

(19)



österreichisches  
patentamt

(10)

**AT 500 848 A1 2006-04-15**

(12)

## **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer:

**A 9110/2000**

(51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **A61K 39/395** (2006.01)

(22) Anmeldetag:

**23.06.2000**

(43) Veröffentlicht am:

**15.04.2006**

(30) Priorität:

25.06.1999 US 60/141316 beansprucht.

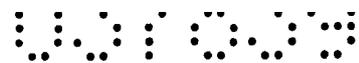
(73) Patentanmelder:

GENENTECH, INC.  
94080 SOUTH SAN FRANCISCO (US)

(54) **HUMANISIERTE ANTI-ERBB2-ANTIKÖRPER UND BEHANDLUNG MIT ANTI-ERBB2-ANTIKÖRPERN**

(57) Die vorliegende Erfindung beschreibt humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper und Verfahren zur Behandlung von Krebs mit Anti-ErbB2-Antikörpern, wie z.B. humanisierten Anti-ErbB2-Antikörpern.

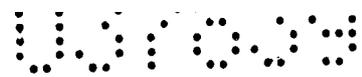
**AT 500 848 A1 2006-04-15**



Humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper und Behandlung  
mit Anti-ErbB2-Antikörpern

Zusammenfassung der Offenbarung

Die vorliegende Erfindung beschreibt humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper und Verfahren zur Behandlung von Krebs mit Anti-ErbB2-Antikörpern, wie z.B. humanisierten Anti-ErbB2-Antikörpern.



## Humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper und Behandlung mit Anti-ErbB2-Antikörpern

### Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper und Verfahren zur Behandlung von Krebs mit Anti-ErbB2-Antikörpern, wie z.B. humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper.

### Hintergrund der Erfindung

Die ErbB-Familie von Rezeptor-Tyrosinkinase 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<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4 oder tyro2).

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-Expression in denselben Tumorzellen ist oft mit erhöhter Produktion des EGFR-Liganden, dem transformierenden Wachstumsfaktor Alpha (TGF- $\alpha$ ), 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- $\alpha$  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).

Das zweite Mitglied der ErbB-Familie, p185<sup>neu</sup>, ist ursprünglich als das Produkt des transformierenden Gens aus Neuroblasten chemisch behandelte Mäuse 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., Lancer 1, 765-767 (1986); Fukushigi 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); 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<sup>neu</sup> und Human-ErbB2-Protein-Produkte sind beschrieben worden. Drebin und Mitarbeiter haben Antikörper gegen das Ratten-neu-Genprodukt, p185<sup>neu</sup>, hergestellt. Siehe, z.B. Drebin et al., Cell 41, 695-706 (1985); Myers et al., Meth. Enzym. 198, 277-290 (1991); und WO94/22478. Drebin et al., Oncogene 2, 273-277 (1988), berichten, dass gegen zwei gesonderte p185<sup>neu</sup>-Regionen reaktive Antikörpermischungen zu synergistischen Anti-Tumor-Effekten auf neu-transformierte, in nackte Mäuse implantierte NIH-3T3-Zellen führen. Siehe auch U.S.-Patent 5.824.311, erteilt am 20. Oktober 1998.

Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3), 1165-1172 (1989), beschreiben eine Liste von Anti-ErbB2-Antikörpern, die unter Verwendung der Human-Brusttumor-Zelllinie SK-BR-3 charakterisiert wurden. Relative Zellproliferation der SK-BR-3-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- $\alpha$  sensitiviert. Siehe auch U.S.-Patent Nr. 5.677.171, erteilt am 14. Oktober 1997. Die bei Hudziak et al. diskutierten ErbB2-Antikörper werden weiter charakterisiert von Fendly et al., *Cancer Research* 50, 1550-1558 (1990); Kotts et al., *In Vitro* 26(3), 59A (1990); Saruo 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).

Eine rekombinante, humanisierte Version des murinen Anti-ErbB2-Antikörpers 4D5 (huM Ab4D5-8, rhuM Ab HER2 oder HERCEPTIN<sup>®</sup>; U.S.-Patent Nr. 5.821.337) ist in Patienten mit ErbB2-überexprimierenden metastasierenden Brustkrebsen, und die eine umfassende Vor-Anti-Krebstherapie erhalten haben, klinisch aktiv Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14, 737-744 (1996)). HERCEPTIN<sup>®</sup> erhielt die Marktzulassung von der Food and Drug Administration am 25. September 1998 für die Behandlung von Patienten mit metastasierendem Brustkrebs, deren Tumore das ErbB2-Protein überexprimieren.

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); WO94/00136; 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); U.S.-Patent Nr. 5.783.186; und Klapper et al., *Oncogene* 14, 2099-2109 (1997).

Homologie-Screening führt 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 (EP Pat. Anm. 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.

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), transformierender Wachstumsfaktor Alpha (TGF- $\alpha$ ), Amphiregulin, Heparin-bindender Epidermis-Wachstumsfaktor (HB-EGF), Betacellulin und Epiregulin (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); U.S.-Patent Nr. 5.641.869; und Schaefer et al., *Oncogene* 15, 1385-1394 (1994)); neu-Differenzierungsfaktoren (NDFs), Glial-Wachstumsfaktoren (GGFs);

Acetylcholin-Rezeptor-induzierende Aktivität (AREA); und sensorisches und motorisches 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.

Während EGF und TGF- $\alpha$  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 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 ErbB2-ErbB3-Komplexes. ErbB4 bildet wie ErbB3 einen aktiven Signalkomplex mit ErbB2 (Carraway und Cantley, Cell 78, 5-8 (1994)).

### Zusammenfassung der Erfindung

In einem ersten Aspekt führt die vorliegende Erfindung zu einem Verfahren zur Behandlung von Krebs beim Menschen, worin der Krebs den Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) exprimiert, umfassen die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der ErbB2 bindet, an den Menschen.

Verschiedenste Vorteile der Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet, zur Behandlung einer solchen Krebsform, im Gegensatz zu auf EGFR abzielende Medikamente, werden hierin ins Auge gefasst. Im Speziellen wird EGFR in höchstem Ausmaß in Leber und Haut exprimiert, und dies schafft eine enorme Senke für das aktive Medikament, wo das Medikament an EGFR bindet. Zusätzlich ist für andere, auf EGFR abzielende Medikamente, wie z.B. der chimäre Anti-EGFR-Antikörper C225 und das kleinmolekulare Medikament ZD1839, das EGFR bindet, Hauttoxizität beobachtet worden. Von Antikörpern, die ErbB2 binden, wird erwartet, dass sie ein besseres Sicherheitsprofil aufweisen, als derartige Medikamente.

Wo der hierin für die Therapie verwendete Antikörper die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert und/oder eine biologische Eigenschaft des monoklonalen Antikörpers 2C4 aufweist, werden weitere Vorteile erreicht. Beispielsweise werden hierin besonders interessierende Antikörper (z.B. 2C4, einschließlich humanisierte und/oder deren affinitätsgereifte Varianten) mit EGFR/ErbB2-, ErbB3/ErbB4- und ErbB2/ErbB3-Heterodimeren interferieren, während auf ERGF abzielende Medikamente nur mit EGFR interferieren. Zusätzlich werden die Antikörper hierin, die ErbB2 binden und die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockieren, komplementär zu auf EGFR abzielende Medikamente sein, wo auf EGFR abzielende Medikamente zueinander nicht komplementär sind.

Weiters führt die Erfindung zu einem Verfahren für die Behandlung von Krebs in einem Menschen, worin die Krebsform nicht durch Überexpression eines ErbB2-Rezeptors charakterisiert ist, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der an ErbB2 bindet und die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.

Zusätzlich führt die vorliegende Erfindung zu einem Verfahren der Behandlung von Hormon-unabhängigem Krebs in einem Menschen, umfassend die Verabreichung einer

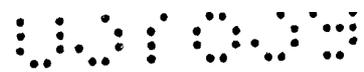
therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der an ErbB2-Rezeptor bindet und die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.

Die Erfindung führt weiters zu einem Verfahren zur Behandlung von Krebs in einem Menschen, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge von (a) einem ersten Antikörper, der ErbB2 bindet und das Wachstum von Krebszellen, die ErbB2 überexprimieren, inhibiert; und (b) eines zweiten Antikörpers, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.

Die Erfindung führt auch zu einem Verfahren der Behandlung von Krebs in einem Menschen, worin der Krebs von der Gruppe bestehend aus Dickdarm-, Rektal- und Kolorektal-Krebs selektiert wird, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.

In weiteren Ausführungsformen führt die Erfindung zu Produkten zur Verwendung (unter anderem) in obigen Verfahren. Beispielsweise führt die Erfindung zu einem Produkt, umfassend einen Behälter und eine darin befindliche Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper, der ErbB2 bindet, umfasst, und weiters eine Packungsbeilage umfasst, die darauf hinweist, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden kann, der Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) exprimiert.

Die Erfindung betrifft zusätzlich ein Produkt, umfassend einen Behälter und eine darin befindliche Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, umfasst, und das weiters eine Packungsbeilage umfasst, die darauf hinweist, dass die Zusammensetzung verwendet werden kann, um Krebs zu behandeln, worin der Krebs nicht durch Überexpression des ErbB2-Rezeptors charakterisiert ist.



Die Erfindung betrifft auch ein Produkt, umfassend einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, umfasst, und umfasst weiters eine Packungsbeilage, die darauf hinweist, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von hormonunabhängigem Krebs verwendet werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Produkt bereitgestellt, das umfasst: (a) einen ersten Behälter mit einer darin enthaltenen Zusammensetzung, wobei die Zusammensetzung einen ersten Antikörper, der ErbB2 bindet und das Wachstum von Krebszellen, die ErbB2 überexprimieren, hemmt; und (b) einen zweiten Behälter mit einer darin enthaltenen Zusammensetzung, wobei die Zusammensetzung einen zweiten Antikörper, der ErbB2 bindet und die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, umfasst.

Ein weiteres Produkt wird bereitgestellt, das einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper, der ErbB2 bindet und die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert umfasst, und weiters eine Packungsbeilage umfasst, die darauf hinweist, dass die Zusammensetzung zur Behandlung einer Krebsform, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Dickdarm-, Rektal- und Kolorektal-Krebs, verwendet werden kann.

Die Erfindung stellt zusätzlich bereit: einen humanisierten Antikörper, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert; eine Zusammensetzung, enthaltend den humanisierten Antikörper und einen pharmazeutisch vertretbaren Träger; sowie ein Immunkonjugat, umfassend den humanisierten Antikörper, konjugiert mit einem cytotoxischen Mittel.

Weiters stellt die Erfindung bereit: isolierte Nukleinsäure, die für den humanisierten Antikörper kodiert; einen Vektor der die Nukleinsäure enthält; eine Wirtszelle, die die Nukleinsäure oder den Vektor enthält; sowie ein Verfahren zur Produktion des humani-

sierten Antikörpers, einschließlich die Kultivierung einer Wirtszelle die die Nukleinsäure enthält, so dass die Nukleinsäure exprimiert wird, und weiters gegebenenfalls die Gewinnung des humanisierten Antikörpers aus der Wirtszellenkultur (z.B. aus dem Wirtszellen-Kulturmedium).

Die Erfindung betrifft weiters ein Immunkonjugat, umfassend einen Antikörper, der ErbB2 bindet, konjugiert an ein oder mehrere Calichaemicin-Moleküle und die Verwendung solcher Konjugate zur Behandlung ErbB2-exprimierender Krebsformen, z.B. ErbB2-überexprimierender Krebs, in einem Menschen. Vorzugsweise ist der Antikörper im Konjugat monoklonaler Antikörper 4D5, z.B. humanisierter 4D5 (und vorzugsweise huMAb4D5-8 (HERPCEPTIN<sup>®</sup>); oder monoklonaler Antikörper 2C4, z.B. humanisierter 2C4. Der Antikörper im Immunkonjugat kann ein intakter Antikörper (z.B. ein intakter IgG<sub>1</sub>-Antikörper) oder ein Antikörperfragment (z.B. ein Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Diakörper, usw.) sein.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen

Die Fig. 1A und 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 Trunktions-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 wurden als gD-Fusionsproteine in einem Säugetier-Expressionsplasmid exprimiert. Dieses Expressionsplasmid verwendet den Cytomegalievirus-Promotor/Enhancer mit SV40-Terminations- und -Polyadenylierungssignalen, die stromabwärts der insertierten 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, Glucose-armem DMEM, enthaltend 1% dialysiertes Fetal-Rinderserum und jeweils 25 µCi <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein. Überstände wurden gesammelt, und es wurden entweder die

monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper oder Kontroll-Antikörper dem Überstand zugesetzt und 2-4 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Komplexe wurden präzipitiert, auf ein 10-20% Tricin-SDS-Gradientengel aufgetragen und Elektrophorese bei 100 V durchgeführt. 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.

Die Fig. 2A und 2B zeigen den Effekt der monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper 2C4 und 7F3 auf die rHRG $\beta$ 1-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  $^{125}$ I-markiertem rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub>-Bindung and MCF7-Zellen durch 2C4 und 7F3.

Fig. 3 beschreibt die Inhibierung der spezifischen Bindung von  $^{125}$ I-markiertem rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> an eine Liste von humanen Tumor-Ziellinien 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  $^{125}$ I-markiertem rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> wurde aus parallelen Inkubationen, durchgeführt in Gegenwart von 100 nM rHRG $\beta$ 1, bestimmt. Werte für unspezifische Bindung von  $^{125}$ I-markiertem rHRG $\beta$ 1<sub>177-244</sub> waren unter 1% der aller getesteten Ziellinien.

Die Fig. 4A und 4B zeigen den Effekt der monoklonalen Antikörper 2C4 und 4D5 auf die Proliferation von MDA-MB-175- (Fig. 4A) und SK-BR-3- (Figur 4B) Zellen. MDA-MB-175- und SK-BR-3-Zellen wurden in 96-Napf-Platten geimpft und für 2 Stunden anhaften gelassen. Das Experiment wurde in 1% Serum enthaltendem Medium durchgeführt. Anti-ErbB2-Antikörper oder Medium alleine wurden den Zellen zugesetzt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde rHRG $\beta$ 1 (1 nM) oder Medium alleine zugesetzt und die Zellen für 4 Tage inkubiert. Monoschichten wurde gewaschen und mit

0,5% Kristallviolett gefärbt/fixiert. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

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

Die Fig. 6A und 6B vergleichen die Aktivitäten von intaktem, murinen monoklonalen Antikörper 2C4 (mu-2C4) und einem chimären 2C4-Fab-Fragment. Fig. 6A zeigt die Inhibierung der <sup>125</sup>I- HRG-Bindung an MCF7-Zellen durch den chimären 2C4-Fab- oder intakten, murinen monoklonalen Antikörper 2C4. MCF7-Zellen wurden in 24-Napf-Platten (1 x 10<sup>5</sup> Zellen/Napf) inokuliert und für 2 Tage auf ungefähr 85% Konfluenz gezüchtet. Bindungsexperimente wurden wie in Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996) 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.

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

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

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

Fig. 10 beschreibt den Effekt des von monoklonalen Antikörper 2C4 oder HERCEPTIN<sup>®</sup> auf EGF-, TGF- $\alpha$ - oder HRG-vermittelte Aktivierung von mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK).

Fig. 11 ist ein Balkendiagramm, das den Effekt von Anti-ErbB2-Antikörpern (alleine oder in Kombinationen) auf Calu3-Lungen-Adenokarzinom-Pfropfungen (3+ ErbB2 Überexprimierer) zeigt. Hinweis: Behandlung am Tag 24 gestoppt.

Fig. 12 beschreibt den Effekt von rekombinantem, humanisiertem monoklonalen Antikörper 2C4 (rhuMAb 2C4) oder HERCEPTIN<sup>®</sup> auf das Wachstum von MDA-175-Zellen, bewertet in einem Alamarblau-Assay.

Fig. 13 zeigt die Effizienz von rhuMAb 2C4 gegen MCF7-Xenografts.

### Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

#### I. Definitionen

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

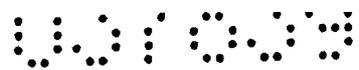
Allgemeinen umfassen: eine extrazelluläre Domäne, die an einen ErbB-Liganden binden kann; eine lipophile Transmembran-Domäne; eine konservierte intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne; und eine carboxylterminale, mehrere phosphorylierbare Tyrosinreste tragende Signaldomäne. Der ErbB-Rezeptor kann eine "Nativsequenz"-ErbB-Rezeptor oder eine derer "Aminosäuresequenz-Varianten" sein. Vorzugsweise ist der ErbB-Rezeptor der humane Nativsequenz-ErbB-Rezeptor.

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 Gen, das für das EGFR-Protein-Produkt kodiert.

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<sup>neu</sup> kodiert. Bevorzugtes ErbB2 ist humanes Nativsequenz-ErbB2.

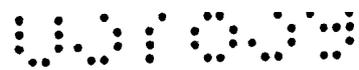
"ErbB3" und "HER3" betreffen das Rezeptor-Polypeptid, wie offenbart in z.B. US-Patent Nr. 5.183.884 und 5.480.968, wie auch Kraus et al., PNAS (USA) 86, 9193-9197 (1989).

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 WO99/19488, publiziert am 22. April 1999.



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- $\alpha$ ) (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. 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- $\alpha$ , 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.

"Heregulin" (HRG), wenn hierin verwendet, betrifft ein Polypeptid, das durch das Heregulin-Genprodukt kodiert wird, wie offenbart in U.S.-Patent Nr. 5.641.869 oder Marchionni et al., Nature 362, 312-318 (1993). Beispiele für Hereguline umfassen Heregulin- $\alpha$ , Heregulin- $\beta$ 1, Heregulin- $\beta$ 2 und Heregulin- $\beta$ 3 (Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992); und U.S.-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)); Glial-Wachstumsfaktoren (GGFs) (Marchionni et al., Nature 362, 312-318 (1993)); sensorisches und motorisches Neuron-abgeleiteter Faktor (SMDF) (Ho et al., J. Biol. Chem. 270, 14523-14532 (1995));  $\gamma$ -Heregulin

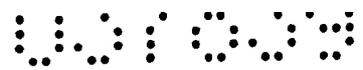


(Schaefer et al., *Oncogene* 15, 1385-1394 (1997)). Der Begriff inkludiert biologisch aktive Fragmente und/oder Aminosäuresequenz-Varianten eines Nativsequenz-HRG-Polypeptids, wie z.B. ein v EGF-artiges Domänen-Fragment davon (z.B. rHRG $\beta$ <sub>177-244</sub>).

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.

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.

Ein "Nativsequenz"-Polypeptid ist eines, das dieselbe Aminosäuresequenz wie ein von der Natur hergeleitetes Polypeptid (z.B. ErbB-Rezeptor oder ErbB-Ligand) besitzt. Solche



Nativsequenz-Polypeptide können aus der Natur isoliert oder auf rekombinante oder synthetische Weise hergestellt werden. Folglich kann ein Nativsequenz-Polypeptid die Aminosäuresequenz eines natürlich auftretenden humanen Polypeptids, eines murinen Polypeptids, oder eines Polypeptids von jeder anderen Säugetier-Spezies besitzen.

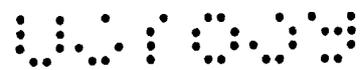
Der Begriff "Aminosäuresequenz-Variante" betrifft Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, die sich in einem gewissen Ausmaß von einem Nativsequenz-Polypeptid unterscheiden. Normalerweise werden Aminosäuresequenz-Varianten zumindest 70% Homologie mit zumindest einer Rezeptor-Bindungsdomäne eines nativen 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.

"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, abgelegt wurde.

Der Begriff "Antikörper", wie hierin im weitesten Sinne verwendet und umfasst im Speziellen intakte monoklonale 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.

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 im 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 rekombinanter DNA-Verfahren (siehe z.B. U.S.-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.

Die monoklonale 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 zu Fragmenten solcher Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufwiesen (U.S.-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 humaner Konstantregion-Sequenzen.

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

Ein "intakter" Antikörper ist einer, der sowohl ein antigenbindende variable Region als auch eine konstante Leichtketten-Domäne (C<sub>L</sub>) und konstante Schwereketten-Domänen C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, und C<sub>H3</sub> 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.

Antikörper-"Effektorfunktionen" betreffen jene biologischen Aktivitäten, die der Fc-Region (eine 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.

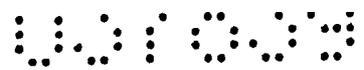
In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz der konstanten Domäne ihrer schweren Ketten, können intakte Antikörper verschiedenen "Klassen" zugeordnet werden. Es gibt fünf Hauptklassen intakter Antikörper: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, und mehrere von diesen können in "Unterklassen" (Isotypen) unterteilt werden, z.B. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA und IgA2. Die konstanten Schwereketten-Domänen, die den verschiedenen

Antikörperklassen entsprechen heißen  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  bzw.  $\mu$ . Die Strukturen der Unter-einheiten und dreidimensionale Konfigurationen der verschiedenen Immunglobulin-Klassen sind gut bekannt.

"Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität" und "ADCC" betreffen eine zellvermittelte Reaktion, in der unspezifische zytotoxische Zellen, die in 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 ausschließlich Fc $\gamma$ RIII, wogegen Monozyten Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII exprimieren. FcR-Expression an hämopoetischen 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 U.S.-Patent Nr. 5.500.362 oder 5.821.337 beschriebene, ausgeführt werden. Nützliche Effektorzellen für solche Tests umfassen mononukleare Peripherblutzellen (PBMC) und natürliche Killerzellen (NK). Alternativ dazu oder zusätzlich 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).

"Human-Effektorzellen" sind Leukozyten, die eine oder mehrere FcRs exprimieren und Effektorfunktionen ausführen. Vorzugsweise exprimieren die Zellen zumindest Fc $\gamma$ RIII und verrichten die ADCC-Effektorfunktion. Beispiele humaner Leukozyten, die ADCC vermitteln umfassen mononukleare 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 PBBCs wie hierin beschrieben isoliert werden.

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 humanes Nativsequenz-FcR. Außerdem ist ein bevorzugter FcR einer, der an IgG-An-



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-Tyrosin-basierendes-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)).

"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. eine 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), durchgeführt werden.

"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.

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  $\beta$ -Faltblattkonfiguration einnehmen, durch drei hypervariable Regionen verbunden sind, die Schleifen bilden, die die  $\beta$ -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 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).

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.

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. Papain-Behandlung führt zu einem  $F(ab)_2$ -Fragment, das zwei Antigen-bindende Stellen besitzt und immer noch in der Lage ist, Antigen zu vernetzen.

"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.

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 die Cystein-Rest(e) der konstanten Domänen zumindest eine freie Thiolgruppe tragen. F(ab)'<sub>2</sub>-Antikörper-Fragmente wurden ursprünglich als Paare von Fab'-Fragmenten produziert, die Hinge-Cysteine zwischen ihnen besitzen. Andere chemische Kopplungen von Antikörper-Fragmenten sind auch bekannt.

Die "leichten Ketten" von Antikörpern jeglicher Wirbeltier-Spezies können einer von zwei klar unterscheidbaren, genannt ( $\kappa$ ) und Lambda ( $\lambda$ ), basierend auf den Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Regionen zugeordnet werden. "Einzelketten-Fv"- oder "scFv"-Antikörper-Fragmente umfassen die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>- Domänen von Antikörper, worin diese Domänen in einer einzelnen Polypeptidkette vorhanden sind. Vorzugsweise beinhaltet das Fv-Polypeptid weiters einen Polypeptid-Linker zwischen den V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>- 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 WO93/16185: U.S.-Patent Nr. 5.571.894 und U.S.-Patent Nr. 5.587.458.

Der Begriff "Diakörper" betrifft kleine Antikörper-Fragmente mit zwei Antigen-bindenden Stellen, derer Fragmente eine variable schwere Domäne (V<sub>H</sub>), verbunden mit einer variablen leichten Domäne (V<sub>L</sub>) in derselben Polypeptidkette (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) 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; WO93/ 11161; und bei Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993).

"Humanisierte" Formen nicht-humaner (Nagetier-) Antikörper sind chimäre Antikörper, die von nicht-humanem Immunglobulin hergeleitete Minimal-Sequenz enthalten. Humanisierte Antikörper sind überwiegend 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 sind jene einer Human-Immunglobulin-Sequenz. Der humanisierte Antikörper wird optional auch zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulin-Region (Fc), typischerweise das 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).

Humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper umfassen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 und huMAb4D5-8 (HERCEPTIN<sup>®</sup>) wie beschrieben in Tabelle 3 von U.S.-Patent Nr. 5.821.337, hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen; humanisiertes 520C9 (WO93/21319) und humanisierte 2C4-Antikörper wie hierin unten beschrieben.

Ein "isolierter" Antikörper ist einer, der aus einem Bestandteil seiner natürlichen Umgebung identifiziert und getrennt und/oder gewonnen worden ist. Kontaminierende Be-

standteile 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, der 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 einem Reinigungsschritt hergestellt.

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 Fluoreszenz-aktivierter 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) Drebin et al., Nature 312, 545-548 (1984).

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 We-

sentlichen 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- $\alpha$ , 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.

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- $\alpha$ -, HB-EGF-, Epiregulin- und/oder Amphiregulin-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors, umfassend EGFR und ErbB2, blockieren; kann EGF-, TGF- $\alpha$ - 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).

Wenn nicht anders angegeben betrifft der Ausdruck "monoklonaler Antikörper 2C4" einen Antikörper, der Antigen-bindende Reste des murinen 2C4-Antikörpers oder davon hergeleiteter Reste Antigen-bindender 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 und Antigen-bindende Aminosäurereste des murinen monoklonalen Antikörpers 2C4 besitzen. 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.

Wenn nicht anders angegeben, betrifft der Begriff "monoklonaler Antikörper 4D5" einen Antikörper, der Antigen-bindende Reste von, oder abgeleitet von murinem Antikörper 4D5 (ATCC CRL 10463) besitzt. Beispielsweise kann der monoklonale Antikörper 4D5 eine muriner monoklonaler Antikörper 4D5 oder eine Variante davon sein, wie z.B. ein humanisiertes 4D5, besitzend Antigen-bindende Reste von murinem monoklonalen Antikörper 4D5. Beispiele humanisierter 4D5-Antikörper umfassen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 und huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) wie in U.S.-Patent Nr. 5.821.337, mit huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) als ein bevorzugter humanisierter 4D5-Antikörper.

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-Fluorouracil 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.

Beispiele von "wachstumshemmenden" Antikörpern sind jene die an ErbB2 binden und das Wachstum 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 µg/ml, wobei die Wachstumshemmung bestimmt wird, nachdem die SK-BR-3-Zellen sechs Tage den Antikörpern ausgesetzt worden sind (siehe U.S.-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. Der bevorzugte inhibierende Antikörper ist monoklonaler Antikörper 4D5, z.B. humanisierter 4D5.

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).

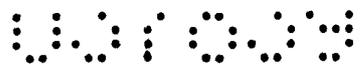
Ein Antikörper, der "Apoptose induziert" ist einer, der programmierten Zelltod induziert, wie bestimmt durch Bindung von Annexin V, Fragmentierung von DNA, Zellschrumpfung, Erweiterung des endoplasmatischen Retikulums, Zellfragmentierung und/oder Bildung von Membran-Vesikeln (genannt Apoptosekörper). 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 Nukleo-/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 50facher Induktion von Annexin-Bindung. 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).

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. jedes von einem oder mehreren Reste(n) in der Region von ungefähr Rest 22 bis inklusive ungefähr Rest 584 von ErbB2; siehe die Fig. 1A-B).

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. jedes von einem oder mehreren Reste(n) in der Region von ungefähr Rest 529 bis inklusive ungefähr Rest 625 von ErbB2; siehe die Fig. 1A-B).

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.



Das Epitop 7C2/7F3" ist die Region am N-Terminus der extrazellulären Domäne von ErbB2, an die die 7C2- und/oder 7F3-Antikörper (beide mit 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. jeder von einem oder mehreren Reste(n) in der Region von ungefähr Rest 22 bis ungefähr Rest 53 von ErbB2; siehe die Fig. 1A-B).

"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.

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

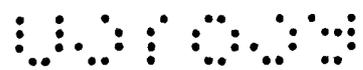
Eine "Störung" ist jeder Zustand, der aus der Behandlung mit Anti-ErbB2-Antikörper Nutzen ziehen könnte. Dies umfasst chronische und akute Störungen oder Krankheiten, einschließlich jene pathologischen Zustände, die das Säugetier für die fragliche Störung prädisponiert. Nichteinschränkende Beispiele von hierin zu behandelnden Störungen umfassen gutartige und maligne Tumore; Leukämien und Lymphoid-Malignitäten; neuronale, gliale, astrocytale, hypothalamische und andere glanduläre, makrophagale, epitheliale, stromale und blastozölische Störungen; und entzündliche, angiogene und immunologische Störungen.



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 Tumorgröße 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.

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 auch Kopf- und Halskrebs.

Ein "ErbB-exprimierender Krebs" ist einer, der Zellen beinhaltet, an deren Oberfläche ErbB-Proteine vorhanden sind. Ein "ErbB2-exprimierender Krebs" ist einer, der ausreichende Spiegel 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.



Ein Krebs "charakterisiert durch übermäßige Aktivierung" eines ErbB-Rezeptors ist einer, bei dem das Ausmaß der ErbB-Rezeptor-Aktivierung in Krebszellen den Level 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 Level eines ErbB-Liganden resultieren. Solche übermäßigen Aktivierungen können verursacht 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.

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- $\alpha$  oder HB-EGF) exprimieren oder überexprimieren. In einer anderen Ausführungsform kann der Krebs ErbB2 exprimieren oder überexprimieren und auch ein Heregulin (z.B.  $\gamma$ -HRG) exprimieren oder überexprimieren.

Ein Krebs, der einen ErbB-Rezeptor "überexprimiert" ist einer, der an seiner Oberfläche, im Vergleich zu nicht-krebsartigen Zellen desselben Gewebetyps, signifikant höhere Level 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 Level eines an der Oberfläche einer Zelle



vorhandenen ErbB-Proteins evaluiert wird (z.B. über einen Immunhistochemie-Assay; IHC). Alternativ dazu oder zusätzlich kann man den Level von ErbB-kodierende Nukleinsäure in der Zelle messen, z.B. über Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH; siehe WO98/45479, publiziert im Oktober 1998), Southern-Blotting, oder Polymerase-Kettenreaktions- (PCR-) Techniken, wie z.B. Echtzeit-quantitative 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. U.S.-Patent Nr. 5.933.294, erteilt am 12. Juni 1990; WO91/05264, publiziert am 18. April 1991; U.S.-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.

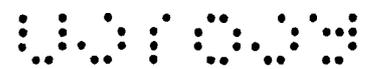
Umgekehrt ist ein Krebs, der "nicht durch Überexpression eines ErbB2-Rezeptors" charakterisiert ist, einer, der in einem diagnostischen Test, im Vergleich zu einer nicht-krebsartigen Zelle desselben Gewebetyps, keine höheren als die normalen Level von ErbB-Rezeptor exprimiert.

Ein Krebs der einen ErbB-Liganden "überexprimiert" ist einer, der im Vergleich zu einer nicht-krebsartigen Zelle desselben Gewebetyps, signifikant höhere Level 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 Nukleinsäure) 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.

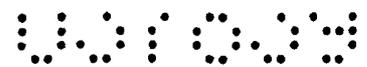
Ein "Hormon-unabhängiger" Krebs ist einer, bei dem seine Proliferation von der Anwesenheit eines Hormons, das an einen durch Krebszellen exprimierten Rezeptor bindet, unabhängig ist. Solche Krebsformen untergehen keine klinische Rückbildung bei Anwendung pharmakologischer oder operativer Strategien, die die Hormonkonzentration im oder in der Nähe des Tumors herabsetzen. Beispiele Hormon-unabhängiger Krebsformen umfassen Androgen-unabhängigen 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-sensitiven Stadium zu einem Hormon-refraktären Tumor fortschreiten.

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 vom radioaktiven Isotope (z.B. At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> und radioaktive Lu-Isotope), chemotherapeutischen Mittel und Toxinen wie z.B. Kleinmolekül-Toxine oder enzymatisch aktive Toxine bakterieller, pilzlicher, pflanzlicher oder tierischer Herkunft, einschließlich derer Fragmente und/oder Varianten.

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 (CYTOXAN<sup>TM</sup>); Alkylsulfonate wie z.B. Busulfan, Improsulfan und Pipsulfan; Aziridine wie z.B. Benzodopa, Carboquon, Meturedopa und Uredopa; Ethylenimine und Methylamelamine einschließlich Al-tretamin, Triethylenmelamim, Triethylenphosphoramid, Triethylthiophosphoramid und Trimethylolomelamin; Stickstofflosts wie z.B. Chlorambucil, Chlornaphazin, Chlo-phosphamid, 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. Aclacinomysin, Actinomycin, Authramycin, Azaserin,



Bleomycine, Cactinomycin, Calicheamicin, Carabycin, Carminomycin, Carzinophilin, Chromomycin, Dactionmycin, Daunorubicin, Detorubicin, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin, Doxorubicin, Epirubicin, Esorubicin, Idarubicin, Marcellomycin, Mitomycin, Mycophenolsäure, Nogalamycin, Olivomycine, Peplomycin, Potfiromycin, Puromycin, Quelamycin, Rodorubicin, Streptonigrin, Streptozocin, Tubercidin, Ubenimex, Zinostatin, Zorubicin; Anti-Metaboliten wie z.B. Methotrexat und 5-Fluorouracil (5-FU); Folsäure-Analoga wie z.B. Denopterin, Methotrexat, Pteropterin, Trimetrexat; Purin-Analoga wie z.B. Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin, Thioguanin; Pyrimidin-Analoga wie z.B. Ancitabin, Azacitidin, 6-Azauridin, Carmofur, Cytarabin, Didesoxyuridin, Doxifluridin, Enocitabin, Floxuridin, 5-FU; Androgene wie z.B. Calusteron, Dromostanolon-Propionat, Epitiostanol, Mepitiostan, Testolacton; Anti-Adrenale wie z.B. Aminoglutethimid, Mitotan, Trilostan; Folsäure-Ergänzer wie z.B. Frolinsäure; Aceglaton; Aldophosphamidglykosid; Aminolevulinsäure; Amsacrin; Bestrabucil; Bisantren; Edatraxat; Defofamin; Demecolcin; Diaziquon; Elfornithin; Elliptiniumacetat; Eto glucid; Galliumnitrat; Hydroxyharnstoff; Lentinan; Lonidamin; Mitoguzon; Mitoxantron; Mopidamol; Nitracrin; Pentostatin; Phenamet; Pirarubicin; Podophyllinsäure; 2-Ethylhydrazid; Procarbazin; PSK®; Razoxan; Sizofiran; Spirogermanium Tenuazonsäure; Triaziqon; 2,2',2''-Trichlortriethylamin; Urethan; Vindesin; Dacarbazin; Mannomustin; Mitobronitol; Mitolactol; Pipobroman; Gacytosin; Arabinosid ("Ara-C"); Cyclophosphamid; Thiotepa; Taxane, z.B. Paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, 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; Difluormethylorthinin (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 Tumore 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 obigen Substanzen.

Wie hierin verwendet, betrifft der Begriff "auf EGFR-abzielendes Medikament" eine therapeutische Verbindung, die an EGFR bindet und optional EGFR-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 U.S.-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 (U.S.-Patent Nr. 5.212.290); humanisierte und chimäre Antikörper, die EGFR binden, wie beschrieben in U.S.-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.

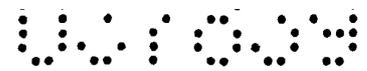
Ein "anti-angiogenes Mittel" betrifft eine Verbindung, die die Entwicklung von Blutgefäßen blockiert oder in gewissem Ausmaß damit interferiert. Der anti-angiogene Faktor kann beispielsweise ein kleines Molekül oder Antikörper sein, das an einen Wachstumsfaktor oder Wachstumsfaktor-Rezeptor, beteiligt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

Der Begriff "Cytokin" ist ein allgemeiner Begriff für Proteine, die von einer Zellpopulation freigesetzt werden und als intrazelluläre Mediatoren auf andere Zellen einwirken. Beispiele für solche Cytokine sind Lymphokine, Monokine und traditionelle Polypeptid-Hormone. In den Cytokinen umfasst sind Wachstumshormone wie z.B. humanes



Wachstumshormon, N-Methionyl-humaner-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- $\alpha$  und - $\beta$ ; Mullerian-inhibierende Substanz; Maus-Gonadotropin-assoziiertes Peptid; Inhibin; Activin; vaskulärer endothelischer Wachstumsfaktor; Integrin; Thrombopoietin (TPO); Nerven-Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF- $\beta$ ; Blutplättchen-Wachstumsfaktor; transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs) wie z.B. TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ : insulinartiger Wachstumsfaktor-I und -II; Erythropoietin (EPO); osteoinduzierende Faktoren; Interferone wie z.B. Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ ; 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 $\alpha$ , 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- $\alpha$  oder TNF- $\beta$  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.

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, Thiophosphat-enthaltende Prodrugs, Sulfat-enthaltende Prodrugs, Peptid-enthaltende Prodrugs, D-Aminosäure-modifizierte Prodrugs, glykosylierte Prodrugs,  $\beta$ -Lactam-enthaltende Prodrugs, optional substituierte Phenoxyacetamid-enthaltende Prodrugs oder optional substituierte Phenylacetamid-



enthaltende Prodrugs, 5-Fluorocytosin und andere 5-Fluorouridin 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 werden können umfassen, sind aber nicht beschränkt auf jene oben beschriebenen chemotherapeutischen Mittel.

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.

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

Ein "Kardioprotektor" ist eine Verbindung oder Zusammensetzung, die Myokard-Dysfunktion (d.h. Kardiomyopathie und/oder kongestive Herzinsuffizienz) verhindert oder herabsetzt, assoziiert mit der Verabreichung eines Medikaments, wie z.B. Anthracyclin Antibiotikum und/oder einem Anti-ErbB2-Antikörper, an einen Patienten. Der Kardioprotektor kann beispielsweise Radikal-vermittelte Kardio-toxische 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 (ICRF-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 (Aminothiold-2-[(3-aminopropyl)amino]ethanthioldihydrogenphosphatester, auch WR-2721 genannt, und dessen dephosphorylierte Zellaufnahmeform, genannt WR-1065) und S-(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.  $\alpha$ -Phenyl-tert-butylNitron (PBN); (Paracchini et al., Anticancer Res. 13, 1607-1612 (1993)); Seleno-organische Verbindungen wie z.B. P251 (Elbesen); und ähnliche.

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül ist ein Nukleinsäuremolekül, das identifiziert und von zumindest einem kontaminierenden Nukleinsäuremolekül getrennt wird, mit dem es gewöhnlich in der natürlichen Quelle der Antikörper-Nukleinsäure assoziiert ist. Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül unterscheidet sich von der in der natur gefundenen Form oder Anordnung. Isolierte Nukleinsäuremoleküle werden deshalb von den Nukleinsäuremolekülen, die in natürlichen Zellen existieren, unterschieden. Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül umfasst jedoch ein in Zellen, die gewöhnlich den Antikörper exprimieren, enthaltenes Nukleinsäuremolekül, wo sich z.B. das Nukleinsäuremolekül an einer chromosomalen Stelle befindet, die von der in natürlichen Zellen verschieden ist.

Der Ausdruck "Kontrollsequenz" betrifft DNA-Sequenzen, die zur Expression einer operativ verbundenen Kodierungssequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich sind. Die für Prokaryoten geeigneten Kontrollsequenzen umfassen z.B. einen Promotor, optional eine Operatorsequenz und eine Ribosom-Bindungsstelle. Es ist bekannt, dass eukaryotische Zellen Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer verwenden.

Eine Nukleinsäure ist "operativ verbunden", wenn sie in einer funktionellen Beziehung zu einer anderen Nukleinsäuresequenz steht. Beispielsweise ist eine DNA für einen Prä-Sequenz- oder sekretorischen Leader operativ mit einer DNA für ein Polypeptid verbunden, wenn es als Prä-Protein exprimiert wird, das sich an der Sekretion des Po-

lypeptids beteiligt; Ein Promotor oder Enhancer ist operativ mit einer Kodierungssequenz verbunden, wenn es die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosomen-Bindungsstelle ist operativ mit einer Kodierungssequenz verbunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie die Translation erleichtert. Im Allgemeinen bedeutet "operativ verbunden", dass die zu verbindenden DNA-Sequenzen zusammenhängend sind und im Falle eines sekretorischen Leader zusammenhängend und in Ablesephase sind. Enhancer müssen jedoch nicht zusammenhängend sein. Das Verbinden wird durch Ligation an günstigen Restriktionsstellen erzielt. Wenn solche Stellen nicht existieren, werden synthetische Oligonukleotid-Adaptoren oder Linker, gemäß konventioneller Praktiken, verwendet.

Wie hierin verwendet, werden die Ausdrücke "Zelle", "Zelllinie" und "Zellkultur" austauschbar verwendet und alle solche Bezeichnungen schließen Nachkommenschaften ein. Folglich umfassen die Worte "Transformanten" und "transformierte Zellen" die ursprünglich betroffenen Zellen und davon hergeleitete Kulturen ohne Berücksichtigung der Anzahl der Transfers. Es versteht sich ebenso, dass aufgrund von beabsichtigten und unabsichtlichen Mutationen nicht alle Nachkommenschaften in ihrem DNA-Gehalt exakt identisch sein müssen. Mutanten-Nachkommenschaften, die dieselbe Funktion oder biologische Aktivität besitzen wie jene, auf die in der ursprünglich transformierten Zelle gescreent worden ist, sind eingeschlossen. Wo gesonderte Bezeichnungen beabsichtigt sind, gehen sie aus dem Kontext klar hervor.

## II. Herstellung von Anti-ErbB2-Antikörpern

Es folgt eine Beschreibung beispielhafter Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gemäß vorliegender Erfindung. Das zur Herstellung von Antikörpern zu verwendende ErbB-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

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-Hemocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin oder Sojabohnen-Trypsininhibitor, unter Verwendung eines bifunktionellen oder derivatisierenden Mittels, beispielsweise Maleoimidobenzoylsulfosuccinimidester (Konjugation über Cystein-Reste), N-Hydroxysuccinimid (über Lysin-Reste), Glutaraldehyd, Bernsteinsäureanhydrid,  $\text{SOCl}_2$  oder  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , wobei R und  $\text{R}^1$  verschiedene Alkylgruppen sind.

Tiere werden gegen das Antigen, Immunogen-Konjugate, oder Derivate immunisiert, indem z.B. 100  $\mu\text{g}$  oder 5  $\mu\text{g}$  (für Kaninchen bzw. Mäuse) des Proteins oder Konjugats mit 3 Volumina Freund'schem komplettem Adjuvans kombiniert 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 Freund'schem 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 rekombinater Zellkultur als Fusionsproteine hergestellt werden. Ebenso sind aggregierende Mittel wie Alaun zur Verstärkung der Immunantwort in geeigneter Weise verwendbar.

(ii) Monoklonale Antikörper

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.

Beispielsweise können monoklonale Antikörper mittels dem Hybridom-Verfahren, das zuerst von Kohler et al., Nature 256, 495 (1995), beschrieben worden ist, oder mittels rekombinanter DNA-Verfahren hergestellt werden (U.S.-Patent Nr. 4.816.567).

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)).

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 Hybridoma, 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.

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 sensitiv 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)).

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 Immunosorptions-Assay (ELISA), bestimmt.

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

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-MEM- oder RPMI-1640-Medium. Zusätzlich können die Hybridomzellen in vivo als Ascites-Tumore in einem Tier gezüchtet werden.

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.

DNA, die für monoklonale Antikörper kodiert, kann mittels konventioneller Verfahren (z.B. unter Verwendung von Oligonukleotid-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, Chinchamster-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. Opinion in Immunol.* 5, 256-262 (1993) und Plückthun, *Immunol. Revs* 130, 151-188 (1992).

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 monoklonaler Antikörper zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern.

Die DNA kann auch modifiziert werden, beispielsweise durch Substitution der kodierenden Sequenz humaner Schwereketten- und Leichtketten-Konstantdomänen anstelle der homologen murinen Sequenzen (U.S.-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.

Typischerweise werden die konstanten Domänen eines Antikörpers durch solche Nicht-Immunglobulin-Peptide substituiert, oder sie substituieren die variabel 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

Verfahren für humanisierte Antikörper sind im Fach beschrieben worden. Bevorzugt besitzt ein humanisierter Antikörper eine oder mehrere eingeführte Aminosäurereste, die von einer nicht-humanen Quelle herrühren. Diese nicht-humanen Aminosäurereste werden oft als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise von einer "Import"-variablen-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); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988)) durchgeführt werden, und zwar durch Substitution der hypervariablen Sequenzen mit den entsprechenden Sequenzen eines humanen Antikörpers. Demgemäß sind solche "humanisierten" Antikörper chimäre Antikörper (U.S.-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.

Die Auswahl der für die Herstellung humanisierter Antikörper zu verwendenden humanen variablen Domänen 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)).

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. 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.

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- $\alpha$ - 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.

Ein exemplarischer humanisierter Antikörper hierin von Interesse beinhaltet die Komplementaritäts-bestimmenden Reste GFTFDYTMX 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 im Wesentlichen die Affinität des Antikörpers 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, her-

gestellt werden. Der insbesondere bevorzugte humanisierte Antikörper beinhaltet die variable Schwerketten-Domänen-Aminosäuresequenz der Seq.-ID Nr. 4.

Der humanisierte Antikörper kann die Komplementaritäts-bestimmenden Reste KAS-QDVSIGVA (Seq.-ID Nr. 10) der variablen leichten Domäne beinhalten; weiters SASY- $X^1X^2X^3$ , wobei  $X^1$  bevorzugt R oder L ist,  $X^2$  bevorzugt Y oder E ist und  $X^3$  bevorzugt T oder S ist (Seq.-ID Nr. 11); und/oder 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 im Wesentlichen die Affinität des Antikörpers 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.

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).

Verschiedene Formen des humanisierten Antikörpers oder affinitätsgereiften Antikörpers werden erwogen. Beispielsweise kann der humanisierte Antikörper oder affinitäts-gereifte Antikörper ein Antikörperfragment sein, wie z.B. Fab, das optional mit einem oder mehreren zytotoxischen Mittel konjugiert ist, um ein Immunkonjugat zu ge-nerieren. Alternativ dazu kann der humanisierte Antikörper oder affinitätsgereifte Anti-körper ein intakter Antikörper sein, wie z.B. ein intakter IgG1-Antikörper.

(iv) Humane Antikörper

Als Alternative zur Humanisierung können humane Antikörper generiert werden. Bei-spielsweise 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 be-schrieben worden, dass die homozygote Deletion der Schwereketten-verbindenden Re-gion ( $J_H$ ) von Antikörpern in chimären und Keimbahn-Mutantenmäusen zur vollständi-gen Inhibierung endogener Antikörper-Produktion führt. Transfer der humanen Keim-bahn-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); Bruggermann et al., Year in Immuno. 7, 33 (1993); und die U.S.-Patente Nr. 5.591.669, 5.589.369 und 5.545.807.

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-im-munisierter 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 U.S.-Patente Nr. 5.565.332 und 5.573.905.

Wie oben diskutiert können humane Antikörper auch durch in vitro Aktivierte B-Zellen generiert werden (siehe die U.S.-Patente Nr. 5.567.610 und 5.229.275).

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

#### (v) Antikörper-Fragmente

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 Me-*

thods 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')<sub>2</sub>-Fragmente zu liefern (Carter et al., Bio/Technology 10, 163-167 (1992)). Gemäß einem anderen Ansatz können F(ab')<sub>2</sub>-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 WO93/16185; U.S.-Patent Nr. 5.571.894 und U.S.-Patent Nr. 5.587.458. Das Antikörper-Fragment kann auch ein "linearer Antikörper" sein, z.B. wie beispielsweise beschrieben in U.S.-Patent Nr. 5,641,870. Solche lineare Antikörper können monospezifisch oder bispezifisch sein.

(vi) Bispezifische Antikörper

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. F(ab')<sub>2</sub>-bispezifischer Antikörper) produziert werden.

WO96/16673 beschreibt einen bispezifischen Anti-ErbB2/anti-FcγRIII-Antikörper und U.S.-Patent Nr. 5.837.234 offenbart einen bispezifischen Anti-ErbB2/anti-FcγRI-Antikörper. Ein bispezifischer Anti-ErbB2/Fcα-Antikörper wird in WO98/02463 gezeigt. U.S.-Patent Nr. 5.821.337 unterrichtet von einem bispezifischen Anti-ErbB2/Anti-CD3-Antikörper.

Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind fachbekannt. Traditionelle Produktion von Vollängen-bispezifischen 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 Trauncker et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991).

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-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Regionen beinhaltet. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerketten-Region (CH<sub>1</sub>), enthaltend die für Leichtketten-Bindung notwendige Stelle, in zumindest eine 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 Wirtsor-

ganismus 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 insertieren wenn die Expression von zumindest zwei Polypeptidketten in gleichen Verhältnissen zu hohen Ausbeuten führt oder wenn die Verhältnisse von keiner besonderen Signifikanz sind.

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).

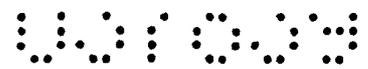
Gemäß einem weiteren Ansatz, beschrieben im U.S.-Patent Nr. 5.731.168, kann die Schnittstelle zwischen einem Paar von Antikörpermolekülen so konstruiert werden, dass der Prozentanteil von Heterodimeren, die aus rekombinanter Zellkultur gewonnen wird, maximiert wird. Die bevorzugte Schnittstelle beinhaltet zumindest einen Teil der C<sub>H</sub>3-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 am Interface 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.

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 (U.S.-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 U.S.-Patent Nr. 4.676.980, gemeinsam mit einer Anzahl von Vernetzungstechniken, offenbart.

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 zugenerieren. 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.

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 $Fab'$ -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 und normale Human-T-Zellen zu binden, sowie auch die lytische Aktivität humaner, cytotoxischer Lymphozyten gegen humane Brusttumor-Targets auszulösen.

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-Zippern 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 ( $V_H$ ), verbunden mit einer variablen 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).

Antikörper mit mehr als zwei Valenzen werden erwogen. Beispielsweise können trispezifische Antikörper hergestellt werden. Tutt et al., *J. Immunol.* 147, 60 (1991).

(vii) Andere Aminosäuresequenz-Modifikationen

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 Nukleotid-Änderungen in die Nukleinsäure des Anti-ErbB2-Antikörpers oder durch Peptidsynthese hergestellt. Solch 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 Konstrukt zu gelangen, sofern das endgültige Konstrukt die gewünschten Charakteristika besitzt. Die Aminosäure-Änderungen kann auch den post-translationellen Prozess des Anti-ErbB2-Antikörpers verändern, wie z.B. die Änderung der Anzahl oder Position von Glykosylierungsstellen.

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-Codon 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.

Aminosäuresequenz-Insertionen umfassen amino- und/oder carboxyterminale Fusionen im Längenbereich von einem Rest bis zu Polypeptiden mit hundert oder mehr Resten, sowie auch Intrasequenz-Insertionen von einzelnen oder multiplen 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.

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.

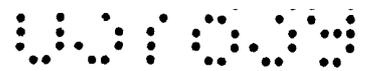


Tabelle 1

Ursprünglicher Rest    Beispielhafte Substitutionen    Bevorzugte Substitutionen

ursprüngl. 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

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. Na-



türlich 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.

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

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 beigefügt werden, um seine Stabilität zu verbessern (besonders wenn der Antikörper ein Antikörperfragment, wie z.B. ein Fv-Fragment, ist).

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 gescreent (z.B. Bindungsaffinität). 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 dazu oder zusätzlich 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.

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, angefügt werden.

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. O-verknüpfte 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.

Die Anfügung von Glykosylierungsstellen an en 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.

Nukleinsäuremoleküle, 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 Oligonukleotid-vermittelter (oder ortsspezifischer) Mutagenese, PCR-Mutagenese, und Kassetten-Mutagenese einer vorher hergestellten Varianten- oder Nicht-Varianten-Version des Anti-ErbB2-Antikörpers.

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 dazu oder zusätzlich 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).

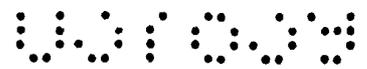
Um die Serum-Halbwertszeit des Antikörpers zu steigern, kann man ein Salvage-Rezeptor-bindendes Epitop in den Antikörper (besonders in ein Antikörperfragment) einbauen, wie beispielsweise beschrieben im U.S.-Patent Nr. 5,739,277. Wie hierin verwendet be-  
trifft der Ausdruck "Salvage-Rezeptor-bindendes Epitop" ein Epitop der Fc-Region eines IgG-Moleküls (z.B. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> oder IgG<sub>4</sub>), das für die Erhöhung der in vivo-Halbwertszeit des IgG-Moleküls im Serum verantwortlich ist.

(viii) Screening auf Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften

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

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.

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. Monokonale Anti-ErbB2-Antikörper können zu jedem Napf



zugesetzt und für 30 Minuten inkubiert werden.  $^{125}\text{I}$ -markiertes rHRG $\beta_{177-224}$  (25 pm) kann dann zugesetzt und die Inkubation für 4 bis 16 Stunden fortgesetzt werden. Dosis-Antwort-Kurven können erstellt und ein  $\text{IC}_{50}$ -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  $\text{IC}_{50}$  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  $\text{IC}_{50}$  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.

Alternativ dazu oder zusätzlich 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.

In einer Ausführungsform kann man auf einen Antikörper screenen, der die HRG-Stimulation von p180-Tyrosin-Phosphorylierung in MCF7-Zellen inhibiert und wird 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 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden; dann kann rHRG $\beta_{177-224}$  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  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuf-

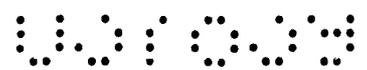
fer (5% SDS, 25 mM DTT und 25 mM Tris-HCl, pH 6,8) gestoppt werden. Jede Probe (25  $\mu$ l) kann in einem 4-12%igen Gradientengel (Novex) elektrophoretisch getrennt und dann elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert werden. Antiphosphotyrosin- (1  $\mu$ g/ml) Immunblots können entwickelt und die Intensität der reaktiven Hauptbande bei MW  $\approx$  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 Dosisantwort-Kurve für die Inhibierung der HRG-Stimulation der p180-Tyrosin-Phosphorylierung, wie bestimmt mittels Reflexionsdensitometrie, kann angefertigt und ein  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  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.

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  $\mu$ g/ml) für 4 Tage behandelt und mit Kristallviolett behandelt werden. Inkubation mit einem Anti-ErbB2-Antikörper könnte einen wachstumshemmenden Effekt auf diese Zelllinie zeigen, ähnlich wie er vom monoklonalen Antikörper C24 gezeigt wird. In einer weiteren Ausführungsform 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.

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-Immunitations-Experiment, wie z.B. dem in Beispiel 2 beschrieben, und zwar effektiver als monoklonaler Antikörper 4D5 und bevorzugt wesentlich effektiver als monoklonaler Antikörper 7F3.

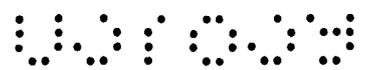
Um wachstumshemmende Anti-ErbB2-Antikörper zu identifizieren, kann man auf Antikörper screenen, die das Wachstum von Krebszellen, die ErbB2 exprimieren, inhibieren. In einer Ausführungsform ist der Antikörper der Wahl fähig, das Wachstum von SK-BR-3-Zellen in Zellkultur zu ungefähr 20-100% und bevorzugt zu 50-100% bei einer Antikörper-Konzentration von ungefähr 0,5 bis 30 µg/ml zu inhibieren. Um solche Antikörper zu identifizieren, kann der im U.S.-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) plattiert. 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 mittels 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.

Zur Selektion von Antikörpern, die Zelltod, Verlust von 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  $3 \times 10^6$  pro Platte in 100 x 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  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) 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<sup>TM</sup>-Durchflusszytometer und FACCONVERT<sup>TM</sup>-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.

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  $\text{Ca}^{2+}$ -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<sup>TM</sup>-Durchflusszytometer und FACCONVERT<sup>TM</sup>-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.



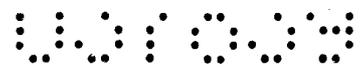
Zusätzlich zum Annexin-Bindungstest ist ein DNA-Färbetest unter Verwendung von BT474-Zellen verfügbar. Um diesen Test auszuführen, werden BT474-Zellen, die mit den in den vorangegangenen zwei Absätzen beschriebenen Antikörpern von Interesse behandelt worden sind, mit 9 µg/ml HOECHST 33342<sup>TM</sup>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

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 dazu oder zusätzlich kann Epitop-Kartierung mittels fachbekannten Methoden (siehe z.B. die Fig. 1A und 1B hierin) durchgeführt werden.

#### (ix) Immunkonjugate

Die Erfindung betrifft auch Immunkonjugate, 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.

Zur Erzeugung solcher Immunkonjugate zweckdienliche chemotherapeutische Mittel sind oben beschrieben worden. Konjugate eines Antikörpers mit einem oder mehreren kleinmolekularen Toxinen, wie z.B. ein Calicheamicin, ein Maytansin (U.S.-Patent Nr. 5.208.020), ein Trichothin und CC1065, werden hierin auch ins Auge gefasst.

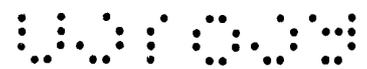


In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, wird der Antikörper an ein oder mehrere Maytansin-Moleküle konjugiert (z.B. ungefähr 1 bis ungefähr 10 Maytansin-Moleküle pro Antikörper-Molekül). Maytansin kann beispielsweise zu May-SS-Me umgesetzt werden, das zu May-SH3 reduziert und mit modifiziertem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

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  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-Acetyl- $\gamma_1^I$ , PSAG und  $\theta^I_1$  (Hinman et al., Cancer Research 53, 3336-3342 (1993); und Lode et al., Cancer Research 58, 2925-2928 (1998)). Siehe auch die U.S.-Patente Nr. 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586 und 5.773.001, hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen.

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, Modecin-A-Kette, Alpha-Sarcin, Aleurites fordii-Proteine, Dianthin-Proteine, Phytolaca americana-Proteine (PAPI, PAPII und PAP-S), Mormordica charantina-Inhibitor, Curcin, Crotin, Sapaonaria officinalis-Inhibitor, Gelonin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Tricothecene. Siehe z.B. WO 93/21232, publiziert am 28. Oktober 1993.

Die vorliegende Erfindung erwägt weiters ein Immunkonjugat, das zwischen einem Antikörper und einer Verbindung mit nukleolytischer Aktivität (z.B. eine Ribonuklease oder eine DNA-Endonuklease wie z.B. Desoxyribonuklease; DNase) gebildet wird.

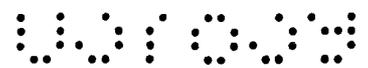


Eine Reihe von radioaktiven Isotopen sind für die Produktion von radiokonjugierten Anti-ErbB2-Antikörpern verfügbar. Beispiele umfassen  $\text{At}^{211}$ ,  $\text{I}^{131}$ ,  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{Y}^{90}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$ ,  $\text{Sm}^{153}$ ,  $\text{Bi}^{212}$ , 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

Konjugate des Antikörpers mit zytotoxischem Mittel können unter Verwendung einer Vielzahl von bifunktionellen Kopplungs-Mittel hergestellt werden, wie z.B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)-propionat (SPDP), Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat, Iminothiolan (IT), bifunktionelle Derivate von Imidoestern (wie z.B. Dimethyladipimidat-HCl), aktive Ester (wie z.B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyde (wie z.B. Glutaraldehyd), Bis-Azido-Verbindungen (wie z.B. Bis-(p-azidobenzoyl)hexandiamin), Bis-Diazonium-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 I-Isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylentriaminpentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein exemplarischer Chelatbildner für die Konjugation von Radionukleotid an den Antikörper. Siehe WO94/11026. Der Linker kann ein "abspaltbarer Linker" sein, um die Freisetzung des zytotoxischen Medikaments in der Zelle zu erleichtern. Beispielsweise kann ein säurelabiler Linker, Peptidase-sensitiver Linker, Dimethyl-Linker oder Disulfid-enthaltender linker (Chari et al., Cancer Research 52, 127-131 (1992)) verwendet werden.

Alternativ dazu kann ein Fusionsprotein, umfassend den Anti-ErbB2-Antikörper und zytotoxisches Mittel, hergestellt werden, z.B. mittels rekombinaten Techniken oder Peptidsynthese.

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 einem Clearing-Mittel



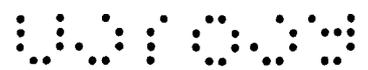
und nachfolgender Verabreichung eines "Liganden" (z.B. Avidin), der an ein zytotoxisches Mittel (z.B. ein Radionukleotid) konjugiert ist.

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

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 U.S.-Patent Nr. 4.975.278.

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.

Für das Verfahren dieser Erfindung zweckdienliche Enzyme umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf, alkalische Phosphatase, zweckdienlich für die Umsetzung Phosphat-enthaltender Prodrugs zu freien Medikamenten; Arylsulfatase, zweckdienlich für die Umsetzung Sulfat-enthaltender Prodrugs zu freien Medikamenten; Cytosin-Deaminase, zweckdienlich für die Umsetzung von nicht-toxischem 5-Fluorocytosin zum Anti-Krebs-Medikament 5-Fluoruracil; Proteasen wie z.B. Serratia-Protease, Thermolysin, Subtilisin, Carboxypeptidasen und Cathepsine ( wie z.B. Capthesine B und L), zweckdienlich für die Umsetzung Peptid-enthaltender Prodrugs zu freien Medikamenten; D-Alanylcarboxypeptidasen, zweckdienlich für die Umsetzung von Prodrugsn, die D-Aminosäure-Substituenten enthalten; Kohlenhydrat-spaltende Enzyme, wie z.B.  $\beta$ -Galactosidase und Neuraminidase, zweckdienlich für die Umsetzung glykosylierter Prodrugs zu freien Medikamenten;  $\beta$ -Lactamase, zweckdienlich für die Umsetzung  $\beta$ -Lactam-derivatisierter Medikamente zu freien Medikamenten; und Penicillinamidasen, wie z.B. Penicillin V-Amidase oder Penicillin G-Amidase, zweckdienlich für die Umsetzung von Medikamenten, die an ihren Amin-Stickstoffen mit Phenoxyacetyl- bzw. Phenylacetyl-Gruppen derivati-



siert sind, zu den freien Medikamenten. 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.

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 können Fusionsproteine, die zumindest die Antigen-bindende Region eines Antikörpers der Erfindung, gebunden an zumindest einem funktionell aktiven Teil eines Enzyms der Erfindung, umfassen, unter Verwendung gut fachbekannter, rekombinater DNA-Techniken konstruiert werden (siehe z.B. Neuberger et al., Nature 312, 604-608 (1984)).

#### (xi) Andere Antikörper-Modifikationen

Andere Modifikationen des Antikörpers werden hierin erwogen. Beispielsweise kann der Antikörper an eines von vielen nicht-proteinartigen Polymeren gebunden werden, z.B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyoxyalkylene 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.

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); U.S.-Patente Nr. 4.485.045 und 4.544.545; und WO 97/38731, publiziert am 23. Oktober 1997. Liposomen mit erhöhter Zirkulationszeit sind in U.S.-Patent Nr. 5.013.556 offenbart.

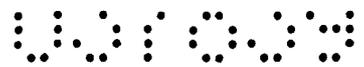
Insbesondere zweckdienliche Liposomen können mittels Umkehrphasen-Verdampfungsverfahren erzeugt werden, und zwar mit einer Lipid-Zusammensetzung, die Phosphatidylcholin, Cholesterin und PEG-derivatisierte Phosphatidylethanolamine (PEG-PE) umfasst. Die Liposomen werden durch Filter definierter Porengröße 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. Vektoren, Wirtszellen und Rekombinationsverfahren

Die Erfindung führt auch zu isolierten Nukleinsäuren, die für den humanisierten Anti-ErbB2-Antikörper kodieren, die Nukleinsäure enthaltende Vektoren und Wirtszellen und Rekombinationsverfahren zur Produktion des Antikörpers.

Zur rekombinanten Produktion des Antikörpers wird die kodierende Nukleinsäure isoliert und für weitere Klonierung (Amplifikation der DNA) oder für die Expression in einen replizierbaren Vektor inseriert. DNA, die für den monoklonalen Antikörper kodiert, kann mittels konventioneller Prozeduren (z.B. mittels Oligonukleotid-Sonden, die fähig sind, spezifisch an Gene zu binden, die für die schweren und leichten Ketten der Antikörper kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Viele Vektoren sind verfügbar. Die Vektoren umfassen im Allgemeinen, sind aber nicht eingeschränkt auf, eine oder mehrere der folgenden Komponenten: Eine Signalsequenz, einen Replikationsur-



sprung, ein oder mehrere Markergene, ein Enhancer-Element, einen Promotor und eine Transkriptions-Terminationssequenz.

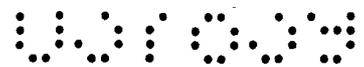
(i) Signalsequenz-Komponente

Der Anti-ErbB2-Antikörper dieser Erfindung kann rekombinant nicht nur direkt, sondern auch als Fusionspeptid mit einem heterologen Polypeptid reproduziert werden, das bevorzugt eine Signalsequenz oder ein anderes Polypeptid ist, das eine spezifische Spaltungsstelle am N-Terminus des gereiften Proteins oder Polypeptids besitzt. Die ausgewählte heterologe Signalsequenz ist bevorzugt eine, die von der Wirtszelle erkannt oder prozessiert (d.h. durch eine Signalpeptidase gespalten) wird. Für prokaryotische Wirtszellen, die die native Anti-ErbB2-Antikörper-Signalsequenz nicht erkennen und prozessieren, wird die Signalsequenz durch eine ausgewählte prokaryotische Signalsequenz, zum Beispiel aus der Gruppe der alkalischen Phosphatase-, Penicillinase-, lpp- oder hitzestabiles Enterotoxin II-Leader, substituiert. Für Hefe-Sekretion kann die native Signalsequenz durch z.B. durch Hefe-Invertase-Leader,  $\alpha$ -Faktor-Leader (einschließlich *Saccharomyces*- und *Kluyveromyces*-  $\alpha$ -Faktor-Leader) oder Phosphatase-Leader, den *C. albicans* Glucoamylase-Leader oder dem in WO 90/13646 beschriebenen Signal substituiert werden. Für Säugetierzellen-Expression sind Säugetier-Signalsequenzen, sowie auch Virus-Sekretionsleader, zum Beispiel das Herpes Simplex gD-Signal, verfügbar.

Die DNA für eine solche Vorläufer-Region wird ins Leseraster an DNA ligiert, die für den Anti-ErbB2-Antikörper kodiert.

(ii) Replikationsursprung-Komponente

Sowohl Expressions-, als auch Klonierungsvektoren enthalten eine Nukleinsäuresequenz, die es dem Vektor erlaubt, in einer oder mehreren Wirtszellen zu replizieren. Im Allgemeinen ist diese Sequenz in Klonierungsvektoren eine, die es dem Vektor ermöglicht, unabhängig von der chromosomalen Wirts-DNA zu replizieren, und enthält Repli-



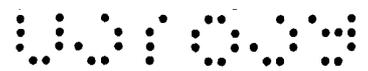
kationsursprunge oder autonom replizierende Sequenzen. Solche Sequenzen sind für eine Vielzahl von Bakterien, Hefen und Viren gut bekannt. Der Replikationsursprung des Plasmids pBR322 ist für die meisten Gram-negativen Bakterien geeignet, der 2 $\mu$ -Plasmid-Ursprung ist für Hefen geeignet und verschiedene Virus-Ursprunge (SV40, Polyoma, Adenovirus, VSV oder BPV) sind für die Klonierung von Vektoren in Säugetierzellen geeignet. Im Allgemeinen wird die Replikationsursprung-Komponente für Säugetier-Expressionsvektoren nicht benötigt (der SV40-Ursprung wird typischerweise nur deshalb verwendet, weil er den frühen Promotor enthält).

### (iii) Selektionsgen-Komponente

Expressions- und Klonierungsvektoren können ein Selektionsgen enthalten und wird auch als Selektionsmarker bezeichnet. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine die (a) Resistenz gegen Antibiotika oder andere Toxine übertragen, z.B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oder Tetracyclin, (b) Auxotrophie-Defizienzen komplementieren oder (c) entscheidende Nährstoffe bereitstellen, die in komplexen Nährmedien nicht enthalten sind, z.B. das für D-Alanin-Racemase von Bazilli kodierende Gen.

Ein Beispiel eines Selektionsschemas verwendet ein Medikament, um das Wachstum einer Wirtszelle zum Stillstand zu bringen. Jene Zellen, die erfolgreich mit einem heterologen Gen transformiert sind, produzieren ein Protein, das Medikamenten-Resistenz überträgt und überleben so den Selektionsvorgang. Beispiele solch dominanter Selektion verwenden die Medikamente Neomycin, Mycophenolsäure und Hygromycin.

Ein weiteres Beispiel geeigneter Selektionsmarker für Säugetierzellen sind jene, die die Identifizierung von Zellen erlauben, die für die Aufnahme der Anti-ErbB2-Antikörper-Nukleinsäure kompetent sind, wie z.B. DHFR, Thymidin-Kinase, Metallothionein-I und -II, vorzugsweise Primaten-Metallothionein-Gene, Adenosin-Deamidase, Orithinin-Decarboxylase, usw.



Beispielsweise werden mit dem DHFR-Selektionsgen transformierte Zellen zunächst identifiziert, indem alle Transformanten in einem Kulturmedium, das Methotrexat (Mtx), ein kompetitiver DHFR-Antagonist, kultiviert werden. Wenn Wildtyp-DHFR angewendet wird, ist eine geeignete Wirtszelle die DHFR-Aktivitäts-defiziente Chinahamster-Eierstock- (CHO-) Zelllinie.

Alternativ dazu können Wirtszellen (insbesondere Wildtyp-Wirte, die endogenes DHFR-Protein enthalten), transformiert oder co-transformiert mit DNA-Sequenzen, die für Anti-ErbB2-Antikörper kodieren, Wildtyp-DHFR-Protein und einem anderen Selektionsmarker, wie z.B. Aminoglykosid-3'-phosphotransferase (APH), selektiert werden, indem die Zellen in Medium gezüchtet werden, das ein Selektionsmittel für den Selektionsmarker enthält, wie z.B. ein aminoglykosidisches Antibiotikum, z.B. Kanamycin, Neomycin oder G418. Siehe U.S.-Patent Nr. 4.965.199.

Ein geeignetes Gen für Verwendung in Hefe ist das im Hefeplasmid YRp7 vorhandene *trp1*-Gen (Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979)). Das *trp1*-Gen liefert einen Selektionsmarker für einen Mutantenstamm von Hefe, dem die Fähigkeit zum Wachstum auf Tryptophan fehlt, z.B. ATCC Nr. 44076 oder PEP4-1. Jones, Genetics 85, 12 (1977). Das Vorhandensein von *trp1*-Schädigung im Hefe-Wirtszellen-Genom liefert dann eine effektive Umgebung zur Detektion von Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan. Auf ähnliche Weise werden *Leu2*-defiziente Hefestämme (ATCC 20.622 oder 38.626) durch bekannte, das *Leu2*-Gen tragende Plasmide komplementiert.

Zusätzlich können vom 1,6  $\mu\text{m}$ -ringförmigen Plasmid pKD1 herrührende Vektoren zur Transformation von *Kluyveromyces*-Hefen verwendet werden. Alternativ dazu wurde über ein Expressionssystem für die Produktion von rekombinantem Kälber-Chymosin für *K. lactis* im Großmaßstab berichtet. Van den Berg, Bio/Technology 8, 135 (1990). Stabile Multikopien-Expressionsvektoren für die Sekretion von reifem, rekombinantem humanem Serumalbumin durch industrielle Stämme von *Kluyveromyces* sind ebenfalls offenbart worden. Fleer et al., Bio/Technology 9, 968-975 (1991).

(iv) Promotor-Komponente

Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten gewöhnlich einen Promotor, der durch den Wirtsorganismus erkannt wird und operativ an die Anti-ErbB2-Antikörper-Nukleinsäure gebunden ist. Geeignete Promotoren für die Verwendung in prokaryotischen Wirten umfassen den phoA-Promotor,  $\beta$ -Lactamase- und Lactose-Promotorsysteme, alkalische Phosphatase, ein Tryptophan- (trp-) Promotorsystem und Hybridpromotoren wie z.B. der tac-Promotor. Andere bekannte bakterielle Promotoren sind jedoch ebenfalls geeignet. Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Systemen werden auch eine Shine-Dalgarno- (S.D.-) Sequenz enthalten, die operativ an die Anti-ErbB2-Antikörper-kodierende DNA gebunden ist.

Promotorsequenzen für Eukaryoten sind bekannt. So gut wie alle eukaryotischen Gene besitzen eine AT-reiche Region, die ungefähr 25 bis 30 Basen stromaufwärts der Stelle lokalisiert ist, wo die Transkription initiiert wird. Eine weitere Sequenz, die 70 bis 80 Basen stromaufwärts vom Start der Transkription vieler Gene gefunden wird, ist eine CNCAAT-Region, worin N jedes Nukleotid sein kann. Am 3'-Ende der meisten eukaryotischen Gene befindet sich eine AATAAA-Sequenz, die das Signal für die Addition des Poly A-Schwanzes an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz sein könnte. Alle diese Sequenzen werden in geeigneter Weise in eukaryotische Expressionsvektoren inseriert.

Beispiele geeigneter Promotorsequenzen zur Verwendung in Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglycerat-Kinase oder glykolytische Enzyme, wie z.B. Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Decarboxylase, Phosphofruktokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Pyruvat-Kinase, Triosephosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und Glucokinase.

Andere Hefepromotoren, die induzierbare Promotoren mit dem zusätzlichen Vorteil der Transkriptionskontrolle über Wachstumsbedingungen sind, sind die Promotorregio-

nen für Alkohol-Dehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, mit Stickstoff-Stoffwechsel assoziierte degradative Enzyme, Metallothionein, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und für Maltose- und Glucoseverwertung verantwortliche Enzyme. Geeignete Vektoren und Promotoren für Verwendung in der Hefeexpression sind in der EP-A-73.657 näher beschrieben.

Anti-ErbB2-Antikörper-Transkription von Vektoren in Säugetier-Wirtszellen wird beispielsweise durch Promotoren gesteuert, die aus Genomen von Viren erhalten werden, wie z.B. Polyomavirus, Geflügelpockenvirus, Adenovirus (wie z.B. Adenovirus 2), Rinder-Papillomavirus, Vogelsarkomavirus, Zytomegalievirus, ein Retrovirus, Hepatitis-B-Virus und insbesondere bevorzugt Simian-Virus-40 (SV40), aus heterologen Säugetier-Promotoren, z.B. den Actin-Promotor oder einem Immunglobulin-Promotor, aus Hitze-schock-Promotoren, vorausgesetzt das solche Promotoren mit den Wirtszellensystemen kompatibel sind.

Die frühen und späten Promotoren des SV40-Virus werden zweckdienlich als ein SV40-Fragment erhalten, das auch den viralen SV40-Replikationsursprung enthält. Der unmittelbar frühe Promotor des humanen Zytomegalievirus wird zweckdienlich als HindIII E-Restriktionsfragment erhalten. Ein System zur Expression von DNA in Säugetier-Wirten unter Verwendung des Rinder-Papillomavirus als Vektor wird offenbart im U.S.-Patent Nr. 4.419.446. Eine Modifikation dieses Systems wird beschrieben im U.S.-Patent Nr. 4.601.978. Siehe auch Reyes et al. Nature 297, 598-601 (1982) über die Expression von humaner  $\beta$ -Interferon-cDNA in Mauszellen unter der Kontrolle eines Thymidin-Kinase-Promotors aus Herpes Simplex-Virus. Alternativ dazu kann die lange terminale Wiederholung von Rous-Sarkoma-Virus als Promotor verwendet werden.

(v) Enhancer-Element-Komponente

Die Transkription der DNA, die für den Anti-ErbB2-Antikörper dieser Erfindung kodiert, durch höhere Eukaryoten wird oft durch die Insertion einer Enhancer-Sequenz in den

Vektor verstärkt. Viele Enhancer-Sequenzen aus Säugetier-Genen sind bekannt (Globin, Elastase, Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein und Insulin). Typischerweise wird man jedoch einen Enhancer aus einem Virus eukaryotischer Zellen verwenden. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer an der späten Seite des Replikationsursprungs (bp 100-270), den Zytomegalievirus-früher-Promotor-Enhancer, den Polyoma-Enhancer an der späten Stelle des Replikationsursprungs, und Adenovirus-Enhancer. Siehe auch Yaniv, Nature 297, 17-18 (1982) über Enhancer-Elemente zur Aktivierung eukaryotischer Promotoren. Der Enhancer kann an einer Position 5'- oder 3'- zur Anti-ErbB2-Antikörper-kodierenden Sequenz in den Vektor gespleißt werden, ist aber bevorzugt an einer Stelle 5' vom Promotor lokalisiert.

(vi) Transkriptions-Terminations-Komponente

In eukaryotischen Zellen (Hefe, Pilze, Insekt, Pflanze, Tier, Mensch oder kernhaltige Zellen anderer vielzelliger Organismen) verwendete Expressionsvektoren werden auch Sequenzen enthalten, die für die Termination der Transkription und zur Stabilisierung der mRNA notwendig sind. Solche Sequenzen sind gewöhnlich aus den 5'- und gelegentlich aus den 3'-untranslatierten Regionen eukaryotischer oder viraler DNAs und cDNAs erhältlich. Diese Regionen enthalten Nukleotidsequenzen, die im untranslatierten Teil der mRNA, die für den Anti-ErbB2-Antikörper kodiert, als Polyadenylierte Fragmente transkribiert werden. Eine zweckdienliche Transkriptions-Terminations-Komponente ist die Rinder-Wachstumshormon-Polyadenylierungsregion. Siehe WO 94/11026 und den darin offenbarten Expressionsvektor.

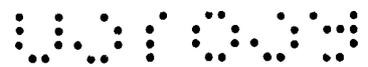
(vii) Selektion und Transformation von Wirtszellen

Geeignete Wirtszellen zur Klonierung oder Expression der DNA in die Vektoren hierin sind die oben beschriebenen Prokaryoten-, Hefe- oder höheren Eukaryotenzellen. Für diesen Zweck geeignete Prokaryoten umfassen Eubakterien, wie z.B. Gram-negative und Gram-positive Organismen, zum Beispiel Enterobacteriaceae, wie z.B. Escherichia, z.B.

*E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, z.B. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, z.B. *Serratia marcescans* und *Shigella*, sowie auch Bacillen, wie z.B. *B. subtilis* und *B. licheniformis* (z.B. *B. licheniformis* 41P, offenbart in DD 266,710, publiziert am 12. April 1989), *Pseudomonas*, wie z.B. *P. aeruginosa* und *Streptomyces*. Ein bevorzugter *E. coli*-Klonierungswirt ist *E. coli* 294 (ATCC 31.446), obwohl andere Stämme, wie z.B. *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) und *E. coli* W3110 (ATCC 31.446) geeignet sind. Diese Beispiele sind illustrativ und nicht einschränkend.

Zusätzlich zu Prokaryoten, sind eukaryotische Mikroorganismen, wie z.B. filamentöse Pilze oder Hefen geeignete Expressionswirte für Anti-ErbB2-Antikörper-kodierende Vektoren. *Saccharomyces cerevisiae* oder gemeine Backhefe ist der am meisten gebräuchliche unter den eukaryotischen Wirts-Mikroorganismen. Jedoch sind eine Anzahl anderer Genera, Spezies und Stämme allgemein erhältlich und hierin geeignet, wie z.B. *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*-Wirte, wie z.B. *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* und *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP-A-402.226); *Pichia pastoris* (EP-A-183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP-A-244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, wie z.B. *Schwanniomyces occidentalis* und filamentöse Pilze, wie z.B. *Neurospora*-, *Penicillium*-, *Tolypocladium*- und *Aspergillus*-Wirte, wie z.B. *A. nidulans* und *A. niger*.

Geeignete Wirtszellen zur Expression von glykosyliertem Anti-ErbB2-Antikörper sind von vielzelligen Organismen abgeleitet. Beispiele für Invertebraten-Zellen umfassen Pflanzen- und Insektenzellen. Eine Vielzahl von Baculovirus-Stämmen und -Varianten und entsprechende permissive Insekten-Wirtszellen aus Wirten, wie z.B. *Spodoptera frugiperda* (Raupe), *Aedes aegypti* (Moskito), *Aedes albopictus* (Moskito), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) und *Bombyx mori* sind identifiziert worden. Eine Vielzahl von Virus-Stämmen für Transfektion sind öffentlich erhältlich, z.B. die L-1-Variante von *Autographa californica* NPV und der Bm-5-Stamm von *Bombyx mori* NPV, und solche Vi-



ren können verwendet werden als der Virus hierin gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere für die Transfektion von *Spodoptera frugiperda*-Zellen.

Pflanzenzellkulturen von Baumwolle, Mais, Kartoffel, Sojabohne, Petunie, Tomate und Tabak können auch als Wirte genutzt werden.

Das größte Interesse hat jedoch für Wirbeltierzellen bestanden, und die Vermehrung von Wirbeltierzellen in Kultur (Gewebekultur) ist zu einer Routineprozedur geworden. Beispiele zweckdienlicher Säugetier-Wirtszelllinien sind Affen-Nieren-CV1-Linie, transformiert durch SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); humane embryonale Nierenlinie (293 oder 293-Zellen, subkloniert zum Wachstum in Suspensionskultur, Graham et al., *J. Gen. Vir.* 36, 59 (1977)); Baby-Hamsternierenzellen (BHK, ATCC CCL 10); Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216 (1980)); Maus-Sertoli-Zellen (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23, 243-251 (1980)); Affen-Nierenzellen (CV1 ATCC CCL 70); afrikanische Grünaffen-Nierenzellen (VERO-76, ATCC CRL-1587); humane Kollumkarzinom-Zellen (HELA, ATCC CCL 2); Hunde-Nierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Büffelratten-Leberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442); humane Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); humane Leberzellen (Hep G2, HB 8065); Maus-Mammatumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-Zellen (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383, 44-68 (1982)); MRC 5-Zellen; FS4-Zellen und humane Hepatomlinie (Hep G2).

Wirtszellen werden mit den oben beschriebenen Expressions- und Klonierungsvektoren zur Anti-ErbB2-Antikörper-Produktion transformiert und in konventionellen Nährmedien kultiviert, die in geeigneter Weise für Promotor-Induktion, Transformanten-Selektion oder Amplifizierung von Genen, die für die gewünschten Sequenzen kodieren, modifiziert werden.

(viii) Kultivierung der Wirtszellen

Die Wirtszellen, die zur Produktion des Anti-ErbB2-Antikörpers dieser Erfindung verwendet werden, können in einer Vielzahl von Medien kultiviert werden. Im Handel erhältliche Medien, wie z.B. Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) sind zur Kultivierung der Wirtszellen geeignet. Zusätzlich kann jedes der in Ham et al., Meth. Enz. 58, 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102, 255 (1980), den U.S.-Patenten Nr. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 oder 5.122.469; den WO 90/03430; WO 87/00195 oder U.S.-Patent Re. 30.985 als Kulturmedium für die Wirtszellen verwendet werden. Jedes dieser Medien kann wie benötigt ergänzt werden mit Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (wie z.B. Insulin, Transferrin oder Epidermis-Wachstumsfaktor), Salzen (wie z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat), Puffer (wie z.B. HEPES), Nukleotiden (wie z.B. Adenosin und Thymidin), Antibiotika (wie z.B. GENTAMYCIN<sup>TM</sup>-Medikament), Spurenelementen (definiert als anorganische Verbindungen, die gewöhnlich in Endkonzentrationen im mikromolaren Bereich vorliegen) und Glucose oder äquivalente Energiequelle. Jegliche weitere notwendige Zusätze können in geeigneten Konzentrationen, die dem Fachkundigen bekannt wären, ebenso enthalten sein. Die Kulturbedingungen, wie z.B. Temperatur, pH und ähnliches, sind jene, die bei der für die Expression gewählten Wirtszelle früher verwendet wurden und werden dem gewöhnlich qualifizierten Praktiker offensichtlich sein.

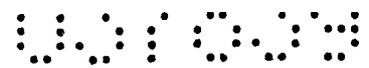
(ix) Reinigung des Anti-ErbB2-Antikörpers

Unter Anwendung von Rekombinationstechniken kann der Antikörper intrazellulär oder im periplasmatischen Raum produziert oder direkt ins Medium sekretiert werden. Wenn der Antikörper intrazellulär produziert wird, werden im ersten Schritt die partikulären Reste, entweder Wirtszellen oder lysierte Fragmente, z.B. durch Zentrifugation oder Ultrafiltration, entfernt. Carter et al., Bio/Technology 10, 163-167 (1992), beschreiben eine Prozedur zur Isolierung von Antikörpern, die in den periplasmatischen Raum



von *E. coli*. sekretiert werden. Kurz gefasst wird Zellbrei in Anwesenheit von Natriumacetat (pH 3,5), EDTA und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) über ungefähr 30 min aufgetaut. Zellreste können durch Zentrifugation entfernt werden. Wenn der Antikörper ins Medium sekretiert wird, werden Überstände solcher Expressionssysteme im Allgemeinen zuerst unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Protein-Konzentrationsfilter, z.B. eine Amicon oder Millipore Ultrafiltrationseinheit, konzentriert. Ein Proteaseinhibitor, wie z.B. PMSF kann in jedem der vorangegangenen Schritte zugegeben werden, um Proteolyse zu inhibieren, und Antibiotika können zugegeben werden, um das Wachstum eingebrachter Kontaminanten zu verhindern.

Die von den Zellen hergestellten Antikörper-Zusammensetzungen können z.B. mittels Hydroxylapatit-Chromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse und Affinitätschromatographie, mit der Affinitätschromatographie als die bevorzugte Reinigungstechnik, gereinigt werden. Die Eignung von Protein A als Affinitätsligand ist Abhängig von Spezies und Isotyp jeglicher Immunglobulin-Fc-Domäne, die im Antikörper vorhanden ist. Protein A kann zur Reinigung von Antikörpern verwendet werden, die auf humanen  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ - oder  $\gamma 4$ -Schwerketten basieren (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62, 1-13 (1983)). Protein G wird empfohlen für alle Maus-Isotypen und für humanes  $\gamma 3$  (Guss et al., EMBO J. 5, 1567-1575 (1986)). Die Matrix, an die der Affinitätsligand gebunden wird ist meistens Agarose, jedoch sind andere Matrices erhältlich. Mechanisch stabile Matrices, wie z.B. Controlled-Pore-Glass oder Poly(styroldivinyl)benzol erlauben höhere Durchflussraten und kürzere Prozesszeiten, als mit Agarose erreicht werden kann. Wenn der Antikörper eine  $C_{H3}$ -Domäne beinhaltet, ist das Bakerbond ABX<sup>TM</sup>-Harz (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) zur Reinigung zweckdienlich. Andere Techniken zur Proteinreinigung, wie z.B. Fraktionierung auf einer Ionentauschersäule, Ethanolpräzipitation, RP-HPLC, Chromatographie auf Kieselgel, Chromatographie auf Heparin-SEPHAROSE<sup>TM</sup>, Chromatographie auf Anionentauscher- oder Kationentauscher-Harz (wie z.B. eine Polyasparaginsäure-Säule), Chromatofokussierung, SDS-PAGE und Ammoniumsulfatpräzipitation sind ebenfalls verfügbar und vom zu gewinnenden Antikörper abhängig.



Im Anschluss an beliebige vorhergehende Reinigungsschritt(e), kann die den Antikörper von Interesse und Kontaminanten enthaltende Mischung Hydrophob-Chromatographie bei niedrigem pH unterzogen werden, und zwar unter Verwendung eines Elutionspuffers mit einem pH zwischen ungefähr 2,5 und 4,5, vorzugsweise durchgeführt bei niedrigen Salzkonzentrationen (z.B. von ungefähr 0-0,25 M Salz).

#### IV. Pharmazeutische Formulierungen

Therapeutische Formulierungen der gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper werden für die Lagerung hergestellt, indem ein Antikörper mit dem gewünschten Reinheitsgrad mit optional pharmazeutisch vertretbaren Trägern, Füllstoffen oder Stabilisatoren ("emington'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. Octadecyldimethylbenzyl-Ammoniumchlorid; 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. Sucrose, Mannit, Trehalose und Sorbit; salzbildende Gegenionen, wie z.B. Natrium; Metallkomplexe (z.B. Zn-Protein-Komplexe) und/oder nichtionische Tenside, wie z.B. TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> oder Polyethylenglykol (PEG). Bevorzugte Anti-ErbB2-Antikörper-Formulierungen werden in der WO 97/04801 beschrieben und sind hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen.

Die Formulierungen hierin können für die einzelne zu behandelnde 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 vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) binden, in dieser einen Formulierung vorzusehen. Alternativ dazu oder zusätzlich kann die Zusammensetzung weiters ein Chemotherapeutikum, ein zytotoxisches Mittel, Cytokin, einen Wachstumshemmer, ein anti-hormonelles Mittel, auf ERFR gerichtetes Medikament, Anti-Angiogenese-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.

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.

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, Hydrogele (zum Beispiel Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (U.S.-Patent Nr. 3.773.919), Copolymere von L-Glutaminsäure und  $\gamma$ -Ethyl-L-glutamat, nicht-abbaubares Ethylen-Vinylacetat, abbaubares Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer, wie z.B. das LU-PRON DEPOT™ (injizierbare Mikrokügelchen, bestehend aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolid-Acetat) und Poly-D(-)-3-Hydroxybuttersäure.

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

#### V. Behandlung mit den Anti-ErbB2-Antikörpern

Es ist beabsichtigt, die Anti-ErbB2-Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung zur Behandlung verschiedener Krankheiten und Störungen zu verwenden. Beispielhafte Zustände oder Störungen umfassen gutartige und bösartige Tumore; Leukämien und Lymphoid-Malignitäten; andere Störungen, wie z.B. neuronale, gliale, astrocytale, hypothalamische, glandulare, makrophagische, epitheliale, stromale, blastocoelische, entzündliche, angiogenetische und immunologische Störungen.

Im Allgemeinen ist Krebs die zu behandelnde Krankheit oder Störung. Nichteinschränkende Beispiele für hierin zu behandelnde Krebsformen sind Karzinome, Lymphome, Blastome, Sarcome und Leukämie oder Lymphoid-Malignitäten. Speziellere Beispiele solcher Krebsformen umfassen Plattenepithelkrebs, Lungenkrebs, einschließlich kleinzelliger Lungenkrebs, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Adenokarzinom der Lunge und Plattenepithelkrebs der Lunge, Peritoneum-Krebs, 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 auch Kopf- und Halskrebs.

Der Krebs wird im Allgemeinen ErbB2-exprimierende Zellen umfassen, sodass der Anti-ErbB2-Antikörper hierin an den Krebs binden kann. Während der Krebs durch Überexpression des ErbB-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 HERCEPTES<sup>TR</sup> (Dako). Paraffineingebettete Gewebeschnitte aus einer Tumorbiopsie können dem IHC-Test unterzogen und die ErbB2-Proteinfärbungsintensität gemäß den folgenden Kriterien eingeordnet werden:

#### Bewertung 0

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

#### Bewertung 1 +

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

#### Bewertung 2 +

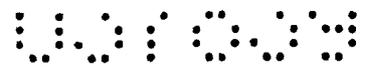
Eine schwache bis mäßige vollständige Membranfärbung wird bei mehr als 10% der Tumorzellen beobachtet.

#### Bewertung 3 +

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

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.

Alternativ dazu oder zusätzlich können FISH-Tests, wie z.B. dem INFORM<sup>TM</sup> (angeboten von Ventana, Arizona, USA), oder PATHVISION<sup>TM</sup> (Vysis, Illinois, USA) an formalin-



fixiertem, paraffineingebettetem Tumorgewebe durchgeführt werden, um das Ausmaß (falls überhaupt vorhanden) von ErbB2-Überexpression im Tumor zu bestimmen.

In einer Ausführungsform ist der Krebs einer, der EGFR exprimiert (oder überexprimiert). Beispiele für Krebsformen, die EGFR exprimieren/überexprimieren umfassen Plattenepithelkrebs, Lungenkrebs, einschließlich kleinzelliger Lungenkrebs, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Adenokarzinom der Lunge und Plattenepithelkrebs der Lunge, Peritoneum-Krebs, 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 auch Kopf- und Halskrebs.

Der hierin zu behandelnde Krebs kann einer sein, der durch übermäßige Aktivierung eines ErbB-Rezeptors, z.B. EGFR, charakterisiert ist. Eine solch übermäßige Aktivierung kann auf Überexpression oder gesteigerter Produktion des ErbB-Rezeptors oder EGFR zurückgeführt werden. In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein diagnostischer oder prognostischer Test durchgeführt, um zu bestimmen, ob der Krebs des Patienten durch übermäßige Aktivierung eines ErbB2-Rezeptors charakterisiert ist. Beispielsweise kann ErbB2-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 dazu oder zusätzlich können die Level eines ErbB-Liganden, wie z.B. TGF- $\alpha$ , im oder assoziiert mit dem Tumor gemäß bekannter Verfahren bestimmt werden. Solche Tests können Proteine oder Nukleinsäuren, 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 dazu oder zusätzlich kann man den Level der ErbB-Liganden-kodierenden Nu-

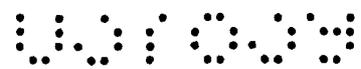
kleinsäure in der zu testenden Probe evaluieren; z.B. mittels FISH, Southern-Blotting oder PCR-Techniken.

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

● Wenn der zu behandelnde Krebs ein hormonunabhängiger Krebs ist, kann die Expression des Hormons (z.B. Androgen) und/oder dessen selbiges erkennenden Rezeptors im Tumor mittels Verwendung jeglicher von verschiedenen verfügbaren Tests, z.B. wie oben beschrieben, bestimmt werden. Alternativ dazu oder zusätzlich kann der Patient mit hormonunabhängigem Krebs diagnostiziert werden, wenn er nicht mehr auf Anti-Androgen-Therapie anspricht.

● 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 Nukleinsäure in der Krebszelle. Beispiele für solche zytotoxische Mittel umfassen Maytansinoide, Calicheamicine, Ribonukleasen und DNA-Endonukleasen.

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, intra-artikuläre,



intrasynoviale, intrathekale, orale, topische oder Inhalations-Wege. Intravenöse oder subkutane Verabreichung des Antikörpers wird bevorzugt.

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.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Patient mit zwei verschiedenen Anti-ErbB2-Antikörpern behandelt. Beispielsweise kann der Patient mit einem ersten Antikörper, der die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, oder einem Antikörper, der die biologische Charakteristik von monoklonalem Antikörper 2C4 besitzt, wie auch mit einem zweiten Anti-ErbB2-Antikörper, der wachstumshemmend ist (z.B. HERCEPTIN®), oder einem 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. Man kann beispielsweise den Patienten mit HERCEPTIN® und anschließend mit rhuMAb2C4, z.B. wenn der Patient auf HERCEPTIN®-Therapie nicht anspricht, behandeln. In einer weiteren Ausführungsform kann der Patient zuerst mit rhuMAb2C4 behandelt werden und dann HERCEPTIN®-Therapie erhalten. In noch einer weiteren Ausführungsform kann der Patient mit beidem, rhuMAb2C4 und HERCEPTIN®, gleichzeitig behandelt werden.

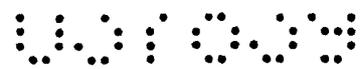
Es kann auch wünschenswert sein, die Verabreichung des/der Anti-ErbB2-Antikörpers oder -Antikörper mit der Verabreichung eines Antikörpers gegen ein anderes tumorassoziiertes Antigen zu kombinieren. Der andere Antikörper kann in diesem Fall zum Beispiel an EGFR, ErbB2, ErbB4 oder den vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor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

In einer Ausführungsform umfasst die Behandlung der vorliegenden Erfindung die kombinierte Verabreichung 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-Antikörper. Präparation und Dosisschemata für solche Chemotherapeutika können gemäß den Anweisungen des Herstellers oder wie von einem qualifizierten Praktiker empirisch bestimmt, verwendet werden. Präparation und Dosisschemata für solche Chemotherapie werden auch beschrieben in "Chemotherapy Service", M.C. Perry (Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1992).

Der Antikörper kann mit einer anti-hormonellen Verbindung kombiniert werden; z.B. eine Anti-Östrogen-Verbindung, wie z.B. Tamoxifen; ein Anti-Progesteron, wie z.B. Onapriston (siehe EP-A-616.812) oder ein 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.

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. Man kann auch ein EGFR-Target-Medikament oder ein Anti-Angiogenese-Mittel co-verabreichen. Zusätzlich zu den obigen therapeutischen Maßnahmen kann der Patient der operativen Entfernung von Krebszellen und/oder Strahlentherapie unterzogen werden.

Die Anti-ErbB2-Antikörper hierin können auch mit einem auf EGFR abzielenden Medikament, wie z.B. jene, die oben im Definitionsteil diskutiert worden sind, kombiniert



werden, was zu einem komplementären und potentiell synergistischen therapeutischen Effekt führt.

Geeignete Dosierungen für jedes der obigen co-verabreichten Mittel sind jene, die zur Zeit verwendet werden und könnten aufgrund der kombinierten Wirkung (Synergismus) des Mittel und dem Anti-ErbB2-Antikörper verringert werden.

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 vorangegangener 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. Die bevorzugte Dosierung des Antikörpers liegt im Bereich von ungefähr 0,05 mg/kg bis ungefähr 10 mg/kg. Folglich können eine oder mehrere Dosierungen von ungefähr 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg oder 10 mg/kg (oder jede Kombination davon) an den Patienten verabreicht werden. Solche Dosierungen können periodisch unterbrochen, z.B. jede Woche oder alle drei Wochen (z.B. so, dass der Patient von ungefähr zwei bis ungefähr zwanzig, z.B. ungefähr sechs Dosierungen des Anti-ErbB2-Antikörpers erhält), verabreicht werden. Eine anfänglich höhere Belastungsdosis, gefolgt von einer oder mehreren niedrigeren Dosen kann verabreicht werden. Eine exemplarische 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.

Abgesehen von der Verabreichung des Antikörperproteins an den Patienten, erwägt die vorliegende Erfindung die Verabreichung des Antikörpers durch Gentherapie. Eine solche Verabreichung von Antikörper-kodierender Nukleinsäure ist umfasst durch den Ausdruck "Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers". Siehe z.B. WO 96/07321, publiziert am 14. März 1996, betreffend die Anwendung von Gentherapie zur Erzeugung intrazellulärer Antikörper.

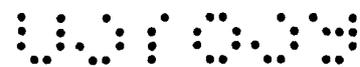
Es bestehen zwei hauptsächliche Ansätze, die Nukleinsäure (optional in einem Vektor enthalten) in die Zellen des Patienten zu bringen; *in vivo* und *ex vivo*. Zur *in vivo*-Zufuhr wird die Nukleinsäure direkt in den Patienten injiziert, gewöhnlich an der Stelle, wo der Antikörper benötigt wird. Zur *ex vivo*-Behandlung werden die Zellen des Patienten entfernt und die Nukleinsäure 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 U.S.-Patente Nr. 4.892.538 und 5.283.187). Es besteht eine Reihe von verfügbaren Techniken zur Einführung von Nukleinsäuren in lebensfähige Zellen. Die Techniken variieren in Abhängigkeit davon, ob die Nukleinsäure *in vitro* in kultivierte Zellen oder *in vivo* in die Zellen des bestimmten Wirtes eingeführt wird. Geeignete Techniken für den *in vitro*-Transfer von Nukleinsäuren 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.

Die zur Zeit bevorzugten *in vivo*-Nukleinsäure-Transfertechniken umfassen Transfektion mit Virusvektoren (wie z.B. Adenovirus, Herpes Simplex-I-Virus oder Adeno-assoziiierter

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 Nukleinsäurequelle 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.

#### VI. Gefertigte Produkte

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein gefertigtes Produkt bereitgestellt, das für die Behandlung der oben beschriebenen Störungen zweckmäßige Materialien enthält. Das gefertigte Produkt 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 effektiv 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



des Zustands der Wahl, wie z.B. Krebs, verwendet wird. In einer Ausführungsform weist das Etikett oder die Packungsbeilage darauf hin, dass die ErbB2-bindenden Antikörper enthaltende Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden kann, der einen ErbB-Rezeptor, ausgewählt aus der aus Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), ErbB3 und ErbB4, vorzugsweise EGFR, umfassenden Gruppe, exprimiert. Zusätzlich kann das Etikett oder die Packungsbeilage darauf hinweisen, dass der zu behandelnde Patient einer mit einem Krebs ist, der durch übermäßige Aktivierung eines aus EGFR, ErbB3 oder ErbB4 ausgewählten ErbB-Rezeptors charakterisiert ist. Beispielsweise kann der Krebs einer sein, der einen dieser Rezeptoren überexprimiert und/oder einen ErbB-Liganden (wie z.B. TGF- $\alpha$ ) überexprimiert. Das Etikett oder die Packungsbeilage kann auch darauf hinweisen, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden kann, wobei der Krebs nicht durch Überexpression des ErbB2-Rezeptors charakterisiert ist. Beispielsweise kann die Packungsbeilage hierin darauf hinweisen, dass der Antikörper oder die Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs unabhängig vom Ausmaß der ErbB2-Überexpression verwendet wird, wogegen die jetzige Packungsbeilage für HERCEPTIN<sup>®</sup> darauf hinweist, dass der Antikörper zur Behandlung von Patienten mit metastasierendem Brustkrebs verwendet wird, deren Tumore das ErbB2-Protein überexprimieren. In anderen Ausführungsformen kann die Packungsbeilage darauf hinweisen, dass der Antikörper oder die Zusammensetzung zur Behandlung von Brustkrebs (z.B. metastasierendem Brustkrebs); hormon-unabhängigem Krebs; Prostatakrebs, (z.B. Androgen-unabhängigem Prostatakrebs); Lungenkrebs (z.B. nicht-kleinzelliger Lungenkrebs); Dickdarm-, Rektum- oder Kolon-Rektum-Krebs; oder jede andere hierin offenbarte Krankheit oder Störung verwendet werden kann. Weiters kann das gefertigte Produkt 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 blockiert. Das gefertigte Produkt in dieser Ausführungsform der Erfindung kann weiters eine Packungsbeilage beinhalten, die darauf hinweist, dass die Erst-

und Zweit-Antikörper-Zusammensetzungen zur Behandlung von Krebs verwendet werden können. Außerdem kann die Packungsbeilage den Benutzer der Zusammensetzung (umfassend einen Antikörper, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert) anweisen, die Therapie mit dem Antikörper und jeder der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Zusatztherapien (z.B. ein Chemotherapeutikum, ein EGFR-adressierendes Medikament, ein Anti-Angiogenese-Mittel, eine anti-hormonelle Verbindung, ein Kardioprotektor und/oder ein Cytokin) zu kombinieren. Alternativ dazu oder zusätzlich kann der gefertigte Produkt weitere einen zweiten (oder dritten) Behälter umfassen, der einen pharmazeutisch vertretbaren Puffer enthält, wie z.B. bakteriestatisches Wasser zur Injektion (BWFI), Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Ringer'sche 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.

#### VII. Nicht-therapeutische Anwendungen für den Anti-ErbB2-Antikörper

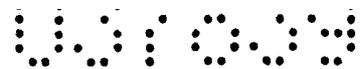
Die Antikörper (z.B. die humanisierten Anti-ErbB2-Antikörper) der Erfindung haben weitere, nicht-therapeutische Anwendungen.

Zum Beispiel können die Antikörper als Affinitätsreinigungsmittel verwendet werden. In diesem Prozess werden die Antikörper unter Verwendung gut fachbekannter Verfahren auf einer Festphase, wie z.B. Sephadex-Harz oder Filterpapier, immobilisiert. Der immobilisierte Antikörper wird mit einer ErbB2-Protein (oder ein Fragment davon) enthaltenden, zu reinigenden Probe kontaktiert, und danach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen alles Material entfernt, außer ErbB2-Protein, das am immobilisierten Antikörper gebunden ist. Zum Schluss wird der Träger mit einem anderen Lösungsmittel gewaschen, wie z.B. mit Glycinpuffer, pH 5,0, das das ErbB2-Protein vom Antikörper ablöst.

Anti-ErbB2-Antikörper für diagnostische Tests für ErbB2-Protein nützlich sein, z.B. zu dessen Detektion in spezifischen Zellen, Geweben oder Serum.

Für diagnostische Anwendungen wird der Antikörper typischerweise mit einem detektierbaren Bestandteil markiert sein. Eine Vielzahl von Markern ist erhältlich, die im Allgemeinen in folgende Kategorien eingeteilt werden können:

- (i) Radioisotope, wie z.B.  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  und  $^{131}\text{I}$ . Der Antikörper kann unter Verwendung der z.B. in "Current Protocols in Immunology", Bd. 1 und 2, Coligen et al. (Hrsg.), Wiley-Interscience, New York, New York Pubs (1992), beschriebenen Techniken mit den Radioisotopen markiert und die Radioaktivität mittels Szintillationszählung gemessen werden.
- (ii) Fluoreszenz-Marker, wie z.B. Seltenerd-Chelate (Europium-Chelate) oder Fluorescein und dessen Derivate, Rhodamin und dessen Derivate, Dansyl, Lissamin, Phycoerythrin und Texasrot sind erhältlich. Die Fluoreszenz-Marker können unter Verwendung der z.B. in "Current Protocols in Immunology" (s.o.) offenbarten Techniken an den Antikörper konjugiert und die Fluoreszenz mittels eines Fluorimeters quantifiziert werden.
- (iii) Verschiedene Enzym-Substrat-Marker sind erhältlich, und das U.S.-Patent Nr. 4.275.149 liefert eine Übersicht einiger davon. Die Enzyme katalysieren im Allgemeinen eine chemische Veränderung des chromogenen Substrats, die mittels verschiedener Techniken gemessen werden kann. Beispielsweise kann das Enzym eine Farbveränderung in einem Substrat katalysieren, die spektralphotometrisch gemessen werden kann. Alternativ dazu kann das Enzym die Fluoreszenz oder Chemolumineszenz des Substrats verändern. Techniken zur Quantifizierung einer Fluoreszenz-Änderung sind oben beschrieben. Das chemolumineszierende Substrat erfährt durch die chemische Reaktion eine Elektronenanregung und kann dann Licht emittieren, das gemessen werden kann (z.B. mit ei-



nem Chemoluminometer), oder überträgt Energie an einen Fluoreszenz-Akzeptor. Beispiele für enzymatische Marker umfassen Luciferase (z.B. Leuchtkäfer-Luciferase und bakterielle Luciferase; U.S.-Patent Nr. 4.737.456), Luciferin, 2,3-Dihydrophthalazindione, Malat-Dehydrogenase, Urease, Peroxidase, wie z.B. Meerrettich-Peroxidase (HRPO), alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase, Glucoamylase, Lysozym, Saccharid-Oxidase (z.B. Glucose-Oxidase, Galactose-Oxidase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase), heterozyklische Oxidasen (wie z.B. Uricase und Xanthin-Oxidase), Lactoperoxidase, Microperoxidase und ähnliche. Techniken zur Konjugation von Enzymen an Antikörper werden beschrieben in O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", *Methods in Enzym.* 73, J. Langone & H. Van Vunakis (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 147-166 (1981).

Beispiele für Enzym-Substrat-Kombinationen umfassen zum Beispiel:

- (i) Meerrettich-Peroxidase (HRPO) mit Wasserstoffperoxid als Substrat, worin die Wasserstoff-Peroxidase einen Farbstoffvorläufer (z.B. o-Phenylendiamin (OPD) oder 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-hydrochlorid (TMB)) oxidiert;
- (ii) alkalische Phosphatase (AP) mit p-Nitrophenylphosphat als chromogenes Substrat; und
- (iii)  $\beta$ -D-Galactosidase ( $\beta$ -D-Gal) mit einem chromogenen Substrat (z.B. p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosidase) oder dem fluorogenen Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidase.

Eine Vielzahl anderer Enzym-Substrat-Kombinationen ist dem Fachkundigen bekannt. Für einen allgemeinen Überblick darüber siehe die U.S.-Patente Nr. 4.275.149 und 4.318.980.

Manchmal ist der Marker indirekt mit dem Antikörper konjugiert. Der qualifizierte Praktiker wird verschiedene Techniken kennen, um dieses zu erzielen. Beispielsweise kann der Antikörper mit Biotin konjugiert werden und alle drei weit gefassten, oben erwähnten Kategorien von Markern können mit Avidin konjugiert werden, oder vice versa. Biotin bindet selektiv an Avidin, und folglich kann der Marker auf diese Weise indirekt mit dem Antikörper konjugiert werden. Alternativ kann die indirekte Konjugation des Markers mit dem Antikörper erzielt werden, indem der Antikörper mit einem kleinen Hapten (z.B. Digoxin) konjugiert wird, und einer der verschiedenen, oben erwähnten Marker wird mit einem Anti-Hapten-Antikörper (z.B. Anti-Digoxin-Antikörper) konjugiert. Folglich kann so indirekte Konjugation des Markers mit dem Antikörper erzielt werden.

In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung muss der Anti-ErbB2-Antikörper nicht markiert werden, und sein Vorhandensein kann unter Verwendung eines markierten Antikörpers, das an den ErbB2-Antikörper bindet, detektiert werden.

Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können für jedes bekannte Testverfahren angewendet werden, wie z.B. kompetitive Bindungstests, direkte und indirekte Sandwich-Tests und Immunpräzipitations-Tests. Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", S. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Für Immunhistochemie kann die Tumorprobe frisch oder gefroren sein, oder kann in Paraffin eingebettet und mit einem Konservierungsmittel, wie z.B. Formalin, fixiert werden.

Die Antikörper können auch für in vivo-diagnostische Tests verwendet werden. Im Allgemeinen ist der Antikörper mit einem Radionuklid markiert (wie z.B.  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$ ), sodass der Tumor mittels Immunszintigraphie lokalisiert werden kann. Der Einfachheit halber können die Antikörper der vorliegenden Erfindung als Set bereitgestellt werden, z.B. als verpackte Kombination von Reagenzien in festgesetzten Mengen mit Anleitungen zur Ausführung diagnostischer Tests. Wenn der Anti-

körper mit einem Enzym markiert ist, wird das Set für das Enzym benötigte Substrate und Co-Faktoren enthalten (z.B. einen Substrat-Vorläufer, der das detektierbare Chromophor oder Fluorophor liefert). Zusätzlich können andere Additive enthalten sein, wie z.B. Stabilisatoren, Puffer (z.B. ein Blockpuffer oder Lysepuffer) und ähnliches. Die relativen Mengen der verschiedenen Reagenzien können breit variiert werden, um Konzentrationen der Reagenzien in Lösung zu liefern, die die Empfindlichkeit des Tests im Wesentlichen optimieren). Insbesondere können die Reagenzien als trockene Pulver bereitgestellt werden, gewöhnlich in lyophilisierter Form, einschließlich Trägerstoffen, die bei Auflösung eine Reagenslösung mit der passenden Konzentration liefern.

### VIII. Hinterlegung von Materialien

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

<b>Antikörper-Bezeichnung</b>	<b>ATCC Nr.</b>	<b>Hinterlegungsdatum</b>
7C2	ATCC HB-12215	17. Oktober 1996
7F3	ATCC HB-12216	17. Oktober 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24. Mai 1990
2C4	ATCC HB-12697	8. April 1999

Weitere Details der Erfindung sind durch die folgenden, nichteinschränkenden Beispiele veranschaulicht. Die Offenlegung aller Zitate in der Patentbeschreibung sind hierin ausdrücklich durch Verweis aufgenommen.



## Beispiel I

### Produktion und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 2C4

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/HER2-3<sub>400</sub>-Zellen (ungefähr  $1 \times 10^5$  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 wurde i.p.-Injektionen von  $10^7$  Zellen in 0,5 ml PBS verabreicht, und zwar an den Wochen 0, 2, 5 und 7. Den Mäusen mit Antisera, die <sup>32</sup>P-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-Ag-8.653 fusioniert.

Hybridom-Überstände wurden mittels Radioimmunpräzipitation und ELISA auf ErbB2-Bindung gescreent.

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 PANDEXTM-Screen-Machine zur Quantifizierung der Fluoreszenz durchgeführt. Unter Verwendung etablierter Prozeduren (Wofsy et al., "Selected Methods in Cellular Immunology", S. 287, Mishel und Schiigi (Hrsg.), San Francisco, W.J. Freeman Co. (1980)) jeder monoklonale Antikörper mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert. Konfluente Monoschichten von NIH-3T3/HER2-3<sub>400</sub>-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% NaN<sub>3</sub>,

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  $\mu$ l, und 20  $\mu$ l gereinigter Antikörper (100  $\mu$ g/ml bis 0,1  $\mu$ g/ml) wurden zu den PANDEX™-Platten-Näpfen zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Eine vorbestimmte Verdünnung FITC-markierter monoklonaler Antikörper in 20  $\mu$ l wurden jedem Napf zugegeben, für 30 Minuten inkubiert, gewaschen und die Fluoreszenz mit dem PANDEX™ quantifiziert. Monoklonale Antikörper wurden als ein Epitop 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.

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./Vol.) Trypsin abgelöst und in komplettem Medium mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro ml suspendiert. Aliquoten von 100  $\mu$ l ( $4 \times 10^4$  Zellen) wurden in 96-Napf-Mikroverdünnungsplatten plattiert, die Zellen wurden anhaften gelassen und dann mit 100  $\mu$ l Medium alleine oder monoklonalen Antikörper enthaltendes Medium (Endkonzentration 5  $\mu$ g/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.

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-Re-

zeptoren 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 exogenem zugesetztem HRG, niedrige bis nicht nachweisbare Mengen von tyrosinphosphorylierten Proteinen im MG-180.000-Bereich aufweisen.

MCF7-Zellen wurden in 24-Napf-Platten ausplattiert und monoklonale Antikörper gegen ErbB2 jedem Napf zugesetzt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert; dann wurde jedem Napf rHRG $\beta$ <sub>177-244</sub> in einer Endkonzentration von 0,2 nM zugesetzt und die Inkubation für 8 Minuten fortgesetzt. Medium wurde vorsichtig aus jedem Napf abgesaugt und die Reaktion durch Zusatz von 100  $\mu$ l SDS-Probenpuffer (5% SDS, 25 mM DTT und 25 mM Tris-HCl, pH 6,8) gestoppt. Jede Probe (25  $\mu$ l) wurde in einem 4-12% Gradientengel (Novex) elektrophoretisch getrennt und dann elektrophoretisch auf Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert. Antiphosphotyrosin- (4G10 von UBI, verwendet in 1  $\mu$ g/ml) Immunblots wurden entwickelt und die Intensität der vorwiegenden reaktiven Bande bei MG  $\sim$ 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,

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  $\sim$ 50%. Fig. 2A zeigt Dosis-Antwort-Kurven für 2C4- oder 7F3-Inhibierung von HRG-Stimulation von p180-Tyrosinphosphorylierung, wie bestimmt mittels Reflexions-Densitometrie. Evaluierung dieser In-

Inhibierungskurven mittels einer 4-Parameter-Anpassung ergab ein  $IC_{50}$  von  $2,8 \pm 0,7$  nM und  $29,0 \pm 4,1$  nM für 2C4 bzw. 7F3.

Inhibierung 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 für 30 Minuten inkubiert.  $^{125}I$ -markiertes rHRG $\beta_1$ <sub>177-224</sub> (25 pm) wurde zugesetzt und die Inkubation für 4 bis 16 Stunden 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  $^{125}I$ -markiertem rHRG $\beta_1$  inkubiert und die Inhibierungskurven sind in Fig. 2B gezeigt. Die Analyse dieser Daten ergab ein  $IC_{50}$  von  $2,4 \pm 0,3$  nM und  $19,0 \pm 7,3$  nM für 2C4 bzw. 7F3. Eine maximale Inhibierung von ~74% für 2C4 und 7F3 war in Übereinstimmung mit den Tyrosinphosphorylierungs-Daten.

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  $^{125}I$ -markiertem rHRG $\beta_1$  bestimmt (Lewis et al., Cancer Research 56, 1457-1465 (1996)). Die Ergebnisse dieser Studie sind in Fig. 3 gezeigt. Bindung von  $^{125}I$ -markiertem rHRG $\beta_1$  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 der Level 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  $\sim 10^4$  ErbB2-Rezeptoren/Zelle, wogegen BT-474 und SK-BR-3  $\sim 10^6$  ErbB2-Rezeptoren/Zellen exprimieren. Aus dem gegebenen, weiten Bereich der ErbB2-Expression in diesen Zellen und den obigen Daten wurde geschlossen, dass die Wechselwirkung zwi-

schen ErbB2, ErbB3 und ErbB4 selbst eine hochaffine Wechselwirkung war, die an der Oberfläche der Plasmamembran stattfindet.

Die wachstumshemmenden Effekte der monoklonalen Antikörper 2C4 und 4D5 auf MDA-MB-175- und SK-BR-3-Zellen in An- und Abwesenheit von exogenem rHRG $\beta$ 1 wurden bestimmt (Schaefer et al., Oncogene 15, 1385-1394 (1997)). ErbB2-Level in MDA-MB-175-Zellen sind 4-6 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  $\mu$ g/ml) für 4 Tage 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 in der Anwesenheit, als auch in der 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

Die Fähigkeit von ErbB3, mit ErbB2 zu assoziieren, wurde in einem Co-Immünpräzipitations-Experiment getestet.  $1,0 \times 10^6$  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.

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 für ungefähr 10 Minuten fortgesetzt.

Überstände wurden durch Absaugung entfernt und die Zellen in RPMI, 10 mM HEPES, pH 7,2, 1,0% (Vol./Vol.) Triton X-100<sup>TM</sup>, 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.

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 zytoplasmatische 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 für zwei Stunden mischen gelassen. Die Gele wurden dann durch Zentrifugation gesammelt. Die Gele wurden Satzweise drei Mal mit Lysepuffer gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. SDS-Probenpuffer wurde dann zugesetzt und die Proben in einem siedenden Wasserbad kurz erhitzt.

Überstände wurden in 4-12% Gelen 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.

Wie in den Kontroll-Spuren in den Fig. 5A und 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 sC4 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 Heregulin-abhängige Assoziierung von ErbB3 mit ErbB2 in sowohl MCF7-, als auch SK-BR-3-Zellen wesentlich effektiver als HERCEPTIN<sup>®</sup>. Vorinkubation mit HERCEPTIN<sup>®</sup> 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 co-immunpräzipitieren.

### Beispiel 3

#### Humanisierte 2C4-Antikörper

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-Extraktionskits, 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<sub>H</sub>1-Domäne enthält, und zwar wie früher beschrieben (Carter et al., PNAS (USA) 89, 4285 (1992); und U.S.-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, <sup>125</sup>I-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 IC<sub>50</sub>-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 IC<sub>50</sub>-Wert für intakten monoklonalen Antikörper 2C4 beträgt 6,0 +/- 2 nM, wogegen der Wert für das Fab-Fragment 15,0 +/- 2 nM beträgt.

Die DNA-Sequenzierung des chimären Klons erlaubte die Identifizierung von CDR-Regionen (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 Oligonukleotid-ortsgerichteter Mutagenese wurden alle dieser CDR-Regionen in ein vollständiges Human-Gerüst (V<sub>L</sub>-Kappa-Untergruppe I und V<sub>H</sub>-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<sup>TM</sup>-Platte mit 1 Mikrogramm pro ml an ErbB2-extrazellulärer Domäne (ECD; produziert wie beschrieben in WO 90/14357) in 50 mM Karbonatpuffer, 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 für 2 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen. wurde gebundenes Fab-Fragment mit biotinyliertem, murinen Anti-Human-Kappa-Antikörper (ICN 634771), ge-



folgt 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.

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 das Antikörper-Antigen-Interface 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

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 Fab-Fragment 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 dazu oder zusätzlich kann der humanisierte Antikörper affinitätsgerieft werden (siehe oben), um seine Affinität und/oder andere biologische Aktivitäten zu verfeinern oder zu verbessern.

Die humanisierte 2C4-Version 574 wurde mittels Phagen-Display-Verfahren affinitätsgerieft. Kurz gesagt wurde humanisiertes 2C4.574-Fragment 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)).

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 "NNS" als ihre Codons enthaltenden Oligomeren 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 Blocklösungen, Panning unterzogen. Um auf Phagen mit höheren Affinitäten als 2C4.574 zu selektieren, wurde in den Panningzyklen 3, 4 und 5 in der Wachschritten lösliches ErbB2-ECD oder lösliches Fab-2C4.574 als Kompetitiv zugesetzt. Waschzeiten wurden auf 1 Stunde bei Raumtemperatur ausgedehnt.

Nach 5 Panningzyklen wurden die einzelnen Klone wiederum mittels Phagen-ELISA analysiert. Einzelne Klone wurden in U-Boden Costar-96-Napf-Gewebekulturplatten ge-

züchtet und die Phagen durch Zusatz von Helferphagen induziert. Nach Züchtung über Nacht, wurden E. coli-Zellen pelletiert und die Phagen-enthaltenden Überstände in 96-Napf-Platten transfiziert, worin der Phage mit MPBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert wurde. Mit ErbB2-ECD beschichtete NUNC MAXISORP<sup>TM</sup>-Platten wurden ebenso wie oben beschrieben mit MPBST blockiert. Blockierte Phagen wurden an den Platten für 2 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen wurden gebundene Phagen mittels Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem, monoklonalen Anti-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.

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 der ursprünglichen humanisierten 2C4.574-Version verglichen.

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

Mutanten-Name	Veränderung gegenüber 574	Mutante/574*
H3.A1	serH99trp, metH34leu	0.380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu	0.087
H1.3.B3	thrH28gln, thrH30ser, metH34leu	0.572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu	0.569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu	0.561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, metH34leu	0.552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, metH34leu	0.215
654	serL50trp, metH34leu	0.176
655	metH34ser	0.542
659	serL50trp, metH34ser	0.076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, serH99trp	0.175
L3G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu, serH99trp	0.218
H1.3.B3.H3.A1	thrH28gln, thrH30ser, metH34leu, serH99trp	0.306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu, serH99trp	0.248
654.H3.A1	serL50trp, metH34leu, serH99trp	0.133
654.L3.G6	serL50trp, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0.213
654.L3.29	serL50trp, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0.236
654.L3.36	serL50trp, metH35leu, 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.

Die folgenden Mutanten wurden ebenfalls konstruiert und werden zurzeit evaluiert:

659.L3.G6	serL50trp, metH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
659.L3.G11	serL50trp, metH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
659.L3.29	serL50trp, metH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
659.L3.36	serL50trp, metH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6.655	serL50trp, tyrL53gly, metH35ser, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11.655	serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly

L2F5.L29.655	serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36.655	serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

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	tyrL91phe
687	thrL56ala
688	glnL28ala
689	glnL28glu

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

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

Ein intakter Antikörper, umfassend die variablen leichten und schweren Domänen der humanisierten Version 574 mit einer Schwereketten-Konstantregion von Human-IgG1 ist hergestellt worden (siehe U.S.-Patent Nr. 5.821.337). Der intakte Antikörper wird durch Chinahamster-Eierstock- (CHO-) Zellen produziert. Dieses Molekül wird hierin als rhu-MAb-2C4 bezeichnet.

#### Beispiel 4

### Monoklonaler Antikörper 2C4 blockiert die EGF-, TGF- $\alpha$ - oder HRG-vermittelte Aktivierung von MAPK

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<sup>®</sup>, die EGF-, TGF- $\alpha$ - oder HRG-Aktivierung zu inhibieren, wurde in der folgenden Weise bestimmt.

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 serum-freien 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 für 30 Minuten mit 0,5 ml von 200 nM HERCEPTIN<sup>®</sup> oder monoklonalem Antikörper 2C4 inkubiert. Die Zellen wurden dann für 15 Minuten mit 1 nM EGF, 1nM TGF- $\alpha$  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)).

Wie in Fig. 10 gezeigt ist, blockiert der monoklonale Antikörper 2C4 signifikant EGF-, TGF- $\alpha$ - und HRG-vermittelte Aktivierung von MAPK in einem stärkeren Ausmaß als HERCEPTIN<sup>®</sup>. 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.

Es wurde auch gezeigt, dass monoklonaler Antikörper 2C4 die Heregulin- (HRG-) abhängige Akt-Aktivierung inhibiert. Die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalübertragungswegs ist wichtig für das Zell-Überleben (Carraway et al., J. Biol. Chem. 270, 7111-6 (1995)). In Tumorzellen könnte PI3-Kinase-Aktivierung eine Rolle im invasiven Phänotyp spielen (Tan et al., Cancer Research 59, 1620-1625 (1999)). Der Überlebensstoffwechselweg wird in erster Linie durch die Serin/Threonin-Kinase AKT vermittelt (Bos et al., Trends Biochem. Sci. 20, 441-442 (1995)). Zwischen ErbB2 und entweder ErbB3 oder EGFR gebildete Komplexe können diese Stoffwechselwege, als Reaktion auf Heregulin bzw. EGF, initiieren (Olayioye et al., Mol. & Cell. Biol. 18, 5042-51 (1998); Karunagaran et al., EMBO Journal 15, 254-264 (1996); und Krymskaya et al., Am. J. Physiol. 276, L246-55 (1999)). Inkubation von MCF7-Brustkrebszellen mit 2C4 inhibiert Heregulin-vermittelte AKT-Aktivierung. Darüber hinaus wird der in Abwesenheit von Heregulin vorhandene Basislevel der AKT-Aktivierung durch Zusatz von 2C4 weiter herabgesetzt. Diese Daten weisen darauf hin, dass 2C4 die ErbB-Liganden-Aktivierung von PI3-Kinase inhibiert und dass diese Inhibierung zu Apoptose führen kann. Die gesteigerte Empfindlichkeit für Apoptose könnte sich in einer höheren Empfindlichkeit von Tumorzellen auf die toxischen Effekte von Chemotherapie manifestieren.

Folglich inhibiert der monoklonale Antikörper 2C4 Liganden-initiierte ErbB-Signalisierung über zwei hauptsächliche Übertragungswege – MAP-Kinase (ein proliferativer Hauptweg) und PI3-Kinase (ein Überlebens/Anti-Apoptose-Hauptweg).

#### Beispiel 5

#### Kombination von monoklonalem Antikörper 2C4 und HERCEPTIN® in vivo

Ein Xenograft-Modell unter Verwendung der Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie Calu 3 wurde verwendet, um die Effizienz von monoklonalen HER2-Antikörpern, entweder alleine oder in Kombination, in der Unterdrückung von Tumorwachstum zu bestimmen. Weibliche NCR-Nacktmäuse wurden mit  $20 \times 10^6$  Zellen in 0,1 ml subkutan inokuliert.

Tumormessungen wurden zweimal in der Woche vorgenommen, und wenn die Tumorknötchen ein Volumen von  $100 \text{ mm}^3$  erreichten, wurden die Tiere in 7 Behandlungsgruppen randomisiert. Die Behandlungsgruppen waren:

- (a) monoklonaler Kontroll-Antikörper, MAb 1766;
- (b) HERCEPTIN<sup>®</sup>, 10 mg/kg;
- (c) monoklonaler Antikörper 7C2, 10 mg/ml;
- (d) monoklonaler Antikörper 2C4, 10 mg/ml;
- (e) HERCEPTIN<sup>®</sup> und 7C2, je 10 mg/kg;
- (f) HERCEPTIN<sup>®</sup> und 2C4, je 10 mg/kg; und
- (g) monoklonale Antikörper 2C4 und 7C2, je 10 mg/ml.

Die Tiere wurden bis Tag 24 zweimal pro Woche behandelt. Tumorumfänge wurden bis Tag 38 zweimal pro Woche gemessen.

Wie im Balkendiagramm in Fig. 11 gezeigt inhibierte die Behandlung von tumortragenden Calu 3-Mäusen mit 2C4 oder HERCEPTIN<sup>®</sup> signifikant das Wachstum der Tumoren. Die Kombination von HERCEPTIN<sup>®</sup> und 2C4 oder HERCEPTIN<sup>®</sup> und 7C2 war der Verabreichung beider Antikörper alleine überlegen.

#### Beispiel 6

##### Behandlung von Kolon-Rektum-Krebs mit monoklonalem Antikörper 2C4

Humane Kolon-Rektum-Zelllinien, wie z.B. HCA-7, LS174T oder CaCo-2, werden in athymische Nacktmäuse subkutan implantiert, wie beschrieben in Sheng et al., J. Clin. Invest. 99, 2254-2259 (1997). Sobald sich Tumoren bis zu einem Volumen von ungefähr  $100 \text{ mm}^3$  entwickelt hatten, wurden Gruppen von Tieren mit 10-50 mg/kg des monoklonalen Antikörpers 2C4 behandelt, verabreicht zweimal die Woche durch Injektion in die Peritonealhöhle. Monoklonaler Antikörper 2C4 unterdrückt das Wachstum von Kolon-Rektum-Xenografts in vivo.

### Beispiel 7

#### Behandlung von Brustkrebs mit humanisiertem 2C4

Der Effekt von rhuMAb 2C4 oder HERCEPTIN<sup>®</sup> auf Human-Brustkrebszellen, die ErbB2 nicht exprimieren, wurden in einem 3Tage-Almarblau-Test (S.A. Ahmed, J. Immunol. Methods 170, 211-224 (1994); und Page et al., Int. J. Oncol. 3, 473-476 (1994)) bestimmt. Die in diesem Test verwendeten Zellen waren MDA-175-Human-Brustkrebszellen, die ErbB2 bei einem 1+-Level exprimieren. Wie in Fig. 12 gezeigt wird das Wachstum der Brustkrebs-Zelllinie MDA-175 durch Zusatz von rhuMAb-2C4 im Vergleich mit HERCEPTIN<sup>®</sup>-Behandlung in Dosis-abhängiger Weise signifikant inhibiert.

Die Effizienz von rhuMAb-2C4 gegen MCF7-Xenografts, die Östrogen-Rezeptor-positiv (ER+) sind und niedrige Level von ErbB2 exprimieren, wurde bestimmt. Mit Östrogen ergänzte, weibliche Mäuse wurden verwendet. rhuMAb-2C4 wurde in einer Dosis von 30 mg/kg jede Woche verabreicht. Wie in Fig. 13 gezeigt ist, war rhuMAb-2C4 effektiv in der Inhibierung von Brustkrebs-Tumor-Wachstum in vivo, wo der Brustkrebs nicht durch Überexpression von ErbB2 charakterisiert war.

### Beispiel 8

#### Pharmakokinetik, Metabolismus und Toxikologie von 2C4

rhuMAb-2C4 war in humanem Serum stabil. Keine Anzeichen von Aggregaten von Komplexbildung in biologischen Grundsubstanzen wurden beobachtet. Bei Mäusen wurde rhuMAb-2C4 schneller eliminiert als HERCEPTIN<sup>®</sup>. Pharmakokinetische Studien weisen darauf hin, dass wöchentliche Verabreichung von ungefähr 2-6 mg/kg rhuMAb-2C4 zu einer Serumkonzentration ähnlich der von HERCEPTIN<sup>®</sup> bei derzeitiger Dosierung führen sollte. Die resultierende Serum-2C4-Exposition sollte in vivo-bestimmte IC<sub>50</sub> stark überschreiten.

Eine toxikologische Studie wurde an Cynomolgus-Affen (2 Männchen und 2 Weibchen pro Gruppe) ausgeführt. rhuMAb-2C4 wurde zu 0, 10, 50 oder 100 mg/kg zweimal pro Woche für 4 Wochen intravenös verabreicht. Die Messungen der toxikologischen Studie umfassten Körpergewicht (-2, -1 Wochen und danach wöchentlich); Futterkonsum (qualitativ, täglich); physikalische Untersuchungen mit Bestimmung von Blutdruck, Elektrokardiogramm (ECG) und Körpertemperatur (-2, -1 Wochen und Wochen 2 und 4, 4 Stunden nach Dosierung der zweiten Dosierung der jeweiligen Woche); Echokardiographie-Untersuchungen (nach der ersten Dosierung in Woche 1 und dem Ende der Studie, Woche 4); klinische Pathologie (Grundlinie und Ende der Wochen 2 und 4); Urinanalyse (Grundlinie und Ende der Wochen 2 und 4); Antikörperanalyse-Probennahmen (Grundlinie und Ende der Wochen 2 und 4), sowie Nekropsie und histopathologische Analyse.

Alle Tiere in allen Gruppen überlebten bis zum Ende der Studie. Keine signifikanten klinischen Beobachtungen oder Unterschiede zwischen den Gruppen wurden ausgemacht. Nekropsie-Ergebnisse zeigten keine signifikanten Abnormalitäten der Organe in allen Tieren. Bei keinem der Tiere wurden signifikante mikroskopische Abnormalitäten in Geweben beobachtet. Keine signifikanten Veränderungen im ECG wurden von Beginn bis zum Abschluss der Studie beobachtet. Zusätzlich wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bemerkt.

### Beispiel 9

#### Dosisanpassung

Krebspatienten wurde eine erste Dosis von rhuMAb-2C4 bei einem von fünf Dosis-Niveaus (0,05, 0,5, 2,0, 4,0 oder 10 mg/kg; 6 Patienten pro Dosis-Niveau) verabreicht, gefolgt von einem 4-wöchigen Auswaschen. In Woche 5 wurde den Patienten dieselbe Dosis 4 Mal wöchentlich gegeben, gefolgt von einem weiteren 4-wöchigen Auswaschen. Patienten mit vollständigem Ansprechen, teilweisem Ansprechen und stabiler Krankheit kommen für Erweiterungsstudien infrage.

## Beispiel 10

### Therapie von rezidiv oder refraktär metastatischem Prostatakrebs

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

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.

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.

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. ein Anti-VEGF-Antikörper); ein EGFR-Target-Medikament (z.B. C225 oder ZD1839); ein weiterer Anti-ErbB2-Antikörper (z.B. ein wachstumshemmender Anti-ErbB2-Antikörper, wie z.B. HERCEPTIN<sup>®</sup> oder ein Anti-ErbB2-Antikörper, der Apoptose induziert, wie z.B. 7C2 oder 7F3, einschließlich humanisierte und/oder affinitätsgereifte 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 Cyclophosphamid/Doxorubicin/Methotrexat; Prednison; Hydrocortison oder eine Kombination davon. Standard-Dosierungen für diese verschiedenen Medikamente können verabreicht werden, z.B. 40 mg/m<sup>2</sup>/Woche Docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>); 6(AUC)-Carboplatin und 200 mg m<sup>2</sup> Paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>).

### Beispiel 11

#### Therapie vom metastasischem Brustkrebs

RhuMAb-2C4 ist indiziert als Einzelmittel zur Behandlung von Patienten mit metastasischem Brustkrebs, deren Tumoren kein ErbB2 überexprimieren. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Ansprechrates und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Gesamt-Überleben, Zeit zur Krankheitsfortschreitung, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. 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.

RhuMAb-2C4 ist auch indiziert in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von Patienten mit metastatischem Brustkrebs, deren Tumoren ErbB2 nicht überexprimieren. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Gesamt-Überleben im Vergleich mit Chemotherapie alleine, und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Ansprechrate, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. 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 flüssige Multi-Dosis Formulierung (20 ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

Beispiele für Medikamente, die mit dem Anti-ErbB2-Antikörper (der die Liganden-Aktivierung des ErbB2-Rezeptors blockiert) kombiniert werden können, um Brustkrebs (z.B. metastatischen Brustkrebs, der nicht durch ErbB2-Überexpression charakterisiert ist) zu behandeln, umfassen chemotherapeutische Mittel, wie z.B. Anthracyclin-Antibiotika (z.B. Doxorubicin), Cyclophosphamid, ein Taxan (z.B. Paclitaxel oder Docetaxel), Navelbin, Xeloda, Mitomycin C, eine Platinverbindung, Oxaliplatin, Gemcitabin oder Kombinationen von zwei oder mehreren dieser, wie z.B. Doxorubicin/Cyclophosphamid; einen weiteren Anti-ErbB2-Antikörper (z.B. ein wachstumshemmender Anti-ErbB2-Antikörper, wie z.B. HERCEPTIN<sup>®</sup> oder ein Anti-ErbB2-Antikörper, der Apoptose induziert, wie z.B. 7C2 oder 7F3, einschließlich humanisierte und/oder affinitätsgeriefte Varianten davon); ein Anti-Östrogen (z.B. Tamoxifen); einen Farnesyltransferase-Inhibitor; ein Anti-Angiogenese-Mittel (z.B. einen Anti-VEGF-Antikörper); ein EGFR-Target-Medikament (z.B. C225 oder ZD1839); ein Cytokin (z.B. IL-2, IL-12, G-CSF oder GM-CSF) oder Kombinationen von obigem. Standard-Dosierungen können für solche Medikamente verwendet werden.

RhuMAb-2C4 ist zusätzlich indiziert in Kombination mit HERCEPTIN<sup>®</sup> zur Behandlung von Patienten mit metastatischem Brustkrebs, deren Tumoren ErbB2 überexprimieren. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Ansprechrate und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Gesamt-Überleben im Vergleich mit HERCEPTIN<sup>®</sup> alleine, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. 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 flüssige Multi-Dosis Formulierung (20 ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt. HERCEPTIN<sup>®</sup> wird verabreicht IV in einer Initial-Belastungsdosis von 4 mg/kg, gefolgt von einer wöchentlichen Erhaltungsdosis von 2 mg/kg. HERCEPTIN<sup>®</sup> wird als lyophilisiertes Pulver bereitgestellt. Jedes HERCEPTIN<sup>®</sup>-Fläschchen enthält 440 mg HERCEPTIN<sup>®</sup>, 9,9 mg L-Histidin-HCl, 6,4 mg L-Histidin, 400 mg  $\alpha$ - $\alpha$ -Trehalose-Dihydrat und 1,8 mg Polysorbat 20. Rekonstitution mit 20 ml bakteriostatischem Wasser (BWF), enthaltend 1,1% Benzylalkohol als Konservierungsmittel, ergibt 21 ml einer Multi-Dosis-Lösung, enthaltend 21 mg/ml HERCEPTIN<sup>®</sup> bei ungefähr pH 6,0.

### Beispiel 12

#### Therapie von Lungenkrebs

RhuMAb-2C4 ist indiziert als Einzelmittel zur Behandlung von Stadium-IIIb oder -IV von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC). Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Ansprechrate und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Gesamt-Überleben, Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. 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 flüssige Multi-Dosis Formulierung (20 ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

RhuMAb-2C4 ist auch indiziert in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von Patienten mit metastatischem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Gesamt-Überleben im Vergleich mit Standardtherapie und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Ansprechrate, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. 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 flüssige Multi-Dosis Formulierung (20 ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

Beispiele für zusätzliche Medikamente, die mit dem Antikörper (der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert) kombiniert werden können, um Lungenkrebs zu behandeln umfassen chemotherapeutische Mittel, wie z.B. Carboplatin, ein Taxan (z.B. Paclitaxel oder Docetaxel), Gemcitabin, Navelbin, Cisplatin, Oxaliplatin oder Kombinationen von zwei oder mehreren dieser, wie z.B. Carboplatin/Docetaxel; einen weiteren Anti-ErbB2-Antikörper (z.B. ein wachstumshemmender Anti-ErbB2-Antikörper, wie z.B. HERCEPTIN<sup>®</sup> oder ein Anti-ErbB2-Antikörper, der Apoptose induziert, wie z.B. 7C2 oder 7F3, einschließlich humanisierte und/oder affinitätsgereifte Varianten davon); einen Farnesyl-Transferase-Inhibitor; ein Anti-Angiogenese-Mittel (z.B. einen Anti-VEGF-Antikörper); ein EGFR-Target-Medikament (z.B. C225 oder ZDI1839); ein Cytokin (z.B. IL-2, IL-12, G-CSF oder GM-CSF) oder Kombinationen von obigem.

### Beispiel 13

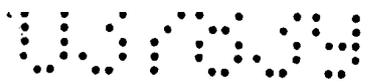
#### Therapie von Kolon-Rektum-Krebs

RhuMAb-2C4 ist indiziert als Einzelmittel zur Behandlung metastatischem Kolon-Rektum-Krebs. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Ansprechrate und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Gesamt-Überleben, Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. RhuMAb-2C4 wird intravenös (IV) wöchentlich oder alle drei Wochen mit 2 bzw. 4 mg/kg bis zur Krank-

heits-Progression verabreicht. Der Antikörper wird als flüssige Multi-Dosis-Formulierung (20 ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

RhuMAb-2C4 ist auch indiziert in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von Patienten mit metastatischem Kolon-Rektum-Krebs. Primäre Endpunkte für Effizienz umfassen Gesamt-Überleben im Vergleich mit Standardtherapie, und Sicherheit. Sekundäre Effizienz-Endpunkte umfassen: Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit, Ansprechrate, Lebensqualität und/oder Dauer der Ansprechreaktion. 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 flüssige Multi-Dosis Formulierung (20 ml-Füllung mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml oder höherer Konzentration) bereitgestellt.

Beispiele für zur Behandlung von Kolon-Rektum-Krebs verwendeten Chemotherapeutika, die mit dem Antikörper, der ErbB2 bindet und Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, kombiniert werden können, umfassen 5-Fluoruracil (5-FU), Leucovorin (LV), CPT-11, Levamisol oder Kombinationen von zwei oder mehreren dieser, wie z.B. 5-FU/LV/CPT-11. Standard-Dosierungen solcher Chemotherapeutika können verabreicht werden. Andere Medikamente, die mit dem Anti-ErbB2-Antikörper kombiniert werden können, um Kolon-Rektum-Krebs 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); ein Cytokin (z.B. IL-2, IL-12, G-CSF oder GM-CSF); einen weiteren Anti-ErbB2-Antikörper (z.B. ein wachstumshemmender Anti-ErbB2-Antikörper, wie z.B. HERCEPTIN<sup>®</sup> oder ein Anti-ErbB2-Antikörper, der Apoptose induziert, wie z.B. 7C2 oder 7F3, einschließlich humanisierte und/oder affinitätsgereifte Varianten davon) oder Kombinationen von obigem.



# Sequenzprotokoll

<110> Genentech, Inc.

5 <120> Humanisierte Anti-ErbB2-Antikörper und Behandlung mit  
Anti-ErbB2-Antikörpern

<130> P1467R2PCT

10 <141> 2000-06-23

<150> US 60/141,316  
<151> 1999-06-25

15 <160> 13

<210> 1  
<211> 107  
<212> PRT

20 <213> Mus Musculus

<400> 1  
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val  
1 5 10 15

25 Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser  
20 25 30

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

35 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

40 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
95 100 105

Ile Lys

45

<210> 2  
<211> 119  
<212> PRT

50 <213> Mus musculus

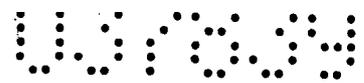
<400> 2  
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly  
1 5 10 15

55 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

60 Glu Trp Ile Gly 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

5 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

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

<210> 5  
<211> 107  
15 <212> PRT  
<213> artifiziell

<400> 5  
20 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

25 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

30 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

35 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
95 100 105

40 Ile Lys

<210> 6  
<211> 119  
45 <212> PRT  
<213> artifiziell

<400> 6  
50 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

55 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

60 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp



80

85

90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu  
95 100 105

5

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

<210> 7

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> ungewiss

<222> 10

<223> unbekannte Aminosäure

<400> 7

20 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa  
1 5 10

<210> 8

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

30 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

35 <210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

40 <400> 9

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 10

45 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

50 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala  
1 5 10

<210> 11

<211> 7

55 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

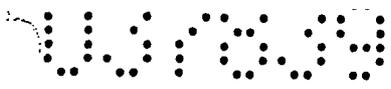
<221> ungewiss

60 <222> 5-7

<223> unbekannte Aminosäure

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa



1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 12  
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr  
 10 1 5

<210> 13  
 <211> 645  
 <212> PRT  
 15 <213> human

<400> 13  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 20 Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp  
 20 25 30  
 25 Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met  
 35 40  
 Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu  
 50 55 60  
 30 Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln  
 65 70 75  
 Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln  
 80 85 90  
 35 Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr  
 95 100 105  
 Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly  
 110 115 120  
 40 Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly  
 125 130 135  
 45 Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys  
 140 145 150  
 Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp  
 155 160 165  
 50 Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala  
 170 175 180  
 Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys  
 185 190 195  
 55 Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu  
 200 205 210  
 60 Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala  
 215 220 225  
 Arg 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

5 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

10 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  
15 305 310 315

Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg  
320 325 330

20 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

25 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  
30 380 385 390

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu  
395 400 405

35 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

40 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  
45 455 460 465

Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
470 475 480

50 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

55 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  
60 530 535 540

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
545 550 555

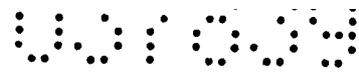
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln



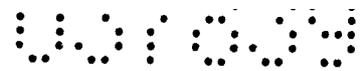


## PATENTANSPRÜCHE

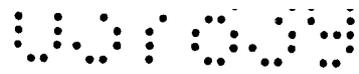
1. Verfahren zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) exprimiert, umfassend das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der ErbB2 bindet, an einen Menschen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper die Liganden-Aktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der Antikörper die Bindung des monoklonalen Antikörpers 2C4 an ErbB2 blockiert.
4. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Krebs durch übermäßige Aktivierung von EGFR gekennzeichnet ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, worin der Krebs einen ErbB-Liganden überexprimiert.
6. Verfahren nach Anspruch 5, worin der ErbB-Ligand transformierender Wachstumsfaktor Alpha (TGF- $\alpha$ ) ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper die TGF- $\alpha$ -Aktivierung von Mitogen-aktivierter Protein-Kinase (MAPK) blockiert.
8. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Krebs nicht durch Überexpression des ErbB2-Rezeptors gekennzeichnet ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Krebs aus der aus Kolon-, Rektal- und Kolorektal-Krebs bestehenden Gruppe ausgewählt ist.



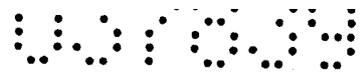
10. Verfahren nach Anspruch 9, weiters umfassend das Verabreichen eines Chemotherapeutikums an den Menschen.
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin das Chemotherapeutikum aus der aus 5-Fluoruracil (5-FU), Leucovorin (LV), CPT-11 und Levamisol bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Krebs Lungenkrebs ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, worin der Krebs ein nicht-kleinzelliger Lungenkrebs ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12, weiters umfassend das Verabreichen eines Chemotherapeutikums an den Menschen.
15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Chemotherapeutikum aus der aus einem Taxan, Gemcitabin, Navelbin, Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
16. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper ein biologisches Merkmal von monoklonalem Antikörper 2C4 aufweist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, worin der Antikörper monoklonalen Antikörper 2C4 oder humanisierten 2C4 umfasst.
18. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper ein Antikörperfragment ist.
19. Verfahren nach Anspruch 18, worin das Antikörperfragment ein Fab-Fragment ist.



20. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper nicht mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert ist.
21. Verfahren nach Anspruch 18, worin das Antikörperfragment nicht mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert ist.
22. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert ist.
23. Verfahren nach Anspruch 1, weiters umfassend das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines zweiten Therapeutikums an den Menschen, das aus der aus einem zweiten, unterschiedlichen Antikörper, der ErbB2 bindet, einem Chemotherapeutikum, einem EGFR-Target-Arzneimittel, einem Anti-Angiogenese-Mittel, einer anti-hormonellen Verbindung, einem Cardioprotektanten und einem Cytokin bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
24. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend das Verabreichen zumindest einer Dosis des Antikörpers in einer Menge von etwa 0,5 mg/kg bis etwa 10 mg/kg an den Menschen.
25. Verfahren nach Anspruch 24, umfassend das Verabreichen der Dosis etwa einmal pro Woche.
26. Verfahren nach Anspruch 24, umfassend das Verabreichen der Dosis etwa alle drei Wochen.
27. Verfahren zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs nicht durch die Überexpression des ErbB2-Rezeptors gekennzeichnet ist, umfassend das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der sich an ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.



28. Verfahren nach Anspruch 27, worin der Krebs Brustkrebs ist.
29. Verfahren nach Anspruch 28, worin der Krebs metastatischer Brustkrebs ist.
30. Verfahren nach Anspruch 28, weiters umfassend die Verabreichung eines Chemotherapeutikums an den Menschen.
31. Verfahren nach Anspruch 30, worin das Chemotherapeutikum aus der aus einem Anthracyclin-Antibiotikum, Cyclophosphomid, einem Taxan, Navelbin, Xeloda, Mitomycin C, Oxaliplatin, Gemcitabin und einer Platinverbindung bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
32. Verfahren zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, umfassend das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge (a) eines ersten Antikörpers, der ErbB2 bindet und das Wachstum von Krebszellen hemmt, die ErbB2 überexprimieren; und (b) eines zweiten Antikörpers, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.
33. Verfahren nach Anspruch 32, worin der erste Antikörper monoklonalen Antikörper 4D5 oder humanisierten 4D5 umfasst und der zweite Antikörper monoklonalen Antikörper 2C4 oder humanisierten 2C4 umfasst.
34. Verfahren zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs aus der aus Kolon-, Rektal- und Kolorektalkrebs bestehenden Gruppe ausgewählt ist, umfassend das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, an den Menschen.



35. Gefertigtes Produkt, umfassend einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet, und das weiters eine Packungsbeilage umfasst, die angibt, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden kann, der Epidermis-Wachstumsfaktor (EGFR) exprimiert.

36. Gefertigtes Produkt, umfassend einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, und das weiters eine Packungsbeilage umfasst, die angibt, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden kann, worin der Krebs nicht durch die Überexpression des ErbB2-Rezeptors gekennzeichnet ist.

37. Gefertigtes Produkt, umfassend (a) einen ersten Behälter mit einer darin enthaltenen Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen ersten Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und das Wachstum von Krebszellen hemmt, die ErbB2 überexprimieren; und (b) einen zweiten Behälter mit einer darin enthaltenen Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen zweiten Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert.

38. Gefertigtes Produkt nach Anspruch 37, weiters umfassend eine Packungsbeilage, die angibt, dass die erste und die zweite Antikörperzusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden können.

39. Gefertigtes Produkt, umfassend einen Behälter und eine darin enthaltene Zusammensetzung, worin die Zusammensetzung einen Antikörper umfasst, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, und weiters umfassend eine Packungsbeilage, die angibt, dass die Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs verwendet werden kann, der aus der aus Kolon-, Rektal- und Kolorektalkrebs bestehenden Gruppe ausgewählt ist.



40. Humanisierter Antikörper, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert.

41. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, der ErbB2 im Wesentlichen so wirksam bindet wie monoklonaler Mäuse-Antikörper 2C4.

42. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, umfassend eine variable schwere ( $V_H$ -) Domäne, die Reste einer nicht-humanen hypervariablen Region umfasst, die in eine humane  $V_H$ -Domäne aufgenommen sind, und weiters eine Rahmenregion- (FR-) Substitution an einer Position umfasst, die aus der aus 69H, 71H und 73H, gemäß dem von Kabat (1991) beschriebenen Nummerierungssystem, bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

43. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 42, umfassend FR-Substitutionen an den Positionen 69H, 71H und 73H.

44. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, umfassend die Komplementaritäts-Bestimmungs-Region- (CDR-) Reste GFTFTDYTMX (Seq.-ID Nr. 7), DVNPNS-GGSIYNQRFKG (Seq.-ID Nr. 8) und NLGPSFYFDY (Seq.-ID Nr. 9) der  $V_H$ -Domäne.

45. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, umfassend die  $V_H$ -Domänen-Aminosäuresequenz mit Seq.-ID Nr. 4.

46. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, umfassend die Komplementaritäts-Bestimmungs-Region- (CDR-) Reste KASQDVSIGVA (Seq.-ID Nr. 10); SASYXXX (Seq.-ID Nr. 11); und QQYYIYPYT (Seq.-ID Nr. 12) der variablen leichten ( $V_L$ -) Domäne.

47. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, umfassend die  $V_L$ -Domänen-Aminosäuresequenz mit Seq.-ID Nr. 3.

48. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, der ein intakter IgG1-Antikörper ist.
49. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 40, der ein Antikörperfragment ist.
50. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 49, der ein Fab-Fragment ist.
51. Affinitätsgereifter Antikörper, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert.
52. Zusammensetzung, umfassend einen humanisierten Antikörper nach Anspruch 40 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
53. Immunkonjugat, umfassend einen humanisierten Antikörper nach Anspruch 40, konjugiert mit einem cytotoxischen Mittel.
54. Isolierte Nukleinsäure, die für einen humanisierten Antikörper nach Anspruch 40 kodiert.
55. Vektor, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 54 umfasst.
56. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 55 umfasst.
57. Verfahren zur Herstellung eines humanisierten Antikörpers, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 56, so dass die Nukleinsäure exprimiert wird.
58. Verfahren nach Anspruch 57, weiters umfassend das Gewinnen des humanisierten Antikörpers aus der Wirtszellenkultur.

59. Verfahren nach Anspruch 58, worin der humanisierter Antikörper aus dem Wirtszellen-Kulturmedium gewonnen wird.
60. Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) exprimiert.
61. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Antikörper die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert.
62. Verwendung nach Anspruch 61, worin der Antikörper die Bindung von monoklonalem Antikörper 2C4 an ErbB2 blockiert.
63. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Krebs durch übermäßige Aktivierung von EGFR gekennzeichnet ist.
64. Verwendung nach Anspruch 63, worin der Krebs einen ErbB-Liganden überexprimiert.
65. Verwendung nach Anspruch 64, worin der ErbB-Ligand transformierender Wachstumsfaktor Alpha (TGF- $\alpha$ ) ist.
66. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Antikörper die TGF- $\alpha$ -Aktivierung von Mitogen-aktivierter Protein-Kinase (MAPK) blockiert.
67. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Krebs nicht durch die Überexpression von ErbB2-Rezeptor gekennzeichnet ist.
68. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Krebs aus der aus Kolon-, Rektal- und Kolorektalkrebs bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

69. Verwendung nach Anspruch 68, worin das Medikament zur Verabreichung mit einem Chemotherapeutikum bestimmt ist.
70. Verwendung nach Anspruch 69, worin das Chemotherapeutikum aus der aus 5-Fluoruracil (5-FU), Leucovorin (LV), CPT-11 und Levamisol bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
71. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Krebs Lungenkrebs ist.
72. Verwendung nach Anspruch 71, worin der Krebs ein nicht-kleinzelliger Lungenkrebs ist.
73. Verwendung nach Anspruch 71, worin das Medikament zur Verabreichung mit einem Chemotherapeutikum bestimmt ist.
74. Verwendung nach Anspruch 73, worin das Chemotherapeutikum aus der aus einem Taxan, Gemcitabin, Navelbin, Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
75. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Antikörper ein biologisches Merkmal von monoklonalem Antikörper 2C4 aufweist.
76. Verwendung nach Anspruch 75, worin der Antikörper monoklonalen Antikörper 2C4 oder humanisierten 2C4 umfasst.
77. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Antikörper ein Antikörperfragment ist.
78. Verwendung nach Anspruch 77, worin das Antikörperfragment ein Fab-Fragment ist.

79. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Antikörper nicht mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert ist.
80. Verwendung nach Anspruch 77, worin das Antikörperfragment nicht mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert ist.
81. Verwendung nach Anspruch 60, worin der Antikörper mit einem cytotoxischen Mittel konjugiert ist.
82. Verwendung nach Anspruch 60, worin das Medikament zur Verabreichung mit einer therapeutisch wirksamen Menge eines zweiten Therapeutikums an den Menschen bestimmt ist, das aus der aus einem zweiten, unterschiedlichen Antikörper, der ErbB2 bindet, einem Chemotherapeutikum, einem EGFR-Target-Arzneimittel, einem Anti-Angiogenese-Mittel, einer anti-hormonellen Verbindung, einem Cardioprotektanten und einem Cytokin bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
83. Verwendung nach Anspruch 60, worin das Medikament zur Verabreichung zumindest einer Dosis des Antikörpers in einer Menge von etwa 0,5 mg/kg bis etwa 10 mg/kg an den Menschen bestimmt ist.
84. Verwendung nach Anspruch 83, worin das Medikament zur Verabreichung der Dosis etwa einmal pro Woche bestimmt ist.
85. Verwendung nach Anspruch 83, worin das Medikament zur Verabreichung der Dosis etwa alle drei Wochen bestimmt ist.
86. Verwendung eines Antikörpers, der sich an ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behand-

lung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs nicht durch die Überexpression des ErbB2-Rezeptors gekennzeichnet ist.

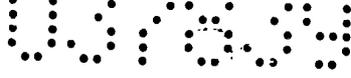
87. Verwendung nach Anspruch 86, worin der Krebs Brustkrebs ist.
88. Verwendung nach Anspruch 87, worin der Krebs metastatischer Brustkrebs ist.
89. Verwendung nach Anspruch 87, worin das Medikament zur Verabreichung mit einem Chemotherapeutikum an den Menschen bestimmt ist.
90. Verwendung nach Anspruch 89, worin das Chemotherapeutikum aus der aus einem Anthracyclin-Antibiotikum, Cyclophosphomid, einem Taxan, Navelbin, Xeloda, Mitomycin C, Oxaliplatin, Gemcitabin und einer Platinverbindung bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
91. Verwendung (a) eines ersten Antikörpers, der ErbB2 bindet und das Wachstum von Krebszellen hemmt, die ErbB2 überexprimieren; und (b) eines zweiten Antikörpers, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen.
92. Verwendung nach Anspruch 91, worin der erste Antikörper monoklonalen Antikörper 4D5 oder humanisierten 4D5 umfasst und der zweite Antikörper monoklonalen Antikörper 2C4 oder humanisierten 2C4 umfasst.
93. Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs aus der aus Kolon-, Rektal- und Kolorektalkrebs bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

Wien, am **21-12-2001**

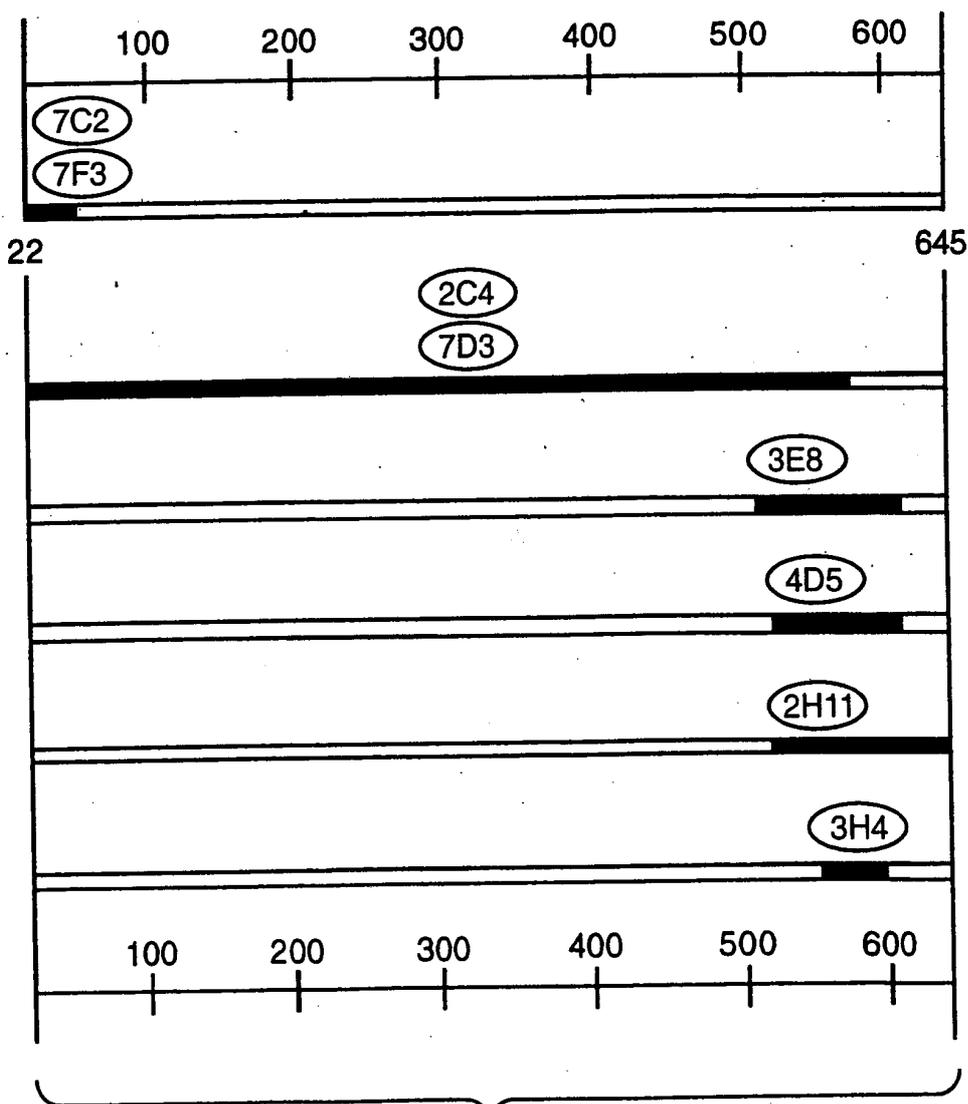
GENENTECH, INC.  
durch:

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLI QGCQVVOGNI ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIAHNQ VRQVPLQRLR  
101 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTFPVT GASPGGLREL QRLSLTEILK GGLIQRNPQ LCYQDTILMK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK  
201 GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP  
301 YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCKPCAR VCYGLGMEHL REVRVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLOPEQLQVF  
401 ETLLEITGYL YISAWPDSL P DLVSFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGLRSLRE LGSGLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP  
501 EDECVGEGLA CHOLCARGHC WGPPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCACAHY KDPPFCVARC  
601 PSGVKPDL SY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (SEQ ID NO: 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**

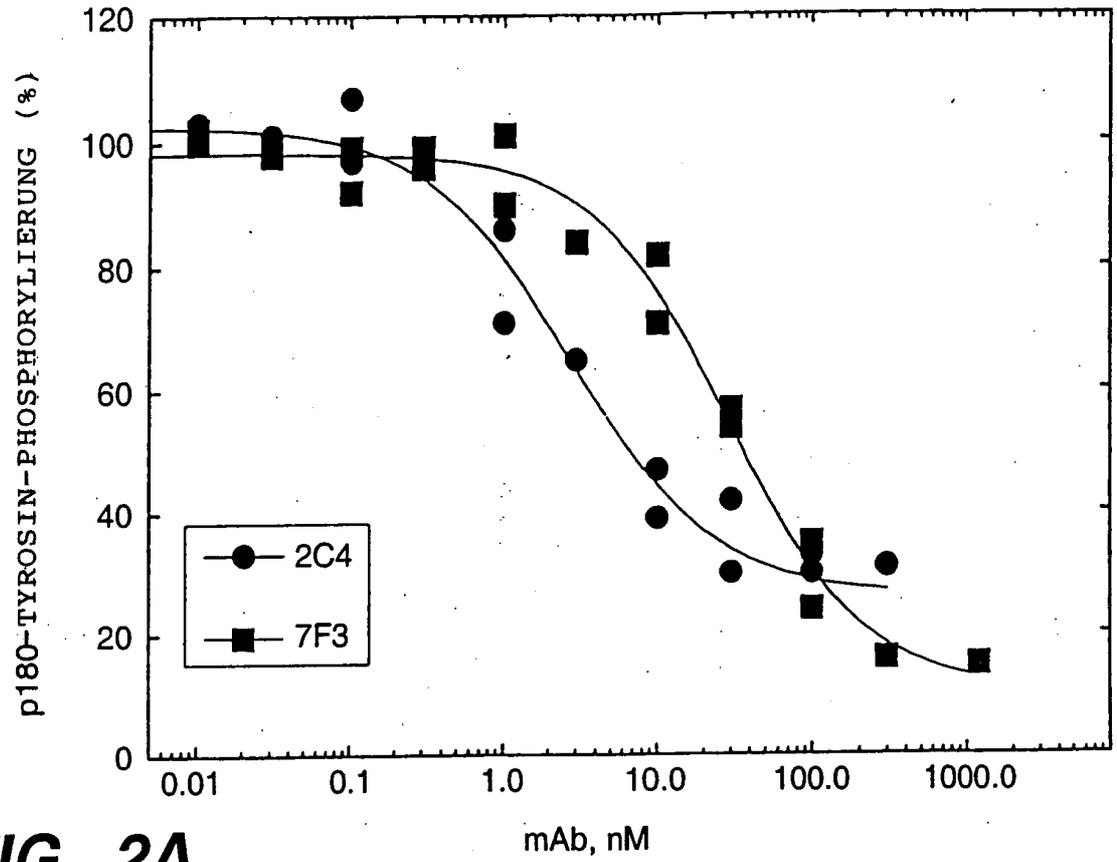


FIG. 2A

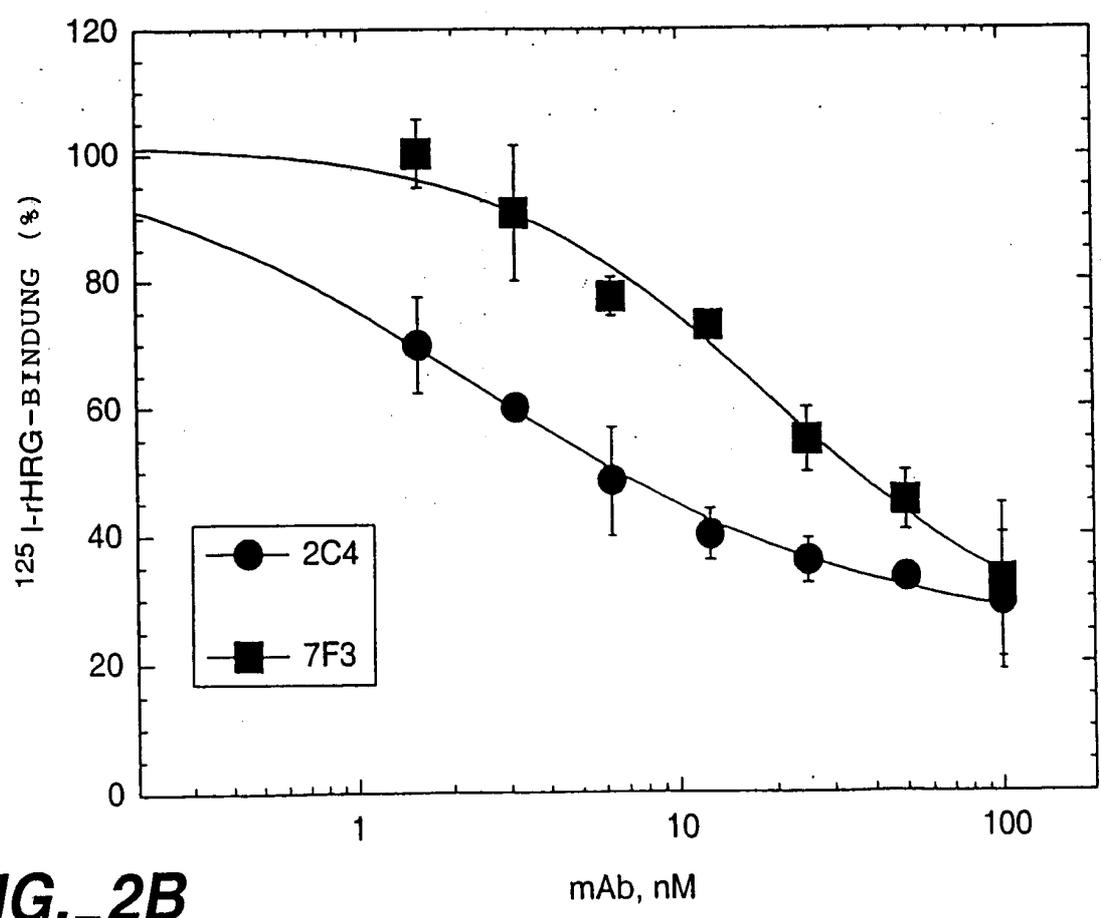


FIG. 2B

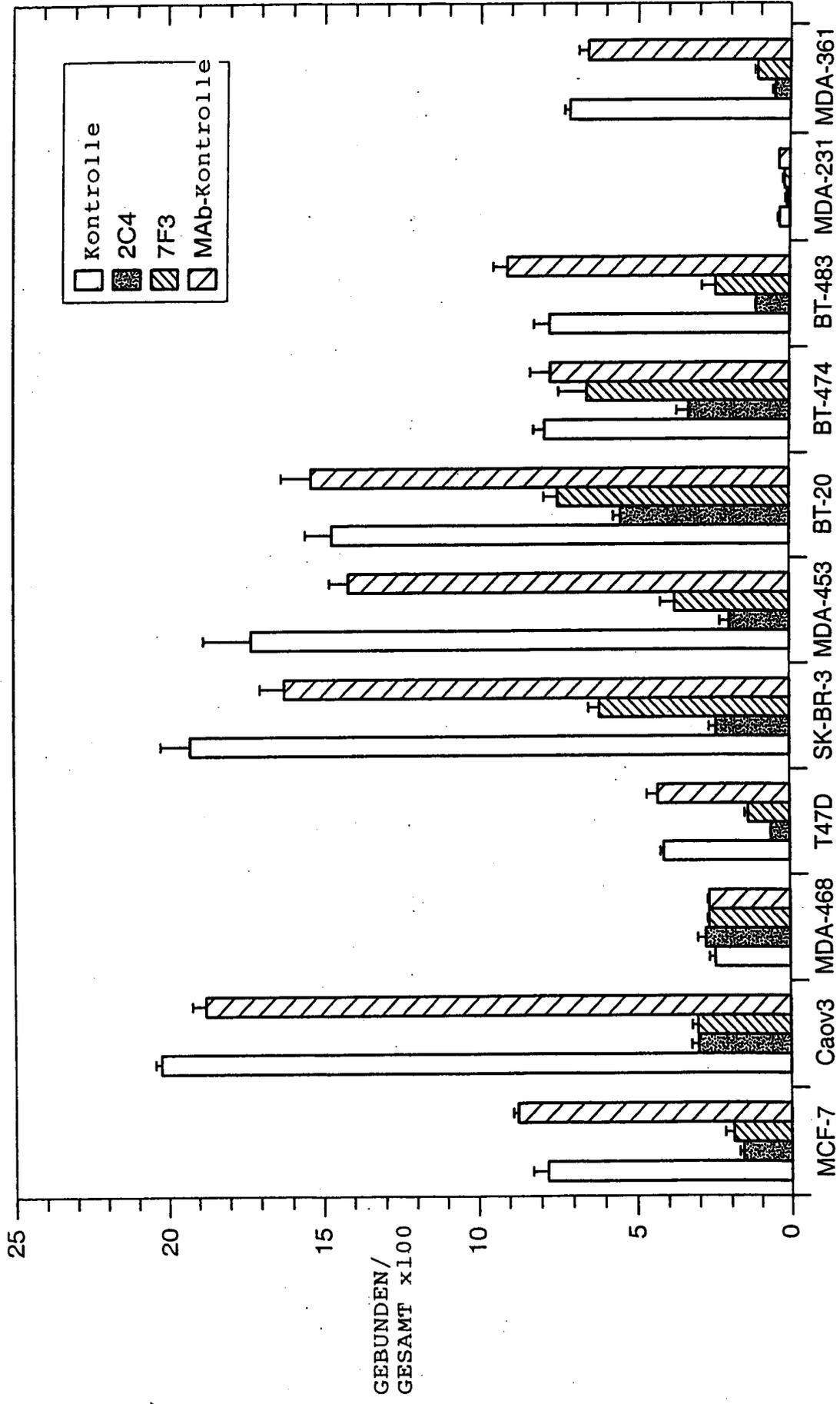
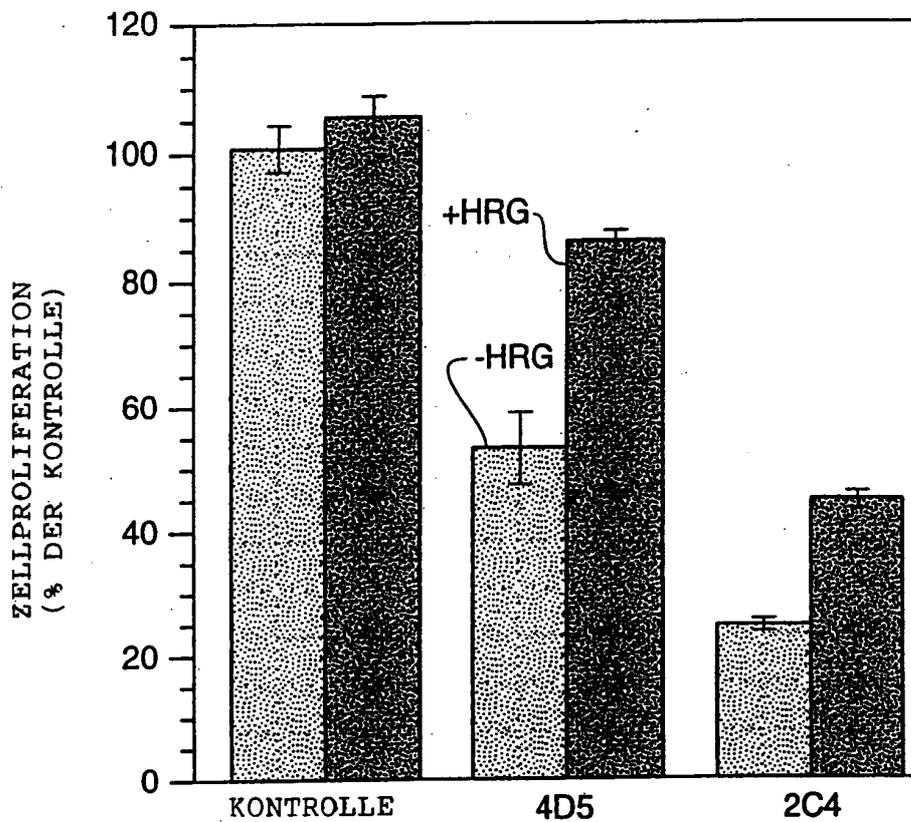
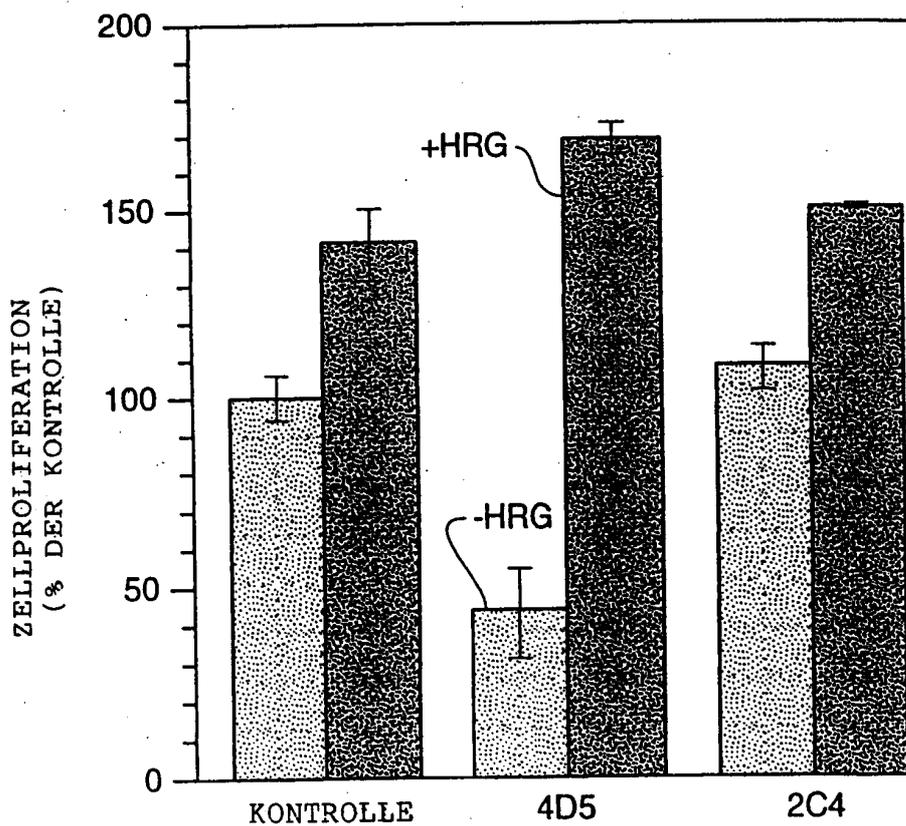


FIG.-3

5/14



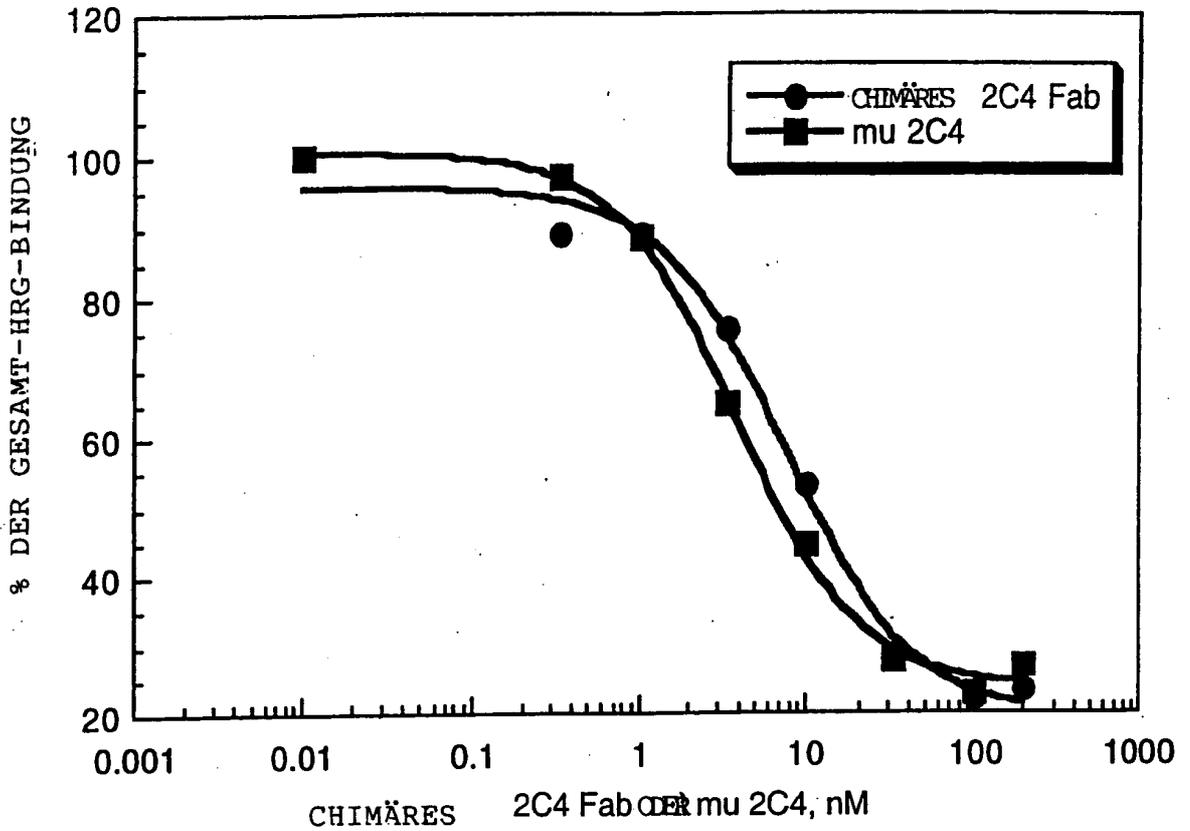
**FIG. 4A**



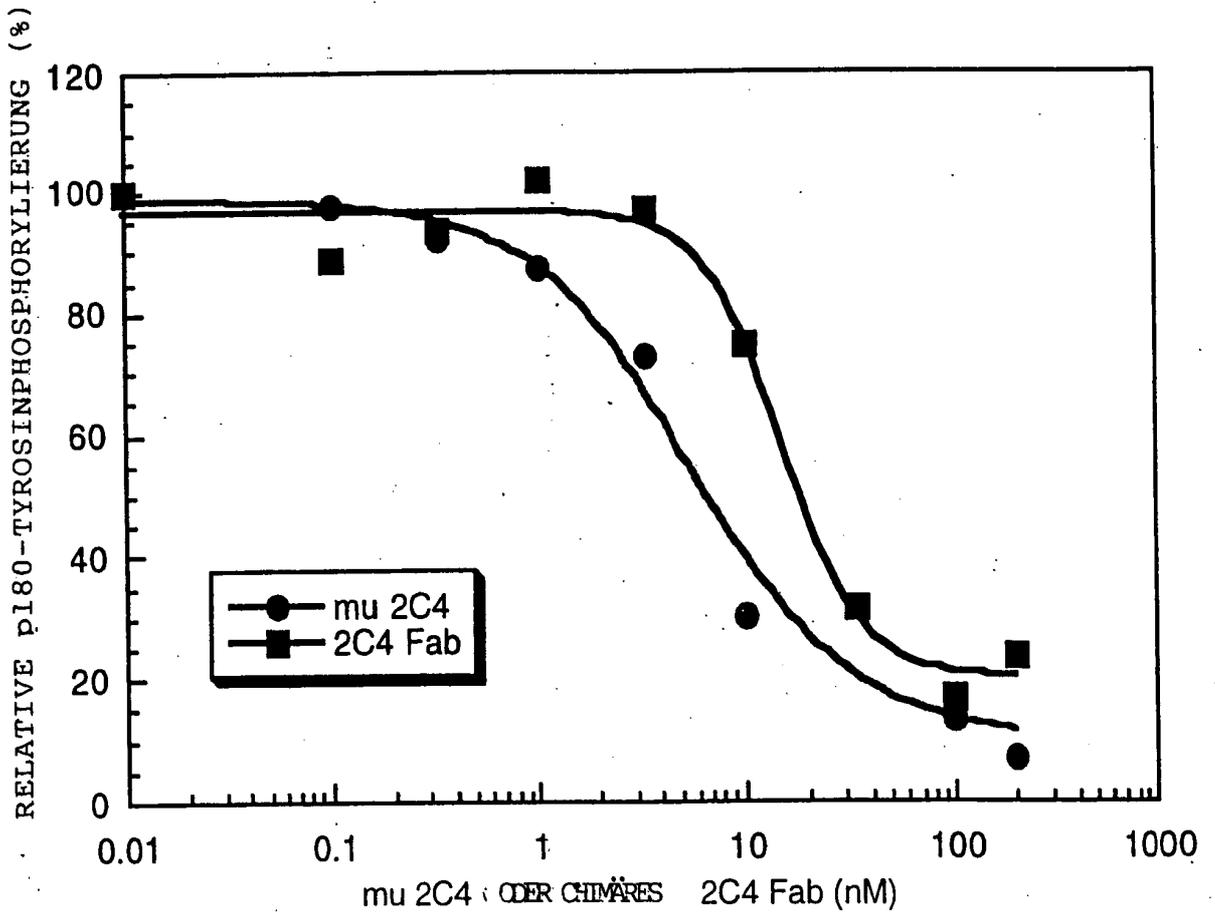
**FIG. 4B**



7/14



**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



9/14

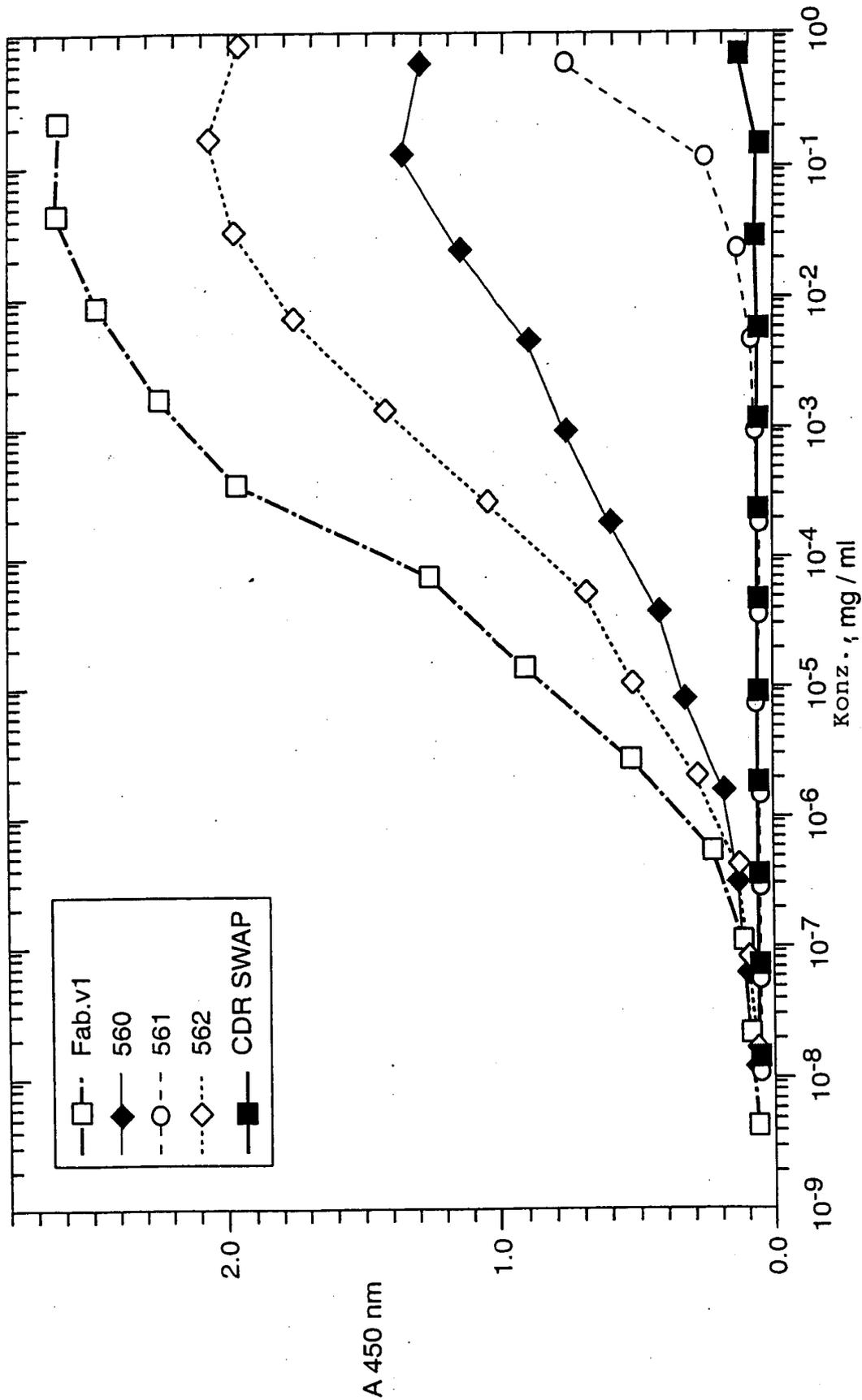


FIG.-8A

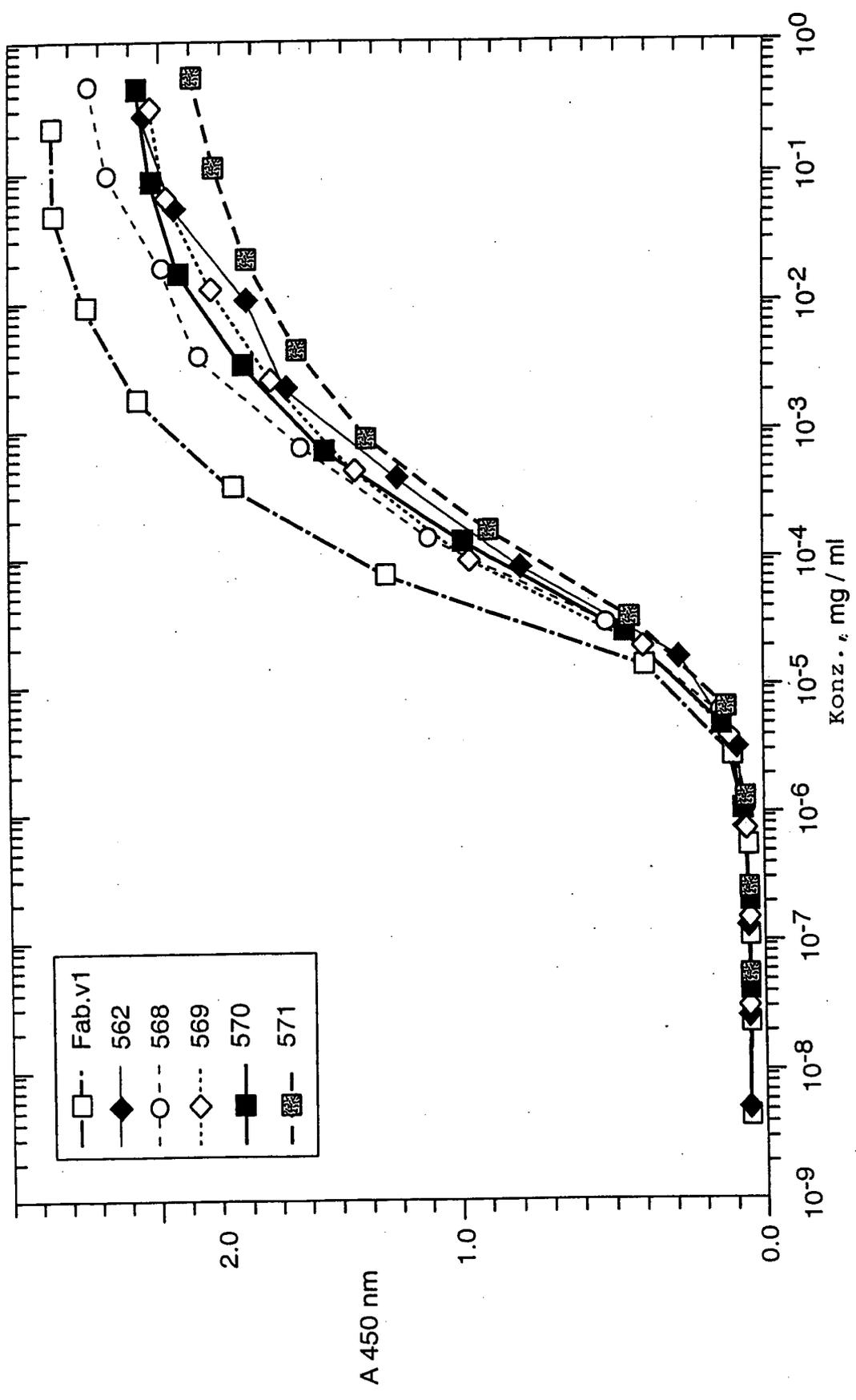


FIG.-8B

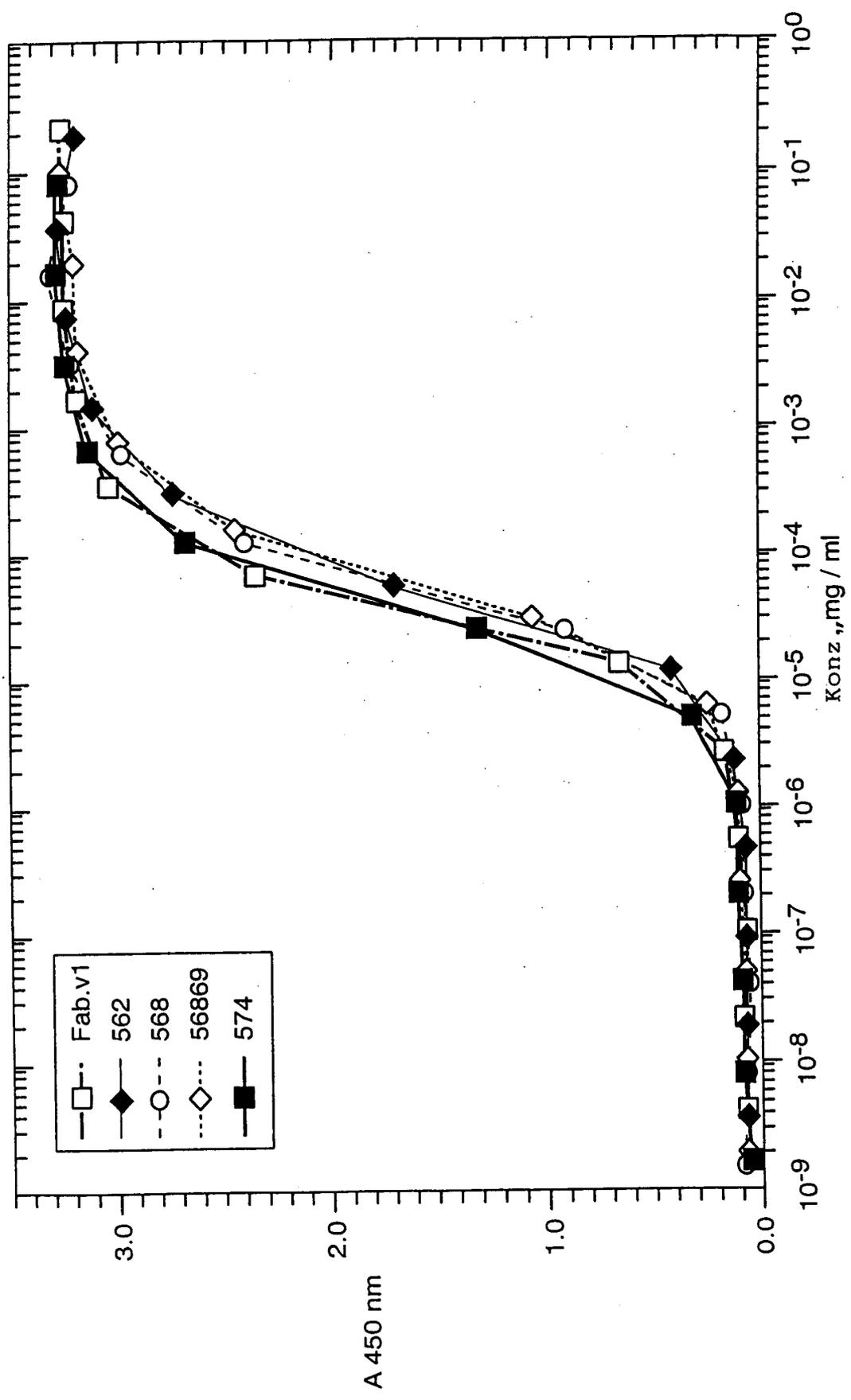


FIG.-8C

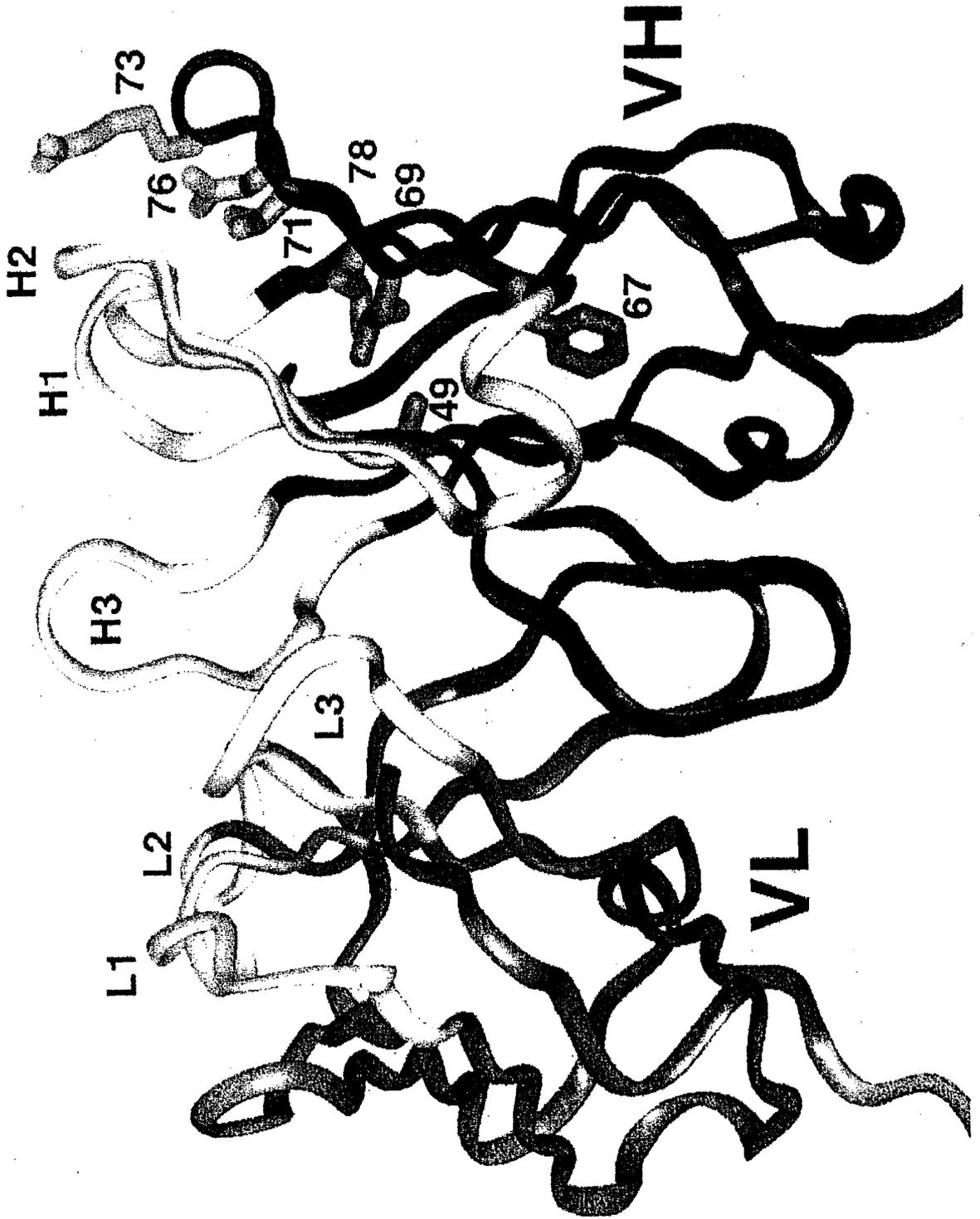
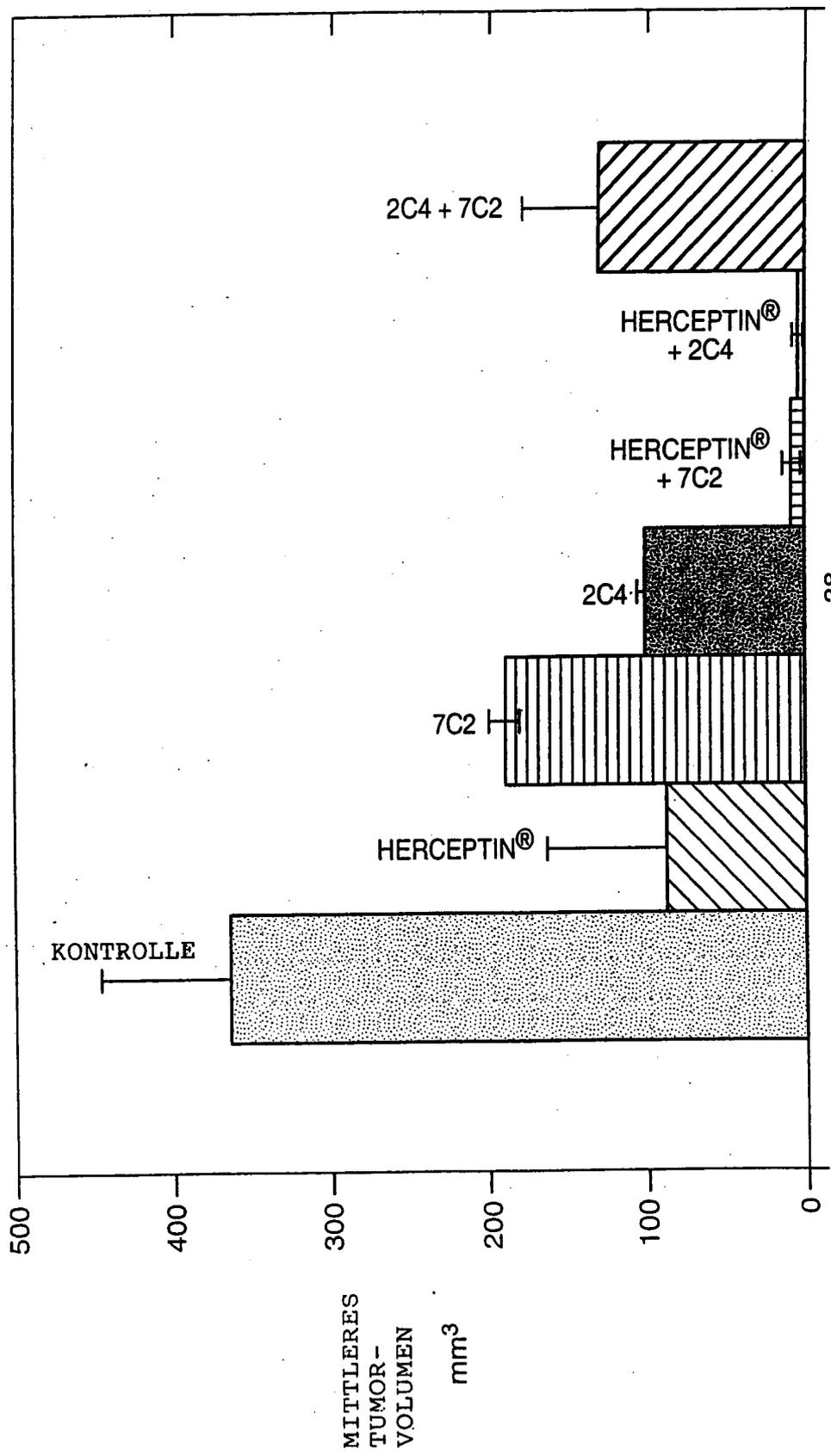


FIG.-9



38

TAG

FIG.- 11

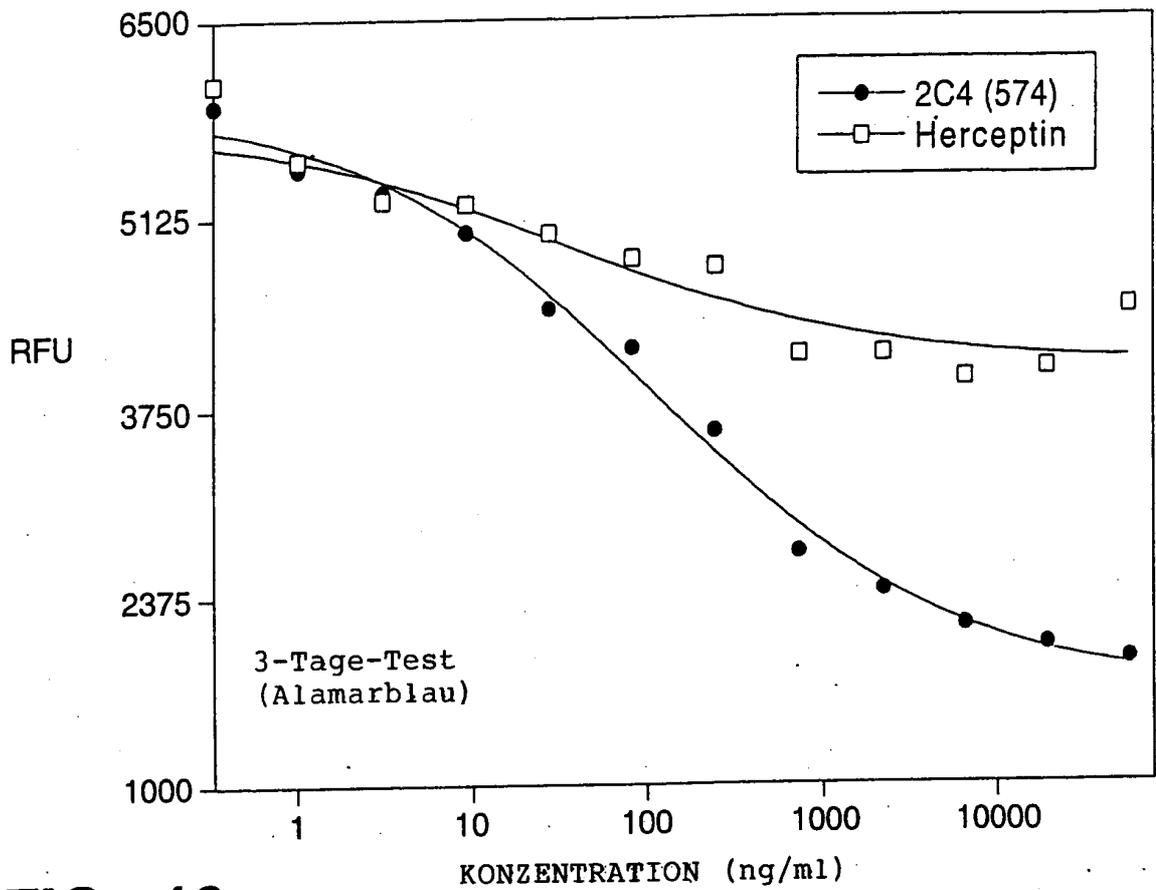


FIG. 12

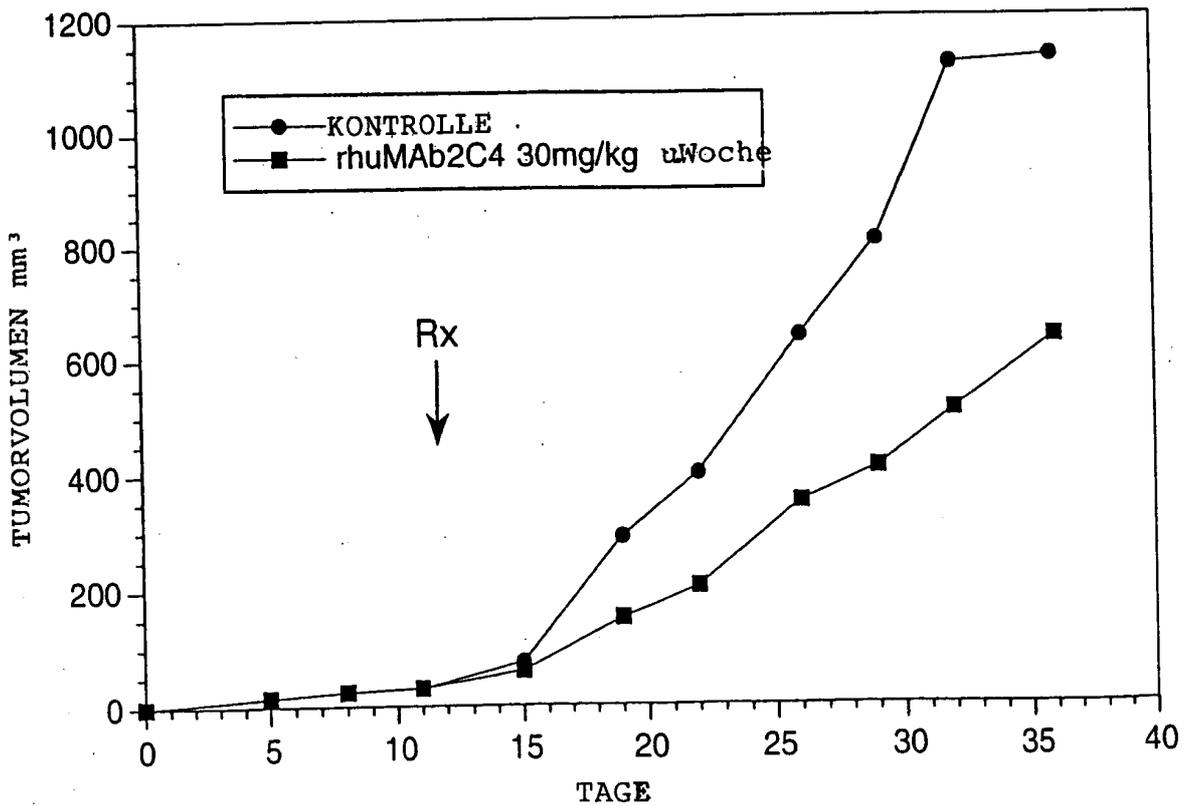


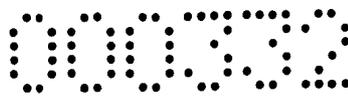
FIG. 13



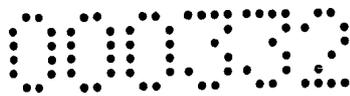
1. Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet und die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs nicht durch die Überexpression des ErbB2-Rezeptors gekennzeichnet ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Krebs Brustkrebs ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2, worin der Krebs metastatischer Brustkrebs ist.
4. Verwendung nach Anspruch 2, worin das Medikament zur gemeinsamen Verabreichung mit einem Chemotherapeutikum an den Menschen dient.
5. Verwendung nach Anspruch 4, worin das Chemotherapeutikum aus der aus einem Anthracyclin-Antibiotikum, Cyclophosphomid, einem Taxan, Navelbin, Xeloda, Mitomycin C, Oxaliplatin, Gemcitabin und einer Platinverbindung bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
6. Verwendung (a) eines ersten Antikörpers, der ErbB2 bindet und das Wachstum von Krebszellen hemmt, die ErbB2 überexprimieren; und (b) eines zweiten Antikörpers, der ErbB2 bindet, die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert und die Bindung von ErbB2 durch den aus der Hinterlegung Nr. ATCC HB-12697 erhältlichen monoklonalen Antikörper blockiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen.
7. Verwendung nach Anspruch 6, worin der erste Antikörper den aus der Hinterlegung Nr. ATCC CRL 10463 erhältlichen monoklonalen Antikörper oder eine humanisierte Form davon umfasst und der zweite Antikörper eine humanisierte Form des aus der Hinterlegung Nr. ATCC HB-12697 erhältlichen Antikörpers umfasst.



8. Verwendung eines Antikörpers, der ErbB2 bindet, die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert und die Bindung von ErbB2 durch den aus der Hinterlegung Nr. ATCC HB-12697 erhältlichen monoklonalen Antikörper blockiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs bei einem Menschen, worin der Krebs aus der aus Kolon-, Rektal- und Kolorektalkrebs bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
9. Humanisierter Antikörper, der ErbB2 bindet, die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert und die Bindung von ErbB2 durch den aus der Hinterlegung Nr. ATCC HB-12697 erhältlichen monoklonalen Antikörper blockiert.
10. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, der ErbB2 im Wesentlichen so wirksam bindet wie der aus der Hinterlegung Nr. ATCC HB-12697 erhältliche monoklonale murine Antikörper.
11. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, umfassend eine variable schwere ( $V_H$ -) Domäne, die Reste einer nicht-humanen hypervariablen Region umfasst, die in eine humane  $V_H$ -Domäne aufgenommen sind, und weiters eine Rahmenregion- (FR-) Substitution an einer Position umfasst, die aus der aus 69H, 71H und 73H bestehenden Gruppe, bei Anwendung des Nummerierungssystems nach Kabat (1991), ausgewählt ist.
12. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 11, umfassend FR-Substitutionen an den Positionen 69H, 71H und 73H.
13. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, umfassend die Komplementaritäts-Bestimmungs-Region- (CDR-) Reste GFTFTDYTMX (Seq.-ID Nr. 7), DVNPNS-GGSIYNQRFKG (Seq.-ID Nr. 8) und NLGPSFYFDY (Seq.-ID Nr. 9) der  $V_H$ -Domäne.
14. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, umfassend die  $V_H$ -Domänen-Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 4.



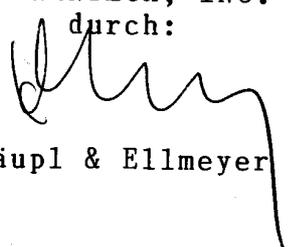
15. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, umfassend die Komplementaritäts-Bestimmungs-Region- (CDR-) Reste KASQDVSIGVA (Seq.-ID Nr. 10); SAS-YXXX (Seq.-ID Nr. 11); und QQYYIYPYT (Seq.-ID Nr. 12) der variablen leichten ( $V_L$ -) Domäne.
16. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, umfassend die  $V_L$ -Domänen-Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 3.
17. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, der ein intakter IgG1-Antikörper ist.
18. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 9, der ein Antikörperfragment ist.
19. Humanisierter Antikörper nach Anspruch 18, der ein Fab-Fragment ist.
20. Affinitätsgereifter Antikörper, der ErbB2 bindet, die Ligandenaktivierung eines ErbB-Rezeptors blockiert und die Bindung von ErbB2 durch den aus der Hinterlegung Nr. ATCC HB-12697 erhältlichen monoklonalen Antikörper blockiert.
21. Antikörper nach einem der Ansprüche 9 bis 20, der an ein nichtproteinartiges Polymer gebunden ist.
22. Antikörper nach Anspruch 21, worin das nichtproteinartige Polymer Polyethylenglykol ist.
23. Zusammensetzung, umfassend einen humanisierten Antikörper nach Anspruch 9 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
24. Immunkonjugat, umfassend einen humanisierten Antikörper nach Anspruch 9, konjugiert mit einem cytotoxischen Mittel.



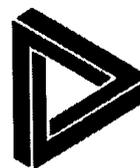
25. Isolierte Nukleinsäure, die für einen humanisierten Antikörper nach Anspruch 9 kodiert.
26. Vektor, der Nukleinsäure nach Anspruch 25 umfasst.
27. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 26 umfasst.
28. Wirtszelle nach Anspruch 27, die eine Säugetierzelle ist.
29. Wirtszelle nach Anspruch 28, die eine China-Hamster-Eierstock- (CHO-) Zelle ist.
30. Wirtszelle nach Anspruch 27, die eine prokaryotische Zelle ist.
31. Wirtszelle nach Anspruch 30, die eine E.coli-Zelle ist.
32. Verfahren zur Herstellung eines humanisierten Antikörpers, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle nach Anspruch 27, so dass die Nukleinsäure exprimiert wird.
33. Verfahren nach Anspruch 32, weiters umfassend das Gewinnen des humanisierten Antikörpers aus der Wirtszellenkultur.
34. Verfahren nach Anspruch 33, worin der humanisierter Antikörper aus dem Wirtszellen-Kulturmedium gewonnen wird.

Wien, am **12. Jan. 2006**

GENENTECH, INC.  
durch:

  
Häupl & Ellmeyer KEG

**NACHGEREICHT**



Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC<sup>B</sup>:  
 A61K 39/395 (2006.01)

Recherchiertes Prüfobjekt (Klassifikation):  
 A61K 39/395

Konsultierte Online-Datenbank:  
 WPI, CAS

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 21. Dezember 2001 eingereichten Ansprüchen 1-93 erstellt.

Kategorie <sup>1)</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO 1998/017797 A1 (GENENTECH, INC.) 30. April 1998 (30.04.1998) <i>Ansprüche</i>	35-41, 48-93
	--	
X	US 5677171 A (HUDZIAK et al.) 14. Oktober 1997 (14.10.1997) <i>Ansprüche</i>	35-41, 48-93
	--	
X	WO 1999/031140 A1 (GENENTECH, INC.) 24. Juni 1999 (24.06.1999) <i>Ansprüche</i>	35-41, 48-93
	--	
X	WO 1989/006692 A1 (GENENTECH, INC.) 27. Juli 1989 (27.07.1989) <i>Ansprüche</i>	35-41, 48-93
	--	
	Die Patentansprüche 1-34 wurden nicht recherchiert, da sie Verfahren zur Behandlung des Menschen betreffen.	
	----	

Datum der Beendigung der Recherche:  
 18. Jänner 2006

Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):  
 Mag. MOSSER

<sup>1)</sup> Kategorien der angeführten Dokumente:

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.

Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert.

P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde.

E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).

& Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.