



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 806 T2 2007.08.09**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 896 586 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 806.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/03546**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 908 923.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/035885**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.03.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **02.10.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.02.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **11.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.08.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 16/32 (2006.01)**

**A61K 39/395 (2006.01)**

**G01N 33/577 (2006.01)**

**C12N 5/10 (2006.01)**

**C12N 5/20 (2006.01)**

**C07K 17/00 (2006.01)**

**C12N 15/13 (2006.01)**

**C12N 15/64 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**624036 27.03.1996 US**

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**AKITA, Robert, Hayward, CA 94541, US;  
SLIWKOWSKI, Mark, San Carlos, CA 94070, US**

(54) Bezeichnung: **ErbB3 ANTIKÖRPER**

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

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

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung betrifft im Allgemeinen Antikörper, die den ErbB3-Rezeptor binden. Insbesondere betrifft sie Anti-ErbB3-Antikörper, die überraschenderweise die HRG-induzierte Bildung eines ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes in einer Zelle verringern, die beide dieser Rezeptoren exprimiert, sowie die Heregulin-induzierte ErbB2-Aktivierung in einer derartigen Zelle verringern und außerdem die Bindungsaffinität von Heregulin (HRG) für ErbB3-Protein erhöhen können.

## Beschreibung des Standes der Technik

**[0002]** Die Transduktion von Signalen, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren, wird teilweise durch Phosphorylierung verschiedener Zellproteine reguliert. Protein-Tyrosinkinase sind Enzyme, die diesen Prozess katalysieren. Von Rezeptorprotein-Tyrosinkinase wird angenommen, dass sie das Zellwachstum über Liganden-stimulierte Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Substrate steuern. Wachstumsfaktor-Rezeptorprotein-Tyrosinkinase der Klasse-I-Unterfamilie umfassen den vom erbB1-Gen kodierten Epidermiswachstumsfaktorrezeptor (EGFR) von 170kDa. erbB1 ist ursächlich mit menschlicher Malignität in Zusammenhang gebracht worden. Insbesondere ist die verstärkte Expression dieses Gens bei aggressiveren Karzinomen der Brust, Blase und des Magens beobachtet worden.

**[0003]** Das zweite Element der Klasse-I-Unterfamilie, p185<sup>neu</sup>, wurde ursprünglich als Produkt des transformierenden Gens aus Neuroblastomen chemisch behandelte Mäuse identifiziert. Das neu-Gen (auch erbB2 und HER2 genannt) kodiert für eine 185-kDa-Rezeptorprotein-Tyrosinkinase. Die Amplifikation und/oder Überexpression des menschlichen HER2-Gens korreliert mit einer schlechten Prognose bei Brust- und Eierstockkrebsformen (Slamon et al., Science 235, 177-182 (1987); und Slamon et al., Science 244, 707-712 (1989)). Die Überexpression von HER2 ist mit anderen Karzinomen, einschließlich Karzinomen des Magens, der Gebärmutter-schleimhaut, Speicheldrüse, Lunge, Niere, des Darms und der Blase korreliert worden.

**[0004]** Ein weiteres verwandtes, erbB3 oder HER3 genanntes Gen ist ebenfalls beschrieben worden. Siehe US-Patente Nr. 5.183.884 und 5.480.968; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4905-4909 (1990); Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9193-9197 (1989); EP-Patentanmeldung Nr. 444.961A1; und Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2900-2904 (1993). Kraus et al. (1989) entdeckten, dass merklich erhöhte Mengen an erbB3-mRNA in gewissen menschlichen Mammatumorzelllinien vorhanden waren, was darauf hinweist, dass erbB3 wie erbB1 und erbB2 eine Rolle bei manchen menschlichen Malignitäten spielen könnte. Diese Forscher zeigten, dass manche menschliche Mammatumorzelllinien eine signifikante Erhöhung der Steady-state-ErbB3-Tyrosinphosphorylierung zeigen, was weiter überdies darauf hinweist, dass dieser Rezeptor eine Rolle bei menschlichen Malignitäten spielen könnte. Demgemäß werden diagnostische Biotests, die Antikörper einsetzen, die an ErbB3 binden, von Kraus et al. in den US-Patenten Nr. 5.183.884 und 5.480.968 beschrieben.

**[0005]** Die Rolle von erbB3 beim Krebs ist von anderen erforscht worden. Es ist gefunden worden, dass es bei Brust- (Lemoine et al., Br. J. Cancer 66, 1116-1121 (1992)), Magen-Darm- (Poller et al., J. Pathol. 168, 275-280 (1992), Raikumer et al., J. Pathol. 170, 271-278 (1993) und Sanidas et al., Int. J. Cancer 54, 935-940 (1993)) und Pankreas-Krebsformen (Lemoine et al., J. Pathol. 168, 269-273 (1992) und Friess et al., Clinical Cancer Research 1, 1413-1420 (1995)) überexprimiert wird.

**[0006]** ErbB3 ist in der ErbR-Rezeptorfamilie insofern einzigartig, als dass es wenig oder keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität aufweist (Guy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8132-8136 (1994) und Kim et al., J. Biol. Chem. 269, 24747-55 (1994)). Wenn ErbB3 mit ErbB2 coexprimiert wird, wird ein aktiver Signalkomplex gebildet, und gegen ErbB2 gerichtete Antikörper sind fähig, diesen Komplex zu zerstören (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20), 14661-14665 (1994)). Außerdem wird die Affinität von ErbB3 für Heregulin (HGR) auf einen höheren Affinitätszustand gehoben, wenn es mit ErbB2 coexprimiert wird. Siehe auch Levi et al., Journal of Neuroscience 15, 1329-1340 (1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1431-1435 (1995); und Lewis et al., Cancer Res. 56, 1457-1465 (1996) bezüglich des ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes.

**[0007]** Rajkumar et al., British Journal Cancer 70(3), 459-465 (1994) entwickelten einen monoklonalen Antikörper gegen ErbB3, der eine agonistische Wirkung auf das verankerungsunabhängige Wachstum von Zelllinien aufwies, die diesen Rezeptor exprimierten.

**[0008]** Die Klasse-I-Unterfamilie der Wachstumsfaktor-Rezeptorprotein-Tyrosinkinasen ist erweitert worden, um den HER4/p180<sup>erbB4</sup>-Rezeptor zu umfassen. Siehe EP-Patentanmeldung Nr. 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1746-1750 (1993); und Plowman et al., Nature 366, 473-475 (1993). Plowman et al. fanden, dass die erhöhte HER4-Expression eng mit bestimmten, aus dem Epithel entstehenden Karzinomen, einschließlich mit Brust-Adenokarzinomen korreliert. Diagnoseverfahren zum Nachweis menschlicher neoplastischer Leiden (insbesondere Brustkrebsformen), welche die HER4-Expression beurteilen, werden demgemäß in der EP-Patentanmeldung Nr. 599.274 beschrieben.

**[0009]** Die Suche nach dem Aktivator des HER2-Onkogens führte zur Entdeckung einer Familie von Heregulin-Polypeptiden. Diese Proteine scheinen aus dem alternativen Spleißen eines einzigen Gens hervorzugehen, das von Lee et al., Genomics 16, 790-791 (1993) und Orr-Urtreger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1867-1871 (1993) an den kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 8 kartiert wurde.

**[0010]** Holmes et al. isolierten und klonierten eine Familie von Polypeptidaktivatoren für den HER2-Rezeptor, die sie Heregulin- $\alpha$  (HRG- $\alpha$ ), Heregulin- $\beta$ 1 (HRG- $\beta$ 1), Heregulin- $\beta$ 2 (HRG- $\beta$ 2), Heregulin- $\beta$ 2-ähnlich (HRG- $\beta$ 2-ähnlich) und Heregulin- $\beta$ 3 (HRG- $\beta$ 3) nannten. Siehe Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992); WO 92/20798. Das 45-kDa-Polypeptid HRG- $\alpha$  wurde aus dem konditionierten Medium der menschlichen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 gereinigt. Diese Forscher bewiesen die Fähigkeit der gereinigten Heregulin-Polypeptide, die Tyrosinphosphorylierung des HER2-Rezeptors in MCF7-Brusttumorzellen zu aktivieren. Darüber hinaus wurde die mitogene Aktivität der Heregulin-Polypeptide an SK-BR-3-Zellen (die hohe Mengen des HER2-Rezeptors exprimieren) illustriert. Wie andere Wachstumsfaktoren, die der EGF-Familie angehören, scheinen lösliche HRG-Polypeptide von einem membrangebundenen Vorläufer zu stammen (der pro-HRG genannt wird), der proteolytisch prozessiert wird, um die lösliche 45-kDa-Form freizusetzen. Diesen pro-HRGs fehlt ein N-terminales Signalpeptid.

**[0011]** Obgleich die ersten 213 Aminosäurereste der Hereguline identisch sind, werden sie in zwei Haupttypen,  $\alpha$  und  $\beta$ , eingeteilt, und zwar auf Basis von zwei EGF-ähnlichen Variantendomänen, die sich in ihren C-terminalen Abschnitten unterscheiden. Trotzdem sind diese EGF-ähnlichen Domänen hinsichtlich des Abstands von sechs darin enthaltenen Cysteinresten identisch. Auf Basis eines Aminosäurevergleichs fanden Holmes et al., dass HRGs zwischen dem ersten und sechsten Cystein in der EGF-ähnlichen Domäne eine Ähnlichkeit von 45% mit dem Heparin-bindenden, EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF), eine Ähnlichkeit von 35% mit Amphiregulin (AR), eine Ähnlichkeit von 32% mit TGF- $\alpha$  und eine Ähnlichkeit von 27% mit EGF aufweisen.

**[0012]** Der neu-Differenzierungsfaktor (NDF) mit 44 kDa, der das Ratten-Äquivalent zum menschlichen HRG ist, wurde erstmals von Peles et al., Cell 69, 205-216 (1992); und Wen et al., Cell 69, 559-572 (1992) beschrieben. Wie die HRG-Polypeptide weist NDF eine Immunglobulin-(Ig-)Homologiedomäne, gefolgt von einer EGF-ähnlichen Domäne auf und es fehlt ihm ein N-terminales Signalpeptid. Anschließend führten Wen et al., Mol. Cell. Biol. 14(3), 1909-1919 (1994) eine „erschöpfende Klonierung“ durch, um die Familie von NDFs zu erweitern. Diese Arbeit offenbarte sechs unterschiedliche Fibroblasten-Pro-NDFs. Die Nomenklatur von Holmes et al. übernehmend, werden die NDFs auf Basis der Sequenzen der EGF-ähnlichen Domänen entweder als  $\alpha$ - oder als  $\beta$ -Polypeptide klassifiziert. Die Isoformen 1 bis 4 werden auf Basis des variablen Juxtamembran-Abschnitts (zwischen der EGF-ähnlichen Domäne und Transmembrandomäne) charakterisiert. Außerdem werden die Isoformen a, b und c beschrieben, die zytoplasmatische Domänen variabler Länge aufweisen. Diese Forscher ziehen den Schluss, dass verschiedene NDF-Isoformen durch alternatives Spleißen erzeugt werden und unterschiedliche gewebespezifische Funktionen erfüllen.

**[0013]** Falls et al., Cell 72, 801-815 (1993) beschreiben ein weiteres Element der Heregulin-Familie, das sie Polypeptid für Acetylcholinrezeptor-induzierende Aktivität (ARIA) nennen. Das vom Huhn stammende ARIA-Polypeptid stimuliert die Synthese von Muskel-Acetylcholinrezeptoren. Siehe auch WO 94/08007. ARIA ist ein Heregulin des  $\beta$ -Typs, dem der gesamte (an Glykosylierungsstellen reiche) „Glyko“-Spacer zwischen der Ig-ähnlichen Domäne und der EGF-ähnlichen Domäne von HRG $\alpha$  und HRG $\beta$ 1- $\beta$ 3 fehlt.

**[0014]** Marchionni et al., Nature 362, 312-318 (1993) identifizierten mehrere vom Rind stammende Proteine, die sie Glia-Wachstumsfaktoren (GFFs) nennen. Diese GFFs haben die Ig-artige Domäne und EGF-artige Domäne mit den anderen oben beschriebenen Heregulin-Proteinen gemeinsam, weisen jedoch außerdem eine amino-terminale Kringle-Region auf. GFFs weisen im Allgemeinen den vollständigen „Glyko“-Spacer zwischen der Ig-ähnlichen Domäne und der EGF-ähnlichen Domäne nicht auf. Nur einer der GFFs, GGFI, wies ein N-terminales Signalpeptid auf.

**[0015]** Die Expression der ErbB2-Familie von Rezeptoren und Heregulin-Polypeptiden bei Brustkrebs wird in

Bacus et al., Pathology Patterns 102(4) (Supp. 1), S13-S24 (1994) im Überblick behandelt.

**[0016]** Siehe auch Alimandi et al., Oncogene 10, 1813-1821 (1995); Beerli et al., Molecular and Cellular Biology 15, 6469-6505 (1995); Karunagaran et al., EMBO J. 15, 254-264 (1996); Wallasch et al., EMBO J. 14, 4267-4275 (1995); und Zhang et al., Journal of Biological Chemistry 271, 3884-3890 (1996) im Bezug auf die obige Rezeptorfamilie.

**[0017]** US-Patent Nr. 5.480.968 offenbart das erbB3-Polypeptid und Antiseren, die gegen spezifische Peptide aus diesem Polypeptid hergestellt wurden, wovon eines aus der extrazellulären Domäne stammt. Obgleich es mögliche Verwendungen der Antikörper bei Therapie und Detektion von erbB3 erwähnt, wird jedoch keinerlei Wirkung auf die Aktivität von Heregulin erwähnt und ihre Existenz in der Tat nicht erkannt. Es ist nicht bekannt, ob das Antiserum gegen die extrazelluläre Domäne eine derartige Eigenschaft intrinsisch aufweisen würde, aber es ist hierin ohnehin aus den Ansprüchen, die die Antikörper an sich betreffen, mittels Disclaimer ausgeschlossen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0018]** Diese Erfindung stellt Antikörper bereit, die an ErbB3-Protein binden und außerdem die folgenden Eigenschaften aufweisen: eine Fähigkeit zur Verringerung der durch Heregulin induzierten Bildung eines ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes in einer ErbB2 und ErbB3 exprimierenden Zelle; und die Eigenschaft der Verringerung der durch Heregulin induzierten ErbB2-Aktivierung in einer ErbB2 und ErbB3 exprimierenden Zelle.

**[0019]** Die Bindungsaffinität von Heregulin für ErbB3-Protein kann erhöht oder verringert werden, wird jedoch vorzugsweise erhöht.

**[0020]** Bevorzugte Antikörper sind monoklonale Antikörper, die an ein Epitop in der extrazellulären Domäne des ErbB3-Rezeptors binden. Im Allgemeinen binden Antikörper von Interesse den ErbB3-Rezeptor mit einer Affinität von zumindest ungefähr 10 nM, bevorzugter zumindest ungefähr 1 nM. Bei gewissen Ausführungsformen ist der Antikörper an einer festen Phase immobilisiert (z.B. kovalent daran gebunden), z.B. für die Affinitätsreinigung des Rezeptors oder für Diagnostiktests.

**[0021]** Die Antikörper der vorangehenden Absätze können in Form einer Zusammensetzung bereitgestellt werden, die den Antikörper und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdüner umfasst.

**[0022]** Offenbart werden ein für den Antikörper der vorangehenden Absätze kodierendes isoliertes Nucleinsäuremolekül, das ferner einen operabel daran gebundenen Promotor enthalten kann; ein Expressionsvektor, der das Nucleinsäuremolekül umfasst, das operabel an Kontrollsequenzen gebunden ist, die von einer mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden; eine die Nucleinsäure umfassende Zelllinie (z.B. eine Hybridomzelllinie); und ein Verfahren zur Verwendung eines für den Antikörper kodierenden Nucleinsäuremoleküls, um die Produktion des Antikörpers zu bewirken, umfassend das Kultivieren einer die Nucleinsäure umfassenden Zelle und gegebenenfalls das Gewinnen des Antikörpers aus der Zellkultur und vorzugsweise aus dem Zellkulturmedium.

**[0023]** Die Erfindung stellt außerdem die Verwendung des Antikörpers bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Säugetiers bereit.

**[0024]** Offenbart werden ein Verfahren zum Nachweis von ErbB3 in vitro oder in vivo, umfassend das Kontaktieren des Antikörpers mit einer Zelle, von der vermutet wird, dass sie ErbB3 enthält, und der Nachweis, dass eine Bindung aufgetreten ist, sowie ein Test zum Nachweis eines Tumors, der durch die amplifizierte Expression von ErbB3 gekennzeichnet ist, umfassend die Schritte des Aussetzens einer Zelle mit dem hierin offenbarten Antikörper und Ermitteln des Ausmaßes an Bindung des Antikörpers an die Zelle. Im Allgemeinen ist der Antikörper zur Verwendung in einem derartigen Test markiert. Der Test hierin kann ein In-vitro-Test (wie z.B. ein ELISA-Test) oder eine In-vivo-Test sein. Für die In-vivo-Tumordiagnose wird der Antikörper im Allgemeinen an ein radioaktives Isotop konjugiert und an ein Säugetier verabreicht und das Ausmaß an Bindung des Antikörpers an Gewebe im Säugetier durch äußeres Scanning auf Radioaktivität festgestellt.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0025]** **Fig. 1** stellt die Bindung von HRG an K562-ErbB3-Zellen in Gegenwart verschiedener monoklonaler Anti-ErbB3-Antikörper dar. Gereinigte Anti-ErbB3-Antikörper wurden mit einer Suspension von

K562-ErbB3-Zellen und  $^{125}\text{I}$ -HRG $\beta_1$ <sub>(177-244)</sub> inkubiert. Nach etwa 18 Stunden auf Eis wurde die zellgebundene Radioaktivität gezählt. Zählergebnisse sind als prozentuelle Bindung in Abwesenheit von Antikörper (Kontrolle) aufgetragen. Nichtspezifische Bindung wurde unter Verwendung eines Überschusses an unmarkiertem HRG $\beta_1$ <sub>(177-244)</sub> (HRG) bestimmt. Gegen ErbB2-Protein (2C4) und HSV (5B6) gerichtete Antikörper wurden als Negativkontrollen verwendet.

**[0026]** **Fig. 2** zeigt die Wirkung der Antikörperkonzentration auf die HRG-Bindung. Ein Dosis-Wirkungs-Experiment wurde am 3-8D6-Antikörper durchgeführt, von dem sich zeigte, dass er die HRG-Bindung verstärkte. K562-ErbB3-Zellen wurden mit einer festgelegten Konzentration an  $^{125}\text{I}$ -HRG und ansteigenden Konzentrationen des 3-8D6-Antikörpers inkubiert. Die Daten aus diesem Experiment sind als zellgebundene Zählimpulse über der Antikörperkonzentration aufgetragen.

**[0027]** **Fig. 3** illustriert die HRG-Bindung an K562-ErbB3-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit des 3-8D6-Antikörpers oder eines Fab-Fragments davon. Kompetitive Ligandenbindungsexperimente wurden in Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von 100 nM 3-8D6 oder Fab durchgeführt. Die Daten sind als gebundenes/gesamtes (B/T) über Gesamt-HRG $\beta_1$ <sub>(177-244)</sub> aufgetragen.

## AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG BEVORZUGTER AUSFÜHRUNGSFORMEN

### I. Definitionen

**[0028]** Sofern nicht anders angegeben, bezieht sich der Ausdruck „ErbB3“ bei Verwendung hierin auf Säugetier-ErbB3-Protein, und „erbB3“ bezieht sich auf das SäugetiererbB3-Gen. Das bevorzugte ErbB3-Protein ist menschliches ErbB3-Protein, das in der Zellmembran einer Zelle vorhanden ist. Das menschliche erbB3-Gen wird im US-Patent Nr. 5.480.968 und von Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4905-4909 (1990), beschrieben.

**[0029]** Der Antikörper von Interesse kann einer sein, der nicht signifikant mit anderen Proteinen kreuzreagiert, wie z.B. mit jenen, die von den erbB1-, erbB2- und/oder erbB4-Genen kodiert werden. Bei derartigen Ausführungsformen beträgt das Ausmaß an Bindung des Antikörpers gegen diese Nicht-ErbB3-Proteine (z.B. Zelloberflächenbindung an endogenen Rezeptor) weniger als 10%, wie durch Analyse mittels fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS-Analyse) oder Radioimmunpräzipitation (RIA) gemessen wird. Jedoch kann der Antikörper manchmal einer sein, der beispielsweise sehr wohl mit dem ErbB4-Rezeptor kreuzreagiert und gegebenenfalls nicht mit dem EGFR- und/oder ErbB2-Rezeptor kreuzreagiert.

**[0030]** „Heregulin“ (HRG) bezieht sich bei Verwendung hierin auf ein Polypeptid, das den ErbB2-ErbB3-Proteinkomplex aktiviert (d.h. bei der Bindung daran die Phosphorylierung von Tyrosinresten im ErbB2-ErbB3-Komplex induziert). Verschiedene von diesem Ausdruck umfasste Heregulin-Polypeptide sind oben offenbart worden. Der Ausdruck umfasst biologisch aktive Fragmente und/oder Varianten natürlich vorkommender HRG-Polypeptide, wie z.B. ein Fragment einer EGF-ähnlichen Domäne davon (z.B. HRG $\beta_1$ <sub>(177-244)</sub>).

**[0031]** Der „ErbB2-ErbB3-Proteinkomplex“ ist ein nichtkovalent assoziiertes Oligomer aus ErbB2-Rezeptor und ErbB3-Rezeptor. Dieser Komplex bildet sich, wenn eine beide dieser Rezeptoren exprimierende Zelle HRG ausgesetzt wird. Der Komplex kann durch Immunpräzipitation isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert werden, wie im unten stehenden Beispiel beschrieben wird.

**[0032]** Der Ausdruck „verringert die durch Heregulin induzierte Bindung eines ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes in einer ErbB2 und ErbB3 exprimierenden Zelle“ bezieht sich auf die Fähigkeit des Antikörpers, die Anzahl an ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexen statistisch signifikant zu verringern, die sich im Vergleich zu einer unbehandelten (Kontroll-) Zelle in einer Zelle bilden, die dem Antikörper und HRG ausgesetzt worden ist. Die Zelle, die ErbB2 und ErbB3 exprimiert, kann eine natürlich vorkommende Zelle oder Zelllinie (z.B. Caov3-Zelle) sein oder kann durch Einführen von für jedes dieser Proteine kodierender Nucleinsäure in eine Wirtszelle rekombinant produziert werden. Vorzugsweise verringert der Antikörper die Bildung dieses Komplexes um zumindest 50% und bevorzugter zumindest 70%, wie sie durch Reflexions-Scanning-Densitometrie von Western-Blots des Komplexes gemessen wird (siehe unten stehende Beispiele).

**[0033]** Der Antikörper, der die „durch Heregulin induzierte ErbB2-Aktivierung in einer ErbB2 und ErbB3 exprimierenden Zelle verringert“ ist einer, der die Tyrosinphosphorylierungsaktivität von ErbB2 statistisch signifikant verringert, die auftritt, wenn HRG an ErbB3 im ErbB2-ErbB3-Proteinkomplex bindet (der an der Oberfläche einer Zelle zugegen ist, die die beiden Rezeptoren exprimiert), und zwar in Bezug auf eine unbehandelte (Kon-

troll-) Zelle. Dies kann auf Basis von Phosphotyrosin-Ausmaßen im ErbB2-ErbB3-Komplex nach Exposition des Komplexes mit HRG und dem Antikörper von Interesse ermittelt werden. Die ErbB2- und ErbB3-Protein exprimierende Zelle kann eine natürlich vorkommende Zelle oder Zelllinie (z.B. Caov3-Zelle) oder rekombinant produziert sein. ErbB2-Aktivierung kann durch Western-Blotting, gefolgt von Sondierung mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper bestimmt werden, wie in den unten stehenden Beispielen beschrieben wird. Alternativ dazu kann der in WO 95/14930 und Sadick et al., *Analytical Biochemistry* 235, 207-214 (1996) beschriebene Kinaserezeptor-Aktivierungstest verwendet werden, um die ErbB2-Aktivierung zu quantifizieren. Vorzugsweise verringert der Antikörper die durch Heregulin induzierte ErbB2-Aktivierung um zumindest 50% und bevorzugter um zumindest 70%, wie sie durch Reflexions-Scanning-Densitometrie von Western-Blots des mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper sondierten Komplexes gemessen wird (siehe unten stehende Beispiele).

**[0034]** Der Antikörper kann einer sein, der „die Bindungsaffinität von Heregulin für ErbB3-Protein erhöht“. Dies bedeutet, dass in Gegenwart des Antikörpers (z.B. 100 nM Antikörper) die Menge an HRG, die an ErbB3 bindet (z.B. endogenes, in einer natürlich vorkommenden Zelle oder Zelllinie vorhandenes oder in eine Zelle durch rekombinante Techniken eingeführtes ErbB3, siehe unten stehende Beispiele), in Bezug auf die Kontrolle (kein Antikörper) statistisch signifikant erhöht ist. Beispielsweise kann die Menge an HRG, die an die mit erbB3 wie hierin beschrieben transfizierte K562-Zelllinie bindet, in Gegenwart von 100 nM Antikörper um zumindest 10%, vorzugsweise zumindest 50% und insbesondere bevorzugt um zumindest ungefähr 100% (siehe [Fig. 1](#)) in Bezug auf die Kontrolle erhöht werden.

**[0035]** Der Antikörper, der die HRG-Bindung an ErbB3-Protein (z.B. in einer Zelle vorhandenes ErbB3) verringert ist einer, der die HRG-Bindungsstelle am ErbB3-Protein stört, so dass er die Menge an Heregulin, die zur Bindung an diese Stelle des Moleküls fähig ist, statistisch signifikant verringert.

**[0036]** Der Ausdruck „Antikörper“ wird hierin im weitesten Sinne verwendet und umfasst im Speziellen monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper), die aus zumindest zwei intakten Antikörpern gebildet werden, und Antikörperfragmente, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen. Der Antikörper kann beispielsweise ein IgM, IgG (z.B. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), IgD, IgA oder IgE sein. Vorzugsweise ist der Antikörper jedoch kein IgM-Antikörper.

**[0037]** „Antikörperfragmente“ umfassen einen Abschnitt eines Antikörpers voller Länge, im Allgemeinen die antigenbindende oder variable Domäne davon. Beispiele für Antikörperfragmente umfassen Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- und Fv-Fragmente; Diabodies; lineare Antikörper; Einzelketten-Antikörpermoleküle; und multispezifische Antikörper, die aus Antikörperfragmenten gebildet werden.

**[0038]** Der Ausdruck „monoklonaler Antikörper“ bezieht sich bei Verwendung hierin auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erlangt wurde, d.h., die einzelnen, die Population umfassenden Antikörper sind identisch mit Ausnahme möglicher natürlich vorkommender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können. Monoklonale Antikörper sind höchst spezifisch und richten sich gegen eine einzige Antigenstelle. Darüber hinaus richtet sich jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzige Determinante (Epitop) am Antigen im Gegensatz zu herkömmlichen (polyklonalen) Antikörperpräparaten, die typischerweise verschiedene Antikörper umfassen, die gegen verschiedene Determinanten (Epitope) gerichtet sind. Zusätzlich zu ihrer Spezifität sind die monoklonalen Antikörper insofern vorteilhaft, als dass sie durch die Hybridomkultur ohne Verunreinigung durch andere Immunglobuline produziert werden. Der Modifikator „monoklonal“ kennzeichnet den Charakter des Antikörpers dahingehend, dass er aus einer im Wesentlichen homogenen Population von Antikörpern erlangt wurde, und ist nicht dahingehend auszulegen, als dass die Produktion des Antikörpers irgendein spezielles Verfahren erfordert. Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendende monoklonale Antikörper mit dem erstmals von Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975) beschriebenen Verfahren hergestellt werden oder können durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 4.816.567). Die „monoklonalen Antikörper“ können außerdem beispielsweise aus 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.

**[0039]** Die monoklonalen Antikörper hierin umfassen im Speziellen „chimäre“ Antikörper (Immunglobuline), bei denen ein Abschnitt der Schwer- und/oder Leichtkette homolog zu oder identisch mit entsprechenden Sequenzen in Antikörpern ist, die aus einer bestimmten Spezies stammen oder die einer bestimmten Antikörperklasse oder Unterklasse angehören, während der Rest der Kette(n) homolog zu oder identisch mit entsprechenden Sequenzen in Antikörpern ist, die aus einer anderen Spezies stammen oder einer anderen Antikörperklasse oder Unterklasse angehören, sowie Fragmente derartiger Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81,

6851-6855 (1984)).

**[0040]** „Humanisierte“ Formen nichtmenschlicher (z.B. Maus) Antikörper sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> oder andere antigenbindende Untersequenzen von Antikörpern), die eine vom nichtmenschlichen Immunglobulin hergeleitete Minimalsequenz enthalten. Größtenteils sind humanisierte Antikörper menschliche Immunglobuline (Empfänger-Antikörper), in denen Reste aus einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Empfängers durch Reste aus einer CDR einer nichtmenschlichen Spezies (Spender-Antikörper), wie z.B. Maus, Ratte oder Kaninchen mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In manchen Fällen werden Fv-Gerüst-(FR-)Reste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Außerdem können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die sich weder im Empfänger-Antikörper, noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen finden. Diese Modifizierungen werden vorgenommen, um die Leistungsfähigkeit des Antikörpers weiter zu verfeinern und zu maximieren. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nichtmenschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulinsequenz sind. Der humanisierte Antikörper wird gegebenenfalls auch zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jene eines menschlichen Immunglobulins umfassen. Für weitere Einzelheiten siehe Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992). Der humanisierte Antikörper umfasst einen PRIMATIZED™-Antikörper, worin die Antigenbindungsregion des Antikörpers aus einem Antikörper stammt, der durch Immunisierung von Makakenaffen mit dem Antigen von Interesse hergestellt wurde.

**[0041]** „Einzelketten-Fv“- oder „sFv“-Antikörperfragmente umfassen die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Antikörperdomänen, worin diese Domänen in einer einzelnen Polypeptidkette vorliegen. Vorzugsweise umfasst das Fv-Polypeptid weiters einen Polypeptidlinker zwischen den V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>-Domänen, was es dem sFv ermöglicht, die gewünschte Struktur für die Antigenbindung auszubilden. Für einen Überblick über sFv siehe Pluckthun in „The Pharmacology of Monoclonal Antibodies“, Bd. 113, Rosenberg und Moore (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, S. 269-315 (1994).

**[0042]** Der Ausdruck „Diabodies“ bezieht sich auf kleine Antikörperfragmente mit zwei Antigenbindungsstellen, wobei die Fragmente eine variable Schwereketten-domäne (V<sub>H</sub>) umfassen, die mit einer variablen Leichtketten-domäne (V<sub>L</sub>) in derselben Polypeptidkette (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) verbunden ist. Durch Verwendung eines Linkers, der zu kurz ist, um die Paarung zwischen den beiden Domänen an derselben Ketten zu erlauben, sind die Domänen gezwungen, sich mit den komplementären Domänen einer anderen Kette zu paaren und zwei Antigenbindungsstellen zu erzeugen. Diabodies werden ausführlicher beispielsweise in EP 404.097; WO 93/11161; und Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993) beschrieben.

**[0043]** Ein „isolierter“ Antikörper ist einer der identifiziert und aus einer Komponente seiner natürlichen Umgebung abgetrennt und/oder gewonnen worden ist. Verunreinigende Komponenten seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, welche die diagnostischen und therapeutischen Verwendungen für den Antikörper stören würden, und können Enzyme, Hormone und andere proteinische oder nichtproteinische Gelöststoffe umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen wird der Antikörper gereinigt, und zwar (1) auf mehr als 95 Gewichtsprozent Antikörper, wie ermittelt mittels Lowry-Verfahren, und insbesondere bevorzugt auf mehr als 99 Gewichtsprozent, (2) in einem Ausmaß, das ausreicht, um zumindest 15 Reste der N-terminalen oder internen Aminosäuresequenz durch Verwendung eines Spinning-Cup-Sequenators zu erlangen oder (3) zur Homogenität mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen unter Verwendung von Coomassie-Blau oder vorzugsweise Silberfärbung. Ein isolierter Antikörper umfasst den Antikörper in situ in rekombinanten Zellen, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umgebung des Antikörpers nicht vorhanden sein wird. Für gewöhnlich wird jedoch ein isolierter Antikörper durch zumindest einen Reinigungsschritt hergestellt.

**[0044]** Wie hierin verwendet bezieht sich der Ausdruck „Salvage-Rezeptorbindungsligand“ auf ein Epitop der Fc-Region eines IgG-Moleküls (z.B. IgG1, IgG2, IgG3 oder IgG4), das für die Erhöhung der In-vivo-Serumhalbwertszeit des IgG-Moleküls verantwortlich ist.

**[0045]** „Behandlung“ bezieht sich auf therapeutische Behandlung sowie prophylaktische oder präventive Maßnahmen. Jene, die einer Behandlung bedürfen umfassen jene, die die Störung bereits aufweisen sowie jene, bei denen die Störung zu verhindern ist.

**[0046]** „Säugetier“ zum Zwecke der Behandlung bezieht sich auf jegliches als Säugetier klassifizierte Tier, einschließlich Menschen, Haus- und Nutztiere, sowie Zoo-, Sport- oder Haustiere, wie z.B. Hunde, Pferde, Katzen, Rinder usw. Vorzugsweise ist das Säugetier der Mensch.

**[0047]** Eine „Störung“ ist jeglicher Zustand, der aus der Behandlung mit dem Anti-ErbB3-Antikörper Nutzen zieht. Dies umfasst chronische und akute Störungen oder Krankheiten, einschließlich jene pathologischen Leiden, die das Säugetier für die fragliche Störung empfänglich machen. Im Allgemeinen wird die Störung eine sein, bei der die übermäßige Aktivierung des ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes durch Heregulin auftritt. Nicht-einschränkende Beispiele von hierin zu behandelnden Störungen umfassen benigne und maligne Tumore; Leukämien und Lymphmalignitäten; Glia-, Astrozyten-, Hypothalamus- und andere Glandula-, Makrophagen-, Epithel-, Stroma- und Blastozöl-Störungen; und entzündliche, angiogene und immunologische Störungen.

**[0048]** Die Ausdrücke „Krebs“ und „kanzerös“ beziehen sich auf oder beschreiben den physiologischen Zustand in Säugetieren, der typischerweise durch unreguliertes Zellwachstum gekennzeichnet ist. Beispiele von Krebs umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Karzinom, Lymphom, Blastom, Sarkom und Leukämie. Speziellere Beispiele für derartige Krebsformen umfassen Plattenepithelkarzinom, kleinzelligen Lungenkrebs, nichtkleinzelligen Lungenkrebs, Magen-Darm-Krebs, Pankreaskrebs, Glioblastom, Zervixkrebs, Eierstockkrebs, Leberkrebs, Blasenkrebs, Hepatom, Brustkrebs, Darmkrebs, kolorektales Karzinom, Endometriumkrebs, Speicheldrüsenkrebs, Nierenkrebs, Leberkrebs, Prostatakrebs, Vulvakrebs, Schilddrüsenkarzinom, Leberkarzinom und verschiedene Typen von Kopf- und Nackenkrebs.

**[0049]** Der Ausdruck „zytotoxisches Mittel“ bezieht sich bei Verwendung hierin auf eine Substanz, die die Funktion von Zellen hemmt oder verhindert und/oder die Zerstörung von Zellen bewirkt. Der Ausdruck umfasst radioaktive Isotope (z.B. I, Y Pr), chemotherapeutische Mittel und Toxine, wie z.B. enzymatisch aktive Toxine bakteriellen, pilzlichen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder Fragmente davon.

**[0050]** Ein „chemotherapeutisches Mittel“ ist eine chemische Verbindung, die bei der Behandlung von Krebs zweckdienlich ist. Beispiele chemotherapeutischer Mittel umfassen Adriamycin, Doxorubicin, 5-Fluoruracil, Cytosinarabinosid („Ara-C“), Cyclophosphamid, Thiopeta, Busulfan, Cytosin, Taxol, Methotrexat, Cisplatin, Melphalan, Vinblastin, Bleomycin, Etoposide, Ifosfamid, Mitomycin C, Mitoxantron, Vincristin, Vinorelbin, Carboplatin, Teniposid, Daunomycin, Carminomycin, Aminopterin, Dactinomycin, Mitomycine, Esperamicine (siehe US-Patent Nr. 4.675.187), Melphalan und andere verwandte Stickstofflosts.

**[0051]** Der Ausdruck „Cytokin“ ist ein allgemeiner Ausdruck für Proteine, die von einer Zellpopulation freigesetzt werden, die auf eine andere Zelle als intrazelluläre Mediatoren wirken. Beispiele derartiger Cytokine sind Lymphokine, Monokine und herkömmliche Polypeptidhormone. Unter den Cytokinen mit umfasst sind Wachstumshormon, wie z.B. menschliches Wachstumshormon, menschliches N-Methionyl-Wachstumshormon und Rinderwachstumshormon; Parathyroidhormon; Thyroxin; Insulin; Proinsulin; Relaxin; Prorelaxin; Glykoprotein-hormone, wie z.B. follikelstimulierendes Hormon (FSH); thyreotropes Hormon (TSH) und luteinisierendes Hormon (LH); Leberwachstumsfaktor; Fibroblastenwachstumsfaktor; Prolactin; Plazentalaktogen; Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und - $\beta$ ; Müllersche Hemmsubstanz; Maus-Gonadotropin-assoziiertes Peptid; Inhibin; Activin; Gefäßendothelwachstumsfaktor; Integrin; Thrombopoietin (TPO); Nervenwachstumsfaktoren, wie z.B. NGF- $\beta$ ; Blutplättchenwachstumsfaktor; transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs), wie z.B. TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ; insulin-artiger Wachstumsfaktor-I und -II; Erythropoietin (EPO); knochenbildende 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-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 Ausdruck Cytokin Proteine aus natürlichen Quellen oder aus rekombinanter Zellkultur und biologisch aktive Entsprechungen der Nativsequenz-Cytokine.

**[0052]** Der Ausdruck „Prodrug“ bezieht sich bei Verwendung in dieser Anmeldung auf eine Vorläufer- oder Derivat-Form einer pharmazeutisch aktiven Substanz, die im Vergleich mit dem Stammarzneimittel weniger zytotoxisch für Tumorzellen und fähig ist, enzymatisch aktiviert oder zur aktiveren Stammform umgesetzt zu werden. Siehe z.B. Wilman, „Prodrugs in Cancer Chemotherapy“, Biochemical Society Transactions 14, S. 375-382, 615<sup>th</sup> Meeting Belfast (1986) und Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (Hrsg.), Humana Press, S. 247-267 (1985). Die Prodrugs dieser Erfindung umfassen, sind jedoch 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, gegebenenfalls substituierte, Phenoxyacet-

amid enthaltende Prodrugs oder gegebenenfalls substituierte, Phenylacetamid enthaltende Prodrugs, 5-Fluorcytosin- und andere 5-Fluoruridin-Prodrugs, die zum aktiveren zytotoxischen freien Arzneimittel umgesetzt werden können. Beispiele zytotoxischer Arzneimittel, die zu einer Prodrug-Form zur Verwendung in dieser Erfindung derivatisiert werden können, umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf die oben beschriebenen Chemotherapeutika.

**[0053]** Der Ausdruck „Marker“ bezieht sich bei Verwendung hierin auf eine nachweisbare Verbindung oder Zusammensetzung, die direkt oder indirekt an den Antikörper konjugiert ist. Der Marker kann selbst nachweisbar sein (z.B. Radioisotopmarker oder Fluoreszenzmarker) oder kann im Falle eines enzymatischen Markers eine chemische Veränderung einer Substratverbindung oder Zusammensetzung katalysieren, die nachweisbar ist.

**[0054]** Unter „feste Phase“ wird eine nichtwässrige Matrix verstanden, an die der Antikörper der vorliegenden Erfindung anhaften kann. Beispiele von hierin vorgesehenen feste Phasen umfassen jene, die teilweise oder völlig aus Glas (z.B. poröses Glas mit definiertem Porendurchmesser), Polysacchariden (z.B. Agarose), Polyacrylamiden, Polystyrol, Polyvinylalkohol und Silikonen gebildet werden. In manchen Ausführungsformen kann die feste Phase in Abhängigkeit von Zusammenhang den Napf einer Testplatte umfassen; in anderen ist sie eine Reinigungssäule (z.B. eine Affinitätschromatographiesäule). Dieser Ausdruck umfasst außerdem eine diskontinuierliche feste Phase getrennter Teilchen, wie z.B. jene im US-Patent Nr. 4.275.149 beschriebenen.

**[0055]** Ein „Liposom“ ist ein kleines Vesikel, das aus verschiedenen Lipidtypen, Phospholipiden und/oder Tensiden zusammengesetzt ist, das zur Abgabe eines Arzneimittels (wie z.B. der hierin offenbarten Anti-ErbB3-Antikörper und, gegebenenfalls, eines chemotherapeutischen Mittels) an ein Säugetier zweckdienlich ist. Die Komponenten des Liposoms sind üblicherweise ähnlich der Lipidanordnung biologischer Membranen in einer Doppelschicht angeordnet.

**[0056]** Ein „isoliertes“ Nucleinsäuremolekül ist ein Nucleinsäuremolekül, das identifiziert und von zumindest einem verunreinigenden Nucleinsäuremolekül abgetrennt ist, mit dem es für gewöhnlich in der natürlichen Quelle der Nucleinsäure assoziiert ist. Ein isoliertes Nucleinsäuremolekül liegt nicht in der Form oder in dem Milieu vor, in der/dem es sich in der Natur findet. Isolierte Nucleinsäuremoleküle unterscheiden sich daher vom Nucleinsäuremolekül, wie es in natürlichen Zellen existiert. Jedoch umfasst ein isoliertes Nucleinsäuremolekül ein Nucleinsäuremolekül, das in Zellen enthalten ist, die für gewöhnlich den Antikörper exprimieren, wo beispielsweise das Nucleinsäuremolekül sich an einer Chromosomenstelle befindet, die sich von der natürlicher Zellen unterscheidet.

**[0057]** Der Ausdruck „Kontrollsequenzen“ bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die zur Expression einer operabel gebundenen kodierenden Sequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus notwendig sind. Die Kontrollsequenzen, die beispielsweise für Prokaryoten zweckdienlich sind, umfassen einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz, eine Ribosombindungsstelle. Eukaryotische Zellen setzen bekannterweise Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer ein.

**[0058]** Eine Nucleinsäure ist „operabel gebunden“, wenn sie in eine funktionelle Beziehung zu einer anderen Nucleinsäuresequenz gesetzt wird. Beispielsweise ist DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader operabel an DNA für ein Polypeptid gebunden, wenn sie als Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids beteiligt ist; ein Promotor oder Enhancer ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosombindungsstelle ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie die Translation erleichtert. Im Allgemeinen bedeutet „operabel gebunden“, dass die gebundenen DNA-Sequenzen zusammenhängend sind und im Falle eines Sekretionsleaders zusammenhängend sind und sich in Lesephase befinden. Jedoch müssen Enhancer nicht zusammenhängend sein. Die Bindung wird durch Ligation an zweckdienlichen Restriktionsstellen erzielt. Falls derartige Stellen nicht existieren, werden die synthetischen Oligonucleotidadaptoren oder Linker gemäß herkömmlicher Praxis verwendet.

**[0059]** „Zelle“, „Zelllinie“ und „Zellkultur“ werden bei Verwendung hierin austauschbar gebraucht, und alle derartige Bezeichnungen umfassen auch die Nachkommen. Folglich umfassen Ausdrücke wie „Transformanten“ und „transformierte Zellen“ die primäre gegenständliche Zelle und davon hergeleitete Kulturen ohne Rücksicht auf die Anzahl der Transfers. Es versteht sich außerdem, dass nicht alle Nachkommen hinsichtlich DNA-Gehalt absolut identisch sein müssen, und zwar aufgrund gezielter oder zufälliger Mutationen. Mutierte Nachkommen, die dieselbe Funktion oder biologische Aktivität wie jene aufweisen, auf die in der ursprünglich transformierten Zelle gescreent worden ist, sind mit umfasst. Wo unterschiedliche Bezeichnungen beabsichtigt sind, werden

sie aus dem Zusammenhang klar sein.

## II. Arten der Durchführung der Erfindung

### A. Antikörperherstellung

**[0060]** Es folgt eine Beschreibung beispielhafter Techniken für die Produktion der beanspruchten Antikörper.

#### (i) Polyklonale Antikörper

**[0061]** Polyklonale Antikörper werden im Allgemeinen in Tieren durch mehrere subkutane (sc) oder intraperitoneale (ip) Injektionen des maßgeblichen Antigens und eines Adjuvans hergestellt. Es kann zweckdienlich sein, das maßgebliche Antigen an ein Protein zu konjugieren, das in der zu immunisierenden Spezies immunogen ist, z.B. an Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthroglobulin oder Sojabohnentrypsin-Inhibitor unter Verwendung eines bifunktionellen oder derivatisierenden Mittels, beispielsweise Maleimidobenzoylsulfosuccinimidester (Konjugation über Cysteinreste), N-Hydroxysuccinimid (über Lysinreste), Glutaraldehyd, Bernsteinsäureanhydrid,  $\text{SOCl}_2$  oder  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , wobei R und  $\text{R}^1$  unterschiedliche Alkylgruppen sind.

**[0062]** Tiere werden gegen das Antigen, immunogene Konjugate oder Derivate immunisiert, indem z.B. 100  $\mu\text{g}$  oder 5  $\mu\text{g}$  des Proteins oder Konjugats (für Kaninchen bzw. Mäuse) mit 3 Volumina Freund'schem kompletten Adjuvans vermischt und die Lösung intradermal an mehreren Stellen injiziert wird. Einen Monat später werden die Tiere mit 1/5 bis 1/10 der ursprünglichen Peptid- oder Konjugatmenge in Freund'schem kompletten Adjuvans durch subkutane Injektion an mehreren Stellen geboostet. Sieben bis 14 Tage später wird den Tieren Blut abgenommen und das Serum auf Antikörpertiter getestet. Die Tiere werden geboostet, bis der Titer sein Plateau erreicht hat. Vorzugsweise wird das Tier mit dem Konjugat desselben Antigens geboostet, das jedoch an ein anderes Protein und/oder durch ein anderes Vernetzungsmittel konjugiert ist. Konjugate können außerdem in rekombinanter Zellkultur als Fusionsproteine produziert werden. Außerdem werden Aggregationsmittel, wie z.B. Alaun, in geeigneter Weise verwendet, um die Immunantwort zu verstärken.

#### (ii) Monoklonale Antikörper

**[0063]** Monoklonale Antikörper werden aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen, d.h., die die Population umfassenden einzelnen Antikörper sind identisch mit Ausnahme möglicher natürlicher vorkommender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können. Folglich kennzeichnet der Modifikator „monoklonal“ den Charakter des Antikörpers dahingehend, dass er nicht eine Mischung unterschiedlicher Antikörper ist.

**[0064]** Beispielsweise können die monoklonalen Antikörper unter Verwendung des erstmals von Kohler et al., Nature 256, 495 (1975) beschriebenen Hybridomverfahrens produziert werden oder können mittels DNA-Rekombinationsverfahren produziert werden (US-Patent Nr. 4.816.567).

**[0065]** Beim Hybridomverfahren wird eine Maus oder ein anderes geeignetes Wirtstier, wie z.B. ein Hamster wie hierin oben beschrieben immunisiert, um Lymphozyten anzuregen, die Antikörper produzieren oder zur Produktion von Antikörpern fähig sind, die spezifisch an das zur Immunisierung verwendete Protein binden. Alternativ dazu können Lymphozyten in vitro immunisiert werden. Die Lymphozyten werden dann unter Verwendung eines geeigneten Fusionierungsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, mit Myelomzellen fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, S. 59-103 (1986)).

**[0066]** Die so hergestellten Hybridomzellen werden in ein geeignetes Kulturmedium geimpft und gezüchtet, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht fusionierten Stamm-Myelomzellen hemmen. Wenn den Stamm-Myelomzellen beispielsweise das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, wird das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) umfassen, wobei diese Substanzen das Wachstum HGPRT-defizienter Zellen verhindert.

**[0067]** Bevorzugte Myelomzellen sind jene, die effizient fusionieren, eine stabile Antikörperproduktion durch die selektierten Antikörper-produzierenden Zellen erhalten und gegen ein Medium, wie z.B. das HAT-Medium empfindlich sind. Unter diesen bevorzugten Myelom-Zelllinien sind Maus-Myelom-Linien, wie z.B. jene, die

sich von MOPC-21- und MPC-11-Maus-Tumoren herleiten, die von Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, USA erhältlich sind, sowie SP-2- oder X63-Ag8-653-Zellen, die von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA erhältlich sind. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelom-Zelllinien sind zur Produktion menschlicher monoklonaler Antikörper ebenfalls beschrieben worden (Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker Inc., New York, S. 51-63 (1987)).

**[0068]** Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen wachsen, wird auf Produktion von gegen das Antigen gerichteten monoklonalen Antikörpern getestet. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität der von Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörper mittels Immunpräzipitation oder mit einem In-vitro-Bindungstest, wie z.B. dem Radioimmuntest (RIA) oder Enzyme-linked-immunoabsorbent-assay (ELISA) bestimmt.

**[0069]** Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise mittels Scatchard-Analyse von Munson et al., *Anal. Biochem.* 107, 220 (1980) bestimmt werden.

**[0070]** Nach der Identifizierung von Hybridomzellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität, Affinität und/oder Aktivität produzieren, können die Klone mittels Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels Standardverfahren gezüchtet werden (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, S. 59-103 (1986)). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise DMEM- oder RPMI-1640-Medium. Außerdem können die Hybridomzellen in vivo als Aszites-Tumore in einem Tier gezüchtet werden.

**[0071]** Die von den Subklonen sekretierten monoklonalen Antikörper werden in geeigneter Weise vom Kulturmedium, Serum oder von der Aszitesflüssigkeit getrennt, und zwar durch herkömmliche Immunglobulin-Reinigungsverfahren, wie z.B. Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatit-Chromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie.

**[0072]** Für die monoklonalen Antikörper kodierende DNA kann unter Anwendung herkömmlicher Verfahren (z.B. durch Verwendung von Oligonucleotidsonden, die zur spezifischen Bindung an Gene fähig sind, die für die Schwer- und Leichtketten von murinen Antikörper kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Die Hybridomzellen dienen als eine bevorzugte Quelle derartiger DNA. Wenn sie einmal isoliert ist, kann die DNA in Expressionsvektoren gesetzt werden, die dann in Wirtszellen, wie z.B. E.coli-Zellen, Simian-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO-)Zellen oder Myelomzellen transfiziert werden, die ansonsten keine Immunglobulin produzieren, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erlangen. Überblicksartikel zur rekombinanten Expression von für den Antikörper kodierender DNA in Bakterien umfassen Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.* 5, 256-262 (1993) und Plückthun, *Immunol. Revs.* 130, 151-188 (1992).

**[0073]** Antikörper oder Antikörperfragmente können aus Antikörper-Phagenbibliotheken unter Anwendung der in McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990) beschriebenen Techniken erzeugt werden. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) und Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991) beschreiben die Isolierung muriner bzw. menschlicher Antikörper unter Verwendung von Phagenbibliotheken. Spätere Veröffentlichungen beschreiben die Herstellung hochaffiner (nM-Bereich) menschlicher Antikörper durch „Chain-Shuffling“ (Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)), sowie kombinatorische Infektion und In-vivo-Rekombination als Strategie zur Konstruktion sehr großer Phagenbibliotheken (Waterhouse et al., *Nuc. Acids Res.* 21, 2265-2266 (1993)). Daher sind diese Techniken brauchbare Alternativen zu herkömmlichen monoklonalen Antikörperhybridomtechniken zur Isolierung monoklonaler Antikörper.

**[0074]** Die DNA kann außerdem modifiziert werden, beispielsweise durch Substituieren der kodierenden Sequenz für menschliche konstante Schwer- und Leichtkettendomänen anstelle der homologen murinen Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851 (1984)) oder durch kovalentes Verbinden der gesamten oder eines Abschnitts der kodierenden Sequenz für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid an die für Immunglobulin kodierende Sequenz.

**[0075]** Typischerweise werden die konstanten Domänen eines Antikörpers durch derartige Nicht-Immunglobulin-Polypeptide substituiert, oder es werden die variablen Domänen einer der Antigen-kombinierenden Stellen eines Antikörpers substituiert, um einen chimären bivalenten Hybridantikörper zu erzeugen, der eine Antigen-kombinierende Stelle mit Spezifität für ein Antigen und eine weitere Antigen-kombinierende Stelle mit Spezifität für ein anderes Antigen umfasst.

## (iii) Humanisierte und menschliche Antikörper

**[0076]** Verfahren zur Humanisierung nichtmenschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die in ihn aus einer Quelle eingeführt worden sind, die nicht menschlich ist. Diese nichtmenschlichen Aminosäurereste werden häufig als „Import“-Reste bezeichnet, die typischerweise einer variablen „Import“-Domäne entnommen sind. Die Humanisierung kann im Wesentlichen nach den Verfahren von Winter und Mitarbeitern durchgeführt werden (Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332, 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988)), indem die entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durch Nager-CDRs oder CDR-Sequenzen ersetzt werden. Demgemäß sind derartige „humanisierte“ Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nichtmenschlichen Spezies ersetzt worden ist. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in denen manche CDR-Reste und möglicherweise manche FR-Reste durch Reste aus analogen Stellen in Nager-Antikörpern ersetzt sind.

**[0077]** Die Auswahl menschlicher variabler Domänen, sowohl schwerer als auch leichter Domänen, die bei der Herstellung der humanisierten Antikörper zu verwenden sind, ist zur Verringerung der Antigenität sehr wichtig. Nach dem so genannten „Best-fit“-Verfahren wird die Sequenz der variablen Domäne eines Nagerantikörpers gegen die gesamte Bibliothek bekannter menschlicher Sequenzen variabler Domänen gescreent. Jene menschliche Sequenz, die jener des Nagers am nächsten kommt, wird dann als das menschliche Gerüst (FR) für den humanisierten Antikörper akzeptiert (Sims et al., *J. Immunol.* 151, 2296 (1993); Chothia und Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987)). Ein weiteres Verfahren verwendet ein bestimmtes Gerüst, das sich von der Konsensussequenz aller menschlichen Antikörper einer bestimmten Untergruppe von Leicht- oder Schwerketten herleitet. 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)).

**[0078]** Es ist ferner wichtig, dass Antikörper mit Erhaltung hoher Affinität für das Antigen und anderer vorteilhafter biologischer Eigenschaften humanisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden humanisierte Antikörper nach einem bevorzugten Verfahren durch einen Prozess der Analyse der Stammsequenzen und der verschiedenen konzeptionellen humanisierten Produkte unter Verwendung dreidimensionaler Modelle der Stamm- und von humanisierten Sequenzen hergestellt. Dreidimensionale Immunglobulinmodelle sind allgemein verfügbar und dem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung geläufig. Es sind Computerprogramme verfügbar, die mögliche dreidimensionale Konformationsstrukturen gewählter Kandidat-Immunglobulinsequenzen illustrieren und darstellen. Die Prüfung dieser Darstellungen ermöglicht die Analyse der wahrscheinlichen Rolle der Reste bei der Funktion der Kandidaten-Immunglobulinsequenz, d.h., die Analyse von Resten, die die Fähigkeit des Kandidaten-Immunglobulins beeinflussen, sein Antigen zu binden. Auf diese Weise können FR-Reste aus den Empfänger- und Importsequenzen gewählt und kombiniert werden, so dass die gewünschte Antikörpereigenschaft, wie z.B. erhöhte Affinität für das/die Target-Antigen(e) erzielt wird. Im Allgemeinen sind die CDR-Reste direkt und sehr wesentlich an der Beeinflussung der Antigenbindung beteiligt.

**[0079]** Alternativ dazu ist es nunmehr möglich, transgene Tiere (z.B. Mäuse) zu erzeugen, die fähig sind, bei Immunisierung ein vollständiges Repertoire menschlicher Antikörper in Abwesenheit endogener Immunglobulinproduktion zu produzieren. Beispielsweise ist beschrieben worden, dass die homozygote Deletion des Antikörper-Schwerketten-Bindungsregion-(J<sub>H</sub>-)Gens bei chimären und Keimbahn-mutierten Mäusen zur vollständigen Hemmung endogener Antikörperproduktion führt. Der Transfer des menschlichen Keimbahn-Immunglobulin-Gen-Arrays in derartige Keimbahn-mutierte Mäuse resultiert bei Antigen-Exposition in der Produktion menschlicher Antikörper. Siehe z.B. Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362, 255-258 (1993); Bruggerman et al., *Year in Immunol.* 7, 33 (1993). Menschliche Antikörper können auch aus Phagen-Display-Bibliotheken hergeleitet werden (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991)).

## (iv) Antikörperfragmente

**[0080]** Es sind verschiedene Techniken zur Produktion von Antikörperfragmenten entwickelt worden. Herkömmlicherweise stammten diese Fragmente aus dem proteolytischen Verdau intakter Antikörper (siehe z.B. Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24, 107-117 (1992) und Brennan et al., *Science* 229, 81 (1985)). Jedoch können diese Fragmente nunmehr direkt durch rekombinante Wirtszellen produziert werden. Beispielsweise können Antikörperfragmente aus den oben erörterten Phagen-Bibliotheken isoliert werden. Alternativ dazu können Fab'-SH-Fragmente direkt aus *E. coli* gewonnen und chemisch gekup-

pelt werden, um  $F(ab')_2$ -Fragmente zu bilden (Carter et al., Bio/Technology 10, 163-167 (1992)). Nach einem anderen Ansatz können  $F(ab')_2$ -Fragmente direkt aus rekombinanter Wirtszellkultur isoliert werden. Andere Techniken zur Produktion von Antikörperfragmenten werden dem geübten Fachmann offensichtlich sein.

(v) Bispezifische Antikörper

**[0081]** Bispezifische Antikörper sind Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Epitope aufweisen. Beispielhafte bispezifische Antikörper können zwei verschiedene Epitope des ErbB3-Proteins binden. Andere derartige Antikörper können eine ErbB3-Bindungsstelle mit (einer) Bindungsstelle(n) für EGFR, ErbB2 und/oder ErbB4 vereinen. Alternativ dazu kann ein Antu-ErbB3-Arm mit einem Arm kombiniert werden, der an ein auslösendes Molekül an einem Leukozyten bindet, wie z.B. an ein T-Zellen-Rezeptormolekül (z.B. CD2 oder CD3), oder an Fc-Rezeptoren für IgG (FcγR), wie z.B. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), so dass zelluläre Verteidigungsmechanismen auf die ErbB3 exprimierende Zelle fokussiert werden. Bispezifische Antikörper können außerdem verwendet werden, um zytotoxische Mittel Zellen zuzuführen, die das Antigen exprimieren. Diese Antikörper besitzen einen ErbB3 bindenden Arm und einen Arm, der das zytotoxische Mittel (z.B. Saporin, Anti-Interferon-γ, Vinca-Alkaloid, Ricin A-Kette, Methotrexat oder Radioaktivisotop-Hapten) bindet. Bispezifische Antikörper können als Antikörper voller Länge oder als Antikörperfragmente (z.B. bispezifische  $F(ab')_2$ -Antikörper) hergestellt werden.

**[0082]** Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Die herkömmliche Produktion bispezifischer Antikörper voller Länge basiert auf der Coexpression von zwei Immunglobulin-Schwerketten-Leichtketten-Paaren, wobei die beiden Ketten verschiedene Spezifitäten aufweisen (Milstein et al., Nature 305, 537-539 (1983)). Aufgrund der zufälligen Auswahl von Immunglobulin-Schwer- und -Leichtketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein mögliches Gemisch aus 10 verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die korrekte bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des korrekten Moleküls, die üblicherweise mittels Affinitätschromatographieschritten durchgeführt wird, ist eher mühsam und die Produktausbeuten sind niedrig. Ähnliche Verfahren sind in WO 93/08829 und in Trauncker et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991) offenbart.

**[0083]** Nach einem anderen Ansatz werden variable Antikörperdomänen mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-kombinierenden Stellen) an Immunglobulinsequenzen konstanter Domänen fusioniert. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit einer konstanten Immunglobulin-Schwerkettendomäne, die zumindest einen Abschnitt der Gelenk-, CH2- und CH3-Regionen umfasst. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerkettenregion (CH1), die die zur Leichtkettenbindung erforderliche Stelle enthält, in zumindest einer der Fusionen vorliegt. Für die Immunglobulin-Schwerkettenfusionen und, falls gewünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette kodierende DNAs werden in gesonderte Expressionsvektoren inseriert und in einen geeigneten Wirtsorganismus cotransfiziert. Dies sorgt für eine höhere Flexibilität bei der Einstellung der wechselseitigen Anteile der drei Polypeptidfragmente, wenn ungleiche Verhältnisse der drei bei der Konstruktion verwendeten Polypeptidketten die optimalen Ausbeuten liefern. Es ist jedoch möglich, die kodierenden Sequenzen für zwei oder alle drei Polypeptidketten in einen Expressionsvektor zu inserieren, wenn die Expression von zumindest zwei Polypeptidketten im gleichen Verhältnis zu höheren Ausbeuten führt oder wenn die Verhältnisse von keiner besonderen Bedeutung sind.

**[0084]** Die bispezifischen Antikörper können aus einer Hybrid-Immunglobulin-Schwerkette mit einer ersten Bindungsspezifität in einem Arm und einem Hybrid-Immunglobulin-Schwerketten-Leichtketten-Paar (das die zweite Bindungsspezifität bereitstellt) im anderen Arm zusammengesetzt sein. Es wurde gefunden, dass diese asymmetrische Struktur die Trennung der gewünschten bispezifischen Verbindung von unerwünschten Immunglobulin-Kettenkombinationen erleichtert, da die Gegenwart einer Immunglobulin-Leichtkette in nur einer Hälfte des bispezifischen Moleküls einen einfachen Weg der Trennung bereitstellt. Dieser Ansatz ist in WO 94/04690 offenbart. Für weitere Einzelheiten der Erzeugung bispezifischer Antikörper siehe beispielsweise Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

**[0085]** Gemäß einem anderen Ansatz kann die Schnittstelle zwischen einem Paar von Antikörpermolekülen so konstruiert werden, dass der prozentuelle Anteil der aus rekombinanter Zellkultur gewonnenen Heterodimere maximal ist. Die bevorzugte Schnittstelle umfasst zumindest einen Abschnitt der  $C_{\mu}3$ -Domäne einer konstanten Antikörperdomäne. Bei diesem Verfahren werden eine oder mehrere kleine Aminosäureseitenketten aus der Schnittstelle des ersten Antikörpermoleküls durch größere Seitenketten (z.B. Tyrosin oder Tryptophan) ersetzt. Ausgleichende „Hohlräume“ derselben oder ähnlicher Größe wie die große(n) Seitenkette(n) werden an der Schnittstelle des zweiten Antikörpermoleküls durch Ersetzen großer Aminosäureseitenketten durch kleinere (z.B. Alanin oder Threonin) erzeugt. Dies stellt einen Mechanismus zur Erhöhung der Ausbeute an Hete-

rodimer gegenüber anderen unerwünschten Endprodukten, wie z.B. Homodimeren bereit.

**[0086]** Bispezifische Antikörper umfassen vernetzte oder „Heterokonjugat“-Antikörper. Beispielsweise kann einer der Antikörper im Heterokonjugat an Avidin, der andere an Biotin gekuppelt werden. Derartige Antikörper sind beispielsweise zum Targeting von Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen (US-Patent Nr. 4.676.980) und zur Behandlung von HIV-Infektion (WO 91/00360, WO 92/200373 und EP 03089) vorgeschlagen worden. Heterokonjugat-Antikörper können mit beliebigen zweckdienlichen Vernetzungsverfahren hergestellt werden. Geeignete Vernetzungsmittel sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt und im US-Patent Nr. 4.676.980 gemeinsam mit einer Reihe von Vernetzungstechniken offenbart.

**[0087]** Techniken zur Erzeugung bispezifischer Antikörper aus Antikörperfragmenten sind in der Literatur ebenfalls beschrieben worden. Beispielsweise können bispezifische Antikörper unter Verwendung chemischer Bindungen hergestellt werden. Brennan et al., *Science* 229, 81 (1985) beschreiben ein Verfahren, worin intakte Antikörper proteolytisch gespalten werden, um  $F(ab')_2$ -Fragmente zu erzeugen. Diese Fragmente werden in Gegenwart des Dithiol-Komplexierungsmittels Natriumarsenit reduziert, um vizinale Dithiole zu stabilisieren und intermolekulare Disulfidbildung zu verhindern. Die erzeugten  $F(ab')_2$ -Fragmente werden dann zu Thionitrobenzoesäure-(TNB-)Derivaten umgesetzt. Eines der  $Fab'$ -TNB-Derivate wird dann mittels Reduktion mit Mercaptoethylamin zurück zum  $Fab'$ -Thiol umgesetzt und mit einer äquimolaren Menge des anderen  $Fab'$ -TNB-Derivats vermischt, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Die hergestellten bispezifischen Antikörper können als Mittel zur selektiven Immobilisierung von Enzymen verwendet werden.

**[0088]** Neuliche Fortschritte haben die direkte Gewinnung von  $Fab'$ -SH-Fragmenten aus *E. coli* erleichtert, die chemisch gekuppelt werden können, um bispezifische Antikörper zu bilden. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217-225 (1992) beschreiben die Produktion eines vollständig humanisierten bispezifischen Antikörper- $F(ab')_2$ -Moleküls. Jedes  $Fab'$ -Fragment wurde gesondert in *E. coli* sekretiert und direkter chemischer Kupplung *in vitro* unterzogen, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Der so gebildete bispezifische Antikörper war fähig, an HER2-Rezeptor überexprimierende Zellen und normale menschliche T-Zellen zu binden, sowie die lytische Aktivität menschlicher zytotoxischer Lymphozyten gegen menschliche Brusttumor-Targets auszulösen.

**[0089]** Verschiedene Techniken zur Herstellung und Isolierung bispezifischer Antikörperfragmente direkt aus rekombinanter Zellkultur sind ebenfalls beschrieben worden. Beispielsweise sind bispezifische Antikörper unter Verwendung von Leucin-Zippern produziert worden. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5), 1547-1553 (1992). Die Leucin-Zipper-Peptide aus den Fos- und Jun-Proteinen wurden an die  $Fab'$ -Abschnitte von zwei verschiedenen Antikörpern mittels Genfusion verbunden. Die Antikörper-Homodimere wurden an der Gelenkregion reduziert, um Monomere zu bilden, und dann wieder oxidiert, um die Antikörper-Heterodimere zu bilden. Dieses Verfahren kann zur Produktion von Antikörper-Homodimeren eingesetzt werden. Die von Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448 (1993) beschriebene „Diabody“-Technologie hat einen alternativen Mechanismus zur Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente bereitgestellt. Diese Fragmente umfassen eine variable Schwereketten-Domäne ( $V_H$ ), die mit einer variablen Leichtketten-Domäne ( $V_L$ ) durch einen Linker verbunden ist, der zu kurz ist, um die Paarung zwischen den beiden Domänen an derselben Kette zu erlauben. Demgemäß sind die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen aus einem Fragment gezwungen, sich mit den komplementären  $V_L$ - und  $V_H$ -Domänen des anderen Fragments zu paaren, wodurch zwei Antigenbindungsstellen gebildet werden. Eine weitere Strategie zur Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente durch Verwendung von Einzelketten-Fv-(sFv-)Dimeren ist ebenfalls beschrieben worden. Siehe Gruber et al., *J. Immunol.* 152, 5368 (1994).

**[0090]** Antikörper mit mehr als zwei Valenzen sind vorgesehen. Beispielsweise können trispezifische Antikörper hergestellt werden. Tutt et al., *J. Immunol.* 147, 60 (1991).

(vi) Screening auf Antikörper mit gewünschten Eigenschaften

**[0091]** Techniken zur Erzeugung von Antikörpern sind oben beschrieben worden. Es werden jene Antikörper ausgewählt, die die hierin beschriebenen Eigenschaften aufweisen.

**[0092]** Um auf Antikörper zu selektieren, die die durch HRG induzierte Bindung des ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes verringern, können Zellen, die beide dieser Rezeptoren exprimieren (z.B. Caov3-Zellen) mit Puffer (Kontrolle) oder Antikörper vorbehandelt und dann mit HRG oder Kontrollpuffer behandelt werden. Die Zellen werden dann lysiert, und die rohen Lysate können zentrifugiert werden, um unlösliches Material zu entfernen. Überstände können mit einem für ErbB2 spezifischen Antikörper inkubiert werden, der kovalent an eine feste Phase gebunden ist. Nach dem Waschen können die Immunpräzipitate mittels SDS-PAGE getrennt werden.

Western-Blots der Gele werden dann mit Anti-ErbB3-Antikörper sondiert. Nach Sichtbarmachung können die Blots gestrippt und mit einem Anti-ErbB2-Antikörper neu sondiert werden. Eine Reflexions-Scanning-Densitometrie des Gels kann durchgeführt werden, um die Wirkung des fraglichen Antikörpers auf die durch HRG induzierte Bildung des Komplexes zu quantifizieren. Jene Antikörper, die die Bildung des ErbB2-ErbB3-Komplexes im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) verringern, können ausgewählt werden. Siehe unten stehende Beispiele.

**[0093]** Um auf jene Antikörper zu selektieren, die die durch HRG induzierte ErbB2-Aktivierung in einer denn ErbB2- und ErbB3-Rezeptor exprimierenden Zelle verringern, können die Zellen mit Puffer (Kontrolle) oder Antikörper vorinkubiert und dann mit HRG oder Kontrollpuffer behandelt werden. Die Zellen werden dann lysiert und die rohen Lysate können zentrifugiert werden, um unlösliches Material zu entfernen. ErbB2-Aktivierung kann mittels Western-Blotting, gefolgt vom Sondieren mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper wie in den unten stehenden Beispielen beschrieben bestimmt werden. Die ErbB2-Aktivierung kann beispielsweise über Reflexions-Scanning-Densitometrie der Gele quantifiziert werden. Alternativ dazu kann der in WO 95/14930 und Sadick et al., *Analytical Biochemistry* 235, 207-214 (1996) beschriebene Kinaserzeptor-Aktivierungstest verwendet werden, um die ErbB2-Aktivierung zu bestimmen.

**[0094]** Die Wirkung des Antikörpers auf die Bindung von HRG an ErbB3 kann ermittelt werden, indem die diesen Rezeptor exprimierenden Zellen (z.B. zur Expression von ErbB3 transfizierte 4E9H3-Zellen) mit radiomarkiertem HRG (z.B. die EGF-ähnliche Domäne davon) in Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart des Anti-ErbB3-Antikörpers beispielsweise wie im unten stehenden Beispiel beschrieben inkubiert werden. Jene Antikörper, die die Bindungsaffinität von HRG für den ErbB3-Rezeptor erhöhen, können für die weitere Entwicklung ausgewählt werden. Wo der Antikörper der Wahl einer ist, der die Bindung von HRG an ErbB3 blockiert, können jene Antikörper, die dies tun, in diesem Test identifiziert werden.

**[0095]** Um auf Antikörper zu screenen, die an das Epitop am ErbB3 binden, das von einem Antikörper von Interesse (z.B. jenen, die die Bindung des 3-8B8-Antikörpers an ErbB3 blockieren) gebunden wird, kann ein routinemäßiger „Cross-Blocking“-Test durchgeführt werden, wie z.B. jener, der in „Antibodies, A Laboratory Manual“, Harlow und David Lane (HRSG.), Cold Spring Harbor Laboratory (1988) beschrieben ist.

#### (vii) Konstruktion von Effektorfunktionen

**[0096]** Es kann wünschenswert sein, den Antikörper der Erfindung bezüglich Effektorfunktion zu modifizieren, so dass beispielsweise die Wirksamkeit des Antikörpers zur Krebsbehandlung erhöht wird. Zum Beispiel kann/können (ein) Cysteinrest(e) in die Fc-Region eingeführt werden, wodurch die Zwischenketten-Disulfidbildung in dieser Region ermöglicht wird. Der so erzeugte homodimere Antikörper kann eine verbesserte Internalisierungsfähigkeit und/oder erhöhte komplementvermittelte Zellabtötung und antikörperabhängige Zelltoxizität (ADCC) aufweisen. Siehe Caron et al., *J. Exp. Med.* 176, 1191-1195 (1992) und B. Shopes, *J. Immunol.* 148, 2918-2922 (1992). Homodimere Antikörper mit erhöhter Antitumoraktivität können außerdem unter Verwendung von heterobifunktionellen Vernetzern wie in Wolff et al., *Cancer Research* 53, 2560-2565 (1993) beschrieben hergestellt werden. Alternativ dazu kann ein Antikörper konstruiert werden, der doppelte Fc-Regionen aufweist und dadurch verstärkte Komplementlyse- und ADCC-Fähigkeiten aufweisen könnte. Siehe Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3, 219-230 (1989).

#### (viii) Immunokonjugate

**[0097]** Den Antikörper der Erfindung umfassende Immunokonjugate, die an ein zytotoxisches Mittel, wie z.B. ein chemotherapeutisches Mittel, Toxin (z.B. ein enzymatisch aktives Toxin bakteriellen, pilzlichen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder Fragmente davon) oder radioaktives Isotop (d.i. ein Radiokonjugat) konjugiert sind, sind vorgesehen.

**[0098]** Zur Erzeugung derartiger Immunokonjugate zweckdienliche chemotherapeutische Mittel sind oben beschrieben worden. Enzymatisch aktive Toxine und Fragmente davon, die verwendet werden können, umfassen Diphtherie A-Kette, nichtbindende aktive Fragmente von Diphtherie-Toxin, Exotoxin-A-Kette (aus *Pseudomonas aeruginosa*), Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette,  $\alpha$ -Sarcin, Aleurites-fordii-Proteine, Dianthin-Proteine, *Phytolaca-americana*-Proteine (PAPI, PAPII und PAP-S), *Momordica-charantia*-Inhibitor, Curcin, Crocin, *Sapaonaria-officinalis*-Inhibitor, Gelonin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Tricothecene. Eine Vielzahl von Radionukliden ist zur Herstellung radiokonjugierter Anti-ErbB3-Antikörper verfügbar. Beispiele umfassen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{186}\text{Re}$ .

**[0099]** Konjugate des Antikörpers und zytotoxischen Mittels können unter Verwendung einer Vielzahl bifunktionaler Proteinkupplungsmittel hergestellt werden, wie z.B. unter Verwendung von N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP), Iminothiolan (IT), bifunktionalen Derivaten von Imidoestern (wie z.B. Dimethyladipimidat-HCl), aktiven Estern (wie z.B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyden (wie z.B. Glutaraldehyd), Bis-Azido-Verbindungen (wie z.B. Bis-(p-Azidobenzoyl)hexandiamin), Bis-Diazonium-Derivaten (wie z.B. Bis-(p-Diazoniumbenzoyl)-ethylendiamin), Diisocyanaten (wie z.B. Tolylen-2,6-diisocyanat und Bis-aktiven Fluorverbindungen (wie z.B. 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol). Beispielsweise kann ein Ricin-Immunotoxin wie in Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987) beschrieben hergestellt werden. Kohlenstoff-14-markierte 1-Isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylen-triamin-pentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein beispielhafter Chelatbildner für die Konjugation von Radionucleotid an den Antikörper. Siehe WO 94/11026.

**[0100]** Der Antikörper kann an einen „Rezeptor“ (wie z.B. Streptavidin) zum Einsatz im Tumor-Prä-Targeting konjugiert werden, worin das Antikörper-Rezeptor-Konjugat dem Patienten verabreicht wird, gefolgt von der Entfernung des ungebundenen Konjugats aus dem Kreislauf unter Verwendung eines Clearing-Mittels und anschließender Verabreichung eines „Liganden“ (z.B. Avidin), der an ein zytotoxisches Mittel (z.B. ein Radionucleotid) konjugiert ist.

#### (ix) Immunoliposomen

**[0101]** Die hierin offenbarten Anti-ErbB3-Antikörper können auch als Immunoliposomen formuliert werden. Den Antikörper enthaltende Liposomen werden mittels Verfahren hergestellt, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, wie sie z.B. in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030 (1980); und US-Patenten Nr. 4.485.045 und 4.544.545 beschrieben sind. Liposomen mit erhöhter Zirkulationszeit sind im US-Patent Nr. 5.013.556 offenbart.

**[0102]** Insbesondere zweckdienliche Liposomen können mit dem Umkehrphasen-Verdampfungsverfahren mit einer Lipidzusammensetzung erzeugt werden, die Phosphatidylcholin, Cholesterin und PEG-derivatisiertes Phosphatidylethanolamin (PEG-PE) umfasst. Liposomen werden durch Filter definierter Porengröße extrudiert, um Liposomen mit dem gewünschten Durchmesser zu liefern. Fab'-Fragmente des Antikörpers der vorliegenden Erfindung können wie in Martin et al., J. Biol. Chem. 257, 286-288 (1982), beschrieben über eine Disulfid-Austauschreaktion an die Liposomen konjugiert werden. Ein Chemotherapeutikum (z.B. Doxorubicin) ist gegebenenfalls im Liposom enthalten. Siehe Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)484 (1989).

#### (x) Antikörperabhängige enzymvermittelte Prodrug-Therapie (ADEPT)

**[0103]** Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch in der ADEPT verwendet werden, und zwar durch Konjugieren des Antikörpers an ein Prodrug-aktivierendes Enzym, das ein Prodrug (z.B. ein Peptidyl-Chemotherapeutikum, vgl. WO 81/01145) zu einem aktiven Antikrebs-Arzneimittel umsetzt. Siehe beispielsweise WO 88/07378 und US-Patent Nr. 4.975.278.

**[0104]** Die Enzymkomponente des für ADEPT zweckdienlichen Immunokonjugats umfasst jegliches Enzym, das zur Wirkung an einem Prodrug in der Weise fähig ist, dass es dieses zu seiner aktiveren, zytotoxischen Form umsetzt.

**[0105]** Im Verfahren zweckdienliche Enzyme umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf alkalische Phosphatase, die zur Umsetzung von Phosphat-enthaltenden Prodrugs zu freien Arzneimitteln zweckdienlich ist; Arylsulfatase, die zur Umsetzung von Sulfat-enthaltenden Prodrugs zu freien Arzneimitteln zweckdienlich ist; Cytosin-Deaminase, die zur Umsetzung von nichttoxischem 5-Fluorcytosin zum Antikrebs-Arzneimittel, 5-Fluoruracil, zweckdienlich ist; Proteasen, wie z.B. Serratia-Protease, Thermolysin, Subtilisin, Carboxypeptidasen und Cathepsine (wie z.B. Cathepsine B und L), die zur Umsetzung von Peptid-enthaltenden Prodrugs zu freien Arzneimitteln zweckdienlich sind; D-Alanylcarboxypeptidasen, die zur Umsetzung von Prodrugs zweckdienlich sind, die D-Aminosäuresubstituenten enthalten; Kohlenhydrat spaltende Enzyme, wie z.B.  $\beta$ -Galactosidase und Neuramidase, die zur Umsetzung glykosylierter Prodrugs zu freien Arzneimitteln zweckdienlich sind;  $\beta$ -Lactamase, die zur Umsetzung von mit  $\beta$ -Lactamen derivatisierten Arzneimitteln zu freien Arzneimitteln zweckdienlich ist; und Penicillin-Amidasen, wie z.B. Penicillin-V-Amidase oder Penicillin-G-Amidase, die zur Umsetzung von Arzneimitteln, die an ihren Amin-Stickstoffen mit Phenoxyacetyl- oder Phenylacetylgruppen derivatisiert sind, zu freien Arzneimitteln zweckdienlich sind. Alternativ dazu können Antikörper mit enzymatischer Aktivität, die auf dem Gebiet der Erfindung auch als „Abzyme“ bekannt sind, verwendet werden, um die Prodrugs der Erfindung zu freien aktiven Arzneimitteln umzusetzen (siehe z.B. Massey, Nature 328, 457-458 (1987)). Antikörper-Abzym-Konjugate können wie hierin beschrieben für die Abgabe des Abzyms an eine Tu-

morzellpopulation hergestellt werden.

**[0106]** Die Enzyme können mittels Techniken kovalent an die Anti-ErbB3-Antikörper gebunden werden, die auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind, wie z.B. die Verwendung der oben erörterten heterobifunktionellen Vernetzungsreagenzien. Alternativ dazu können unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken, die auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind (siehe z.B. Neuberger et al., Nature 312, 604-608 (1984)), Fusionsproteine konstruiert werden, die zumindest eine Antigenbindungsregion eines Antikörpers der Erfindung umfassen, die an zumindest einen funktionell aktiven Abschnitt eines Enzyms der Erfindung gebunden sind.

(xi) Antikörper-Salvage-Rezeptorbindungsepitop-Fusionen

**[0107]** Bei gewissen Ausführungsformen der Erfindung kann es wünschenswert sein, ein Antikörperfragment anstelle eines intakten Antikörpers zu verwenden, um beispielsweise die Penetration des Tumors zu steigern. In diesem Fall kann es wünschenswert sein, das Antikörperfragment zu modifizieren, um seine Serumhalbwertszeit zu erhöhen. Dies kann beispielsweise durch Einbau eines Salvage-Rezeptorbindungsepitops in das Antikörperfragment erzielt werden (z.B. durch Mutation der geeigneten Region im Antikörperfragment oder durch Einbauen des Epitops in einen Peptidmarker, der dann an das Antikörperfragment an eines der Enden oder in der Mitte fusioniert wird, z.B. durch DNA- oder Peptidsynthese).

**[0108]** Ein systematisches Verfahren zur Herstellung einer derartigen Antikörpervariante mit einer erhöhten In-vivo-Halbwertszeit umfasst mehrere Schritte. Der erste umfasst das Identifizieren der Sequenz und Konformation eines Salvage-Rezeptorbindungsepitops einer Fc-Region eines IgG-Moleküls. Wenn dieses Epitop einmal identifiziert ist, wird die Sequenz des Antikörpers von Interesse modifiziert, so dass sie die Sequenz und Konformation des identifizierten Bindungsepitops enthält. Nachdem die Sequenz mutiert worden ist, wird die Antikörpervariante getestet, um festzustellen, ob sie eine längere In-vivo-Halbwertszeit als der ursprüngliche Antikörper aufweist. Falls die Antikörpervariante nach dem Testen keine längere In-vivo-Halbwertszeit aufweist, wird ihre Sequenz weiter verändert, um die Sequenz und Konformation des identifizierten Bindungsepitops zu umfassen. Der veränderte Antikörper wird auf längere In-vivo-Halbwertszeit getestet und dieser Vorgang fortgesetzt, bis ein Molekül erhalten wird, das eine längere In-vivo-Halbwertszeit aufweist.

**[0109]** Das so in den Antikörper von Interesse eingebaute Salvage-Rezeptorbindungsepitop ist ein beliebiges geeignetes, oben definiertes Epitop und seine Beschaffenheit wird z.B. vom Typ des zu modifizierten Antikörpers abhängen. Der Transfer wird auf eine Weise vorgenommen, so dass der Antikörper von Interesse nach wie vor die hierin beschriebenen biologischen Aktivitäten besitzt.

**[0110]** Das Epitop stellt im Allgemeinen eine Region dar, worin beliebige von einem oder mehreren Aminosäureresten aus einer oder zwei Schleifen einer Fc-Domäne auf eine analoge Position des Antikörperfragments übertragen werden. Noch bevorzugter werden drei oder mehr Reste aus einer oder zwei Schleifen der Fc-Domäne transferiert. Noch bevorzugter wird das Epitop aus der CH2-Domäne der Fc-Region (z.B. eines IgG) entnommen und auf die CH1-, CH3- oder V<sub>H</sub>-Region oder mehr als eine derartige Region des Antikörpers transferiert. Alternativ dazu wird das Epitop der CH2-Domäne der Fc-Region entnommen und auf die C<sub>L</sub>-Region oder V<sub>L</sub>-Region oder beide Regionen des Antikörperfragments transferiert.

**[0111]** Das Salvage-Rezeptorbindungsepitop umfasst vorzugsweise die Sequenz (5' nach 3'): PKNS-SMISNTP (Seq.-ID Nr. 1), und umfasst gegebenenfalls außerdem eine Sequenz, die aus der aus HQSLGTQ (Seq.-ID Nr. 2), HQNLSDGK (Seq.-ID Nr. 3), HQNISDGK (Seq.-ID Nr. 4) oder VISSHLGQ (Seq.-ID Nr. 5) bestehenden Gruppe ausgewählt ist, insbesondere wo das Antikörperfragment ein Fab' oder F(ab')<sub>2</sub> ist, oder das Salvage-Rezeptorbindungsepitop ist ein Polypeptid, das die Sequenzen (5' nach 3'): HQNLSDGK (Seq.-ID Nr. 3), HQNISDGK (Seq.-ID Nr. 4), VISSHLGQ (Seq.-ID Nr. 5) und die Sequenz: PKNSMISNTP (Seq.-ID Nr. 1) enthält.

B. Vektoren Wirtszellen und Rekombinationsverfahren

**[0112]** Für den hierin offenbarten Antikörper kodierende, isolierte Nucleinsäure, Vektoren und die Nucleinsäure umfassende Wirtszellen sowie rekombinante Techniken zur Produktion des Antikörpers sind ebenfalls vorgesehen.

**[0113]** Zur rekombinanten Herstellung des Antikörpers wird die dafür kodierende Nucleinsäure isoliert und in einen replizierbaren Vektor zur weiteren Klonierung (Amplifikation der DNA) oder zur Expression eingesetzt.

Für den monoklonalen Antikörper kodierende DNA kann unter Anwendung herkömmlicher Verfahren (z.B. mittels Oligonucleotidsonden, die fähig sind, spezifisch an Gene zu binden, die für die Schwer- und Leichtketten des Antikörpers kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Es sind zahlreiche Vektoren verfügbar. Die Vektorkomponenten umfassen im Allgemeinen, sind jedoch nicht beschränkt auf eine oder mehrere der Folgenden: eine Signalsequenz, ein Replikationsstartpunkt, ein oder mehrere Markergene, ein Enhancerelement, ein Promotor und eine Transkriptionsterminationssequenz.

(i) Signalsequenzkomponente

**[0114]** Der Anti-ErbB3-Antikörper dieser Erfindung kann rekombinant nicht nur direkt, sondern auch als Fusionspeptid mit einem heterologen Polypeptid produziert werden, das vorzugsweise eine Signalsequenz oder ein anderes Polypeptid mit einer spezifischen Spaltstelle am N-Terminus des reifen Proteins oder Polypeptids ist. Die gewählte heterologe Signalsequenz sollte vorzugsweise eine sein, die von der Wirtszelle erkannt und prozessiert (d.h., von einer Signalpeptidase gespalten) wird. Für prokaryotische Wirtszellen, die die native Anti-ErbB3-Antikörper-Signalsequenz nicht erkennen und prozessieren, wird die Signalsequenz durch eine prokaryotische Signalsequenz ersetzt, die beispielsweise aus der aus alkalische-Phosphatase-, Penicillinase-, lpp- oder hitzestabilen Enterotoxin-II-Leader bestehenden Gruppe ausgewählt ist. Für die Sekretion in Hefe kann die native Signalsequenz beispielsweise durch den Hefe-Invertase-Leader, Alphafaktor-Leader (einschließlich *Saccharomyces*- und *Kluyveromyces*- $\alpha$ -Faktor-Leader, Saure-Phosphatase-Leader, den Glucoamylase-Leader aus *C. albicans* oder das in der WO 90/13646 beschriebene Signal ersetzt werden. Bei der Säugetierzell-expression sind Säugetier-Signalsequenzen sowie virale Sekretionsleader, beispielsweise das gD-Signal aus Herpes simplex verfügbar.

**[0115]** Die DNA für eine derartige Vorläuferregion wird im Leseraster zur für den Anti-ErbB3-Antikörper kodierenden DNA ligiert.

(ii) Replikationsstartpunktkomponente

**[0116]** Sowohl Expressions-, als auch Klonierungsvektoren enthalten eine Nucleinsäuresequenz, die es dem Vektor ermöglicht, in einer oder mehreren gewählten Wirtszellen zu replizieren. Im Allgemeinen ist in Klonierungsvektoren diese Sequenz eine, die es dem Vektor ermöglicht, sich unabhängig von der Wirtschromosomen-DNA zu replizieren und umfasst Replikationsstartpunkte oder autonom replizierende Sequenzen. Derartige Sequenzen sind für eine Reihe von Bakterien, Hefe und Viren wohlbekannt. Der Replikationsstartpunkt aus dem Plasmid pBR322 ist für die meisten Gram-negativen Bakterien geeignet, der 2 $\mu$ -Plasmid-Startpunkt ist für Hefe und verschiedene Virenstartpunkte (SV40, Polyoma, Adenovirus, VSV oder BPV) sind für Klonierungsvektoren in Säugetieren zweckdienlich. Im Allgemeinen wird die Replikationsstartpunktkomponente für Säugetier-Expressionsvektoren nicht benötigt (der SV40-Startpunkt wird typischerweise in erster Linie nur deshalb verwendet, weil er den frühen Promotor enthält).

(iii) Selektionsgenkomponente

**[0117]** Expressions- und Klonierungsvektoren können ein Selektionsgen enthalten, das auch Selektionsmarker genannt wird. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegen Antibiotika oder andere Toxine, z.B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oder Tetracyclin verleihen, (b) auxotrophe Defekte komplementieren oder (c) kritische Nährstoffe bereitstellen, die aus komplexen Nährmedien nicht verfügbar sind, z.B. das für D-Alanin-Racemase kodierende Gen für Bacilli.

**[0118]** Eines der Beispiele für ein Selektionsschema verwendet ein Arzneimittel, um das Wachstum einer Wirtszelle zum Stillstand zu bringen. Jene Zellen, die erfolgreich mit einem heterologen Gen transformiert sind, produzieren ein Protein, das Arzneimittelresistenz verleiht und überleben daher das Selektionsregime. Beispiele für eine ähnliche dominanten Selektion verwenden die Arzneimittel Neomycin, Mycophenolsäure und Hygromycin.

**[0119]** Ein weiteres Beispiel für geeignete Selektionsmarker für Säugetierzellen sind jene, die eine Identifizierung von Zellen ermöglichen, die kompetent zur Aufnahme der Anti-ErbB3-Antikörper-Nucleinsäure sind, wie z.B. DHFR oder Thymidinkinase, Metallothionein-I und -II, vorzugsweise Primaten-Metallothionein-Gene, Adenosin-Deaminase, Ornithin-Decarboxylase usw.

**[0120]** Beispielsweise werden mit dem DHFR-Selektionsgen transformierte Zellen zuerst durch Kultivieren aller Transformanten in einem Kulturmedium identifiziert, das Methotrexat (Mtx), einem kompetitiven Antagonis-

ten von DHFR enthält. Eine geeignete Wirtszelle beim Einsatz von DHFR der Wildform ist die hinsichtlich DHFR-Aktivität defekte Chinahamster-Eierstock (CHO-) Zelllinie.

**[0121]** Alternativ dazu können Wirte (insbesondere Wirte der Wildform, die endogenes DHFR enthalten), die mit DNA-Sequenzen transformiert oder cotransformiert sind, die für den Anti-ErbB3-Antikörper, DHFR-Protein der Wildform und einen weiteren Selektionsmarker, wie z.B. Aminoglycosid-3-phosphotransferase (APH), kodieren, durch Zellwachstum in Medium selektiert werden, das ein Selektionsmittel für den Selektionsmarker, wie z.B. ein aminoglykosidisches Antibiotikum, z.B. Kanamycin, Neomycin oder G418 enthält. Siehe auch US-Patent Nr. 4.965.199.

**[0122]** Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das im Hefepiasmid YRp7 vorhandene *trp1*-Gen (Stinchcomb et al., *Nature* 282, 39 (1979)). Das *trp1*-Gen stellt einen Selektionsmarker für einen mutierten Hefestamm bereit, dem die Fähigkeit zum Wachstum in Tryptophan fehlt, beispielsweise ATCC-Nr. 44076. oder PEP4-1. Jones, *Genetics* 85, 12 (1977). Die Gegenwart der *trp1*-Läsion im Hefewirtszellgenom stellt dann eine wirksame Umgebung für den Nachweis der Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan bereit. Gleichmaßen werden *Leu2*-defekte Hefestämme (ATCC 20.622 oder 38.626) durch bekannte, das *Leu2*-Gen tragende Plasmide komplementiert.

**[0123]** Außerdem können vom zirkulären 1,6- $\mu$ m-Plasmid pKD1 hergeleitete Vektoren zur Transformation von *Kluyveromyces*-Wirten verwendet werden. Alternativ dazu wurde ein Expressionssystem für die Produktion von rekombinantem Kälber-Chymosin für *K. lactis* im Großmaßstab beschrieben. Van der Berg, *Bio/Technology* 8, 135 (1990). Stabile Mehrfachkopie-Expressionsvektoren zur Sekretion von reifem, rekombinantem menschlichen Serumalbumin durch Industriestämme von *Kluyveromyces* sind ebenfalls offenbart worden. Fler et al., *Bio/Technology* 9, 968-975 (1991).

#### (iv) Promotorkomponente

**[0124]** Expressionsvektoren und Klonierungsvektoren enthalten üblicherweise einen Promotor, der vom Wirtsorganismus erkannt wird und operabel an die Anti-ErbB3-Antikörper-Nucleinsäure gebunden ist. Zur Verwendung mit prokaryotischen Wirten geeignete Promotoren umfassen den *phoA*-Promotor,  $\beta$ -Lactamase- und Lactose-Promotorsysteme, Alkalische Phosphatase, ein Tryptophan-(*trp*-)Promotorsystem und Hybridpromotoren, wie z.B. den *tac*-Promotor. Jedoch sind andere bekannte bakterielle Promotoren ebenfalls geeignet. Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Systemen werden außerdem eine Shine-Dalgarno-(SD-)Sequenz enthalten, die operabel an die für den Anti-ErbB3-Antikörper kodierende DNA gebunden ist.

**[0125]** Es sind Promotorsequenzen für Eukaryoten bekannt. Nahezu alle eukaryotischen Gene weisen eine AT-reiche Region auf, die sich etwa 25 bis 30 Basen stromauf der Stelle befindet, wo die Transkription initiiert wird. Eine weitere Sequenz, die sich 70 bis 80 Basen stromauf des Transkriptionsstarts vieler Gene findet, ist die CNCAAT-Region, wobei N jegliches Nucleotid sein kann. Am 3'-Ende der meisten eukaryotischen Gene befindet sich eine AATAAA-Sequenz, die das Signal zur Hinzufügung des Poly-A-Schwanzes an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz sein könnte. Alle dieser Sequenzen werden in geeigneter Weise in eukaryotische Expressionsvektoren inseriert.

**[0126]** Beispiele für geeignete Promotorsequenzen zur Verwendung mit Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase oder andere glykolytische Enzyme, wie z.B. Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofruktokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase.

**[0127]** Andere Hefepromotoren, die induzierbare Promotoren mit dem zusätzlichen Vorteil der durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription sind, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, Saure Phosphatase, mit dem Stickstoffmetabolismus zusammenhängende Abbauenzyme, Metallothionein, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Enzyme, die für Maltose- und Galactoseverwertung verantwortlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefeexpression werden in EP 73.657 weiterführend beschrieben. Hefe-Enhancer werden ebenfalls vorteilhaft mit Hefepromotoren verwendet.

**[0128]** Die Anti-ErbB3-Antikörper-Transkription aus Vektoren in Säugetierwirtszellen wird beispielsweise durch Promotoren kontrolliert, die aus den Genomen von Viren erlangt werden, wie z.B. aus Polyomavirus, Geflügelpockenvirus, Adenovirus (wie z.B. Adenovirus 2), Rinder-Papillomavirus, Vogel-Sarkomvirus, Cytomega-

lovirus, einem Retrovirus, Hepatitis-B-Virus und insbesondere bevorzugt Simian-Virus 40 (SV40), aus heterologen Säugetier-Promotoren, z.B. dem Actin-Promotor oder einem Immunglobulin-Promotor, aus Hitzeschock-Promotoren, und zwar unter der Voraussetzung, dass derartige Promotoren mit den Wirtszellsystemen kompatibel sind.

**[0129]** Die frühen und späten Promotoren des SV40-Virus werden zweckdienlicherweise als SV40-Restriktionsfragment erlangt, das außerdem den SV40-Virus-Replikationsstartpunkt enthält. Der unmittelbar frühe Promotor des menschlichen Cytomegalovirus wird zweckdienlicherweise als HindIII-E-Restriktionsfragment erlangt. Ein System zur Expression von DNA in Säugetierwirten unter Verwendung des Rinder-Papillomavirus als Vektor ist im US-Patent Nr. 4.419.446 offenbart. Eine Modifizierung dieses Systems wird im US-Patent Nr. 4.601.978 beschrieben. Siehe auch Reyes et al., Nature 297, 598-601 (1982) über die Expression menschlicher  $\beta$ -Interferon-cDNA in Mauszellen unter der Kontrolle eines Thymidinkinase-Promotors aus dem Herpes-simplex-Virus. Alternativ dazu kann die lange terminale Wiederholung aus dem Rous-Sarkomvirus als Promotor verwendet werden.

#### (v) Enhancerelementkomponente

**[0130]** Die Transkription einer für den Anti-ErbB3-Antikörper dieser Erfindung kodierenden DNA durch höhere Eukaryoten wird häufig durch Insertieren einer Enhancersequenz in den Vektor gesteigert. Zahlreiche Enhancersequenzen aus Säugetiergenen sind nun bekannt (Globin, Elastase, Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein und Insulin). Typischerweise wird man jedoch einen Enhancer aus einem Virus einer eukaryotischen Zelle verwenden. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer an der späten Seite des Replikationsstartpunkts (bp 100-270), den frühen Promotor-Enhancer aus Cytomegalovirus, den Polyoma-Enhancer an der späten Seite des Replikationsstartpunkts und Adenovirus-Enhancer. Siehe auch Yaniv, Nature 297, 17-18 (1982) über Enhancer-Elemente für die Aktivierung eukaryotischer Promotoren. Der Enhancer kann in den Vektor an einer Stelle 5' oder 3' der für den Anti-ErbB3-Antikörper kodierenden Sequenz gespleißt werden, befindet sich jedoch vorzugsweise an einer Stelle 5' des Promotors.

#### (vi) Transkriptionsterminationskomponente

**[0131]** In eukaryotischen Wirtszellen (Hefe, Pilze, Insekten, Pflanzen, Tiere, Menschen oder kernhaltige Zellen aus anderen mehrzelligen Organismen) verwendete Expressionsvektoren werden außerdem Sequenzen enthalten, die zur Termination der Transkription und zur Stabilisierung der mRNA erforderlich sind. Derartige Sequenzen sind üblicherweise aus den 5'- und gelegentlich aus den 3'-untranslatierten Regionen eukaryotischer oder viraler DNAs oder cDNAs verfügbar. Diese Regionen enthalten Nucleotidsegmente, die als polyadenylierte Fragmente im untranslatierten Abschnitt der für den Anti-ErbB3-Antikörper kodierenden mRNA transkribiert werden. Eine der zweckdienlichen Transkriptionsterminationskomponenten ist die Polyadenylierungsregion des Rinderwachstumshormons. Siehe WO 94/11026 und der darin offenbarte Expressionsvektor.

#### (vii) Wahl und Transformation von Wirtszellen

**[0132]** Geeignete Wirtszellen zur Klonierung und Expression der Vektoren hierin sind die oben beschriebenen Prokaryoten-, Hefe- oder höheren Eukaryotenzellen. Geeignete Prokaryoten zu diesem Zweck umfassen Eubakterien, wie z.B. Gram-positive oder Gram-negative Organismen, beispielsweise 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 Bacilli, wie z.B. B. subtilis und B. licheniformis (z.B. B. licheniformis 41P, offenbart in DD 266.710, veröffentlicht am 12. April 1989), Pseudomonas, wie z.B. P. aeruginosa und Streptomyces. Ein bevorzugter E.-coli-Klonierungswirt ist E coli 294 (ATCC 31.446), obgleich andere Stämme, wie z.B. E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31.537), E. coli W3110 (ATCC 27.325) geeignet sind. Diese Beispiele sind illustrativ und nicht einschränkend.

**[0133]** Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroorganismen, wie z.B. Fadenpilze oder Hefe, geeignete Klonierungs- oder Expressionswirte für Vektoren, die für Anti-ErbB3-Antikörper kodieren. Saccharomyces cerevisiae oder gewöhnliche Bäckerhefe ist der am häufigsten verwendete unter den niederen eukaryotischen Wirtsmikroorganismen. Jedoch ist eine Reihe anderer Gattungen, Spezies und Stämme allgemein verfügbar und hierin zweckdienlich, 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. drosophilum (ATCC 36.906), K. thermotolerans und K. marxianus; Yarrowia (EP 402.226); Pichia pastoris (EP 183.070); Candida; Trichoderma reesei (EP 244.234); Neurospora crassa, Schwanniomycetes, wie z.B. Schwanniomycetes occidentalis; und Fadenpilze, wie z.B. Neurospora, Penicillium, Tolypocladium und Aspergillus.

lus-Wirte, wie z.B. *A. nidulans* und *A. niger*.

**[0134]** Geeignete Wirtszellen zur Expression von glykosyliertem Anti-ErbB3-Antikörper stammen von mehrzelligen Organismen. Beispiele von Invertebratenzellen umfassen Pflanzen- und Insektenzellen. Es sind zahlreiche Baculovirus-Stämme und Varianten und entsprechende permissive Insektenwirtszellen aus Wirten, wie z.B. *Spodoptera frugiperda* (Raupe), *Aedes aegypti* (Stechmücke), *Aedes albopictus* (Stechmücke), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) und *Bombyx mori* identifiziert worden. Eine Vielzahl an Virusstämmen zur Transfektion ist öffentlich verfügbar, z.B. die L-1-Variante von *Autographa californica* NPV und der Bm-5-Stamm von *Bombyx mori* NPV, und derartige Viren können als der Virus hierin gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere zur Transfektion von *Spodoptera-frugiperda*-Zellen verwendet werden.

**[0135]** Pflanzenzellkulturen von Baumwolle, Mais, Kartoffel, Sojabohne, Petunie, Tomate und Tabak können ebenfalls als Wirte eingesetzt werden.

**[0136]** Jedoch bestand größtes Interesse an Vertebratenzellen und die Vermehrung von Vertebratenzellen in Kultur (Gewebekultur) ist zu einem Routineverfahren geworden. Beispiele für zweckdienliche Säugetierwirtszelllinien sind mit SV40 transformierte Affennieren-CV1-Linie (COS-7, ATCC CRL 1651); menschliche Urnierenzellen (293-Zellen oder zum Wachstum in Suspensionskultur subklonierte 293-Zellen, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36, 59 (1977)); Babyhamsternierenzellen (BHK, ATCC CCL10); Chinahamster-Einerstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216 (1980)); Maus-Sertolizellen (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23, 243-251 (1980)); Affennierenzellen (CV1, ATCC CCL 70); Nierenzellen Afrikanischer Grüner Meerkatzen (VERO-76, ATCC CRL-1587); menschliche Zervixkarzinomzellen (HELA, ATCC CCL 2); Hundenierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Büffelrattenleberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442); menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065); Maus-Mammatumorzellen (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-Zellen (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383, 44-68 (1982)); MRC-5-Zellen; FS4-Zellen; und eine menschliche Hepatomlinie (Hep G2).

**[0137]** Wirtszellen werden mit den oben beschriebenen Expressions- oder Klonierungsvektoren zur Anti-ErbB3-Antikörper-Produktion transformiert und in herkömmlichen Nährmedien kultiviert, die in geeigneter Weise zur Induktion von Promotoren, Selektion von Transformanten oder Amplifizieren der für die gewünschten Sequenzen kodierenden Gene modifiziert sind.

#### (viii) Kultivieren der Wirtszellen

**[0138]** Die zur Produktion des Anti-ErbB3-Antikörpers dieser Erfindung verwendeten Wirtszellen können in einer Reihe 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 ((D-MEM), Sigma) sind zur Kultivierung der Wirtszellen geeignet. Außerdem kann ein beliebiges der in Ham et al., *Methods in Enzymology* 58, 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102, 255 (1980), US-Patenten Nr. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 5.122.469; oder 4.560.655; WO 90/03430; WO 87/00195; oder US-Patentanmeldung Nr. 30.985 beschriebenen Medien als Kulturmedien für die Wirtszellen verwendet werden. Jedes dieser Medien kann wie erforderlich mit Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (wie z.B. Insulin, Transferrin oder Epidermiswachstumsfaktor), Salzen (wie z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat), Puffern (wie z.B. HEPES), Nucleotiden (wie z.B. Adenosin und Thymidin), Antibiotika (wie z.B. Gentamycin<sup>TM</sup>-Arzneimittel), Spurenelementen (definiert als anorganische Verbindungen, die üblicherweise in Endkonzentrationen im mikromolaren Bereich vorliegen) und Glucose oder einer äquivalenten Energiequelle ergänzt werden. Beliebige andere notwendige Ergänzungen können ebenfalls in geeigneten Konzentrationen enthalten sein, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung für gewöhnlich bekannt sind. Die Kulturbedingungen, wie z.B. Temperatur, pH und dergleichen sind jene, die vorher mit der zur Expression gewählten Wirtszelle verwendet worden sind und sind für den durchschnittlichen Fachmann offensichtlich.

#### (ix) Reinigung des Anti-ErbB3-Antikörpers

**[0139]** Bei Verwendung von Rekombinationstechniken kann der Antikörper intrazellulär, im periplasmatischen Raum produziert oder direkt in das Medium sekretiert werden. Falls der Antikörper intrazellulär produziert wird, werden als erster Schritt die partikulären Bruchstücke, entweder Wirtszellen oder lysierte Fragmente beispielsweise durch Zentrifugation oder Ultrafiltration entfernt. Carter et al., *Bio/Technology* 10, 163-167 (1992) beschreiben ein Verfahren zur Isolierung von Antikörpern, die in den periplasmatischen Raum von *E. coli* sekretiert werden. Zusammenfassend wird Zellpaste in Gegenwart von Natriumacetat (pH 3,5), EDTA und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) über ungefähr 30 Minuten aufgetaut. Zellbruchstücke können durch Zentrifugati-

on entfernt werden. Wenn der Antikörper in das Medium sekretiert wird, werden Überstände aus derartigen Expressionssystemen im Allgemeinen zuerst unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Proteinkonzentrationsfilters, beispielsweise einer Amicon- oder Millipore-Pellicon-Ultrafiltrationseinheit konzentriert. Ein Proteaseinhibitor, wie z.B. PMSF kann in jedem der vorangehenden Schritte enthalten sein, um Proteolyse zu hemmen, und es können Antibiotika enthalten sein, um das Wachstum hinzukommender Kontaminanten zu verhindern.

**[0140]** Die aus den Zellen hergestellte Antikörperzusammensetzung kann gereinigt werden, und zwar unter Verwendung von Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse und Affinitätschromatographie, wobei Affinitätschromatographie die bevorzugte Reinigungstechnik ist. Die Eignung von Protein A als Affinitätsligand hängt von Spezies und Isotyp jeglicher Immunglobulin-Fc-Domäne ab, die im Antikörper vorhanden ist. Protein A kann verwendet werden, um Antikörper zu reinigen, die auf menschliche  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ - oder  $\gamma 4$ -Schwerketten basieren (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62, 1-13 (1983)). Protein G wird für alle Maus-Isotypen und für menschliches  $\gamma 3$  empfohlen (Guss et al., EMBO J. 5, 1567-1575 (1986)). Die Matrix, an die der Affinitätsligand angebonden wird, ist am häufigsten Agarose, jedoch sind andere Matrices verfügbar. Mechanisch stabile Matrices, wie z.B. poröses Glas mit kontrolliertem Porendurchmesser oder Poly(styroldivinyl)benzol ermöglichen schnellere Flussraten und kürzere Verarbeitungszeiten, als sie mit Agarose erzielt werden können. Wo der Antikörper eine  $C_{H}3$ -Domäne umfasst, ist das Bakerbond-ABX<sup>TM</sup>-Harz (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) zur Reinigung zweckdienlich. Andere Techniken zur Proteinreinigung, wie z.B. Fraktionierung an einer Ionentauschersäule, Ethanolpräzipitation, Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie an Silika, Chromatographie an Heparin-Sepharose<sup>TM</sup>, Chromatographie an Anionen- oder Kationentauscherharz (wie z.B. Polyasparaginsäure-Säule), Chromatofokussierung, SDS-PAGE und Ammoniumsulfatpräzipitation sind in Abhängigkeit vom zu gewinnenden Antikörper ebenfalls verfügbar.

**[0141]** Nach (einem) beliebigen vorläufigen Reinigungsschritten) kann das Antikörper von Interesse und Verunreinigungen umfassende Gemisch einer Hydrophobchromatographie bei niedrigem pH unter Verwendung eines Puffers bei einem pH zwischen ungefähr 2,5 bis 4,5 unterzogen werden, die vorzugsweise bei niedrigen Salzkonzentrationen (z.B. von etwa 0 bis 0,25 M Salz) durchgeführt wird.

### C. Pharmazeutische Formulierungen

**[0142]** Therapeutische Formulierungen des Antikörpers werden zur Lagerung hergestellt, indem der Antikörper mit dem gewünschten Reinheitsgrad mit optionalen pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Exzipienten oder Stabilisatoren vermischt wird (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Aufl., A. Osol (Hrsg.) (1980)), und zwar in Form von lyophilisierten Formulierungen oder wässrigen Lösungen. Annehmbare Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren sind für den Empfänger bei den eingesetzten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch und umfassen Puffer, wie z.B. Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidantien, einschließlich Ascorbinsäure und Methionin; Konservierungsmittel (wie z.B. Octadecyldimethylbenzylammoniumchlorid; Hexamethoniumchlorid; Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid; Phenol, Butyl- oder Benzylalkohol; Alkylparabene, wie z.B. Methyl- oder Propylparaben; Catechin; Resorcin; Cyclohexanol; 3-Pentanol; und m-Kresol); niedermolekulare (weniger als etwa 10 Reste) Polypeptide; Proteine, wie z.B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere, wie z.B. Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren, wie z. B. Glycin, Glutamin, Asparagin, Histidin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner, wie z.B. EDTA; Zucker, wie z.B. Saccharose, Mannit, Trehalose oder Sorbit; salzbildende Gegenionen, wie z.B. Natrium; Metallkomplexe (z.B. Zn-Proteinkomplexe); und/oder nichtionische Tenside, wie z.B. Tween<sup>TM</sup>, Pluronic<sup>TM</sup> oder Polyethylenglykol (PEG).

**[0143]** Die Formulierung hierin kann außerdem mehr als eine aktive Komponente enthalten, wie sie für die speziell behandelte Indikation notwendig sind, vorzugsweise jene mit komplementären Aktivitäten, die sich gegenseitig nicht nachteilig beeinflussen. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, in dieser einen Formulierung außerdem Antikörper bereitzustellen, die an EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 oder Gefäßendothelfaktor (VEGF) binden. Alternativ dazu oder zusätzlich kann die Zusammensetzung ein Chemotherapeutikum oder ein Cytokin umfassen. Derartige Moleküle liegen in geeigneter Weise in Kombination in Mengen vor, die für den beabsichtigten Zweck wirksam sind.

**[0144]** Die aktiven Inhaltsstoffe können außerdem in Mikrokapseln, die beispielsweise durch Koazervations- oder Grenzflächenpolymerisation hergestellt werden, beispielsweise Hydroxymethylcellulose- oder Gelatine-Mikrokapseln bzw. Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, in kolloidalen Arzneimittel-Abgabesystemen (beispielsweise Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen eingeschlossen sein. Derartige Techniken sind in Remington's Phar-

maceutical Sciences, 16. Aufl., A. Osol (Hrsg.) (1980) offenbart.

**[0145]** Die zur In-vivo-Verabreichung zu verwendenden Formulierungen müssen steril sein. Dies wird leicht mittels Filtration durch Sterilfiltrationsmembranen erzielt.

**[0146]** Es können Präparate mit nachhaltiger Freisetzung hergestellt werden. Geeignete Beispiele für Präparate mit nachhaltiger Freisetzung umfassen semipermeable Membranen aus festen, hydrophoben Polymeren, die den Antikörper enthalten, wobei die Matrices in Form von Formteilen, z.B. Filmen oder Mikrokapseln vorliegen. Beispiele von Matrices für nachhaltige Freisetzung umfassen Polyester, Hydrogele (beispielsweise Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (US-Patent Nr. 3.773.919), Copolymere von L-Glutaminsäure und  $\gamma$ -Ethyl-L-glutamat, nicht abbaubares Ethylen-Vinylacetat, abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere, wie z.B. das Lupron Depot™ (injizierbare Mikrokügelchen, die sich aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolid-Acetat zusammensetzen), und Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure. Während Polymere, wie z.B. Ethylvinylacetat und Milchsäure-Glykolsäure die Freisetzung von Molekülen für mehr als 100 Tage ermöglichen, setzen gewisse Hydrogele Protein für kürzere Zeiträume frei. Wenn verkapselte Antikörper für lange Zeit im Körper verbleiben, können sie als Folge der Exposition mit Feuchtigkeit bei 37°C denaturieren oder aggregieren, was in einem Verlust an biologischer Aktivität und möglichen Veränderungen der Immunogenität resultiert. Es können rationale Strategien zur Stabilisierung in Abhängigkeit vom beteiligten Mechanismus ausgearbeitet werden. Wenn beispielsweise entdeckt wird, dass der Aggregationsmechanismus die Bildung intermolekularer S-S-Bindungen über Thio-Disulfid-Austausch ist, kann eine Stabilisierung durch Modifizieren von Sulfhydrylresten, Lyophilisieren aus sauren Lösungen, Kontrolle des Feuchtegehalts, unter Verwendung geeigneter Zusätze und Entwickeln spezieller Polymermatrix-Zusammensetzungen erzielt werden.

#### D. Nicht-therapeutische Verwendungen für den Antikörper

**[0147]** Die Antikörper der Erfindung können als Affinitätsreinigungsmittel verwendet werden. In diesem Verfahren werden die Antikörper an einer festen Phase, wie z.B. einem Sephadex-Harz oder Filterpapier und Anwendung von Verfahren immobilisiert, die auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind. Der immobilisierte Antikörper wird mit einer das zu reinigende ErbB3-Protein (oder ein Fragment davon) enthaltenden Probe kontaktiert und der Träger danach mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen das gesamte Material in der Probe mit Ausnahme des an den immobilisierten Antikörper gebundenen ErbB3-Proteins entfernt. Schließlich wird der Träger mit einem weiteren geeigneten Lösungsmittel, wie z.B. Glycinpuffer, pH 5,0 gewaschen, das das ErbB3-Protein vom Antikörper freisetzt.

**[0148]** Anti-ErbB3-Antikörper können außerdem in Diagnostetests für ErbB3-Protein zweckdienlich sein, z.B. für das Nachweisen seiner Expression in spezifischen Zellen, Geweben oder Serum. Folglich können die Antikörper bei der Diagnose menschlicher Malignitäten verwendet werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 5.183.884).

**[0149]** Für diagnostische Anwendungen wird der Antikörper typischerweise mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert sein. Es sind zahlreiche Marker verfügbar, die allgemein in die folgenden Kategorien eingeteilt werden können:

(a) Radioisotope, wie z.B.  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  und  $^{131}\text{I}$ . Der Antikörper kann mit dem Radioisotop unter Verwendung der beispielsweise in Current Protocols in Immunology, Bd. 1 und 2, Coligen et al. (Hrsg.), Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs (1991) beschriebenen Techniken markiert und die Radioaktivität unter Verwendung von Szintillationszählung gemessen werden.

(b) Fluoreszenzmarker, wie z.B. Chelate seltener Erden (Europium-Chelate) oder Fluorescein und seine Derivate, Rhodamin und seine Derivate, Dansyl, Lissamin, Phycoerythrin und Texasrot sind verfügbar. Die Fluoreszenzmarker können beispielsweise unter Verwendung der in Current Protocols in Immunology, s.o., offenbarten Techniken an den Antikörper konjugiert werden. Die Fluoreszenz kann unter Verwendung eines Fluorimeters quantifiziert werden.

(c) Verschiedene Enzym-Substrat-Marker sind verfügbar und US-Patent Nr. 4.275.149 stellt einen Überblick über einige davon bereit. Das Enzym katalysiert im Allgemeinen eine chemische Veränderung des chromogenen Substrats, die unter Verwendung verschiedener Techniken gemessen werden kann. Beispielsweise kann das Enzym eine Farbveränderung bei einem Substrat katalysieren, die spektralphotometrisch gemessen werden kann. Alternativ dazu kann das Enzym die Fluoreszenz oder Chemolumineszenz des Substrats verändern. Techniken zur Quantifizierung einer Fluoreszenzveränderung sind oben beschrieben. Das chemolumineszente Substrat wird durch eine chemische Reaktion elektronisch angeregt und kann dann Licht emittieren, das gemessen werden kann (beispielsweise unter Verwendung eines Chemoluminometers), oder gibt Energie an einen Fluoreszenz-Akzeptor ab. Beispiele für enzymatische Marker

umfassen Luciferasen (z.B. Glühwürmchen-Luciferase oder Bakterien-Luciferase; US-Patent Nr. 4.737.456), Luciferin, 2,3-Dihydrophthalazinodione, Malatdehydrogenase, Urease, Peroxidase, wie z.B. Meerrettichperoxidase (HRPO), alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase, Glucoamylase, Lysozym, Saccharidoxidasen (z.B. Glucoseoxidase, Galactoseoxidase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase), heterocyclische Oxidasen (wie z.B. Uricase und Xanthinoxidase), Lactoperoxidase, Microperoxidase und dergleichen. Techniken zur Konjugation von Enzymen und Antikörpern sind in O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody-Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in: *Methods in Enzymology*, J. Langone und H. Van Vunakis (Hrsg.), Academic Press, New York, 73, 147-166 (1981) beschrieben.

**[0150]** Beispiele für Enzym-Substrat-Kombinationen umfassen unter anderem:

- (i) Meerrettichperoxidase (HRPO) mit Wasserstoffperoxidase als Substrat, worin die Wasserstoffperoxidase einen Farbstoff-Vorläufer oxidiert (z.B. o-Phenylendiamin (OPD) oder 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-hydrochlorid (TMB));
- (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.

**[0151]** Zahlreiche andere Enzym-Substrat-Kombinationen sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung verfügbar. Für einen allgemeinen Überblick über diese, siehe US-Patente Nr. 4.275.149 und 4.318.980.

**[0152]** Manchmal wird der Marker indirekt mit dem Antikörper konjugiert. Der qualifizierte Fachmann wird verschiedene Techniken kennen, um dies zu erzielen. Beispielsweise kann der Antikörper mit Biotin konjugiert werden und beliebige der oben erwähnten, breit gefassten Kategorien von Markern können mit Avidin konjugiert werden und umgekehrt. Biotin bindet selektiv an Avidin und daher kann der Marker mit dem Antikörper auf diese indirekte Weise konjugiert werden. Alternativ dazu wird zur Erzielung der indirekten Konjugation des Markers mit dem Antikörper der Antikörper mit einem kleinen Hapten (z.B. Digoxin) konjugiert und einer der verschiedenen oben erwähnten Markertypen wird mit einem Anti-Hapten-Antikörper (z.B. einem Anti-Digoxin-Antikörper) konjugiert. Auf diese Weise kann die indirekte Konjugation des Markers mit dem Antikörper erzielt werden.

**[0153]** Der Anti-ErbB3-Antikörper muss nicht markiert sein und seine Gegenwart kann unter Verwendung eines markierten Antikörpers, der an den Antikörper bindet, nachgewiesen werden.

**[0154]** Der Antikörper der vorliegenden Erfindung kann in einem beliebigen bekannten Testverfahren eingesetzt werden, wie z.B. in kompetitiven Bindungstests, direkten und indirekten Sandwich-Tests und Immunoprecipitationstests. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press Inc., S. 147-158 (1987).

**[0155]** Kompetitive Bindungstests beruhen auf der Fähigkeit eines markierten Standards, mit dem Testprobenanalyten um die Bindung mit einer beschränkten Menge an Antikörper zu konkurrieren. Die Menge an ErbB3-Protein in der Testprobe ist umgekehrt proportional zur Menge an Standard, die an die Antikörper gebunden wird. Um die Bestimmung der Menge an Standard, die gebunden wird, zu erleichtern, werden die Antikörper vorzugsweise vor oder nach der Konkurrenzreaktion unlöslich gemacht, so dass Standard und Analyt, die an die Antikörper gebunden werden, bequem von Standard und Analyten getrennt werden können, die ungebunden verbleiben.

**[0156]** Sandwich-Tests umfassen die Verwendung von zwei Antikörpern, wobei beide fähig sind, an ein(en) anderen/s immunogenen Abschnitt oder Epitop des nachzuweisenden Proteins zu binden. Bei einem Sandwich-Test wird der Testprobenanalyt von einem ersten Antikörper gebunden, der an einen festen Träger immobilisiert ist, und danach bindet ein zweiter Antikörper an den Analyten, wodurch ein unlöslicher dreiteiliger Komplex gebildet wird. Siehe z.B. US-Patent Nr. 4.376.110. Der zweite Antikörper kann selbst mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert sein (direkte Sandwich-Tests) oder kann unter Verwendung eines Anti-Immunglobulin-Antikörpers gemessen werden, der mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert ist (indirekter Sandwich-Test). Beispielsweise ist ein ELISA-Test ein Typ von Sandwich-Test, wobei in diesem Fall die nachweisbare Gruppierung ein Enzym ist.

**[0157]** Für die Immunhistochemie kann die Tumorprobe frisch oder gefroren sein oder kann in Paraffin eingebettet und mit einem Konservierungsmittel, wie z.B. Formalin fixiert sein.

**[0158]** Die Antikörper können außerdem für In-vivo-Diagnostiktests verwendet werden. Der Antikörper wird im Allgemeinen mit einem Radionuklid (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  $^{35}\text{S}$ ) markiert werden, so dass

der Tumor mittels Immunoszintigraphie lokalisiert werden kann.

#### E. Diagnosesets

**[0159]** Aus Gründen der Benutzerfreundlichkeit kann der Antikörper der vorliegenden Erfindung in einem Set, d.h. in einer verpackten Kombination von Reagenzien in vorherbestimmten Mengen mit Anweisungen zur Durchführung des Diagnosetests bereitgestellt werden. Wenn Antikörper mit einem Enzym markiert ist, wird das Set vom Enzym benötigte Substrate und Cofaktoren umfassen (z.B. einen Substratvorläufer, der ein nachweisbares Chromophor oder Fluorophor bereitstellt). Zusätzlich können andere Additive umfasst sein, wie z.B. Stabilisatoren, Puffer (z.B. ein Blockpuffer oder Lysepuffer) und dergleichen. Die verhältnismäßigen Mengen der verschiedenen Reagenzien können weitgehend variiert werden, um für Konzentrationen der Reagenzien in Lösung zu sorgen, die die Empfindlichkeit des Tests in hohem Maße optimieren. Insbesondere können die Reagenzien als Trockenpulver bereitgestellt werden, üblicherweise lyophilisiert und Exzipienten umfassend, das bei Auflösung eine Reagenslösung mit der geeigneten Konzentration bereitstellt.

#### F. Therapeutische Verwendung des Antikörpers

**[0160]** Es ist beabsichtigt, dass der Anti-ErbB3-Antikörper der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Leiden verwendet wird, bei denen die übermäßige Aktivierung des ErbB2-ErbB3-Komplexes auftritt, insbesondere wo eine derartige Aktivierung durch ein Heregulin-Polypeptid vermittelt wird. Beispielhafte Leiden und Störungen, die mit dem ErbB3-Antikörper zu behandeln sind, umfassen benigne und maligne Tumore (z.B. Karzinome der/des Niere, Leber, Blase, Brust, Darms, Eierstocks, Kolon-Rektums, Prostata, Pankreas, Lunge, Vulva, Schilddrüse, Leber; Sarkome; Glioblastome; und verschiedene Kopf- und Nackentumoren); Leukämien und Lymphmalignitäten; andere Störungen, wie z.B. Neuronen-, Glia-, Astrozyten-, Hypothalamus- und andere Glandula-, Makrophagen-, Epithel-, Stroma- und Blastozöl-Störungen; und entzündliche, angiogene und immunologische Störungen.

**[0161]** Die Antikörper der Erfindung werden einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen nach bekannten Verfahren verabreicht, wie z.B. durch intravenöse Verabreichung als Bolus oder durch kontinuierliche Infusion über einen Zeitraum, durch intramuskuläre, intraperitoneale, intrazerebrospinale, subkutane, intraartikuläre, intrasynoviale, intrathekale, orale, topische oder inhalatorische Wege. Die intravenöse Verabreichung des Antikörpers ist bevorzugt.

**[0162]** Andere therapeutische Regime können mit der Verabreichung der Anti-ErbB3-Antikörper der vorliegenden Erfindung kombiniert werden. Beispielsweise kann ein mit den hierin offenbarten Antikörpern zu behandelnder Patient auch eine Bestrahlungstherapie erhalten. Alternativ dazu oder zusätzlich kann dem Patienten ein Chemotherapeutikum verabreicht werden. Herstellung und Dosierungsschemata für derartige Chemotherapeutika können gemäß den Anleitungen des Herstellers oder wie vom geübten Praktiker empirisch ermittelt angewendet werden. Herstellung und Dosierungsschemata für derartige Chemotherapien sind auch in *Chemotherapy Service, M.C. Perry (Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)* beschrieben. Das Chemotherapeutikum kann der Verabreichung des Antikörpers vorangehen oder folgen oder kann gleichzeitig damit verabreicht werden.

**[0163]** Es kann wünschenswert sein, außerdem Antikörper gegen andere tumorassoziierte Antigene zu verabreichen, wie z.B. Antikörper, die an EGFR, ErbB2, ErbB4 oder Gefäßendothelfaktor (VEGF) binden. Zwei oder mehrere Anti-ErbB3-Antikörper können einem Patienten zusammen verabreicht werden. Alternativ dazu oder zusätzlich können dem Patienten ein oder mehrere Cytokine verabreicht werden.

**[0164]** Zur Prävention oder Behandlung einer Krankheit wird die geeignete Dosierung des Antikörpers von Folgendem abhängen: von der Art der zu behandelnden, oben definierten Krankheit; von der Schwere und vom Verlauf der Krankheit; davon, ob der Antikörper zu präventiven oder therapeutischen Zwecken verabreicht wird; von der vorhergehenden Therapie; von der Krankengeschichte und der Reaktion des Patienten auf den Antikörper; und vom Ermessen des behandelnden Arztes. Der Antikörper wird dem Patienten in geeigneter Weise auf einmal oder über eine Reihe von Behandlungen verabreicht.

**[0165]** In Abhängigkeit von der Art und Schwere der Krankheit sind 1 µg/kg bis 15 mg/kg (z.B. 0,1-20 mg/kg) Antikörper eine anfängliche Kandidat-Dosierung zur Verabreichung an den Patienten, ob beispielsweise durch eine oder mehrere gesonderte Verabreichungen oder durch kontinuierliche Infusion. Eine typische Tagesdosis könnte in Abhängigkeit von den oben erwähnten Faktoren von etwa 1 µg/kg bis 100 mg/kg oder mehr reichen. Für wiederholte Verabreichungen über mehrere Tage oder länger in Abhängigkeit vom Leiden wird die Behand-

lung aufrechterhalten bis eine gewünschte Unterdrückung von Krankheitssymptomen eintritt. Jedoch können andere Dosisregime zweckdienlich sein. Der Fortschritt dieser Therapie wird leicht durch herkömmliche Techniken und Tests überwacht.

#### G. Fertigartikel

**[0166]** Es wird ein Fertigartikel offenbart, der für die Behandlung der oben beschriebenen Störungen zweckdienliche Materialien enthält. Der Fertigartikel umfasst einen Behälter und ein Etikett. Geeignete Behälter umfassen beispielsweise Flaschen, Fläschchen, Spritzen und Teströhrchen. Die Behälter können aus einer Reihe von Materialien, wie z.B. Glas oder Kunststoff bestehen. Der Behälter enthält eine Zusammensetzung, die zur Behandlung des Leidens wirksam ist und kann eine sterile Einfüllöffnung aufweisen (beispielsweise kann der Behälter ein Beutel für intravenöse Lösungen oder ein Fläschchen sein, das einen von einer Injektionsnadel durchstechbaren Stopfen aufweist). Das aktive Mittel in der Zusammensetzung ist der Anti-ErbB3-Antikörper. Das Etikett, das am Behälter angebracht oder mit ihm verbunden ist, weist darauf hin, dass die Zusammensetzung zur Behandlung des Leidens der Wahl verwendet wird. Der Fertigartikel kann außerdem einen zweiten Behälter umfassen, der einen pharmazeutisch annehmbaren Puffer, wie z.B. phosphatgepufferte Salzlösung, Ringer-Lösung und Dextroselösung umfasst. Er kann außerdem andere Materialien umfassen, die vom wirtschaftlichen und Nutzerstandpunkt wünschenswert sind, einschließlich anderer Puffer, Verdüner, Filter, Nadeln, Spritzen und Packungsbeilagen mit Gebrauchsanleitungen.

#### H. Hinterlegung von Material

**[0167]** Die folgende Hybridomzelllinie ist bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC) hinterlegt worden:

<b>Hybridom-/Antikörperbezeichnung</b>	<b>ATCC-Nr.</b>	<b>Hinterlegungsdatum</b>
<b>8B8</b>	<b>HB-12070</b>	<b>22. März 1996</b>

**[0168]** Diese Hinterlegung wurde gemäß den Bestimmungen des „Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder“ (Budapest-Vertrag) vorgenommen.

#### BEISPIELE

##### HERSTELLUNG VON ANTI-ErbB3-ANTIKÖRPERN

**[0169]** Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung der Anti-ErbB3-Antikörper mit den hierin beschriebenen Kennzeichen.

#### Materialien und Verfahren

**[0170]** Zelllinien. Die menschliche myeloische Leukämie-Zelllinie K562 (der die mittels Northern-Blotting ermittelten Rezeptorprotein-Tyrosinkinasen der Klasse-I-Unterfamilie fehlen) und menschliche Eierstockkarzinom-Zelllinie Caov3 wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) erhalten. Beide wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert, das mit 10% Fötalkälberserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 mM HEPES ergänzt war („Wachstumsmedium“).

**[0171]** Stabile Transfektion von K562-Zellen. Die K562-Zelllinie wurde transfiziert und es wurde auf ErbB3 exprimierende Klone selektiert. Zusammenfassend wurde erbB3-RNA in den Säugetierzellen-Expressionsvektor pcDNA-3 (Invitrogen) subkloniert und in K562-Zellen durch Elektroporation (1180 mF, 350 V) eingeführt. Transfizierte Zellen wurden in 0,8 mg/ml G418 enthaltendem Wachstumsmedium kultiviert. Resistente Klone wurden durch Grenzverdünnung erlangt und auf ErbB3-Expression mittels Western-Blotting und Heregulin-(HER-)Bindungstests getestet. Der ErbB3 exprimierende Klon 4E9H3 wurde in den in diesem Bericht beschriebenen Experimenten verwendet. Es erwies sich, dass Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) die ErbB3-Expression in den K562-Transfektanten signifikant verstärkt. Daher wurden 4E9H3-Zellen vor Verwendung in verschiedenen unten beschriebenen Tests in 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) enthaltendem Wachstumsmedium über Nacht gegeben.

**[0172]** Antikörper. Für ErbB3-Proteine spezifische monoklonale Antikörper wurden gegen ein rekombinantes Fragment des Rezeptors erzeugt, das der extrazellulären Domäne (ECD) davon entspricht, fusioniert an sei-

nem Aminoterminus an das Glykoprotein-D-(gD-)Epitop des Herpes-simplex-Virus vom Typ 1 (HSV 1) für den monoklonalen Antikörper 5B6. Die kodierende Sequenz für die Signalsequenz von ErbB3 wurde durch eine Sequenz ersetzt, die für die Aminosäuren 1-53 des gD-Polypeptids kodiert. Die Aminosäuren 1-25 kodieren für die Signalsequenz von gD, während die Aminosäuren 26-53 ein Epitop für den monoklonalen Antikörper 5B6 enthalten. Siehe WO 95/14776. Das resultierende Konstrukt gD.Erb3.ECD wurde unter Verwendung einer Anti-gD-Antikörper-Affinitätsäule gereinigt. Immunisierungen wurden wie folgt durchgeführt. Weibliche Balb/c-Mäuse (Charles River) wurden zunächst über die Fußpfote mit 5 µg gD.ErbB3.ECD in 100 µl RIBI's™ Adjuvans (Ribi ImmunochemResearch, Inc., Hamilton, MT) injiziert. Die Tiere wurden 2 Mal mit 5 µg gD.ErbB3.ECD in ihre Fußpfote alle zwei Wochen geboostet, gefolgt von einer letzten Fußpfoteninjektion von 5 µg gD.ErbB3.ECD. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die poplitealen Lymphknoten entfernt und eine Einzelzellsuspension für PEG-Infusion hergestellt.

**[0173]** Die monoklonalen Antikörper wurden gereinigt und mittels immobilisiertem und Lösungsphasen-ELISA auf Kreuzreaktivität mit ErbB2 und ErbB4 getestet. Für den immobilisierten ELISA wurde 1 µg/ml ErbB2.ECD, gD.ErbB3.ECD oder gD.ErbB4.ECD verwendet, um eine 96-Napf-Mikrotiterplatte über Nacht zu beschichten. 1 µg/ml Anti-ErbB3-Mab wurde zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, gewaschen und mit an HRPO konjugiertem Ziege-Anti-Maus (gam-) IgG verfolgt. Der ELISA wurde entwickelt und bei 490 nm gemessen. Für den Lösungsphasen-ELISA wurde 1 µg/ml gam-IgG (Fc-spezifisch) verwendet, um eine 96-Napf-Mikrotiterplatte über Nacht zu inkubieren. 1 µg/ml Anti-ErbB3-Mab wurde zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert, gewaschen und mittels biotinylierter ErbB2.ECD, gD.ErbB3.ECD oder gD.ErbB4.ECD verfolgt. Diese Reaktion wurde für 1 Stunde bei RT inkubiert, gewaschen und mittels HR-PO-Streptavidin verfolgt. Der ELISA wurde entwickelt und bei 490 nm gemessen. In diesem Test kreuzreagierte keiner der Anti-ErbB3-Antikörper mit ErbB2 oder ErbB4.

**[0174]** Fab-Fragmente des 3-8D6-Antiköpers wurden durch Papainverdau erzeugt. Unverdautes IgG und Fc-Fragmente wurden durch Protein-A-Chromatographie, gefolgt von Gelfiltrationschromatographie entfernt. Es war kein IgG im Fab-Pool durch SDS-PAGE und einen mit einem Fc-spezifischen Antikörper sondierten Western-Blot nachweisbar.

**[0175]** HRG-Bindungsassays. Alle HRG-Bindungsexperimente wurden unter Verwendung der EGF-ähnlichen Domäne der β1-Isoform, d.h. HRGβ1<sub>177-244</sub> durchgeführt (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269, 14661-5 (1994)). Das Feld von ErbB3-Antikörpern wurde auf eine Wirkung auf die HRG-Bindung gescreent, indem 5,0 × 10<sup>4</sup> 4E9H3-Zellen mit 100 pM <sup>125</sup>I-HRG über Nacht bei 0°C in Abwesenheit (Kontrolle) oder Gegenwart von 100 nM Anti-ErbB3-Antikörper inkubiert wurden. Irrelevante IgGs wurden als Negativkontrollen verwendet. Die Zellen wurden geerntet und rasch mit eiskaltem Testpuffer (RPMI-Medium, das 10 mM HEPES, pH = 7,2) in einer 96-Napf-Filtrationsvorrichtung (Millipore) gewaschen. Die Filter wurden dann entfernt und gezählt.

**[0176]** Für die Antikörper-Dosis-Wirkungs-Experimente wurden 4E9H3-Zellen mit 100 pM <sup>125</sup>I-HRG in Gegenwart von ansteigenden Antikörperkonzentrationen inkubiert. HRG-Affinitätsmessungen wurden in Abwesenheit (Kontrolle) oder Gegenwart von entweder 100 nM Antikörper oder Fab-Fragment ermittelt. Diese Experimente wurden in einem kompetitiven Hemmformat mit ansteigenden Mengen von unmarkiertem HRG und einer festgelegten Konzentration (35 pM) <sup>125</sup>I-HRG durchgeführt. Für das Kontrollexperiment (kein Antikörper) wurden 1 × 10<sup>5</sup> 4E9H3-Zellen für jede Probe verwendet. Aufgrund von Beschränkungen des dynamischen Bereichs des Tests wurde die Anzahl an 4E9H3-Zellen, die für die Bindung in Gegenwart des Antikörpers oder Fab verwendet wurde, auf 2,5 × 10<sup>4</sup> Zellen pro Probe herabgesetzt.

**[0177]** Verringerung von HRG-stimulierter Phosphorylierung durch Antikörper. Caov3-Zellen, die von Natur aus ErbB2 und ErbB3 exprimieren, wurden mit 250 nM Anti-ErbB3-Antikörper 3-8D6, Fab-Fragmenten dieses Antikörpers oder Puffer (Kontrolle) für 60 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Der Anti-ErbB2-Antikörper 2C4 (Fendly et al., Cancer Res. 50, 1550-1558 (1990)), von dem früher gezeigt worden ist, dass er die HRG-stimulierte Phosphorylierung von ErbB2 blockiert, wurde als Positivkontrolle aufgenommen. Die Zellen wurden dann mit HRG in einer Endkonzentration von 10 nM für 8 Minuten bei Raumtemperatur stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Überstände und Auflösen der Zellen in SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Lysate wurden dann an einer SDS-PAGE laufen gelassen. Western-Blots der Gele wurden mit an Meerrettichperoxidase (Transduction Labs) konjugiertem Anti-Phosphotyrosin sondiert und die Blots unter Verwendung eines chemolumineszierenden Substrats (Amersham) sichtbar gemacht. Die Blots wurden mit einem Reflexions-Scanning-Densitometer wie in Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992) beschrieben gescannt.

**[0178]** Verringerung der Bildung von ErbB2-ErbB3-Komplex durch Antikörper. Caov3-Zellen wurden mit Puf-

fer (Kontrolle), 250 nM Anti-ErbB3-Antikörper 3-8D6 oder Fab-Fragmenten dieses Antikörpers oder dem Anti-ErbB2-Antikörper (2C4) für 60 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann mit 10 nM HRG oder Kontrollpuffer für 10 Minuten behandelt. Die Zellen wurden in 25 mM Tris, pH=7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1,0% Triton X-100™, 1,0% CHAPS, 10 Vol.-% Glycerin, enthaltend 0,2 mM PMSF, 50 mTU/ml Aprotinin und 10 mM Leupeptin („Lysepuffer“) lysiert und die Rohlysate kurz zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Überstände wurden mit 3E8 inkubiert, einem monoklonalen, für ErbB2 spezifischen Antikörper (Fendly et al., Cancer Res. 50, 1550-1558 (1990)), der kovalent an einen unlöslichen Träger (Affi Prep-10™, Bio-Rad) gekuppelt war. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden zweimal mit eiskaltem Lysepuffer gewaschen, in einem Minimalvolumen von SDS-Probenpuffer resuspendiert und der SDS-PAGE unterzogen. Western-Blots der Gele wurden dann mit einem polyklonalen Anti-ErbB3 (Santa Cruz Biotech) sondiert. Die Blots wurden mit einem Reflexions-Scanning-Densitometer wie in Holmes et al., Science 256, 1205-1210 (1992) beschrieben gescannt. Nach Sichtbarmachung mit ECL-Chemolumineszenzsubstrat wurden die Blots gestrippt und mit einem polyklonalen Anti-ErbB2 (Santa Cruz Biotech) neu sondiert. Mit Anti-ErbB2 sondierte, jeweils zweifache Blots zeigten, dass gleiche Mengen an ErbB2 aus jeder Probe immunpräzipitiert wurden.

### Ergebnisse

**[0179]** Eine Reihe von gegen die extrazelluläre Domäne von ErbB3 gerichteten monoklonalen Antikörpern wurde auf deren Fähigkeit beurteilt, die HRG-Bindung an ErbB3 zu beeinflussen. Das anfängliche Screening wurde durchgeführt, indem jeder der gereinigten Antikörper in einer Endkonzentration von 100 nM mit 4E9H3-Zellen in Gegenwart von <sup>125</sup>I-HRG inkubiert wurde. 4E9H3-Zellen sind ErbB3-Transfektanten der menschlichen myeloischen Leukämie-Zelllinie K562. Die K562-Zelllinie exprimiert keine endogenen ErbB-Rezeptoren oder HRG. Daher tritt eine Heregulin-Bindung an 4E9H3-Zellen ausschließlich über ErbB3 auf. Nach Inkubieren der Proben über Nacht auf Eis wurde die zellassoziierte Radioaktivität gemessen. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt ist, verringerten zwei der monoklonalen Anti-ErbB3-Antikörper (2F9 und 3E9) die Menge des an 4E9H3-Zellen gebundenen <sup>125</sup>I-HRG im Vergleich zur Kontrolle (ohne Antikörper). Jedoch verstärkten mehrere andere die Ligandenbindung signifikant. Diese Ergebnisse legen nahe, dass diese Anti-ErbB3-Antikörper fähig waren, die Affinität für HRG-Bindung zu erhöhen und/oder die Verfügbarkeit von HRG-Bindungsstellen zu erhöhen. Um den Einfluss dieser Antikörper auf die Bindung von HRG an ErbB3 näher zu charakterisieren, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente unter Verwendung des 3-8D6-Antikörpers durchgeführt, der die HRG-Bindung erhöhte. 4E9H3-Zellen wurden mit 100 pM <sup>125</sup>I-HRG in Gegenwart ansteigender Konzentrationen des 3-8D6-Antikörpers inkubiert. Zellassoziierte Radioaktivität wurde dann nach Inkubation über Nacht auf Eis gemessen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) als Diagramme zellassoziierter Radioaktivitäten über den Antikörperkonzentrationen gezeigt. Es besteht eine Korrelation zwischen erhöhter HRG-Bindung und ansteigender Antikörperkonzentration. Die Bindung von Heregulin erreichte die Sättigung zwischen 10 und 100 nM IgG. Der EC<sub>50</sub>-Wert für den 3-8D6-Antikörper betrug 722 pM. Für keinen der Antikörper wurde eine Abnahme der Dosis-Wirkungs-Kurven bei hohen Antikörperkonzentrationen beobachtet.

**[0180]** Die Scatchard-Analyse der HRG-Bindung wurde in Gegenwart dieser Antikörper ermittelt und die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Datensatz	Kd	Stellen/Zelle
Kontrolle	$1,2 \times 10^{-9}$	$3,6 \times 10^5$
MAb 3-8D6	$2,1 \times 10^{-10}$	$2,4 \times 10^5$
FAb 3-8D6	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,9 \times 10^5$

**[0181]** In Abwesenheit des Antikörpers wurde eine Kd von 1.200 pM für die HRG-Bindung an ErbB3 gemessen, die im Einklang mit einer früher gemessenen Affinitätsmessung der HRG-Bindung an ErbB3 steht. Die Anzahl an Bindungsstellen pro Zelle wurde mit 36.000 ermittelt. In Gegenwart des Antikörpers 3-8D6 wird die Bindungskonstante für HRG-Bindung signifikant auf 210 pM erhöht. Jedoch wird die Anzahl an HRG-Bindungsstellen in Gegenwart von 3-8D6 nicht erhöht.

**[0182]** Um zu ermitteln, ob die Erhöhung der ErbB3-Ligandenbindungsaffinität davon abhängig war, dass es sich um einen zweiwertigen Antikörper handelte, wurden HRG-Bindungsexperimente in Gegenwart von 100

nM eines durch Papainverdau des 3-8D6-Antikörpers hergestellten Fab-Fragments durchgeführt. Für diese Experimente verwendete Fab-Fragmente wurden durch Protein-A-Affinitätschromatographie und durch Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Es wurde in diesem gereinigten Präparat mittels SDS-PAGE kein intaktes IgG detektiert. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt ist, ist die Bindung von HRG in Gegenwart des intakten Antikörpers oder des resultierenden Fab nahezu identisch. Die Scatchard-Analyse dieser Daten liefern eine Dissoziationskonstante von 280 pM für HRG-Bindung in Gegenwart von Fab und die Anzahl an Rezeptoren pro Zelle, die in diesem Experiment ermittelt wurde, war ebenfalls im Wesentlichen dieselbe wie jene der Kontrolle. Diese Daten stehen im Einklang mit jenen, die in [Fig. 2](#) dargestellt sind, wo die Dosis-Wirkungs-Kurven mit den intakten Antikörpern ein Plateau und keine glockenförmige Kurve bei höherer Antikörperkonzentration zeigten, wo möglicherweise eine einwertige Antikörperbindung auftritt. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie festzulegen weisen diese Daten darauf hin, dass die in Gegenwart dieser Antikörper beobachtete Veränderung der HRG-Bindung keinen zweiwertigen Antikörper erfordert.

**[0183]** Die Wirkung des 3-8D6-Antikörpers in einem Rezeptortyrosin-Phosphorylierungstest unter Verwendung der Eierstocktumor-Zelllinie Caov3, die ErbB2 und ErbB3 coexprimiert, wurde als nächstes untersucht. Die Zellen wurden mit 10 nM HRG stimuliert, gefolgt von einer Vorinkubation für 60 Minuten mit entweder 3-8D6-Antikörper (250 nM) oder Puffer (Kontrolle). Gesamtzelllysate wurden an einem mit Anti-Phosphotyrosin sondierten Western-Blot analysiert. HRG-Behandlung stimulierte nicht die Phosphorylierung an 4E9H3-Zellen. Die Behandlung von 4E9H3-Zellen mit dem 3-8D6-Antikörper induzierte nicht die Phosphorylierung von ErbB3 selbst und hatte keine Wirkung auf die Tyrosin-Phosphorylierung in Caov3-Zellen. Eine deutliches Tyrosin-Phosphorylierungssignal wurde an einem Protein mit einer Molekülgröße von 180 kDa nach HRG-Stimulierung detektiert. Die Behandlung von Caov3-Zellen mit 2C4, einem für ErbB2 spezifischen Antikörper, war in der Lage, das HRG-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierungssignal zu blockieren. Wenn die Zellen mit dem Anti-ErbB3-Antikörper 3-8D6 vor der HRG-Stimulierung behandelt wurden, war die Tyrosin-Phosphorylierung ebenfalls verringert. Mittels Scanning-Densitometrie der Anti-Phosphotyrosin-Blots von Gesamtzelllysaten wurde beobachtet, dass 3-8D6 das Phosphotyrosinsignal bei 180-185 kDa um ungefähr 80% (Bereich 76-84%) hemmt. Dieses Signal wird von Tyrosinphosphatresten am ErbB2 sowie ErbB3 beigesteuert. Die Behandlung von Caov3-Zellen mit den aus dem 3-8D6-Antikörper hergestellten Fab-Fragmenten verringerte ebenfalls die durch HRG stimulierte Phosphorylierung der 180-kDa-Bande relativ zur Kontrolle. Jedoch war die hemmende Aktivität des Fab geringfügig weniger potent als die des intakten Antikörpers.

**[0184]** Die durch den 3-8D6-Antikörper vermittelte Erhöhung der Rezeptoraffinität an Zellen, die ErbB3 alleine exprimieren, ist analog zur Erhöhung der mit der Coexpression von ErbB2 mit ErbB3 verbundenen Affinität. Darüber hinaus blockiert dieser Antikörper die durch HRG stimulierte ErbB2-Kinaseaktivität in Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren. Um zu ermitteln, ob der Anti-ErbB3-Antikörper direkt mit ErbB2 um Bindung an ErbB3 konkurriert, wurde eine Reihe von Co-Immünpräzipitationsexperimenten unter Verwendung von Caov3-Zellen durchgeführt. Zellen wurden entweder mit Antikörper oder Puffer (Kontrolle) vorinkubiert und dann mit 10 nM HRG für 10 Minuten behandelt. Lysate der Zellen wurden dann mit einem monoklonalen Antikörper gegen ErbB2 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden dann mittels Western-Blot auf Gegenwart von ErbB3 analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten an, dass ErbB3 im ErbB2-Immünpräzipitat des durch HRG stimulierten Zelllysats zugegen war, nicht jedoch im Immunpräzipitat von unstimuliertem Lysat. Diese Daten legen nahe, dass HRG aus der Bildung eines ErbB2-ErbB3-Komplexes in Caov3-Zellen herrührt. ErbB3 war im Immunpräzipitat der mit dem monoklonalen Anti-ErbB2-Antikörper 2C4 behandelten Probe nicht nachweisbar. Eine signifikante Abnahme des ErbB3-Signals wurde beobachtet, wenn die Zellen mit dem 3-8D6-Antikörper oder seinem resultierenden Fab vor der HRG-Stimulierung vorinkubiert wurden. Diese Daten zeigen an, dass der 3-8D6-Antikörper die Bildung eines ErbB2-ErbB3-Komplexes nach HRG-Behandlung hemmt. Die Scanning-Densitometrie der Anti-ErbB3-Western-Blots von Anti-ErbB2-Immünpräzipitaten offenbarte, dass das Anti-ErbB3-Signal (das die Anzahl an vorhandenen ErbB2-ErbB3-Komplexen anzeigt) auch durch 3-8D6 um ungefähr 80% (Bereich 71-90%) verringert wird. Wenn jeweils zweifache Blots mit Anti-ErbB2 sondiert wurden, waren in allen Spuren gleiche Mengen an ErbB2 vorhanden.



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 2:

His	Gln	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
1				5		7

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 3:

His	Gln	Asn	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys
1				5			8

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

His	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Gly	Lys
1				5			8

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

Val	Ile	Ser	Ser	His	Leu	Gly	Gln
1				5			8

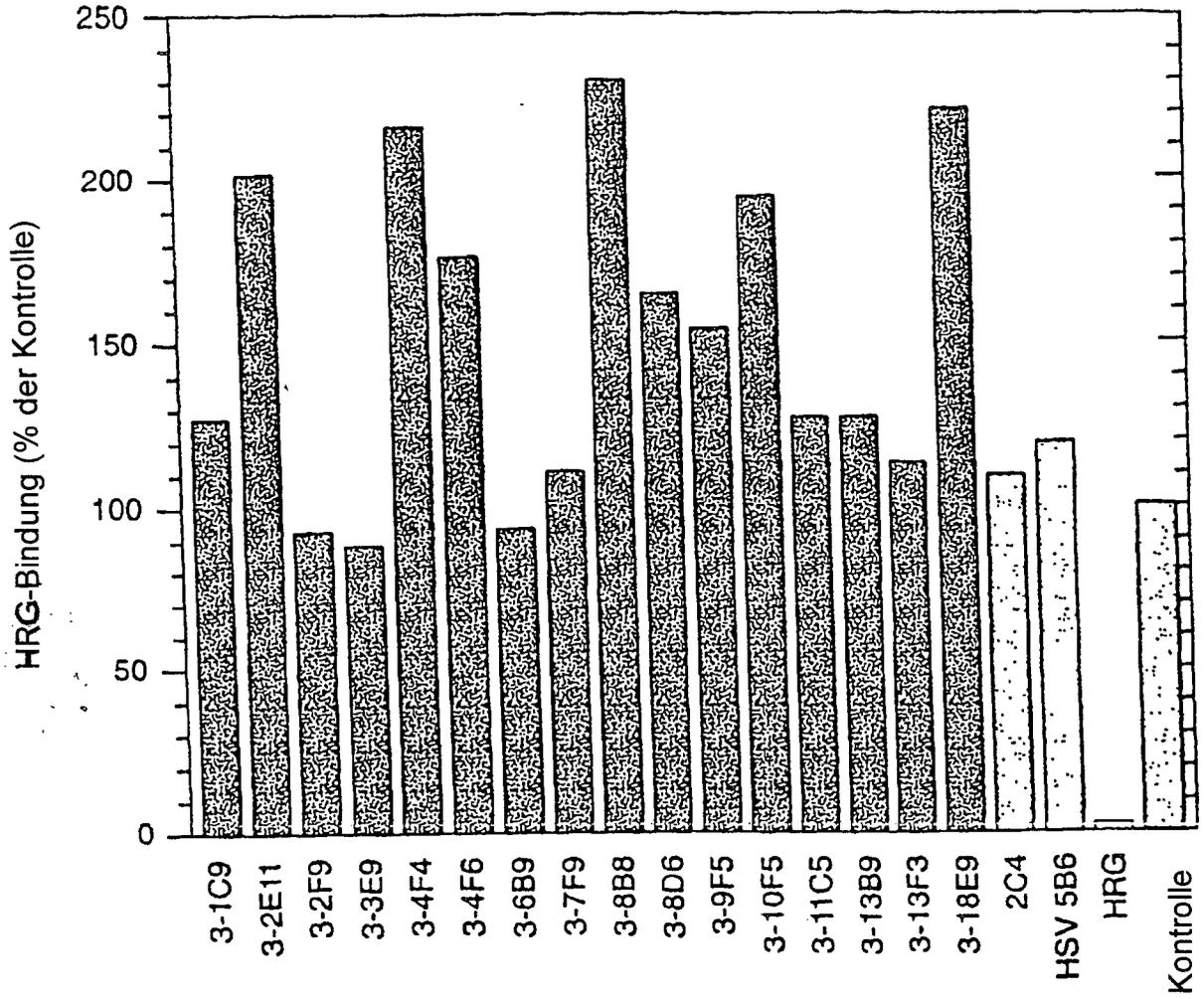
### Patentansprüche

- Antikörper, der an das ErbB3-Protein bindet und
  - die durch Heregulin induzierte Bildung eines ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes in einer ErbB2 und ErbB3 exprimierenden Zelle verringert und
  - die durch Heregulin induzierte ErbB2-Aktivierung in einer ErbB2 und ErbB3 exprimierenden Zelle verringert.
- Antikörper nach Anspruch 1, der auch die Bindungsaffinität von Heregulin für das ErbB3-Protein erhöht.
- Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, der ein monoklonaler Antikörper ist.
- Antikörper nach Anspruch 3, der humanisiert ist.
- Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, der vom Menschen stammt.
- Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5, der ein Antikörperfragment ist.
- Antikörperfragment nach Anspruch 6, das ein Fab ist.

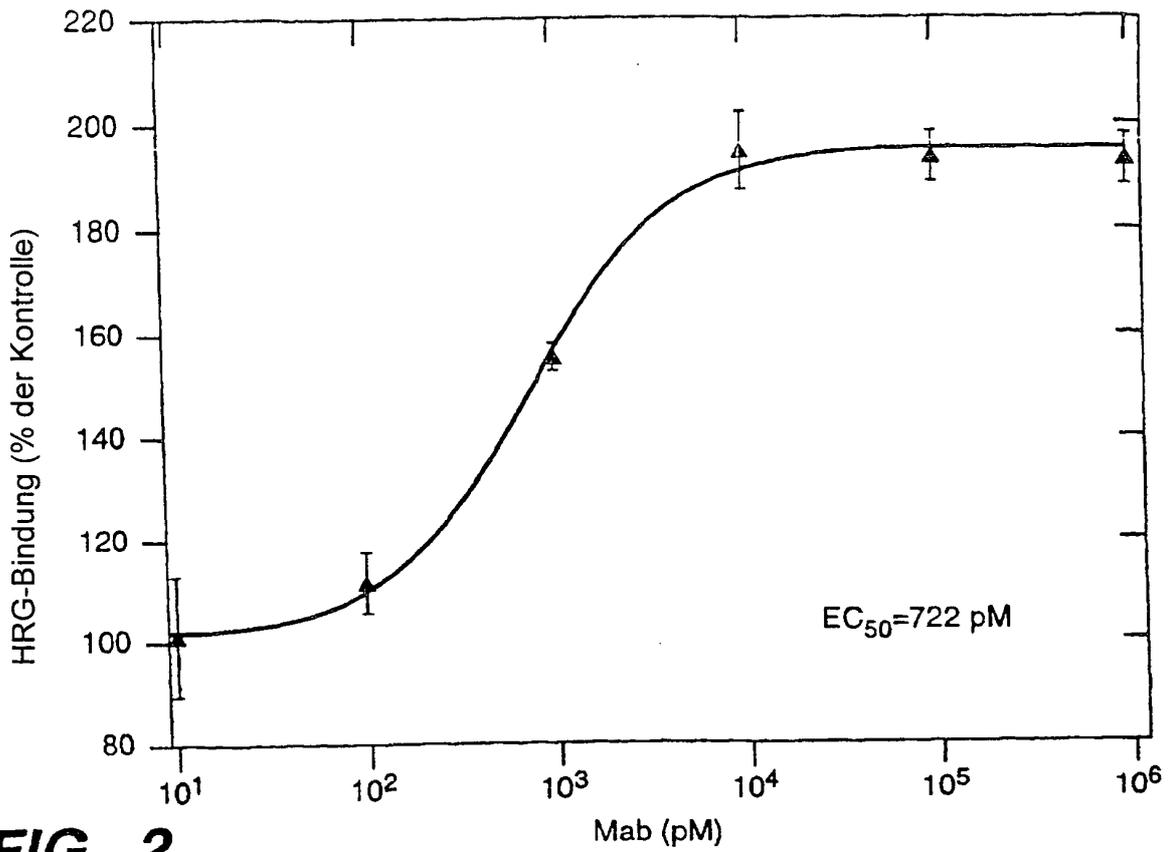
8. Antikörper, der an das Epitop bindet, das vom 8B8-Antikörper gebunden wird, der aus der Hybridomzelllinie ATCC Nr. HB-12070 erhältlich ist.
9. Antikörper nach Anspruch 8, der aus der Hybridomzelllinie ATCC Nr. HB-2070 erhältlich ist.
10. Antikörper, der die komplementätsbestimmenden Regionen des 8B8-Antikörpers aufweist, der aus der Hybridomzelllinie ATCC Nr. HB-12070 erhältlich ist.
11. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 10, der markiert ist.
12. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 11, der an einer festen Phase immobilisiert ist.
13. Zusammensetzung, die einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.
14. Zelllinie, die einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 10 produziert.
15. Hybridomzelllinie, die den 8B8-Antikörper produziert (ATCC Nr. HB-12070).
16. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Verwendung in einem medizinischen Behandlungsverfahren.
17. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 10 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Leidens, bei dem eine übermäßige Aktivierung des ErbB2-ErbB3-Proteinkomplexes erfolgt, wie beispielsweise bei benignen und malignen Tumoren; Leukämien und lymphoiden Malignitäten; neuronalen, gliaastrozytalen, hypothalamischen und anderen glandulären, makrophagien, epithelialen, stromalen und blastozölichen Leiden; sowie entzündlichen, angiogenen und immunologischen Störungen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

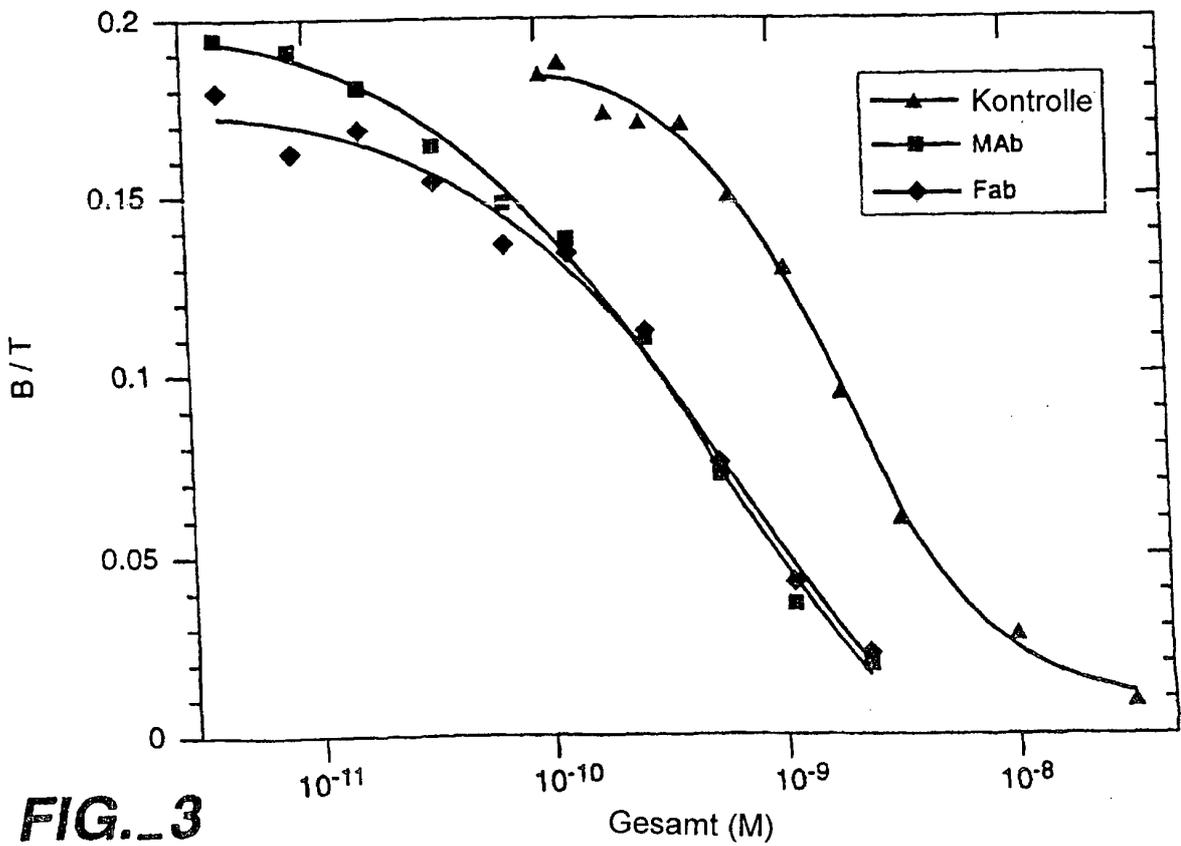
Anhängende Zeichnungen



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**