(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 209 T2** 2004.07.01

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 669 988 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 209.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU93/00558**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 923 976.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/010331**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.10.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.05.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.09.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12P 21/08**
C12N 5/20, C07K 16/28, A61K 39/395, A61K 47/48

(30) Unionspriorität:
PL557392 29.10.1992 AU

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The Australian National University, Acton, Australian Capital Territory, AU

(72) Erfinder:
PARISH, Richard, Christopher, Campbell, AU

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **ANGIOGENESE-INHIBIERENDE ANTIKÖRPER**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Angiogenese hemmende Antikörper und deren Verwendung bei der Inhibierung von Angiogenese, insbesondere von Angiogenese, die mit dem Wachstum fester Tumore, mit proliferativen Retinopathien und mit bestimmten entzündlichen Erkrankungen assoziiert ist.

[0002] Das Kreislaufsystem stellt ein umfangreiches, verzweigtes Netzwerk von Blutgefäßen dar, das wesentlich ist für die Versorgung von Geweben mit Sauerstoff und Nährstoffen und zur Entsorgung von Stoffwechselnebenprodukten. Bei Erwachsenen kommt es nur selten zur Entwicklung neuer Blutgefäße bzw. zur „Angiogenese", außer während der Wundheilung oder als Folge einer Reihe pathologischer Situationen, die als „angiogeneseabhängige Erkrankungen" [(1,2)] bezeichnet werden. Die wichtigste hiervon ist die mit dem Wachstum fester Tumore und mit proliferativen Retinopathien assoziierte Angiogenese. Angiogenese kann auch bei rheumatoider Arthritis und Psoriasis eine wichtige Rolle spielen.

[0003] Angiogenesehemmer können daher bei der Behandlung angiogeneseabhängiger Erkrankungen von beträchtlichem Wert sein. Im Fall von festen Tumoren beispielsweise ist die Entwicklung einer Blutversorgung für das Wachstum und das Überleben des Tumors wesentlich. Durch die Inhibierung der Angiogenese steht somit ein hochselektives Mittel zur Induktion der Tumorregression bereit. In ähnlicher Weise kann man durch den Einsatz von Angiogeneseinhibitoren das mit proliferativer diabetischer Retinopathie, einer der Hauptkomplikationen von Diabetes, verbundene Erblinden verhindern.

[0004] In Arbeiten, die zur vorliegenden Erfindung führten, wurden monoklonale Antikörper (mAbs) gegen proliferierende/angiogene humane Endothelzellen entwickelt, die entweder zur direkten Inhibierung der Angiogenese oder für die Anreicherung zytotoxischer Arzneimittel bzw. von aus einem Radionuklid bestehenden Markierungen an Angiogenesestellen verwendet werden können. Da eine Angiogenese bei Erwachsenen außer nach einer Gewebeverletzung nicht stattfindet, können solche mAbs bemerkenswert spezifisch sein. Weiterhin zielt die vorliegende Erfindung im Gegensatz zu anderen Forschungsrichtungen, die krebszellspezifische mAbs zur Anreicherung zytotoxischer Arzneimittel in Tumoren geliefert haben, auf die Erzeugung von mAbs gegen Wirtsantigene. Dieser Ansatz hat den großen Vorteil, dass es nicht zu einem Auftreten „resistenter" Varianten des Tumors kommen kann, und es sollte daher theoretisch möglich sein, alle festen Tumore mit einem mAb zu behandeln. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Endothelzellen aufgrund ihrer vaskulären Lokalisierung für mAbs im Blutkreislauf sehr leicht zugänglich sind.

[0005] Die Erfindung stellt somit einen Antikörper bereit, der spezifisch an sich vermehrende humane Endothelzellen bindet, und an sich vermehrende humane Nabelvenenendothelzellen oder sich vermehrende humane Nabelarterienendothelzellen, die im Medium 199, ergänzt mit 20% Rinderfetenserum, L-Glutamin, Antibiotika, 130 µg/ml Heparin und 1,2 µg/ml Endothelzellenvermehrungssupplement, kultiviert werden, bindet und nicht an sich nicht vermehrende humane Nabelvenenendothelzellen oder sich nicht vermehrende humane Nabelarterienendothelzellen bindet.

[0006] Bei dem Antikörper kann es sich um einen monoklonalen Antikörper handeln.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem eine Hybridomzelllinie, die den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper produziert. Die Zelllinie lässt sich nach dem Fachmann gut bekannten Verfahren herstellen.

[0008] Wie bereits beschrieben, kann man den erfindungsgemäßen Antikörper allein als Antiangiogenesemittel bei der Behandlung einer angiogeneseabhängigen Erkrankung in einem Patienten verwenden.

[0009] Die Erfindung stellt weiterhin ein Antikörperkonjugat bereit, das einen erfindungsgemäßen Antikörper mit einem daran gekoppelten toxischen Stoff oder mit einer daran gekoppelten Markierung umfasst.

[0010] Der toxische Stoff kann beispielsweise zytotoxisch sein. Der Antikörper ist somit typischerweise mit einem zytotoxischen Stoff konjugiert. Bei dem Stoff kann es sich um ein zytotoxisches Arzneimittel handeln. Man kann auch andere dem Fachmann gut bekannte toxische Stoffe in das erfindungsgemäße Antikörperkonjugat einbauen. Typischerweise handelt es sich bei dem zytotoxischen Stoff um eine Ricin-A-Kette, um Diphterietoxin, um Pseudomonas-Exotoxin-A oder um Idarubicin.

[0011] Der Antikörper ist typischerweise an eine aus einem Radionuklid bestehenden Markierung gekoppelt. Eine geeignete radioaktive Markierung ist ^{99m}Technetium. Die Kopplung verschiedener Toxine an monoklonale Antikörper lässt sich nach bekannten Verfahren [(3,4,5,6)] durchführen. In ähnlicher Weise kann man sich bei der Herstellung eines Konjugats mit einer radioaktiven Markierung bekannter Verfahren [(7)] bedienen.

[0012] Die Erfindung stellt weiterhin eine therapeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer angiogeneseabhängigen Erkrankung bereit, welche einen erfindungsgemäßen Antikörper oder ein erfindungsgemäßes Antikörperkonjugat zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel umfasst.

[0013] Die Erfindung stellt einen erfindungsgemäßen Antikörper bzw. ein erfindungsgemäßes Antikörperkonjugat zur Verwendung bei einem Verfahren zur Behandlung einer angiogeneseabhängigen Erkrankung in einem Patienten bereit. Dies ist typisch für die Verwendung bei einem Verfahren zur Inhibierung von mit dem Wachstum von festen Tumoren oder mit proliferativen Retinopathien assoziierter Angiogenese.

[0014] Die Erfindung stellt weiterhin die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers bzw. eines erfindungsgemäßen Antikörperkonjugats für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer angiogeneseabhängigen Erkrankung bereit. Typischerweise handelt es sich bei der Angiogenese um mit dem Wachstum von festen Tumoren oder mit proliferativen Retinopathien assoziierte Angiogenese.

[0015] Die Verabreichung des Antikörpers bzw. des Antikörperkonjugats kann auf eine beliebige geeignete Weise erfolgen. Die Verabreichung an den Patienten erfolgt vorzugsweise parenteral, beispielsweise durch Injektion.

[0016] Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers bereit, welches das Züchten von Antikörpern gegen sich vermehrende humane Nabelvenenendothelzellen (HWEC), Screening der Antikörper auf Reaktivität gegen sich vermehrende HUVEC, Entfernen von Antikörpern, die mit anderen humanen Zelllinien reagieren und Identifizieren eines Antikörpers, der nicht mit frisch isolierten, sich nicht vermehrenden humanen Endothelzellen reagiert, umfasst.

[0017] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurden monoklonale Antikörper (mAbs) entwickelt, die spezifisch sind für sich vermehrende/angiogene Endothelzellen. Die Hauptverwendung dieser mAbs ist einfach die Inhibierung von Angiogenese, wenngleich man gewünschtenfalls die mAbs auch für die Anreicherung von zytotoxischen Arzneimitteln bzw. Markierungen an Angiogenesestellen verwenden kann. Bei Tumoren sind die Hauptvorteile dieses Ansatzes Tumorspezifität, minimale Nebenwirkungen und ein geringes Risiko des Entstehens von „resistenten" Tumorvarianten. Darüber hinaus wird mit diesen mAbs ein einzelnes therapeutisches Mittel bereitgestellt, das sich für alle festen Tumore gleich welchen Typs und in welchem Gewebe sie sich befinden, anwenden lässt, und durch die Inhibierung der Angiogenese in festen Tumoren kann sich eine Tumorregression erzielen lassen.

[0018] Beim zunächst verfolgten experimentellen Ansatz wurden murine mAbs gegen sich vermehrende/angiogene humane Nabelvenenendothelzellen (HUVEC) gezüchtet. Die so erhaltenen mAbs wurden zunächst auf Reaktivität gegen HUVEC gescreent, und anschließend wurden die mAbs entfernt, die mit anderen humanen Zelllinien reagierten, z.B. mit humanen Melanomzelllinien. Schließlich wurden endothelspezifische mAbs identifiziert, die nicht mit frisch isolierten, sich nicht vermehrenden/nicht angiogenen humanen Endothelzellen reagierten. Mit diesem Ansatz wurde eindeutig festgestellt, dass sich mAbs erhalten lassen, die spezifisch für sich vermehrende/angiogene humane Endothelzellen sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0019] **Fig.** 1 zeigt die Bindung von mAbs an sich vermehrende/angiogene und ruhende (sich nicht vermehrende/nicht angiogene) humane Nabelvenenendothelzellen (HUVEC), nachgewiesen durch Immunofluoreszenz-Durchflusscytometrie. CONT bezieht sich auf HUVEC, die nicht mit mAbs inkubiert wurden, bei 20G5 handelt es sich um einen HUVEC-spezifischen mAb, der sowohl mit sich vermehrenden/angiogenen als auch ruhenden HWEC reagiert, und bei 9B11 handelt es sich um einen HUVEC-spezifischen mAb, der ausschließlich mit sich vermehrenden/angiogenen HUVEC reagiert.

[0020] Weitere Details der vorliegenden Erfindung sind aus der folgenden ausführlichen Beschreibung der Herstellung erfindungsgemäßer endothelspezifischer mAbs ersichtlich.

BEISPIEL

A. Materialien und Methoden

Zellen

[0021] Humane Nabelvenenendothelzellen (HUVEC) und Nabelarterienendothelzellen (HUAEC) wurden nach dem Verfahren von Jaffe[(8)] aus humanen Nabelschnüren isoliert und in Medium 199, ergänzt mit 20% Rinderfetenserum (Fetal Calf Serum, FCS), L-Glutamin, Antibiotika, 130 µg/ml Heparin und 1,2 µg/ml Endothelzellenvermehrungssupplement (Sigma), kultiviert. Für die mAb-Bindungsstudien wurden HUVEC zwischen Passagen 2 und 7 verwendet. Die humanen Tumorzelllinien (z. B. MM-170-Melanoma, K562-Erythroleukämie) wurden in RPMI-1640/10% FCS kultiviert. Einkernige Zellen (Lymphocyten und Monocyten) und neutrophile Zellen wurden gleichzeitig aus peripherem Humanblut isoliert, indem man verdünntes Blut auf einem Polymorphprep™ (Nycomed. Pharma A. S., Oslo, Norwegen) zentrifugierte. Rote Blutkörperchen und Blutplättchen wurden durch Differentialzentrifugation aus citriertem Humanblut isoliert.

Herstellung von Hybridomen

[0022] BALB/c-Mäuse wurden 3 bis 4mal in Abständen von 2 bis 4 Wochen i. p. mit 15×10^6 HUVEC in PBS

immunisiert und 3 Tage vor Entnahme der Milz mit 15 × 10^6 HUVEC gereizt. Eine Milzzellensuspension wurde hergestellt und mit dem Myelom NS1/1.AG4.1 fusioniert, und Hybridomzellen wurden wie bereits beschrieben[9] herangezüchtet und kloniert. Zur Verbesserung des Wachstums der Hybridomzellen und der Klonierungseffizienz wurde den Kulturmedien 10% endothelzellenkonditioniertes Medium (HUVEC oder Rinderhornhautendothelzellen) zugesetzt.

mAb-Screening Assays.

[0023] Die Überstände der Hybridomkultur wurden zunächst durch Immunofluoreszenz-Durchflusszytometrie auf Reaktivität mit HWEC geprüft Kurz gesagt wurden HUVEC (5 × 10^4) mit unverdünntem Hybridomüberstand inkubiert (30 min, 4°C), gewaschen und mit FITC-Schaf $F(ab')_2$-Antimaus-Ig (100 µg/ml) inkubiert. Nach abschließendem Waschen wurden die HUVEC durch Analyse auf einem FACScan von Becton-Dickinson auf mAb-Bindung untersucht. Positive Hybridomüberstände wurden dann auf die humane Melanomzelllinie MM-170 gescreent, um nichtendothelspezifische mAbs zu eliminieren. Die Endothelspezifität wurde weiter durch Screening der mAbs mit einer Reihe humaner Tumorzelllinien und humaner Lymphozyten, Monozyten, neutrophilerzellen, roter Blutkörperchen und Blutplättchen bestätigt. Schließlich wurde die Spezifität für sich vermehrende HUVEC festgestellt, indem man die Hybridomüberstände mit frisch isolierten (nicht kultivierten) HUVEC screente. Die Hybridomzellen, die positiv für sich vermehrende HUVEC, jedoch negativ für frisch isolierte HUVEC waren, wurden für eine weitere Untersuchung kloniert[9]. Weiterhin wurde eine Reihe von Hybridomen (z. B. 20G5) kloniert, die endothelspezifisch, jedoch nicht proliferations-/angiogenesespezfisch waren.

HUVEC-Proliferationsassay

[0024] Die Assays wurden in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen mit flachem Boden, die mit 0,1% Gelatine beschichtet waren und 2,5 × 10^9 HWEC-Vertiefung in 150 µl Kulturmedium enthielten, durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Kulturzellen weitere 24 Stunden lang mit ^{3}H-Thymidin gepulst, und der Einbau von ^{3}H-Thymidin in die gewaschenen und geernteten Zellen wurde mit einem Titertek 530 Zellernter (Flow Labs) bestimmt. Bei den mAb-Blockierungsexperimenten wurde zu Beginn der Kultivierung 50 µl/Vertiefung Hybridomüberstand zugesetzt, wobei Überstand von einer Hybridomzelllinie, die nicht mit HWED reagiert, als Negativkontrolle verwendet wurde.

B. Ergebnisse

Herstellung von für sich vermehrende/angiogene Endothelzellen spezifischen mAbs

[0025] Tabelle 1 zeigt, dass sich mAbs erhalten lassen, die spezifisch für sich vermehrende/angiogene humane Endothelzellen sind.

TABELLE 1

Herstellung von endothelspezifischen monoklonalen Antikörpern (mAbs)		
Hybridome	Nummer	
	Fusion Nr. 1	Fusion Nr. 2
insgesamt gescreent	1196	660
positiv auf sich vermehrende HUVEC	811	276
spezifisch für sich vermehrende HUVEC	541[a]	102[b]
negativ auf sich nicht vermehrende (ruhende)	25[c]	17[c]

HUVEC		

a Hybridome, die nicht mit der humanen Melanomzelllinie MM-170 reagieren.

b Hybridome, die nicht mit der humanen MM170-Zelllinie, der monozytischen U937-Zelllinie, Lymphozyten, neutrophilen Zellen, Monozyten, roten Blutkörperchen und Blutplättchen reagieren.

c Hybridome, die nicht mit frisch aus humaner Nabelschnur isolierten Endothelzellen, d.h. „sich nicht vermehrenden" bzw. „ruhenden" Endothelzellen, reagieren.

HUVEC = Humane Nabelvenenendothelzellen.

[0026] In der ersten Fusion von 1196 gescreenten Hybridomen reagierten 811 mit sich vermehrenden/angiogenen Endothelzellen, von denen es sich bei 541 um sich vermehrende/angiogene endothelzellenspezifische Hybridome handelte, d. h. Hybridome, die nicht mit anderen sich vermehrenden humanen Zelllinien wie der humanen Melanomalinie MM-170 reagierten. Von besonderer Wichtigkeit war die Tatsache, dass 25 der 541 sich vermehrenden/angiogenen humanen endothelzellenspezifischen Hybridome nicht mit sich nicht vermehrenden/nicht angiogenen (frisch isolierten) Endothelzellen reagierten. 4,6% der Hybridome produzieren somit mAbs, die proliferations/angiogenesespezifisch sind, eine eindeutige Bestätigung des verwendeten Ansatzes. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei einer zweiten Fusion erhalten, bei der 16,6% der HWEC-spezifischen mAbs angiogenesespezifisch waren. Ein typisches Beispiel für die mit einem proliferations-/angiogenesespezifischen (9B11) und einem proliferations-/angiogenesenichtspezifischen 20G5) mAb, nachgewiesen durch Immunofluoreszenz-Flusscytometrie, ist in **Fig.** 1 gezeigt.

Tabelle 2

Reaktivitätsmuster einiger klonierter monoklonaler Antikörper gegen humane Endothelzellen						
Humane Zellen	mAb-Klone					
	9D9 (IgM)	12E5 (IgM)	10A5 (IgM)	14G11 (IgG1)	21F10 (IgM)	20G5 (IgM)
sich vermehrende HUVEC	+	+	+	+	+	+
Ruhende HUVEC	-	-	-	-	-	+
sich vermehrende HUAEC	+	+	+	+	+	+
K562-Erythroleukämie	-	-	+	+	+	-
MM170-Melanoma	-	±	+	+	+	-
PE.01-Eierstockkarzinom	-	-	+	+	+	-
COLO397-Kolonkarzinom	-	-	+	+	+	-
KJD-Keratinozytenkarzinom	-	-	+	+	+	-
MT2-B-Lymphom	-	-	+	+	+	+
Molt-4-T-Lymphom	-	-	+	+	+	+
U937 (monozytisch)	-	-	+	+	+	-
Lymphozyten	-	-	+	-	-	+
Neutrophile Zellen	-	±	±	-	-	+
Monozyten	-	+	+	±	-	+
Rote Blutkörperchen	-	-	-	-	-	-
Blutplättchen	±	-	±	+	-	+
Fibroblasten	-	-	+	±	-	-
HUVEC = humane Nabelvenenendothelzellen HUAEC = humane Nabelarterienendothelzellen						

[0027] In Tabelle 2 ist eine ausführliche Spezifitätsanalyse von sechs klonierten, HUVEC-reaktiven mAbs als Beispiele gezeigt. Bei einem mAb (20G5) handelt es sich um eine Kontrolle, die sowohl mit ruhenden als auch sich vermehrenden/angiogenen Endothelzellen reagiert und wahrscheinlich für das CD31-Antigen spezifisch ist. Die restlichen fünf mAbs reagieren mit sich vermehrenden/angiogenen, jedoch nicht mit ruhenden Endo-

thelzellen. Drei dieser mAbs (10A5, 14G11, 21F10) reagieren mit einer Vielzahl anderer sich vermehrender Zelltypen. Die restlichen beiden Klone (9D9 und 12E5) zeigen beträchtliche Spezifität für sich vermehrende/angiogene Endothelzellen, wobei 9D9 der mAb mit der größten Spezifität ist, der lediglich eine schwache Reaktion mit Blutplättchen zeigt.

[0028] Der 9D9-mAb reagiert mit sich vermehrenden/angiogenen Venen- oder Arterienendothelzellen, jedoch nicht mit sich nicht vermehrenden (ruhenden) Endothelzellen (Tabelle 2). Anschließende Untersuchungen haben gezeigt, dass das 9D9-Antigen innerhalb von 24 Stunden Kultivierung auf HUVEC auftritt und auf über viele Passagen, d. h. zehn Passagen über eine Zeitspanne von zwei Monaten, kultivierten HUVEC persistiert. Weiterhin tritt das 9D9-Antigen auf HUVEC auf, gleich ob sie in 20% FCS+ Rinderwachstumssupplement oder 20% humanen Serum kultiviert werden, was darauf hindeutet, dass das 9D9-Antigen sich nicht von Komponenten des Kulturmediums ableitet.

Wirkung von mAbs auf die Proliferation von Endothelzellen.

[0029] Wurden einige der proliferationsspezifischen mAbs in vitro zu sich vermehrenden HUVEC gegeben, so konnte man feststellen, dass einige der mAbs dazu in der Lage sind, die HUVEC-Proliferation direkt zu hemmen. Die Ergebnisse eines typischen Experiments sind in Tabelle 3 gezeigt.

TABELLE 3

Inhibierung der HUVEC-Proliferation durch für sich vermehrende/angiogene endothelzellenspezifische mAbs

mAb	Spezifität	Einbau von ^{3}H-Thymidin* (cpm)	Reaktion in % des Kontrollwerts
9B9	nichtreaktiv	7779±1420	100
20G5	HUVEC	6806±1290	87,5
1D5	sich vermehrende HUVEC**	1256±110	16,1
8G4	sich vermehrende HUVEC**	1857±38	23,9
16C6	sich vermehrende HUVEC**	1767±175	22,7
19D4	sich vermehrende HUVEC	7539±753	96,8

* in Proliferationsassay mit mAbs enthaltenden, dialysierten Hybridomüberständen kultivierte HUVEC. Die Proliferation wurde 24-48 Stunden nach Beginn der Kultivierung gemessen und stellt den Mittelwert ± Standardabweichung von drei Bestimmungen dar.

** mAbs reagieren nur mit sich vermehrenden/angiogenen (nichtruhenden) HUVEC.

[0030] Von den vier untersuchten proliferations/angiogenesespezifischen mAbs inhibierten drei (1D5, 8G4 und 16C6) die HWEC-Proliferation, gemessen als Einbau von ^{3}H-Thymidin, um ungefähr 75–85%. Im Gegensatz dazu hatten ein proliferations-/angiogenesespezifischer mAb (19D4) und 20G5, ein mAb, der sowohl mit sich vermehrenden als auch mit sich nicht vermehrenden HUVEC reagiert, keine signifikante Wirkung auf die

HWEC-Proliferation. Der mAb 9B9, der nicht mit HUVEC reagiert, wurde in diesem Experiment als negativer Kontrollwert verwendet.

[0031] Diese Daten deuten stark darauf hin, dass einige der proliferations-/angiogenesespezifischen mAbs die Angiogenese direkt hemmen können, wodurch die Notwendigkeit von Konjugaten aus zytotoxischen Arzneimittel und mAb umgangen wird. Es sollte betont werden, dass die in Tabelle 2 wiedergegebenen Daten mit Hybridomüberständen und nicht mit aufgereinigten und konzentrierten mAb-Zubereitungen erhalten wurden.

Literaturangaben:

[0032] 1. Folkman, J. Adv. Cancer Res. 43, 175–203 (1985).

[0033] 2. Folkman, J. und Klagsbrun, M. Science 235, 442–447 (1987).

[0034] 3. Bridges, S., Longo, D. L. und Youle, R. J. Methods Enzymol. 178, 356–368 (1989).

[0035] 4. Colombatti, M., Dell'Arciprete, L., Rappouli, R. und Tridente, G. Methods Enzymol. 178 404–422 (1989).

[0036] 5. Kondo, T., Fitzgerald, D., Chaudhary, V. K., Adhya, S. und Pastan, I. J.Biol.Chem. 263, 9470–9475 (1988).

[0037] 6. Pieterz, G. A., Smyth, M. J. und McKenzie, I. F. C. Cancer Res. 48, 926–931 (1988).

[0038] 7. Lee, R–T., Milner, L. J., Boniface, G. R., Bautovich, G. J., Weedon, A. R. J., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B. und Walker, K. Z. Immunol. Cell Biol. 70, 173–179 (1992).

[0039] 8. Jaffe, E. A. In „Biology of Endothelial Cells", E. A. Jaffe, Hrsg., Martinus-Nijhoff, The Hague (1984).

[0040] 9. Gooding, J. W. J. Immunol. Methods 39, 185–308 (1980).

Patentansprüche

1. Antikörper, der specifisch an sich vermehrende humane Endothelzellen bindet, und an sich vermehrende humane Nabelvenenendothelzellen oder sich vermehrende humane Nabelarterienendothelzellen, die im Medium 199, ergänzt mit 20% Rinderfetenserum, L-Glutamin, Antibiotika, 130 µg/ml Heparin und 1,2 µg/ml Endothelzellenvermehrungssupplement, kultiviert werden, bindet und nicht an sich nicht vermehrende humane Nabelvenenendothelzellen oder sich nicht vermehrende humane Nabelarterienendothelzellen bindet.

2. Antikörper nach Anspruch 1, der ein monoklonaler Antikörper ist.

3. Hybridomzelllinie, die einen monokonalen Antikörper nach Anspruch 2 produziert.

4. Antikörperkonjugat, das ein Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 mit einem daran gekoppelten toxischen Stoff oder mit einer daran gekoppelten Markierung umfasst.

5. Antikörperkonjugat nach Anspruch 4, wobei der Antikörper an einen zytotoxischen Stoff gekoppelt ist.

6. Antikörperkonjugat nach Anspruch 5, wobei der zytotoxische Stoff eine Ricin-A-Kette, Diphtherietoxin, Pseudomonas-Exotoxin-A oder Idarubicin ist.

7. Antikörperkonjugat nach Anspruch 4, wobei der Antikörper an eine aus einem Radionuklid bestehende Markierung gekoppelt ist.

8. Antikörperkonjugat nach Anspruch 7, wobei die radioaktive Markierung ^{99m}Technetium ist.

9. Therapeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer Antiogenese-abhängigen Erkrankung, welche einen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 bzw. ein Antikörperkonjugat nach einem der Ansprüche 4 bis 8 zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel umfasst.

10. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 bzw. Antikörperkonjugat nach einem der Ansprüche 4 bis 8 für die Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer angiogeneseabhängigen Erkrankung eines Patienten.

11. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 bzw. eines Antikörperkonjugats nach einem der Ansprüche 4 bis 8 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer angiogeneseabhängigen Erkrankung.

12. Antikörper oder Antikörperkonjugat nach Anspruch 10 für die Verwendung in einem Verfahren zur Inhibierung der Angiogenese, die mit dem Wachstum solider Tumoren oder mit sich ausbreitenden Retinopathien

verbunden ist.

13. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Angiogenese eine solche ist, die mit dem Wachstum solider Tumoren oder mit sich ausbreitenden Retinopathien verbunden ist.

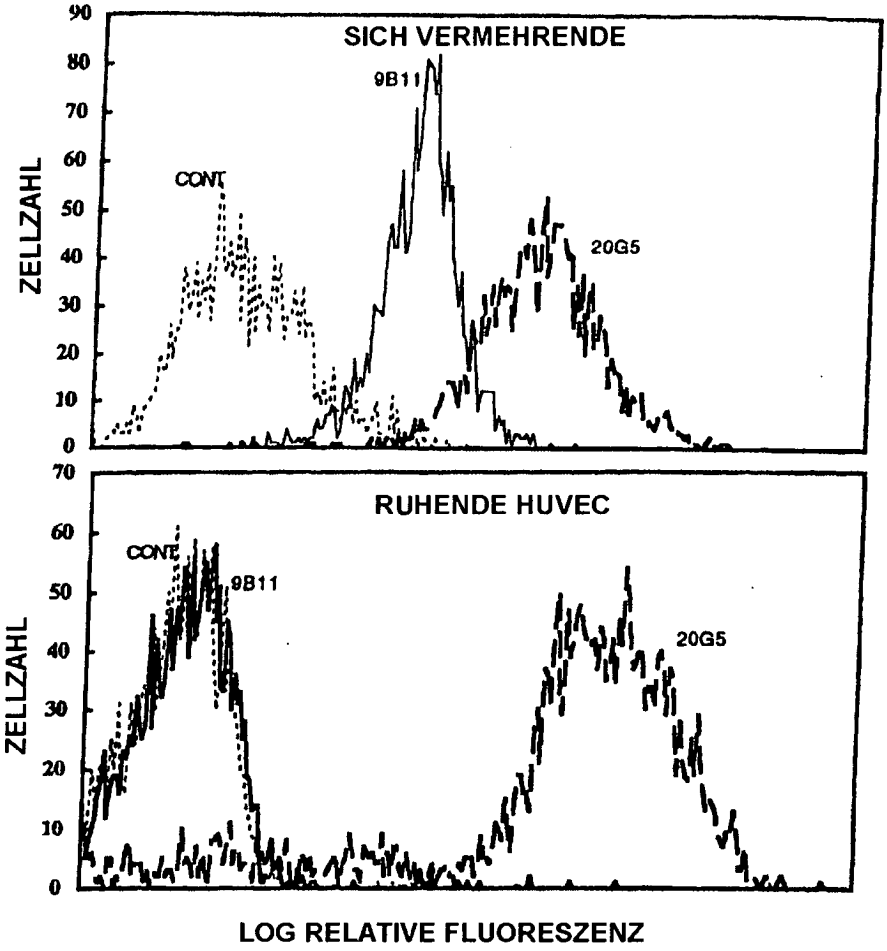
14. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2, welches das Züchten von Antikörpern gegen sich vermehrende humane Nabelvenenendothelzellen (HWEC), Screening der Antikörper auf Reaktivität gegen sich vermehrende HWEC, Entfernen von Antikörpern, die mit anderen humanen Zelllinien reagieren, und Identifizieren eines Antikörpers, der nicht mit frisch isolierten, sich nicht vermehrenden humanen Endothelzellen reagiert, umfasst.

15. Verfahren nach Anspruch 14, welches das Entfernen von Antikörpern umfasst, die mit anderen sich vermehrenden humanen Zelllinien reagieren.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die sich vermehrenden humanen Zelllinien eine Melanomzelllinie umfassen.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1