



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 11 612 T2 2005.07.07**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 179 541 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 11 612.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 125 821.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **28.04.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.02.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 16/28**

A61K 39/395, C12N 5/20, C12N 15/13,

G01N 33/577, A61K 38/18, A61P 35/00

(30) Unionspriorität:

131432 28.04.1999 US

(73) Patentinhaber:

**Board of Regents, The University of Texas
System, Austin, Tex., US**

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Brekken, Rolf A.Dr., Seattle, US; Thorpe, Philip
Edward Dr., Dallas, US**

(54) Bezeichnung: **Zusammensetzungen und Verfahren zur Krebsbehandlung durch die selektive Hemmung von VEGF**

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**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung beansprucht die Priorität der zeitgleich anhängigen US-Provisional Patentanmeldung Nr. 60/131,432, eingereicht am 28. April 1999, deren gesamter Text und Zeichnungen spezifisch hierin durch Bezugnahme ohne Disclaimer aufgenommen wird. Die US-Regierung besitzt Rechte an der vorliegenden Erfindung aufgrund von Grant Nr. 1RO1 CA 74951, 5RO CA54168 und T32 GM07062 von den National Institutes of Health.

1. Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft im allgemeinen das Gebiet der Antikörper, Angiogenese und Tumorbehandlung. Genauer stellt sie Anti-VEGF-Antikörper bereit, die spezifisch die VEGF-Bindung an nur einen (VEGFR2) der beiden VEGF-Rezeptoren inhibieren. Solche Antikörper inhibieren die Angiogenese und induzieren eine Tumoregression und haben dennoch eine verbesserte Sicherheit aufgrund ihrer spezifischen Blockierungseigenschaften. Die Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung auf Antikörper-Basis erstrecken sich auch auf die Verwendung von Immunkonjugaten und anderen therapeutischen Kombinationen, Kits und Verfahren, einschließlich denjenigen mit Prodrugs.

2. Beschreibung des verwandten Stands der Technik

[0003] Tumorzellresistenz gegenüber chemotherapeutischen Mitteln stellt ein signifikantes Problem in der klinischen Onkologie dar. In der Tat ist diese einer der Hauptgründe, warum viele der vorherrschendsten Formen von Krebs beim Menschen immer noch einer effektiven chemotherapeutischen Behandlung trotz bestimmter Fortschritte auf diesem Gebiet widerstehen.

[0004] Eine weitere Tumorbehandlungsstrategie ist die Verwendung eines „Immuntoxins“, bei dem ein Anti-Tumorzellantikörper verwendet wird, um ein Toxin an die Tumorzellen abzugeben. Jedoch leidet die Immuntoxin-Therapie, ebenso wie die chemotherapeutischen Ansätze, an signifikanten Nachteilen bei Anwendung an festen Tumoren. Zum Beispiel können Antigennegative oder Antigen-defiziente Zellen überleben und den Tumor repopulieren oder zu weiteren Metastasen führen.

[0005] Ein weiterer Grund für eine Resistenz von festen Tumoren gegenüber Therapien auf Antikörperbasis ist, daß die Tumormasse im allgemeinen gegenüber makromolekularen Mitteln, wie etwa Antikörpern und Immuntoxin, undurchlässig ist (Burrows et al., 1992; Dvorak et al., 1991a; Baxter and Jain, 1991). Sowohl die physikalischen Diffusionsdistanzen als auch der interstitielle Druck innerhalb des Tumors sind signifikante Einschränkungen für diesen Typ der Therapie. Deshalb haben sich feste Tumore, die mehr als 90% aller menschlichen Krebse ausmachen, bislang als resistent gegenüber Antikörper- und Immuntoxin-Behandlung herausgestellt.

[0006] Eine jüngere Strategie ist es gewesen, auf die Gefäße von festen Tumoren abzu zielen. Das Zielen auf die Blutgefäße von Tumoren statt auf die Tumorzellen selbst hat bestimmte Vorteile, dahingehend, daß es wahrscheinlich nicht zur Entwicklung von resistenten Tumorzellen führen wird, und daß die Zellen, auf die gezielt wird, leicht zugänglich sind. Darüberhinaus führt die Zerstörung von Blutgefäßen zu einer Amplifizierung des Anti-Tumoreffekts, da viele Tumorzellen von einem einzelnen Gefäß für ihren Sauerstoff und Nährstoffe abhängen (Burrows and Thorpe, 1994a; 1994b). Beispielhafte Gefäß-Zielstrategien werden in US-Patent Nr. 5,855,866 und 5,965,132 beschrieben, die insbesondere die gezielte Abgabe von anti-zellulären Mitteln und Toxinen auf Marker von Tumorgefäßen beschreiben.

[0007] Eine weitere effektive Version des Gefäß-Ziel-Ansatzes („vascular targeting approach“) ist es, mit einem Coagulationsfaktor auf einen Marker zu zielen, der innerhalb der Tumorgefäße exprimiert oder adsorbiert ist (Huang et al., 1997; US-Patent Nr. 5,877,289; 6,004,555; und 5,___ (US-Anmeldung Nr. 08/482,369; Erteilungsgebühr bezahlt am 20. Oktober 1998). Die Abgabe von Coagulanzen statt Toxinen an Tumorgefäße hat die weiteren Vorteile einer verringerten Immungenizität und sogar ein geringeres Risiko von toxischen Nebenwirkungen. Wie in US-Patent Nr. 5,877,289 offenbart, ist ein bevorzugter Coagulationsfaktor zur Verwendung in solchen Tumor-spezifischen „Coaguliganden“ eine trunkierte Version des menschlichen Coagulations-induzierenden Proteins, Gewebefaktor (TF), dem Hauptinitiator der Blutcoagulation.

[0008] Obwohl die spezifische Abgabe von Toxinen und Coagulationsfaktoren an Tumorblutgefäße einen si-

gnifikanten Fortschritt bei der Tumorbehandlung darstellt, können bestimmte periphere Tumorzellen die durch solche Therapien verursachte Zerstörung innerhalb des Tumors überleben. Anti-angiogene Strategien wären deshalb von Nutzen in Kombination mit den Tumorzerstörungsverfahren von US-Patent Nr. 5,855,866 und 5,877,289.

[0009] Anti-angiogene Tumorbehandlungsstrategien beruhen auf der Inhibition der Proliferation von knospenden Gefäßen, im allgemeinen an der Peripherie eines festen Tumors. Diese Therapien werden hauptsächlich angewandt, um das Risiko von Mikrometastasen zu verringern oder um weiteres Wachstum eines festen Tumors nach herkömmlicherer Behandlung (wie etwa Operation oder Chemotherapie) zu inhibieren.

[0010] Angiogenese ist die Entwicklung von neuen Gefäßen aus bereits vorher existierenden Blutgefäßen und/oder zirkulierenden Endothel-Stammzellen (Asahara et al., 1997; Springer et al., 1998; Folkman and Shing, 1992). Angiogenese spielt eine vitale Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie etwa Embryogenese, Wundheilung und Menstruation. Die Angiogenese ist ebenso bei bestimmten pathologischen Ereignissen wichtig. Zusätzlich zu einer Rolle bei dem Wachstum und der Metastase von festen Tumoren sind andere wichtige Zustände mit einem angiogenen Bestandteil Arthritis, Psoriasis und diabetische Retinopathie (Hahnan and Folkman, 1996; Fidler and Ellis, 1994).

[0011] Angiogenese wird in normalen und malignen Geweben durch das Gleichgewicht zwischen angiogenen Reizen und angiogenen Inhibitoren reguliert, die in dem Zielgewebe und an entfernten Stellen produziert werden (Fidler et al., 1998; McNamara et al., 1998). Gefäßendothel-Wachstumsfaktor-A (VEGF, ebenso als Gefäß-Permeabilitätsfaktor, VPF, bekannt) ist ein Hauptstimulus für die Angiogenese. VEGF ist ein multifunktionelles Cytokin, das durch Hypoxie und onkogene Mutationen induziert wird und von einer großen Vielzahl von Geweben produziert werden kann (Kerbel et al., 1998; Mazure et al., 1996).

[0012] Das Erkennen von VEGF als ein Hauptstimulus der Angiogenese bei pathologischen Zuständen hat zu verschiedenen Versuchen geführt, die VEGF-Aktivität zu blockieren. Inhibitorische Anti-VEGF-Rezeptor-Antikörper, lösliche Rezeptorkonstrukte, Antisens-Strategien, RNA-Aptamere gegen VEGF und niedermolekulargewichtige VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Inhibitoren sind alle zur Verwendung bei der Störung des VEGF-Signalwegs vorgeschlagen worden (Siemeister et al., 1998). In der Tat ist gezeigt worden, daß monoklonale Antikörper gegen VEGF menschliches Tumor-Xenograft-Wachstum und die Bildung von Ascites in Mäusen inhibieren (Kim et al., 1993; Asano et al., 1998; Mesiano et al., 1998; Luo et al., 1998a; 1998b; Borgstrom et al., 1996; 1998).

[0013] PNAS, Band 94, 7192-7197 (1997) offenbart die Kristallstruktur von VEGF und relevanter Epitope.

[0014] Frontiers in Biosciences, Band 4, 141-161 (1999) gibt eine Übersicht über Signalzusammenhänge in dem VEGF-System.

[0015] Cancer and Metastasis Reviews, Band 17, 155-161 (1998) offenbart für VEGFR2 spezifische, monoklonale Antikörper als eine anti-angiogene therapeutische Strategie.

[0016] Cancer-Immunology Immunotherapy Band 34, 343-348 (1992) offenbart die Verwendung von Immunkonjugaten und Prodrugs als eine therapeutische Anti-Krebs-Therapeutikum-Strategie.

[0017] British Journal of Cancer, Band 70, 786-794 (1994) gibt eine Übersicht über Antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie bei der Tumorthherapie.

[0018] Obwohl die vorhergehenden Studien die Wichtigkeit von VEGF beim Wachstum von festen Tumoren und sein Potential als ein Ziel für die Tumorthherapie unterstreichen, wäre die Identifizierung von weiteren Mitteln, die VEGF-induzierte Angiogenese inhibieren von Vorteil beim Erweitern der Anzahl von therapeutischen Optionen. Die Entwicklung von therapeutischen Mitteln, die die VEGF-Rezeptorbindung spezifischer inhibieren, würde einen wichtigen Fortschritt darstellen, solange wie ihre Anti-Tumor-Effekte nicht aufgrund der verbesserten Spezifität wesentlich beeinträchtigt wären.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0019] Die vorliegende Erfindung überwindet bestimmte Nachteile im Stand der Technik, indem sie neue therapeutische Zusammensetzungen und Verfahren zur Verwendung bei der Anti-Angiogenese- und Anti-Tumor-Behandlung bereitstellt. Die Erfindung beruht auf Antikörpern, die spezifisch die VEGF-Bindung an nur ei-

nen (VEGFR2) der beiden Haupt-VEGF-Rezeptoren inhibieren. Solche Antikörper inhibieren die Angiogenese und induzieren eine Tumorregression genauso effektiv wie andere Anti-VEGF-Antikörper, einschließlich derjenigen, die sich bereits in klinischen Versuchen befinden, und haben doch eine verbesserte Sicherheit aufgrund ihrer spezifischen Blockierungseigenschaften. Die Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung erstrecken sich auch auf die Verwendung von Immunkonjugaten und Kombinationen, einschließlich Prodrugs, unter Verwendung der spezifischen Kategorie von bereitgestellten Antikörpern.

[0020] Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, daß die bereitgestellten Antikörper die VEGF-Bindung nur an VEGFR2 und nicht an VEGFR1 inhibieren. Dies steht im Gegensatz zu den führenden Antikörpern nach dem Stand der Technik, einschließlich A4.6.1, die die VEGF-Bindung an sowohl VEGFR2 als auch VEGFR1 inhibieren. Da VEGFR1 wichtige biologische Funktionen hat, die mit der Angiogenese nicht in Verbindung stehen, insbesondere bei der Makrophagenwanderung und -Chemotaxis und der Osteoclasten- und Chondroclastenfunktion, ist die vorliegende Fähigkeit, nur VEGFR2-vermittelte Angiogenese zu inhibieren, ein besonderer Vorteil. Dies überträgt sich in merkbare klinische Vorteile, dahingehend, daß Makrophagen noch in der Lage sind, Anti-Tumor-Antworten des Wirts zu vermitteln, und daß der Knochenmetabolismus, z.B. bei der Behandlung von pädiatrischen Krebsen, nicht nachteilig beeinträchtigt ist.

[0021] Ein weiterer Vorteil ist der, daß, während die Bindung von VEGF an VEGFR1 in der Anwesenheit der Antikörper der Erfindung aufrecht erhalten wird, diese verwendet werden können, um angehängte therapeutische Mittel spezifisch an Tumorgefäße abzugeben aufgrund ihrer Bindung an VEGF, das an VEGFR1 gebunden ist, das auf dem Tumorendothel hoch reguliert ist. Im Kontext von Immunkonjugaten stellt die vorliegende Erfindung deshalb Mittel bereit, die sowohl anti-angiogene als auch Tumor-zerstörende Eigenschaften innerhalb desselben Moleküls haben.

[0022] Noch ein weiterer Vorteil liegt in der Fähigkeit der bereitgestellten Zusammensetzungen, das Überlebenssignal von VEGF zu neutralisieren, das durch VEGFR2 vermittelt wird. Die nackten und konjugierten Antikörper der Erfindung formen daher synergistische Kombinationen mit anderen Therapien und/oder angehängten Mitteln, insbesondere den Verfahren und Mitteln, die aufgrund der Fähigkeit von VEGF, ihren zerstörerischen Eigenschaften gegenzuwirken, keine maximale Wirksamkeit in vivo erzielen.

[0023] Die vorliegende Erfindung stellt somit Antikörper bereit, die spezifisch die VEGF-Bindung an den VEGFR2-Rezeptor blockieren, oder die die VEGF-Bindung an im wesentlichen nur den VEGFR2-Rezeptor blockieren. Solche Antikörper inhibieren die VEGF-Bindung an den VEGFR2-Rezeptor (KDR/Flk-1) signifikant, ohne die VEGF-Bindung an den VEGFR1-Rezeptor signifikant zu inhibieren (Flt-1). Die Antikörper inhibieren somit die VEGF-Bindung an den VEGFR2-Rezeptor (KDR/Flk-1), inhibieren nicht wesentlich die VEGF-Bindung an den VEGFR1-Rezeptor (Flt-1), weisen anti-angiogene Effekte und Anti-Tumor-Effekte in vivo auf und inhibieren die Makrophagen-Chemotaxis, die Osteoclasten- oder Chondroclasten-Funktionen nicht signifikant.

[0024] Die Antikörper der Erfindung werden somit prägnant als „VEGFR2-blockierende, nicht-VEGFR1-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper“ bezeichnet. Noch prägnanter werden sie bezeichnet als „VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper“, das der Einfachheit halber in Bezug auf alle Zusammensetzungen, Verwendungen und Verfahren der Erfindung verwendet wird. Ein „VEGFR2-blockierender, Anti-VEGF-Antikörper“ ist ein Antikörper gegen VEGF, der die VEGF-Bindung an den VEGFR2-Rezeptor blockiert. Es wird klar sein, daß solche Antikörper nicht Antikörper gegen den VEGFR2-Rezeptor selbst sind.

[0025] Vor der vorliegenden Erfindung gab es keine Motivation Anti-VEGF-Antikörper zu erzeugen, die spezifisch die VEGF-Bindung an den VEGFR2-Rezeptor, aber nicht den VEGFR1-Rezeptor blockieren, noch wurde an irgendwelche Vorteile von solchen Antikörpern gedacht. Wichtig, da blockierende Antikörper die Wechselwirkung eines Wachstumsfaktors und seines (seiner) Rezeptors (Rezeptoren) physisch verhindern müssen, und da Rezeptorbindungsstellen an den Wachstumsfaktoren hinsichtlich ihrer Größe beschränkt sind, gab es keinen Hinweis darauf, daß solche spezifischen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper entwickelt werden könnten.

[0026] Jedoch wird im Lichte der hierin offenbarten überraschenden Entdeckungen der Erfinder der Fachwelt nun die Kenntnis zur Verfügung gestellt, daß solche spezifischen inhibitorischen Anti-VEGF-Antikörper hergestellt werden können und bestimmte Vorteile haben. Die vorliegende Anmeldung beschreibt weiterhin die Methodologie zum Erzeugen von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-Kandidaten und die technischen Routineaspekte der Assays, die benötigt werden, um tatsächliche VEGFR2-blockierende spezifische Antikörper aus dem Pool von Kandidaten zu identifizieren. Im Lichte dieser Erfindung können deshalb eine Vielzahl von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper gemacht und in einer Vielzahl von Ausführungs-

formen verwendet werden, einschließlich bei der Inhibition der Angiogenese und der Behandlung von angiogenen Krankheiten und Tumoren, ohne die VEGF-Signalgebung über den VEGFR1-Rezeptor zu inhibieren und ohne die merkbaren Nachteile und die damit verbundenen Nebenwirkungen.

[0027] Wie in der gesamten Anmeldung verwendet, wird der Begriff „ein“ in dem Sinne verwendet, daß er „wenigstens ein“, „wenigstens ein erster“, „ein oder mehrere“ oder „eine Vielzahl“ der Komponenten oder Schritte, auf die Bezug genommen wird, bedeutet, außer in Fällen, bei denen eine obere Grenze danach spezifisch angegeben ist. Deshalb bedeutet ein „Antikörper“, wie hierin verwendet „wenigstens ein erster Antikörper“. Die anwendbaren Grenzen und Parameter von Kombinationen, ebenso die Mengen eines einzelnen Mittels, werden Fachleuten auf dem Gebiet im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt sein.

[0028] Antikörper, die „spezifisch die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren“, können jetzt durch Kompetitions- und/oder funktionellen Assays identifiziert werden. Die bevorzugten Assays sind der Einfachheit wegen Kompetitionsassays auf der Grundlage eines ELISA. In Kompetitionsassays mischt man im voraus VEGF mit variierenden Mengen der Test-Antikörper (z.B. 100-facher bis 1000-facher molarer Überschuß) oder mischt VEGF diesen bei und bestimmt die Fähigkeit der Test-Antikörper, die VEGF-Bindung an VEGFR2 zu reduzieren. VEGF kann vormarkiert sein und direkt nachgewiesen werden oder kann unter Verwendung eines (sekundären) Anti-VEGF-Antikörpers oder eines sekundären und tertiären Antikörper-Nachweissystems nachgewiesen werden. Ein ELISA-Format eines solchen Kompetitionsassay ist ein bevorzugtes Format, aber jeder Typ Immunkompetitionsassay kann durchgeführt werden.

[0029] Die VEGF-Bindung an VEGFR2 in der Anwesenheit eines vollständig irrelevanten Antikörpers (einschließlich nicht-blockierender, monoklonaler Anti-VEGF-Antikörper) ist der Kontrolloberwert (100%) in einem solchen Kompetitionsassay. In einem Testassay weist eine signifikante Reduktion bei der VEGF-Bindung an VEGFR2 in der Anwesenheit eines Test-Antikörpers auf einen Test-Antikörper hin, der signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert.

[0030] Eine signifikante Verringerung ist eine „reproduzierbare“, d.h. konsistent beobachtete Verringerung hinsichtlich der Bindung. Eine „signifikante Verringerung“ im Hinblick auf die vorliegende Anmeldung ist als eine reproduzierbare Verringerung (hinsichtlich VEGF-Bindung an VEGFR2) von wenigstens ungefähr 45%, ungefähr 50%, ungefähr 55%, ungefähr 60% oder ungefähr 65% für jede Menge zwischen einem ungefähr 100-fachen und ungefähr 1000-fachen molaren Überschuß an Antikörper über VEGF definiert.

[0031] Da ein bevorzugtes Merkmal der Erfindung ist, daß die bereitgestellten Antikörper nicht im wesentlichen die VEGF-Bindung an VEGFR1 inhibieren, werden Antikörper, die eine moderate signifikante Verringerung der VEGF-Bindung an VEGFR2 aufweisen, immer noch nützlich sein, solange sie nicht die VEGF-Bindung an VEGFR1 wesentlich inhibieren. Nichtsdestotrotz werden bevorzugtere Antikörper diejenigen sein, die eine signifikantere Fähigkeit haben, die VEGF-Bindung an VEGFR2 zu inhibieren. Diese Antikörper sind diejenigen, die eine reproduzierbare Fähigkeit aufweisen, die VEGF-Bindung an VEGFR2 um wenigstens ungefähr 70%, ungefähr 75% oder ungefähr 80% bei jeder Menge zwischen einem ungefähr 100-fachen und einem ungefähr 1000-fachen molaren Überschuß an Antikörper gegenüber VEGF zu reduzieren. Obwohl nicht erforderlich, um die Erfindung auszuführen, sind Antikörper, die die VEGF-Bindung an VEGFR2 um wenigstens 85%, ungefähr 90%, ungefähr 95% oder sogar höher verringern, in keiner Weise ausgeschlossen.

[0032] Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, die die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren, ohne die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) signifikant zu inhibieren, werden in leichter Weise durch einfache Kompetitionsassays bestätigt, wie diejenigen, die oben beschrieben werden, aber VEGFR1 verwenden.

[0033] Die Abwesenheit einer signifikante Verringerung ist eine „reproduzierbare“, d.h. konsistent beobachtete „wesentliche Aufrechterhaltung einer Bindung“. Eine „wesentliche Aufrechterhaltung einer Bindung“ in Bezug auf die vorliegende Anmeldung ist als eine reproduzierbare Aufrechterhaltung (im Hinblick auf die VEGF-Bindung an VEGFR1) von wenigstens ungefähr 60%, ungefähr 75%, ungefähr 80% oder ungefähr 85% bei jeder Menge zwischen einem ungefähr 100-fachen und ungefähr 1000-fachen molaren Überschuß an Antikörper gegenüber VEGF definiert.

[0034] Die Absicht, Antikörper zu verwenden, die nicht im wesentlichen die VEGF-Bindung an VEGFR1 inhibieren, ist es, die durch VEGFR1 vermittelten biologischen Funktionen aufrechtzuerhalten. Deshalb muß ein Antikörper nun ausreichend VEGF-Bindung an VEGFR1 aufrechterhalten, so daß eine biologische Antwort durch VEGF induziert wird. Nichtsdestotrotz werden bevorzugtere Antikörper diejenigen sein, die eine signifi-

kantere Fähigkeit haben, die VEGF-Bindung an VEGFR1 aufrechtzuerhalten. Diese Antikörper sind diejenigen, die eine reproduzierbare Fähigkeit aufweisen, die VEGF-Bindung an VEGFR1 auf Niveaus von wenigstens ungefähr 88%, ungefähr 90%, ungefähr 92%, ungefähr 95% oder von ungefähr 98 – 99% bei jeder Menge eines zwischen ungefähr 100-fachen und ungefähr 1000-fachen molaren Überschusses an Antikörper über VEGF aufrechtzuerhalten.

[0035] Es wird klar sein, daß Antikörper, die die VEGF-Bindung an VEGFR2 in größerem Ausmaß inhibieren, wahrscheinlich eine größere Verringerung hinsichtlich der Bindung an VEGFR1 ertragen können. In gleicher Weise sollte, wenn ein Antikörper eine mäßige Verringerung hinsichtlich der VEGF-Bindung an VEGFR2 hat, die Aufrechterhaltung der Bindung an VEGFR1 in stringenter Weise verfolgt werden.

[0036] Ein anderer bevorzugter Bindungsassay, um zu identifizieren und/oder zu bestätigen, daß ein Antikörper die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert, ist ein Co-Präzipitationsassay. Ein Co-Präzipitationsassay testet die Fähigkeit eines Antikörpers, die Bindung von VEGF an einen oder mehrere Rezeptoren in Lösung zu blockieren. In einem solchen Assay wird VEGF oder nachweisbar markierter VEGF mit einer geeigneten Form des Rezeptors inkubiert.

[0037] Es gibt viele Formate zum Durchführen von Immunpräzipitations- oder Co-Präzipitationsassays. Im vorliegenden Fall kann eine „geeignete Form des Rezeptors“ der betroffene VEGFR2-Rezeptor oder die extrazelluläre Domäne des Rezeptors sein. Eine Immunpräzipitation wird dann, neben den Standardreagenzien, die Anwesenheit eines Antikörpers gegen den VEGFR2-Rezeptor oder ein Epitop auf der extrazellulären Domäne des Rezeptors erfordern, die von der Stelle, an die VEGF bindet, unterschiedlich ist. Die vorliegende Erfindung stellt andere „geeignete“ Formen der VEGF-Rezeptoren, nämlich die extrazellulären Domänen der Rezeptoren, verbunden mit einem Fc-Antikörper-Teil, bereit. Solche Rezeptor/Fc-Konstrukte können durch Inkubation mit einer wirksamen immunfällenden Zusammensetzung, wie etwa einer Zusammensetzung auf Protein-A-Grundlage, ausgefällt werden.

[0038] Unabhängig von dem geeigneten Rezeptor werden die Immunpräzipitations- oder Co-Präzipitationsassays bevorzugt mit Kontrollen durchgeführt. Die Fähigkeit von VEGF alleine, an den ausgewählten Rezeptor zu binden, sollte durch Fällung in der Abwesenheit eines Anti-VEGF-Antikörpers bestätigt werden. Bevorzugt werden parallele Inkubationen in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Antikörpers mit bekannten Bindungseigenschaften durchgeführt, der als eine Kontrolle fungiert. Am bevorzugtesten werden Assays unter Verwendung von sowohl einem blockierenden Kontroll- als auch einem nicht-blockierenden Kontrollantikörper parallel laufengelassen.

[0039] Jede gebundene immunologische Spezies wird dann immungefällt, z.B. durch Inkubation mit einer wirksamen immunfällenden Zusammensetzung, wie etwa einer Protein-A-Zusammensetzung oder Protein-A-Sepharose-Beads. Der Niederschlag wird dann auf die Anwesenheit von VEGF getestet. Wenn der VEGF in der anfänglichen Inkubation nachweisbar markierter VEGF war, wie etwa radioaktiv markierter VEGF, kann jegliches VEGF in den Immunniederschlägen direkt nachgewiesen werden. Jeglicher nicht-markierter VEGF in den Immunniederschlägen kann mit anderen geeigneten Mitteln nachgewiesen werden, z.B. mittels Gelreinigung und Immunnachweis mit einem Anti-VEGF-Antikörper.

[0040] Die Fähigkeit eines Antikörpers, die VEGF-Bindung an einen VEGF-Rezeptor zu blockieren, wie etwa VEGFR2, kann in einem solchen Co-Präzipitationsassay in leichter Weise quantifiziert werden, obwohl qualitative Ergebnisse ebenso wertvoll sind. Die Quantifizierung kann durch direkte Messung von markiertem VEGF oder z.B. durch densitometrische Analysen von immunnachgewiesenem VEGF erzielt werden. Antikörper, die eine reproduzierbare, d.h. konsistent beobachtete Fähigkeit aufweisen, die VEGF-Bindung an VEGFR2 zu inhibieren, kann somit nachgewiesen werden, und nützliche Antikörper können gemäß den oben dargestellten quantitativen Kriterien ausgewählt werden.

[0041] Anti-VEGF-Antikörper, die nicht in signifikanter Weise die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) inhibieren, können ebenso in leichter Weise durch Durchführung von Co-Präzipitationsassays, wie oben beschrieben, aber unter Verwendung von VEGFR1 anstelle von VEGFR2, identifiziert werden. Deshalb können Anti-VEGF-Antikörper, die die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren, ohne die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) signifikant zu inhibieren, ebenso in leichter Weise unter Verwendung von derlei Verfahren identifiziert werden.

[0042] Die vorliegende Erfindung stellt ebenso verschiedene funktionelle Assays bereit, um zu identifizieren und/oder zu bestätigen, daß ein Antikörper die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1)

signifikant inhibiert. Diese stehen im allgemeinen im Zusammenhang mit der Identifizierung von VEGFR2 als dem Rezeptor, der für bestimmte definierte biologische Antworten verantwortlich ist. Obwohl weniger bevorzugt als die vorhergehenden Assays vom Kompetitionstyp, die in zellfreien Systemen durchgeführt werden und am reproduzierbarsten, zuverlässigsten, arbeitssparendsten und kosteneffektivsten sind, sind die folgenden Assays nichtsdestotrotz im Kontext der vorliegenden Erfindung nützlich.

[0043] Zum Beispiel kann ein VEGFR2-blockierender, Anti-VEGF-Antikörper identifiziert werden durch Testen auf die Fähigkeit, VEGF-vermitteltes Endothelzellwachstum zu inhibieren (durch Inhibieren der mitogenen Aktivität von VEGF). Jeder geeignete Assay kann unter Verwendung einer aus einer Vielzahl von Endothelzellen in der Anwesenheit von VEGF mit oder ohne Test-Antikörper verwendet werden. Bevorzugt werden duplizierte Assays parallel laufen gelassen, wie etwa diejenige ohne VEGF und diejenige mit Kontroll-Antikörpern mit definierten Eigenschaften (sowohl blockierend als auch nicht-blockierend). Das Endothelzellwachstum kann bestimmt und bevorzugt genau quantifiziert werden durch jedes geeignete Mittel zum Bestimmen der Zellzahl, einschließlich colorimetrischer Assays.

[0044] Ein Antikörper mit einer Fähigkeit, VEGF-vermitteltes Endothelzellwachstum zu inhibieren, wird im allgemeinen eine konsistent beobachtete Inhibition von VEGF-vermitteltem Endothelzellwachstum von ungefähr 25%, 30%, 35%, 40%, 45% oder 50% oder ähnliches aufweisen. Die Inhibition in solchen Bereichen wird auf einen Antikörper mit Eigenschaften hinweisen, die ausreichen, um die Angiogenese in vivo zu inhibieren. Antikörper mit signifikanter inhibitorischer Aktivität werden nicht von der Verbindung ausgeschlossen.

[0045] Weitere funktionelle Assays, um Antikörper in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zu identifizieren, sind Assays, um die Blockierung VEGF-induzierter Phosphorylierung zu testen. Jeder geeignete Assay kann unter Verwendung einer aus einer Vielzahl von Endothelzellen verwendet werden, die irgendeine Form von nativem oder rekombinantem phosphorylierbarem VEGFR2 exprimieren. Die Zellen werden mit VEGF in der Anwesenheit oder Abwesenheit des zu testenden Antikörpers für eine geeignete Zeitperiode inkubiert. Bevorzugt werden duplizierte Assays parallel laufengelassen, wie etwa diejenigen ohne VEGF und diejenigen mit Kontrollantikörpern mit definierten Eigenschaften (sowohl blockierend als auch nicht-blockierend).

[0046] Die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 kann bestimmt und bevorzugt mittels akzeptabler Mittel genau quantifiziert werden. Im allgemeinen wird VEGFR2 für weitere Analysen immungefällt. Der Grad der Phosphorylierung von VEGFR2 kann direkt bestimmt werden, zum Beispiel können die Zellen mit ³²P-markiertem ATP inkubiert worden sein, was eine direkte Quantifizierung des ³²P in dem immungefällten VEGFR2 ermöglicht. Bevorzugt werden die immungefällten VEGFR2 mit anderen Mitteln analysiert, z.B. durch Gelreinigung und Immunnachweis mit einem Antikörper, der an Phosphotyrosinreste bindet. Ein Antikörper mit einer Fähigkeit, die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 zu inhibieren, wird im allgemeinen eine konsistent beobachtete Verringerung hinsichtlich der Konzentrationen an phosphoryliertem VEGFR2 aufweisen.

[0047] Noch weitere funktionelle Assays, um VEGFR2-blockierende, Anti-VEGFR-Antikörper in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zu identifizieren, sind Assays zum Testen der Inhibition von VEGF-induzierter Gefäßpermeabilität. Obwohl ein beliebiger solcher Assay verwendet werden kann, ist ein besonders geeigneter Assay der Miles-Permeabilitätsassay, bei dem Tieren, wie etwa Meerschweinchen ein Farbstoff injiziert wird, wie etwa Evan's blauer Farbstoff, und das Erscheinen des Farbstoffs in der Tierhaut wird nach der Bereitstellung von VEGF in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Testantikörpern bestimmt. Bevorzugt werden duplizierte Studien parallel durchgeführt, wie etwa diejenigen ohne VEGF und diejenigen mit Kontroll-Antikörpern mit definierten Eigenschaften (sowohl blockierend als auch nicht-blockierend). Das Auftreten von Farbstoff in der Tierhaut erfolgt typischerweise als Flecken, wie etwa blaue Flecken, auf dem Rücken des Tieres, die fotografiert und vermessen werden können.

[0048] VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper werden die VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität als eine konsistent beobachtete Inhibition bei niedrigen Konzentrationen inhibieren, zum Beispiel bei Verabreichung eines 100-fachen oder 1000-fachen molaren Überschusses gegenüber VEGF. Antikörper, die nicht die VEGF-Bindung an VEGFR2 blockieren, werden keine signifikante Inhibition von VEGF-induzierter Gefäßpermeabilität zeigen. Im allgemeinen werden Antikörper, die eine VEGF-induzierte Permeabilität nur bei hohen Konzentrationen blockieren, wie etwa einem 10-fachen molaren Überschuss gegenüber VEGF, keine Antikörper mit Eigenschaften in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung sein.

[0049] Weitgehend akzeptierte funktionelle Assays der Angiogenese und daher von anti-angiogenen Mitteln

sind der Cornea-Micropocket-Assay der Neovaskularisierung und der Hühnchen-Chorioallantois-Membran-Assay (CAM)-Assay. US-Patent Nr. 5,712,291 zeigt, daß die Cornea-Micropocket- und CAM-Assays hinreichend aussagekräftig sind, um Mittel zur Verwendung bei der Behandlung eines extrem großen Bereichs von angiogenen Krankheiten zu identifizieren.

[0050] US-Patent Nr. 5,001,116 beschreibt den CAM-Assay. Im wesentlichen werden befruchtete Hühnerembryos aus ihrer Schale am Tag 3 oder 4 entnommen, und eine Methylzellulosescheibe, enthaltend die Testverbindung, wird auf der Chorioallantois-Membran implantiert. Die Embryonen werden näherungsweise 48 Stunden später untersucht, und, wenn eine klare Zone ohne Gefäße um die Methylzellulosescheibe erscheint, wird der Durchmesser dieser Zone gemessen. Wie in US-Patent Nr. 5,712,291 offenbart, ist im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung das Auftreten einer beliebigen Zone ohne Gefäße ein ausreichender Nachweis für einen anti-angiogenen Antikörper. Je größer die Zone, desto effektiver ist der Antikörper.

[0051] Der Cornea-Micropocket-Assay der Neovaskularisierung kann unter Verwendung von Ratten- oder Kaninchenorneas durchgeführt werden. Dieses in-vivo-Modell ist weithin als Hinweis auf einen klinischen Nutzen akzeptiert, wie durch US-Patent Nr. 5,712,291 und 5,871,723 nachgewiesen wird. Obwohl nicht davon ausgegangen wird, daß dies besonders relevant für die vorliegende Erfindung ist, sind die Cornea-Assays gegenüber dem CAM-Assay bevorzugt, da sie im allgemeinen Verbindungen erkennen werden, die per se inaktiv sind, aber umgesetzt werden, um aktive Verbindungen zu ergeben.

[0052] In der vorliegenden Erfindung wird der Cornea-Micropocket-Assay verwendet, um ein antiangiogenes Mittel zu identifizieren. Dies wird anhand einer signifikanten Reduktion in der Angiogenese nachgewiesen, wie dargestellt durch eine konsistent beobachtete und bevorzugt merkbare Verringerung der Anzahl an Blutgefäßen in der Cornea. Solche Antworten sind bevorzugt als diejenigen Corneas definiert, die nur ein gelegentliches Sprießen und/oder eine Haarnadelschleife zeigten, die keinen Hinweis auf anhaltendes Wachstum in Kontakt mit der Testsubstanz aufwies.

[0053] Beispielhafte VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper (und Antigen-bindende Fragmente) der Erfindung schließen diejenigen ein, die:

- (a) signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren;
- (b) nicht signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) inhibieren;
- (c) die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (d) die VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (e) die VEGF-vermittelte Endothelzellproliferation inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (f) Angiogenese inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (g) nicht die VEGFR1-vermittelte Stimulierung oder Aktivierung von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten signifikant inhibieren; und
- (h) bei Verabreichung an ein Tier mit einem vaskularisierten Tumor sich bevorzugt zu Tumorgefäßen und Tumorstroma bewegen.

[0054] Ein besonderer Aspekt der Erfindung beruht auf der ursprünglichen überraschenden Entdeckung der Erfinder von Antikörpern, die spezifisch die VEGF-Bindung an den VEGFR2-Rezeptor inhibierten, die signifikante Anti-Tumor-Effekte in vivo hatten und die nicht die VEGF-Bindung an den VEGFR1-Rezeptor inhibierten. In bestimmten Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung somit Antikörper mit definierter Epitop-Spezifität bereit, wobei solche Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden.

[0055] Die Erfindung, wie beansprucht, ist in Übereinstimmung mit der vorliegenden Beschreibung und leicht erhältlichen technologischen Literaturangaben, Know-How und Ausgangsmaterialien nacharbeitbar. Nichtsdestotrotz wurde eine Probe der Hybridom-Zelllinie, die den monoklonalen Antikörper 2C3 produziert, am 27. März zum Empfang am 28. März 2000 zur Hinterlegung bei der American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA, hinterlegt und erhielt die ATCC-Hinterlegungsnummer ATCC PTA 1595 am 11. April 2000. Diese Hinterlegung wurde unter den Bestimmungen des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren und den Regeln davon gemacht (Budapester Vertrag). Das Hybridom wird durch die ATCC unter den Bedingungen des Budapester Vertrags bei Erteilung eines US-Patents mit angemessenen Ansprüchen zugänglich gemacht werden. Die Verfügbarkeit des hinterlegten Hybridoms soll nicht als eine Lizenz aufgefaßt werden, die Erfindung in Überschreitung der Rechte auszuüben, die unter der Autorität einer Regierung in Übereinstimmung mit ihren Patentgesetzen verliehen werden.

[0056] Bestimmte bevorzugte Zusammensetzungen sind deshalb Zusammensetzungen, umfassend wenigstens einen ersten Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon oder wenigstens einen ersten aufgereinigten Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, Zusammensetzungen, umfassend wenigstens einen ersten monoklonalen Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon, der an VEGF am im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, und Zusammensetzungen, umfassend wenigstens einen ersten monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon, der an dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet.

[0057] Trotzdem betreffen bestimmte andere Zusammensetzungen, Antikörper, Verfahren und insbesondere erste und zweite medizinische Verwendungen der Erfindung Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, die an dasselbe oder im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden, die nicht der monoklonale Antikörper 2C3 selbst (ATCC PTA 1595) sind.

[0058] Der Begriff „der an ungefähr, in der Hauptsache oder im wesentlichen dasselbe oder dasselbe Epitop wie“ der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) „bindet“ bedeutet, daß ein Antikörper mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) „kreuzreagiert“. „Kreuzreaktive Antikörper“ sind diejenigen, die erkennen, binden an oder eine Immunspezifität haben für in der Hauptsache oder im wesentlichen dasselbe, oder dasselbe Epitop oder „Epitop-Stelle“ haben wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595), wie solche, die in der Lage sind, effektiv mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) um die Bindung an VEGF in Wettbewerb zu treten. „2C3-kreuzreaktive Antikörper“ werden kurz als „2C3-artige Antikörper“ und „2C3-basierende Antikörper“ bezeichnet, und solche Begriffe werden hierin austauschbar verwendet und betreffen Zusammensetzung, Verwendungen und Verfahren.

[0059] Die Identifizierung von einem oder mehreren Antikörpern, die (der) an ungefähr, in der Hauptsache, im wesentlichen oder an dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden (bindet), ist jetzt, da 2C3 mit seinen vorteilhaften Eigenschaften bereitgestellt worden ist eine einfache technische Angelegenheit. Da die Identifizierung von kreuzreaktiven Antikörpern im Vergleich mit einem Bezugsantikörper bestimmt wird, wird es klar sein, daß die tatsächliche Bestimmung des Epitops, an die der Bezugsantikörper (2C3) und der Testantikörper binden, in keinerlei Weise erforderlich ist, um einen Antikörper zu identifizieren, der an dasselbe oder im wesentlichen dasselbe Epitop der monoklonalen Antikörper 2C3 bindet. Jedoch wird umfangreiche Information über das Epitop, welches von 2C3 gebunden wird, hierin eingeschlossen, und eine Epitopkartierung kann weiter durchgeführt werden, wie beschrieben von Champe et al., (1995).

[0060] Die Identifizierung von kreuzreaktiven Antikörpern kann in leichter Weise unter Verwendung von einem aus einer Vielzahl von immunologischen Screeningassays bestimmt werden, in dem der Antikörperwettbewerb bewertet wird. Alle solche Assays sind auf dem Gebiet Routine und werden hierin in Einzelheiten weiterbeschrieben. US-Patent Nr. 5,660,827, erteilt am 26. August 1997, ergänzt die vorliegende Lehre sogar weiter im Hinblick darauf, wie Antikörper gemacht werden, die an dasselbe oder im wesentlichen dasselbe Epitop wie ein gegebener Antikörper binden, wie etwa 2C3.

[0061] Zum Beispiel kann, wenn die zu untersuchenden Testantikörper von unterschiedlichen Ursprungstieren erhalten werden oder sogar von einem unterschiedlichen Isotyp sind, ein einfacher Wettbewerbsassay verwendet werden, bei dem die Kontroll(2C3)- und Testantikörper beigemischt werden (oder vor-adsorbiert werden) und auf eine VEGF-Antigen-Zusammensetzung aufgetragen werden. Mit „VEGF-Antigen-Zusammensetzung“ ist jede Zusammensetzung gemeint, die ein 2C3-bindendes VEGF-Antigen, wie hierin beschrieben, wie etwa freien VEGF, enthält. Daher sind Protokolle auf der Grundlage von ELISAs und Western-Blotting zur Verwendung in solchen simplen Wettbewerbstudien geeignet.

[0062] In bestimmten Ausführungsformen würde man die Kontrollantikörper (2C3) mit verschiedenen Mengen der Testantikörper (z.B. 1:10 oder 1:100) für eine Zeitperiode vormischen, bevor sie an einer Antigen-Zusammensetzung angewandt werden. In anderen Ausführungsformen können die Kontroll- und verschiedene Mengen an Testantikörpern einfach während des Aussetzens gegenüber der Antigenzusammensetzung beigemischt werden. Auf jeden Fall wird man durch Verwendung von Spezies- oder sekundären Isotyp-Antikörpern in der Lage sein, nur die gebundenen Kontrollantikörper nachzuweisen, deren Bindung durch die Anwesenheit eines Testantikörpers verringert sein wird, der im wesentlichen dasselbe Epitop erkennt.

[0063] Beim Durchführen einer Antikörper-Wettbewerbstudie zwischen einem Kontrollantikörper und einem Testantikörper (ungeachtet der Spezies oder des Isotyps), kann man zuerst die Kontrolle (2C3) mit einer nach-

weisbaren Markierung markieren, wie etwa z.B. Biotin, oder einer enzymatischen (oder sogar radioaktiven) Markierung, um eine darauffolgende Identifizierung zu ermöglichen. In diesen Zellen würde man die markierten Kontrollantikörper mit den zu untersuchenden Testantikörpern in verschiedenen Verhältnissen vormischen oder inkubieren (z.B. 1:10 oder 1:100) und (fakultativ nach einer geeigneten Zeitperiode) dann die Reaktivität der markierten Kontrollantikörper testen und dies mit einem Kontrollwert vergleichen, bei dem kein potentiell in Wettbewerb stehender Testantikörper in der Inkubation eingeschlossen war.

[0064] Der Assay kann wiederum einer aus einer Vielzahl von immunologischen Assays auf Grundlage von Antikörper-Hybridisierung sein, und die Kontrollantikörper würden mittels Nachweises ihrer Markierung nachgewiesen werden, z.B. unter Verwendung von Streptavidin im Falle von biotinylierten Antikörpern, oder durch Verwendung eines chromogenen Substrats in Zusammenhang mit einer enzymatischen Markierung (wie etwa 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin(TMB)-Substrat mit Peroxidase-Enzym), oder durch einfachen Nachweis einer radioaktiven Markierung. Ein Antikörper, der an dasselbe Epitop wie die Kontrollantikörper bindet, wird in der Lage sein, um eine Bindung effektiv in Wettbewerb zu treten, und wird somit signifikant die Kontrollantikörper-Bindung verringern, wie anhand einer Verringerung an gebundener Markierung nachgewiesen.

[0065] Die Reaktivität der (markierten) Kontrollantikörper in der Abwesenheit eines vollständig irrelevanten Antikörpers wäre der hohe Kontrollwert. Der niedrige Kontrollwert würde durch Inkubieren der markierten (2C3)-Antikörper mit nicht-markierten Antikörpern von genau demselben Typ (2C3) erhalten werden, wenn ein Wettbewerb stattfinden würde und die Bindung der markierten Antikörper verringern würde. In einem Testassay weist eine signifikante Verringerung an markierter Antikörperreaktivität in der Anwesenheit eines Testantikörpers auf einen Testantikörper hin, der dasselbe Epitop erkennt, d.h. einen, der mit dem markierten (2C3) Antikörper „kreuzreagiert“.

[0066] Eine signifikante Verringerung ist eine „reproduzierbare“, d.h. konsistent beobachtete Verringerung in der Bindung. Eine „signifikante Verringerung“ im Hinblick auf die vorliegende Anmeldung ist als eine reproduzierbare Verringerung (hinsichtlich der 2C3-Bindung an VEGF in einem ELISA) von wenigstens ungefähr 70%, ungefähr 75% oder ungefähr 80% bei einem beliebigen Verhältnis zwischen ungefähr 1:10 und ungefähr 1:100 definiert. Antikörper mit sogar noch stringenteren kreuz-blockierenden Aktivitäten werden eine reproduzierbare Verringerung (in der 2C3-Bindung an VEGF in einem ELISA oder einem anderen geeigneten Assay) von wenigstens ungefähr 82%, ungefähr 85%, ungefähr 88%, ungefähr 90%, ungefähr 92% oder ungefähr 95% oder ähnliches bei einem beliebigen Verhältnis zwischen ungefähr 1:10 und ungefähr 1:100 aufweisen. Vollständige oder nahezu vollständige Kreuz-Blockierung, wie etwa das Aufweisen einer reproduzierbaren Verringerung in der 2C3-Bindung an VEGF von ungefähr 99%, ungefähr 98%, ungefähr 97% oder ungefähr 96% oder ähnliches, obwohl auf keinen Fall erforderlich, um die Erfindung auszuüben, ist sicherlich nicht ausgeschlossen.

[0067] Die Erfindung wird durch den monoklonalen Antikörper 2C3 beispielhaft veranschaulicht, der durch Hybridom ATCC PTA 1595 oder ein Antigen-bindendes Fragment eines solchen monoklonalen Antikörpers erzeugt wird. Ein Hybridom, das einen monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper erzeugt, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, ist ein weiterer Aspekt der Erfindung.

[0068] Die Erfindung stellt weiterhin Anti-VEGF-Antikörper bereit, die an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden, hergestellt durch ein Verfahren, umfassend das Immunisieren eines Tieres mit wenigstens einem ersten immunogenen VEGF-Bestandteil, und Auswählen eines Antikörpers aus dem immunisierten Tier, der im wesentlichen mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) kreuzreagiert; sowie Anti-VEGF-Antikörper, die an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden, hergestellt durch ein Verfahren, umfassend das Immunisieren eines Tieres mit wenigstens einem ersten immunogenen VEGF-Bestandteil, und Auswählen eines kreuzreaktiven Anti-VEGF-Antikörpers aus dem immunisierten Tier durch Identifizieren eines Antikörpers, der die Bindung des 2C3-Antikörpers an VEGF wesentlich verringert.

[0069] Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, die an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden und die insbesondere die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren; und Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, die an im wesentlichen dasselben Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden und die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) signifikant zu inhibieren, bilden weitere Aspekte der Erfindung.

[0070] Antikörper mit solchen Kombinationen von Eigenschaften können in leichter Weise durch einen oder mehrere oder eine Kombination aus Rezeptor-Kompetition, ELISA, Co-Präzipitation und/oder funktionelle Assays und die 2C3-Kreuzreaktivitäts-Assays, oben beschreiben, in leichter Weise identifiziert werden. Die Anleitung im Hinblick auf die quantitative Beurteilung von 2C3-artigen Antikörpern, die konsistent in signifikanter Weise die VEGF-Bindung an VEGFR2 reduzieren und die konsistent in nicht signifikanter Weise die VEGF-Bindung an VEGFR1 inhibieren, ist wie oben beschrieben.

[0071] Es wird hierin gezeigt, daß 2C3 die Menge an VEGF, die mit VEGFR2-beschichteten ELISA-Näpfen eine Bindung einging, auf ungefähr 26% bzw. 19% bei 100-fachen und 1000-fachen molaren Überschüssen über VEGF verringerte. Diese Zahlen kommen Verringerungen hinsichtlich der VEGF-Bindung an VEGFR2 von ungefähr 74% bzw. ungefähr 81% gleich. Es wird hierin gezeigt, daß 2C3 die Menge an VEGF, die mit VEGFR2-beschichteten ELISA-Näpfen eine Bindung einging, bei ungefähr 92% bzw. 105% bei 100-fachen und 1000-fachen molaren Überschüssen über VEGF aufrecht erhält.

[0072] Es wird wiederum verstanden werden, daß 2C3-artige oder kreuzreaktive Antikörper, die im wesentlichen die VEGF-Bindung an VEGFR2 inhibieren, wahrscheinlich mehr Verringerung hinsichtlich der Bindung an VEGFR1 tolerieren können. In gleicher Weise sollte, wenn ein Antikörper eine mäßige Verringerung hinsichtlich der VEGF-Bindung an VEGFR2 hat, die Aufrechterhaltung der Bindung an VEGFR1 in stringenterer Weise verfolgt werden.

[0073] Zusätzliche beispielhafte Anti-VEGF-Antikörper (und Antigen-bindende Fragmente) der Erfindung sind deshalb diejenigen, die:

- (a) an ein nicht-konformationsabhängiges VEGF-Epitop binden, beurteilt anhand der Bindung an VEGF in einem Western-Blot;
- (b) an freien VEGF binden;
- (c) signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibieren;
- (d) nicht signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) inhibieren;
- (e) die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (f) die VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (g) die VEGF-vermittelte Endothelzellproliferation inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (h) die Angiogenese inhibieren und bevorzugt signifikant inhibieren;
- (i) die VEGFR1-vermittelte Stimulation oder Aktivierung von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten nicht signifikant inhibieren;
- (j) bei Verabreichung an ein Tier mit einem vaskularisierten Tumor sich zu den Tumorgefäßen und dem Tumorstroma bewegen („localize“); und
- (k) an dasselbe oder im wesentlichen dasselbe Epitop wieder monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) binden.

[0074] In den folgenden Beschreibungen der Zusammensetzungen, Immunkonjugaten, Pharmazeutika, Kombinationen, Cocktails, Kits, ersten und zweiten medizinischen Verwendungen und allen Verfahren in Übereinstimmung mit dieser Erfindung beziehen sich die Begriffe „Antikörper“ und „Immunkonjugat“ oder eine Antigen-bindende Region davon, sofern nicht anderweitig spezifisch festgestellt oder anhand der wissenschaftlichen Terminologie erläutert, auf eine Vielzahl von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern ebenso wie auf spezifische 2C3-kreuzreaktive Antikörper.

[0075] Die Begriffe „Antikörper“ und „Immunglobulin“, wie hierin verwendet, beziehen sich in breiter Weise auf jedes immunologische bindende Mittel, einschließlich polyklonaler und monoklonaler Antikörper. Abhängig von dem Typ der konstanten Domäne in den schweren Ketten werden Antikörper auf eine von fünf Hauptklassen aufgeteilt; IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Mehrere von diesen werden weiter in Unterklassen oder Isotypen aufgeteilt, wie etwa IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und ähnliche. Die schwerkettigen konstanten Domänen, die den Unterschiedsklassen der Immunglobuline entsprechen, werden als α , δ , ϵ , γ bzw. μ bezeichnet. Die Untereinheitsstrukturen und dreidimensionalen Konfigurationen der unterschiedlichen Klassen der Immunglobuline sind wohlbekannt.

[0076] Im allgemeinen werden, wenn Antikörper statt Antigen-bindende Regionen bei der Erfindung verwendet werden, IgG und/oder IgM bevorzugt, da sie die häufigsten Antikörper in der physiologischen Situation sind und da sie am leichtesten in einer Laborumgebung hergestellt werden.

[0077] Die „leichten Ketten“ von Säugetierantikörpern werden einem von zwei deutlich unterschiedlichen Typen zugeordnet: kappa (κ) und lambda (λ), auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Do-

mänen. Es gibt im wesentlichen keine Präferenz für die Verwendung von κ - oder λ -leichten Ketten in den Antikörpern der vorliegenden Erfindung.

[0078] Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (MAbs) oder Derivaten davon wird sehr bevorzugt. Es ist anerkannt, daß MAbs bestimmte Vorteile haben, z.B. Reproduzierbarkeit und Produktion auf großem Maßstab, die sie zur klinischen Behandlung geeignet machen. Die Erfindung stellt somit monoklonale Antikörper aus murinem, humanem, Affen-, Ratten-, Hamster-, Kaninchen- und sogar Frosch- oder Hühnchenursprung bereit. Marine, humane oder humanisierte monoklonale Antikörper werden im allgemeinen bevorzugt sein.

[0079] Wie von Fachleuten verstanden werden wird, erstrecken sich die immunologischen bindenden Reagenzien, die von dem Begriff „Antikörper“ umfaßt werden, auf alle Antikörper von allen Spezies und Antigen-bindenden Fragmenten davon, einschließlich dimeren, trimeren und multimeren Antikörpern, bispezifischen Antikörpern, chimären Antikörpern, humanen und humanisierten Antikörpern, rekombinanten und gentechnisch hergestellten Antikörpern und Fragmenten davon.

[0080] Der Begriff „Antikörper“ wird somit verwendet, um sich auf ein Antikörper-artiges Molekül zu beziehen, das eine Antigen-Bindungsregion hat, und dieser Begriff schließt Antikörperfragmente, wie etwa Fab', Fab, F(ab')₂, Einzeldomänen-Antikörper (DABs), Fv, scFv (Einzelketten Fv), lineare Antikörper, Diabodies und ähnliches ein. Die Techniken zum Herstellen und Verwenden verschiedener Antikörper-basierender Konstrukte und Fragmente sind auf dem Gebiet gut bekannt, (siehe Kabat et al., 1991). Insbesondere Diabodies werden weiter beschrieben in EP 404, 097 und WO 93/11161, während lineare Antikörper weiter beschrieben sind in Zapata et al. (1995).

[0081] In bestimmten Ausführungsformen umfassen die Zusammensetzungen der Erfindung wenigstens einen ersten Anti-VEGF-Antikörper, der wenigstens eine erste variable Region umfaßt, die eine Aminosäuresequenzregion von wenigstens ungefähr 75%, bevorzugter wenigstens ungefähr 80%, bevorzugter wenigstens ungefähr 85%, bevorzugter wenigstens ungefähr 90% und am bevorzugtesten wenigstens ungefähr 95% oder ähnliches an Aminosäuresequenzidentität zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO:9 einschließt; wobei besagter Anti-VEGF-Antikörper wenigstens im wesentlichen die biologischen Eigenschaften der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers der vorliegenden Erfindung beibehält, wie durch den 2C3-Antikörper beispielhaft veranschaulicht.

[0082] Die Identität oder Homologie in Bezug auf diese und andere Anti-VEGF-Antikörpersequenzen der vorliegenden Erfindung wird hierin als der prozentuale Anteil an Aminosäureresten in einer Kandidatensequenz definiert, die zu den Sequenzen von SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO:9 oder zu der Sequenz eines anderen Anti-VEGF-Antikörpers der Erfindung identisch sind, nach einem Aligning der Sequenzen und der Einführung von Lücken, sofern notwendig, um die maximale prozentuale Sequenzidentität zu erzielen. Die Aufrechterhaltung von im wesentlichen denselben oder sogar wirksameren biologischen Eigenschaften des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers, der für den Sequenzvergleich verwendet wird, ist besonders wichtig. Solche Vergleiche werden in leichter Weise durchgeführt, z.B. unter Verwendung von einem oder mehreren der verschiedenen, hierin im einzelnen beschriebenen Assays.

[0083] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen umfassen die Anti-VEGF-Antikörper der Erfindung wenigstens eine erste variable Region, die eine Aminosäuresequenzregion mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9 einschließt, wie beispielhaft veranschaulicht durch variable Regionen, die eine Aminosäuresequenzregion einschließen, die durch die Nukleinsäuresequenzen von SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:8 kodiert wird. Solche Sequenzen sind die Sequenzen von Vh und Vk von 2C3 ScFv umfassenden CDR1-3 (Komplementaritäts-bestimmende Regionen) der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten.

[0084] In anderen bevorzugten Ausführungsformen werden Antikörper der zweiten Generation bereitgestellt, die verstärkte oder bessere Eigenschaften im Vergleich zu einem ursprünglichen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, haben. Zum Beispiel können die Antikörper der zweiten Generation eine stärkere Bindungsaffinität, effektivere Blockierung der VEGF-Bindung an VEGFR2, spezifischere Blockierung der VEGF-Bindung an VEGFR2, sogar weniger Blockierung der VEGF-Bindung an VEGFR1, eine verbesserte Fähigkeit, die VEGF-induzierte Proliferation und/oder Migration von Endothelzellen zu inhibieren, eine bessere Fähigkeit, die VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität zu inhibieren, und bevorzugt eine verstärkte Fähigkeit, die VEGF-induzierte Angiogenese in vivo zu inhibieren und angiogene Krankheiten, einschließlich vaskularisierter Tumore zu behandeln, haben.

[0085] Vergleiche zum Identifizieren von wirksamen Antikörpern der zweiten Generation werden in leichter Weise durchgeführt und quantifiziert, z.B. unter Verwendung von einem oder mehreren verschiedenen, hierin im einzelnen beschriebenen Assays. Die Antikörper der zweiten Generation, die eine verbesserte biologische Eigenschaft oder Aktivität von wenigstens ungefähr 10-fach, bevorzugt wenigstens ungefähr 20-fach und bevorzugter wenigstens ungefähr 50-fach im Vergleich mit den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern der vorliegenden Erfindung, wie beispielhaft durch den 2C3-Antikörper veranschaulicht, haben, werden von der vorliegenden Erfindung umfaßt.

[0086] In bestimmten Ausführungsformen werden die verwendeten Antikörper „humanisierte“, teilweise humane oder humane Antikörper sein. „Humanisierte“ Antikörper sind im allgemeinen chimäre monoklonale Antikörper aus der Maus, der Ratte oder einer anderen nicht-humanen Spezies, die humane konstante und/oder variable Region-Domänen tragen („teilweise humane chimäre Antikörper“). Verschiedene humanisierte monoklonale Antikörper zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung werden chimäre Antikörper sein, bei denen wenigstens eine erste Antigen-bindende Region oder eine Komplementaritäts-bestimmende Region (CDR) eines Maus-, Ratten- oder anderen nicht-humanen monoklonalen Antikörpers an eine humane konstante Antikörperregion oder „ein Netzwerk“ operativ angehängt oder darauf „aufgefropft“ ist.

[0087] „Humanisierte“ monoklonale Antikörper zur Verwendung hierin können ebenso monoklonale Antikörper von nicht-humanen Spezies sein, bei denen eine oder mehrere ausgewählte Aminosäuren gegen Aminosäuren ausgetauscht sind, die häufiger in humanen Antikörpern beobachtet werden. Dies kann in leichter Weise durch die Verwendung von rekombinanter Routine-Technologie, insbesondere ortsspezifische Mutagenese erzielt werden.

[0088] Vollständig humane, statt „humanisierte“ Antikörper können ebenso hergestellt und bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Solche humanen Antikörper können aus gesunden Individuen durch einfaches Erhalten einer Population von gemischten peripheren Blutlymphocyten aus einem menschlichen Patienten, einschließlich Antigen-präsentierender und Antikörper-produzierender Zellen, und durch Stimulieren der Zellpopulation in vitro durch Beimischen einer immunogen wirksamen Menge einer VEGF-Probe erhalten werden. Die humanen Anti-VEGF-Antikörper-produzierenden Zellen werden nach Erhalt in der Hybridom- und/oder rekombinanten Antikörperproduktion verwendet.

[0089] Weitere Techniken für die Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern schließen das Immunisieren eines transgenen Tieres, bevorzugt einer transgenen Maus ein, die eine humane Antikörperbibliothek umfaßt, mit einer immunogenen wirksamen Menge einer VEGF-Probe ein. Dies erzeugt ebenso humane Anti-VEGF-Antikörper-produzierende Zellen für die weitere Handhabung in der Hybridom- und/oder rekombinanten Antikörperproduktion, mit dem Vorteil, daß Milzzellen statt periphere Blutzellen in leichter Weise aus dem transgenen Tier oder der Maus erhalten werden können.

[0090] VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper in Übereinstimmung mit der Erfindung können in leichter Weise durch Prozesse und Verfahren hergestellt werden, die umfassen:

- (a) Herstellen von Antikörper-Kandidaten-produzierenden Zellen; und
- (b) Auswählen eines Antikörpers aus den Antikörper-Kandidaten-produzierenden Zellen, der signifikant die VEGF-Bindung an VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert und nicht signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) inhibiert.

[0091] Andere Antikörper in Übereinstimmung mit der Erfindung können in leichter Weise hergestellt werden durch Auswählen eines Antikörpers, der im wesentlichen mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATTC PTA 1595) kreuzreagiert. Geeignete präparative Prozesse und Verfahren umfassen:

- (a) Herstellen von Antikörper-Kandidaten-produzierenden Zellen; und
- (b) Auswählen eines Antikörpers aus den Antikörper-Kandidaten-produzierenden Zellen, der im wesentlichen mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATTC PTA 1595) kreuzreagiert.

[0092] Ein Prozeß zum Herstellen von geeigneten Antikörper-produzierenden Zellen und zum Erhalten von Antikörpern hiervon kann in situ in einem gegebenen Patienten durchgeführt werden. D.h., das einfache Bereitstellen einer immunogen wirksamen Menge einer immunogenen VEGF-Probe an einen Patienten wird zu einer geeigneten Antikörper-Erzeugung führen. Daher wird der Antikörper immer noch aus der Antikörper-erzeugenden Zelle „erhalten“, aber er muß nicht mehr aus einem Wirt isoliert und anschließend an einen Patienten verabreicht werden, da er in der Lage ist, sich spontan zu den Tumorgefäßen zu begeben und seine biologischen Anti-Tumor-Effekte auszuüben. Jedoch werden solche Ausführungsformen aufgrund des merkbaren Mangels an Spezifität nicht bevorzugt.

[0093] Geeignete Antikörper-produzierende Zellen können ebenso erhalten und darauffolgend Antikörper isoliert und/oder aufgereinigt werden, indem periphere Blutlymphocyten mit VEGF in vitro stimuliert werden.

[0094] Andere Verfahren umfassen das Verabreichen einer immunisierenden Zusammensetzung an ein Tier, umfassend wenigstens einen ersten immunogenen VEGF-Bestandteil, und Auswählen eines Antikörpers aus dem immunisierten Tier, der signifikant die VEGF-Bindung an VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert und nicht signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) inhibiert, und der fakultativ mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) im wesentlichen kreuzreagiert. Diese Verfahren umfassen im allgemeinen:

- (a) Immunisieren eines Tiers durch Verabreichung von wenigstens einer Dosis und fakultativ mehr als einer Dosis einer immunogen wirksamen Menge einer immunogenen VEGF-Probe an das Tier (wie etwa einen ersten humanen VEGF-Bestandteil, einen VEGF-Bestandteil mit im wesentlichen voller Länge oder rekombinanten humanen VEGF); und
- (b) Erhalten einer geeigneten Antikörper-erzeugenden Zelle aus dem immunisierten Tier, wie etwa eine Antikörper-erzeugende Zelle, die einen Antikörper erzeugt, der signifikant die VEGF-Bindung an VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert und nicht signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) inhibiert, und der fakultativ mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) im wesentlichen kreuzreagiert.

[0095] Die immunogen wirksame Menge der VEGF-Probe oder Proben kann als VEGF-Konjugate oder in Kombination mit einem geeigneten Adjuvans verabreicht werden, wie etwa Freundschem vollständigem Adjuvant. Jede empirische Technik oder Variation kann verwendet werden, um die Immunogenität zu erhöhen. Intaktes humanes VEGF mit im wesentlichen voller Länge wird im allgemeinen als ein Immunogen bevorzugt.

[0096] Ungeachtet der Natur des Immunisierungsprozesses oder des Typs des immunisierten Tieres werden geeignete Antikörper-produzierende Zellen aus dem immunisierten Tier erhalten und bevorzugt weiter von Menschenhand manipuliert. „Ein immunisiertes Tier“, wie hierin verwendet, ist ein nicht-humanes Tier, sofern nicht anderweitig ausdrücklich festgestellt. Obwohl jede Antikörper-produzierende Zelle verwendet werden kann, werden am bevorzugtesten Milzzellen als Quelle der Antikörper-produzierenden Zellen erhalten. Die Antikörperproduzierenden Zellen können in einem Herstellungsprozeß verwendet werden, der umfaßt:

- (a) Fusionieren einer geeigneten Anti-VEGF-Antikörper-produzierenden Zelle mit einer unsterblichen Zelle, um ein Hybridom herzustellen, das einen monoklonalen Antikörper in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung erzeugt; und
- (b) Erhalten eines geeigneten Anti-VEGF-Antikörpers in Übereinstimmung mit der Erfindung aus dem Hybridom.

[0097] „Geeignete“ Anti-VEGF-Antikörper-erzeugende Zellen, Hybridome und Antikörper sind diejenigen, die VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper produzieren oder als solche existieren, d.h. Antikörper, die die VEGF-Bindung an VEGFR2 (KDR/Flk-1) signifikant inhibieren und die die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) nicht signifikant inhibieren, und fakultativ, die mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) im wesentlichen kreuzreagieren.

[0098] Hybridom-basierende, monoklonale Antikörper-produzierende Verfahren schließen somit diejenigen ein, die umfassen:

- (a) Immunisieren eines Tieres durch Verabreichen von mindestens einer Dosis und fakultativ mehr als einer Dosis einer immunogen wirksamen Menge einer immunogenen VEGF-Probe, bevorzugt einer intakten humanen VEGF-Probe an das Tier;
- (b) Herstellen einer Sammlung von monoklonalen Antikörper-produzierenden Hybridomen aus dem immunisierten Tier;
- (c) Auswählen wenigstens eines ersten Hybridoms aus der Sammlung, das wenigstens einen ersten monoklonalen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper in Übereinstimmung mit der Erfindung erzeugt, fakultativ einen Anti-VEGF-Antikörper, der mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) im wesentlichen kreuzreagiert;
- (d) Kultivieren des wenigstens ersten Antikörper-erzeugenden Hybridoms, um den wenigstens ersten monoklonalen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper bereitzustellen; und bevorzugt
- (e) Erhalten des wenigstens ersten monoklonalen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers aus dem kultivierten wenigstens ersten Hybridom.

[0099] Beim Identifizieren eines Anti-VEGF-Antikörpers, der mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) im wesentlichen kreuzreagiert, kann der Auswahlschritt umfassen:

- (a) In-Kontakt-Bringen einer VEGF-Probe mit wirksamen Mengen des monoklonalen Antikörpers 2C3 (ATCC PTA 1595) und einem Kandidaten-Antikörper; und
- (b) Bestimmen der Fähigkeit des Kandidaten-Antikörpers, die Bindung des 2C3-Antikörpers an die VEGF-Probe im wesentlichen zu verringern; wobei die Fähigkeit eines Kandidaten-Antikörpers, die Bindung des 2C3-Antikörpers an die VEGF-Probe im wesentlichen zu verringern, auf einen Anti-VEGF-Antikörper hinweist, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet.

[0100] Der Auswahlsschritt kann weiter umfassen:

- (a) In-Kontakt-Bringen einer ersten VEGF-Probe mit einer wirksamen Bindungsmenge des monoklonalen Antikörpers 2C3 (ATCC PTA 1595) und Bestimmen der Menge an 2C3, die an VEGF bindet;
- (b) In-Kontakt-Bringen einer zweiten VEGF-Probe mit einer wirksam bindenden Menge des monoklonalen Antikörpers 2C3 (ATCC PTA 1595) in Kombination mit einer wirksamen in Wettbewerb tretenden Menge des Kandidaten-Antikörpers und Bestimmen der Menge an 2C3, der an VEGF in der Anwesenheit des Kandidaten-Antikörpers bindet; und
- (c) Identifizieren eines Anti-VEGF-Antikörpers, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, durch Auswählen eines Kandidaten-Antikörpers, der die Menge an 2C3, die an VEGF bindet, um bevorzugt wenigstens ungefähr 80% verringert.

[0101] Da nicht-humane Tiere für die Immunisierung verwendet werden, werden die monoklonalen Antikörper, die aus einem solchen Hybridom erhalten werden, oft eine nicht-humane Aufmachung haben. Solche Antikörper können fakultativ einem Humanisierungsprozeß, einer Propfung oder Mutation unterzogen werden, wie sie Fachleuten auf dem Gebiet bekannt ist und hierin weiter offenbart wird. Alternativ können transgene Tiere, wie etwa Mäuse, verwendet werden, die eine menschliche Antikörper-Gen-Bibliothek umfassen. Die Immunisierung von solchen Tieren wird deshalb direkt zur Erzeugung von geeigneten humanen Antikörpern führen.

[0102] Nach der Erzeugung einer geeigneten Antikörper-produzierenden Zelle, am bevorzugtesten eines Hybridoms, ob es humane oder nicht-humane Antikörper erzeugt, können die monoklonalen Antikörper-kodierenden Nukleinsäuren kloniert werden, um einen „rekombinanten“ monoklonalen Antikörper herzustellen. Jede rekombinante Klonierungstechnik kann verwendet werden, einschließlich der Verwendung von PCRTM, um die Synthese der Antikörperkodierenden Nukleinsäuresequenzen zu beginnen. Deshalb schließen noch weitere geeignete monoklonale Antikörper-erzeugende Verfahren diejenigen ein, die die Verwendung der Antikörper-erzeugenden Zellen wie folgt umfassen:

- (a) Erhalten von wenigstens einem ersten geeigneten Anti-VEGF-Antikörper-kodierenden Nukleinsäuremolekül oder Segment aus einer geeigneten Anti-VEGF-Antikörpererzeugenden Zelle, bevorzugt einem Hybridom; und
- (b) Exprimieren des Nukleinsäuremoleküls oder Segments in einer rekombinanten Wirtszelle, um einen rekombinanten monoklonalen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

[0103] Jedoch sind andere starke rekombinante Techniken verfügbar, die ideal zur Herstellung von rekombinanten monoklonalen Antikörpern geeignet sind. Solche rekombinanten Techniken schließen die Phagemid-Bibliothek-basierenden, monoklonale, Antikörper-erzeugenden Verfahren ein, umfassend:

- (a) Immunisieren eines Tieres durch Verabreichung von wenigstens einer Dosis an das Tier, und fakultativ mehr als einer Dosis einer immunogen wirksamen Menge einer immunogenen VEGF-Probe (wie etwa einer intakten humanen VEGF-Probe);
- (b) Herstellen einer kombinatorischen Immunglobulin-Phagemid-Bibliothek, die RNA exprimiert, die aus den Antikörper-erzeugenden Zellen isoliert worden ist, bevorzugt aus der Milz, des immunisierten Tiers;
- (c) Auswählen von wenigstens einem ersten Klon aus der Phagemid-Bibliothek, der wenigstens einen ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper exprimiert, fakultativ einen, der mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) im wesentlichen kreuzreagiert;
- (d) Erhalten von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-kodierenden Nukleinsäuren aus dem wenigstens ersten ausgewählten Klon und Exprimieren der Nukleinsäuren in einer rekombinanten Wirtszelle, um den wenigstens ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper bereitzustellen; und bevorzugt
- (e) Erhalten des wenigstens ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers, der durch die Nukleinsäuren exprimiert wird, die von dem wenigstens ersten ausgewählten Klon erhalten werden.

[0104] Wiederum können in solchen Phagemid-Bibliothek-basierenden Techniken transgene Tiere, die humane Antikörper-Gen-Bibliotheken tragen, verwendet werden, wodurch sie rekombinante humane monoklonale

Antikörper ergeben.

[0105] Unabhängig von der Art der Herstellung eines ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-Nukleinsäuresegments können weitere geeignete Antikörper-Nukleinsäuresegmente in leichter Weise mittels molekularbiologischer Standardtechniken hergestellt werden. Um zu bestätigen, daß ein variantes, mutantes oder VEGFR2-blockierendes Anti-VEGF-Antikörper-Nukleinsäuresegment der zweiten Generation zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wird das Nukleinsäuresegment getestet werden, um die Expression eines VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zu bestätigen. Bevorzugt wird das variante, mutante oder Nukleinsäuresegment der zweiten Generation ebenso getestet werden, um die Hybridisierung unter Standardbedingungen zu bestätigen, bevorzugter unter stringenten Hybridisierungs-Standardbedingungen. Beispielhafte geeignete Hybridisierungsbedingungen schließen die Hybridisierung in ungefähr 7% Natriumdodecylsulfat (SDS), ungefähr 0,5 M NaPO₄, ungefähr 1 mM EDTA bei ungefähr 50%, und Waschen mit ungefähr 1% SDS bei ungefähr 42°C ein.

[0106] Da eine Vielzahl von rekombinanten monoklonalen Antikörpern, ob humanen oder nicht-humanen Ursprungs, in leichter Weise hergestellt werden können, können die Behandlungsverfahren der Erfindung durchgeführt werden, indem an das Tier oder Patienten wenigstens ein erstes Nukleinsäuresegment verabreicht wird, das eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper in den Patienten exprimiert. Das „Nukleinsäuresegment, das einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-, 2C3-artigen oder 2C3-basierenden Antikörper exprimiert“, wird im allgemeinen in der Form von wenigstens einem Expressionskonstrukt sein und kann in der Form eines Expressionskonstrukts sein, das innerhalb eines Virus oder innerhalb einer rekombinanten Wirtszelle umfaßt ist. Bevorzugte Gentherapievektoren der vorliegenden Erfindung werden im allgemeinen virale Vektoren sein, wie etwa in einem rekombinanten Retrovirus, Herpes-Simplex-Virus (HV), Adenovirus, Adeno-assoziierten Virus (AAV), Cytomegalovirus (CMV) und Ähnlichem umfaßt.

[0107] Die Erfindung stellt weiterhin Zusammensetzungen bereit, umfassend wenigstens einen ersten aufgereinigten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet. Solche Zusammensetzungen können pharmazeutisch annehmbare Zusammensetzungen oder Zusammensetzungen zur Verwendung in Laborstudien sein. Hinsichtlich der pharmazeutischen Zusammensetzungen können diese bevorzugt zur parenteralen Verabreichung, wie etwa zur intravenösen Verabreichung, formuliert sein.

[0108] Die vorliegende Erfindung stellt eine Anzahl von Verfahren und Verwendungen der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, einschließlich der 2C3-kreuzreaktiven, 2C3-artigen oder 2C3-basierenden Antikörper bereit. Hinsichtlich aller Verfahren wird der Begriff „ein“ dahingehend verwendet, daß er „wenigstens ein“, „wenigstens einen ersten“, „einen oder mehr“ oder „eine Vielzahl“ von Schritten in den aufgeführten Verfahren bedeutet, außer wenn eine Besonderheit dargestellt wird. Dies ist besonders für die Verabreichungsschritte bei den Behandlungsverfahren relevant. Daher können nicht nur unterschiedliche Dosen mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sondern auch unterschiedliche Anzahlen von Dosen, z.B. Injektionen können verwendet werden bis zu und einschließlich multipler Injektionen. Kombinierte Therapeutika können verwendet werden, vorher, nachher oder während der Verabreichung des Anti-VEGF-therapeutischen Antikörpers verabreicht werden.

[0109] Verschieden nützliche in-vitro-Verfahren und -verwendungen werden bereitgestellt, die wichtige biologische Implikationen haben. Als erstes werden Verfahren und Verwendungen bei der Bindung von VEGF bereitgestellt, die im allgemeinen das wirksame In-Kontakt-Bringen einer Zusammensetzung, umfassend VEGF, bevorzugt freien (nicht-Rezeptor-gebundenen) VEGF, mit wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder einem Antigen-bindenden Fragment davon, fakultativ einem Antikörper, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, umfaßt.

[0110] Verfahren zu und Verwendung bei dem Nachweis von VEGF werden bereitgestellt, die im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen einer Zusammensetzung umfassen, von der angenommen wird, daß sie VEGF enthält, mit wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindenden Fragment davon, fakultativ mit einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, unter Bedingungen, die wirksam sind, um die Bildung von VEGF/Antikörper-Komplexen ermöglichen, und Nachweis der so gebildeten Komplexe. Die Nachweisverfahren und Verwendungen können zusammen mit biologischen Proben verwendet werden, z.B. bei Diagnostika für die Angiogenese und Tumore, und es werden ebenso darauf basierende Diagnosekits bereitgestellt.

[0111] Die vorliegenden Erfindung stellt Verfahren zum und Verwendungen bei dem bevorzugten oder spezifischen Inhibieren der VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor, VEGFR2, bereit, die im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen in der Anwesenheit von VEGF einer Population von Zellen oder Geweben umfassen, die Endothelzellen einschließen, welche VEGFR2 (KDR/Flk-1) exprimieren, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder einem Antigen-bindenden Fragment davon, unter Bedingungen, die wirksam sind, daß sie die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 inhibieren.

[0112] Verfahren zu und Verwendung bei dem signifikanten Inhibieren der VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 zu inhibieren, werden bereitgestellt. Diese Verfahren umfassen das In-Kontakt-Bringen, in der Anwesenheit von VEGF, einer Population von Zellen oder Geweben, die eine Population von Endothelzellen einschließt, welche VEGFR2 (KDR/Flk-1) und VEGFR1 (Flt-1) exprimieren, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem Anti-VEGF-Antikörper, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, unter Bedingungen, die wirksam sind, die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 zu inhibieren, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 zu inhibieren.

[0113] Weitere Verfahren und Verwendungen der Erfindung liegen im Analysieren der biologischen Rollen der VEGF-Rezeptoren, bezeichnet als VEGFR2 und VEGFR1, umfassend die Schritte:

- (a) In-Kontakt-Bringen einer biologischen Zusammensetzung oder Gewebe, das VEGF und einer Population von Zellen umfaßt, die VEGFR2 (KDR/Flk-1) und VEGFR1 (Flt-1)-Rezeptoren exprimieren, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem Anti-VEGF-Antikörper, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon; und
- (b) Bestimmen des Effekts des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers auf wenigstens eine erste biologische Antwort auf VEGF, wobei:
 - (i) eine Veränderung in einer biologischen Antwort in der Anwesenheit des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers auf eine Antwort hinweist, die durch den VEGFR2-Rezeptor vermittelt wird; und
 - (ii) die Aufrechterhaltung einer biologischen Antwort in der Anwesenheit des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers auf eine Antwort hinweist, die durch den VEGFR1-Rezeptor vermittelt wird.

[0114] Proliferationsinhibitionsverfahren und -verwendungen werden bereitgestellt, einschließlich denjenigen, um die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -migration spezifisch zu inhibieren, die im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen einer Population von Zellen oder Geweben umfassen, die eine Population von Endothelzellen und VEGF einschließt, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder einem Antigen-bindenden Fragment des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers, unter Bedingungen, die wirksam sind, um die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -migration zu inhibieren.

[0115] Verfahren zu und Verwendungen bei dem Inhibieren der VEGF-induzierten Endothelzellproliferation und/oder -migration, ohne signifikant die VEGF-induzierte Macrophagen-Chemotaxis zu inhibieren, werden bereitgestellt, die im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen einer Population von Zellen oder Geweben umfassen, die Endothelzellen, Macrophagen und VEGF enthält, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder einem Antigen-bindenden Fragment des Anti-VEGF-Antikörpers, unter Bedingungen, die wirksam sind, die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -migration zu inhibieren, ohne signifikant die VEGF-induzierte Macrophagen-Chemotaxis zu inhibieren.

[0116] Verfahren zu und Verwendungen bei dem Inhibieren der VEGF-induzierten Endothelzellproliferation und/oder -migration und fakultativ Angiogenese, ohne signifikant die VEGF-Stimulation von Macrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten zu inhibieren, werden weiterhin bereitgestellt. Die Verfahren umfassen im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen einer Population von Zellen oder Geweben, die Endothelzellen und wenigstens einen aus Macrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten enthalten, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, An-

ti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers, unter Bedingungen, die wirksam sind, die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -migration oder Angiogenese zu inhibieren, ohne signifikant die VEGF-Stimulation der Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten zu inhibieren.

[0117] Die vorhergehenden Verfahren und Verwendungen können in vitro und in vivo durchgeführt werden, im letzteren Fall, wobei sich die Gewebe oder Zellen innerhalb eines Tieres befinden und der Anti-VEGF-Antikörper an das Tier verabreicht wird. In beiden Fällen werden die Verfahren und Verwendungen zu Verfahren und Verwendungen zum Inhibieren von Angiogenese, umfassend das In-Kontakt-Bringen eines Gewebes, umfassend potentiell angiogene Blutgefäße, oder eine Population von potentiell angiogenen Blutgefäßen, d.h. denjenigen, die potentiell gegenüber VEGF exponiert sind, mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigenbindendes Fragment davon, unter Bedingungen, die zum Inhibieren der Angiogenese wirksam sind.

[0118] Wenn Populationen von potentiell angiogenen Blutgefäßen ex vivo gehalten werden, hat die vorliegende Erfindung Nützlichkeit bei Programmen zur Entdeckung von Arzneien. In-vitro-Screening-Assays mit zuverlässigen positiven und negativen Kontrollen sind als ein erster Schritt bei der Entwicklung von Arzneien nützlich, um die Angiogenese zu inhibieren oder zu fördern, ebenso wie bei der Aufklärung von weiteren Informationen hinsichtlich des Angiogeneseprozesses. Wenn sich die Population von potentiell angiogenen Blutgefäßen in einem Tier oder Patienten befindet, wird die anti-angiogene Zusammensetzung an das Tier als eine Form der Therapie verabreicht.

[0119] „Biologisch wirksame Mengen“ hinsichtlich jedem der vorhergehenden inhibitorischen Verfahren sind deshalb Mengen von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern, fakultativ 2C3-basierenden Antikörpern, die wirksam sind, um die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -Migration zu inhibieren, die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -Migration zu inhibieren, ohne signifikant die VEGF-induzierte Makrophagen-Chemotaxis zu inhibieren, die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation und/oder -Migration oder Angiogenese zu inhibieren, ohne die VEGF-Stimulation von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten signifikant zu inhibieren, und insgesamt die Gefäßendothelzellproliferation und/oder -Migration auf eine Weise zu verringern, die wirksam ist, um das Wachstum von Blutgefäßen oder Angiogenese zu inhibieren.

[0120] Die Erfindung stellt somit Verfahren zu und Verwendung bei dem Inhibieren von VEGF-induzierter Angiogenese und bevorzugt dem Behandeln einer angiogenen Krankheit bereit, ohne die VEGF-Stimulation von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten signifikant zu inhibieren. Die Verfahren umfassen im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen einer Population von Zellen oder Geweben, die Endothelzellen und wenigstens einen aus Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten enthalten, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder einem Antigen-bindenden Fragment des Antikörpers, unter Bedingungen, die wirksam sind, die VEGF-induzierte Angiogenese zu inhibieren und eine angiogene Krankheit zu behandeln, ohne signifikant die VEGF-Stimulation von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten zu inhibieren.

[0121] Verfahren zu und Verwendung bei dem Inhibieren von VEGF-induzierter Angiogenese und bevorzugt dem Behandeln einer anti-angiogenen Krankheit, ohne signifikante Nebenwirkungen am Knochenmetabolismus zu verursachen, werden weiterhin bereitgestellt. Die Verfahren umfassen im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen eines Gewebes oder einer Population von angiogenen Gefäßen, die Gefäßendothelzellen und wenigstens einen von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten enthalten, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers, unter Bedingungen, die wirksam sind, die VEGF-induzierte Angiogenese zu inhibieren und eine angiogene Krankheit zu behandeln, ohne signifikante Nebenwirkungen am Knochenmetabolismus zu verursachen, indem die Aktivitäten der Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten nicht signifikant beeinträchtigt werden.

[0122] Das Screenen auf anti-angiogene Arzneien (in vitro) und die Therapie (in vivo) werden hinsichtlich Tieren und Patienten bereitgestellt, die eine Krankheit oder Störung haben oder ein Risiko dafür tragen, diese zu

entwickeln, gekennzeichnet durch eine unerwünschte, unangemessene, abweichende, übermäßige und/oder pathologische Vaskularisierung. Es ist Fachleuten auf dem Gebiet wohlbekannt, daß, da eine abweichende Angiogenese in einer großen Vielzahl von Krankheiten und Störungen auftritt, eine gegebene anti-angiogene Therapie, von der einmal gezeigt worden ist, daß sie in einem akzeptablen Modellsystem wirksam ist, dazu verwendet werden kann, den gesamten Bereich an Krankheiten und Störungen zu behandeln, die mit Angiogenese verbunden sind.

[0123] Die Verfahren und Verwendungen der vorliegenden Erfindung sind besonders zur Verwendung bei Tieren und Patienten beabsichtigt, die eine Form von vaskularisiertem Tumor, Maculadegeneration, einschließlich altersbedingter Maculadegeneration, Arthritis, einschließlich rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose und arteriosklerotische Plaques, diabetische Retinopathie und andere Retinopathien, Hyperplasien der Schilddrüse, einschließlich Basedowsche Krankheit, Hämangiom, neovaskuläres Glaukom und Psoriasis haben oder ein Risiko zur Entwicklung hiervon tragen.

[0124] Die Verfahren und Verwendungen der Erfindung sind weiterhin zur Behandlung von Tieren und Patienten beabsichtigt, die arteriovenöse Fehlbildungen (AVM), Meningiom und Gefäßrestenose, einschließlich Restenose nach Angioplastie haben oder ein Risiko zur Entwicklung hiervon tragen. Andere beabsichtigte Ziele der therapeutischen Verfahren und Verwendungen sind Tiere und Patienten, die Angiofibrom, Dermatitis und Endometriose, hämophile Gelenke, hypertrophe Narben, entzündliche Krankheiten und Störungen, pyogenes Granulom, Skleroderma, Synovitis, Trachom und Gefäßadhäsionen haben oder das Risiko zur Entwicklung hiervon tragen.

[0125] Wie in U.S.-Patent Nr. 5,712,291 offenbart sind jede der vorhergehenden ein wenig bevorzugten Behandlungsgruppen in keiner Weise für die Typen von Zuständen erschöpfend, die durch die vorliegende Erfindung behandelt werden sollen. U.S.-Patent Nr. 5,712,291 identifiziert eine Anzahl von anderen Zuständen, die durch ein anti-angiogenes Therapeutikum effektiv behandelt werden können. Der Zweck der Demonstration, daß die Behandlung von allen angiogenen Krankheiten ein vereinigtes Konzept darstellt, wenn eine definierte Kategorie von Angiogenese-inhibierenden Verbindungen offenbart und beansprucht worden ist (im vorliegenden Fall VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ diejenigen, die an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2CR (ATCC PTA 1595) bindet), und der Zweck der Demonstration, daß die Behandlung von allen angiogenen Krankheiten durch Daten von einem einzelnen Modellsystem ermöglicht wird.

[0126] Unter noch weiteren Gesichtspunkten und wie in U.S.-Patent Nr. 5,712,291 offenbart, sind die offenbarten Verfahren und Verwendungen zur Behandlung von Tieren und Patienten beabsichtigt, die abnorme Proliferation des fibrovaskulären Gewebes, Akne rosacea, erworbenes Immunschwächesyndrom, artiieller Verschuß, atopische Keratitis, bakterielle Geschwüre, Bechets-Krankheit, hämotogene Tumoren, Carotis-Verschußkrankheit, chemische Verbrennungen, choroidale Neovaskularisierung, chronische Entzündung, chronische Retinaablösung, chronische Uveitis, chronische Vitritis, Kontaktlinsenübertragung, Cornea-Transplantat-Abstoßung, Cornea-Neovaskularisierung, Cornea-Transplantat-Neovaskularisierung, Morbus Crohn, Ealesche Krankheit, epidemische Keratokonjunktivitis, Pilzgeschwüre, Herpes-Simplex-Infektionen, Herpes-Zoster-Infektionen, Hyperviskositätssyndrome, Kaposi-Sarcom, Leukämie, Lipid-Degenerierung, Borreliose, marginale Keratolyse, Mooren-Geschwür, Mycobakterium-Infektionen, die nicht Lepra sind, Myopie, neovaskuläre Augenkrankheit, optische Sehnerventrichter („optic pits“), Osler-Weber-Syndrom (Osler-Weber-Rendu), Osteoarthritis, Paget-Krankheit, Pars planitis, Pemphigoid, Phlyctenulosis, Polyarthritis, Komplikationen nach Laser-Behandlung, Protozoen-Infektionen, Pseudoxanthoma elasticum, Pterygium Keratitis sicca, Radius-Keratotomie, Retina-Neovaskularisierung, Frühgeborenenretinopathie, retrolentale Fibroplasien, Sarkoidose, Scleritis, Sichelzellenanämie, Sogrens-Syndrom, feste Tumoren, Stargarts-Krankheit, Stevens-Johnson-Krankheit, superiore limbische Keratitis, Syphilis, systemischer Lupus, marginale Terrien's-Degenerierung, Toxoplasmose, Trauma, Ewing-Sarcom-Tumore, Neuroblastom-Tumore, Osteosarcom-Tumore, Retinoblastom-Tumore, Rhabdomyosarcom-Tumore, ulzerative Colitis, Venenverschuß, Vitamin A-Defizienz und Wegeners-Sarkoidose haben oder das Risiko zur Entwicklung hiervon tragen.

[0127] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin Verfahren und Verwendungen zur Behandlung von Tieren und Patienten bereit, die Arthritis haben oder das Risiko zur Entwicklung davon tragen, zusammen mit der Behandlung von Arthritis unter Verwendung von immunologischen Mitteln, beschrieben in U.S.-Patent Nr. 5,753,230. U.S.-Patent Nr. 5,972,922 veranschaulicht sogar weiter beispielhaft die Anwendung von anti-angiogenen Strategien auf die Behandlung von unerwünschter Angiogenese, die mit Diabetes, Parasiten-Krankheiten, abnormer Wundheilung und Hypertrophie nach Operationen, Verbrennungen, Verletzung oder Trauma, Inhibition des Haarwachstums, Inhibition der Ovulation und der Bildung des Corpus Luteum, Inhibition der Im-

plantation und Inhibition der Embryoentwicklung im Uterus assoziiert ist.

[0128] Alle vorhergehenden Zustände werden deshalb zur Behandlung durch die Verfahren und Verwendungen der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

[0129] US-Patent Nr. 5,639,757 veranschaulicht beispielhaft die Verwendung von anti-angiogenen Strategien auf die allgemeine Behandlung von Transplantatabstoßungen. Die Behandlung von Lungenentzündung, nephrotischem Syndrom, Präeklampsie, Perikarderguß, wie etwa derjenige, der mit Pericarditis assoziiert ist, und Pleuraerguß, unter Verwendung von antiangiogenen Strategien, basierend auf der VEGF-Inhibition, wird in WO 98/45331 beschrieben. Tiere und Patienten, die irgendeine der vorgehenden Zustände haben oder das Risiko tragen, diese zu entwickeln, werden deshalb zur Behandlung durch die Verfahren und Verwendungen der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

[0130] Wie in WO 98/16551 offenbart, sind die biologischen Moleküle, die die VEGF-Funktion antagonisieren, ebenso zur Verwendung bei der Behandlung von Krankheiten und Störungen geeignet, die durch unerwünschte Gefäßpermeabilität charakterisiert sind. Entsprechend sind die VEGF-antagonisierenden Antikörper, Verfahren und Verwendungen der vorliegenden Erfindung auf die Behandlung von Tieren und Patienten anwendbar, die Krankheiten und Störungen haben, die durch unerwünschte Gefäßpermeabilität charakterisiert sind, z.B. Ödem, das mit Hirntumoren assoziiert ist, Aszites, das mit malignen Erkrankungen assoziiert ist, Meig-Syndrom, Lungenentzündung, nephrotisches Syndrom, Perikarderguß und Pleuraerguß und ähnliche, oder ein Risiko haben, diese zu entwickeln.

[0131] Obwohl die Behandlung aller vorhergehenden Krankheiten durch die vorliegende, einheitliche Erfindung ermöglicht wird, ist ein besonders bevorzugter Gesichtspunkt der Verfahren und Verwendungen der vorliegenden Erfindung die Anwendung von anti-angiogener Therapie auf Tiere und Patienten, die einen vaskularisierten festen Tumor, einen Metastasen-Tumor oder Metastasen aus einem primären Tumor haben oder das Risiko zur Entwicklung hiervon haben.

[0132] Verfahren zu und Verwendungen bei dem Inhibieren von VEGF-induzierter Angiogenese und bevorzugt, bei dem Ausüben eines Anti-Tumor- oder verbesserten Anti-Tumor-Effekts, ohne die VEGF-Stimulation von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten signifikant zu inhibieren, werden darüberhinaus bereitgestellt. Die Verfahren umfassen im allgemeinen das In-Kontakt-Bringen eines Gewebes, einer Tumorumgebung oder einer Population von angiogenen Gefäßen, die Gefäßendothelzellen und wenigstens einen von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten enthalten, mit einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers, unter Bedingungen, die wirksam sind, die VEGF-induzierte Angiogenese zu inhibieren und einen Anti-Tumor- oder verbesserten Anti-Tumor-Effekt auszuüben, ohne signifikant die VEGF-Stimulation von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten zu inhibieren.

[0133] Es werden Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit bereitgestellt, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassend das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einer ersten pharmazeutischen Zusammensetzung an ein Tier oder einen Patienten mit einer solchen Krankheit oder Krebs, wobei die Zusammensetzung einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper umfaßt, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment oder Immunkonjugat eines solchen Anti-VEGF-Antikörpers.

[0134] Die Offenbarung verknüpft sowohl anti-angiogene Verfahren unter Verwendung von nicht-konjugierten oder nackten Antikörpern und Fragmenten davon und Gefäß-Ziel-Verfahren („vaskular targeting methods“) unter Verwendung von Immunkonjugaten, bei denen der Antikörper oder das Antigen-bindende Fragment davon operativ an ein therapeutisches Mittel angehängt ist. Sofern nicht anderweitig spezifisch dargestellt oder in wissenschaftlichen Begriffen erläutert, bedeuten die Begriffe „Antikörper und Fragment davon“, wie hierin verwendet, einen „nicht-konjugierten oder nackten“ Antikörper oder Fragment, der nicht an ein anderes Mittel angehängt ist, insbesondere ein therapeutisches oder diagnostisches Mittel. Diese Definitionen schließen nicht Modifizierungen des Antikörpers aus, wie lediglich beispielsweise Modifizierungen zum Verbessern der biologischen Halbwertszeit, Affinität, Avidität oder anderen Eigenschaften des Antikörpers, oder Kombinationen des Antikörpers mit anderen Effektoren.

[0135] Die offenbarten anti-angiogenen Behandlungsverfahren und Verwendungen umfassen ebenso die Verwendung von sowohl nicht-konjugierten oder nackten Antikörpern und Immunkonjugaten. Bei den Immunkonjugat-basierenden anti-angiogenen Behandlungsverfahren wird der Antikörper oder das Antigen-bindende Fragment davon bevorzugt operativ an ein zweites anti-angiogenes Mittel angehängt (wobei der Anti-VEGF-Antikörper selbst das antiangiogene Mittel ist). Die angehängten anti-angiogenen Mittel können diejenigen sein, die einen direkten oder indirekten anti-angiogenen Effekt haben.

[0136] Die anti-angiogenen Behandlungsverfahren und Verwendungen umfassen das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einer ersten pharmazeutischen Zusammensetzung an ein Tier oder Patient mit einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, wobei die Zusammensetzung wenigstens einen ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon umfaßt, der fakultativ an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet. In gleicher Weise kann der verabreichte Antikörper operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert sein.

[0137] Verfahren zur und Verwendungen bei dem Behandeln von Metastasenkrebs umfassen das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einer ersten pharmazeutischen Zusammensetzung an ein Tier oder Patienten mit Metastasenkrebs, wobei die Zusammensetzung wenigstens einen ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon umfaßt, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet. Weitere Verfahren sind diejenigen, bei denen der verabreichte Antikörper operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel verknüpft ist.

[0138] Verfahren zur und Verwendungen bei dem Reduzieren von Metastasen aus einem primären Krebs umfassen das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon an ein Tier oder Patienten, der einen primären Krebs hat oder darauf behandelt wurde, wobei der nicht-konjugierte oder nackte VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder Fragment davon fakultativ an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet. In ähnlicher Weise kann der verabreichte Antikörper operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert sein.

[0139] Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassen weiterhin das Verabreichen an ein Tier oder Patienten mit einer solchen Krankheit, z.B. einem vaskularisierten Tumor, von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, in einer Menge, die wirksam ist, die Angiogenese innerhalb der Krankheitsstelle oder des vaskularisierten Tumors zu inhibieren. In gleicher Weise kann der verabreichte Antikörper operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert sein.

[0140] Die Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassen weiterhin das Verabreichen an ein Tier oder Patient mit einer solchen Krankheit oder Krebs von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, in einer Menge, die wirksam ist, die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) zu inhibieren, wodurch die Angiogenese innerhalb der Krankheit oder der Krebsstelle inhibiert wird. Der verabreichte Antikörper kann alternativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel operativ assoziiert sein.

[0141] Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassen ebenso das Verabreichen an ein Tier oder Patient mit einem vaskularisierten Tumor von einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, wobei der Anti-VEGF-Antikörper im wesentlichen die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert, ohne die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) signifikant zu inhibieren. In gleicher Weise kann der verabreichte Antikörper operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert sein.

[0142] Noch weitere Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassen das Verabreichen an ein Tier oder Patient mit einer solchen Krankheit, Krebs oder vaskularisiertem Tumor, von einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, wobei der Anti-VEGF-Antikörper im wesentlichen die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) zu inhibieren, wodurch die Angiogenese innerhalb der Krankheitsstelle, Krebs oder vaskularisiertem Tumor inhibiert wird, ohne die Makrophagen-Chemotaxis in dem Tier signifikant zu beeinträchtigen. Der verabreichte Antikörper kann ebenso operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert sein.

[0143] Noch weitere Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassen das Verabreichen an ein Tier oder Patienten mit einer solchen Krankheit, Krebs oder vaskularisiertem Tumor, von einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, wobei der Anti-VEGF-Antikörper im wesentlichen die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert, ohne die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (FLT-1) signifikant zu inhibieren, wodurch die Angiogenese innerhalb der Krankheitsstelle, Krebs oder vaskularisiertem Tumor inhibiert wird, ohne die Makrophagen-, Osteoclasten- und/oder Chondroclasten-Aktivität in dem Tier signifikant zu beeinträchtigen. In gleicher Weise kann der verabreichte Antikörper operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert sein.

[0144] Verfahren zu und Verwendungen bei dem Behandeln einer Krankheit, die mit Angiogenese assoziiert ist, einschließlich aller Formen von Krebs, die mit Angiogenese assoziiert sind, umfassen weiterhin das Verabreichen an ein Tier oder Patienten mit einer solchen Krankheit, z. B. einem vaskularisierten Tumor, von wenigstens einem ersten nicht-konjugierten oder nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, in einer Menge, die wirksam ist, die Angiogenese innerhalb der Krankheitsstelle oder dem vaskularisierten Tumor zu inhibieren, ohne eine signifikante nachteilige Wirkung auf den Knochenmetabolismus auszuüben.

[0145] Die vorhergehenden anti-angiogenen Behandlungsverfahren und Verwendungen werden im allgemeinen die Verabreichung der pharmazeutisch wirksamen Zusammensetzung an das Tier oder Patient in systemischer Weise beinhalten, wie etwa mittels transdermaler, intramuskulärer, intravenöser Injektion und ähnlichem. Jedoch wird jede Verabreichungsrouten, die es dem therapeutischen Mittel ermöglicht, sich an die angiogene Stelle oder Stelle, einschließlich Tumor- oder intratumoralen Gefäßendothelzellen, zu begeben, akzeptabel sein. Deshalb schließen andere geeignete Verabreichungsrouten orale, rektale, nasale, topische und vaginale Verabreichung ein. US Patent Nr. 5,712,291 beschreibt die verschiedenen Verabreichungsrouten weiter, die im Zusammenhang mit der Behandlung einer angiogenen Krankheit oder Störung eingeschlossen werden können.

[0146] Für Verwendungen und Verfahren zur Behandlung von Arthritis kann zum Beispiel eine intrasynoviale Verabreichung verwendet werden, wie für andere immunologische Mittel in US Patent Nr. 5,753,230 beschrieben. Für Zustände, die mit dem Auge assoziiert sind, werden ophthalmische Formulierungen und Verabreichung in Erwägung gezogen.

[0147] „Verabreichung“, wie hierin verwendet, bedeutet die Bereitstellung oder Abgabe von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutika in einer Menge (Mengen) und für eine Periode von Zeit(en), die ausreicht, um anti-angiogene und/oder Anti-Tumor-Effekte auszuüben. Die passive Verabreichung von Protein-Therapeutika wird im allgemeinen bevorzugt, teilweise aus Gründen der Einfachheit und Reproduzierbarkeit.

[0148] Jedoch wird der Begriff „Verabreichung“ hierin verwendet, um auf ein beliebiges und alle Mittel Bezug zu nehmen, mit denen VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Therapeutika abgegeben oder anderweitig an die Tumorgefäße bereitgestellt werden können. „Verabreichung“ schließt deshalb die Bereitstellung von Zellen ein, die die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutika in einer Weise produzieren, die wirksam ist, um zur Abgabe an den Tumor zu führen. In

solchen Ausführungsformen kann es wünschenswert sein, die Zellen in einer selektiv permeablen Membran, Struktur oder implantierbaren Vorrichtung zu formulieren oder zu verpacken, im allgemeinen eine, die entfernt werden kann, um mit der Therapie aufzuhören. Eine exogene VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-artige Verabreichung wird im allgemeinen noch bevorzugt, da dies ein nicht-invasives Verfahren darstellt, das es ermöglicht, daß die Dosis streng überwacht und kontrolliert werden kann.

[0149] Die therapeutischen Verfahren und Verwendungen erstrecken sich auch auf die Bereitstellung von Nukleinsäuren, die für VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Therapeutika auf eine Weise kodieren, die dahingehend wirksam ist, daß sie zu ihrer Expression in der Nähe des Tumors oder ihrer Lokalisierung an den Tumor führt. Jede Gentherapietechnik kann verwendet werden, wie etwa die Abgabe von nackter DNA, rekombinanter Gene und Vektoren, Zellen-basierende Abgabe, einschließlich ex-vivo-Manipulierung von Zellen von Patienten und ähnliches.

[0150] In noch weiteren Ausführungsformen werden Verfahren zu und Verwendungen bei dem Abgeben von ausgewählten therapeutischen oder diagnostischen Mitteln an angiogene Blutgefäße offenbart, die mit der Krankheit assoziiert sind. Solche Ausführungsformen werden bevorzugt zur Abgabe von ausgewählten therapeutischen oder diagnostischen Mitteln an einen Tumor oder intratumorale Gefäße oder Stroma verwendet und umfassen das Verabreichen an ein Tier oder Patienten mit einem vaskularisiertem Tumor von einer biologisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, umfassend wenigstens ein erstes Immunkonjugat, bei dem ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel operativ an einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon angehängt ist, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet.

[0151] Obwohl das Verständnis des Wirkmechanismus, der den Zielaspekten („targeting aspects“) der Erfindung zugrunde liegt, nicht notwendig ist, um solche Ausführungsformen auszuüben, wird geglaubt, daß die Antikörper der Erfindung daran angehängte Mittel an angiogene und Tumorgefäße mittels Bindung an VEGF abgeben, der an den darauf exprimierten VEGFR1 bindet. Diese Verfahren und Verwendungen der Erfindung betreffen somit das Abgeben von ausgewählten therapeutischen oder diagnostischen Mitteln an angiogene Blutgefäße, Tumor- oder intratumorale Gefäße und umfassen das Verabreichen an ein behandlungsbedürftiges Tier oder Patienten von einer biologisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, umfassend ein Immunkonjugat, bei dem ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel an wenigstens einen ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigenbindendes Fragment davon operativ angehängt ist, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, auf eine Weise, die dahingehend wirksam ist, daß sie die Bindung des Antikörpers an VEGF ermöglicht, der an VEGFR1 gebunden ist, welcher auf den angiogenen Blutgefäßen, Tumor- oder intratumoralen Gefäßen exprimiert, überexprimiert oder hochreguliert ist, wodurch das diagnostische oder therapeutische Mittel an den VEGF-VEGFR1 auf den angiogenen Blutgefäßen, Tumor- oder intratumoralen Gefäßen abgeben wird.

[0152] Die Abgabe von ausgewählten therapeutischen Mitteln an Tumor- oder intratumorale Gefäße oder Stroma wirkt dahingehend, daß der Blutfluß unterbrochen wird oder daß der Blutfluß spezifisch in Tumorgefäßen unterbrochen wird, daß Tumorgefäße zerstört oder Tumorgefäße spezifisch zerstört werden und daß Nekrose induziert wird oder daß Nekrose spezifisch in einem Tumor induziert wird. Diese Verfahren und Verwendungen können damit als Verfahren zum Behandeln eines Tieres oder Patienten mit einem vaskularisiertem Tumor zusammengefaßt werden, umfassend das Verabreichen an das Tier oder den Patienten von einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einer ersten pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend wenigstens ein erstes Immunkonjugat, das einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper umfaßt, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, der operativ an ein therapeutisches Mittel gebunden ist.

[0153] Die „therapeutische wirksamen Mengen“ sind Mengen an VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Immunkonjugaten, die wirksam sind, daß sie wenigstens einen Teil der Tumor- oder intratumoralen Gefäßendothelzellen töten, daß sie spezifisch Apoptose in wenigstens einem Teil der Tumor- oder intratumoralen Gefäßendothelzellen induzieren, daß sie spezifisch die Coagulation in wenigstens einem Teil der Tumor- oder intratumoralen Blutgefäßen fördern, daß sie spezifisch wenigstens einen Teil der bluttransportierenden Gefäße des Tumors verschließen oder zerstören, daß sie spezifisch Nekrose in einem Teil eines Tumors induzieren, und daß sie eine Tumorregression oder -Remission nach Verabreichung an ausgewählte Tiere oder Patienten induzieren. Solche Effekte werden erzielt, während eine geringe oder keine Bindung an Gefäßendothelzellen in normalen gesunden Geweben oder ein geringes oder kein Töten hiervon, wenig oder keine Coagulation in Blutgefäßen in gesunden normalen Geweben oder ein Verschluß oder Zerstörung davon aufgewiesen wird, und wobei vernachlässigbare oder handhabbare nachteilige Nebenwirkungen

auf normale gesunde Gewebe des Tiers oder Patienten ausgeübt werden.

[0154] Die Begriffe „bevorzugt“ und „besonders“, wie hierin im Kontext der Förderung von Coagulation bei oder dem Zerstören von Tumorgefäßen und/oder im Kontext der Bindung an Tumorstroma und/oder der Verursachung von Tumornekrose verwendet, bedeuten daher, daß die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate dahingehend funktionieren, daß sie stromale Bindung, Coagulation, Zerstörung und/oder Tumornekrose erzielen, die im wesentlichen auf das Tumorstroma, Gefäße und die Tumorstelle beschränkt sind, und nicht sich im wesentlichen darauf erstrecken, Coagulation, Zerstörung und/oder Gewebenekrose in normalen gesunden Geweben des Tiers oder Patienten zu verursachen. Die Struktur und Funktion von gesunden Zellen und Geweben wird deshalb im wesentlichen durch die Ausübung der Erfindung unbeeinträchtigt gehalten.

[0155] Obwohl die Antikörper der Erfindung in effektiver Weise Mittel an angiogene Gefäße und Tumorgefäße abgeben, indem sie an VEGF in Assoziation mit VEGFR1 binden, funktionieren andere Verfahren und Verwendungen auf der Grundlage des Abgebens eines therapeutischen Mittels an Tumorstroma, wobei es einen therapeutischen Effekt auf Gefäße in der Umgebung ausübt. Diese Verfahren und Verwendungen umfassen das Verabreichen eines Immunkonjugats an ein Tier oder Patienten mit einem vaskularisiertem Tumor, das ein therapeutisches Mittel umfaßt, operativ angehängt an wenigstens einen ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, in einer Menge, die wirksam ist, um das Immunkonjugat an nicht-Rezeptor-gebundenen VEGF innerhalb des Tumorstromas zu binden.

[0156] Diese Verfahren und Verwendungen umfassen das Verabreichen eines Immunkonjugats an ein Tier oder Patient mit einem vaskularisiertem Tumor, das ein therapeutisches Mittel umfaßt, operativ angehängt an wenigstens einen ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, in einer Menge, die wirksam ist, um das Immunkonjugat innerhalb des Tumorstroma anzusiedeln, so daß das angehängte therapeutische Mittel einen Anti-Tumor-Effekt auf die umgebenden Tumorgefäße und/oder Tumorzellen ausübt.

[0157] Die Zusammensetzungen der Erfindung, ebenso wie die offenbarten Verfahren und Verwendungen, erstrecken sich daher auf Zusammensetzungen, umfassend VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate, umfassend wenigstens einen ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, fakultativ einen, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, operativ angehängt an wenigstens ein erstes therapeutisches oder diagnostisches Mittel. VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende therapeutische Konjugate sind bevorzugt an radiotherapeutische Mittel, anti-angiogene Mittel, Apoptose-induzierende Mittel, Anti-Tubulin-Arzneien, anti-zelluläre Mittel oder cytotoxische Mittel oder Coagulantien (Coagulationsfaktoren) geknüpft.

[0158] Die Erfindung stellt somit eine Vielzahl von konjugierten Antikörpern und Fragmenten davon bereit, bei denen der Antikörper an wenigstens ein erstes therapeutisches Mittel oder diagnostisches Mittel operativ angehängt ist. Der Begriff „Immunkonjugat“ wird in breiter Weise verwendet, um die operative Assoziation des Antikörpers mit einem anderen effektiven Mittel zu definieren, und soll sich nicht auf nur einen Typ von operativer Assoziation beziehen und ist insbesondere nicht auf chemische „Konjugation“ beschränkt. Rekombinante Fusionsproteine werden insbesondere in Erwägung gezogen. Solange das Abgabemittel oder Zielmittel in der Lage ist, an das Ziel zu binden, und das therapeutische oder diagnostische Mittel nach der Abgabe hinreichend funktionell ist, wird die Art der Anhängung geeignet sein.

[0159] Die Anhängung von Mitteln über die Kohlenhydratgruppen an Antikörpern wird ebenso erwogen. Glykosylierung, sowohl O-verknüpft als auch N-verknüpft, findet in natürlicher Weise in Antikörpern statt. Rekombinante Antikörper können modifiziert werden, um zusätzliche Glykosylierungsstellen wieder zu erschaffen oder zu erzeugen, wenn erwünscht, was einfach dadurch erreicht wird, daß die passenden Aminosäuresequenzen (wie etwa Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser oder Thr) in die Primärsequenz des Antikörper eingebaut werden.

[0160] Gegenwärtig bevorzugte Mittel zur Verwendung bei den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden therapeutischen Konjugate und verwandten Verfahren und Verwendungen sind diejenigen, die die Effekte des Antikörpers komplementieren oder verbessern, und/oder diejenigen, die für einen bestimmten Tumortyp oder Patienten ausgewählt sind. „Therapeutische Mittel, die die Effekte des Antikör-

pers komplementieren oder verbessern", schließen radiotherapeutische Mittel, anti-angiogene Mittel, Apoptos-einduzierende Mittel und Anti-Tubulin-Arzneien ein, von denen ein beliebiges einzelnes oder mehrere zur Verwendung hierin bevorzugt werden.

[0161] Die Anhängung oder Assoziierung der bevorzugten Mittel mit VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörpern ergibt „Immunkonjugate“, wobei solche Immunkonjugate oft verbesserte oder sogar synergistische Anti-Tumor-Eigenschaften haben. Gegenwärtig bevorzugte anti-angiogene Mittel zur Verwendung auf diese Weise sind Angiostatin, Endostatin, ein beliebiges der Angiopoietine, Vaskulostatin, Canstatin und Maspin. Gegenwärtig bevorzugte Anti-Tubulin-Arzneien schließen Colchicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Vindescin und ein oder mehrere der Combretastatine ein.

[0162] Die Verwendung von anti-zellulären und cytotoxischen Mitteln führt zu VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden „Immuntoxinen“, während die Verwendung von Coagulationsfaktoren zu VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden „Coaguliganden“ führt. Die Verwendung von wenigstens zwei therapeutischen Mitteln wird ebenso in Erwägung gezogen, wie etwa Kombinationen von einem oder mehreren radiotherapeutischen Mitteln, anti-angiogenen Mitteln, Apoptoseinduzierenden Mitteln, Anti-Tubulin-Arzneien, anti-zellulären und cytotoxischen Mitteln und Coagulationsfaktoren.

[0163] In bestimmten Anwendungen werden die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutika operativ an cytotoxische, cytostatische oder anderweitig anti-zelluläre Mitteln angehängt sein, die die Fähigkeit haben, das Wachstum oder die Zellteilung von Endothelzellen zu töten oder zu unterdrücken. Geeignete anti-zelluläre Mittel schließen chemotherapeutische Mittel ebenso wie Cytotoxine und cytostatische Mittel ein. Cytostatische Mittel sind im allgemeinen diejenigen, die den natürlichen Zellzyklus einer Zielzelle stören, bevorzugt auf eine solche Weise, daß die Zelle aus dem Zellzyklus genommen wird.

[0164] Beispielhafte chemotherapeutische Mittel schließen ein: Steroide, Cytokine, Anti-Metabolite, wie etwa Cytosinarabinsid, Fluoruracil, Methotrexat oder Aminopterin, Anthracycline, Mitomycin C, Vinca-Alkaloide, Antibiotika, Demecolcin, Etoposid, Mithramycin und Anti-Tumor-alkylierende Mittel, wie etwa Chlorambucil oder Melphalan. In der Tat könnte irgendeines der hierin in Tabelle C offenbarten Mittel verwendet werden. Bestimmte bevorzugte anti-zelluläre Mittel sind DNA-Syntheseinhibitoren, wie etwa Daunorubicin, Doxorubicin, Adriamycin und ähnliche.

[0165] In bestimmten therapeutischen Anwendungen werden Toxingruppen bevorzugt, aufgrund der viel größeren Fähigkeit der meisten Toxine, einen zelltötenden Effekt abzugeben, im Vergleich mit anderen potentiellen Mitteln: Deshalb sind bestimmte bevorzugte anti-zelluläre Mittel für VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörperkonstrukte Pflanzen-, Pelz- oder Bakterien-abgeleitete Toxine. Beispielhafte Toxine schließen Epipodophyllotoxine, bakterielles Endotoxin oder die Lipid-A-Gruppe von bakteriellem Endotoxin, Ribosomen-inaktivierende Proteine, wie etwa Saporin oder Gelonin, a-Sarcin, Aspergillin, Restrictocin, Ribonucleasen, wie etwa Placenta-Ribonuclease, Diphtherietoxin und Pseudomonas-Exotoxin ein.

[0166] Bevorzugte Toxine sind die A-Ketten-Toxine, wie etwa Ricin-A-Kette. Die bevorzugteste Toxin-Gruppe ist oft die Ricin-A-Kette, die behandelt worden ist, um Kohlenhydratreste zu modifizieren oder zu entfernen, sogenannte „deglycosylierte-A-Kette“ (dgA). Deglycosylierte Ricin-A-Kette wird bevorzugt wegen ihrer extremen Potenz, längeren Halbwertszeit, und weil sie in der Herstellung in klinischer Qualität und Maßstab so billig ist. Rekombinante und/oder trunkierte Ricin-A-Kette kann ebenso verwendet werden.

[0167] Für das Zielen auf Tumore („tumor targeting“) und die Behandlung mit Immuntoxinen ergänzen die folgenden Patente und Patentanmeldung die vorliegende Lehre hinsichtlich antizellulärer und cytotoxischer Mittel weiter: US-Anmeldung Nr. 07/846,349, 08/295,868 (US-Patent Nr. 6,004,554), 08/205,330 (US-Patent Nr. 5,855,866), 08/350,212 (US-Patent Nr. 5,965,132), 08/456,495 (US-Patent Nr. 5,776,427), 08/457,487 (US-Patent Nr. 5,863,538), 08/457,229 und 08/457,031 (US-Patent Nr. 5,660,827) und 08/457,869 (US-Patent Nr. 6,051,230).

[0168] Der 2C3-basierende oder andere VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper der vorliegenden Erfindung kann an eine Anti-Tubulin-Arznei geknüpft sein. „Anti-Tubulin-Arznei(en)“, wie hierin verwendet, bedeutet jedes Mittel, Arznei, Prodrug oder Kombinationen davon, die die Zellmitose inhibiert, bevorzugt, indem sie direkt oder indirekt Tubulinaktivitäten inhibiert, die für die Zellmitose notwendig sind, bevorzugt Tubulin-Polymerisierung oder -Depolymerisierung.

[0169] Gegenwärtig bevorzugte Anti-Tubulin-Arzneien zur Verwendung hiermit sind Colchicin, Taxane, wie etwa Taxol, Vinca-Alkaloide, wie etwa Vinblastin, Vincristin und Vindesin, und Combretastatine. Beispielhafte Combretastatine sind Combretastatin A, B und/oder D, einschließlich A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3, B-4, D-1 und D-2 und Prodrug-Formen davon.

[0170] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutika können einen Bestandteil umfassen, der in der Lage ist, die Coagulation zu fördern, d. h. ein Coagulans. Hier kann der Targeting-Antikörper direkt oder indirekt, z. B. über einen anderen Antikörper, an einen Faktor geknüpft sein, der direkt oder indirekt die Coagulation stimuliert.

[0171] Bevorzugte Coagulationsfaktoren für solche Verwendungen sind Gewebefaktor (TF) und TF-Derivate, wie etwa trunkierter TF (tTF), dimerer, trimerer, polymerer/multimerer TF und mutanter TF, der hinsichtlich der Fähigkeit, Faktor VII zu aktivieren, defizient ist. Andere geeignete Coagulationsfaktoren schließen Vitamin-K-abhängige Coagulantien, wie etwa Faktor II/IIa, Faktor VII/VIIa, Faktor IX/IXa und Faktor X/Xa, Vitamin-K-abhängige Coagulationsfaktoren, denen die Gla-Modifizierung fehlt, Russell's-Schlangengift-Faktor-X-Aktivator, Blutplättchen-aktivierende Verbindungen, wie etwa Thromboxan A₂ und Thromboxan A₂-Synthase und Inhibitoren der Fibrinolyse, wie etwa α₂-Antiplasmin, ein.

[0172] Das Zielen auf Tumore („tumor targeting“) und die Behandlung mit Coaguliganden wird in den folgenden Patenten und Patentanmeldungen beschrieben, von denen jede die vorliegenden Lehren im Hinblick auf Coaguliganden und Coagulationsfaktoren weiter ergänzt: US-Anmeldung Nr. 07/846,349, 08/205,330 (US-Patent Nr. 5,855,866), 08/350,212 (US-Patent Nr. 5,965,132), 08/273,567, 08/482,369 (US-Patent Nr. 6,093,399), 08/485,482, 08/487,427 (US-Patent Nr. 6,004,555), 08/479,733 (US-Patent Nr. 5,877,289), 08/472,631, und 08/479,727 und 08/481,904 (US-Patent Nr. 6,036,955).

[0173] Die Herstellung von Immunkonjugaten und Immuntoxinen ist im allgemeinen auf dem Gebiet gut bekannt (siehe zum Beispiel US-Patent Nr. 4,340,535). Jedes der folgenden Patente und Patentanmeldungen ergänzt die vorliegenden Lehren im Hinblick auf die Immuntoxinerzeugung, -aufreinigung und -verwendung weiter: US-Anmeldung Nr. 07/846,349, 08/295,868 (US-Patent Nr. 6,004,554), 08/205,330 (US-Patent Nr. 5,855,866), 08/350,212 (US-Patent Nr. 5,965,132), 08/456,495 (US-Patent Nr. 5,776,427), 08/457,487 (US-Patent Nr. 5,863,538), 08/457,229 und 08/457,031 (US-Patent Nr. 5,660,827) und 08/457,869 (US-Patent Nr. 6,051,230).

[0174] Bei der Herstellung von Immunkonjugaten und Immuntoxinen können Vorteile durch die Verwendung von bestimmten Linkern erzielt werden. Zum Beispiel werden Linker, die eine Disulfid-Bindung enthalten, die sterisch „behindert“ ist, oft bevorzugt aufgrund ihrer größeren Stabilität in vivo, wodurch sie die Freisetzung der Toxingruppe vor der Bindung an die Wirkungsstelle verhindern. Es ist im allgemeinen erwünscht, ein Konjugat zu haben, das unter Bedingungen intakt bleibt, die überall im Körper gefunden werden, außer der beabsichtigten Wirkungsstelle, wo es wünschenswert ist, daß das Konjugat gute „Freisetzungs“-Charakteristiken hat.

[0175] Abhängig von der spezifischen verwendeten Toxinverbindung, kann es notwendig sein, einen Peptid-Spacer bereitzustellen, indem man operativ den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper und die Toxinverbindung anhängt, wobei der Peptid-Spacer in der Lage ist, sich in eine Disulfid-gebundene Schleifen-Struktur zu falten. Eine proteolytische Spaltung innerhalb der Schleife würde dann ein heterodimeres Polypeptid ergeben, bei dem der Antikörper und die Toxinverbindung nur durch eine einzelne Disulfidbindung verknüpft sind.

[0176] Wenn bestimmte andere Toxinverbindungen verwendet werden, kann ein nicht-spaltbarer Peptid-Spacer bereitgestellt werden, um den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper und die Toxinverbindung operativ anzuhängen. Toxine, die im Zusammenhang mit nicht-spaltbaren Peptid-Spacern verwendet werden können, sind diejenigen, die selbst durch proteolytische Spaltung in eine cytotoxische Disulfid-gebundene Form angewandelt werden können. Ein Beispiel für eine solche Toxinverbindung ist eine Pseudomonas-Exotoxin-Verbindung.

[0177] Eine Vielzahl von chemotherapeutischen und anderen pharmakologischen Agentien kann ebenso erfolgreich an VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Therapeutika konjugiert werden. Beispielhafte antineoplastische Agentien, die an Antikörper konjugiert worden sind, schließen Doxorubicin, Daunomycin, Methotrexat und Vinblastin ein. Darüberhinaus ist das Anhängen von anderen Agentien, wie etwa Neocarzinostatin, Macromycin, Trenimon und α-Amanitin beschrieben worden (siehe US-Patent Nr. 5,660,827, 5,855,866, und 5,965,132).

[0178] Im Licht der früheren Arbeit von einem der vorliegenden Erfinder kann die Herstellung von Coaguliganden jetzt ebenso leicht praktiziert werden. Die funktionierende Assoziation von einem oder mehreren Coagulationsfaktoren mit einem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper kann eine direkte Verknüpfung sein, wie etwa diejenigen, die oben für die Immuntoxine beschrieben worden sind. Alternativ kann die operative Assoziation ein indirektes Anhängen sein, wie etwa, wenn der Antikörper operativ an eine zweite Bindungsregion angehängt wird, bevorzugt einen Antikörper oder eine Antigenbindende Region eines Antikörpers, die an den Coagulationsfaktor bindet. Der Coagulationsfaktor sollte an den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper an einer Stelle angehängt werden, die von seiner funktionellen coagulierenden Stelle unterschiedlich ist, insbesondere wenn eine kovalente Verknüpfung verwendet wird, um die Moleküle miteinander zu verbinden.

[0179] Indirekt verknüpfte Coaguliganden beruhen oft auf bispezifischen Antikörpern. Die Herstellung von bispezifischen Antikörpern ist ebenso auf dem Gebiet bekannt. Ein Herstellungsverfahren beinhaltet die getrennte Herstellung von Antikörpern mit einer Spezifität für die angezielte Tumorkomponente auf der einen Seite und das coagulierende Mittel auf der anderen Seite. Peptische $F(ab')_2$ -Fragmente aus den beiden ausgewählten Antikörpern werden dann erzeugt, gefolgt von einer Reduktion von jedem, um separate Fab'_{SH} -Fragmente bereitzustellen. Die SH-Gruppen an einem der zwei zu koppelnden Partner werden dann mit einem Quervernetzungsreagenz alkylisiert, wie etwa o-Phenylendimaleimid, um freie Maleimidgruppen in einem Partner bereitzustellen. Dieser Partner kann dann an den anderen mittels einer Thioetherverknüpfung konjugiert werden, um das erwünschte $F(ab')_2$ -Heterokonjugat zu ergeben (Glennie et al., 1987). Andere Ansätze, wie etwa die Quervernetzung mit SPDP oder Protein A, können ebenso durchgeführt werden.

[0180] Ein anderes Verfahren zum Herstellen von bispezifischen Antikörpern ist die Fusion von zwei Hybridomen, um ein Quadrom zu bilden. Wie hierin verwendet, wird der Begriff „Quadrom“ verwendet, um die produktive Fusion von zwei B-Zell-Hybridomen zu beschreiben. Unter Verwendung von Techniken, die jetzt standardmäßig sind, werden zwei Antikörperproduzierende Hybridome fusioniert, um Tochterzellen zu ergeben, und diese Zellen, die die Expression von beiden Sätzen von Klontyp-Immunglobulin-Genen beibehalten haben, werden dann ausgewählt.

[0181] Ein bevorzugtes Verfahren zum Erzeugen eines Quadroms beinhaltet die Selektion einer Enzym-defizienten Mutante von wenigstens einem der elterlichen Hybridome. Diese erste mutante Hybridomzelllinie wird dann mit Zellen eines zweiten Hybridoms fusioniert, das in letaler Weise, z. B. Iodacetamid ausgesetzt worden war, was sein fortgesetztes Überleben ausschließt. Die Zellfusion ermöglicht die Rettung des ersten Hybridoms durch Erwerb des Gens für seine Enzymdefizienz von dem letal behandelten Hybridom und die Rettung des zweiten Hybridoms durch die Fusion an das erste Hybridom. Bevorzugt aber nicht erforderlich ist die Fusion von Immunglobulinen desselben Isotyps, aber von einer unterschiedlichen Subklasse. Ein gemischter Subklassen-Antikörper erlaubt die Verwendung eines alternativen Assay für die Isolierung eines bevorzugten Quadroms.

[0182] Mikrotiter-Identifizierungsausführungsformen, FACS, Immunfluoreszenzfärbung, Idiotypspezifische Antikörper, Antigen-bindende Kompetitionsassays und andere Verfahren, die auf dem Gebiet der Antikörpercharakterisierung üblich sind, können verwendet werden, um bevorzugte Quadrome zu identifizieren. Nach der Isolierung des Quadroms werden die bispezifischen Antikörper von anderen Zellprodukten aufgereinigt. Dies kann durch eine Vielzahl von Antikörper-Isolierungsprozeduren erzielt werden, die Fachleuten auf dem Gebiet der Immunglobulinaufreinigung bekannt sind (siehe z. B. Antibodies: A Laboratory Manual, 1988). Protein-A-oder Protein-G-Sepharose-Säulen werden bevorzugt.

[0183] Bei der Herstellung von Immunkonjugaten, Immuntoxinen und Coaguliganden kann eine rekombinante Expression verwendet werden. Die Nukleinsäuresequenzen, die für den ausgewählten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper, und das therapeutische Agens, Toxin oder Coagulans kodieren, werden innerhalb des Leserasters in einen Expressionsvektor angehängt. Rekombinante Expression führt somit zur Translation der Nukleinsäure, um das erwünschte Immunkonjugat zu ergeben. Chemische Crosslinker und Avidin:Biotin-Brücken können ebenso die therapeutischen Mittel an den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper verbinden.

[0184] Die folgenden Patente und Patentanmeldungen ergänzen die vorliegenden Lehren im Hinblick auf Coaguligand-Herstellung, -Aufreinigung und -Verwendung, einschließlich bispezifischer Antikörpercoaguliganden weiter: US-Anmeldung Nr. 07/846,349, 08/205,330 (US-Patent Nr.-5,855,866), 08/350,212 (US-Patent Nr. 5,965,132), 08/273,567, 08/482,369 (US-Patent Nr. 6,093,399), 08/485,482, 08/487,427 (US-Patent Nr. 6,004,555), 08/479,733 (US-Patent Nr. 5,877,289), 08/472,631, und 08/479,727 und 08/481,904 (US-Patent

[0185] Immunkonjugate mit radiotherapeutischen Mitteln, anti-angiogenen Mitteln, Apoptoseinduzierenden Mitteln, Anti-Tubulin-Arzneien, Toxinen und Coagulantien, ob mittels chemischer Konjugation oder rekombinanter Expression hergestellt, können eine biologisch freisetzbare Bindung und/oder einen selektiv spaltbaren Spacer oder Linker verwenden. Solche Zusammensetzungen sind bevorzugt im Kreislauf in vernünftigem Maße während der Zirkulation stabil und werden bevorzugt oder spezifisch bei Abgabe an die Krankheits- oder Tumorstelle freigesetzt.

[0186] Bestimmte bevorzugte Beispiele sind säureempfindliche Spacer, bei denen VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, geknüpft an Colchicin oder Doxorubicin, besonders in Erwägung gezogen werden. Andere bevorzugte Beispiele sind Peptidlinker, die eine Spaltstelle für Peptidasen und/oder Proteinasen beinhalten, die spezifisch oder bevorzugt an einer Krankheitsstelle vorhanden oder aktiv sind, wie etwa einer Tumorumgebung. Die Abgabe des Immunkonjugats an die Krankheits- oder Tumorstelle führt zur Spaltung und der relativ spezifischen Freisetzung des Coagulationsfaktors.

[0187] Peptid-Linker, die eine Spaltstelle für Urokinase, Pro-Urokinase, Plasmin, Plasminogen, TGF β , Staphylokinase, Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa oder eine Metalloproteinase (MMP), wie etwa eine interstitielle Kollagenase, eine Gelatinase oder ein Stromelysin einschließen, werden besonders bevorzugt, wie beschrieben und nacharbeitbar gemacht durch US-Patent Nr. 5,877,289 und wie weiter hierin in Tabelle B2 beispielhaft veranschaulicht.

[0188] Der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper kann ebenso derivatisiert sein, um funktionelle Gruppen einzuführen, die das Anhängen des (der) therapeutischen Mittels (Mittel) durch eine biologisch freisetzbare Bindung ermöglichen. Der zielende Antikörper („targeting antibody“) kann somit derivatisiert werden, um Seitenketten einzuführen, die in Hydrazid, Hydrazin, primären Amin- oder sekundären Amin-Gruppen enden. Therapeutische Mittel können durch eine Schiffsche Basenverknüpfung, einer Hydrazon- oder einer Acylhydrazon-Bindung oder einem Hydrazid-Linker konjugiert werden (US-Patent Nr. 5,474,765 und 5,762,918).

[0189] Ob primär auf anti-angiogener oder Gefäß-zielender Basis, können die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung in Kombination mit anderen Therapeutika und Diagnostika verwendet werden. Hinsichtlich der biologischen Mittel, bevorzugt diagnostischen oder therapeutischen Mittel, zur Verwendung „in Kombination“ mit einem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, wie etwa einem 2C3-basierenden Antikörper, wird der Begriff „in Kombination“ in prägnanter Weise verwendet, um eine Vielzahl von Ausführungsformen abzudecken. Die „in Kombination“-Terminologie, sofern nicht anderweitig spezifisch festgestellt oder anhand der wissenschaftlichen Terminologie deutlich erläutert, ist somit auf verschiedene Formate von kombinierten Zusammensetzungen, Pharmazeutika, Cocktails, Kits, Verfahren und erste und zweite medizinische Verwendungen anwendbar.

[0190] Die „kombinierten“ Ausführungsformen der Erfindung schließen somit zum Beispiel ein, wenn der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF- oder 2C3-basierende Antikörper ein nackter Antikörper ist und in Kombination mit einem Mittel oder therapeutischen Mittel verwendet wird, das nicht operativ daran angehängt ist. In solchen Fällen kann das Mittel oder therapeutische Mittel in einer nicht-zielgerichteten („non-targeted“) oder zielgerichteten („targeted“) Form verwendet werden. In „nicht-zielgerichteter Form“ wird das Mittel, insbesondere die therapeutischen Mittel, im allgemeinen gemäß ihrer Standardverwendung auf dem Gebiet verwendet werden. In „zielgerichteter Form“ wird das Mittel im allgemeinen operativ an einen bestimmten Antikörper oder eine Zielregion angehängt sein, die das Mittel oder das therapeutische Mittel an die angiogene Krankheitsstelle oder Tumor abgibt. Die Verwendung von solchen zielgerichteten Formen von biologischen Mitteln, sowohl Diagnostika als auch Therapeutika, ist ebenso Standard auf dem Gebiet.

[0191] In anderen „kombinierten“ Ausführungsformen der Erfindung ist der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper ein Immunkonjugat, bei dem der Antikörper selbst operativ assoziiert oder mit dem Mittel oder therapeutischen Mittel kombiniert ist. In bestimmten bevorzugten Beispielen wird das Mittel, einschließlich diagnostischer und therapeutischer Mittel, ein „2C3-zielgerichtetes Mittel“ sein. Die operative Anhängung schließt alle Formen der direkten und indirekten Anhängung ein, wie hierin beschrieben und auf dem Gebiet bekannt.

[0192] Die „kombinierten“ Verwendungen, insbesondere im Hinblick auf VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF- oder 2C3-basierende Antikörper in Kombination mit therapeutischen Mitteln, schließen ebenso kombinierte Zusammensetzungen, Pharmazeutika, Cocktails, Kits, Verfahren und erste und zweite medizinische Verwendun-

gen ein, bei denen das therapeutische Mittel in der Form einer Prodrug ist. In solchen Ausführungsformen kann der aktivierende Bestandteil, der in der Lage ist, die Prodrug in die funktionelle Form der Arznei umzuwandeln, wiederum operativ mit den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-basierenden Antikörpern der vorliegenden Erfindung assoziiert sein.

[0193] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen werden die therapeutischen Zusammensetzungen, Kombinationen, Pharmazeutika, Cocktails, Kits, Verfahren und ersten und zweiten medizinischen Verwendungen „2C3-Prodrug-Kombinationen“ sein. Wie von Fachleuten auf dem Gebiet verstanden werden wird, bedeutet der Begriff „2C3-Prodrug-Kombination“, sofern nicht anderweitig festgestellt, daß der 2C3-basierende Antikörper operativ an einen Bestandteil angehängt ist, der in der Lage ist, die Prodrug in die aktive Arznei umzuwandeln, nicht, daß der 2C3-basierende Antikörper an die Prodrug selbst angehängt ist. Jedoch gibt es kein Erfordernis, daß die Prodrug-Ausführungsformen der Erfindungen als 2C3-Prodrug-Kombinationen verwendet werden müssen. Entsprechend können Prodrugs auf jede Weise verwendet werden, in der sie von der Fachwelt verwendet werden; einschließlich in ADEPT und anderen Formen.

[0194] Daher, wenn kombinierte Zusammensetzungen, Pharmazeutika, Cocktails, Kits, Verfahren und erste und zweite medizinische Verwendungen beschrieben sind, bevorzugt im Hinblick auf die diagnostischen Mittel, und bevorzugter therapeutischen Mittel, schließen die Kombinationen VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3-basierende Antikörper ein, die nackte Antikörper und Immunkonjugate sind, und wobei die Ausübung der in-vivo-Ausführungsformen der Erfindung die vorherige, zeitgleiche oder aufeinanderfolgende Verabreichung der nackten Antikörper oder des Immunkonjugats und des biologischen, diagnostischen oder therapeutischen Mittel beinhaltet, solange wie in einer konjugierten oder nicht-konjugierten Form die Bereitstellung insgesamt einer Form des Antikörpers und einer Form des biologischen, diagnostischen oder therapeutischen Mittels erzielt wird.

[0195] Besonders bevorzugte kombinierte Zusammensetzungen, Verfahren und Verwendungen der Erfindung sind diejenigen, die VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper und Endostatin einschließen (US-Patent Nr. 5,854,205). Diese schließen die Fälle ein, bei denen das VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-Konstrukt ein nackter Antikörper oder Immunkonjugat ist und, für den Fall, daß er ein Immunkonjugat ist, bei dem der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3 an Endostatin, fakultativ mit Angiostatin, verknüpft ist, bei denen das kombinierte therapeutische Verfahren oder Verwendung die vorherige, zeitgleiche oder darauffolgende Verabreichung von Endostatin beinhaltet, fakultativ mit Angiostatin, solange, wie in einer konjugierten oder nicht-konjugierten Form die Bereitstellung von 2C3, Endostatin und fakultativ Angiostatin insgesamt erzielt wird. VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF- oder 2C3-basierende Antikörper, die operativ mit Kollagenase assoziiert sind, werden ebenso bereitgestellt, da die Kollagenase, wenn spezifisch an den Tumor abgegeben, Endostatin in situ erzeugen wird, was ähnliche Vorteile erzielt.

[0196] Die vorhergehenden und anderen Erklärungen der Effekte der vorliegenden Erfindung auf Tumore werden aus Einfachheitsgründen gemacht, um den kombinierten Arbeitsmodus, Typ des (der) angehängten Mittels (Mittel) und ähnliches zu erklären. Dieser beschreibende Ansatz sollte nicht dahingehend als entweder eine Unterschätzung oder eine Übereinfachung der vorteilhaften Eigenschaften der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper der Erfindung ausgelegt werden. Es wird deshalb klar sein, daß solche Antikörper selbst anti-angiogene Eigenschaften und VEGF-Neutralisierungseigenschaften haben (wie etwa Neutralisieren der Überlebensfunktion von VEGF), daß die Immunkonjugate von solchen Antikörpern diese Eigenschaften beibehalten und sie mit den Eigenschaften des angehängten Mittels kombinieren werden, und weiterhin, daß der kombinierte Effekt des Antikörpers und jeden angehängten Mittels typischerweise verstärkt und/oder vergrößert werden wird.

[0197] Die Erfindung stellt deshalb Zusammensetzungen, pharmazeutische Zusammensetzungen, therapeutische Kits und medizinische Cocktails bereit, umfassend fakultativ in wenigstens einer ersten Zusammensetzung oder Behälter, eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment oder Immunkonjugat eines solchen Anti-VEGF-Antikörpers, und eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem zweiten biologischem Mittel, Bestandteil oder System.

[0198] Das „ein wenigstens zweites biologisches Mittel, Bestandteil oder System“ wird oft ein therapeutisches oder diagnostisches Mittel, Bestandteil oder System sein, muß es aber nicht. Zum Beispiel kann das wenigstens zweite biologische Mittel, Bestandteil oder System, Bestandteile zur Modifizierung des Antikörpers und/oder zum Anhängen anderer Mittel an den Antikörper umfassen. Bestimmte bevorzugte zweite biologische

Mittel, Bestandteile oder Systeme sind Prodrugs oder Bestandteile zum Herstellen und Verwenden von Prodrugs, einschließlich Bestandteilen zum Herstellen der Prodrugs selbst und Bestandteilen zum Anpassen der Antikörper der Erfindung, um in solchen Prodrug- oder ADEPT-Ausführungsformen zu funktionieren.

[0199] Wenn therapeutische oder diagnostische Mittel als das wenigstens zweite biologische Mittel, Bestandteil oder System eingeschlossen sind, werden solche Therapeutika und/oder Diagnostika typischerweise diejenigen zur Verwendung in Verbindung mit angiogenen Krankheiten sein. Solche Mittel sind diejenigen, die zur Verwendung beim Behandeln oder Diagnostizieren einer Krankheit oder Störung geeignet sind, wie sie offenbart sind in jedem beliebigen der US-Patente Nr. 5,712,291, 5,753,230, 5,972,922, 5,639,757, WO 98/45331 und WO 98/16551.

[0200] Wenn die zu behandelnde Krankheit Krebs ist, wird „ein wenigstens zweites Antikrebsmittel“ in dem therapeutischen Kit oder Cocktail eingeschlossen sein. Der Begriff „ein wenigstens zweites Antikrebsmittel“ wird in Bezug auf das VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-Konstrukt als erstes Antikrebsmittel ausgewählt. Die Antikörper der Erfindung können daher mit chemotherapeutischen Mitteln, radiotherapeutischen Mitteln, Cytokinen, anti-angiogenen Mitteln, Apoptose-induzierenden Mitteln oder Anti-Krebs-Immuntoxinen oder Coaguliganden kombiniert werden.

[0201] „Chemotherapeutische Mittel“, wie hierin verwendet, beziehen sich auf klassische chemotherapeutische Mittel oder Arzneien, die bei der Behandlung von malignen Erkrankungen verwendet werden. Dieser Begriff wird aus Einfachheitsgründen verwendet, ungeachtet der Tatsache, daß andere Verbindungen technisch als chemotherapeutische Mittel dahingehend beschrieben sein können, daß sie einen Anti-Krebs-Effekt ausüben. Jedoch ist es dazu gekommen, daß „Chemotherapeutikum“ eine bestimmte Bedeutung auf dem Gebiet hat, und wird gemäß dieser Standardbedeutung verwendet. Eine Anzahl von beispielhaften chemotherapeutischen Mitteln werden hierin beschrieben. Fachleute auf dem Gebiet werden in leichter Weise die Verwendungen und geeigneten Dosierungen von chemotherapeutischen Mitteln verstehen, obwohl die Dosierungen gut reduziert werden können, wenn sie in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0202] Eine neue Klasse von Arzneien, die ebenso als „chemotherapeutische Mittel“ bezeichnet werden können, sind Mittel, die Apoptose induzieren. Eine einzige oder mehrere solcher Arzneien, einschließlich Gene, Vektoren, Antisense-Konstrukte und Ribozyme, können je nach Bedarf ebenso im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Gegenwärtig bevorzugte zweite Mittel sind anti-angiogene Mittel, wie etwa Angiostatin, Endostatin, Vasculostatin, Canstatin und Maspin.

[0203] Andere beispielhafte Anti-Krebsmittel schließen z. B. Neomycin, Podophyllo toxin(e), TNF- α , $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten, Calcium-Ionophoren, Calcium-Flux-induzierende Mittel und jedes Derivat oder Prodrug davon. Gegenwärtig bevorzugte Anti-Tubulin-Arzneien schließen Colchicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Vindescin, ein Combretastatin oder ein Derivat oder Prodrug davon ein.

[0204] Anti-Krebs-Immuntoxine oder Coaguliganden sind weiterhin geeignete Anti-Krebsmittel. „Anti-Krebs-Immuntoxine oder Coaguliganden“ oder Konstrukte von Zielmittel/therapeutisches Mittel („targeting agent/therapeutic agent constructs“), beruhen auf Zielmitteln, einschließlich Antikörpern oder Antigen-bindenden Fragmenten davon, die an einen als Ziel erfaßbaren oder zugänglichen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäße oder Tumorstroma binden, und die operativ an ein therapeutisches Mittel angehängt sind, einschließlich cytotoxischer Mittel (Immuntoxine) und Coagulationsfaktoren (Coaguliganden). Ein „als Ziel erfaßbarer oder zugänglicher Bestandteil“ einer Tumorzelle, Tumorgefäß oder Tumorstroma ist bevorzugt ein oberflächenexprimierter, oberflächenzugänglicher oder sich auf der Oberfläche befindlicher Bestandteil, obwohl Bestandteile, die aus nekrotischen oder anderweitig beschädigten Tumorzellen oder Gefäßendothelzellen ebenso angezielt werden können, einschließlich cytosolischer und/oder nukleärer Tumorzellantigenen.

[0205] Sowohl Antikörper- als auch Nicht-Antikörper-Zielmittel („antibody and non-antibody targeting agents“) können verwendet werden, einschließlich Wachstumsfaktoren, wie etwa VEGF und FGF, Peptide, enthaltend das Tripeptid R-G-D, das spezifisch an die Tumorgefäße bindet und andere Zielbestandteile, wie etwa Annexine und verwandte Liganden.

[0206] Anti-Tumor-Zell-Immuntoxine oder Coaguliganden können Antikörper umfassen, die durch die Gruppe beispielhaft veranschaulicht sind, bestehend aus Antikörpern, die bezeichnet werden als B3 (ATCC HB 10573), 260F9 (ATCC HB 8488), D612 (ATCC HB 9796) und KS1/4, wobei besagter KS1/4-Antikörper von einer Zelle erhalten wird, umfassend den Vektor pGKC2310 (NRRL B-18356) oder den Vektor pG2A52 (NRRL B-18357).

[0207] Anti-Tumorzell-Zielmittel, die einen Antikörper oder ein Antigen-bindende Region davon umfassen, der an einen intrazellulären Bestandteil bindet, der aus einer nekrotischen Tumorzelle freigesetzt wird, werden ebenso in Erwägung gezogen. Bevorzugt sind solche Antikörper monoklonale Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, die an unlösliche intrazelluläre Antigene binden, die in Zellen, die dahingehend induziert werden können, daß sie permeabel sind, oder in Zell-Ghosts von im wesentlichen vollständig neoplastischen und normalen Zellen vorhanden sind, die aber nicht auf der äußeren Seite von normalen lebenden Zellen eines Säugetiers vorhanden oder zugänglich sind.

[0208] US-Patente Nr. 5,019,368, 4,861,581 und 5,882,626, jedes erteilt für Alan Epstein und Kollegen beschreiben weiter und lehren, wie Antikörper, die für intrazelluläre Antigen spezifisch sind, welche von malignen Zellen in vivo zugänglich sind, hergestellt und verwendet werden können. Die beschriebenen Antikörper sind hinreichend spezifisch auf interne zelluläre Bestandteile von malignen Säugetierzellen, aber nicht gegenüber externen zellulären Bestandteilen. Beispielhafte Ziele schließen Histone ein, aber alle intrazellulären Bestandteile, die spezifisch aus nekrotischen Tumorzellen freigesetzt werden, werden umfaßt.

[0209] Nach Verabreichung an ein Tier oder Patient mit einem vaskularisierten Tumor begeben sich solche Antikörper zu malignen Zellen aufgrund der Tatsache, daß vaskularisierte Tumore natürlicherweise nekrotische Tumorzellen enthalten, aufgrund des (der) Prozesses (Prozesse) der Tumor-Remodellierung, die in vivo stattfinden und eine Nekrose von wenigstens einem Teil der malignen Zelle hervorrufen. Zusätzlich dient die Verwendung solcher Antikörper in Kombination mit anderen Therapien, die die Tumornekrose verstärken, dazu, die Wirksamkeit des Zielens („targeting“) und der darauffolgenden Therapie zu verbessern.

[0210] Diese Typen von Antikörpern können daher verwendet werden, um direkt oder indirekt mit Angiopoietinen zu assoziieren und die Angiopoietine an nekrotische maligne Zellen innerhalb von vaskularisierten Tumoren zu verabreichen, wie genetisch hierin offenbart.

[0211] Wie ebenso in US-Patent Nr. 5,019,368, 4,861,581 und 5,882,626 offenbart, können diese Antikörper in kombinierten diagnostischen Methoden (siehe unten) und in Verfahren zum Messen der Wirksamkeit von Anti-Tumor-Therapien verwendet werden. Solche Verfahren beinhalten im allgemeinen die Herstellung und Verabreichung einer markierten Version der Antikörper und Messen der Bindung des markierten Antikörpers an das interne zelluläre Bestandteilziel, das bevorzugt innerhalb von nekrotischem Gewebe gebunden ist. Die Verfahren bilden damit das nekrotische Gewebe ab, wobei eine lokalisierte Konzentration des Antikörpers auf die Anwesenheit eines Tumors hinweist und Ghosts von Zellen anzeigt, die durch die Anti-Tumor-Therapie getötet worden sind.

[0212] Anti-Tumor-Stroma-Immunttoxine oder Coaguliganden werden im allgemeinen Antikörper umfassen, die an einen Bindegewebebestandteil, einen Basalmembranbestandteil oder einen aktivierten Blutplättchenbestandteil binden, wie beispielhaft veranschaulicht durch die Bindung an Fibrin, RIBS oder LIBS.

[0213] Anti-Tumorgefäß-Immunttoxine oder Coaguliganden können Liganden, Antikörper und Fragmente davon umfassen, die an einen oberflächenexprimierten, oberflächenzugänglichen oder oberflächenlokalisierten Bestandteil der bluttransportierenden Gefäße binden, bevorzugt die intratumoralen Blutgefäße eines vaskularisierten Tumors. Solche Antikörper schließen diejenigen ein, die an oberflächenexprimierte Bestandteile von intratumoralen Blutgefäßen eines vaskularisierten Tumors, einschließlich intratumoralen Gefäßzelloberflächenrezeptoren binden, wie etwa Endoglin (TEC-4- und TEC-11-Antikörper), einen TGF β -Rezeptor, E-Selectin, P-Selectin, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, einen VEGF/VPF-Rezeptor, einen FGF-Rezeptor, einen TIE, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Pleiotropin, Endosialin und MHC-Klasse-II-Proteine. Die Antikörper können ebenso an Cytokin-induzierbare oder Coagulans-induzierbare Bestandteile von intratumoralen Blutgefäßen binden. Bestimmte bevorzugte Mittel werden an Aminophospholipide, wie etwa Phosphatidylserin oder Phosphatidylethanolamin binden.

[0214] Andere Anti-Tumorgefäß-Immunttoxine oder Coaguliganden können Antikörper oder Fragmente davon umfassen, die an einen Liganden oder Wachstumsfaktor binden, der an einen intratumoralen Gefäßzelloberflächenrezeptor bindet. Solche Antikörper schließen diejenigen ein, die an VEGF/VPF (GV39- und GV97-Antikörper), FGF, TGF β , einen Liganden, der an ein TIE bindet, eine Tumor-assoziierte Fibronektin-Isoform, Streufaktor/Hepatocytenwachstumsfaktor (HGF), Blutplättchenfaktor 4 (PF4), PDGF und TIMP binden. Die Antikörper oder Fragmente davon können ebenso an einen Ligand:Rezeptorkomplex oder einen Wachstumsfaktor:Rezeptorkomplex binden, aber nicht an den Liganden oder Wachstumsfaktor, oder an den Rezeptor, wenn der Ligand oder Wachstumsfaktor oder der Rezeptor nicht in dem Ligand:Rezeptor- oder Wachstumsfaktor:Rezeptorkomplex ist.

[0215] Anti-Tumorzell-, Anti-Tumorstroma- oder Anti-Tumorgefäß-Antikörper-therapeutisches Mittel-Konstrukte können anti-angiogene Mittel, Apoptose-induzierende Mittel, Anti-Tubulin-Arzneien, cytotoxische Mittel, wie etwa Pflanzen-, Pilz- oder Bakterien-abgeleitete Toxine umfassen. Ricin-A-Kette und deglycosylierte Ricin-A-Kette werden oft bevorzugt werden. Anti-Tumorzell-, Anti-Tumorstroma- oder Anti-Tumorgefäß-Antikörper-therapeutisches Mittel-Konstrukte können Coagulantien (direkt und indirekt wirkende Coagulationsfaktoren) oder zweite Antikörper-Bindungsregionen umfassen, die an Coagulationsfaktoren binden. Die operative Assoziation mit Gewebefaktor oder Gewebefaktorderivaten, wie etwa trunkiertem Gewebefaktor wird oft bevorzugt sein.

[0216] Hinsichtlich der Zusammensetzungen, Kits und/oder Medikamenten der Erfindung können die kombinierten wirksamen Mengen der therapeutischen Mitteln in einem einzelnen Behälter oder Behältermitteln umfaßt sein oder innerhalb verschiedener Behälter oder Behältermittel umfaßt sein. Die Cocktails werden im allgemeinen für eine kombinierte Verwendung zusammengemischt. Mittel, formuliert zu intravenösen Verabreichung, werden oft bevorzugt sein. Bildgebende Bestandteile können ebenso eingeschlossen werden. Die Kits können ebenso Anweisungen zum Verwenden des wenigstens einen ersten Antikörpers und des einen oder mehreren anderen eingeschlossenen biologischen Mittel umfassen.

[0217] Allgemein gesprochen kann das wenigstens eine zweite Antikrebsmittel an das Tier oder Patient im wesentlichen simultan mit dem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Therapeutikum verabreicht werden, wie etwa aus einer einzelnen pharmazeutischen Zusammensetzung oder aus zwei pharmazeutischen Zusammensetzungen, die zusammen verabreicht werden.

[0218] Alternativ kann das wenigstens eine zweite Antikrebsmittel an das Tier oder den Patienten zu einer Zeit verabreicht werden, die der Verabreichung des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder 2C3-basierenden Therapeutikums folgt. „Zu einer Zeit, die folgt“ wie hierin verwendet, bedeutet „versetzt“ („staggered“), so daß das wenigstens eine zweite Antikrebsmittel an das Tier oder Patient zu einer Zeit verabreicht wird, die zur Verabreichung des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutikums unterschiedlich ist. Im allgemeinen werden die beiden Mittel zu Zeiten verabreicht, die im Ergebnis voneinander getrennt sind, um es zu ermöglichen, daß die beiden Mittel ihre jeweiligen therapeutischen Effekte ausüben, d. h. sie werden in „biologisch wirksamen Zeitintervallen“ verabreicht. Das wenigstens eine zweite Antikrebsmittel kann an das Tier oder den Patienten zu einer biologisch wirksamen Zeit vor dem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutikum oder zu einer biologisch wirksamen Zeit im Anschluß an dieses Therapeutikum verabreicht werden.

[0219] Entsprechend stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Behandeln eines Tiers oder Patienten mit einem vaskularisiertem Tumor bereit, umfassend:

- (a) Durchführen einer ersten Behandlung an dem Tier oder Patient, die im wesentlichen die Tumorlast verringert; und
- (b) darauffolgend Verabreichen von wenigstens einem ersten anti-angiogenen Mittel an das Tier oder Patient in einer Menge, die wirksam ist, die Metastase von jeglichen überlebenden Tumorzellen zu inhibieren, wobei das erste anti-angiogene Mittel wenigstens ein erster VEGFR2-blockierender, Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon ist, fakultativ einer, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, fakultativ, wobei der Antikörper oder das Fragment operativ mit einem zweiten anti-angiogenem Mittel assoziiert ist.

[0220] Bevorzugte erste Behandlungen schließen chirurgische Resektion und chemotherapeutische Intervention ein. Kombinierte Anti-Angiogenika können ebenso verwendet werden, wie etwa Angiopoietin-2 oder auf Tumore zielende Angiopoietin-2-Konstrukte.

[0221] Andere Behandlungsverfahren für Tiere oder Patienten mit vaskularisierten Tumoren umfassen:

- (a) Verabreichen eines ersten Antikörper-therapeutisches Mittel-Konstrukts an das Tier oder den Patienten in einer Menge, die wirksam ist, um eine wesentliche Tumornekrose zu induzieren, wobei das erste Antikörper-therapeutische Mittel-Konstrukt ein therapeutisches Mittel umfaßt, operativ verknüpft an einen ersten Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, das an einen oberflächenexprimierten, oberflächenzugänglichen oder oberflächenlokalisierten Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäße oder Tumorstroma bindet, und
- (b) darauffolgend Verabreichen eines zweiten Antikörpers an das Tier oder den Patient in einer Menge, die wirksam ist, die Metastase von irgendwelchen überlebenden Tumorzellen zu inhibieren, wobei der zweite Antikörper wenigstens ein erster VEGFR2-blockierender, Anti-VEGF-Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon ist, fakultativ einer, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper

per 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, und weiterhin, fakultativ, wobei der Antikörper oder das Fragment operativ mit einem zweiten anti-angiogenen Mittel assoziiert ist.

[0222] In besonders bevorzugten Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper und 2C3-basierende Antikörper zur Verwendung in Kombination mit Prodrugs und ADEPT bereit. In solchen Zusammensetzungen, Kombinationen, Pharmazeutika, Kits, Verfahren und Verwendungen wird der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper oder Fragment modifiziert sein, um eine umwandelnde oder enzymatische Kapazität bereitzustellen, oder wird operativ mit wenigstens einem ersten umwandelnden Mittel oder Enzym assoziiert sein, bevorzugt kovalent damit verknüpft oder daran konjugiert sein, das in der Lage ist, wenigstens eine Prodrug in die aktive Form der Arznei umzuwandeln.

[0223] Der enzymatische oder Enzym-konjugierte Antikörper oder Fragment wird mit einer anfänglich getrennten Formulierung der „Prodrug“ kombiniert werden. Die Prodrug wird eine inaktive oder schwach aktive Form einer Arznei sein, d. h. eine, welche in die aktive Form der Arznei auf Kontakt mit der enzymatischen Kapazität, Umwandlungsfunktion oder Enzym umgewandelt wird, das mit dem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-Antikörper assoziiert ist.

[0224] Entsprechend werden Kits bereitgestellt, die, bevorzugt in getrennten Zusammensetzungen und/oder Behältern, umfassen:

- (a) eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder Fragment davon, der/das eine enzymatische Funktion hat, bevorzugt, wenn der Antikörper oder Fragment operativ mit wenigstens einem ersten Enzym assoziiert, kovalent verknüpft oder daran konjugiert ist, und
- (b) eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einer ersten, im wesentlichen inaktiven Prodrug, die in eine im wesentlichen aktive Arznei durch die enzymatische Funktion des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-Antikörpers oder Fragments oder des damit assoziierten, verknüpften oder daran konjugierten Enzyms umgewandelt wird.

[0225] Es werden weiterhin vorteilhafte Verfahren und Verwendungen offenbart, die umfassen:

- (a) Verabreichen an ein Tier oder Patient mit einem vaskularisiertem Tumor von einer biologisch wirksamen Menge von wenigstens einer ersten pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend wenigstens einen ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder eines Antigen-bindenden Fragments davon, wobei der Antikörper oder Fragment eine enzymatische Funktion hat, wobei bevorzugt der Antikörper oder das Fragment operativ an wenigstens ein erstes Enzym assoziiert, kovalent damit verbunden oder daran konjugiert ist, wobei besagter Antikörper oder Fragment sich an die Gefäße, Intratumoralgefäße oder das Stroma des vaskularisierten Tumors nach der Verabreichung begibt, und
- (b) darauffolgendes Verabreichen an das Tier oder Patient, nach einer wirksamen Zeitperiode, von einer biologisch wirksamen Menge von wenigstens einer zweiten pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einer im wesentlichen inaktiven Prodrug, wobei die Prodrug in eine im wesentlichen aktive Arznei durch die enzymatische Funktion von dem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-Antikörper oder Fragment, das sich innerhalb der Gefäße, intratumoralen Gefäßen oder Stroma des besagten vaskularisierten Tumors befindet, oder durch das damit assoziierte, verknüpfte oder daran konjugierte Enzym umgewandelt wird.

[0226] In bestimmten anderen Ausführungsformen können die Antikörper und Immunkonjugate der Erfindung mit einem oder mehreren diagnostischen Mitteln, typischerweise diagnostischen Mitteln zur Verwendung im Zusammenhang mit angiogenen Krankheiten kombiniert werden. Eine Vielzahl von diagnostischen Zusammensetzungen, Kits und Verfahren sind somit innerhalb der Erfindung eingeschlossen.

[0227] Hinsichtlich der Krebsdiagnose und -Behandlung schließen die diagnostischen und bildgebenden Zusammensetzungen, Kits und Verfahren der vorliegenden Erfindung in-vivo- und in-vitro-Diagnostika ein. Zum Beispiel kann ein vaskularisierter Tumor unter Verwendung einer diagnostisch wirksamen Menge eines Tumor-diagnostischen Bestandteils abgebildet werden, der wenigstens eine erste Bindungsregion umfaßt, die an einen zugänglichen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäße oder Tumorstroma bindet, operativ an ein in-vivo-diagnostisches Bildgebungsmittel („imaging agent“) angehängt ist.

[0228] Die Tumorbildgebung wird bevorzugt durchgeführt, um ein Bild des Stroma und/oder der Gefäße eines vaskularisierten Tumors bereitzustellen unter Verwendung eines diagnostischen Bestandteils, der wenigstens eine erste Bindungsregion umfaßt, die an einen zugänglichen Bestandteil von Tumorgefäßen oder Tumorstro-

ma bindet. Jede geeignete Bindungsregion oder Antikörper kann verwendet werden, wie etwa diejenigen, die oben im Hinblick auf die therapeutischen Konstrukte beschrieben sind. Bestimmte Vorteile werden bereitgestellt unter Verwendung eines nachweisbar markierten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper-Konstrukts, wobei das geformte Bild die Bindungsstellen des zu verwendenden Therapeutikums vorhersagen wird.

[0229] Nachweisbar markierte in-vivo-Tumor-Diagnostika, sei es auf Basis eines VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder von 2C3 oder nicht, kann eine Röntgennachweisbare Verbindung umfassen, wie etwa Wismut (III), Gold (III), Lanthan (III) oder Blei (II), ein radioaktives Ion, wie etwa Kupfer⁶⁷, Gallium⁶⁷, Gallium⁶⁸, Indium¹¹¹, Indium¹¹³, Iod¹²³, Iod¹²⁵, Iod¹³¹, Quecksilber¹⁹⁷, Quecksilber²⁰³, Rhenium¹⁸⁶, Rhenium¹⁸⁸, Rubidium⁹⁷, Rubidium¹⁰³, Technetium^{99m} oder Yttrium⁹⁰, ein magnetisches Kernspinresonanzisotop, wie etwa Kobalt (II), Kupfer (II), Chrom (III), Dysprosium (III), Erbium (III), Gadolinium (III), Holmium (III), Eisen (II), Eisen (III), Mangan (II), Neodymium (III), Nickel (II), Samarium (III), Terbium (III), Vanadium (II) oder Ytterbium (III), oder Rhodamin oder Fluorescein.

[0230] Eine Vor-Abbildung („pre-imaging“) vor der Tumorbehandlung kann durchgeführt werden durch:

- (a) Verabreichen an das Tier oder Patienten von einer diagnostisch wirksamen Menge einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend ein diagnostisches Mittel, operativ an wenigstens eine erste Bindungsregion angehängt, die an einen zugänglichen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäße (bevorzugt) oder Tumorstroma (bevorzugt) bindet, einschließlich diagnostischer Mittel, die operativ an VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierender Antikörper-Konstrukte angehängt sind, und
- b) darauffolgendes Nachweisen der nachweisbar markierten ersten Bindungsregion (oder des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder 2C3-basierenden Antikörpers) gebunden an die Tumorzellen, Tumorblutgefäße (bevorzugt) oder Tumorstroma (bevorzugt), wodurch ein Bild des Tumors, der Tumorgefäße und/oder des Tumorstroma erhalten wird.

[0231] Eine Krebsbehandlung kann ebenso durchgeführt werden durch:

- (a) Erstellen eines Bildes eines vaskularisierten Tumors durch Verabreichen an ein Tier oder Patient mit, einem vaskularisierten Tumor, von einer diagnostisch minimalen Menge von wenigstens einem ersten nachweisbar markierten Tumor-Bindungsmittel, bevorzugt einem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper-Konstrukt, umfassend ein diagnostisches Mittel, operativ an das Tumor-bindende Mittel oder den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper angehängt, wodurch ein nachweisbares Bild des Tumors, der Tumorgefäße (bevorzugt) oder des Tumorstroma (bevorzugt) erstellt wird; und
- (b) darauffolgendes Verabreichen an dasselbe Tier oder Patient von einer therapeutisch optimierten Menge von wenigstens einem ersten nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-Antikörper oder eines therapeutischen Mittel-Antikörper-Konstruktes unter Verwendung eines solchen Antikörpers, wodurch ein Anti-Tumor-Effekt ausgeübt wird.

[0232] Die Bildgebungs- und Behandlungsformulierungen oder Medikamente werden somit bereitgestellt, die im allgemeinen umfassen:

- (a) eine erste pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine diagnostisch wirksame Menge eines nachweisbar markierten Tumor-Bindungsmittels, bevorzugt eines VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder 2C3-basierenden Antikörper-Konstrukts, das ein nachweisbares Mittel umfaßt, operativ an das Tumor-Bindungsmittel oder den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper angehängt ist, und
- (b) eine zweite pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge von wenigstens einem nackten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-Antikörper oder ein therapeutisches Mittel-Antikörper-Konstrukt unter Verwendung eines solchen Antikörpers.

[0233] Die Erfindung stellt ebenso in-vitro-diagnostische Kits bereit, umfassend wenigstens eine erste Zusammensetzung oder pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem diagnostischen Mittel, das operativ mit wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper assoziiert ist, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment davon.

[0234] Die Erfindung stellt noch darüberhinaus kombinierte Kits bereit, in denen das diagnostische Mittel zur Verwendung außerhalb des Körpers vorgesehen ist, bevorzugt in Verbindung mit einem Test, der an einer biologischen Probe durchgeführt wird, die von einem Tier oder Patient erhalten worden ist. Als solches stellt die Erfindung Kits bereit, umfassend im allgemeinen in wenigstens zwei unterschiedlichen Behältern, wenigstens

eine erste Zusammensetzung, pharmazeutische Zusammensetzung oder medizinisches Cocktail, umfassend eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, fakultativ einem, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, oder ein Antigen-bindendes Fragment oder Immunkonjugat eines solchen Anti-VEGF-Antikörpers, und eine biologisch wirksame Menge von wenigstens einem diagnostischen Mittel, Bestandteil oder System zur in-vitro-Verwendung.

[0235] Das „diagnostische Mittel, Bestandteil oder System zur in-vitro-Verwendung“ wird jedes diagnostische Mittel oder Kombination von Mitteln sein, die die Diagnose von einer oder mehreren Krankheiten ermöglichen, die einen angiogenen Bestandteil haben. Die in-vitro-Diagnostika schließen somit diejenigen ein, die zur Verwendung bei der Erzeugung von diagnostischer oder prognostischer Information im Hinblick auf eine Krankheit oder Störung geeignet sind, wie offenbart in US-Patenten Nr. 5,712,291, 5,753,230, 5,972,922, 5,639,757, WO 98/45331 und WO 98/16551.

[0236] Im Hinblick auf Krebsdiagnose und -Behandlung werden die in-vitro-Diagnostika bevorzugt einen diagnostischen Bestandteil einschließen, der wenigstens eine erste Bindungsregion umfaßt, die an einen zugänglichen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäße (bevorzugt) oder Tumorstroma (bevorzugt) bindet, operativ an ein „nachweisbares oder Reporter-Agens“ angehängt, direkt oder indirekt nachweisbar durch einen in-vitro-Diagnose-Test. „Nachweisbare oder Reporter-Agentien“, direkt nachweisbar in vitro, schließen beispielsweise radioaktive Markierungen und Reporter-Agentien ein, die mittels Immunfluoreszenz nachweisbar sind.

[0237] „Nachweisbare oder Reporter-Agentien“, indirekt in vitro nachweisbar, schließen diejenigen ein, die mit einem weiteren exogenen Mittel (weiteren exogenen Mitteln) funktionieren, wie etwa nachweisbaren Enzymen, die ein farbiges Produkt auf Kontakt mit einem chromogenen Substrat ergeben. Ein indirekter Nachweis in vitro erstreckt sich auch auf nachweisbare oder Reporter-Bestandteile oder Systeme, die die erste Bindungsregion umfassen, die an einen zugänglichen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäße (bevorzugt) oder Tumorstroma (bevorzugt) in Kombination mit wenigstens einem Nachweisantikörper bindet, der Immunspezifität für die erste Bindungsregion hat. Der „Nachweisantikörper“ ist bevorzugt ein „sekundärer Antikörper“, der an ein direktes oder indirektes nachweisbares Mittel, wie etwa eine radioaktive Markierung oder ein Enzym angehängt ist. Alternativ kann ein „sekundäres und tertiäres Antikörperrnachweissystem“ verwendet werden, einschließlich eines ersten Nachweisantikörpers, der Immunspezifität für die erste Bindungsregion hat, in Kombination mit einem zweiten Nachweisantikörper, der Immunspezifität für den ersten Nachweisantikörper hat, wobei der zweite Nachweisantikörper an ein direkt oder indirekt nachweisbares Mittel angehängt ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0238] Die folgenden Abbildungen bilden Teil der vorliegenden Beschreibung und werden eingebaut, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung weiter zu veranschaulichen. Die Erfindung kann unter Bezugnahme auf eine oder mehrere dieser Abbildungen in Kombination mit der detaillierten Beschreibung von spezifisch hierin offenbarten Ausführungsformen besser verstanden werden.

[0239] **Fig. 1.** 2C3 inhibiert VEGF-vermitteltes Wachstum von ABAE-Zellen. ABAE-Zellen wurden in der Anwesenheit der verschiedenen angezeigten Antikörper und 0,5 nM VEGF wachsgelassen. Das Wachstum nach 4 Tagen wurde kolorimetrisch durch die enzymatische Umwandlung von MTS (Owen-Reagenz) in ein gelbes Formazan bestimmt. Die Resultate werden als ein prozentualer Anteil der Formazan-Produktion in Kontrollnäpfen dargestellt, die mit VEGF alleine wachsgelassen wurden. Der Hintergrund wurde bestimmt durch Wachsenlassen von Zellen ohne VEGF oder Antikörper und wurde von den Kontroll- und Probennäpfen subtrahiert. Die Resultate zeigen das arithmetische Mittel von dreifachen Bestimmungen, deren Standardabweichungen immer weniger als 20% des Mittelwerts waren. Gezeigt werden die Wachstumskurven für die Anti-VEGF-IgG-Antikörper, einschließlich mAb 4.6.1 als eine positive Kontrolle und ein IgG mit irrelevanter Spezifität (Kontroll-IgG) als eine negative Kontrolle.

[0240] **Fig. 2.** 2C3 blockiert die VEGF-Bindung an VEGFR2, aber nicht an VEGFR1 in ELISA. Die Näpfe wurden mit der extrazellulären Domäne von VEGFR1 (Flt-1/Fc) oder VEGFR2 (sFlk-1) beschichtet und wurden dann mit VEGF alleine bei 1 nM oder VEGF in der Anwesenheit des angezeigten IgG bei entweder 100 nM oder 1000 nM inkubiert. Die Platte wurde dann mit Kaninchen-Anti-VEGF (A-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) bei 1 µg/ml inkubiert und unter Verwendung eines Peroxidase-konjugierten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörpers entwickelt. Die Assays wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Die mittlere prozentuale Bindung in der Abwesenheit des Antikörpers wird gezeigt, zusammen mit der Standardabweichung. Die Sternchen zeigen die Werte an, die statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,002$) von denjenigen in der Abwesen-

heit des Antikörpers sind mittels eines gepaarten Student's T-Test.

[0241] [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#). 2C3 inhibiert das in-vivo-Wachstum von menschlichen Tumor-Xenografts. [Fig. 3A](#): 1×10^7 NCI-H358 NSCLC-Zellen wurden subkutan in nu/nu-Mäuse am Tag 0 injiziert. [Fig. 3B](#): 5×10^6 A673-Rhabdomyosarcom-Zellen wurden subkutan in nu/nu-Mäuse am Tag 0 injiziert. Den Mäusen wurde i.p. der angezeigte IgG am Tag 1 und 2-mal/Woche danach injiziert. 2C3 wurde in einer Dosis von 100, 10 oder 1 µg/Injektion gegeben, während ein Kontroll-IgG mit irrelevanter Spezifität ([Fig. 3A](#)) und 3E7 ([Fig. 3B](#)) ebenso in 100 µg/Injektion gegeben wurde. Die Tumore wurden 2–3 mal pro Woche gemessen. Der Mittelwert und der Standardfehler wird für die Dauer der Studie in [Fig. 3A](#) gezeigt, während die Daten für den letzten Tag der Studie (Tag 26) in [Fig. 3B](#) gezeigt werden.

[0242] [Fig. 4](#). 2C3-Behandlung verringert die Größe von etablierten humanen NCI-H358-NSCLC-Tumor-Xenografts. Mäuse, die subkutane NCI-H358-Tumore tragen, näherungsweise 350–450 mm³ groß, wurden i.p. mit 50 µg oder 100 µg 2C3 (n=14), mAb 4.6.1 (n=5), 3E7 (n=12) oder einem Kontroll-IgG (n=9) an den angegebenen Zeitpunkten behandelt. Das mittlere Tumolvolumen zusammen mit dem SEM über 116 Tage wird gezeigt.

[0243] [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#). Vergleich der 2C3- und 3E7-Behandlung von etablierten humanen Tumor-Xenografts. [Fig. 5A](#): Mäuse, die subkutane NCI-H358-Tumore trugen, näherungsweise 450 mm³ groß, wurden entweder mit 2C3 (n=6) oder 3E7 (n=4) behandelt. Die Behandlungen (T) waren 100 µg des i.p. gegebenen IgG, außer für die anfängliche Behandlung, die aus 500 µg des i.v. gegebenen IgG bestand. Das mittlere Tumolvolumen zusammen mit dem SEM wird gezeigt. Am Ende der Studie (Tag 116) wurden die Mäuse geopfert, und die Tumore seziert und gewogen. Das mittlere Tumorgewicht für die 2C3-behandelte Gruppe war 0,054 g, während die 3E7-behandelte Gruppe ein mittleres Tumorgewicht von 0,545 g hatte. [Fig. 5B](#): Mäuse, die subkutane HT1080-Tumore, näherungsweise 200–250 mm³ groß, trugen, wurden i.p. mit 100 µg 2C3 (n=9), 3E7 (n=11), Kontroll-IgG (n=11) oder Kochsalzlösung (n=11) behandelt. Die Mäuse wurden jeden zweiten Tag, wie angezeigt, behandelt (T). Die nicht-2C3-behandelten Mäuse wurden am Tag 26 geopfert, da mehr als 50% jeder Gruppe große ulceröse Tumore hatten. Das mittlere Tumolvolumen zusammen mit dem SE wird gezeigt.

BESCHREIBUNG DER ERLÄUTERNDEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0244] Feste Tumore und Karzinome machen mehr als 90% aller Krebse beim Menschen aus. Obwohl die Verwendung von monoklonalen Antikörpern und Immuntoxinen bei der Therapie von Lymphomen und Leukämien erforscht worden ist, sind diese Mittel enttäuschend ineffektiv in klinischen Versuchen gegen Karzinome und andere feste Tumore gewesen (Abrams and Oldham, 1985). Ein Hauptgrund für die Ineffektivität von Antikörper-basierenden Behandlungen ist, daß Makromoleküle nicht in leichter Weise in feste Tumore transportiert werden. Sogar wenn sie erst einmal innerhalb einer Tumormasse sind, können sich diese Moleküle nicht gleichmäßig verteilen, aufgrund der Anwesenheit von Tight Junctions zwischen Tumorzellen, fibrösem Stroma, interstitiellen Druckgradienten und Bindungsstellenbarrieren (Dvorak et al., 1991a).

[0245] Beim Entwickeln von neuen Strategien für die Behandlung von festen Tumoren bieten die Verfahren bestimmte Vorteile, die das Zielen auf die Gefäße des Tumors statt auf die Tumorzellen beinhalten. Eine effektive Zerstörung oder Blockade der Tumorgefäße unterbricht den Blutfluß durch den Tumor und führt zu einer Lawine von Tumorzelltod. Antikörper-Toxin- und Antikörper-Coagulans-Konstrukte sind bereits effektiv bei dem spezifischen Zielen auf und der Zerstörung von Tumorgefäßen verwendet worden, was zu Tumornekrose führte (Burrows et al., 1992; Burrows and Thorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; US-Patent Nr. 5,855,866; 5,877,289; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555; US Patent Nr. 6,093,399; Erteilungsgebühr am 20. Oktober 1998 bezahlt).

[0246] Wenn Antikörper, Wachstumsfaktoren oder andere Bindungsliganden verwendet werden, um spezifisch ein Coagulans an die Tumorgefäße abzugeben, werden solche Agentien als „Coaguliganden“ bezeichnet. Ein gegenwärtig bevorzugtes Coagulans zur Verwendung bei Coaguliganden ist trunkierter Gewebefaktor (tTF) (Huang et al., 1997; WO 96/01653; US-Patent-Nr. 5,877,289). TF ist der Hauptinitiator der Blutcoagulation. An Verletzungsstellen kommt Faktor VII/VIIa im Blut in Kontakt mit und bindet an TF auf Zellen in den perivaskulären Geweben. Der TF:VIIa-Komplex, in der Anwesenheit der Phospholipidoberfläche, aktiviert Faktoren IX und X. Dies wiederum führt zur Bildung von Thrombin und Fibrin und schließlich zu einem Blutgerinnsel.

[0247] Eine Reihe von geeigneten Zielmolekülen, die auf dem Tumorendothel verfügbar, aber weitgehend abwesend von normalem Endothel sind, sind beschrieben worden. Zum Beispiel können exprimierte Ziele verwendet werden, wie etwa Endoglin, E-Selectin, P-Selectin, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, ein TIE, ein Ligand, der

mit LAM-1 reaktiv ist, ein VEGF/VPF-Rezeptor, ein FGF-Rezeptor, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Pleiotropin oder Endosialin (US-Patent Nr. 5,855,866; 5,877,289 und 6,004,555; Burrows et al., 1992; Burrows and Thorpe; 1993; Huang et al., 1997).

[0248] Andere Ziele, die durch die natürliche Tumorumgebung oder nach Intervention durch den Menschen induzierbar sind, sind ebenso Entitäten, auf die gezielt werden kann, wie beschrieben in US-Patent Nr. 5,776,427 und 6,036,955. Bei Verwendung im Zusammenhang mit einer vorherigen Unterdrückung in normalen Geweben und einer Tumorgefäßinduktion, können auch MHC-Klasse-II-Antigene als Ziele verwendet werden (US-Patent Nr. 5,776,427; 6,004,554 und 6,036,955).

[0249] Adsorbierte Ziele sind eine andere geeignete Gruppe, wie etwa VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, ein Ligand, der an ein TIE oder eine Tumor-assoziierte Fibronectin-Isoform bindet (US-Patent Nr. 5,877,289 und 5,965,132). Fibronectin-Isoformen sind Liganden, die an die Integrinfamilie der Rezeptoren binden. Tumor-assoziierte Fibronectin-Isoformen sind Bestandteile, auf die gezielt werden kann, von sowohl Tumorgefäßen als auch Tumorstroma.

[0250] Ein gegenwärtig bevorzugter Marker für solche klinischen Targeting-Anwendungen ist Rezeptor-assoziiierter VEGF. In der Tat sind Anordnungen von VEGF:Rezeptor-Komplexen einer der spezifischsten Marker für Tumorgefäße, die bis heute beobachtet worden sind (US-Patent Nr. 5,877,289; 5,965,132 und 6,051,230; Lin-Ke et al., 1996; Dvorak et al., 1991b).

[0251] Der VEGF:Rezeptor-Komplex stellt ein attraktives Ziel für die spezifische Abgabe von Arzneien oder anderen Effektoren an das Tumorendothel dar – da Tumore reich an Cytokinen und Wachstumsfaktoren sind und da VEGF-Rezeptoren unter den hypoxischen Bedingungen hochreguliert sind, die in den meisten festen Tumoren gefunden werden (Mazure et al., 1996; Forsythe et al., 1996; Waltenberger et al., 1996; Gerber et al., 1997; Kremer et al., 1997). Eine Hochregulation sowohl des Liganden als auch seines Rezeptors, insbesondere in der Tumor-Mikroumgebung, führt zu einer hohen Konzentration an besetztem Rezeptor auf Tumorgefäßendothel, im Vergleich mit dem Endothel in normalem Gewebe (US-Patent Nr. 5,877,289 und 5,965,132). Dvorak und Kollegen zeigten ebenso, daß polyklonale Kaninchen-Antikörper, die gegen den N-Terminus von VEGF gerichtet waren, selektiv Tumorblutgefäße nach der Injektion in Mäuse färbten, welche syngene Tumoren trugen (Lin-Ke et al., 1996).

[0252] Die Rolle von VEGF als ein Ziel für die klinische Intervention ist nicht auf Immuntoxin oder Coaguland-Therapien beschränkt. In der Tat ist VEGF einer der Schlüsselfaktoren, der bei der Angiogenese von festen Tumoren beteiligt ist (Ferrara, 1995; Potgens et al., 1995), wobei beide sowohl ein potentielles Permeabilitätsmittel (Senger et al., 1983; Senger et al., 1990; Senger et al., 1986) als auch ein Endothelzellen-Mitogen (Keck et al., 1989; Connolly et al., 1989; Thomas, 1996) sind. Die Verbindung zwischen VEGF und Angiogenese hat zu Vorschlägen für verschiedene therapeutische Strategien geführt, die auf eine VEGF-Intervention zielen (Siemeister et al., 1998).

A. VEGF und VEGF-Rezeptoren

[0253] Gefäß-Endothelwachstumsfaktor (VEGF) ist ein multifunktionelles Cytokin, das durch Hypoxie und onkogene Mutationen induziert wird. VEGF ist ein primäres Stimulans der Entwicklung und Aufrechterhaltung eines Gefäßnetzwerkes bei der Embryogenese. Er funktioniert als ein potentes Permeabilitäts-induzierendes Mittel, ein Endothelzell-chemotaktisches Mittel, ein Endothel-Überlebensfaktor und ein Endothelzell-Proliferationsfaktor (Thomas, 1996; Neufeld et al., 1999). Seine Aktivität ist für eine normale Embryonenentwicklung erforderlich (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995), da die gezielte Zerstörung von einem oder beiden Allelen von VEGF zu einer Embryonenletalität führt (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996).

[0254] VEGF ist ein wichtiger Faktor, der die Angiogenese und die Vasculogenese in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen antreibt, einschließlich Wundheilung (Frank et al., 1995; Burke et al., 1995), diabetischer Retinopathie (Alon et al., 1995; Malecaze et al., 1994), Psoriasis (Detmar et al., 1994), Arteriosklerose (Inoue et al., 1998), Rheumatoidarthritis (Harada et al., 1998; Nagashima et al., 1999), Wachstum eines festen Tumors (Plate et al., 1994; Claffey et al., 1996).

[0255] Eine große Vielzahl von Zellen und Geweben erzeugen VEGF, der in wenigstens fünf Isoformen existiert (121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren), die Splice-Varianten sind, welche durch dasselbe Gen kodiert werden (Houck et al., 1991; Ferrara et al., 1991; Tischer et al., 1991). Die beiden kleineren Isoformen, 121 und 165, werden aus Zellen ausgeschieden (Houck et al., 1991; Anthony et al., 1994). Sezernierter VEGF ist ein

obligates Dimer von zwischen 38–46 kDa, bei dem die Monomere über zwei Disulfid-Bindungen geknüpft sind.

[0256] VEGF-Dimere binden mit einer hohen Affinität an zwei gut charakterisierte Rezeptoren, VEGFR1 (FLT-1) und VEGFR2 (KDR/Flk-1), die selektiv auf Endothelzellen exprimiert werden (FLT-1 und Flk-1 sind die Maus-Homologe). Die K_d der VEGF-Bindung an VEGFR1 und VEGFR2 ist 15–100 pM bzw. 400–800 pM (Terman et al., 1994). Ein vor kurzem identifiziertes drittes Zelloberflächenprotein, Neuropilin-1, bindet ebenso an VEGF mit hoher Affinität (Olander et al., 1991; De Vries et al., 1992; Terman et al., 1992; Soker et al., 1998).

[0257] VEGFR1 und VEGFR2 sind Mitglieder der Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK III)-Familie, die durch sieben extrazelluläre IgG-artige Repeats, eine einzelne überspannende Transmembrandomäne und eine intrazelluläre gespaltene („split“) Tyrosinkinasedomäne charakterisiert ist (Mustonen und Alitalo, 1995). Bis vor sehr kurzem wurde gedacht, daß VEGFR1 und VEGFR2 beinahe exklusiv auf Endothelzellen exprimiert werden (Mustonen und Alitalo, 1995). Obwohl berichtet worden ist, daß VEGFR1 und VEGFR2 unterschiedliche Funktionen im Hinblick auf das Stimulieren von Endothelzellproliferation, -Migration und -Differenzierung haben (Waltenberger et al., 1994; Guo et al., 1995), war die genaue Rolle, die jeder Rezeptor bei der VEGF-Biologie und Endothelzellhomöostase spielt, vor der vorliegenden Erfindung nicht klar definiert.

[0258] Jüngere Studien unter Verwendung von Knockout-Mäusen haben gezeigt, daß jeder von VEGF, VEGFR1 und VEGFR2 für die Vasculogenese, Angiogenese und die Embryoentwicklung essentiell sind (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995; Hiratsuka et al., 1998). In Studien mit letalen Knockouts waren die Phänotypen, die mit dem Mangel an jedem Rezeptor assoziiert waren, unterschiedlich. Eine gezielte Zerstörung von VEGFR2 führte zu einem Embryo, dem die Endothelzelldifferenzierung fehlte, und der keine Dottersackblutinseln bilden oder eine Vasculogenese durchlaufen konnte (Shalaby et al., 1995). VEGFR1-Nullmutanten zeigten eine beeinträchtigte Vasculogenese, einen disorganisierten Aufbau von Endothelzellen und erweiterte Blutgefäße (Fong et al., 1995; Hiratsuka et al., 1998). VEGFR1 hat offensichtlich eine vitale biologische Rolle.

[0259] VEGFR1 hat eine höhere Affinität für VEGF als VEGFR2, obwohl es eine niedrigere Tyrosinkinaseaktivität hat. Dies legt nahe, daß die extrazelluläre Domäne von VEGFR1 besonders wichtig ist. Diese Hypothese wurde stark durch Ergebnisse aus Studien an Knockout-Mäusen unterstützt, bei denen die Tyrosinkinasedomäne von VEGFR1 zerstört wurde, während die VEGF-Bindungsdomäne intakt blieb (Hiratsuka et al., 1998). Die VEGFR1-Tyrosinkinasen-defizienten Embryos entwickelten normale Blutgefäße und überlebten bis zum Termin (Hiratsuka et al., 1998).

[0260] Zusätzlich zu den früheren Knockouts (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995) zeigen die Hiratsuka et al. (1998)-Studien, daß VEGFR1 eine vitale biologische Rolle hat. Jedoch scheint die Tyrosinkinase-Signalgebung nicht der wesentliche Faktor zu sein. Es ist interessant festzustellen, daß Macrophagen aus den VEGFR1-Knockout-Mäusen keine VEGF-induzierte Chemotaxis aufwiesen (Hiratsuka et al., 1998), wodurch VEGFR1 als der Rezeptor impliziert wird, der für das Vermitteln dieser wichtigen biologischen Antwort auf VEGF verantwortlich ist.

[0261] Bestimmte Gruppen haben berichtet, daß VEGFR2 der dominante Signalrezeptor bei VEGF-induzierter Mitogenese und Permeabilität ist (Waltenberger et al., 1994; Zachary, 1998; Korpelainen und Alitalo, 1998). Die Rolle von VEGFR1 bei der Endothelzellfunktion ist viel weniger klar, obwohl Funktionen bei der Macrophagenmigration und -chemotaxis in den oben diskutierten Hiratsuka et al. (1998)-Studien dokumentiert wurden.

[0262] Clauss et al. (1996) berichteten auch, daß VEGFR1 wichtige Rollen bei der Monocyten-Aktivierung und -chemotaxis hat. In der Tat exprimieren Zellen der Macrophagen/Monocyten-Linie nur VEGFR1, der der Rezeptor ist, der für die Vermittlung von Monocyten-Rekrutierung und Procoagulans-Aktivität verantwortlich ist (Clauss et al., 1996). Die VEGF-Bindung an VEGFR1 auf Monocyten und Macrophagen funktioniert ebenso dadurch, daß intrazelluläres Calcium angehoben und die Tyrosinphosphorylierung induziert wird (Clauss et al., 1996).

[0263] Es wird geglaubt, daß die Bindung des VEGF-Dimers an den VEGF-Rezeptor die Rezeptor-Dimerisierung induziert. Die Dimerisierung des Rezeptors bewirkt dann eine Autotransphosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten, Y801 und Y1175, und Y1213 und Y1333 auf der intrazellulären Seite von VEGFR2 bzw. VEGFR1. Dies führt zu einer Signaltransduktionscascade, die die Aktivierung von Phospholipase C γ (PLC γ) und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und ein Anwachsen an intrazellulären Calciumionen beinhaltet (Hood und Meininger, 1998; Hood et al., 1998; Kroll und Waltenberger, 1998).

[0264] Die intrazellulären Ereignisse weiter stromabwärts bei der VEGF-induzierten Signalgebung, sind we-

niger klar, obwohl eine Anzahl von Gruppen gezeigt haben, daß Stickoxid (NO) nach VEGF-Aktivierung von VEGFR2 erzeugt wird (Hood und Meininger, 1998; Hood et al., 1998; Kroll und Waltenberger, 1998). Es ist ebenso gezeigt worden, daß die Aktivierung durch VEGF von VEGFR2, aber nicht von VEGFR1 Src und die Ras-MAP-Kinasekaskade aktiviert, einschließlich der MAP-Kinasen ERK-1 und -2 (Waltenberger et al., 1994; Kroll und Waltenberger, 1997).

[0265] Die Rolle von VEGFR1 bei der Endothelzellfunktion ist viel weniger klar, insbesondere da Flt-1-Tyrosinkinase-defiziente Mäuse lebensfähig sind und normale Gefäße entwickeln (Hiratsuka et al., 1998). Es ist vorgeschlagen worden, daß die biologische Hauptrolle von VEGFR1 auf dem Endothel als ein nicht-signalgebendes, Liganden-bindendes Molekül oder ein „Decoy“-Rezeptor ist, der erforderlich sein könnte, um VEGF an VEGFR2 zu präsentieren.

[0266] Die Verbindung zwischen VEGF und pathologischen angiogenen Zuständen hat zu verschiedenen Versuchen Anlaß gegeben, die VEGF-Aktivität zu blockieren. Diese schließen die Entwicklung von bestimmten neutralisierenden Antikörpern gegen VEGF (Kim et al., 1992; Presta et al., 1997; Sioussat et al., 1993; Kondo et al., 1993; Asano et al., 1995) ein. Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren sind ebenso beschrieben worden, wie etwa in US Patenten Nr. 5,840,301 und 5,874,542 und, anschließend an die vorliegende Erfindung, in WO 99/40118. US Patent Nr. 5,840,301 und 5,874,542 legen in der Tat nahe, daß das Blockieren von VEGF-Rezeptoren statt von VEGF selbst vorteilhaft aus verschiedenen Gründen ist.

[0267] Lösliche Rezeptorkonstrukte (Kendall und Thomas, 1993; Aiello et al., 1995; Lin et al., 1998; Millauer et al., 1996), Tyrosinkinaseinhibitoren (Siemeister et al., 1998), Antisense-Strategien, RNA-Aptamere und Ribozyme gegen VEGF oder VEGF-Rezeptoren sind ebenso berichtet worden (Saleh et al., 1996; Cheng et al., 1996; Ke et al., 1998; Parry et al., 1999).

B. Anti-VEGF-Antikörper

B1. Eine Vielzahl von Antikörpereigenschaften

[0268] Es ist gezeigt worden, daß die Anwendung verschiedener inhibitorischer Verfahren entweder bei der Blockierung von Angiogenese und/oder bei dem Unterdrücken von Tumorwachstum wenigstens zu einem gewissen Grad effektiv ist, indem die VEGF-Signalgebung gestört wird. In der Tat ist gezeigt worden, daß monoklonale Antikörper gegen VEGF das Wachstum von menschlichen Tumor-Xenografts und die Ascites-Bildung in Mäusen inhibieren (Kim et al., 1993; Asano et al., 1995; 1998; Mesiano et al., 1998; Luo et al., 1998a; 1998b; Borgstrom et al., 1996; 1998).

[0269] Der Antikörper A4.6.1 ist ein Anti-VEGF-Antikörper mit hoher Affinität, der in der Lage ist, die VEGF-Bindung an sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 zu blockieren (Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998). Alanin-Scanning-Mutagenese und Röntgenkristallographie von VEGF, gebunden durch das Fab-Fragment von A4.6.1, zeigte, daß das Epitop auf VEGF, an das A4.6.1 bindet, um die Aminosäuren 89–94 zentriert ist. Diese strukturellen Daten zeigen, daß A4.6.1 kompetitiv VEGF an der Bindung an VEGFR2 inhibiert, aber VEGF an der Bindung an VEGFR1 am wahrscheinlichsten durch sterische Hinderung inhibiert (Muller et al., 1998; Keyt et al., 1996).

[0270] A4.6.1 ist der in der Literatur bis heute am weitesten verbreitete verwendete neutralisierende Anti-VEGF-Antikörper. Es ist gezeigt worden, daß er das Wachstum und die VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität einer Vielzahl von menschlichen Tumoren in Mäusen inhibiert (Brem, 1998; Baca et al., 1997; Presta et al., 1997; Mordenti et al., 1999; Borgstrom et al., 1999; Ryan et al., 1999; Lin et al., 1999). A4.6.1 inhibiert ebenso die Ascites-Bildung in einem gut charakterisierten menschlichen Ovarial-Carcinom-Mausmodell und die Tumordissemination in einem neuen Metastasen-Mausmodell. A4.6.1 ist vor kurzem durch monovalente Phagen-display-Techniken humanisiert worden und befindet sich gegenwärtig in klinischen Versuchen der Phase I als ein Antikrebsmittel (Brem, 1998; Baca et al., 1997; Presta et al., 1997).

[0271] Trotz eines gewissen Erfolges auf dem Gebiet mit neutralisierenden Antikörpern gegen VEGF erkannten die gegenwärtigen Erfinder, daß neue Antikörper, insbesondere diejenigen mit einem genauer definierten Modus der Wechselwirkung mit VEGFR1 (FLT-1) und/oder VEGFR2 (KDR/Flk-1) aus einer Vielzahl von Gründen von Vorteil wären. Zum Beispiel würde die Entwicklung von Anti-VEGF-Antikörpern, die selektiv die Wechselwirkung von VEGF mit nur einem der beiden VEGF-Rezeptoren blockieren, eine genauere Sezierung der Pathways ermöglichen, die durch VEGF in Zellen aktiviert werden, die sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 exprimieren.

[0272] Die gegenwärtigen Erfinder glaubten, daß Antikörper mit einer definierten Epitop-Spezifität, die die VEGF-Bindung an nur einen Rezeptor (VEGFR2s) blockierten, sehr wohl klinische Vorteile haben könnten, abhängig natürlich von der Aufrechterhaltung ihrer inhibitorischen Effekte in einer in-vivo-Umgebung. Die Knock-out-Maus-Studien von Hiratsuka et al. (1998) zeigen, daß sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 wichtige biologische Rollen haben. Vor der vorliegenden Erfindung waren realistische Gelegenheiten zur therapeutischen Intervention, die auf das Inhibieren von VEGF-vermittelten Effekten durch nur einen der beiden Rezeptoren abzielten, durch den Mangel an effektiven maßgeschneiderten inhibitorischen Mitteln beeinträchtigt.

[0273] Die gegenwärtigen Erfinder entwickelten zuerst eine Vielzahl von neuen Anti-VEGF-Antikörpern mit verschiedenen Epitop-Spezifitäten und -Eigenschaften. Sechs Gruppen Hybridome, die monoklonale Antikörper gegen den VEGF:Rezeptor (Flk-1)-Komplex oder gegen VEGF selbst sezernieren, werden bereitgestellt. Fünf der Antikörpergruppen stören die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor nicht, während einer diese Wechselwirkung blockierte (2C3-Gruppe) und das VEGF-vermittelte Wachstum von Endothelzellen inhibierte.

[0274] Antikörper der 3E7-, GV39M- und 2C3-Gruppen, von denen sich alle selektiv an den Tumor nach intravenöser Injektion in Mäusen begeben, die humane Tumor-Xenografts tragen, werden gegenwärtig zur Verwendung beim Zielen, der Bildgebung und dem Behandeln von Gefäßen oder Bindegewebe von festen Tumoren bevorzugt.

[0275] Die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung, die den VEGF:Rezeptor-Komplex erkennen, begeben sich selektiv an Tumorendothelzellen nach der Injektion in Mäusen, die humane Tumor-Xenografts tragen. Die monoklonalen Antikörper der 2C3-Gruppe begeben sich in auffälliger Weise an das perivaskuläre Bindegewebe des Tumors und ebenso an die umgebenden Tumorgefäße.

[0276] Die Antikörper, die den N-Terminus erkennen, reagieren mit Rezeptor-gebundenem VEGF über ELISA. GV39M und 11B5 weisen eine hohe Spezifität für Rezeptor-gebundenen VEGF auf, im Gegensatz zu nicht-Rezeptor-gebundenem VEGF. Vermutlich ist das durch GV39M und 11B5 auf dem N-Terminus erkannte Epitop konformationell und wird erzeugt, wenn VEGF an seinen Rezeptor bindet. Die Tatsache, daß die Antikörper beide IgMs und deshalb groß sind, kann für ihre Selektivität gegenüber dem VEGF:Rezeptor-Komplex wichtig sein.

[0277] Die Anti-N-terminalen Antikörper inhibierten nicht das VEGF-vermittelte Endothelzellwachstum. Dies legt nahe, daß der N-Terminus von VEGF nicht bei der Rezeptorwechselwirkung beteiligt ist, und daß Antikörper gegen den N-Terminus von VEGF nicht bei der VEGF-vermittelten Signalgebung stören.

[0278] Im Gegensatz dazu inhibiert 2C3 das VEGF-vermittelte Wachstum von Endothelzellen mit einer IC_{50} von 3 nM. ^{125}I -VEGF-Bindungsstudien unter Verwendung von KDR-exprimierenden Endothelzellen (ABAE-Zellen) zeigten, daß 2C3 VEGF von der Bindung an KDR auf eine konzentrationsabhängige Weise blockiert. Daher ist 2C3 in der Lage, KDR (VEGFR2)-vermittelte VEGF-Aktivität in vitro zu neutralisieren, indem es die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor stört.

[0279] Immunhistochemische Analysen offenbarten, daß GV39M, 11B5, 3E7 und 7G3 mäßig bis stark mit Gefäßendothel reagieren, wenn sie direkt auf die Schnitte aufgebracht werden. GV39M zeigt die höchste Spezifität für Tumorendothelzellen mit vergleichsweise geringer Färbung von Tumorzellen oder Bindegewebe. 11B5, 3E7 und 7G3 färben bevorzugt Endothelzellen bei Auftragung in niedrigen Konzentrationen, färben aber Tumorzellen und Bindegewebe deutlich bei höheren Konzentrationen.

[0280] Das Muster der Färbung, das mit 11B5, 3E7 und 7G3 beobachtet wird, ist typisch für den Typ Färbung, der bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern gegen VEGF gesehen wird, die keine Präferenz für eine besondere Konformation von VEGF haben (Lin-Ke et al., 1996; Plate et al., 1994; Claffey et al., 1996). Die selektive Färbung des Endothels durch GV39M legt nahe, daß er an den VEGF:Rezeptor-Komplex auf diesen Zellen bindet, und ist übereinstimmend mit der Lage der Rezeptoren auf den Endothelzellen und der Tatsache, daß GV39M selektiv an VEGF:sFlk-1 im ELISA bindet.

[0281] In ähnlicher Weise sind die breiteren Färbungsmuster von 3E7 und 7G3 mit ihrer Fähigkeit übereinstimmend, sowohl freien als auch Rezeptor-gebundenen VEGF zu erkennen. Jedoch wurde erwartet, daß 11B5 ein Färbemuster hat, das mehr auf das Endothel beschränkt ist, da er in dem Fänger-ELISA („capture ELISA“) VEGF:Flk-1 stark bevorzugt (siehe Tabelle 2). Es ist möglich, daß 11B5 in der Lage ist, VEGF zu erkennen, das an stromale Bestandteile gebunden ist, was ihm ein breiteres Reaktivitätsmuster auf Tumorschnitten gibt.

[0282] 3E7 und GV39M begeben sich selektiv in vivo an Gefäßendothelzellen von Tumorgewebe, während sich 2C3 an perivaskuläres Bindegewebe von Tumoren begibt, zusätzlich zu dem Endothel. Vierundzwanzig Stunden nach einer i.v.-Injektion in Tumor-tragenden Mäusen war 3E7 auf dem Endothel von keinem Gewebe außer dem Tumor nachweisbar. GV39M ging andererseits auch eine Bindung an Endothelzellen oder Mesangialzellen in den Glomeruli der Niere ein. Der Grund für die Reaktivität von GV39M mit dem Maus-Nieren-Glomerulus ist nicht klar. Es könnte sein, daß der Antikörper an den VEGF:Rezeptor-Komplex auf den normalen Endothelzellen in der Niere bindet (Takahashi et al., 1995). Jedoch haben Lokalisierungsstudien in Meer-schweinchen, die syngene Linie 10-Tumoren tragen, gezeigt, daß GV39M sich an Tumorblutgefäße, aber nicht zu Glomeruli oder Gefäßen in anderen normalen Geweben begibt.

[0283] Die Fähigkeit von 3E7 und GV39M, sich spezifisch zu Tumorendothel zu begeben, ist wahrscheinlich ein Resultat von wenigstens zwei Faktoren. Erstens ist der VEGF:Rezeptor-Komplex auf Tumorblutgefäßen relativ weit verbreitet, da die hypoxische Tumor-Microumgebung die VEGF-Expression durch Tumorzellen und die VEGF-Rezeptorexpression durch Endothelzellen stimuliert. Zweitens sind Tumorblutgefäße permeabler als normale Blutgefäße (Yuan et al., 1996), was dem Antikörper einen größeren Zugang zu dem VEGF:Rezeptor-Komplex erlauben kann, der auf der abluminalen Seite der Gefäße konzentriert zu sein scheint (Lin-Ke et al., 1996; Hong et al., 1995).

[0284] In einer früheren Studie durch Lin-Ke und Kollegen (1996) wurde gefunden, daß polyklonale Kaninchen-Antikörper, die gegen den N-Terminus von Ratten-VEGF gerichtet waren, sich zu Tumorendothelzellen nach Injektion in Mäusen begeben, die TA3/St-Maus-Mammarcarcinom oder MOT-Ovarialcarcinom tragen. Im Gegensatz dazu begab sich ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Ab-618), gerichtet gegen das gesamte VEGF-Protein, nicht spezifisch zu den Endothelzellen in diesen Tumoren oder sonstwo in den Tumoren selbst.

[0285] Auf der Grundlage dieser Resultate schloß Lin-Ke et al. (1996), daß der N-Terminus von VEGF die Fähigkeit hat, Antikörper zu binden, nachdem VEGF mit mikrovaskulärem Endothel assoziiert hat, und daß der Pool an freiem oder nicht-Endothelzell-assoziiertem VEGF nicht ausreicht, um Anti-VEGF-Antikörper, die gegen nicht-N-terminale Epitope gerichtet sind, zu konzentrieren (Lin-Ke et al., 1996). Die vorliegenden Resultate mit 3E7 und GV39M, gerichtet gegen den N-Terminus von VEGF, unterstützen ihre Schlußfolgerungen.

[0286] Jedoch sind die Ergebnisse der vorliegenden Erfindung, daß Antikörper der 2C3-Gruppe, gerichtet gegen ein nicht-N-terminales Epitop auf VEGF, sich sowohl zu den Gefäßen als auch zu dem perivaskulärem Bindegewebe von festen Tumoren in Mäusen begeben, bemerkenswert überraschend gegenüber der Arbeit von Lin-Ke et al. (1996). Die vorliegende Erfindung legt nahe, daß ein „Pool“ von VEGF in dem Tumorstroma vorhanden ist und in der Tat die Konzentrierung von 2C3 in der Tumormasse ermöglicht. Ein solches Tumorstroma-Targeting konnte aus einer Studie der früheren Veröffentlichungen nicht vorhergesagt werden. Die Erfinder erwägen, daß VEGF an Heparansulfatproteoglycane (HSPGs) in dem Tumor binden kann, obwohl ein Verständnis des Wirkmechanismus sicherlich nicht notwendig ist, um die vorliegende Erfindung auszuüben.

[0287] Eine frühe Schlußfolgerung der vorliegenden Erfindung ist es, daß Antikörper der GV39M- und 3E7-Gruppen sich selektiv zu Tumorendothelzellen in Mäuse begeben, während Antikörper der 2C3-Gruppe sich zu Tumorendothelzellen und zu dem perivaskulären Bindegewebe des Tumors begeben. Da die Verteilung von VEGF und seiner Rezeptoren bei der Maus und beim Menschen ähnlich sind, wird erwogen, daß diese Antikörper ähnliche Muster der Lokalisierung bei Krebspatienten zeigen. Daher werden GV39M und 3E7 zur Verwendung bei der Abgabe von therapeutischen oder diagnostischen Mitteln an Tumorgefäße beim Menschen in Erwägung gezogen, während Antikörper der 2C3-Gruppe als Vehikel zum zielgerichteten Einsatz („for targeting“) von therapeutischen oder diagnostischen Mitteln auf Tumorgefäße und Tumorbindegewebe erwogen werden.

B2. VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF- und 2C3-Antikörper

[0288] Weitere Studien an den Antikörpern der 2C3-Gruppe zeigten noch weiter überraschende Eigenschaften, was zu den wirksamen Zusammensetzungen und Verwendungen der vorliegenden Erfindung führte.

[0289] Eine wichtige Entdeckung dieser Erfindung, die unter Verwendung von ELISA, Rezeptorbindungsassays und Rezeptoraktivierungsassays gemacht wurde, ist, daß monoklonale Antikörper der 2C3-Gruppe selektiv die Wechselwirkung von VEGF mit VEGFR2 (KDR/Flk-1), aber nicht mit VEGFR1 (FLT-1) blockieren. 2C3-Antikörper inhibieren die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 und blockieren die VEGF-induzierte Permeabilität, was VEGFR2 als den Rezeptor impliziert, der für die VEGF-induzierte Permeabilität verantwortlich ist. 2C3-Antikörper haben ebenso eine potente Anti-Tumor-Aktivität, indem sie das Wachstum

verschiedener etablierter humaner fester Tumore in auf dem Gebiet akzeptierten Tiermodellen von menschlichem Krebs unterbrechen.

[0290] Diese Entdeckungen zeigen die Nützlichkeit von 2C3 beim Sezieren der Pathways, die durch VEGF in Zellen aktiviert werden, die sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 exprimieren, und unterstreichen die Wichtigkeit der VEGFR2-Aktivität bei dem Prozeß des Tumorwachstums und des Überlebens. Wichtiger stellen sie einen einzigartigen Modus der therapeutischen Intervention bereit, indem sie eine spezifische Inhibition der VEGFR2-induzierten Angiogenese ohne eine einhergehende Inhibition der Macrophagen-Chemotaxis, Osteoclasten- und Chondroclasten-Funktion (vermittelt durch VEGFR1) ermöglichen.

[0291] Die Entdeckungen, betreffend 2C3, stellen somit zum ersten Mal die Motivation und die Mittel bereit, um Anti-VEGF-Antikörper zu machen und zu verwenden, die die VEGF-Bindung nur an VEGFR2 und nicht an VEGFR1 inhibieren. Solche Antikörper, in prägnanter Weise als „VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper“ bezeichnet, stellen einen Fortschritt auf dem Gebiet dar und bieten zahlreiche Vorteile sowohl in Hinblick auf die Verwendung in nicht-konjugierter oder „nackter“ Form, und bei Konjugation an oder in Assoziation mit anderen therapeutischen Mitteln.

[0292] Die in-vitro-Bindungsstudien der vorliegenden Erfindung, die ELISA und Co-Präzipitationsassay mit aufgereinigten Rezeptorproteinen verwenden, zeigten, daß 2C3 die Bindung von VEGF and VEGFR2 blockiert. Überraschenderweise inhibierte 2C3 jedoch nicht die Bindung von VEGF an VEGFR1 in irgendeinem Assaysystem. Um die anfänglichen Ergebnisse zu bestätigen, wurden Bindungs-ELISAs in verschiedenen Konfigurationen wiederholt. In jeder Konfiguration zeigten die Resultate, daß 2C3 nicht die VEGF:VEGFR1 Wechselwirkung stört. Als eine Kontrolle für diese Studie wurde der monoklonale Antikörper 3E7, ein Antikörper, der gegen den NH₂-Terminus des VEGF gerichtet ist, verwendet, der VEGF nicht blockierte, an VEGFR1 oder VEGFR2 zu binden.

[0293] Die 2C3-Gruppe der Antikörper der vorliegenden Erfindung sind somit gegenüber anderen blockierenden Antikörpern auf VEGF, einschließlich A4.6.1, signifikant verbessert. Der A4.6.1-Anti-VEGF-Antikörper blockiert die Bindung von VEGF an beide VEGF-Rezeptoren. Kristallographie- und Mutagenese-Studien haben gezeigt, daß die Bindungs epitope für VEGFR2 und VEGFR1 auf die beiden symmetrischen Pole des VEGF-Dimers konzentriert sind (Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1997). Die Bindungsdeterminanten an VEGF, die mit den beiden Rezeptoren wechselwirken, überlappen teilweise und sind über vier verschiedene Segmente verteilt, die sich über die Dimer-Oberfläche erstrecken (Muller et al., 1998). Antikörper 4.6.1 bindet an eine Region von VEGF innerhalb der Rezeptorbindungsregion von beiden Rezeptoren (Muller et al., 1998). Es wird vorgeschlagen, daß 2C3 an eine Region bindet, die nahe der VEGFR2-Bindungsstelle, aber nicht der VEGFR1-Bindungsstelle liegt.

[0294] Studien über den Effekt von 2C3 auf VEGF-induzierte Phosphorylierung der Rezeptoren zeigten, daß 2C3 die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 blockiert. Dies entspricht ebenso den oben diskutierten Daten und festigt die Rolle von VEGFR2 bei VEGF-induzierter Proliferation.

[0295] Ähnlich zu Resultaten aus anderen Studien konnte eine konsistente VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR1 nicht demonstriert werden (De Vries et al., 1992; Waltenberger et al., 1994; Davis-Smyth et al., 1996; Landgren et al., 1998). Deshalb konnte nicht zuverlässig beurteilt werden, ob 2C3 die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR1 inhibiert. Die geringe Aktivität von VEGF auf die VEGFR1-Phosphorylierung hat andere dazu geführt, vorzuschlagen, daß VEGFR1 möglicherweise kein Signalrezeptor auf Endothelzellen ist, sondern daß er möglicherweise als ein Decoy-Rezeptor fungiert, um VEGF einzufangen und sein Signal über VEGFR2 zu amplifizieren (Hiratsuka et al., 1998). Jedoch ist über eine Tyrosinphosphorylierung von VEGFR1 durch VEGF-Bindung von Kupprion et al. (1998) unter Verwendung von menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) und von Sawano et al. (1996) unter Verwendung von NIH 373-Zellen, die VEGFR1 überexprimieren, berichtet worden. Zusätzlich haben Waltenberger et al. (1994) gezeigt, daß die VEGF-induzierte VEGFR1-Aktivierung unter Verwendung eines in-vitro-Kinase-Assays verfolgt werden kann. Der Effekt von 2C3 auf die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR1, oder ein Mangel davon konnte unter Verwendung von einem der vorhergehenden Zelltypen oder einem in-vitro-Kinase-Assay bestimmt werden.

[0296] Die vorliegenden ELISA-Daten aus [Fig. 2](#) und Zellbindungsdaten demonstrieren, daß 2C3-Antikörper VEGF nicht vollständig blockieren, an Zellen zu binden, die sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 exprimieren. Die Tatsache, daß 2C3 nicht die VEGF-Bindung an VEGFR1 blockiert, bedeutet, daß 2C3-Antikörper effektive Werkzeuge beim Aufklären der Rolle von VEGFR1 bei der Biologie von Endothelzellen und anderen Zelltypen

sein werden.

[0297] Die funktionellen Konsequenzen der Selektivität, die 2C3 beim Blockieren von VEGF von der Aktivierung seiner Rezeptoren zeigt, wurde unter Verwendung des Miles-, Permeabilitätsassay in Meerschweinchen untersucht. Sowohl 2C3 als auch A4.6.1 inhibierte die VEGF-induzierte Permeabilität, wenn der IgG in wenigstens einem 10-fach molaren Überschuß über VEGF war. 3E7- und Kontroll-Antikörper inhibierten nicht die VEGF-induzierte Permeabilität sogar bei einem 1000-fach molaren Überschuß. Diese Resultate zeigen, daß VEGFR2 bei VEGF-induzierter Permeabilität beteiligt ist.

[0298] Dieses Ergebnis stimmt überein mit jüngeren Berichten, daß eine neue Form von VEGF-C und zwei Virus-abgeleitete VEGF-E-Varianten an VEGFR2, aber nicht an VEGFR1 binden, jedoch die Fähigkeit beibehalten, die Gefäßpermeabilität zu verbessern (Joukov et al., 1998; Ogawa et al., 1998; Meyer et al., 1999). Wahrscheinlich vermitteln die verschiedenen Formen von VEGF ihre Signale über VEGFR2, die eine NO-Produktion bewirken, die wiederum das Anwachsen der Gefäßpermeabilität verursacht, (Hood und Granger, 1998; Hood et al., 1998; Kroll und Waltenberger, 1998; Murohara et al., 1998; Kupprion et al., 1998; Sawano et al., 1996; Fujii et al., 1997; Parenti et al., 1998). Dies deutet indirekt auf eine VEGFR2-Beteiligung, da gezeigt worden ist, daß die NO-Erzeugung eine Konsequenz der VEGFR2-Aktivierung ist. Jedoch gibt es ebenso bestimmte Hinweise auf das Gegenteil, da Couper et al. (1997), eine starke Korrelation zwischen erhöhter Gefäßpermeabilität, die durch VEGF induziert ist, und der VEGFR1-Expression in vivo fanden.

[0299] 2C3 inhibierte das Wachstum von vielfachen unterschiedlichen menschlichen Tumortypen in vivo. Der Effekt von 100 µg 2C3, der zweimal/Woche gegeben wurde, war identisch in Mäusen, die subkutane NCI-H358-NSCLC- und A673-Rhabdomyosarcom-Tumore trugen, bei denen er effektiv das Wachstum der Tumore auf ein kleines Knötchen von näherungsweise 150 mm³ Größe beschränkte. Ähnliche Antworten wurden bei anderen Tumormodellen beobachtet, wie etwa HT29 und LS174T, beide menschliche Adenocarcinome des Colon.

[0300] Die Größe der Tumorwachstumsunterdrückung durch 2C3 ist ähnlich derjenigen, die von anderen Forschern unter Verwendung von unterschiedlichen neutralisierenden Anti-VEGF-Antikörpern berichtet wurde (Asano et al., 1998; Mesiano et al., 1998). Ein monoklonaler Ratten-Anti-Maus-VEGFR2-Antikörper blockierte ebenso stark das Wachstum von malignen menschlichen Keratinocyten in Mäusen durch einen anti-angiogenen Mechanismus (Skobe et al., 1997). Die Wirksamkeit von 2C3, die ähnlich zu dem ist, was andere Forscher unter Verwendung von unterschiedlichen Anti-VEGF-Antikörpern gefunden haben, demonstriert weiterhin die Rolle von VEGF in der Tumor-Angiogenese und dem Tumorwachstum. Jedoch sollte 2C3 ein sichereres Therapeutikum bereitstellen, auf der Grundlage der hierin diskutierten spezifischen inhibitorischen Eigenschaften.

[0301] Um den Effekt des Inhibierens der VEGF-Aktivität in einer Umgebung zu analysieren, die den Bedingungen bei Menschen näher wären, wurden Mäuse, die etablierte Tumore hatten, mit 2C3 behandelt. In dieser Umgebung verlangsamte die 2C3-Behandlung signifikant das Wachstum von zwei aggressiven menschlichen Tumoren, A673-Rhabdomyosarcom und LS174T-Colon-Adenocarcinom-Tumore. 2C3-Antikörper bewirkten signifikante Tumorregressionen in Mäusen, die NCI-H358-NSCLC-Tumore trugen.

[0302] Tumore, die mit 2C3 oder A4.6.1 behandelt wurden, gingen auf 30% bzw. 35% ihrer ursprünglichen Größe nach näherungsweise zehn Behandlungswochen zurück. In einer Studie, bei der man sich die Behandlung über 100 Tage hinaus erstrecken ließ, wurden noch signifikantere Regressionen beobachtet. Die Ergebnisse legen nahe, daß VEGF mehr als nur ein Mitosesignal für das Tumorendothel bereitstellt.

[0303] Die Tatsache, daß Regressionen statt Tumor-Stasis beobachtet wurden, legt nahe, daß VEGF mehr als nur ein angiogenes Signal für das Tumorendothel bereitstellt. Benjamin et al. (1999) berichteten vor kurzem, daß Tumore einen großen Bruchteil an unreifen Blutgefäßen enthalten, die noch Kontakt mit Periendothelzellen etablieren müssen, und daß diese Blutgefäße zum Überleben von VEGF abhängen. Es ist möglich, daß die Neutralisierung von VEGF bewirkt, daß diese unreifen Blutgefäße Apoptose durchlaufen, wodurch das existierende Gefäßnetzwerk im Tumor verringert wird. Es ist ebenso möglich, daß ein dynamischer Prozeß des Gefäßremodellierens in Tumoren stattfindet, was sowohl Gefäßbildung als auch Gefäßregression beinhaltet, und daß die Neutralisierung von VEGF die Gefäßbildung verhindert, was zu einer Netto-Verschiebung zu der Gefäßregression führt.

[0304] Das Ergebnis, daß 2C3 das Tumorwachstum ebenso vollständig wie A4.6.1 unterdrückte (wenn nicht sogar noch stärker), deutet auf eine dominante Rolle für VEGFR2 bei der Tumorangiogenese hin. Der vielschrittige Prozeß der Angiogenese erfordert eine Endothelzell-Chemotaxis, Metalloprotease-Produktion, Inva-

sion, Proliferation und Differenzierung. Es kann sein, daß VEGFR1 keine Rolle bei diesen Prozessen hat oder bei den Prozessen dadurch hilft, daß es VEGF bindet und es dem Signalrezeptor, VEGFR2, präsentiert.

[0305] Die vergleichbaren Zahlen für 2C3 und A4.6.1 bei der Tumorbehandlung sind hochrelevant: 2C3 ist geringfügig effektiver als A4.6.1, obwohl es nur an VEGFR2 und nicht an VEGFR1 bindet. Die vorliegenden Studien weisen deshalb darauf hin, daß VEGFR1 keine merkbare Rolle bei der VEGF-vermittelten Tumorangiogenese spielt, und legen weiter nahe, daß VEGFR1-spezifische Inhibitoren die Tumorangiogenese nicht beeinflussen. Diese Resultate bedeuten auch, daß 2C3 in gleicher Weise oder effektiver als A4.6.1 sein kann, wobei es gleichzeitig weniger Nebenwirkungen verursacht.

[0306] Die Fähigkeit, spezifisch die VEGF-Bindung an und die Aktivierung von VEGFR2 zu blockieren, hat eine wichtige Bedeutung in wenigstens zwei Gebieten mit klinischer Relevanz. Als erstes wird geglaubt, daß VEGFR2 (Flt-1) eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen und Monocyten in den Tumor spielt, da diese Zellen VEGFR1 exprimieren und auf VEGF über die VEGFR1-Signalgebung chemotaktisch reagieren (Clauss et al., 1996; Hiratsuka et al., 1998; Akuzawa et al., 2000). Nach der Aktivierung von Makrophagen wird die flt-1-Gentranskription durch eine Induktion von Egr-1 stimuliert, das an überlappende Egr-1/Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in dem humanen flt-1-Promotor bindet, was einen Hinweis darauf bietet, daß das flt-1-Gen ein direktes Ziel von Egr-1 ist, dem Transkriptionsfaktor, der bei der Macrophagendifferenzierung hauptsächlich induziert wird (Akuzawa et al., 2000).

[0307] Um die Aktivierung von Macrophagen aufrechtzuerhalten, die erforderlich ist, um eine starke Anti-Tumor-Antwort zu erzeugen, sollte eine Inhibition der VEGFR1-Signalgebung vermieden werden. Das spezifische Blockieren von VEGFR1, das durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt wird, liefert somit wichtige Vorteile gegenüber A4.6.1 bei der Tumorthherapie, da die Macrophageninfiltration nicht beeinträchtigt werden wird, was es diesen Zellen ermöglicht, Tumorzelltrümmer aus nekrotischen Tumoren zu entfernen und die Tumorschrumpfung zu fördern. Die Verwendung von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern, wie etwa 2C3, wird es ebenso ermöglichen, daß die infiltrierenden Macrophagen zu dem Anti-Tumor-Effekt insgesamt beitragen, indem sie einen direkten cytociden Effekt auf Tumorzellen haben.

[0308] In der Tat stellt die vorliegende Erfindung einzigartig vorteilhafte Mittel zur Verwendung in allen Formen der anti-angiogenen Therapie bereit, aufgrund ihrer Fähigkeit, VEGF-angiogene Aktivität zu blockieren, aber nicht andere vorteilhafte Wirkungen von VEGF zu inhibieren, die durch VEGFR1 vermittelt werden, wie etwa diejenigen auf Immun- und Knochenzellen. Ein zweites Gebiet mit klinischer Wichtigkeit betrifft die Fähigkeit von Antikörpern, die in Übereinstimmung mit dieser Erfindung hergestellt worden sind, in vivo zu funktionieren, ohne die vorteilhaften Effekte von Osteoclasten und Chondroclasten zu inhibieren. Dies bedeutet, daß die Verwendung der vorliegenden VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-Therapeutika, einschließlich 2C3, nicht mit Nebenwirkungen auf Knochen und/oder Knorpel assoziiert sein werden.

[0309] In-vivo-Studien haben gezeigt, daß VEGF die hypertrophe Knorpel-Remodellierung, Ossifikation und Angiogenese während der endochondralen Knochenbildung koppelt und daß VEGF für die Knorpelremodellierung essentiell ist (Gerber et al., 1999). Es wurde gezeigt, daß die Inaktivierung der VEGF-Signalgebung durch VEGFR1 durch Verabreichung des löslichen VEGFR1-Rezeptor-chimeren-Proteins (Flt-(1-3)-IgG) die trabekuläre Knochenbildung und die Expansion der hypertrophen Chondrocytenzone beeinträchtigt, indem die Rekrutierung und/oder Differenzierung von Chondroclasten verringert wird (Gerber et al., 1999).

[0310] Es ist weiterhin gezeigt worden, daß VEGF den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) in Unterstützung der Osteoclastenfunktion in vivo ersetzen kann (Niida et al., 1999). In Studien unter Verwendung von osteopetrotischen Mäusen (op/op) mit einem Defekt in den Osteoclasten, die aus einer Mutation in dem M-CSF-Gen resultiert, ermöglicht eine Injektion von rekombinantem humanem M-CSF (rhM-CSF) eine Osteoclastenrekrutierung und – überleben. In jüngeren Studien wurde gezeigt, daß eine einzelne Injektion von rekombinantem humanem VEGF in ähnlicher Weise die Osteoclastenrekrutierung in op/op-Mäusen induzieren kann (Niida et al., 1999).

[0311] Niida et al. (1999) berichteten, daß, da Osteoclasten überwiegend VEGFR1 exprimieren und die Aktivität von rekombinantem humanem Placenta-Wachstumsfaktor 1 auf die Osteoclastenrekruierung vergleichbar mit der von rhVEGF war, die vorteilhaften Effekte der VEGF-Signalgebung in osteopetrotischen Mäusen (op/op) über den VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1) vermittelt werden. Diese Autoren zeigten weiterhin, daß rhM-CSF-induzierte Osteoclasten starben, nachdem VEGF inhibiert wurde (unter Verwendung eines VEGFR1-Rezeptorchimären-Proteins, VEGFR1/Fc), daß aber solche Effekte durch einhergehende Injektionen von rhM-CSF unterbunden wurden. Osteoclasten, die durch rhM-CSF oder endogenen VEGF unterstützt wur-

den, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der in-vivo-Aktivität (Niida et al., 1999).

[0312] Mutante op/op-Mäuse durchlaufen eine altersbezogene Auflösung an Osteopetrose, begleitet von einem Anwachsen der Osteoclastenzahl. Bei den Studien von Niida et al. (1999) verschwanden die meisten Osteoclasten nach Injektion eines Anti-VEGF-Antikörpers, was demonstriert, daß endogen produzierter VEGF für das Erscheinen von Osteoclasten in den mutanten Mäusen verantwortlich ist. Zusätzlich ersetzte rhVEGF den rhM-CSF bei der Unterstützung von in-vitro-Osteoclasten-Differenzierung. Diese Resultate demonstrieren, daß M-CSF und VEGF überlappende Funktionen beim Unterstützen der Osteoclastenfunktion haben und daß VEGF durch den VEGFR-1-Rezeptor wirkt (Niida et al., 1999).

[0313] Es kann somit gefolgert werden, daß 2C3, der erste der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper der Erfindung VEGF nicht blockiert, an VEGFR1 zu binden und zu aktivieren, aber daß er VEGF blockiert, an VEGFR2 zu binden und zu aktivieren. Die Anti-Tumor-Effekte von einer solchen VEGFR2-Inhibition werden deutlich demonstriert. Diese Resultate zeigen, daß VEGFR2 der VEGFR-Rezeptor ist, der die Permeabilität vermittelt, und unterstreichen seine Rolle bei der Tumorangio-genese. Diese Erfindung validiert deshalb darüber hinaus die VEGF-Inhibition als eine Therapie für die Behandlung von festen Tumoren. Wichtiger, die Erfindung stellt eine Vielzahl von neuen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern bereit, wie etwa diejenigen auf der Grundlage von 2C3, zur therapeutischen Intervention und insbesondere zur Verwendung als sichere und wirksame Arzneien zum Inhibieren von Angiogenese bei Tumoren und anderen Krankheiten.

[0314] Die Vorteile der vorliegenden Erfindung sind nicht auf den Mangel an Nebenwirkungen beschränkt. Obwohl diese wichtige Merkmale sind, die merkbare Vorteile haben werden, insbesondere bei der Behandlung von Kindern und Patienten mit Knochenkrankheiten, haben die Antikörper der Erfindung zahlreiche andere Vorteile.

[0315] Zum Beispiel können Antikörper-Konjugate, basierend auf den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-Antikörpern, dazu verwendet werden, therapeutische Mittel an die Tumorumgebung abzugeben. In der Tat wird hierin gezeigt, daß 2C3-Antikörper an sowohl die Tumorgefäße als auch Tumorstroma nach Verabreichung in vivo binden, aber nicht an die Gefäße oder Bindegewebe in normalen Organen oder Geweben binden. Therapeutische Konstrukte auf der Grundlage der vorliegenden Antikörper haben deshalb den Vorteil, zwei Funktionen innerhalb eines Moleküls zu kombinieren: die anti-angiogenen Eigenschaften des Antikörpers oder Fragments davon und die Eigenschaften des therapeutischen Mittels, das zum Anhängen ausgebildet wurde.

[0316] Da VEGFR2 der Schlüsselrezeptor auf dem Endothel ist, ist das Blockieren der VEGF-Bindung an VEGFR2 für einen anti-angiogenen Effekt wesentlich. Obwohl VEGFR1 auf dem Endothel exprimiert wird, ist er in diesem Kontext nicht-signal-transduzierend oder passiv. Deshalb ist die Unfähigkeit der Antikörper der vorliegenden Erfindung, die VEGF-Bindung an VEGFR1 zu blockieren, ohne Konsequenz auf ihre Wirksamkeit als anti-angiogene und Anti-Tumor-Mittel. In der Tat verbessert die Fähigkeit der vorliegenden Antikörper, an VEGF zu binden und dennoch nicht die VEGF-VEGFR1-Wechselwirkungen wesentlich zu stören, die Arznei-abgabeeigenschaften dieser neuen Antikörper, statt die VEGF-Bindung an VEGFR1 zu inhibieren, was bei den blockierenden Antikörpern nach dem Stand der Technik stattfindet.

[0317] Die vorliegenden Erfinder realisierten, daß blockierende Antikörper immer noch erwartungsgemäß funktionieren würden, um therapeutische Mittel an die Tumorumgebung abzugeben, dadurch daß sie an Tumor-lokaliserten VEGF binden, der nicht an einen Rezeptor gebunden ist. Insbesondere verstanden sie, daß solche Antikörper an VEGF in dem Tumorstroma binden werden und therapeutische Mittel hierzu abgeben werden. Dies stellt ein Arzneireservoir um das Endothel bereit, was cytotoxische oder andere zerstörerische Effekte auf die Gefäßendothelzellen verursacht und einen anti-Tumor-Effekt ausübt.

[0318] Der VEGF, der mit dem Stroma oder Bindegewebe assoziiert ist, wird nicht an einen VEGF-Rezeptor in einem klassischen Sinne, d.h. einen Zelloberflächenrezeptor, gebunden. Statt dessen wird VEGF an einen oder mehrere Bindegewebebestandteile, einschließlich Proteoglycanen, wie etwa Heparansulfat-Proteoglycan, durch eine basische Region von VEGF gebunden. Diese Sequenzen (und die für sie kodierenden Exons) fehlen in VEGF121-Protein (und der zugrundeliegenden DNA), so daß diese Isoform nicht im Stroma in signifikanten Mengen vorliegen sollte. VEGF in dem Tumorstroma wird oft auch als „frei“ bezeichnet, obwohl es sich immer noch innerhalb des Tumors befindet, so daß „frei“ im wesentlichen nicht-Rezeptor-gebunden bedeutet.

[0319] Die Erfinder folgerten weiterhin, daß ein Antikörper, der die VEGF-Bindung an einen, aber nicht beide Rezeptoren blockiert, immer noch in der Lage wäre, therapeutische Mittel an die Tumorumgebung abzugeben,

indem er an Rezeptor-gebundenen VEGF auf den Gefäßen bindet. Dies ist eines der vorteilhaftesten Merkmale der vorliegenden Erfindung. Nämlich die Bereitstellung von Antikörpern, die die VEGF-Bindung an VEGFR2 blockieren und daher das angiogene Signal von VEGF inhibieren, die aber nicht die VEGF-Bindung an VEGFR1 blockieren. Zusätzlich zur Verringerung von systemischen Nebenwirkungen durch Aufrechterhaltung der VEGF-Signalgebung über VEGFR1 in anderen Zelltypen und Geweben sind diese Antikörper in der Lage, sich an den VEGF-VEGFR1-Komplex auf Tumorgefäßen zu begeben und therapeutische Mittel direkt daran abzugeben.

[0320] Sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 sind auf Tumorendothelzellen hochreguliert, im Gegensatz zu Endothelzellen in normalen Geweben. VEGFR1 ist auf Tumorgefäßendothel stark exprimiert, was die Targeting-Aspekte der vorliegenden Erfindung besonders effektiv macht. In der Tat wird VEGFR1, obwohl „nicht-signalgebend“ im Endothel, zumindest auf denselben Niveaus wie VEGFR2 exprimiert, wenn nicht auf höheren Niveaus. Ein Faktor, der diesem Phänomen zugrunde liegt, ist, daß VEGFR1 in Antwort sowohl auf Hypoxie als auch auf VEGF hochreguliert ist, während VEGFR2 nur in Antwort auf VEGF hochreguliert ist und durch Hypoxie nicht beeinflusst wird.

[0321] Obwohl die Rolle von VEGFR1 auf dem Endothel ungewiß bleibt, kann VEGFR1 als ein Decoy-Rezeptor fungieren, um VEGF „einzufangen“ und den Liganden auf den Signalrezeptor, VEGFR2, weiterzugeben. Damit dies richtig ist, würde man erwarten, daß der Decoy-Rezeptor eine höhere Affinität für VEGF als der signalgebende Rezeptor hat, was in der Tat der Fall ist. Im Lichte hiervon und vielleicht auch aufgrund von verstärktem Expressionsniveaus sind die VEGFR2-blockierenden, nicht-VEGFR1-blockierenden Antikörper dieser Erfindung ideale Abgabemittel zur Tumorbehandlung. Therapeutische Konjugate dieser Antikörper sind in der Lage, simultan die Angiogenese durch VEGFR2 zu inhibieren und die existierenden Gefäße durch Abgabe eines therapeutischen Mittels an den VEGF-VEGFR1-Rezeptor-Komplex zu zerstören.

[0322] Die Erfinder sind in keinem Fall auf die vorhergehenden wissenschaftlichen Begründungen als eine Erklärung für die vorteilhaften anti-angiogenen und Tumor-lokalisierenden Eigenschaften der vorliegenden Antikörper beschränkt. Obwohl die Nützlichkeit der Erfindung selbsterklärend ist und keine zugrundeliegende Theorie benötigt, um in die Praxis umgesetzt zu werden, haben die Erfinder alternative Mechanismen in Erwägung gezogen, aufgrund deren sich VEGFR2-blockierenden, nicht-VEGFR1-blockierenden Antikörper in effektiver Weise und spezifisch zu Tumorgefäßen begeben können.

[0323] Solche Antikörper könnten an VEGF binden, das mit Npn-1 oder einem anderen, noch nicht charakterisierten VEGF-Bindungsprotein auf der Zelloberfläche assoziiert ist, oder könnten an VEGF binden, der an Heparansulfatproteoglycane auf der Oberfläche von Endothelzellen gebunden ist. Die Antikörperlokalisierung könnte ebenso durch die Bindung an ein anderes Mitglied der VEGF-Proteinfamilie verstärkt werden, d.h. VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, die mit den Blutgefäßen assoziiert sind, obwohl dies weniger wahrscheinlich ist.

[0324] Eine andere vorteilhafte Eigenschaft der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-Antikörper der Erfindung ist, daß diese Antikörper das Überlebenssignal oder den „Schutzeffekt“ von VEGF neutralisieren, der durch VEGFR2 vermittelt wird. Zusätzlich dazu, daß die Antikörper selbst effektiver gemacht werden, macht diese Eigenschaft sie besonders nützlich in Kombination mit anderen Mitteln, die durch die VEGF-Überlebensfunktion beeinträchtigt werden.

[0325] Zum Beispiel schützt VEGF das Endothel vor Radiotherapie. Deshalb sind sowohl die nackten Antikörper als auch die Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung ideal zur Verwendung in Kombination mit Radiotherapie. Noch mehr Vorteile werden durch die Verwendung eines solchen Antikörpers, angehängt an ein radiotherapeutisches Mittel, bereitgestellt. Dieser Typ von Konstrukt hätte die dreifachen Vorteile von: (1) Ausüben eines anti-angiogenen Effekts durch den Antikörperteil; (2) Ausüben eines Tumorgefäß-zerstörerischen Effekts durch die Abgabe des radiotherapeutischen Mittels; und (3) Verhinderung des typischen VEGF-Überlebenssignals, den Effekten des radiotherapeutischen Mittels entgegenzuwirken.

[0326] Andere Konstrukte mit ähnlichen synergistischen Effekten sind VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper in Assoziation mit Anti-Tubulin-Arzneien oder Prodrugs, Anti-Apoptose-Mittel und anderen anti-angiogenen Mitteln. Die Wirkungen von Mitteln oder Arzneien, die Apoptose verursachen, werden durch VEGF antagonisiert. Die vorliegende Erfindung verbessert deshalb die Wirksamkeit von solchen Mitteln durch Neutralisieren von VEGF. Die VEGF-Überlebenssignale wirken ebenso Endostatin entgegen, was diese Therapie beschränkt. Deshalb werden in kombinierter Verwendung mit Endostatin die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-Antikörper der Erfindung VEGF neutralisieren und die Anti-Tumor-Effekte von Endostatin amplifizieren. 2C3- oder andere VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper können ebenso verwendet wer-

den, um spezifisch Kollagenase an den Tumor abzugeben, wo die Kollagenase Endostatin in situ erzeugen wird, das ähnliche Vorteile erzielt.

[0327] In allen solchen verstärkten oder synergistischen Kombinationen können die Antikörper und andere Mittel separat verabreicht werden, oder die zweiten Mittel können an die Antikörper zur spezifischen Abgabe (d.h. zielgerichteten Abgabe an VEGFR1) geknüpft werden. In Kombination mit Endostatin werden chemische Konjugate oder rekombinante Fusionsproteine bevorzugt sein, da diese der kurzen Halbwertszeit von Endostatin entgegenwirken werden, was gegenwärtig eine Beschränkung einer potentiellen Endostatintherapie ist. Kombinationen mit oder zielgerichtete Formen von Gewebeplasminogenaktivator (tPA) können ebenso verwendet werden.

[0328] Weitere Vorteile der Therapeutika der vorliegenden Erfindung schließen die Fähigkeit ein, den Interstitialdruck zu senken. Da die VEGF-vermittelte erhöhte Permeabilität zu dem Interstitialdruck beiträgt, wird eine reduzierte Signalgebung über VEGFR2 sowohl die Permeabilität als auch den Interstitialdruck reduzieren. Dies wiederum wird die Barriere gegenüber Arzneien reduzieren, die durch die Gesamtheit des Tumorgewebes durchqueren, so daß Tumorzellen, die von den Gefäßen entfernt liegen, getötet werden können. Eine verlängerte Therapie kann ebenso erzielt werden, da die vorliegenden Zusammensetzungen keine, eine vernachlässigbare oder geringe Immungenität haben werden.

B3. 2C3 Antikörper-CDR-Sequenzen

[0329] Der Begriff „variabel“, wie hierin in Bezug auf Antikörper verwendet, bedeutet, daß bestimmte Teile der variablen Domänen sich weitreichend hinsichtlich der Sequenz unter den Antikörpern unterscheiden und bei der Bindung und Spezifität von jedem bestimmten Antikörper an sein bestimmtes Antigen verwendet werden. Jedoch ist die Variabilität nicht in gleichmäßiger Weise durch die variablen Domänen der Antikörper verteilt. Sie ist in drei Segmenten konzentriert, die als „hypervariable Regionen“ bezeichnet werden, sowohl in den leichtkettigen als auch den schwerkettigen variablen Domänen.

[0330] Die stärker konservierten Teile der variablen Domänen werden Framework-Region genannt (FR). Die variablen Domänen der nativen schweren und leichten Ketten umfassen jede vier FRs (FR1, FR2, FR3 bzw. FR4), die weitgehend eine β -Faltblatt-Konfiguration annehmen, die durch drei hypervariable Regionen verbunden sind, welche verbindende Schleifen bilden und in einigen Fällen Teil der β -Faltblatt-Struktur bilden.

[0331] Die hypervariablen Regionen in jeder Kette werden zusammen in enger Nachbarschaft durch die FRs gehalten und tragen mit den hypervariablen Regionen von der anderen Kette zur Bildung der Antigen-Bindungsstelle der Antikörper bei (Kabat et al., 1991). Die konstanten Domänen sind nicht direkt bei der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen beteiligt, weisen aber verschiedene Effektorfunktionen auf, wie etwa die Teilnahme des Antikörpers bei der Antikörper-abhängigen zellulären Toxizität.

[0332] Der Begriff „hypervariable Region“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Aminosäurereste eines Antikörpers, die für die Antigen-Bindung verantwortlich sind. Die hypervariable Region umfaßt Aminosäurereste von einer „Komplementaritäts-bestimmenden Region“ oder „CDR“ (d.h. Reste 24–34 (L1), 50–56 (L2) und 89–97 (L3) in der leichtkettigen variablen Domäne und 31–35 (H1), 50–56 (H2) und 95–102 (H3) in der schwerkettigen variablen Domäne; Kabat et al., 1991), und/oder diejenigen Reste aus einer „hypervariablen Schleife“ („Loop“, (d.h. Reste 26–32 (L1), 50–52 (L2) und 91–96 (L3) in der leichtkettigen variablen Domäne und 26–32 (H1), 53–55 (H2) und 96–101 (H3) in der schwerkettigen variablen Domäne). „Framework“- oder „FR“-Reste sind diejenigen variablen Domänenreste, die nicht die Reste aus der hypervariablen Region, wie hierin definiert, sind.

[0333] Die DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Vh- und Vk-Ketten des 2C3-ScFv-Fragments werden hier als SEQ ID NO: 6, 7, 8 und 9 bereitgestellt. Diese Sequenzen umfassen CDR1-3 der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten des Antikörpers.

[0334] Wie hierin beschrieben (Abschnitt C3), können mit der Bereitstellung der strukturellen und funktionellen Informationen für ein biologisches Molekül eine Vielzahl von äquivalenten oder sogar verbesserten Molekülen erzeugt werden. Dies betrifft die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper der vorliegenden Erfindung, wie beispielhaft veranschaulicht durch die 2C3-Antikörper. Obwohl die Antigen-bindenden anderen funktionellen Eigenschaften eines Antikörpers konserviert werden müssen, gibt es ein extrem hohes Ausmaß an Geschicklichkeit auf dem Gebiet, äquivalente und sogar verbesserte Antikörper herzustellen, wenn erst einmal ein Bezugsantikörper bereitgestellt worden ist. Solche technischen Fertigkeiten können im Lichte der hierin be-

reitgestellten Sequenzen und Informationen auf die Erzeugung von weiteren Antikörpern angewendet werden, die gleiche, verbesserte oder anderweitig wünschenswerte Eigenschaften haben.

[0335] Für äquivalente Antikörper können bestimmte Aminosäuren gegen andere Aminosäuren in den konstanten oder variablen Domän-Framework-Regionen des Antikörpers substituiert werden, ohne merkbareren Verlust einer interaktiven Bindungsfähigkeit. Es wird bevorzugt, daß solche Veränderungen an den DNA-Sequenzen durchgeführt werden, die für die Antikörperteile kodieren, und daß die Veränderungen in ihrer Natur konservativ sind (siehe Abschnitt C3, die Codon-Information in Tabelle A und unterstützende technische Einzelheiten über ortsspezifische Mutagenese). Natürlich gibt es eine Grenze im Hinblick auf die Anzahl an Veränderungen, die gemacht werden sollten, aber dies wird Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sein.

[0336] Andere Typen von Varianten sind Antikörper mit verbesserten biologischen Eigenschaften relativ zu dem Eltern-Antikörper, aus dem sie erzeugt werden. Solche Varianten oder Verbindungen der zweiten Generation sind typischerweise Substitutionsvarianten, die einen oder mehrere substituierte Reste in der hypervariablen Region eines Eltern-Antikörpers beinhalten. Ein bequemer Weg zum Erzeugen von solchen Substitutionsvarianten ist die Affinitätsreifung unter Verwendung von Pagen-Display.

[0337] Bei der Affinitätsreifung unter Verwendung von Phagen-Display werden mehrere hypervariable Regionsstellen (z.B. 6-7-Stellen) mutiert, um alle möglichen Aminosubstitutionen an jeder Stelle zu erzeugen. Die so erzeugten Antikörpervarianten werden auf eine monovalente Weise aus filamentösen Phagenpartikeln als Fusionen an das Gen-III-Produkt von M13, verpackt innerhalb jedes Partikels, ausgestellt („displayed“). Die Phagen-ausgestellten Varianten werden dann auf ihre biologische Aktivität überprüft (z.B. Bindungsaffinität), wie hierin offenbart. Um Kandidatenstellen der hypervariablen Region zur Modifizierung zu identifizieren, kann eine Alanin-Scanning-Mutagenese durchgeführt werden, um Reste in der hypervariablen Region zu identifizieren, die signifikant zur Antigen-Bindung beitragen.

[0338] Alternativ oder zusätzlich wird in Erwägung gezogen, daß die Kristallstruktur des Antigen-Antikörper-Komplexes aufgeklärt und analysiert wird, um Kontaktpunkte zwischen dem Antikörper und VEGF zu identifizieren. Solche Kontaktreste und benachbarte Reste sind Kandidaten für die Substitution. Wenn solche Varianten erzeugt worden sind, wird die Gruppe von Varianten einem Screening unterzogen, wie hierin beschrieben, und es werden Antikörper mit analogen, aber verschiedenen oder sogar besseren Eigenschaften in einem oder mehreren relevanten Assays zur weiteren Entwicklung ausgewählt.

[0339] Weitere Aspekte der Erfindung betreffen deshalb isolierte DNA-Segmente und rekombinante Vektoren, die für CDR-Regionen von schweren und leichten Ketten von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern kodieren, wie etwa die schweren und leichten Ketten von 2C3, sowie die Erzeugung und die Verwendung von rekombinanten Wirtszellen durch die Anwendung von DNA-Technologie, die solche CDR-Regionen exprimieren.

[0340] Die vorliegende Erfindung betrifft daher DNA-Segmente, die von jedem Säugetier, bevorzugt einem menschlichen oder murinen Säugetier isoliert werden können, die frei von gesamter genomischer DNA sind und in der Lage sind, CDR-Regionen von schweren und leichten Ketten von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern zu exprimieren, wie etwa von schweren und leichten Ketten von 2C3. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „DNA-Segment“ auf ein DNA-Molekül, das von der gesamten genomischen DNA einer einzelnen Spezies frei isoliert worden ist. Eingeschlossen in den Begriff „DNA-Segment“ sind DNA-Segmente und kleinere Fragmente von solchen Segmenten, und ebenso rekombinante Vektoren, einschließlich z.B. Plasmiden, Cosmiden, Phagen, Viren und ähnlichem.

[0341] In ähnlicher Weise bezieht sich ein DNA-Segment, umfassend ein kodierendes Segment oder einen isolierten Genteil, der für aufgereinigte CDR-Regionen von schweren und leichten Ketten von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern kodiert, wie etwa schweren und leichten Ketten von 2C3, auf ein DNA-Segment, einschließlich solcher kodierenden Sequenzen und, unter bestimmten Gesichtspunkten, regulatorischen Sequenzen, die im wesentlichen von anderen natürlich vorkommenden Genen oder Protein-kodierenden Sequenzen isoliert worden sind. In dieser Hinsicht wird der Begriff „Gen“ aus Einfachheitsgründen so verwendet, daß er sich auf ein funktionelles Protein, Polypeptid oder eine Peptid-kodierende Einheit bezieht. Wie von Fachleuten verstanden werden wird, schließt dieser funktionelle Begriff die nativen Antikörper-kodierenden Sequenzen und kleinere gentechnisch hergestellte Segmente ein, die geeignete Antigen-bindende Proteine, Polypeptide oder Peptide exprimieren oder dazu angepaßt werden können, diese zu exprimieren.

[0342] „Isoliert von anderen kodierenden Sequenzen“ bedeutet, daß das kodierende Segment oder der iso-

lierte Genteil von Interesse den signifikanten Teil der kodierenden Region des DNA-Segments bildet, und daß das DNA-Segment keine großen Teile von natürlich vorkommender DNA enthält, wie etwa große chromosomale Fragmente oder andere funktionelle Gene oder cDNA-kodierende Regionen. Natürlich bezieht sich dies auf das DNA-Segment, wie ursprünglich isoliert, und schließt nicht Gene oder kodierende Regionen aus, die später zu dem Segment von Menschenhand zugefügt werden.

[0343] In besonderen Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte kodierende Segmente oder isolierte Genteile und rekombinante Vektoren, die DNA-Sequenzen eingebaut haben, die für CDR-Regionen von schweren und leichten Ketten von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern, wie etwa schweren und leichten Ketten von 2C3, kodieren, die wenigstens eine erste Sequenzregion umfassen, die eine Aminosäuresequenzregion von wenigstens ungefähr 75%, bevorzugter wenigstens ungefähr 80%, bevorzugter wenigstens ungefähr 85%, bevorzugter wenigstens ungefähr 90% und am bevorzugtesten wenigstens ungefähr 95% oder ähnliches an Aminosäuresequenzidentität zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:9 einschließt, wobei besagte CDR-Regionen wenigstens im wesentlichen die biologischen Eigenschaften der CDR-Regionen der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:9 beibehalten.

[0344] Wie hierin offenbart, können die Sequenzen bestimmte biologisch funktionelle äquivalente Aminosäuren oder „konservative Substitutionen“ umfassen. Andere Sequenzen können funktionell nicht-äquivalente Aminosäuren oder „nicht-konservative Substitutionen“ umfassen, die absichtlich gentechnisch konstruiert worden sind, um die Eigenschaften der CDR oder des Antikörpers zu verbessern, der die CDR enthält, wie Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und hierin weiter beschrieben ist.

[0345] Es wird ebenso verstanden werden, daß Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen zusätzliche Reste einschließen können, wie etwa zusätzliche N- oder C-terminale Aminosäuren oder 5'- oder 3'-Sequenzen, und immer noch einer Sequenz der Erfindung entsprechen, solange wie die Sequenz die oben dargestellten Kriterien erfüllt, bevorzugt einschließlich der Aufrechterhaltung oder Verbesserung von biologischer Proteinaktivität, wenn die Proteinexpression betroffen ist. Die Hinzufügung von terminalen Sequenzen schließt verschiedene nicht-kodierende Sequenzen, die beide der 5'- oder 3'-Teile der kodierenden Region flankieren, sowie auch Kontrollregionen ein.

[0346] Die Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung können somit mit anderen DNA-Sequenzen kombiniert werden, wie etwa Promotoren, Polyadenylierungssignalen, zusätzlichen Restriktionsenzymstellen, vielfachen Klonierungsstellen, anderen kodierenden Segmenten und ähnlichem, so daß ihre Gesamtlänge beträchtlich variieren kann. Es wird deshalb in Erwägung gezogen, daß ein Nukleinsäurefragment von beinahe jeder beliebigen Länge verwendet werden kann, wobei die Gesamtlänge bevorzugt durch die Leichtigkeit der Herstellung und Verwendung bei dem beabsichtigten rekombinanten DNA-Protokoll begrenzt ist.

[0347] Rekombinante Vektoren bilden deshalb weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung. Als besonders nützliche Vektoren werden diejenigen Vektoren angesehen, bei denen der kodierende Teil des DNA-Segments unter die Kontrolle eines Promoters positioniert wird. Im allgemeinen wird, obwohl nicht ausschließlich, ein rekombinanter oder heterologer Promoter verwendet werden, d.h. ein Promoter, der normalerweise nicht mit kodierenden Sequenzen in ihrer natürlichen Umgebung assoziiert ist. Solche Promotoren können bakterielle, virale, eukaryotische und Säugetier-Promotoren einschließen, solange, wie der Promoter in wirksamer Weise die Expression des DNA-Segments in dem Zelltyp, Organismus oder sogar Tier, das zur Expression ausgewählt worden ist, in effektiver Weise steuert.

[0348] Die Verwendung von Promoter-und-Zelltyp-Kombinationen zur Proteinexpression ist Fachleuten auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt. Die verwendeten Promotoren können konstitutiv oder induzierbar sein und können unter den geeigneten Bedingungen verwendet werden, um eine Expression des eingeführten DNA-Segments auf hohem Niveau zu steuern, wie es bei der Erzeugung von rekombinanten Proteinen oder Peptiden auf großem Maßstab vorteilhaft ist.

[0349] Die Expression der Nukleinsäuresequenzen der Erfindung kann in bequemer Weise durch eine beliebige oder mehrere Standardtechniken erreicht werden, die Fachleuten bekannt und hierin weiter beschrieben ist. Zum Beispiel kann die spätere Beschreibung der rekombinanten Expression von Fusionsproteinen in gleicher Weise gut auf Antikörper und Antikörperfragmente angewandt werden, die nicht operativ mit einer anderen kodierenden Sequenz auf dem Nukleinsäureniveau assoziiert sind.

B4. Polyklonale Antikörper

[0350] Mittel zum Herstellen und Charakterisieren von Antikörpern sind auf dem Gebiet wohlbekannt (siehe z.B. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Um polyklonale Antiseren herzustellen, wird ein Tier mit einer immunogenen VEGF-Zusammensetzung immunisiert, und es werden Antiseren aus diesem immunisierten Tier gesammelt. Eine große Vielzahl von Tierarten können zur Herstellung von Antiseren verwendet werden. Typischerweise ist das zur Herstellung von Anti-Antiseren verwendete Tier ein Kaninchen, Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen oder Ziege. Wegen des relativ großen Blutvolumens von Kaninchen ist ein Kaninchen eine bevorzugte Wahl zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern.

[0351] Die bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendete Menge der VEGF-Immunogen-Zusammensetzung variiert in Abhängigkeit von der Natur des Immunogens ebenso wie des Tiers, das zur Immunisierung verwendet wird. Eine Vielzahl von Routen kann verwendet werden, um das vorliegende VEGF-Immunogen zu verabreichen; subcutan, intramuskulär, intradermal, intravenös, intraperitoneal und intrasplenisch. Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern kann durch Entnehmen von Blut aus dem immunisierten Tier zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung überwacht werden. Eine zweite, Booster-Injektion kann ebenso gegeben werden. Der Prozeß des Boosting und Titrierens wird wiederholt, bis ein geeigneter Titer erzielt wird. Wenn ein erwünschter Titerlevel erhalten wird, kann das immunisierte Tier ausgeblutet werden und das Serum isoliert und gelagert werden. Das Tier kann ebenso verwendet werden, um monoklonale Antikörper zu erzeugen.

[0352] Wie auf dem Gebiet wohlbekannt ist, kann die Immunogenität einer individuellen Zusammensetzung durch die Verwendung von nicht-spezifischen Stimulatoren der Immunantwort, bekannt als Adjuvantien, verbessert werden. Beispielhafte Adjuvantien schließen vollständiges Freund'sches Adjuvans, einen nicht-spezifischen Stimulator der Immunantwort, enthaltend abgetötetes *Mycobacterium Tuberculosis*, unvollständiges Freund'sches Adjuvans und Aluminiumhydroxyd-Adjuvans ein.

[0353] Es kann ebenso wünschenswert sein, das Immunsystem des Wirt zu boosten, was erzielt werden kann durch Assoziieren von VEGF mit einem Träger oder das Koppeln von VEGF an einen Träger. Beispielhafte Träger sind Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) und bovines Serumalbumin (BSA). Andere Albumine, wie etwa Ovalbumin, Maus-Serum-Albumin oder Kaninchen-Serum-Albumin können ebenso als Träger verwendet werden. Wie ebenfalls auf dem Gebiet bekannt ist, kann eine gegebene Zusammensetzung in ihrer Immunogenität variieren. Jedoch ist die Erzeugung von Antikörpern gegen VEGF nicht besonders schwierig.

B5. Monoklonale Antikörper

[0354] Verschiedene Verfahren zum Erzeugen von monoklonalen Antikörpern (MAbs) sind ebenso jetzt auf dem Gebiet sehr gut bekannt. Die meisten Standardtechniken zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern beginnen im allgemeinen gemäß demselben Prinzip wie dem zum Herstellen von polyklonalen Antikörpern (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Eine polyklonale Antikörperantwort wird durch Immunisieren eines Tieres mit einer immunogenen VEGF-Zusammensetzung initiiert, und, wenn ein erwünschter Titerlevel erhalten wird, kann das immunisierte Tier verwendet werden, um MAbs zu erzeugen.

[0355] MAbs können in leichter Weise durch Verwendung von gut bekannten Techniken hergestellt werden, wie etwa diejenigen, die in US-Patent Nr. 4,196,265 beispielhaft veranschaulicht sind. Typischerweise beinhaltet diese Technik das Immunisieren eines geeigneten Tieres mit der ausgewählten VEGF-Immunogen-Zusammensetzung. Die immunisierende Zusammensetzung wird auf eine Weise verabreicht, die effektiv ist, um Antikörper-erzeugende Zellen zu stimulieren. Nagetiere, wie etwa Mäuse und Ratten, sind bevorzugte Tiere, jedoch ist die Verwendung von Kaninchen-, Schaf- und Froschzellen ebenso möglich. Die Verwendung von Ratten kann bestimmte Vorteile bieten (Goding, 1986, S. 60–61), aber Mäuse werden bevorzugt, wobei die BALB/c-Maus am bevorzugtesten ist, da diese am routinemäßigsten verwendet wird und im allgemeinen einen höheren prozentualen Anteil an stabilen Fusionen ergibt.

[0356] Nach der Immunisierung werden somatische Zellen mit dem Potential zum Erzeugen von VEGF-Antikörpern, insbesondere B-Lymphocyten (B-Zellen), zur Verwendung in dem Protokoll zum Erzeugen von mAb ausgewählt. Diese Zellen können aus biopsierten Milzen, Mandeln oder Lymphknoten oder aus einer peripheren Blutprobe erhalten werden. Milzzellen und periphere Blutzellen werden bevorzugt, die ersteren, weil sie eine reiche Quelle an Antikörpererzeugenden Zellen sind, die sich in dem sich teilenden Plasmablasten-Stadium befinden, und die letzteren, weil peripheres Blut leicht zugänglich ist. Oft wird eine Reihe von Tieren immunisiert worden sein, und die Milz des Tieres mit dem höchsten Antikörpertiter wird entnommen und die Milz-

lymphocyten durch Homogenisieren der Milz mit einer Spritze erhalten. Typischerweise enthält eine Milz aus einer immunisierten Maus näherungsweise 5×10^7 bis 2×10^8 Lymphocyten.

[0357] Die Anti-VEGF-Antikörper-erzeugenden B-Lymphocyten aus dem immunisierten Tier werden dann mit Zellen einer unsterblichen Myelom-Zelle fusioniert, im allgemeinen eine von derselben Art wie das Tier, das immunisiert wurde. Myelom-Zelllinien, die zur Verwendung in Hybridom-erzeugenden Fusionsprozeduren geeignet sind, sind bevorzugt nicht-Antikörperproduzierend, haben eine hohe Fusions-effizienz und Enzymdefekte, die sie unfähig macht, in bestimmten selektiven Medien zu wachsen, die nur das Wachstum der erwünschten fusionierten Zellen (Hybridome) unterstützen.

[0358] Eine aus einer Vielzahl von Myelom-Zellen können verwendet werden, wie sie Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind (Goding S. 65–66, 1986; Campbell, S. 75–83, 1984). Zum Beispiel, wenn das immunisierte Tier eine Maus ist, kann man P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 41, Sp210-Ag14, Fo, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 und 5194/5XX0 Bul verwenden; für Ratten kann man R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F, 4B210 oder eine der oben aufgelisteten Maus-Zelllinien verwenden; und U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 und UC729-6 sind alle im Zusammenhang mit humanen Zellfusionen nützlich.

[0359] Verfahren zum Erzeugen von Hybriden von Antikörper-erzeugenden Milz- oder Lymphknotenzellen und Myelom-Zellen umfassen gewöhnlich das Mischen von somatischen Zellen mit Myelom-Zellen in einem 4:1-Verhältnis, obwohl das Verhältnis von ungefähr 20:1 bis ungefähr 1:1 jeweils variieren kann, in der Anwesenheit von einem Mittel oder Mitteln (chemisch oder elektrisch), die die Fusion von Zellmembranen fördern. Fusionsverfahren unter Verwendung von Sendai-Virus sind von Kohler und Milstein beschrieben worden (1975; 1976), und diejenigen unter Verwendung von Polyethylenglycol (PEG), wie etwa 37% (v/v) PEG, von Geffer et al. (1977). Die Verwendung von elektrisch induzierten Fusionsverfahren ist ebenso geeignet (Goding S. 71–74, 1986).

[0360] Fusionsprozeduren erzeugen gewöhnlich lebensfähige Hybride in niedrigen Frequenzen, ungefähr 1×10^{-6} bis 1×10^{-8} . Jedoch stellt dies kein Problem dar, da die lebensfähigen, fusionierten Hybride von den nicht-fusionierten Elternzellen (insbesondere den nicht-fusionierten Myelom-Zellen, die sich normalerweise unendlich weiter teilen würden) durch das Kultivieren in einem selektiven Medium differenziert werden. Das selektive Medium ist im allgemeinen eines, das ein Mittel enthält, das die de-novo-Synthese von Nucleotiden in dem Gewebekulturmedium blockiert. Beispielhafte und bevorzugte Mittel sind Aminopterin, Methotrexat und Azaserin. Aminopterin und Methotrexat blocken die de-novo-Synthese von sowohl Purinen als auch Pyrimidinen, während Azaserin nur die Purinsynthese blockiert. Wo Aminopterin oder Methotrexat verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin als eine Nucleotidquelle supplementiert (HAT-Medium). Wenn Azaserin verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin supplementiert.

[0361] Das bevorzugte Selektionsmedium ist HAT. Nur Zellen, die in der Lage sind, Salvage-Wege („Salvage Pathways“) zu betreiben, sind in der Lage, in HAT-Medium zu überleben. Die Myelom-Zellen sind im Hinblick auf Schlüsselenzyme des Salvage-Wegs defizient, z.B. Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), und sie können nicht überleben. Die B-Zellen können diesen Weg betreiben, aber sie haben eine begrenzte Lebensspanne in Kultur und sterben im allgemeinen innerhalb von ungefähr zwei Wochen. Deshalb sind die einzigen Zellen, die in den selektiven Medien überleben können, diejenigen Hybride, die aus Myelom- und B-Zellen gebildet werden.

[0362] Diese Kultivierung stellt eine Population von Hybridomen bereit, aus denen spezifische Hybridome ausgewählt werden. Typischerweise wird die Selektion von Hybridomen durch Kultivieren der Zellen mittels Einzelklon-Verdünnung in Mikrotiterplatten durchgeführt, gefolgt vom Testen der individuellen klonalen Überstände (nach ungefähr zwei bis drei Wochen) auf die gewünschte Anti-VEGF-Reaktivität. Der Assay sollte empfindlich, einfach und rasch sein, wie etwa Radioimmunoassays, Enzym-Immunoassays, Cytotoxizitätsassays, Plaque-Assays, Dot-Immunoassays und ähnliche.

[0363] Die ausgewählten Hybridome würden dann seriell verdünnt und in einzelne Anti-VEGF-Antikörper-erzeugende Zelllinien kloniert, wobei die Klone dann unendlich propagiert werden können, um MAbs bereitzustellen. Die Zelllinien können für die mAb-Produktion auf zwei grundlegende Weisen ausgebeutet werden. Eine Probe des Hybridoms kann in ein histokompatibles Tier des Typs injiziert werden (oft in die Peritonealhöhle), das verwendet wurde, um die somatischen und Myelomzellen für die ursprüngliche Fusion bereitzustellen. Das injizierte Tier entwickelt Tumore, die den spezifischen monoklonalen Antikörper sezernieren, der durch den fusionierten Zellhybrid erzeugt wird. Die Körperflüssigkeiten des Tieres, wie etwa Serum oder Ascites-Flüssigkeit, kann dann abgenommen werden, um MAbs in hoher Konzentration bereitzustellen. Die einzelnen Zellini-

en könnten ebenso in vitro kultiviert werden, wenn die MAbs natürlicherweise in das Kulturmedium sezerniert werden, aus dem sie in leichter Weise in hohen Konzentrationen erhalten werden können.

[0364] MAbs, die mit einem der beiden Mittel erzeugt worden sind, werden im allgemeinen weiter aufgereinigt, z.B. unter Verwendung von Filtration, Zentrifugation und verschiedenen chromatographischen Verfahren, wie etwa HPLC oder Affinitätschromatographie, von denen alle Aufreinigungstechniken Fachleuten wohlbekannt sind. Diese Aufreinigungstechniken beinhalten alle eine Fraktionierung, um den erwünschten Antikörper von anderen Bestandteilen einer Mischung zu trennen. Analytische Verfahren, die besonders zur Herstellung von Antikörpern geeignet sind, schließen z.B. Protein-A-Sepharose- und/oder Protein-G-Sepharose-Chromatographie ein.

B6. Antikörper aus Phagemid-Bibliotheken

[0365] Rekombinante Technologie ermöglicht jetzt die Herstellung von Antikörpern mit der erwünschten Spezifität aus rekombinanten Genen, die für eine Vielzahl von Antikörpern kodieren (Van Dijk et al., 1989). Bestimmte rekombinante Techniken beinhalten die Isolierung der Antikörpergene durch immunologisches Screenen von kombinatorischen Immunglobulin-Phagen-Expressionsbibliotheken, hergestellt aus RNA, isoliert aus der Milz eines immunisierten Tiers (Morrison et al., 1986; Winter und Milstein, 1991).

[0366] Für solche Verfahren werden kombinatorische Immunglobulin-Phagemid-Bibliotheken aus RNA hergestellt, isoliert aus der Milz des immunisierten Tiers, und die Phagemide, die die geeigneten Antikörper exprimieren, werden ausgewählt durch Panning unter Verwendung von Zellen, die das Antigen exprimieren, und Kontrollzellen. Die Vorteile dieses Ansatzes gegenüber herkömmlichen Hybridom-Techniken sind, daß näherungsweise 10^4 mal so viele Antikörper in einer einzelnen Runde erzeugt und gescreent werden können, und daß neue Spezifitäten durch H- und L-Ketten-Kombination erzeugt werden, was den prozentualen Anteil an geeigneten erzeugten Antikörpern erhöht.

[0367] Ein Verfahren zur Erzeugung eines großen Repertoires von unterschiedlichen Antikörpermolekülen in Bakterien verwendet den Bakteriophagen Lambda als den Vektor (Huse et al., 1989). Die Herstellung von Antikörpern unter Verwendung des Lambda-Vektors beinhaltet das Klonieren von schweren und leichten Ketten-Populationen von DNA-Sequenzen in getrennte Ausgangsvektoren. Die Vektoren werden darauffolgend zufallsmäßig kombiniert, um eine einzelnen Vektor zu bilden, der die Co-Expression von schweren und leichten Ketten steuert, um Antikörperfragmente zu bilden. Die schwer- und leichtkettigen DNA-Sequenzen werden durch Amplifikation erhalten, bevorzugt mittels PCRTM oder einer verwandten Amplifikationstechnik der mRNA, die aus Milzzellen (oder Hybridomen davon) aus einem Tier isoliert worden sind, das mit einem ausgewählten Antigen immunisiert worden ist. Die schwer- und leichtkettigen Sequenzen werden typischerweise unter Verwendung von Primern amplifiziert, die Restriktionsstellen in die Enden des amplifizierten DNA-Segments einbauen, um das Klonieren der schwer- und leichtkettigen Segmente in die Ausgangsvektoren zu erleichtern.

[0368] Ein weiteres Verfahren zur Erzeugung und zum Screenen von großen Bibliotheken an vollständig oder partiell synthetischen Antikörperkombinationsstellen, oder Paratopen, verwendet Display-Vektoren, die aus filamentösen Phagen, wie etwa M13, f1 oder fd abgeleitet sind: Diese filamentösen Phagen-Display-Vektoren, bezeichnet als „Phagemide“, ergeben große Bibliotheken von monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen und neuen Immunspezifitäten. Die Technologie verwendet eine filamentöse Phagen-Hüllprotein-Membran-Ankerdomäne als ein Mittel zum Verknüpfen von Genprodukt und Gen während des Aufbaustadiums der filamentösen Phagenreplikation und ist zur Klonierung und Expression von Antikörpern aus kombinatorischen Bibliotheken verwendet worden (Karg et al., 1991; Barbas et al., 1991).

[0369] Diese allgemeine Technik für filamentösen Phagendisplay wird in US Patent Nr. 5,658,727 beschrieben. In einem allgemeinsten Sinn stellt das Verfahren ein System zum simultanen Klonieren und Screenen von vorher ausgewählten Ligandenbindungs-Spezifitäten aus Antikörper-Gen-Repertoires unter Verwendung eines einzelnen Vektorsystems bereit. Das Screenen von isolierten Mitgliedern der Bibliothek auf eine vorher ausgewählte Ligandenbindungsfähigkeit ermöglicht die Korrelation der Bindungsfähigkeit eines exprimierten Antikörpermoleküls mit einem bequemen Mittel, um das Gen zu isolieren, das für das Mitglied aus der Bibliothek kodiert.

[0370] Die Verknüpfung von Expression und Screening wird durch die Kombination des Targeting eines Fusionspolypeptids in das Periplasma einer bakteriellen Zelle ermöglicht, um den Aufbau eines funktionellen Antikörpers zu ermöglichen, und das Targeting eines Fusionspolypeptids auf die Hülle eines filamentösen Phagenpartikels während des Phagenaufbaus, um ein bequemes Screenen des Bibliothekmitglieds von Interesse

zu ermöglichen. Periplasmisches Targeting wird durch die Anwesenheit einer Sekretionssignaldomäne in einem Fusionspolypeptid ermöglicht. Das Targeting auf einen Phagenpartikel wird durch die Anwesenheit einer filamentösen Phagen-Hüllprotein-Membran-Ankerdomäne (d.h. einer cpIII- oder cpVIII-abgeleiteten Membranankerdomäne) in einem Fusionspolypeptid bereitgestellt.

[0371] Die Diversität einer auf filamentösen Phagen basierenden, kombinatorischen Antikörperbibliothek kann erhöht werden durch Mischen der Gene für schwere und leichte Ketten, durch Verändern von einer oder mehreren der komplementaritätsbestimmenden Regionen der klonierten Gene für die schweren Ketten der Bibliothek oder durch Einführen von Zufallsmutationen in die Bibliothek durch fehlerbehafteten Polymerasekettenreaktionen. Zusätzliche Verfahren zu dem Screenen von Phagemid-Bibliotheken werden in US Patent Nr. 5,580,717; 5,427,980; 5,403,484 und 5,223,409 beschrieben.

[0372] Ein weiteres Verfahren zum Screenen von großen kombinatorischen Antikörperbibliotheken ist entwickelt worden unter Verwendung der Expression von Populationen von verschiedenen Sequenzen für schwere und leichte Ketten auf der Oberfläche eines filamentösen Bacteriophagen, wie M13, fl oder fd (US Patent Nr. 5,698,426). Zwei Populationen von unterschiedlich schweren (Hc) und leichten (Lc) Ketten-Sequenzen werden mittels Polymerasekettenreaktion (PCRTM) synthetisiert. Diese Populationen werden in separate M13-basierende Vektor-enthaltende Elemente kloniert, die notwendig zur Expression sind. Der schwere Ketten-Vektor enthält eine Gen-VIII(gVIII)-Hüllproteinsequenz, so daß die Translation der schweren Ketten-Sequenz gVII-Hc-Fusionsproteine erzeugt. Die Populationen von zwei Vektoren werden zufallsmäßig kombiniert, so daß nur die Vektorteile, die die Hc- und Lc-Sequenzen enthalten, in einen einzelnen zirkulären Vektor verbunden werden.

[0373] Der kombinierte Vektor steuert die Co-Expression von sowohl Hc- als auch Lc-Sequenzen zum Aufbau der beiden Polypeptide und der Oberflächenexpression auf M13 (US Patent Nr. 5,698,426). Der Kombinations-schritt bringt unterschiedliche Hc- und Lc-kodierende Sequenzen innerhalb von zwei verschiedenen Populationen zufallsmäßig in einen einzelnen Vektor zusammen. Die Vektorsequenzen, die von jedem unabhängigen Vektor gegeben werden, sind zur Erzeugung von lebensfähigem Phagen notwendig. Zusätzlich kann, da die pseudo-gVIII-Sequenzen in nur einem der beiden Ausgangsvektoren enthalten sind, die Co-Expression von funktionellen Antikörperfragmenten als Lc-assoziierten gVIII-Hc-Fusionsproteinen nicht auf der Phagenoberfläche erzielt werden, bis die Vektorsequenzen in dem einzelnen Vektor verknüpft sind.

[0374] Die Oberflächenexpression der Antikörperbibliothek wird in einem Amber-Suppressor-Stamm durchgeführt. Ein Amber-Stop-Codon zwischen der Hc-Sequenz und der gVIII-Sequenz trennt die beiden Bestandteile in einem Nicht-Suppressor-Stamm. Das Isolieren des aus dem Nicht-Suppressor-Stamm produzierten Phagen und das Infizieren eines Suppressor-Stamms wird die Hc-Sequenzen an die gVIII-Sequenz während der Expression verknüpfen. Das Kultivieren des Suppressor-Stamms nach der Infektion ermöglicht die Co-Expression auf der Oberfläche von M13 von allen Antikörperspezies innerhalb der Bibliothek als gVIII-Fusionsproteine (gVIII-Fab-Fusionsproteinen). Alternativ kann die DNA aus dem Nicht-Suppressor-Stamm isoliert werden und dann in einen Suppressor-Stamm eingeführt werden, um denselben Effekt zu erzielen.

[0375] Die Oberflächenexpressionsbibliothek wird auf spezifische Fab-Fragmente, die an vorher ausgewählte Moleküle binden, mittels Standard-Affinitäts-Isolierungsprozeduren gescreent. Solche Verfahren schließen z.B. Panning (Parmley and Smith, 1988), Affinitätschromatographie und Festphasen-Blotting-Prozeduren ein. Panning wird bevorzugt, da hohe Titer an Phagen in leichter Weise, schnell und in geringen Volumina gescreent werden können. Darüber hinaus kann diese Prozedur kleinere Fab-Fragmente-Spezies innerhalb der Population auswählen, die ansonsten nicht nachweisbar gewesen wären, und amplifiziert auf im wesentlichen homogene Populationen. Die ausgewählten Fab-Fragmente können durch Sequenzieren der für die Polypeptide kodierenden Nukleinsäuren nach Amplifikation der Phagenpopulation charakterisiert werden.

[0376] Ein weiteres Verfahren zum Erzeugen von verschiedenen Bibliotheken von Antikörpern und zum Screenen auf erwünschte Bindungsspezifitäten wird in US Patent Nr. 5,667,988 und US Patent Nr. 5,759,817 beschrieben. Das Verfahren beinhaltet die Herstellung von Bibliotheken aus heterodimeren Immunglobulinmolekülen in der Form von Phagemid-Bibliotheken unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden und Primer-Extensions-Reaktionen, um die Degeneriertheiten („degeneracies“) in die CDR-Regionen der schwerkettigen variablen Immunglobulin- und leichtkettigen variablen Immunglobulin-Domänen einzubauen und die mutagenisierten Polypeptide auf der Oberfläche des Phagemids auszustellen („display“). Danach wird das Display-Protein auf die Fähigkeit gescreent, an ein vorher ausgewähltes Antigen zu binden.

[0377] Das Verfahren zum Erzeugen eines heterodimeren Immunglobulinmoleküls beinhaltet im allgemeinen

(1) das Einführen eines für die schwere oder leichte Ketten-V-Region kodierenden Gens von Interesse in den Phagemid-Display-Vektor; (2) das Einführen einer randomisierten Bindungsstelle in den Phagemid-Display-Proteinvektor durch Primer-Extension mit einem Oligonukleotid, enthaltend Homologieregionen zu einer CDR des Antikörper-V-Region-Gens, und enthaltend degenerierte Regionen zum Produzieren von randomisierten kodierenden Sequenzen, um eine große Population von Display-Vektoren zu bilden, von denen jeder in der Lage ist, verschiedene vermeintliche Bindungsstellen zu exprimieren, die auf einem Phagemid-Oberflächen-Display-Protein ausgestellt sind; (3) Exprimieren des Display-Proteins und der Bindungsstelle auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen-Partikels; und (4) Isolieren (Screening) des Oberflächen-exprimierten Phagen-Partikels unter Verwendung von Affinitätstechniken, wie etwa Panning der Phagen-Partikel gegen ein vorher ausgewähltes Antigen, wodurch eine oder mehrere Spezies eines Phagemids isoliert wird, enthaltend ein Display-Protein, enthaltend eine Bindungsstelle, die ein vorher ausgewähltes Antigen bindet.

[0378] Eine weitere Variation dieses Verfahrens zum Herstellen von verschiedenen Bibliotheken von Antikörpern und zum Screenen auf erwünschte Bindungsspezifitäten wird in US Patent Nr. 5,702,892 beschrieben. In diesem Verfahren werden nur schwere Ketten-Sequenzen verwendet, die schweren Ketten-Sequenzen werden an allen Nukleotidpositionen randomisiert, die für entweder die CDRI- oder CDRIII-hypervariable Region kodieren, und die genetische Variabilität in den CDRs wird unabhängig von irgendeinem biologischen Prozeß erzeugt.

[0379] In den Verfahren werden zwei Bibliotheken konstruiert, um Oligonukleotid-Motive innerhalb des Gerüsts („framework“) der schweren Ketten-Genstruktur genetisch zu vermischen. Durch Zufallsmutation von entweder CDRI oder CDRIII wurden die hypervariablen Regionen des schweren Ketten-Gens rekonstruiert, um zu einer Sammlung an hochdiversen Sequenzen zu führen. Die schweren Ketten-Proteine, die durch die Sammlung von mutierten Gensequenzen kodiert werden, besaßen das Potential, alle Bindungscharakteristika eines Immunglobulins zu haben, während sie nur eine der beiden Immunglobulinketten erforderten.

[0380] Insbesondere wird das Verfahren in der Abwesenheit des leichten Immunglobulinketten-Proteins durchgeführt. Eine Phagenbibliothek, die modifizierte schwere Ketten-Proteine ausstellt („displaying“), wird mit einem immobilisierten Liganden inkubiert, um Klone auszuwählen, die für rekombinante Proteine kodieren, die spezifisch an den immobilisierten Liganden binden. Die gebundenen Phagen werden dann von dem immobilisierten Liganden dissoziiert und durch Wachstum in bakteriellen Wirtszellen amplifiziert. Individuelle Viren-Plaques, von denen jeder ein unterschiedliches rekombinantes Protein exprimiert, werden expandiert, und individuelle Klone können dann auf ihre Bindungsaktivität getestet werden.

B7. Antikörper aus humanen Lymphocyten

[0381] In-vitro-Immunisierung oder Antigen-Stimulation kann ebenso verwendet werden, um einen humanen Anti-VEGF-Antikörper zu erzeugen. Solche Techniken können verwendet werden, um periphere Blutlymphocyten aus normalen gesunden Patienten zu stimulieren, einfach durch Stimulieren von Antikörper-erzeugenden Zellen mit VEGF in vitro.

[0382] Eine solche „in-vitro-Immunisierung“ beinhaltet die Antigen-spezifische Aktivierung von nicht-immunisierten B-Lymphocyten, allgemein in einer gemischten Population von Lymphocyten (gemischte Lymphocytenkulturen, MLC). In-vitro-Immunisierungen können ebenso durch B-Zell-Wachstums- und Differenzierungs-Faktoren und Lymphokine unterstützt werden. Die durch diese Verfahren erzeugten Antikörper sind oft IgM-Antikörper (Borrebaeck et al., 1986).

[0383] Ein weiteres Verfahren ist beschrieben worden (US Patent Nr. 5,681,729), bei dem humane Lymphocyten, die hauptsächlich IgG (oder IgA)-Antikörper erzeugen, erhalten werden können. Das Verfahren beinhaltet, in einem allgemeinen Sinne, das Transplantieren von humanen Lymphocyten auf ein immundefizientes Tier, so daß die humanen Lymphocyten den Tierkörper „einnehmen“; Immunisieren des Tiers mit einem erwünschten Antigen, um humane Lymphocyten zu erzeugen, die einen Antikörper produzieren, der spezifisch auf das Antigen ist; und Gewinnen der humanen Lymphocyten aus dem Tier, die den Antikörper erzeugen. Die so erzeugten humanen Lymphocyten können verwendet werden, um einen monoklonalen Antikörper zu erzeugen, durch Immortalisieren der den Antikörper erzeugenden humanen Lymphocyten, Klonieren der erhaltenen immortalisierten Lymphocyten humanen Ursprungs, die den Antikörper erzeugen, und Gewinnen eines monoklonalen Antikörpers, der für das erwünschte Antigen spezifisch ist, aus den klonierten immortalisierten Lymphocyten humanen Ursprungs.

[0384] Die immundefizienten Tiere, die bei dieser Technik verwendet werden können, sind diejenigen, die kei-

ne Abstoßung aufweisen, wenn menschliche Lymphocyten in die Tiere transplantiert werden. Solche Tiere können durch physische, chemische oder biologische Behandlungen künstlich hergestellt werden. Jedes immundefiziente Tier kann verwendet werden. Die menschlichen Lymphocyten können aus humanem peripheren Blut, Milz, Lymphknoten, Mandeln oder Ähnlichem erhalten werden.

[0385] Das „Einnehmen“ der transplantierten humanen Lymphocyten in die Tiere kann durch einfaches Verabreichen der humanen Lymphocyten an die Tiere erreicht werden. Die Verabreichungsrouten ist nicht beschränkt und kann z.B. subkutan, intravenös oder intraperitoneal sein. Die Dosis der humanen Lymphocyten ist nicht beschränkt und kann gewöhnlich 10^6 bis 10^8 Lymphocyten pro Tier sein. Das immundefiziente Tier wird dann mit dem erwünschten VEGF-Antigen immunisiert.

[0386] Nach der Immunisierung werden humane Lymphocyten aus dem Blut, der Milz, den Lymphknoten oder anderen lymphatischen Geweben durch jedes herkömmliche Verfahren gewonnen. Zum Beispiel können einkernige Zellen durch die Ficoll-Hypaque-Zentrifugationsmethode (relative Dichte 1,077), und die Monocyten durch die Plastischalen-Adsorptionsmethode entfernt werden. Die kontaminierenden Zellen, die aus dem immundefizienten Tier stammen, können unter Verwendung eines Antiserums, das für die Tierzellen spezifisch ist, entfernt werden. Das Antiserum kann z.B. durch Immunisieren eines zweiten unterschiedlichen Tiers mit den Milzzellen des Immundefizienten Tiers und durch Gewinnen des Serums aus dem unterschiedlich immunisierten Tier erhalten werden. Die Behandlung mit dem Antiserum kann in jedem Stadium durchgeführt werden. Die humanen Lymphocyten können ebenso durch ein immunologisches Verfahren gewonnen werden, das ein humanes Immunglobulin verwendet, das auf der Zelloberfläche als ein Marker exprimiert wird.

[0387] Mit diesen Verfahren können humane Lymphocyten, die hauptsächlich IgG- und IgA-Antikörper erzeugen, die spezifisch auf ein oder mehrere ausgewählte VEGF-Epitope sind, erhalten werden. Monoklonale Antikörper werden dann aus den humanen Lymphocyten durch Immortalisierung, Auswahl, Zellwachstum und Antikörpererzeugung erhalten.

B8. Transgene Mäuse, enthaltend humane Antikörperbibliotheken

[0388] Es steht jetzt rekombinante Technologie zur Herstellung von Antikörpern zur Verfügung. Zusätzlich zu den oben offenbarten kombinatorischen Immunglobulin-Phagenexpressionsbibliotheken ist ein anderer molekularer Klonierungsansatz die Herstellung von Antikörpern aus transgenen Mäusen, die humane Antikörperbibliotheken enthalten. Solche Techniken werden in US Patent Nr. 5,545,807 beschrieben.

[0389] In einem allgemeinsten Sinne beinhalten diese Verfahren die Erzeugung eines transgenen Tiers, das in seiner Keimbahn genetisches Material eingebaut hat, das für wenigstens einen Teil eines Immunglobulins humanen Ursprungs kodiert oder das sich umordnen kann, um für ein Repertoire von Immunglobulinen zu kodieren. Das eingebaute genetische Material kann aus einer humanen Quelle produziert werden oder kann synthetisch erzeugt werden. Das Material kann für wenigstens einen Teil eines bekannten Immunglobulins kodieren oder kann modifiziert werden, um für wenigstens einen Teil eines veränderten Immunglobulins zu kodieren.

[0390] Das eingebaute genetische Material wird in dem transgenen Tier exprimiert, was zur Erzeugung eines Immunglobulins führt, das wenigstens zum Teil aus dem eingebauten genetischen humanen Immunglobulinmaterial stammt. Es wird gefunden, daß das genetische Material in dem transgenen Tier umgeordnet wird, so daß ein Repertoire von Immunglobulinen mit einem Teil oder Teilen erzeugt werden kann, die aus dem eingebauten genetischen Material stammen, sogar wenn das eingebaute genetische Material in der Keimbahn in der falschen Position oder mit der falschen Geometrie eingebaut ist.

[0391] Das eingebaute genetische Material kann in der Form von DNA vorliegen, die in prokaryotische Vektoren, wie etwa Plasmide und/oder Cosmide kloniert ist. Größere DNA-Fragmente werden unter Verwendung von künstlichen Hefechromosomenvektoren (Burke et al., 1987) oder durch Einbau von Chromosomenfragmenten (Richter und Lo, 1989) eingebaut. Das eingebaute genetische Material kann in den Wirt auf eine herkömmliche Weise eingeführt werden, z.B. durch Injektion oder andere Prozeduren in befruchtete Eier oder embryonische Stammzellen.

[0392] In bevorzugten Aspekten wird ein Wirtstier verwendet, das anfänglich nicht das genetische Material trägt, welches für konstante Immunglobulinregionen kodiert, so daß das resultierende transgene Tier nur das eingebaute humane genetische Material bei der Erzeugung von Immunglobulinen verwenden wird. Dies kann erzielt werden, indem man entweder einen natürlich vorkommenden mutanten Wirt verwendet, dem das relevante genetische Material fehlt, oder indem man Mutanten künstlich herstellt, z.B. in Zelllinien, um letztendlich

einen Wirt zu erzeugen, von dem das relevante genetische Material entfernt worden ist.

[0393] Wenn das Wirtstier genetisches Material trägt, das für konstante Immunglobulinregionen kodiert, wird das transgene Tier das natürlich vorkommende genetische Material und das eingebaute genetische Material tragen und wird Immunglobuline erzeugen, die aus dem natürlich vorkommenden genetischen Material, dem eingebauten genetischen Material und Mischungen von beiden Gruppen von genetischem Material stammen. In diesem Fall kann das erwünschte Immunglobulin durch Screenen von Hybridomen erhalten werden, die aus dem transgenen Tier stammen, z.B. durch Ausnutzen des Phänomens des Allelausschlusses der Antikörpergenexpression oder des differentiellen Chromosomenverlustes.

[0394] Wenn ein geeignetes transgenes Tier erzeugt worden ist, wird das Tier einfach mit dem erwünschten Immunogen immunisiert. Abhängig von der Natur des eingebauten Materials kann das Tier ein chimäres Immunglobulin erzeugen, z.B. von gemischtem Maus/humanem Ursprung, wobei das genetische Material aus fremdem Ursprung nur für einen Teil des immunglobulins kodiert; oder das Tier kann ein vollständig fremdes Immunglobulin erzeugen, z.B. von vollständig humanem Ursprung, wobei das genetische Material aus fremdem Ursprung ein vollständiges Immunglobulin kodiert.

[0395] Polyklonale Antiseren können aus dem transgenen Tier nach der Immunisierung erzeugt werden. Immunglobulin-erzeugende Zellen können aus dem Tier entnommen werden, um das interessierende Immunglobulin zu erzeugen. Bevorzugt werden monoklonale Antikörper aus dem transgenen Tier erzeugt, z.B. durch Fusionieren von Milzzellen aus dem Tier mit Myelom-Zellen und Screenen der resultierenden Hybridome, um diejenigen auszuwählen, die den erwünschten Antikörper erzeugen. Geeignete Techniken für solche Prozesse werden hierin beschrieben.

[0396] In einem alternativen Ansatz kann das genetische Material in das Tier auf eine solche Weise eingebaut werden, daß der erwünschte Antikörper in Körperflüssigkeiten, wie etwa Serum oder externen Sekretionen des Tieres, wie etwa Milch, Colostrum oder Speichel, erzeugt wird. Zum Beispiel kann durch Einbauen von genetischem Material, das für wenigstens einen Teil eines humanen Immunglobulins kodiert, in vitro in ein Gen eines Säugetiers, das für ein Milchprotein kodiert, und dann durch Einführen des Gens in ein befruchtetes Ei des Säugetiers, z.B. durch Injektion, das Ei sich in ein erwachsenes weibliches Säugetier entwickeln, das Milch produziert, enthaltend das Immunglobulin, das wenigstens zum Teil aus dem eingebauten genetischen humanen Immunglobulin-Material stammt. Der erwünschte Antikörper kann dann aus der Milch geerntet werden. Geeignete Techniken zum Durchführen von solchen Prozessen sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt.

[0397] Die vorhergehenden transgenen Tiere werden gewöhnlich verwendet, um humane Antikörper eines einzelnen Isotyps zu erzeugen, genauer eines Isotyps, der wesentlich für die B-Zell-Reifung ist, wie etwa IgM und möglicherweise IgD. Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zum Erzeugen von humanen Anti-VEGF-Antikörpern ist es, die in US Patenten Nr. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 und 5,770,429 beschriebene Technologie zu verwenden, wobei transgene Tiere beschrieben werden, die in der Lage sind, von einem für die B-Zell-Entwicklung benötigten Isotyp zu anderen Isotypen umzuschalten.

[0398] Bei der Entwicklung eines B-Lymphocyten erzeugt die Zelle anfänglich IgM mit einer Bindungsspezifität, die durch die produktiv umgeordneten V_H - und V_L -Regionen bestimmt wird. Darauf folgend synthetisiert jede B-Zelle und ihre Nachkommenschaftszellen Antikörper mit denselben L- und H-Ketten-V-Regionen, aber sie können den Isotyp der H-Kette umschalten. Die Verwendung von mu- oder delta-konstanten-Regionen wird weitgehend durch alternatives Splicing bestimmt, was es erlaubt, daß IgM und IgD in einer einzelnen Zelle zusammen exprimiert werden. Die anderen schwerkettigen Isotypen (gamma, alpha und epsilon) werden nur nativ exprimiert, nachdem ein Genumordnungsereignis die C-mu- und C-delta-Exons zerstört. Dieser Genumordnungsprozeß, der als Isotyp-Switching bezeichnet wird, findet typischerweise durch Rekombination zwischen sogenannten Switch-Segmenten statt, die sich unmittelbar stromauf von jedem schwerkettigen Gen (außer delta) befinden. Die einzelnen Switch-Segmente sind zwischen 2 und 10 kb lang und bestehen hauptsächlich aus kurzen wiederholten Sequenzen.

[0399] Aus diesen Gründen ist es bevorzugt, daß Transgene transkriptionsregulatorische Sequenzen innerhalb von ungefähr 1-2kb stromauf von jeder Switch-Region eingebaut haben, die für das Isotyp-Switching verwendet werden soll. Diese transkriptionsregulatorischen Sequenzen schließen bevorzugt einen Promotor und ein Enhancer-Element ein und schließen bevorzugt die 5'-flankierende (d.h. stromauf) Region ein, die natürlicherweise mit einer Switch-Region assoziiert ist (d.h. in der Keimbahn-Konfiguration auftritt). Obwohl eine 5'-flankierende Sequenz von einer Switch-Region operativ mit einer unterschiedlichen Switch-Region für die Transgenkonstruktion verknüpft werden kann, ist es in einigen Ausführungsformen bevorzugt, daß jede

Switch-Region, die in dem Transgenkonstrukt eingebaut ist, die 5'-flankierende Region hat, die unmittelbar stromauf in der natürlich auftretenden Keimbahn-Konfiguration vorhanden ist. Die Sequenzinformationen in Bezug auf die Immunglobulin-Switch-Region-Sequenzen ist bekannt (Mills et al., 1990; Sideras et al., 1989).

[0400] Bei dem in US Patenten Nr. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 und 5,770,429 beschriebenen Verfahren funktionieren die humanen Immunglobulin-Transgene, die innerhalb des transgenen Tiers enthalten sind, in korrekter Weise in dem ganzen Weg der B-Zell-Entwicklung, die zu einem Isotyp-Switching führt. Entsprechend sind in diesem Verfahren diese Transgene so konstruiert, daß sie ein Isotyp-Switching und eines oder mehrere der Folgenden erzeugen: (1) eine Expression auf hohem Niveau und zelltyp-spezifisch, (2) funktionelle Genumordnung, (3) Aktivierung von und Antwort auf Allelausschluß, (4) Expression eines ausreichenden primären Repertoires, (5) Signaltransduktion, (6) somatische Hypermutation und (7) Vorherrschaft des Transgen-Antikörperlokus während der Immunantwort.

[0401] Ein wichtiges Erfordernis für die Transgenfunktion ist die Erzeugung eines primären Antikörperrepertoires, das hinreichend divers ist, um eine sekundäre Immunantwort für eine große Vielzahl von Antigenen auszulösen. Das ungeordnete schwerkettige Gen besteht aus einem Signalpeptid-Exon, einem variablen Region-Exon und einem Tandem-Array von Multidomän-konstanten Region-Regionen, von denen jede durch mehrere Exons kodiert wird. Jede der konstanten Region-Gene kodieren für den konstanten Teil einer unterschiedlichen Klasse von Immunglobulinen. Während der B-Zell-Entwicklung werden V-Region-proximalekonstante-Regionen zerstört, was zu der Expression von neuen schwerkettigen Klassen führt. Für jede schwerkettige Klasse erzeugen alternative Muster des RNA-Splicing sowohl Transmembran- als auch sezernierte Immunglobuline.

[0402] Der humane schwerkettige Locus besteht aus näherungsweise 200 V-Gen-Segmenten, die sich über 2 Mb erstrecken, näherungsweise 30 D-Gensegmente, die sich über 40 kb erstrecken, sechs J-Segmente, die innerhalb eines 3 kb-Abschnitts geclustert sind, und neun konstante Region-Gensegmente, die über näherungsweise 300 kb ausgebreitet sind. Der gesamte Locus erstreckt sich näherungsweise über 2,5 Mb des distalen Teils des langen Arms von Chromosom 14. Schwerkettige Transgenfragmente, enthaltend Mitglieder aller sechs der bekannten V_H-Familien, der D- und J-Gensegmente sowie die mu-, delta-, gamma-3-, gamma-1- und alpha-1-konstanten Regionen sind bekannt (Berman et al., 1988). Genomische Fragmente, enthaltend alle notwendigen Gensegmente und regulatorischen Sequenzen von einem humanen leichtkettigen Locus werden in ähnlicher Weise konstruiert.

[0403] Die Expression von erfolgreich umgeordneten schweren und leichten Immunglobulin-Transgenen hat einen dominanten Effekt durch Unterdrücken der Umordnung der endogenen Immunglobulingene in dem nicht-humanen, transgenen Tier. Jedoch ist es in bestimmten Ausführungsformen wünschenswert, einen vollständigen Inaktivierung der endogenen Ig-Loci zu bewirken, so daß Hybrid-Immunglobulin-Ketten, umfassend eine humane variable Region und eine nicht-humane (z.B. murine) konstante Region, nicht gebildet werden können, z.B. durch Trans-Switching zwischen den Transgen- und endogenen Ig-Sequenzen. Unter Verwendung von Embryonen-Stammzell-Technologie und homologer Rekombination kann das endogene Immunglobulin-Repertoire in leichter Weise eliminiert werden. Zusätzlich kann die Unterdrückung von endogenen Ig-Genen unter Verwendung einer Vielzahl von Techniken erzielt werden, wie etwa Antisense-Technologie.

[0404] In anderen Aspekten der Erfindung kann es wünschenswert sein, ein trans-geschaltetes („trans-switched“) Immunglobulin zu erzeugen. Antikörper, umfassend solche chimären trans-geschalteten Immunglobuline, können für eine Vielzahl von Anwendungen verwendet werden, bei denen es wünschenswert ist, eine nicht-humane (z.B. murine) konstante Region zu haben, z.B. zur Beibehaltung von Effektor-Funktionen in dem Wirt. Die Anwesenheit einer murinen konstanten Region kann Vorteile gegenüber einer humanen konstanten Region bieten, z.B. um murine Effektorfunktionen bereitzustellen (z.B. ADCC, murine Komplementfixierung), so daß ein solcher chimärer Antikörper in einem Maus-Krankheitsmodell getestet werden kann. Im Anschluß an das Testen im Tier kann die für die humane variable Region kodierende Sequenz isoliert werden, z.B. durch PCRTM-Amplifikation oder cDNA-Klonierung aus der Quelle (Hybridom-Klon) und in eine Sequenz gespleißt („spliced“) werden, die für eine erwünschte humane konstante Region kodiert, um für einen Antikörper mit humaner Sequenz zu kodieren, der für die humane therapeutische Verwendung geeigneter ist.

B9. Humanisierte Antikörper

[0405] Humane Antikörper haben wenigstens drei potentielle Vorteile zur Verwendung bei der humanen Therapie. Erstens, da der Effortorteil human ist, kann er besser mit den anderen Teilen des humanen Immunsystems wechselwirken, z.B. um Zielzellen in effizienterer Weise durch eine Komplement-abhängige Cytotoxizität

(CDC) oder durch eine Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) zu zerstören. Zweitens sollte das humane Immunsystem den Antikörper nicht als fremd erkennen. Drittens wird die Halbwertszeit im humanen Kreislauf ähnlich derjenigen von natürlich vorkommenden humanen Antikörpern sein, was es ermöglicht, daß kleinere und weniger häufige Dosen gegeben werden.

[0406] Verschiedene Verfahren zum Herstellen von humanen Anti-VEGF-Antikörpern werden hierin bereitgestellt. Zusätzlich zu humanen Antikörpern haben „humanisierte“ Antikörper viele Vorteile. „Humanisierte“ Antikörper sind im allgemeinen chimäre oder mutante monoklonale Antikörper aus der Maus, der Ratte, dem Hamster, dem Kaninchen oder anderen Spezies, die humane konstante und/oder variable Region-Domänen oder spezifische Veränderungen tragen. Techniken zum Erzeugen eines sogenannten „humanisierten“ Anti-VEGF-Antikörpers sind Fachleuten wohlbekannt.

[0407] Humanisierte Antikörper teilen ebenso die vorhergehenden Vorteile. Erstens ist der Effortorteil noch human. Zweitens sollte das humane Immunsystem das Gerüst („Framework“) oder die konstante Region nicht als fremd erkennen, und deshalb sollte die Antikörperantwort gegen einen solchen injizierten Antikörper weniger als gegen einen vollständig fremden Mausantikörper sein. Drittens werden injizierte humanisierte Antikörper im Gegensatz zu injizierten Mausantikörpern vermutlich eine Halbwertszeit haben, die ähnlicher derjenigen von natürlich vorkommenden humanen Antikörpern ist, was ebenso kleinere und weniger häufige Dosen ermöglicht.

[0408] Eine Anzahl von Verfahren sind beschrieben worden, um humanisierte Antikörper zu erzeugen. Eine kontrollierte Umordnung der Antikörperdomänen, die durch spezifische Protein-Disulfid-Bindungen verbunden sind, um neue artifizielle Proteinmoleküle oder „chimäre“ Antikörper zu bilden, kann verwendet werden (Konieczny et al., 1981). Rekombinante DNA-Technologie kann ebenso verwendet werden, um Genfusionen zwischen DNA-Sequenzen zu konstruieren, die für variable leichtkettige und schwerkettige Maus-Antikörper-Domänen und leicht- und schwerkettige konstante humane Antikörperdomänen kodieren (Morrison et al., 1984).

[0409] DNA-Sequenzen, die für die Antigen-bindenden Teile oder komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) von murinen monoklonalen Antikörpern kodieren, können mittels molekularer Mittel in die DNA-Sequenzen, die für die Gerüste („Frameworks“) von schweren und leichten humanen Antikörperketten kodieren, verpropft werden (Riechmann et al., 1988). Die exprimierten rekombinanten Produkte werden als „umgeformte“ („reshaped“) oder humanisierte Antikörper bezeichnet und umfassen das Gerüst einer leichten oder schweren humanen Antikörperkette und die Antigen-Erkennungsteile, CDRs, eines murinen monoklonalen Antikörpers.

[0410] Ein weiteres Verfahren zum Erzeugen von humanisierten Antikörpern wird in US Patent Nr. 5,639,641 beschrieben. Das Verfahren stellt mittels Schaffens einer neuen Oberfläche („resurfacing“) humanisierte Nagetierantikörper bereit, die eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit aufgrund der Präsentation einer humanen Oberfläche in der variablen Region. Bei dem Verfahren: (1) Positionalignments eines Pools aus schwer- und leichtkettigen variablen Antikörperregionen werden erzeugt, um einen Satz aus oberflächenexponierten, schwer- und leichtkettigen, variablen Regions-Gerüst-Positionen zu ergeben, bei denen die Alignment-Positionen für alle variablen Regionen wenigstens ungefähr 98% identisch sind; (2) ein Satz aus oberflächenexponierten schwer- und leichtkettigen, variablen Regions-Gerüst-Aminosäureresten wird für einen Nagetierantikörper (oder ein Fragment davon) definiert; (3) ein Satz aus oberflächenexponierten, schwer- und leichtkettigen, variablen Regions-Gerüst-Aminosäureresten, der dem Satz der oberflächenexponierten Nagetier-Aminosäureresten am ähnlichsten ist, wird identifiziert; (4) der Satz aus oberflächenexponierten, schwer- und leichtkettigen, variablen Regions-Gerüst-Aminosäureresten, definiert in Schritt (2), wird mit dem Satz aus oberflächenexponierten, schwer- und leichtkettigen, variablen Regions-Gerüst-Aminosäureresten, identifiziert in Schritt (3), substituiert, außer denjenigen Aminosäureresten, die innerhalb von 5Å eines beliebigen Atoms eines beliebigen Rests der komplementaritätsbestimmenden Regionen des Nagetierantikörpers liegen; und (5) der humanisierte Nagetierantikörper mit Bindungsspezifität wird produziert.

[0411] Ein ähnliches Verfahren zur Erzeugung von humanisierten Antikörpern wird in US Patent Nr. 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 und 5,530,101 beschrieben. Diese Verfahren beinhalten das Erzeugen von humanisierten Immunglobulinen mit einer oder mehreren komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) und möglichen zusätzlichen Aminosäuren aus einem Donor-Immunglobulin und einer Gerüstregion von einem empfangenden humanen Immunglobulin. Jede humanisierte Immunglobulinkette umfaßt gewöhnlich, zusätzlich zu den CDRs, Aminosäuren von dem Donor-Immunglobulingerüst, die in der Lage sind, mit den CDRs wechselzuwirken, um die Bindungsaffinität zu bewirken, wie etwa eine oder mehrere Aminosäuren, die unmittelbar an eine CDR in dem Donor-Immunglobulin oder an diejenigen innerhalb von ungefähr 3Å angrenzen,

wie mittels molekularer Modellierung vorhergesagt. Die schweren und leichten Ketten können jede unter Verwendung eines beliebigen Positionskriteriums, einer beliebigen Kombination oder allen der verschiedenen Positionskriterien konstruiert werden, die in US Patenten Nr. 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 und 5,530,101 beschrieben werden. Bei Kombinationen in einen intakten Antikörper sind die humanisierten Immunglobuline im wesentlichen nicht immunogen bei Menschen und behalten im wesentlichen dieselbe Affinität für das ursprüngliche Antigen wie das Donor-Immunglobulin bei.

[0412] Ein zusätzliches Verfahren zum Erzeugen von humanisierten Antikörpern wird im US Patent Nr. 5,565,332 und 5,733,743 beschrieben. Dieses Verfahren kombiniert das Konzept von humanisierenden Antikörpern mit den Phagemid-Bibliotheken, die ebenso im einzelnen hierin beschrieben werden. In einem allgemeinen Sinne verwendet das Verfahren Sequenzen von der Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers oder einer Population von Antikörpern, der (die) gegen ein interessierendes Antigen gerichtet ist (sind). Daher können für einen einzelnen Nagetierantikörper Sequenzen, die einen Teil der Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers umfassen, mit verschiedenen Repertoiren von Sequenzen von humanen Antikörper kombiniert werden, die in Kombination eine vollständige Antigen-Bindungsstelle erzeugen können.

[0413] Die durch dieses Verfahren erzeugten Antigen-Bindungsstellen unterscheiden sich von denjenigen, die durch CDR-Verpropfung („CDR-grafting“) erzeugt werden, dahingehend, daß nur der Teil der Sequenz des ursprünglichen Nagetierantikörpers wahrscheinlich Kontakte mit dem Antigen auf eine ähnliche Weise macht. Die ausgewählten humanen Sequenzen unterscheiden sich wahrscheinlich in der Sequenz und machen andere Kontakte mit dem Antigen als diejenigen der ursprünglichen Bindungsstelle. Jedoch forcieren wahrscheinlich die Beschränkungen, die durch die Bindung des Teils der ursprünglichen Sequenz an das Antigen und durch die Formen des Antigens und seiner Antigen-Bindungsstellen auferlegt sind, die neuen Kontakte der humanen Sequenzen auf dieselbe Region oder Epitop des Antigens. Dieser Prozeß ist deshalb als „Epitop-geprägte Selektion“ („epitope imprinted selection“) (EIS) bezeichnet worden.

[0414] Ausgehend von einem Tierantikörper führt ein Verfahren zur Selektion von Antikörpern, die teilweise humane Antikörper sind. Solche Antikörper können in der Sequenz mit humanen Antikörpern hinreichend ähnlich sein, um bei der Therapie direkt oder nach Veränderung einiger Schlüsselreste verwendet zu werden. Sequenzunterschiede zwischen dem Nagetierbestandteil des ausgewählten Antikörpers mit den humanen Sequenzen könnten minimiert werden durch Ersetzen der unterschiedlichen Reste durch die Reste von humanen Sequenzen, z.B. mittels ortsgerichteter Mutagenese von einzelnen Resten oder durch CDR-Verpropfung von gesamten Schleifen. Jedoch können auch Antikörper mit vollständig humanen Sequenzen erzeugt werden. EIS bietet deshalb ein Verfahren zum Herstellen von teilweise humanen oder vollständig humanen Antikörpern, die an dasselbe Epitop wie tierische bzw. teilweise humane Antikörper binden. Bei EIS können Repertoires von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von filamentösen Phagen ausgestellt und die für Fragmente mit Antigen-Bindungsaktivität kodierenden Gene durch Bindung des Phagen an das Antigen ausgewählt werden.

[0415] Zusätzliche Verfahren zum Humanisieren von Antikörpern, die zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen werden, werden in US Patenten Nr. 5,750,078; 5,502,167; 5,705,154; 5,770,403; 5,698,417; 5,693,493; 5,558,864; 4,935,496 und 4,816,567 beschrieben. Es wird geglaubt, daß WO 98/45331 und WO 98/45332 besonders instruktiv sind und die Prinzipien der Humanisierung, wie auf Anti-VEGF-Antikörper angewandt, weiter beispielhaft veranschaulichen.

B10. Mutagenese mittels PCR™

[0416] Ortsspezifische Mutagenese ist eine Technik, die bei der Herstellung von individuellen Antikörpern durch spezifische Mutagenese der zugrundeliegenden DNA nützlich ist. Die Technik stellt weiterhin eine leichte Fähigkeit bereit, Sequenzvarianten herzustellen und zu testen, die eine oder mehrere der vorhergehenden Überlegungen einbeziehen, sei es Humanisieren oder nicht, durch Einführen von einer oder mehreren Nucleotidsequenzveränderungen in die DNA.

[0417] Obwohl viele Verfahren zur Verwendung bei der Mutagenese geeignet sind, wird die Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR™) im allgemeinen jetzt bevorzugt. Diese Technologie bietet eine schnelle und effiziente Methode zum Einführen von erwünschten Mutationen in eine gegebene DNA-Sequenz. Der folgende Text beschreibt insbesondere die Verwendung von PCR™, um Punktmutationen in eine Sequenz einzuführen, wie sie verwendet werden kann, um die durch die gegebene Sequenz kodierte Aminosäure zu verändern. Anpassungen dieses Verfahrens sind ebenso zum Einführen von Restriktionsenzymstellen in ein DNA-Molekül geeignet.

[0418] Bei diesem Verfahren werden synthetische Oligonukleotide konstruiert, um eine Punktmutation an einem Ende eines amplifizierten Segments einzubauen. Nach der PCRTM werden die amplifizierten Fragmente durch Behandlung mit Klenow-Fragmenten mit stumpfen Enden versehen („blunt-ended“), und die stumpfendigen Fragmente werden dann in einen Vektor ligiert und subkloniert, um die Sequenzanalyse zu erleichtern.

[0419] Um die Matrizen-DNA herzustellen, die man zu mutagenisieren wünscht, wird die DNA in einen Vektor mit hoher Kopienzahl subkloniert, wie etwa pUC19, unter Verwendung von Restriktionsstellen, die das zu mutierende Gebiet flankieren. Matrizen-DNA wird dann unter Verwendung einer Plasmid-Miniprep hergestellt. Geeignete Oligonukleotid-Primer, die auf der Elternsequenz beruhen, die aber die erwünschte Punktmutation enthalten und die am 5'-Ende durch eine Restriktionsenzymstelle flankiert werden, werden unter Verwendung eines automatisierten Synthesizers synthetisiert. Es ist im allgemeinen erforderlich, daß der Primer zu der Matrizen-DNA für ungefähr 15 Basen oder ähnliches homolog ist. Primer können mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt werden, obwohl dies zur Verwendung bei der PCRTM nicht absolut notwendig ist. Das 5'-Ende der Oligonukleotide sollte dann phosphoryliert werden.

[0420] Die Matrizen-DNA sollte mittels PCRTM unter Verwendung der Oligonukleotidprimer, die die erwünschten Punktmutationen enthalten, amplifiziert werden. Die Konzentration von MgCl₂ in dem Amplifikationspuffer wird im allgemeinen ungefähr 15 mM sein. Im allgemeinen sollten ungefähr 20–25 Zyklen PCRTM wie folgt durchgeführt werden: Denaturierung, 35 s bei 95°C; Hybridisierung, 2 min. bei 50°C; und Extension, 2 min. bei 72°C. Die PCRTM wird im allgemeinen einen letzten Extensionszyklus von ungefähr 10 min. bei 72°C einschließen. Nach dem letzten Extensionsschritt sollten ungefähr fünf Einheiten Klenow-Fragmente zu der Reaktionsmischung zugegeben werden und für weitere 15 min. bei ungefähr 30°C inkubiert werden. Die Exonuklease-Aktivität der Klenow-Fragmente ist erforderlich, um die Enden „flush“ und für stumpfendiges Klonieren („blunt-end cloning“) geeignet zu machen.

[0421] Die resultierende Reaktionsmischung sollte im allgemeinen mittels nicht-denaturierender Agarose- oder Acrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden, um zu verifizieren, daß die Amplifikation das vorhergesagte Produkt ergeben hat. Man würde dann die Reaktionsmischung durch Entfernen von einem Großteil der Mineralöle, Extrahieren mit Chloroform, um das verbleibende Öl zu entfernen, Extrahieren mit gepuffertem Phenol und dann durch Aufkonzentrieren mittels Fällung mit 100% Ethanol aufarbeiten. Als nächstes sollte man ungefähr die Hälfte der amplifizierten Fragmente mit einem Restriktionsenzym verdauen, das an den flankierenden Sequenzen, die bei den Oligonukleotiden verwendet werden, schneidet. Die verdauten Fragmente werden auf einem niedrig-gelierenden/schmelzenden Agarosegel aufgereinigt.

[0422] Um die Fragmente zu subklonieren und um die Punktmutation zu überprüfen, würde man die beiden amplifizierten Fragmente in einen geeignet verdauten Vektor mit stumpfendiger Ligation subklonieren. Dieser würde verwendet werden, um E. coli zu transformieren, aus welchem Plasmid-DNA in der Folge unter Verwendung einer Miniprep hergestellt werden könnte. Der amplifizierte Teil der Plasmid-DNA würde dann mittels DNA-Sequenzierung analysiert werden, um zu bestätigen, daß die korrekte Punktmutation erzeugt wurde. Dies ist wichtig, da Taq-DNA-Polymerase zusätzliche Mutationen in DNA-Fragmente einführen kann.

[0423] Die Einführung einer Punktmutation kann ebenso unter Verwendung von sequentiellen PCRTM-Schritten durchgeführt werden. Bei diesem Verfahren werden die zwei Fragmente, die die Mutation umfassen, miteinander annealed und durch gegenseitig geprimte Synthese („primed synthesis“) verlängert. Dieses Fragment wird dann mittels eines zweiten PCRTM-Schrittes amplifiziert, wodurch die in dem obigen Protokoll erforderliche stumpfendige Ligation vermieden wird. Bei diesem Verfahren werden die Herstellung der Matrizen-DNA, die Erzeugung der Oligonukleotidprimer und die erste PCRTM-Amplifikation wie oben beschrieben, durchgeführt. Bei diesem Verfahren sollten jedoch die ausgewählten Oligonukleotide zu der Matrizen-DNA für einen Abschnitt von zwischen ungefähr 15 und ungefähr 20 Basen homolog sein und müssen ebenso miteinander um ungefähr 10 Basen oder mehr überlappen.

[0424] Bei der zweiten PCRTM-Amplifikation würde man jedes amplifizierte Fragment und jeden flankierenden Sequenzprimer verwenden und eine PCRTM für zwischen ungefähr 20 und ungefähr 25 Zyklen durchführen, unter Verwendung der oben beschriebenen Bedingungen. Man würde wiederum die Fragmente subklonieren und unter Verwendung der oben dargestellten Schritte überprüfen, daß die Punktmutation korrekt war.

[0425] Bei Verwendung von beiden vorhergehenden Verfahren ist es im allgemeinen bevorzugt, die Mutation durch Amplifikation eines so kleinen Fragments wie möglich einzuführen. Natürlich sollten Parameter, wie etwa die Schmelztemperatur des Oligonukleotids, die im allgemeinen durch den GC-Gehalt und die Länge des Oligos beeinflußt werden wird, sorgfältig betrachtet werden. Die Ausführung dieser Verfahren und ihre Optimie-

rung, sofern notwendig, wird Fachleuten bekannt sein und ist weiter in verschiedenen Publikationen beschrieben, wie etwa Current Protocols in Molecular Biology, 1995.

[0426] Bei der Durchführung ortsspezifischer Mutagenese kann Tabelle A als Bezug verwendet werden.

Tabelle A

Aminosäure			Codons						
Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cystein	Cys	C	UGC	UGU					
Asparaginsäure	Asp	D	GAC	GAU					
Glutaminsäure	Glu	E	GAA	GAG					
Phenylalanin	Phe	F	UUC	UUU					
Glycin	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidin	His	H	CAC	CAU					
Isoleucin	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lysin	Lys	K	AAA	AAG					
Leucin	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Methionin	Met	M	AUG						
Asparagin	Asn	N	AAC	AAU					
Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serin	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Threonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valin	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Tryptophan	Trp	W	UGG						
Tyrosin	Tyr	Y	UAC	UAU					

B11. Antikörperfragmente und -derivate

[0427] Unabhängig von der Herkunft des ursprünglichen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers können entweder der intakte Antikörper, Antikörper-Multimere oder eine beliebige aus einer Vielzahl von funktionellen Antigen-bindenden Regionen des Antikörpers bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Beispielhafte funktionelle Regionen schließen Diabodies, lineare Antikörper und scFv, Fv, Fab', Fab, F(ab')₂-Fragmente der Anti-VEGF-Antikörper ein. Techniken zum Herstellen solcher Konstrukte sind Fachleuten wohl bekannt und werden hierin weiter beispielhaft veranschaulicht.

[0428] Die Auswahl des Antikörperkonstrukts kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Zum Beispiel kann eine verlängerte Halbwertszeit aus der aktiven Readsorption von intakten Antikörpern innerhalb der Niere resultieren, eine Eigenschaft des Fc-Stücks des Immunglobulins. Es wird deshalb erwartet, daß IgG-basierende Antikörper eine langsamere Blut-Clearance als ihre Fab'-Gegenstücke haben werden. Jedoch werden Fab'-Fragmentbasierende Zusammensetzungen im allgemeinen eine bessere Gewebe-penetrierende Fähigkeit aufweisen.

[0429] Antikörperfragmente können durch Proteolyse des ganzen Immunglobulins durch die nichtspezifische Thiolprotease, Papain, erhalten werden. Ein Papain-Verdau ergibt zwei identische Antigen-bindende Fragmente, bezeichnet als „Fab-Fragmente“, jedes mit einer einzelnen Antigen-Bindungsstelle, und ein verbleibendes „Fc-Fragment“.

[0430] Papain muß zuerst durch Reduzieren der Sulfhydrylgruppe in dem aktiven Zentrum mit Cystein, 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol aktiviert werden. Schwermetalle im Stammenzym sollten durch Chelierung mit EDTA (2 mM) entfernt werden, um eine maximale Enzymaktivität sicherzustellen. Enzym und Substrat werden normalerweise im Verhältnis von 1:100, bezogen auf das Gewicht, zusammengemischt. Nach Inkubation kann die Reaktion durch irreversible Alkylierung der Thiolgruppe mit Iodacetamid oder einfach mittels Dialyse abgestoppt werden. Die Vollständigkeit des Verdau sollte mittels SDS-PAGE überwacht werden und die verschiedenen Fraktionen mittels Protein-A-Sepharose- oder Ionenaustausch-Chromatographie getrennt werden.

[0431] Die gewöhnliche Prozedur zur Herstellung von $F(ab')_2$ -Fragmenten aus IgG von Kaninchen- und menschlichem Ursprung ist limitierte Proteolyse mit dem Enzym Pepsin. Die Bedingungen, 100 × Antikörperüberschuß w/w in Acetatpuffer bei pH 4,5, 37°C, legen nahe, daß der Antikörper an der C-terminalen Seite der Disulfidbindung zwischen den schweren Ketten gespalten wird. Die Verdau-Geschwindigkeiten des Maus-IgG können mit der Subklasse variieren, und die Bedingungen sollten ausgewählt werden, um signifikante Mengen an vollständig abgebautem IgG zu verhindern. Insbesondere neigt IgG_{2b} zu einem vollständigen Abbau. Die anderen Subklassen erfordern unterschiedliche Inkubationsbedingungen, um optimale Resultate zu erzeugen, was alles auf dem Gebiet bekannt ist.

[0432] Die Pepsinbehandlung von intakten Antikörpern ergibt ein $F(ab')_2$ -Fragment, das zwei Antigen-kombinierende Stellen hat und noch in der Lage ist, ein Antigen quervernetzten. Ein Verdau von Ratten-IgG mit Pepsin erfordert Bedingungen, die Dialyse in 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5 und dann eine Inkubation für vier Stunden mit 1% w/w Pepsin einschließen; ein IgG₁- und IgG_{2a}-Verdau wird verbessert, wenn zuerst gegen 0,1 M Formiatpuffer, pH 2,8 bei 4°C für 16 Stunden dialysiert wird, gefolgt von Acetatpuffer. IgG_{2b} ergibt konsistentere Ergebnisse mit Inkubation in Staphylokokken-V8-Protease (3% w/w) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,8, für vier Stunden bei 37°C.

[0433] Ein Fab-Fragment enthält ebenso die konstante Domäne der leichten Kette und die erste konstante Domäne (CH1) der schweren Kette. Fab'-Fragmente unterscheiden sich von Fab-Fragmenten durch die Zugabe von einigen Resten am Carboxylterminus der schwermkettigen CH1-Domäne, einschließlich eines oder mehrerer Cystein(en) aus der Antikörper-Scharnier-Region („Hinge Region“). $F(ab')_2$ -Antikörperfragmente wurden ursprünglich als Paare von Fab'-Fragmenten erzeugt, die Scharnier-Cysteine zwischen ihnen haben. Andere chemische Kopplungen von Antikörperfragmenten sind ebenso bekannt.

[0434] Ein „Fv“-Fragment ist das minimale Antikörperfragment, das eine vollständige Antigen-Erkennungs- und -Bindungsstelle enthält. Diese Region besteht aus einem Dimer aus einer schwermkettigen und einer leichtkettigen variablen Domäne in enger, nicht-kovalenter Assoziation. Es ist diese Konfiguration, in der die drei hypervariablen Regionen von jeder variablen Domäne miteinander wechselwirken, um eine Antigen-Bindungsstelle auf der Oberfläche des V_H-V_L-Dimers zu definieren. Kollektiv verleihen die sechs hypervariablen Regionen dem Antikörper eine Antigen-Bindungsspezifität. Jedoch hat sogar eine einzelne variable Domäne (oder die Hälfte eines Fv, umfassend nur drei hypervariable Regionen, spezifisch für ein Antigen), die Fähigkeit, ein Antigen zu erkennen und zu binden, obwohl mit einer niedrigeren Affinität als die gesamte Bindungsstelle.

[0435] „Einzelketten-Fv“ oder „sFv“-Antikörperfragmente umfassen die V_H- und V_L-Domänen des Antikörpers, wobei diese Domänen in einer einzelnen Polypeptidkette vorliegen. Im allgemeinen umfaßt das Fv-Polypeptid weiterhin einen Polypeptid-Linker zwischen den V_H- und V_L-Domänen, die das sFv in die Lage versetzt, die erwünschte Struktur zur Antigenbindung zu bilden.

[0436] Die folgenden Patente und Patentanmeldungen ergänzen die vorliegenden Lehren im Hinblick auf die Herstellung und Verwendung von funktionellen, Antigen-bindenden Regionen von Antikörpern weiter, einschließlich scFv, Fv, Fab', Fab und $F(ab')_2$ -Fragmenten der Anti-VEGF-Antikörper: US Patent Nr. 5,855,866; 5,965,132; 6,051,230; 6,004,555 und 5,877,289 und US Patent Nr. 6,093,399. WO 98/45331 beschreibt und lehrt die Herstellung von variablen, hypervariablen und komplementaritätsbestimmenden (CDR)-Regionen von Antikörpern sogar noch weitergehend.

[0437] „Diabodies“ sind kleine Antikörperfragmente mit zwei Antigen-Bindungsstellen, wobei die Fragmente eine schwermkettige variable Domäne (V_H), verbunden mit einer leichtkettigen variablen Domäne (V_L), in dersel-

ben Polypeptidkette umfassen (V_H-V_L). Unter Verwendung eines Linker, der zu kurz ist, um eine Paarung zwischen den beiden Domänen auf derselben Kette zu ermöglichen, werden die Domänen dazu gezwungen, mit den komplementären Domänen einer anderen Kette zu paaren und zwei Antigen-Bindungsstellen zu erzeugen. Diabodies werden in EP 404 097 und WO 93/11161 beschrieben. „Lineare Antikörper“, die bispezifisch oder monospezifisch sein können, umfassen ein Paar von Tandem-Fd-Segmenten ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$), die ein Paar von Antigen-Bindungsregionen bilden, wie in Zapata et al. (1995) beschrieben.

[0438] Bei Verwendung eines Fab' oder eines Antigen-Bindungsfragments eines Antikörpers, mit den begleitenden Vorteilen im Hinblick auf die Gewebepenetration, kann man zusätzliche Vorteile aus dem Modifizieren des Fragments gewinnen, um seine Halbwertszeit zu erhöhen. Eine Vielzahl von Techniken kann verwendet werden, wie etwa die Manipulierung oder Modifizierung des Antikörper-Moleküls selbst und ebenso die Konjugation an inerte Träger. Jede Konjugation zum alleinigen Zwecke der Erhöhung der Halbwertszeit, statt um ein Mittel an ein Ziel abzugeben, sollte sorgfältig angegangen werden, dahingehend, daß Fab' und andere Fragmente ausgewählt werden, um Gewebe zu penetrieren. Nichtsdestotrotz wird die Konjugation an Nicht-Protein-Polymere, wie etwa PEG oder ähnliches, in Erwägung gezogen.

[0439] Modifizierungen, die nicht eine Konjugation sind, beruhen deshalb auf dem Modifizieren der Struktur des Antikörperfragments, um es stabiler zu machen und/oder um die Abbaurate im Körper zu verringern. Ein Mechanismus für solche Modifizierungen ist die Verwendung von D-Aminosäuren anstelle von L-Aminosäuren. Fachleute auf dem Gebiet werden verstehen, daß die Einführung von solchen Modifizierungen von rigorosem Testen des resultierenden Moleküls gefolgt werden muß, um sicherzustellen, daß es immer noch die erwünschten biologischen Eigenschaften beibehält. Weitere stabilisierende Modifizierungen schließen die Verwendung der Zugabe von stabilisierenden Gruppen an entweder den N-Terminus oder den C-Terminus oder beide ein, die im allgemeinen verwendet werden, um die Halbwertszeit von biologischen Molekülen zu verlängern. Beispielsweise kann man wünschen, die Termini durch Acylierung oder Aminierung zu modifizieren.

[0440] Moderate Modifikationen von Konjugationstyp zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung schließen den Einbau eines Salvage-Rezeptor-Bindungsepitops in das Antikörperfragment ein. Techniken zum Erzielen hiervon schließen die Mutation der geeigneten Region des Antikörperfragments oder den Einbau des Epitops als ein Peptid-Tag ein, der an das Antikörperfragment angehängt ist. WO 96/32478 veranschaulicht beispielhaft solche Technologie. Die Salvage-Rezeptor-Bindungsepitope sind typischerweise Regionen aus drei oder mehreren Aminosäuren aus einer oder zwei Loops der Fc-Domäne, die auf die analoge Position auf dem Antikörperfragment übertragen werden. Die Salvage-Rezeptor-Bindungsepitope von WO 98/45331 dienen zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung.

B12. Bindungs- und funktionelle Assays

[0441] Obwohl die vorliegende Erfindung eine signifikante Nützlichkeit bei Tier- und humanen Behandlungsschemata hat, hat sie ebenso viele andere praktische Verwendungen, einschließlich vieler in-vitro-Verwendungen. Bestimmte dieser Verwendungen beziehen sich auf die spezifischen Bindungseigenschaften der Antikörper oder Immunkonjugate. Dadurch, daß alle Verbindungen der Erfindung wenigstens einen Antikörperbestandteil einschließen, können sie in nahezu allen Bindungsausführungsformen verwendet werden, in der der ursprüngliche Antikörper verwendet werden kann.

[0442] Die Anwesenheit eines angehängten Mittels, sofern relevant, obwohl sie vorteilhafte Eigenschaften bereitstellt, verneint nicht die Nützlichkeit der ersten Antikörperregionen in einem Bindungsassay. Geeignet nützliche Bindungsassays schließen daher diejenigen ein, die üblicherweise auf dem Gebiet verwendet werden, wie etwa Immun-Blots, Western-Blots, Dotblots, RIAs, ELISAs, Immunhistochemie, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), Immunfällung, Affinitätschromatographie und ähnliches, wie hierin weiter beschrieben.

[0443] Bestimmte Standardbindungsassays sind diejenigen, bei denen ein Antigen auf eine feste Trägermatrix, z.B. Nitrocellulose, Nylon oder eine Kombination davon, immobilisiert wird, wie etwa bei Immun-Blots, Western-Blots und verwandten Assays. Andere wichtige Assays sind ELISAs. Alle solche Assays können in leichter Weise zur Verwendung bei dem Nachweis von VEGF angepaßt werden, wie er bei der Diagnose einer angiogenen Krankheit angewandt werden kann. Die Mittel der Erfindung können ebenso im Zusammenhang mit frisch eingefrorenen und Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben bei der Immunhistochemie, bei Fluoreszenz-aktiver Zellsortierung, Flußzytometrie oder Fluß-Microfluorometrie, bei der Immunfällung, bei Antigen-Aufreinigungs-Ausführungsformen, wie etwa Affinitätschromatographie, sogar einschließlich, in Fällen von bispezifischen Antikörpern, der einstufigen raschen Aufreinigung von einem oder

mehreren Antigenen zur selben Zeit, und in vielen anderen Bindungsassays verwendet werden, die Fachleuten bekannt sein werden, angesichts der hierin dargebotenen Information.

[0444] Weitere praktische Verwendungen der vorliegenden Antikörper sind als Kontrollen in funktionellen Assays. Diese schließen viele in-vitro- und ex-vivo-Assays und -systeme ein, ebenso wie Tiermodellstudien. Da die Bindungs- und funktionellen Eigenschaften der Antikörper der Erfindung besonders spezifisch sind, d.h. sie inhibieren die VEGF-Bindung an und die Signalgebung über VEGFR2, aber nicht VEGFR1, sind solche „Kontroll“-Verwendungen tatsächlich extrem wertvoll. Die Assays, die von einer solchen praktischen Anwendung der vorliegenden Erfindung Vorteil ziehen, schließen z.B. Assays, betreffend VEGF-vermitteltes Endothelzellwachstum, VEGF-induzierte Phosphorylierung und VEGF-induzierte Gefäßpermeabilität, ebenso wie den Cornea-Micropocket-Assay der Neovaskularisierung und den Hühnchen-Chorio-Allantois-Membran-Assay (CAM)-Assay ein. Diese Assaysysteme können ebenso zu in-vitro- oder ex-vivo-Arznei-Screening-Assays entwickelt werden, bei denen die vorliegende Bereitstellung von biologischen Materialien mit gut definierten Eigenschaften besonders wichtig ist.

C. Immunkonjugate

[0445] Obwohl die vorliegende Erfindung überraschenderweise wirksame nackte oder nicht-konjugierte Antikörper zur Verwendung bei anti-angiogenen Verfahren bereitstellt, werden VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate, Immuntoxine und Coaguliganden ebenso hierdurch bereitgestellt. Gegenwärtig bevorzugte Mittel zur Verwendung bei VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden therapeutischen Konjugaten sind radiotherapeutische Mittel (beispielhaft veranschaulicht durch die Radiodiagnostika, die hierin offenbart sind), anti-angiogene Mittel, Apoptose-induzierende Mittel, Anti-Tubulin-Arzneien, antizelluläre oder cytotoxische Mittel und Coagulantien (Coagulationsfaktoren).

[0446] Um Immunkonjugate, Immuntoxine und Coaguliganden zu erzeugen, kann eine rekombinante Expression verwendet werden, um ein Fusionsprotein zu erzeugen, was Fachleuten bekannt ist und hierin weiter offenbart wird. In gleicher Weise können Immunkonjugate, Immuntoxine und Coaguliganden unter Verwendung von Avidin:Biotin-Brücken oder einer beliebigen Technologie aus der chemischen Konjugation und der Quervernetzung erzeugt werden, die im Hinblick auf Antikörperkonjugate entwickelt wurden.

C1. Toxische und anti-zelluläre Mittel

[0447] Für bestimmte Anwendungen werden die therapeutischen Mittel cytotoxische oder pharmakologische Mittel sein, insbesondere cytotoxische, cytostatische oder andersartig anti-zelluläre Mittel mit der Fähigkeit, das Wachstum oder die Zellteilung von Endothelzellen abzutöten oder zu unterdrücken. Im allgemeinen erwägen diese Aspekte der Erfindung die Verwendung eines beliebigen pharmakologischen Mittels, das an einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-artigen Antikörper konjugiert werden und in aktiver Form an das angezielte Endothel abgegeben werden kann.

[0448] Beispielhafte anti-zelluläre Mittel schließen chemotherapeutische Mittel, ebenso wie Cytotoxine ein. Chemotherapeutische Mittel, die verwendet werden können, schließen ein: Hormone, wie etwa Steroide, Anti-Metabolite, wie etwa Cytosin-Arabinosid, Fluoruracil, Methotrexat oder Aminopterin, Anthracycline, Mitomycin C, Vinca-Alkaloide, Demecolcin, Etoposid, Mithramycin, anti-Tumor-alkylierende Mittel, wie etwa Chlorambucil oder Melphalan. Andere Ausführungsformen können Mittel einschließen, wie etwa Cytokine. Im Grunde genommen kann jedes anti-zelluläre Mittel verwendet werden, solange wie es erfolgreich an einen Antikörper auf eine Weise konjugiert oder damit assoziiert werden kann, die sein Targeting, Internalisierung, Freisetzung und/oder Präsentation gegenüber Blutbestandteilen an dem Ort der Ziel-Endothelzellen ermöglicht.

[0449] Es kann Umstände geben, wie etwa, wenn das Ziel-Antigen nicht auf eine Route internalisiert wird, die mit einer effizienten Intoxikation durch die toxische Verbindung übereinstimmt, daß es erwünscht sein kann, chemotherapeutische Mittel, wie etwa Anti-Tumor-Arzneien, Cytokine, Antimetabolite, alkylierende Mittel, Hormone und ähnliche zielgerichtet einzusetzen. Eine Vielzahl von chemotherapeutischen und anderen pharmakologischen Mitteln sind jetzt in erfolgreicher Weise an Antikörper konjugiert worden, und es ist gezeigt worden, daß sie pharmakologisch wirken, einschließlich Doxorubicin, Daunomycin, Methotrexat, Vinblastin, Neocarzinostatin, Macromycin, Trenimon und α -Amanitin.

[0450] Unter anderen Umständen können jegliche potentielle Nebenwirkungen aus einer Cytotoxinbasierenden Therapie durch die Verwendung von DNA-Synthese-Inhibitoren eliminiert werden, wie etwa Daunorubicin,

Doxorubicin, Adriamycin und ähnliches. Diese Mittel sind deshalb bevorzugte Beispiele für anti-zelluläre Mittel zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung.

[0451] Im Hinblick auf cytostatische Mittel stören solche Verbindung im allgemeinen den natürlichen Zellzyklus einer Zielzelle, bevorzugt auf eine solche Weise, daß die Zelle aus dem Zellzyklus genommen wird.

[0452] Eine große Vielzahl von cytotoxischen Mitteln sind bekannt, die an VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper konjugiert werden können. Beispiele schließen zahlreiche nützliche Pflanzen-, Pilz- oder Bakterien-abgeleitete Toxine ein, die beispielsweise verschiedene A-Ketten-Toxine, insbesondere Ricin-A-Kette, Ribosomeninaktivierende Proteine, wie etwa Saporin oder Gelonin, α -Sarcin, Aspergillin, Restrictocin, Ribonucleasen, wie etwa Placenta-Ribonuclease, Diphtherie-Toxin und Pseudomonas-Exotoxin einschließen, um nur einige zu nennen.

[0453] Von den Toxinen werden Ricin-A-Ketten bevorzugt. Die bevorzugteste Toxingruppe zur Verwendung hierbei ist die Toxin-A-Kette, die behandelt worden ist, um Kohlenhydratreste zu modifizieren oder zu entfernen, die sogenannte deglycosylierte A-Kette (dgA). Deglycosylierte Ricin-A-Kette wird bevorzugt wegen ihrer extremen Potenz, längeren Halbwertszeit und da es ökonomisch machbar ist, sie in klinischer Qualität und Maßstab herzustellen.

[0454] Von einem pharmakologischen Standpunkt kann es wünschenswert sein, das kleinstmögliche Molekül zu verwenden, das nichtsdestotrotz eine geeignete biologische Antwort bereitstellt. Man kann somit wünschen, kleinere A-Ketten-Peptide zu verwenden, die eine adäquate antizelluläre Antwort bereitstellen werden. Zu diesem Zweck ist entdeckt worden, daß Ricin-A-Kette durch Entfernung von 30 N-terminalen Aminosäuren mit Nagarase (Sigma) „trunkiert“ werden kann und immer noch eine adäquate Toxinaktivität beibehält. Es wird vorgeschlagen, daß, sofern erwünscht, diese trunkierte A-Kette in Konjugaten in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden kann.

[0455] Alternativ kann man finden, daß die Anwendung von rekombinanter DNA-Technologie auf die Toxin-A-Kettengruppe zusätzliche Vorteile in Übereinstimmung mit der Erfindung liefern wird. Dadurch, daß die Klonierung und Expression von biologisch aktiver Ricin-A-Kette erreicht worden ist, ist es nun möglich, kleinere oder andersartig variierende Peptide zu identifizieren und herzustellen, die nichtsdestotrotz eine geeignete Toxinaktivität aufweisen. Darüberhinaus ermöglicht die Tatsache, daß die Ricin-A-Kette jetzt kloniert worden ist, die Anwendung von ortsgerichteter Mutagenese, durch welche man in leichter Weise A-Ketten-abgeleitete Peptide herstellen und screenen und zusätzliche nützliche Gruppen zur Verwendung im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung erhalten kann.

C2. Coagulationsfaktoren

[0456] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder die 2C3-basierenden Antikörper der Erfindung können an einen Bestandteil geknüpft sein, der in der Lage ist, die Coagulation direkt oder indirekt zu stimulieren, um einen Coaguliganden zu bilden. Hier können die Antikörper direkt an das Coagulans oder den Coagulationsfaktor geknüpft werden oder können an eine zweite Bindungsregion geknüpft werden, die das Coagulans oder den Coagulationsfaktor bindet und dann freisetzt. Wie hierin verwendet, werden die Begriffe „Coagulans“ und „Coagulationsfaktor“ jeder verwendet, um auf einen Bestandteil Bezug zu nehmen, der in der Lage ist, direkt oder indirekt die Coagulation unter geeigneten Bedingungen zu stimulieren, bevorzugt wenn er an eine spezifische in-vivo-Umgebung, wie etwa die Tumorgefäße, bereitgestellt wird.

[0457] Bevorzugte Coagulationsfaktoren sind Gewebefaktor-Zusammensetzungen, wie etwa trunkierter TF (tTF), dimere, multimere und mutante TF-Moleküle. „Trunkierter TF“ (tTF) bezieht sich auf TF-Konstrukte, die durch Entfernen von ausreichenden Aminosäuresequenzen membranbindungsdefizient gemacht werden, um diese Eigenschaftsveränderung durchzuführen. Eine „ausreichende Menge“ in diesem Kontext ist eine Menge an Transmembran-Aminosäuresequenz, die ursprünglich ausreichte, um das TF-Molekül in die Membran einzuführen oder anderweitig eine funktionelle Membranbindung des TF-Proteins zu vermitteln. Das Entfernen einer solchen „hinreichenden Menge einer transmembran-überspannenden Sequenz“ erzeugt deshalb ein trunkiertes Gewebefaktorprotein oder Polypeptid, das hinsichtlich der Phospholipidmembranbindungskapazität defizient ist, so daß das Protein im wesentlichen ein lösliches Protein ist, das nicht signifikant an Phospholipidmembranen bindet. Trunkierter TF vermag daher im wesentlichen nicht Faktor VII in Faktor VIIa in einem Standard-TF-Assay umzuwandeln, und behält doch die sogenannte katalytische Aktivität bei, einschließlich derjenigen, Faktor X in der Anwesenheit von Faktor VIIa zu aktivieren.

[0458] US Patent Nr. 5,504,067 beschreibt solche trunkierten Gewebefaktorproteine weiter. Bevorzugt wird den Gewebefaktoren zur Verwendung bei diesen Aspekten der vorliegenden Erfindung im allgemeinen die Transmembran- und cytosolischen Regionen (Aminosäuren 220-263) des Proteins fehlen. Jedoch ist es nicht notwendig, daß die trunkierten TF-Moleküle auf Moleküle mit der exakten Länge von 219 Aminosäuren beschränkt sind.

[0459] Gewebefaktorzusammensetzungen können ebenso als Dimere nützlich sein. Jedes der trunkierten, mutierten oder anderen Gewebefaktorenkonstrukte kann in einer dimeren Form zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung hergestellt werden. Wie Fachleuten bekannt sein wird, können solche TF-Dimere durch Verwendung der molekularbiologischen und rekombinanten Expressions-Standardtechniken hergestellt werden, bei denen zwei kodierende Regionen im Leserahmen hergestellt und aus einem Expressionsvektor exprimiert werden. In gleicher Weise können verschiedene chemische Konjugationstechnologien im Zusammenhang mit der Herstellung von TF-Dimeren verwendet werden. Die einzelnen TF-Monomere können vor der Konjugation derivatisiert werden. Alle solche Techniken sind Fachleuten in leichter Weise bekannt.

[0460] Wenn erwünscht, können die Gewebefaktor-Dimere oder -multimere über eine biologisch lösbare Bindung verbunden werden, wie etwa einen selektiv spaltbaren Linker oder Aminosäuresequenz. Zum Beispiel werden Peptidlinker, die eine Spaltungsstelle für ein Enzym einschließen, das sich bevorzugt in einer Tumorumgebung befindet oder darin aktiv ist, in Erwägung gezogen. Beispielhafte Formen für solche Peptidlinker sind diejenigen, die durch Urokinase, Plasmin, Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa oder eine Metalloproteinase, wie etwa Kollagenase, Gelatinase oder Stromelysin gespalten werden.

[0461] In bestimmten Ausführungsformen können die Gewebefaktor-Dimere weiter eine gehinderte hydrophobe Membran-Einführungsgruppe umfassen, um später die funktionelle Assoziation des Gewebefaktors mit der Phosphorlipidmembran zu fördern, aber nur unter bestimmten definierten Bedingungen. Wie in dem Kontext der trunkierten Gewebefaktoren beschrieben, sind hydrophobe Membran-Assoziationssequenzen im allgemeinen Abschnitte von Aminosäuren, die die Assoziation mit der Phosphorlipidumgebung aufgrund ihrer hydrophoben Natur fördern. In gleicher Weise können Fettsäuren verwendet werden, um die potentielle Membran-Einführungsgruppe bereitzustellen.

[0462] Solche Membran-Einführungssequenzen können sich entweder am N-Terminus oder dem C-Terminus des TF-Moleküls befinden oder allgemein an jeden anderen Punkt des Moleküls angehängt werden, solange, wie ihre Anhängung daran nicht die funktionellen Eigenschaften des TF-Konstrukts hindert. Der Zweck der gehinderten Einführungsgruppe ist die, daß sie nicht funktionell bleibt, bis sich das TF-Konstrukt innerhalb der Tumorumgebung befindet, und daß sie es dem hydrophoben Anhängsel ermöglicht, zugänglich zu werden und sogar darüber hinaus noch eine physische Assoziation mit der Membran zu fördern. Wiederum wird in Erwägung gezogen, daß biologisch lösbare Bindungen und selektiv spaltbare Sequenzen in diesem Hinblick besonders nützlich sein werden, wobei die Bindung oder Sequenz nur gespalten oder andersartig modifiziert wird bei Lokalisierung innerhalb der Tumorumgebung und Aussetzung gegenüber den jeweiligen Enzymen oder anderen bioaktiven Molekülen.

[0463] In anderen Ausführungsformen können die tTF-Konstrukte multimer oder polymer sein. In diesem Kontext enthält ein „polymeres Konstrukt“ drei oder mehr Gewebefaktor-Konstrukte. Ein „multimeres oder polymeres TF-Konstrukt“ ist ein Konstrukt, das ein erstes TF-Molekül oder Derivat umfaßt, das operativ an wenigstens ein zweites und ein drittes TF-Molekül oder Derivat angehängt ist. Die Multimere können zwischen ungefähr 3 und ungefähr 20 solcher TF-Moleküle umfassen. Die einzelnen TF-Einheiten innerhalb der Multimere oder Polymere können ebenso durch selektiv spaltbare Peptid-Linker oder andere biologisch lösbare Bindungen verknüpft sein, wie erwünscht. Wiederum können die Konstrukte, wie bei den oben diskutierten TF-Dimeren, in leichter Weise unter Verwendung von entweder rekombinanter Manipulation und Expression oder unter Verwendung von Standard-Syntheschemie hergestellt werden.

[0464] Sogar weitere TF-Konstrukte, die im Kontext der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind diejenigen Mutanten, die hinsichtlich der Fähigkeit, Faktor VII zu aktivieren, defizient sind. Solche „Faktor-VII-Aktivierungsmutanten“ werden im allgemeinen hierin als TF-Mutanten definiert, die funktionellen Faktor VII/VIIa binden, proteolytisch Faktor X aktivieren, im wesentlichen aber frei von der Fähigkeit sind, Faktor VII proteolytisch zu aktivieren. Entsprechend sind solche Konstrukte TF-Mutanten, denen die Faktor VII-Aktivierungsaktivität fehlt.

[0465] Die Fähigkeit von solchen Faktor VII-Aktivierungsmutanten, beim Fördern von tumorspezifischer Coagulation zu wirken, beruht auf ihrer spezifischen Abgabe an die Tumorgefäße und die Anwesenheit von Faktor

VIIa in niedrigen Konzentrationen im Plasma. Bei Verabreichung eines solchen Faktor VII-Aktivierungsmutantenkonjugats wird sich der Mutant an den Gefäßen eines vaskularisierten Tumors lokalisieren. Vor der Lokalisierung wäre die TF-Mutante im allgemeinen unfähig, die Coagulation an anderen Körperstellen zu fördern, auf der Grundlage ihrer Unfähigkeit, Faktor VII in Faktor VIIa umzuwandeln. Jedoch wird die Mutante nach Lokalisierung an und Akkumulation innerhalb der Tumorregion dann ausreichend Faktor VIIa aus dem Plasma antreffen, um den extrinsischen Coagulations-Pathway zu initiieren, was zu einer tumorspezifischen Thrombose führt. Exogener Faktor VIIa könnte ebenso einem Patienten verabreicht werden.

[0466] Eine oder mehrere aus einer Vielzahl von Faktor-VII-Aktivierungsmutanten können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung hergestellt und verwendet werden. Es gibt eine signifikante Menge an wissenschaftlicher Erkenntnis, betreffend die Erkennungsstellen auf dem TF-Molekül für Faktor VII/VIIa. Es wird somit klar sein, daß die Faktor-VII-Aktivierungsregion im allgemeinen zwischen ungefähr Aminosäure 157 und ungefähr Aminosäure 167 des TF-Moleküls liegt. Jedoch wird in Erwägung gezogen, daß sich Reste außerhalb dieser Region als ebenso relevant für die Faktor-VII-aktivierende Aktivität herausstellen können, und man kann deshalb in Erwägung ziehen, Mutationen in einen oder mehrere der Reste einzuführen, die sich im allgemeinen zwischen ungefähr Aminosäure 106 und ungefähr Aminosäure 209 der TF-Sequenz befinden (WO 94/07515, WO 94/28017).

[0467] Eine Vielzahl von anderen Coagulationsfaktoren können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, die durch die unten dargestellten Mittel beispielhaft veranschaulicht. Thrombin, Faktor V/Va und Derivate, Faktor VIII/VIIIa und Derivate, Faktor IX/IXa und Derivate, Faktor X/Xa und Derivate, Faktor XI/XIa und Derivate, Faktor XII/XIIa und Derivate, Faktor XIII/XIIIa und Derivate, Faktor-X-Aktivator und Faktor-V-Aktivator können bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0468] Russell's Schlangengift-Faktor-X-Aktivator wird zur Verwendung bei dieser Erfindung in Erwägung gezogen. Monoklonale Antikörper, die für den Faktor-X-Aktivator spezifisch sind, der in Russell's Schlangengift vorhanden ist, sind ebenso erzeugt worden und könnten verwendet werden, um spezifisch das Mittel als Teil eines bispezifischen Bindungsliganden abzugeben.

[0469] Thromboxan-A₂ wird aus Endoperoxiden durch die sequentiellen Wirkungen der Enzyme Cyclooxygenase und Thromboxansynthase in Blutplättchenmicrosomen gebildet. Thromboxan-A₂ wird in leichter Weise durch Plättchen erzeugt und ist ein potenter Vasoconstrictor aufgrund seiner Fähigkeit, eine Plättchenaggregation zu erzeugen. Sowohl Thromboxan-A₂ als auch aktive Analoge davon werden zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

[0470] Thromboxansynthase und andere Enzyme, die plättchenaktivierende Prostaglandine synthetisieren, können ebenso als „Coagulantien“ im vorliegenden Kontext verwendet werden. Monoklonale Antikörper gegen Thromboxansynthase und die Immunaффinitätsaufreinigung davon sind bekannt, ebenso wie die cDNA für humane Thromboxansynthase.

[0471] α2-Plasmin oder α2-Plasmin-Inhibitor ist ein natürlicherweise in menschlichem Plasma vorkommender Proteinaseinhibitor, der dahingehend wirkt, daß er die Lyse von Fibringerinnsel, die durch Plasminogenaktivator induziert wird, effizient inhibiert. α2-Antiplasmin ist ein besonders potenter Inhibitor und wird zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

[0472] Da die cDNA-Sequenz für α2-Antiplasmin zur Verfügung steht, werden rekombinante Expression und/oder Fusionsproteine bevorzugt. Monoklonale Antikörper gegen α2-Antiplasmin stehen ebenso zur Verfügung, die bei den bispezifischen Bindungsliganden-Ausführungsformen der Erfindung verwendet werden können. Diese Antikörper könnten sowohl verwendet werden, um exogenes α2-Antiplasmin an den Zielort abzugeben, oder um endogenes α2-Antiplasmin zu sammeln und innerhalb der Zielregion zu konzentrieren.

C3. Anti-Tubulin-Arzneien

[0473] Eine Vielzahl von Arzneien üben ihre Wirkungen durch Beeinträchtigung der Tubulin-Aktivität aus. Da Tubulinfunktionen für die Mitose und Zellebensfähigkeit essentiell sind, sind bestimmte „Anti-Tubulin-Arzneien“ starke chemotherapeutische Mittel. Einige der bekannteren und gegenwärtig bevorzugten Anti-Tubulin-Arzneien zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung sind Colchicin, Taxane, wie etwa Taxol, Vinca-Alkaloide, wie etwa Vinblastin, Vincristin und Vindesin, und Combretastatine. Andere geeignete Anti-Tubulin-Arzneien sind Cytochalasine (einschließlich B, J, E), Dolastatin, Auristatin PE, Paclitaxel, Ustiloxin D, Rhizoxin, 1069C85, Colcemid, Albendazol, Azatoxin und Nocodazol.

[0474] Wie in US Patent Nr. 5,892,069, 5,504,074 und 5,661,143 beschrieben, sind Combretastatine Estradiolderivate, die im allgemeinen die Zellmitose inhibieren. Beispielhafte Combretastatine, die im Zusammenhang mit der Erfindung verwendet werden können, schließlich diejenigen auf der Grundlage von Combretastatin A, B und/oder D und diejenigen ein, die in US Patenten Nr. 5,892,069, 5,504,074 und 5,661,143 beschrieben sind. Combretastatine A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3 und B-4 sind beispielhaft für die vorhergehenden Typen.

[0475] US Patent Nr. 5,569,786 und 5,409,953 beschreiben die Isolierung, strukturelle Charakterisierung und Synthese von jedem der Combretastatine A-1, A-2, A-3, B-1, B-2, B-3 und B-4 sowie Formulierungen und Verfahren zum Verwenden solcher Combretastatine, um neoplastisches Wachstum zu behandeln. Ein beliebiges oder mehrere von solchen Combretastatinen können zusammen mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0476] Combretastatin A-4, wie in US Patent Nr. 5,892,069, 5,504,074, 5,661,143 und 4,996,237 beschrieben, kann ebenso hiermit verwendet werden. US Patent Nr. 5,561,122 beschreibt geeignete Combretastatin-A-4-Prodrugs, die zur kombinierten Verwendung mit der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen werden.

[0477] US Patent Nr. 4,940,726 beschreibt insbesondere macrocyklische Lactone, bezeichnet als Combretastatin D-1 und „Combretastatin D-2“, von denen jedes in Kombination mit den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann. US Patent Nr. 5,430,062 betrifft Stilben-Derivate und Combretastatin-Analoga mit Anti-Krebs-Aktivität, die in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können.

C4. Anti-angiogene Mittel

[0478] Die vorliegende Erfindung stellt insbesondere kombinierte anti-angiogene Mittel bereit. Die Angiopoietine zusammen mit den Mitgliedern der VEGF-Familie sind Wachstumsfaktoren, die für Gefäßendothel spezifisch sind (Davis und Yancopoulos, 1999; Holash et al., 1999). Die zuerst beschriebenen Angiopoietine waren ein natürlich vorkommender Rezeptoraktivator oder -agonist, Angiopoietin-1 (Ang-1), und ein natürlich vorkommender Rezeptorantagonist, Angiopoietin-2 (Ang-2), von denen beide mittels des Endothelzell-Tyrosinkinase-Rezeptors, Tie2, wirken.

[0479] Zwei neue Angiopoietine, Angiopoietin-3 (Maus) und Angiopoietin-4 (human) sind ebenso identifiziert worden (Valenzuela et al., 1999). Angiopoietin-3 scheint als ein Antagonist zu wirken (wie Ang-2), während Angiopoietin-4 als ein Agonist zu wirken scheint (wie Ang-1) (Valenzuela et al., 1999). Ein als Angiopoietin-3 bezeichnetes Protein wurde ebenso aus menschlichem Herz kloniert, und es wurde berichtet, daß es keine mitogenen Effekte auf Endothelzellen hat (Kim et al., 1999).

[0480] Während VEGF für die frühen Stadien der Gefäßentwicklung notwendig ist, ist Angiopoietin-1 im allgemeinen für die späteren Stadien der Vaskularisierung erforderlich. VEGF wirkt somit dahingehend, daß es die Endothelzelldifferenzierung, Proliferation und primitive Gefäßbildung fördert. Angiopoietin-1 wirkt über den Tie2-Rezeptor, um die Aufrechterhaltung und Stabilisierung von reifen Gefäßen zu fördern. Angiopoietin-1 ist damit ein Reifungs- oder Stabilisierungsfaktor, von dem gedacht wird, daß er unreife Gefäße in reife Gefäße umwandelt, indem er Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und umgebenden Unterstützungszellen („support cells“) fördert (Holash et al., 1999).

[0481] Es ist gezeigt worden, daß Angiopoietin-1 die Revaskularisierung in ischämischem Gewebe steigert (Shyu et al., 1998) und daß es das Überleben von Gefäßnetzwerken erhöht, die entweder gegenüber VEGF oder einer Form eines aFGF ausgesetzt sind (Papapetropoulos et al., 1999). Diese Autoren zeigten ebenso, daß Angiopoietin-1 apoptotischen Tod in HUVEC verhindert, ausgelöst durch das Entfernen derselben Form des aFGF (Papapetropoulos et al., 1999). Solche Daten stimmen mit der direkten Rolle von Angiopoietin-1 auf humane Endothelzellen und seiner Wechselwirkung mit anderen angiogenen Molekülen zum Stabilisieren von Gefäßstrukturen durch Fördern des Überlebens von differenzierten Endothelzellen überein.

[0482] Da Angiopoietin-1 ein Reife- und Stabilitätssignal verleiht, haben die Erfinder diese Aspekte der vorliegenden Erfindung sorgfältig in Erwägung gezogen, die sich auf eine zielgerichtete Angiopoietin-1-Abgabe beziehen. Die Erfinder erwogen, daß, da Angiopoietin-1 ein Reifefaktor ist, es Tumorblutgefäße Wachstumsfaktor-unabhängig machen wird. Ein Aspekt dieser Erfindung betrifft deshalb die Verwendung von auf einen Tumor zielendes Angiopoietin-1, um die VEGF-nicht-responsiven Eigenschaften der Zielgefäße zu zementie-

ren.

[0483] Es wird gedacht, daß die Verwendung eines Tumor-bindenden Liganden, um Angiopoietin-1 an Tumorgefäße abzugeben, in leichter Weise Angiopoietin-1-Moleküle in der Größenordnung von 500.000 an ein Gefäßlumen abgeben würde. Dies würde das Tie2-Rezeptorsystem überwinden, die Tie2-Rezeptoren mit dem Angiopoietin-1-Liganden total absättigen. Angiopoietin-2 wäre somit unfähig, zu binden, und somit würden die kombinierten Effekte von Angiopoietin-2 und VEGF (siehe Diskussion unten) inhibiert.

[0484] Die Abgabe von Angiopoietin-1 an den Tumor, bevorzugt an die Tumorgefäße, kann ebenso im Zusammenhang mit einer Vielzahl von anderen Anti-Krebs-Strategien verwendet werden, wie im einzelnen hierin offenbart, um einen kombinierten therapeutischen Effekt zu erzielen. Die typische Antwort eines Tumors auf Therapien, die wenigstens eine gewisse Nekrose induzieren, ist es, eine Gefäßregeneration zu initiieren. Da das Angiopoietin-1-Signal die Blutgefäße zur Reife zwingt, wären sie unfähig, sich zu remodellieren, und könnten nicht den Verlust an Tumormasse kompensieren, der durch das primäre therapeutische Mittel induziert würde. Diese Beobachtungen stellen deshalb einen weiteren bevorzugten Aspekt der Angiopoietin-Abgabe-Erfindung bereit, nämlich die kombinierte Verwendung von zielgerichtetem Einsatz von Angiopoietin-1 in Kombination mit einem oder mehreren Anti-Krebsmitteln, einschließlich herkömmlicher chemotherapeutischer Arzneien.

[0485] Die Wirkung des Angiopoietin-1 nach Abgabe ist dem Grunde nach, die Gefäß-Remodellierung zu verhindern. Ob dies alleine verwendet wird oder in Kombinationstherapien, der Wert des zielgerichteten Einsatzes von Angiopoietin-1 wird besonders durch die Sicherheit verstärkt, die diesem therapeutischen Ansatz inneohnt. Es gibt keinen signifikanten Nachteil bei einer Angiopoietin-1-Therapie. Sogar im unwahrscheinlichen Falle, daß eine Menge des zielgerichtet eingesetzten Ang-1 auf nicht-Tumorgewebe fehlgesteuert wäre, würde hieraus lediglich resultieren, daß die Gefäße in dem angezielten Gebiet stabiler würden und/oder ruhen. Unter diesem Aspekt könnte Ang-1 ebenso als ein anti-entzündliches Mittel verwendet werden.

[0486] Angiopoietin-2 ist gegenwärtig ein bevorzugtes Mittel zur Verwendung bei einer auf einen Tumor zielenden Therapie, insbesondere in Kombination mit der VEGF-Inhibition der vorliegenden Erfindung. Jedoch haben aufgrund der differentiellen Effekte von Angiopoietin-2 unter verschiedenen Bedingungen, insbesondere im Hinblick auf variierende VEGF-Konzentrationen, die Erfinder wiederum sorgfältig diese Aspekte der Erfindung betrachtet, die sich auf die zielgerichtete Abgabe von Angiopoietin-2 beziehen.

[0487] Angiopoietin-2 ist ebenso ein Ligand für den Tie2-Rezeptor, wirkt aber im allgemeinen der Blutgefäßreifung/Stabilität entgegen, die durch Angiopoietin-1 vermittelt wird. Es ist somit ein Antagonist von Angiopoietin-1 und wirkt dahingehend, daß es die Kapillarstruktur stört. Unter geeigneten Bedingungen verleiht Angiopoietin-2 ein negatives Signal an die Zielzellen, und eine Destabilisierung, die durch Angiopoietin-2 induziert wird, führt zu einer Gefäßregression. Dies ist das erste Merkmal von Angiopoietin-2, das bei der zielgerichteten Abgabe von Angiopoietin-2 an Tumoren, bevorzugt an Tumorgefäße, ausgenutzt werden soll.

[0488] Es wird in Erwägung gezogen, daß die einfache Abgabe von ausreichend Angiopoietin-2, was unter Verwendung von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern, wie etwa 2C3, leicht erreicht werden kann, jedes andere Signal überwinden würde, das in der Tumorumgebung vorhanden sein könnte, und Gefäßregression fördern würde. Da es eine sorgfältig kontrollierte Wechselwirkung zwischen den Angiopoietinen in der natürlichen Umgebung gibt, kann eine extreme Beeinflussung des Systems zugunsten einer Regression durch andauerndes Angiopoietin-2-Signalgeben in hervorragender Weise die Effekte von sowohl Angiopoietin-1 als auch VEGF auslöschen.

[0489] Die Verwendung eines auf einen Tumor zielenden Angiopoietin-2 allein kann deshalb vorteilhaft verwendet werden, um Tumorgefäßregression zu induzieren, insbesondere als ein früher Mechanismus der therapeutischen Intervention. Im allgemeinen kann jedoch eine Destabilisierung, die durch Angiopoietin-2 induziert wird, entweder zu einer Gefäßregression oder -regeneration führen. Es ist die Destabilisierung in der Abwesenheit von anderen angiogenen Reizen, insbesondere VEGF, die zur Gefäßregression führt; während die Destabilisierung in der Anwesenheit von hohen Konzentrationen von VEGF die angiogene Antwort erleichtert (Holash et al., 1999).

[0490] Gefäße, die eine Destabilisierung in Antwort auf Angiopoietin-2 durchlaufen, können vor der Regression durch Aussetzen gegenüber anderen Reizen „gerettet“ werden. Angiopoietin-2 kann deshalb Endothelzellen empfindlich gegenüber anderen angiogenen Reizen machen und eine angiogene Antwort unter definierten Bedingungen erleichtern. Insbesondere kann VEGF Ang-2-destabilisierte Zellen dazu bringen, zu proliferieren.

rieren und primitive neue Gefäße zu bilden (Asahara et al., 1998; Holash et al., 1999). In der Tat ist über eine Angiopoietin-2-Expression in Tumorgewebe berichtet worden (Tanaka et al., 1999), wo vermutet wurde, daß es in Kombination mit VEGF wirkt, um die Angiogenese zu fördern (Stratmann et al., 1998). Die durch Angiopoietin-2 und VEGF initiierte Neovaskularisierung macht diese Moleküle „co-angiogen“.

[0491] Über ein koordiniertes Modell, um die positiven und negativen Effekte von Angiopoietin-2 auf Blutgefäße in bestimmten Tumortypen zu erklären, ist nun berichtet worden (Holash et al., 1999). Bei diesem Modell bewirkt eine Angiopoietin-2-induzierte Destabilisierung anfänglich eine signifikante Gefäßregression in Tumoren, die entstehen, indem sie Blutgefäße aus den umgebenden Wirtsgefäßen hinzuwählen („by coopting“). Die hohen Konzentrationen an Angiopoietin-2, erzeugt durch Tumor-assoziierte Endothelzellen, wirken dem Überlebenssignal entgegen, das anscheinend durch eine konstitutive Expression auf niedrigem Niveau von Angiopoietin-1 bereitgestellt wird. Angiopoietin-2 markiert somit hinzugewählte Gefäße für die apoptotische Regression (Holash et al., 1999). Trotz der resultierenden Tumornekrose regulieren jedoch überlebende Tumorzellen VEGF hoch, um ihr Überleben sicherzustellen. Die koinzidente Expression von VEGF und Angiopoietin-2 führt dann zu einer robusten Angiogenese an der Tumorperipherie, da VEGF das regressive Signal von Angiopoietin-2 nichtig macht und in der Tat eine Gefäßentwicklung fördert (Holash et al., 1999).

[0492] Obwohl anscheinend beim ersten Anblick widersprüchlich, können die Wirkungen von Angiopoietin-2 erklärt und weitgehend auf der Grundlage von anderen vorhandenen Signalen, insbesondere VEGF, vorhergesagt werden. In der Abwesenheit eines anderen angiogenen Signals bewirkt Angiopoietin-2, daß sich Gefäße destabilisieren und unreif werden, was zu einer Regression führt. In der Anwesenheit eines Stimulus, insbesondere VEGF, führt die Destabilisierung, die durch Angiopoietin-2 verursacht wird, tatsächlich zu einer Angiogenese, da die Gefäße bereitgemacht werden („primed“), um sekundäre angiogene Reize zu empfangen. Es wird somit geglaubt, daß die angiogenen Effekte einer Anzahl von Regulatoren erzielt werden, zumindest teilweise durch die Regulation einer autokrinen Schleife von Angiopoietin-2-Aktivität in Mikrogefäßendothelzellen (Mandriota und Pepper, 1998).

[0493] Die dualen biologischen Rollen von Angiopoietin-2 veranlassten die Erfinder dazu, zusätzliche therapeutische Strategien zu entwickeln, die andere Signale in der Tumorumgebung, insbesondere VEGF, berücksichtigen. Da Angiopoietin-2 und VEGF zusammenwirken, um die Angiogenese zu stimulieren, ist ein bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung, die auf einen Tumor zielende Angiopoietin-2-Abgabe in Kombination mit den vorliegenden VEGF-inhibitorischen Antikörpern zu verwenden. Dies wird sicherstellen, daß Angiopoietin-2 bei der Regression und nicht bei der Angiogenese wirkt.

[0494] Im Lichte der vorhergehenden Erklärungen wird verstanden werden, daß die vorliegende Erfindung VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, zur Verfügung stellt, die operativ an einen oder mehrere aus Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin-3 und/oder Angiopoietin-4 angehängt sind oder anderweitig funktionell damit assoziiert sind. Beispielhafte Angiopoietin-1-Zusammensetzungen sind diejenigen aus SEQ ID NO:1 (DNA) und SEQ ID NO:2 (Protein), während Angiopoietin-2-Zusammensetzungen beispielhaft veranschaulicht sind durch SEQ ID NO:3 (DNA) und SEQ ID NO:4 (Protein). Angiopoietin-3, das ein Antagonist ist, wird im allgemeinen wie Angiopoietin-2 verwendet werden; und der Agonist Angiopoietin-4 kann in der Weise wie Angiopoietin-1 verwendet werden. Der Artikel von Valenzuela et al. (1999) ergänzt die vorliegende Lehre im Hinblick auf Angiopoietin-3 und Angiopoietin-4 weiter.

[0495] Zusätzlich werden Fusionproteine von Angiopoietinen zur Verwendung bei dieser Erfindung in Erwägung gezogen. Ein Beispiel ist das stabile Ang-1-Ang-2-Fusionsprotein, das hierin als SEQ ID NO:5 eingeschlossen ist. Dieses Protein enthält die ersten 73 Reste von Angiopoietin-2, bis zu der DAPLEY-Sequenz, fusioniert an die Angiopoietin-1-Sequenz, beginnend bei Aminosäure 77. Sie hat ebenso eine Mutation an Position 265 in der Angiopoietin-1-Sequenz, wo Cys durch Ser ersetzt ist.

[0496] Andere anti-angiogene Mittel zur Verwendung hierbei schließen Angiostatin und Endostatin ein. Angiostatin wird in US Patenten 5,776,704, 5,639,725 und 5,733,876 offenbart. Angiostatin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen ungefähr 38 kD und ungefähr 45 kD, bestimmt durch reduzierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, das näherungsweise Kringle-Regionen 1 bis 4 eines Plasminogenmoleküls enthält. Angiostatin hat im allgemeinen eine Aminosäuresequenz, die im wesentlichen ähnlich derjenigen eines Fragments von murinem Plasminogen ist, beginnend bei Aminosäure Nummer 98 eines intakten murinen Plasminogenmoleküls.

[0497] Die Aminosäuresequenz von Angiostatin variiert geringfügig zwischen den Arten. Zum Beispiel ist beim humanen Angiostatin die Aminosäuresequenz im wesentlichen der Sequenz des oben beschriebenen

murinen Plasminogenfragments ähnlich, obwohl eine aktive humane Angiostatinsequenz an entweder Aminosäure Nummer 97 oder 99 einer intakten humanen Plasminogenamino-säuresequenz beginnen kann. Darüberhinaus kann humanes Plasminogen verwendet werden, da es eine ähnliche anti-angiogene Aktivität hat, wie in einem Maus-Tumor-Modell gezeigt.

[0498] Angiostatin und Endostatin sind der Fokus einer intensiven Studie geworden, da sie die ersten Angiogenese-Inhibitoren sind, die die Fähigkeit gezeigt haben, nicht nur Tumorstadium zu inhibieren, sondern auch Tumorstadium Regressionen im Mäusen zu verursachen. Es gibt vielfache Proteasen, von denen gezeigt worden ist, daß sie Angiostatin aus Plasminogen erzeugen, einschließlich Elastase, Macrophagen-Metalloelastase (MME), Matrilysin (MMP-7) und 92 kDa Gelatinase B/Typ IV Collagenase (MMP-9).

[0499] MME kann Angiostatin aus Plasminogen in Tumoren erzeugen, und Granulocyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) reguliert die Expression von MME durch Macrophagen hoch, und induziert somit die Erzeugung von Angiostatin. Die Rolle von MME bei der Angiostatin-Erzeugung wird durch das Ergebnis unterstützt, daß MME in der Tat in klinischen Proben aus hepatozellulären Carcinomen aus Patienten exprimiert wird. Eine andere Protease, von der gedacht wird, daß sie in der Lage ist, Angiostatin zu erzeugen, ist Stromelysin-1 (MMP-3). Es ist gezeigt worden, daß MMP-3 Angiostatin-artige Fragmente aus Plasminogen in vitro erzeugt. Der Wirkmechanismus für Angiostatin ist gegenwärtig unklar, es wird hypothesisiert, daß es an einen nicht-identifizierten Zelloberflächenrezeptor auf Endothelzellen bindet und die Endothelzelle dazu induziert, einen programmierten Zelltod oder Mitosearrest zu durchlaufen.

[0500] Endostatin scheint ein noch stärkeres Anti-Angiogenese- und Anti-Tumor-Mittel zu sein und wird besonders zum Verknüpfen an VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, bevorzugt. Endostatin ist wirksam bei dem Verursachen von Regressionen in einer Anzahl von Tumormodellen in Mäusen. Tumore entwickeln keine Resistenz gegenüber Endostatin und, nach mehrfachen Behandlungszyklen, treten Tumore in einen ruhenden Zustand ein, während dessen sie nicht in ihrem Volumen zunehmen. In diesem ruhenden Zustand wurde der prozentuale Anteil an Tumorzellen, die Apoptose durchlaufen, erhöht, was eine Population ergibt, die im wesentlichen dieselbe Größe behält.

[0501] US Patent Nr. 5,854,205 an Folkman und O'Reilly betrifft Endostatin und seine Verwendung als ein Inhibitor der Endothelzellproliferation und Angiogenese. Das Endostatinprotein entspricht einem C-terminalen Fragment von Collagentyp XVIII, und das Protein kann aus einer Vielzahl von Quellen isoliert werden. US Patent Nr. 5,854,205 lehrt ebenso, daß Endostatin eine Aminosäuresequenz eines Fragments von Collagentyp XVIII, einem Collagentyp XV oder BOVMPE-1-prägastrischer Esterase haben kann. Kombinationen von Endostatin mit anderen anti-angiogenen Proteinen, insbesondere Angiostatin, werden ebenso durch US Patent Nr. 5,854,205 beschrieben, so daß die kombinierten Zusammensetzungen in der Lage sind, in effektiver Weise die Masse eines Angiogenese-abhängigen Tumors zu verringern.

[0502] Endostatin und Angiostatin sind bevorzugte Mittel zur Tumorstadiumabgabe gemäß der vorliegenden Erfindung. Vasculostatin, Canstatin und Maspin sind ebenso bevorzugte Mittel. Insbesondere Endostatin ist eines der bevorzugtesten Mittel. Endostatin-2C3-Fusionsproteine können hergestellt werden, wie hierin beschrieben. Verschiedene Formen von chemisch verknüpften Endostatin-2C3-Konstrukten werden ebenso in der vorliegenden Anmeldung beschrieben.

C5. Apoptose-induzierende Mittel

[0503] Die vorliegende Erfindung kann ebenso verwendet werden, um Mittel abzugeben, die Apoptose in beliebigen Zellen innerhalb des Tumors induzieren, einschließlich Tumorzellen und Tumor-Gefäßendothelzellen. Obwohl viele Anti-Krebsmittel als Teil ihres Wirkmechanismus einen Apoptose-induzierenden Effekt haben können, sind bestimmte Mittel hiermit als einem primären Mechanismus, wie unten beschrieben, entdeckt, konstruiert oder ausgewählt worden.

[0504] Bei vielen Formen von Krebs wird über Mutationen in Tumor-Suppressorgenen, wie etwa p53, berichtet. Die Inaktivierung von p53 führt zu einem Versagen, die Apoptose zu fördern. Mit diesem Versagen schreiten Krebszellen bei der Tumorbildung weiter fort, statt daß sie für den Zelltod bestimmt werden. Daher wird die Abgabe von Tumor-Suppressoren ebenso zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen, um Zelltod zu stimulieren. Beispielhafte Tumor-Suppressoren schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf p53, Retinoblastom-Gen (Rb), Wilm'scher Tumor (WT1), Bax-alpha, Interleukin-1b-konvertierendes Enzym und Familie, MEN-1-Gen, Neurofibromatose vom Typ 1 (NF1), cdk-Inhibitor-p16, colorektales Krebsgen (DCC), familiäres Adenomatose-Polypose-Gen (FAP), multiples Tumor-Suppressorgen (MTS-1), BRCA1 und

BRCA2.

[0505] Bevorzugt zur Verwendung sind die p53- (U.S. Patent Nr. 5,747,469, 5,677,178 und 5,756,455), Retinoblastoma-, BRCA1- (U.S. Patent Nr. 5,750,400, 5,654,155, 5,710,001, 5,756,294, 5,709,999, 5,693,473, 5,753,441, 5,622,829 und 5,747,282), MEN-1- (GenBank Hinterlegungsnummer U93236) und Adenovirus E1A- (U.S. Patent Nr. 5,776,743)-Gene.

[0506] Andere Zusammensetzungen, die durch VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, abgegeben werden können, schließen Gene ein, die für Tumornekrosefaktorbezogenen, Apoptose-induzierenden Liganden, bezeichnet als TRAIL, und das TRAIL-Polypeptid kodieren (U.S. Patent Nr. 5,763,223); die 24 kD-Apoptose-assoziierte Protease von U.S. Patent Nr. 5,605,826; Fas-assoziierten Faktor 1, FAF1 (U.S. Patent Nr. 5,750,653). Ebenso zur Verwendung bei diesen Aspekten der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Interleukin-1- β -umwandelndem Enzym und Familienmitgliedern, von denen ebenso berichtet wird, daß sie Apoptose stimulieren.

[0507] Verbindungen, wie etwa Carbostyrylderivate (U.S. Patent Nr. 5,672,603 und 5,464,833), verzweigte apogene Peptide (U.S. Patent Nr. 5,591,717), Phosphotyrosin-Inhibitoren und nicht-hydrolysierbare Phosphotyrosin-Analoga (U.S. Patent Nr. 5,565,491 und 5,693,627), Agonisten von RXR-Retinoid-Rezeptoren (U.S. Patent Nr. 5,399,586) und sogar Antioxidantien (U.S. Patent Nr. 5,571,523) können ebenso verwendet werden. Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie etwa Genistein, können ebenso an die Mittel der vorliegenden Erfindung geknüpft werden, die auf den Zelloberflächenrezeptor, VEGFR1, abzielen, (wie von U.S. Patent Nr. 5,587,459 belegt).

C6. Biologisch funktionelle Äquivalente

[0508] Äquivalente oder sogar Verbesserungen von 2C3-basierenden Antikörpern oder jedem anderen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, können jetzt gemacht werden, im allgemeinen unter Verwendung der oben als ein Ausgangspunkt bereitgestellten Materialien. Modifizierungen und Veränderungen können in der Struktur eines solchen Antikörpers gemacht werden, und man würde immer noch ein Molekül mit ähnlichen oder anderweitig wünschenswerten Eigenschaften erhalten. Zum Beispiel können bestimmte Aminosäuren gegen andere Aminosäuren in einer Proteinstruktur ohne merkbaren Verlust einer interaktiven Bindungskapazität ausgetauscht werden. Diese Überlegungen betreffen ebenso Toxine, antiangiogene Mittel, Apoptose-induzierende Mittel, Coagulantien und ähnliche.

[0509] Da es die interaktive Kapazität und Natur eines Proteins ist, die die biologische funktionelle Aktivität dieses Proteins definiert, können bestimmte Aminosäuresequenzsubstitutionen in einer Proteinsequenz gemacht werden (oder natürlich in der zugrundeliegenden DNA-Sequenz), und man würde nichtsdestotrotz ein Protein mit ähnlichen (agonistischen) Eigenschaften erhalten. Es wird daher in Erwägung gezogen, daß verschiedene Veränderungen der Sequenz der Antikörper oder therapeutischen Mittel (oder der zugrundeliegenden DNA-Sequenzen) ohne einen merkbaren Verlust ihrer biologischen Nützlichkeit oder Aktivität gemacht werden können. Biologisch funktionelle Äquivalente, die aus dem Mutieren einer zugrundeliegenden DNA-Sequenz gemacht werden, können unter Verwendung der hierin in Tabelle A bereitgestellten Kodoninformation und der unterstützenden technischen Einzelheiten über ortsspezifische Mutagenese gemacht werden.

[0510] Es wird ebenso Fachleuten klar sein, daß der Definition eines „biologisch funktionellen äquivalenten“ Proteins oder Peptids das Konzept inhärent ist, daß es eine Grenze im Hinblick auf die Anzahl an Veränderungen gibt, die in einem definierten Teil des Moleküls gemacht werden können, um immer noch zu einem Molekül mit einem akzeptablen Niveau an äquivalenter biologischer Aktivität zu führen. Biologisch funktionelle äquivalente Proteine und Peptide werden daher hierin als diejenigen Proteine und Peptide definiert, bei denen bestimmte, nicht die meisten oder alle, Aminosäuren substituiert sein können. Natürlich können eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen/Peptiden mit unterschiedlichen Substitutionen in leichter Weise gemacht und in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden.

[0511] Aminosäuresubstitutionen beruhen im allgemeinen auf der relativen Ähnlichkeit der Aminosäureseitenkettensubstituenten, zum Beispiel im Hinblick auf ihre Hydrophobizität, Hydrophilie, Ladung, Größe und ähnliches. Eine Analyse der Größe, der Form und des Typs der Aminosäureseitenkettensubstituenten offenbart, daß Arginin, Lysin und Histidin alle positive geladene Reste sind, daß Alanin, Glycin und Serin alle eine ähnliche Größe haben, und daß Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin alle eine allgemein ähnliche Form haben. Deshalb werden hierin auf der Grundlage dieser Überlegungen Arginin, Lysin und Histidin; Alanin, Glycin und Serin; und Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin als biologisch funktionelle Äquivalente definiert.

[0512] Beim Durchführen von quantitativeren Veränderungen kann der hydropathische Index von Aminosäuren betrachtet werden. Jeder Aminosäure ist ein hydropathischer Index auf der Grundlage ihrer Hydrophobizität und ihrer Ladungseigenschaften zugeteilt, diese sind: Isoleucin (+4,5), Valin (+4,2), Leucin (+3,8), Phenylalanin (+2,8), Cystein/Cystin (+2,5), Methionin (+1,9), Alanin (+1,8), Glycin (−0,4), Threonin (−0,7), Serin (−0,8), Tryptophan (−0,9), Tyrosin (−1,3), Prolin (−1,6), Histidin (−3,2), Glutamat (−3,5), Glutamin (−3,5), Aspartat (−3,5), Asparagin (−3,5), Lysin (−3,9) und Arginin (−4,5).

[0513] Die wichtige Bedeutung des hydropathischen Aminosäureindex beim Verleihen von interaktiver biologischer Funktion an ein Protein wird allgemein auf dem Gebiet verstanden (Kyte und Doolittle, 1982) Es ist bekannt, daß bestimmte Aminosäuren gegen andere Aminosäuren mit einem ähnlichen hydropathischen Index oder Wert ausgetauscht werden können und immer noch eine ähnliche biologische Aktivität beibehalten. Beim Einführen von Veränderungen auf der Grundlage des hydropathischen Index wird die Substitution von Aminosäuren, deren hydropathische Indizes innerhalb von ± 2 sind, bevorzugt, diejenigen, die innerhalb von ± 1 sind, werden besonders bevorzugt und diejenigen innerhalb von $\pm 0,5$ sind sogar noch stärker bevorzugt.

[0514] Es ist somit klar, daß eine Aminosäure gegen eine andere mit einem ähnlichen Hydrophilie-Wert ausgetauscht werden kann, und daß man immer noch ein biologisch äquivalentes Protein erhalten wird. Wie in U.S. Patent Nr. 4,554,101 im einzelnen ausgeführt, sind die folgenden Hydrophilie-Werte Aminosäureresten zugeordnet: Arginin (+3,0), Lysin (+3,0), Aspartat (+3,0 \pm 1), Glutamat (+3,0 \pm 1), Serin (+0,3), Asparagin (+0,2), Glutamin (+0,2), Glycin (0), Threonin (−0,4), Prolin (−0,5 \pm 1), Alanin (−0,5), Histidin (−0,5), Cystein (−1,0), Methionin (−1,3), Valin (−1,5), Leucin (−1,8), Isoleucin (−1,8), Tyrosin (−2,3), Phenylalanin (−2,5), Tryptophan (−3,4).

[0515] Beim Einführen von Veränderungen, auf der Grundlage der Hydrophilie-Werte wird die Substitution von Aminosäuren, deren Hydrophilie-Werte innerhalb von ± 2 liegen, bevorzugt, diejenigen, die innerhalb von ± 1 liegen, werden besonders bevorzugt, und diejenigen innerhalb von $\pm 0,5$ werden sogar noch stärker bevorzugt

C7. Fusionsproteine und rekombinante Expression

[0516] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung können in leichter Weise als Fusionsproteine unter Verwendung von molekularbiologischen Techniken hergestellt werden. Jedes Fusionsprotein kann konstruiert und hergestellt werden unter Verwendung eines der hierin offenbarten therapeutischen Mittel und derjenigen Mittel, die Fachleuten bekannt sind, konstruiert und hergestellt werden. Die Fusionsproteintechnologie wird in leichter Weise angepaßt, um Fusionsproteine herzustellen, bei denen die beiden Teile durch eine selektiv spaltbare Peptidsequenz verbunden sind. Gegenwärtig bevorzugte Fusionsproteine sind diejenigen, enthaltend Endostatin. Das Endostatin, wie jedes andere Therapeutikum, kann an den Terminus des Antikörpers oder an einen Punkt, der zu den CDRs verschieden ist, angehängt werden. Therapeutika, wie etwa Endostatin, können eben „integriert“ hergestellt werden, wobei sie bevorzugt mit einem selektiv spaltbaren Peptid assoziiert sind, um die Freisetzung des Mittels nach dem zielgerichteten Einsatz („targeting“) zu ermöglichen.

[0517] Die Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken, um solche Zwecke zu erzielen, ist jetzt Standardpraxis bei Fachleuten auf dem Gebiet. Diese Verfahren schließen zum Beispiel in-vitro rekombinante DNA-Techniken, synthetische Techniken, und in-vivo-Rekombination/genetische Rekombination ein. DNA- und RNA-Synthese kann zusätzlich durchgeführt werden unter Verwendung eines automatisierten Synthesizers (siehe zum Beispiel die in Sambrook et al., 1989, beschriebenen Techniken).

[0518] Die Herstellung eines solchen Fusionsproteins beinhaltet im allgemeinen die Herstellung einer ersten und einer zweiten DNA-kodierenden Region und die funktionelle Ligation oder Verbindung von solchen Regionen, im Leserahmen, um eine einzelne kodierende Region herzustellen, die für das erwünschte Fusionsprotein kodiert. Im vorliegenden Kontext wird die VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-artige Antikörper-DNA-Sequenz im Leserahmen mit einer DNA-Sequenz verbunden, die für ein therapeutisches Mittel kodiert. Es wird nicht allgemein geglaubt, daß es besonders wichtig ist, welcher Teil des Konstrukts als die N-terminale Region oder als die C-terminale Region hergestellt wird.

[0519] Wenn die erwünschte kodierende Region erzeugt worden ist, wird ein Expressionsvektor erzeugt. Expressionsvektoren enthalten einen oder mehrere Promoter stromauf von den eingeführten DNA-Regionen, die dahingehend wirken, daß sie die Transkription der DNA fördern und somit die Expression des kodierten rekombinanten Proteins fördern. Dies ist die Bedeutung von „rekombinanter Expression“.

[0520] Um eine sogenannte „rekombinante“ Version des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Immunkonjugats zu erhalten, wird es in einer rekombinanten Zelle exprimiert. Die gentechnische Herstellung eines DNA-Segments (von DNA-Segmenten) zur Expression in einem prokaryotischen oder eukaryotischen System kann mittels Techniken durchgeführt werden, die im allgemeinen Fachleuten auf dem Gebiet der rekombinanten Expression bekannt sind. Es wird geglaubt, daß praktisch jedes Expressionssystem bei der Expression von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Immunkonjugat-Konstrukten verwendet werden kann.

[0521] Solche Proteine können erfolgreich in eukaryotischen Expressionssystemen, z. B. CHO-Zellen, exprimiert werden, jedoch wird erwogen, daß bakterielle Expressionssysteme, wie etwa E. coli pQE-60, für die Herstellung in großem Maßstab und für die darauffolgende Aufreinigung der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Immunkonjugate besonders nützlich sein wird. Die cDNAs können ebenso in bakteriellen Systemen exprimiert werden, wobei die kodierten Proteine als Fusionen mit β -Galactosidase, Ubiquitin, Schistosoma japonicum-Glutathion-S-Transferase und ähnlichem exprimiert werden. Es wird geglaubt, daß die bakterielle Expression Vorteile gegenüber eukaryotischer Expression im Hinblick auf die Leichtigkeit der Verwendung und der Menge an dadurch erhaltenen Materialien haben wird.

[0522] Hinsichtlich der mikrobiellen Expression ergänzen U.S. Patent Nr. 5,583,013, 5,221,619, 4,785,420, 4,704,362 und 4,366,246 die vorliegende Offenbarung im Zusammenhang mit der Expression von Genen in rekombinanten Wirtszellen sogar noch weiter.

[0523] Rekombinant produzierte VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate können aufgereinigt und zur humanen Verabreichung formuliert werden. Alternativ können für die Immunkonjugate kodierenden Nukleinsäuren mittels Gentherapie abgegeben werden. Obwohl nackte rekombinante DNA oder Plasmide verwendet werden können, wird die Verwendung von Liposomen oder Vektoren bevorzugt. Die Fähigkeit von bestimmten Viren, in Zellen über eine Rezeptor-vermittelte Endocytose einzudringen und sich in das Wirtzellgenom zu integrieren und in stabiler und effizienter Weise virale Gene zu exprimieren, haben sie zu attraktiven Kandidaten für den Transfer von Fremdgenen in Säugetierzellen gemacht. Bevorzugte Gentherapievektoren zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung werden im allgemeinen virale Vektoren sein.

[0524] Retroviren sind vielversprechend als Gen-Abgabe-Vektoren aufgrund ihrer Fähigkeit, ihre Gene in das Wirtsgenom zu integrieren, wobei sie eine große Menge an fremdem genetischem Material übertragen, ein breites Spektrum an Spezies und Zelltypen infizieren und in speziellen Zelllinien verpackt werden. Andere Viren, wie etwa Adenovirus, Herpes Simplex-Viren (HSV), Cytomegalovirus (CMV) und Adeno-assoziiertes Virus (AAV), wie etwa diejenigen, die von U.S. Patent Nr. 5,139,941 beschrieben werden, können ebenso konstruiert werden, um als Vektoren für den Gentransfer zu dienen.

[0525] Obwohl einige Viren, die fremdes genetisches Material aufnehmen können, hinsichtlich der Anzahl von Nukleotiden, die sie unterbringen können, und hinsichtlich des Bereichs an Zellen, die sie infizieren, beschränkt sind, ist dennoch gezeigt worden, daß diese Viren in erfolgreicher Weise eine Genexpression durchführen. Jedoch integrieren Adenoviren ihr genetisches Material nicht in das Wirtsgenom und erfordern deshalb keine Wirtsreplikation für die Genexpression, was sie ideal geeignet für eine rasche, effiziente, heterologe Genexpression macht. Techniken zum Herstellen von Replikations-defizienten infektiösen Viren sind auf dem Gebiet wohl bekannt.

[0526] In bestimmten weiteren Ausführungsformen wird der Gentherapievektor HSV sein. Ein Faktor, der HSV einen attraktiven Vektor macht, ist die Größe und die Organisation des Genoms. Da HSV groß ist, ist der Einbau von vielfachen Genen oder Expressionskassetten weniger problematisch als in anderen kleineren viralen Systemen. Zusätzlich macht die Verfügbarkeit unterschiedlicher viraler Kontrollsequenzen mit variierender Leistung (z. B. temporal, Stärke), es möglich, die Expression in einem größeren Ausmaß als in anderen Systemen zu kontrollieren. Es ist ebenso ein Vorteil, daß das Virus relativ wenige gespleißte („spliced“) Informationen hat, was die genetischen Manipulationen weiter erleichtert. HSV ist ebenso leicht zu manipulieren und kann in hohen Titern wachsgelassen werden.

[0527] Natürlich wird man beim Verwendung von viralen Abgabesystemen es wünschen, das Virion ausreichend aufzureinigen, um es im wesentlichen frei von unerwünschten Kontaminantien zu machen, wie etwa defizienten störenden viralen Partikeln oder Endotoxinen und andere Pyrogenen, so daß es nicht irgendwelche unerwünschte Reaktionen in der Zelle, dem Tier oder dem Individuum verursachen wird, die das Vektorkonstrukt empfangen. Ein bevorzugtes Mittel zum Aufreinigen des Vektors beinhaltet die Verwendung von

Schwimmdichte-Gradienten, wie etwa Cäsiumchlorid-Gradienten-Zentrifugation.

C8. Antikörperkonjugate

[0528] VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper können an anti-zelluläre oder cytotoxische Mittel konjugiert werden, um „Immuntoxine“ herzustellen; oder sie können operativ mit Bestandteilen assoziiert werden, die in der Lage sind, direkt oder indirekt die Coagulation zu stimulieren, wodurch sie einen „Coaguliganden“ bilden. Bei Coaguliganden kann der Antikörper direkt an einen direkten oder indirekten Coagulationsfaktor verknüpft werden, oder kann an eine zweite Bindungsregion verknüpft werden, die an einen direkten oder indirekten Coagulationsfaktoren bindet und ihn dann freisetzt. Der „zweite Bindungsregion“-Ansatz verwendet im allgemeinen einen Coagulans-bindenden Antikörper als eine zweite Bindungsregion, was zu einem bispezifischen Antikörperkonstrukt führt. Die Herstellung und Verwendung von bispezifischen Antikörpern ist im allgemeinen gut auf dem Gebiet bekannt und wird hierin weiter offenbart.

[0529] Bei der Herstellung von Immuntoxinen, Coaguliganden und bispezifischen Antikörpern kann eine rekombinante Expression verwendet werden. Die Nukleinsäuresequenzen, die für den ausgewählten Antikörper kodieren, werden im Leserahmen an Nukleinsäuresequenzen angehängt, die für das ausgewählte Toxin, Coagulans oder zweite Bindungsregion kodieren, um eine Expressionseinheit oder -vektor zu erzeugen. Rekombinante Expression führt zur Translation der neuen Nukleinsäure, um das erwünschte Proteinprodukt zu ergeben. Obwohl Antikörper-kodierende Nukleinsäuren verwendet werden statt Protein-Bindungs-liganden, ist der rekombinante Ansatz im wesentlichen derselbe, wie diejenigen, die hierin oben beschrieben werden.

[0530] Zurückkehrend auf die Konjugat-Technologie, die Herstellung von Immuntoxinen ist im allgemeinen wohlbekannt auf dem Gebiet. Jedoch können bestimmte Vorteile durch die Anwendung von bestimmten bevorzugten Technologien erzielt werden sowohl bei der Herstellung der Immuntoxine als auch bei ihrer Aufreinigung für die darauffolgende klinische Verabreichung. Zum Beispiel werden, während IgG-basierende Immuntoxine typischerweise bessere Bindungsfähigkeit und langsamere Blut-Clearance als ihre Fab'-Gegenstücke aufweisen werden, die Fab'-Fragment-basierenden Immuntoxine im allgemeinen eine bessere Gewebe-Penetrationsfähigkeit aufweisen im Vergleich zu IgG-basierenden Immuntoxinen.

[0531] Zusätzlich, während zahlreiche Typen an Disulfid-Bindung-enthaltenden Linkern bekannt sind, die in erfolgreicher Weise verwendet werden können, um die Toxingruppe an den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörpern zu konjugieren, werden im allgemeinen bestimmte Linker gegenüber anderen Linkern bevorzugt werden, auf der Grundlage unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften und Fähigkeiten. Zum Beispiel sind Linker, die eine Disulfidbindung enthalten, die sterisch „gehindert“ („hindered“) ist, aufgrund ihrer größeren Stabilität in vivo zu bevorzugen, wodurch sie die Freisetzung der Toxingruppe vor der Bindung an die Wirkungsstelle verhindern.

[0532] Eine große Vielzahl von cytotoxischen Mitteln sind bekannt, die an VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper konjugiert werden können, einschließlich Pflanzen-, Pilz- und Bakterien-abgeleiteten Toxinen, wie etwa Ricin-A-Kette oder deglykosylierte A-Kette. Die Quervernetzung einer Toxin-A-Kette an einen Antikörper erfordert in bestimmten Fällen einen Quervernetzer, der Disulfidfunktionen präsentiert. Der Grund hierfür ist unklar, beruht aber wahrscheinlich auf einem Bedarf bestimmter Toxingruppen, daß sie in leichter Weise von dem Antikörper freisetzbar sind, sobald das Mittel das Toxin an die angezielten Zellen „abgeben“ hat.

[0533] Jeder Typ Quervernetzer, ebenso wie die Art und Weise, wie die Quervernetzung durchgeführt wird, wird dazu tendieren, die Pharmakodynamik des resultierenden Konjugats zu variieren. Letztendlich wird man in Fällen, bei denen ein freisetzbares Toxin in Erwägung gezogen wird, es wünschen, ein Konjugat zu haben, das unter Bedingungen in Takt bleiben wird, die überall im Körper gefunden werden, außer an der beabsichtigten Wirkungsstelle, dem Punkt, an dem es wünschenswert ist, daß das Konjugat gute „Freisetzung“-Eigenschaften hat. Deshalb werden das bestimmte Quervernetzungsschema, einschließlich insbesondere des individuellen Quervernetzungsreagenz, das verwendet wird, und die Strukturen, die quervernetzt werden, von einer gewissen Bedeutung sein.

[0534] Abhängig von der spezifischen Toxinverbindung, die als Teil des Fusionsprotein verwendet wird, kann es notwendig sein, einen Peptid-Spacer bereitzustellen, in dem man operativ den Antikörper und die Toxinverbindung anhängt, die in der Lage ist, in eine Disulfid-gebundene Schleifenstruktur zu falten. Proteolytische Spaltung innerhalb der Schleife würde dann ein heterodimeres Polypeptid ergeben, bei dem der Antikörper und die Toxin-Verbindung durch nur eine einzelne Disulfidbindung verknüpft sind. Ein Beispiel für ein solches

Toxin ist ein Ricin-A-Ketten-Toxin.

[0535] Wenn bestimmte andere Toxinverbindungen verwendet werden, kann ein nicht-spaltbarer Peptidspacer bereitgestellt werden, um den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper und die Toxinverbindung des Fusionsproteins operativ anzuhängen. Toxine, die im Zusammenhang mit nicht-spaltbaren Peptid-Spacern verwendet werden können, sind diejenigen, die mittels proteolytischer Spaltung selbst in eine cytotoxische Disulfid-gebundene Form umgewandelt werden können. Ein Beispiel für eine solche Toxinverbindung ist eine Pseudomonas-Exotoxin-Verbindung.

[0536] Es kann Umstände geben, wie zum Beispiel, wenn das Target-Antigen nicht auf eine Route internalisiert wird, die mit einer effizienten Vergiftung durch Immuntoxine konsistent ist, unter denen man chemotherapeutische Mittel, wie etwa Anti-Tumor-Arzneien, andere Cytokine, Antimetaboliten, alkylierende Mittel, Hormone und ähnliche zielgerichtet einsetzen möchte. Eine Vielzahl von chemotherapeutischen und anderen pharmakologischen Mitteln sind jetzt erfolgreich an Antikörper konjugiert worden, und es ist gezeigt worden, daß sie pharmakologisch wirken. Beispielhafte antineoplastische Mittel, die erforscht worden sind, schließen Doxorubicin, Daunomycin, Methotrexat, Vinblastin und verschiedene andere ein. Darüberhinaus ist das Anhängen von anderen Mitteln, wie etwa Neocarzinostatin, Macromycin, Trenimon und α -Amanitin beschrieben worden.

[0537] Wenn Coagulationsfaktoren im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sollte jede kovalente Verknüpfung an den Antikörper an einer Stelle gemacht werden, die von seiner funktionellen coagulierenden Stelle unterschiedlich ist. Die Zusammensetzungen sind somit in jeglicher operativer Weise „verknüpft“, die es jeder Region ermöglicht, ihre beabsichtigte Funktion ohne signifikante Beeinträchtigung durchzuführen. Daher bindet der Antikörper an VEGF, und der Coagulationsfaktor fördert die Blutgerinnung.

C9. Biochemische Quervernetzer

[0538] Zusätzlich zu der oben bereitgestellten allgemeinen Information können VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper an ein oder mehrere therapeutische Mittel konjugiert werden unter Verwendung von bestimmten bevorzugten biochemischen Quervernetzern. Quervernetzende Reagenzien werden verwendet, um molekulare Brücken zu bilden, die funktionelle Gruppen von zwei verschiedenen Molekülen zusammen binden. Um zwei unterschiedliche Proteine auf eine abgestufte Weise zu verknüpfen, können hetero-bifunktionelle Quervernetzer verwendet werden, die eine unerwünschte Homopolymer-Bildung eliminieren. Beispielhafte hetero-bifunktionelle Quervernetzer sind in Tabelle B1 aufgeführt.

TABELLE B1

Hetero-bifunktionelle Quervernetzer

Linker	Reaktiv gegen- über	Vorteile und Anwendungen	Länge des Spacer-Arms nach Querver- netzung
SMPT	Primäre Amine Sulphydryle	• Größere Stabilität	11,2 A
SPDP	Primäre Amine Sulphydryle	• Thiolierung • spaltbare Quervernetzung	6,8 A
LC-SPDP	Primäre Amine Sulphydryle	• ausgedehnter Spacer-Arm	15,6 A
Sulfo-LC-SPDP	Primäre Amine Sulphydryle	• ausgedehnter Spacer-Arm • wasserlöslich	15,6 A
SMCC	Primäre Amine Sulphydryle	• stabile, reaktive Maleimid-Gruppe • Enzym-Antikörper-Konjugation • Hapten-Carrier-Protein-Konjugation	11,6 A
Sulfo-SMCC	Primäre Amine Sulphydryle	• stabile, reaktive Maleimid-Gruppe • wasserlöslich • Enzym-Antikörper-Konjugation	11,6 A
MBS	Primäre Amine Sulphydryle	• Enzym-Antikörper-Konjugation • Hapten-Carrierprotein-Konjugation	9,9 A
Sulfo-MBS	Primäre Amine Sulphydryle	• wasserlöslich	9,9 A
SIAB	Primäre Amine Sulphydryle	• Enzym-Antikörper-Konjugation	10,6 A
Sulfo-SIAB	Primäre Amine Sulphydryle	• wasserlöslich	10,6 A
SMPB	Primäre Amine Sulphydryle	• ausgedehnter Spacer-Arm • Enzym-Antikörper-Konjugation	14,5 A
Sulfo-SMPB	Primäre Amine Sulphydryle	• ausgedehnter Spacer-Arm • wasserlöslich	14,5 A
EDC/Sulfo-NHS	Primäre Amine Carboxylgruppen	• Hapten-Carrier-Konjugation	0
ABH	Kohlenhydrate Nicht selektiv	• Reagiert mit Zuckergruppen	11,9 A

[0539] Hetero-bifunktionelle Quervernetzer enthalten zwei reaktive Gruppen: eine, die im allgemeinen mit einer primären Aminogruppe reagiert (N-Hydroxysuccinimid), und die andere, die im allgemeinen mit einer Thiolgruppe reagiert (z. B. Pyridyldisulfid, Maleimide, Halogene, etc.). Durch die reaktive primäre Aminogruppe kann der Quervernetzer mit dem Lysinrest (den Lysinresten) eines Proteins reagieren (z. B. des ausgewählten Antikörpers oder Fragments), und durch die reaktive Thiolgruppe reagiert der Quervernetzer, der bereits an das erste Protein gebunden ist, mit dem Cysteinrest (freie Sulphydrylgruppe) des anderen Proteins (z. B. des Coagulans).

[0540] Zusammensetzungen haben deshalb im allgemeinen eine funktionelle Gruppe, die für Quervernetzungs-zwecke zur Verfügung steht, oder sind dahingehend derivatisiert, daß sie eine solche haben. Dieses Erfordernis wird als nicht beschränkend angesehen, dahingehend, daß eine große Vielzahl von Gruppen auf diese Weise verwendet werden kann. Zum Beispiel können primäre oder sekundäre Amingruppen, Hydrazid- oder Hydrazin-Gruppen, Carboxylalkohol-, Phosphat-, oder alkylierende Gruppen für eine Bindung oder Quervernetzung verwendet werden.

[0541] Der Spacer-Arm zwischen den beiden reaktiven Gruppen eines Quervernetzers kann verschiedene Längen und chemische Zusammensetzungen haben. Ein längerer Spacer-Arm ermöglicht eine bessere Flexibilität der Konjugat-Bestandteile, während einige besondere Bestandteile in der Brücke (z. B. Benzolgruppe) der reaktiven Gruppe eine Extrastabilität oder eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der chemischen Bindung gegenüber der Wirkung von verschiedenen Aspekten verleihen können (z. B. eine Disulfidbindung, die gegenüber Reduktionsmitteln resistent ist). Die Verwendung von Peptid-Spacern, wie etwa L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala, wird ebenso in Erwägung gezogen.

[0542] Es wird bevorzugt, daß ein Quervernetzer mit einer vernünftigen Stabilität im Blut verwendet werden wird. Zahlreiche Typen an Disulfidbindung-enthaltenden Linkern sind bekannt, die erfolgreich verwendet werden können, um Zielmittel („targeting agents“) und toxische oder coagulierende Mittel zu konjugieren. Es kann sich herausstellen, daß Linker, die eine Disulfidbindung enthalten, die sterisch gehindert ist, eine größere Stabilität in vivo ergeben, was die Freisetzung des Mittels vor der Bindung an die Wirkungsstelle verhindert. Diese Linker sind somit eine bevorzugte Gruppe von verknüpfenden Mitteln.

[0543] Eines der am bevorzugtesten quervernetzenden Reagenzien zur Verwendung bei Immuntoxinen ist SMPT, das ein bifunktionseller Quervernetzer ist, enthaltend eine Disulfidbindung, die durch einen angrenzenden Benzolring und Methylgruppen „sterisch gehindert“ ist. Es wird geglaubt, daß die sterische Hinderung der Disulfidbindung als eine Funktion zum Schutz der Bindung vor einem Angriff durch Thiolat-Anionen dient, wie etwa Glutathion, das in Geweben und Blut vorhanden sein kann, und dadurch beim Verhindern eines Entkopplens des Konjugats vor der Abgabe des angehängten Mittels an die Tumorstelle hilft. Es wird in Erwägung gezogen, daß das SMPT-Mittel ebenso im Zusammenhang mit den bispezifischen Liganden dieser Erfindung verwendet werden kann.

[0544] Das SMPT-Quervernetzungsreagenz, ebenso wie viele andere bekannte quervernetzenden Reagenzien, verleihen die Fähigkeit, funktionelle Gruppen, wie etwa das SH von Cystein oder primäre Amine (z. B. die ε-Aminogruppe von Lysin) quervernetzen. Ein anderer möglicher Typ Quervernetzer schließt die hetero-bifunktionsellen photoreaktiven Phenylazide ein, enthaltend eine spaltbare Disulfidbindung, wie etwa Sulfosuccinimidyl-2-(p-azido-salicylamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat. Die N-Hydroxysuccinimidylgruppe reagiert mit primären Aminogruppen, und das Phenylazid (nach Photolyse) reagiert nicht-selektiv mit einem beliebigen Aminosäurerest.

[0545] Zusätzlich zu gehinderten Quervernetzern können nicht-gehinderte Linker ebenso in Übereinstimmung hiermit verwendet werden. Andere nützliche Quervernetzer, von denen nicht gedacht wird, daß sie ein geschütztes Disulfid enthalten oder erzeugen, schließen SATA, SPDP und 2-Iminothiolan ein. Die Verwendung von solchen Quervernetzern wird auf dem Gebiet gut verstanden.

[0546] Nach der Konjugation wird das Konjugat von nicht-konjugierten Zielmitteln und therapeutischen Mitteln und von anderen Kontaminationen getrennt. Eine große Vielzahl an Aufreinigungstechniken steht zur Verwendung beim Bereitstellen von Konjugaten mit einem hinreichenden Grad an Reinheit für den klinischen Nutzen zur Verfügung. Aufreinigungsverfahren auf der Grundlage von Größentrennung, wie etwa Gelfiltration, Gelpermeationschromatographie oder Hochleistungs-Flüssigchromatographie, werden im allgemeinen am nützlichsten sein. Andere chromatographische Techniken wie etwa Blue-Sepharose-Trennung, können ebenso verwendet werden.

C10. Biologisch lösbare Linker

[0547] Obwohl es bevorzugt ist, daß eine beliebige Verknüpfungsgruppe eine vernünftige Stabilität im Blut haben wird, um eine wesentliche Freisetzung des angehängten Mittels vor dem Zielen auf die Krankheitsstelle oder Tumorstelle zu verhindern, wird in bestimmten Aspekten die Verwendung von biologisch freisetzbaren Bindungen und/oder selektiv spaltbaren Spacern oder Linkern in Erwägung gezogen. „Biologisch lösbare Bindungen“ und „selektiv spaltbare Spacer oder Linker“ haben immer noch eine vernünftige Stabilität im Kreislauf.

[0548] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper der vorliegenden Erfindung, wie etwa 2C3-artige Antikörper, können daher an ein oder mehrere therapeutische Mittel über eine biologisch lösbare Bindung verknüpft werden. Jede Form von VEGFR2-blockierendem, Anti-VEGF-Antikörper oder „Ziel-Antikörper oder Mittel“ („targeting antibody or agent“) können verwendet werden, einschließlich intakter Antikörper, obwohl ScFv-Fragment in bestimmten Ausführungsformen bevorzugt sein werden.

[0549] „Biologisch lösbare Bindungen“ oder „selektiv hydrolysierbare Bindungen“ schließen alle Bindungen ein, die lösbar, spaltbar oder nur hydrolysierbar oder dieses bevorzugt unter bestimmten Bedingungen sind. Dies schließt Disulfid- und Trisulfid-Bindungen und säure-labile Bindungen ein, wie in U.S. Patent Nr. 5,474,765 und 5,762,918 beschrieben, von denen jedes spezifisch durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0550] Die Verwendung eines säureempfindlichen Spacer zum Anhängen eines therapeutischen Mittels oder Arznei an einen Antikörper der Erfindung wird insbesondere in Erwägung gezogen. In solchen Ausführungsformen werden die therapeutischen Mittel oder Arzneien in den sauren Kompartimenten in einer Zelle freigesetzt. Es wird in Erwägung gezogen, daß eine säureempfindliche Freisetzung extrazellulär stattfinden kann, aber immer noch nach einem spezifischen Zielen („targeting“), bevorzugt auf die Tumorstelle. Bestimmte gegenwärtig bevorzugte Beispiele schließen 2C3-artige Antikörper ein, die an Colchicin oder Doxorubicin über einen säureempfindlichen Spacer geknüpft sind. Die Anhängung über die Kohlenhydratgruppen der Antikörper wird ebenso in Erwägung gezogen. In solchen Ausführungsformen werden die therapeutischen Mittel oder Arzneien in den sauren Kompartimenten innerhalb einer Zelle freigesetzt.

[0551] Der Ziel-Anti-VEGF-Antikörper („targeting anti-VEGF antibody“) kann ebenso derivatisiert werden, um funktionelle Gruppen einzuführen, die das Anhängen des therapeutischen Mittels (der therapeutischen Mittel) durch eine biologisch freisetzbare Bindung ermöglichen. Der Ziel-Antikörper kann somit derivatisiert werden, um Seitenketten einzuführen, die in Hydrazid-, Hydrazin-, primären Amin- oder sekundären Amingruppen enden. Therapeutische Mittel können durch eine Schiffsche Basenverknüpfung, eine Hydrazon- oder Acylhydrazon-Bindung oder einen Hydrazid-Linker konjugiert werden (U.S. Patent Nr. 5,474,765 und 5,762,918).

[0552] Ebenso kann, wie in U.S. Patent Nr. 5,474,765 und 5,762,918 beschrieben, der Ziel-Anti-VEGF-Antikörper operativ an das therapeutische Mittel (die therapeutischen Mittel) durch eine oder mehrere biologisch lösbare Bindungen angehängt sein, die enzymempfindliche Bindungen sind, einschließlich Peptid-Bindungen, Estern; Amiden, Phosphodiestern und Glycosiden.

[0553] Bevorzugte Aspekte der Erfindung betreffen die Verwendung von Peptidlinkern, die wenigstens eine erste Spaltungsstelle für eine Peptidase und/oder Proteinase einschließen, die sich bevorzugt innerhalb einer Krankheitsstelle befindet, insbesondere innerhalb der Tumorumgebung. Die Antikörper-vermittelte Abgabe des angehängten therapeutischen Mittels führt somit zu einer Spaltung spezifisch innerhalb der Krankheitsstelle oder der Tumorumgebung, was zur spezifischen Freisetzung des aktiven Mittels führt. Bestimmte Peptidlinker werden eine Spaltungsstelle enthalten, die durch ein oder mehrere Enzyme erkannt wird, die bei der Re-Modellierung beteiligt sind.

[0554] Peptidlinker, die eine Spaltungsstelle für Urokinase, Pro-Urokinase, Plasmin, Plasminogen, TGF β , Staphylokinase, Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa oder eine Metalloproteinase, wie etwa eine interstitielle Kollagenase, eine Gelatinase oder ein Stromelysin, enthalten, sind besonders bevorzugt. U.S. Patent Nr. 6,004,555, U.S. Patent Nr. 5,877,289, und U.S. Patent Nr. 6,093,399 beschreiben und machen nacharbeitbar, wie Ziel-Mittel-therapeutisches-Mittel-Konstrukte, umfassend biologisch lösbare Bindungen und selektiv spaltbare Linker und Peptide, hergestellt und verwendet werden können. Insbesondere U.S. Patent Nr. 5,877,289, erteilt am 2. März 1999 beschreibt weiter und macht nacharbeitbar, wie Ziel-Mittel-therapeutisches Mittel-Konstrukte, die einen selektiv spaltbaren Peptidlinker umfassen, der durch Urokinase, Plasmin, Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa oder eine Metalloproteinase, wie etwa eine interstitielle Kollagenase, eine Gelatinase oder ein Stromelysin, in einer Tumorumgebung gespalten wird, gemacht und verwendet werden.

[0555] Gegenwärtig bevorzugte selektiv spaltbare Peptidlinker sind diejenigen, die eine Spaltungsstelle für Plasmin oder eine Metalloproteinase einschließen (ebenso bekannt als „Matrix-Metalloproteasen“ oder „MMPs“), wie etwa eine interstitielle Kollagenase, eine Gelatinase oder ein Stromelysin. Zusätzliche Peptidlinker, die vorteilhaft im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen zum Beispiel diejenigen ein, die in Tabelle B2 aufgelistet sind.

TABELLE B2

Spaltbare Linker-Sequenzen

Typen von spaltbaren Sequenzen	Aminosäuresequenz	SEQ ID NO:
Plasmin-spaltbare Sequenzen		
Pro-Urokinase	PRFKIIGG	15
	PRFRIIGG	16
TGFβ	SSRHRRALD	17
Plasminogen	RKSSIIIRMRDVVL	18
Staphylokinase	SSSFDKGKYKKGDDA	19
	SSSFDKGKYKRGDDA	20
Faktor Xa-spaltbare Sequenzen		
	IEGR	21
	IDGR	22
	GGSIDGR	23
MMP spaltbare Sequenzen		
Gelatinase A	PLGLWA	24
Collagenase spaltbare Sequenzen		
Collagen aus Kalbshaut (α1(I)-Kette)	GPQGIAGQ	25
Collagen aus Kalbshaut (α2(I)-Kette)	GPQGLLGA	26
Rinderknorpelcollagen (α1(II)-Kette)	GIAGQ	27
Menschliches Lebercollagen (α1(III)-Kette)	GPLGIAGI	28
Humanes α ₂ M	GPEGLRVG	29
Humanes PZP	YGAGLGVV	30
	AGLGVVER	31
	AGLISST	32
Ratten-α ₁ M	EPQALAMS	33
	QALAMSAI	34
Ratten-α ₂ M	AA YHLVSQ	35
	MDAFLESS	36
Ratten-α ₁ I ₃ (2J)	ESLPVVAV	37
Ratten-α ₁ I ₃ (27J)	SAPAVESE	38
Humane Fibroblastencollagenase (autolytische Spaltungen)		
	DVAQFVLT	39
	VAQFVLTE	40
	AQFVLTEG	41
	PVQPIGPQ	42

C11. Bispezifische Antikörper

[0556] Bispezifische Antikörper sind besonders bei den Coaguliganden- und kombinierten antiangiogenen Aspekten der vorliegenden Erfindung nützlich. Jedoch können bispezifische Antikörper im allgemeinen verwendet werden, solange, wie ein Arm an VEGF bindet, fakultativ an im wesentlichen dasselbe Epitop wie 2C3, und der bispezifische Antikörper wird an ein therapeutisches Mittel angehängt, im allgemeinen an einer Stelle, die sich von der Antigen-Bindungsstelle unterscheidet.

[0557] Im allgemeinen ist die Herstellung von bispezifischen Antikörpern ebenso auf dem Gebiet bekannt. Ein

Verfahren beinhaltet die separate Herstellung von Antikörpern mit einer Spezifität für das angezielte Antigen, auf der einen Seite, und (wie hierin) einem coagulierenden Mittel auf der anderen Seite. Peptische $F(ab'\gamma)_2$ -Fragmente werden aus den beiden ausgewählten Antikörpern hergestellt, gefolgt von einer Reduktion von jedem, um separate $Fab'\gamma_{SH}$ -Fragmente bereitzustellen. Die SH-Gruppen an einem der beiden zu koppeln- den Partnern werden dann mit einem Quervernetzungsreagenz alkyliert, wie etwa o-Phenylendimaleimid, um freie Maleimidgruppen an einem Partner bereitzustellen. Dieser Partner kann dann an den anderen mittels einer Thioether-Verknüpfung konjugiert werden, um das erwünschte $F(ab'\gamma)_2$ -Heterokonjugat zu ergeben. Andere Techniken sind bekannt, bei denen eine Quervernetzung mit SPDP oder Protein A durchgeführt wird, oder ein trispezifisches Konstrukt wird hergestellt.

[0558] Ein weiteres Verfahren zum Herstellen von bispezifischen Antikörpern ist mittels der Fusion von zwei Hybridomen, um ein Quadrom zu bilden. Wie hierin verwendet, wird der Begriff „Quadrom“ verwendet, um die produktive Fusion von zwei B-Zell-Hybridomen zu beschreiben. Unter Verwendung von Techniken, die jetzt Standard sind, werden zwei Antikörpererzeugende Hybridome fusioniert, um Tochterzellen zu ergeben, und diejenigen Zellen, die die Expression von beiden Sätzen an Klontyp-Immunglobulin-Genen beibehalten haben, werden dann ausgewählt.

[0559] Ein bevorzugtes Verfahren zum Erzeugen eines Quadroms beinhaltet die Auswahl einer Enzym-effizienten Mutante von wenigstens einem der Eltern-Hybridome. Diese erste mutante Hybridom-Zelllinie wird dann mit Zellen eines zweiten Hybridoms fusioniert, das letal exponiert worden ist, z. B. gegenüber Iodacetamid, was die Fortsetzung seines Überlebens ausschließt. Eine Zellfusion ermöglicht das Retten des ersten Hybridoms durch Erwerb des Gens für seine Enzymdefizienz von dem letal behandelten Hybridom, und die Rettung des zweiten Hybridoms durch Fusion an das erste Hybridom. Bevorzugt, aber nicht erforderlich, ist die Fusion von Immunglobuline desselben Isotyps, aber von einer unterschiedlichen Subklasse. Ein Antikörper einer gemischten Subklasse erlaubt die Verwendung eines alternativen Assay zur Isolierung eines bevorzugten Quadroms.

[0560] In größeren Einzelheiten beinhaltet ein Verfahren zur Entwicklung und zum Screenen von Quadromen den Erhalt einer Hybridom-Linie, die den ersten ausgewählten mAb sezerniert, und das Defizientmachen dieser Linie im Hinblick auf das essentielle Stoffwechselenzym, Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (HGPRT). Um defiziente Mutanten des Hybridoms zu erhalten, werden Zellen in der Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an 8-Azaguanin ($1 \times 10^{-7}M$ bis $1 \times 10^{-5}M$) wachengelassen. Die Mutanten werden durch limitierende Verdünnung subkloniert und auf ihre Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT)-Empfindlichkeit getestet. Das Kulturmedium kann zum Beispiel aus DMEM bestehen, supplementiert mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Penicillin-streptomycin.

[0561] Eine komplementäre Hybridom-Zelllinie, die den zweiten erwünschten mAb Antikörper erzeugt, wird verwendet, um die Quadrome mittels Zellfusions-Standardtechniken zu erzeugen. Kurz gesagt, werden $4,5 \times 10^7$ HAT-empfindliche Erstzellen mit $2,8 \times 10^7$ HAT-resistenten zweiten Zellen vermischt, die mit einer letalen Dosis des irreversiblen biochemischen Inhibitors Iodacetamid (5 mM in Phosphat-gepufferter Salzlösung) für 30 Minuten auf Eis vor der Fusion vorbehandelt worden sind. Die Zellfusion wird unter Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) induziert, und die Zellen werden in 96-Napf-Mikrokultur-Platten ausplattiert. Quadrome werden ausgewählt unter Verwendung von HAT-enthaltendem Medium. Bispezifische Antikörper-enthaltende Kulturen werden unter Verwendung von zum Beispiel einem Festphasen-Isotyp-spezifischen ELISA und einer Isotyp-spezifischen Immunfluoreszenzfärbung identifiziert.

[0562] In einer Identifizierungsausführungsform zum Identifizieren des bispezifischen Antikörpers werden die Näpfe von Mikrotiterplatten (Falcon, Becton Dickinson Labware) mit einem Reagenz beschichtet, das spezifisch mit einem der Eltern-Hybridom-Antikörper wechselwirkt, und dem eine Kreuzreaktivität mit beiden Antikörpern fehlt. Die Platten werden gewaschen, blockiert, und die zu testenden Überstände (SNs) werden zu jedem Napf zugegeben. Die Platten werden bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert, die Überstände verworfen, die Platten gewaschen und ein verdünntes alkalisches Phosphatase-Anti-Antikörper-Konjugat für zwei Stunden bei Raumtemperatur zugegeben. Die Platten werden gewaschen, und ein Phosphatase-Substrat, z. B. P-Nitrophenylphosphat (Sigma St. Louis) wird zu jedem Napf zugegeben. Die Platten werden inkubiert, 3N NaOH wird zu jedem Napf zugegeben, um die Reaktion zu beenden, und die OD_{410} -Werte werden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bestimmt.

[0563] In einer anderen Identifizierungsausführungsform werden Mikrotiterplatten, die mit Poly-L-Lysin vorbehandelt sind, verwendet, um eine der Zielzellen an jeden Napf zu binden, die Zellen werden dann fixiert, z. B. unter Verwendung von 1% Glutaraldehyd, und die bispezifischen Antikörper werden auf ihre Fähigkeit getestet, an die intakte Zelle zu binden. Zusätzlich können FACS, Immunfluoreszenzfärbung, Idiotyp-spezifische Anti-

körper, Antigen-Bindungs-Kompetitionsassays und andere Verfahren, die auf dem Gebiet der Antikörpercharakterisierung üblich sind, im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um bevorzugte Quadrome zu identifizieren.

[0564] Nach der Isolierung des Quadroms werden die bispezifischen Antikörper von den anderen Zellprodukten aufgereinigt. Dies kann durch eine Vielzahl von Protein-Isolierungsprozeduren erreicht werden, die Fachleuten auf dem Gebiet der Immunglobulinaufreinigung bekannt sind. Mittel zur Herstellung und Charakterisieren von Antikörpern sind auf dem Gebiet gut bekannt (siehe z. B. *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988).

[0565] Zum Beispiel werden Überstände aus ausgewählten Quadromen über Protein-A- oder Protein G-Sepharose-Säulen laufengelassen, um IgG zu binden (abhängig von dem Isotyp). Die gebundenen Antikörper werden dann mit z. B. einem pH 5,0 Citratpuffer eluiert. Die eluierten Fraktionen, enthaltend die BsAbs werden gegen einen isotonischen Puffer dialysiert. Alternativ wird das Eluat ebenso über eine Anti-Immunglobulin-Sepharose-Säule laufengelassen. Der BsAb wird dann mit 3,5 M Magnesiumchlorid eluiert. BsAbs, die auf diese Weise aufgereinigt worden sind, werden dann auf ihre Bindungsaktivität mittels z. B. eines Isotypspezifischen ELISA und eines Immunfluoreszenz-Färbungsassay der Zielzellen, wie oben beschrieben, getestet.

[0566] Aufgereinigte BsAbs und Eltern-Antikörper können ebenso mittels SDS-PAGE-Elektrophorese charakterisiert und isoliert werden, gefolgt von einer Färbung mit Silber oder Coomassie. Dies ist möglich, wenn einer der Eltern-Antikörper ein höheres Molekulargewicht als der andere hat, wobei die Bande der BsAbs in der Mitte zwischen der der beiden Eltern-Antikörper wandert. Eine Reduktion der Proben verifiziert die Anwesenheit von schweren Ketten mit zwei unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten.

D. Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0567] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung werden im allgemeinen eine wirksame Menge von wenigstens einem ersten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder Immunkonjugat umfassen, aufgelöst oder dispergiert in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder wäßrigen Medium. Kombinierte Therapeutika werden ebenso in Erwägung gezogen, und derselbe Typ an zugrundeliegenden pharmazeutischen Zusammensetzungen kann für sowohl einzelne als auch kombinierte Medikamente verwendet werden.

[0568] Die Phrasen „pharmazeutisch oder pharmakologisch akzeptabel“ beziehen sich auf molekulare Größen und Zusammensetzungen, die keine nachteilige, allergische oder anderweitig schädliche Reaktion erzeugen bei Verabreichung an ein Tier oder einen Menschen. Veterinäre Verwendungen sind in gleicher Weise von der Erfindung eingeschlossen, und „pharmazeutisch akzeptable“ Formulierungen schließen Formulierungen für sowohl klinische als auch/oder veterinäre Verwendung ein.

[0569] Wie hierin verwendet, schließt ein „pharmazeutisch akzeptabler Träger“ ein beliebiges und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Beschichtungen, antibakterielle und Antipilz-Mittel, isotonische und absorptionsverzögernde Mittel und ähnliches ein. Die Verwendung von solchen Medien und Mitteln für pharmazeutisch aktive Substanzen ist auf dem Gebiet wohlbekannt. Außer daß insoweit ein beliebiges herkömmliches Medium oder Mittel mit dem aktiven Inhaltsstoff kompatibel ist, wird seine Verwendung bei den therapeutischen Zusammensetzungen in Erwägung gezogen. Für die Verabreichung an den Menschen sollten die Zubereitungen die Standards hinsichtlich Sterilität, Pyrogenizität, allgemeine Sicherheit und Reinheit erfüllen, die von dem FDA Office of Biologics Standards gefordert werden. Unterstützende aktive Inhaltsstoffe können ebenso in die Zusammensetzungen eingebaut werden.

[0570] „Einheitsdosierungs“-Formulierungen sind diejenigen, die eine Dosis oder Subdosis des verabreichten Inhaltsstoffes enthalten, angepaßt für eine besondere zeitlich abgestimmte Abgabe. Zum Beispiel sind beispielhafte „Einheitsdosierungs“-Formulierungen diejenigen, die eine tägliche Dosis oder Einheit oder eine tägliche Subdosis oder eine wöchentliche Dosis oder Einheit oder eine wöchentliche Subdosis enthalten etc.

D1. Injizierbare Formulierungen

[0571] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-basierenden und 2C3-basierenden Antikörper oder Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung werden am häufigsten zur parenteralen Verabreichung formuliert sein, z. B. formuliert zur Injektion über die intravenöse, intramuskuläre, subkutane, transdermale oder eine andere solche Route, einschließlich peristaltischer Verabreichung und direkte Einflößung in einen Tumor oder eine Krankheitsstelle (Verabreichung in eine Körperhöhle). Die Herstellung einer wäßrigen Zusammen-

setzung, die einen solchen Antikörper oder Immunkonjugat als einen aktiven Inhaltsstoff enthält, wird Fachleuten im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt sein. Typischerweise können solche Zusammensetzungen als injizierbare Zusammensetzungen hergestellt werden, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen; feste Formen, die zur Verwendung zum Herstellen von Lösungen oder Suspensionen bei Zugabe einer Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, können ebenso hergestellt werden; und die Zubereitung können ebenso emulgiert werden.

[0572] Die pharmazeutischen Formen, die für die injizierbare Verwendung geeignet sind, schließen sterile wäßrige Lösungen oder Dispersionen, Formulierungen, einschließlich Sesamöl, Erdnußöl oder wäßriges Propylenglycol, und sterile Pulver für die Zubereitung ad hoc von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen ein. In allen Fällen sollte die Form steril und in dem Ausmaß flüssig sein, daß eine Spritzbarkeit vorhanden ist. Sie sollte unter den Herstellungsbedingungen und Lagerungsbedingungen stabil sein und sollte gegen die kontaminierende Wirkung von Mikroorganismen konserviert sein, wie etwa Bakterien und Pilzen.

[0573] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper- oder Immunkonjugat-Zusammensetzungen können zu einer sterilen wäßrigen Zusammensetzung in einer neutralen oder Salzform formuliert werden. Lösungen als freie Base oder pharmakologisch akzeptable Salze können in Wasser hergestellt werden, in geeigneter Weise mit einem oberflächenaktiven Mittel gemischt, wie etwa Hydroxypropylcellulose. Pharmazeutisch akzeptable Salze schließen die Säureadditionssalze (gebildet mit den freien Aminogruppen des Proteins) und diejenigen ein, die mit anorganischen Säuren gebildet werden, wie zum Beispiel Salzsäure oder Phosphorsäure, oder solche organischen Säuren, wie etwa Essigsäure, Trifluoressigsäure, Oxasäure, Weinsäure, Mandelsäure und ähnliche. Salze, die mit den freien Carboxylgruppen gebildet werden, können ebenso aus anorganischen Basen abgeleitet werden, wie etwa zum Beispiel Natrium, Kalium, Ammonium, Calcium, Eisenhydroxide und solche organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, Histidin, Procain und ähnliche.

[0574] Geeignete Träger schließen Lösungsmittel und Dispersionsmedien ein, enthaltend zum Beispiel Wasser, Ethanol, Polyol (zum Beispiel Glycerin, Propylenglycol und flüssiges Polyethylenglycol und ähnliche), geeignete Mischungen davon und pflanzliche Öle. In vielen Fällen wird es bevorzugt sein, isotonische Mittel, zum Beispiel Zucker oder Natriumchlorid einzuschließen. Die passende Fluidität kann zum Beispiel durch die Verwendung einer Beschichtung, wie etwa Lecithin, aufrechterhalten werden, indem die erforderliche Partikelgröße im Falle der Dispersion und/oder durch die Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln aufrechterhalten wird.

[0575] Unter normalen Lagerungs- und Verwendungsbedingungen sollten alle solchen Zubereitungen ein Konservierungsmittel enthalten, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Die Verhinderung der Wirkung von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und Antipilz-Mittel, zum Beispiel Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure, Thimerosal und ähnliches erzielt werden. Eine verlängerte Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch Verwendung in den Zusammensetzungen von Mitteln erzielt werden, die die Absorption verzögern, zum Beispiel Aluminiummonostearat und Gelatine.

[0576] Vor oder nach der Formulierung sollten der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper oder Immunkonjugat umfangreich dialysiert werden, um unerwünschte niedermolekulargewichtige Moleküle zu entfernen, und/oder für eine fertigere Formulierung in einen erwünschten Träger, je nach Bedarf; lyophilisiert werden. Sterile injizierbare Lösungen werden durch Einbau der aktiven Mittel in der erforderlichen Menge in dem geeigneten Lösungsmittel mit verschiedenen der anderen oben aufgezählten Inhaltsstoffe zubereitet, je nach Bedarf, gefolgt von einer gefilterten Sterilisierung. Im allgemeinen werden Dispersionen durch Einbau der verschiedenen sterilisierten aktiven Inhaltsstoffe in einen sterilen Träger zubereitet, der das grundlegende Dispersionsmedien und die erforderlichen anderen Inhaltsstoffe aus den oben aufgezählten enthält.

[0577] Im Falle von sterilen Pulvern zur Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen sind die bevorzugten Verfahren zur Herstellung Vakuumtrocknungs- und Gefriertrocknungstechniken; die ein Pulver des aktiven Inhaltsstoffes plus jeden zusätzlichen erwünschten Inhaltsstoff von einer zuvor steril gefilterten Lösung davon ergeben.

[0578] Geeignete pharmazeutische Zusammensetzungen in Übereinstimmung mit der Erfindung werden im allgemeinen eine Menge des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder 2C3-basierenden Antikörpers oder Immunkonjugats enthalten, beigemischt mit einem akzeptablen pharmazeutischen Verdünnungsmittel oder Bindemittel, wie etwa einer sterilen wäßrigen Lösung, um einen Bereich an Endkonzentrationen zu ge-

ben, abhängig von der beabsichtigten Verwendung. Die Herstellungstechniken sind im allgemeinen auf dem Gebiet wohlbekannt, wie beispielhaft veranschaulicht durch Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, Mack Publishing Company, 1980. Es sollte bemerkt werden, daß die Endotoxinkontaminierung minimal auf einem sicheren Niveau gehalten werden sollte, zum Beispiel weniger als 0,5 ng/mg Protein. Darüberhinaus sollten für die Verabreichung an den Menschen die Zubereitungen die Sterilitäts-, Pyrogenizitäts-, allgemeinen Sicherheits- und Reinheitsstandards erfüllen, wie vom FDA Office of Biological Standards erfordert. Nach der Formulierung werden die Antikörper- oder Immunkonjugat-Lösungen auf eine Weise verabreicht werden, die mit der Dosierungsformulierung kompatibel ist, und in einer solchen Menge, die therapeutisch wirksam ist.

D2. Formulierungen mit verzögerter Freisetzung

[0579] Formulierungen von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-basierenden oder 2C3-basierenden Antikörpern oder Immunkonjugat-Lösungen werden leicht in einer Vielzahl von Dosierungsformen verabreicht, wie etwa der Typ der oben beschriebenen injizierbaren Lösungen, aber andere pharmazeutisch akzeptable Formen werden ebenso in Erwägung gezogen, z. B. Tabletten, Pillen, Kapseln oder andere feste Formen zur oralen Verabreichung, Zäpfchen, Pessare, Nasenlösungen oder -sprays, Aerosole, Inhalantien, topische Formulierungen, Liposomenformen und ähnliche. Der Typ der Verabreichungsform wird der zu behandelnden Krankheit oder Störung angepaßt werden.

[0580] Pharmazeutische Kapseln mit „langsamer Freisetzung“ oder Zusammensetzungen mit „verzögerter Freisetzung“ oder Zubereitungen können verwendet werden und sind im allgemeinen anwendbar. Formulierungen mit langsamer Freisetzung sind im allgemeinen daraufhin angelegt, daß sie eine konstante Arzneikonzentration über eine ausgedehnte Zeitperiode ergeben, und können verwendet werden, um einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder Immunkonjugat in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung abzugeben. Die Formulierungen mit langsamer Freisetzung werden typischerweise in der Nähe der Krankheitsstelle, zum Beispiel an der Stelle eines Tumors implantiert.

[0581] Geeignete Beispiele für Zubereitungen mit verzögerter Freisetzung schließen semipermeable Matrizen von festen hydrophoben Polymeren ein, enthaltend den Antikörper oder das Immunkonjugat, wobei die Matrizen in der Form von geformten Artikeln, z. B. Filmen oder Mikrokapseln sind. Beispiele für Matrizen mit verzögerter Freisetzung schließen Polyester, Hydrogele, zum Beispiel Poly-(2-hydroxyethyl-methacrylat) oder Poly(vinylalcohol), Polylactide, z. B. U.S. Patent Nr. 3,773,919, Copolymere aus L-Glutaminsäure und γ -Ethyl-L-glutamat, nicht-abbaubares Ethylenvinylacetat, abbaubare Milchsäure-glycolsäurecopolymere, wie etwa das Lupron Depot™ (injizierbare Mikrosphären, zusammengesetzt aus Milchsäure-Glycolsäure-Copolymer und Leuprolid-acetat), und Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure ein.

[0582] Während Polymere, wie etwa Ethylenvinylacetat und Milchsäure-Glycolsäure, die Freisetzung von Molekülen für über 100 Tage ermöglichen, setzen bestimmte Hydrogele Proteine für kürzere Zeitperioden frei. Bei der Verkapselung bleiben Antikörper im Körper für eine lange Zeit, sie können denaturieren oder als ein Ergebnis des Aussetzens gegenüber Feuchtigkeit bei 37°C aggregieren, wodurch die biologische Aktivität verringert und/oder die Immunogenizität verändert wird. Rationale Strategien zur Stabilisierung stehen zur Verfügung, in Abhängigkeit von den beteiligten Mechanismen. Zum Beispiel wird, wenn der Aggregationsmechanismus eine intermolekulare S-S-Bindungsbildung durch den Thio-Disulfid-Austausch beinhaltet, eine Stabilisierung durch Modifizieren von Sulhydrylresten, Lyophilisieren aus sauren Lösungen, Kontrollieren des Feuchtigkeitsgehalts, Verwendung von geeigneten Zusatzstoffen, Entwicklung spezifischer Polymermatrixzusammensetzungen und ähnlichem erzielt.

D3. Liposomen und Nanopartikel

[0583] In bestimmten Ausführungsformen können Liposomen und/oder Nanopartikel ebenso mit den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörpern oder Immunkonjugaten verwendet werden. Die Bildung und Verwendung von Liposomen ist im allgemeinen Fachleuten auf dem Gebiet bekannt, wie unten zusammengefaßt.

[0584] Liposomen werden aus Phospholipiden gebildet, die in einem wäßrigen Medium dispergiert sind und in spontaner Weise multilamellare konzentrische Bilayer-Vesikel bilden (ebenso als multilamellare Vesikel bezeichnet (MLVs)). MLVs haben im allgemeinen einen Durchmesser von 25 nm bis 4 μ m. Eine Beschallung von MLVs führt zur Bildung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUVs) mit Durchmessern im Bereich von 200 bis 500 Å, enthaltend eine wäßrige Lösung im Kern.

[0585] Phospholipide können eine Vielzahl von Strukturen bilden, die nicht Liposomen sind, bei Dispersion in Wasser, abhängig vom molaren Verhältnis von Lipid zu Wasser. Bei niedrigen Verhältnissen ist das Liposom die bevorzugte Struktur. Die physikalischen Eigenschaften von Liposomen hängen vom pH, der Innenstärke und der Anwesenheit von divalenten Kationen ab. Liposomen können eine geringe Permeabilität gegenüber ionischen und polaren Substanzen zeigen, durchlaufen aber bei erhöhten Temperaturen einen Phasenübergang, der in merkbarer Weise ihre Permeabilität ändert. Der Phasenübergang beinhaltet eine Veränderung von einer dicht gepackten, geordneten Struktur, die als der Gelzustand bezeichnet wird, in eine lose gepackte, weniger geordnete Struktur, die als der flüssige Zustand bekannt ist. Dies findet bei einer charakteristischen Phasenübergangstemperatur statt und führt zu einem Anwachsen an Permeabilität gegenüber Ionen, Zuckern und Arzneien.

[0586] Liposomen wechselwirken mit Zellen über vier verschiedene Mechanismen: Endocytose durch phagocytische Zellen des reticuloendothelialen Systems, wie etwa Makrophagen und Neutrophilen; Adsorption an die Zelloberfläche, entweder durch nicht-spezifische schwache hydrophobe oder elektrostatische Kräfte, oder durch spezifische Wechselwirkungen mit Zelloberflächenbestandteilen; Fusion mit der Plasmamembran durch Einbau der Lipid-Doppelschicht des Liposoms in die Plasmamembran, mit zeitgleicher Freisetzung des Liposomeninhalts in das Cytoplasma; und durch Transfer von liposomalen Lipiden auf die zellulären oder subzellulären Membranen oder umgekehrt, ohne irgendeine Assoziation des Liposomengehalts. Eine Variation der Liposomenformulierung kann ändern, welcher Mechanismus wirksam ist, obwohl mehr als ein Mechanismus zur gleichen Zeit wirken kann.

[0587] Nanokapseln können im allgemeinen Verbindungen auf eine stabile und reproduzierbare Weise einfangen. Um Nebenwirkungen aufgrund von einer intrazellulären polymeren Überladung zu verhindern, sollten solche ultrafeinen Partikel (mit einer Größe von ungefähr 0,1 µm) unter Verwendung von Polymeren konstruiert werden, die in der Lage sind, in vivo abgebaut zu werden. Bioabbaubare Polyalkyl-Cyanoacrylat-Nanopartikel, die diese Anforderungen erfüllen, werden zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen, und solche Partikel werden in leichter Weise hergestellt.

D4. Ophthalmische Formulierungen

[0588] Viele Krankheiten mit einem angiogenen Bestandteil sind mit dem Auge assoziiert. Zum Beispiel schließen Krankheiten, die mit einer Cornea-Neovaskularisierung assoziiert sind, die gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, ein, sind aber nicht beschränkt auf diabetische Retinopathie, Frühgeborenen-Retinopathie, Cornea-Transplantatabstoßung, neovaskuläres Glaucom und retrolentale Fibroplasie, epidemische Keratoconjunctivitis, Vitamin-A-Defizienz, Kontaktlinsenübertragung, atopische Keratitis, obere limbische Keratitis, Pterygium Keratitis Sicca, Sjogren-Syndrom, Acne rosacea, Phlyctenulosis, Syphilis, Mycobakterieninfektionen, Lipidabbau, chemische Verbrennungen, bakterielle Geschwüre, Pilzgeschwüre, Herpes-Simplex-Infektionen, Herpes-Zoster-Infektionen, Protozoen-Infektionen, Kaposi-Sarcom, Mooren-Geschwür, Terrien's Marginal-Degeneration, Marjinalkeratolyse, Trauma, rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus, Polyarthritis, Wegeners-Sarcoidose, Scleritis, Steven's Johnson-Krankheit, periphigoide Radialkeratotomie und Cornea-Transplantatabstoßung.

[0589] Krankheiten, die mit einer retinalen/chorioiden Neovaskularisierung assoziiert sind, die gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf diabetische Retinopathie, Macula-Degeneration, Sichelzellenanämie, Sarcoidose, Syphilis, Pseudoxanthoma elasticum, Paget-Krankheit, Venenverschuß, Arterienverschuß, Carotisverschußkrankheit, chronische Uveitis/Vitritis, Mycobakterieninfektionen, Lyme-Borreliose, systemischer Lupus Erythematodes, Frühgeborenenretinopathie, Ealesche Krankheit, Behçetsche Krankheit, Infektionen, die eine Retinitis oder eine Choroiditis verursachen, vermutete Augen-Histoplasmose, infantile Maculadegeneration, Myopie, Sehnerventrichter („optic pits“), Stargardsche Krankheit, Parsplanitis, chronische Retinaablösung, Hyperviskositätssyndrome, Toxoplasmose, Trauma und Post-Laser-Komplikationen.

[0590] Andere Krankheiten, die gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Krankheiten, die mit Rubeose assoziiert sind (Neovaskularisierung des Winkels („angle“)), und Krankheiten, die durch die abnorme Proliferation von fibrovaskulärem oder fibrösem Gewebe verursacht werden, einschließlich aller Formen der proliferativen Vitreoretinopathie, die mit Diabetes assoziiert ist oder auch nicht.

[0591] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-basierenden und 2C3-basierenden Antikörper und Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung können daher vorteilhafterweise bei der Herstellung von

pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet werden, die zur Verwendung als Augenlösungen geeignet sind, einschließlich denjenigen für eine Verabreichung in den Glaskörper und/oder in die Kammer. Zur Behandlung von irgendeiner der vorhergehenden oder anderen Krankheiten würde eine VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörperzusammensetzung der Erfindung an das Auge oder die Augen des behandlungsbedürftigen Patienten in der Form einer ophthalmischen Zubereitung verabreicht werden, die in Übereinstimmung mit herkömmlicher pharmazeutischer Praxis hergestellt worden ist, siehe zum Beispiel „Remington's Pharmaceutical Sciences" 15. Auflage, Seiten 1488 bis 1501 (Mack Publishing Co., Easton, PA).

[0592] Die ophthalmische Zubereitung wird einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper in einer Konzentration von ungefähr 0,01 bis 1 Gew.% enthalten, bevorzugt von ungefähr 0,05 bis ungefähr 0,5% in einer pharmazeutisch akzeptablen Lösung, Suspension oder Salbe. Eine gewisse Variation in der Konzentration wird notwendigerweise auftreten, abhängig von der jeweiligen verwendeten Verbindung, dem Zustand des zu behandelnden Patienten und ähnliches, und die Person, die für die Behandlung verantwortlich ist, wird die geeignetste Konzentration für den einzelnen Patienten bestimmen. Die ophthalmische Zubereitung wird bevorzugt in der Form einer sterilen wäßrigen Lösung sein, die, sofern erwünscht, zusätzliche Inhaltsstoffe enthält, zum Beispiel Konservierungsmittel, Puffer, Tonizitätsmittel, Antioxidantien und Stabilisatoren, nicht-ionische Befeuchtungs- oder Klärungsmittel, Viskositätserhöhende Mittel und ähnliches.

[0593] Geeignete Konservierungsmittel zur Verwendung in einer solchen Lösung schließen Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid, Chlorbutanol, Thimerosal und ähnliches ein. Geeignete Puffer schließen Borsäure, Natrium- und Kaliumhydrogencarbonat, Natrium- und Kaliumborate, Natrium- und Kaliumcarbonat, Natriumacetat, Natriumdihydrogenphosphat und ähnliche, in Mengen ein, die ausreichen, um den pH auf zwischen ungefähr pH 6 und pH 8 und bevorzugt zwischen ungefähr pH 7 und pH 7,5 zu halten. Geeignete Tonizitätsmittel sind Dextran 40, Dextran 70, Dextrose, Glycerin, Kaliumchlorid, Propylenglycol, Natriumchlorid und ähnliche, so daß das Natriumchloridäquivalent der ophthalmischen Lösung im Bereich von 0,9 plus oder minus 0,2% ist.

[0594] Geeignete Antioxidantien und Stabilisatoren schließen Natriumbisulfit, Natriummetabisulfit, Natriumthiosulfit, Thioharnstoff und ähnliches ein. Geeignete Feuchthalte- und Klärungsmittel schließen Polysorbat 80, Polysorbat 20, Poloxamer 282 und Tyloxapol ein. Geeignete Viskositätserhöhende Mittel schließen Dextran 40, Dextran 70, Gelatine, Glycerin, Hydroxyethylcellulose, Hydroxymethylpropylcellulose, Lanolin, Methylcellulose, Petrolatum, Polyethylenglycol, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose und ähnliche ein. Die ophthalmische Zubereitung wird topisch an das Auge des behandlungsbedürftigen Patienten mittels herkömmlicher Verfahren verabreicht werden, zum Beispiel in der Form von Tropfen oder durch Baden des Auges in der ophthalmischen Lösung.

D5. Topische Formulierungen

[0595] Im breitesten Sinn schließen Formulierungen für die topische Verabreichung diejenigen zur Abgabe über den Mund (buccal) und durch die Haut ein. „Topische Abgabesysteme" schließen ebenso transdermale Pflaster ein, die den zu verabreichenden Inhaltsstoff enthalten. Eine Abgabe durch die Haut kann weiterhin durch Iontophorese oder Elektrotransport erzielt werden, wenn erwünscht.

[0596] Formulierungen, die zur topischen Verabreichung im Mund geeignet sind, schließen Tabletten, die die Inhaltsstoffe in einer aromatisierten Grundlage, gewöhnlich Saccharose und Akaziengummi oder Tragant, Pastillen, umfassend den aktiven Inhaltsstoff in einer inerten Basis, wie etwa Gelatine und Glycerin oder Saccharose und Akaziengummi, und Mundspülungen ein, umfassend den zu verabreichenden Inhaltsstoff in einem geeigneten flüssigen Träger.

[0597] Formulierungen, die für die topische Verabreichung an die Haut geeignet sind, schließen Salben, Cremes, Gele und Pasten ein, umfassend den zu verabreichenden Inhaltsstoff in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger. Die Formulierung von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- oder 2C3-basierenden Antikörpern zur topischen Verwendung, wie etwa in Cremes, Salben und Gelen, schließt die Zubereitung von öl- oder wasserlöslichen Salbengrundlagen ein, wie auf dem Gebiet gut bekannt ist. Zum Beispiel können diese Zusammensetzungen pflanzliche Öle, tierische Fette und bevorzugter halbfeste Kohlenwasserstoffe, die aus Petroleum erhalten werden, einschließen. Besondere Bestandteile, die verwendet werden, können weiße Salbe („white ointment"), gelbe Salbe („yellow ointment"), Cetylestherwachs, Ölsäure, Olivenöl, Paraffin, Petrolatum, weißes Petrolatum, Walrat, Stärkeglycerit, weißes Wachs, gelbes Wachs, Lanolin, wasserfreies Lanolin und

Glycerylmonostearat einschließen. Verschiedene wasserlösliche Salbengrunden können ebenso verwendet werden, einschließlich Glycolethern und Derivaten, Polyethylenglycolen, Polyoxyl-40-Stearat und Polysorbaten.

[0598] Formulierungen für die rektale Verabreichung können als ein Zäpfchen mit einer geeigneten Grundlage präsentiert werden, umfassend zum Beispiel Kakaobutter oder ein Salicylat. Formulierungen die für die vaginale Verabreichung geeignet sind, können als Pessare, Tampons, Creme, Gele, Pasten, Schäume oder Sprühformulierungen dargeboten werden, enthaltend zusätzlich zu dem aktiven Inhaltsstoff solche Träger, wie sie auf dem Gebiet als geeignet bekannt sind.

D6. Nasale Formulierungen

[0599] Eine lokale Abgabe über die Nasen- und respiratorische Route wird zur Behandlung verschiedener Zustände in Erwägung gezogen. Diese Abgaberrouten sind ebenso zum Abgeben von Mitteln in den systemischen Kreislauf geeignet. Formulierungen von aktiven Inhaltsstoffen in Trägern, die für die nasale Verabreichung geeignet sind, werden deshalb in der Erfindung eingeschlossen, zum Beispiel Nasenlösungen, Sprays, Aerosole und Inhalantien. Wenn der Träger ein Feststoff ist, schließen die Formulierungen ein grobes Pulver mit einer Partikelgröße von zum Beispiel im Bereich von 20 bis 500 Mikrons ein, das z. B. durch rasche Inhalation durch den Nasenweg aus einem Pulverbehälter verabreicht wird, der nahe an die Nase gehalten wird.

[0600] Geeignete Formulierungen, bei denen der Träger eine Flüssigkeit ist, sind bei der Nasenverabreichung nützlich. Nasenlösungen sind gewöhnlich wäßrige Lösungen, die so konstruiert sind, daß sie an den Nasenweg in Tropfen oder Sprays verabreicht werden, und werden so zubereitet, daß sie in vielen Aspekten Nasensekretionen ähnlich sind, so daß eine normale Cilientätigkeit aufrechterhalten wird. Daher sind die wäßrigen nasalen Lösungen gewöhnlich isotonisch und wenig gepuffert, um einen pH von 5,5 bis 6,5 aufrechtzuerhalten. Zusätzlich können antimikrobielle Konservierungsmittel, ähnlich denjenigen, die in Augenzubereitungen verwendet werden, und geeignete Arzneistabilisatoren nach Bedarf in der Formulierung eingeschlossen sein. Verschiedene kommerzielle Nasenzubereitungen sind bekannt und schließen zum Beispiel Antibiotika und Antihistamine ein und werden für die Asthma-Prophylaxe verwendet.

[0601] Inhalationen und Inhalantien sind pharmazeutische Zubereitungen, die zum Abgeben einer Arznei oder einer Verbindung in dem Atemweg eines Patienten konstruiert sind. Ein Dampf oder Nebel wird verabreicht und erreicht das betroffene Gebiet. Diese Route kann ebenso verwendet werden, um Mittel in den systemischen Kreislauf abzugeben. Inhalationen können auf dem nasalen oder oralen Atemweg verabreicht werden. Die Verabreichung von Inhalationslösungen ist nur wirksam, wenn die Tröpfchen hinreichend fein und uniform in ihrer Größe sind, so daß der Nebel die Bronchiolen erreicht.

[0602] Eine andere Gruppe von Produkten, die ebenso als Inhalationen bekannt sind, und manchmal als Insufflationen bezeichnet werden, umfaßt fein gepulverte oder flüssige Arzneien, die in die Atemwege durch die Verwendung von speziellen Abgabesystemen getragen werden, wie etwa pharmazeutische Aerosole, die eine Lösung oder Suspension der Arznei in einem verflüssigten Gastreibmittel enthalten. Bei Freisetzung durch ein geeignetes Ventil und einen oralen Adapter wird eine abgemessene Dosis der Inhalation in den Atemtrakt des Patienten getrieben. Die Partikelgröße ist von wesentlicher Wichtigkeit bei der Verabreichung dieses Typs Zubereitung. Es ist berichtet worden, daß die optimale Partikelgröße zur Penetration in die Lungenhöhlung die Größenordnung 0,5 bis 7 µm hat. Feine Nebel werden durch Aerosole unter Druck erzeugt, und deshalb wird ihre Verwendung als vorteilhaft betrachtet.

E. Therapeutische Kits

[0603] Diese Erfindung stellt ebenso therapeutische Kits bereit, umfassend einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder Immunkonjugat zur Verwendung bei den vorliegenden Behandlungsverfahren. Solche Kits werden im allgemeinen in geeigneten Behältermitteln eine pharmazeutisch akzeptable Formulierung von wenigstens einem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder Immunkonjugat enthalten. Die Kits können ebenso andere pharmazeutisch akzeptable Formulierungen enthalten, entweder zur Diagnose, Bildgebung oder einer kombinierten Therapie. Zum Beispiel können solche Kits eine oder mehrere aus einer Vielzahl von chemotherapeutischen oder radiotherapeutischen Arzneien, anti-angiogenen Mitteln, Anti-Tumorzell-Antikörpern, und/oder Anti-Tumorgefäß- oder Anti-Tumor-Stroma-Immuntoxinen oder -Coagulganden enthalten.

[0604] Die Kits können einen einzelnen Behälter (Behältermittel) enthalten, der den VEGFR2-blockierenden,

Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Antikörper oder Immunkonjugat enthält, mit oder ohne zusätzliche Bestandteile, oder sie können unterschiedliche Behälter für jedes erwünschte Mittel haben. Bei kombinierten Therapeutika kann eine einzelne Lösung vorgemischt werden, entweder in einer molaren äquivalenten Kombination oder mit einem Bestandteil, der im Überschuß gegenüber dem anderen vorliegt. Alternativ kann jeder des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder 2C3-basierenden Antikörpers oder Immunkonjugats und andere Anti-Krebsmittel-Bestandteile des Kits separat in unterschiedlichen Behältern vor Verabreichung an einen Patienten aufbewahrt werden.

[0605] Wenn die Bestandteile des Kit in einer oder mehreren flüssigen Lösungen bereitgestellt werden, ist die flüssige Lösung bevorzugt eine wäßrige Lösung, wobei eine sterile wäßrige Lösung besonders bevorzugt ist. Jedoch können die Bestandteile des Kit als getrocknetes (getrocknete) Pulver bereitgestellt werden. Wenn Reagenzien oder Bestandteile als ein trockenes Pulver bereitgestellt werden, kann das Pulver durch die Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels rekonstituiert werden. Es wird erwogen, daß das Lösungsmittel auch in einem anderen Behälter bereitgestellt werden kann.

[0606] Die Behälter des Kits werden im allgemeinen wenigstens ein Gefäß, Reagenzröhrchen, Kolben, Flasche, Spritze oder andere Behältermittel einschließen, in die der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper oder Immunkonjugat und jedes andere erwünschte Mittel gebracht werden und, bevorzugt, in geeigneter Form aliquotisiert werden kann. Wenn separate Bestandteile enthalten sind, wird der Kit ebenso im allgemeinen ein zweites Gefäß oder einen anderen Behälter enthalten, in den diese gebracht werden, was die Verabreichung von getrennt angelegten Dosierungen ermöglicht. Die Kits können ebenso einen zweiten/dritten Behälter zum Enthalten eines sterilen pharmazeutisch akzeptablen Puffers oder anderen Verdünnungsmittels umfassen.

[0607] Die Kits können ebenso ein Mittel enthalten, mit dem der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper oder Immunkonjugat an ein Tier oder Patient verabreicht werden kann, z. B. ein oder mehrere Nadeln oder Spritzen oder sogar einen Augentropfer, Pipette oder andere solche Vorrichtung, aus der die Formulierung in das Tier injiziert oder auf eine Krankheitsfläche des Körpers aufgetragen werden kann. Die Kits der vorliegenden Erfindung werden ebenso typischerweise ein Mittel zum Aufnehmen der Gefäße oder ähnlichem und einen anderen Bestandteil in enger Verschränkung für den kommerziellen Verkauf einschließen, wie etwa Spritzguß-geformte oder blasgeformte Plastikbehälter in die die gewünschten Gefäße und andere Vorrichtungen eingebracht oder aufbewahrt werden.

F. Anti-angiogene Therapie

[0608] Die vorliegende Erfindung kann verwendet werden, um Tiere und Patienten mit abnormer Angiogenese zu behandeln, wie etwa diejenige, die zu einer Vielzahl von Krankheiten und Störungen beiträgt. Die vorherrschendsten und klinisch wichtigsten hiervon, außerhalb des Gebiets der Krebsbehandlung, schließen Arthritis, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Arteriosclerose, diabetische Retinopathie, altersbedingte Maculadegeneration, Basedow-Krankheit, vaskuläre Restenose, einschließlich Restenosen nach Angioplastie, arteriovenöse Fehlbildungen (AVM), Meningiom, Hämangiom und neovaskuläres Glaucom ein. Andere potentielle Ziele zum Eingriff schließen Angiofibrom, arteriosklerotische Plaques, Cornea-Transplantat-Neovaskularisierung, hämophile Gelenke, hypertrophe Narben, Osler-Weber-Syndrom, pyogenes Granulom, retrolentales Fibroplasie, Scleroderma, Trachom, Gefäßverklebungen, Synovitis, Dermatitis, verschiedene andere entzündlichen Krankheiten und Störungen und sogar Endometriose ein. Weitere Krankheiten und Störungen, die durch die Erfindung behandelbar sind, und die vereinigende Basis von solchen angiogenischen Störungen werden unten dargestellt.

[0609] Eine Krankheit, bei der Angiogenese beteiligt ist, ist rheumatoide Arthritis, bei der die Blutgefäße in der Synovialauskleidung der Gelenke eine Angiogenese durchlaufen. Zusätzlich zum Bilden von neuen Gefäßnetzwerken setzen die Endothelzellen Faktoren und reaktive Sauerstoffspezies frei, die zu einem Panus-Wachstum und einer Knorpelzerstörung führen. Die Faktoren, die bei der Angiogenese beteiligt sind, können aktiv zum chronisch entzündeten Status der rheumatoiden Arthritis beitragen und helfen, diesen aufrechtzuerhalten. Faktoren, die mit Angiogenese assoziiert sind, haben ebenso eine Rolle bei der Osteoarthritis, in dem sie zur Zerstörung des Gelenks beitragen.

[0610] Harada et al. (1998) zeigten, daß VEGF bei der Pathogenese von rheumatoider Arthritis beteiligt ist, und weiterhin, daß eine Messung der Serumkonzentration von VEGF ein nicht-invasives, nützliches Verfahren zum Überwachen der Krankheitsaktivität von rheumatoider Arthritis ist. Dies unterstützt die therapeutischen und diagnostischen Verwendungen der vorliegenden Erfindung im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis.

[0611] Nagashima et al. (1999) beschrieben die inhibitorischen Effekte von anti-rheumatischen Arzneien auf VEGF in kultivierten rheumatoiden Synovialzellen. VEGF wird konstitutiv im Synovium von rheumatoider Arthritis exprimiert. Es wurde gezeigt, daß die bekannte antirheumatische Arznei Bucillamin (BUC) in ihrem Wirkmechanismus die Inhibition der VEGF-Erzeugung durch Synovialzellen beinhaltet. Daher werden die anti-rheumatischen Effekte von BUC durch die Unterdrückung der Angiogenese und synovialen Proliferation im arthritischen Synovium durch die Inhibition der VEGF-Produktion durch Synovialzellen vermittelt. Die Verwendung der vorliegenden Erfindung als ein anti-arthritische Therapie wird durch die VEGF-inhibitorischen Wirkungen dieses existierenden Therapeutikums unterstützt.

[0612] Ein weiteres Beispiel für eine durch Angiogenese vermittelte Krankheit ist neovaskuläre Augenkrankheit („ocular neovaskular disease“). Diese Krankheit ist durch eine Invasion von neuen Blutgefäßen in die Strukturen des Auges, wie etwa die Retina oder Cornea, charakterisiert. Sie ist die häufigste Ursache für Blindheit und ist bei näherungsweise zwanzig Augenkrankheiten beteiligt. Bei der altersbedingten Maculadegeneration werden die assoziierten visuellen Probleme durch ein Einwachsen von chorioiden Kapillaren durch Defekte in der Bruchschens Membran mit einer Proliferation des fibrovaskulären Gewebes unterhalb des retinalen Pigmentepithels verursacht. Eine angiogene Schädigung ist ebenso mit der diabetischen Retinopathie, Frühgeborenen-Retinopathie, Cornea-Transplantatabstoßung, neovaskulärem Glaukom und retrolentaler Fibroplasie assoziiert.

[0613] Andere Krankheiten, die mit einer Cornea-Neovaskularisierung assoziiert sind, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf epidemische Keratoconjunctivitis, Vitamin A-Defizienz, Kontaktlinsen-Übertragung, atopische Keratitis, obere limbische Keratitis, Pterygium Keratitis Sicca, Sjogren-Syndrom, Acne rosacea, Phlyctenulosis, Syphilis, Mycobakterieninfektionen, Lipidabbau, chemische Verbrennungen, bakterielle Geschwüre, Pilzgeschwüre, Herpes-Simplex-Infektionen, Herpes-Zoster-Infektionen, Protozoen-Infektionen, Kaposi-Sarcom, Mooren-Geschwür, Terrien's Marginal-Degeneration, Mariginalkeratolyse, rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus, Polyarthritis, Trauma, Wegener-Sarcoidose, Scleritis, Steven-Johnson-Krankheit, periphigoide Radialkeratotomie und Cornea-Transplantatabstoßung.

[0614] Krankheiten, die mit einer retinalen/chorioiden Neovaskularisierung assoziiert sind, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf diabetische Retinopathie, Macula-Degeneration, Sichelzellenanämie, Sarcoidose, Syphilis, Pseudoxanthoma elasticum, Paget-Krankheit, Venenverschuß, Arterienverschuß, Carotisverschußkrankheit, chronische Uveitis/Vitritis, Mycobakterieninfektionen, Lyme-Borreliose, systemischer Lupus Erythematoses, Frühgeborenenretinopathie, Ealesche Krankheit, Behçetsche Krankheit, Infektionen, die eine Retinitis oder eine Choroiditis verursachen, vermutete Augen-Histoplasmose, infantile Maculadegeneration, Myopie, Sehnerventrichter („optic pits“), Stargardtsche Krankheit, Pars planitis, chronische Retinaablösung, Hyperviskositätssyndrome, Toxoplasmose, Trauma und Post-Laser-Komplikationen.

[0615] Andere Krankheiten schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Krankheiten, die mit Rubeose assoziiert sind (Neovaskularisierung des Winkels („angle“)), und Krankheiten, die durch die abnorme Proliferation von fibrovaskulärem oder fibrösem Gewebe verursacht werden, einschließlich aller Formen der proliferativen Vitreoretinopathie.

[0616] Chronische Entzündung beinhaltet ebenso eine pathologische Angiogenese. Solche Krankheitszustände, wie etwa ulcerative Colitis und Morbus Crohn zeigen histologische Veränderungen mit dem Einwachsen von neuen Blutgefäßen in die entzündeten Gewebe. Bartonellose, eine bakterielle Infektion, die in Südamerika gefunden wird, kann zu einem chronischen Stadium führen, das durch die Proliferation von Gefäßendothelzellen charakterisiert ist.

[0617] Eine weitere pathologische Rolle, die mit der Angiogenese assoziiert ist, wird bei Arteriosklerose gefunden. Es ist gezeigt worden, daß die in dem Lumen von Blutgefäßen gebildeten Plaques eine angiogene stimulatorische Aktivität haben. Eine VEGF-Expression in humanen koronar-arteriosklerotischen Läsionen wurde von Inoue et al. (1998) gezeigt. Dies belegt die pathophysiologische Wichtigkeit von VEGF bei dem Fortschreiten von humaner koronarer Arteriosklerose ebenso wie bei Rekanalisierungsprozessen bei koronaren Verschußkrankheiten. Die vorliegende Erfindung stellt eine effektive Behandlung für solche Zustände bereit.

[0618] Eine der häufigsten angiogenen Krankheiten in der Kindheit ist das Hämangiom. In den meisten Fällen sind die Tumore gutartig und bilden sich ohne Eingreifen zurück. In heftigeren Fällen entwickeln sich die Tumore zu großen kavernösen und infiltrativen Formen fort und erzeugen klinische Komplikationen. Systemische Formen von Hämangiomen, die Hämangiomatosen, haben eine hohe Mortalitätsrate. Es gibt therapieresistente Hämangiome, die nicht mit gegenwärtig verwendeten Therapeutika behandelt werden können.

[0619] Die Angiogenese ist ebenso für die Schädigung verantwortlich, die bei Erbkrankheiten gefunden wird, wie etwa die Osler-Weber-Rendu-Krankheit oder die vererbte hämorrhagische Telangiectasie. Dies ist eine vererbte Krankheit, charakterisiert durch vielfache kleine Angiome, Tumore von Blut- oder Lymphgefäßen. Die Angiome werden in der Haut und den Schleimhäuten gefunden, oft begleitet von einer Epistaxis (Nasenbluten) oder Gastrointestinalblutung und manchmal mit Lungen- oder hepatischen arteriovenösen Fisteln.

[0620] Angiogenese ist ebenso bei normalen physiologischen Prozessen, wie der Reproduktion und Wundheilung, beteiligt. Angiogenese ist ein wichtiger Schritt bei der Ovulation und ebenso bei der Einpflanzung der Blastula nach der Befruchtung. Eine Verhinderung der Angiogenese könnte verwendet werden, um Amenorrhoe zu induzieren, die Ovulation zu blockieren oder die Einpflanzung durch die Blastula zu verhindern.

[0621] Bei der Wundheilung können eine übermäßige Reparatur oder Fibroplasie eine nachteilige Nebenwirkung von chirurgischen Prozeduren sein und können durch Angiogenese verursacht oder verschlimmert werden. Adhäsionen sind eine häufige Komplikation von Operationen und führen zu Problemen, wie etwa Dünndarmverschluss.

[0622] Krankheiten und Störungen, die durch unerwünschte Gefäßpermeabilität charakterisiert sind, können ebenso mit der vorliegenden Erfindung behandelt werden. Diese schließen Ödem, assoziiert mit Hirntumoren, Ascites, assoziiert mit malignen Erkrankungen, Meigs-Syndrom, Lungenentzündung, nephrotisches Syndrom, Pericard-Erguß und Pleura-Erguß ein, wie in WO 98/16551 offenbart.

[0623] Jede der vorhergehenden Krankheiten und Störungen, zusammen mit allen Typen von Tumoren, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, können durch die vorliegende Erfindung in Übereinstimmung mit Fachwissen, wie offenbart in z.B. US Patent Nr. 5,712,291, daß vereinigte Vorteile aus der Anwendung von anti-angiogenen Strategien auf die Behandlung von angiogenen Krankheiten resultieren, in effektiver Weise behandelt werden.

[0624] Die Antikörper und/oder Immunkonjugate der Erfindung werden am bevorzugtesten bei der Behandlung von Tumoren verwendet. Tumore, bei denen die Angiogenese wichtig ist, schließen maligne Tumore und gutartige Tumore, wie akustisches Neurom, Neurofibrom, Trachom und pyogene Granulome ein. Die Angiogenese ist besonders vorherrschend bei der Bildung von festen Tumoren und Metastase. Jedoch ist die Angiogenese ebenfalls mit Blut getragenen Tumoren, wie etwa Leukämie, und verschiedenen akuten oder chronischen neoplastischen Krankheiten des Knochenmarks assoziiert, bei denen eine uneingeschränkte Proliferation von weißen Blutkörperchen stattfindet, gewöhnlich begleitet von einer Anämie, beeinträchtigter Blutgerinnung und einer Vergrößerung der Lymphknoten, Leber und Milz. Die Angiogenese spielt ebenso eine Rolle bei den Abnormitäten im Knochenmark, die zu Leukämie-artigen Tumoren führen.

[0625] Die Angiogenese ist wichtig bei zwei Stadien der Tumormetastase. Bei der Vaskularisierung des primären Tumors ermöglicht die Angiogenese den Zellen, in den Blutstrom einzutreten und durch den Körper zu zirkulieren. Nachdem die Tumorzellen die primäre Stelle verlassen und sich an der sekundären Stelle, der Metastasenstelle niedergelassen haben, muß eine Angiogenese stattfinden, bevor der neue Tumor wachsen und expandieren kann. Deshalb kann eine Verhinderung von Angiogenese die Metastase von Tumoren verhindern und das neoplastische Wachstum an der primären Stelle eingrenzen, was eine Behandlung mit anderen Therapeutika, insbesondere therapeutischen Mittel-Zielmittel-Konstrukten ermöglicht (siehe unten).

[0626] Die Verfahren mit VEGFR2-blockierendem, Anti-VEGF-Antikörper und 2C3-basierendem Antikörper oder Immunkonjugat, die durch diese Erfindung bereitgestellt werden, sind damit in breiter Weise auf die Behandlung eines beliebigen malignen Tumors mit einem Gefäßkomponenten anwendbar. Bei der Verwendung der Antikörper und/oder der Immunkonjugate der Erfindung bei der Behandlung von Tumoren, insbesondere vaskularisierten, malignen Tumoren, können die Mittel allein oder in Kombination mit z.B. chemotherapeutischen, radiotherapeutischen, apoptotischen, anti-angiogenen Mitteln und/oder Immuntoxinen oder Coagulganden verwendet werden.

[0627] Typische vaskularisierte Tumore für die Behandlung sind die festen Tumore, insbesondere Carcinome, die einen Gefäßkomponenten für die Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen erfordern. Beispielhafte feste Tumore, die unter Verwendung der Erfindung behandelt werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Carcinome der Lunge, der Brust, des Ovars, des Magens, des Pankreas, der Larynx, des Ösophagus, der Testes, der Leber, der Parotis, des Gallentrakts, des Colon, des Rectum, der Cervix, des Uterus, des Endometriums, der Niere, der Blase, der Prostata, der Schilddrüse, Plattenepithelcarcinome, Adenocarcinome, kleinzellige Carcinome, Melanome, Gliome, Glioblastome, Neuroblastome und ähnliche. WO 98/45331

veranschaulicht die Vielzahl von Tumortypen beispielhaft weiter, die unter Verwendung eines Anti-VEGF-Antikörpers in effektiver Weise behandelt werden können.

[0628] Die Kenntnis der Rolle der Angiogenese bei der Aufrechterhaltung und der Metastase von Tumoren haben zu einem prognostischen Indikator für Krebse, wie etwa Brustkrebs geführt. Die Menge an Neovaskularisierung, die in dem primären Tumor gefunden wird, wurde durch Zählen der Mikrogefäßdichte in dem Gebiet der intensivsten Neovaskularisierung bei invasivem Brustcarcinom bestimmt. Es wurde gefunden, daß ein hohes Niveau der Mikrogefäßdichte mit einem Tumorrückfall korreliert. Eine Kontrolle der Angiogenese durch die Therapien der vorliegenden Erfindung wird die Wiedererkrankung mit solchen Tumoren verringern oder verhindern.

[0629] Die vorliegende Erfindung wird zur Verwendung bei der Behandlung eines beliebigen Patienten in Erwägung gezogen, der sich mit einem festen Tumor vorstellt. Im Lichte der spezifischen Eigenschaften der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper-basierenden Zusammensetzungen werden die Therapeutika der vorliegenden Erfindung verringerte Nebenwirkungen haben. Besondere Vorteile werden zur Aufrechterhaltung oder Verstärkung von Immunantworten des Wirts gegen den Tumor führen, vermittelt durch Macrophagen, und ohne Nebenwirkungen auf das Knochengewebe. Die Erfindung wird somit die anti-angiogene Therapie der Wahl für die Behandlung von pädiatrischen Krebsen und Patienten mit Osteoporose und anderen Knochendefizienzen sein oder solchen Patienten, bei denen das Risiko besteht, daß sie dergleichen entwickeln.

[0630] Obwohl alle bösartigen Erkrankungen und feste Tumore durch die Erfindung behandelt werden können, werden die nicht-konjugierten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- und 2C3-Antikörper dieser Erfindung besonders zur Verwendung bei der Behandlung von Patienten mit stärker angiogenen Tumoren oder von Patienten in Erwägung gezogen, die das Risiko haben, Metastasen zu entwickeln.

[0631] Die vorliegende Erfindung ist ebenso als eine präventative oder prophylaktische Behandlung beabsichtigt. Diese Aspekte der Erfindung schließen die Fähigkeit der Erfindung ein, Patienten zu behandeln, die sich mit einem primären Tumor vorstellen, der metastatische Tumore oder Tumorzellen in den früheren Stadien der metastatischen Tumorausbreitung haben können. Als eine anti-angiogene Strategie kann die vorliegende Erfindung ebenso verwendet werden, um die Tumorentwicklung bei Patienten zu verhindern, die ein moderates oder hohes Risiko zum Entwickeln eines Tumors haben, basierend auf prognostischen Tests und/oder engen Verwandten, die an einem vererbten Krebs leiden.

[0632] Die konjugierten oder Immuntoxinformen der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF- und 2C3-Antikörper der Erfindung werden insbesondere zur Verwendung beim Zerstören oder Auflösen von festen Tumoren in Erwägung gezogen. Diese Aspekte der Erfindung können zusammen mit den nicht-konjugierten, anti-angiogenen Antikörpern der Erfindung oder mit anderen anti-angiogenen Ansätzen verwendet werden.

[0633] Es wird in leichter Weise von Fachleuten auf dem Gebiet verstanden werden, daß die Immunkonjugat- und Prodrug-Formen der vorliegenden Behandlungsverfahren den bestimmten Vorteil des Bereitstellen eines einzelnen therapeutischen Agens mit zwei Eigenschaften haben: die inhärente anti-angiogene Eigenschaft des Antikörpers und die therapeutische Eigenschaft des angehängten Agens (z.B. cytotoxisch, coagulativ, apoptotisch, etc.). Die konjugierten und Prodrug-Behandlungsformen der vorliegenden Antikörper haben damit eine unglaublich weite Nützlichkeit im ganzen Gebiet der Krebsbehandlung.

[0634] Die hierin bereitgestellte Anleitung hinsichtlich der geeigneteren Patienten zur Verwendung im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Aspekten der vorliegenden Erfindung soll lehren, daß bestimmte Patientenprofile bei der Auswahl von Patienten zur Behandlung durch die vorliegende Erfindung helfen können. Die Vorauswahl bestimmter Patienten oder Kategorien von Patienten verneinen in keiner Weise die Nützlichkeit der vorliegenden Erfindung im Zusammenhang mit der Behandlung von allen Patienten mit einem vaskularisierten Tumor oder anderen angiogenen Erkrankungen, wie oben beschrieben. Eine weitere Überlegung ist die Tatsache, daß der durch die Erfindung bereitgestellte Angriff auf den Tumor den Tumor gegenüber einer weiteren therapeutischen Behandlung prädisponieren kann, so daß die darauffolgende Behandlung zu einem insgesamt synergistischen Effekt oder sogar zu einer Totalremission oder Heilung führt.

[0635] Es wird nicht geglaubt, daß irgendein besonderer Typ Tumor von der Behandlung unter Verwendung der vorliegenden Erfindung ausgeschlossen werden sollte. Jedoch kann der Typ an Tumorzellen für die Verwendung der Erfindung in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln, insbesondere Chemotherapeutika und Anti-Tumorzell-Immuntoxinen relevant sein. Sowohl die nicht-konjugierten als auch konjugierten Aspekte der vorliegenden Therapien werden einen anti-angiogenen Effekt einschließen, der die Tumorgefäßpro-

liferation inhibieren wird. Die konjugierten und Prodrug-Behandlungsaspekte werden die Tumorgefäße weiter zerstören oder verschließen. Da die Gefäße im wesentlichen oder in allen festen Tumoren insgesamt dieselben sind, wird es klar sein, daß die vorliegende Methodologie weitgehend oder vollständig anwendbar auf die Behandlung von allen festen Tumoren ist, unabhängig von dem besonderen Phänotyp oder Genotyp der Tumorzellen selbst.

[0636] Therapeutisch wirksame Dosen von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern oder 2C3-basierenden Antikörper- oder Immunkonjugat-Konstrukten sind in leichter Weise unter Verwendung von Daten aus einem Tiermodell bestimmbar, z.B. wie in den hierin im einzelnen aufgeführten Studien gezeigt. Versuchstiere, die feste Tumore tragen, werden häufig verwendet, um geeignete therapeutische Dosen vor der Umsetzung in eine klinische Umgebung zu optimieren. Es ist bekannt, daß solche Modelle beim Vorhersagen von wirksamen Anti-Krebs-Strategien sehr zuverlässig sind. Zum Beispiel werden Mäuse, die feste Tumore tragen, solche, wie sie in den Beispielen verwendet werden, in großem Umfang bei der prä-klinischen Testung verwendet. Die Erfinder haben solche auf dem Gebiet akzeptierten Mausmodelle verwendet, um Arbeitsbereiche von therapeutischen Mitteln zu bestimmen, die vorteilhafte Anti-Tumor-Effekte mit minimaler Toxizität ergeben.

[0637] Bei der Verwendung von nicht-konjugierten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern oder 2C3-basierenden Antikörpern in anti-angiogenen Therapien kann man ebenso andere publizierte Daten hinzuziehen, um bei der Formulierung für Dosierungen für die klinische Behandlung zu assistieren. Zum Beispiel kann, obwohl die Antikörper der vorliegenden Erfindung bestimmte Vorteile gegenüber denjenigen auf dem Gebiet haben, die Information in der Literatur im Hinblick auf die Behandlung mit anderen Anti-VEGF-Antikörpern immer noch in Kombination mit den Daten und der Lehre in der vorliegenden Anmeldung verwendet werden, um Behandlungsprotokolle und -dosierungen zu konstruieren und/oder zu optimieren.

[0638] Zum Beispiel beschrieb Borgstrom et al. (1999) die Wichtigkeit von VEGF bei der Brustkrebsangiogenese in vivo unter Verwendung von MAb A4.6.1. Da die 2C3-artigen Antikörper dieser Erfindung äquivalente oder sogar verbesserte Anti-Tumor-Antworten bei Vergleichsstudien mit A4.6.1 aufwiesen, werden diese Antikörper auch eine signifikante Nützlichkeit bei der Behandlung von Brustkrebs haben. Die Erfinder erkannten weiterhin, wie von Fachleuten erkannt werden wird, daß Patienten mit Brustkrebs typischerweise Frauen in den Gruppen mit mittlerem oder höherem Alter sind, bei denen ebenfalls Probleme im Hinblick auf Osteoporose auftreten. Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- und 2C3-basierenden Antikörper der vorliegenden Erfindung werden somit den zusätzlichen Vorteil haben, daß sie keine Nebenwirkung auf dem Knochenmetabolismus verursachen, und werden somit zur Verwendung bei Brustkrebspatienten mit Osteoporose oder solchen Patienten, bei denen ein Risiko zur Entwicklung derselben besteht, nicht bevorzugt sein.

[0639] Derselbe Typ von Vorteilen macht VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- und 2C3-basierende Therapeutika zu den bevorzugten Arzneien zur Behandlung von pädiatrischen Krebsen. Bei Kindern mit Krebs ist das Bedürfnis, ein gesundes und substantielles Knochenwachstum fortzusetzen, offensichtlich. Da VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, die Aktivitäten der Osteoclasten und Chondroclasten nicht wesentlich beeinträchtigen werden, die bei der Entwicklung von Knochen wichtig sind, wird 2C3 wichtige Vorteile gegenüber anderen Antikörpern haben, wie etwa A4.6.1.

[0640] Borgstrom et al. (1999) berichteten ebenso, daß MAb A4.6.1 zu signifikanten Tumorregressionen bei Verwendung in Kombination mit Doxorubicin führte. Dies unterstützt die kombinierte Verwendung von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern und herkömmlichen cytotoxischen oder chemotherapeutischen Mitteln weiter, um signifikante klinische Ergebnisse beim Behandeln einer Vielzahl von Krebsen zu erzielen. Sowohl nicht-konjugiertes Doxorubicin als auch Doxorubicin-Prodrug-Kombinationen werden in Erwägung gezogen.

[0641] Ferrara und Kollegen berichteten ebenso über die Wirksamkeit und die Konzentrationsantwort eines murinen monoklonalen Anti-VEGF-Antikörpers bei Tumor-tragenden Mäusen und die Extrapolierung auf die Behandlung am Menschen (Mordenti et al., 1999). Die Studien waren so angelegt, daß sie die Konzentrations-Antwort-Beziehung des murinen, monoklonalen Anti-VEGF-Antikörpers bewerteten, so daß eine wirksame Plasmakonzentration der rekombinanten humanisierten Form des Antikörpers in Krebspatienten abgeschätzt werden konnte. Mordenti et al. (1999) schlußfolgerten, daß eine zufriedenstellende Tumorunterdrückung bei nackten Mäusen unter Verwendung von Dosen des murinen Antikörpers erzielt wurde, die in leichter Weise auf das humane System angewandt werden konnten, um klinische Dosierungsbehandlungsschemata zu definieren, die wirksam waren, um einen therapeutischen Antikörper zur Verwendung beim Menschen in dem erforderlichen wirksamen Bereich zu halten. Entsprechend können die Daten aus den gegenwärtig auf dem Gebiet akzeptierten Mausmodellen ebenso in geeignete Dosierungen für den Menschen unter Verwen-

derung des Typs von Analysen übersetzt werden, über den in Mordenti et al. (1999) berichtet wurde, zusätzlich zu den Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, wie hierin beschrieben.

[0642] Ergebnisse aus präklinischen Sicherheitsbewertungen einer rekombinanten, humanisierten Form von Genentech's Anti-VEGF-Antikörper in Affen (Ryan et al., 1999) dienen zur beispielhaften Veranschaulichung der Nachteile mit diesem besonderen Kandidaten-Therapeutikum. Obwohl der Antikörper eine pharmakologische Aktivität in diesem Tier hat, wiesen die Affen in diesen Studien eine Physischen-Dysplasie („physeal dysplasia“) auf, charakterisiert durch eine dosisabhängige Steigerung an hypertrophierten Chondrocyten, subchondraler Knochenplattenbildung und Inhibition der Gefäßinvasion der Wachstumsplatte. Keine solchen Nachteile werden bei der Verwendung des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers und 2C3-basierenden Therapeutika offensichtlich sein, die nicht die VEGF-Bindung und Signalgebung bei Chondroclasten und Chondrocyten inhibieren, die durch VEGFR1 vermittelt wird.

[0643] Daten aus einer weiteren Studie hinsichtlich der präklinischen Pharmacokinetiken, der Wahl des Maßstabs bei verschiedenen Arten und der Gewebeverteilung von Genentech's humanisiertem monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper wurden von Lin et al. (1999) berichtet. Diese Studien wurden in Mäusen, Ratten, Affen und Kaninchen durchgeführt, letzteren unter Verwendung von ¹²⁵I-markiertem Antikörper. Die pharmacokinetischen Daten aus Mäusen, Ratten und Affen wurden verwendet, um die Pharmacokinetiken des humanisierten Gegenstückantikörpers unter Verwendung von allometrischer Maßstabvergrößerung bei Menschen vorherzusagen. Entsprechend kann eine geeignete Dosierungsinformation für die Behandlung von humanen pathologischen Bedingungen entwickelt werden, wie etwa rheumatoide Arthritis, Augen-Neovaskularisierung und Krebs.

[0644] Eine humanisierte Version des Anti-VEGF-Antikörpers A4.6.1 ist in klinischen Versuchen als ein Anti-Krebsmittel verwendet worden (Brem, 1998; Baca et al., 1997; Presta et al., 1997). Deshalb können solche klinischen Daten ebenso als eine Bezugsquelle beim Designen von therapeutischen Dosen für den vorliegenden VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper und 2C3-Behandlung angesehen werden. Die vorliegende Erfindung zeigt, daß 2C3 ebenso effektiv wie A4.6.1 in Studien mit Tumor-tragenden Mäusen ist, obwohl die Spezifität zum Inhibieren von nur VEGFR2-vermittelten Wirkungen von VEGF ein Vorteil ist. WO 98/45331 veranschaulicht beispielhaft die Dosen von humanisierten Anti-VEGF-Antikörpern, die bei der Behandlung verwendet werden können.

[0645] Hinsichtlich der Verwendung von konjugierten VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern oder 2C3-basierenden Immunkonjugaten bei der Tumorthherapie kann man sich auf wissenschaftliche Literatur und Patentliteratur im Hinblick auf den Erfolg der Abgabe eines weiten Bereichs an Therapeutika an Tumorgefäßen beziehen, um einen vorteilhaften Effekt zu erzielen. Beispielsweise beschreiben jedes der US Patente Nr. 5,855,866, 5,877,289, 5,965,132, 6,051,230, 6,004,555, 5,776,427, 6,004,554 und 6,036,955 und US Patent Nr. 6,093,399 die Verwendung von solchen therapeutischen Mittel-Zielformen weiter.

[0646] Im vorliegenden Fall schließen therapeutische Mittel-Zielformen Zielformen-Teile („targeting agent portions“) ein, die einen anti-angiogenen Effekt einschließen, der die Anti-Tumoreffektivität des angehängten therapeutischen Mittels vergrößern oder anderweitig verbessern wird.

[0647] Wie auf dem Gebiet bekannt ist, gibt es realistische Ziele, die als eine Richtlinie in Verbindung mit präklinischem Testen verwendet werden kann, bevor man zu einer klinischen Behandlung übergeht. Jedoch, im Lichte des Fortschrittes anderer Anti-VEGF-Antikörper in der Klinik, den demonstrierten Anti-Tumoreffekten bei akzeptierten, hierin gezeigten Tiermodellen und der verbesserten Sicherheit der vorliegenden Strategien, stellt die vorliegende Erfindung ein Therapeutikum mit einer schnellen Entwicklung zur klinischen Behandlung bereit. Daher kann präklinisches Testen verwendet werden, um die vorteilhaftesten Antikörper, Dosen oder Kombinationen auszuwählen.

[0648] Jede VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper- oder Immunkonjugat-Dosis oder kombiniertes Medikament, das zu einem konsistent nachweisbaren anti-angiogenen Effekt, Inhibition der Metastase, Tumorgefäßzerstörung, Tumorthrombose, Nekrose und/oder allgemeinem Anti-Tumoreffekt führt, wird eine nützliche Erfindung definieren. Die vorliegende Erfindung kann ebenso gegen Gefäße stromabwärts an dem Tumor wirksam sein, d.h. auf wenigstens eine Teilmenge der ableitenden Gefäße abzielen, insbesondere, da Cytokine, die aus dem Tumor freigesetzt werden, auf diese Gefäße wirken werden, was ihr Antigenprofil verändert.

[0649] Es wird ebenso klar sein, daß sogar unter solchen Umständen, bei denen die anti-angiogenen

und/oder Tumoreffekte der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper- oder Immunkonjugat-Dosis oder kombinierten Therapien auf das niedrige Ende des beabsichtigten therapeutischen Bereichs hin tendieren, es dennoch sein kann, daß diese Therapie immer noch in gleicher Weise oder sogar noch effektiver ist als alle anderen bekannten Therapien im Kontext des besonderen Tumorziels oder Patienten. Es ist leider offensichtlich für einen klinischen Arzt, daß bestimmte Tumore und Zustände mittelfristig oder langfristig nicht effektiv behandelt werden können, aber dies verneint nicht die Nützlichkeit der vorliegenden Therapie, insbesondere wenn sie ungefähr wenigstens so effektiv wie die anderen allgemein vorgeschlagenen Strategien ist.

[0650] Beim Designen von geeigneten Dosen der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper- oder Immunkonjugat-Konstrukte oder kombinierten Therapeutika zur Behandlung von vaskularisierten Tumoren kann man in leichter Weise aus den hierin beschriebenen Tierstudien und dem Wissen in der Literatur extrapolieren, um bei geeigneten Dosen für die klinische Verabreichung anzukommen. Um eine Umwandlung von tierischen auf menschliche Dosen zu erzielen, würde man die Maske der verabreichten Mittel pro Einheitsmasse des Versuchstiers berücksichtigen und würde bevorzugt die Unterschiede hinsichtlich der Körperoberfläche (m^2) zwischen dem Versuchstier und dem menschlichen Patienten berücksichtigen. Alle solche Berechnungen sind wohlbekannt und für Fachleute Routine.

[0651] Wenn man z.B. die erfolgreichen Dosen von 2C3 in Mausstudien nimmt und Standardberechnungen auf der Grundlage von Masse und Oberfläche durchführt, wären effektive Dosen zur Verwendung beim menschlichen Patienten zwischen ungefähr 1 mg/m^2 und ungefähr 1000 mg/m^2 , bevorzugt zwischen ungefähr 50 mg/m^2 und 500 mg/m^2 und am bevorzugtesten zwischen ungefähr 10 mg/m^2 und ungefähr 100 mg/m^2 . Diese Dosen sind für VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende nackte Antikörper und VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate geeignet, obwohl die Dosen bevorzugt zur Verwendung im Zusammenhang mit nackten oder nicht-konjugierten Antikörpern zur Verwendung als anti-angiogene Mittel dienen.

[0652] Entsprechend erwägen die Erfinder unter Verwendung dieser Information, daß mögliche niedrige Dosen an VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörpern oder Immunkonjugaten zur Verabreichung an den Menschen ungefähr 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder ungefähr 50 mg/m^2 betragen, und daß nützliche hohe Dosen an solchen Antikörpern oder Immunkonjugaten zur Verabreichung an den Menschen ungefähr 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 925, 950, 975 oder ungefähr 1000 mg/m^2 betragen werden. Nützliche mittlere Dosen an VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörpern oder Immunkonjugaten zur Verabreichung an den Menschen werden erwogen, daß sie jegliche Dosis zwischen dem niedrigem und dem hohen Bereich sind, wie etwa ungefähr 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550 oder ungefähr 575 mg/m^2 oder ähnliches.

[0653] Jeder besondere Bereich unter Verwendung von einer der vorhergehend aufgeführten beispielhaften Dosen oder jeder Wert zwischen den besonders aufgeführten Bereichen wird in Erwägung gezogen. Wenn VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate verwendet werden, wird ebenso verstanden werden, daß coagulierende Immunkonjugate im allgemeinen in höheren Dosis als Toxin-Immunkonjugate verwendet werden können.

[0654] Im allgemeinen werden Dosierungsbereiche von zwischen ungefähr $10\text{--}100 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $10\text{--}90 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $10\text{--}80 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $20\text{--}100 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $20\text{--}90 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $20\text{--}80 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $30\text{--}100 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $30\text{--}90 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $30\text{--}80 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $15\text{--}100 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $25\text{--}100 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $35\text{--}100 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $15\text{--}90 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $25\text{--}90 \text{ mg/m}^2$, ungefähr $35\text{--}90 \text{ mg/m}^2$ oder ähnliches an VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörpern oder Immunkonjugaten bevorzugt werden. Ungeachtet dieser aufgeführten Bereiche wird es verstanden werden, daß angesichts der hierin dargestellten Parameter und detaillierten Anleitung weitere Variationen hinsichtlich der aktiven und optimalen Bereiche von der vorliegenden Erfindung umfaßt sein werden.

[0655] Deshalb wird es klar sein, daß geringere Dosen in Kombination mit anderen Mitteln geeigneter sein werden, und daß hohe Dosen immer noch toleriert werden können, insbesondere angesichts der verbesserten Sicherheit der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- und 2C3-basierenden Antikörper, die nur an VEGFR2 binden, und der noch weiter verbesserten Sicherheit von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- und 2C3-basierenden coagulierenden und anti-angiogenen Immunkonjugaten. Die Verwendung von humanen oder humanisierten Antikörpern (und fakultativ humanen coagulierenden oder anti-angiogenen Proteinen) macht die vorliegende Erfindung sogar noch sicherer für die klinische Verwendung, was weiterhin die

Chancen einer signifikanten Toxizität oder Nebenwirkungen in gesunden Geweben verringert.

[0656] Die Absicht der therapeutischen Schemata der vorliegenden Erfindung ist es im allgemeinen, signifikante Anti-Tumor-Effekte zu erzeugen, während gleichzeitig die Dosis unterhalb der mit nicht akzeptabler Toxizität assoziierten Konzentrationen gehalten wird. Zusätzlich zum Variieren der Dosis selbst kann das Verabreichungsschema ebenso angepaßt werden, um die Behandlungsstrategie zu optimieren. Ein Behandlungsprotokoll ist es, zwischen ungefähr 1 mg/m² und ungefähr 1000 mg/m², bevorzugt zwischen ungefähr 50 mg/m² und 500 mg/m², und am bevorzugtesten zwischen ungefähr 10 mg/m² und ungefähr 100 mg/m² des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpers oder 2C3-basierenden Antikörpers oder Immunkonjugats oder eines therapeutischen Cocktails, das derlei enthält, ungefähr 1 bis 3 Mal pro Woche zu verabreichen, bevorzugt mittels intravenöser oder intramuskulärer Verabreichung und am bevorzugtesten auf intravenösem Wege.

[0657] Beim Verabreichen der jeweiligen Dosen würde man bevorzugt eine pharmazeutisch akzeptable Zusammensetzung (gemäß FDA-Standards hinsichtlich Sterilität, Pyrogenizität, Reinheit und allgemeiner Sicherheit) für den Patienten in systemischer Weise bereitstellen. Eine intravenöse Injektion wird im allgemeinen bevorzugt. Eine kontinuierliche Infusion über eine Zeitperiode von ungefähr 1 oder 2 Stunden wird ebenso in Erwägung gezogen.

[0658] Natürlich werden vor einer weitverbreiteten Verwendung klinische Versuche durchgeführt werden. Die verschiedenen Elemente der Durchführung eines klinischen Versuchs, einschließlich der Patientenbehandlung und -Überwachung, wird Fachleuten auf dem Gebiet im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt sein. Die folgende Information wird als eine allgemeine Richtlinie zur Verwendung beim Etablieren von solchen Versuchen dargestellt.

[0659] Patienten, die für die ersten Studien mit VEGFR2-blockierender, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierender Behandlung ausgewählt werden, werden keine Antwort auf wenigstens einen Durchlauf herkömmlicher Therapie gezeigt haben und werden eine objektiv meßbare Krankheit haben, bestimmt anhand physischer Untersuchung, Labortechniken und/oder radiographischen Prozeduren. Jede Chemotherapie sollte wenigstens 2 Wochen vor Eintritt in die Studie abgebrochen werden. Wenn murine monoklonale Antikörper oder Antikörperteile verwendet werden, sollten die Patienten keine Historie einer Allergie gegenüber Mausimmunglobulin haben.

[0660] Bestimmte Vorteile werden mit der Verwendung eines eingesetzten zentralen venösen Katheters mit einem dreifachen Lumen-Port gefunden werden. Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Mittel sollten gefiltert, zum Beispiel unter Verwendung eines 0,22 µ-Filter, und geeignet verdünnt sein, wie etwa mit Salzlösung, auf ein Endvolumen von 100 ml. Vor der Verwendung sollte die Testprobe ebenso auf eine ähnliche Weise gefiltert werden und ihre Konzentration vor und nach der Filtration durch Bestimmen der A₂₈₀ bestimmt werden. Die erwartete Wiedergewinnung sollte innerhalb des Bereichs von 87% bis 99% liegen, und Anpassungen im Hinblick auf Proteinverlust können dann berücksichtigt werden.

[0661] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper oder Konjugate können über eine Periode von näherungsweise 4 – 24 Stunden verabreicht werden; wobei jeder Patient 2 – 4 Fusionen in 2 – 7-tägigen Intervallen erhält. Die Verabreichung kann ebenso mittels einer stetigen Infusionsrate über eine 7-tägige Periode durchgeführt werden. Die Infusion, die bei einem beliebigen Dosisniveau gegeben wird, sollte von jeglicher beobachteten Toxizität abhängig sein. Daher sollten, wenn eine Toxizität vom Grad II nach einer einzelnen Infusion oder nach einer bestimmten Zeitperiode für eine Infusion in stetiger Rate erreicht wurde, weitere Dosen zurückgehalten oder die Infusion mit stetiger Rate abgebrochen werden, es sei denn, daß sich die Toxizität verbessern würde. Steigende Dosen an VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapeutika sollten an Gruppen von Patienten verabreicht werden, bis näherungsweise 60% der Patienten eine Toxizität vom nicht-akzeptablen Grad III oder IV in jeder Kategorie zeigen würden. Dosen, die 2/3 dieses Werts betragen, werden als die sichere Dosis definiert.

[0662] Eine physische Untersuchung, Tumormessungen und Labortests sollten natürlich vor der Behandlung und in Intervallen bis zu 1 Monat später durchgeführt werden. Labortests sollten vollständige Blutzählungen, Serumcreatinin, Creatinkinase, Elektrolyte, Harnstoff, Stickstoff, SGOT, Bilirubin, Albumin und gesamtes Serumprotein einschließen. Serumproben, die bis zu 60 Tagen nach der Behandlung genommen worden sind, sollten mittels Radioimmunassay auf die Anwesenheit des verabreichten Therapeutikums und Antikörpern gegen jegliche Teile davon bewertet werden. Immunologische Analysen der Seren unter Verwendung eines Standardassay, wie zum Beispiel eines ELISA oder RIA, werden es ermöglichen, daß die Pharmakokinetiken und

Clearance des VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden therapeutischen Mittels bewertet werden.

[0663] Um die Anti-Tumor-Antwort zu bewerten, sollten die Patienten nach 48 Stunden bis 1 Woche und wieder nach 30 Tagen nach der letzten Infusion untersucht werden. Wenn eine tastbare Krankheit vorhanden war, sollten 2 rechtwinklige Durchmesser aller Massen täglich während der Behandlung gemessen werden, innerhalb 1 Woche nach Abschluß der Therapie und nach 30 Tagen. Um eine nicht-tastbare Krankheit zu messen, könnten serielle CT-Scans in 1-cm-Intervallen durch die gesamte Brust, Abdomen und Pelvis nach 48 Stunden bis 1 Woche und wieder nach 30 Tagen durchgeführt werden. Gewebeprobe sollten ebenso histologisch und/oder mittels Fluoreszenzcytometrie unter Verwendung von Biopsien aus den Krankheitsstellen oder sogar Blut- oder Flüssigkeitsproben, sofern geeignet, bewertet werden.

[0664] Klinische Antworten können mit einem akzeptablen Maß definiert werden. Zum Beispiel kann eine vollständige Antwort anhand des Verschwindens des gesamten meßbaren Tumors 1 Monat nach der Behandlung definiert werden, während eine partielle Antwort durch eine 50%-ige oder größere Verringerung der Summe der Produkte der rechtwinkligen Durchmesser aller bewertbaren Tumorknoten 1 Monat nach der Behandlung definiert werden können, wobei keine Tumorstelle eine Vergrößerung aufweist. In ähnlicher Weise kann eine gemischte Antwort anhand einer Reduktion des Produktes der rechtwinkligen Durchmesser aller meßbaren Läsionen um 50% oder größer 1 Monat nach der Behandlung definiert werden, wobei ein Krankheitsfortschritt an einer oder mehreren Stellen auftritt.

[0665] Im Lichte der Ergebnisse aus klinischen Versuchen, wie diejenigen, die oben beschrieben sind, kann ein sogar noch genaueres Behandlungsschema formuliert werden. Darüberhinaus kann eine gewisse Variation hinsichtlich der Dosierung später notwendig sein, abhängig von dem Zustand des behandelten Patienten. Der Arzt, der für die Verabreichung verantwortlich ist, wird im Lichte der vorliegenden Offenbarung in der Lage sein, die geeignete Dosis für den einzelnen Patienten zu bestimmen. Eine solche Optimierung und Anpassung wird routinemäßig auf dem Gebiet durchgeführt und reflektiert keineswegs einen übermäßigen Aufwand an Experimentierung.

G. Kombinationstherapien

[0666] Sei es zur Verwendung bei der Behandlung von angiogenen Krankheiten, wie etwa Arthritis, Psoriasis, Arteriosklerose, diabetische Retinopathie, altersbedingte Maculadegeneration, Basedowsche Krankheit, Gefäßstenose, Hämangiom und neovaskuläres Glaukom (oder andere oben beschriebene Krankheiten) oder feste Tumore, die vorliegende Erfindung kann mit anderen Therapien kombiniert werden.

[0667] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Behandlungsverfahren der vorliegenden Erfindung können mit allen anderen Verfahren kombiniert werden, die im allgemeinen bei der Behandlung des einzelnen Tumors, Krankheit oder Störung, die der Patient aufweist, verwendet werden. Solange wie bekannt ist, daß ein bestimmter therapeutischer Ansatz nicht nachteilig für den Zustand des Patienten selbst ist und nicht signifikant der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Behandlung entgegenwirkt, wird seine Kombination mit der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

[0668] Im Zusammenhang mit der Behandlung von festen Tumoren, kann die vorliegende Erfindung in Kombination mit klassischen Ansätzen, wie etwa Operation, Radiotherapie, Chemotherapie und ähnlichem verwendet werden. Die Erfindung stellt deshalb kombinierte Therapien bereit, bei denen VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Konstrukte zeitgleich mit, vor oder nach einem chirurgischen Eingriff oder einer Strahlungsbehandlung verwendet werden, oder an Patienten mit, vor oder nach herkömmlichen chemotherapeutischen, radiotherapeutischen oder anti-angiogenen Mittel oder zielgerichtet eingesetzten Immunotoxinen oder Coagulganden verabreicht werden.

[0669] Die kombinierte Verwendung der Erfindung mit Radiotherapie, Radiotherapeutika, antiangiogenen Mitteln, Apoptose-induzierenden Mitteln und Anti-Tubulin-Arzneien wird besonders bevorzugt. Viele Beispiele für solche Mittel sind oben zusammen mit den Immunkonjugaten der vorliegenden Erfindung beschrieben worden. Jedes der anfänglich zur Verwendung als ein Teil eines therapeutischen Konjugats beschriebenen Mittel kann ebenso separat verwendet werden, aber immer noch in funktionierender Kombination mit der vorliegenden Erfindung.

[0670] Wenn eines oder mehrere Mittel in Kombination mit der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Therapie verwendet werden, gibt es kein Erfordernis dafür, daß die kombinierten

Resultate additiv im Hinblick auf die Effekte sind, die beobachtet werden, wenn jede Behandlung separat durchgeführt wird. Obwohl wenigstens additive Effekte im allgemeinen wünschenswert sind, wäre jeder erhöhte Anti-Tumor-Effekt über einen der einzelnen Therapie hinaus von Vorteil. Ebenso gibt es kein besonderes Erfordernis dafür, daß die kombinierte Behandlung synergistische Effekte aufweist, obwohl dies sicherlich möglich und vorteilhaft ist.

[0671] Um eine kombinierte Anti-Tumor-Therapie auszuüben, würde man einfach ein VEGFR2-blockierendes, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierendes Konstrukt in Kombination mit einem anderen Anti-Krebsmittel auf eine Weise an ein Tier verabreichen, die ausreicht, um zu ihren kombinierten Anti-Tumorkwirkungen innerhalb des Tieres zu führen. Die Mittel würden deshalb in effektiven Mengen und für Zeitperioden bereitgestellt werden, die ausreichen, um zu ihrer kombinierten Anwesenheit innerhalb der Tumorgefäße und zu ihren kombinierten Wirkungen in der Tumorumgebung zu führen. Um dieses Ziel zu erzielen, können das VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Therapeutikum und die Anti-Krebsmittel an das Tier simultan verabreicht werden, entweder in einer einzelnen Zusammensetzung oder als zwei unterschiedliche Zusammensetzungen unter Verwendung unterschiedlicher Verabreichungsrouten.

[0672] Alternativ kann die VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Behandlung der Anti-Krebsmittel-Behandlung vorausgehen oder folgend, beispielsweise in Intervallen im Bereich von Minuten bis Wochen und Monaten. Man würde sicherstellen, daß das Anti-Krebsmittel und das VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Mittel einen vorteilhaft kombinierten Effekt auf den Tumor ausüben.

[0673] Die meisten Anti-Krebsmittel würden vor der VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden anti-angiogenen Therapie gegeben werden. Jedoch, wo VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Immunkonjugate verwendet werden, können verschiedenen Anti-Krebsmittel zeitgleich oder aufeinanderfolgend verabreicht werden.

[0674] Die allgemeine Verwendung von Kombinationen von Substanzen bei der Krebsbehandlung ist gut bekannt. Zum Beispiel offenbart US-Patent Nr. 5,710,134 Bestandteile, die eine Nekrose in Tumoren in Kombination mit nicht-toxischen Substanzen oder „Prodrugs“ induzieren. Die durch die nekrotischen Prozesse freigesetzten Enzyme spalten die nicht-toxische „Prodrug“ in die toxische „Arznei“ („drug“), die zu einem Tumorzelltod führt. Ebenso offenbart US-Patent Nr. 5,747,469 die kombinierte Verwendung von viralen Vektoren, die für p53 kodieren, und DNA-schädigenden Mitteln. Solche ähnlichen Ansätze können mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0675] In einigen Situationen kann es sogar wünschenswert sein, die Zeitperiode für die Behandlung signifikant auszudehnen, wenn mehrere Tage (2, 3, 4, 5, 6 oder 7), mehrere Wochen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8) oder sogar mehrere Monate (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8) zwischen den jeweiligen Verabreichungen verstreichen. Dies wäre unter Umständen vorteilhaft, bei denen eine Behandlung im wesentlichen den Tumor zerstören sollte, wie etwa eine Operation oder Chemotherapie, und eine andere Behandlung die Mikrometastase oder das erneute Tumorwachstum verhindern sollte, wie etwa eine auf anti-angiogenen Mitteln basierende Therapie. Antiangiogene Mittel sollten zu einer sorgfältigen Zeit nach der Operation verabreicht werden, um eine effektive Wundheilung zu ermöglichen.

[0676] Es wird ebenso erwogen, daß mehr als eine Verabreichung von entweder dem VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Mittel oder des Anti-Krebsmittels verwendet werden wird. Die Mittel können miteinander austauschbar verabreicht werden, an alternierenden Tagen oder Wochen, oder eine Sequenz von VEGFR2-blockierender, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierender Behandlung kann gegeben werden, gefolgt von einer Sequenz einer Anti-Krebsmittel-Therapie. Auf jeden Fall ist, um eine Tumoregression unter Verwendung einer kombinierten Therapie zu erzielen, alles, was erforderlich ist, beide Mittel in einer kombinierten Menge abzugeben, die wirksam ist, um einen Anti-Tumor-Effekt auszuüben, unabhängig von den Zeiten für die Verabreichung.

[0677] Im Hinblick auf eine Operation kann jeder chirurgische Eingriff in Kombination mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt werden. Im Zusammenhang mit Radiotherapie wird jeder Mechanismus zum Induzieren von DNA-Schädigung lokal innerhalb von Tumorzellen in Erwägung gezogen, wie etwa γ -Bestrahlung, Röntgenstrahlen, UV-Strahlung, Mikrowellen und sogar elektronische Emissionen und ähnliches. Die gerichtete Abgabe von Radioisotopen an Tumorzellen wird ebenso in Erwägung gezogen, und dies kann zusammen mit einem Ziel-Antikörper („targeting antibody“) oder anderen Ziel-Mitteln, und bevorzugt mit VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern, wie etwa 2C3, verwendet werden.

[0678] Die Cytokintherapie hat sich ebenfalls als ein effektiver Partner für kombinierte Verabreichungsschemata von Therapeutika herausgestellt. Verschiedene Cytokine können in solchen kombinierten Ansätzen verwendet werden. Beispiele für Cytokine schließen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- β , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF α , TNF β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ ein. Cytokine werden gemäß Standard-Behandlungsschemata verabreicht, in Übereinstimmung mit klinischen Indikationen, wie etwa der Zustand des Patienten und die relative Toxizität des Cytokins. Uteroglobine können ebenso verwendet werden, um Metastasen zu verhindern, oder zu inhibieren (U.S. Patent Nr. 5,696,092).

G1. Chemotherapeutika

[0679] In bestimmten Ausführungsformen können die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem chemotherapeutischen Mittel verabreicht werden. Eine Vielzahl von chemotherapeutischen Mitteln können bei den hierin offenbarten kombinierten Behandlungsverfahren verwendet werden. In Erwägung gezogene chemotherapeutische Mittel schließen beispielsweise Adriamycin, Dactinomycin, Mitomycin, Carminomycin, Daunomycin, Doxorubicin, Tamoxifen, Taxol, Taxotere, Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Etoposid (VP-16), 5-Fluoruracil (SFU), Cytosinarabinosid, Cyclophosphamid, Thiotepa, Methotrexat, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Cisplatin (CDDP), Aminopterin, Combretastatin(e) und Derivate und Prodrugs davon ein.

[0680] Wie von Fachleuten auf dem Gebiet verstanden werden wird, werden die geeigneten Dosen der chemotherapeutischen Mittel im allgemeinen bei ungefähr denjenigen liegen, die bereits in klinischen Therapien verwendet werden, bei denen die Chemotherapeutika alleine oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verabreicht werden. Beispielsweise können Mittel wie etwa Cisplatin und andere DNA-alkylierende Mittel verwendet werden. Cisplatin ist in großem Umfang verwendet worden, um Krebs zu behandeln, wobei die wirksamen Dosen, die in klinischen Anwendungen verwendet wurden, 20 mg/m² für 5 Tage alle drei Wochen für insgesamt drei Verläufe betragen. Cisplatin wird nicht oral absorbiert und muß deshalb über Injektion intravenös, subkutan, intratumoral oder intraperitoneal abgegeben werden.

[0681] Weitere nützliche Mittel schließen Verbindungen ein, die die DNA-Replikation, Mitose und chromosomale Segregation stören. Solche chemotherapeutischen Verbindungen schließen Adriamycin, ebenso bekannt als Doxorubicin, Etoposid, Verapamil, Podophyllo toxin und ähnliches ein. Weitverbreitet verwendet in einer klinischen Umgebung zur Behandlung von Neoplasmen, werden diese Verbindungen durch Bolus-Injektionen intravenös in Dosen im Bereich von 25 – 75 mg/m² in 21-tägigen Intervallen für Adriamycin, bis 35 – 50 mg/m² für Etoposid intravenös oder zweimal die intravenöse Dosis oral verabreicht.

[0682] Mittel, die die Synthese und Genauigkeit von Polynukleotid-Vorläufern („precursors“) zerstören, können ebenso verwendet werden. Besonders nützlich sind Mittel, die ein weitreichendes Testen durchlaufen haben und in leichter Weise verfügbar sind. Als solche werden Mittel, wie etwa 5-Fluoruracil (5-FU) bevorzugt von neoplastischem Gewebe verwendet, was dieses besonders nützlich zum Targeting auf neoplastische Zellen macht. Obwohl ziemlich toxisch, ist 5-FU in einem großen Bereich von Trägern anwendbar, einschließlich topischer Träger, jedoch wird die intravenöse Verabreichung mit Dosen im Bereich von 3 bis 15 mg/kg/Tag häufig verwendet.

[0683] Beispielhafte chemotherapeutische Mittel für die kombinierte Therapie werden in Tabelle C aufgelistet. Jedes der aufgelisteten Mittel ist beispielhaft und nicht beschränkend. Der Fachmann wird auf "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15. Auflage, Kapitel 33, insbesondere Seiten 624–652 verwiesen. Eine Variation hinsichtlich der Dosierung wird wahrscheinlich stattfinden, abhängig von dem zu behandelnden Zustand. Der Arzt, der die Behandlung verabreicht, wird in der Lage sein, die geeignete Dosis für den einzelnen Patienten zu bestimmen.

TABELLE C

CHEMOTHERAPEUTISCHE MITTEL, DIE BEI EINER NEOPLASTISCHEN KRANKHEIT NÜTZLICH SIND

Klasse	Typ des Mittel	Freinamen (andere Namen)	Krankheit
Alkylierende Mittel	Stickstoffloste	Mechlorethamin (HN ₂)	Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome
		Cyclophosphamid Ifosfamid	Akute und chronische lymphocytische Leukämien, Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, vielfaches Myelom, Neuroblastom, Brust-, Ovar-, Lungen-, Wilm-Tumor-, Cervix-, Testis-, Weichgewebe-Sarcome
		Melphalan (L-Sarcolysin)	Multiplres Myelom, Brust, Ovar
		Chlorambucil	Chronische lymphocytische Leukämie, primäre Macroglobulinämie, Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsches Lymphom
	Ethylenimine und Methylmelamine	Hexamethylmelanin	Ovar
		Thiotepa	Blase, Brust, Ovar
	Alkylsulfonate	Busulfan	Chronische granulocytische Leukämie
	Nitrosoharnstoffen	Carmustin (BCNU)	Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, primäre Hirntumore, multiples Myelom, malignes Melanom
		Lomustin (CCNU)	Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, primäre Hirntumore, kleinzellige Lunge
		Semustin (Methyl-CCNU)	Primäre Hirntumore, Magen, Colon
		Streptozocin (Streptozotocin)	Malignes pankreatisches Insulinom, malignes Carcinoid
	Triazine	Dacarbazin (DTIC; Dimethyltriazenoimidazolcarboxamid)	Malignes Melanom, Hodgkinsche Krankheit, Weichgewebe-Sarcome
Antimetaboliten	Folsäureanaloge	Methotrexat (Amethopterin)	Akute lymphocytische Leukämie, Choriocarcinom, Mycosis fungoides, Brust, Kopf und Nacken, Lunge, osteogenes Sarcom
	Pyrimidinanaloge	Fluoruracil (5-Fluoruracil, 5-FU) Floxuridin (Fluorodeoxyuridin; FUdR)	Brust, Colon, Magen, Pankreas, Ovar, Kopf und Nacken, Harnblase, prämaligne Hautläsionen (topisch)
		Cytarabin (Cytosinarabinosid)	Akute granulocytische und akute lymphocytische Leukämien
		Mercaptopurin (6-Mercaptopurin; 6-MP)	Akute lymphocytische, akute granulocytische und chronische granulocytische Leukämien

Klasse	Typ des Mittel	Freinamen (andere Namen)	Krankheit
	Purin-Analoge und verwandte Inhibitoren	Thioguanin (6-Thioguanin; TG)	Akute granulocytische, akute lymphocytische und chronische granulocytische Leukämien
		Pentostatin (2-Deoxycoformycin)	Haarzelleukämie, Mycosis fungoides, chronische lymphocytische Leukämie
Natürliche Produkte	Vincaalkaloide	Vinblastin (VLB)	Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, Brust, Testis
		Vincristin	Akute lymphocytische Leukämie, Neuroblastom, Wilmscher Tumor, Rhabdomyosarcom, Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, kleinzellige Lunge
	Epipodophyllotoxine	Etoposid Tertiposid	Testis, kleinzellige Lunge und andere Lunge, Brust, Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, akute granulocytische Leukämie, Kaposi-Sarcom
	Antibiotika	Dactinomycin (Actinomycin D)	Choriocarcinom, Wilmscher Tumor, Rhabdomyosarcom, Testis, Kaposi-Sarcom
		Daunorubicin (Daunomycin; Rubidomycin)	Akute granulocytische und akute lymphocytische Leukämien
		Doxorubicin	Weichgewebe, osteogene und andere Sarcome; Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome, akute Leukämien, urogenital, Schilddrüse, Lunge, Magen, Neuroblastom
		Bleomycin	Testis, Kopf und Nacken, Haut, Ösophagus, Lunge und Urogenitaltrakt; Hodgkinsche Krankheit, nicht-Hodgkinsche Lymphome
		Plicamycin (Mithramycin)	Testis, maligne Hypercalciämie
		Mitomycin (Mitomycin C)	Magen, Cervix, Colon, Brust, Pankreas, Blase, Kopf und Nacken
	Enzyme	L-Asparaginase	Akute lymphocytische Leukämie
	Biologische Antwortmodifikatoren („Response Modifiers“)	Interferon alfa	Haarzelleukämie, Kaposi-Sarcom, Melanom, Carcinoid, renale Zelle, Ovar, Blase, nicht-Hodgkinsche Lymphome, Mycosis fungoides, multiples Myelom, chronische granulocytische Leukämie
	Platinkoordinationskomplexe	Cisplatin (<i>cis</i> -DDP) Carboplatin	Testis, Ovar, Blase, Kopf und Nacken, Lunge, Schilddrüse, Cervix, Endometrium, Neuroblastom, osteogenes Sarcom

Klasse	Typ des Mittel	Freinamen (andere Namen)	Krankheit
Verschiedene Mittel	Anthracendion	Mitoxantron	Akute granulocytische Leukämie, Brust
	Substituierter Harnstoff	Hydroxyharnstoff	Chronische granulocytische Leukämie, Polycythaemia vera, essentielle Thrombocytose, malignes Melanom
	Methylhydrazin-derivat	Procarbazin (N-Methylhydrazin, MIH)	Hodgkinsche Krankheit
	Adrenocortikaler Unterdrücker („adrenocortical suppressant“)	Mitotane (o, p'-DDD)	Adrenaler Cortex
		Aminoglutethimid	Brust
Hormone und Antagonisten	Adrenocorticosteroide	Prednison (mehrere andere äquivalente Zubereitungen erhältlich)	Akute und chronische lymphocytische Leukämien, nicht-Hodgkinsche Lymphome, Hodgkinsche Krankheit, Brust
	Progestin	Hydroxyprogesteron-caproat Medroxyprogesteron-acetat Megestrolacetat	Endometrium, Brust
	Östrogene	Diethylstilbestrol Ethinylöstradiol (andere Zubereitungen erhältlich)	Brust, Prostata
	Anti-Östrogen	Tamoxifen	Brust
	Androgene	Testosteronpropionat Fluoxymesteron (andere Zubereitungen erhältlich)	Brust
	Anti-Androgen	Flutamid	Prostata
	Gonadotropin-freisetzendes Hormon-Analog	Leuprolid	Prostata

G2. Anti-angiogene Mittel

[0684] Unter normalen physiologischen Bedingungen durchlaufen Menschen oder Tiere eine Angiogenese nur in sehr spezifischen beschränkten Situationen. Zum Beispiel wird die Angiogenese normalerweise bei der Wundheilung, der fötalen und Embryo-Entwicklung und der Bildung der Corpus luteum, Endometrium und Placenta beobachtet. Unkontrollierte (persistente und/oder nicht-regulierte) Angiogenese steht mit verschiedenen Krankheitszuständen im Zusammenhang und tritt während der Tumormetastase auf.

[0685] Es wird gedacht, daß sowohl kontrollierte als auch nicht-kontrollierte Angiogenese auf eine ähnliche Weise fortschreitet. Endothelzellen und Pericyten, umgeben von einer Basalmembran, bilden kapillare Blutgefäße. Die Angiogenese beginnt mit der Erosion der Basalmembran durch Enzyme, die von den Endothelzellen

und Leukocyten freigesetzt werden. Die Endothelzellen, die das Lumen der Blutgefäße auskleiden, dringen dann durch die Basalmembran vor. Angiogene Stimulantien induzieren, daß die Endothelzellen durch die erodierte Basalmembran wandern. Die wandernden Zellen bilden einen „Sproß“ von dem Elternblutgefäß, wobei die Endothelzellen Mitose durchlaufen und proliferieren. Die Endothel-Sprossen verschmelzen miteinander, um kapillare Schleifen zu bilden, und erzeugen das neue Blutgefäß.

[0686] Die vorliegende VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Erfindung kann in Kombination mit einer oder mehreren anderen anti-angiogenen Therapien verwendet werden. Kombinationen mit anderen Mitteln, die VEGF inhibieren, sind eingeschlossen, wie etwa andere neutralisierende Antikörper (Kim et al., 1992; Presta et al., 1997; Sioussat et al., 1993; Kondo et al., 1993; Asano et al., 1995), lösliche Rezeptorkonstrukte (Kendall and Thomas, 1993; Aiello et al., 1995; Lin et al., 1998; Millauer et al., 1996), Tyrosinkinaseinhibitoren (Siemeister et al., 1998), Antisense-Strategien, RNA-Aptamere und Ribozyme gegen VEGF oder VEGF-Rezeptoren (Saleh et al., 1996; Cheng et al., 1996; Ke et al., 1998; Parry et al., 1999). Varianten von VEGF mit antagonistischen Eigenschaften können ebenso verwendet werden, wie beschrieben in WO 98/16551.

[0687] Die anti-angiogenen Therapien können auf der Bereitstellung eines anti-angiogenen Mittels oder der Inhibition eines angiogenen Mittels begründet sein. Die Inhibition von angiogenen Mitteln kann durch eines oder mehrere der Verfahren erzielt werden, die zum Inhibieren von VEGF beschrieben worden sind, einschließlich neutralisierender Antikörper, löslicher Rezeptorkonstrukte, Small-Molecule-Inhibitoren, Antisense, RNA-Aptamere und Ribozyme können alle verwendet werden. Zum Beispiel können Antikörper gegen Angiogenin verwendet werden, wie in U.S. Patent Nr. 5,520,914 beschrieben. Dadurch, daß FGF mit Angiogenese in Beziehung steht, können ebenso FGF-Inhibitoren verwendet werden. Bestimmte Beispiele sind die Verbindungen mit N-Acetylglucosamin, alternierend in der Sequenz mit 2-Osulfatierter Uronsäure, als ihre Hauptwiederholungseinheiten, einschließlich Glycosaminoglycanen, wie etwa Archaransulfat. Solche Verbindungen werden in U.S. Patent Nr. 6,028,061 beschrieben und können in Kombination hiermit verwendet werden.

[0688] Zahlreiche Tyrosinkinaseinhibitoren, die für die Behandlung der Angiogenese nützlich sind, wie sie sich in verschiedenen Krankheitszuständen manifestiert, sind jetzt bekannt. Diese schließen zum Beispiel die 4-Aminopyrrolo[2,3-d]pyrimidine aus U.S. Patent Nr. 5,639,757 ein, die ebenso in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Weitere Beispiele für organische Moleküle, die in der Lage sind, die Tyrosinkinasesignaltransduktion über den VEGFR2-Rezeptor zu modulieren, sind die Chinazolin-Verbindungen und Zusammensetzungen aus U.S. Patent Nr. 5,792,771, das weitere Kombinationen zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung bei der Behandlung von angiogenen Krankheiten beschreibt.

[0689] Es ist ebenso gezeigt worden, daß Verbindungen von anderen chemischen Klassen die Angiogenese inhibieren und in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Zum Beispiel können Steroide, wie die angiostatischen 4,9(11)-Steroide und die C21-oxygenierten Steroide, wie in U.S. Patent Nr. 5,972,922 beschrieben, in einer kombinierten Therapie verwendet werden. U.S. Patent Nr. 5,712,291 und 5,593,990 beschreiben Thalidomid und verwandte Verbindungen, Vorläufer, Analoge, Metabolite und Hydrolyseprodukte, die ebenso in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, um die Angiogenese zu inhibieren. Die Verbindungen in U.S. Patent Nr. 5,712,291 und 5,593,990 können oral verabreicht werden. Weitere beispielhafte anti-angiogene Mittel, die im Zusammenhang mit einer kombinierten Therapie nützlich sind, werden in Tabelle D aufgelistet. Jedes der darin aufgelisteten Mittel ist beispielhaft und in keiner Weise beschränkend.

TABELLE D

INHIBITOREN UND NEGATIVE REGULATOREN DER ANGIOGENESE

Substanzen	Literaturangaben
Angiostatin	O'Reilly et al., 1994
Endostatin	O'Reilly et al., 1997
16kDa Prolactin-Fragment	Ferrara et al., 1991; Clapp et al., 1993; D'Angelo et al., 1995; Lee et al., 1998
Laminin-Peptide	Kleinman et al., 1993; Yamamura et al., 1993; Iwamoto et al., 1996; Tryggvason, 1993
Fibronectin-Peptide	Grant et al., 1998; Sheu et al., 1997
Gewebe-Metalloproteinase-Inhibitoren (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1, -2)	Soff et al., 1995
Tumornekrosefaktor α (hohe Dosis, in vitro)	Frater-Schroder et al., 1987
TGF- β 1	RayChadhury and D'Amore, 1991; Tada et al., 1994
Interferone (IFN- α , - β , - γ)	Moore et al., 1998; Lingen et al., 1998
ELR- CXC Chemokine: IL-12; SDF-1; MIG; Blutplättchenfaktor- 4 (PF-4); IP-10	Moore et al., 1998; Hiscox and Jiang, 1997; Coughlin et al., 1998; Tanaka et al., 1997
Thrombospondin (TSP)	Good et al., 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma et al., 1993; Sheibani and Frazier, 1995; Volpert et al., 1998
SPARC	Hasselaar and Sage, 1992; Lane et al., 1992; Jendraschak and Sage, 1996
2-Methoxyoestradiol	Fotsis et al., 1994
Proliferin-verwandtes Protein	Jackson et al., 1994
Suramin	Gagliardi et al., 1992; Takano et al., 1994; Waltenberger et al., 1996; Gagliardi et al., 1998; Manetti et al., 1998
Thalidomid	D'Amato et al., 1994; Kenyon et al., 1997 Wells, 1998
Cortison	Thorpe et al., 1993 Folkman et al., 1983 Sakamoto et al., 1986
Linomid	Vukanovic et al., 1993; Ziche et al., 1998; Nagler et al., 1998
Fumagillin (AGM-1470; TNP-470)	Sipos et al., 1994; Yoshida et al., 1998
Tamoxifen	Gagliardi and Collins, 1993; Lindner and Borden, 1997; Haran et al., 1994
Koreanischer Mistelextrakt (<i>Viscum album coloratum</i>)	Yoon et al., 1995
Retinoide	Oikawa et al., 1989; Lingen et al., 1996; Majewski et al. 1996
CM101	Hellerqvist et al., 1993; Quinn et al., 1995; Wamil et al., 1997; DeVore et al., 1997
Dexamethason	Hori et al., 1996; Wolff et al., 1997
Leukämie-inhibitorischer Faktor (LIF)	Pepper et al., 1995

[0690] Bestimmte bevorzugte Bestandteile zur Verwendung beim Inhibieren der Angiogenese sind Angiostatin, Endostatin, Vasclostatin, Canstatin und Maspin. Solche Mittel werden oben im Zusammenhang mit den Immunkonjugaten der vorliegenden Erfindung beschrieben, können aber in kombinierter, aber nicht-konjugierter

ter Form verwendet werden. Andere bevorzugte Mittel, die ebenso oben in Immunkonjugat-Form beschrieben worden sind, sind die Angiopoietine, insbesondere Angiopoietin-2, das zur kombinierten Verwendung mit der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen wird.

[0691] Es ist bereits gezeigt worden, daß bestimmte anti-angiogene Therapien Tumorregressionen verursachen, einschließlich des bakteriellen Polysaccharids CM101 und des Antikörpers LM609. CM101 ist ein bakterielles Polysaccharid, das in seiner Fähigkeit, eine neovaskuläre Entzündung in Tumoren zu induzieren, gut charakterisiert worden ist. CM101 bindet an Rezeptoren, die auf entdifferenziertem Endothel exprimiert werden, das die Aktivierung des Complementsystems stimuliert, und vernetzt diese. Es initiiert ebenso eine Cytokingetriebene Entzündungsantwort, die selektiv auf den Tumor zielt. Es ist ein einzigartig antipathoangiogenes Mittel, das die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren herunterreguliert. CM101 ist gegenwärtig in klinischen Versuchen als eine Anti-Krebsarznei und kann in Kombination hiermit verwendet werden.

[0692] Thrombospondin (TSP-1) und Plättchenfaktor 4 (PF4), können ebenso in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Dies sind beides Angiogenese-Inhibitoren, die mit Heparin assoziieren und in Plättchen- α -Granula gefunden werden. TSP-1 ist ein großes 450 kDa Multi-Domänen-Glycoprotein, das Bestandteil der extrazellulären Matrix ist. TSP-1 bindet an viele der Proteoglycanmoleküle, die in der extrazellulären Matrix gefunden werden, einschließlich HSPGs, Fibronectin, Laminin und verschiedenen Typen von Collagen. TSP-1 inhibiert die Endothelzellmigration und -proliferation in vitro und die Angiogenese in vivo. TSP-1 kann ebenso den malignen Phänotyp und die Tumorentstehung von transformierten Endothelzellen unterdrücken. Es ist gezeigt worden, daß das Tumorsuppressorgen p53 direkt die Expression von TSP-1 reguliert, so daß ein Verlust von p53-Aktivität eine dramatische Verringerung in der Erzeugung von TSP-1 und eine einhergehende Steigerung an Tumorentstehung verursacht.

[0693] PF4 ist ein 70aa-Protein, das ein Mitglied der CXC-ELR-Familie von Chemokinen ist, das in der Lage ist, Endothelzellproliferation in vitro und Angiogenese in vivo potent zu inhibieren.

[0694] PF4, das intratumoral verabreicht worden ist oder mittels eines adenoviralen Vektors abgegeben worden ist, ist in der Lage, eine Inhibition des Tumorwachstums zu verursachen.

[0695] Interferone und Metalloproteinase-Inhibitoren sind zwei weitere Klassen von natürlich vorkommenden angiogenen Inhibitoren, die mit der vorliegenden Erfindung kombiniert werden können. Die Anti-Endothel-Aktivität der Interferone ist seit den frühen 1980ern bekannt gewesen, jedoch ist der Mechanismus der Inhibition immer noch unklar. Es ist bekannt, daß sie eine Endothelzellmigration inhibieren können und daß sie eine gewisse anti-angiogene Aktivität in vivo haben, die möglicherweise durch eine Fähigkeit vermittelt wird, die Produktion von angiogenen Promotoren durch Tumorzellen zu inhibieren. Gefäßtumore, insbesondere sind empfindlich gegenüber Interferon, zum Beispiel können proliferierende Hämangiome in erfolgreicher Weise mit IFN α behandelt werden.

[0696] Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) sind eine Familie von natürlich vorkommenden Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen (MMPs), die ebenso Angiogenese inhibieren können und in kombinierten Behandlungsprotokollen verwendet werden können. MMPs spielen eine Schlüsselrolle bei dem angiogenen Prozeß, da sie die Matrix abbauen, durch welche Endothelzellen und Fibroblasten wandern, wenn sie das Gefäßnetzwerk ausweiten oder ummodellieren. In der Tat ist gezeigt worden, daß ein Mitglied der MMPs, MMP-2, mit aktiviertem Endothel durch das Integrin α v β 3 vermutlich zu diesem Zwecke assoziiert. Wenn diese Wechselwirkung durch ein Fragment von MMP-2 zerstört wird, dann wird die Angiogenese herunterreguliert, und in Tumoren wird das Wachstum inhibiert.

[0697] Es gibt eine Anzahl von pharmakologischen Mitteln, die die Angiogenese inhibieren, von denen eines oder mehrere in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Diese schließen AGM-1470/TNP-470, Thalidomid und Carboxyamidotriazol (CAI) ein. Es wurde 1990 gefunden, daß Fumagillin ein potenter Inhibitor der Angiogenese ist, und seit dem sind die synthetischen Analoge von Fumagillin, AGM-1470 und TNP-470 entwickelt worden. Beide dieser Arzneien inhibieren die Endothelzellproliferation in vitro und die Angiogenese in vivo. TNP-470 ist in großem Umfang in menschlichen klinischen Versuchen untersucht worden, wobei Daten nahelegen, daß eine langfristige Verabreichung optimal ist.

[0698] Thalidomid wurde ursprünglich als ein Sedativum verwendet, es wurde allerdings gefunden, daß es ein potentes Teratogen ist, und wurde abgesetzt. 1994 wurde gefunden, daß Thalidomid ein Angiogeneseinhibitor ist. Thalidomid befindet sich gegenwärtig in klinischen Versuchen als ein Anti-Krebsmittel, ebenso wie zur Behandlung von Augengefäßkrankheiten.

[0699] CAI ist ein niedermolekulargewichtiger synthetischer Inhibitor der Angiogenese, der als ein Calciumkanalblocker wirkt, der die Actin-Reorganisation, Endothelzellwanderung und Ausbreitung auf Collagen-IV verhindert. CAI inhibiert die Neovaskularisierung in physiologisch erzielbaren Konzentrationen und wird oral von Krebspatienten gut toleriert. Klinische Versuche mit CAI haben eine Krankheitsstabilisierung in 49% der Krebspatienten mit einer fortgeschrittenen Krankheit vor der Behandlung ergeben.

[0700] Es wurde gezeigt, daß Cortison in der Anwesenheit von Heparin oder Heparin-Fragmenten das Tumorstadium in Mäusen inhibiert, indem es die Endothelzellproliferation blockiert. Der bei dem zusätzlichen inhibitorischen Effekt des Steroids und Heparins beteiligte Mechanismus ist unklar, obwohl gedacht wird, daß das Heparin die Aufnahme des Steroids durch die Endothelzellen erhöhen kann. Es ist gezeigt worden, daß die Mischung die Auflösung der Basalmembran unterhalb von neu geformten Kapillaren erhöht, und dies ist ebenso eine mögliche Erklärung für den additiven angiostatischen Effekt. Heparin-Cortison-Konjugate haben ebenso potente angiostatische und Anti-Tumor-Effekt-Aktivität in vivo.

[0701] Weitere spezifische Angiogeneseinhibitoren, einschließlich, aber nicht beschränkt auf antiinvasiven Faktor, Retinsäuren und Paclitaxel (US Patent Nr. 5,16,981), AGM-1470 (Ingber et al., 1990), Haiknorpelextrakt (U.S. Patent Nr. 5,618,925), anionische Polyamid- oder Polyharnstoffoligomere (U.S. Patent Nr. 5,593,664), Oxindolderivate (U.S. Patent Nr. 5,576,330) Estradiolderivate (U.S. Patent Nr. 5,504,074) und Thiazolopyrimidinderivate (U.S. Patent Nr. 5,599,813) werden ebenso zur Verwendung als anti-angiogene Zusammensetzungen für die kombinierten Verwendungen der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen.

[0702] Zusammensetzungen, umfassend einen Antagonisten eines $\alpha_v\beta_3$ -Integrin können ebenso verwendet werden, um die Angiogenese in Kombination mit der vorliegenden Erfindung zu inhibieren. Wie in US-Patent Nr. 5,766,591 offenbart, sind RGD-enthaltende Polypeptide und Salze davon, einschließlich zyklischer Polypeptide, geeignete Beispiele für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten.

[0703] Der Antikörper LM609 gegen das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin induziert ebenso Tumorregressionen. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten, wie etwa LM609 induzieren die Apoptose von angiogenen Endothelzellen und lassen die ruhenden Blutgefäße hiervon unbeeinträchtigt. LM609 oder andere $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten können ebenso arbeiten, indem sie die Wechselwirkung von $\alpha_v\beta_3$ und MMP-2 inhibieren, einem proteolytischen Enzym, von dem gedacht wird, daß es eine wichtige Rolle bei der Wanderung von Endothelzellen und Fibroblasten spielt. US Patent Nr. 5,753,230 beschreibt Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin $\alpha_v\beta_3$) zur kombinierten Verwendung mit der vorliegenden Erfindung zum Inhibieren der Angiogenese.

[0704] Apoptose des angiogenen Endothels in diesem Fall kann einen Kaskadeneffekt auf den Rest des Gefäßnetzwerks haben. Das Inhibieren des Tumor-Gefäßnetzwerks daran, auf das Tumorsignal zur Expansion vollständig zu antworten, kann in der Tat den partiellen oder vollständigen Kollaps des Netzwerks initiieren, was zu Tumorzelltod und Verlust an Tumolvolumen führt. Es ist möglich, das Endostatin und Angiostatin auf eine ähnliche Weise funktionieren. Die Tatsache, daß LM609 ruhende Gefäße nicht beeinflusst, aber in der Lage ist, Tumorregressionen zu verursachen, legt in starker Weise nahe, daß zur Behandlung nicht alle Blutgefäße in einem Tumor angezielt werden müssen, um einen Anti-Tumor-Effekt zu erhalten.

[0705] Andere Verfahren der therapeutischen Intervention basierend auf einer Änderung der Signalgebung durch den Tie2-Rezeptor können ebenso in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wie etwa die Verwendung eines löslichen Tie2-Rezeptors, der in der Lage ist, die Tie2-Aktivierung zu blockieren (Lin et al., 1998). Es ist gezeigt worden, daß die Abgabe eines solchen Konstruktes unter Verwendung von rekombinanter adenoviraler Gentherapie bei der Behandlung von Krebs und der Verringerung von Metastasen effektiv ist (Lin et al., 1998).

G3. Apoptose-induzierende Mittel

[0706] VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende therapeutische Mittel können ebenso in vorteilhafter Weise mit Verfahren kombiniert werden, um Apoptose zu induzieren. Verschiedene Apoptose-induzierende Mittel sind oben im Zusammenhang mit den Immunkonjugaten der vorliegenden Erfindung beschrieben worden. Ein beliebiges solches Apoptose-induzierendes Mittel kann in Kombination mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, ohne an einen Antikörper der Erfindung geknüpft zu sein.

[0707] Neben den Apoptose-induzierenden Mittel, die oben als Immunkonjugate beschrieben worden sind, sind eine Anzahl von Onkogenen identifiziert worden, die Apoptose oder programmierten Zelltod inhibieren. Beispielhafte Onkogene in dieser Kategorie schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf bcr-abl, bcl-2 (unter-

schiedlich zu bcl-1, Cyclin D1; GenBank-Hinterlegungsnummern M14745, X06487; U.S. Patent Nr. 5,650,491 und 5,539,094) und Familienmitglieder, einschließlich Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1, A20. Die Überexpression von bcl-2 wurde zuerst in 7-Zell-Lymphomen entdeckt. bcl-2 funktioniert als ein Onkogen, indem es Bax bindet und inaktiviert, ein Protein auf dem Apoptose-Stoffwechselweg. Die Inhibition der bcl-2 Funktion verhindert eine Inaktivierung von Bax und ermöglicht, daß der Apoptose-Weg abläuft.

[0708] Die Inhibition dieser Klasse von Onkogenen, z. B. unter Verwendung von Antisense-Nukleotidsequenzen, wird zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen, um eine Verstärkung der Apoptose zu ergeben (U.S. Patent Nr. 5,650,491, 5,539,094 und 5,583,034).

G4. Immuntoxine und Coaguliganden

[0709] Die Behandlungsverfahren der Erfindung können in Kombination mit [anderen] Immuntoxinen und/oder Coaguliganden verwendet werden, bei denen der Targeting-Teil davon, z. B. Antikörper oder Ligand, auf einen relativ spezifischen Marker der Tumorzellen, der Tumorgefäße oder des Tumorstroma gerichtet ist. In Übereinstimmung mit den oben diskutierten chemotherapeutischen und anti-angiogenen Mittel, die oben diskutiert sind, wird die kombinierte Verwendung von zielgerichteten Toxinen oder Coagulantien im allgemeinen zu additiven, merkbar größer als additiven oder synergistischen Anti-Tumor-Ergebnissen führen.

[0710] Allgemein gesprochen werden Antikörper oder Liganden zur Verwendung bei diesen zusätzlichen Aspekten der Erfindung bevorzugt zugängliche Tumor-Antigene erkennen, die bevorzugt oder spezifisch an der Tumorstelle exprimiert werden. Die Antikörper oder Liganden werden ebenso bevorzugt Eigenschaften hoher Affinität aufweisen; und die Antikörper, Liganden oder Konjugate davon werden keine signifikanten in-vivo-Nebenwirkungen gegen lebenserhaltende normale Gewebe ausüben, wie etwa ein oder mehrere Gewebe ausgewählt aus Herz, Niere, Hirn, Leber, Knochenmark, Colon, Brust, Prostata, Schilddrüse, Gallenblase, Lunge, Nebennieren, Muskel, Nervenfasern, Pankreas, Haut oder ein anderes lebenserhaltendes Organ oder Gewebe im menschlichen Körper. Der Begriff „signifikante Nebenwirkungen, wie hierin verwendet, betrifft einen Antikörper, Liganden oder Antikörper-Konjugat, der bei Verabreichung in vivo nur vernachlässigbare oder klinisch handhabbare Nebenwirkungen erzeugen wird, wie etwa diejenigen, die normalerweise während der Chemotherapie angetroffen werden.

[0711] Wenigstens eine Bindungsregion dieser zweiten Anti-Krebsmittel, die in Kombination mit der Erfindung verwendet werden, wird ein Bestandteil sein, der in der Lage ist, ein Toxin oder Coagulationsfaktor an die Tumorregion abzugeben, d. h. der in der Lage ist, sich an eine Tumorstelle zu begeben. Solche Ziel-Mittel („targeting agents“) können gegen einen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäßen oder Tumorstroma gerichtet sein. Die Ziel-Mittel werden im allgemeinen an einen Oberflächen-exprimierten, Oberflächen-zugänglichen oder sich auf der Oberfläche befindlichen Bestandteil einer Tumorzelle, Tumorgefäßen oder Tumorstroma binden. Jedoch, wenn die Zerstörung der Tumorgefäße und der Tumorzellen erst einmal beginnt, werden interne Bestandteile freigesetzt werden, was ein zusätzliches Zielen auf praktisch jeden Tumorbestandteil ermöglicht.

[0712] Viele Tumorzell-Antigene sind beschrieben worden, von denen jedes als ein Ziel im Zusammenhang mit den kombinierten Aspekten der vorliegenden Erfindung verwendet werden könnte. Geeignete Tumorzell-Antigene für zusätzliches Immuntoxin- und Coaguligand-Targeting schließen diejenigen ein, die durch die Antikörper B3 (US-Patent Nr. 5,242,813), ATTCC HB 10573), KSI/4 (US-Patent Nr. 4,975,369) erhalten aus einer Zelle; umfassend die Vektoren NRRL B-18356 und/oder NRRL B-18357), 260F9 (ATCC HB 8488) und D612 (U.S. Patent Nr. 5,183,756) ATCC HB 9796) erkannt werden. Man kann ebenso den ATCC-Katalog von jedem folgenden Jahr zu Rate ziehen, um andere geeignete Zelllinien zu identifizieren, die Anti-Tumorzell-Antikörper erzeugen.

[0713] Für das Zielen auf Tumorgefäße, wird der Ziel-Antikörper („targeting antibody“) oder -Ligand oft an einen Marker binden, der von intratumoralen Blutgefäßen eines vaskularisierten Tumors exprimiert, daran adsorbiert, darauf induziert wird, oder sich anderweitig dort befindet. Geeignete exprimierte Zielmoleküle schließen zum Beispiel Endoglin, E-Selectin, P-Selectin, VCAM-1, ICAM-1, PSMA (Liu et al., 1997), ein TIE, einen Liganden, der mit LAM-1 reaktiv ist, einen VEGF/VPF-Rezeptor, einen FGF-Rezeptor, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Pleiotropin und Endosialin ein. Geeignete adsorbierte Ziele sind diejenigen, wie etwa VEGF, FGF, TGF β , HGF, PF4, PDGF, TIMP, ein Ligand, der an ein TIE bindet, und Tumor-assoziierte Fibronektin-Isoformen. Antigene, die in natürlicher Weise und künstlich durch Cytokine und Coagulantien induzierbar sind, können ebenso angezielt werden, wie etwa ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, ein Ligand, der mit LAM-1 reaktiv ist, Endoglin, und sogar MHC-Klasse-II (Cytokin-induzierbar, z. B. durch IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-4 und/oder TNF- β), und E-Selectin, P-Selectin, PDGF und ICAM-1 (Coagulans-induzierbar, z. B. durch Thrombin, Faktor IX/IXa, Faktor X/Xa

und/oder Plasmin).

[0714] Die folgenden Patente und Patentanmeldungen ergänzen die vorliegenden Lehren im Hinblick auf die Herstellung und Verwendung von Immuntoxinen weiter, die gegen exprimierte, adsorbierte, induzierte oder lokalisierte Marker von Tumorgefäßen gerichtet sind: U.S. Patent Nr. 6,093,399, U.S. Patent Nr. 5,855,866, 5,965,132, 6,051,230, 6,004,555, 5,877,289, 6,004,554, 5,776,427, 5,863,538, 5,660,827 und 6,036,955.

[0715] Weitere auf die Tumorgefäße zielende Zusammensetzungen und Verfahren schließen diejenigen ein, die auf Aminophospholipide, wie etwa Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin zielen, von denen kürzlich entdeckt wurde, daß sie zugängliche, spezifische Marker von Tumorblutgefäßen sind. Die Verabreichung von Anti-Aminophospholipid-Antikörpern alleine reicht aus, um die Thrombose und Tumorregression zu induzieren. Die vorliegende Erfindung kann daher in effektiver Weise mit nicht-konjugierten, Anti-Phosphatidylserin- und/oder -Phosphatidylethanolamin-Antikörpern in effektiver Weise kombiniert werden; oder Immunkonjugate von solchen Antikörpern können verwendet werden.

[0716] PCT/WO00/02587, US Patent Nr. 6,312,694 ergänzt die vorliegenden Lehren im Hinblick auf die Herstellung und Verwendung von Anti-Aminophospholipid-Antikörper und Immuntoxinen weiter und ergänzt die vorliegenden Lehren im Hinblick auf die Verwendung von Aminophospholipid-Bindungsprotein-Konjugaten weiter, wie etwa Annexin-Konjugaten, zur Verwendung bei der Abgabe von Toxinen und Coagulantien an Tumorblutgefäße und zum Induzieren von Thrombose und Tumorregression.

[0717] Geeignete Tumor-stromale Ziele schließen Bestandteile der Tumor-extrazellulären Matrix oder Stroma oder diejenigen Bestandteile ein, die darin eingebunden sind, einschließlich Basalmembran-Markern, Typ-IV-Collagen, Laminin, Heparansulfat, Proteoglycan, Fibronectine, aktivierte Blutplättchen, LIBS und Tetrascin. Ein bevorzugtes Ziel für solche Verwendungen ist RIBS.

[0718] Die folgenden Patente und Patentanmeldungen ergänzen die vorliegenden Lehren im Hinblick auf die Herstellung und Verwendung von tumorstromalen Ziel-Mitteln weiter: US Anmeldung Nr. 08/482,369 (U.S. Patent Nr. 6,093,399) 08/485,482, 08/487,427 (U.S. Patent Nr. 6,004,555), 08/479,733 (U.S. Patent Nr. 5,877,289), 08/472,631 und 08/479,727 und 08/481,904 (U.S. Patent Nr. 6,036,955).

[0719] Die zweiten Anti-Krebs-Therapeutika können operativ an irgendeines der hierin zur Verwendung bei den VEGFR-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierenden Immuntoxinen beschriebenen zytotoxischen oder anderweitig anti-zellulären Mitteln angehängt sein. Jedoch schließen geeignete anti-zelluläre Mittel ebenso Radioisotope ein. Toxingruppen werden bevorzugt sein, wie etwa Ricin-A-Kette und deglykosylierte A-Kette (dgA).

[0720] Das zweite zielgerichtet eingesetzte Mittel zur fakultativen Verwendung bei der Erfindung kann einen zielgerichtet eingesetzten („targeting“) Bestandteil umfassen, der in der Lage ist, die Coagulation zu fördern, d. h. ein Coaguligand. Hier kann der Targeting-Antikörper oder -Ligand direkt oder indirekt, z. B. über einen anderen Antikörper, an einen beliebigen Faktor geknüpft sein, der direkt oder indirekt die Coagulation stimuliert, einschließlich eines beliebigen der hierin zur Verwendung bei den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Coaguliganden beschriebenen. Bevorzugte Coagulationsfaktoren für solche Verwendungen sind Gewebefaktor (TF) und TF-Derivate, wie etwa trunkierter TF (tTF), dimerer und multimerer TF sowie mutanter TF, der hinsichtlich der Fähigkeit, Faktor VII zu aktivieren, defizient ist.

[0721] Effektive Dosen an Immuntoxinen und Coaguliganden zur kombinierten Verwendung bei der Behandlung von Krebs werden zwischen ungefähr 0,1 mg/kg und ungefähr 2 mg/kg und bevorzugt zwischen ungefähr 0,8 mg/kg und ungefähr 1,2 mg/kg liegen, bei Verabreichung über die IV-Route bei einer Frequenz von ungefähr 1 mal pro Woche. Eine gewisse Variation hinsichtlich der Dosierung wird notwendigerweise stattfinden, abhängig von dem Zustand des behandelten Patienten. Der Arzt, der für die Verabreichung verantwortlich ist, wird die geeignete Dosis für den einzelnen Patienten bestimmen.

G5. ADEPT- und Prodrug-Therapie

[0722] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörper der vorliegenden Erfindung können zusammen mit Prodrugs verwendet werden, wobei der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper operativ mit einem Prodrug-aktivierenden Bestandteil assoziiert ist, wie etwa ein Prodrugaktivierendes Enzym, das eine Prodrug in die aktivere Form nur bei Kontakt mit dem Antikörper umwandelt. Diese Technologie wird im allgemein als „ADEPT“ bezeichnet und ist z. B. in

WO 95/13095, WO 97/26918, WO 97/24143, und U.S. Patent Nr. 4,975,278 und 5,658,568 beschrieben.

[0723] Der Begriff „Prodrug“ wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Vorläufer- oder Derivat-Form einer biologisch oder pharmazeutisch aktiven Substanz, die reduzierte cytotoxische oder anderweitig antizelluläre Effekte auf Zielzellen ausübt, einschließlich Tumor-Gefäßendothelzellen, im Vergleich mit der Elternarznei, auf der sie beruht. Bevorzugt übt die Prodrug- oder Precursor-Form signifikant reduzierte oder bevorzugt vernachlässigbare cytotoxische oder antizelluläre Effekte im Vergleich mit der „nativen“ oder Elternform aus. „Prodrugs“ sind in der Lage, aktiviert oder umgewandelt zu werden, um die aktivere Elternform der Arznei zu ergeben.

[0724] Die technische Fähigkeit, Prodrugs herzustellen und zu verwenden, existiert bei dem Durchschnittsfachmann. Willman et al. (1986) und Stella et al. (1985) ergänzen die Beschreibung und die Lehre im Hinblick auf die Herstellung und Verwendung verschiedener Prodrugs weiter. Beispielhafte Prodrug-Konstrukte, die im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Phosphat-enthaltende Prodrugs (U.S. Patent Nr. 4,975,278), Thiophosphat-enthaltende Prodrugs, Sulfat-enthaltende Prodrugs, Peptid-basierende Prodrugs (U.S. Patent Nr. 5,660,829, 5,587,161, 5,405,990, WO 97/07118), D-Aminosäure-modifizierte Prodrugs, glycosylierte Prodrugs (U.S. Patent Nr. 5,561,119, 5,646,298, 4,904,768, 5,041,424), β -Lactam-enthaltende Prodrugs, fakultativ substituierte Phenoxyacetamid-enthaltende Prodrugs (U.S. Patent Nr. 4,975,278), fakultativ substituierte Phenylacetamid-enthaltende Prodrugs, und sogar 5-Fluorcytosin- (U.S. Patent Nr. 4,975,278) und 5-Fluoruridin-Prodrugs und ähnliche.

[0725] Der Typ des therapeutischen Mittels oder der cytotoxischen Arznei, die in Prodrug-Form verwendet werden kann, ist praktisch grenzenlos. Die cytotoxischeren Mittel werden für eine solche Form der Abgabe bevorzugt werden gegenüber z. B. der Abgabe von Coagulantien, die weniger zur Verwendung als Prodrugs bevorzugt werden. Alles, was bei der Bildung der Prodrugs erforderlich ist, ist es, das Konstrukt so anzulegen, daß die Prodrug im wesentlichen inaktiv ist und daß die „freigesetzte“ oder aktivierte Arznei wesentliche oder wenigstens ausreichende Aktivität für den beabsichtigten Zweck hat.

[0726] Verschiedene Verbesserungen an den ursprünglichen Prodrugs sind ebenso bekannt und werden zur Verwendung hiermit in Erwägung gezogen, wie in WO 95/03830, EP 751,144 (Anthracycline), WO 97/07097 (Cyclopropylindole), und WO 96/20169 offenbart. Zum Beispiel werden Prodrugs mit reduzierter Km in U.S. Patent Nr. 5,621,002 beschrieben, die im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Eine Prodrug-Therapie, die intrazellulär durchgeführt werden kann, ist ebenso bekannt, wie beispielhaft veranschaulicht durch WO 96/03151, und kann hiermit praktiziert werden.

[0727] Zur Verwendung bei ADEPT wird das Mittel, das die Prodrug zu der aktivieren Arznei aktiviert oder umwandelt, operativ an den VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-artigen Antikörper angehängt. Der VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-artige Antikörper lokalisiert somit die Prodrug-umwandelnde Fähigkeit an die angiogene Stelle, bevorzugt innerhalb der Tumorgefäße und -stroma, so daß eine aktive Arznei nur in solchen Regionen und nicht im Kreislauf oder in gesunden Geweben produziert wird.

[0728] Enzyme, die an VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper angehängt werden können, um bei der Prodrug-Aktivierung zu wirken, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf alkalische Phosphatase zur Verwendung in Kombination mit Phosphat-enthaltenden Prodrugs (U.S. Patent Nr. 4,975,278), Arylsulfatase zur Verwendung in Kombination mit Sulfat-enthaltenden Prodrugs (U.S. Patent Nr. 5,270,196), Peptidasen und Proteasen, wie etwa Serratia-Protease, Thermolysin, Subtilisin, Carboxypeptidase (U.S. Patent Nr. 5,660,829, 5,587,161, 5,405,990) und Cathepsine (einschließlich Cathepsin B und L), zur Verwendung in Kombination mit Peptid-basierenden Prodrugs, D-Alanylcarboxypeptidasen zur Verwendung in Kombination mit D-Aminosäure-modifizierten Prodrugs, Kohlenhydrat-spaltende Enzyme, wie etwa mit β -Galactosidase und Neuraminidase, zur Verwendung in Kombination mit glycosylierten Prodrugs (U.S. Patent Nr. 5,561,119, 5,646,298), β -Lactamase zur Verwendung in Kombination β -Lactam-enthaltenden Prodrugs, Penicillinamidasen, wie etwa Penicillin-V-Amidase (U.S. Patent Nr. 4,975,278) oder Penicillin-G-amidase, zur Verwendung in Kombination mit Arzneien, die an ihren Amino-Stickstoffen mit Phenoxyacetamid- oder Phenylacetamid-Gruppen derivatisiert sind, und Cytosindeaminase (U.S. Patent Nr. 5,338,678, 5,545,548) zur Verwendung in Kombination mit 5-Fluorcytosin-basierenden Prodrugs (U.S. Patent Nr. 4,975,278).

[0729] Antikörper mit einer enzymatischen Aktivität, die als katalytische Antikörper oder „Abzyme“ bekannt sind, können ebenso verwendet werden, um Prodrugs in aktive Arzneien umzuwandeln. Abzyme auf der Grundlage von VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-artigen Antikörpern bilden somit ei-

nen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung. Die technische Fähigkeit, Abzyme herzustellen, existiert ebenso bei einem Durchschnittsfachmann, wie beispielhaft veranschaulicht von Massey et al. (1987), das spezifisch hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird zu Zwecken des Supplementierens der Abzym-Lehre. Katalytische Antikörper, die in der Lage sind, den Abbau einer Prodrug an der Carbamat-Position zu katalysieren, wie etwa Stickstofflost-Arylcarbamat, werden weiterhin in Erwägung gezogen, wie in EP 745 673 beschrieben, spezifisch hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

H. Diagnostika und Bilderzeugung (Imaging)

[0730] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin in-vitro- und in-vivo-Diagnostik- und Bildgebungsverfahren bereit. Solche Verfahren sind auf die Verwendung zum Erzeugen von diagnostischer, prognostischer oder Bildgebungsinformation für jede angiogene Krankheit anwendbar, wie beispielhaft veranschaulicht durch Arthritis, Psoriasis und feste Tumore, aber einschließlich aller hierin offenbarten angiogenen Krankheiten. Außerhalb des Gebiets der Tumordiagnostika und der Bildgebung werden diese Aspekte der Erfindung am meisten bevorzugt zur Verwendung bei in-vitro-diagnostischen Tests, bevorzugt entweder, wenn die Proben nicht-invasiv erhalten werden und in Hochdurchsatzassays getestet werden können und/oder wenn die klinische Diagnose nicht eindeutig ist und eine Bestätigung erwünscht wird.

H1. Immunnachweisverfahren und Kits

[0731] In noch weiteren Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung Immunnachweisverfahren zum Binden, Aufreinigen, Entfernen, Quantifizieren oder anderweitig allgemein Nachweisen von VEGF und zum Diagnostizieren von angiogenen Krankheiten. Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper der vorliegenden Erfindung, wie etwa 2C3, können verwendet werden, um VEGF in vivo (siehe unten) in isolierten Gewebeproben, Biopsien oder Abstrichen und/oder in homogenisierten Gewebeproben nachzuweisen. Solche Immunnachweisverfahren haben eine offensichtliche diagnostische Nützlichkeit, haben aber auch Anwendungen auf nicht-klinische Proben, wie etwa beim Titrieren von Antigen-Proben und ähnlichem.

[0732] Die Schritte der verschiedenen nützlichen Immunnachweisverfahren sind in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden, wie z. B. Nakamura et al. (1987). Im allgemeinen schließen die Immunbindungsverfahren das Erhalten einer Probe, von der angenommen wird, daß sie VEGF enthält, und das In-Kontakt-Bringen der Probe mit VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörpern, wie etwa 2C3, unter Bedingungen ein, die ausreichend sind, um die Bildung von Immunkomplexen zu ermöglichen. Bei solchen Verfahren kann der Antikörper an einen festen Träger geknüpft sein, wie etwa in der Form einer Säulenmatrix, und die Probe, von der angenommen wird, daß sie VEGF enthält, wird auf den immobilisierten Antikörper aufgetragen.

[0733] Bevorzugter schließen die Immunbindungsverfahren Verfahren zum Nachweis oder Quantifizieren der Menge von VEGF in einer Probe ein, wobei die Verfahren den Nachweis oder die Quantifizierung von beliebigen Immunkomplexen erfordern, die während des Bindungsprozesses gebildet werden. Man würde hier eine Probe nehmen, von der angenommen wird, daß sie VEGF enthält, und die Probe mit einem Antikörper in Übereinstimmung hiermit in Kontakt bringen und dann die Menge an den unter den spezifischen Bedingungen gebildeten Immunkomplex nachweisen oder quantifizieren.

[0734] Die analysierte biologische Probe kann jede Probe sein, von der angenommen wird, daß sie VEGF enthält, im allgemeinen aus einem Tier oder Patienten, von dem angenommen wird, daß er eine angiogene Krankheit hat. Die Proben können einen Gewebeschnitt oder -Probe, eine Biopsie, eine Tupfer- oder Schmier-testprobe, ein homogenisierter Gewebeextrakt oder abgetrennte oder aufgereinigte Formen hiervon sein.

[0735] Das In-Kontakt-Bringen der gewählten biologischen Probe mit dem Antikörper unter Bedingungen, die wirksam sind, um die Bildung von Immunkomplexen (primäre Immunkomplexe) zu ermöglichen, und für eine hierzu ausreichende Zeitperiode, ist im allgemeinen eine Angelegenheit, bei der eine Antikörperzusammensetzung einfach zu der Probe hinzugeben und die Mischung für eine Zeitperiode inkubiert wird, die lange genug ist, daß die Antikörper Immunkomplexe mit jeglichem vorhandenem VEGF bilden können, d. h. hieran binden können. Nach dieser Zeit wird die Probe-Antikörper-Zusammensetzung, wie etwa ein Gewebeschnitt, ELISA-Platte, Dot-blot oder Western-Blot, im allgemeinen gewaschen werden, um jegliche nicht-spezifisch gebundene Antikörperspezies zu entfernen, was es nur denjenigen Antikörpern ermöglicht, nachgewiesen zu werden, die spezifisch in den nachzuweisenden primären Immunkomplexen gebunden sind.

[0736] Der Nachweis der Immunkomplexbildung ist auf dem Gebiet gut bekannt und kann durch die Anwendung von zahlreichen Ansätzen erreicht werden. Diese Verfahren beruhen im allgemeinen auf dem Nachweis

einer Markierung oder eines Marker, wie etwa alle radioaktiven, fluoreszierenden, biologischen oder enzymatischen Tags oder Markierungen, die auf dem Gebiet bekannt sind. US Patente, betreffend die Verwendung von solchen Markierungen, schließen 3,817,837, 3,850,752, 3,939,351), 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 und 4,366,241 ein. Die Verwendung von Enzymen, die ein farbiges Produkt bei Kontakt mit einem chromogenen Substrat erzeugen, werden im allgemeinen bevorzugt. Sekundäre Bindungsliganden, wie etwa ein zweiter Antikörper oder eine Biotin/Avidin-Ligandenbindungsanordnung, können ebenso verwendet werden, wie auf dem Gebiet bekannt ist.

[0737] Die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, die bei dem Nachweis verwendet werden, können selbst an eine nachweisbare Markierung geknüpft sein, wobei man dann einfach diese Markierung nachweisen würde, wodurch es möglich ist, die Menge der primären Immunkomplexe in der Zusammensetzung zu bestimmen.

[0738] Bevorzugt werden die primären Immunkomplexe mittels eines zweiten Bindungsliganden nachgewiesen, der eine Bindungsaffinität für die Antikörper der Erfindung hat. In solchen Fällen kann der zweite Bindungsligand an eine nachweisbare Markierung geknüpft sein. Der zweite Bindungsligand ist selbst oft ein Antikörper und kann daher als ein „sekundärer“ Antikörper bezeichnet werden. Die primären Immunkomplexe werden mit dem markierten sekundären Bindungsliganden oder Antikörper unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die ausreichen, um die Bildung von sekundären Immunkomplexen zu ermöglichen, und für eine hierzu ausreichende Zeitperiode. Die sekundären Immunkomplexe werden dann im allgemeinen gewaschen, um jegliche nicht-spezifisch gebundenen markierten sekundären Antikörper oder Liganden zu entfernen, und die verbleibende Markierung in den sekundären Immunkomplexen wird dann nachgewiesen.

[0739] Weitere Verfahren schließen den Nachweis von primären Immunkomplexen in einem zweistufigen Ansatz ein. Ein zweiter Bindungsligand, wie etwa ein Antikörper, der eine Bindungsaffinität für den ersten Antikörper hat, wird verwendet, um sekundäre Immunkomplexe, wie oben beschrieben, zu bilden. Nach dem Waschen werden die sekundären Immunkomplexe mit einem dritten Bindungsliganden oder Antikörper in Kontakt gebracht, der eine Bindungsaffinität für den zweiten Antikörper hat, wieder unter Bedingungen, die wirksam sind, daß die Bildung von Immunkomplexen (tertiären Immunkomplexen) ermöglicht wird, und für eine hierzu ausreichende Zeitperiode. Der dritte Ligand oder Antikörper wird an eine nachweisbare Markierung geknüpft, was den Nachweis der so gebildeten tertiären Immunkomplexe ermöglicht. Dieses System kann eine Signalamplifizierung ermöglichen, sofern erwünscht.

[0740] Bei der klinischen Diagnose oder Überwachung von Patienten mit einer angiogenen Krankheit weist der Nachweis von VEGF oder eine Erhöhung der Konzentrationen von VEGF im Vergleich mit den Konzentrationen in einer entsprechenden biologischen Probe aus einem normalen Patienten auf einen Patienten mit einer angiogenen Krankheit hin.

[0741] Jedoch würde eine solche klinische Diagnose wahrscheinlich nicht auf der alleinigen Grundlage dieses Verfahren gemacht werden, wie Fachleuten bekannt ist. Fachleute sind sehr vertraut mit der Differenzierung zwischen einer signifikanten Expression eines Biomarker, der eine positive Identifizierung darstellt, und der Expression eines Biomarkers auf niedrigem Niveau oder im Hintergrund. In der Tat werden Hintergrundexpressionsniveaus oft verwendet, um einen „Cut-off“ zu bilden, oberhalb dessen eine erhöhte Färbung als signifikant oder positiv eingestuft werden wird.

H2. Bildgebung

[0742] Diese Aspekte der Erfindung werden zur Verwendung bei Tumor-Bildgebungsverfahren und kombinierten Tumor-Behandlungs- und Bildgebungsverfahren bevorzugt. VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper oder 2C3-basierende Antikörper, die an ein oder mehrere nachweisbare Mittel geknüpft sind, werden zur Verwendung bei der Abbildung per se oder zur vorherigen Abbildung des Tumors in Erwägung gezogen, um ein zuverlässiges Bild vor der Behandlung zu erzeugen. Solche Zusammensetzungen und Verfahren können ebenso auf die Bildgebung und Diagnose einer jeden anderen angiogenen Krankheit oder Zustand angewandt werden, insbesondere nicht-maligne Tumore, Arteriosklerose und Zustände, bei denen ein internes Bild aus diagnostischen oder prognostischen Zwecken oder zum Entwerfen einer Behandlung erwünscht ist.

[0743] VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Bildgebungsantikörper werden im allgemeinen einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper umfassen, der operativ an eine nachweisbare Markierung angehängt oder daran konjugiert ist. „Nachweisbare Markierungen“ sind Verbindungen oder Elemente, die aufgrund ihrer spezifischen funktionellen Eigenschaften

oder chemischen Eigenschaften nachgewiesen werden können, deren Verwendung es ermöglicht, daß der Bestandteil, an den sie angehängt sind, nachgewiesen wird und, sofern erwünscht, weiter quantifiziert wird. Bei Antikörperkonjugaten für die in-vivo-diagnostischen Protokolle oder „Bildgebungsverfahren“ werden Markierungen erfordert, die unter Verwendung von nicht-invasiven Verfahren nachgewiesen werden können.

[0744] Viele geeignete Bildgebungsmittel sind auf dem Gebiet bekannt, ebenso wie Verfahren zu ihrem Anhängen an Antikörper und Bindungsliganden (siehe z. B. US-Patent Nr. 5,021,236 und 4,472,509). Bestimmte Anhängungsverfahren beinhalten die Verwendung eines Metallchelatkomplexes, der zum Beispiel ein organisches chelierendes Mittel, wie etwa ein DTPA verwendet, das an den Antikörper angehängt ist (US Patent Nr. 4,472,509). Monoklonale Antikörper können ebenso mit einem Enzym in der Anwesenheit eines Kopplungsmittels umgesetzt werden, wie etwa Glutaraldehyd oder Periodat. Konjugate mit Fluoresceinmarkern werden in der Anwesenheit dieser Kopplungsmittel oder durch Reaktion mit einem Isothiocyanat hergestellt.

[0745] Ein Beispiel für nachweisbare Markierungen sind die paramagnetischen Ionen. In diesem Falle schließen geeignete Ionen Chrom (III), Mangan (II), Eisen (III), Eisen (II), Kobalt (II), Nickel (II), Kupfer (II), Neodymium (III), Samarium (III), Ytterbium (III), Gadolinium (III), Vanadium (II), Terbium (III), Dysprosium (III), Holmium (III) und Erbium (III) ein, wobei Gadolinium besonders bevorzugt wird.

[0746] Ionen, die in anderen Kontexten nützlich sind, wie etwa der Röntgenbildgebung, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Lanthan (III), Gold (III), Blei (II) und insbesondere Wismut (III). Fluoreszierende Markierungen schließen Rhodamin, Fluorescein und Renographin ein. Rhodamin und Fluorescein werden oft über ein Isothiocyanat-Intermediat verknüpft.

[0747] Im Falle von radioaktiven Isotopen für diagnostische Anwendungen schließen geeignete Beispiele ¹⁴Kohlenstoff, ⁵¹Chrom, ³⁶Chlor, ⁵⁷Kobalt, ⁵⁸Kobalt, Kupfer⁶⁷, ¹⁵²Eu, Gallium⁶⁷, ³Wasserstoff, Iod¹²³, Iod¹²⁵, Iod¹³¹, Indium¹¹¹, ⁵⁹Eisen, ³²Phosphor, Rhenium¹⁸⁶, Rhenium¹⁸⁸, ⁷⁵Selen, ³⁵Schwefel, Technetium^{99m} und Yttrium⁹⁰ ein. ¹²⁵I wird oft zur Verwendung bei bestimmten Ausführungsformen bevorzugt, und Technetium^{99m} und Indium¹¹¹ werden ebenso bevorzugt aufgrund ihrer geringen Energie und Eignung für den langstreckigen Nachweis.

[0748] Radioaktiv markierte VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung können gemäß wohlbekannten Verfahren auf dem Gebiet erzeugt werden. Zum Beispiel sind intermediäre funktionelle Gruppen, die oft verwendet werden, um radioisotopische Metallionen an Antikörper zu binden, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA).

[0749] Monoklonale Antikörper können ebenso iodiert werden durch Kontakt mit Natrium- oder Kaliumiodid und einem chemischen Oxidationsmittel, wie etwa Natriumhypochlorit, oder einem enzymatischen Oxidationsmittel, wie etwa Lactoperoxidase. Antikörper gemäß der Erfindung können mit Technetium^{99m} durch einen Ligandenaustauschprozeß markiert werden, zum Beispiel durch Reduzieren von Pertechnat mit einer Zinn (II)-Lösung, Chelieren des reduzierten Technetiums auf einer Sephadex-Säule und Aufgingen des Antikörpers auf diese Säule, oder durch direkte Markierungstechniken, z. B. durch Inkubieren von Pertechnat, einem Reduktionsmittel, wie etwa SnCl₂, einer Pufferlösung, wie etwa Natrium-Kalium-Phthalatlösung und dem Antikörper.

[0750] Beliebige nachweisbar markierte VEGFR2-blockierende, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierende Antikörper des vorhergehenden Typs können bei den Bildgebungs- oder kombinierten Bildgebungs- und Behandlungsaspekten der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Sie sind in gleicher Weise zur Verwendung bei in-vitro-Diagnostika geeignet. Dosierungen für die in-vivo-Bildgebungsausführungsformen sind im allgemeinen geringer als für eine Therapie, hängen aber auch von dem Alter und Gewicht eines Patienten ab. Einmalige Dosierungen sollten ausreichen.

[0751] Die in-vivo-diagnostischen oder Bildgebungsverfahren umfassen im allgemeinen das Verabreichen einer diagnostisch wirksamen Menge eines VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper- oder 2C3-basierenden Antikörpers an einen Patienten, wobei der Antikörper an einen Marker konjugiert ist, der durch nicht-invasive Verfahren nachweisbar ist. Dem Antikörper-Marker-Konjugat wird ausreichend Zeit gegeben, um VEGF innerhalb des Tumors zu lokalisieren und sich daran zu binden. Der Patient wird dann einer Nachweisvorrichtung ausgesetzt, um den nachweisbaren Marker zu identifizieren, wodurch ein Abbild des Tumors gebildet wird.

H3. Diagnostische Kits

[0752] In noch weiteren Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung diagnostische Kits, einschließlich von sowohl Immunnachweis als auch Bildgebungskits bereit, zur Verwendung bei den oben beschriebenen Immunnachweis- und Bildgebungsverfahren. Entsprechend werden die VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa 2C3, in dem Kit bereitgestellt, im allgemeinen umfaßt in einem geeigneten Behälter.

[0753] Für den Immunnachweis können die Antikörper an einen festen Träger gebunden werden, wie etwa eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte, obwohl Antikörperlösungen oder Pulver zur Rekonstitution bevorzugt werden. Die Immunnachweiskits umfassen bevorzugt wenigsten ein erstes Immunnachweisreagenz. Die Immunnachweisreagentien des Kit können eine beliebige aus einer Vielzahl von Formen annehmen, einschließlich denjenigen nachweisbaren Markierungen, die mit dem gegebenen Antikörper assoziiert oder verknüpft sind. Nachweisbare Markierungen, die mit einem sekundären Bindungsliganden assoziiert oder daran angehängt sind, werden ebenso in Erwägung gezogen. Beispielhafte sekundäre Liganden sind diejenigen sekundären Antikörper, die eine Bindungsaffinität für den ersten Antikörper haben.

[0754] Weitere geeignete Immunnachweisreagentien zur Verwendung bei den vorliegenden Kits schließen das Zwei-Bestandteil-Reagenz ein, das einen sekundären Antikörper umfaßt, der eine Bindungsaffinität für den ersten Antikörper hat, zusammen mit einem dritten Antikörper, der eine Bindungsaffinität für den zweiten Antikörper hat, wobei der dritte Antikörper an eine nachweisbare Markierung geknüpft ist. Wie oben bemerkt, ist eine Anzahl von beispielhaften Markierungen auf dem Gebiet bekannt, und alle solche Markierungen können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Diese Kits können Antikörper-Markierungs-Konjugate entweder in vollständig konjugierter Form, in der Form von Intermediaten oder als separate Einheiten enthalten, die durch den Benutzer des Kits konjugiert werden müssen.

[0755] Die Bildgebungskits („imaging kits“) werden bevorzugt einen VEGFR2-blockierenden, Anti-VEGF-Antikörper umfassen, wie etwa 2C3, der bereits an eine in-vivo-nachweisbare Markierung angehängt ist. Jedoch könnte die Markierung und die Anhängungsmittel separat geliefert werden.

[0756] Jedes Kit kann weiterhin Kontrollagentien umfassen, wie etwa geeignete aliquotisierte Zusammensetzungen von VEGF, ob markiert oder unmarkiert, wie sie verwendet werden können, um eine Standardkurve für einen Nachweisassay zu erstellen. Die Bestandteile der Kits können entweder in wäßrigen Medien oder in lyophilisierter Form verpackt sein.

[0757] Die Behältermittel des Kits werden im allgemeinen wenigstens ein Gefäß, ein Reagenzröhrchen, Kolben, Flasche, Spritze oder andere Behälter einschließen, in die der Antikörper oder das Antigen gebracht und bevorzugt in geeigneter Weise aliquotisiert werden können. Wenn ein zweiter oder dritter Bindungsligand oder zusätzlicher Bestandteil bereitgestellt wird, wird der Kit ebenso im allgemeinen einen zweiten, dritten oder anderen zusätzlichen Behälter enthalten, in den dieser Ligand oder Bestandteil gebracht werden kann. Die Kits können ebenso andere diagnostische Reagenzien zur Verwendung bei der Diagnose von einer oder mehreren angiogenen Krankheiten einschließen. Bevorzugt werden zweite diagnostische Mittel, die nicht auf VEGF-Bindung beruhen, verwendet werden.

[0758] Die Kits der vorliegenden Erfindung werden ebenso typischerweise Mittel zum Enthalten des Antikörpers und alle anderen Reagenzbehälter in enger Verpackung zum kommerziellen Verkauf einschließen. Solche Behälter können spritzguß- oder blasgeformte Plastikbehälter einschließen, in denen die erwünschten Gefäße gehalten werden.

[0759] Die folgenden Beispiele werden aufgenommen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zu demonstrieren. Es sollte von Fachleuten erkannt werden, daß die in den folgenden Beispielen offenbarten Techniken Techniken darstellen, bei denen der Erfinder entdeckt hat, daß sie bei der Ausübung der Erfindung gut funktionieren, und die somit als bevorzugte Ausführungsformen angesehen werden können. Jedoch sollten Fachleute im Lichte der vorliegenden Offenbarung erkennen, daß viele Veränderungen in den spezifischen Ausführungsformen, die offenbart sind, gemacht werden können, und daß man immer noch ein gleiches oder ähnliches Resultat erhalten würde, ohne vom Geist und Umfang der Erfindung abzuweichen.

BEISPIEL 1

Erzeugung und einzigartige Charakteristika von Anti-VEGF-Antikörper 2C3

A. Materialien und Methoden

1. Immunogene

[0760] Peptide, entsprechend den N-terminalen 26 Aminosäuren von humanem VEGF (huVEGF; SEQ ID NO: 10) und den N-terminalen 25 Aminosäuren von Meerschweinchen-VEGF (gpVEGF; SEQ ID NO: 11) wurden durch die Biopolymers Facility des Howard Hughes Medical Institute am UT Southwestern Medical Center in Dallas synthetisiert. Die Peptide hatten die folgenden Sequenzen (N bis C): APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYC, SEQ ID NO:10; und APMAEGEQKPREVVKFMDVYKRSYC, SEQ ID NO:11.

[0761] Peptide wurden über das C-terminale Cystein an Thyreoglobulin unter Verwendung von Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC)-Linker (Pierce, Rockford, IL) konjugiert. Kontroll-Konjugate wurden ebenso hergestellt, die aus L-Cystein bestanden, verknüpft an Thyreoglobulin. Konjugate wurden von dem freien Peptid oder Linker mittels Größenausschlußchromatographie getrennt.

[0762] Rekombinanter humaner VEGF wurde ebenso separat als ein Immunogen verwendet (erhalten von Dr. S. Ramakrishnan, University of Minnesota, Minneapolis, MN).

2. Hybridome

[0763] Für die Produktion von anti-gpVEGF-Antikörper-produzierenden Hybridomen wurden C57/B1-6-Mäuse mit dem gpVEGF-Peptid-Thyreoglobulin-Konjugat in TiterMax-Adjuvans (CytRX Co., Norcross, GA) immunisiert. Für die Herstellung von anti-humanen VEGF-Antikörpern wurden BALB/c-Mäuse mit entweder dem huVEGF-Peptid-Thyreoglobulin-Konjugat oder rekombinantem humanen VEGF in TiterMax immunisiert. Drei Tage nach dem letzten Boost wurden Splenocyten mit Myelom P3X63AG8.653-Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, MD) fusioniert und wurden kultiviert, wie von Morrow et al. (1990) beschrieben.

3. Antikörperaufreinigung

[0764] IgG-Antikörper (2C3, 12D7, 3E7) wurden aus Gewebekulturüberstand mittels Ammoniumsulfatfällung und Protein-A-Chromatographie mittels Verwendung des Pierce ImmunoPure-Bindungs/Elutions-Puffersystem (Pierce) aufgereinigt.

[0765] IgM-Antikörper (GV39M, 11B5, 7G3) wurden aus Gewebekulturüberstand durch 50 % gesättigte Ammoniumsulfatfällung, Resuspension des Pellet in PBS (pH 7,4) und Dialyse gegen dH₂O aufgereinigt, um das Euglobulin zu fällen. Der dH₂O-Niederschlag wurde in PBS resuspendiert und durch Größenausschluß-Chromatographie auf einer Sepharose S300-Säule (Pharmacia) fraktioniert. Die IgM-Fraktion war 85–90% rein, beurteilt anhand von SDS-PAGE.

4. Kontroll-Antikörper

[0766] Verschiedene Kontroll-Antikörper sind durchgängig in diesen Studien verwendet worden, einschließlich mAb 4.6.1 (Maus-anti-human-VEGF von Genentech, Inc.), Ab-3 (Maus-anti-human-VEGF von OncogeneScience, Inc.), A-20 (Kaninchen-anti-human-VEGF von Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), OX7 (Maus-anti-Ratten-Thy1.1 von Dr. A. F. Williams, MRC Cellular Immunology Unit, Oxford, UK), MTSA (ein Maus-Myelom-IgM mit irrelevanter Spezifität von Dr. E. S. Vitetta, UT-Southwestern, Dallas, TX), 1A8 (Mausanti-Maus-Flk-1; Philip E. Thorpe and Kollegen), MECA 32 (Ratten-anti-Maus-Endothel von Dr. E. Butcher, Stanford University, CA), und TEC 11 (Maus-anti-human-Endoglin; U.S. Patent Nr. 5,660,827).

5. Anfängliches Screening

[0767] Für das anfängliche Screening wurden 96-Napf-ELISA-Platten (Falcon, Franklin Lakes, NJ) mit 250ng von entweder dem VEGF-Peptid or VEGF-Cys-Thyreoglobulin-Konjugat beschichtet und mit 5% Casein-Säure-Hydrolysat (Sigma, St. Louis, MO) blockiert. Überstände aus den Anti-gpVEGF-Hybridomen und den anfänglichen anti-human-VEGF-Hybridomen wurden auf den Antigen-beschichteten Platten durch eine duale in-

direkte ELISA-Technik gescreent (Crowther, 1995).

[0768] Hybridome, die eine bevorzugte Reaktivität mit VEGF-Peptid-Thyreoglobulin, aber keine oder eine schwache Reaktivität mit Cys-Thyreoglobulin zeigten, wurden weiter mittels Immunhistochemie (unten beschrieben) an gefrorenen Tumorgewebeschnitten gescreent.

6. Immunhistochemie

[0769] Meerschweinchen-Linie-10-hepatozelluläre Carcinom-Tumorzellen (erhalten von Dr. Ronald Neuman, NIH, Bethesda, MD) wurden in Stamm-2-Meerschweinchen wachsen gelassen (NCI, Bethesda, MD). Die menschlichen Tumore NCI-H358-nicht-kleinzelliges Lungencarcinom (NSCLC), NCI-H460-NSCLC (beide erhalten von Dr. Adi Gazdar, UT Southwestern, Dallas, TX), HT29-Colon-Adenocarcinom (American Type Culture Collection) und L540CY-Hodgkin'sches Lymphom (erhalten von Prof. V. Diehl, Köln, Deutschland) wurden als Xenografts in CB 17-SCID-Mäusen wachsen gelassen (Charles River, Wilmington, MA).

[0770] Tumore wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die gefrorenen Proben der Tumorzellen von Patienten wurden von dem National Cancer Institute Cooperative Human Tissue Network (Southern Division, Birmingham, AL) erhalten. Eine Immunhistochemie wurde durchgeführt, wie von Burrows et al. (1995) beschrieben.

7. ELISA-Analyse

[0771] Hybridom-Überstände aus Tieren, die mit VEGF immunisiert waren, wurden durch eine differentielle ELISA-Technik gescreent, die drei verschiedene Antigene verwendete: humanen VEGF alleine, VEGF:Flk-1/SEAP-Komplex und Flk-1/SEAP alleine. Für den humanen VEGF alleine wurden bestimmte ELISA-Platten mit 100ng VEGF beschichtet.

[0772] Für Flk-1/SEAP alleine wurden andere ELISA-Platten mit 500ng Flk-1/SEAP, einer löslichen Form des Maus-VEGF-Rezeptors beschichtet (Zellen, die Flk-1/SEAP sezernieren, wurden von Dr. Ihor Lemischka, Princeton University, Princeton, NJ) erhalten. Das Flk-1/SEAP-Protein wurde erzeugt und aufgereinigt, wie von Tessier et al. (1994) beschrieben. Einfach gesagt, wurde die extrazelluläre Domäne von Flk-1 (sFlk-1) in *Spartan* frugiperda-Zellen (Sf9) erzeugt und mittels Immunaффinität-Techniken unter Verwendung eines monoklonalen Anti-Flk-1-Antikörpers (1A8) aufgereinigt. sFlk-1 wurde dann biotinyliert und auf Avidinbeschichteten Platten gebunden.

[0773] Um Platten herzustellen, die mit VEGF:Flk-1/SEAP-Komplex beschichtet waren, herzustellen, wurde aufgereinigter sFlk-1 biotinyliert und mit VEGF über Nacht bei 4°C in Bindungspuffer (10mM HEPES, 150mM NaCl, 20µg/ml bovines Serumalbumin und 0,1 µg/ml Heparin) in einem molaren Verhältnis von sFlk-1 zu VEGF von 2,5:1 umgesetzt, um die Dimer-Bildung zu fördern. Der VEGF:sFlk-1-Komplex wurde dann in Avidin-beschichteten Näpfen einer 96-Napf-Mikrotiter-Platte inkubiert, um Platten zu erzeugen, die mit VEGF beschichtet waren, der mit seinem Rezeptor assoziiert war.

[0774] Die Reaktivität der Antikörper mit VEGF alleine, biotinyliertem sFlk-1 und VEGF:sFlk-1-Komplex wurde dann in kontrollierten Studien unter Verwendung der drei Antigene auf Avidin-beschichteten Platten bestimmt. Die Reaktivität wurde bestimmt, wie oben für das anfängliche Screening beschrieben.

[0775] Ein Fänger-ELISA wurde ebenso entwickelt. Bei dem Fänger-ELISA wurden Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit 100ng des angezeigten Antikörpers beschichtet. Die Näpfe wurden gewaschen und wie oben blockiert, dann mit verschiedenen Konzentrationen an biotinyliertem VEGF oder VEGF:sFlk-1-Biotin inkubiert. Streptavidin, das an Peroxidase konjugiert war, (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.), verdünnt 1:2000, wurde als eine zweite Schicht verwendet und entwickelt.

[0776] Kompetitions-ELISA-Studien wurden durchgeführt, indem man zuerst die Antikörper mit Peroxidase gemäß den Anweisungen des Herstellers markierte (EZ-Link Activated Peroxidase, Pierce). Das für die Kompetitions-Studien mit I2D7, 3E7, 2C3 und 7G3 verwendete Antigen war VEGF-Biotin, eingefangen von Avidin auf einer ELISA-Platte. Näherungsweise 0,5-2,0µg/ml an Peroxidase-markiertem Test-Antikörper wurden auf der Platte in der Anwesenheit von entweder Puffer alleine, einem irrelevanten IgG oder den anderen Anti-VEGF-kompetierenden Antikörpern in einem 10-100-fachen Überschuß inkubiert.

[0777] Die Bindung des markierten Antikörpers wurde durch Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Subst-

rat (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) beurteilt. Die Reaktionen wurden nach 15 min mit 1M H_3PO_4 abgebrochen und spektrophotometrisch bei 450nm ausgelesen. Der Assay wurde in dreifacher Ausfertigung mindestens zweimal für jede Kombination von markiertem und Kompetitor-Antikörper durchgeführt. Zwei Antikörper wurden als in derselben Epitopgruppe liegend angesehen, wenn sie die gegenseitige Bindung um mehr als 80% kreuzblockierten.

[0778] GV39M und 11B5 behielten nach einer Peroxidasemarkierung keine Bindungsaktivität bei, tolerierten aber eine Biotinylierung. GV39M und 11B5 wurden biotinyliert und gegen VEGF:sFlk-1 getestet, das entweder durch den Anti-Flk-1-Antikörper (1A8) gefangen oder direkt auf einer ELISA-Platte aufgetragen worden war.

8. Western Blot-Analyse

[0779] Aufgereinigter rekombinanter VEGF in der Anwesenheit von 5% fötalem Kälberserum wurde durch 12% SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die Nitrozellulose-Membran wurde unter Verwendung von Sea-Block PP82-41 (East Coast Biologics, Berwick, ME) blockiert und mit primären Antikörpern unter Verwendung eines Mini-Blotter-Apparats sondiert (Immuntics, Cambridge, MA). Die Membranen wurden nach Inkubation mit dem geeigneten Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper mittels ECL-verstärkter Chemilumineszenz entwickelt.

B. Resultate

1. 2C3 hat eine einzigartige Epitopspezifität

[0780] Tabelle 1 faßt die Information über die Klasse/Subklasse von unterschiedlichen Anti-VEGF-Antikörpern, die Epitopgruppen, die sie an VEGF erkennen, und ihre bevorzugte Bindung an VEGF oder VEGF:Rezeptor (VEGF:Flk-1)-Komplex zusammen. In allen Fällen gingen die Antikörper eine Bindung mit VEGF 121 und VEGF 165 in gleich guter Weise ein und erzeugten im wesentlichen dieselben Resultate. Die Resultate unten sind für VEGF165, sofern nicht anderweitig ausgeführt.

TABELLE 1. ZUSAMMENFASSUNG DER ANTI-VEGF-ANTIKÖRPEREIGENSCHAFTEN

Epitop-Gruppe ¹	Klon	Isotyp	VEGF-Immunogen ²	Prädominante Reaktivität ³
1	GV39M	IgM,k	Gp N-Terminus	VEGF:Flk-1
1	11B5	IgM,k	Hu N-Terminus	VEGF:Flk-1
2	3E7	IgG1,l	Hu N-Terminus	VEGF und VEGF:Flk-1
2	7G3	IgM,k	Hu N-Terminus	VEGF und VEGF:Flk-1
3	12D7	IgG1,k	Hu N-Terminus	VEGF
4	2C3	IgG2a,k	rHuVEGF	VEGF
⁴ zentriert	A4.6.1	IgFl		VEGF

um.aa
89-94

¹Epitopgruppen wurden mittels kompetitivem ELISA bestimmt.

²Mäuse wurden mit einem synthetischem Peptid immunisiert, entsprechend entweder den N-Terminalen 26 Aminosäuren von humanem VEGF (11B5, 3E7, 7G3 und 12D7), den N-Terminalen 25 Aminosäuren von Meer-schweinchen-VEGF (GV39M) oder dem rekombinanten humanen VEGF voller Länge (2C3).

³Antikörper wurden in einem indirekten und einem Fänger-ELISA auf Reaktivität mit VEGF alleine oder mit VEGF, assoziiert mit sFlk-1 (VEGF:Flk-1), gescreent.

⁴A4.6.1 hat ein genau definiertes Epitop, das sich vom Epitop Gruppe 4, erkannt von 2C3, unterscheidet. Die A4.6.1-Studien werden in Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998 und Keyt et al., 1996 berichtet, von denen jedes hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0781] Kompetitive Bindungsstudien unter Verwendung von biotinylierten oder Peroxidasemarkierten Testantikörpern und einem 10-100-fachen Überschuß an nicht-markierten, im Wettbewerb stehenden Antikörpern zeigten, daß 2C3 an ein einzigartiges Epitop bindet. Diese Studien offenbarten zuerst, daß GV39M und 11B5 die gegenseitige Bindung an VEGF:Flk-1 kreuzblockierten und daß 3E7 und 7G3 die gegenseitige Bindung an VEGF-Biotin, eingefangen auf Avidin, kreuzblockierten. GV39M und 11B5 wurden willkürlich der Epitop-Gruppe 1 zugeordnet, während 3E7 und 7G3 der Epitop-Gruppe 2 zugeordnet wurden.

[0782] 2C3 und der verbleibende Antikörper, 12D7, störten nicht signifikant die gegenseitige Bindung oder die Bindung des Rests der Antikörper an VEGF oder VEGF:Rezeptor. 12D7 wurde der Epitop-Gruppe 3 zugeordnet, und 2C3 wurde der Epitop-Gruppe 4 zugeordnet (Tabelle 1).

[0783] Wie oben in der Tabelle aufgeführt, erkennt 2C3 ein anders Epitop als der Antikörper A4.6.1. Die Kompetitionssstudien der Erfinder zeigten, daß 2C3 und A4.6.1 nicht kreuzreaktiv sind. Das von A4.6.1 erkannte Epitop ist ebenso zuvor genau definiert worden und ist ein kontinuierliches Epitop, das um Aminosäuren 89-94 zentriert ist (Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998; Keyt et al., 1996). Es gibt ebenso eine Anzahl von bekannten Unterschieden zwischen 2C3 und A4.6.1 (s. unten).

2. 2C3 kann an freien VEGF binden

[0784] Es gab merkbare Unterschiede hinsichtlich der Fähigkeit der Antikörper, an löslichen VEGF in freier und komplexierter Form zu binden (Tabelle 2). Diese Studien liefern weitere Hinweise auf die einzigartige Natur von 2C3. Tabelle 2 zeigt, daß GV39M und 11B5 eine starke Präferenz für den VEGF:Rezeptor-Komplex aufweisen, wobei eine halb-maximale Bindung mit VEGF:Flk-1 bei 5,5 bzw. 2nM erzielt wird, im Vergleich mit 400 bzw. 800nM für freien VEGF in Lösung.

[0785] Im Gegensatz dazu wiesen 2C3 und 12D7 eine Präferenz für freien VEGF auf, wobei eine halb-maxi-

male Bindung bei 1 bzw. 20nM erzielt wurde, im Vergleich mit 150 bzw. 250nM für den VEGF:Flk-1-Komplex. Jedoch begibt sich 2C3 an die Tumorgefäße ebenso wie zum Tumorstroma nach Injektion in vivo (s. unten).

[0786] 3E7 ging eine Bindung mit freiem VEGF und dem VEGF:Flk-1-Komplex in gleich guter Weise ein, wobei eine halb-maximale Bindung bei 1nM für beide erzielt wurde.

TABELLE 2. EINFANGEN VEGF VEGF gg. VEGF:FLK-1 MITTEILS ELISA („ELISA CAPTURE“)

Klon	Konzentration, die 50% maximale Bindung ergibt (nM) ¹	Verhältnis von VEGF/VEGF:Flk-1 ²	
	VEGF	VEGF:Flk-1	
GV39M	400*	5,5	72,7
11B5	800*	2	400,0
3E7	0,9	1	0,9
12D7	20	250*	0,1
2C3	1	150	0,007
Mab4.6.1 ³	0,3	500*	0,0006
1A8	NR ⁴	1,5	
Kontrolle	NR	600*	

¹Extrapolierter Wert

¹Halb-maximale Bindungswerte wurden durch Titrieren von biotinyliertem VEGF und biotinyliertem sFlk-1, komplexiert mit VEGF, in dreifacher Ausfertigung auf Näpfe, die mit dem angezeigten Antikörper beschichtet waren, und dann durch Entwickeln mit Peroxidase-markiertem Avidin bestimmt.

²Verhältnisse größer als 1,0 weisen auf eine Präferenz des Antikörpers für den Komplex (VEGF:Flk-1) hin, während Verhältnisse weniger als 1,0 auf eine Präferenz für VEGF hinweisen.

³Verwendete Kontroll-Antikörper schlossen ein: 1A8 (Maus-anti-Flk-1), Mab 4.6.1 (Maus-anti-human-VEGF von Genentech) und ein irrelevanter IgM als eine negative Kontrolle.

⁴NR = keine Reaktion nachgewiesen.

3. 2C3 erkennt ein nicht-konformationsabhängiges Epitop

[0787] Eine Western-Analyse zeigt, daß 12D7, 2C3 und 7G3 mit denaturiertem VEGF 121 und VEGF 165 unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen reagieren. Diese Antikörper scheinen deshalb Epitope zu erkennen, die nicht konformationsabhängig sind.

[0788] Im Gegensatz dazu reagierten GV39M, 11B5 und 3E7 nicht mit VEGF auf Western-Blots, möglicherweise, weil sie ein Epitop am N-Terminus von VEGF erkennen, das konformationsabhängig ist und unter denaturierenden Bedingungen verzerrt wird.

[0789] Western-Blot-Analysen von Anti-VEGF-Antikörpern wurden durch Trennen von VEGF165 in Anwesenheit von 5% FCS durchgeführt, unter Verwendung von SDS-PAGE auf einem 12% Gel und durch Analysieren mittels eines Standard-Western-Blot-Protokolls unter Verwendung von ECL-Nachweis. Die primären Antikörper wurden mit der Nitrozellulosemembran unter Verwendung eines Vielspur-Mini-Blotter-Apparats inkubiert. Kontrollantikörper schlossen ein: Ab-3, ein monoklonaler IgG, der für VEGF spezifisch ist, von Oncogene Science mit 1 µg/ml, A-20, ein Kaninchen-anti-VEGF-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Inc. mit 5µg/ml, und ein IgG mit irrelevanter Spezifität mit 10µg/ml.

[0790] Ein typischer Western-Blot für die verschiedenen Antikörper, einschließlich 2C3 mit 5µg/ml, zeigte dimeren VEGF als eine große Bande bei näherungsweise 42kd. Ein Multimer von VEGF bei näherungsweise 130kd war ebenso sichtbar bei 12D7, 7G3 und einem positiven Kontrollantikörper.

4. Tumor-Immunhistochemie

[0791] Tumore, die mittels Immunhistochemie untersucht wurden, waren humane Tumore verschiedener Typen von Krebspatienten, transplantierbare humane Tumor-Xenografts von verschiedenen Typen, die in Mäusen wachsen gelassen worden waren, Meerschweinchen-Linie-10-Tumor, wachsen gelassen in Meerschweinchen, und Maus-3LL-Tumor, wachsen gelassen in Mäusen (s. Legende zu Tabelle 3 für Einzelheiten).

[0792] Die immunhistochemische Reaktivität von 3E7, GV39M und 11B5 an NCI-H358-humanen NSCLC-Xenografts wurde bestimmt und mit Kontrollantikörpern verglichen (einem IgG mit irrelevanter Spezifität; A-20, einem Kaninchen-anti-VEGF-Antikörper; und MECA-32, einem Ratten-anti-Maus-Endothelzell-Antikörper). 8µm gefrorene Schnitte von NCI-H358-humanem NSCLC, wachsen gelassen in SCID-Mäusen, wurden gefärbt unter Verwendung einer indirekten Immunperoxidase-Technik und wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

[0793] Es wurde bestimmt, daß GV39M und 11B5, die das Epitop-Gruppe-1 an VEGF erkennen die Gefäßendothelzellen stark und perivaskuläres Bindegewebe mäßig in allen untersuchten Tumoren färbten. Die Epitop-Gruppe-1-Antikörper unterschieden sich in ihrer Reaktivität mit Tumorzellen dahingehend, daß GV39M nur schwach mit Tumorzellen reagierte, während 11B5 stärker reagierte. Näherungsweise 80% der Endothelzellen, die durch MECA 32 (Maus) oder TEC 11 (human) gefärbt wurden, wurden ebenso durch GV39M und 11B5 gefärbt.

[0794] 3E7 und 7G3, die das VEGF-Epitop-Gruppe-2 erkennen, zeigten Reaktivität mit Gefäßendothelzellen, Bindegewebe und Tumor-Zellen in allen untersuchten Tumoren (Tabelle 3). Die Intensität der Endothelzellsfärbung war typischerweise stärker als die Tumorzell- oder Bindegewebe-Färbung, insbesondere, wenn die Antikörper in niedrigen (1–2µg/ml) Konzentrationen aufgebracht wurden, wenn es eine merkbar gestiegene Selektivität für Gefäßendothel gab.

TABELLE 3. IMMUNHISTOCHEMISCHE REAKTIVITÄT VON ANTIVGFE-ANTIKÖRPERN AUF TUMOR-SCHNITTE

<u>Gruppe</u>	<u>Klon¹</u>	<u>Reaktivität²</u>	<u>Xenograft³</u>	<u>Hu-Tumor⁴</u>	Endothelzell- färbung	Meerschwein- chen- Tumor ⁵	Maus- Tumor ⁶
						(Linie 10)	(3LL)
1	GV39M	EC>CT>TC	3-4+	2-3+		4+	3+
1	11B5	EC>CT=TC	3+	3+		3+	3+
2	3E7	EC>CT=TC	2+	2+		2+	1-2+
2	7G3	EC>CT=TC	3+	2-3+		3+	2+
3	12D7	NR	-	-		-	-
4	2C3	NR	-	-		-	-

¹2C3 und 12D7 wurden in 20µg/ml aufgetragen; alle anderen Antikörper waren 5-10µg/ml.

²Reaktivitäts-Definition: EC = Endothel; CT = Bindegewebe; TC = Tumorzelle; NR = keine Reaktion

³Getestete humane Tumor-Xenografts; NCI-H358 NSCLC, NCI-H460 NSCLC, HT29-Colon-Adenocarcinom, L540-Hodgkin'sches Lymphom.

⁴Getestete humane Tumore; Weichgewebesarkom, Hodgkin'sches Lymphom, renales-, Brust-, Parotis-, Colon-, Lunge- und endometriales Carcinom.

⁵Reaktivität mit Meerschweinchen-VEGF in Linie-10-Meerschweinchen-Tumor-Schnitten.

⁶Reaktivität mit Maus-VEGF in Maus-3LL-Lewis Lungen-Carcinom-Tumor-Schnitten.

[0795] Die immunhistochemische Analyse wurde an Aceton-fixierten gefrorenen Schnitten von Tumorgewebe mittels immunhistochemischen Standardtechniken durchgeführt. Die Schnitte wurden mikroskopisch untersucht und auf ihre Reaktivität wie folgt bewertet: –, negativ; +/-, sehr schwach; 1+, schwach; 2+, mäßig; 3+, stark; 4+, sehr stark.

[0796] 12D7 und 2C3 färbten gefrorene Schnitte von irgendeiner Tumorgewebe nicht, wahrscheinlich weil die Acetonfixierung des Gewebes die Antikörperbindung zerstörte. Jedoch begab sich 2C3 zu dem Tumorgewebe nach der Injektion in vivo (s. unten).

[0797] GV39M, 11B5, 3E7 und 7G3 reagierten mit Nagetiergefäßen an gefrorenen Schnitten von Meerschweinchen-Linie-10-Tumor, wachsen gelassen in Meerschweinchen, und Maus-3LL-Tumor, wachsen gelassen in Mäusen. GV39M, 11B5 und 7G3 reagierten genau so stark mit Meerschweinchen- und Maus-Tumor-Gefäßen, wie sie dies mit humanen Gefäßen in humanen Tumorproben taten. 3E7 färbte den Maus-3LL-Tumor weniger intensiv, als dies die Meerschweinchen- oder humanen Tumor-Schnitte taten, was nahelegt, daß 3E7 eine geringere Affinität für Maus-VEGF hat. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Analyse mittels indirektem ELISA überein, die gezeigt hat, daß alle Antikörper außer 2C3 mit Maus-VEGF reagieren.

BEISPIEL II

2C3 inhibiert die Endothelzell-Wanderung

A. Materialien und Methoden

Endothelzell-Wachstums-Assay

[0798] Adulte bovine Endothelzellen aus der Aorta (ABAE) wurden in 96-Napf-Gewebekultur-Platten mit 1500 Zellen/Napf ausplattiert und in der Anwesenheit von 0,5nM humanem VEGF unter der Zugabe der verschiedenen Proben- und Kontroll-Antikörper wachsen gelassen. Kontrollnöpfe erhielten Medien mit oder ohne VEGF.

[0799] Nach 4 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit einem MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, inneres Salz) Umwandlungsassay quantifiziert, bei dem die MTS-Umwandlung in ein Formazan proportional zur Zellzahl ist und anhand der Exinktion bei 490nm verfolgt werden kann (Cell Titer 95 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI). Der Assay wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

[0800] Das Zellwachstum wurde durch Subtrahieren der MTS-Umwandlung in Kulturen abgeschätzt, zu denen VEGF nicht zugegeben wurde. Die Resultate wurden als ein prozentualer Anteil der MTS-Umwandlung in Kontroll-Kulturen ausgedrückt, zu denen nur VEGF zugegeben worden war (Buttke et al., 1993).

B. RESULTATE

Inhibition des VEGF-vermittelten Endothelzell-Wachstums

[0801] Die IgG-Antikörper 3E7 und 12D7, die die Epitop-Gruppen 1–3 auf VEGF erkennen, inhibierten nicht das VEGF-vermittelte Wachstum von ABAE-Zellen ([Fig. 1](#)), was nahelegt, daß sie nicht-blockierende Anti-VEGF-Antikörper sind, deren Epitope nicht bei der VEGF:KDR-Wechselwirkung beteiligt sind. Der IgM-Antikörper GV39M, der ebenso Epitop-Gruppen 1–3 an VEGF erkennt, inhibierte ebenso nicht das VEGF-vermittelte Wachstum von ABAE-Zellen und ist ein nicht-blockierender Anti-VEGF-Antikörper.

[0802] Im Gegensatz dazu inhibierten 2C3 gegen Epitop 4 an VEGF und ein neutralisierender Anti-VEGF-Referenz-Antikörper, Mab.4.6.1, das VEGF-vermittelte ABAE-Wachstum um 50% bei 3nM bzw. 1 nM ([Fig. 1](#)). Dies weist darauf hin, daß 2C3 die mitogene Aktivität von VEGF neutralisieren kann.

[0803] Die Definition von 2C3 als ein blockierender Mab unterscheidet 2C3 von einer Vielzahl von anderen Antikörpern zusätzlich zu GV39M, 3E7 und 12D7. Verschiedene Anti-VEGF-Antikörper, wie etwa Ab-3 sind bekanntermaßen nicht-blockierende, monoklonale Antikörper, die sich deutlich von 2C3 unterscheiden.

[0804] Einer der IgM-Antikörper, 11B5, war gegenüber ABAE-Zellen bei einer Konzentration von 8nM oder größer toxisch. Die Zellen lösten sich innerhalb von 30 min ab und nahmen innerhalb von 24 h Trypan-Blau-Farbstoff auf. Dieser Effekt scheint Zelltyp-spezifisch zu sein, da HUVEC, Endothelzellen aus der Schweineaorta und bEND.3-Zellen von 11B5 sogar bei 40nM unbeeinträchtigt blieben. Der toxische Effekt von 11B5 scheint Wachstumsfaktorunabhängig zu sein, da er in Abwesenheit von zugegebenem VEGF und in Anwesenheit von basalem Fibroblast-Wachstum-Faktor (bFGF) stattfand.

BEISPIEL III

2C3 bewegt sich spezifisch zu Tumoren In Vivo

A. Materialien und Methoden

In-Vivo-Lokalisierung an humane Tumor-Xenografts

[0805] Tumore wurden subkutan in immunkompromittierten Mäusen wachsen gelassen (NCI-H358 NSCLC in nu/nu-Mäusen und HT29-Colon-Adenocarcinom in SCID-Mäusen), bis das Tumolvolumen näherungsweise 1cm³ betrug. 100µg nicht-markierter Antikörper für Studien unter Verwendung von SCID-Mäusen oder 100µg biotinylierter Antikörper für Studien unter Verwendung von nackten Mäusen wurden intravenös über eine

Schwanzvene injiziert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse anästhesiert, mit PBS perfundiert, und der Tumor und die Organe, einschließlich Herz, Lungen, Leber, Nieren, Darm und Milz wurden gesammelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

[0806] Der Tumor und die Organe von jeder Maus wurden auf einem Cryostat geschnitten und auf Antikörper immunhistochemisch wie oben gefärbt, mit der Ausnahme, daß Schnitte aus den nackten Mäusen unter Verwendung von Peroxidase-markierten Streptavidin-Biotin-Komplex entwickelt wurden (Dako, Carpinteria, CA), und daß die Schnitte aus den SCID-Mäusen unter Verwendung von zwei Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern, einem Ziegen-Anti-Maus-IgG + IgM, gefolgt von einem Kaninchen-Anti-Ziegen-IgG, entwickelt wurden.

B. Resultate

In-vivo-Lokalisierung in Tumor-tragenden Mäusen

[0807] Die in-vivo-Lokalisierung von 2C3, 3E7 und GV39M in humanen Tumor-Xenografts wurde bestimmt. 100 µg biotinylierter 2C3 oder Isotyp-passender Kontroll-IgG wurden i. v. in nu/nu-Mäusen injiziert, die NCI-H358-humanen-NSCLC trugen. 100 µg GV39M und 3E7 oder ein Isotyp-passender Kontroll-IgG wurden in SCID-Mäusen injiziert, die HT29-humane Colon-Adenocarcinome trugen. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse geopfert, ausgeblutet, und die Tumore und Gewebe wurden entnommen. Gefrorene Schnitte der Tumore und Gewebe wurden immunhistochemisch analysiert, um die Bindung und Verteilung der Antikörper zu bestimmten (Tabelle 4).

Tabelle 4. Gewebeverteilung van Anti-VEGF-Antikörper in Tumor-tragenden Mäusen

Antikörper	Immunhistochemische Reaktivität						
	<u>Herz</u>	<u>Lunge</u>	<u>Leber</u>	<u>Niere¹</u>	<u>Darm</u>	<u>Milz</u>	<u>Tumor</u>
2C3	-	-	-	-	-	-	3+
3E7	-	-	-	-	-	-	1-2+
GV39M	-	-	-	2+	-	-	2+
Kontrolle ³	-	-	-	-	-	-	-

¹GV39M ging spezifisch eine Bindung mit Endothel- oder Mesangialzellen in den Glomeruli der Niere ein.

²3E7 und GV39M ging eine spezifische Bindung mit Tumorgefäßendothel ein, während 2C3 spezifisch eine Bindung an Tumorstroma einging.

³Kontrolle = IgM mit irrelevanter Spezifität

[0808] Die immunhistochemische Analyse wurde an Aceton-fixierten gefrorenen Schnitten von Geweben durchgeführt, einschließlich des Tumors, aus Tumor-tragenden Mäusen, die 100 mg des angezeigten Antikörper intravenös 24 Stunden vor der Tötung erhalten hatten. Die Schnitte wurden mikroskopisch untersucht und auf spezifische Reaktivität wie folgt bewertet: –, negativ; +/-; sehr schwach; +, schwach; 2+, mäßig; 3+, stark; 4+, sehr stark.

[0809] 3E7 begab sich spezifisch an das Gefäßendothel innerhalb der Tumore. Näherungsweise 70% der MECA 32-positiven Blutgefäße wurden durch 3E7, injiziert in vivo, gefärbt. Die größeren Blutgefäße, die die Mikrogefäße versorgen, waren 3E7 positiv. Kleine Mikrogefäße in sowohl den Spuren des Stroma („tracks of stroma“) und in den Tumornestern waren ebenso für 3E7 positiv. Die Intensität der Färbung mittels 3E7 war erhöht in und um Gebiete der focalen Nekrose. In nekrotischen Gebieten des Tumors war ein extravaskulärer Antikörper offensichtlich, aber in gesunden Regionen des Tumors gab es wenige Hinweise auf eine extravaskuläre Färbung. Das Gefäßendothel in allen untersuchten normalen Geweben, einschließlich der Niere, wurde nicht durch 3E7 gefärbt.

[0810] GV39M lokalisierte ebenso spezifisch an das Gefäßendothel der Tumore. Näherungsweise 80% der MECA 32-positiven Blutgefäße im Tumor wurden durch GV39M gefärbt. Die GV39M-positiven Gefäße waren gleichmäßig durch den ganzen Tumor verteilt, einschließlich großer Blutgefäße, aber ebenso kleine Kapillaren.

Ebenso wie mit 3E7 war die Färbungsintensität der GV39M-positiven Blutgefäßen erhöht in Gebieten mit fokaler Nekrose im Tumor. Jedoch waren, anders als 3E7, Endothelzellen oder Mesangialzellen in den Nierenglomeruli ebenso gefärbt. Es scheint, daß die Färbung der Glomeruli durch GV39M antigen-spezifisch ist, da ein Kontroll-IgM mit irrelevanter Spezifität keine Färbung der Glomeruli erzeugte. Gefäßendothel in Geweben, die nicht die Niere waren, wurde nicht von GV39M gefärbt.

[0811] Biotinyliertes 2C3 erzeugte eine intensive Färbung des Bindegewebes um die Gefäße des H358-humanen-NSCLC-Tumors nach i.v.-Injektion. Die großen Abschnitte (tracks) des Stromalen Gewebes, die die Tumorzellnester verbinden, wurden durch 2C3 gefärbt, wobei die intensivste Lokalisierung in den größten Abschnitten des Stroma beobachtet wurden. Es war nicht möglich, das Gefäßendothel von dem umgebenden Bindegewebe in diesen Regionen zu unterscheiden. Jedoch wurden die Endothelzellen in Gefäßen, die nicht von Stroma umgeben waren, wie etwa in Gefäßen, die durch die Tumornester selbst liefen, gefärbt. Es gab keine nachweisbare Färbung durch 2C3 in irgendeinem der untersuchten normalen Gewebe.

[0812] In dem HT29-humanen Tumormodell begab sich 2C3 ebenso in starker Weise an das Bindegewebe, aber die intensivste Färbung wurde in den nekrotischen Regionen des Tumors beobachtet.

BEISPIEL IV

2C3 inhibiert die VEGF-Bindung an VEGFR2, aber nicht an VEGFR1

A. Materialien und Methoden

1. Zelllinien und Antikörper

[0813] Endothelzellen aus der Schweineaorta (PAE), transfiziert mit entweder VEGFR1 (PAE/FLT) oder VEGFR2 (PAE/KDR) wurden von Dr. Johannes Waltenberger (Ulm, Deutschland) erhalten, hergestellt, wie in Waltenberger et al. beschrieben (1994, spezifisch hierin durch Bezugnahme aufgenommen) und wurden in F-12-Medium wachsgelassen, enthaltend 5% FCS, L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin (GPS). bEND.3-Zellen wurden von Dr. Werner Risau (Bad Nauheim, Deutschland) erhalten und wurden in DMEM-Medium wachsgelassen, enthaltend 5% FCS und GPS. NCI-H358 NSCLC (erhalten von Dr. Adi Gazdar, UT-Southwestern, Dallas, TX), A673-humanes-Rhabdomyosarcoma und HT1080-humanes-Fibrosarcom (beide von der American Type Culture Collection) wurden in DMEM-Medium wachsgelassen, enthaltend 10% FCS und GPS.

[0814] 2C3 und 3E7, monoklonale Anti-VEGF-Antikörper, und 1A8, monoklonale Anti-Flk-1-Antikörper und T014, ein polyklonaler Anti-Flk-1-Antikörper sind wie oben beschrieben in Beispiel I und in Brekken et al. (1998) und Huang et al. (1998), von denen jedes hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. A4.6.1, monoklonaler Maus-Anti-humaner-VEGF-Antikörper, wurde von Dr. Jin Kim (Genentech Inc., CA) erhalten und ist zuvor beschrieben worden (Kim et al., 1992; spezifisch hierin durch Bezugnahme aufgenommen). Negative Kontrollantikörper, die verwendet wurden, waren OX7, ein Maus-Anti-Ratten-Thyl.1-Antikörper (Bukovsky et al., 1983), erhalten von Dr. A.F. Williams (MRC Cellular Immunology Unit, Oxford, UK) und C44, ein Maus-Anti-Colchicin-Antikörper (Rouan et al., 1990, erhalten von ATCC).

2. ELISA-Analyse

[0815] Die extrazelluläre Domäne von VEGFR1 (Flt-1/Fc, R&D Systems, Minneapolis) oder VEGFR2 (sFlk-1-Biotin) wurde direkt auf Näpfe einer Mikrotiterplatte aufgetragen oder durch NeutrAvidin (Pierce, Rockford, IL)-beschichtete Näpfen eingefangen. VEGF in einer Konzentration von 1 nM (40 ng/ml) wurde in den Näpfen in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 100–1000 nM (15 µg–150 µg/ml) an Kontroll- oder Test-Antikörpern inkubiert. Die Näpfe wurden dann mit 1 µg/ml des Kaninchen-Anti-VEGF-Antikörpers inkubiert (A-20 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

[0816] Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Peroxidase-markiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (Dako, Carpinteria, CA) entwickelt und durch die Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat (Kirkegaard und Perry Laboratories, Inc.) visualisiert. Die Reaktionen wurden nach 15 min. mit 1 M H₃PO₄ abgebrochen und spektrophotometrisch bei 450 nM ausgelesen.

[0817] Der Assay wurde ebenso durch Beschichten der Näpfe einer Mikrotiterplatte mit entweder Kontroll- oder Test-IgG durchgeführt. Die Näpfe wurden dann mit VEGF: Flt-1/Fc oder VEGF:sFlk-1-Biotin inkubiert und

mit entweder Peroxidase-markiertem Ziegen-Antihumanem-Fc (Kirkegaard und Perry Laboratories, Inc.) oder Peroxidase-markiertem Streptavidin entwickelt und wie oben visualisiert.

3. Copräzipitationsassay

[0818] 40 ng VEGF wurde mit dem $F(ab')_2$ von entweder 2C3 (20 μ g) oder A4.6.1 (10 und 1 μ g) für 30 min in Bindungspuffer präinkubiert (DMEM mit 1 mM $CaCl_2$, 0,1 mM $CuSO_4$, und 0,5% Trypton). 200 ng lösliche Formen VEGFR1 (Flt-1/Fc) oder VEGFR2 (KDR/Fc, R&D Systems, Minneapolis, MN) wurden auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l zugegeben und für 2 h inkubiert. Die Rezeptor/Fc-Konstrukte wurden unter Verwendung von Protein-A-Sepharose-Kügelchen ausgefällt, und der resultierende Niederschlag wurde 4 mal mit Bindungspuffer gewaschen.

[0819] Reduzierender Probenpuffer wurde zu dem Pellet und dem Überstand jeder Reaktion zugegeben, und beide wurden mittels 12% SDS-PAGE analysiert und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranen wurden dann mit 12D7 (1,0 μ g/ml), einem Maus-Anti-VEGF-Antikörper, sondiert und nach Inkubation mit Peroxidase-markiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) mit einem Super Signal Chemilumineszenz-Substrat entwickelt (Pierce, Rockford, IL). Die löslichen Rezeptor/Fc-Konstrukte wurden ebenso unter Verwendung von Peroxidase-konjugiertem Ziegen-Anti-humanem Fc nachgewiesen (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.).

B. RESULTATE

1. 2C3 blockiert die VEGF-Bindung an VEGFR2, aber nicht an VEGFR1 in ELISAs

[0820] Der Anti-VEGF-Antikörper 2C3 blockierte VEGF von der Bindung an VEGFR2 (KDR/Flk-1), aber nicht an VEGFR1 (FLT-1) in dem ELISA-Assay. In der Anwesenheit eines 100-fachen und 1000-fachen molaren Überschusses an 2C3 wurde die Menge an VEGF, die mit VEGFR2-beschichteten Näpfe eine Bindung einging, auf 26% bzw. 19% der Menge reduziert, die in der Abwesenheit von 2C3 eine Bindung einging ([Fig. 2](#)). Im Gegensatz dazu betrug in der Anwesenheit eines 100-fachen und 1000-fachen molaren Überschusses an 2C3 die Menge an VEGF, die mit VEGFR1-beschichteten Näpfen eine Bindung einging, 92% bzw. 105% der Menge, die in der Abwesenheit von 2C3 ([Fig. 2](#)) eine Bindung einging.

[0821] Die Mengen an VEGF, die eine Bindung mit VEGFR1 oder VEGFR2 eingingen, waren durch die Anwesenheit eines 100 – 1000-fachen Überschusses des nicht-blockierenden monoklonalen Anti-VEGF-Antikörpers 3E7 oder eines Kontroll-IgG mit irrelevanter Spezifität unbeeinflusst ([Fig. 2](#)). A4.6.1 blockierte die VEGF-Bindung an sowohl VEGFR2 (KDR/Flk-1) als auch VEGFR1 (Flt-1).

2. 2C3 blockiert die VEGF-Bindung an VEGFR2, aber nicht an VEGFR1 in Lösung

[0822] Die Fähigkeit von 2C3, die Bindung von VEGF an VEGFR1/Fc oder VEGFR2/Fc in Lösung zu blockieren, wurde in Co-Präzipitationsassays beurteilt. 40 ng VEGF wurden mit 200 ng extrazellulärer Domäne von VEGFR1, verknüpft mit einem Fc-Teil (Flt-1/Fc), oder von VEGFR2 (KDR/Fc), verknüpft an, in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 2C3 oder 4.6.1 $F(ab')_2$ inkubiert. Die Rezeptor/Fc-Konstrukte wurden durch Inkubation mit Protein A-Sepharose-Kügelchen ausgefällt. Der Niederschlag wurde gewaschen und in reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und mittels 12% SDS-PAGE getrennt und auf PVDF transferiert. Die Membran wurde mit PP82 blockiert und mit 12D7 (1 μ g/ml) Maus-Anti-VEGF-Antikörper sondiert und unter Standard-Chemilumineszenzbedingungen entwickelt. VEGF-Monomer und -dimer zusammen mit $F(ab')_2$ wurden nachgewiesen.

[0823] VEGF, vermischt mit entweder VEGFR1/Fc oder VEGFR2/Fc, wurde durch Protein-A-Sepharose co-präzipitiert, was zeigt, daß VEGF an beide Rezeptoren bindet. Die Zugabe von 2C3 $F(ab')_2$ blockierte die Bindung von VEGF an VEGFR2/Fc, aber nicht an VEGFR1/Fc. Im Gegensatz dazu blockierte 4.6.1 $F(ab')_2$ die Bindung von VEGF an sowohl VEGFR2/Fc als auch VEGFR1/Fc. Die Ergebnisse bestätigen, daß 2C3 die Bindung von VEGF an VEGFR2 inhibiert, aber nicht an VEGFR1, während der 4.6.1-Antikörper die Bindung von VEGF an sowohl VEGFR2 als auch VEGFR1 inhibiert.

2C3 blockiert die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2

A. Materialien und Methoden

Immunfällung und Western-Blot-Analyse

[0824] PAE/KDR-, FAE/FLT- und bEND.3-Zellen wurden auf 80–90% Konfluenz in 100 mm Gewebeschalen in Medien wachsen gelassen, enthaltend 5% Serum. Die Zellen wurden dann hinsichtlich des Serum gefastet („serum-starved“) für 24 Stunden in Medium, enthaltend 0,1% Serum. Nach Vorbehandlung mit 100 nM Natriumorthovanadat in PBS für 30 Min. wurden die Zellen mit 5 nM (200 ng/ml) VEGF165, 5 nM (100 ng/ml) bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) oder A673-Tumor-konditioniertem Medium in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Kontroll- oder Test-Antikörpern für zusätzliche 15 Min. inkubiert.

[0825] Die Zellen wurden dann mit eiskaltem PBS gewaschen, enthaltend 10 mM EDTA, 2 mM Natriumfluorid und 2 mM Natriumorthovanadat, und in Lysepuffer lysiert (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,25% Natriumdeoxycholat, 0,1% CHAPS, 5 mM EDTA, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM Natriumfluorid, 2 mM Natriumorthovanadat, 10% Glycerin und Proteaseinhibitoren (Vollständige-Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten, Boehringer Mannheim)). Die Lysate wurden durch Zentrifugation geklärt und der resultierende Überstand für die Immunfällung verwendet.

[0826] VEGFR1 und VEGFR2 wurden durch Inkubieren der Zellysate über Nacht bei 4°C mit 5 µg Hühnchen-anti-FLT-1-N-Terminus (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) oder 10 µg T014 (affinitätsaufgereinigtem Anti-Flk-1) immungefällt. Die Reaktionen unter Verwendung des Hühnchen-Anti-FLT-1-Antikörpers wurden darauffolgend mit einem überbrückenden Ziegen-Anti-Hühnchen-Antikörper (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) für 1 h bei 4°C inkubiert. Der Immunkomplex wurde dann mit Protein A/G-Sepharose gefällt, mehrfach mit 10% Lysepuffer (mit zugegebenen Proteaseinhibitoren) in PBS-Tween (0,2%) gewaschen und in SDS-Probenpuffer gekocht, enthaltend 100 mM β-Mercaptoethanol und 8 M Harnstoff.

[0827] Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranen wurden für 30–60 Min. mit PP81 (Esst Coast Biologies, Berwick, ME) blockiert und auf Phosphotyrosinreste mit 0,5 µg/ml 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) über Nacht bei 4°C sondiert. Die PVDF-Membranen wurden nach Inkubation mit Peroxidase-markiertem Kaninchen-Anti-Maus-IgG (Dako, Carpinteria, CA) mittels Super Signal-Chemilumineszenz-Substrat (Pierce, Rockford, IL) entwickelt. Die PVDF-Membranen wurden dann mit ImmunoPure Elutionspuffer (Pierce, Rockford, IL) für 30 Min. bei 55°C abgestreift („stripped“) und erneut auf Rezeptorkonzentrationen mit entweder 0,5 µg/ml Hühnchen-Anti-FLT-1 oder 1,0 µg/ml T014 sondiert und wie oben nach der Inkubation mit dem geeigneten Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper entwickelt.

B. Resultate

Blockieren der VEGF-induzierten Phosphorylierung

[0828] In diesen Studien wurden PAE/KDR-Zellen für 15 Min. mit PBS, bFGF (5 nM, 100 ng/ml), VEGF 165 (5 nM, 210 ng/ml), A673-konditioniertem Medium (CM), CM in Kombination mit bestimmten Antikörpern (CNTL, 2C3, 3E7, A4.6.1, separat bei 100 nM, 15 µg/ml) oder T014 alleine (100 nM, 15 µg/ml) stimuliert. PAE/FLT-Zellen wurden ebenso für 15 Min. mit PBS, VEGF165 (5 nM, 210 ng/ml), A673-konditioniertem Medium (CM), CM in Kombination mit bestimmten Antikörpern (2C3, 3E7, A4.6.1, separat bei 100 nm, 15 µg/ml), oder T014 alleine (100 nM, 15 µg/ml) stimuliert. Die Zellen wurden dann in Lysepuffer inkubiert, und der Rezeptor wurde immungefällt, mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen getrennt, auf PVDF-Membranen übertragen und mit 4G10 (0,5 µg/ml) Maus-Anti-Phosphotyrosin-Antikörper sondiert und unter Standard-Chemilumineszenzbedingungen entwickelt. Die Membranen wurden dann abgestreift („stripped“) und erneut mit dem immunfällenden IgG sondiert, um das Niveau an Rezeptorprotein in jeder Spur zu bestimmen.

[0829] Die Resultate zeigten, daß 2C3, zusammen mit A4.6.1, einer Kontrolle, die Anti-VEGF-Antikörper neutralisiert, die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2 in PAE/KDR-Zellen blockiert. Dies stimmt mit früheren Resultaten überein, die zeigten, daß sowohl 2C3 als auch A4.6.1 das VEGF-vermittelte Wachstum von Endothelzellen blockieren (Beispiel II; Brekken et al., 1998). Western-blots von VEGFR2 in den Immunniederschlägen wurden durchgeführt, um die Mengen an VEGFR2-Protein in jeder Spur zu demonstrieren. 3E7, der

ein NH₂-terminales Epitop von VEGF sieht, blockierte nicht die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR2, noch tat dies ein Kontroll-IgG mit irrelevanter Spezifität.

[0830] Der Effekt von 2C3 auf die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR1 ist nicht klar. Wie andere Forscher gezeigt haben, ist die VEGF-induzierte Phosphorylierung von VEGFR1 in PAE/FLT-Zellen schwierig zu demonstrieren, möglicherweise aufgrund der niedrigen intrinsischen Kinaseaktivität von VEGFR1 (De Vries et al., 1992; Waltenberger et al., 1994; Davis-Smyth et al., 1996; Landgren et al., 1998).

BEISPIEL VI

2C3 inhibiert die VEGF-induzierte Permeabilität

A. Materialien und Methoden

Miles-Permeabilitäts-Assay

[0831] Das folgende Protokoll lief ab, wie von Murohara et al. (1998) beschrieben. In Kürze gesagt wurden 400–450 g männliche IAF-haarlose Meerschweinchen (Charles River, Wilmington, MA) anästhesiert und dann i.v. mit 0,5 ml 5% Evan's blauem Farbstoff in steriler PBS durch eine Ohrvene injiziert. 20 Min. später wurden 20 ng VEGF in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Kontroll- oder Test-Antikörpern intradermal (i.d.) injiziert. Die resultierenden blauen Flecken am Rücken des Meerschweinchens wurden fotografiert und mit einer Micrometerschraube 30 Min. nach den i.d.-Injektionen vermessen.

B. Resultate

2C3 blockiert die VEGF-induzierte Permeabilität

[0832] Um die Effekte von 2C3 auf VEGF-induzierte Permeabilität zu erforschen, wurden haarlose IAF-Meerschweinchen (Hartley-Stamm), 400–450 g groß, anästhesiert und i.v. mit 0,5 ml 0,5% Evan's blauem Farbstoff in steriler PBS durch eine Ohrvene injiziert. 20 Min. später wurden 25 ng VEGF in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Kontroll- oder Test-Antikörpern intradermal (i.d.) injiziert. Die resultierenden blauen Flecken am Rücken des Meerschweinchens wurden fotografiert und mit einer Micrometerschraube 30 Min. nach den i.d.-Injektionen vermessen.

[0833] Unter Verwendung dieses Miles-Permeabilitäts-Assay wurde gefunden, daß 2C3, der VEGF blockiert, VEGFR2 zu aktivieren, die VEGF-induzierte Permeabilität in den Meerschweinchen inhibierte. Dieser Effekt war bei 2C3 bei einem 10-fachen, 100-fachen oder 1000-fachen molaren Überschuß über VEGF offensichtlich. A4.6.1, der VEGF daran blockiert, sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 zu aktivieren, blockierte die VEGF-induzierte Permeabilität bei einem 10-fachen molaren Überschuß (vorliegende Studien und Kim et al., 1992). 3E7 und ein Kontroll-IgG, die nicht die VEGF:VEGFR2-Wechselwirkung blockieren, blockieren ebenso nicht die VEGF-induzierte Permeabilität in dem Miles-Permeabilitäts-Assay in Meerschweinchen.

[0834] Diese Resultate legen nahe, daß die durch VEGF vermittelte Endothelpermeabilität wenigstens teilweise durch VEGFR2-Aktivierung vermittelt wird. Diese Resultate stimmen mit denjenigen von anderen Forschern überein, die gezeigt haben, daß die Tyrosinkinaseaktivität von VEGFR2 notwendig für die VEGF-induzierte Permeabilität ist (Murohara et al., 1998; Joukov et al., 1998; Ogawa et al., 1998).

BEISPIEL VII

Anti-Tumor-Effekte von 2C3

A. Materialien und Methoden

1. In-vivo-Tumor-Wachstumsinhibition

[0835] Nu/nu-Mäusen wurde subkutan entweder 1×10^7 NCI-H358-NSCLC-Zellen oder 5×10^6 A673-Rhabdomyosarcom-Zellen am Tag 0 injiziert. Am Tag 1 und darauffolgend zwei Mal pro Woche wurden den Mäusen i.p.-Injektionen von 2C3 mit 1, 10 oder 100 µg oder Kontrollen, wie angezeigt, gegeben. Die Tumore wurden dann zwei Mal pro Woche für eine Periode von näherungsweise sechs Wochen für die NCI-H358-tragenden Mäuse und vier Wochen für die A673-tragenden Mäuse vermessen. Das Tumolvolumen wurde gemäß der For-

mel berechnet: Volumen = $L \times W \times H$, wobei L = Länge, W = Breite, H = Höhe.

2. In-vivo-Tumor-Therapie

[0836] Männlichen nu/nu-Mäusen, die subkutane NCI-H358-Tumore oder HT1080-Fibrosarcom mit 200–400 mm³ Größe trugen, wurde i.p. Test- oder Kontroll-Antikörper injiziert. Die NCI-H358-tragenden Mäuse wurden mit 100 µg Antikörper pro Injektion drei Mal pro Woche in der ersten Woche und zwei Mal pro Woche während der zweiten und dritten Woche behandelt. Die Mäuse wurden dann auf 50 µg pro Injektion alle fünf Tage umgeschaltet. Die HT1080-tragenden Mäuse wurden mit 100 µg des angezeigten Antikörpers oder Salzlösung an jedem zweiten Tag während der Studiendauer behandelt. In beiden Studien wurden die Mäuse geopfert, wenn ihre Tumore 2500 mm³ Größe erreichte, oder früher, wenn die Tumore begannen, sich ulzerös aufzulösen.

B. Resultate

1. 2C3-Wachstumsinhibition von neu implantierten humanen Tumor-Xenografts

[0837] 2C3 inhibiert das in-vivo-Wachstum von sowohl NCI-H358-NSCLS und A673-Rhabdomyosarcom in nu/nu-Mäusen auf eine Dosis-abhängige Weise ([Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#)). 100 µg 2C3, das zwei Mal i.p. pro Woche an Mäuse gegeben wurde, denen Tumorzellen subkutan ein Tag früher injiziert worden war, inhibierten das Wachstum von beiden humanen Tumortypen. Das endgültige Tumolvolumen bei den 2C3-Empfängern betrug näherungsweise 150 mm³ in beiden Tumorsystemen, im Vergleich mit näherungsweise 1000 mm³ bei den Empfängern der Kontrollen.

[0838] Behandlungen mit entweder 10 oder 1 µg von 2C3 zwei Mal pro Woche war weniger effektiv beim Verhindern des Tumorwachstums. Jedoch verlangsamten beide niedrigeren Dosen von 2C3 das Wachstum der A673-Tumore auf einen ähnlichen Grad im Vergleich mit den unbehandelten Mäusen. Die Tumorwachstumsverzögerung, die durch eine 10 µg-Dosis von 2C3 verursacht wurde, war in dem NCI-H358-Tumormodell weniger merkbar. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Tumormodellen und ihre Antwort auf die Inhibition der VEGFR2-Aktivität durch 2C3 korreliert mit der Aggressivität der beiden Typen von Tumoren in vivo. NCI-H358 wächst in vivo viel langsamer als A673 und scheint weniger empfindlich gegenüber niedrigen Dosen von 2C3 zu sein, während A673-Tumore rascher und aggressiver wachsen und empfindlicher gegenüber niedrigeren Dosen von 2C3 zu sein scheinen.

[0839] 3E7, das an VEGF bindet, aber nicht seine Aktivität blockiert, hatte keinen Effekt auf das Wachstum von NCI-H358-Tumoren. Jedoch stimulierte 3E7, der in einer Dosis von 100 µg zwei Mal pro Woche gegeben wurde, das Wachstum von A673-Tumoren ([Fig. 3B](#)), was nahelegt, daß er die Effizienz der VEGF-Signalgebung in den Tumor erhöht.

2. Behandlung von etablierten humanen Tumor-Xenografts mit 2C3

[0840] Mäuse, die subkutane NCI-H358-NSCLC-Tumore trugen, die zu einer Größe von näherungsweise 300–450 mm³ gewachsen waren, wurde 2C3, A4.6.1, 3E7 oder ein IgG mit irrelevanter Spezifität injiziert ([Fig. 4](#)). Die Dosen betrugen 50–100 µg alle 3–5 Tage. A4.6.1 wurde als eine positive Kontrolle verwendet, da von anderen Forschern gezeigt wurde, daß er die VEGF-Aktivität in vivo blockiert, was zu einer Inhibition des Tumorwachstums führt (Kim et al., 1993; Mesiano et al., 1998). Zusätzlich zum Messen des mittleren Tumolvolumens ([Fig. 4](#)) wurden Fotografien der Mäuse aus jeder Behandlungsgruppe ebenso gemacht, um die Unterschiede hinsichtlich der Tumorgröße und -Erscheinung am Ende der Studie zu zeigen.

[0841] Eine Behandlung mit entweder 2C3 oder A4.6.1 führte zu einer langsamen Regression der Tumore über den Verlauf der Studie. Die mittleren Tumolvolumina am Ende der Studie betrugen 30% (2C3) und 35% (A4.6.1) des anfänglichen mittleren Tumolvolumens ([Fig. 4](#)). Jedoch werden diese Resultate durch die Tatsache verkompliziert, daß eine spontane Verlangsamung des Tumorwachstums bei den Kontrollgruppen der Mäuse zwischen dem Tag 40 und dem Tag 60 nach der Tumorzellinjektion beobachtet wurde. Die Resultate bis zu 40 Tagen, bevor die spontane Verlangsamung im Wachstum augenscheinlich wurde, zeigen, daß die Behandlung mit 2C3 und A4.6.1 das Tumorwachstum verhindert.

[0842] [Fig. 5A](#) zeigt eine weitere Studie, bei der Mäuse, die NCI H358 trugen, auf eine verlängerte Periode mit 100 µg mit entweder 2C3 oder 3E7 behandelt wurden. Bei dieser Studie waren die spontanen Regressionen weniger ausgeprägt. Das mittlere Tumolvolumen der 2C3-behandelten Mäuse am Start der Behandlung betrug 480 mm³, und nach näherungsweise 14 Behandlungswochen, fiel das mittlere Tumolvolumen auf 84

mm³, eine Abnahme von näherungsweise 80% im Volumen. Die 3E7-behandelten Mäuse begannen eine Behandlung mit einem mittleren Tumervolumen von 428 mm³ und stiegen auf ein Volumen von 1326 mm³ nach näherungsweise 14 Wochen an, einer Volumenzunahme von 300%.

[0843] [Fig. 5B](#) zeigt die Tumorwachstumskurven von Mäusen, die ein humanes Fibrosarcom, HT1080, trugen, die alle zwei Tage mit 100 µg von 2C3, 3E7 oder einem Kontroll-IgG oder Salzlösung behandelt wurden. 2C3 unterbrach das Wachstum der Tumore für so lange, bis die Behandlung fortgesetzt wurde. Die Mäuse, die mit 3E7, Kontroll-IgG oder Salzlösung behandelt wurden, trugen Tumore, die progressiv und auf eine Größe wuchsen, die es erforderlich machte, daß die Mäuse weniger als 4 Wochen nach der Tumorzellinjektion geopfert wurden.

BEISPIEL VIII

2C3 unterscheidet sich von A4.6.1

[0844] Es gibt eine Anzahl von Unterschieden zwischen 2C3 und A4.6.1 (z.B. Tabelle 5). Die Antikörper erkennen unterschiedliche Epitope auf VEGF, basierend auf ELISA-Kreuzblockierungsstudien (Beispiel I). Mutagenese- und Röntgenkristallographische Studien haben früher gezeigt, daß A4.6.1 an ein Epitop auf VEGF bindet, das um Aminosäuren 89–94 zentriert ist (Muller et al., 1998).

[0845] Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß A4.6.1 VEGF blockiert, an sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 zu binden (Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998; Keyt et al., 1996), während 2C3 nur VEGF blockiert, an VEGFR2 zu binden (Beispiel IV). Überzeugende veröffentlichte Hinweise, daß A4.6.1 die VEGF-Bindung an VEGFR2 und VEGFR1 inhibiert, kommt von detailliertem kristallographischen und strukturellen Studien (Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998; Keyt et al., 1996). Die publizierten Daten zeigen an, daß A4.6.1 die VEGF-Bindung an VEGFR2 inhibiert, indem er um das Epitop auf VEGF in Wettbewerb steht, das wesentlich für die Bindung an VEGFR2 ist, und daß er die Bindung von VEGF an VEGFR1 am wahrscheinlichsten durch sterische Hinderung blockiert (Muller et al., 1998; Keyt et al., 1996).

[0846] Eine humanisierte Version von A4.6.1 befindet sich gegenwärtig in klinischen Versuchen (Brem, 1998; Baca et al., 1997; Presta et al., 1997). Macrophagen/Monocyten-Chemotaxis und andere endogene Funktionen von VEGF, die durch VEGFR1 vermittelt werden, werden am wahrscheinlichsten bei den A4.6.1-Versuchen beeinträchtigt sein. Im Gegensatz dazu wird vorausgesehen, daß 2C3 aufgrund seiner Fähigkeit, spezifisch VEGFR2-vermittelte Effekte zu blockieren, überlegen ist. 2C3 ist daher potentiell ein sichererer Antikörper, insbesondere für eine langfristige Verabreichung an Menschen. Die Vorteile der Behandlung mit 2C3 schließen die Fähigkeit des Wirtes ein, eine größere Anti-Tumor-Antwort zu errichten, indem eine Macrophagenwanderung an den Tumoren zur selben Zeit ermöglicht wird, zu der er die VEGF-induzierte Tumorgefäßexpansion blockiert. Ebenso sollten die vielen systemischen Vorteile, die Macrophagenchemotaxis aufrechtzuhalten, und andere Effekte, die durch VEGFR1 vermittelt werden, nicht übersehen werden.

TABELLE 5.

CHARAKTERISTIKA DER ANTI-VEGF-ANTIKÖRPER 2C3 UND A4.6.1

Charakteristikum	2C3	A4.6.1
Isotyp	IgG2a, k	IgG1 ¹
Epitop auf VEGF	nicht-definiert, aber unterschiedlich von A4.6.1 ²	kontinuierlich, zentriert um Aminosäure 89-94
Affinität	1×10^{-9} (M) ³	8×10^{-10} (M)
Blockt VEGF, an VEGFR1 zu binden	Nein	Ja
Blockt VEGF, an VEGFR2 zu binden	Ja	Ja
Blockt VEGF-induzierte Permeabilität	Ja	Ja
Blockt VEGF-induzierte Proliferation	Ja	Ja
Direktes IHC-Muster auf gefrorenen Tumorschnitten	NR	schwache Reaktivität mit einigen BV ⁴
In-vivo-Tumor-Lokalisierungsmuster	Mäßige bis starke Reaktivität mit CT	Mäßige Reaktivität mit einer Minderheit von BV, schwache bis keine Reaktivität mit CT
Lokalisierung in-vivo in normalem Mausgewebe	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

(Literaturangaben für A4.6.1-Daten schließen Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998 und Keyt et al., 1996 ein.)(Das Epitop, das 2C3 auf VEGF erkennt, ist nicht-definiert, aber es ist gezeigt worden, daß es von dem Epitop unterschiedlich ist, das A4.6.1 erkennt, mittels ELISA-Kreuzblockierungstudien.)(Die Affinität von 2C3 für VEGF ist mittels ELISA und Oberflächenplasmonresonanzanalyse geschätzt worden.)(A4.6.1 reagiert nur mit leicht fixierten, Aceton-fixierten gefrorenen Schnitten.) verwendete Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; NR, keine Reaktivität; BV, Blutgefäße; CT, Bindegewebe.

BEISPIEL IX

VEGF-Färbung in arthritischem Gewebe

[0847] Die Beziehung zwischen Angiogenese und Krankheit erstreckt sich über das hinaus, was in vaskularisierten Tumoren beobachtet wird. Zum Beispiel ist die Beteiligung von abweichender Angiogenese bei Arthritis gut dokumentiert. Eine Gruppe von unterschiedlichen Anti-VEGF-Antikörpern und Antikörpern gegen Thymidinphosphorylase sind verwendet worden, um arthritisches Gewebe zu färben und dies von passenden Kontrollen zu differenzieren. Studien unter Verwendung von Antikörpern gegen VEGF haben eine auffallende Expression in dem Pannus von rheumatoider Arthritis gezeigt.

BEISPIEL X

2C3-Endostatin-Konjugate

A. Klonierung und Expression von Endostatin

[0848] RNA wurde isoliert aus Mäuseleber und als die Matrize für RT-PCRTM mit den folgenden Primern verwendet:

5'-Primer aga cca tgg gtc ata ctc atc agg act ttc a (SEQ ID NO:43),

3'-Primer ctac cat ggc tat ttg gag aaa gag gtc a (SEQ ID NO:44).

[0849] Das resultierende cDNA-Fragment hat die DNA-Sequenz von SEQ ID NO:12 und die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:13. Zum Bezug, die humane Endostatin-Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO:14. Das Maus-cDNA-Fragment wurde in den Expressionsvektor H6pQE60 (Qiagen) kloniert, der für einen N-terminalen 6 × Histidin-Tag kodiert, und dann in *E. coli* M15-Zellen exprimiert. Wenn die *E. coli*-Zelldichte eine optische Dichte von 0,6 bei 560 nm erreichte, wurden 0,1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) für vier Stunden zugegeben, um die Expression von 6-His-Endostatin zu induzieren. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und in Lysepuffer lysiert (B-PER bakterielles Proteinextraktionsreagenz (Pierce, Rockford, IL)).

[0850] Die Inclusion-Bodies, die das 6-His-Endostatin enthielten, wurden mittels Zentrifugation sedimentiert und in Puffer A aufgelöst (pH 8,0, 6 M Guanidin-HCl (GuHCl), 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM Imidazol, 10 mM β-2-Mercaptoethanol). Die Lösung, enthaltend das reduzierte 6-His-Endostatin, wurde mit einem Überschuss an 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (Ellman's Reagenz) (20 mM) behandelt und auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Die Säule wurde mit Waschpuffer gewaschen (6 M GuHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,3), und 6-His-Endostatin wurde aus der Säule mit 0,2 M Imidazol in Waschpuffer eluiert.

[0851] Das eluierte und unlösliche 6-His-Endostatin wurde mit einem gleichen Volumen an Rückfaltungspuffer verdünnt (3 M Harnstoff, 1 M Tris, pH 7,3, 0,5 M L-Arginin, 0,5 M NaCl, 0,1 M Na₂HPO₄, 1 mM reduziertes Glutathion (GSH)) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Rückgefaltetes 6-His-Endostatin wurde umfassend gegen PBS, pH 7,4 bei Raumtemperatur dialysiert. Das resultierende Protein, 6-His-Endostatin war löslich und in hohem Maße rein, basierend auf SDS-PAGE-Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen, bei denen es als eine einzelne 20 kDa-Bande lief.

B. Funktionelle Aktivität von Endostatin

[0852] Zusätzlich zu der Tatsache, daß das exprimierte Protein voll löslich ist, schließen andere Hinweise darauf, daß das *E. coli*-exprimierte 6-His-Endostatin biologisch aktiv ist, die demonstrierte Bindung an Endothelzellen ein. Biotinyliertes 6-His-Endostatin wurde hergestellt und mit drei unterschiedlichen Endothelzelltypen *in vitro* inkubiert (Bend3-Maus-Endothelzellen; ABAE, Endothelzellen aus Rinderarteria; und HUVEC, menschliche Nabelschnurendothelzellen). Die Bindung wurde unter Verwendung von Streptavidin-Peroxidase in Zusammenhang mit O-Phenylendiamin (OPD) nachgewiesen, und die Extinktion bei 490 nm abgelesen.

[0853] Die direkten Bindungsstudien zeigten, daß (biotinyliertes 6-His)-Endostatin in einer sättigbaren Weise eine Bindung an diese drei unterschiedlichen Typen von Endothelzellen *in vitro* einging. Ebenso wurde gezeigt, daß exprimiertes Endostatin (ohne Markierung) mit biotinyliertem Endostatin um die Bindung an Bend3-Endothelzellen in Wettbewerb steht.

C. Konjugation von Endostatin an 2C3 über SMPT und 2-IT

[0854] 4-Succinimidylloxycarbonyl-α-methyl- α-(2-pyridyldithio)-Toluol (SMPT) in N,N-dimethylformamid (DMF) wurde zu 2C3-IgG in einem molaren Verhältnis von 5:1 (SMPT:2C3) zugegeben und bei Raumtemperatur (RT) für 1 h in PBS mit 5 mM EDTA (PBSE) inkubiert. Freies SMPT wurde mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE laufen gelassen wurde. Zeitgleich wurde Maus-6-His-Endostatin mit 2-Iminoethanol (2-IT, Traut's Reagenz) in einem molaren Verhältnis von 1:5 (Endostatin:2-IT) für eine Stunde bei RT inkubiert. Freies 2-IT wurde mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE laufen gelassen wurde.

[0855] SMPT-modifizierter 2C3 wurde mit 2-IT-modifiziertem 6-His-Endostatin gemischt, auf 3–5 ml konzentriert und für 24 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Nicht-konjugiertes 2C3-SMPT wurde aus dem Konjugat mittels Heparin-Affinitätschromatographie entfernt, was somit 2C3-Endostatin lieferte.

D. Konjugation von Endostatin an 2C3 über SMCC und SATA

[0856] N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA) wurde mit 6-His-Endostatin in einem molaren Verhältnis von 6:1 (SATA:Endostatin) für 30 Min. bei RT inkubiert. Freies SATA wurde mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE laufengelassen wurde. SATA-modifiziertes 6-His-Endostatin in PBSE wurde auf 4,0 ml konzentriert, und eine 0,4 ml-Deacetylierungslösung (0,1 M Hydroxylamin) wurde zugegeben. Die Mi-

schung wurde bei RT für 2 h inkubiert. Zeitgleich wurde 2C3-IgG in PBSE mit Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) in einem molaren Verhältnis von 1:5 (2C3:SMCC) inkubiert. Freies SMCC wurde mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE lafengelassen wurde.

[0857] Deacetyliertes SATA-modifizierte Endostatin wurde dann mit SMCC-modifiziertem 2C3 inkubiert, auf näherungsweise 5 mg/ml Gesamtprotein unter Stickstoff aufkonzentriert und über Nacht bei RT unter leichtem Rühren inkubiert. Die Reaktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Nicht-konjugiertes 2C3-MCC wurde aus dem 2C3-Endostatin-Konjugat mittels Heparinaffinitätschromatographie in PBSE entfernt, was somit 2C3-Endostatin lieferte. Eine erfolgreiche Konjugation wurde ebenso unter Verwendung von 2-Iminoethanol statt SATA als das Thiolierungsmittel erzielt.

E. Fusionsproteine von 2C3 und Endostatin

[0858] Da die DNA-Sequenzen für Maus- und humanes Endostatin und für 2C3 zur Verfügung stehen (und hiermit bereitgestellt werden), können 2C3-Endostatin-Fusionsproteine in leichter Weise hergestellt werden. Die Expression und das Rückfaltung von Endostatin, wie oben beschrieben, zeigt, daß eine erfolgreiche rekombinante Expression dieses Moleküls in der Tat möglich ist.

[0859] Die Herstellung eines 2C3-Endostatin-Fusionsproteins kann in einer Form sein, bei der Endostatin am C-Terminus einer schweren Kette von 2C3 vorhanden ist oder an ein 2C3-ScFv-Fragment geknüpft ist. Bei diesen Fällen ermöglicht es rekombinante Technologie in leichter Weise, die Verknüpfung zu variieren, und die Verwendung von selektiv spaltbaren Sequenzen, um die beiden funktionellen Proteine zu verbinden, wird insbesondere in Erwägung gezogen. Plasmin-spaltbare oder MMP-spaltbare Sequenzen werden gegenwärtig bevorzugt.

[0860] Die Verfügbarkeit von selektiv spaltbaren Sequenzen und die Anpassungsfähigkeit von rekombinanter Technologie stellt ebenso 2C3-Endostatin-Fusionsproteine bereit, bei denen das Endostatin an einem anderen Punkt des 2C3-Konstrukts substituiert ist. Das Endostatin wird in 2C3 eingebettet bleiben bis zum Kontakt mit einem Enzym, das auf die selektiv spaltbare Sequenz einwirkt, bis funktionelles Endostatin aus dem Fusionsprotein freigesetzt wird.

BEISPIEL XI

2C3-Ang-2-Konjugate

A. Expression von Ang-2

[0861] Um ein 2C3-Ang-2-Konjugat zu konstruieren, wird Ang-2 bevorzugt in rekombinanter Form verwendet, wie es in Insektenzellen unter Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems hergestellt werden kann. Das gegenwärtig bevorzugte Protokoll für die Ang-2-Expression und -Aufreinigung beinhaltet das Klonieren von Ang-2-cDNA aus Maus-Placenta-RNA mittels RT-PCR™ und die Klonierung der Ang-2-cDNA in einen pFastBac1-Expressionsvektor. Kompetente DH10Bac-E.coli-Zellen werden mit dem rekombinanten Plasmid transformiert.

[0862] Nach einer Antibiotikumsselektion werden E.coli-Kolonien, enthaltend rekombinantes Bacmid gepickt, wachselengelassen und rekombinante Bacmid-DNA aufgereinigt. Insektenzellen SF9 werden mit der rekombinanten Bacmid-DNA unter Verwendung des Cellfectin-Reagenz transfiziert. Rekombinanter Baculovirus wird aus dem Überstand der transfizierten SF9-Zellen geerntet. Rekombinanter Baculovirus wird amplifiziert und verwendet, um SF9-Zellen zu infizieren, und die infizierten SF9-Zellen werden Ang-2 exprimieren. Ang-2 wird aus dem Überstand von solchen infizierten SF9-Zellen mittels Affinitätsaufreinigung aufgereinigt.

B. Konjugation von Ang-2 an 2C3

[0863] Aufgereinigter 2C3 wird an rekombinantes Ang-2 unter Verwendung des chemischen Linkers SMPT konjugiert, im allgemeinen wie oben beschrieben. SMPT in N,N-Dimethylformamid (DMF) wird zu 2C3-IgG in einem molaren Verhältnis von 5:1 (SMPT:2C3) zugegeben und bei Zimmertemperatur (RT) für 1 h in PBS mit 5 mM EDTA (PBSE) inkubiert. Freies SMPT wird mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE lafengelassen wurde. Zeitgleich wird rekombinantes Ang-2 mit 2-IT bei RT inkubiert. Freies 2-IT wird mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE lafengelassen wurde.

[0864] SMPT-modifizierter 2C3 wird mit 2-IT-modifiziertem rekombinantem Ang-2 vermischt, konzentriert und für 24 h bei RT unter leichtem Rühren inkubiert. Die Reaktion wird mittels SDS-PAGE analysiert. Nicht-konjugiertes 2C3-SMPT wird aus dem Konjugat mittels Gelfiltrationschromatographie entfernt, was somit 2C3-Endostatin lieferte.

BEISPIEL XII

2C3-Gewebefaktor-Konjugate

[0865] 2C3 wurde mit SMPT modifiziert, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben. Freies SMPT wurde mittels G25-Chromatographie entfernt, wie oben ausgeführt, außer, daß der Peak (2C3-SMPT) unter Stickstoff gesammelt wurde. 600 µl 2C3-SMPT wurde entfernt, um Thiopyridyl-Gruppen nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT) auf 50 mM zu quantifizieren. Durchschnittlich 3 MPT-Gruppen wurden pro IgG eingeführt. Humaner trunkierter Gewebefaktor (tTF) mit einem Cysteinrest, eingeführt am N-Terminus, wurde mit 5 mM β-2-ME reduziert. β-2-ME wurde mittels G25-Chromatographie entfernt.

[0866] Reduzierter N-Cys-tTF wurde mit dem 2C3-SMPT vereinigt und bei einem molaren Verhältnis von 2,5:1 (tTF:IgG) für 24 Stunden bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde auf 1–2 ml unter Verwendung eines Amicon mit einer Molekulargewichts-cut-off-Membran (MWCO) von 50.000 aufkonzentriert. Nicht-konjugierter tTF und IgG wurden von den Konjugaten unter Verwendung einer Superdex-200-Größenausschlußchromatographie getrennt, was somit 2C3-tTF lieferte.

BEISPIEL XIII

2C3-CRM107-Konjugate

[0867] 2C3 wurde mit SMPT modifiziert. Das cytotoxische Mittel, CRM107 (von Dr. Jerry Fulton; Inland Laboratories, DeSoto, TX), wurde mit 2-IT modifiziert, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben. SMPT-modifizierter 2C3 wurde mit 2-IT modifiziertem CRM107 in einem molaren Verhältnis von 1:5 (IgG:CRM107) für 24 h bei RT unter leichtem Rühren inkubiert. Konjugierter 2C3 wurde von den freien Reaktanten mittels Superdex-200-Größenausschlußchromatographie abgetrennt, was somit 2C3-CRM107 lieferte.

BEISPIEL XIV

2C3-ProDrug-Studien

A. Klonierung und Expression von β-Glucoronidase (GUS)

[0868] Ein Plasmid (pBacgus-1), enthaltend das E. coli-GUS-Gen, wurde von Novagen, Inc. erhalten. Das Plasmid wurde als eine Matrize für PCR verwendet, um das GUS-Gen in den H6pQE60-Expressionsvektor zu klonieren, der für einen N-terminalen 6 × Histidin-Tag kodiert. E. coli-M15-Zellen, die das Plasmid trugen, wurden wachengelassen, bis die Zelldichte eine optische Dichte von 0,6 bei 560 nm erreichte. 0,1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) wurde zugegeben, um eine Expression von 6-his-GUS zu induzieren. Nach vier Stunden wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet.

[0869] Das E. coli-Pellet wurde in Zellyse-Puffer lysiert (B-PER bakterielles Protein-Extraktionsreagenz (Pierce, Rockford, IL)). Die Lösung wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen, die Säule mit Waschpuffer gewaschen (6 M GuHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,3), und das gebundene 6-His-GUS wurde mit 0,2 M Imidazol im selben Puffer eluiert.

[0870] Das 6-His-GUS war rein, basierend auf SDS-PAGE, wo es als eine einzelne Bande von 75 kDa lief. Auf Gelfiltrationssäule läuft das 6-His-GUS als ein Tetramer von ungefähr 300 kDa. Das 6-His-GUS war enzymatisch aktiv, beurteilt anhand seiner Fähigkeit, das Substrat p-Nitrophenyl-β-D-glucuronid (PNPG) zu spalten.

B. Konjugation von 2C3 an β-Glucoronidase (GUS)

[0871] N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA) wurde mit GUS in einem molaren Verhältnis von 6:1 (SATA:GUS) für 30 Min. bei RT inkubiert. Freies SATA wurde mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE laufengelassen wurde. SATA-modifizierte GUS in PBSE wurde auf 4,0 ml aufkonzentriert, und 0,4 ml Deacetylierungslösung (0,1 M Hydroxylamin) wurde zugegeben. Die Mischung wurde bei RT für 2

h inkubiert. Zeitgleich wurde 2C3-IgG in PBSE mit Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) in einem molaren Verhältnis von 1:5 (2C3:SMCC) inkubiert. Freies SMCC wurde mittels G25-Größenausschlußchromatographie entfernt, die in PBSE laufengelassen wurde.

[0872] Deacetylierte SATA-modifizierte GUS wurde dann mit SMCC-modifiziertem 2C3 über Nacht bei RT unter leichtem Rühren inkubiert. Freie GUS wurde mittels Ionenaustauschchromatographie auf Q-Sepharose entfernt, wobei der freie 2C3 und das 2C3-GUS-Konjugat mit 0,5 M NaCl in PBS eluiert wurde. Die resultierende Lösung wurde mittels Superdex 200-Größenausschlußchromatographie getrennt, was 2C3-GUS mit einer Reinheit von 90% ergab.

C. Biologische Aktivität von 2C3-GUS-Konjugat

[0873] Die biologische Aktivität jeden Bestandteils des 2C3-GUS-Konjugats wurde bestätigt. 2C3-GUS ging spezifisch eine Bindung mit VEGF-beschichteten Näpfen in einem angemessenen kontrollierten ELISA ein, nachgewiesen mittels sekundärem HRP-markiertem Anti-Maus-IgG und OPD. Eine halbmaximale Bindung wurde bei 0,1 nM beobachtet. Daher funktioniert der 2C3-bindende Teil korrekt. Der GUS-Teil behielt ebenso enzymatische Aktivität bei.

[0874] 2C3-GUS wurde mit ^{125}I auf eine spezifische Aktivität von 5×10^6 cpm/ μg radioaktiv iodiert. Nach intravenöser Injektion in Mäuse verschwand die radioiodierte 2C3-GUS aus dem Blut mit einer $t_{1/2}$ α von ungefähr 6 Stunden und einer $t_{1/2}$ β von ungefähr 25 Stunden.

D. GUS-spaltbare Prodrugs

[0875] β -Glucuronid-Prodrugs, wie etwa Doxorubicin- β -glucuronid und Calcimycin- β -glucuronid wurden im wesentlichen hergestellt, wie in US Patent 5,561,119 beschrieben, das spezifisch hierin durch Bezugnahme eingebaut wird. Solche Prodrugs sind darauf angelegt, den cytotoxischen Bestandteil, wie etwa Doxorubicin oder Calcimycin, nur bei Abbau durch ein Glycosid-Enzym freizusetzen, wie etwa GUS. Durch Anhängen von GUS an 2C3 wird GUS spezifisch auf die Tumorgefäße und das Stroma gezielt, was somit für eine spezifische Spaltung der Prodrugs und eine Freisetzung des cytotoxischen Bestandteils spezifisch in der Tumorstelle sorgt.

E. Biologische Aktivität von 2C3-GUS-Konjugat

[0876] 2C3-GUS begab sich spezifisch an Tumorgefäße und das umgebende Tumorstroma nach i.v. Injektion in SCID-Mäuse, die humane NCI-H358 NSCLC-Tumore an der subkutanen Stelle trugen. Die Anwesenheit von 2C3-GUS wurde immunhistochemisch an gefrorenen Schnitten von Tumoren mit HRP-markiertem Anti-Maus-IgG oder mit HRP-markiertem Anti-GUS nachgewiesen. Eine maximale Lokalisierung wurde 24–48 Stunden nach der Injektion von 2C3-GUS beobachtet. Normale Gewebe waren nicht gefärbt. Eine spezifische Lokalisierung von 2C3-GUS an die Tumorgefäße und das umgebende Tumorstroma ermöglicht, daß eine systemisch verabreichte Prodrug, wie etwa Doxorubicin-Glucuronid oder Calcimycin-Glucuronid, nur innerhalb des Tumors aktiviert wird.

[0877] Eine Hybridom-Zelllinie, wie hierin beschrieben, ist gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, hinterlegt worden, und ihm ist die Hinterlegungsnummer ATCC Nr. PTA 1595 zugeordnet worden. Die hierin beschriebene und beanspruchte Erfindung ist im Umfang nicht durch die hinterlegte PTA-1595-Zelllinie beschränkt, da die hinterlegte Ausführungsform eine Erläuterung eines Aspekts der Erfindung ist und alle äquivalenten Hybridom-Zelllinien, die funktionell äquivalente monoklonale Antikörper erzeugen, innerhalb des Umfangs dieser Erfindung liegen. In der Tat können alle hierin offenbaren und beanspruchten Zusammensetzungen und Verfahren im Lichte der vorliegenden Offenbarung ohne übermäßigen experimentellen Aufwand gemacht und ausgeführt werden.

LITERATURANGABEN

[0878] Die folgenden Literaturangaben stellen beispielhafte prozedurale and andere Einzelheiten bereit, die die hierin dargestellten Details ergänzen.

Abrams and Oldham, In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer, Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.

Aiello, Pierce, Foley, Takagi, Chen, Riddle, Ferrara, King, Smith, "Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins,"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:10457-10461, 1995.

Akuzawa, Kurabayashi, Ohya, Arai, Nagai, "Zinc finger transcription factor Egr-1 activates Flt-1 gene expression in THP-1 cells on induction for macrophage differentiation", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(2):377-84, 2000.

Alon, Hemo, Itin, Pe'er, Stone, Keshet, "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity," *Nature Med*, 1:1024-1028, 1995.

Antibodies: A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Anthony, Wheeler, Elcock, Pickett, Thomas, "Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts", *Placenta*, 15:557-61, 1994.

Asahara et al., "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science*, 275(5302):964-967, 1997.

Asahara, Chen, Takahashi, Fujikawa, Kearney, Magner, Yancopoulos, Isner, "Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization" *Circ. Res.*, 83(3):233-40, 1998.

Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.

Asano, Yukita, Matsumoto, Hanatani, Suzuki, "An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor-activity in vivo," *Hybridoma*, 17:185-90, 1998.

Baca et al., "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.

Barbas, Kang; Lerner and Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 88(18):7978-7982, 1991.

Baxter and Jain, Transport of fluid and macromolecules in tumors," *Micro. Res.*, 41:5-23, 1991.

Benjamin, Golijanin, Itin, Podes and Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *J. Clin. Invest.*, 103(2):159-165, 1999.

Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, et al., "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988.

Borgstrom, Hillan, Sriramam, Ferrara, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-4039, 1996.

Borgstrom, Bourdon, Hillan, Sriramam, Ferrara, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.

Borgstrom, Gold, Hillan, Ferrara, "Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin," *Anticancer Research*, 19(5B):4203-11, 1999.

Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," *FASEB J*, 6(14):3290-3299, 1992.

Borrebäck and Møller, "In vitro immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens," *J. Immunol.*, 136(10):3710-3715, 1986.

Brekken, Huang, King, Thorpe, "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium," *Cancer Res.*, 58(9):1952-1959, 1998.

Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2:9-20, 1998.

Bukovsky, Presl, Zidovsky, Mancal, "The localization of Thy-1.1, MRC OX 2 and Ia antigens in the rat ovary and fallopian tube," *Immunology*, 48(3):587-596, 1983.

Burke et al., "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors," *Science*, 236, 806-812, 1987.

Burke, Lehmann-Bruinsma, Powell, "Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 207:348-354, 1995.

Burrows and Thorpe, "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors," *Pharmacol. Ther.*, 64:155-174, 1994a.

Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1994b.

Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.

Burrows, Derbyshire, Tazzari, Amlot, Gazdar, King, Letarte, Vitetta, Thorpe, "Endoglin is an endothelial cell proliferation marker that is upregulated in tumor vasculature," *Clin. Cancer Res.*, 1:1623-1634, 1995.

Buttke, McCabrey, Owen, J. Immunol. Methods, 157:233-240, 1993.

- Campbell, In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden and Von Krippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.
- Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoek, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," *Nature*, 380(6573):435-439, 1996.
- Champe et al., *J. Biol. Chem.*, 270:1388-1394, 1995.
- Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenne, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.
- Claffey, Brown, del Aguila, Tognazzi, Yeo, Manseau, Dvorak, "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis," *Cancer Res.*, 56:172-181, 1996.
- Clapp et al., "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.
- Clauss et al., "The vascular endothelial cell growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities," *J. Biol. Chem.*, 271(30):17629-17634, 1996.
- Connolly, Heuvelman, Nelson, Olander, Eppley, Delfino, Siegel, Leimgruber, Feder, "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 84:1470-1478, 1989.
- Coughlin et al., "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.
- Couper, Bryant, qEldrup-Jorgensen, Bredenberg, Lindner, "Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2 in vascular smooth muscle cells in vivo via expression of fms-like tyrosine kinase-1," *Circ. Res.*, 81(6):932-939, 1997.
- Crowther, In: ELISA Theory and Practice, Totowa: Humana Press, 1995.
- D'Amato et al., "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.
- D'Angelo et al., "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.
- Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- Davis-Smyth, Chen, Park, Presta, Ferrara, "The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade," *EMBO. J.*, 15(18):4919-4927, 1996.
- Detmar, Brown, Claffey, Yeo, Kocher, Jackman, Berse, Dvorak, "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis," *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.
- DeVore et al., "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Clin Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.
- deVries, Escobedo, Ueno, Houck, Ferrara, Williams, "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor," *Science*, 255(5047):989-991, 1992.
- Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells*, 3:77-85, 1991a.
- Dvorak, Sioussat, Brown, Berse, Nagy, Sotrel, Manseau, Vandewater, Senger, "Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors – concentration in tumor blood vessels," *J. Exp. Med.*, 174:1275-1278, 1991b.
- Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137, 1995.
- Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.
- Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991.
- Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea, Powell-Braxton, Hillan, Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene," *Nature*, 380(6573):439-442, 1996.
- Fidler and Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [comment]," *Cell*, 79(2):185-188, 1994.
- Fidler, Kumar, Bielenberg, Ellis, "Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis," *Cancer J. Sci. Am.*, 4 Suppl 1:558-66, 1998.
- Folkman and Shing, "Angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934, 1992.
- Folkman et al., "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983.

- Fong, Rossant, Gertsenstein, Breitman, "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium," *Nature*, 376:66-70, 1995.
- Forsythe, Jiang, Iyer, Agani, Leung, Koos, Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Mol. Cell. Biol.*, 16:4604-4613, 1996.
- Fotsis et al., "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994.
- Frank, Hubner, Breier, Longaker, Greenhalgh, Werner; "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," *J. Biol. Chem.*, 270:12607-12613, 1995.
- Frater-Schroder et al., "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987.
- Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3(5):792-799, 1991.
- Fujii et al., "Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356(4):475-480, 1997.
- Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533-535, 1993.
- Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.
- Gagliardi et al., "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41(2):117-124, 1998.
- Gefter et al., "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gerber, Condorelli, Park, Ferrara, "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes," *J. Biol. Chem.*, 272:23659-23667, 1997.
- Gerber, Yu, Ryan, Kowalski, Werb, Ferrara, "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation"; *Nature Medicine*, 5(6):623-8, 1999.
- Glennie, et al., "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments," *J. Immunol.*, 139:2367-2375, 1987.
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd Edition; Academic Press, Orlando, FL, pp. 60-61, 65-66, 71-74; 1986.
- Good et al., "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.
- Grant et al., "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8):1335-1340, 1998.
- Guo, Jia, Song, Warren, Donner, "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains," *J. Biol. Chem.*, 270:6729-6733, 1995.
- Hanahan and Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, 86(3):353-364, 1996.
- Harada, Mitsuyama, Yoshida, Sakisaka, Taniguchi, Kawaguchi, Ariyoshi, Saiki, Sakamoto, Nagata, Sata, Matsuo, Tanikawa, "Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis", *Scandinavian J. Rheumatol.*, 27(5):377-80, 1998.
- Haran et al., "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994.
- Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992.
- Hellerqvist et al., "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Clin Oncol.*, 120(1-2):63-70, 1993.
- Hiratsuka; Minowa, Kuno, Noda, Shibuya, "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(16):9349-9354, 1998.
- Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.
- Holash et al., "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- Hong, Nagy, Scnger, Dvorak, Dvorak, "Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium," *J. Histochem. Cytochem.*, 43:381-389, 1995.
- Hood and Granger, "Protein kinase G mediates vascular endothelial growth, factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(36):23504-23508, 1998.
- Hood, Meininger, Zicke, Granger, "VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells," *Am. J. Physiol.*, 274(3 Pt 2):H1054-1058, 1998.
- Hori et al., "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.

- Houck, Ferrara, Winer, Cachianes, Li, Leung, "The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA," *Molec. Endo.*, 5(12):1806-1814, 1991.
- Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.
- Huang, Gottstein, Brekken, Thorpe, "Expression, of soluble VEGF receptor 2 and characterization of its binding by surface plasmon resonance," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3):643-648, 1998.
- Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic and Lerner, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.
- Ingber et al., "Angiostatin: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.
- Inoue, Itoh, Ueda, Naruko, Kojima, Komatsu, Doi, Ogawa, Tamura, Takaya, Igaki, Yamashita, Chun, Masatsugu, Becker, Nakao, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis," *Circulation*, 98(20):2108-16, 1998.
- Iwamoto et al., "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells IIT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.
- Jackson et al., "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.
- Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146; 1996.
- Joukov, Kumar, Sorsa, Arighi, Weich, Saksela, Alitalo, "A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities," *J. Biol. Chem.*, 273(12):6599-6602, 1998.
- Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 in particular.
- Kang, Barbas, Janda, Benkovic and Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.
- Keck, Hauser, Krivi, Sanzo, Warren, Feder, Connolly, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF," *Science*, 246:1309-1312, 1989.
- Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.
- Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res*, 64(6):971-978, 1997.
- Kerbel, Vitoria-Petit, Okada, Rak, "Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis," *Mol. Med*, 4(5):286-295, 1998.
- Keyt et al., "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR, and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46, 1996.
- Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.
- Kim, Li, Winer, Armanini, Gillett, Phillips, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo," *Nature*, 362:841-844, 1993.
- Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3," *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999.
- Kleinman et al., "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.
- Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Konieczny, Bobrzecka, Laidler and Rybarska, "The combination of IgM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides," *Haematologia*, 14(1):95-99, 1981.
- Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:1234-1241, 1993.
- Korpelainen and Alitalo, "Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10(2):159-164, 1998.
- Kremer, Breier, Risau, Plate, "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system," *Cancer Res*, 57:3852-3859, 1997.
- Kroll and Waltenberger, "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 272:32521-7, 1997.

- Kroll and Waltenberger, "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)," *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 252(3):743-746, 1998.
- Kupprion, Motamed, Sage, "SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(45):29635-29640, 1998.
- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Landgren, Schiller, Cao, Claesson-Welsh, "Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells. expressing Flt 1," *Oncogene*, 16(3):359-367, 1998.
- Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro. Changes in fibronectin; thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23):16736-16745, 1992.
- Lee et al., "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor I expression," *Endocrinology*, 139(9):3696-3703, 1998.
- Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998.
- Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonnier, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(15):8829-34, 1998.
- Lin, Nguyen, Mendoza, Escandon, Fei, Meng, Modi; "Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor", *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 288(1):371-8, 1999.
- Lindner and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumorinduced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):470-483, 1996.
- Lin-Ke, Hong-Qu, Nagy; Eckelhoefer, Masse, Dvorak, Dvorak, "Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor," *Eur. J. Cancer*, 32A(14):2467-2473, 1996.
- Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.
- Luo, Yamaguchi, Shinkai, Shitara, Shibuya, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer. Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.
- Majewski et al., "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.
- Malecaze, Clamens, Simorre-Pinatel, Mathis, Chollet, Favard, Bayard, Plouet, "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy," *Arch. Ophthalmol.*, 112:1476-1482, 1994.
- Mandriota and Pepper, "Regulation of angiopoietin -2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia", *Circ. Res.*, 83(8):852-9, 1998.
- Manetti et al., "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med Chem.*, 6(7):947-958, 1998.
- Massey et al, *Nature*, 328:457-458, 1987.
- Mazure, Chen, Yeh, Laderoute, Giaccia, "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression," *Cancer Res.*, 56:3436-3440, 1996.
- McNamara, Harmey, Walsh, Redmond, Bouchier-Hayes, "Significance of angiogenesis in cancer therapy [published erratum appears in Br J Surg., Oct;85(10):1449, 1998," *Br. J. Surg.*, 85(8):1044-1055. 1998.
- Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256, 1998.
- Meyer, Clauss, Lepple-Wienhues, Waltenberger, Augustin, Ziche, Lanz, Banner, Rziha, Dehio, "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases, *EMBO J.*, 18:363-74, 1999.
- Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996.
- Mills, Brooker and Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.
- Moore et al., "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.
- Mordenti, Thomsen, Licko, Chen, Meng, Ferrara, "Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF

- monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans", *Toxicologic Pathology*, 27(1):14-21, 1999.
- Morrison, Johnson, Herzenberg and Oi, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigenbinding domains with human constant region domains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(21):6851-6855, 1984.
- Monison, Wims, Kobrin and Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175, 1986.
- Morrow, Unuvar, King, Mieczko, "Techniques for the production of monoclonal and polyclonal antibodies," in: *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications*, M.A. Hayat (ed.), Orlando: Academic Press, pp. 31-57, 1990.
- Muller, Li, Christinger, Wells, Cunningham, De Vos, "Vascular Endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7192-7197, 1997.
- Muller, Chen, Christinger, Li, Cunningham, Lowman, de Vos, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998.
- Murohara, Horowitz, Silver, Tsurumi, Chen, Sullivan, Isner, "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin," *Circulation*, 97(1):99-107, 1998.
- Mustonen and Alitalo, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis," *J. Cell Biol.*, 129:895-898, 1995.
- Nagashima, Yoshino, Aono, Takai, Sasano, "Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells", *Clin. Exp. Immunol.*, 116(2):360-5, 1999.
- Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis in vivo by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.
- Nakamura et al., *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27.
- Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FA-SEB J.*, 13(1):9-22, 1999.
- Niida, Kaku, Amano, Yoshida, Kataoka, Nishikawa, Tanne, Maeda, Nishikawa, Kodama, "Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption", *J. Exp. Med.*, 190(2):293-8, 1999.
- Ogawa, Oku, Sawano, Yamaguchi, Yazaki, Shibuya, "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Fik-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain," *J. Biol. Chem.*, 273(47):31273-31282, 1998.
- Oikawa et al., "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2):157-162, 1989.
- Olander, Connolly, DeLarco, "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 175:68-76, 1991.
- O'Reilly et al., "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994.
- O'Reilly et al., "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.
- Papapetropoulos, Garcia-Cardena, Dengler, Maisonpiene, Yancopoulos, Sessa, "Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors", *Lab. Invest.*, 79(2):213-23, 1999.
- Parenti et al., "Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in postcapillary endothelium," *J. Biol. Chem.*, 273(7):4220-4226, 1998.
- Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.
- Pepper et al., "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis in vitro," *J. Cell Sci.*, 108(Pt 1):73-83, 1995.
- Plate, Breier, Weich, Mennel, Risau, "Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms," *Int. J. Cancer*, 59:520-529, 1994.
- Potgens, Westphal, DeWaal, Ruiter, "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis," In: *Growth Factors in Tumor Angiogenesis*, Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp. 57-70, 1995.
- Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997.
- Quinn et al., CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.
- RayChaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*,

47(3):224-229, 1991.

Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science* 245, 175-177, 1989.

Riechmann, Clark, Waldmann and Winter, "Reshaping human antibodies for therapy," *Nature*, 332(6162):323-327, 1988.

Rouan, Otterness, Cunningham, Holden, Rhodes, "Reversal of colchicine-induced mitotic arrest in Chinese hamster cells with a colchicine-specific monoclonal antibody," *Am. J. Pathol.*, 137(4):779-787, 1990.

Ryan, Eppler, Hagler, Bruner, Thomford, Hall, Shopp, O'Neill, "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody", *Toxicologic Pathology*, 27(1):78-86, 1999.

Sakamoto et al., "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.

Saleh, Starker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res*, 56:393-401, 1996.

Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998.

Sawano, Takahashi, Yamaguchi, Aonuma, Shibuya, "Flt-1 but not ICDF/Flk-1 tyrosine kinase, is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor," *Cell Growth Differ*, 7(2):213-221, 1996.

Senger, Galli, Dvorak, Perruzzi, Harvey, Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," *Science*; 219:983-985, 1983.

Senger, Perruzzi, Feder, Dvorak, "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines," *Cancer Res.*, 46:5629-5632, 1986.

Senger, Connolly, Vandewater, Feder, Dvorak, "Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor" *Cancer Res.*, 50:1774-1778, 1990.

Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice," *Nature*, 376:62-66, 1995.

Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.

Sheu et al., "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha(v)\beta_3$ integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997.

Shyu, Manor, Magner, Yancopoulos, Isner, "Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb", *Circulation*, 98(19):2081-7, 1998.

Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, et al., "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989.

Siemeistec, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.

Sipos et al., "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.

Skobe, Rockwell, Goldstein, Vosseler, Fusenig, "Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion", *Nat. Med.*, 3:1222-7, 1997.

Soff et al., "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.

Soker, Takashima, Miao, Neufeld; Klagsbrun., "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor," *Cell*, 92(6):735-745, 1998.

Springer, Chen, Kraft, Bednarski, Blau, "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults," *Mol. Cell*, 2(5):549-558, 1998.

Stella et al., "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Stratmann, Risau, Plate, "Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis", *Am. J. Pathol.*, 153(5):1333-9; 1998.

Tada et al., "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.

Takahashi, Shirasawa, Miyake, Yahagi, Maruyama, Kasahara, Kawamura, Matsumura, Mitarai, Sakai, "Protein

- tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 209:218-226, 1995.
- Takano et al., "Suramin, an anticancer and angiostatic agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.*, 54(10):2654-2660, 1994.
- Tanaka, Mori, Sakamoto, Makuuchi, Sugimachi, Wands, "Biologic significance of angiopoietin -2 expression in human hepatocellular carcinoma," *J. Clin. Invest.*, 103(3):341-5, 1999.
- Tanaka et al., "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.
- Terman, Dougher-Vermazen, Carrion, Dimitrov, Armellino, Gospodarowicz, Bohlen, "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187:1579-1586, 1992.
- Terman, Khandke, Dougher-Vermazan, Maglione, Lassam, Gospodarowicz, Persico, Bohlen, Eisinger, "VEGF receptor subtypes ICDR and FLT1 show different sensitivities to, heparin and placenta growth factor," *Growth Factors*, 11(3):187-195, 1994.
- Tessler, Rockwell, Hicklin, Cohen, Levi, Witte, Lemischka, Neufeld, "Heparin modulates the interaction of VEGF 165 with soluble and cell associated flk-1 receptors," *J. Biol. Chem.*, 269:12456-12461, 1994.
- Thomas, "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent," *J. Biol. Chem.*, 271:603-606, 1996.
- Thorpe et al., "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.
- Tischer, Mitchell, Hartman, Silva, Gospodarowicz, Fiddes, Abraham, "The human gene for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954, 1991.
- Tolsma et al., "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.
- Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.
- Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Nuang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.
- van Dijk, Wamaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren and Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.
- Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.
- Vukanovic et al., "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.
- Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, Heldin, "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 269(43):26988-26995, 1994.
- Waltenberger, Mayr, Pentz, Hornbach, "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia," *Circulation*, 94:1647-1654, 1996.
- Waltenberger et al., "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996.
- Wamil et al., "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.
- Wells, "Starving cancer into submission," *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.
- Wiesmann, Fuh, Christinger, Eigenbrot, Wells, de Vos, "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.
- Willman et al., "Prodrugs in cancer therapy," *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.
- Winter and Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Wolff et al., "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.
- Yoon et al., "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett.*, 97(1):83-91, 1995.
- Yoshida et al., "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.
- Yuan, Chen, Dellian, Safabakhsh, Ferrara, Jain, "Time-dependent vascular regression and permeability changes in established Human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:14765-14770, 1996.

Yamamura et al., "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," Semin. Cancer Biol., 4(4):259-265, 1993.
 Zachary, "Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal," Exp. Nephrol., 6(6):480-487, 1998.
 Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062, 1995.
 Zichc et al., "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," Br. J. Cancer, 77(7):1123-1129, 1998.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN FÜR DIE KREBSBEHANDLUNG DURCH SELEKTIVES INHIBIEREN VON VEGF

<130> 4001.002510

<140> UNKNOWN

<141> 2000-04-28

<150> 60/131,432

<151> 1999-04-28

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2149

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cagctgactc aggcaggctc catgctgaac ggtcacacag agaggaaaca ataaatctca 60
gctactatgc aataaatatc tcaagtttta acgaagaaaa acatcattgc agtgaaataa 120
aaaattttta aatttttagaa caaagctaac aaatggctag ttttctatga ttctttctca 180
aacgctttct ttgaggggga aagagtcaaa caaacaagca gttttacctg aaataaagaa 240
ctagtttttag aggtcagaag aaaggagcaa gttttgcgag aggcacggaa ggagtgtgct 300
ggcagtacaa tgacagtttt cctttccctt gctttccctg ctgccattct gactcacata 360
gggtgcagca atcagcgccg aagtcagaaa aacagtggga gaagatataa ccggattcaa 420
catgggcaat gtgcctacac ttctattcct ccagaacacg atggcaactg tcgtgagagt 480
acgacagacc agtacaacac aaacgctctg cagagagatg ctccacacgt ggaaccggat 540
ttctcttccc agaaacttca acatctggaa catgtgatgg aaaattatac tcagtggctg 600
caaaaacttg agaattacat tgtggaaaac atgaagtcgg agatggcca gatacagcag 660
aatgcagttc agaaccacac ggctaccatg ctggagatag gaaccagcct cctctctcag 720
actgcagagc agaccagaaa gctgacagat gttgagaccc aggtactaaa tcaaaacttct 780
cgacttgaga tacagctgct ggagaattca ttatccacct acaagctaga gaagcaactt 840
cttcaacaga caaatgaaat cttgaagatc catgaaaaaa acagtttatt agaacataaa 900
atcttagaaa tgggaaggaaa acacaaggaa gagttggaca ccttaaagga agagaaagag 960
aaccttcaag gcttggttac tcgtcaaaac tatataatcc aggagctgga aaagcaatta 1020
aacagagcta ccaccaacaa cagtgtcctt cagaagcagc aactggagct gatggacaca 1080
gtccacaacc ttgtcaatct ttgcactaaa gaaggtgttt tactaaaggg aggaaaaaga 1140
gaggaagaga aaccatttag agactgtgca gatgtatgc aagctggttt taataaaagt 1200
ggaatctaca ctatttatat taataatatg ccagaaccca aaaaggtggt ttgcaatatg 1260
gatgtcaatg ggggaggttg gactgtaata caacatcgtg aagatggaag tctagatttc 1320
caaagaggct ggaaggaata taaaatgggt tttggaaatc cctccggtga atattggctg 1380
gggaatgagt ttatttttgc cattaccagt cagaggcagt acatgctaag aattgagtta 1440
atggactggg aagggaaccg agcctattca cagtatgaca gattccacat aggaaatgaa 1500
aagcaaaact ataggttgta tttaaaaggt cacactggga cagcaggaaa acagagcagc 1560
ctgatcttac acggtgctga tttcagcact aaagatgctg ataatgacaa ctgtatgtgc 1620
aaatgtgccc tcatgttaac aggaggatgg tggtttgatg cttgtggccc ctccaatcta 1680
aatggaatgt tctatactgc gggacaaaac ctgggaaaac tgaatgggat aaagtggcac 1740
tacttcaaag ggcccagtta ctccctacgt tccacaacta tgatgattcg accttagat 1800
ttttgaaagc gcaatgtcag aagcgattat gaaagcaaca aagaaatccg gagaagctgc 1860
caggtgagaa actgtttgaa aacttcagaa gcaaacaata ttgtctccct tccagcaata 1920

```

agtggtagtt atgtgaagtc accaagggtc ttgaccgtga atctggagcc gtttgagttc 1980
 acaagagtct ctacttgggg tgacagtgtc cacgtggctc gactatagaa aactccactg 2040
 actgtcgggc tttaaaaagg gaagaaactg ctgagcttgc tgtgcttcaa actactactg 2100
 gaccttattt tggaactatg gtagccagat gataaatatg gtaatttc 2149

<210> 2

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
 1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
 50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
 85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
 100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
 115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
 130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
 145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
 165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
 180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
 195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
 210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
 225 230 235 240

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

Asp Phe

<210> 3

<211> 2269

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

tgggttggtg tttatctcct cccagccttg agggaggga caacactgta ggatctgggg 60
agagaggaac aaaggaccgt gaaagctgct ctgtaaaagc tgacacagcc ctccaagtg 120
agcaggactg ttcttcccac tgcaatctga cagtttactg catgcctgga gagaacacag 180
cagtaaaaaa caggtttgct actggaaaaa gaggaagag aagactttca ttgacggacc 240
cagccatggc agcgtagcag ccctgcgttt cagacggcag cagctcggga ctctggacgt 300
gtgtttgccc tcaagtttgc taagctgctg gtttattact gaagaaagaa tgtggcagat 360
tgttttcttt actctgagct gtgatcttgt cttggccgca gcctataaca actttcggaa 420
gagcatggac agcataggaa agaagcaata tcagggtccag catgggtcct gcagctacac 480
tttcctcctg ccagagatgg acaactgccg ctcttctcc agcccctacg tgtccaatgc 540
tgtgcagagg gacgcgccg tcgaatacga tgactcggg cagaggctgc aagtgcctga 600
gaacatcatg gaaaacaaca ctcagtggct aatgaagctt gagaattata tccaggacaa 660
catgaagaaa gaaatggtag agatacagca gaatgcagta cagaaccaga cggctgtgat 720
gatagaaata gggacaaaac tgttgaaacca aacagctgag caaacgcgga agttaactga 780
tgtggaagcc caagtattaa atcagaccac gagacttgaa cttcagctct tggaacactc 840
cctctcgaca acaaaattgg aaaaacagat tttggaccag accagtgaat taaacaaatt 900
gcaagataag aacagtttcc tagaaaagaa ggtgctagct atggaagaca agcacatcat 960
ccaactacag tcaataaaa aagagaaaga tcagctacag gtgttagtat ccaagcaaaa 1020
ttccatcatt gaagaactag aaaaaaaat agtgactgcc acggtgaata attcagttct 1080
tcaaaagcag caacatgatc tcattggagac agttaataac ttactgacta tgatgtccac 1140
atcaaaactca gctaaggacc ccaactgttg taaagaagaa caaatcagct tcagagactg 1200
tgctgaagta ttcaaatcag gacacaccac aaatggcatc tacacgttaa cattccctaa 1260
ttctacagaa gagatcaagg cctactgtga catggaagct ggaggaggcg ggtggacaat 1320
tattcagcga cgtgaggatg gcagcgttga ttttcagagg acttggaag aatataaagt 1380
gggatttggt aacccttcag gagaatattg gctgggaaat gagtttgttt cgcaactgac 1440
taatcagcaa cgctatgtgc ttaaaatata ccttaaagac tgggaaggga atgaggctta 1500
ctcattgtat gaacatttct atctctcaag tgaagaactc aattatagga ttcaccttaa 1560
aggacttaca gggacagccg gcaaaaataag cagcatcagc caaccaggaa atgattttag 1620
cacaaggat ggagacaacg acaaatgtat ttgcaaatgt tcacaaatgc taacaggagg 1680
ctggtggttt gatgcattgt gtccttccaa cttgaacgga atgtactatc cacagaggca 1740
gaacacaaat aagttcaacg gcattaaatg gtactactgg aaaggctcag gctattcgct 1800
caaggccaca accatgatga tccgaccagc agattttctaa acatcccagt ccacctgagg 1860
aactgtctcg aactattttc aaagacttaa gccagtgca ctgaaagtca cggctgcgca 1920
ctgtgtcctc ttccaccaca gagggcgtgt gctcgggtgt gacgggaccc acatgctcca 1980
gattagagcc tgtaaaactt atcacttaaa cttgcacac ttaacggacc aaagcaagac 2040
cctaaacatc cataattgtg attagacaga acacctatgc aaagatgaac ccgaggctga 2100
gaatcagact gacagtttac agacgtgct gtcacaacca agaattgtat gtgcaagttt 2160
atcagtaaat aactggaaaa cagaacactt atgttatata atacagatca tcttggaaact 2220
gcattcttct gagcactgtt tatacactgt gtaaataccc atatgtcct 2269

```

<210> 4

<211> 496

<212> PRT

<213> Homo sapiens'

<400> 4

```

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

```


50

55

60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
195 200 205

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
245 250 255

Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
260 265 270

Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
275 280 285

Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
290 295 300

Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
305 310 315 320

Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
325 330 335

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
340 345 350

Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg

355

360

365

Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
370 375 380

Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
385 390 395 400

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
405 410 415

Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
420 425 430

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
435 440 445

Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
485 490 495

<210> 5

<211> 495

<212> PRT

<213> Homo. sapiens

<400> 5

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Phe Ser Ser Gln Lys Leu
65 70 75 80

Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp Leu Gln Lys
85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met Ala Gln Ile
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu Glu Ile Gly
115 120 125

Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
 130 135 140
 Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu Ile Gln Leu
 145 150 155 160
 Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln Leu Leu Gln
 165 170 175
 Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser Leu Leu Glu
 180 185 190
 His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu Leu Asp Thr
 195 200 205
 Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr Arg Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp Thr Val His
 245 250 255
 Asn Leu Val Asn Leu Ser Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu Lys Gly Gly
 260 265 270
 Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln
 275 280 285
 Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met
 290 295 300
 Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg
 325 330 335
 Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr
 340 345 350
 Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr
 355 360 365
 Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser
 370 375 380
 Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu
 385 390 395 400
 Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile
 405 410 415
 Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys
 420 425 430

Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala
435 440 445

Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn
450 455 460

His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser
465 470 475 480

Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe
485 490 495

<210> 6

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
OLIGONUCLEOTIDE

<400> 6

aagcttcagg tgcaactgca ggagtcctgga cctgagctgg taaagcctgg ggcttcagtg 60
aagatgtcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactagct atgttttcca ctgggtgaag 120
cagaaacctg ggcagggcct tgagtggatt ggatatatta atccttaca tgatgttact 180
aagtacaatg agaagttcaa aggcaaggcc acactgactt cagacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgg agctcagcag cctgacctct gaggactctg cggtctatta ctgtgcaagc 300
tactacggta gtagttacgg atactatgct atggacgact ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtttcct ctggcggtgg c 381

<210> 7

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 7

Lys Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Val Phe His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

<210> 8

<211> 347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
OLIGONUCLEOTIDE

<400> 8

gacatccagc tgacgcagtc tccagcatcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggctcact 60
atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgccc 120
tggtatcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tccacggggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg gaaacgattt cactcttacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
cctctcacgt tcggtgctgg caccaagctg gaactgaaac gtctaga 347

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 9

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100

105

110

Lys Arg Leu
115

<210> 10
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 10
Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys
20 25

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 11
Ala Pro Met Ala Glu Gly Glu Gln Lys Pro Arg Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15

Met Asp Val Tyr Lys Arg Ser Tyr Cys
20 25

<210> 12
<211> 573
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
OLIGONUCLEOTIDE

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(573)

<400> 12
atg cat cac cat cac cat cac cat act cat cag gac ttt cag cca gtg 48
Met His His His His His His His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val
1 5 10 15

ctg cac ctg gtg gca ctg aac acc ccc ctg tct gga ggc atg cgt ggt 96
 Leu His Leu Val Ala Leu Asn Thr Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly
 20 25 30

atc cgt gga gca gat ttc cag tgc ttc cag caa gcc cga gcc gtg ggg 144
 Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly
 35 40 45

ctg tgc ggc acc ttc cgg gct ttc ctg tcc tct agg ctg cag gat ctc 192
 Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu
 50 55 60

tat agc atc gtg cgc cgt gct gac cgg ggg tct gtg ccc atc gtc aac 240
 Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Gly Ser Val Pro Ile Val Asn
 65 70 75 80

ctg aag gac gag gtg cta tct ccc agc tgg gac tcc ctg ttt tct ggc 288
 Leu Lys Asp Glu Val Leu Ser Pro Ser Trp Asp Ser Leu Phe Ser Gly
 85 90 95

tcc cag ggt caa ctg caa ccc ggg gcc cgc atc ttt tct ttt gac ggc 336
 Ser Gln Gly Gln Leu Gln Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly
 100 105 110

aga gat gtc ctg aga cac cca gcc tgg ccg cag aag agc gta tgg cac 384
 Arg Asp Val Leu Arg His Pro Ala Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His
 115 120 125

ggc tgc gac ccc agt ggg cgg agg ctg atg gag agt tac tgt gag aca 432
 Gly Ser Asp Pro Ser Gly Arg Arg Leu Met Glu Ser Tyr Cys Glu Thr
 130 135 140

tgg cga act gaa act act ggg gct aca ggt cag gcc tcc tcc ctg ctg 480
 Trp Arg Thr Glu Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu
 145 150 155 160

tca ggc agg ctc ctg gaa cag aaa gct gcg agc tgc cac aac agc tac 528
 Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Cys His Asn Ser Tyr
 165 170 175

atc gtc ctg tgc att gag aat agc ttc atg acc tct ttc tcc aaa 573
 Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ser Phe Ser Lys
 180 185 190

<210> 13

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 <223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
 PEPTIDE

<400> 13

 Met His His His His His His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val
 1 5 10 15

Leu His Leu Val Ala Leu Asn Thr Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly
20 25 30

Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly
35 40 45

Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu
50 55 60

Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Gly Ser Val Pro Ile Val Asn
65 70 75 80

Leu Lys Asp Glu Val Leu Ser Pro Ser Trp Asp Ser Leu Phe Ser Gly
85 90 95

Ser Gln Gly Gln Leu Gln Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly
100 105 110

Arg Asp Val Leu Arg His Pro Ala Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His
115 120 125

Gly Ser Asp Pro Ser Gly Arg Arg Leu Met Glu Ser Tyr Cys Glu Thr
130 135 140

Trp Arg Thr Glu Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu
145 150 155 160

Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Cys His Asn Ser Tyr
165 170 175

Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ser Phe Ser Lys
180 185 190

<210> 14

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 14

His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn
1 5 10 15

Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln
20 25 30

Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala
35 40 45

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala
50 55 60

Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe
65 70 75 80

Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro
85 90 95

Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro
100 105 110

Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg
115 120 125

Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser
130 135 140

Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln
145 150 155 160

Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn
165 170 175

Ser Phe Met Thr Ala Ser
180

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 15
Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 16
Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 17

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp
1 5

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 18

Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 19

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 20

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 21

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 22

Ile Asp Gly Arg

1

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 23

Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg

1

5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 24

Pro Leu Gly Leu Trp Ala

1

5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 25

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 26

Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala
1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 27

Gly Ile Ala Gly Gln
1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 28

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile
1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC

PEPTIDE

<400> 29

Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly
1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 30

Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 31

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg
1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 32

Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr
1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 33
Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 34
Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 35
Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

<400> 36
Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC
PEPTIDE

Patentansprüche

1. Eine Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge eines aufgereinigten Anti-VEGF-Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Fragments davon, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper ATCC PTA 1595 bindet und der signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Fik-1) inhibiert, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) zu inhibieren.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei besagter Antikörper ein monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei besagter Antikörper ein IgG-Antikörper oder ein

IgM-Antikörper ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei besagter Antikörper ein scFv, Fv, Fab', Fab, ein Diabody, ein linearer Antikörper oder ein F(ab')₂-Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers ist.

5. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper ein Dimer, Trimer oder Multimer des besagten Antikörpers oder Antigen-bindender Fragmente davon ist.

6. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper ein menschlicher, humanisierter oder teilweise-menschlicher Antikörper oder Antigenbindendes Fragment davon ist.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei besagter Antikörper eine Antigen-bindende Region besagten Antikörpers umfaßt, operativ angehängt an ein menschliches Antikörpernetzwerk oder eine konstante Region.

8. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper ein chimärer Antikörper ist.

9. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper ein rekombinanter Antikörper ist.

10. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper wenigstens eine erste variable Region umfaßt, die eine Aminosäuresequenzregion einschließt, welche die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9 hat.

11. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper der monoklonale Antikörper ATCC PTA 1595 ist.

12. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagter Antikörper operativ an wenigstens ein erstes biologisches Mittel angehängt ist.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei besagter Antikörper operativ an wenigstens ein erstes Mittel angehängt ist, das eine im wesentlichen inaktive Prodrug spaltet, um einen im wesentlichen aktiven Wirkstoff freizusetzen.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei besagter Antikörper operativ an alkalische Phosphatase angehängt ist, die eine im wesentlichen inaktive Phosphat-Prodrug spaltet, um einen im wesentlichen aktiven Wirkstoff freizusetzen.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 12; wobei besagter Antikörper operativ an wenigstens ein erstes therapeutisches oder diagnostisches Mittel angehängt ist.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei besagter Antikörper operativ an wenigstens ein erstes therapeutisches Mittel angehängt ist.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei besagter Antikörper operativ an wenigstens ein erstes und ein zweites therapeutisches Mittel angehängt ist.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 16 oder 17, wobei besagter Antikörper operativ an wenigstens ein erstes chemotherapeutisches Mittel, radiotherapeutisches Mittel, antiangiogenes Mittel, Apoptose-induzierendes Mittel, Steroid, Antimetabolit, Anthracyclin, Vinca-Alkaloid, Anti-Tubulin-Wirkstoff, Antibiotikum, Cytokin, alkylierendes Mittel oder Coagulans angehängt ist.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei besagter Antikörper operativ an ein cytotoxisches, cyto-statisches oder antizelluläres Mittel angehängt ist, das in der Lage ist, das Wachstum oder die Zellteilung von Endothelzellen abzutöten oder zu unterdrücken.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei besagter Antikörper operativ an ein Pflanzen-, Pilz- oder aus Bakterien stammendes Toxin angehängt ist.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei besagter Antikörper operativ an ein A-Ketten-Toxin, ein Ribosomen-inaktivierendes Protein, α -Sarcin, Gelonin, Aspergillin, Restrictocin, eine Ribonuklease, ein Epipodophyllotoxin, Diphtherie-Toxin oder Pseudomonas-Exotoxin angehängt ist.

22. Zusammensetzung nach Anspruch 22, wobei besagter Antikörper operativ an Ricin-A-Kette oder deglycosylierte Ricin-A-Kette angehängt ist.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei besagter Antikörper operativ an ein antiangiogenes Mittel angehängt ist.

24. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei besagter Antikörper operativ an ein Angiopoietin angehängt ist.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei besagter Antikörper operativ an Angiopoietin-2 oder Angiopoietin-1 angehängt ist.

26. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei besagter Antikörper operativ an Angiostatin, Vasculostatin, Canstatin oder Maspin angehängt ist.

27. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei besagter Antikörper operativ an Endostatin angehängt ist.

28. Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei besagter Antikörper operativ an einen Anti-Tubulin-Wirkstoff angehängt ist.

29. Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei besagter Antikörper operativ an einen Anti-Tubulin-Wirkstoff angehängt ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Colchicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Vindesin und ein Combretastatin.

30. Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei besagter Antikörper operativ an ein Coagulans angehängt ist.

31. Zusammensetzung nach Anspruch 30, wobei besagter Antikörper operativ an ein Coagulans angehängt ist; das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Faktor II/IIa, Faktor VII/VIIa, Faktor IX/IXa, Faktor X/Xa, einem Vitamin-K-abhängigen Coagulationsfaktor, dem die Gla-Modifizierung fehlt, Russell's-Schlängengift-Faktor-X-Aktivator, Thromboxart A_2 , Thromboxan- A_2 -Synthase und $\alpha 2$ -Antiplasmin.

32. Zusammensetzung nach Anspruch 30, wobei besagter Antikörper operativ an einen Gewebefaktor, einen menschlichen Gewebefaktor, einen mutanten Gewebefaktor, der hinsichtlich der Fähigkeit, Faktor VII zu aktivieren, defizient ist, trunkierten Gewebefaktor oder an einen dimeren, trimeren oder polymeren Gewebefaktor oder Gewebefaktor-Derivat angehängt ist.

33. Zusammensetzung nach Anspruch 32, wobei besagter Antikörper operativ an einen trunkierten Gewebefaktor angehängt ist.

34. Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei besagter Antikörper operativ an ein diagnostisches Mittel, ein Mittel zu Bildgebung (Imaging) oder ein nachweisbares Mittel angehängt ist.

35. Zusammensetzung nach Anspruch 34, wobei besagter Antikörper operativ an eine Röntgen-nachweisbare Verbindung, ein radioaktives Ion oder ein Kernspinresonanz-Isotop angehängt ist.

36. Zusammensetzung nach Anspruch 34, wobei besagter Antikörper operativ an Biotin, Avidin oder an ein Enzym angehängt ist, das ein farbiges Produkt bei Kontakt mit einem chromogenen Substrat erzeugt.

37. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 33, wobei besagter Antikörper operativ an besagtes biologisches Mittel als ein Fusionsprotein angehängt ist, das hergestellt wird durch Exprimieren eines rekombinanten Vektors, der im selben Leserahmen ein DNA-Segment umfaßt, das für besagten Antikörper kodiert, operativ verknüpft mit einem DNA-Segment, das für besagtes biologisches Mittel kodiert.

38. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 33, wobei besagter Antikörper operativ an be-

sagtes biologisches Mittel über eine biologisch lösbare Bindung oder einen selektiv spaltbaren Linker angehängt ist.

39. Zusammensetzung nach Anspruch 38, wobei besagter Antikörper operativ an besagtes biologisches Mittel über einen Peptid-Linker angehängt ist, der eine Spaltstelle für Urokinase, Pro-Urokinase, Plasmin, Plasminogen, TGF β , Staphylokinase, Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa, eine Metalloproteinase, eine interstitielle Kollagenase, eine Gelatinase oder ein Stromelysin beinhaltet.

40. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 36, wobei besagter Antikörper direkt an besagtes biologisches Mittel angehängt ist.

41. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 36, wobei besagter Antikörper an einen zweiten Antikörper oder eine Antigen-bindende Region davon angehängt ist, der an besagtes therapeutisches oder diagnostisches Mittel bindet.

42. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagte Zusammensetzung eine pharmazeutisch annehmbare Zusammensetzung ist.

43. Zusammensetzung nach Anspruch 42, wobei besagte pharmazeutisch annehmbare Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung formuliert ist.

44. Zusammensetzung nach Anspruch 42, wobei besagte pharmazeutisch annehmbare Zusammensetzung eine liposomale Formulierung ist.

45. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei besagte Zusammensetzung weiterhin ein zweites therapeutisches Mittel umfaßt.

46. Zusammensetzung nach Anspruch 45, wobei besagtes zweites therapeutisches Mittel ein zweites Antikrebsmittel ist.

47. Zusammensetzung nach Anspruch 46, wobei besagtes Antikrebsmittel ein chemotherapeutisches Mittel, ein radiotherapeutisches Mittel, ein anti-angiogenes Mittel, ein Apoptose-induzierendes Mittel, ein Anti-Tubulin-Wirkstoff oder ein auf einen Tumor zielendes chemotherapeutisches Mittel, radiotherapeutisches Mittel, anti-angiogenes Mittel, Apoptose-induzierendes Mittel oder Anti-Tubulin-Wirkstoff ist.

48. Zusammensetzung nach Anspruch 47, wobei besagtes zweites Antikrebsmittel ein Angiopoietin oder ein auf einen Tumor zielendes Angiopoietin ist.

49. Zusammensetzung nach Anspruch 48, wobei besagtes Antikrebsmittel ein auf einen Tumor zielendes Angiopoietin-1 ist.

50. Zusammensetzung nach Anspruch 47, wobei besagtes zweites Antikrebsmittel Endostatin oder ein auf einen Tumor zielendes Endostatin ist.

51. Zusammensetzung nach Anspruch 47, wobei besagtes zweites Antikrebsmittel ein Anti-Tubulin-Wirkstoff oder ein auf einen Tumor zielender Anti-Tubulin-Wirkstoff ist.

52. Zusammensetzung nach Anspruch 47, wobei besagtes zweites Antikrebsmittel ein therapeutisches Antikörper-Mittel-Konstrukt ist, das ein therapeutisches Mittel umfaßt, das operativ mit einem zweiten Antikörper oder einem Antigen-bindenden Fragment davon verknüpft ist, der an einen Oberflächen-exprimierten, Oberflächen-zugänglichen oder sich auf der Oberfläche befindlichen Bestandteil einer Tumorzelle, eines Tumorgefäßes oder eines Tumorstroma bindet.

53. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Verwendung bei der Therapie.

54. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder der Ansprüche 34 bis 36, zur Verwendung bei der Diagnose.

55. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder der Ansprüche 23 bis 29 zur Verwendung beim Inhibieren von Angiogenese nach Verabreichung an ein Tier.

56. Zusammensetzung nach Anspruch 55 zur Verwendung beim Inhibieren von Angiogenese in einem Tier, das eine neovaskuläre Augenkrankheit oder eine Makuladegeneration hat, nach Verabreichung an besagtes Tier.

57. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 41, zur Verwendung bei der Abgabe eines biologischen Mittels an einen vaskularisierten Tumor nach Verabreichung an ein Tier mit einem vaskularisierten Tumor.

58. Zusammensetzung, nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Verwendung bei der Behandlung von Krebs.

59. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder der Ansprüche 23 bis 29 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit durch Inhibieren der Angiogenese.

60. Verwendung nach Anspruch 59, wobei besagtes Medikament zur Behandlung einer neovaskulären Augenkrankheit oder einer Makuladegeneration durch Inhibieren von Angiogenese beabsichtigt ist.

61. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 41 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs durch Abgeben eines biologischen Mittels an einen vaskularisierten Tumor.

62. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

63. Eine Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge eines Anti-VEGF-Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Fragments davon, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, zur Verwendung bei der Therapie ohne wesentliche Inhibition von Makrophagen, Osteoclasten oder Chondroclasten.

64. Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge eines Anti-VEGF-Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Fragments davon, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) bindet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs durch Inhibieren der VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1), ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) zu inhibieren.

65. Ein Kit, umfassend wenigstens eine erste Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58.

66. Ein Kit, umfassend wenigstens eine erste Zusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14 und wenigstens eine zweite Zusammensetzung, umfassend eine im wesentlichen inaktive Prodrug, die durch das biologische Mittel, das an den Antikörper in besagter erster Zusammensetzung angehängt ist, gespalten wird, um einen im wesentlichen aktiven Wirkstoff freizusetzen.

67. Ein Kit, umfassend wenigstens eine erste Zusammensetzung nach Anspruch 14 und wenigstens eine zweite Zusammensetzung, umfassend Combretastatinphosphat.

68. Ein Hybridom, das einen monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper erzeugt, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper ATCC PTA 1595 bindet und der signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) zu inhibieren.

69. Monoklonaler Antikörper ATCC PTA 1595.

70. Ein Immunkonjugat, das den monoklonalen Antikörper ATCC PTA 1595 umfaßt, operativ an wenigstens ein erstes biologisches Mittel angehängt.

71. Ein Verfahren zum Herstellen eines Anti-VEGF-Antikörpers, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper ATCC PTA 1595 bindet, umfassend das Immunisieren eines nicht-menschlichen Tieres mit einer immunisierenden Zusammensetzung, umfassend wenigstens einen ersten immunogenen VEGF-Bestandteil, und Auswählen eines Antikörpers aus dem immunisierten Tier, der im wesentlichen mit dem monoklonalen Antikörper ATCC PTA 1595 kreuzreagiert.

72. Verfahren nach Anspruch 71, wobei besagtes nicht-menschliches Tier eine transgene Maus ist, die eine menschliche Antikörper-Bibliothek umfaßt.

73. Verfahren nach Anspruch 71 oder 72, umfassend das Erhalten von Nukleinsäuren, die für besagten Anti-VEGF-Antikörper kodieren, und Exprimieren besagter Nukleinsäuren, um einen rekombinanten Anti-VEGF-Antikörper zu erhalten.

74. Verfahren nach einem der Ansprüche 71 bis 73, umfassend:

- a) Verabreichen einer immunisierenden wirksamen Menge einer Zusammensetzung, umfassend wenigstens einen ersten immunogenen VEGF-Bestandteil, an ein nicht-menschliches Tier;
- b) Herstellen einer kombinatorischen Immunglobulin-Phagemid-Bibliothek, die die aus der Milz des immunisierten Tiers isolierte RNA exprimiert;
- c) Auswählen eines Klons aus der Phagemid-Bibliothek, der einen Anti-VEGF-Antikörper exprimiert, der im wesentlichen mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 (ATCC PTA 1595) kreuzreagiert; und
- d) Exprimieren der für den Anti-VEGF-Antikörper kodierenden Nukleinsäuren aus besagtem ausgewählten Klon, um einen rekombinanten Anti-VEGF-Antikörper bereitzustellen.

75. Ein Verfahren zum Nachweisen von VEGF, umfassend das In-Kontakt-Bringen einer in-vitro-Zusammensetzung, von der angenommen wird, daß sie VEGF enthält, mit einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58, unter Bedingungen, die dahingehend wirksam sind, daß sie die Bildung von VEGF/Antikörper-Komplexen ermöglichen, und Nachweisen der so gebildeten Komplexe.

76. Ein Verfahren zum Inhibieren der VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR2, ohne signifikant die VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 zu inhibieren, umfassend das In-Kontakt-Bringen einer homogen oder heterogenen in-vitro-Population von Zellen, die VEGFR2 (KDR/Flk-1) und VEGFR1 (Flt-1) exprimieren, mit einer biologisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58.

77. Ein Verfahren zum spezifischen Inhibieren der VEGF-induzierten Endothelzell-Proliferation, umfassend das In-Kontakt-Bringen einer Population von Endothelzellen in vitro mit einer biologisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58.

78. Ein Verfahren zum Inhibieren der VEGF-induzierten Endothelzell-Proliferation, ohne signifikant die VEGF-induzierten Makrophagen-, Osteoclasten- oder Chondroclasten-Funktion zu inhibieren, umfassend das In-Kontakt-Bringen einer Gewebeprobe in vitro, die Endothelzellen und wenigstens eines von Makrophagen, Osteoclasten und Chondroclasten enthält, mit einer biologisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58.

79. Ein Verfahren zum Inhibieren von Angiogenese, umfassend das In-Kontakt-Bringen einer Population von Blutgefäßen in vitro mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 58.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

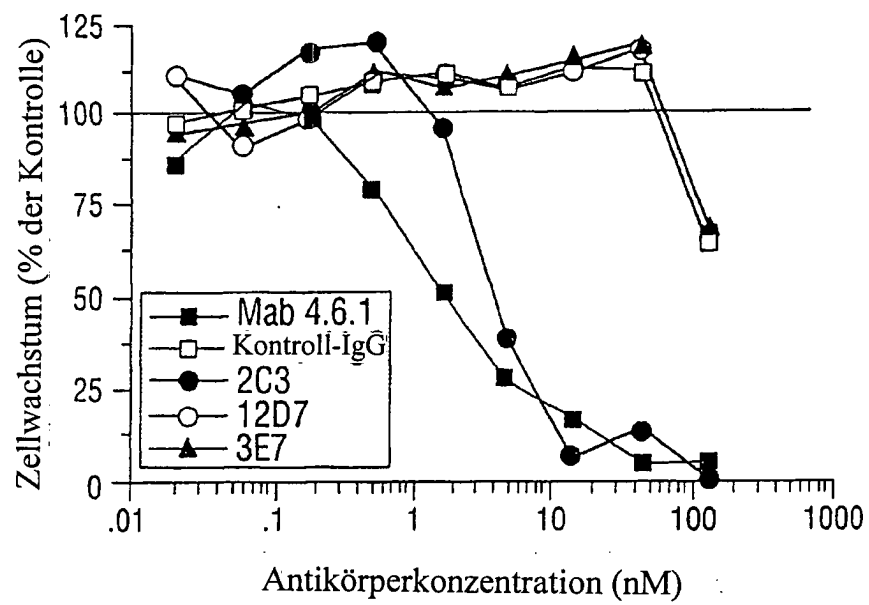


FIG. 1

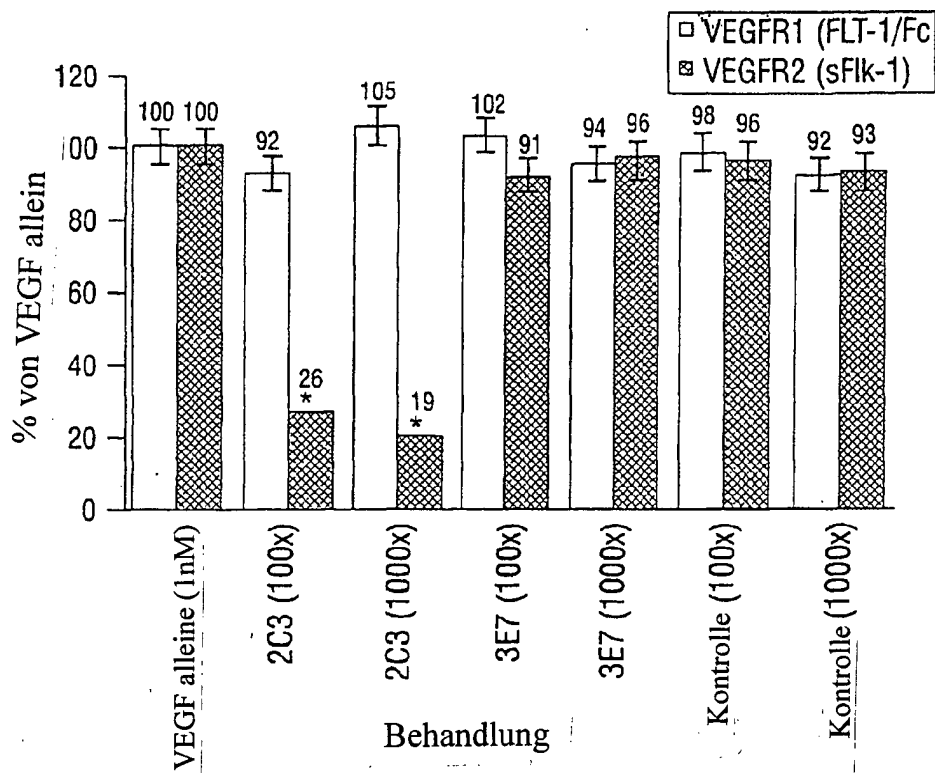


FIG. 2

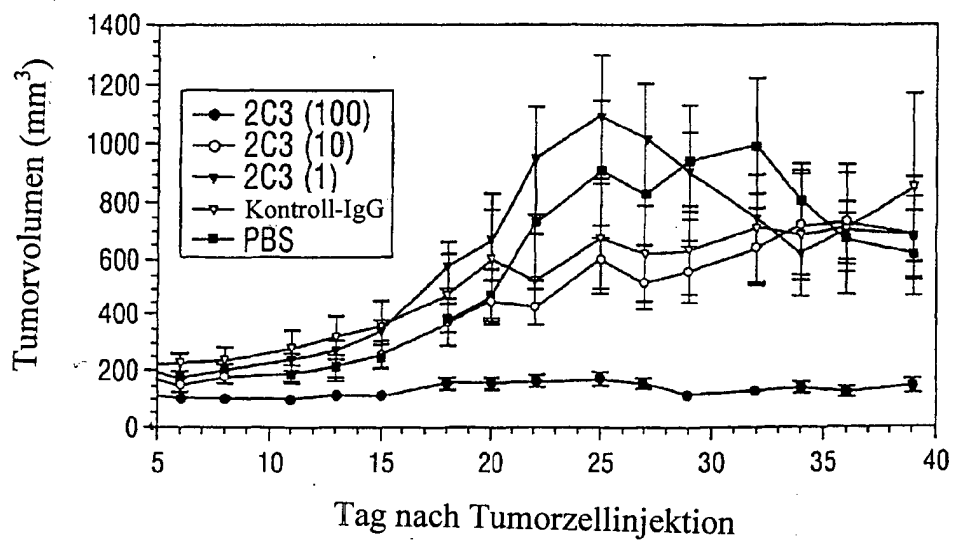


FIG. 3A

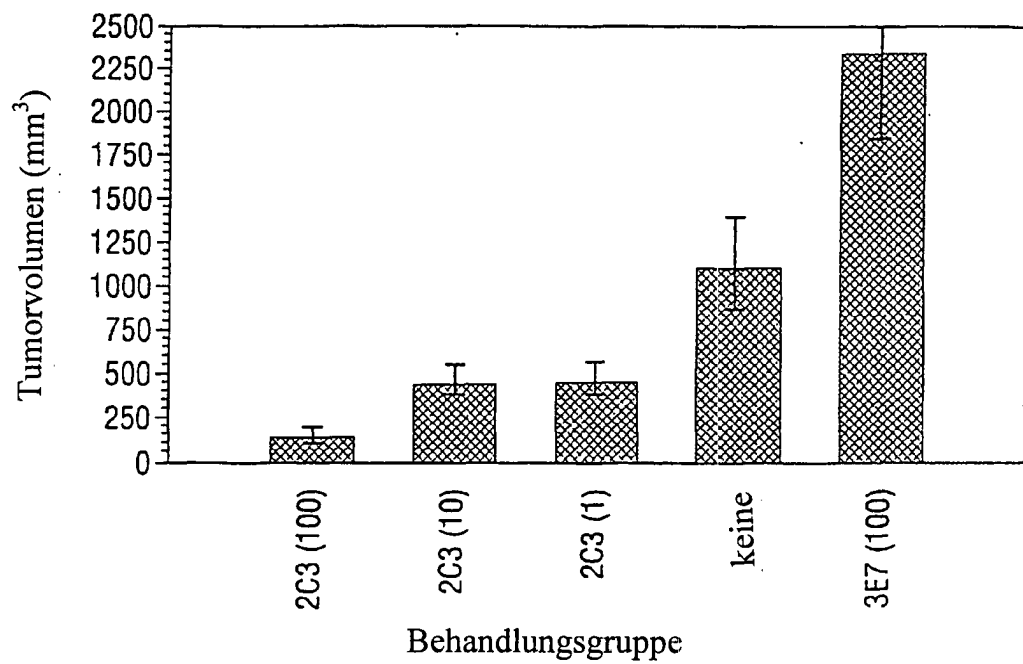


FIG. 3B

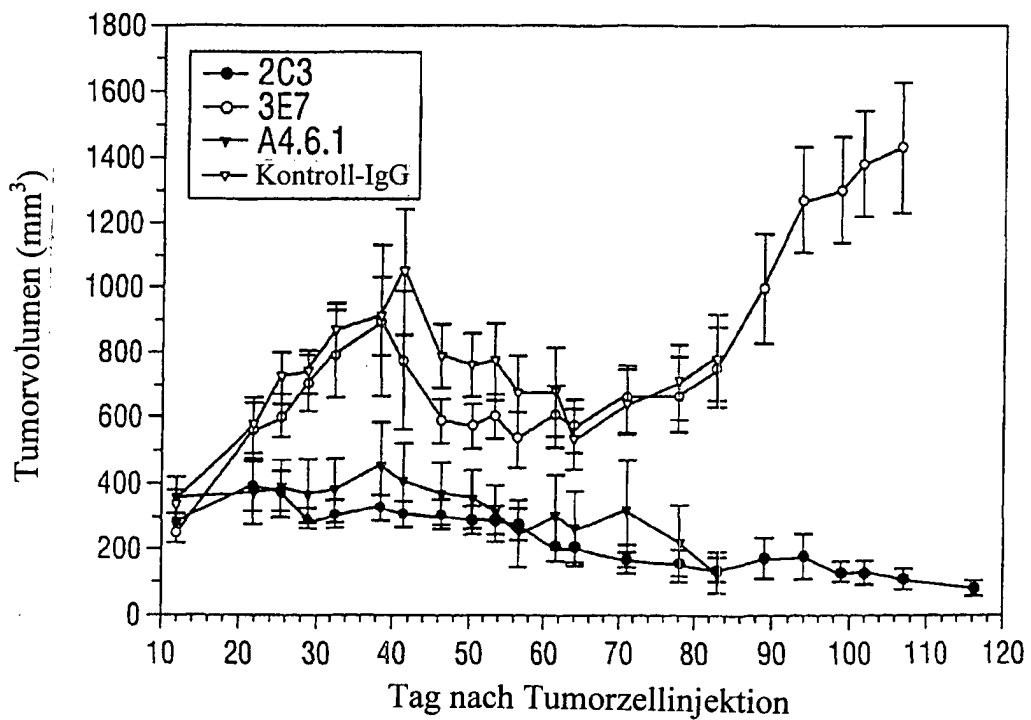


FIG. 4

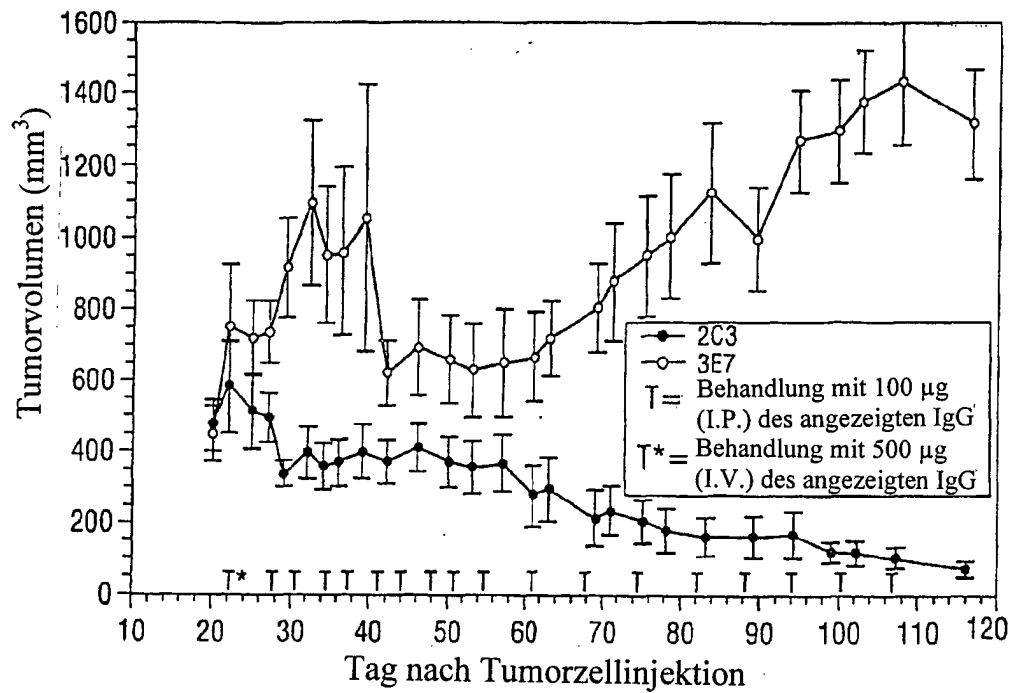


FIG. 5A

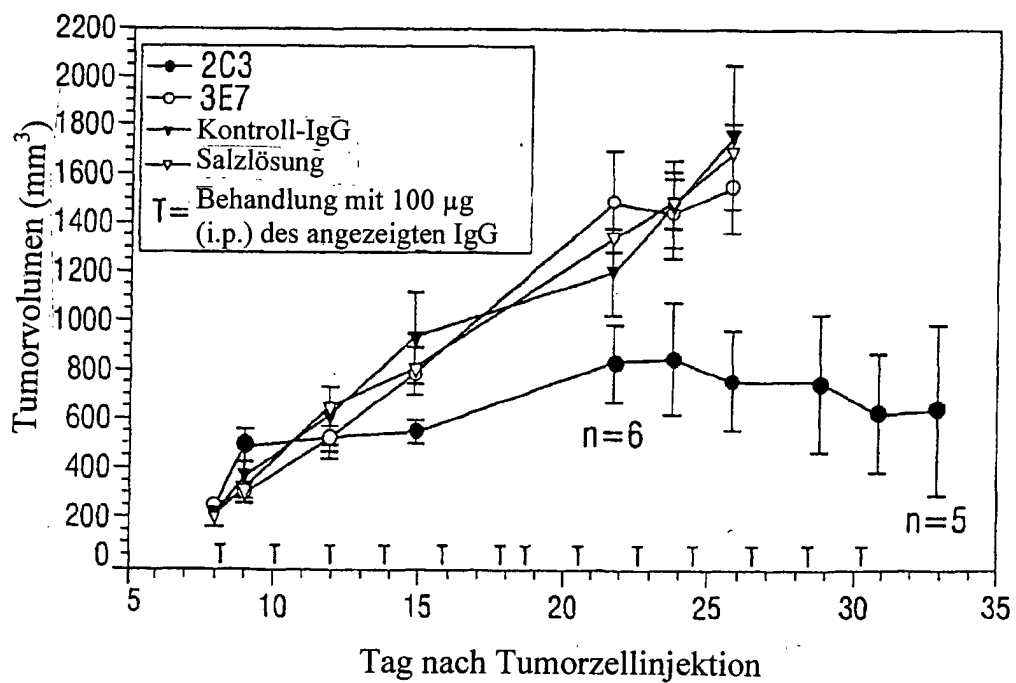


FIG. 5B