögliche Mischung von 10 verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eine die korrekte bispezifische Struktur besitzt. Die Reinigung des korrekten Moleküls, die gewöhnlich mittels affinitätschromatographischen Schritten durchgeführt wird, ist eher beschwerlich, und die Produktausbeuten sind niedrig. Ähnliche Prozeduren werden offenbart in WO 93/08829 und in Traunecker et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991).

[0149] Gemäß einem anderen Ansatz werden variable Antikörper-Domänen mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Bindungsstellen) an Sequenzen der konstanten Immunglobulin-Domäne fusioniert. Die Fusionierung erfolgt bevorzugt mit einer konstanten Schwerketten-Immunglobulin-Domäne, die zumindest einen Teil der Hinge-, CH2- und CH3-Regionen beinhaltet. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerketten-Region (CH1), enthaltend die für Leichtketten-Bindung notwendige Stelle, in zumindest einer der Fusionen vorhanden ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerketten-Fusionen und, falls erwünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in getrennte Expressionsvektoren inseriert und in einen geeigneten Wirtsorganismus co-transfiziert. Dies führt zu hoher Flexibilität der Einstellung der wechselseitigen Anteile der drei Polypeptidfragmente in Ausführungsformen, wenn ungleiche Verhältnisse der drei zur Konstruktion verwendeten Polypeptidketten zu den optimalen Ausbeuten führen. Es ist jedoch möglich, die kodierenden Sequenzen für zwei oder alle Polypeptidketten in einem Expressionsvektor zu inserieren, wenn die Expression von zumindest zwei Polypeptidketten in gleichen Verhältnissen zu hohen Ausbeuten führt oder wenn die Verhältnisse von keiner besonderen Signifikanz sind.

[0150] In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Ansatzes sind die bispezifischen Antikörper aus einer Hybrid-Immunglobulin-Schwerkette mit einer ersten Bindungsspezifität in einem Arm und einem Hybrid-Immunglobulin-Schwerketten-Leichtketten-Paar (eine zweite Bindungsspezifität bereitstellend) im anderen Arm zusammengesetzt. Es wurde gefunden, dass diese asymmetrische Struktur die Trennung der gewünschten bispezifischen Verbindung von unerwünschten Immunglobulin-Kettenkombinationen erleichtert, da das Vorhandensein einer Immunglobulin-Leichtkette in nur der Hälfte der bispezifischen Moleküle eine einfache Möglichkeit zur Trennung bereitstellt. Dieser Ansatz ist in WO 94/04690 offenbart. Für weitere Details zur Generierung bispezifischer Antikörper siehe z.B. Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

[0151] Gemäß einem weiteren Ansatz, beschrieben im US-Patent Nr. 5.731.168, kann die Schnittstelle zwischen einem Paar von Antikörpermolekülen so konstruiert werden, dass der Prozentanteil von Heterodimeren, die aus rekombinanter Zellkultur gewonnen wird, maximiert wird. Die bevorzugte Schnittstelle beinhaltet zumindest einen Teil der C_H3-Domäne einer konstanten Antikörper-Domäne. In diesem Verfahren werden eine oder mehrere kleine Aminosäure-Seitenketten der Schnittstelle des ersten Antikörpers durch größere Seitenketten ersetzt (z.B. Tyrosin oder Tryptophan). Kompensierende "Zellen" mit einer den größeren Seitenkette(n) identischen oder ähnlichen Größe werden an der Schnittstelle des zweiten Antikörpers erzeugt, indem große

Aminosäure-Seitenketten durch kleinere (z.B. Alanin oder Threonin) ersetzt werden. Dies stellt einen Mechanismus zur Steigerung der Ausbeute von Heterodimer gegenüber anderen, unerwünschten Endprodukten, wie z.B. Homodimeren, bereit.

[0152] Bispezifische Antikörper umfassen vernetzte oder "Heterokonjugat"-Antikörper. Beispielsweise kann einer der Antikörper im Heterokonjugat an Avidin, der andere an Biotin gekoppelt werden. Solche Antikörper sind beispielsweise vorgeschlagen worden, um Immunsystem-Zellen auf ungewünschte Zellen zu zielen (US-Patent Nr. 4.676.980), und zur Behandlung von HIV-Infektion (WO 91/00360, WO 92/200373 und EP-A-03089). Heterokonjugat-Antikörper können mit jeglicher passenden Vernetzungsmethode hergestellt werden. Geeignete Vernetzer sind gut fachbekannt und in US-Patent Nr. 4.676.980, gemeinsam mit einer Anzahl von Vernetzungstechniken, offenbart.

[0153] Verfahren zur Generierung bispezifischer Antikörper aus Antikörper-Fragmenten sind in der Literatur ebenfalls beschrieben worden. Beispielsweise können bispezifische Antikörper mittels chemischer Verknüpfung hergestellt werden. Brennan et al., Science 229, 81 (1985), beschreiben eine Prozedur, worin intakte Antikörper proteolytisch gespalten werden, um $F(ab')_2$ -Fragmente zu generieren. Diese Fragmente werden in Gegenwart des Dithiol-komplexierenden Mittel Natriumarsenit reduziert, um benachbarte Dithiole zu stabilisieren und intramolekulare Disulfid-Bildung zu verhindern. Die generierten Fab' -Fragmente werden dann zu den Thionitrobenzoat(TNB-) Derivaten umgesetzt. Eines der Fab' -TNB-Fragmente wird dann mittels Reduktion mit Mercaptoethylamin zum Fab' -Thiol rückgebildet und mit einer äquimolaren Menge des anderen Fab' -TNB-Derivats vermischt, um den bispezifischen Antikörper zu erhalten. Die hergestellten bispezifischen Antikörper können als Mittel zur selektiven Immobilisierung von Enzymen verwendet werden.

[0154] Kürzliche Fortschritte haben die direkte Gewinnung von Fab' -SH-Fragmenten aus E. coli vereinfacht, die zur Bildung bispezifischer Antikörper chemisch gekoppelt werden können. Shylaby et al., J. Exp. Med. 175, 217-225 (1992), beschreiben die Produktion eines vollständig humanisierten, bispezifischen Antikörper- $F(ab')_2$ -Moleküls. Jedes Fab' -Fragment wurde getrennt aus E. coli sekretiert und gerichteter chemischer In-vitro-Kopplung unterworfen, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Der so gebildete bispezifische Antikörper war in der Lage, an ErbB2-Rezeptor-überexprimierende Zellen und normale Human-T-Zellen zu binden sowie die lytische Aktivität humaner, cytotoxischer Lymphozyten gegen humane Brusttumor-Targets auszulösen.

[0155] Verschiedene Techniken zur Herstellung und Isolierung bispezifischer Antikörper-Fragmente direkt aus rekombinanten Zellkulturen sind ebenfalls beschrieben worden. Beispielsweise sind bispezifische Antikörper mittels Verwendung von Leucin-Zippen hergestellt worden. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5), 1547-1553 (1992). Die Leucin-Zipper-Peptide von Fos- und Jun-Proteinen wurden mittels Genfusion an die Fab' -Teile von zwei verschiedenen Antikörpern gebunden. Die Antikörper-Homodimere wurden an der Hinge-Region reduziert, um Monomere zu bilden, und dann reoxidiert, um die Antikörper-Heterodimere zu bilden. Dieses Verfahren kann auch zur Produktion von Antikörper-Homodimeren genutzt werden. Die von Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1992), beschriebene "Diakörper"-Technologie lieferte einen alternativen Mechanismus zur Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente. Die Fragmente umfassen eine variable Schwereketten-Domäne (V_H), gebunden an eine variable Leichtketten-Domäne (V_L) über einen Linker, der zu kurz ist, um Paarung der beiden Domänen an derselben Kette zu erlauben. Demgemäß sind die V_H - und V_L -Domänen eines Fragments gezwungen, sich den komplementären V_L - und V_H -Domänen des anderen Fragments zu paaren und so zwei Antigen-bindende Stellen zu bilden. Eine weitere Strategie zur Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente mittels Einzelketten-Fv-(sFv-) Dimeren ist ebenfalls berichtet worden. Siehe Gruber et al., J. Immunol. 152, 5368 (1994).

[0156] Antikörper mit mehr als zwei Wertigkeiten werden erwogen. Beispielsweise können trispezifische Antikörper hergestellt werden. Tutt et al., J. Immunol. 147, 60 (1991).

(vii) Andere Aminosäuresequenz-Modifikationen

[0157] Aminosäuresequenz-Modifikation(en) des hierin beschriebenen Anti-ErbB2-Antikörpers wird/werden erwogen. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, die Bindungsaffinität und/oder andere biologische Eigenschaften des Antikörpers zu verbessern. Aminosäuresequenz-Varianten des Anti-ErbB2-Antikörpers werden durch Einführung geeigneter Nucleotid-Änderungen in die Nucleinsäure des Anti-ErbB2-Antikörpers oder durch Peptidsynthese hergestellt. Solche Modifikationen umfassen beispielsweise Deletionen aus und/oder Insertionen in und/oder Substitutionen von Resten innerhalb der Aminosäuresequenzen des Anti-ErbB2-Antikörpers. Jede Kombination von Deletion, Insertion und Substitution wird durchgeführt, um zum endgültigen Kon-

strukt zu gelangen, sofern das endgültige Konstrukt die gewünschten Charakteristika besitzt. Die Aminosäure-Änderungen kann auch den posttranslationalen Prozess des Anti-ErbB2-Antikörpers verändern, wie z.B. die Änderung der Anzahl oder Position von Glykosylierungsstellen.

[0158] Ein nützliches Verfahren zur Identifizierung gewisser Reste oder Regionen des Anti-ErbB2-Antikörpers, die bevorzugte Stellen für Mutagenese sind, wird "Alanin-Scanning-Mutagenese" genannt, wie beschrieben von Cunningham und Wells, Science 244, 1081-1085 (1989). Hier wird ein Rest oder eine Gruppe von Ziel-Resten identifiziert (z.B. geladene Reste wie z.B. arg, asp, his, lys und glu) und durch neutrale oder negativ geladene Aminosäuren (insbesondere bevorzugt Alanin und Polyalanin) ersetzt, um die Interaktion der Aminosäuren mit ErbB2-Antigen zu beeinflussen. Jene Aminosäure-Stellen, die funktionelle Sensibilität auf Substitutionen zeigen, werden dann durch Einführung weiterer oder anderer Varianten, an oder anstelle der Substitutionsstellen, verfeinert. Folglich muss die Natur der Mutation per se nicht vorbestimmt sein, während die Stelle für die Einführung einer Aminosäuresequenz-Variation vorbestimmt ist. Beispielsweise wird am Target-Codeon oder der Target-Region, um die Leistung einer Mutation an einer gegebenen Stelle zu analysieren, Ala-Scanning oder Zufallsmutagenese durchgeführt und die exprimierten Anti-ErbB2-Antikörper-Varianten auf die gewünschte Aktivität gescreent.

[0159] Aminosäuresequenz-Insertionen umfassen amino- und/oder carboxyterminale Fusionen im Längenbereich von einem Rest bis zu Polypeptiden mit hundert oder mehr Resten sowie Intrasequenz-Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäureresten. Beispiele terminaler Insertionen umfassen einen Anti-ErbB2-Antikörper mit einem N-terminalen Methionyl-Rest oder den mit einem zytotoxischen Polypeptid fusionierten Antikörper. Andere Insertions-Varianten des Anti-ErbB2-Antikörper-Moleküls umfassen die Fusion des N- oder C-Terminus des Anti-ErbB2-Antikörpers an ein Enzym (z.B. ADEPT) oder ein Polypeptid, das die Serum-Halbwertszeit des Antikörpers erhöht.

[0160] Ein anderer Variantentyp ist eine Aminosäuresubstitutions-Variante. Bei diesen Varianten ist zumindest ein Aminosäurerest im Anti-ErbB2-Antikörper-Molekül durch einen unterschiedlichen Rest ersetzt. Die Stellen von größtem Interesse für substitutionelle Mutagenese umfassen die hypervariablen Regionen, jedoch werden FR-Veränderungen auch erwogen. Konservative Substitutionen sind in Tabelle 1 unter der Überschrift "bevorzugte Substitutionen" gezeigt. Wenn solche Substitutionen zu einer Veränderung der biologischen Aktivität führen, können substantiellere Änderungen, in Tabelle 1 als "beispielhafte Substitutionen" bezeichnet, oder wie weiter unten in Bezug auf Aminosäureklassen beschrieben, eingeführt und die Produkte gescreent werden.

Tabelle 1

Ursprünglicher Rest	Beispielhafte Substitutionen	Bevorzugte Substitutionen
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; Norleucin	leu
Leu (L)	Norleucin; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; Norleucin	leu

[0161] Wesentliche Modifikationen der biologischen Eigenschaften des Antikörpers werden erzielt, indem Substitutionen ausgewählt werden, die sich signifikant unterscheiden, und zwar in ihrer Wirkung auf die Erhaltung (a) der Struktur des Polypeptid-Gerüsts im Bereich der Substitution, z.B. als Faltblatt- oder Helix-Konformation, (b) der Ladung oder Hydrophobie des Moleküls an der Zielstelle oder (c) des Hauptteils der Seitenkette. Natürlich auftretende Reste werden, basierend auf gemeinsame Eigenschaften der Seitenketten, in Gruppen unterteilt:

- (1) hydrophob: Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutral hydrophil: Cys, Ser, Thr;
- (3) sauer: Asp, Glu;
- (4) basisch: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) Kettenorientierung-beeinflussende Reste: Gly, Pro; und
- (6) aromatisch: Trp, Tyr, Phe.

[0162] Nicht-konservative Substitutionen erfordern den Austausch eines Mitglieds einer dieser Klassen gegen eine andere Klasse.

[0163] Jeglicher Cystein-Rest, der nicht an der Erhaltung der richtigen Konformation des Anti-ErbB2-Antikörpers beteiligt ist, kann ebenfalls substituiert werden, im Allgemeinen mit Serin, um die oxidative Stabilität des Moleküls zu verbessern und abweichende Vernetzung zu verhindern. Umgekehrt können/kann Cystein-Bindung(en) dem Antikörper hinzugefügt werden, um seine Stabilität zu verbessern (besonders wenn der Antikörper ein Antikörperfragment, wie z.B. ein Fv-Fragment, ist).

[0164] Eine besonders bevorzugter Typ von Substitutionsvarianten umfasst die Substitution von einem oder mehreren Resten der hypervariablen Region eines parentalen Antikörpers (z.B. ein humanisierter oder humaner Antikörper). Im Allgemeinen werden die resultierenden, für weitere Entwicklung selektierten Varianten im Vergleich mit dem parentalen Antikörper, aus dem sie generiert wurden, verbesserte biologische Eigenschaften aufweisen. Eine günstige Art und Weise für die Generierung solcher substitutioneller Varianten involviert Reifung mittels Phagen-Display. Kurz gefasst, werden mehrere Stellen der hypervariablen Region (z.B. 6-7 Stellen) mutiert, um alle möglichen Aminosubstitutionen an jeder Stelle zu erzeugen. Die so generierten Antikörper-Varianten werden in monovalenter Weise von filamentösen Phagenpartikeln präsentiert, und zwar als

Fusionen an das Gen-III-Produkt von M13, eingeschlossen innerhalb eines jeden Partikels. Die Phagen-Display-Varianten werden dann, wie hierin offenbart, auf ihre biologische Aktivität (z.B. Bindungsaffinität) gescreent. Um die Kandidaten der Stellen hypervariabler Regionen für die Modifizierung zu identifizieren, kann Alanin-Scanning-Mutagenese durchgeführt werden, um Reste hypervariabler Regionen zu identifizieren, die signifikant zur Antigenbindung beitragen. Alternativ oder zusätzlich dazu kann es von Vorteil sein, die Kristallstruktur des Antigen-Antikörper-Komplexes zu analysieren, um die Kontaktpunkte zwischen dem Antikörper und humanem ErbB2 zu identifizieren. Solche Kontaktreste und benachbarte Reste sind Kandidaten zur Substitution gemäß der hierin ausgearbeiteten Techniken. Wenn solche Varianten einmal erzeugt sind, wird die Reihe von Varianten, wie hierin beschrieben, einem Screening unterworfen, und Antikörper mit überlegenen Eigenschaften in einem oder mehreren der Tests können für die weitere Entwicklung selektiert werden.

[0165] Ein weiterer Typus der Aminosäure-Variante des Antikörpers verändert das ursprüngliche Glykosylierungsmuster des Antikörpers. Mit Veränderung ist gemeint, dass eine oder mehrere im Antikörper gefundenen Kohlenhydrat-Bestandteile deletiert werden oder dass eine oder mehrere Glykosylierungsstellen, die im Antikörper nicht vorhanden sind, hinzugefügt werden.

[0166] Glykosylierung in Antikörpern ist typischerweise entweder N-verknüpft oder O-verknüpft. N-verknüpft betrifft die Anbindung des Kohlenhydrat-Bestandteils an die Seitenkette eines Asparaginrests. Die Tripeptidsequenzen Asparagin-X-Serin und Asparagin-X-Threonin, worin X jegliche Aminosäure außer Prolin ist, sind die Erkennungssequenzen für die enzymatische Anbindung des Kohlenhydrat-Bestandteils an die Asparagin-Seitenkette. Folglich erzeugt die Anwesenheit irgendeiner dieser Tripeptid-Sequenzen in einem Polypeptid eine potentielle Glykosylierungsstelle. Overknüpfte Glykosylierung betrifft die Anbindung einer der Zucker N-Acetylgalactosamin, Galactose oder Xylose an eine Hydroxyaminosäure, am häufigsten Serin oder Threonin, obwohl 5-Hydroxyprolin und 5-Hydroxylysin auch verwendet werden können.

[0167] Die Anfügung von Glykosylierungsstellen an den Antikörper wird bequem erzielt, indem die Aminosäuresequenz so verändert wird, dass sie eine oder mehrere der oben beschriebenen Tripeptidsequenzen (für N-verknüpfte Glykosylierungsstellen) enthält. Die Veränderung kann auch mittels Addition von, oder Substitution durch, einem oder mehreren Serin- oder Threonin-Resten an die Sequenz des ursprünglichen Antikörpers (für O-verknüpfte Glykosylierungsstellen) herbeigeführt werden.

[0168] Nucleinsäuremoleküle, die für Aminosäure-Varianten des Anti-ErbB2-Antikörpers kodieren, werden mittels einer Vielzahl fachbekannter Verfahren hergestellt. Diese Verfahren umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, die Isolierung aus einer natürlichen Quelle (im Falle von natürlich auftretenden Aminosäuresequenz-Varianten) oder die Herstellung mittels Oligonucleotid-vermittelter (oder ortsspezifischer) Mutagenese, PCR-Mutagenese und Kassetten-Mutagenese einer vorher hergestellten Varianten- oder Nicht-Varianten-Version des Anti-ErbB2-Antikörpers.

[0169] Es kann wünschenswert sein, den Antikörper der Erfindung bezüglich der Effektorfunktion zu modifizieren, z.B. um die Antigen-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und/oder die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) des Antikörpers zu steigern. Die kann erreicht werden, indem eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen in die Fc-Region des Antikörpers eingeführt werden. Alternativ oder zusätzlich dazu können Cystein-Rest(e) in die Fc-Region eingeführt werden, um so die Bildung von Interketten-Disulfidbindung in dieser Region zu ermöglichen. Der so erzeugte homodimere Antikörper könnte verbesserte Internalisierungsfähigkeit und/oder erhöhte Komplement-vermittelte Zellabtötung und Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) besitzen. Siehe Caron et al., J. Exp. Med. 176, 1191-1195 (1992); und B. Shopes, J. Immunol. 148, 2918-2922 (1992). Homodimere Antikörper mit verstärkter Anti-Tumor-Aktivität können auch hergestellt werden, indem heterobifunktionelle Vernetzer verwendet werden, wie beschrieben von Wolff et al., Cancer Research 53, 2560-2565 (1993). Alternativ dazu kann ein Antikörper konstruiert werden, der duale Fc-Regionen besitzt und so verstärkte Komplement-Lyse- und ADCC-Fähigkeiten aufweist. Siehe Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3, 219-230 (1989).

[0170] Um die Serum-Halbwertszeit des Antikörpers zu steigern, kann man ein Salvage-Rezeptor-bindendes Epitop in den Antikörper (besonders in ein Antikörperfragment) einbauen, wie beispielsweise beschrieben im US-Patent Nr. 5,739,277. Wie hierin verwendet betrifft der Ausdruck "Salvage-Rezeptor-bindendes Epitop" ein Epitop der Fc-Region eines IgG-Moleküls (z.B. IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄), das für die Erhöhung der In-vivo-Halbwertszeit des IgG-Moleküls im Serum verantwortlich ist.

(viii) Screening auf Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften

[0171] Techniken zur Erzeugung von Antikörpern sind oben beschrieben worden. Man kann Antikörper mit bestimmten biologischen Charakteristika wie gewünscht weiter selektieren.

[0172] Um einen Antikörper zu identifizieren, der Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, kann die Fähigkeit des Antikörpers, die Bindung des ErbB-Liganden an ErbB-Rezeptor-exprimierende Zellen zu blockieren (z.B. bei Konjugation mit einem anderen ErbB-Rezeptor, mit dem der ErbB-Rezeptor von Interesse ein ErbB-Hetero-Oligomer bildet), bestimmt werden. Beispielsweise können Zellen, die ErbB-Rezeptoren des ErbB-Hetero-Oligomers natürlich exprimieren oder nach Transfektion exprimieren, mit dem Antikörper inkubiert und dann markiertem ErbB-Liganden ausgesetzt werden. Die Fähigkeit des Anti-ErbB2-Antikörpers, die Liganden-Bindung an den ErbB-Rezeptor im ErbB-Hetero-Oligomer zu blockieren, kann dann bewertet werden.

[0173] Beispielsweise kann die Inhibierung der HRG-Bindung an MCF7-Brusttumor-Zelllinien mittels Anti-ErbB2-Antikörper durchgeführt werden, indem Monolayer-MCF7-Kulturen auf Eis im 24-Napf-Platten-Format verwendet werden, wie im Wesentlichen unten in Beispiel 1 beschrieben wird. Monoklonale Anti-ErbB2-Antikörper können zu jedem Napf zugesetzt und 30 Minuten lang inkubiert werden. ¹²⁵I-markiertes rHRGβ1₁₇₇₋₂₂₄ (25 pm) kann dann zugesetzt und die Inkubation 4 bis 16 Stundenlang fortgesetzt werden. Dosis-Antwort-Kurven können erstellt und ein IC₅₀-Wert für den Antikörper von Interesse berechnet werden. In einer Ausführungsform wird der Antikörper, der Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, für die Inhibierung von HRG-Bindung an MCF7-Zellen in diesem Test einen IC₅₀ von ungefähr 50 nM oder weniger, stärker bevorzugt 10 nM oder weniger, aufweisen. Wenn der Antikörper ein Antikörperfragment ist, wie z.B. ein Fab-Fragment, kann der IC₅₀ für die Inhibierung von HRG-Bindung an MCF7-Zellen in diesem Test z.B. ungefähr 100 nM oder weniger, stärker bevorzugt 50 nM oder weniger, sein.

[0174] Alternativ oder zusätzlich dazu kann die Fähigkeit des Anti-ErbB2-Antikörpers, die ErbB-Liganden-stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung eines im ErbB-Hetero-Oligomer vorhandenen ErbB-Rezeptors zu blockieren, bestimmt werden. Beispielsweise können Zellen, die ErbB-Rezeptoren endogen exprimieren oder nach Transfektion exprimieren, mit dem Antikörper inkubiert und dann auf ErbB-Liganden-abhängige Tyrosin-Phosphorylierungs-Aktivität, unter Verwendung eines monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (der optional mit einem detektierbaren Marker konjugiert ist), getestet werden. Der Kinase-Rezeptor-Aktivierungstest, beschrieben in U.S. Patent Nr. 5,766,863, ist auch verfügbar für die Bestimmung von ErbB-Rezeptor-Aktivierung und Blockierung dieser Aktivität durch einen Antikörper.

[0175] In einer Ausführungsform kann man auf einen Antikörper screenen, der die HRG-Stimulation von p180-Tyrosin-Phosphorylierung in MCF7-Zellen inhibiert, und ist im Wesentlichen unten in Beispiel 1 beschrieben. Beispielsweise können die MCF7-Zellen in 24-Napf-Platten ausplattiert werden, und monoklonale Antikörper gegen ErbB2 können jedem Napf zugesetzt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert werden; dann kann rHRGβ1₁₇₇₋₂₂₄ jedem Napf in einer Endkonzentration von 0,2 nM zugesetzt und die Inkubation für weitere 8 Minuten fortgesetzt werden. Das Medium kann aus jedem Napf abgesaugt werden, und die Reaktion kann durch Zusatz von 100 µl SDS-Probenpuffer (5% SDS, 25 mM DTT und 25 mM Tris-HCl, pH 6,8) gestoppt werden. Jede Probe (25 µl) kann in einem 4–12%igen Gradientengel (Novex) elektrophoretisch getrennt und dann elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert werden. Antiphosphotyrosin-(1 µg/ml) Immunblots können entwickelt und die Intensität der reaktiven Hauptbande bei MW ~ 180.000 reflexionsdensitometrisch quantifiziert werden. Der selektierte Antikörper wird in diesem Test die HRG-Stimulation der p180-Tyrosin-Phosphorylierung bevorzugt signifikant zu etwa 0-35% der Kontrolle inhibieren. Eine Dosis-Antwort-Kurve für die Inhibierung der HRG-Stimulation der p180-Tyrosin-Phosphorylierung, wie bestimmt mittels Reflexionsdensitometrie, kann angefertigt und ein IC₅₀ für den Antikörper von Interesse berechnet werden. In einer Ausführungsform wird der Antikörper, der Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, für die Inhibierung der HRG-Stimulation der p180-Tyrosin-Phosphorylierung in diesem Test einen IC₅₀ von ungefähr 50 nM oder weniger, stärker bevorzugt 10 nM oder weniger, aufweisen. Wenn der Antikörper ein Antikörperfragment ist, wie z.B. ein Fab-Fragment, kann der IC₅₀ für die Inhibierung von HRG-Stimulation der p180-Tyrosin-Phosphorylierung in diesem Test z.B. ungefähr 100 nM oder weniger, stärker bevorzugt 50 nM oder weniger, sein.

[0176] Man kann auch die wachstumshemmenden Effekte des Antikörpers auf MDA-MB-175-Zellen bestimmen, im Wesentlichen wie beschrieben von Schaefer et al., *Oncogene* 15, 1385-1394 (1997). Gemäß diesem Test können MDA-MB-175-Zellen mit einem monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper (10 µg/ml) 4 Tage lang behandelt und mit Kristallviolett gefärbt werden. Inkubation mit einem Anti-ErbB2-Antikörper könnte einen wachs-

tumshemmenden Effekt auf diese Zelllinie zeigen, ähnlich wie er vom monoklonalen Antikörper C24 gezeigt wird. In einer weiteren Anusführungsform wird exogenes HRG diese Inhibierung nicht signifikant umkehren. Bevorzugt wird der Antikörper auch die Zellproliferation von MDA-MB-175-Zellen in einem größeren Ausmaß inhibieren als der monoklonale Antikörper 4D5 (und optional in einem größeren Ausmaß als monoklonaler Antikörper 7F3), und zwar sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von exogenem HRG.

[0177] In einer Ausführungsform kann der Anti-ErbB2-Antikörper von Interesse die Heregulin-abhängige Assoziierung von ErbB2 mit ErbB3 sowohl in MCF7- als auch in SK-BR-3-Zellen blockieren, wie bestimmt in einem Co-Immunpräzipitations-Experiment, wie z.B. dem in Beispiel 2 beschrieben, und zwar effektiver als monoklonaler Antikörper 4D5 und bevorzugt wesentlich effektiver als monoklonaler Antikörper 7F3.

[0178] Alternativ oder zusätzlich dazu kann die Fähigkeit des Antikörpers bestimmt werden, EGF-, TGF- α - und/oder HRG-vermittelte Aktivierung von mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) zu blockieren, z.B. wie im nachstehenden Beispiel 4 gezeigt. Ein Antikörper, der EGF-, TGF- α - und/oder HRG-vermittelte Aktivierung von mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) stärker blockiert als HERCEPTIN® oder ein monoklonaler Antikörper 4D5, kann selektiert werden. Außerdem kann der Antikörper von Interesse EGF-, TGF- α - und/oder HRG-vermittelte Aktivierung von mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) stärker blockieren als ein monoklonaler Antikörper 7F3.

[0179] Um wachstumshemmende Anti-ErbB2-Antikörper zu identifizieren, kann man auf Antikörper screenen, die das Wachstum von Krebszellen, die ErbB2 exprimieren, inhibieren. In einer Ausführungsform ist der Antikörper der Wahl fähig, das Wachstum von SK-BR-3-Zellen in Zellkultur zu ungefähr 20–100% und bevorzugt zu 50–100% bei einer Antikörper-Konzentration von ungefähr 0,5 bis 30 $\mu\text{g/ml}$ zu inhibieren. Um solche Antikörper zu identifizieren, kann der im US-Patent Nr. 5.677.171 beschriebene SK-BR-3-Test durchgeführt werden. Gemäß diesem Test werden SK-BR-3-Zellen in einer 1:1-Mischung von F12- und DMEM-Medium, ergänzt mit 10% fetalem Rinderserum, Glutamin und Penicillin-Streptomycin, gezüchtet. 20.000 SK-BR-3-Zellen werden in eine 35-mm-Zellkulturplatte (2 ml/35-mm-Platte) ausplattiert. 0,5 bis 30 μg des Anti-ErbB2-Antikörpers werden pro Platte zugesetzt. Nach sechs Tagen wird die Anzahl von Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit einem elektronischen COULTER™-Zellzähler gezählt. Jene Antikörper, die das Wachstum der SK-BR-3-Zellen zu ungefähr 20–100% oder zu 50–100% inhibieren, können als wachstumshemmende Antikörper selektiert werden.

[0180] Zur Selektion von Antikörpern, die Zelltod, Verlust vom Membranintegrität, wie z.B. angezeigt durch PI, induzieren, kann Trypanblau- oder 7AAD-Aufnahme relativ zur Kontrolle bestimmt werden. Der bevorzugte Test ist der PI-Aufnahme-Test unter Verwendung von BT474-Zellen. Gemäß diesem Test werden BT474-Zellen (die von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) beziehbar sind) in Dubelco's Modified Eagle Medium (D-MEM); Ham's F12 (50:50), ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FBS (Hyclone) und 2 mM L-Glutamin, kultiviert. (Folglich wird dieser Test in Abwesenheit von Komplement und Immuneffektor-Zellen durchgeführt.) Die BT474-Zellen werden in einer Dichte von 3×10^6 pro Platte in 100×20 mm Platten inokuliert und über Nacht anhaften gelassen. Das Medium wird dann entfernt und durch frisches Medium alleine oder Medium, das 10 $\mu\text{g/ml}$ des geeigneten monoklonalen Antikörpers enthält, ersetzt. Die Zellen werden für eine Zeitspanne von drei Tagen inkubiert. Nach jeder Behandlung werden die Monolayers mit PBS gewaschen und mittels Trypsinbehandlung abgelöst. Die Zellen werden bei 1200 U/min für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 3 ml eiskaltem Ca^{2+} -bindendem Puffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) resuspendiert und zur Entfernung von Zellklumpen in 35 mm, filterbedeckten 12-x-75-mm-Röhrchen aliquotiert (1 ml pro Röhrchen, 3 Röhrchen pro Behandlungsgruppe). Die Röhrchen erhalten dann PI (10 $\mu\text{g/ml}$). Die Proben können mittels FACSCAN™-Durchflussszytometer und FACCONVERT™-CellQuest-Software (Becton Dickinson) analysiert werden. Jene Antikörper, die statistisch signifikante Levels von Zelltod, wie bestimmt mittels PI-Aufnahme, induzieren, können als Zelltod-induzierende Antikörper selektiert werden.

[0181] Zur Selektion von Antikörpern, die Apoptose induzieren, ist ein Annexin-Bindungstest unter Verwendung von BT474-Zellen erhältlich. Die BT474-Zellen werden kultiviert und, wie im vorangegangenen Absatz diskutiert, in Platten inokuliert. Das Medium wird dann entfernt und durch frisches Medium alleine oder Medium, das 10 $\mu\text{g/ml}$ des monoklonalen Antikörpers enthält, ersetzt. Nach einer dreitägigen Inkubationsperiode werden die Monolayers mit PBS gewaschen und durch Trypsinbehandlung abgelöst. Die Zellen werden dann zentrifugiert, in Ca^{2+} -bindendem Puffer resuspendiert und wie oben diskutiert für den Zelltod-Test in Röhrchen aliquotiert. Die Röhrchen erhalten dann markiertes Annexin (z.B. Annexin-V-FITC). Die Proben können mittels FACSCAN™-Durchflussszytometer und FACCONVERT™-CellQuest-Software (Becton Dickinson) analysiert werden. Jene Antikörper, die im Vergleich zu Kontrollen statistisch signifikante Levels von Annexin-Bindung induzieren, können als Apoptose-induzierende Antikörper selektiert werden.

[0182] Zusätzlich zum Annexin-Bindungstest ist ein DNA-Färbetest unter Verwendung von BT474-Zellen verfügbar. Um diesen Test auszuführen, werden BT474-Zellen, die mit den in den vorangegangenen zwei Absätzen beschriebenen Antikörpern von Interesse behandelt worden sind, mit 9 µg/ml HOECHST 33342TM 2 Stunden lang bei 37 °C inkubiert und dann in einem EPICS-ELITETM-Durchflusszytometer (Coulter Corporation) mittels MODFIT-LTTM-Software (Verity Software House) analysiert. Antikörper, die eine Änderung des Prozentanteils apoptotischer Zellen induzieren, die 2-mal oder mehr (und bevorzugt 3-mal oder mehr) ist als die von unbehandelten Zellen (bis zu 100% apoptotische Zellen), können als pro-apoptotische Antikörper unter Verwendung dieses Tests selektiert werden.

[0183] Um auf Antikörper zu screenen, die an ein Epitop von ErbB2, das an einen Antikörper von Interesse gebundenen ist, binden, kann eine Routine-Cross-Blocking-Test, wie er z.B. in "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow und David Lane (1988), beschrieben ist, durchgeführt werden. Alternativ oder zusätzlich dazu kann Epitop-Kartierung mittels fachbekannten Methoden (siehe z.B. die [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) hierin) durchgeführt werden.

(ix) Immunkonjugate

[0184] Die Erfindung betrifft auch eine Therapie mit Immunkonjugaten, umfassend einen Antikörper, der an ein zytotoxisches Mittel, wie z.B. ein therapeutisches Mittel, Toxin (z.B. ein kleinmolekulares Toxin oder ein enzymatisch aktives Toxin bakterieller, pilzlicher oder tierischer Herkunft, einschließlich deren Fragmente und/oder Varianten) oder ein radioaktives Isotop (z.B. ein Radiokonjugat) konjugiert ist.

[0185] Zur Erzeugung solcher Immunkonjugate zweckdienliche chemotherapeutische Mittel sind oben beschrieben worden.

[0186] Konjugate eines Antikörpers mit einem oder mehreren kleinmolekularen Toxinen, wie z.B. ein Calicheamicin, ein Maytansin (US-Patent Nr. 5.208.020), ein Trichothin und CC1065, werden hierin auch ins Auge gefasst.

[0187] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Antikörper an ein oder mehrere Maytansin-Moleküle konjugiert (z.B. ungefähr 1 bis ungefähr 10 Maytansin-Moleküle pro Antikörper-Molekül). Maytansin kann beispielsweise zu May-SS-Me umgesetzt werden, das zu May-SH3 reduziert und mit modifiziertem Antikörper umgesetzt werden kann (Chari et al., Cancer Research 52, 127-131 (1992)), um ein Maytansin-Antikörper-Immunkonjugat zu erzeugen.

[0188] Ein weiteres Immunkonjugat von Interesse umfasst einen Anti-ErbB2-Antikörper, der an ein oder mehrere Calicheamicin-Moleküle konjugiert ist. Die Calicheamicin-Familie von Antikörpern ist in der Lage, bei sub-picomolaren Konzentrationen Doppelstrang-DNA-Brüche zu produzieren. Struktur-Analoga von Calicheamicin, die verwendet werden können, umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-Acetyl- γ_1^I , PSAG und θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53, 3336-3342 (1993); und Lode et al., Cancer Research 58, 2925-2928 (1998)).

[0189] Enzymatisch aktive Toxine und deren Fragmente, die verwendet werden können, umfassen Diphtherie-A-Kette, nicht-bindende aktive Fragmente von Diphtherie-Toxin, Exotoxin-A-Kette (von Pseudomonas aeruginosa), Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette, Alpha-Sarcin, Aleurites-fordii-Proteine, Dianthin-Proteine, Phytolacca-america-Proteine (PAPI, PAPII und PAP-S), Mormordica-charantina-Inhibitor, Curcin, Crocin, Sapaonaria-officinalis-Inhibitor, Gelonin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Tricothecene. Siehe z.B. WO 93/21232, publiziert am 28. Oktober 1993.

[0190] Die vorliegende Erfindung erwägt weiters ein Immunkonjugat, das zwischen einem Antikörper und einer Verbindung mit nucleolytischer Aktivität (z.B. eine Ribonuclease oder eine DNA-Endonuclease wie z.B. Desoxyribonuclease; DNase) gebildet wird.

[0191] Eine Reihe von radioaktiven Isotopen sind für die Produktion von radiokonjugierten Anti-ErbB2-Antikörpern verfügbar. Beispiele umfassen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} und radioaktive Lu-Isotope.

[0192] Konjugate des Antikörpers mit zytotoxischem Mittel können unter Verwendung einer Vielzahl von bifunktionellen Protein-Kopplungs-Mitteln hergestellt werden, wie z.B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP), Succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, Iminothiolan (IT), bifunktionelle

Derivate von Imidoestern (wie z.B. Dimethyadipimidat-HCl), aktive Ester (wie z.B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyde (wie z.B. Glutaraldehyd), Bisazido-Verbindungen (wie z.B. Bis-(pazidobenzoyl)hexandiamin), Bisdiazonium-Derivate (wie z.B. Bis-(p-diazoniumbenzoyl)ethylendiamin), Diisocyanate (wie z.B. Tolyen-2,6-diisocyanat) und bis-aktive Fluorverbindungen (wie z.B. 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol). Beispielsweise kann ein Ricin-Immuntoxin wie in Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987), beschrieben hergestellt werden. Kohlenstoff-14-markierte 1-Isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylentriaminpentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein exemplarischer Chelatbildner für die Konjugation von Radionucleotid an den Antikörper. Siehe WO 94/11026. Der Linker kann ein "abspaltbarer Linker" sein, um die Freisetzung des zytotoxischen Medikaments in der Zelle zu erleichtern. Beispielsweise kann ein säurelabiler Linker, Peptidasesensitiver Linker, Dimethyl-Linker oder Disulfid-enthaltender Linker (Chari et al., Cancer Research 52, 127-131 (1992)) verwendet werden.

[0193] Alternativ dazu kann ein Fusionsprotein, umfassend den Anti-ErbB2-Antikörper und zytotoxisches Mittel, hergestellt werden, z.B. mittels Rekombinationsverfahren oder Peptidsynthese.

[0194] In noch einer weiteren Ausführungsform kann der Antikörper zur Verwendung in Tumor-Vor-Targeting an einen "Rezeptor" (wie z.B. Streptavidin) konjugiert werden, worin das Antikörper-Rezeptor-Konjugat an den Patienten verabreicht wird, gefolgt von der Entfernung nichtgebundenen Konjugats aus dem Kreislauf mittels eines Clearing-Mittels und nachfolgender Verabreichung eines "Liganden" (z.B. Avidin), der an ein zytotoxisches Mittel (z.B. ein Radionucleotid) konjugiert ist.

(x) Antikörper-abhängige, Enzym-vermittelte Prodrug-Therapie (ADEPT)

[0195] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch für ADEPT verwendet werden, indem der Antikörper an ein Prodrug-aktivierendes Enzym konjugiert wird, das ein Prodrug (z.B. ein Peptidyl-Chemotherapeutikum, siehe WO 81/01145) zu einem aktiven Anti-Krebs-Medikament umsetzt. Siehe beispielsweise WO 88/07378 und US-Patent Nr. 4.975.278.

[0196] Die Enzymkomponente in dem für ADEPT zweckmäßigen Immunkonjugat umfasst jegliches Enzym, das fähig ist, auf das Prodrug zu wirken und es so zu der aktiveren, zytotoxischen Form umzusetzen.

[0197] Für das Verfahren dieser Erfindung zweckdienliche Enzyme umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, alkalische Phosphatase, die für die Umsetzung Phosphatenthaltender Prodrugs zu freien Medikamenten zweckdienlich ist; Arylsulfatase, die für die Umsetzung Sulfat-enthaltender Prodrugs zu freien Medikamenten zweckdienlich ist; Cytosin-Deaminase, die für die Umsetzung von nicht-toxischem 5-Fluorcytosin zum Anti-Krebs-Medikament 5-Fluoruracil zweckdienlich ist; Proteasen wie z.B. Serratia-Protease, Thermolysin, Subtilisin, Carboxypeptidasen und Cathepsine (wie z.B. Capthesine B und L), die für die Umsetzung Peptid-enthaltender Prodrugs zu freien Medikamenten zweckdienlich sind; D-Alanylcarboxypeptidasen, die für die Umsetzung von Prodrugs, die D-Aminosäure-Substituenten enthalten, zweckdienlich sind; Kohlenhydrat-spaltende Enzyme, wie z.B. β -Galactosidase und Neuraminidase, die für die Umsetzung glykosylierter Prodrugs zu freien Medikamenten zweckdienlich sind; β -Lactamase, die für die Umsetzung β -Lactam-derivatisierter Medikamente zu freien Medikamenten zweckdienlich ist; und Penicillinamidasen, wie z.B. Penicillin-V-Amidase oder Penicillin-G-Amidase, die für die Umsetzung von Medikamenten, die an ihren Amin-Stickstoffen mit Phenoxycetyl- bzw. Phenylacetyl-Gruppen derivatisiert sind, zu den freien Medikamente zweckdienlich sind. Alternativ dazu können Antikörper mit enzymatischer Aktivität, auch als "Abzyme" fachbekannt, verwendet werden, um die Prodrugs der Erfindung zu freien, aktiven Medikamenten umzusetzen (siehe z.B. Massey, Nature 328, 457-458 (1987)). Antikörper-Abzym-Konjugate können wie hierin beschrieben für die Zufuhr des Abzyms zu einer Tumorzellen-Population hergestellt werden.

[0198] Die Enzyme dieser Erfindung können kovalent an die Anti-ErbB2-Antikörper gebunden werden, und zwar durch gut fachbekannte Techniken, wie z.B. die Verwendung der oben diskutierten, heterobifunktionellen Vernetzungsreagenzien. Alternativ dazu können Fusionsproteine, die zumindest die Antigen-bindende Region eines Antikörpers der Erfindung, gebunden an zumindest einen funktionell aktiven Teil eines Enzyms der Erfindung, umfassen, unter Verwendung gut fachbekannter DNA-Rekombinationsverfahren konstruiert werden (siehe z.B. Neuberger et al., Nature 312, 604-608 (1984)).

(xi) Andere Antikörper-Modifikationen

[0199] Andere Modifikationen des Antikörpers werden hierin erwogen. Beispielsweise kann der Antikörper an eines von vielen nicht-proteinartigen Polymeren gebunden werden, z.B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyoxalkylene oder Co-Polymere von Polyethylenglykol und Polypropylenglykol. Der Antikörper kann auch

in Mikrokapseln eingeschlossen werden, z.B. mittels Coazervations-Techniken und Grenzflächen-Polymerisation (zum Beispiel Hydroxymethylcellulose oder Gelatine-Mikrokapseln bzw. Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln), und zwar in kolloidalen Medikament-Zufuhrsystemen (zum Beispiel Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nano-Partikel und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen. Solche Techniken sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16. Auflage, A. Oslo (Hrsg.) (1980), offenbart.

[0200] Die hierin offenbarten Anti-ErbB2-Antikörper können auch in Immunliposomen formuliert sein. Antikörper enthaltende Liposomen werden nach fachbekannten Verfahren hergestellt, wie z.B. beschrieben in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030 (1980); US-Patente Nr. 4.485.045 und 4.544.545; und WO 97/38731, publiziert am 23. Oktober 1997. Liposomen mit erhöhter Zirkulationszeit sind in US-Patent Nr. 5.013.556 offenbart.

[0201] Insbesondere zweckdienliche Liposomen können mittels Umkehrphasen-Verdampfungs-Verfahren erzeugt werden, und zwar mit einer Lipid-Zusammensetzung, die Phosphatidylcholin, Cholesterin und PEG-derivatisierte Phosphatidylethanolamine (PEG-PE) umfasst. Die Liposomen werden durch Filter definierter Porengröße extrudiert, um Liposomen mit gewünschtem Durchmesser zu erhalten. Fab'-Fragmente des Antikörpers der vorliegenden Erfindung können über eine Disulfid-Austauschreaktion, wie von Martin et al., J. Biol. Chem. 257, 286-288 (1982), beschrieben, an die Liposomen konjugiert werden. Innerhalb des Liposoms befindet sich optional ein Chemotherapeutikum. Siehe Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19), 1484 (1989).

III. Pharmazeutische Formulierungen

[0202] Therapeutische Formulierungen der gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper werden für die Lagerung hergestellt, indem ein Antikörper mit dem gewünschten Reinheitsgrad mit optionalen pharmazeutisch vertretbaren Trägern, Füllstoffen oder Stabilisatoren ("Remington's Pharmaceutical Sciences", 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980)) in Form von lyophilisierten Formulierungen oder wässrigen Lösungen gemischt werden. Vertretbare Träger, Füllstoffe oder Stabilisatoren sind für den Empfänger bei den angewendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch und umfassen Puffer, wie z.B. Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidantien, einschließlich Ascorbinsäure und Methionin; Konservierungsmittel (wie z.B. Octadecyldimethylbenzylammoniumchlorid; Hexamethoniumchlorid; Benzalkoniumchlorid; Benzethoniumchlorid; Phenol, Butyl- oder Benzylalkohol; Alkylparabene, wie z.B. Methyl- oder Propylparaben; Brenzcatechin; Resorcin; Cyclohexanol; 3-Pentanol und m-Kresol); niedermolekulare (weniger als 10 Reste) Polypeptide; Proteine, wie z.B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere, wie z.B. Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren, wie z.B. Glycin, Glutamin, Asparagin, Histidin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner, wie z.B. EDTA; Zucker, wie z.B. Saccharose, Mannit, Trehalose und Sorbit; salzbildende Gegenionen, wie z.B. Natrium; Metallkomplexe (z.B. Zn-Protein-Komplexe) und/oder nichtionische Tenside, wie z.B. TWEENTM, PLURONICSTM oder Polyethylenglykol (PEG). Bevorzugte Anti-ErbB2-Antikörper-Formulierungen werden in der WO 97/04801 beschrieben und sind hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen.

[0203] Die Formulierungen hierin können für die einzelnen zu behandelnden Indikationen auch mehr als eine aktive Verbindung enthalten, vorzugsweise jene mit komplementären Aktivitäten, die sich nicht gegenseitig negativ beeinflussen. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, weitere Antikörper, die an EGFR, ErbB2 (z.B. ein Antikörper, der ein anderes Epitop von ErbB2 bindet), ErbB3, ErbB4 oder Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) binden, in dieser einen Formulierung vorzusehen. Alternativ oder zusätzlich dazu kann die Zusammensetzung weiters ein Chemotherapeutikum, ein zytotoxisches Mittel, Cytokin, einen Wachstumshemmer, ein antihormonelles Mittel und/oder einen Kardioprotektor enthalten. Solche Moleküle sind in geeigneter Weise in Kombination vorhanden und in Mengen, die für den beabsichtigten Zweck effektiv sind.

[0204] Die aktiven Bestandteile können auch in hergestellte Mikrokapseln eingeschlossen sein, z.B. mittels Coazervations-Techniken und Grenzflächen-Polymerisation, zum Beispiel Hydroxymethylcellulose oder Gelatine-Mikrokapseln bzw. Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, und zwar in kolloidalen Medikament-Zufuhrsystemen (zum Beispiel Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nano-Partikel und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen. Solche Techniken sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980), offenbart.

[0205] Retard-Präparate können hergestellt werden. Geeignete Beispiele für Retard-Präparate umfassen semipermeable Matrices von festen, hydrophoben, den Antikörper enthaltenden Polymeren, wobei die Matrices als Formteile, z.B. Filme oder Mikrokapseln, bestehen. Beispiele für Retard-Matrices umfassen Polyester, Hy-

drogele (zum Beispiel Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (US-Patent Nr. 3.773.919), Copolymere von L-Glutaminsäure und γ -Ethyl-L-glutamat, nicht-abbaubares Ethylen-Vinylacetat, abbaubares Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer, wie z.B. das LUPRON DEPOT™ (injizierbare Mikrokügelchen, bestehend aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolid-Acetat), und Poly-D-(-)-3-Hydroxybuttersäure.

[0206] Die für In-vivo-Verabreichung zu verwendenden Formulierungen müssen steril sein. Dies kann leicht durch Filtration durch Sterilfiltrationsmembranen erreicht werden.

IV. Behandlung mit den Anti-ErbB2-Antikörpern

[0207] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird der Anti-ErbB2-Antikörper zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs, wie beispielsweise androgenunabhängigem Prostatakrebs oder androgenabhängigem Prostatakrebs, verwendet. Wenn der zu behandelnde Krebs androgenunabhängiger oder -abhängiger Prostatakrebs ist, kann die Expression des Androgens (z.B. Andosteron oder Testosteron) und/oder seines zugehörigen Rezeptors im Tumor unter Einsatz verschiedener verfügbarer Tests bewertet werden, wie sie z.B. oben beschrieben sind. Alternativ oder zusätzlich dazu kann bei einem Patienten androgenunabhängiger Prostatakrebs diagnostiziert werden, wenn er nicht länger auf eine Anti-Androgen-Therapie anspricht, und androgenabhängiger Prostatakrebs, wenn er auf eine Anti-Androgen-Therapie anspricht. Der Krebs wird im Allgemeinen ErbB2-exprimierende Zellen umfassen, sodass der Anti-ErbB2-Antikörper daran binden kann. Während der Krebs durch Überexpression des ErbB2-Rezeptors charakterisiert sein kann, liefert die vorliegende Anwendung weiters ein Verfahren zur Behandlung von Krebs, der nicht als ErbB2-überexprimierender Krebs anzusehen ist. Zur Bestimmung der ErbB2-Expression im Krebs steht eine Reihe von diagnostischen/prognostischen Tests zur Verfügung. In einer Ausführungsform kann die ErbB2-Überexpression mittels IHC analysiert werden, z.B. unter Verwendung des HERCEPTEST® (Dako). Paraffineingebettete Gewebeschnitte aus einer Tumorbiopsie können dem IHC-Test unterzogen und die ErbB2-Proteinfärbungsintensität gemäß den folgenden Kriterien eingeordnet werden:

Bewertung 0.

[0208] Keine Färbung wird beobachtet, oder Membranfärbung wird bei weniger als 10% der Tumorzellen beobachtet.

Bewertung 1+

[0209] Eine schwache/kaum merkbare Membranfärbung wird bei mehr als 10% der Tumorzellen detektiert. Nur in ein Teil der Membranen der Zellen ist gefärbt.

Bewertung 2+

[0210] Eine schwache bis mäßige vollständige Membranfärbung wird bei mehr als 10% der Tumorzellen beobachtet.

Bewertung 3+

[0211] Mäßig bis starke vollständige Membranfärbung wird bei mehr als 10% der Tumorzellen beobachtet.

[0212] Jene Tumoren mit den Bewertungen 0 und 1+ bei der Abschätzung der ErbB2-Überexpression können als nicht ErbB2-überexprimierend charakterisiert werden, während jene Tumoren mit Bewertungen 2+ oder 3+ als ErbB2-überexprimierend charakterisiert werden können.

[0213] Alternativ dazu oder zusätzlich können FISH-Tests, wie z.B. INFORM™ (angeboten von Ventana, Arizona, USA) oder PATHVISION™ (Vysis, Illinois, USA), an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Tumorgewebe durchgeführt werden, um das Ausmaß (falls überhaupt vorhanden) von ErbB2-Überexpression im Tumor zu bestimmen.

[0214] Der hierin zu behandelnde Prostatakrebs kann einer sein, der durch übermäßige Aktivierung eines ErbB-Rezeptors, z.B. EGFR, charakterisiert ist. Eine solch übermäßige Aktivierung kann auf Überexpression oder gesteigerte Produktion des ErbB-Rezeptors oder eines ErbB-Liganden zurückgeführt werden. In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein diagnostischer oder prognostischer Test durchgeführt, um zu bestim-

men, ob der Krebs des Patienten durch übermäßige Aktivierung eines ErbB2-Rezeptors charakterisiert ist. Beispielsweise kann ErbB-Genamplifizierung und/oder Überexpression eines ErbB-Rezeptors im Krebs bestimmt werden. Verschiedene Tests zur Bestimmung einer solchen Amplifizierung/Überexpression sind im Fachgebiet verfügbar und umfassen die oben beschriebenen IHC-, FISH- und Shed-Antigen-Tests. Alternativ oder zusätzlich dazu können die Level eines ErbB-Liganden, wie z.B. TGF- α , im oder assoziiert mit dem Tumor gemäß bekannter Verfahren bestimmt werden. Solche Tests können Proteine und/oder Nucleinsäuren, die für diese kodieren, in der zu testenden Probe detektieren. In einer Ausführungsform können die ErbB-Liganden-Level im Tumor mittels Immunhistochemie (IHC) bestimmt werden; siehe zum Beispiel Scher et al., Clin. Cancer Research 1, 545-550 (1995). Alternativ oder zusätzlich dazu kann man den Level der ErbB-Liganden-kodierenden Nucleinsäure in der zu testenden Probe evaluieren; z.B. mittels FISH, Southern-Blotting oder PCR-Techniken.

[0215] Darüber hinaus kann ErbB-Rezeptor- oder ErbB-Liganden-Überexpression oder -Amplifikation evaluiert werden, indem ein diagnostischer In-vivo-Test verwendet wird, z.B. durch Verabreichung eines Moleküls (wie z.B. eines Antikörpers), das an das zu detektierende Molekül bindet und mit einem detektierbaren Marker (z.B. einem radioaktiven Isotop) markiert ist, und äußerliches Scanning des Patienten zur Lokalisierung des Markers.

[0216] In bestimmten Ausführungsformen wird dem Patienten ein Immunkonjugat, umfassend den mit einem zytotoxischen Mittel konjugierten Anti-ErbB2-Antikörper, verabreicht. Vorzugsweise werden das Immunkonjugat und/oder das ErbB2-Protein, an das es gebunden ist, von der Zelle aufgenommen und führt zu erhöhter therapeutischer Effizienz des Immunkonjugats bei der Abtötung der Krebszelle, an die es bindet. In einer bevorzugten Ausführungsform zielt das zytotoxische Mittel auf oder interferiert mit Nucleinsäure in der Krebszelle. Beispiele für solche zytotoxischen Mittel umfassen Maytansinoide, Calicheamicine, Ribonucleasen und DNA-Endonucleasen.

[0217] Die Anti-ErbB2-Antikörper oder -Immunkonjugate werden gemäß bekannter Verfahren an einen menschlichen Patienten verabreicht, wie z.B. durch intravenöse Verabreichung, z.B. als Bolusinjektion oder durch kontinuierliche Infusion über einen Zeitraum, durch intramuskuläre, intraperitoneale, intracerebrospinale, subkutane, intraartikuläre, intrasynoviale, intrathekale, orale, topische oder Inhalations-Wege. Intravenöse oder subkutane Verabreichung des Antikörpers wird bevorzugt.

[0218] Andere therapeutische Vorgehensweisen können mit der Verabreichung des Anti-ErbB2-Antikörpers kombiniert werden. Die kombinierte Verabreichung umfasst Co-Verabreichung, unter Verwendung von getrennten Formulierungen oder einer einzelnen pharmazeutischen Formulierung, und konsekutive Verabreichung in jeder Reihenfolge, worin bevorzugt eine Zeitspanne besteht, während der beide (oder alle) aktiven Mittel ihre biologischen Aktivitäten gleichzeitig ausüben.

[0219] In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Patient mit zwei verschiedenen Anti-ErbB2-Antikörpern behandelt. Beispielsweise kann der Patient mit einem ersten Anti-ErbB2-Antikörper, der die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 offenbart ist, oder einem Antikörper, der die biologische Charakteristik von monoklonalem Antikörper 2C4 besitzt, sowie mit einem zweiten Anti-ErbB2-Antikörper, der wachstumshemmend ist (z.B. HERCEPTIN®), oder einem Anti-ErbB2-Antikörper, der Apoptose einer ErbB2-überexprimierenden Zelle (z.B. 7C2, 7F3 oder deren humanisierte Varianten) induziert, behandelt werden. Vorzugsweise führt eine solche kombinierte Behandlung zu einem synergistischen therapeutischen Effekt.

[0220] Es kann auch wünschenswert sein, die Verabreichung des/der Anti-ErbB2-Antikörpers oder -Antikörper mit der Verabreichung eines Antikörpers gegen ein anderes tumorassoziiertes Antigen zu kombinieren. Der andere Antikörper kann in diesem Fall zum Beispiel an EGFR, ErbB2, ErbB4 oder den Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) binden.

[0221] In einer Ausführungsform umfasst die vorliegende die Verwendung eines oder mehrerer Anti-ErbB2-Antikörper und eines oder mehrerer Chemotherapeutika oder Wachstumshemmer, einschließlich die Co-Verabreichung von Cocktails verschiedener Chemotherapeutika. Bevorzugte Chemotherapeutika umfassen Taxane (wie z.B. Paclitaxel und Docetaxel) und/oder Anthracyclin-Antibiotika. Herstellung und Dosierungsschemata für solche Chemotherapeutika können gemäß den Anweisungen des Herstellers oder wie von einem qualifizierten Praktiker empirisch bestimmt verwendet werden. Herstellung und Dosierungsschemata für solche Chemotherapie werden auch beschrieben in "Chemotherapy Service", M.C. Perry (Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1992).

[0222] Der Antikörper kann mit einer anti-hormonellen Verbindung kombiniert werden; z.B. einer Anti-Östrogen-Verbindung, wie z.B. Tamoxifen; einem Anti-Progesteron, wie z.B. Onapriston (siehe EP-A-616.812), oder einem Anti-Androgen, wie z.B. Flutamid, in für solche Moleküle bekannten Dosierungen. Wenn der zu behandelnde Krebs ein hormonunabhängiger Krebs ist, kann der Patient vorher der Anti-Hormontherapie unterzogen worden sein, und es kann, sobald der Krebs hormonunabhängig wird, der Anti-ErbB2-Antikörper (oder optional andere hierin beschriebene Mittel) an den Patienten verabreicht werden.

[0223] Manchmal kann auch die Co-Verabreichung eines Kardioprotektors (um mit Therapie assoziierte Myokard-Fehlfunktion zu verhindern oder zu vermindern) oder eines oder mehrerer Cytokine an den Patienten von Vorteil sein. Zusätzlich zu den obigen therapeutischen Maßnahmen kann der Patient der operativen Entfernung von Krebszellen und/oder Strahlentherapie unterzogen werden. Geeignete Dosierungen für jedes der obigen co-verabreichten Mittel sind jene, die zur Zeit verwendet werden, und könnten aufgrund der kombinierten Wirkung (Synergismus) des Mittels mit dem Anti-ErbB2-Antikörper verringert werden.

[0224] Die geeignete Dosierung von Antikörper zur Verhinderung und Behandlung von Krankheit hängt von der Art der zu behandelnden Krankheit, wie sie oben definiert wurden, ist, von der Schwere und dem Verlauf der Krankheit, davon, ob der Antikörper für präventive oder therapeutische Zwecke verabreicht wird, der vorangegangenen Therapie, der Krankengeschichte des Patienten und dem Ansprechen auf den Antikörper und dem Ermessen des behandelnden Arztes ab. Der Antikörper wird passend zu einem Zeitpunkt oder in einer Serie von Behandlungen verabreicht. In Abhängigkeit von Art und Schweregrad der Krankheit ist ungefähr 1 µg/kg bis 15 mg/kg (z.B. 0,1–20 mg/kg) Antikörper eine mögliche Ausgangsdosis für die Verabreichung an den Patienten, ob beispielsweise als eine oder mehrere getrennte Verabreichungen oder als kontinuierliche Infusion. Eine typische Dosierung kann im Bereich von ungefähr 1 µg/kg bis 100 mg/kg oder mehr liegen, abhängig von den oben erwähnten Faktoren. Für wiederholte Verabreichung über mehrere Tage oder länger, in Abhängigkeit vom Zustand, wird die Behandlung aufrechterhalten, bis eine gewünschte Unterdrückung der Krankheitssymptome auftritt. Eine bevorzugte Dosisvorgabe umfasst die Verabreichung einer anfänglichen Belastungsdosis von ungefähr 4 mg/kg, gefolgt von einer wöchentlichen Erhaltungsdosis von ungefähr 2 mg/kg des Anti-ErbB2-Antikörpers. Jedoch können auch andere Dosisvorgaben zweckmäßig sein. Der Fortschritt dieser Therapie kann mittels konventioneller Techniken und Tests leicht überwacht werden.

[0225] Ein Antikörperprotein kann dem Patienten verabreicht werden, oder der Antikörper kann durch Gentherapie verabreicht werden. Siehe z.B. WO 96/07321, publiziert am 14. März 1996, betreffend die Anwendung von Gentherapie zur Erzeugung intrazellulärer Antikörper.

[0226] Es bestehen zwei hauptsächliche Ansätze, die Nucleinsäure (optional in einem Vektor enthalten) in die Zellen des Patienten zu bringen; in vivo und ex vivo. Zur In-vivo-Zufuhr wird die Nucleinsäure direkt in den Patienten injiziert, gewöhnlich an der Stelle, wo der Antikörper benötigt wird. Zur Ex-vivo-Behandlung werden die Zellen des Patienten entfernt und die Nucleinsäure in diese isolierten Zellen eingeführt, und die modifizierten Zellen werden dem Patienten entweder direkt verabreicht oder beispielsweise innerhalb poröser Membranen eingeschlossen, die in den Patienten implantiert werden (siehe z.B. die US-Patente Nr. 4.892.538 und 5.283.187). Es besteht eine Reihe von verfügbaren Techniken zur Einführung von Nucleinsäuren in lebensfähige Zellen. Die Techniken variieren in Abhängigkeit davon, ob die Nucleinsäure in vitro in kultivierte Zellen oder in vivo in die Zellen des bestimmten Wirtes eingeführt wird. Geeignete Techniken für den In-vitro-Transfer von Nucleinsäuren in Säugetierzellen umfassen die Verwendung von Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran, die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode usw. Ein gewöhnlich verwendeter Vektor für In-vivo-Zufuhr des Gens ist ein Retrovirus.

[0227] Die zur Zeit bevorzugten In-vivo-Nucleinsäure-Transfertechniken umfassen Transfektion mit Virusvektoren (wie z.B. Adenovirus, Herpes-Simplex-I-Virus oder Adenoassoziiertes Virus) und Lipid-basierende Systeme (zweckmäßige Lipide für Lipid-vermittelten Transfer des Gens sind beispielsweise DOTMA, DOPE und DC-Chol). In einigen Situationen ist es wünschenswert, die Nucleinsäurequelle mit einem Mittel, das an eine Target-Zelle adressiert ist, bereitzustellen, wie z.B. einem Antikörper, der für ein Oberflächen-Membranprotein an der Target-Zelle spezifisch ist, einem Liganden für einen Rezeptor an der Target-Zelle usw. Wenn Liposomen angewendet werden, können Proteine, die an ein Endozytose-assoziiertes Zelloberflächen-Membranprotein binden, zur Adressierung und/oder zur Erleichterung der Aufnahme verwendet werden, z.B. für einen bestimmten Zelltyp typische Capsid-Proteine und deren Fragmente, Antikörper gegen Proteine, die im Kreislauf Internalisierung erfahren, und Proteine, die intrazelluläre Lokalisierung adressieren und intrazelluläre Halbwertszeit erhöhen. Die Technik Rezeptor-vermittelter Endozytose wird z.B. beschrieben von Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); und Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Für einen Überblick gegenwärtig bekannter Genmarkierungs- und Gentherapie-Protokolle siehe Anderson et al., Science

256, 808-813 (1992). Siehe auch WO 93/25673 und darin zitierte Literatur.

V. Fabrikate

[0228] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Fabrikat bereitgestellt, das für die Behandlung von Prostatakrebs zweckmäßige Materialien enthält. Das Fabrikat umfasst einen Behälter und ein Etikett oder eine Packungsbeilage auf dem oder gebunden an den Behälter. Geeignete Behälter umfassen beispielsweise Flaschen, Fläschchen, Spritzen usw. Die Behälter können aus einer Vielzahl von Materialien bestehen, wie z.B. Glas oder Kunststoff. Der Behälter enthält eine Zusammensetzung, die zur Behandlung des Zustands wirksam ist, und kann eine sterile Zugangsöffnung besitzen (z.B. kann der Behälter ein Infusionsbeutel oder ein Fläschchen mit einem von einer Subkutankanüle durchstechbaren Stopfen sein). Zumindest ein aktives Mittel in der Zusammensetzung ist ein Anti-ErbB2-Antikörper. Das Etikett oder die Packungsbeilage weist darauf hin, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatakrebs, androgenunabhängigem Prostatakrebs oder androgenabhängigem Prostatakrebs verwendet wird. Weiters kann das Fabrikat umfassen: (a) einen ersten Behälter mit einer darin enthaltenen Zusammensetzung, wobei die Zusammensetzung einen ersten Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und das Wachstum ErbB2-überexprimierender Krebszellen inhibiert, und (b) einen zweiten Behälter mit einer darin enthaltenen Zusammensetzung, wobei die Zusammensetzung einen zweiten Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 offenbart. Das Fabrikat in dieser Ausführungsform der Erfindung kann weiters eine Packungsbeilage beinhalten, die darauf hinweist, dass die erste und zweite Antikörper-Zusammensetzungen zur Behandlung von Prostatakrebs verwendet werden können. Alternativ oder zusätzlich dazu kann das Fabrikat weiters einen zweiten (oder dritten) Behälter umfassen, der einen pharmazeutisch annehmbaren Puffer enthält, wie z.B. bakteriostatisches Wasser zur Injektion (BWI), Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Ringersche Lösung und Dextrose-Lösung. Er kann weiters andere Materialien enthalten, die vom geschäftlichen oder Anwenderstandpunkt wünschenswert sind, einschließlich von anderen Puffern, Verdünnern, Filtern, Nadeln und Injektionsspritzen.

VI. Hinterlegung von Materialien

[0229] Die folgenden Hybridom-Zelllinien sind bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC), hinterlegt worden:

Antikörper- Bezeichnung	ATCC Nr.	Hinterlegungs- datum
7C2	ATCC HB-12215	17. Oktober 1996
7F3	ATCC HB-1221	17. Oktober 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24. Mai 1990
2C4	ATCC HB-12697	8. April 1999

[0230] Weitere Details der Erfindung sind durch die folgenden, nichteinschränkenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiel 1

Produktion und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 2C4

[0231] Die murinen monoklonalen Antikörper 2C4, 7F3 und 4D5, die spezifisch an die extrazelluläre Domäne von ErbB2 binden, wurden wie in Fendly et al., Cancer Research 50, 1550-1558 (1990), beschrieben produziert. Kurz gefasst wurden NIH-3T3/HER2-3₄₀₀-Zellen (ungefähr 1×10^5 ErbB2-Moleküle/Zelle exprimierend), produziert wie in Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 7158-7163 (1987), beschrieben, mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), enthaltend 25 mM EDTA, geerntet und zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen verwendet. Den Mäusen wurden i.p. Injektionen von 10^7 Zellen in 0,5 ml PBS verabreicht, und zwar in den Wochen 0, 2, 5 und 7. Den Mäusen mit Antisera, die ³²P-markiertes ErbB2 immunpräzipitierten, wurden an Wochen 9 und 13 i.p. Injektionen eines Wheat-Germ-Agglutinin-Sepharose-(WGA-) gereinigten ErbB2-Membran-Extrakts verabreicht. Dies war gefolgt von einer i.v. Injektion von 0,1 ml des ErbB2-Präparats, und die Splenozyten wurden mit Maus-Myelom-Linie X63-Ag8.653 fusioniert. Hybridom-Überstände wurden mittels Radioimmunpräzipitation und ELISA auf ErbB2-Bindung gescreent.

[0232] Die von den monoklonalen Antikörpern 4D5, 7F3 und 2C4 gebundenen ErbB2-Epitope wurden mittels kompetitiver Bindungsanalyse bestimmt (Fendly et al., Cancer Research 50, 1550-1558 (1990)). Cross-Blocking-Studien wurden an Antikörpern durch direkte Fluoreszenz an intakten Zellen unter Verwendung der PAN-DEXTM-Screen-Machine zur Quantifizierung der Fluoreszenz durchgeführt. Unter Verwendung etablierter Prozeduren (Wofsy et al., "Selected Methods in Cellular Immunology", S. 287, Mishel und Schügi (Hrsg.), San Francisco, W. J. Freeman Co. (1980)) wurde jeder monoklonale Antikörper mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert. Konfluente Monoschichten von NIH-3T3/HER2-3₄₀₀-Zellen wurden mit Trypsin behandelt, einmal gewaschen und bei $1,75 \times 10^6$ Zellen/ml in kaltem PBS, enthaltend 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) und 0,1% NaN₃, resuspendiert. Eine Endkonzentration von 1% Latex-Partikeln (IDC, Portland, OR, USA) wurde zugesetzt, um Verstopfung der PANDEX™-Platten-Membranen zu reduzieren. Zellen in Suspension, 20 µl, und 20 µl gereinigter Antikörper (100 µg/ml bis 0,1 µg/ml) wurden zu den PANDEX™-Platten-Näpfen zugegeben und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Eine vorbestimmte Verdünnung FITC-markierter monoklonaler Antikörper in 20 µl wurden jedem Napf zugegeben, 30 Minuten lang inkubiert, gewaschen und die Fluoreszenz mit dem PANDEX™ quantifiziert. Monoklonale Antikörper wurden als ein gemeinsames Epitop besitzend betrachtet, wenn jeder die Bindung des anderen im Vergleich zu einer irrelevanten monoklonalen Antikörperkontrolle zu 50% oder mehr blockierte. In diesem Test wurden den monoklonalen Antikörpern 4D5, 7F3 und 2C4 die Epitope I, G/F bzw. F zugeordnet.

[0233] Die wachstumshemmenden Charakteristika der monoklonalen Antikörper 2C4, 7F3 und 4D5 wurden unter Verwendung der Brusttumor-Zelllinie SK-BR-3 (siehe Hudziak et al., Molec. Cell Biol. 9(3), 1165-1172 (1989)) evaluiert. Kurz gefasst wurden SK-BR-3-Zellen mittels 0,25 Vol.-% Trypsin abgelöst und in komplettem Medium mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro ml suspendiert. Aliquoten von 100 µl (4×10^4 Zellen) wurden in 96-Napf-Mikroverdünnungsplatten plattiert, die Zellen wurden anhaften gelassen und dann mit 100 µl Medium alleine oder monoklonalen Antikörper enthaltendes Medium (Endkonzentration 5 µl/ml) versetzt. Nach 72 Stunden wurden die Platten zweimal mit PBS (pH 7,5) gewaschen, mit Kristallviolett (0,5% in Methanol) gefärbt und auf relative Zellproliferation analysiert, wie beschrieben in Sugarman et al., Science 230, 943-945 (1985). Monoklonale Antikörper 2C4 und 7F3 inhibierten die relative SK-BR-3-Zellenproliferation um ungefähr 20% bzw. ungefähr 38% im Vergleich zu ungefähr 56% Inhibition mit monoklonalem Antikörper 4D5.

[0234] Die monoklonalen Antikörper 2C4, 4D5 und 7F3 wurden auf ihre Fähigkeit hin evaluiert, HRG-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im MG-Bereich 180.000 aus Ganz-Zellen-Lysaten von MCF7-Zellen zu inhibieren (Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996)). Es wurde berichtet, dass MCF-Zellen alle bekannten ErbB-Rezeptoren exprimieren, jedoch in relativ niedrigen Mengen. Da ErbB2, ErbB3 und ErbB4 nahezu identische Molekülgröße besitzen, ist es nicht möglich festzustellen, welches Protein tyrosinphosphoryliert wird, wenn Ganz-Zellen-Lysate mittels Western-Blot-Analyse evaluiert werden. Jedoch sind diese Zellen ideal für HRG-Tyrosinphosphorylierungs-Tests, da sie unter den verwendeten Testbedingungen, in Abwesenheit von exogen zugesetztem HRG, niedrige bis nicht nachweisbare Mengen von tyrosinphosphorylierten Proteinen im MG-180.000-Bereich aufweisen.

[0235] MCF7-Zellen wurden in 24-Napf-Platten ausplattiert und monoklonale Antikörper gegen ErbB2 jedem Napf zugesetzt und 30 Minuten lang bei 30°C inkubiert; dann wurde jedem Napf rHRGβ1₁₇₇₋₂₄₄ in einer Endkonzentration von 0,2 nM zugesetzt und die Inkubation 8 Minuten lang fortgesetzt. Medium wurde vorsichtig aus jedem Napf abgesaugt und die Reaktion durch Zusatz von 100 µl SDS-Probenpuffer (5% SDS, 25 mM DTT und 25 mM Tris-HCl, pH 6,8) gestoppt. Jede Probe (25 µl) wurde in einem 4–12% Gradientengel (Novex) elektrophoretisch getrennt und dann elektrophoretisch auf Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert. Antiphosphotyrosin(4G10 von UBI, verwendet in 1 µg/ml) Immunblots wurden entwickelt und die Intensität der vorwiegenden reaktiven Bande bei MG ~ 180.000 mittels Reflexions-Densitometrie, wie früher beschrieben (Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992); Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269, 14661-14665), quantifiziert.

[0236] Monoklonale Antikörper 2C4, 7F3 und 4D5 inhibierten signifikant die Bildung eines HRG-induzierten Tyrosinphosphorylierungs-Signals im MG-180.000-Bereich. Diese Antikörper kreuzreagierten auch nicht mit EGFR (Fendly et al., Cancer Research 50, 1550-1558 (1990)), ErbB3 oder ErbB4. Antikörper 2C4 und 7F3 inhibierten signifikant die HRG-Stimulation von p180-Tyrosinphosphorylierung um ~50%. [Fig. 2A](#) zeigt Dosis-Antwort-Kurven für 2C4- oder 7F3-Inhibition von HRG-Stimulation von p180-Tyrosinphosphorylierung, wie bestimmt mittels Reflexions-Densitometrie. Evaluierung dieser Inhibierungskurven mittels einer 4-Parameter-Anpassung ergab ein IC₅₀ von 2,8 +/- 0,7 nM und 29,0 +/- 4,1 nM für 2C4 bzw. 7F3.

[0237] Inhibition der HRG-Bindung an MCF7-Brusttumor-Zelllinien durch Anti-ErbB2-Antikörper wurde im 24-Napf-Format mit Monoschicht-Kulturen auf Eis durchgeführt (Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996)). Monoklonale Anti-ErbB2-Antikörper wurden jedem Napf zugesetzt und 30 Minuten lang inkubiert.

¹²⁵I-markiertes rHRGβ_{1,177-224} (25 pm) wurde zugesetzt und die Inkubation 4 bis 16 Stunden lang fortgesetzt. **Fig. 2B** zeigt Dosis-Antwort-Kurven für 2C4- oder 7F3-Inhibierung von HRG-Bindung an MCF7-Zellen. Variierende Konzentrationen von 2C4 oder 7F3 wurden mit MCF-Zellen in Gegenwart von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ₁ inkubiert, und die Inhibierungskurven sind in **Fig. 2B** gezeigt. Die Analyse dieser Daten ergab ein IC₅₀ von 2,4 +/- 0,3 nM und 19,0 +/- 7,3 nM für 2C4 bzw. 7F3. Eine maximale Inhibierung von ~74% für 2C4 und 7F3 war in Übereinstimmung mit den Tyrosinphosphorylierungs-Daten.

[0238] Um zu bestimmen, ob der beobachtete Effekt der Anti-ErbB2-Antikörper ein generelles Phänomen war, wurden humane Tumor-Zelllinien mit 2C4 oder 7F3 inkubiert und der Grad an spezifischer Bindung von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ₁ bestimmt (Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996)). Die Ergebnisse dieser Studie sind in **Fig. 3** gezeigt. Bindung von ¹²⁵I-markiertem rHRGβ₁ konnte sowohl durch 2C4 als auch 7F3 in allen Zelllinien signifikant inhibiert werden, mit Ausnahme der Brusttumor-Krebszelllinie MDA-MB-468, von der berichtet wurde, dass sie wenig oder kein ErbB2 exprimiert. Von den verbleibenden Zelllinien wurde berichtet, dass sie ErbB2 exprimieren, wobei das Ausmaß von ErbB2-Expression unter diesen Zelllinien in einem weiten Bereich variiert. Tatsächlich variiert der Bereich von ErbB2-Expression in den getesteten Zelllinien um mehr als 2 Größenordnungen. Beispielsweise exprimieren BT-20, MCF7 und Caov-3 ~10⁴ ErbB2-Rezeptoren/Zelle, wogegen BT-474 und SK-BR-3 ~10⁶ ErbB2-Rezeptoren/Zellen exprimieren. Aus dem gegebenen, weiten Bereich der ErbB2-Expression in diesen Zellen und den obigen Daten wurde geschlossen, dass die Wechselwirkung zwischen ErbB2, ErbB3 und ErbB4 selbst eine hochaffine Wechselwirkung war, die an der Oberfläche der Plasmamembran stattfindet.

[0239] Die wachstumshemmenden Effekte der monoklonalen Antikörper 2C4 und 4D5 auf MDA-MB-175- und SK-BR-3-Zellen in An- und Abwesenheit von exogenem rHRGβ₁ wurden bestimmt (Schaefer et al., Oncogene 15, 1385-1394 (1997)). ErbB2-Level in MDA-MB-175-Zellen sind 4- bis 6-mal höher als die in normalen Brust-Epithelzellen gefundenen Level, und der ErbB2-ErbB4-Rezeptor ist in MDA-MB-175-Zellen konstitutiv tyrosinphosphoryliert. MDA-MB-175-Zellen wurden mit den monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörpern 2C4 und 4D5 (10 µg/ml) 4 Tage lang behandelt. In einem Kristallviolett-Färbungstest zeigte die Inkubation mit 2C4 einen starken inhibierenden Effekt auf diese Zelllinie (**Fig. 4A**). Exogenes HRG kehrt diese Inhibierung nicht signifikant um. Andererseits zeigte 2C4 keinen inhibierenden Effekt auf die ErbB2-überexprimierende Zelllinie SK-BR-3 (**Fig. 4B**). Der monoklonale Antikörper 2C4 war in der Lage, die Zellproliferation von MDA-MB-175-Zellen in einem stärkeren Ausmaß zu inhibieren als der monoklonale Antikörper 4D5, sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von exogenem HRG. Inhibierung von Zellproliferation durch 4D5 ist abhängig vom ErbB2-Expressions-Level (Lewis et al., Cancer Immunol. Immunother. 37, 255-263 (1993)). Eine maximale Inhibierung von 66% in SK-BR-3-Zellen konnte detektiert werden (**Fig. 4B**). Dieser Effekt konnte jedoch durch exogenes HRG überwunden werden.

Beispiel 2

HRG-abhängige Assoziierung von ErbB2 mit ErbB2 wird durch den monoklonalen Antikörper 2C4 blockiert

[0240] Die Fähigkeit von ErbB3, mit ErbB2 zu assoziieren, wurde in einem Co-Immunpräzipitations-Experiment getestet. 1,0 × 10⁶ MCF7- oder SK-BR-Zellen wurden in Sechs-Napf-Gewebekulturplatten in 50:50 DMEM/Ham's F12-Medium, enthaltend 10% Fetal-Rinderserum (FBS) und 10 mM HEPES, pH 7,2 (Wachstumsmedium), inokuliert und über Nacht anhaften gelassen. Die Zellen wurden vor Beginn des Experiments für zwei Stunden in Wachstumsmedium ohne Serum ausgehungert.

[0241] Die Zellen wurden kurz mit phosphatgepuffertem Kochsalz (PBS) gewaschen und dann entweder mit 100 nM des bezeichneten Antikörpers, verdünnt in 0,2% (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin (BSA), RPMI-Medium, mit 10 mM HEPES, pH 7,2 (Bindungspuffer), oder mit Bindungspuffer alleine (Kontrolle) inkubiert. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde HRG auf eine Endkonzentration von 5 nM einer Hälfte der Näpfe (+) zugesetzt. Ein ähnliches Volumen von Bindungspuffer wurde den anderen Näpfen (-) zugesetzt. Die Inkubation wurde ungefähr 10 Minuten lang fortgesetzt.

[0242] Überstände wurden durch Absaugung entfernt und die Zellen in RPMI, 10 mM HEPES, pH 7,2, 1,0 Vol.-% Triton X-100TM, 1,0% (Gew./Vol.) CHAPS (Lysepuffer), enthaltend 0,2 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin und 10 TU/ml Aprotinin, lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation von unlöslichem Material befreit.

[0243] ErbB2 wurde unter Verwendung eines an ein Affinitätsgel (Affi-Prep, Bio-Rad) konjugierten monoklonalen Antikörpers immunpräzipitiert. Dieser Antikörper (Ab-3, Oncogene Sciences) erkennt ein Epitop der zytoplasmatischen Domäne. Immunpräzipitation wurde durch Zusatz von 10 µl Gel-Brei, enthaltend ungefähr 8,5

µg des immobilisierten Antikörpers, zu jedem Lysat durchgeführt, und die Proben wurden bei Raumtemperatur zwei Stunden lang mischen gelassen. Die Gele wurden dann durch Zentrifugation gesammelt. Die Gele wurden chargenweise drei Mal mit Lysepuffer gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. SDS-Probenpuffer wurde dann zugesetzt und die Proben in einem siedenden Wasserbad kurz erhitzt.

[0244] Überstände wurden in 4–12% Polyacrylamid-Gele getrennt und auf Nitrocellulose-Membranen elektroblottet. Die Anwesenheit von ErbB3 wurde bestimmt, indem die Blots mit einem polyklonalen Antikörper gegen eines von dessen Epitopen der Cytoplasma-Domäne (c-17, Santa Cruz Biotech) sondiert wurden. Die Blots wurden mit einem chemolumineszenten Substrat (ECL, Amersham) visualisiert.

[0245] Wie in den Kontroll-Spuren in den [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) für MCF7- bzw. SK-BR-3-Zellen gezeigt war ErbB3 in einem ErbB2-Immunpräzipitat nur dann anwesend, wenn die Zellen mit HRG stimuliert waren. Wenn die Zellen zuerst mit monoklonalem Antikörper 2C4 inkubiert wurden, war das ErbB3-Signal in MCF7-Zellen abwesend ([Fig. 5A](#), Spur 2C4 +) oder in SK-BR-3-Zellen wesentlich reduziert ([Fig. 5B](#), Spur 2C4 +). Wie in den [Fig. 5A–B](#) gezeigt blockiert monoklonaler Antikörper 2C4 die Heregulinabhängige Assoziation von ErbB3 mit ErbB2 in sowohl MCF7- als auch SK-BR-3-Zellen wesentlich effektiver als HERCEPTIN®. Vorinkubation mit HERCEPTIN® erniedrigte das ErbB3-Signal in MCF7-Lysaten, hatte jedoch einen geringen oder keinen Effekt auf die aus SK-BR-3-Lysaten co-präzipitierte ErbB3-Menge. Vorinkubation mit einem Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (Ab-1, Oncogene Sciences) hatte keinen Effekt auf die Fähigkeit von ErbB3, mit ErbB2 der beiden Zelllinien zu coimmunpräzipitieren.

Beispiel 3

Humanisierte 2C4-Antikörper und affinitätsgereifte 2C4-Antikörpervarianten

[0246] Die variablen Domänen des murinen monoklonalen Antikörpers 2C4 wurden zuerst in einen Vektor kloniert, der die Produktion eines Maus/Mensch-chimären Fab-Fragments erlaubt. Gesamt-RNA wurde mittels eines Stratagene-RNA-Extraktionssets, unter Befolgung der Vorschriften des Herstellers, aus Hybridomzellen isoliert. Die variablen Domänen wurden durch RT-PCR amplifiziert, Gel-gereinigt und in ein Derivat eines pUC119-basierten Plasmids inseriert, das eine humane Kappa-Konstantdomäne und humane C_H1-Domäne enthält, und zwar wie früher beschrieben (Carter et al., PNAS (USA) 89, 4285 (1992); und US-Patent Nr. 5.821.337). Das resultierende Plasmid wurde zur Expression des Fab-Fragments in den E.-coli-Stamm 16C9 transformiert. Wachstum der Kulturen, Induktion von Proteinexpression und Reinigung von Fab-Fragment wurden wie früher beschrieben (Werther et al., J. Immunol. 157, 4986-4995 (1996); Presta et al., Cancer Research 57, 4593-4599 (1997)) durchgeführt. Das gereinigte chimäre 2C4-Fab-Fragment wurde mit dem parentalen, murinen Antikörper 2C4 bezüglich dessen Fähigkeit verglichen, ¹²⁵I-HRG-Bindung an MCF7-Zellen zu inhibieren und rHRG-Aktivierung von p180-Tyrosinphosphorylierung in MCF7-Zellen zu inhibieren. Wie in [Fig. 6A](#) gezeigt ist das chimäre 2C4-Fab-Fragment sehr effektiv in der Störung der Bildung der hoch-affinen ErbB2-ErbB3-Bindungsstelle an der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7. Der berechnete, relative IC₅₀-Wert für intaktes, murines 2C4 beträgt 4,0 +/- 0,4 nM, wogegen der Wert für das Fab-Fragment 7,7 +/- 1,1 nM beträgt. Wie in [Fig. 6B](#) illustriert ist das monovalente, chimäre 2C4-Fragment sehr effektiv in der Störung HRG-abhängiger ErbB2-ErbB3-Aktivierung. Der berechnete IC₅₀-Wert für intakten monoklonalen Antikörper 2C4 beträgt 6,0 +/- 2 nM, wogegen der Wert für das Fab-Fragment 15,0 +/- 2 nM beträgt.

[0247] Die DNA-Sequenzierung des chimären Klons erlaubte die Identifizierung von CDR-Resten (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. Auflage, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) ([Fig. 7A](#) und B). Unter Verwendung von Oligonucleotid-ortsgerichteter Mutagenese wurden alle dieser CDR-Regionen in ein vollständiges Human-Gerüst (V_L-Kappa-Untergruppe I und V_H-Untergruppe III), enthalten auf Plasmid VX4, wie früher beschrieben (Presta et al., Cancer Research 57, 4593-4599 (1997)) eingeführt. Proteine des resultierenden "CDR-Tauschs" wurden wie oben exprimiert und gereinigt. Bindungsstudien wurden durchgeführt, um die beiden Versionen zu vergleichen. Kurz gefasst wurde eine NUNC-MAXISORP™-Platte mit 1 Mikrogramm pro ml an extrazellulärer ErbB2-Domäne (ECD; produziert wie beschrieben in WO 90/14357) in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6, über Nacht bei 4°C beschichtet und dann mit ELISA-Verdünner (0,5% BSA, 0,05% Polysorbat 20, PBS) bei Raumtemperatur für 1 Stunde blockiert. Verdünnungsreihen in ELISA-Verdünner wurden an den Platten 2 Stunden lang inkubiert. Nach dem Waschen wurde gebundenes Fab-Fragment mit biotinyliertem, murinem Anti-Human-Kappa-Antikörper (ICN 634771) gefolgt von Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase (Sigma) und mittels 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) als Substrat detektiert. Die Absorption bei 450 nm wurde abgelesen. Wie in [Fig. 8A](#) gezeigt ging durch Konstruktion von CDR-Tausch-Human-Fab-Fragment die gesamte Bindung verloren.

[0248] Um die Bindung des humanisierten Fab wieder herzustellen, wurden unter Verwendung von DNA des CDR-Tauschs als Templat Mutanten hergestellt. Unter Verwendung eines Computer-generierten Modells ([Fig. 9](#)) wurden diese Mutationen so konstruiert, dass sie humane Gerüstregion-Reste zu ihren murinen Gegenstücken veränderten, und zwar an Positionen, wo die Veränderung CDR-Konformationen oder die Antikörper-Antigen-Schnittstelle beeinflussen könnte. Mutanten sind in Tabelle 2 angeführt.

Tabelle 2

Bezeichnungen von humanisierten 2C4-FR-Mutationen

Mutante Nr.	Gerüstregion- (FR-) Substitutionen
560	ArgH71Val
561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

[0249] Bindungskurven für die verschiedenen Mutanten sind in den [Fig. 8A–C](#) gezeigt. Bei der humanisierten Fab-Version 574 mit den Veränderungen ArgH71Val, AspH73Arg und IleH69Leu scheint die Bindung des ursprünglichen, chimären 2C4-Fab-Fragments wiederhergestellt zu sein. Zusätzliche FR- und/oder CDR-Reste, wie z.B. L2, L54, L55, L56, H35 und/oder H48, können modifiziert werden (z.B. modifiziert wie folgt – IleL2Thr; ArgL54Leu; TyrL55Glu; ThrL56Ser; AspH35Ser und ValH48Ile), um die Bindung des humanisierten Antikörpers weiter zu verfeinern oder zu verstärken. Alternativ oder zusätzlich dazu kann der humanisierte Antikörper affinitätsgereift werden (siehe oben), um seine Affinität und/oder andere biologische Aktivitäten zu verfeinern oder zu verbessern.

[0250] Die humanisierte 2C4-Version 574 wurde mittels Phagen-Display-Verfahren affinitätsgereift. Kurz gesagt wurde humanisiertes 2C4.574-Fab als GenIII-Fusion in einen Phagen-Display-Vektor kloniert. Wenn Phagen-Partikel durch Infektion mit M13KO7-Helferphagen induziert werden, erlaubt diese Fusion, dass das Fab am N-Terminus des Phagen-Schwanzfaser-Proteins GenIII präsentiert wird (Baca et al., J. Biol. Chem. 272, 10678 (1997)).

[0251] Individuelle Bibliotheken wurden für jedes der 6 oben identifizierten CDRs konstruiert. In diesen Bibliotheken wurden die Aminosäuren in den CDRs, die mit Hilfe eines Computer-generierten Modells ([Fig. 9](#)) als potentiell an ErbB2-bindend identifiziert wurden, unter Verwendung von Oligomeren, die "NNS" als ihre Codons enthielten, randomisiert. Die Bibliotheken wurden dann gegen ErbB2-ECD, beschichtet auf NUNC-MAXISORP™-Platten mit 3% Trockenmilch in PBS mit 0,2% TWEEN 20® (MPBST) anstelle aller Block-Lösungen, Panning unterzogen. Um auf Phagen mit höheren Affinitäten als 2C4.574 zu selektieren, wurde in den Panningzyklen 3, 4 und 5 in den Wachschritten lösliches ErbB2-ECD oder lösliches Fab-2C4.574 als Konkurrent zugesetzt. Waschzeiten wurden auf 1 Stunde bei Raumtemperatur ausgedehnt.

[0252] Nach 5 Panningzyklen wurden die einzelnen Klone wiederum mittels Phagen-ELISA analysiert. Einzelne Klone wurden in U-Boden-Costar-96-Napf-Gewebekulturplatten gezüchtet und die Phagen durch Zusatz von Helferphagen induziert. Nach Züchtung über Nacht wurden E.-coli-Zellen pelletiert und die Phagen-enhaltenden Überstände in 96-Napf-Platten transfiziert, worin der Phage mit MPBST 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert wurde. Mit ErbB2-ECD beschichtete NUNC-MAXISORP™-Platten wurden ebenso wie oben beschrieben mit MPBST blockiert. Blockierte Phagen wurden an den Platten 2 Stunden lang inkubiert. Nach dem Waschen wurden gebundene Phagen mittels Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem, monoklonalem An-

ti-M13-Antikörper (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01), 1:5000 in MPBST verdünnt, gefolgt von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin als Substrat, detektiert. Die Absorption wurde bei 450 nm abgelesen.

[0253] Diejenigen 48 Klone jeder Bibliothek, die die stärksten Signale lieferten, wurden DNA-sequenziert. Jene Klone, deren Sequenzen am häufigsten auftraten, wurden in den oben beschriebenen Vektor subkloniert, der die Expression löslicher Fabs erlaubt. Diese Fabs wurden induziert, die Proteine gereinigt, und die gereinigten Fabs wurden mittels ELISA, wie oben beschrieben, auf Bindung analysiert und die Bindung mit der ursprünglichen humanisierten 2C4.574-Version verglichen.

[0254] Nach Identifizierung interessanter Mutationen in einzelnen CDRs wurden zusätzliche Mutationen, die verschiedene Kombinationen davon waren, konstruiert und wie oben getestet. Mutanten, die relativ zu 574 verbesserte Bindung ergaben, sind in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3

Bezeichnungen von durch Affinitätsreifung von 2C4.574 abgeleiteten Mutanten

<u>Mutanten-Name</u>	<u>Veränderung gegenüber 574</u>	<u>Mutante/574*</u>
H3.A1	serH99trp, methH34leu	0,380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu	0,087
H1.3.B3	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu	0,572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu	0,569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu	0,561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, methH34leu	0,552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, methH34leu	0,215
654	serL50trp, methH34leu	0,176
655	methH34ser	0,542
659	serL50trp, methH34ser	0,076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, serH99trp	0,175
L3G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu, serH99trp	0,218
H1.3.B3.H3.A1	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu, serH99trp	0,306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu, serH99trp	0,248
654.H3.A1	serL50trp, methH34leu, serH99trp	0,133
654.L3.G6	serL50trp, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0,213
654.L3.29	serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0,236
654.L3.36	serL50trp, methH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0,141

*Verhältnis zwischen der zur Erreichung der mittleren optischen Dichte (OD) der Standardkurve benötigten Menge an Mutante und der zur Erreichung der mittleren OD der Standardkurve in einem Erb2-ECD-ELISA benötigten Menge an 574. Eine Zahl kleiner als 1,0 weist darauf hin, dass die Mutante Erb2 besser bindet als 574.

[0255] Die folgenden Mutanten wurden ebenfalls konstruiert und werden zurzeit evaluiert:

659.L3.G6 serL50trp, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
 659.L3.G11 serL50trp, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
 659.L3.29 serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
 659.L3.36 serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
 L2F5.L3G6 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys

L2F5.L3G11 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
 L2F5.L29 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn
 L2F5.L36 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
 L2F5.L3G6.655 serL50trp, tyrL53gly, methH35ser, tyrL92pro, ileL93lys
 L2F5.L3G11.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
 L2F5.L29.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
 L2F5.L36.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

[0256] Die folgenden Mutanten, nahe gelegt durch einen Homologie-Scan, werden zurzeit konstruiert:

678	thrH30ala
679	thrH30ser
680	lysH64arg
681	leuH96val
682	thrL97ala
683	thrL97ser
684	tyrL96phe
685	tyrL96ala
686	tyrL91 phe
687	thrL56ala
688	glnL28ala
689	glnL28glu

[0257] Die bevorzugte Aminosäure bei H34 wäre Methionin. Ein Wechsel zu Leucin könnte vorgenommen werden, falls Oxidation an dieser Position aufträte.

[0258] AsnH52 und asnH53 wurden als stark bevorzugt für die Bindung erkannt. Änderung dieser Reste zu Alanin und Asparaginsäure setzte die Bindung dramatisch herab.

[0259] Ein intakter Antikörper, umfassend die humanisierte Fab-Version 574 mit einer Schwereketten-Konstantregion von Human-IgG1, ist hergestellt worden (siehe US-Patent Nr. 5.821.337). Der intakte Antikörper wird durch Chinahamster-Eierstock(CHO-) Zellen produziert.

Beispiel 4

Monoklonaler Antikörper 2C4 blockiert die EGF-, TGF- α - oder HRG-vermittelte Aktivierung von MAPK

[0260] Viele Wachstumsfaktor-Rezeptoren signalisieren über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase-(MAPK-) Stoffwechselweg. Diese Doppelspezifitäts-Kinasen sind eine der Schlüssel-Endpunkte in Signalübertragungs-Stoffwechselwegen, die letztlich die Teilung der Krebszellen auslösen. Die Fähigkeit von monoklonalem Antikörper 2C4 oder HERCEPTIN[®], die EGF-, TGF- α - oder HRG-Aktivierung von MAPK zu inhibieren, wurde in der folgenden Weise bestimmt.

[0261] MCF7-Zellen (10^5 Zellen/Napf) wurden in Serum-enthaltenden 12-Napf-Kulturplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellmedien entfernt und jedem Napf frisches, 0,1% Serum enthaltendes Medium zugesetzt. Dieser Vorgang wurde dann am nächsten Tag wiederholt, und vor dem Test wurde das Medium durch serumfreien Bindungspuffer ersetzt (Jones et al., J. Biol. Chem. 273, 11667-74 (1998); und Schaefer et al., J. Biol. Chem. 274, 859-66 (1999)). Zellen wurden bei Raumtemperatur äquilibriert und dann 30 Minuten lang mit 0,5 ml von 200 nM HERCEPTIN[®] oder monoklonalem Antikörper 2C4 inkubiert. Die Zellen wurden dann 15 Minuten lang mit 1 nM EGF, 1 nM TGF- α oder 0,2 nM HRG behandelt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem das Medium abgesaugt und dann 0,2 ml 1% DTT enthaltender SDS-Probenpuffer zugesetzt wurde. MAPK-Aktivierung wurde mittels Western-Blotting bestimmt, unter Verwendung eines Anti-Aktiv-MAPK-Antikörpers (Promega), wie früher beschrieben (Jones et al., J. Biol. Chem. 273, 11667-74 (1998)).

[0262] Wie in [Fig. 10](#) gezeigt ist, blockiert der monoklonale Antikörper 2C4 signifikant EGF-, TGF- α - und HRG-vermittelte Aktivierung von MAPK in einem stärkeren Ausmaß als HERCEPTIN[®]. Diese Daten weisen darauf hin, dass der monoklonale Antikörper 2C4 an eine Oberfläche von ErbB2 bindet, die für dessen Assoziierung mit entweder EGFR oder ErbB3 verwendet wird, und so die Bildung des Signal-Rezeptor-Komplexes verhindert.

Wirkung von HERCEPTIN® auf das Wachstum von androgenabhängigem und androgenunabhängigem menschlichem Prostatakrebs

[0263] Die Wirkung einer HERCEPTIN®-Monotherapie auf androgenabhängige Prostatakrebs-Xenotransplantatmodelle und die Kombination von HERCEPTIN® mit Paclitaxel wurden in präklinischen Modellen von menschlichem Prostatakrebs untersucht. Die androgenabhängigen CWR22- und LNCaP-Human-Prostatakrebs-Xenotransplantatmodelle und androgenunabhängigen Sublinien von CWR22 wurden eingesetzt (Nagabhushan et al., Cancer Res. 56, 3042-3046 (1996); Wainstein et al., Cancer Res. 54, 6049-6052 (1994); und Stearns et al., Prostate 36, 56-58 (1998)).

MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0264] Untersuchungen an Tieren. Vier bis sechs Wochen alte, männliche und weibliche athymische BALB/c-Nacktmäuse wurden vom National Cancer Institute-Frederick Cancer Center erhalten und am Sloan-Kettering Institute in überdruckbelüfteten Käfigen gehalten wurden. Den männlichen Tieren wurden s.c. 1×10^6 LNCaP-Zellen oder zerkleinertes Tumorgewebe vom androgenabhängigen CWR22 inokuliert, und die Weibchen erhielten die androgenunabhängigen Sublinien CWR22R oder CWR22SA1, CWRSA4, CWRSA6, die durch die Selektion von Tumoren für eine Nachzüchtung erhalten wurden, und erhöhtes Serum-PSA nach Androgenentzug. Alle Linien wurden gemeinsam mit einer rekonstituierten Basalmembran injiziert (Matrigel; Collaborative Research, Bedford, MA, USA), wie schon beschrieben wurde (Nagabhushan et al., Cancer Res. 56, 3042-3046 (1996); Wainstein et al., Cancer Res. 54, 6049-6052 (1994), und Sato et al., Cancer Res. 57, 1584-1589 (1997)). Um die Serum-Testosteronwerte aufrechtzuerhalten, wurden männlichen Mäusen 12,5-mg-Retard-Testosteronpellets s.c. implantiert (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA), bevor sie die Tumorzellinokulation erhielten. Behandlungen bestanden aus zweimal wöchentlichen i.p. Injektionen von 20 mg/kg HERCEPTIN® in PBS über nicht mehr als 3 Wochen und/oder einer niedrigen Dosis (6,25 mg/kg s.c., 5 x/Woche x 3 Wochen) oder hohen Dosis (12,5 mg/kg s.c., 5 x/Woche x 2 Wochen) Paclitaxel (TAXOL®, Bristol Myers-Squibb Company, Princeton, NJ, USA) in einer sterilen Kochsalzlösung. Kontrollmäusen wurde ein Vehikel alleine verabreicht. Tumoren wurden alle 3–4 Tage mit Schublehren gemessen, und die Tumorumfänge wurden mithilfe der folgenden Formel berechnet: $p/6 \times \text{größerer Durchmesser} \times (\text{kleinerer Durchmesser})^2$. Tiere mit fühlbaren Tumoren mit einem Volumen von zumindest 65 mm³ wurden Behandlungsgruppen zugeordnet.

[0265] Bestimmung des ErbB2-Status der Xenotransplantate. Xenotransplantate wurden durch Immunhistochemie unter Einsatz des DAKO-ErbB2-Sets (HERCEPTEST®, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) auf ErbB2-Expression untersucht. Die Proben wurden wie folgt durch einen Vergleich mit herkömmlichen Kontrollen in den DAKO-Set-Standards blind untersucht und wie folgt bewertet: 0 (keine Färbung oder Membranfärbung bei weniger als 10% der Tumorzellen), 1⁺ (schwache Membranfärbung wird bei mehr als 10% der Tumorzellen), 2⁺ (schwache bis mäßige vollständige Membranfärbung bei > 10% der Zellen) oder 3⁺ (mäßig bis starke vollständige Membranfärbung bei > 10% der Zellen). Eine Bewertung von 0 oder 1⁺ wurde als negativ in Bezug auf ErbB2-Überexpression betrachtet, während 2⁺ oder 3⁺ auf eine ErbB2-Überexpression hinwiesen. Eine FISH-Analyse wurde unter Einsatz des ONCOR-Sets (INFORM®-ErbB2-Gendetektionssystem, Oncor Inc., Gaithersburg, MD, USA) durchgeführt. Mindestens 100 Tumorzellen pro Tumor wurden auf die nucleäre ErbB2-Genkopienzahl beurteilt (Ross et al., Hum. Pathol. 28, 827-833 (1997)).

[0266] Bestimmung von Serum-PSA-Werten. Blutproben (~50 µl) von männlichen Mäusen, die durch einen Einschnitt in die dorsale Schwanzvene in Mikrotainer-Serumtrennröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gesammelt worden waren, wurden vor der Therapie und am Tag 9 und 21 der Therapie entnommen. Dann wurden PSA-Werte des Serums unter Einsatz des Tandem-R-PSA-Immunoradiometrietests (Hybritech, San Diego, CA, USA) bestimmt.

[0267] Statistische Analyse. Paarweise Unterschiede zwischen den Tumorumfängen der Behandlungsgruppen im Laufe der Zeit wurden mithilfe eines Permutationstests verglichen. Die Nullhypothese für diesen Test ist, dass eine Behandlung keine erkennbare Wirkung auf die Tumorumfänge im Laufe der Zeit hat. Die Statistik, mit der diese Hypothese getestet wurde, war die Summe des Quadrats der Differenz des mittleren Tumorumfanges, zusammengefasst über alle Zeitpunkte.

$$SS_DEV = \sum_{i=1}^k (\bar{x}_i - \bar{y}_i)^2$$

[0268] SS_Dev wurde verwendet, um die mittleren Differenzen zwischen Behandlungsgruppen zu den einzelnen Zeitpunkten zu erhalten. Diese Statistik spiegelt die Menge wider, um die sich der Verlauf des mittleren Tumolvolumens zwischen zwei Behandlungsgruppen unterscheidet.

ERGEBNISSE

[0269] ErbB2-Immunhistochemische Färbung und ErbB2-Genkopienzahl der Prostata-Xenotransplantate. Die ErbB2-Expressionsmuster der androgenabhängigen und androgenunabhängigen Prostata-Xenotransplantate wurden durch Immunhistochemie (IHC) und FISH untersucht. Die parentalen androgenabhängigen CWR22-Tumoren wiesen 2⁺-ErbB2-Färbung auf und die LNCaP-Tumoren 3⁺-ErbB2-Färbung. Die androgenunabhängigen Sublinien von CWR22 zeigen 2⁺-(CWRSA1), 3⁺-(CWRSA4), 2⁺-(CWRSA6) und 1⁺-(CWR22R) Färbung für ErbB2. Alle Tumoren wiesen in FISH eine 2-4-ErbB2-Genkopienzahl (normaler Bereich) auf.

[0270] Wirkungen von HERCEPTIN® auf etablierte Prostatakrebs Xenotransplantate. Tierversuche wurden durchgeführt, um die Wirksamkeit von HERCEPTIN in gut etablierten androgenabhängigen und androgenunabhängigen Prostatakrebs-Xenotransplantaten zu beurteilen. Das CWR22-, LNCaP-, CWR22R- und CWRSA6-Modell wurden für diese Versuche verwendet, weil sie reproduzierbare Wachstumskurven bereitstellen. HERCEPTIN® wurde nach der Etablierung des Xenotransplantats intraperitoneal (i.p.) in einer Dosis von 20 mg/kg zweimal wöchentlich verabreicht. Bei einem Vergleich mit Kontrollen (CWR22R, $p = 0,60$, $n = 10$, [Fig. 11A](#); CWRSA6, $p = 0,63$, $n = 10$, [Fig. 11B](#)) war bei keinem der androgenabhängigen Tumoren eine Wirkung von HERCEPTIN® auf das Tumorwachstum erkennbar. Der murine Anti-ErbB2-Antikörper 4D5 wies ebenfalls keine Wirkung auf das Tumorwachstum in der androgenunabhängigen CWR22R-Linie auf ($p = 0,21$, $n = 10$). Im Gegensatz dazu führte HERCEPTIN® zu einer deutlichen Hemmung in den beiden androgenabhängigen Xenotransplantat-Modellen CWR22 (68% Wachstumshemmung; $p < 0,03$, $n = 12$, [Fig. 11C](#)) und LNCaP (89% Wachstumshemmung; $p = 0,002$, $n = 12$, [Fig. 11D](#)).

[0271] Wirkungen von HERCEPTIN® kombiniert mit TAXOL® auf etablierte Tumor Xenotransplantate. Als Paclitaxel und HERCEPTIN® gemeinsam an Tiere verabreicht wurden, kam es zu einer deutlichen Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zu Kontrollen, und das sowohl bei androgenabhängigen als auch bei androgenunabhängigen Tumoren (CWR22 98% Wachstumshemmung, $p < 0,01$, [Fig. 11E](#), CWR22R, 92% Wachstumshemmung, $p < 0,01$, [Fig. 11G](#); LNCaP 94% Wachstumshemmung, $p = 0,006$, [Fig. 11F](#); CWRSA6 77% Wachstumshemmung, $p < 0,01$, [Fig. 11H](#)). Bei der Kombination von HERCEPTIN® mit Paclitaxel war am Ende des Behandlungszeitraums bei den Tieren mit androgenabhängigen Xenotransplantaten ([Fig. 11E–H](#)) eine gesteigerte Wachstumshemmung im Vergleich zu beiden Wirkstoffen alleine zu beobachten: die CWR22-Gruppe (mittlere Tumolvolumina, $n = 6$ in jeder Gruppe, Paclitaxel 408 mm³, HERCEPTIN® 520 mm³, Paclitaxel und HERCEPTIN® 76 mm³; $p < 0,03$ Paclitaxel versus Paclitaxel und HERCEPTIN®) und die LNCaP-Gruppe (mittlere Tumolvolumina, $n = 6$ in jeder Gruppe, Paclitaxel 233 mm³, HERCEPTIN® 163 mm³, Paclitaxel und HERCEPTIN® 82 mm³; $p < 0,03$ Paclitaxel versus Paclitaxel und HERCEPTIN®). Außerdem war bei der Kombination von HERCEPTIN® und Paclitaxel im Vergleich zu den Wirkstoffen alleine am Ende der Behandlungsdauer bei Tieren mit androgenunabhängigen Xenotransplantaten ([Fig. 11E–H](#)) ebenfalls eine gesteigerte Wachstumshemmung zu beobachten: die CWRSA6-Gruppe (mittlere Tumolvolumina, $n = 5$ in jeder Gruppe, Paclitaxel 1.496 mm³, HERCEPTIN® 2.941 mm³, Paclitaxel und HERCEPTIN® 687 mm³; $p < 0,001$ Paclitaxel versus Paclitaxel und HERCEPTIN®) und die CWR22R-Gruppe (mittlere Tumolvolumina, $n = 5$ in jeder Gruppe, Paclitaxel 1.273 mm³, HERCEPTIN® 3.811 mm³, Paclitaxel und HERCEPTIN® 592 mm³; $p = 0,095$ Paclitaxel versus Paclitaxel und HERCEPTIN®).

[0272] Wirkungen von HERCEPTIN® auf den PSA-Index in behandelten Tieren mit androgenabhängigen Xenotransplantaten. Wie in [Fig. 12A](#) und B zu sehen gab es eine deutliche Steigerung des prostataspezifischen Antigen-(PSA-) Index (ng PSA/ml Serum/mm³ Tumor) in mit HERCEPTIN® behandelten androgenabhängigen Gruppen im Vergleich mit einer Kontrolle (CWR22, 1864% versus -4%, $p < 0,0001$, [Fig. 12A](#); LNCaP, 232% versus -68%, $p < 0,0001$, [Fig. 12B](#)). Außerdem gab es eine Steigerung des PSA-Index nach einer Kombinationsbehandlung mit HERCEPTIN® und Paclitaxel im Vergleich mit Werten vor der Behandlung.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0273] In diesen Prostatakrebs-Modellsystemen wies HERCEPTIN® alleine nur bei den androgenabhängigen Tumoren Aktivität auf und hatte zumindest eine additive Wirkung auf das Wachstum, und zwar in Kombination mit Paclitaxel, und dies sowohl bei androgenabhängigen als auch androgenunabhängigen Tumoren. Die Reaktion auf HERCEPTIN® korrelierte nicht mit den PSA-Werten, und der PSA-Index stieg in der mit HERCEPTIN® behandelten Gruppe deutlich an, während er in der Kontrollgruppe konstant blieb.

Beispiel 6

Wirkung von monoklonalem Antikörper 2C4 auf das Wachstum von androgenabhängigem und androgenunabhängigem menschlichem Prostatakrebs

[0274] Die Wirkung eines Antikörpers, der Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, auf menschlichen Prostatakrebs wurde beurteilt. Vor allem die Reaktion von Xenotransplantat-Tumoren auf HERCEPTIN®, monoklonalen Antikörper 2C4, Paclitaxel und eine 2C4/Paclitaxel-Kombinationsbehandlung wurde mithilfe des androgenabhängigen Tumors CWR22 und der androgenunabhängigen Tumoren CWR22R und CWRSA6 wie oben in Beispiel 5 beschrieben bestimmt. Die Antikörper und Paclitaxel wurden wie in Beispiel 5 beschrieben verabreicht.

[0275] Die Reaktion des androgenabhängigen Tumors CWR22 auf die Therapie ist in [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#) dargestellt. Die Ergebnisse sind als mittleres Tumolvolumen $\pm$ SF angegeben. Die in [Fig. 13](#) dargestellten Tumolvolumina der Tiere zeigen, dass HERCEPTIN® klinische Aktivität in diesem androgenabhängigen Modell aufweist, wie auch der monoklonale Antikörper 2C4. Die Kombination des monoklonalen Antikörpers 2C4 mit TAXOL® ergibt erhöhte Wachstumshemmung im Vergleich mit entweder 2C4 oder TAXOL® alleine ([Fig. 14](#); $p = 0,003$).

[0276] Die Reaktion der androgenabhängigen Tumoren CWR22R und CWRSA6 auf eine Therapie mit HERCEPTIN®, monoklonalem Antikörper 2C4, Paclitaxel oder eine 2C4/Paclitaxel-Kombinationsbehandlung ist in [Fig. 15–Fig. 18](#) dargestellt. Die Ergebnisse sind als mittleres Tumolvolumen $\pm$ SF angegeben. Die in [Fig. 15](#) und [Fig. 17](#) dargestellten Tumolvolumina der Tiere zeigen, dass HERCEPTIN® wenig oder keine klinische Aktivität in diesen androgenunabhängigen Modellen aufweist, während der monoklonale Antikörper 2C4 klinische Aktivität in diesen Modellen aufweist. Die Kombination des monoklonalen Antikörpers 2C4 mit TAXOL® ergibt erhöhte Wachstumshemmung im Vergleich mit entweder 2C4 oder TAXOL® alleine ([Fig. 16](#) und [Fig. 18](#); $p = 0,002$).

[0277] Ein Fab'-Fragment von rhuMAb 2C4 wurde in E. coli exprimiert und wie in WO 98/37200 beschrieben an ein verzweigtes 20-kD-Polyethylenglykol (PEG) konjugiert. Die Fähigkeit des murinen 2C4-Antikörpers (20 mg/kg), von rhuMAb 2C4 (20 mg/kg) und des pegylierten Fab-Fragments (PEG-Fab, 20 oder 40 mg/kg), androgenunabhängigen Prostatakrebs in vivo zu behandeln, wurde mithilfe des obigen CWR22R-Xenotransplantats beurteilt. Alle Injektionen erfolgen IP ($N = 5$). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in [Fig. 23](#) dargestellt. Die Daten zeigen, dass die Tumorchemmung mit 2C4 im CWR22R-Modell keinen intakten, zweiwertigen Antikörper erfordert. Da diese Fab-Fragmente kein Fc enthalten, kann ein immunologischer Mechanismus wie ADCC mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse stimmten mit den in [Fig. 6](#) gezeigten überein, wo ein In-vitro-System und chimäre Versionen von 2C4-Fab verwendet wurden. Die Beobachtung, dass 2C4 Tumorstadium als einwertiges Fragment hemmt, unterstützt die Ansicht, dass diese Hemmung das Ergebnis einer Blockade der Fähigkeit von ErbB2 ist, mit anderen ErbB-Familienmitgliedern ein Heterodimer zu bilden, und so die Initiierung von Downstream-Signalvorgängen hemmt.

[0278] Dosis-Wirkungs-Untersuchungen wurden unter Einsatz von rhuMAb 4D5 in den androgenunabhängigen CWR22R- und MSKPC6-Prostata-Xenotransplantaten durchgeführt (Agus et al., Cancer Research 59, 4761-4764 (1999)). Tieren wurde Folgendes IP verabreicht: Kontrolle; 6 mg/kg Belastungsdosis, dann 3 mg/kg zweimal wöchentlich; 20 mg/kg Belastungsdosis, dann 20 mg/kg zweimal wöchentlich; oder 60 mg/kg Belastungsdosis, dann 40 mg/kg zweimal wöchentlich. Die Ergebnisse dieser Studien sind in [Fig. 24](#) und [Fig. 25](#) dargestellt. Diese Daten zeigen, dass 2C4 das Wachstum von androgenunabhängigen Tumor-Xenotransplantaten auf dosisabhängige Weise unterdrückt. Außerdem bestätigten diese Ergebnisse erneut, dass diese Hemmung von Tumorstadium auf die 2C4-Behandlung und nicht auf einen Versuchseffekt zurückzuführen ist.

[0279] Eine Zusammenfassung typischer Ergebnisse aus den Untersuchungen aus Beispiel 5 und 6 ist in [Fig. 21](#) zu sehen.

Beispiel 7

TGF- α - und HB-EGF-Werte bei androgenabhängigem und androgenunabhängigem menschlichem Prostatakrebs

[0280] In diesem Beispiel wurden die TGF- α - und HB-EGF-mRNA-Werte in CWR22-Zellen (androgenabhängig) und CWR22R-Zellen (androgenunabhängig) bewertet.

[0281] mRNA-Herstellung. Gefrorenes Tumorgewebe wurde laut der Qiagen-Arbeitsvorschrift (Qiagen Maxi Set Nr. 57163) bearbeitet. Kurz gesagt wurde eine Homogenisierung von Gewebe mit einem Brinkman-Polytron-Homogenisator (Pt-3000) erreicht, der mit dem PT-DA-3012/2-TS-Generator ausgestattet war, wobei 15-Sekunden-Impulse und 30-Sekunden-Pausen eingesetzt wurden. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, und das Extrakt wurde auf eine Qiagen-Säule gegeben und gemäß den Anleitungen des Herstellers gewaschen. Die Säulen wurden mit 1 ml RNase-freiem Wasser eluiert, und der RNA-Gehalt wurde durch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Da TGF- α und HB-EGF in der Zelllinie MDA-MB-231 exprimiert werden, wurde die Gesamt-RNA aus diesen Zellen als Standard für die TGF- α - und HB-EGF-Quantifizierung verwendet.

[0282] Quantitative Echtzeit-PCR. TGF- α - und HB-EGF-mRNA wurde unter Verwendung von quantitativer Echtzeit-PCR oder des TagMan-Verfahrens wie schon beschrieben quantifiziert (Gibson et al., Genome Research 6, 986-994 (1996); und Heid et al., Genomic Research 6, 986-994 (1996)). Die Sequenz der Primer/Sonden-Sätze, die für diese Analyse verwendet wurden, ist nachstehend dargestellt:

TGF- α

F 5'-GGACAGCACTGCCAGAGA-3' (Seq.-ID Nr. 14)
 R 5'-CAGGTGATTACAGGCCAAGTAG-3' (Seq.-ID Nr. 15)
 P 5'-FAM-CCTGGGTGTGCCACAGACCTTCA-TAMRA-p-3' (Seq.-ID Nr. 16)

HB-EGF:

F 5'-TGAAGTTACCTCCAGGTTGGT-3' (Seq.-ID Nr. 17)
 R 5'-AGACACATTCTGTCCATTTTCAA-3' (Seq.-ID Nr. 18)
 P 5'-FAM-CAAGCTGCAAAGTGCCTTGCTCAT-TAMRA-p-3' (Seq.-ID Nr. 19) worin F und R Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer sind und P die fluoreszierend markierte Sonde ist. β -Actin wurde als konstitutives Gen verwendet. Primer/Sonden-Sätze für β -Actin sind:

β -Actin

F 5'-ATGTATCACAGCCTGTACCTG-3' (Seq.-ID Nr. 20)
 R 5'-TTCTTGGTCTCTTCCTCCTTG-3' (Seq.-ID Nr. 21)
 P 5'-FAM-AGGTCTAAGACCAAGGAAGCACGCAA-TAMRA-p-3' (Seq.-ID Nr. 22)

[0283] Eine TaqMan-Analyse wurde in einem Standard-96-Napf-Plattenformat durchgeführt. Standardkurven wurden unter Verwendung von 0,6-150 ng mRNA für die TGF- α und HB-EGF-Analyse und 9,5-150 ng für β -Actin konstruiert. Jede Verdünnung wurde doppelt laufen gelassen. Als Tumorproben wurden für alle analysierten Gene 100 ng verwendet.

ERGEBNISSE

[0284] Wie in [Fig. 19–Fig. 20](#) dargestellt exprimierte die androgenunabhängige Prostatatumorlinie CWR22R deutlich höhere Werte von EGFR-Liganden-TGF- α und -HB-EGF als die androgenabhängige Zelllinie CWR22. Im Detail wurde TGF- α 8- bis 9-mal stärker im CWR22R-Tumor exprimiert als im CWR22-Tumor. Auf ähnliche Weise wurde HB-EGF in CWR22R ~ 19-mal stärker exprimiert als in CWR22.

Beispiel 8

Wirkung von 2C4 oder HERCEPTIN® auf den PSA-Index in Tieren mit androgenabhängigen Xenotransplantaten

[0285] Wie in [Fig. 22](#) dargestellt wurde der PSA-Index (definiert als ng PSA/ml Serum/mm³ Tumor) in androgenabhängigen Tieren am Tag 21, also gegen Ende der Behandlung, gemessen. Es gab eine deutliche Steigerung des PSA-Index bei mit HERCEPTIN® behandelten, androgenabhängigen Tieren, während die Kontrolltiere eine Verringerung des PSA-Index aufwiesen (LNCaP:Kontrolle = 0,6 in Bezug zum Wert vor der Behandlung, HERCEPTIN®-Gruppe = 2,35 in Bezug zum Vorbehandlungswert am Tag 21; CWR22:Kontrolle = 1,0 in Bezug zum Vorbehandlungswert, HERCEPTIN®-Gruppe = 18 in Bezug zum Vorbehandlungswert am Tag 21). Der relative PSA-Index nahm in der LNCaP-unbehandelten Gruppe ab, wahrscheinlich sekundär zu einer ge-

steigerten Nekrose mit wachsender Tumorgroße. Im Gegensatz dazu hatte 2C4 keine erkennbare Auswirkung auf den PSA-Index von behandelten Tumoren im Vergleich mit Kontrollen. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie festlegen zu wollen, könnte eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen mit dem Grad der ErbB2-Aktivierung in Prostatakrebszellen zusammenhängen. ErbB2-Aktivierung kann androgenunabhängiges Wachstum durch eine Überschneidung mit dem Androgenrezeptor-Signalstoff-Stoffwechselweg verursachen (Craft et al., Nature Med. 5, 280-285 (1999)). In den Modellsystemen der Erfindung führte an ErbB2 bindendes HERCEPTIN® zu erhöhter zellulärer Sekretion von PSA auf androgenunabhängige Weise (Agus et al., Cancer Res. 59, 4761-4764 (1999)). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme einer Überschneidung zwischen dem ErbB2- und dem Androgenrezeptor-Signalstoff-Stoffwechselweg.

Beispiel 9

Wirkung von 7C2-Anti-ErbB2-Antikörper auf androgenabhängige und -unabhängige Xenotransplantate

[0286] Die Wirkung eines monoklonalen Antikörpers 7C2 (ATCC HB-12215), der Apoptose von ErbB2 überexprimierenden Zellen verursacht, wurde im androgenabhängigen CWR22-Xenotransplantat mit der eines monoklonalen Antikörpers 2C4 verglichen. Beide Antikörper wurden zweimal wöchentlich in einer Dosis von 20 mg/kg verabreicht. Wie in [Fig. 26](#) dargestellt ist 7C2, genauso wie 2C4 und HERCEPTIN®, wirksam bei der Behandlung von androgenabhängigem Prostatakrebs. Die Wirkung von 7C2 auf androgenunabhängigen Prostatakrebs wurde ebenfalls unter Einsatz des CWR22R-Xenotransplantats beurteilt. [Fig. 27](#) zeigt, dass 7C2 alleine in diesem Modell nicht wirksam, in Kombination mit TAXOL® jedoch wirksam war.

Beispiel 10

Therapie von rezidiv oder refraktär metastatischem Prostatakrebs

[0287] RhuMAb-2C4 ist ein humanisierter, monoklonaler Vollängen-Antikörper (produziert in CHO-Zellen) gegen ErbB2. RhuMAb-2C4 blockiert die Assoziation von ErbB2 mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie und inhibiert so die intrazelluläre Signalisierung über den ErbB-Stoffwechselweg. Im Gegensatz zu HERCEPTIN®, inhibiert rhuMAb-2C4 nicht nur das Wachstum von ErbB2-überexprimierenden Tumoren, sondern blockiert auch das Wachstum von Tumoren, die ErbB-Liganden-abhängige Signalisierung erfordern.

[0288] RhuMAb-2C4 ist als ein einzelnes Mittel für die Behandlung von Hormon-refraktären (Androgen-unabhängigen) Prostatakrebs-Patienten indiziert. Primäre Endpunkte der Effizienz umfassen Gesamt-Überleben im Vergleich zur bestmöglichen Behandlung (Mitoxantron/Prednison), wenn als Einzelmittel verwendet, und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Zeit zur Krankheitsfortschreitung, Ansprechrate, Lebensqualität, Schmerz und/oder Dauer der Reaktion. RhuMAb-2C4 wird intravenös (IV) wöchentlich oder alle drei Wochen mit 2 bzw. 4 mg/kg bis zur Krankheits-Progression verabreicht. Der Antikörper wird als eine flüssige Multi-Dosis-Formulierung (20-ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

[0289] RhuMAb-2C4 ist auch indiziert in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von Hormon-refraktären (Androgen-unabhängigen) Prostatakrebs-Patienten. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Gesamt-Überleben im Vergleich mit Chemotherapie und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Ansprechrate, Lebensqualität, Schmerz und/oder Dauer der Reaktion. RhuMAb-2C4 wird intravenös (IV) wöchentlich oder alle drei Wochen mit 2 bzw. 4 mg/kg bis zur Krankheits-Progression verabreicht. Der Antikörper wird als eine flüssige Multi-Dosis-Formulierung (20-ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

[0290] Beispiele für Medikamente, die mit dem Anti-ErbB2-Antikörper (der die Liganden-Aktivierung des ErbB2-Rezeptors blockiert) kombiniert werden können, um Prostatakrebs (z.B. Androgen-unabhängigen Prostatakrebs) zu behandeln, umfassen einen Farnesyl-Transferase-Inhibitor; ein Anti-Angiogenese-Mittel (z.B. einen Anti-VEGF-Antikörper); ein EGFR-Target-Medikament (z.B. C225 oder ZD1839); einen weiteren Anti-ErbB2-Antikörper (z.B. einen wachstumshemmenden Anti-ErbB2-Antikörper, wie z.B. HERCEPTIN®, oder einen Anti-ErbB2-Antikörper, der Apoptose induziert, wie z.B. 7C2 oder 7F3, einschließlich humanisierte und/oder affinitätsgeriffte Varianten davon); ein Cytokin (z.B. IL-2, IL-12, G-CSF oder GM-CSF); ein Anti-Androgen (wie z.B. Flutamid oder Cyproteron-Acetat); Leuprolid; Suramin; ein chemotherapeutisches Mittel, wie z.B. Vinblastin, Estramustin, Mitoxantron, Liarozol (ein Retinolsäure-Metabolismus-blockierendes Mittel), Cyclophosphamid, Anthracyclin-Antibiotika, wie z.B. Doxorubicin, ein Taxan (z.B. Paclitaxel oder Docetaxel), oder Methotrexat oder jede andere Kombination von obigem, wie z.B. Vinblastin/Estramustin oder Cyclophosphat.

mid/Doxorubicin/Methotrexat; Prednison; Hydrocortison oder eine Kombination davon. Standard-Dosierungen für diese verschiedenen Medikamente können verabreicht werden, z.B. 40 mg/m²/Woche Docetaxel (TAXOTERE®); 6(AUC)-Carboplatin und 200 mg/m² Paclitaxel (TAXOL®).

Sequenzprotokoll

<110> Genentech, Inc., et al.

<120> BEHANDLUNG VON PROSTATA-KREBS MIT ANTI-ErbB2-ANTIKÖRPERN

<130> P1760R1PCT

<141> 23. 6. 2000

<150> US 60/141.315

<151> 25. 6. 1999

<160> 22

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 1

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> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	1	5	10	15
Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	20	25	30	
Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	50	55	60	

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser

				65					70					75
Ser	Arg	Ile	Val	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	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	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	
				110					115					

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> künstlich

<400> 3
 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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 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> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> künstlich

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

<400> 4
 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> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> künstlich

<400> 5
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> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> künstlich

<400> 6
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
				95	
					Ala
					Arg
					Gly
					Arg
					Val
					Gly
					Tyr
					Ser
					Leu
					105

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> ungewiss
 <222> 10
 <223> unbekannte Aminosäure

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 1 5 10

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 1 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> ungewiss
 <222> 5-7
 <223> unbekannte Aminosäure

<400> 11
 Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 13

<211> 645

<212> PRT

<213> menschlich

<400> 13

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp
20 25 30Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met
35 40 45Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu
50 55 60Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln
65 70 75Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln
80 85 90Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr
95 100 105Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly
110 115 120Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly
125 130 135Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
140 145 150Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp
155 160 165Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala
170 175 180Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys
185 190 195Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu
200 205 210Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala
215 220 225Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys	245	250	255
Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala	260	265	270
Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro	275	280	285
Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro	290	295	300
Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys	305	310	315
Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg	320	325	330
Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu	335	340	345
Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn	350	355	360
Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala	365	370	375
Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala	380	385	390
Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu	395	400	405
Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro	410	415	420
Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile	425	430	435
Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile	440	445	450
Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu	455	460	465
Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val	470	475	480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His	485	490	495
Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala	500	505	510
Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro	515	520	525
Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys	530	535	540
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val	545	550	555
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln			

560	565	570
Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro	Glu Ala Asp Gln Cys Val	
575	580	585
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro	Phe Cys Val Ala Arg Cys	
590	595	600
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser	Tyr Met Pro Ile Trp Lys	
605	610	615
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln	Pro Cys Pro Ile Asn Cys	
620	625	630
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp	Lys Gly Cys Pro Ala Glu	
635	640	645

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> künstlich

<400> 14

ggacagcact gccagaga 18

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> künstlich

<400> 15

caggtgatta caggccaagt ag 22

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> künstlich

<400> 16

cctgggtgtg ccacagacct tca 23

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> künstlich

<400> 17

tgaagttacc tccaggttgg t 21

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> künstlich

<400> 18

agacacattc tgtccatttt caa 23

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> künstlich

<400> 19

caagctgcaa agtgccttgc tcat 24

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> künstlich

<400> 20
 atgtatcaca gctgtacct g 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> künstlich

<400> 21
 ttcttggtct ctctctcctt g 21

<210> 22
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> künstlich

<400> 22
 aggtctaaga ccaaggaagc acgcaa 26

Patentansprüche

1. Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 geoffenbart ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs beim Menschen, worin der Antikörper die Bindung eines monoklonalen Antikörpers 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, an ErbB2 blockiert.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Prostatakrebs ein androgenunabhängiger Prostatakrebs ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Antikörper TGF- α -Aktivierung von mitogenaktivierter Protein-kinase (MAPK) blockiert.

4. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Antikörper die Bildung eines ErbB-Heterooligomers blockiert.

5. Verwendung nach Anspruch 4, worin der Antikörper einen monoklonalen Antikörper 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, oder einen humanisierten 2C4 umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Antikörper ein Antikörperfragment ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, worin das Antikörperfragment ein Fab-Fragment ist.

8. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Antikörper nicht mit einem zytotoxischen Mittel konjugiert ist.

9. Verwendung nach Anspruch 6, worin das Antikörperfragment nicht mit einem zytotoxischen Mittel konjugiert ist.

10. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Antikörper mit einem zytotoxischen Mittel konjugiert ist.

11. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Prostatakrebs ein androgenabhängiger Prostatakrebs ist.

12. Verwendung nach Anspruch 11, worin das Medikament weiters ein Taxan enthält.

13. Verwendung nach Anspruch 11, worin die Verabreichung des Medikaments zu einem erhöhten prostata-spezifischen Antigen-(PSA-) Index im Menschen führt.

14. Verwendung nach Anspruch 11, worin der Antikörper einen monoklonalen Antikörper 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, oder einen humanisierten 2C4 umfasst.

15. Verwendung eines Chemotherapeutikums und eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 geoffenbart ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prostatakrebs beim Menschen, worin der Antikörper die Bindung eines monoklonalen Antikörpers 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, an ErbB2 blockiert.

16. Verwendung nach Anspruch 15, worin das Chemotherapeutikum ein Taxan ist.

17. Fabrikat, einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung umfassend, worin die Zusammensetzung einen Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors 50–100% wirksamer blockiert als ein humanisierter monoklonaler Antikörper huMAb4D5-8, wie im US-Patent 5.821.337 geoffenbart ist, und weiters eine Packungsbeilage umfassend, in der angegeben ist, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt werden kann, worin der Antikörper die Bindung eines monoklonalen Antikörpers 2C4, der bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer HB12697 erhältlich ist, an ErbB2 blockiert.

18. Fabrikat nach Anspruch 17, worin der Prostatakrebs ein androgenunabhängiger Prostatakrebs ist.

19. Fabrikat nach Anspruch 17, worin die Packungsbeilage weiters die Behandlung des Patienten mit einem Chemotherapeutikum angibt.

20. Fabrikat nach Anspruch 19, worin das Chemotherapeutikum ein Taxan ist.

21. Fabrikat nach Anspruch 17, worin der Prostatakrebs ein androgenabhängiger Prostatakrebs ist.

Es folgen 23 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVVGQNL ELTYLPTNAS LSFLODIQEV QGYVLIHNO VRQVPLQRLR
101 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK
201 GSRGWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP
301 YNYLSTDVGS CTLVCPHLNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF
401 ETLEEITGYL YISAWPDSL P DLVSFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWGLRLSLRE LGSGLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP
501 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLOGL PREYVNARHC LPCHPECQPO NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC
601 PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (Seq.-ID Nr. 13)

FIG._ 1A

7C2	aa	22-53	(31 Reste)
7F3	aa	22-53	(31 Reste)
2C4	aa	22-584	(562 Reste)
7D3	aa	22-584	(562 Reste)
3E8	aa	512-625	(113 Reste)
4D5	aa	529-625	(96 Reste)
2H11	aa	529-645	(116 Reste)
3H4	aa	541-599	(58 Reste)

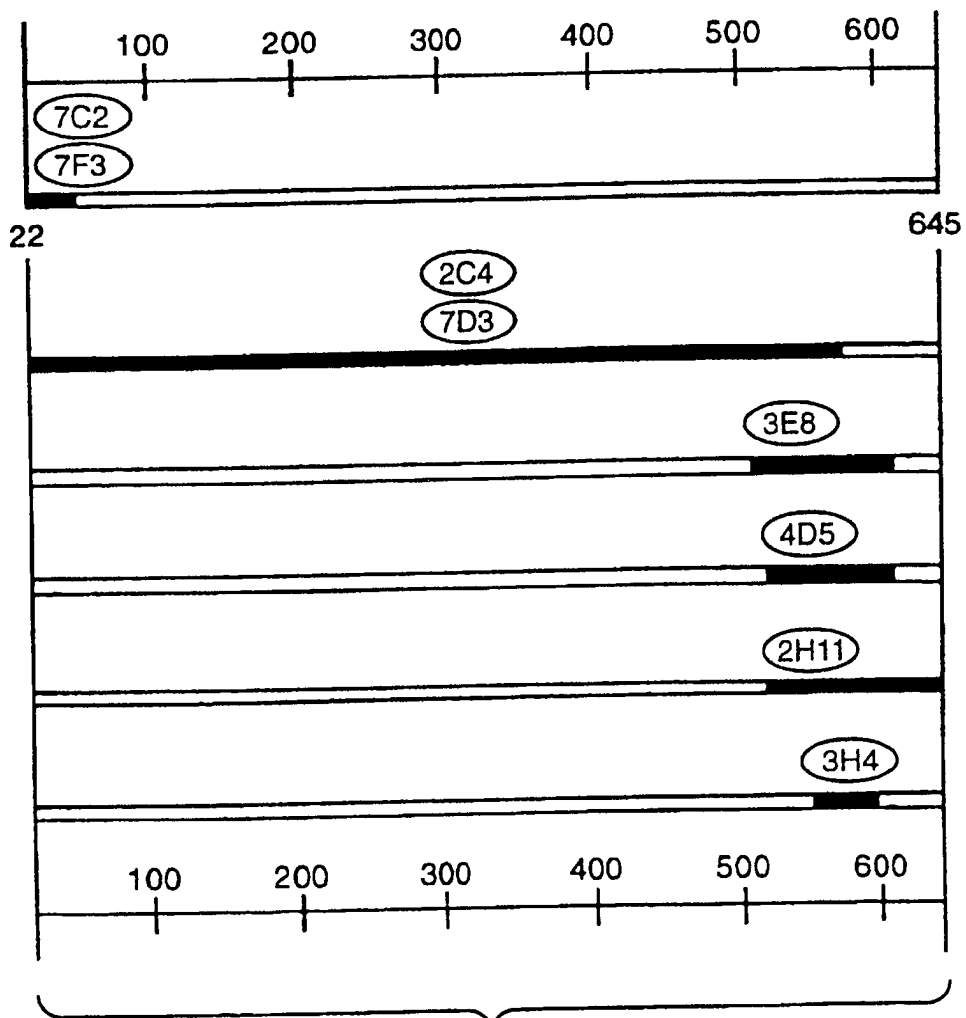
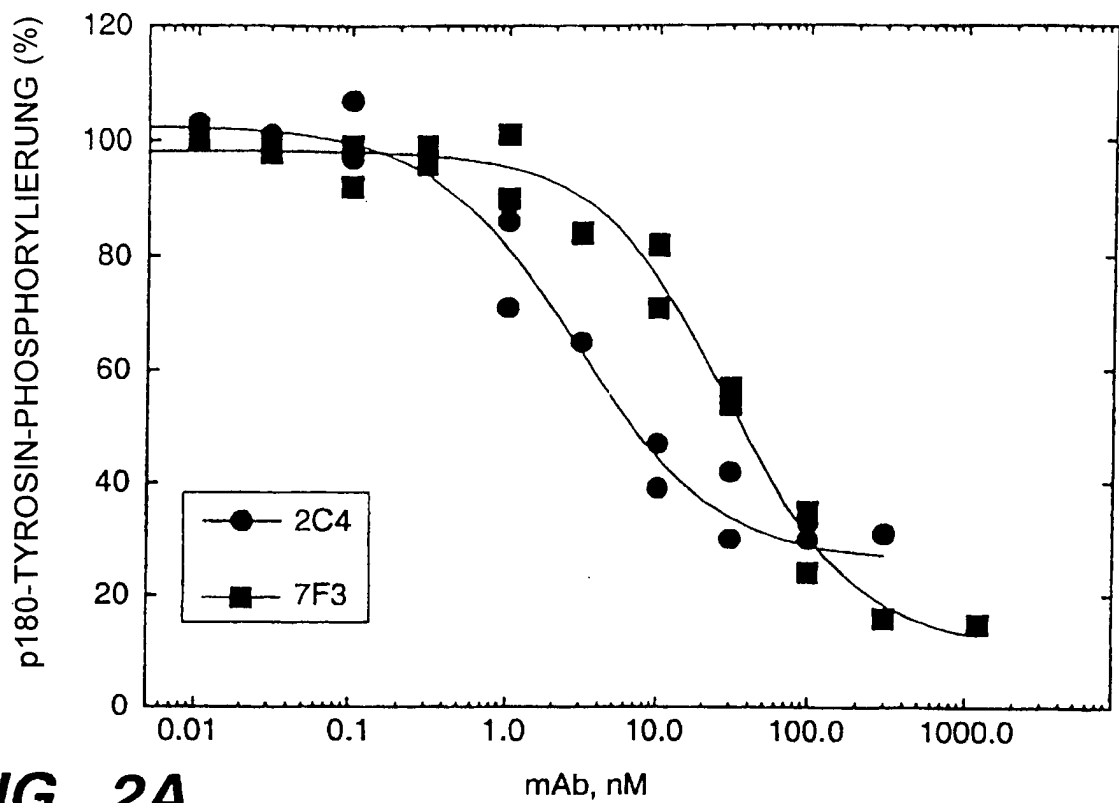
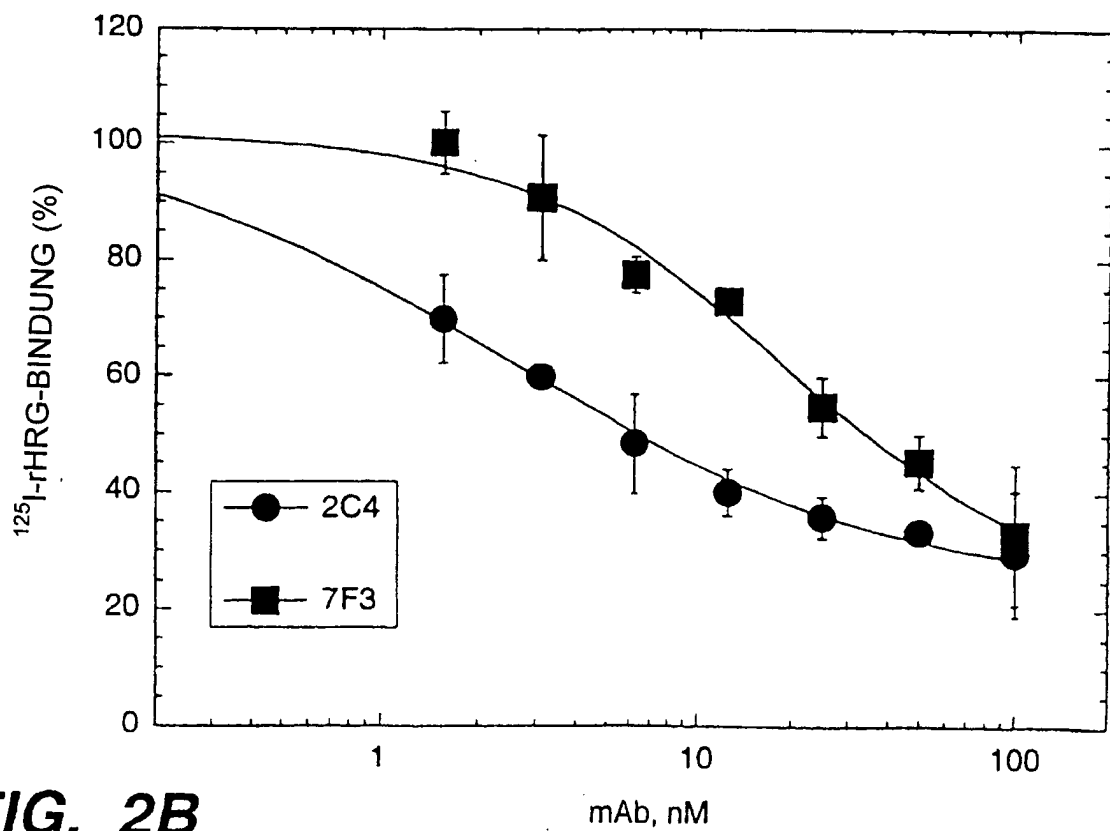
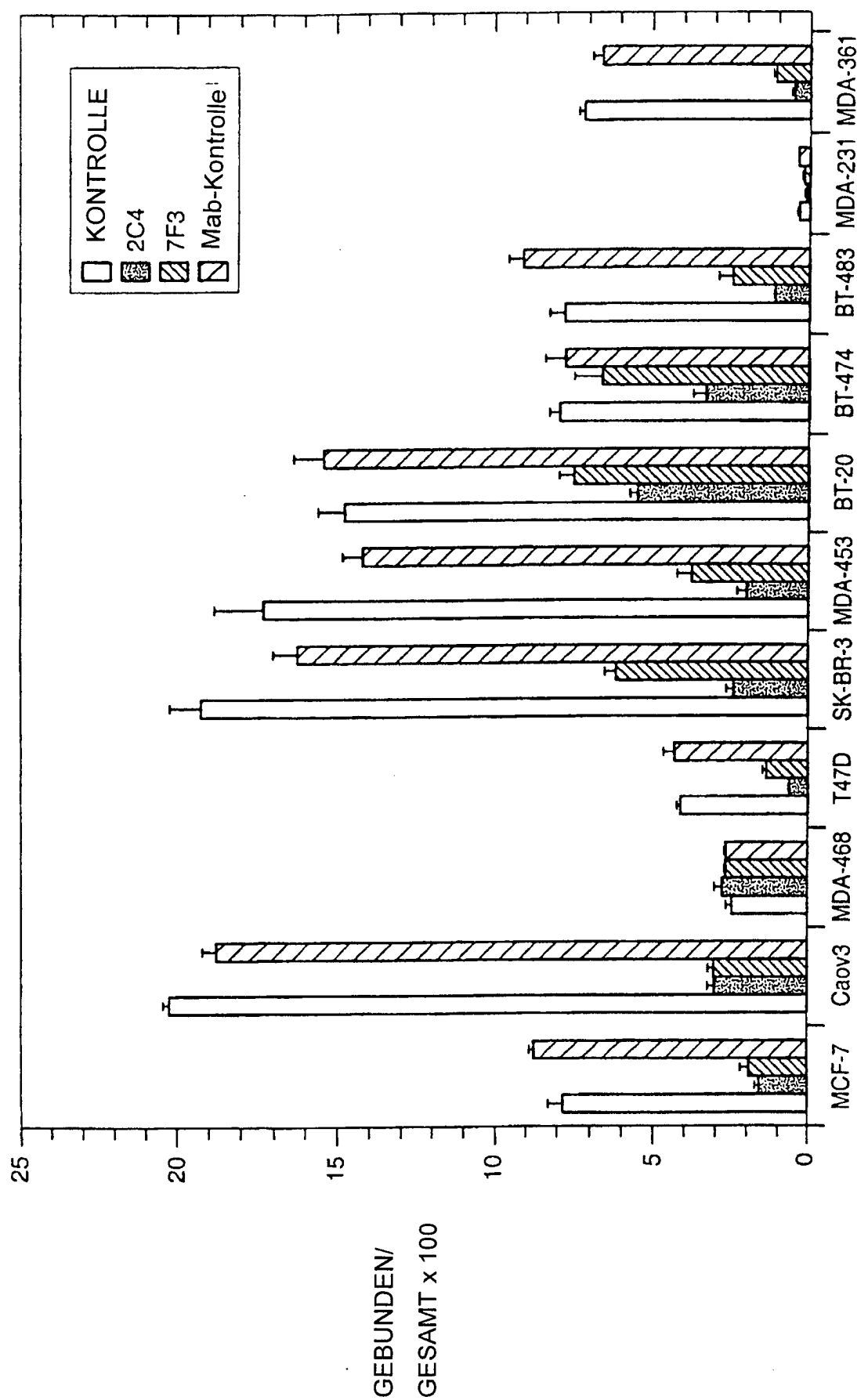


FIG. 1B

**FIG. 2A****FIG. 2B**

**FIG.-3**

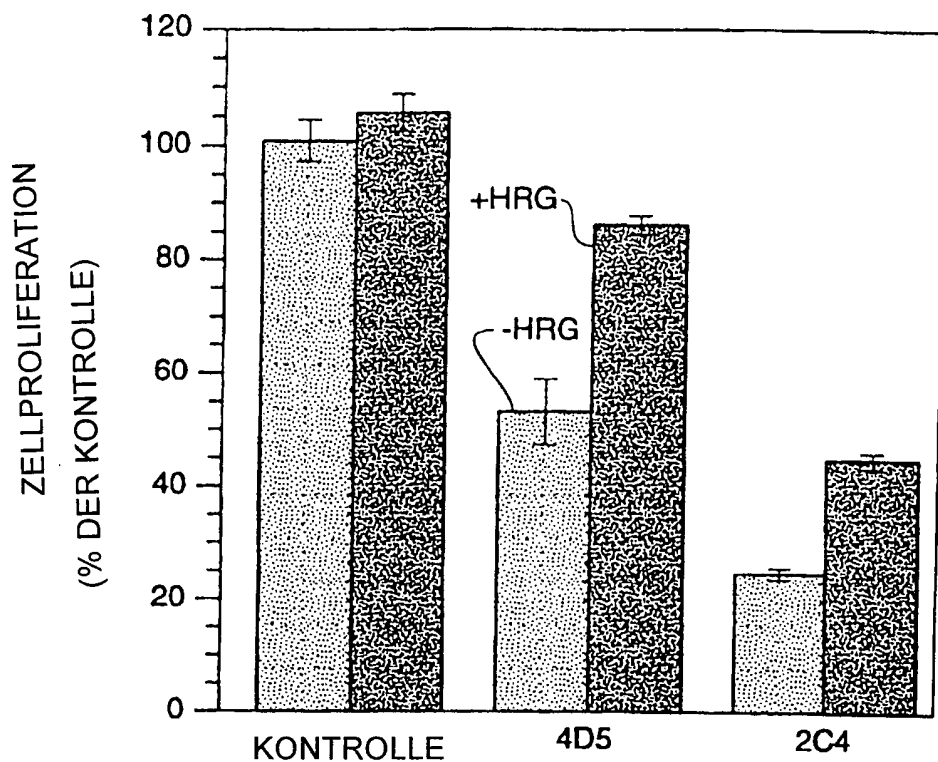


FIG. 4A

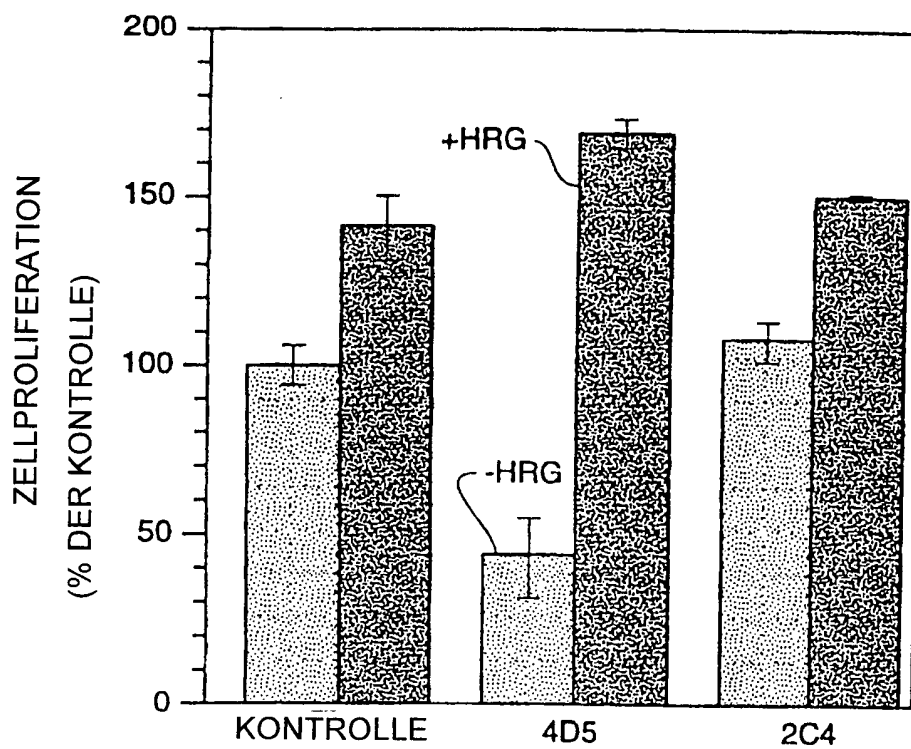
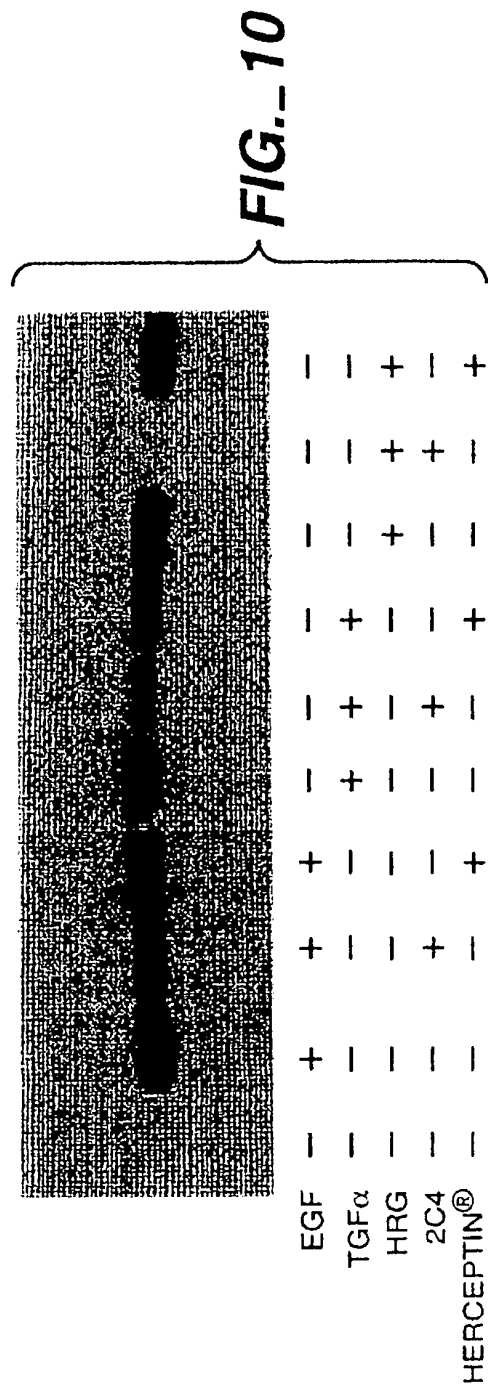
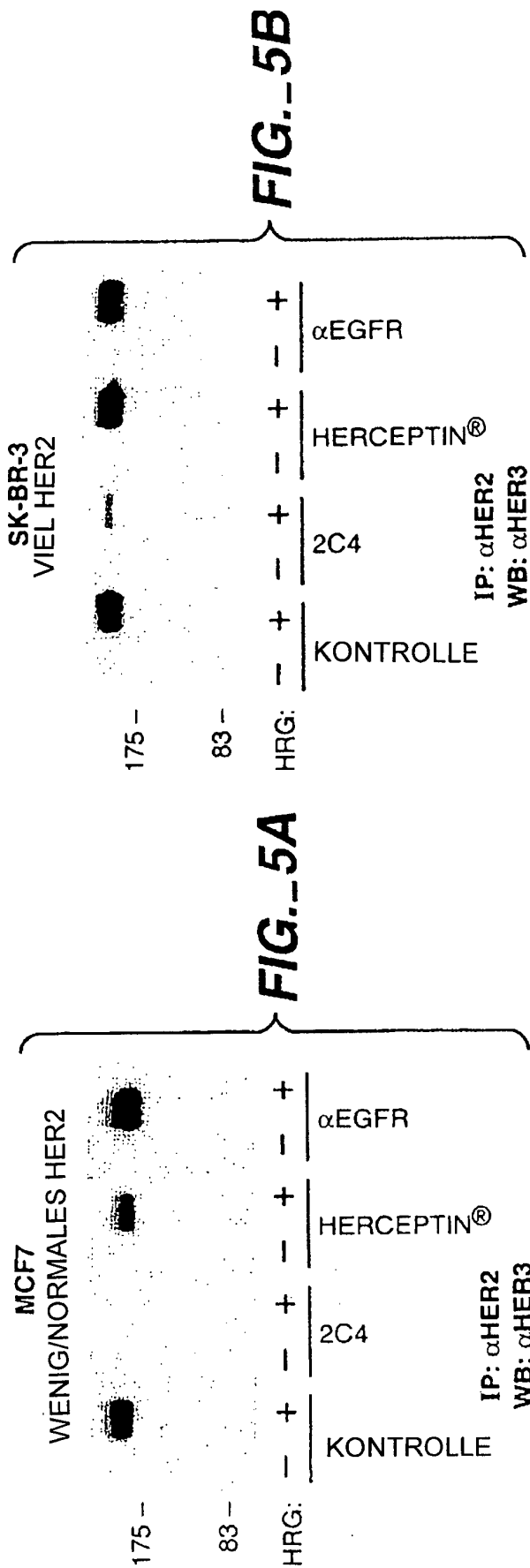


FIG. 4B



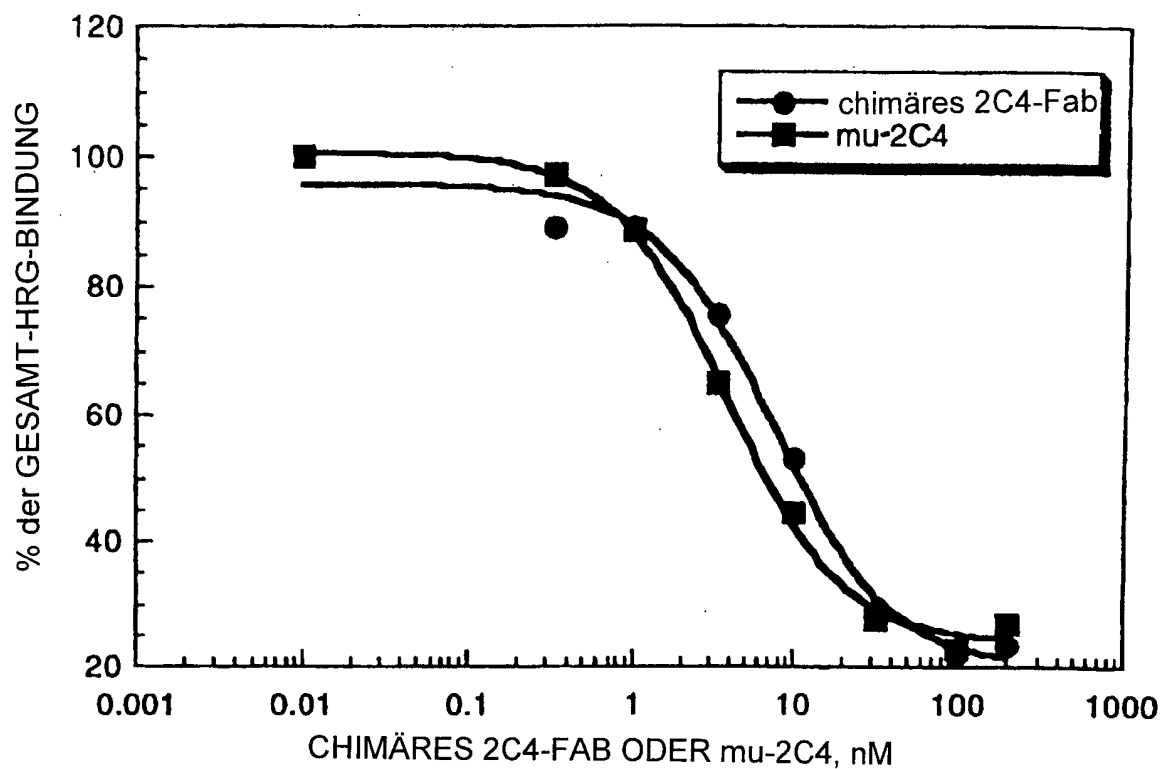


FIG._6A

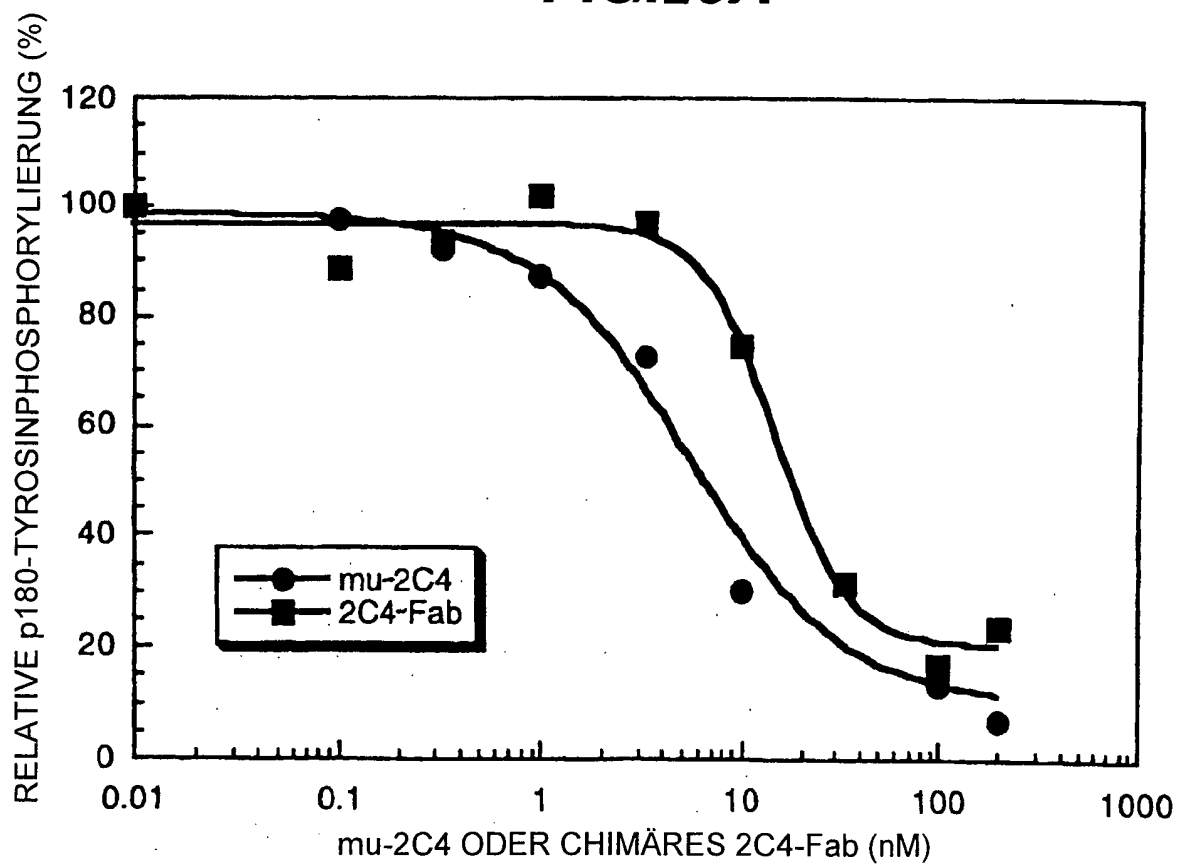


FIG._6B

VARIABEL LEICHT

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP	
	** **** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISINYLA]	WYQQKP	

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQA		
	**	* *	*	* *
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP		

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK	(Seq.-ID Nr. 1)
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(Seq.-ID Nr. 3)
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(Seq.-ID Nr. 5)

FIG._7A

VARIABEL SCHWER

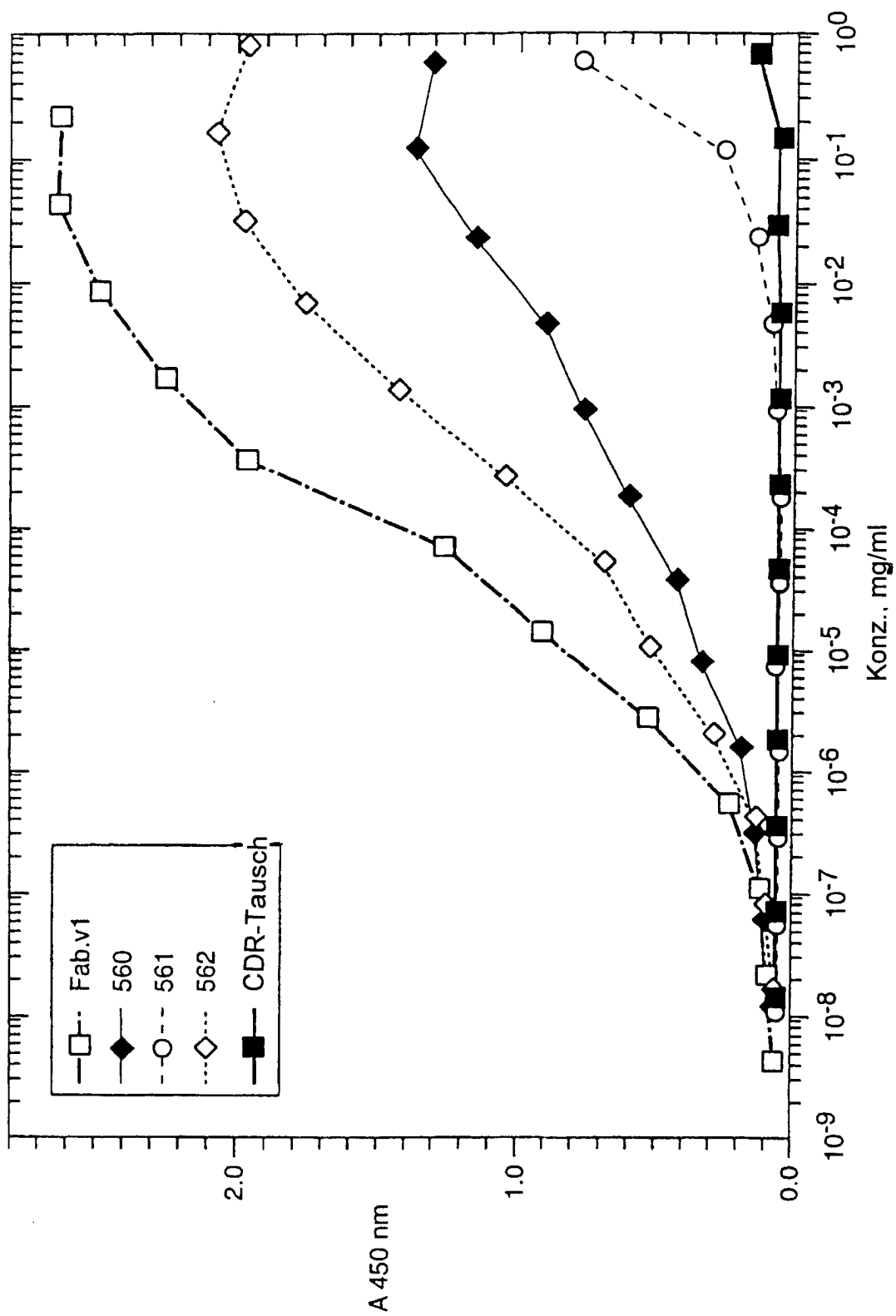
	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** *	* *		*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		*** *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

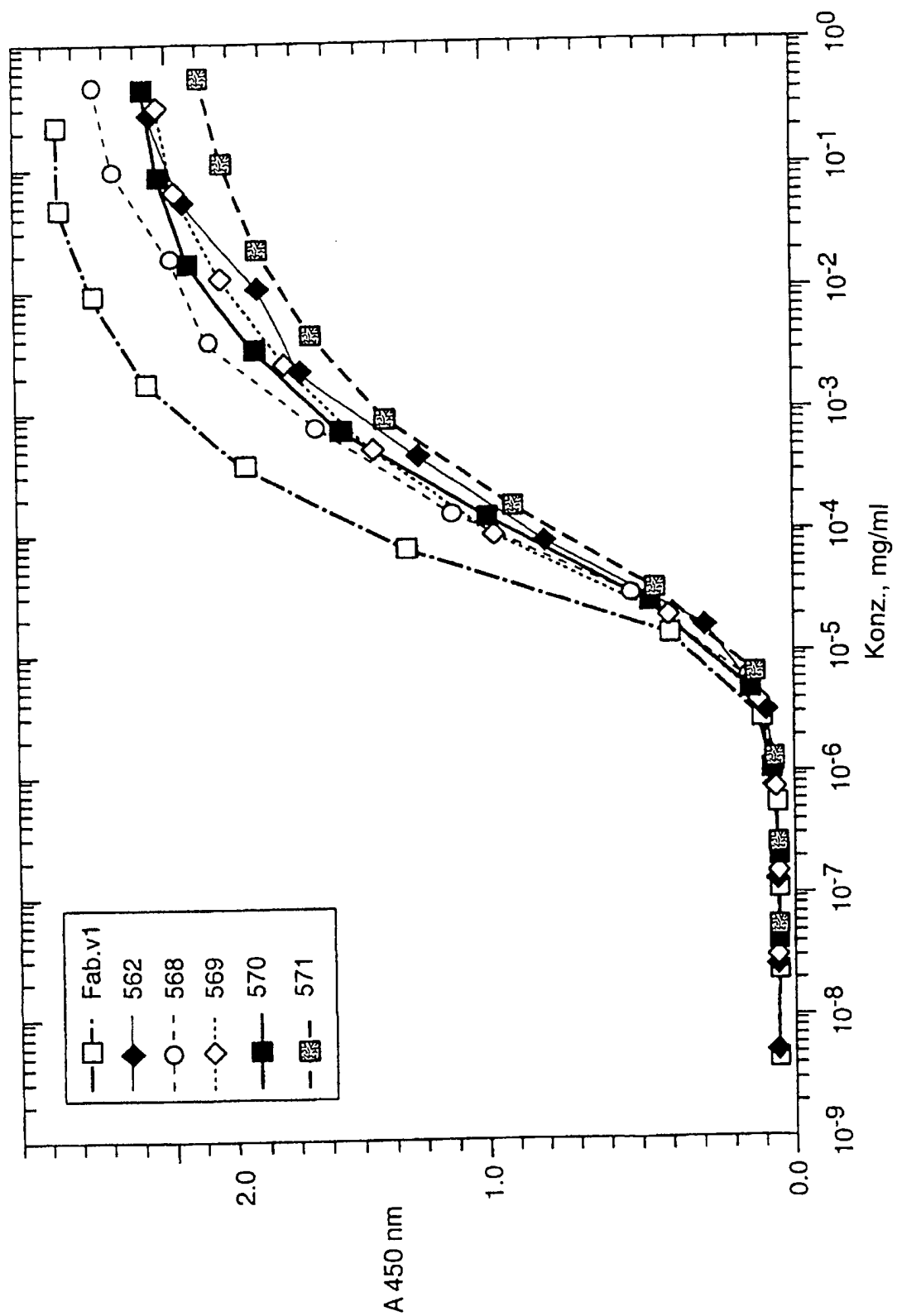
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* **	*** *	***** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** *	*** *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		

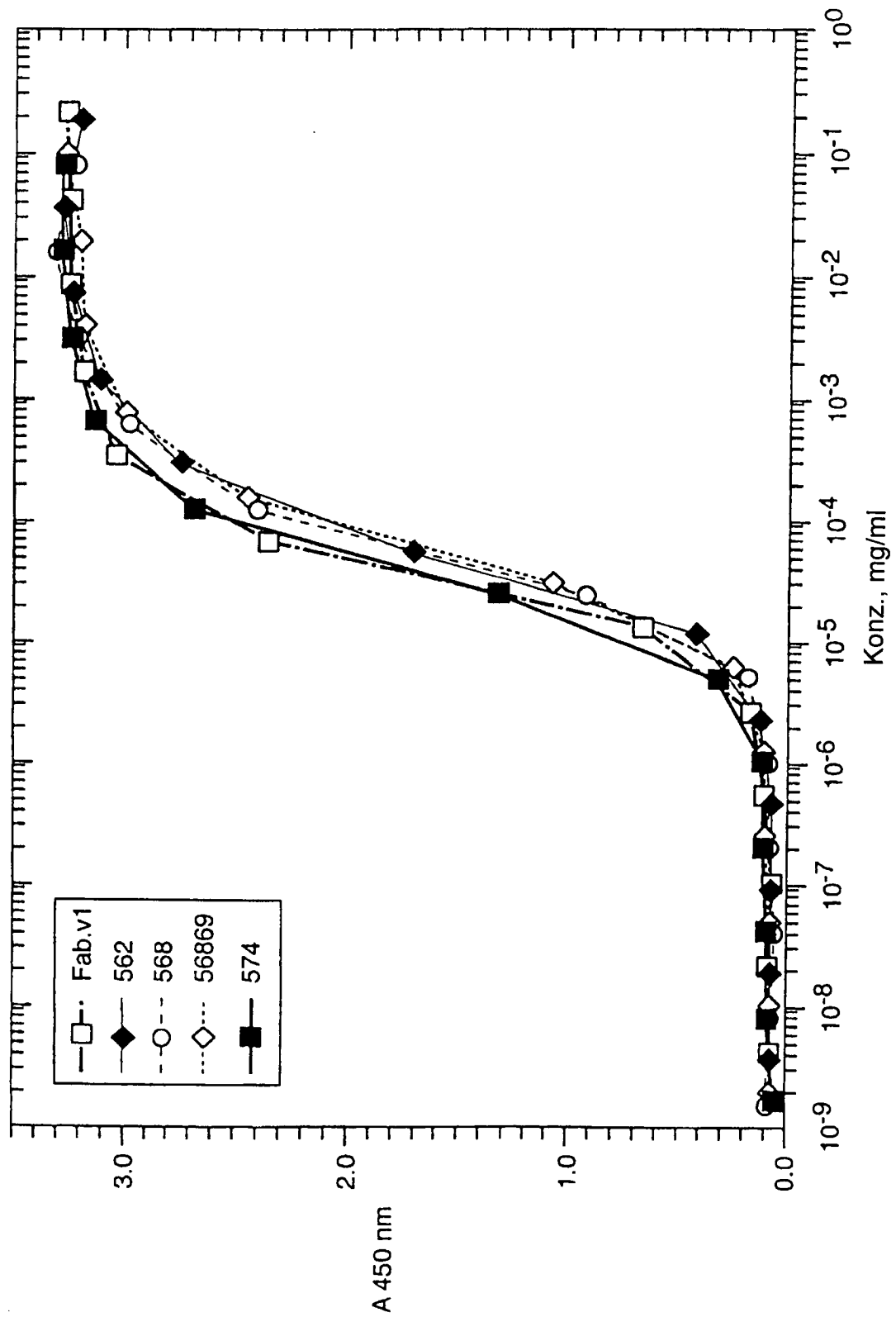
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(Seq.-ID Nr. 2)
	*** *		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(Seq.-ID Nr. 4)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(Seq.-ID Nr. 6)

FIG._7B

**FIG._8A**

**FIG._8B**

**FIG._8C**

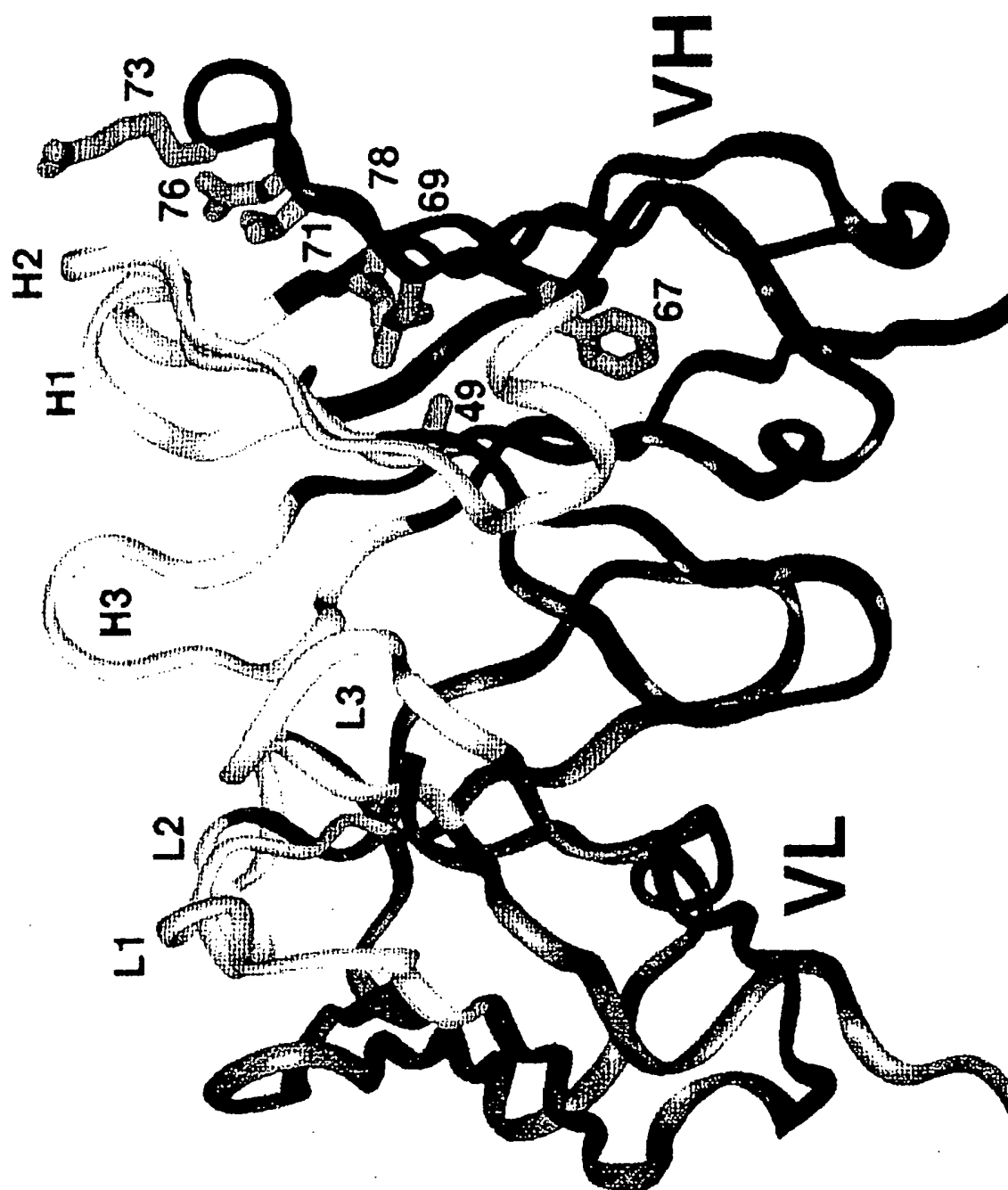


FIG._9

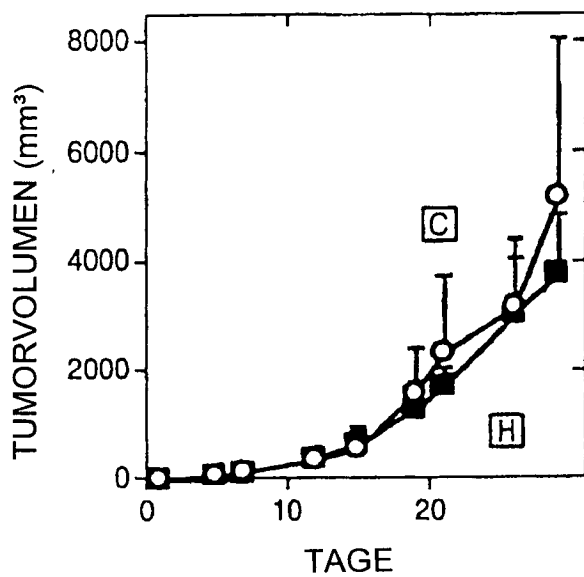


FIG._11A

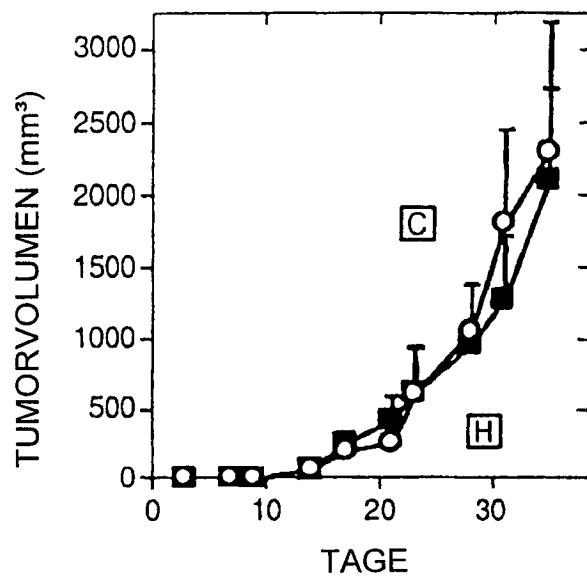


FIG._11B

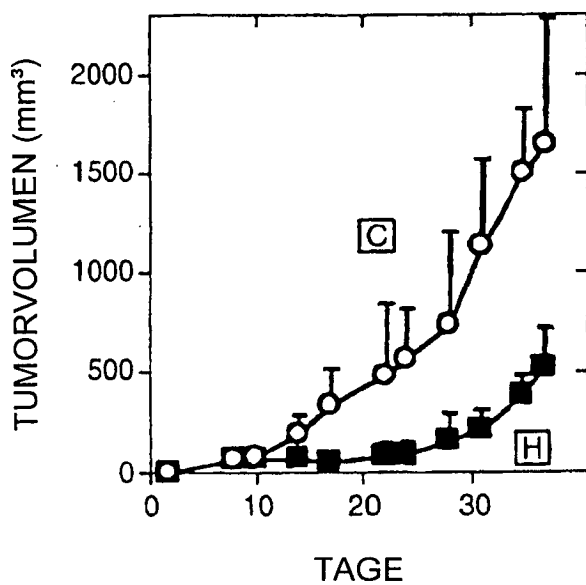


FIG._11C

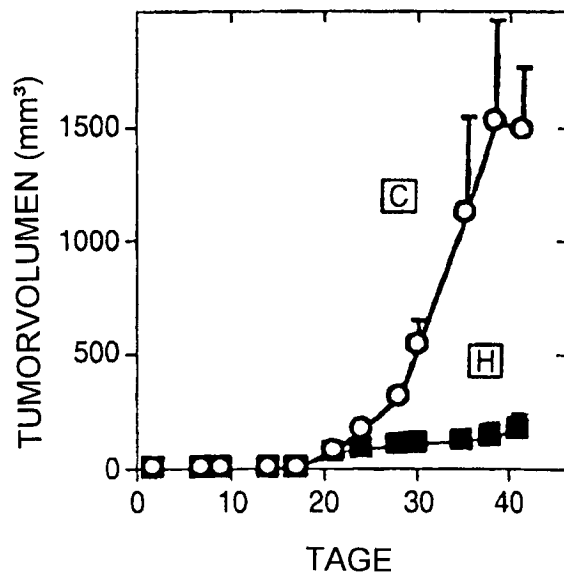


FIG._11D

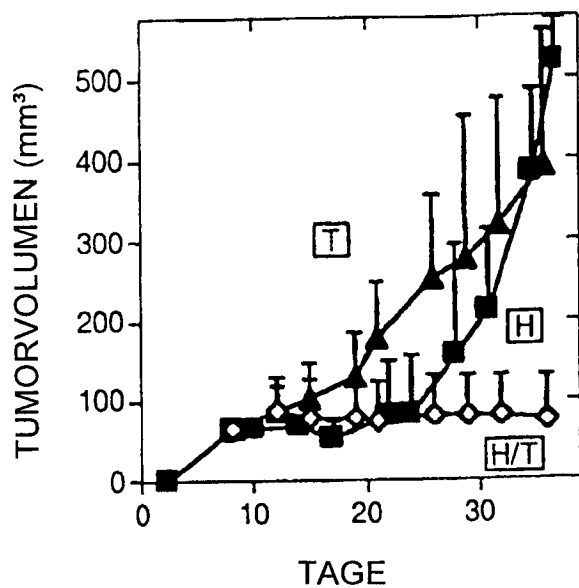


FIG. 11E

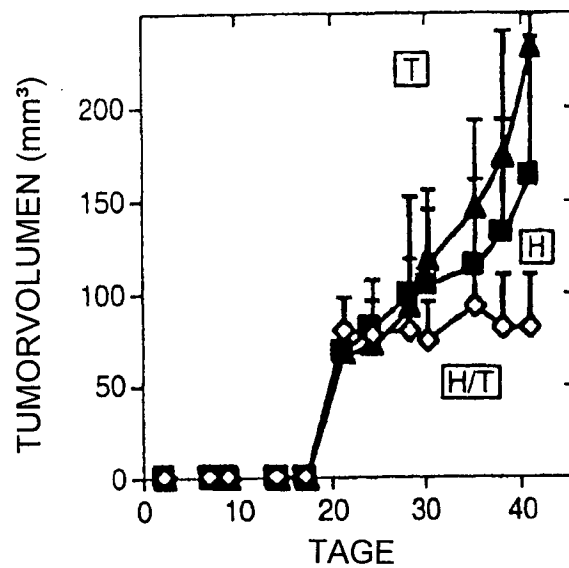


FIG. 11F

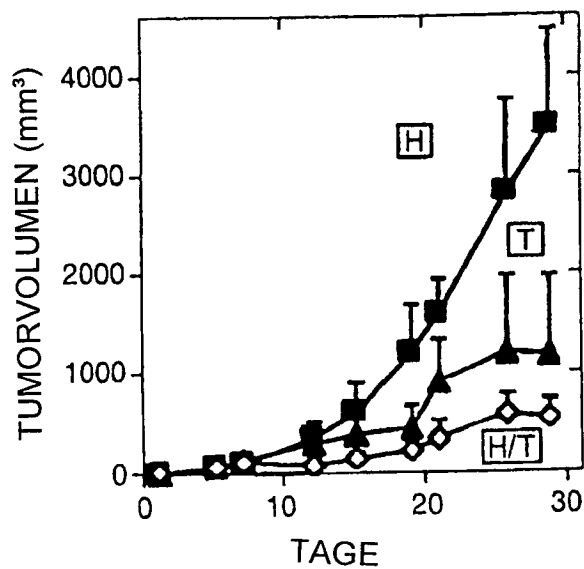


FIG. 11G

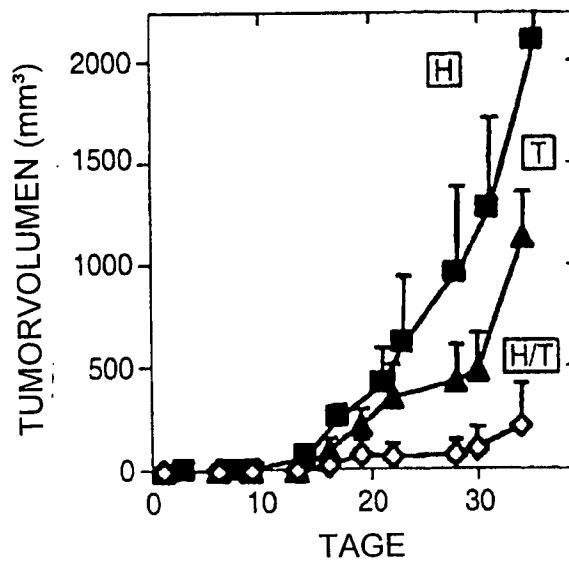


FIG. 11H

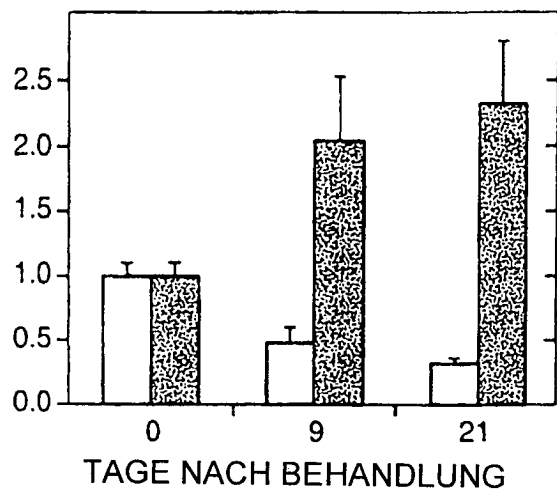


FIG._12A

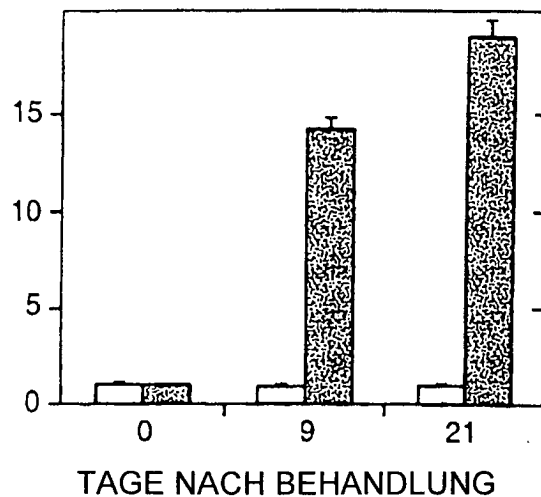


FIG._12B

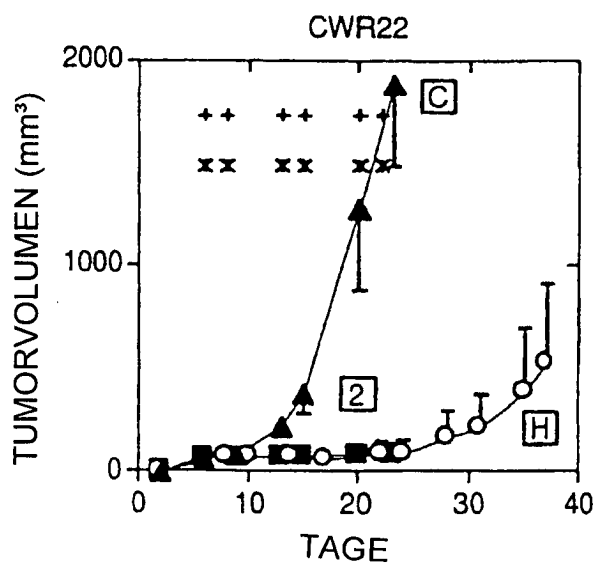


FIG._13

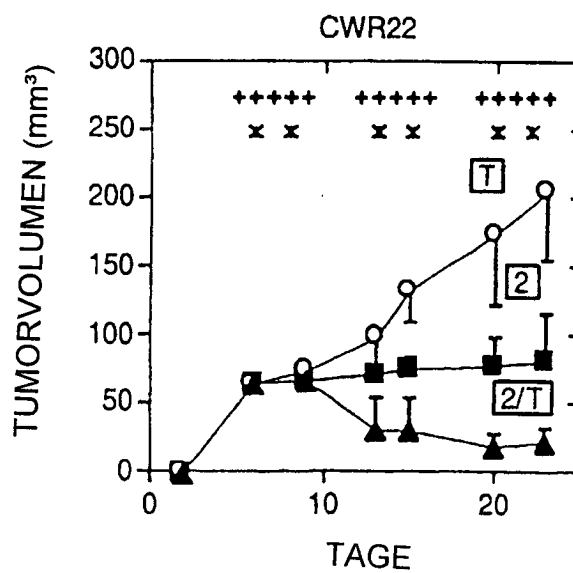


FIG._14

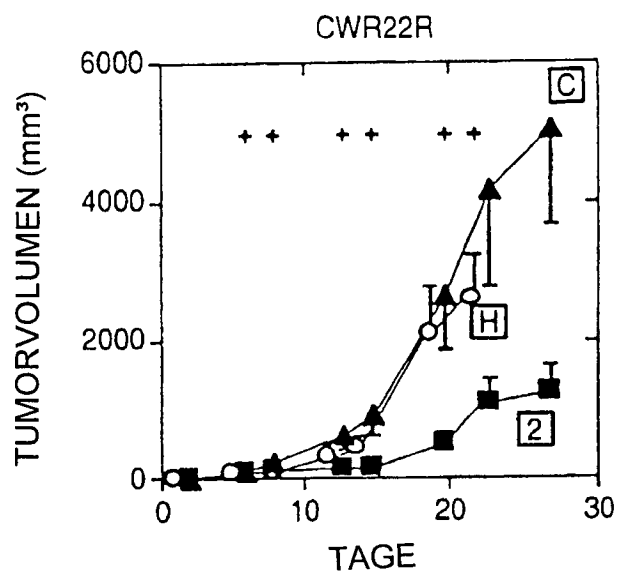


FIG._15

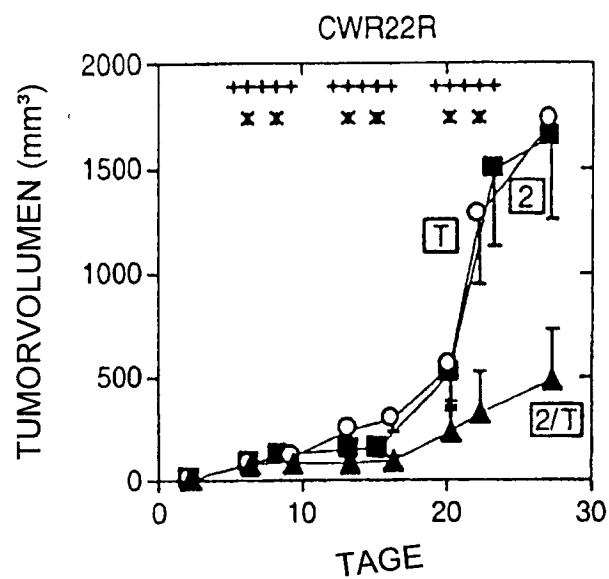


FIG._16

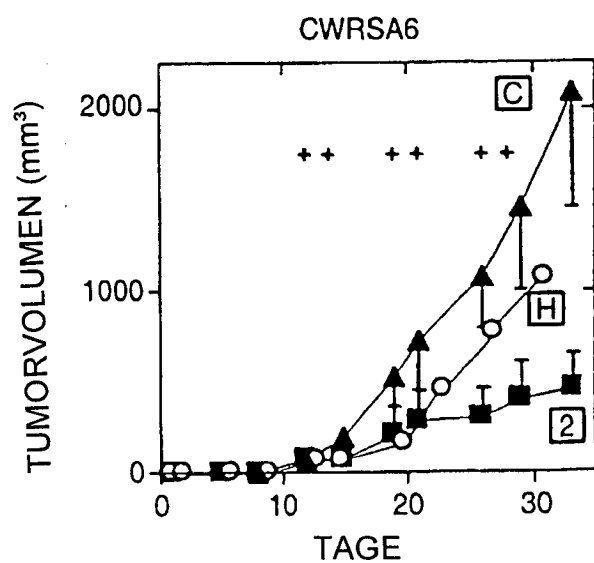


FIG._17

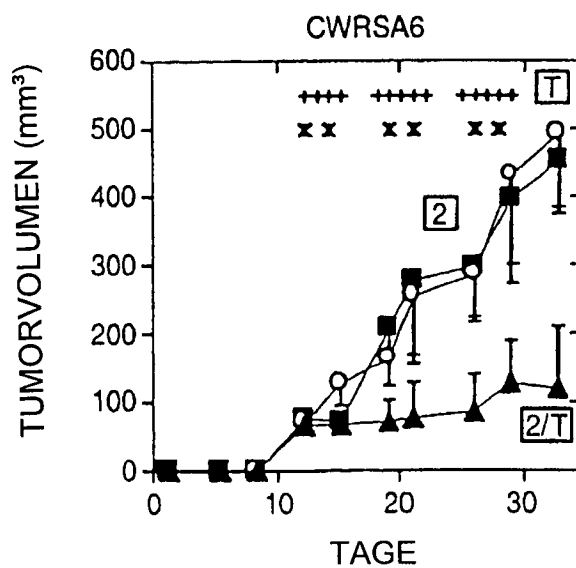
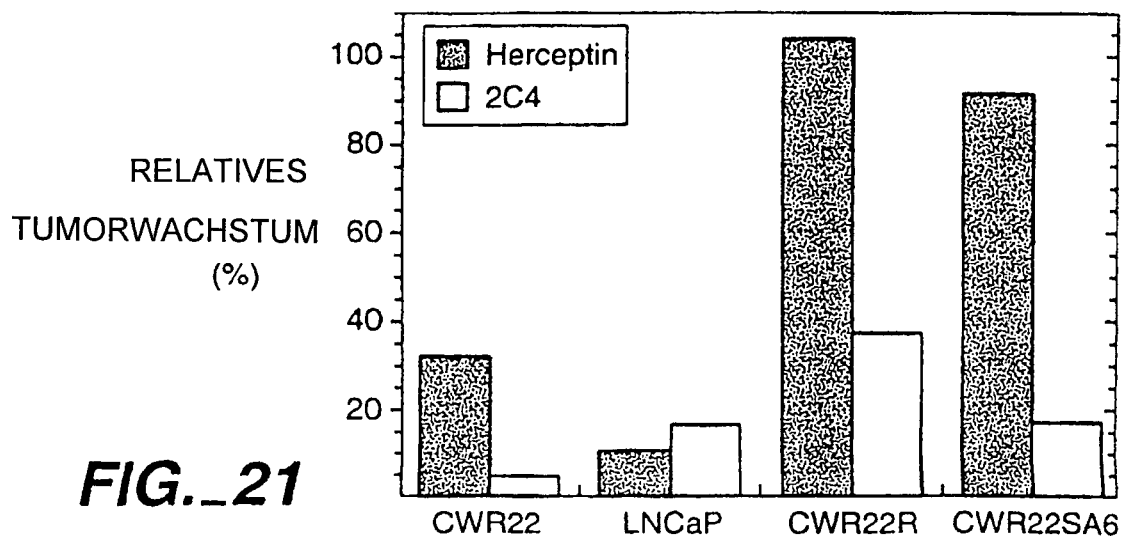
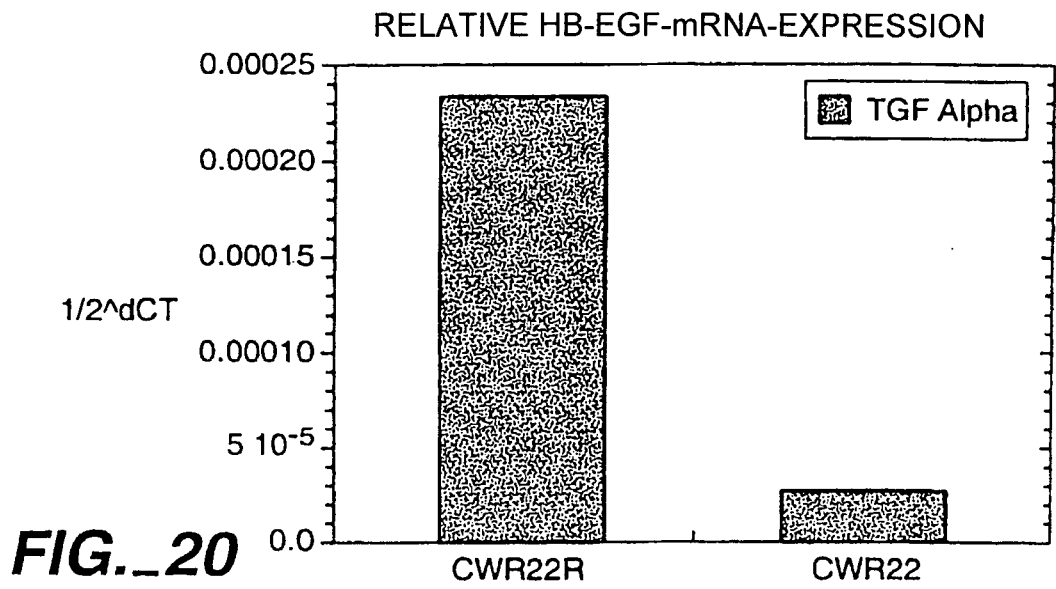
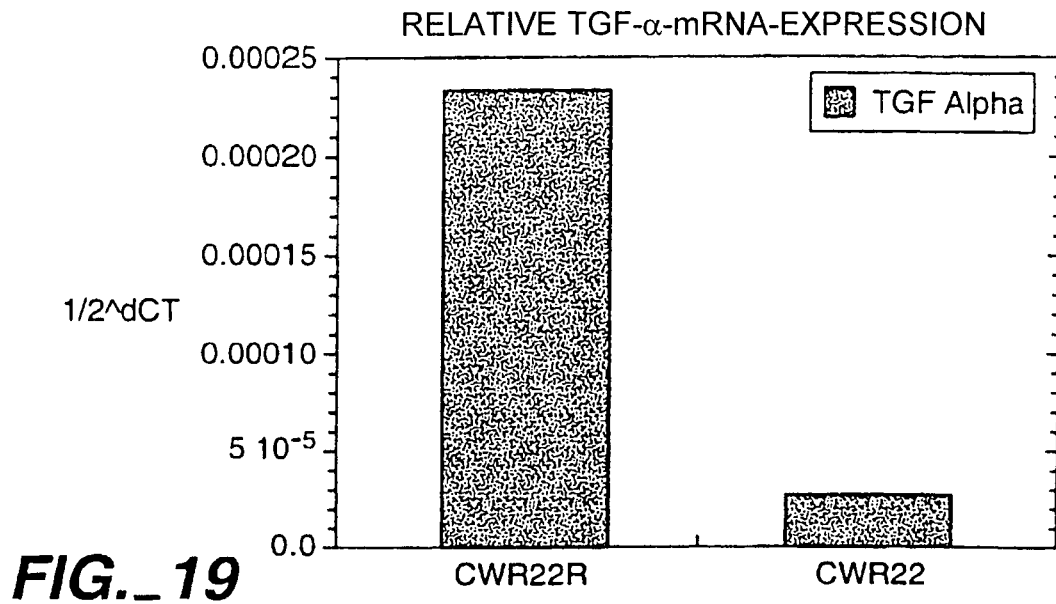


FIG._18



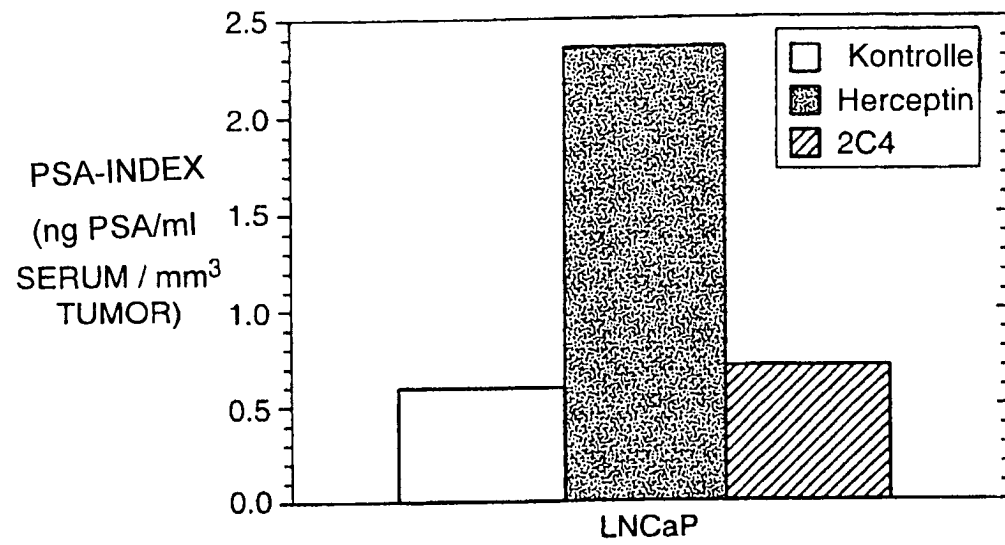


FIG. 22A

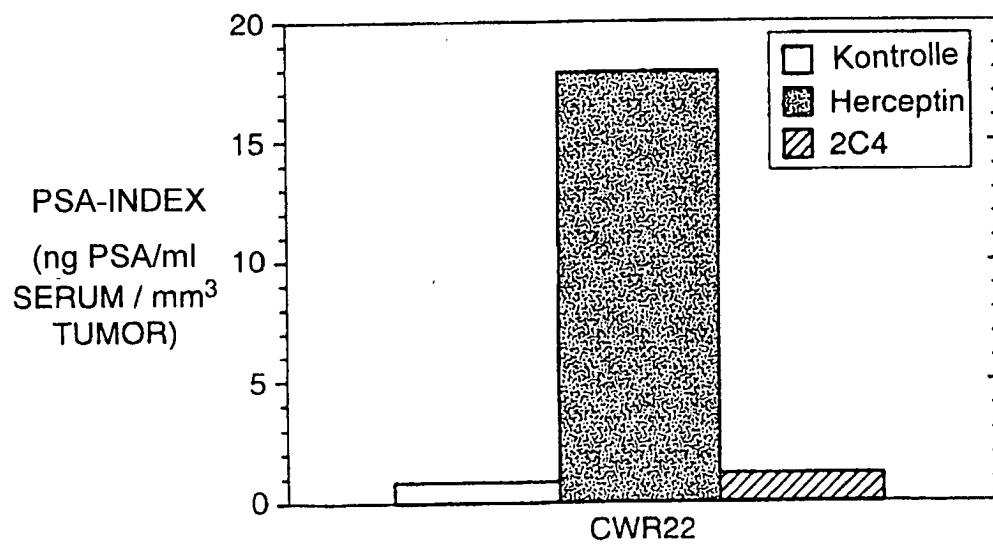


FIG. 22B

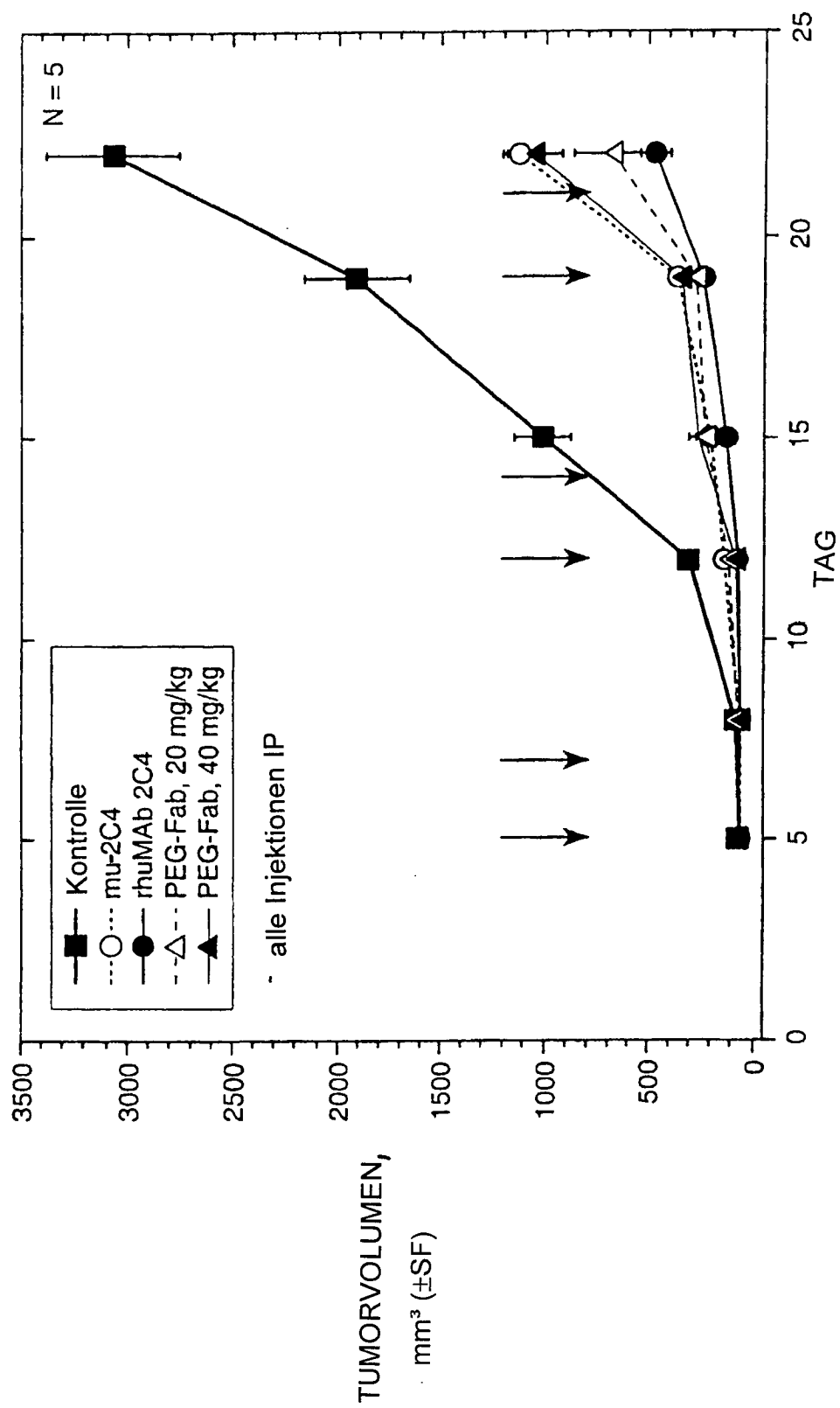


FIG. 23

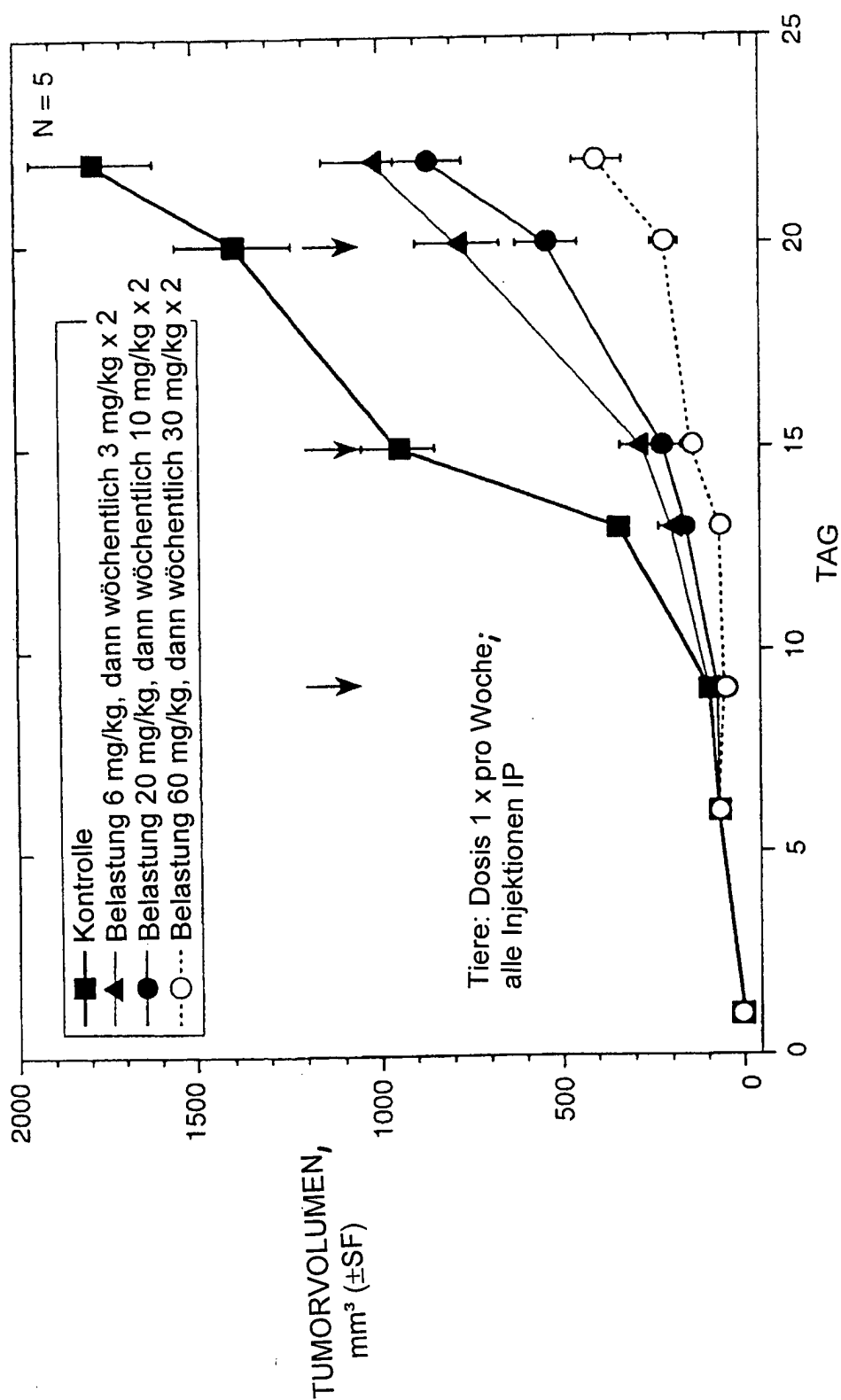


FIG..24

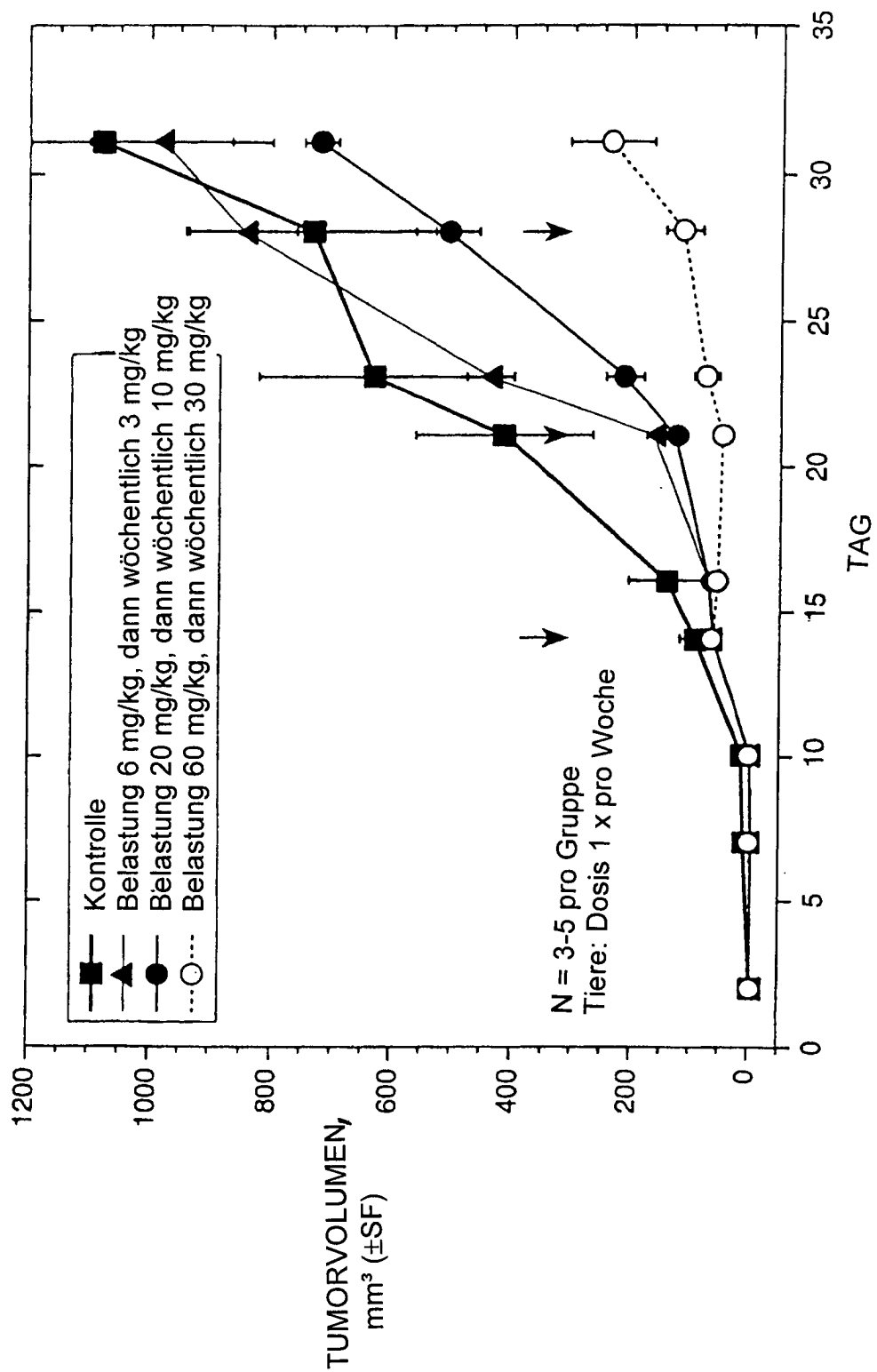


FIG._25

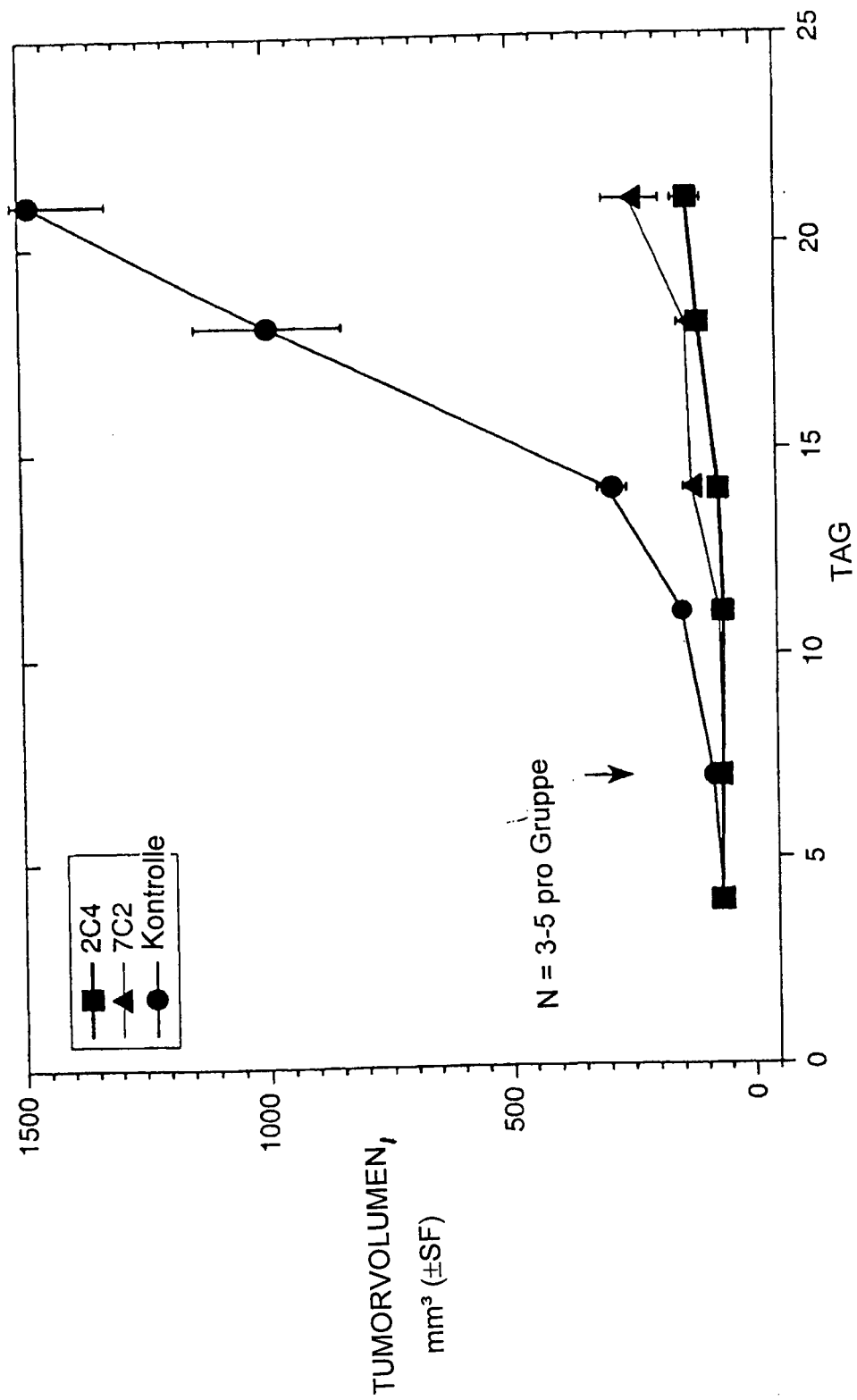


FIG. 26

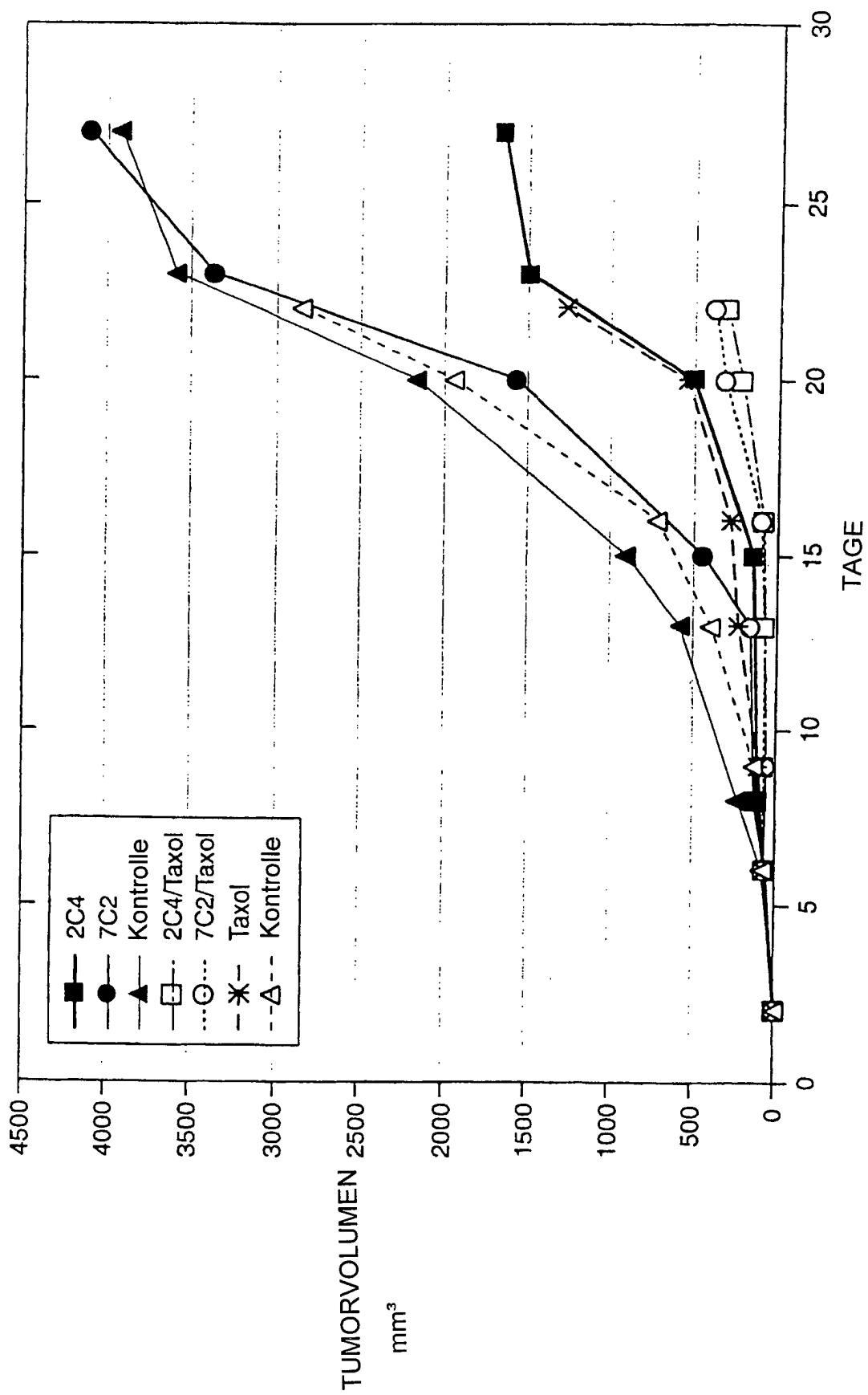


FIG..27