



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 574 T2** 2005.08.25

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 635 030 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 574.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/03292**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 912 147.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/021232**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.04.1993**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.10.1993**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.01.1995**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.08.2005**

(51) Int Cl.7: **C07K 14/415**

A61K 39/395, A61K 47/48

(30) Unionspriorität:

867728 10.04.1992 US

(73) Patentinhaber:

**Research Development Foundation, Carson City,
Nev., US**

(74) Vertreter:

Meissner, Bolte & Partner GbR, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ROSENBLUM, Michael G., Houston, US;
SHAWVER, Laura K., San Fransisco, US**

(54) Bezeichnung: **GEGEN C-ERB B-2 (HER-2/NEU) VEWANDTE OBERFLÄCHENANTIGENE GERICHTETE IMMUN-
TOXINE**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ganz allgemein auf das Gebiet der Behandlung von Tumorerkrankungen. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf neue Immun-Konjugate und deren Einsatz bei der Behandlung von Tumorerkrankungen.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Bei Tumorerkrankung handelt es sich um eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Morbidität in der westlichen Welt. Krankhafte Zustände mit Gewebeneubildungen, z. B. Tumorleiden oder „Krebsarten“, haben mindestens ein charakteristisches Merkmal gemeinsam, nämlich den Aspekt, dass dabei Defekte in den Regelprozessen im Zellwachstum eine Rolle spielen.

[0003] Der Prozess, durch den normale Zellen zu bösartigen Zellen werden, war jahrzehntelang Gegenstand intensiver Studien. In jüngerer Zeit hat sich die Forschung auf die Rolle der Onkogene beim Prozess der Krebsentwicklung konzentriert. Onkogene sind Gene, welche die Fähigkeit besitzen, Zellen von Eukaryoten so zu transformieren, dass sie in einer Weise wachsen, die analog zum Wachstum von Krebszellen ist.

[0004] Ein Onkogen wird gebildet, wenn ein normales Gen bzw. Protoonkogen mutiert, umorganisiert oder vermehrt ausgebildet wird. Eines dieser Onkogene ist das Protoonkogen c-erbB-2(HER-2/neu). Im folgenden Text wird dieses Onkogen als c-erbB-2 bezeichnet. Dieses Gen kodiert ein Protein ähnlich dem Rezeptor für den Wachstumsfaktor der Epidermis. Das vermehrte Auftreten dieses Protoonkogens kann zu einer Kaskade zellulärer Ereignisse führen, die in unregelmäßiges Zellwachstum mündet.

[0005] Bei Antikörpern handelt es sich um Proteine, die das Immunsystem eines Tieres oder des Menschen normalerweise im Ansprechen auf fremde Antigene oder Antigen-Determinanten ausbildet. Antikörper lagern sich an dem spezifischen Antigen an, auf das sie ausgerichtet sind. Die Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper hat den Forschern ein mögliches Mittel an die Hand gegeben, um mit selektiv therapeutischen Mitteln auf Zellen zu zielen, bei welchen definierte Antigene übermäßig stark ausgeprägt sind.

[0006] Tecce et al. (Anti-Cancer Research 1990, Jahrg. 10 (5A), Seite 1454) haben Immunotoxine zu einem Her-2-Produkt hergestellt, bei welchen zwei monoklonale Antikörper verwendet werden, die an gp 185 unterschiedliche Epitope erkennen, welche mit dem pflanzlichen Toxin Saporin konjugiert sind. Nach Sivam et al. (Cancer Research 47, 3169–3175, 15. Juni 1987) ist Gelonin kovalent an den monoklonalen Antikörper 9.2.27 angebunden, der auf ein menschliches Glykoprotein/Proteoglycan ausgerichtet ist, das mit einem Melanom in Verbindung steht.

[0007] Die übermäßige Ausprägung des Protoonkogens c-erbB-2 wurde bei der neoplastischen Transformation postuliert. Bei mehreren Typen menschlicher Krebsarten, unter anderem einigen Mammakarzinomen und einigen Ovariumkarzinomen, liegt ein vermehrt vorhandenes Gen c-erbB-2 vor. Darüber hinaus wurden das vermehrte Auftreten und anschließende übermäßig starke Ausprägung mit einer dürrtigen Krankheitsprognose in Verbindung gebracht. Somit bestehen ein großer Bedarf und ein starker Wunsch auf diesem Gebiet, ein Verfahren zur selektiven Anpeilung einer Zelle, die eine übermäßige Ausprägung des Onkogens c-erbB-2 zeigt, mit einem chemotherapeutischen Mittel zu entwickeln, um das Zellwachstum bei Zellen zu modulieren, bei denen eine übermäßig starke Ausprägung des Proteins vorliegt. Mit der vorliegenden Erfindung werden Mittel geschaffen, um dieses Ziel zu erreichen.

KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung schafft eine neue Zusammensetzung, die ein Konjugat einer Protein-Zieleinheit, z. B. einen Antigen-Bindungsbereich, aufweist, der eine Bindungsspezifität für eine Antigenomäne für das Protein c-erbB-2 zeigt, mit einem von einer Pflanze stammenden Toxin aufweist, wobei das Toxin aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Gelonin und rekombinantem Gelonin mit der gesamten Länge besteht. Eine derartige Zusammensetzung kann als Immunotoxin zur spezifischen Anpeilung von Tumorzellen, bei denen übermäßige Ausprägung des Proteins c-erbB-2 vorliegt, mit einem Modulator für das Zellwachstum fungieren.

[0009] Somit ist bei einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung eine neue Zusammensetzung von Stoffen vorgesehen, welche ein Konjugat einer Protein-Zieleinheit mit Bindungsspezifität für das Protein

c-erbB-2, z. B. den monoklonalen Antikörper TAb 250, ein V_H -Segment eines Antikörpers, eine schwere Kette eines intakten Immunglobulins, ein V_L -Segment eines Antikörpers, eine leichte Kette eines intakten Immunglobulins und eine toxische Einheit umfasst. Die toxische Einheit kann ein biologischer Reaktionsmodifizierer sein. Bei einem speziellen Ausführungsbeispiel handelt es sich bei der toxischen Einheit um ein von Pflanzen stammendes Toxin mit viel geringerer Wirkung auf Zellen, wenn es nicht mit der Zieleinheit konjugiert ist. Dieses Toxin kann aus der Gruppe gewählt werden, die aus nativem Toxin oder rekombinantem Toxin besteht. Bei einem weiteren Ausführungsbeispiel ist die toxische Einheit Gelonin.

[0010] Ein weiteres Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung sieht eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung eines krankhaften Zustands mit Gewebeneubildungen vor, z. B. einer Erkrankung, die sich durch das vermehrte Auftreten oder die übermäßige Ausprägung des Onkogens c-erbB2 in Zellen gekennzeichnet ist, wobei einem behandlungsbedürftigen Patienten eine zytotoxisch wirksame Dosis eines erfindungsgemäßen Immunotoxin verabreicht wird.

[0011] Ein weiteres Ausführungsbeispiel sieht eine Zusammensetzung vor, welche des Weiteren einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist.

[0012] Ein anderes Ausführungsbeispiel sieht ein Verfahren zur Abtötung von Tumorzellen in vitro vor, an die sich im typischen Fall die erneute Einbringung in einen Wirt anschließt. Zum Beispiel wird bei der Behandlung eines krankhaften Zustands am Knochenmark bei einem daran leidenden Patienten Knochenmark entnommen und mit einer Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt.

[0013] Ein weiteres Ausführungsbeispiel sieht eine Zusammensetzung zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines übermäßig ausgeprägten Proteins c-erbB-2 bzw. Tumorzellen vor, zum Beispiel Zellen aus einem Mammakarzinom, Zellen aus einem Eierstockskarzinom, Zellen aus einem Lungenkarzinom, Karzinomzellen aus einer Speicheldrüse, Zellen aus einem Magengeschwür, Zellen eines Adenokarzinoms aus dem Kolon und Leukämiezellen aus Knochenmark.

[0014] Ein anderes Ausführungsbeispiel sieht ein in-vitro-Verfahren zur Behandlung einer Tumorzelle vor, wobei das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Dosis der Zusammensetzung in die Zellen umfasst.

[0015] Nach einem anderen Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Verhinderung des erneuten Auftretens einer Neoplasie-Krankheit vorgesehen. Das erneute Auftreten wird durch die Verabreichung einer zytotoxisch wirksamen Dosis zur Behandlung mit dem Zieltoxin verhindert, z. B. einem Immunotoxin wie zum Beispiel das Antikörper-Gelonin TAb 250.

[0016] Gemäß einem noch anderen Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung sind neue Zusammensetzungen von Substanzen vorgesehen, welche Fusionskonstrukte von Zieleinheiten mit Bindungsaffinität für das Protein c-erbB-2 und eine toxische Einheit enthalten. Vorzugsweise handelt es sich bei der Zieleinheit um einen Antikörper, welche ein extrazelluläres Epitop von c-erbB-2, z. B. TAb 250, erkennt und bei dem die toxische Einheit relativ inert ist, wenn sie separat von der Zieleinheit, z. B. Gelonin, appliziert wird. Bei weiteren Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Verlängerung der Überlebensdauer eines Säugetiers vorgesehen, welches einen Tumor hat, indem zielgerichtete Toxine gemäß dieser Erfindung diesem Säugetier verabreicht werden, und ebenso ein Verfahren zum Verzögern der Wachstumsgeschwindigkeit von Tumoren durch Verabreichung von zielgerichteten Toxinen gemäß der vorliegenden Erfindung. Im typischen Fall werden die zielgerichteten Toxine mittels einer immunologischen Bindungszone, z. B. eines Segments für die Anbindung von Antikörpern, auf ihr Ziel gerichtet. Des Weiteren ist eine pharmazeutische Zusammensetzung vorgesehen, welche ein Immunotoxin enthält, das im Wesentlichen aus einer toxischen Einheit besteht, die mit einem monoklonalen Antikörper konjugiert ist. Ganz besonders bevorzugt wird, dass der Antikörper TAb 250 ist und die toxische Einheit Gelonin ist.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] [Fig. 1](#) stellt die Auswirkungen des ZME-Antikörpers, des Antikörpers TAb-250 oder der Immun-Konjugate von TAb 205 und Gelonin bei SKOV-3-Zellen dar, mit ELISA gemessen;

[0018] [Fig. 2](#) zeigt die Zytotoxizität des Konstrukts aus TAb 250 und Gelonin bei SKOV-3-Zellen;

[0019] [Fig. 3](#) demonstriert den Wettbewerb zwischen dem relevanten Antikörper gegenüber dem irrelevanten Antikörper und dem Konjugat bei SKOV-3-Zellen;

[0020] **Fig. 4** zeigt die Beziehung zwischen Dosis und Reaktion sowie die Auswirkungen des Konjugats aus Tab 250 und Gelonin bei SKOV-3-Zellen auf;

[0021] **Fig. 5** stellt die Zytotoxizität von TAb 250 und des Konjugats aus TAb 250 und Gelonin bei SKOV-3-Zellen dar;

[0022] **Fig. 6** zeigt die Fähigkeit des Antikörpers TAb 250 zur Einverleibung bei verschiedenen Zelllinien

[0023] **Fig. 7** zeigt die Zytotoxizität des Immuno-Konjugats aus TAb 250 und Gelonin beim MTT-Nachweis auf.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0024] Im Zusammenhang mit dieser Beschreibung ist eine zelluläre Zieleinheit in der Lage, sich selektiv an ein Protein c-erbB-2 anzubinden, deren Expression auf einer Zelle vorhanden ist, im typischen Fall auf deren Oberfläche. Hierzu gehört ein Protein, das eine spezifische Anbindung für eine Antigen-Domäne zur Anbindung an das Protein c-erbB-2 aufweist, z. B. intakte Antikörper oder deren Epitop-Anbindungsfragmente. Dies umfasst sowohl klassische Antikörpermoleküle, Chimären-Versionen, Einzelketten und modifizierte Antikörper-Fragmente, welche ihre Spezifität und Affinität bei der Epitop-Anbindung behalten.

[0025] Im Kontext dieser Beschreibung bezieht sich der Begriff „Immunglobulin“ oder „Antikörper-Peptid(e)“ auf ein ganzes Immunglobulin oder einen ganzen Antikörper oder auch auf jedes funktionale Anbindungsfragment eines Immunglobulin-Moleküls. Zu den Beispielen für solche Peptide gehören vollständige Antikörper-Moleküle, Antikörper-Fragmente, wie zum Beispiel Fab, F(ab)₂, CDRs, V_L, V_H und jeder andere Teil eines Antikörpers, insbesondere solche, die eine Spezifität oder Affinität zur Antigen-Anbindung zeigen. Zum Beispiel ist ein IgG-Antikörpermolekül aus zwei leichten Ketten zusammengesetzt, von denen jede durch Disulfid-Brücken an zwei schweren Ketten angebonden ist. Die zwei schweren Ketten sind ihrerseits durch Disulfid-Brücken mit einander in einem Bereich verbunden, der als Gelenkbereich des Antikörpers bekannt ist. Ein einzelnes IgG-Molekül besitzt im typischen Fall ein Molekulargewicht von etwa 150–160 kD und enthält zwei Antigen-Anbindungsstellen. Fragmente solcher Moleküle, z. B. schwere oder leichte Ketten allein, können gelegentlich ein Antigen binden. Antikörper, Fragmente von Antikörpern und einzelne Ketten können von ihrer Funktion her äquivalent zu Immunglobulinen sein.

[0026] Eine normale schwere oder leichte Antikörper-Kette besitzt einen N-endständigen (NH₂)-variablen (V)-Bereich und einen C-endständigen (-COOH)-konstanten (C)-Bereich. Der variable Bereich der schweren Kette wird als V_H bezeichnet (der beispielsweise V_V umfasst) und der variable Bereich der leichten Kette wird als V_L bezeichnet (der V_K oder V_λ) enthält. Bei dem variablen Bereich handelt es sich um den Teil des Moleküls, der sich an das artverwandte Antigen des Antikörpers anbindet, während der Bereich Fc (die zweite und dritte Domäne des C-Bereichs) die Effektor-Funktion des Antikörpers festlegt (z. B. Komplement-Fixierung, Opsonisierung). Immunglobulin in voller Länge oder „leichte Ketten“ des Antikörpers (im Allgemeinen etwa 25 Kd, etwa 214 Aminosäuren) werden mittels eines Gens mit variablem Bereich an N-Terminus (im Allgemeinen etwa 110 Aminosäuren) und eines Gens mit κ- (Kappa-) oder λ-konstantem Bereich am COOH-Terminus kodiert. „Schwere Ketten“ von Immunglobulin in voller Länge oder eines Antikörpers (im Allgemeinen etwa 50 Kd, etwa 446 Aminosäuren) werden in ähnlicher Weise mit einem Gen mit variablem Bereich (das im Allgemeinen etwa 116 Aminosäuren kodiert) und einem der Gene mit konstantem Bereich, z. B. Gamma (das etwa 330 Aminosäuren kodiert) kodiert. Im typischen Fall umfasst „V_L“ den Abschnitt der mit den Gensegmenten V_L und/oder J_L (J oder angrenzender Bereich) kodierten leichten Kette und umfasst „V_H“ den mit den Gensegmenten V_H und/oder D_H (D oder Diversitätsbereich) kodierten Abschnitt der schweren Kette. Vgl. ganz allgemein Roitt et al. „Immunology, Kapitel 6 (2. Auflage 1989) und Paul: „Fundamental Immunology“, Raven Press (2. Auflage, 1989).

[0027] Ein variabler Bereich einer leichten oder schweren Kette eines Immunglobulins besteht aus einem „Gerüst“-Bereich, der von drei hypervariablen Bereichen unterbrochen wird, die auch als Komplementaritäts-bestimmende Bereiche bzw. CDRs bezeichnet werden. Der Umfang des Gerüstbereichs und der CDRs wurden definiert (vgl. „Sequences of Proteins of Immunological Interest“ von E. Kabat et al., U.S. Gesundheits- und Sozialministerium, 1987).

[0028] Die Sequenzen der Gerüstbereiche verschiedener leichter oder schwerer Ketten sind innerhalb einer Spezies relativ erhalten. Die Gerüstbereiche eines Antikörpers, also der kombinierten Gerüstbereiche der diesen bildenden leichten und schweren Ketten, dienen zur Positionierung und Ausrichtung der CDRs im dreidi-

mensionalen Raum. Die CDRs sind in erster Linie für die Anbindung an ein Epitop eines Antigens verantwortlich. Die CDRs werden im typischen Fall als CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet, wobei die Nummerierung sequentiell vom N-Terminus aus beginnt.

[0029] Die beiden Arten leichter Ketten, κ und λ , werden als Isotypen bezeichnet. Isotypische Determinanten sind im typischen Fall in dem konstanten Bereich der leichten Kette angesiedelt, der ganz allgemein auch als C_L und insbesondere als C_{κ} oder C_{λ} bezeichnet wird. Der konstante Bereich des Moleküls mit schwerer Kette, der auch als CH bekannt ist, bestimmt den Isotyp des Antikörpers. Antikörper werden je nach dem Isotyp der schweren Kette nach IgM, IgD, IgG, IgA und IgE eingeteilt. Die Isotypen sind jeweils in den μ -, Delta- (Δ), Gamma- (Γ), Alpha- (α) und Epsilon- (ϵ)-Segmenten des konstanten Bereichs der schweren Kette kodiert. Außerdem gibt es noch eine Reihe von γ -Untertypen.

[0030] Der Isotyp der schweren Kette legt verschiedene Effektor-Funktionen des Antikörpers fest, wie zum Beispiel die Opsonisierung oder die Komplement-Fixierung. Außerdem bestimmt der Isotyp der schweren Kette die ausgeschiedene Form des Antikörpers. Ausgeschiedene IgG-, IgD- und IgE-Isotypen finden sich im typischen Fall in einer einzelnen Einheit oder in Monomeren-Form. Der ausgeschiedene IgM-Isotyp findet sich in Pentamer-Form; ausgeschiedenes IgA kann sowohl in Monomer- als auch in Dimer-Form gefunden werden.

[0031] Bei einem Fragment $F(ab')_2$ fehlt der endständige C-Abschnitt des konstanten Bereichs einer schweren Kette und normalerweise besitzt das Fragment ein Molekulargewicht von etwa 110 kD. Es behält zwei Anbindungsstellen für Antigene und die Disulfid-Bindungen zwischen den Ketten im Gelenkbereich, doch besitzt es nicht die Effektor-Funktionen eines intakten IgG-Moleküls. Ein $F(ab')_2$ -Fragment kann man durch proteolytisches Aufschließen mit Pepsin bei einem pH-Wert von 3,0 bis 3,5 aus einem IgG-Molekül unter Einsatz standardisierter Verfahren erhalten, wie sie von Harlow und Lane (s. oben) beschrieben wurden.

[0032] Ein „Fab“-Fragment weist eine leichte Kette und den N-endständigen Abschnitt der schweren Kette auf, die durch Disulfid-Bindungen mit einander verbunden sind. Im typischen Fall besitzt es ein Molekulargewicht von etwa 50 kD und enthält eine einzige Anbindungsstelle für ein Antigen. Fab-Fragmente kann man durch begrenzte Reduzierung aus $F(ab')_2$ -Fragmenten oder durch Aufschließen mit Papain in Anwesenheit von Reduktionsmitteln aus dem ganzen Antikörper erhalten. (vgl. Harlow und Lane, s. oben). In bestimmten Fällen reicht die Konzentration des Reduktionsmittels, das notwendig ist, um die Aktivität des Papains in Anwesenheit von Sauerstoff aus der Luft aufrecht zu erhalten, aus, um die Disulfid-Bindungen zwischen den Ketten am Antikörper vollständig zu reduzieren. Dies kann zum Verlust der Erkennung des Antigens führen. Um dieses Problem zu umgehen, kann das Papain aktiviert und dann in einen Puffer ausgetauscht werden, der das Reduktionsmittel in einer Konzentration enthält, die mit der Aufrechterhaltung der Bindungsaktivität des Antigens kompatibel ist. Der Aufschluss des Antikörpers wird im typischen Fall in inerter Atmosphäre ausgeführt, um eine Deaktivierung des Papains zu verhindern.

[0033] Das nachfolgende Protokoll gibt ein Beispiel für diesen Prozess wieder:

- A) Aktivierung des Papains: Papain, das in Form einer NH_4SO_4 -Suspension in einer Stärke von 10 mg/ml zugeführt wurde, wird in 10 mM EDTA, 20 mM Cystein, pH-Wert = 8,0, bis zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml aufgelöst. Die Lösung wird entgast und 2 Stunden lang in Stickstoffatmosphäre inkubieren gelassen.
- B) Das aktivierte Papain wird in 20 mM $NaPO_4$, pH-Wert = 7,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 30 μ M DTT ausgetauscht.
- C) Aufschließen des Antikörpers: 1 mg aktiviertes Papain wird auf jeweils 100 mg des Antikörpers zugesetzt und die Lösung wird gegenüber einem großen Überschuss von 20 mM $NaPO_4$, pH-Wert = 7,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 30 μ M DTT unter kontinuierlichem Begasen mit Helium dialysiert. Die Dialyse dient dazu, einen molaren Überschuss des Reduktionsmittels während des Ablaufs des Aufschließvorgangs aufrecht zu erhalten.
- D) Nach 2 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur wird durch Zusatz von Jodacetamid der Aufschluss beendet.
- E) Fab-Fragmente werden unter Einsatz herkömmlicher Chromatographie-Verfahren aus nicht aufgeschlossenem oder teilweise aufgeschlossenem Antikörper-Material abgetrennt.

[0034] Im Zusammenhang mit dieser Beschreibung sind die Begriffe „Fab“ oder jedes andere Antikörper-Fragment ähnlich einklassifiziert, wenn sie bei der vorliegenden Erfindung im Zusammenhang mit den allgemeinen Begriffen „Antikörper“ oder „Immunglobuline“ eingesetzt werden. Somit Werden die Begriffe „Fab-Protein eines „Säugetiers“, „Chimären-Fab“ und dergleichen in Analogie zu den entsprechenden Definitionen nach dem allgemeinen Sprachgebrauch verwendet, wie sie in den nachfolgenden Abschnitten vorkommen.

[0035] Im Kontext mit dieser Beschreibung bezieht sich der Begriff „Chimären-Antikörper“ oder „Chimären-Peptide“ auf die Antikörper bzw. Antikörper-Peptide, bei denen ein Teil des Peptids eine Aminosäuren-Sequenz aufweist, die von einer entsprechenden Sequenz bei einem Antikörper oder Peptid stammt oder homolog zu diesem ist, wobei der Antikörper bzw. das Peptid von einer ersten Genquelle stammt, während der restliche Abschnitt der Kette(n) homolog zu entsprechenden Sequenzen einer anderen Genquelle ist. Zum Beispiel kann ein Chimären-Antikörperpeptid mit schwerer Kette einen variablen Bereich von der Maus und einen konstanten Bereich vom Menschen enthalten. Die beiden Genquellen gehören zwar im typischen Fall zu zwei separaten Arten, doch sind sie gelegentlich auch nur einer einzigen Spezies zuzuordnen.

[0036] Chimären-Antikörper bzw. -Peptide werden im typischen Fall unter Einsatz von molekularen und/oder zellulären rekombinanten Techniken hergestellt. In vielen Fällen besitzen Chimären-Antikörper variable Bereiche sowohl mit leichten als auch mit schweren Ketten, welche die variablen Bereiche von Antikörpern nachahmen, welche von einer Säugetierart stammen, während die konstanten und/oder Gerüst-Abschnitte homolog zu den Sequenzen in Antikörpern sind, die von einer zweiten, anderen Säugetierart stammen.

[0037] Im Zusammenhang mit dieser Beschreibung beschränkt sich jedoch die Definition eines Chimären-Antikörpers nicht auf dieses Beispiel. Bei einem Chimären-Antikörper handelt es sich um einen Antikörper, bei dem eine oder beide schweren oder leichten Ketten aus Kombinationen von Sequenzen aufgebaut sind, welche die Sequenzen bei Antikörpern aus verschiedenen Quellen nachahmen, gleich ob diese Quellen zu unterschiedlichen Klassen gehören, eine unterschiedliche Reaktion auf Antigene zeigen oder von ihrer Herkunft her zu unterschiedlichen Arten gehören, und ob der Fusionspunkt sich an der Grenze zwischen einem variablen und einem konstanten Bereich befindet oder nicht. Zum Beispiel können Chimären-Antikörper Antikörper enthalten, bei denen das Gerüst und die CDRs aus unterschiedlichen Quellen stammen. Zum Beispiel werden CDRs, die nicht vom Menschen stammen, in Gerüstbereiche vom Menschen integriert, welche mit einem humanen konstanten Bereich verbunden sind, um so „humanisierte Antikörper“ herzustellen. Vgl. z. B. die veröffentlichte PCT-Anmeldung Nr. WO 87/02671; US-Patentschrift Nr. 4,816,567; die europäische Patentanmeldung EP 0173494; Jones et al. in: „Nature“, 321: 522–525 (1986); und Verhoeyen et al. in: „Science“, 239: 1534–1536 (1988).

[0038] Im Kontakt der vorliegenden Beschreibung bezeichnet der Begriff „humanähnlicher Gerüstbereich“ einen Gerüstbereich für jede Antikörper-Kette und umfasst normalerweise mindestens etwa 70 Aminosäurereste, im typischen Fall 75 bis 85 oder noch mehr Reste. Die Aminosäurereste des humanähnlichen Gerüstbereichs betragen mindestens etwa 80%, vorzugsweise etwa 80 bis 85% und ganz bevorzugter Weise mehr als 85% Reste, die homolog zu denen bei humanem Immunglobulin sind. Dieses Merkmal, das gemeinsam mit anderen endogenen Antikörpern vorliegt, ist bei der Erzeugung einer Zieleinheit von Nutzen, das nur eine geringere Immunreaktion hervorruft, z. B. einen Mechanismus, welcher die Reaktion auf „Eigen“-Markierstoffe minimiert.

[0039] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Beschreibung bezieht sich der Begriff „humanisiertes“ bzw. „humanähnliches Immunglobulin“ auf ein Immunglobulin, das einen humanähnlichen Gerüstbereich und einen konstanten Bereich aufweist, der im Wesentlichen homolog zu einem konstanten Bereich von humanem Immunglobulin ist, z. B. einen Bereich, der mindestens etwa 80% oder mehr, vorzugsweise etwa 85 bis 90% oder mehr und ganz bevorzugter Weise etwa 95% oder mehr Homologie besitzt. Somit sind die meisten Teile eines humanähnlichen Immunglobulins, evtl. mit Ausnahme der CDRs, im Wesentlichen homolog zu entsprechenden Teiles von einem oder mehr nativen Sequenzen von humanem Immunglobulin.

[0040] Im Kontext dieser Beschreibung bezieht sich der Begriff „hybrider Antikörper“ auf einen Antikörper, bei welchem jede Kette separat homolog ist, bezogen auf eine Kette eines Antikörpers von einem Säugetier, doch stellt die Kombination eine neue Gruppe dar, so dass zwei verschiedene Antigene von dem Antikörper erkannt werden. Bei hybriden Antikörpern ist ein Paar aus schwerer und leichter Kette homolog zu dem, was bei einem Antikörper zu finden ist, der gegen ein Merkmal zur Antigen-Erkennung – z. B. ein Epitop – angezüchtet wurde, während das andere Paar aus schwerer und leichter Kette homolog zu einem Paar ist, das sich bei einem Antikörper findet, der gegen ein anderes Epitop angezüchtet wurde. Dies führt zur Eigenschaft einer multifunktionalen Valenz, d. h. zu der Fähigkeit zur gleichzeitigen Anbindung von mindestens zwei verschiedenen Epitopen. Solche Hybriden können selbstverständlich auch unter Verwendung von Chimären-Ketten gebildet werden.

[0041] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Beschreibung bedeutet der Begriff „monoklonaler Antikörper“ eine Zusammensetzung eines Antikörpers, welcher eine diskrete Antigen-Determinante erkennt. Dieser Begriff soll hier nicht hinsichtlich der Herkunftsquelle des Antikörpers oder der Art und Weise, in der er gebildet wurde,

eingeschränkt werden.

[0042] Werden standardisierte Verfahren angewendet, die auf diesem Gebiet allgemein bekannt sind, so können die variablen Bereiche und die CDRs von einem Hybridoma stammen, das einen monoklonalen Antikörper produziert, der für c-erbB-2 spezifisch ist. Die Nukleinsäuresequenzen gemäß der vorliegenden Erfindung, die letztendlich zur Expression der gewünschten Chimären-Antikörper in der Lage sind, lassen sich aus einer breiten Palette verschiedener Nukleotid-Sequenzen (aus den Genom oder cDNS, RNA, synthetische Oligonukleotide, etc.) und Komponenten (z. B. V-, J-, D- und C-Bereiche) sowie mit einer breiten Palette unterschiedlicher Arbeitstechniken bilden. Das Zusammenfügen geeigneter Genom-Sequenzen stellt derzeit ein übliches Verfahren zur Herstellung dar, doch können ebenso auch cDNA-Sequenzen verwendet werden (vgl. veröffentlichtes europäisches Patent Nr. 039400 und Reichmann, L. et al. in: „Nature“, 332: 323–327 (1988)).

[0043] Die humanen DNS-Sequenzen mit konstantem Bereich werden vorzugsweise von unsterblich gemachten B-Zellen isoliert – vgl. z. B. Heiter et al. in: „Cell“, 22: 197–207 (1980), hier durch Querverweis einbezogen; sie können auch aus einer Vielzahl anderer Herkunftsquellen isoliert oder synthetisiert werden. Die Nukleotidsequenz eines humanen Immunglobulins C_{γ1}-Gens wird von Ellison et al. in: „Nucl. Acid. Res.“, 10: 4071 (1982); Beidler et al., in: „J. Immunol.“, 141: 4053 (1988); Liu et al. in: „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 84: 3439 (1987) beschrieben.

[0044] Die CDRs zur Bildung der Immunglobuline gemäß der vorliegenden Erfindung stammen vorzugsweise von monoklonalen Antikörpern, die zur Anbindung an das gewünschte Antigen, das c-erbB-2-Protein, in der Lage sind und in jeder geeigneten Herkunftsquelle bei Säugetieren, unter anderem bei der Maus, der Ratte, dem Kaninchen, dem Hamster oder in anderen Wirtszellen von Wirbeltieren, mit den allgemein bekannten Verfahren gebildet werden, die zur Produktion von Antikörpern in der Lage sind. Geeignete Herkunftszellen für die DNS-Sequenzen und die Wirtszellen zur Expression und Sekretion von Immunglobulin können aus einer Reihe von Herkunftsquellen gewonnen werden, zum Beispiel aus der amerikanischen Kultursammlung „American Type Culture Collection ATCC“ („Catalogue of Cell Lines and Hybridomas“, fünfte Auflage (1985), Rockville, Maryland, USA).

[0045] Neben den Chimären-Antikörperpeptiden, die hier speziell beschrieben werden, können auch andere „im Wesentlichen homologe“ modifizierte Immunglobuline unter Einsatz verschiedener rekombinanter DNS-Techniken leicht konzipiert und hergestellt werden, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind. Modifizierungen der Gene lassen sich leicht mit einer breiten Palette allgemein bekannter Arbeitstechniken bewerkstelligen, zum Beispiel mit der örtlich ausgerichteten Mutagenese (vgl. Gillmann und Smith in: „Gene“, 8: 81–97 (1979) und Roberts, S. et al. in: „Nature“ 328: 731–734 (1987)).

[0046] Diese Modifizierungen können Zusätze, Auslöschungen, Substitutionen von Aminosäuren, vorzugsweise konservierender Art, und weitere Veränderungen an der Polypeptid-Sequenz umfassen, während die entsprechende Eigenschaft bzw. biologische Aktivität beibehalten wird. Alternativ können auch Polypeptid-Fragmente hergestellt werden, die nur einen Teil der primären Antikörperstruktur umfassen und Bindungs- und/oder Effektor-Aktivitäten besitzen. Auch weil die mit Immunglobulin in Zusammenhang stehenden Gene wie viele Gene separate Funktionsbereiche enthalten, von denen jeder eine oder mehrere ausgeprägte biologische Aktivitäten besitzt, können die Gene an Funktionsbereiche von anderen Genen angeschmolzen werden, um Fusionsproteine (z. B. Immunotoxine) mit neuen Eigenschaften oder neuen Kombinationen von Eigenschaften zu bilden.

[0047] Die geklonten variablen und konstanten Bereiche lassen sich aus Plasmiden isolieren und zu einem Säugetier-Expressions-Vektor verknüpfen, z. B. pSV2-neo oder pRSV-gpt, um so eine funktionale Transkriptionseinheit zu bilden. Diese Expressions-Vektoren können dann in Wirtszellen eingeschleust werden. Myelomzellen von der Maus, z. B. SP 2/0- oder P3X-Zellen, sind ein bevorzugter Wirt, da sie kein endogenes Immunglobulin-Protein ausscheiden und alle Komponenten enthalten, die bei der Immunglobulin-Expression gebraucht werden. Myelom-Zellen können unter Verwendung geeigneter und vorstehend beschriebener Arbeitstechniken eingeschleust werden.

[0048] Auf diesem Gebiet sind auch andere Arten von Beschleunigern und Verstärkern bekannt, die für andere Wirtszellen spezifisch sind. Vgl. Kameyama, K. et al. (wie oben). Zum Beispiel kann die DNS-Sequenz, welche die Aminosäuresequenz für den Chimären-Antikörper kodiert, mit allgemein auf diesem Gebiet bekannten Verfahren (vgl. Kriegler, s. oben) an Hefeschleuniger und -verstärker angebunden und in die Hefe eingeschleust werden.

[0049] Dem gleichen Nachweis kann gefolgt werden, um die für c-erbB-2 spezifischen CDRs aus einer Quelle, zum Beispiel einer Säugetier-Spezies, und die Gerüstbereiche einer anderen Quelle, zum Beispiel einer anderen Säugetier-Spezies, von einander zu trennen. Die CDRs können dann an die Gerüstbereiche und konstante Bereiche angebunden werden, um einen Chimären-Antikörper zu bilden. Vgl. PCT-Anmeldung Nr. GB88/00731 (1989) und US-Anmeldung S. N. 07/808,462, angemeldet am 12. Dezember 1991.

[0050] Die CDRs könnten in einem Expressions-Vektor geklont werden, zum Beispiel in humanen Gerüstbereichen und konstanten Bereichen.

[0051] Ein weiteres Beispiel ist eine rekombinante DNS-Sequenz, welche die schwere und/oder leichte Kette CDR1, CDR2 und CDR3 einer Spezies, zum Beispiel von der Maus, und die Gerüstbereiche einer humanen schweren Kette aufweist, um einen für c-erbB-2 spezifischen Antikörper zu kodieren. Zu den weiteren Möglichkeiten gehören die Verwendung von CDRs, die für c-erbB-2 spezifisch sind, von einem Teil des variablen Bereichs, der CDR1 und CDR2 von einer Säugetierart umfasst, und dann die Anbindung dieser Sequenz an eine weitere, welche die Gerüstbereiche einer zweiten Säugetierart kodiert, an CDR3 der ersten; oder die Einschleusung einer rekombinanten DNS-Sequenz, welche eine für c-erbB2 spezifische schwere Kette der CDR2 kodiert, welche von einer ersten Säugetier-Spezies stammt und innerhalb des Gerüsts von einer zweiten Säugetierart mit einer leichten Kette durchsetzt ist, welche eine DNS-Sequenz mit variablem Bereich, die von einer ersten Spezies stammt, und den von der zweiten Spezies stammenden konstanten Bereich enthält.

[0052] Rekombinante DNS-Expressions-Vektoren, welche Antikörper-Sequenzen enthalten, können durch Elektroporation in die Wirtszellen eingeschleust werden. Es wird mit Standardverfahren zur Auswahl gearbeitet, um Klone zu isolieren, welche den für c-erbB-2 spezifischen Chimären-Antikörper produzieren.

[0053] Antikörper können aus Bakterien wie zum Beispiel E. coli in einer entsprechenden gefalteten Form dargestellt werden, unter anderem als Antikörper mit einzelner Kette. Vgl. Pluckthun in: „Biotechnology“, 9: 545 (1991); Huse et al. in: „Science“, 246: 1275 (1989) und Ward et al. in: „Nature“, 341: 544 (1989).

[0054] Die Antikörper-Peptidsequenzen können unter Einsatz einer Polymerasekettenreaktion – bzw. PCR –, einer Technik, die zum Amplifizieren einer interessierenden DNS-Sequenz unter Verwendung von wärmostabiler DNS-Polymerase, z. B. Taq-Polymerase, sowie von Polymerase- und Oligonukleotid-Startern amplifiziert werden, wie sie alle in „PCR Protocols“, herausg. von Innis et al., Academic Press, Inc. (1990) beschrieben werden. Vgl. auch Orlandi (s. oben) und Larrick et al. in: „Biotechnology“, 7: 934 (1989).

[0055] Bei dem c-erbB-2-Protein (das hier der Einfachheit halber auch nur als c-erbB-2 bezeichnet wird) handelt es sich um ein Membran-Glykoprotein von 185 Kd (Kilodalton), das eine Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzt und in Zusammenhang mit dem Rezeptor für den Epidermis-Wachstumsfaktor EGFR steht, von diesem aber unterscheidbar ist. Wie das EGFR-Protein besitzt das c-erbB-2-Protein eine extrazelluläre Domäne, welche zwei an Cystein reiche Wiederholungs-Cluster, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Kinase-Domäne aufweist. Außerdem wurden die Aminosäuren-Sequenz des c-erbB-2-Proteins wie auch die Nukleotid-Sequenz von Coussens et al. in „Science“, 230: 1132 (1985) beschrieben.

[0056] Das c-erbB-Protein wird von dem c-erbB-2-Onkogen kodiert, das 1985 von drei verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben wurde: Semba et al. in: „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 82: 6497 (welches das Gen als c-erbB-2 bezeichnet); Coussens et al. (s. oben) (welches das Gen als HER-2 bezeichnet) und King et al. in: „Science“, 229: 1132 (welches das Gen als mit v-erbB verwandt bezeichnet). Somit sind die c-erbB-2-Gensequenz und ihre entsprechende Proteinsequenz allgemein bekannt und werden im Stand der Technik beschrieben. Das c-erbB-2-Protein besitzt eine definierte intrazelluläre Konstruktion, einen Transmembran-Bereich und einen extrazellulären Bereich. Im typischen Fall binden sich die Zieleinheiten gemäß der vorliegenden Erfindung an den extrazellulären Bereich, der an der Tumorzelle nach außen exponiert sein sollte. Die Zieleinheit erkennt im Allgemeinen ein oder mehrere dort angetroffene Merkmale, unter anderem Stellen zur Erkennung eines Antigens, z. B. Epitope. Die Epitope richten sich zwar häufig auf reine Polypeptid-Epitope aus, entweder Determinanten in Form einer linearen Peptid-Sequenz oder Formanpassungs-Determinanten, doch können sie auch auf Epitope ausgerichtet sein, die Kohlenhydrat-Komponenten enthalten. Die Epitope können somit kombinierte Protein-/Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Komponenten allein enthalten. Weitere Modifizierung Komponenten an dem normalen oder abnormalen Protein bieten ebenfalls wichtige Epitopen-Determinanten.

[0057] Der Nachweis des c-erbB-2-Proteins kann durch allgemein bekannte Immuno-Assays bewerkstelligt werden, bei welchen Antikörper verwendet werden, die für das c-erbB-2-Protein spezifisch sind, wie zum Bei-

spiel die hier beschriebenen. Solche Antikörper sind im Handel erhältlich und können beispielsweise von Chemicon International, Inc., Temecula, Kalifornien bezogen werden, oder sie können durch standardisierte immunologische Verfahren hergestellt werden. Vgl. z. B. Harlow und Lane in: „Antibodies: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Publications, N. Y. (1988).

[0058] Es ist hier beabsichtigt, dass die Definition des c-erbB-2-Proteins sich auch auf jene Proteine erstreckt, die aus anderen Wirtssystemen entwickelt werden, z. B. Proteine, die immunologisch mit dem humanen c-erbB-2-Protein verwandt sind. Zum Beispiel wurde von einem verwandten Gen von der Ratte (als neu bezeichnet) bei Schecter et al. in: „Science“, 229: 976 (1985) berichtet.

[0059] Zu den nützlichen Epitopen, an welchen Antikörper leicht angezüchtet werden können, gehören extrazelluläre Epitope, die man auf Zielzellen findet. Diese Epitope sind im Allgemeinen Protein-Epitope, z. B. lineare oder Anpassungs-Epitope des Proteins, wie man sie bei Tumorzellen antrifft. Zu weiteren nützlichen Epitopen gehören nicht-proteinhaltige Komponenten, darunter Kohlenhydrate oder andere Modifizierungen, üblicherweise nach der Translation, die man bei dem c-erbB-2-Protein findet. Antikörper und andere Bindungsbe- reiche, die eine Bindungsspezifität für übermäßig stark ausgeprägtes c-erbB-2 zeigen, können gegen Frag- mente des Proteins angezüchtet werden.

[0060] Monoklonale Antikörper der Maus wurden gegen den extrazellulären Bereich von c-erbB-2 hergestellt. Ein Beispiel für einen solchen Antikörper ist TAb 250, das bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (ATCC) hinterlegt wurde und die Zugangsnummer HB10646 hat.

[0061] Alternativ kann eine Protein-Zieleinheit mit jedem anderen Zielverfahren abgeleitet werden, welche für eine c-erbB ausprägende Zelle affin und spezifisch ist. Zum Beispiel wäre ein Ligand, der von dem c-erbB2-Protein erkannt und gebunden wird, eine nützliche Zieleinheit. Vgl. zum Beispiel Ciccodicola et al. (1989) in: „Embo J.“, 8: 1987–1991; Ciardiello et al. (1991) in: „Cancer Research“, 51: 1051–1054; und Ciardiello et al. (1991), in: „P. N. A. S. USA“, 88: 7792–7796, welche CRIPTO beschreiben, ein Molekül, das sich als Ligand für den EGF-Rezeptor dienlich erweist und sich wahrscheinlich auch spezifisch mit dem c-erbB-2-Pro- tein bindet.

[0062] Im Falle der hier beschriebenen Sequenzen sollte es offensichtlich sein, dass Varianten dieser Se- quenzen auch einbezogen sind, zum Beispiel Mutationen durch Substitution, Addition und/oder Auslöschung, oder auch jede andere Sequenz, welche eine im Wesentlichen ähnliche Bindungsaktivität bei der Anbindung an die Sequenzen zeigen, von denen sie stammen oder denen sie in anderer Weise ähnlich sind.

[0063] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung ist ein Antikörper oder ein anderes Peptid für ein c-erbB-2-Protein spezifisch, sofern sich der Antikörper oder das Peptid an c-erbB-2 bindet oder zur Anbindung daran in der Lage ist, z. B. ein Protein, das durch standardisierte Antikörper-Antigen-Nachweise oder Ligan- den-Rezeptor-Nachweise, zum Beispiel Konkurrenz-Versuche, Sättigungsversuche oder standardisierte Im- munoassays wie ELISA oder RIA, gemessen oder bestimmt wird. Diese Definition der Spezifität gilt für ein- zelne schwere und/oder leichte Ketten, CDRs, Fusionsproteine oder Fragmente von schweren und/oder leich- ten Ketten, die ebenfalls für das c-erbB-2-Protein spezifisch sind, sofern sie sich an das c-erbB-2-Protein allein binden oder wenn sie bei Einbeziehung in die Immunglobulin-Ausbildung mit komplementären variablen Be- reichen und konstanten Bereichen, je nach Eignung, dann in der Lage sind, eine spezifische Anbindung an das c-erbB-2-Protein einzugehen.

[0064] Bei den Konkurrenz- Versuchen lässt sich die Fähigkeit eines Antikörpers oder eines Peptidfragments zur Bindung eines Antigens dadurch nachweisen, dass die Fähigkeit des Peptids ermittelt wird, in Wettbewerb zur Bindung einer Brücke zu treten, von der bekannt ist, dass sie das Antigen bindet. Zahlreiche Arten von Kon- kurrenz- Versuchen sind bekannt und werden hier besprochen. Alternativ können auch Versuche herangezo- gen werden, mit welchen die Bindung einer Versuchsverbindung bei fehlendem Hemmstoff bzw. Inhibitor ge- messen wird. Die Fähigkeit eines Moleküls oder einer anderen Verbindung zur Bindung des c-erbB-2-Proteins kann zum Beispiel dadurch nachgewiesen werden, dass das interessierende Molekül direkt markiert wird, oder seine Markierung kann entfernt werden und dann ist ein indirekter Nachweis unter Verwendung verschiedener Sandwich-Nachweisformate möglich. Es sind zahlreiche Arten von Bindungsversuchen wie zum Beispiel Kon- kurrenz-Bindungs-Versuche bekannt (vgl. beispielsweise US-Patente Nr. 3,376,110; 4,016,043; Harlow und Lane in: „Antibodies: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Publications, N. Y. (1988) und Coligan et al. (Herausg.) in: „Current Protocol in Immunology“ Wiley and Sons, N. Y.). Versuche zum Messen der Bindung einer Versuchsverbindung an eine Komponente allein statt Heranziehung eines Konkurrenz- Versuchs stehen ebenfalls zur Verfügung. Zum Beispiel können Immunglobuline dazu verwendet werden, die Anwesenheit des

c-erbB-2-Proteins zu identifizieren. Standardisierte Verfahrensweisen für Versuche mit monoklonalen Antikörpern, zum Beispiel ELISA, können auch herangezogen werden (vgl. Harlow und Lane, s. oben). Zu einer Übersicht der verschiedenen Systeme, welche Signale erzeugen und die eingesetzt werden können, wird auf die US-Patentschrift 4,391,904 verwiesen.

[0065] Außerdem lässt sich die Spezifität der Bindungseinheiten gegenüber c-erbB-2 anhand ihrer Affinität bestimmen. Eine solche Spezifität liegt vor, wenn die Dissoziierungs-Konstante ($K_D = 1/k$, wobei K die Affinitäts-Konstante ist) der Einheit $< 1 \mu\text{M}$ beträgt, vorzugsweise $< 100 \text{ nM}$ und ganz bevorzugter Weise $< 1 \text{ nM}$. Der K_D -Wert der Antikörper-Moleküle liegt dabei im typischen Fall in den unteren Bereichen. Dabei gilt: $K_D = [R - L]/[R][L]$, wobei $[R]$, $[L]$ und $[R - L]$ die Konzentrationen am Gleichgewichtspunkt jeweils des Rezeptors bzw. von c-erbB-2 (R), des Liganden, des Antikörpers oder des Peptids (L) und des aus dem Rezeptor und dem Liganden bestehenden Komplexes ($R - L$) bedeuten. Im typischen Fall gehören zu den Bindungs-Wechselbeziehungen zwischen dem Liganden oder Peptid und dem Rezeptor oder dem Antigen reversible nicht-kovalente Zuordnungen wie zum Beispiel die elektrostatische Anziehung, van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbindungen.

[0066] Zu weiteren Versuchsformaten kann der Nachweis der Anwesenheit oder des Fehlens verschiedener physiologischer oder chemischer Veränderungen gehören, welche sich aus dieser Wechselwirkung ergeben, wie zum Beispiel die Abwärtsmodulation, die Einverleibung oder eine Steigerung der Phosphorylierung, wie dies in der US-Patentanmeldung Nr. 07/644,361 beschrieben wird, die am 18. 1. 1991 eingereicht wurde. Vgl. Hierzu auch „Receptor-Effector Coupling – A Practical Approach“, herausg. von Hulme, IRL Press, Oxford (1990).

[0067] Ein bevorzugte Peptid, das für das c-erbB-2-Protein spezifisch ist, führt eine Steigerung der Phosphorylierung des c-erbB-2-Proteins herbei, wenn dieses mit Tumorzellen in Berührung gebracht wird, welche das c-erbB-2-Protein ausprägen. Ein Molekül, das „eine Steigerung in der Phosphorylierung des c-erbB-2-Proteins herbeiführt“ ist ein Molekül, das eine nachweisbare Steigerung der Aufnahme von Phosphat in das Protein gegenüber der Aufnahme verursacht, die bei Fehlen des Moleküls auftritt. Im typischen Fall bedeutet diese nachweisbare Steigerung eine Erhöhung der Phosphorylierung um das Zweifache oder noch mehr, vorzugsweise eine Steigerung, die mehr als das Dreifache gegenüber Vergleichsstoffen beträgt. Die Phosphorylierung lässt sich mit den Methoden messen, die auf diesem Gebiet zum Nachweis der Phosphorylierung von Rezeptoren bekannt sind. Vgl. Beispielsweise Cooper et al. in: „Methods in Enzymology“, 99: 387–402 (1983); Antoniades und Pantazis, in: „Methods in Enzymology“, 147: 36–40 (1987) und Lesniak et al. in: „Methods in Enzymology“, 150: 717–723 (1987).

[0068] Im typischen Fall lässt sich die Phosphorylierung dadurch messen, dass intakte Zellen (Lesniak, s. oben) in vivo phosphoryliert werden, oder dass eine Reaktion zur Auto-Phosphorylierung in vitro durchgeführt wird (Antoniades, s. oben). Um zum Beispiel die Phosphorylierung in vivo zu messen, können Versuche durchgeführt werden, bei denen Zellen, die das c-erbB-2-Protein tragen, mit radioaktiv markierten Phosphaten in Kontakt gebracht werden. Um bei dem Versuch in vivo die Phosphorylierung des Rezeptors mit dem c-erbB-2-Protein nachzuweisen, ist es von Vorteil, wenn die Versuchszellen für die Dauer von etwa 12 bis etwa 18 Stunden mit dem markierten Phosphat inkubiert werden. Die Zellen werden in zwei oder mehr Mengen aufgeteilt, wovon einige dem Molekül ausgesetzt werden, von dem erwartet wird, dass es die Phosphorylierung des Rezeptors erhöht, während andere als Vergleichsmengen abgetrennt werden. Anschließend werden die aliquoten Mengen einer Immun-Ausfällung unterzogen, wird der Rezeptor erkannt, zum Beispiel mittels SDS-Polyacrylamid-Gel oder mit auto-radiologischen Verfahren, und dann gilt eine Steigerung der Phosphorylierung als statistisch signifikant, wenn im Vergleich zu den aliquoten Vergleichsmengen im Hintergrund der aliquoten Menge, die dem Versuchs-Molekül ausgesetzt war, eine Erhöhung um das Zweifache oder mehr vorliegt.

[0069] Um die Auto-Phosphorylierung in vitro zu messen, können zum Beispiel Zellen oder Zellextrakte bei anwesendem oder fehlendem Peptid, das für c-erbB-2 spezifisch ist, inkubiert werden. Im Anschluss an die Immun-Ausfällung mit einem Anti-c-erbB-2-Antikörper kann der Immunkomplex mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert und einem auto-radiographischen Verfahren vom Typ SDS-PAGE analysiert werden.

[0070] Ein weiteres Peptid, das für das c-erbB-2-Protein spezifisch ist, ist ein Peptid, das eine Abwärtsmodulierung des c-erbB-2-Proteins herbeiführt. Die „Abwärts-Modulierung des c-erbB-2-Proteins“ wird anhand einer nachweisbaren Verringerung der Präsenz des c-erbB-2-Rezeptors auf den Tumorzellen bestimmt. Eine solche Abwärts-Modulierung wird anhand einer Abnahme der Fähigkeit von Antikörpern oder anderen spezifischen Bindungseinheiten erfasst, sich an das c-erbB-2-Rezeptor-Protein auf den Tumorzellen anzubinden oder die-

ses zu erkennen. Zum Beispiel lässt sich die Abwärts-Modulation durch Inkubation von Tumorzellen, die den c-erbB-2-Protein-Rezeptor tragen, mit dem interessierenden Peptid bestimmen, durch anschließendes Waschen der Zellen und dann durch Kontaktieren der Zellen mit markierten (vorzugsweise radiologisch markierten) Antikörpern, die für das c-erbB-2-Protein spezifisch sind. Das Ausmaß, in dem sich die markierten Anti-c-erbB-2-Antikörper an die Zellen anbinden, welche dem für das c-erbB-2-Protein spezifischen Peptid ausgesetzt waren, wird mit dem Ausmaß verglichen, in dem sich die Antikörper an Vergleichszellen (also Zellen, die nicht dem für c-erbB-2 spezifischen Peptid ausgesetzt waren) binden. Bei diesen Versuchen werden die Zellen vorzugsweise nach dem Waschen direkt mit den markierten anti-c-erbB-2-Antikörpern behandelt.

[0071] Die beobachtete Abwärts-Modulierung ist typischerweise von der Dosis abhängig, was bedeutet, dass das Ausmaß der Abwärts-Modulierung mit der Menge des für der mehr das c-erbB-2-Protein spezifischen Peptids, das dem c-erbB-2-Protein ausgesetzt war, zunimmt. Ein Peptid, das im Vergleich zu den Vergleichszellen eine Verringerung der Bindung der behandelten Zellen an Anti-c-erbB-2-Antikörper um 90% oder mehr herbeiführt, wird dabei bevorzugt.

[0072] Ein weiteres Peptid, das für das c-erbB-2-Protein spezifisch ist, ist ein Peptid, das Tumorzellen bindet, bei welchen das c-erbB-2-Protein ausgeprägt ist; es wird Einverleibt, wenn es mit solchen Tumorzellen in Kontakt gebracht wird. Es kommt zur „Einverleibung“, wenn das Peptid im Zytoplasma der Zellen sequestriert wird. Sobald die Einverleibung abgeschlossen ist, können der Rezeptor und/oder das Peptid in den Lysosomen der Zelle abgebaut oder in die Oberfläche der Zelle zurückgeführt werden. Ein Verfahren zum Bestimmen der Einverleibung eines aus Ligand und Rezeptor bestehenden Komplexes wird auch von Haigler et al. in *J. Biol. Chem.*, 255: 1239–1241 (1980) beschrieben.

[0073] Bei einem Zellwachstums-Modulator handelt es sich um ein Molekül, welches das Wachstum einer Zelle, auf die es ausgerichtet ist, nachteilig beeinflusst. Im typischen Fall muss der Modulator in die Zielzelle Einverleibt werden, doch sorgt normalerweise die Einverleibung, die sich aus der Zieleinheit ergibt, für diese Funktion.

[0074] Die Modulation ist im typischen Fall eine Senkung des Stoffwechsels oder der Wachstumsgeschwindigkeit, vorzugsweise eine toxische Wirkung, doch ist auch eine signifikante Steigerung im Stoffwechsel oder in der Wachstumsgeschwindigkeit ebenfalls von Nutzen. Wenn eine signifikante Verstärkung Stoffwechsels oder in der Wachstumsgeschwindigkeit vorgenommen wird, könnte mit einem kurzzeitig wirksamen Gift in Kombination gearbeitet werden, um nur jene Zellen abzutöten, die eine solche Ausprägung zeigen.

[0075] Bei Modulatoren, welche den Stoffwechsel oder die Wachstumsgeschwindigkeit senken, wird bevorzugt, dass der Modulator eine hohe Potenz besitzt, d. h. dass er eine sehr hohe Aktivität entwickelt.

[0076] Auch wenn es Toxine von Viren und Pilzen gibt, gehören insbesondere Toxine bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs zu den Toxinen, welche die bisher bekannten höchsten spezifischen Aktivitäten entwickeln. Wenn man unter eine Reihe wesentlicher Zellfunktionen, darunter die Nukleinsäure-Synthese, die Proteinsynthese und den Stoffwechsel der Zelle, ganz allgemein oder spezifisch verhindert, kann es zu einem Wachstumsstillstand kommen. Zum Beispiel funktionieren das *Pseudomonas-Exotoxin* und das *Diphtheria-Toxin* dadurch, dass sie die Proteinsynthese in Eukaryoten-Zellen irreversibel zum Erliegen bringen. Bei beiden Beispielen wird der Elongationsfaktor 2, der ein wesentlicher Bestandteil bei der Proteinsynthese ist, durch Enzymwirkung deaktiviert. Andere Elongationsfaktoren können jeweils das Ziel für andere Toxine sein. Ricin dagegen ist ein pflanzliches Toxin, das direkt auf das Ribosom einwirkt und die 28S rRNA beeinflusst.

[0077] Die Wachstums-Modulatoren entwickeln vorzugsweise enzymatische Aktivitäten mit hohem Umsatz, so dass die Einverleibung von sehr wenigen Molekülen bereits die Zielzelle abtöten kann. Vgl. Pastain et al. in: *Science*, 254: 1173–1172.

[0078] Gelonin ist ein Glykoprotein (Molekulargewicht etwa 29–30.000 Kd), das aus dem Samen von *Gelonium multiflorum* gereinigt gewonnen wird und zu einer Gruppe von potenten pflanzlichen Toxinen gehört, welche das Ribosom deaktivieren. Zu den weiteren Angehörigen dieser Klasse gehören Ketten von Abrin, Ricin und Modeccin. Gelonin unterbindet – wie Abrin und Ricin – die Proteinsynthese dadurch, dass es die Untereinheit 60S bei Ribosomen von Säugetieren beschädigt. Gelonin erweist sich als gegenüber chemischer und physikalischer Behandlung stabil. Des Weiteren bindet sich Gelonin selbst nicht an Zellen an und ist normalerweise nicht toxisch (ausgenommen in hohen Konzentrationen), wenn es allein zugeführt wird; außerdem ist es in der Handhabung im Labor sicher. Die Deaktivierung von Ribosomen ist unumkehrbar, scheinbar keine Ko-Faktoren einzuschließen und tritt mit einer Wirksamkeit auf, die den Schluss nahe legt, dass Gelonin enzymatisch wirkt.

[0079] Gelonin und Ricin unterbinden die Protein-Synthese und gehören zu den wirksamsten Toxinen, bezogen auf das Proteingewicht. Gelonin hat dabei eine 10- bis 1.000-fach höhere Wirksamkeit bei der Unterbindung der Proteinsynthese als die Ricin-A-Kette. Peptide wie Ricin und Abrin bestehen aus zwei Ketten, und zwar einer A-Kette, die eine toxische Einheit darstellt, und einer B-Kette, die durch Anbindung an Zellen wirksam ist. Im Unterschied zu Ricin und Abrin besteht Gelonin aus einer einzigen Kette, und da bei dieser Substanz eine B-Kette zur Anbindung an Zellen fehlt, ist es selbst vergleichsweise inert bzw. gegenüber intakten Zellen nicht toxisch. Dieses Merkmal, dass eine viel geringere zelluläre Wirkung vorliegt, wenn keine Konjugierung an eine Bindungs- oder Zieleinheit vorgesehen ist, stellt ein wichtiges Merkmal bei den verschiedenen Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung dar. Diese differentielle Toxizität spielt bei der hohen Spezifität gegenüber Zellen eine große Rolle, die c-erbB-2 ausprägen.

[0080] Offensichtlich fehlt Zellen von Säugetieren die Fähigkeit zur Anbindung an das native Gelonin-Molekül und/oder zu dessen Einverleibung. Konjugate von Gelonin mit einem auf einen Tumor zielenden Reagens, zum Beispiel dem monoklonalen Antikörper TAb 250, der auf einen Tumor ausgerichtet ist, welcher mit einem Antigen in Verbindung steht, das auf bestimmten Tumorzellen vorhanden ist, bieten sowohl ein spezifisches Verfahren zur Anbindung des Gelonins an die Zelle als auch einen Weg für die Einverleibung des aus Gelonin und Antikörper bestehenden Komplexes.

[0081] Die toxische Einheit des Immunotoxins kann ein toxisches Medikament oder ein enzymatisch wirksames Toxin pflanzlichen Ursprungs sein oder auch ein enzymatisch aktives Fragment („A-Kette“) eines solchen Toxins.

[0082] Die aktiven Toxine können mit jeder beliebigen Anzahl von Wirkungsmechanismen wirksam werden, von denen sich jeder nachteilig auf die physiologischen Gegebenheiten der Zelle und deren Wachstum auswirkt. Bei den Toxinen kann es sich um Substanzen handeln, welche den Stoffwechselunterbinden, oder um Gifte, um Stoffe, welche die Nukleinsäure-Synthese unterbinden, um Substanzen, welche die Proteinsynthese unterbinden, oder um jeden anderen Vermittler abnormaler oder zerstörerischer Funktionen. Besonders bevorzugt ist dabei die Konjugation mit Gelonin.

[0083] Aktive Fragmente und Derivate umfassen alle Verbindungen, welche die gleiche Kernstruktur wie die Struktur des Gelonins in voller Länge aufweisen, aber es fehlt ihnen die gesamte primäre Sequenz. Diese Fragmente bzw. Derivate entwickeln die gleiche oder sogar eine bessere biologische oder toxische Wirkung wie Gelonin. Die Toxizität der Geloninfragmente bzw. Gelonin-Derivate kann routinemäßig von Fachleuten auf diesem Gebiet unter Heranziehung des Versuchs mit Reticulozyten-Lysat vom Kaninchen bestimmt werden.

[0084] Die Zieleinheit und der Modulator für das Zellwachstum können unter Verwendung einer großen Zahl verschiedener bifunktionaler Mittel zur Protein-Kopplung konjugiert werden. Beispiele für derartige Reagenzien sind N-succinimidyl 3-(2-Pyrididyl-dithio)(propionat) (SPDP), 2-IT, 4-succinimidyl-oxycarbonyl- α -Methyl- α (2-Pyridyl-Dithio)Toluol (SMPT), bifunktionale Derivate von Imidoestern wie zum Beispiel Dimethyl-Adipimidat, HCl, aktive Ester wie Disuccinimidyl-Suberat, Aldehyde wie Glutaraldehyd, bis-Azido-Verbindungen wie bis(p-Azidobenzoyl)Hexan-Diamin, bis-Diazonium-Derivate wie zum Beispiel bis-(p-Diazoniumbenzoyl)-Ethylen-Diamin, Di-Isozyanate wie zum Beispiel Tolylen 2,6-Di-Isozyanat und bis-aktive Fluorverbindungen wie zum Beispiel 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol.

[0085] Vor der Verwendung bei diesen Untersuchungen lässt man die Sp2/0-Ag14-Zellen anfänglich in Anwesenheit von 0,1 μ g/ml nativem Gelonin aufwachsen. Im Verlauf von mehreren Monaten erhöht sich die Konzentration von Gelonin allmählich so lange, bis die Zellen in bis zu 10 mg/ml gehalten werden können. Die Zellen werden dann durch Beschränkung der Verdünnung in Anwesenheit von 10 mg/ml Gelonin geklont und die sich daraus ergebenden Kolonien, die gegenüber Gelonin resistent sind, werden expandiert. Gelonin wird dann für zwei Durchgänge aus dem Kulturmedium entfernt, und dann werden die Zellen wieder gereizt, indem sie Gelonin ausgesetzt werden, um die Entwicklung von stabil resistenten Klonen zu bestätigen. Nach Tests zur Bestätigung der Produktion und Aktivität des Chimären-TAb-250 wird ein gegenüber Gelonin resistenter Antikörper gezüchtet, der SP2/0 Zellen produziert, und wird durch Inkubation mit einer Restriktions-Endonuklease die cDNS für den TAb-250-Antikörper aus der Gesamt-DNS entfernt. Parallel hierzu wird die cDNS aus JM105 E. coli, welche optimiertes Gelonin ausprägt, entfernt, gereinigt und wird nach Aufschluss mit HindIII und Eco RI das die DNS kodierende Gelonin entfernt. Das Gelonin-Gen wird in das Fragment der schweren Kette durch Ligation eingebunden und das eingesetzte Stück wird wieder in die gegenüber Gelonin resistenten SP2/0-Zellen eingefügt. Anschließend werden Sub-Klone der Zellen dadurch hergestellt, dass die Verdünnung begrenzt wird und die Klone sowohl auf die Produktion von Chimären-Antikörpern als auch auf den Gelonin-Gehalt hin durchgeprüft werden. Schließlich werden positive Klone expandiert und danach wird das rekomb-

binante Fusions-Protein gereinigt und untersucht, sowohl mit Versuchen zur Ermittlung der Zytotoxizität in vitro als auch in vivo zur Bestimmung der Verteilung im Gewebe, der Pharmakokinetik, des therapeutischen Einsatzes als auch der Toxizität. Ein Vergleich der Eigenschaften des Fusionsproteins von TAB-250-Gelonin der vorstehend beschriebenen TAB-250-Gelonin-Konstrukte wird durchgeführt, um die Vorteile und Nachteile jedes einzelnen zu ermitteln. Aufgrund dieser Studien kann an Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs eine klinische Untersuchung des chimärischen Fusionsproteins von TAB-250-Gelonin durchgeführt werden.

[0086] Die Verabreichung der Immunotoxine gemäß der vorliegenden Erfindung an eine Person, bei der die Ausbildung von Tumorzellen diagnostiziert wurde, z. B. ein Tumor mit einem unerwünschten Niveau der Ausprägung des c-erbB-2-Onkogens, gestattet die Anpeilung und Konzentrierung des zytotoxischen Mittels an der Stelle, wo es benötigt wird, um diese Zellen abzutöten. Indem die toxischen Mittel in dieser Weise zielgerichtet eingesetzt werden, wird die unspezifische Toxizität gegenüber anderen Organen, Gewebearten und Zellen aufgehoben, auf ein Mindestmaß reduziert oder zumindest abgemildert.

[0087] Bei Verwendung der Immunotoxine gemäß der vorliegenden Erfindung in vivo zu therapeutischen Zwecken werden diese dem Patienten oder einem Tier in therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht, d. h. in Mengen, bei welchen die Tumorbelastung beseitigt oder verringert wird. Normalerweise erfolgt die Verabreichung parenteral, vorzugsweise intravenös, doch können auch andere Verabreichungswege als geeignet in Betracht kommen. Die Dosis und der Dosierungsplan sind von der Art des Krebses (primärer Krebs oder Metastasen) und dessen Population abhängig, ebenso von den charakteristischen Merkmalen des speziellen Immunotoxins, z. B. dessen therapeutischem Index, vom Patienten, von der Vorgeschichte des Patienten und anderen Faktoren. Die verabreichte Menge des Immunotoxins liegt im typischen Fall im Bereich zwischen etwa 0,1 und etwa 10 mg/kg des Körpergewichts des Patienten. Der Behandlungsplan wird weitergeführt, um die Wirksamkeit zu optimieren, während er gegenüber negativen Auswirkungen der Behandlung ausgeglichen wird. Vgl. „Remington's Pharmaceutical Science“, 17. Auflage (1990), Mark Publishing Co., Easton, Penn.; sowie Goodman und Gilman: „The Pharmacological Basis of Therapeutics“, 8. Auflage (1990), Pergamon Press.

[0088] Zur parenteralen Verabreichung werden die Immunotoxine meistens in einer Dosierungseinheit in injizierbarer Form (Lösung, Suspension, Emulsion) in Verbindung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger für die parenterale Verabreichung formuliert. Beispiele für solche Träger sind Wasser, Kochsalzlösung, Ringer-Lösung, Dextrose-Lösung und 5%-iges Albumin aus Humanserum. Nichtwässrige Träger wie zum Beispiel fixierte Öle und Ethyloleate können ebenfalls verwendet werden. Liposome können als Träger verwendet werden. Der Träger kann Zusätze in kleineren Mengen enthalten, wie zum Beispiel Substanzen, welche die Isotonizität und die chemische Stabilität verbessern, z. B. Puffer und Konservierungsstoffe. Das Immunotoxin wird im typischen Fall in solchen Träger in einer Konzentration formuliert, die zwischen etwa 0,1 mg/ml und 10 mg/ml beträgt.

[0089] Die Immunotoxine gemäß der vorliegenden Erfindung können auch bei einem in-vitro-Verfahren Verwendung finden. Zum Beispiel kann das Verfahren zum Abtöten von Tumorzellen aus Knochenmark eingesetzt werden. Bei diesem Verfahren wird als erstes der Person, bei der eine Tumorerkrankung vorliegt, das Knochenmark entnommen. Anschließend wird das Knochenmark mit einer zytotoxisch wirksamen Dosis eines Immunotoxins gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt, um die restlichen Tumorzellen zu entfernen. Die behandelten Knochenmarkzellen können dem Patienten wieder zugeführt werden, um nach einer intensiven Chemotherapie und/oder Bestrahlungstherapie wieder ein Immunsystem aufzubauen, um so alle endogenen hämotoxischen Tumorzellen zu beseitigen.

[0090] Die Immunotoxine gemäß der vorliegenden Erfindung können auch dazu eingesetzt werden, die Überlebensdauer von Säugetieren mit Tumoren zu verlängern und die Wachstumsrate der Zellen der Tumoren zu verlangsamen, die aus Krebszellen im Körper eines Säugetieres bestehen. Zum Beispiel können nackte Mäuse, die fremdverpflanzte Humantumoren tragen, welche unter der Haut oder im Peritoneum wachsen, mit Dosen von Immunotoxin, Antikörpern allein, Toxin allein oder Kochsalzlösung in einer Dosierung von 25 bis 100 mg/kg behandelt werden. Das Maß, in dem das Tumorwachstum inhibiert wird, lässt sich durch die Veränderung in der physischen Größe der subkutanen Tumoren oder durch Verlängerung der Überlebensdauer bei Mäusen messen, die mit intraperitonealen Tumoren behaftet sind, zum Beispiel SKOV-3-Zellen. Solche Studien können nützlich sein oder einen Hinweis auf die Vorgehensweisen liefern, und könnten auch bei anderen Säugetieren, einschließlich Primaten, eingesetzt werden.

[0091] Die nachstehenden Beispiele liefern eine ausführliche Beschreibung der Herstellung, der Charakterisierung und der Verwendung der Immunotoxine gemäß der vorliegenden Erfindung. Diese Beispiele sollen dabei in keiner Weise die Erfindung einschränken.

Beispiel 1

Reinigung von Gelonin

[0092] Bei Stirps et al. in: „I. Biol. Chem., 255, 6947–53 (1980) wird ein Verfahren zur Isolierung von Gelonin beschrieben. Dabei wurden Samen von *Gelonium multiflorum* geschält und wurden die Nüsse in einem Homogenisator mit acht Volumenteilen von 0,14 M NaCl gemahlen, der ein Natriumphosphat von 5 mM enthielt (pH-Wert 7,4). Das Homogenisat wurde über Nacht bei 4°C unter fortgesetztem Rühren stehen gelassen, auf Eis gekühlt und 20 Minuten lang bei 0°C mit 35.000 mal g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, gegen 5 mM Natriumphosphat (pH-Wert 6,5) dialysiert und unter Verwendung eines pm10-Filters konzentriert. Die Probe wurde auf einer CM-52-Ionentauscher-Säule (20 × 1,5 cm) geschichtet, die mit 5 mM Natriumphosphat (pH-Wert 6,5) im Gleichgewicht gehalten wurde. Material, das sich an das Ionentauscher-Harz gebunden hatte, wurde mit 400 ml eines linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0,3 M mit einer Geschwindigkeit von 25 ml pro Stunde bei 4°C eluiert. Dabei wurden Fraktionen zu fünf ml aufgefangen. Die Fraktionen wurden bei 280 nm in einem Spektrophotometer beobachtet. Das Gelonin eluierte in etwa in den Fraktionen 55–70 und war die letzte größere Elutions-Spitze. Die Fraktionen 55–70 wurden in einem Pool zusammengefasst, gegen doppelt destilliertes Wasser dialysiert und durch Lyophilisierung konzentriert. Die Reinheit und das Molekulargewicht jedes Präparats wurde durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie unter Verwendung einer Gel-Permeations-Säule TSK 3000 mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH-Wert 7,4, und durch Gel-Elektrophorese (SDS PAGE) mit 15%-igem Natrium-Dodecyl-Sulphat-Polyacrylamid-Gel geprüft. Das Gelonin wanderte als einzelnes Band mit einem ungefähren Molekulargewicht von 29–30.000 Dalton.

Beispiel 2

Untersuchung der Gelonin-Aktivität

[0093] Die Aktivität von Gelonin wurde in einem zellfreien Versuch zur Inhibierung der Protein-Synthese kontrolliert. Dabei wurde der zellfreie Nachweis zur Inhibierung der Protein-Synthese in der Weise durchgeführt, dass 50 µl Reticulozyten-Lysat vom Kaninchen nacheinander die folgenden Bestandteile zugesetzt wurden, wobei nach jeder Zugabe gemischt wurde: 0,5 ml 0,2 M Tris-HCl (pH-Wert 7,8), 8,9 ml Ethylenglykol und 0,25 ml von 1 M HCl.

[0094] Zwanzig Mikroliter eines Energiegemisches mit Salz-Aminosäure (SAEM) bestehend aus: 0,75 M KCl, 10 mM Mg(CH₃CO₂)₂, 15 mM Glukose, 0,25–10 mM Aminosäuren (ohne Leukin), 5 mM ATP, 1 mM GTP, 50 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,6), 10 µl Kreatinin-Phosphat-Kreatinin-Phosphokinase, 12 µl [³H]-Leukin (Amersham, 74 mCi/mmol) wurden hergestellt und 1,5 µl von Lösungen, die unterschiedliche Konzentrationen der Gelonin-Mischung enthielten, wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde 60 Minuten lang bei 30°C inkubiert. Die Aufnahme von [³H]-Leukin wurde in einer aliquoten Menge des Gemisches kontrolliert, indem das synthetisierte Protein auf Glasfaserfiltern ausgefällt, in 10%-igem TCA und Azeton gewaschen wurde, und die Radioaktivität wurde in einem Beta-Zähler unter Verwendung eines Aquasol-Szintillationsfluids kontrolliert. Gelonin mit einer spezifischen Aktivität von nicht weniger als 4 × 10⁹ U/mg wurde zur Konjugierung mit den Antikörpern verwendet. Eine Einheit der Gelonin-Aktivität ist dabei die Menge des Gelonin-Proteins, welches eine 50%-ige Inhibierung der Aufnahme von [¹⁴C]-Leukin in das Protein in dem zellfreien Versuch herbeiführt.

Beispiel 3

Konjugierung von TAb 250 mit Gelonin

Herstellung von 2-IT-modifiziertem Gelonin

[0095] Gelonin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurde auf etwa 10 mg/ml in einer Anreicherungsanlage Centriprep 10 konzentriert. Triäthanolamin-Hydrochlorid (TA/HCl), pH-Wert 8,0, und EDTA wurden bis zu einer Endkonzentration von 60 mM TEA/HCl und 1 mM EDTA pH-Wert 8,0 zugegeben. Eine Stammlösung von 2-Iminoethanol (50 mM in 60 mM TEA/HCl-Puffer, der 1 mM EDTA enthielt, pH-Wert 8,0) wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt, und die Probe wurde 90 Minuten lang bei 4°C unter einem Strom aus Stickstoffgas unter Rühren inkubiert. Überschüssiges Iminoethanol wurde durch Gelfiltrierung auf einer Sephadex-Säule G-25 (1 × 24 cm) entfernt, die zuvor mit einem Phosphat-EDTA-Puffer, pH-Wert 7,5, ins Gleichgewicht gebracht worden war, der 0,01 M Na₂HPO₄, 0,0018 M KH₂PO₄, 0,0034 M KCl, 0,001 M EDTA und 0,17 M NaCl enthielt. Die Fraktionen wurden auf ihren Protein-Gehalt in Mikrotiterplatten unter Verwendung des Bio-Rad-Nachweises analysiert. Das Gelonin eluierte beim Zwischenraumvolumen (etwa Fraktionen 21–23).

Diese Fraktionen wurden in einen Pool gegeben und bei 4°C gelagert.

Beispiel 4

Herstellung von monoklonalen Antikörpern

[0096] Mäuse vom Stamm BALB/c wurden intraperitoneal (i. p.) und subkutan (s. c.) mit 2×10^6 – 1×10^7 NIH3T3_T-Zellen (NIH373-Zellen mit c-erbB-2 durch Transfektion übertragen) immunisiert, die 1 : 1 in einem kompletten Hilfsstoff nach Freund in Emulsion gebracht waren. Die Tiere wurden alle 2 bis 4 Wochen aufgefrischt. Wenn im ELISA-Test (nachstehend beschrieben) positive Titerwerte nachgewiesen wurden, wurde 4 Tage vor der Fusion eine abschließende Auffrischung i. p. oder intravenös (i. v.) verabreicht. Dann wurden Milzzellen mit P3-X63Ag8.653-Myelom-Zellen fusioniert, die in RPMI 1640, 10% FBS und 2 mM L-Glutamin gehalten wurden. Hybridoma-Überstände wurden auf positive Reaktivität in einem ELISA-Test (s. unten) untersucht bzw. es wurde die Reaktivität der extrazellulären Domäne durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von nicht-fixierten NIH3T3 und NIH3T3_T-Zellen bei 4°C mit nachfolgender zytometrischer Strömungsanalyse bestimmt. Der monoklonale Antikörper TAb 250 kann dann von jeder beliebigen Quelle stammen. Ganz besonders bevorzugter Weise handelt es sich bei den Ani-c-erbB-2-Antikörper, der gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet wird, entweder um einen Antikörper vom Menschen oder um einen Antikörper von der Maus.

[0097] Hybridoma-Zellen, die TAb 250 produzieren, werden in einem kontinuierlich arbeitenden Perforations-Bioreaktor von 2 L gezüchtet. Der Zellen-Überstand aus dem Bioreaktor wird abgefiltert und dann durch ein Protein-G-Trio-System geleitet, woran sich eine Ionenaustausch-Chromatographie anschließt. Das Material wird dann konzentriert und steril gefiltert. Die Untersuchung des Endprodukts umfasst Tests zur Bestimmung der Gesamt-DNS, der Protein-Reinheit, des pH-Werts, (IEF), des Gesamt-Proteins, des Endotoxins, der Potenz, der Identität und des Protein-G-Antigens.

[0098] Bei der vorliegenden Erfindung wird unter anderem ein Chimären-Antikörper verwendet, der einen hybriden Antikörper oder einen humanisierten oder humanähnlichen Antikörper umfasst. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel stammt die variable Sequenz von einer Sequenz des TAb-250-Antikörpers von der Maus und ist im Wesentlichen identisch mit dieser. Ein solcher Chimären-Antikörper ist BACK-250.

Beispiel 5

ELISA-Nachweis

[0099] Sterile 96-Loch-Testplatten wurden 2 Stunden lang bei 37°C mit Rinder-Kollagen von 1 mg/ml in sterilem PBS vorbehandelt. NIH3T3_T-Zellen (NIH353-Zellen, mit dem Träger transformiert) wurden auf 80% Konfluenz gezüchtet und mit warmem Puck-Versene (0,02% EDTA in PBS) geerntet, gewaschen und bei $0,5$ – 1×10^6 Zellen/ml über Nacht bei 37°C in den behandelten Löchern eingebracht. Die Platten wurden vorsichtig gewaschen und mit 10% neutralem gepufferten Formalin behandelt, woran sich ein Blockierschritt mit 1% Albumin aus Rinderserum BSA/PBS anschloss. Die Probenüberstände bzw. Antikörper-Verdünnungen wurden dann den Platten zugesetzt und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert und im Anschluss daran mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert und spezifisch für Ziege/Anti-Maus-IgG Fc war; danach wurde 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit PB gewaschen, ein para-Nitrophenyl-Phosphat und ein Dieäthanolamin-Substrat wurden zugegeben und dann wurde 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert, wonach Aaos gemessen wurde. Überstände bzw. Antikörper, die mit den durch Transfektion infizierten Zellen bei einer Absorptionsfähigkeit von 0,2–1,0, die höher lag als die Absorptionsfähigkeit bei einem negativen Vergleichs-Antikörper, galten als positiv.

Beispiel 6

Herstellung und Handhabung von ¹²⁵I-TAb 250

[0100] TAb 250 wurde unter Verwendung von Iodobeads (Pierce) entsprechend den Vorgaben des Herstellers radioaktiv markiert. Trägerfreies Na¹²⁵I (400 µCi von IMS.30, Amersham) wurde mit 25 µg TAb 250 in 100 mM Na-Phosphat-Puffer (200 µl, pH-Wert 7,4) in Anwesenheit von 3 Iodobeads umgesetzt. Dies führte zu einem ungefähren Verhältnis von einem Jod-Atom pro IgG-Molekül. Die Inkorporierung ließ man 7,5 Minuten mit intermittierendem Rühren ablaufen. Das Reaktionsgemisch wurde von den Jodperlen entfernt und nach 5 Minuten wurde das Volumen mit Na-Phosphat-Puffer auf 0,5 ml eingestellt und 2 µl wurden zur Abschätzung der

spezifischen Aktivität (s. unten) abgenommen. Das verbleibende Volumen wurde durch Gelfiltrierung unter Einsatz einer NAP-5-Säule (Pharmacia) entsalzt, die mit PBS ins Gleichgewicht gebracht wurde, das 0,1% BSA und 0,02 Azid enthält. Der radioaktiv markierte Antikörper wurde in 1 ml Säulenpuffer eluiert und bei 4°C bis zu sechs Wochen ohne erkennbare Einbuße bei der Bindungsaktivität gelagert. Das entsalzte Material war im Wesentlichen frei von nicht inkorporiertem Jod, da > 95% in TCA ausgefällt werden konnten.

[0101] Die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Antikörpers wurde durch TCA-Ausfällung des Materials vor dem Entsalzungsvorgang abgeschätzt. Somit wurden 2 µl des Reaktionsgemischtes 500-fach in Säulenpuffer und doppelten aliquoten Mengen verdünnt, die mit einem gleichen Volumen von eiskaltem 20%-igen TCA vermischt waren. Nach 25 Minuten auf Eis wurde das ausgefällte Material durch Zentrifugieren (10 Min., 3000 × g) aufgefangen. Überstände und Pellets wurden separat gezählt, und die Inkorporierung wurde durch Prozentsätze der Zählungen des mit TCA ausfällbaren Materials ausgedrückt. Die in separaten Jodiergängen erhaltene Inkorporierung lag im Bereich zwischen 27% und 45% und erbrachte Schätzwerte für die spezifische Aktivität zwischen 3,9 und 7,2 µCi/µg. Vor jedem Bindungsversuch wurde eine entsprechende Menge von ¹²⁵I-TAb 250 durch Gel-Filtrierung unter Verwendung einer in Bindungspuffer ins Gleichgewicht gebrachten NAP-5-Säule entsalzt. Mit diesem Vorgang wurden das Azid und das gewonnene Material entfernt, wobei die entfernte Menge routinemäßig zu mehr als 98% in TCA ausgefällt werden konnte.

Beispiel 7

Zell-Kultur

[0102] Verwendet wurden humane Brust-Adenokarzinom-Zelllinien SKB\$-3, MDA-MB-453 und MDA-MB-231 und die humane Eierstocks-Adenokarzinom-Zelllinie SKOV-3. SKBR-3-, MDA-MB-231-, MDA-MB-453-Zellen wurden in einem minimalen essentiellen Medium gehalten, das mit 10% FBS und 2 mM L-Glutamin ergänzt war. Das Medium für die MDA-MB-453-Zellen enthielt auch 1% nichtessentielle Aminosäure und 1% Vitamine. Die SKOV-3-Zellen wurden in modifiziertem Dulbecco-Medium nach Iskow gezüchtet, das mit 10% FBS und M L-Glutamin ergänzt war. Alle Zellkulturen wurden bei 37°C nach Bedarf in 5%-igem oder 10%-igem CO₂ inkubiert.

Beispiel 8

Einverleibung von ¹²⁵I-TAb 250

[0103] Die Einverleibung von ¹²⁵I-TAb 250 wurde dadurch bestimmt, dass der Betrag der Radioaktivität in säureempfindlichen und unempfindlichen Kammern ermittelt wird. Die Zellen wurden geerntet und erneut in eiskaltem Bindungspuffer mit ¹²⁵I-TAb 250 allein (form 6 ng/ml bis 153 ng/ml) oder mit überschüssigem unmarkierten TAb 250 suspendiert, um die unspezifische Bindung zu ermitteln. Nach der Anbindung an die Zellenoberfläche erreichte der radioaktiv markierte Antikörper das Gleichgewicht; die Zellen wurden 5 Minuten lang bei 4°C mit 200 × g zu Pellets geformt und dreimal mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen, um ungebundenes Antikörpermaterial zu entfernen. Die Zellenpellets wurden erneut in eiskaltem Bindungsmedium suspendiert und aliquote Mengen wurden abgenommen, um den Betrag der anfänglichen Anbindung von ¹²⁵I-TAb 250 an die Oberfläche zu bestimmen. Um die Einverleibung des radioaktiv markierten Antikörpers wurden die Zellen auf 37°C erwärmt. Nach Zeitabständen von 15 bis 150 Minuten wurden aliquote Mengen abgenommen und die Zellen durch Abzentrifugieren (1400 × g, 5 Minuten, 4°C) aufgefangen. Die Überstände, die dissoziiertes oder zurückgeführtes Antikörper-Material enthielten, wurden aufgefangen. Die Pellets wurden zweimal in einer sauren Waschlösung (100 µl/Reagenzglas PBS, 1% Glukose, pH-Wert 1) suspendiert. Die Überstände, die an die Oberfläche gebundenes Antikörpermaterial enthielten, wurden zusammengegeben und gezählt. Die Spitzen der Reagenzgläser, welche die restliche, mit Zellen verbundene Radioaktivität enthielten, wurden abgeklemmt und dann wurde gezählt.

[0104] Fig. 6 stellt dar, dass der monoklonale Antikörper TAb 250 nicht in MDA-MB-231-Zellen einverleibt wurde (Grafik B). Im Gegensatz hierzu verleibten sich SKBR-3-Zellen den TAb 250-Antikörper mit höchster Wirksamkeit ein (Grafik A), während die Einverleibung des Antikörpers in SKOV-3-Zellen und MDA-MB-453-Zellen mittelhoch war (Grafik C bzw. D).

Beispiel 9

Modifizierung des monoklonalen Antikörpers TAB 250 mit SPDP

[0105] N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio)(Propionat) (SPDP) in Dimethylformamid wurde als Stammlösung von 3 mg/ml in trockenem Dimethylformamid hergestellt. Da das kristalline SPDP-Material hydrolysiert werden kann, wurde die tatsächliche Konzentration des chemisch reaktiven Quervernetzungsmittels durch spektrophotometrische Verfahren bestimmt, indem die Absorptionsfähigkeit bei 260 nm in einem Doppelstrahl-Spektrophotometer analysiert wurde. Die Konzentration des SPDP-Materials wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Veränderung in der Absorptionsfähigkeit (260 nm)}}{0,02 \times 10^3 \text{ ml mmol}} \times 0,01 \frac{(301)}{\text{}} = \text{mMol/ml/SPDP}$$

[0106] Ein Milligramm des monoklonalen Antikörpers TAB 250 in 1,0 ml phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) wurde in ein Glasröhrchen gegeben. Die SPDP-Stammlösung wurde mit etwa 5-fachem molarem Überschuss langsam in das Röhrchen (etwa 10 µl Stammlösung) unter gleichmäßigem Vermischen zugegeben. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert, wobei während der Inkubationszeit alle fünf Minuten gemischt wurde.

[0107] Überschüssiges, nicht umgesetztes SPDP-Material wurde durch Gel-Filtrierungs-Chromatographie auf einer Sephadex G-25-Säule (1 × 24 cm) entfernt, die zuvor mit 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH-Wert 7,0), der 0,5 mM EDTA enthielt, ins Gleichgewicht gebracht wurden war (Puffer A). Es wurden Fraktionen (0,5 ml) aufgefangen und unter Verwendung des Farbstoff-Bindungs-Versuchs nach Bradford auf ihren Protein-Gehalt untersucht (Vgl. Bradford in: „Anal. Biochem.“, 72: 248–254 (1976)). Die Absorptionsfähigkeit (600 nm) wurde in einer 96-Loch-Testplatte mit Hilfe eines automatischen Mikroplattenlesers Bio-TEK beobachtet. Der Antikörper eluierte beim Zwischenraumvolumen (Fraktionen 14–20) und diese Fraktionen wurden in einem Pool zugesammengfasst und bei 4°C gehalten. Das Protein wurde in einem Mikro-Anreicherungsgerät Centricon-30 konzentriert. Das aufgefangene Material aus dem Centricon wurde mit 100 mM Natriumphosphat-Puffer (pH-Wert 7,0), der EDTA enthielt (0,5 mM), gewaschen. Der Antikörper wurde auf ein Endvolumen von etwa 0,5 bis 0,75 ml konzentriert.

Beispiel 10

Konjugierung des SPDP-modifizierten monoklonalen Antikörpers TAB 250 mit Gelonin, modifiziert mit Iminothiolan

Konjugierung von mit 2-IT modifiziertem Gelonin und TAB 250

[0108] Es wird TAB 250-Gelonin, das mit SMPT verbunden ist, durch Ankopplung von Gelonin, das mit 2-IT modifiziert ist, an den monoklonalen Antikörper TAB 250, modifiziert mit SMPT, hergestellt. Kurz gesagt werden zur Modifizierung von TAB 250 mit SMPT 10 mg des Antikörpermaterials in 1,0 ml PBS im Verhältnis 1 : 1 mit 2X-Boratpuffer (0,05 M Natriumborat, 1,7% Natriumchlorid, pH-Wert 9,0) und 52 µl von 4 mM SMPT in trockenem DMF langsam der Antikörper-Lösung zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur in N₂-Atmosphäre unter Rühren inkubiert. Überschüssiges SMPT wird dadurch entfernt, dass das Reaktionsgemisch durch eine Sephadex G-25-Säule geleitet wird, die einen Phosphat-EDTA-Puffer (pH-Wert 7,5) enthält, und dann werden mit einem Bio-Rad-Nachweis Antikörper-positive Fraktionen ausgewertet. Die Fraktionen werden zusammengfasst und in N₂-Atmosphäre bei 4°C gelagert. Das Quervernetzungsmittel mit 2-IT wird 96 Stunden lang unter Rühren in N₂-Atmosphäre bei 27°C durchgeführt. Das Endprodukt wird gereinigt, wie dies in Beispiel 9 für SPDP beschrieben wird.

[0109] Ein Milligramm des gereinigten Gelonins (2 mg/ml in PBS), das in Beispiel 1 beschrieben wurde, wurde mit Iminothiolan modifiziert, wie dies in Beispiel 3 beschrieben ist. Der monoklonale Antikörper TAB 250, der gemäß der Beschreibung bei Beispiel 9 modifiziert war, wurde mit einem gleichen Gewichtsanteil des modifizierten Gelonins gemischt. Dieses Verhältnis entsprach einem 5-fachen molaren Überschuss an Gelonin gegenüber dem Antikörper. Der pH-Wert des Gemisches wurde durch Zugabe von 0,05 M TEA/HCl-Puffer (pH-Wert 8,0) auf 7,0 eingestellt und dann wurde das Gemisch 20 Stunden lang in Stickstoffatmosphäre bei 4°C inkubiert. Bis zu einer Endkonzentration von 2 mM wurde Jod-Acetamid (0,1 M) zugegeben, um alle verbleibenden freien Sulfhydryl-Gruppen zu blockieren; die Inkubation wurde eine weitere Stunde lang bei etwa 25°C fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur Reinigung durch Gel-Filtrierung bei 4°C gelagert.

Reinigung von Komplexen aus Gelonin und dem monoklonalen Antikörper TAB 250

[0110] Nicht-konjugiertes Gelonin und Produkte mit niedrigem Molekulargewicht wurden durch Gel-Filtrierung auf einer Sephadex S-300-Säule (1,6 × 31 cm), die zuvor auf Gleichgewicht mit PBS eingestellt worden war, aus den Reaktionsgemischen nach Beispiel 10 entfernt.

[0111] Die Reaktionsgemische aus Beispiel 10 wurden mit einem Mikro-Anreicherungsgerät Centricon 30 auf etwa 1 ml konzentriert, ehe sie auf die Sephadex-Säule gegeben wurden. Die Säule wurde mit PBS gewaschen. Es wurden Fraktionen von 1 ml aufgefangen und aliquote Mengen von 50 µl werden dann mit dem Bradford-Nachweis auf Protein analysiert.

[0112] Nicht-konjugiertes Antikörpermaterial wurde aus dem mit Gelonin konjugierten Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie auf einer Säule (1 × 24 cm) aus Blue Sepharose CL-6B entfernt, das zuvor mit 10 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,2, auf Gleichgewicht eingestellt worden war, der 0,1 M NaCl enthielt. Nach Aufgabe der Eluat-Probe aus der S-300-Säule wurde die Säule mit 30 ml desselben Puffers gewaschen, um nicht-konjugiertes Antikörper-Material vollständig zu eluieren.

[0113] Mit Gelonin konjugiertes Antikörpermaterial, das an die Säule gebunden war, wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0,2 bis 2 M NaCl in 10 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,2, eluiert. Der Komplex aus Antikörpermaterial und Gelonin eluierte bei etwa 0,7 M NaCl. Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde mit dem Bradford-Nachweis bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden zusammengefasst und das Elutionsmuster wurde elektrophoretisch auf einem 5%-igen bis 20%-igen Gradienten von nicht-reduzierendem Polyacrylamid-Gel bestätigt. Die Durchflussspitze (Fraktionen 14–20) enthält nur freie Antikörper, während die Fraktionen 50–80, die mit hohem Salzgradienten eluiert waren, das TAB 250/Gelonin-Konjugat enthalten, das frei von nicht-konjugiertem Gelonin bzw. Antikörper ist. Das Endprodukt enthielt den TAB 250-Antikörper, der an 1, 2 und 3 Gelonin-Moleküle angekoppelt war. Der durchschnittliche Gelonin-Gehalt betrug 1,5 Moleküle pro Antikörper-Molekül. Das in vitro-Translationssystem mit Reticulozyten vom Kaninchen wurde zur Ermittlung der Gelonin-Aktivität des im Wesentlichen reinen Komplexes aus Gelonin und TAB 20-Antikörpern. Bei diesem Nachweis wurde eine Aktivitätseinheit als die Menge an Protein definiert, die nötig ist, um im Vergleich zu unbehandelten Vergleichseinheiten eine 50%-ige Inhibierung der Proteinsynthese zu erreichen. Unter Heranziehung dieses Nachweisverfahrens wurde die spezifische Aktivität sowohl des nativen Gelonins als auch des TAB 250/Gelonin-Konjugats mit 2×10^8 U/mg bzw. $8,2 \times 10^5$ U/mg ermittelt. Der im Wesentlichen reine Gelonin-TAB 250-Antikörper ist bei dem Reticulozyten-/Lysat-Nachweis aktiv. Eine Verdünnung der ursprünglichen Probe im Verhältnis von 1 : 1000 veranlasste eine Inhibierung der Protein-Synthese um etwa 50%, was eine Reduzierung der Aufnahme von [14 C]-Leukin im Protein um 50% bedeutet. Somit betrug die Aktivität des ursprünglichen Präparats 1000 U/ml.

[0114] Die Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung können Fusions-Konstrukte des monoklonalen TAB 250-Antikörpers und eine zytotoxische Einheit enthalten. Fusions-Konstrukte des Immunotoxins gemäß der vorliegenden Erfindung kann zum Beispiel nach der folgenden Verfahrensweise hergestellt werden: Die Nukleotidsequenz des variablen Bereichs mit schwerer als auch leichter Kette bei TAB 250 lässt sich leicht ermitteln. Zum Beispiel wird die gesamte RNA aus den TAB 250 produzierenden Zellen mit Quindinium-Thiozyanat extrahiert. Poly A+-RNA lässt sich durch Oligo(dT)-Zellulose-Chromatographie isolieren. Die geeigneten Gene können unter Heranziehung standardmäßiger Techniken isoliert werden, unter anderem der Technik zur reversen Transkription und PCR-Techniken. Ein cDNA-Strang lässt sich aus isolierter mRNA unter Verwendung eines Oligo-dT-Starters und von reverser Transkriptase synthetisieren. Ein solcher cDNS-Strang kann unter Einsatz standardisierter PCR-Techniken mit geeigneten Startern amplifiziert werden. Ein Starter nahe dem Poly-A-Endstück der Information kann entweder auf der Poly-A-Sequenz oder auf gemeinsamen benachbarten Sequenzen aufgebaut werden, die sich in Immunglobulinen von der Maus finden. Vgl. Devereaux, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center und die angeschlossenen Sequenzen-Datenbanken. Ein Primer am anderen Ende des Gens kann aus normalen Sequenzen ausgewählt werden, die sich in Immunglobulinen von der Maus finden. Vgl. Orlandi et al. (1989), in: „PNAS“, 86: 3833–3837 und Larrick et al. (1989) in: „Bio/Technology“ 7: 934–938. Das TAB 250-Gen mit schwerer Kette besitzt eine aufwärts liegende 5'-Sequenz von ATATAG CAGGAC CATATG und beginnt die Kodierung mit ATGAA TTGG GGCTC. Das TAB 250-Gen mit leichter Kette besitzt eine aufwärts liegende 5'-Sequenz TTTAC TTCCT TATTT und beginnt die Kodierung mit ATGGG CATCA AGATG. Diese Starter können dazu verwendet werden, die Gene durch PCK-Technik zu amplifizieren und können zu Vektoren mit Plasmid-Expression geklont werden.

Transfektion von DNS in Mäusezellen durch Elektroporation

[0115] Standardmäßige Transfektions-Verfahren können bei diesen Genen eingesetzt werden. Zum Beispiel kann DNS in Hybridoma-SP2/0-AG14-Zellen von der Maus durch Elektroporation eingebracht werden. $1-2 \times 10^3$ aktiv wachsende SP2/0-AG14-Zellen werden gewaschen und erneut in 1,0 ml sterilem PBS suspendiert. Dreißig Mikrogramm jedes IgK- und IgG1-Chimärenplasmids werden der Zellsuspension zugesetzt. Die DNS/Zellen werden in ein vorgekühlte Schock-Küvette eingebracht, auf Eis mindestens 5 Minuten lang inkubiert und dann wird 10 ms lang ein Stromimpuls von 0,5 kV/cm abgegeben (Transfactor 300, BTX). Nach dem Schock wird das DNS-/Zellen-Gemisch 10 Minuten lang wieder auf Eis gebracht, in 10 ml DMEM verdünnt, das 5% NCTC-109 und 10% FCS enthält, und 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Schließlich werden die Zellen in einen Inkubator bei 37°C mit 7% CO₂ eingebracht und 48 Stunden lang darin belassen, ehe sie in einem selektiven Medium aufgetragen werden, das 1 µg/ml Xanthin enthält. Die Zellen können in 96-Loch-Testplatten bei 3×10^4 Zellen/Loch aufgetragen werden und die Kultur-Überstände werden mit dem ELISA-Nachweis auf Antikörper untersucht, die an Zielzellen angebunden sind, die mit TAb 250-Antigen positiv sind.

Beispiel 12

MTT-Nachweis

[0116] Es wurden Versuche mit 3-(4,5-Dimethyl/Thiazolyl)-2,5-Diphenyltetrazol-Bromid (MTT) dadurch durchgeführt, dass Zellen aus Gewebekulturflaschen mit Versene 1 : 5000 entfernt werden, dass bei $500 \times g$ 5 Minuten lang zentrifugiert wird und dass die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml erneut im Medium suspendiert werden. Die Zellen wurden in einer Menge von 100 µl/Loch in 96-Loch-Mikrotitrerplatten aufgebracht und in einem befeuchteten CO₂-Inkubator bei 37°C 24 Stunden lang inkubiert.

[0117] Am nächsten Tag wurde TAb 250 bzw. TAb 250/Gelonin zugesetzt. Unmittelbar nach dem Absetzen der höchsten Antikörper-Konzentration in der ersten Spalte von Löchern wurden Verdünnungen des Antikörpermaterials von 1 : 2 mittels einer Mehrkanal-Pipette direkt in den Mikrotitrerplatten vorgenommen. Die Platten wurden dann drei Tage lang inkubiert und danach wurden 10 µl/Loch MTT zugegeben. MTT wurde als PBS-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt, gefiltert, sterilisiert und im Dunklen bei 4°C gelagert. Die Platten wurden im Dunklen gehalten und bei 37°C weitere 4 Stunden inkubiert. Die MTT-Kristalle wurden aufgelöst, indem der Inhalt der Löcher mit 100 Mikroliter Isopropanol heftig gemischt, das 0,04 N HCl und 3% Natriumdodecylsulfat enthielt. Die Absorptionsfähigkeit bei 570 nm wurde unter Verwendung eines mit Enzymen verknüpften Lesers für den Immunosorbens-Nachweis (ELISA-Nachweis) bestimmt.

Beispiel 13

CPA

[0118] Der Zell-Proliferations-Nachweis (CPA) misst das Zellwachstum durch Bestimmung der Zellenanzahl und der Lebensfähigkeit. Am Tag 0 werden Zellen mit 80–90% Konfluenz aus einer Gewebekulturflasche freigesetzt, bei $200 \times g$ 6 Minuten lang bei 20°C pelletisiert und in Iskow-MEM, das 2 mM Glutamin und 10% fötales Rinderserum enthält, erneut bis zu einer Konzentration von 6000 Zellen/ml suspendiert. Die Zellsuspension wird in einer Menge von 1 ml pro Loch auf 24-Loch-Testplatten aufgebracht. Am Tag 1 werden die Zellen in drei Löchern mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,05% Trypsin von der Platte freigesetzt und dann werden 500 µl mit einem Coulter-Zähler ausgezählt. 20 µl PBS, TAb 250 oder TAb 250/Gelonin werden in den in den Figuren angegebenen Konzentrationen den restlichen Löchern zugesetzt. Die Platten werden wieder in den Inkubator eingesetzt. Zu den in den Figuren angegebenen Zeitpunkten werden die Zellen mit Trypsin freigesetzt und wie am Tag 1 ausgezählt. Die restlichen 500 µl Zellen werden mit Propidium-Jodid angefärbt, so dass die Lebensfähigkeit durch Strömungs-Zytometrie bestimmt werden kann. Für jeden Punkt auf der Grafik wird eine mittlere Zellenanzahl ($n = 3$) bestimmt und mit dem Prozentsatz lebender Zellen multipliziert, um die Anzahl der lebensfähige Zellen zu ermitteln. Diese wird durch die Anzahl der lebenden Zellen dividiert, die mit PBS behandelt wurden, bezogen auf den Prozentsatz der Vergleichsmenge auf der Y-Achse.

Beispiel 14

Zytotoxizität von Gelonin und des Komplexes aus Gelonin und TAb 250-Antikörper

[0119] Wie aus [Fig. 1](#) ersichtlich ist, hat der ZME-Antikörper wirklich keine Wirkung auf SKOV-3-Zellen. Das

TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugat war dagegen hochaktiv.

[0120] [Fig. 2](#) stellt die Zytotoxizität des TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats bei SKOV-3-Zellen im Vergleich zu Gelonin allein dar. Bei der gleichen Konzentration lag die Toxizität des TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats bei etwa dem 10.000-Fachen der Toxizität von Gelonin allein.

[0121] [Fig. 3](#) zeigt, dass ein irrelevanter Antikörper, der monoklonale ZME 18-Antikörper, keine Konkurrenz-Auswirkung auf die Zytotoxizität des TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats hat. Die steigende Konzentration des monoklonalen TAb 250-Antikörpers senkt dagegen die Zytotoxizität des Immunokonjugats in einer von der Dosis abhängigen Weise.

[0122] [Fig. 4](#) stellt eine Beziehung der Reaktion des TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats bei SKOV-3-Zellen dar. Wie sich bei dem CPA-Nachweis zeigte, erbrachte eine Dosis von über 0,1 Mikrogramm/ml eine Inhibierung um 80% bei sechs Tagen.

[0123] [Fig. 5](#) stellt die Auswirkungen des monoklonalen Antikörpers TAb 250 allein oder des Konjugats von TAb 250 mit Gelonin auf SKOV-3-Zellen dar. Wie daraus ersichtlich ist, liegt dabei eine von der Dosierung abhängige Inhibierung durch das TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats beim CPA-Nachweis vor.

[0124] [Fig. 7](#) ist eine Abbildung der Auswirkungen des TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats auf vier verschiedene Zelllinien. Wie zu erwarten trat der höchste Betrag der Toxizität bei der SKBR-3-Zelllinie auf. Dazwischen liegende Werte der Toxizität wurden bei SKOV-3- und MDA-MB-453-Zellen nachgewiesen, während sich bei den MDA-MB-231-Zellen wirklich keine Zytotoxizität zu beobachten war. Somit korreliert die Zytotoxizität des TAb 250/Gelonin-Immuno-Konjugats mit der Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche dieser Zellen.

[0125] Deshalb wird zusammengefasst deutlich, dass die vorliegende Erfindung und die hier beschriebenen Ausführungsbeispiele sich sehr gut dazu eignen, die gestellte Aufgabe zu erfüllen und die eingangs dargestellten Ziele zu erreichen.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, die folgendes aufweist:
ein Konjugat eines Proteins, das eine Bindungsspezifität für eine Antigenomäne für das Protein c-erbB-2 zeigt, und eines von einer Pflanze stammenden Toxins,
wobei das Toxin aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Gelonin und rekombinantem Gelonin mit der gesamten Länge besteht.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Bindungsspezifität für ein extrazelluläres Epitop von c-erbB-2 gilt.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Protein von einem V_H-Segment eines Antikörpers stammt.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Protein eine schwere Kette eines intakten Immunglobulins aufweist.
5. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein von einem V_L-Segment eines Antikörpers stammt.
6. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein eine leichte Kette eines intakten Immunglobulins aufweist.
7. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein ferner eine schwere Kette eines intakten Immunglobulins aufweist.
8. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein von einer einzigen Kette eines Antikörpers stammt.
9. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Protein von TAb 250 (ATCC-Zugangsnummer HB 10646) oder BACK-250 (humanisiertes TAb 250) stammt.

10. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das von einer Pflanze stammende Toxin einen viel geringeren zellulären Effekt hat, wenn es nicht mit der Zieleinheit konjugiert ist.
11. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Toxin aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus natürlichem Toxin und rekombinantem Toxin besteht.
12. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Konjugat ein Fusionsprotein zwischen der Zieleinheit und dem von einer Pflanze stammenden Toxin ist.
13. Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche, die ferner einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche aufweist.
15. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche bei der Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer neoplastischen Zelle.
16. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung der übermäßigen Ausprägung des Proteins c-erbB-2.
17. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von neoplastischen Zellen, wobei die Zelle aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer Mammarkarzinomzelle, einer Ovariumkarzinomzelle, einer Lungenkarzinomzelle, einer Speicheldrüsenkarzinomzelle, einer Magentumorzelle, einer Adenokarzinomzelle des Kolons und einer Leukämiezelle des Knochenmarks besteht.
18. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Verzögerung der Wachstumsrate von neoplastischen Zellen.
19. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von neoplastischen Zellen von einem Menschen oder einem Tier.
20. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Verhinderung des Wiederauftretens eines neoplastischen Zustandes.
21. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Verlängerung der Überlebenszeit eines Wirtes der neoplastischen Zelle.
22. In vitro Verfahren zur Behandlung einer neoplastischen Zelle, wobei bei diesem Verfahren den Zellen eine wirksame Dosis einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zugeführt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die neoplastische Zelle eine Knochenmarkszelle ist.
24. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Abtötung von neoplastischen Zellen im Knochenmark.
25. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei die Knochenmarkszelle das Protein c-erbB-2 übermäßig ausprägt.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

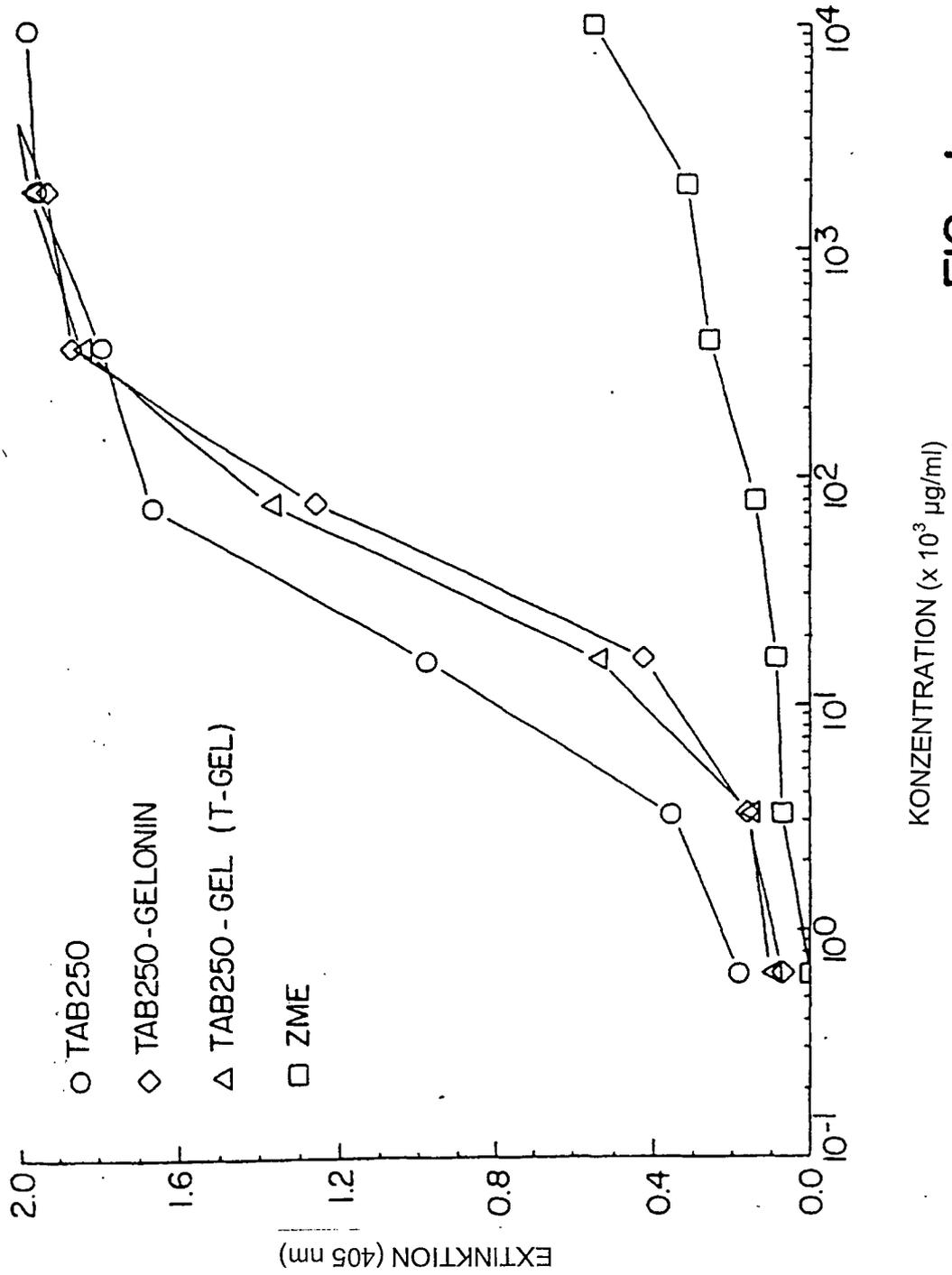


FIG. 1

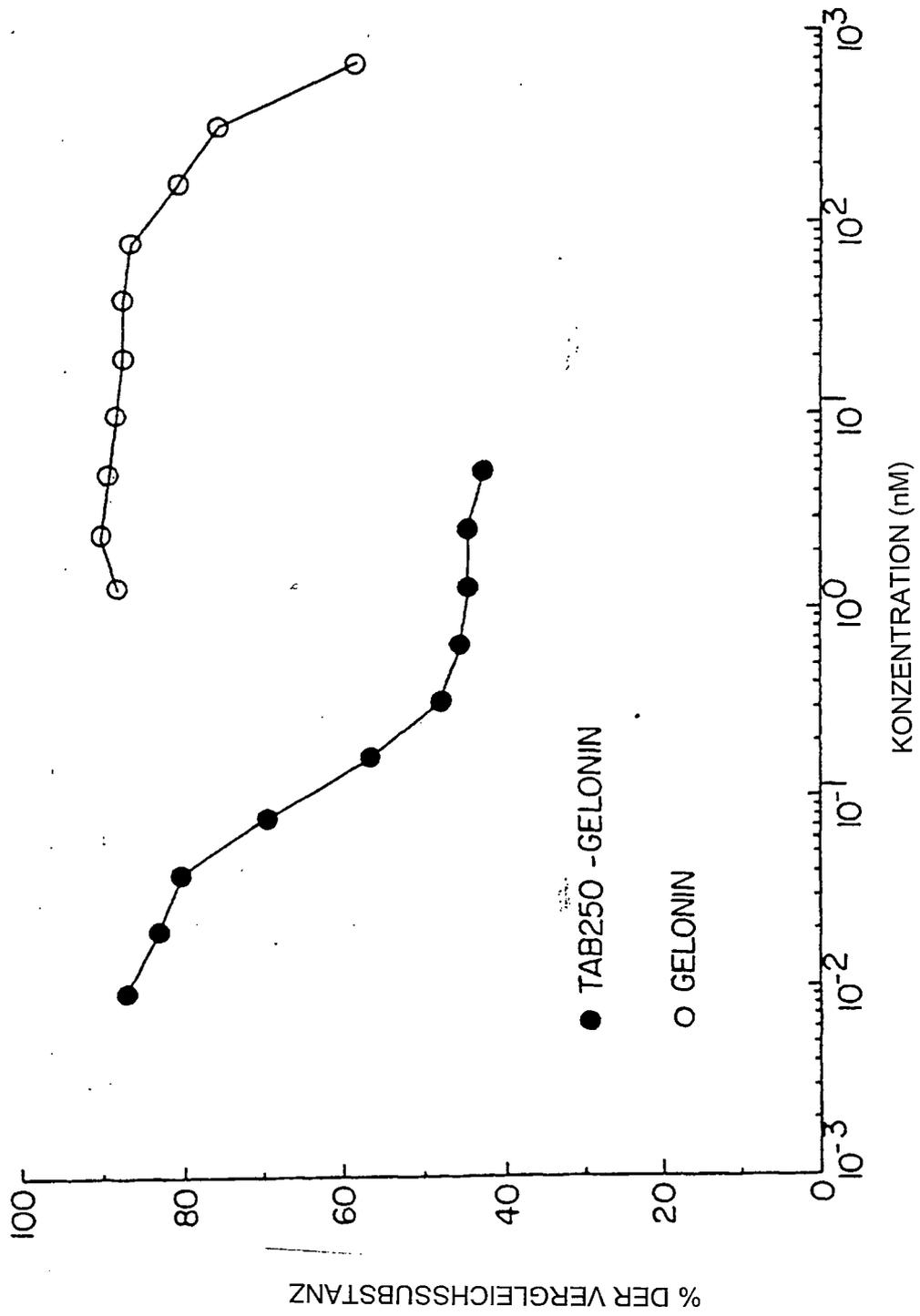
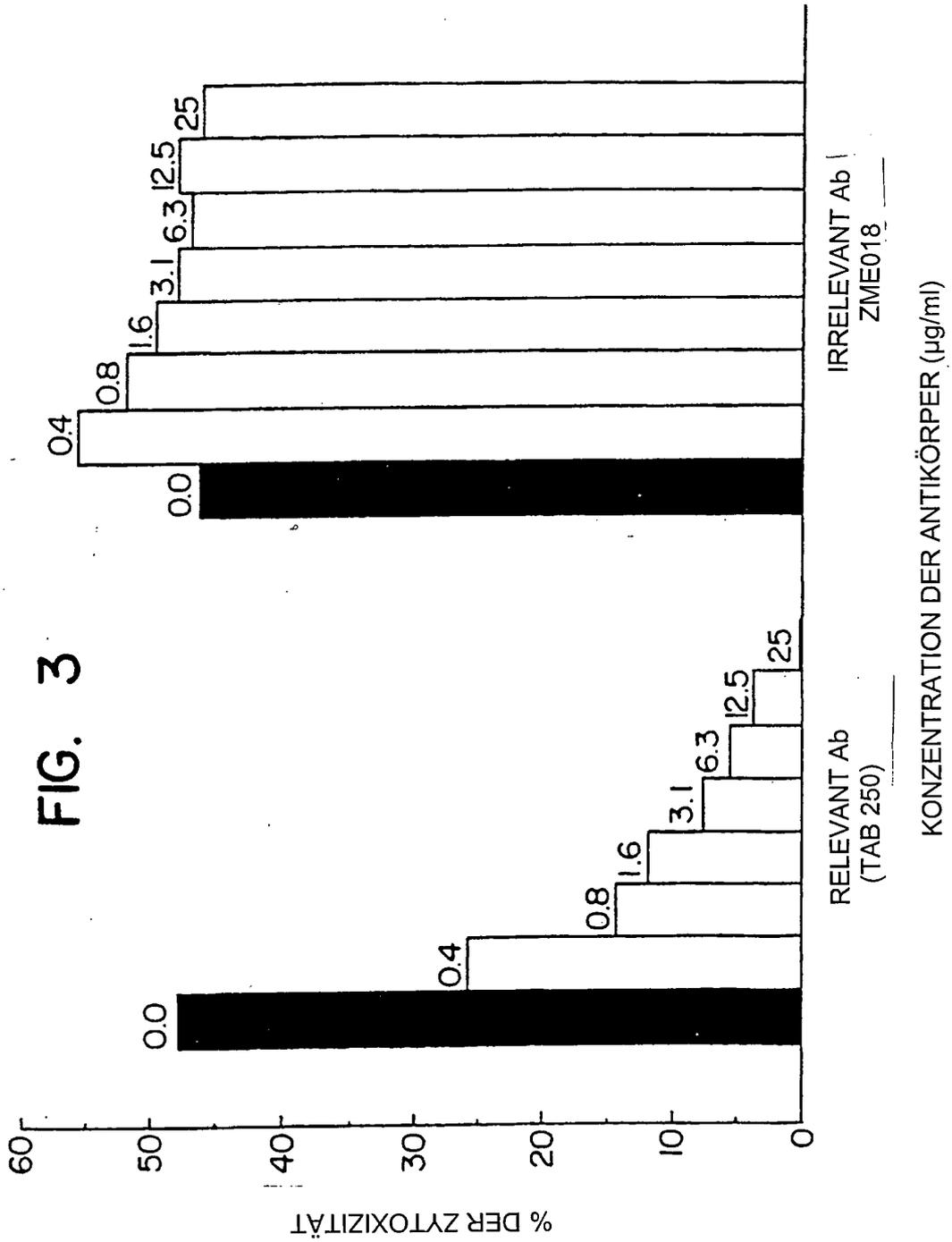
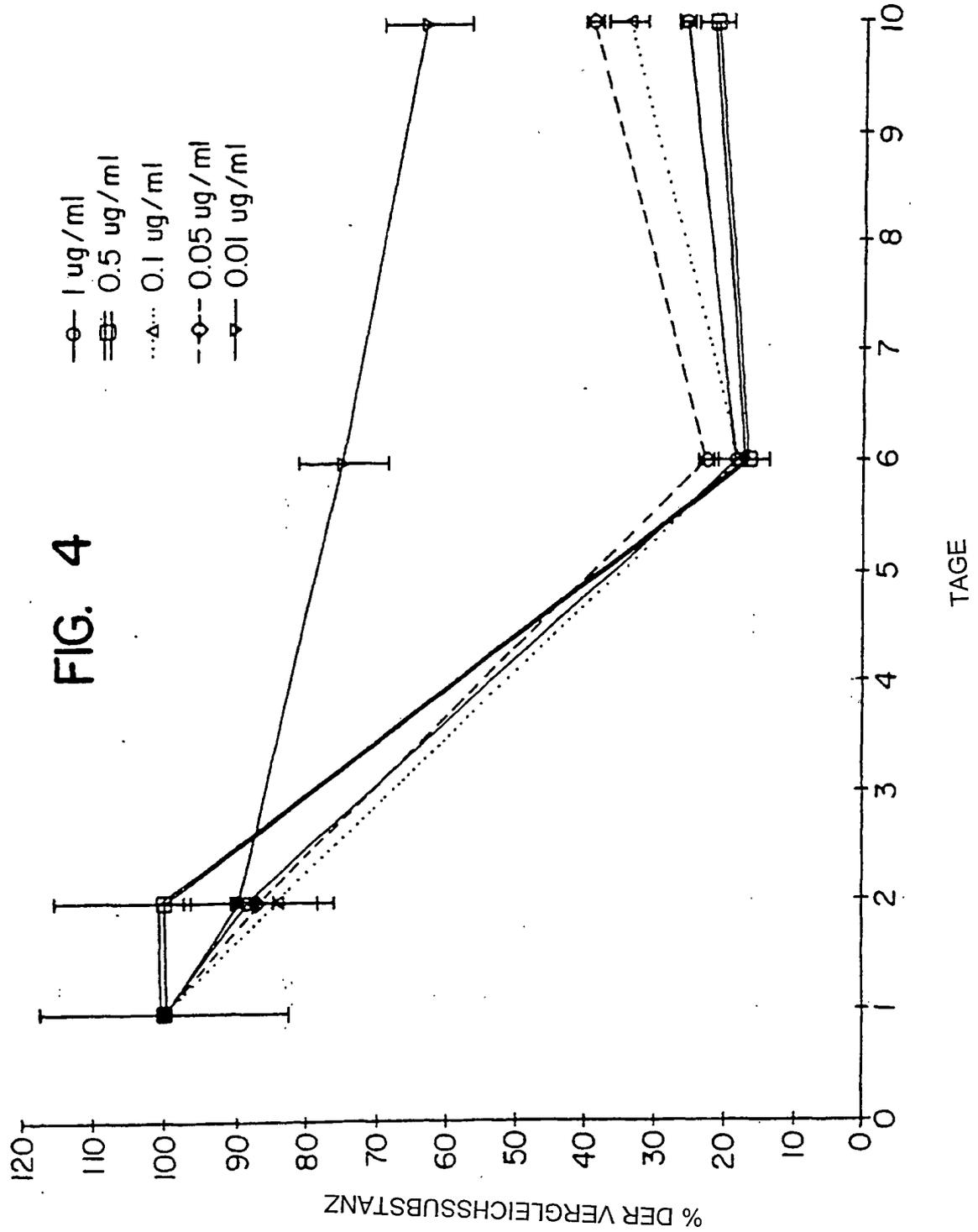
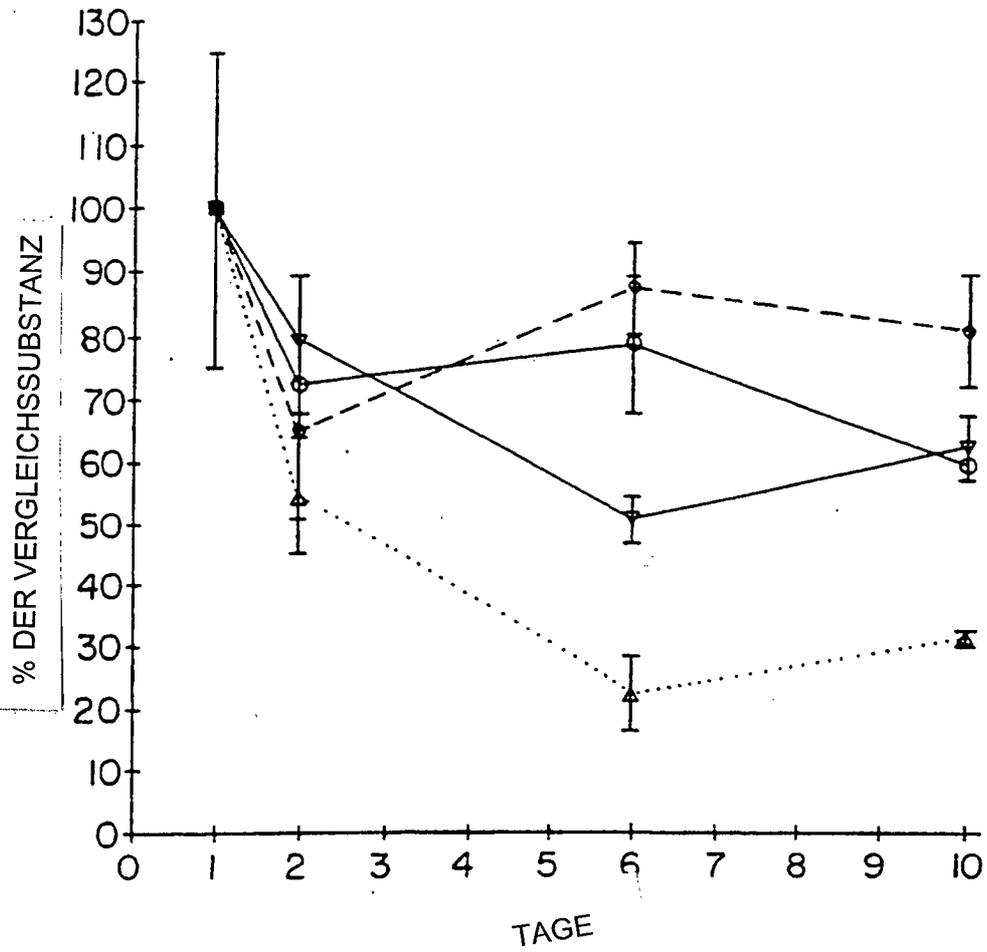


FIG. 2

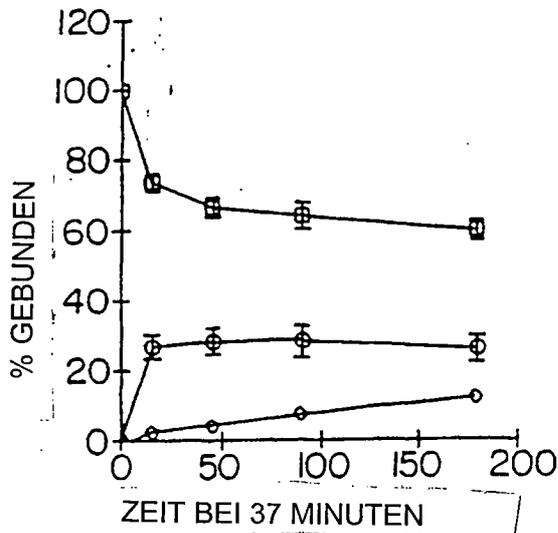






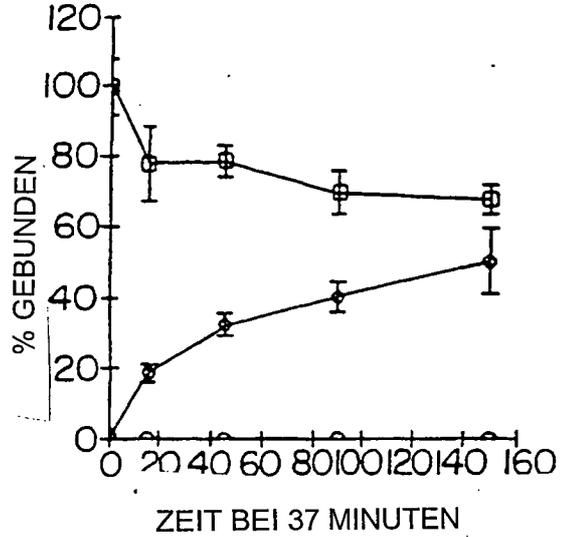
- 1 ug/ml TAb 250
- -○- - 0.01 ug/ml TAb 250
- ...△... 1 ug/ml TAb 250-GELONIN
- ▽— 0.01 ug/ml TAb 250-GELONIN

FIG. 5



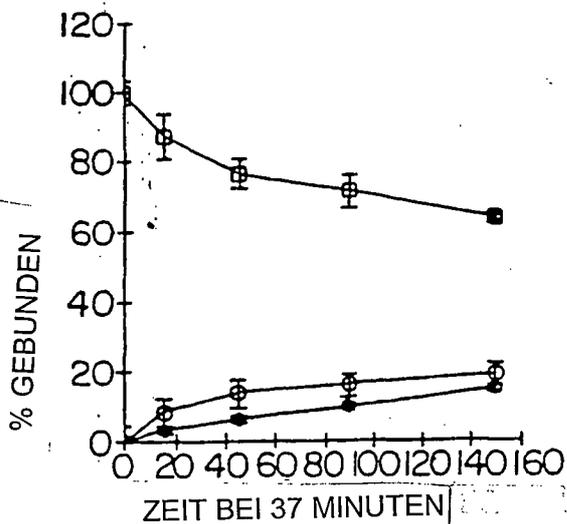
- INTERNALISIERT
- ◇ DISSOZIIERT/ZURÜCKGEFÜHRT
- AN DIE OBERFLÄCHE GEBUNDEN

FIG. 6A



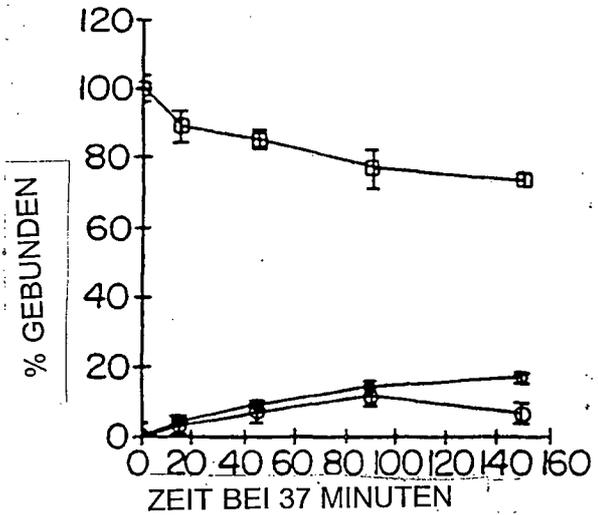
- ◇ DISSOZIIERT/ZURÜCKGEFÜHRT
- AN DIE OBERFLÄCHE GEBUNDEN
- INTERNALISIERT

FIG. 6B



- INTERNALISIERT
- ◇ DISSOZIIERT/ZURÜCKGEFÜHRT
- AN DIE OBERFLÄCHE GEBUNDEN

FIG. 6C



- INTERNALISIERT
- ◇ DISSOZIIERT/ZURÜCKGEFÜHRT
- AN DIE OBERFLÄCHE GEBUNDEN

FIG. 6D

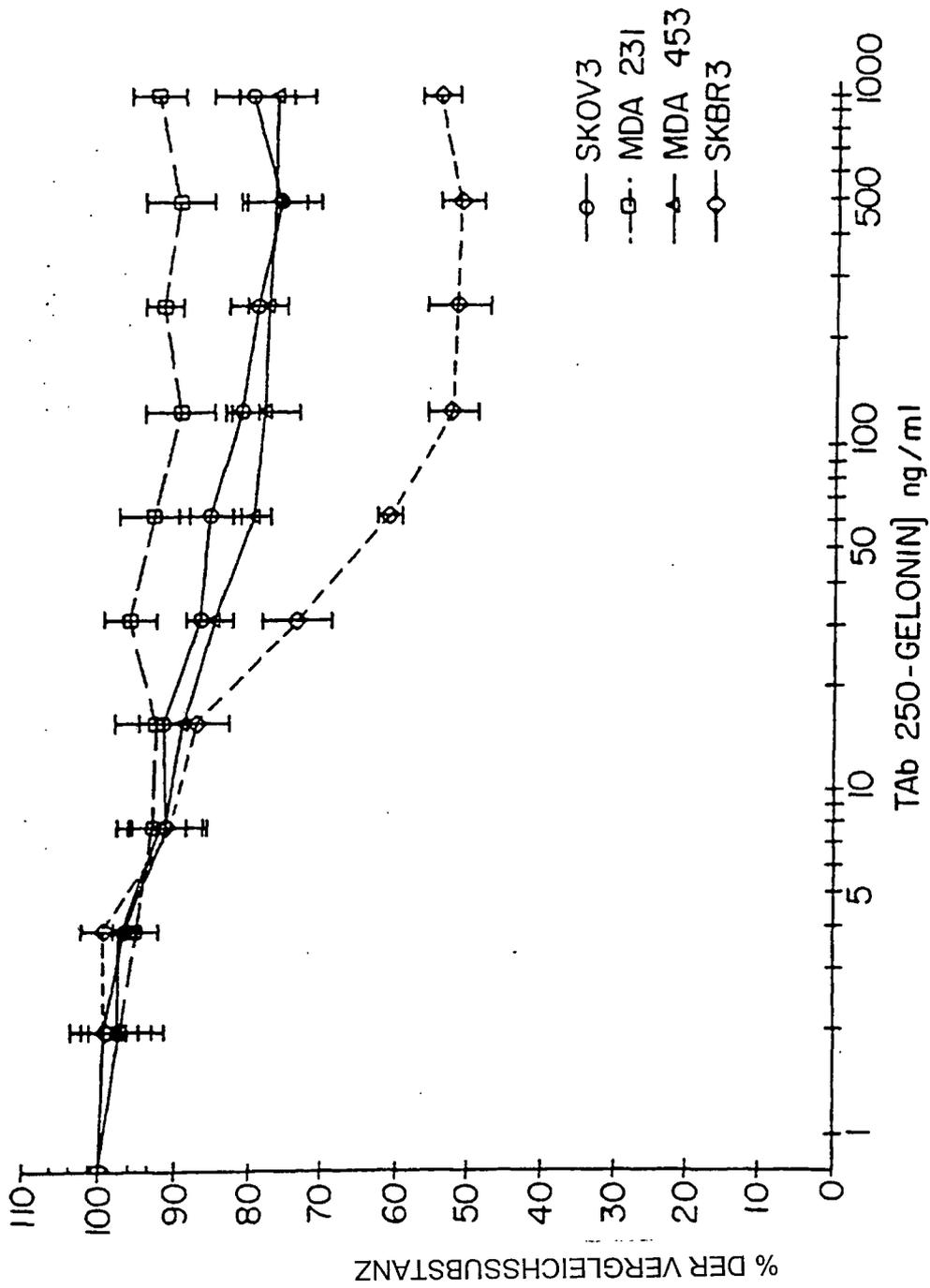


FIG. 7