



(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 1 140 173 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 26 536.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/29475

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 96 8115.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/037502

(86) PCT-Anmeldetag: 09.12.1999

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 29.06.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 10.10.2001

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 03.08.2005

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: 03.04.2013

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.09.2013

(51) Int Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

218481 22.12.1998 US

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., 94080-4990, South San
Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

Patentanwälte Henkel, Breuer & Partner, 80333,
München, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

VAN BRUGGEN, Nicholas, San Carlos, US;
FERRARA, Napoleone, San Francisco, US

(54) Bezeichnung: **ANTAGONISTEN VON VASKULAR-ENDOTHELIALEN ZELLWACHSTUMSFÄKTOREN UND IHRE
ANWENDUNG**

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Antagonisten des vaskulären Endothelzellen-Wachstumsfaktors (VEGF) bei der Herstellung eines Medikaments für therapeutische Zwecke. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Ödems.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die zwei Hauptzellkomponenten des Gefäßsystems sind die Endothel- und glatten Muskelzellen. Die Endothelzellen bilden die Auskleidung der Innenoberfläche aller Blutgefäße und sie bilden eine nicht-thrombogene Grenzfläche zwischen Blut und Gewebe. Ferner sind Endothelzellen eine wichtige Komponente für die Entwicklung neuer Kapillaren und Blutgefäße. Daher proliferieren Endothelzellen während der Angiogenese oder Revaskularisation in Verbindung mit Tumorwachstum und -metastasierung sowie einer Vielzahl nicht-neoplastischer Erkrankungen oder Störungen.

[0003] Verschiedene natürliche vorkommende Polypeptide induzieren nach Berichten die Proliferation von Endothelzellen. Zu diesen Polypeptiden gehören die basischen und sauren Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF), Burgess und Maciag, Annual Rev. Biochem., 58: 575 (1989), Plättchen-Endothelzellen-Wachstumsfaktor (PD-ECGF), Ishikawa et al., Nature, 338: 557 (1989), und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Leung et al., Science 246: 1306 (1989); Ferrara & Henzel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 851 (1989); Tischer et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1198 (1989); Ferrara et al., PCT Pat. Pub. Nr. WO 90/13649 (veröffentlicht am 15. November 1990).

[0004] VEGF wurde zum ersten Mal in Medien identifiziert, die durch follikuläre Zellen oder follikuläre Sternzellen von Rinderhypophyse konditioniert waren. Biochemische Analysen zeigen, dass Rinder-VEGF ein dimeres Protein mit einer scheinbaren Molekulärmasse von etwa 45000 Dalton und mit einer scheinbaren mitogenen Spezifität für vaskuläre Endothelzellen ist. DNA mit Codierung für Rinder-VEGF wurde durch Screening einer aus derartigen Zellen hergestellten cDNA-Bibliothek isoliert, wobei Oligonukleotide auf der Basis der aminoterminalen Aminosäuresequenz des Proteins als Hybridisierungssonden verwendet wurden.

[0005] Humaner VEGF wurde durch ein erstes Screening einer aus humanen Zellen hergestellten cDNA-Bibliothek erhalten, wobei Rinder-VEGF-cDNA als Hybridisierungssonde verwendet wurde. Ei-

ne dadurch identifizierte cDNA codiert ein 165-Aminosäuren-Protein mit mehr als 95% Homologie zu Rinder-VEGF, wobei dieses Protein als humaner VEGF (hVEGF) bezeichnet wird. Die mitogene Aktivität von humanem VEGF wurde durch Expression der humanen VEGF-cDNA in Säugerwirtszellen festgestellt. Durch mit der humanen VEGF-cDNA transfierte Zellen konditionierte Medien förderten die Proliferation von Kapillarendothelzellen, während Kontrollzellen dies nicht taten. Siehe Leung et al., Science 246: 1306 (1989).

[0006] Mehrere weitere cDNAs, die 121-, 189- und 206-Aminosäuren-Isoformen von hVEGF (kollektiv auch als hVEGF-verwandte Proteine bezeichnet) codieren, wurden in humanen cDNA-Bibliotheken identifiziert. Das 121-Aminosäuren-Protein unterscheidet sich von hVEGF durch die Deletion der 44 Aminosäuren zwischen den Resten 116 und 159 in hVEGF. Das 189-Aminosäuren-Protein unterscheidet sich von hVEGF durch die Insertion von 24 Aminosäuren an Rest 116 in hVEGF und es ist scheinbar identisch mit dem humanen vaskulären Permeabilitätsfaktor (hVPF). Das 206-Aminosäuren-Protein unterscheidet sich von hVEGF durch eine Insertion von 41 Aminosäuren an Rest 116 in hVEGF. Houck et al., Mol. Endocrin. 5: 1806 (1991); Ferrara et al., J. Cell. Biochem. 47: 211 (1991); Ferrara et al., Endocrine Reviews 13: 18 (1992); Keck et al., Science 246: 1309 (1989); Connolly et al., J. Biol. Chem. 264: 20017 (1989); Keck et al., EPO Pat. Pub. Nr. 0 370 989 (veröffentlicht am 30. Mai 1990).

[0007] Rezeptoren für VEGF wurden in der Literatur beschrieben. Für zwei derartige Rezeptoren, flt-1 und flk-1, wurde ermittelt, dass sie VEGF-Wirkungen vermitteln [DeVries et al., Science 255: 989 (1992); Shibusawa et al., Oncogene 5: 519 (1990); Matthews et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 9026 (1991); Terman et al., Oncogene 6: 1677 (1991); Terman et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 187: 1579 (1992); Neufeld et al., Prog. Growth Factor Res. 5: 89–97 (1994); Waltenberger et al., J. Biol. Chem. 269: 26988 (1994); Quinn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7533 (1993)] doch sind deren Regulation und Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. Lenmyr et al., J. Neuropathology and Exp. Neurology 57: 874–882 (1998). Sowohl der flt-1- als auch der flk-1-Rezeptor sind membran durchspannende Rezeptoren und gehören zur Klasse-III-Tyrosinkinaserezeptorfamilie. Barleon et al., J. Cell Biochem. 54: 56 (1994); Neufeld et al., aaO.

[0008] VEGF stimuliert nicht nur die vaskuläre Endothelzellproliferation, sondern induziert auch die Angiogenese. Die Angiogenese, die die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierendem Endothel umfasst, ist eine wichtige Komponente einer Vielzahl von Erkrankungen und Störungen, die Tumorwachstum und -metastasierung, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Diabetiker-Nephropathie, Schlaganfall, Myokardinfarkt, Akne und Venenbeschwerden auslösen.

riasis, Atherosklerose, diabetische Retinopathie, retrolentale Fibroplasie, neovaskuläres Glaukom, altersbedingte Makuladegeneration, Hämangiome, Immunabstoßung von transplantiertem Korneagewebe und anderen Geweben und chronische Entzündung umfassen.

[0009] Im Falle von Tumorwachstum scheint Angiogenese für den Übergang von Hyperplasie zu Neoplasie und für die Bereitstellung einer Ernährung des wachsenden soliden Tumors entscheidend zu sein. Folkman et al., Nature 339: 58 (1989). Angiogenese ermöglicht auch den Kontakt von Tumoren mit dem Gefäßbett des Wirts, was einen Weg zur Metastasierung der Tumorzellen ergeben kann. Beweisanzeichen für die Rolle von Angiogenese bei Tumormetastasierung werden beispielsweise durch Untersuchungen geliefert, die eine Korrelation zwischen der Zahl und Dichte von Mikrogefäßen in histologischen Schnitten eines invasiven humanen Brustkarzinoms und dem tatsächlichen Vorhandensein entfernter Metastasen zeigen, Weidner et al., New Engl. J. Med. 324: 1 (1991).

[0010] Es wurde auch berichtet, dass VEGF an der endothelialen und vaskulären Permeabilität beteiligt ist. Siehe Ferrara et al., Endocrine Reviews 18: 4–25 (1997); Dobrogowska et al., J. Neurocytology 27: 163 (1998). Obwohl dies nicht vollständig verstanden wird, wird angenommen, dass VEGF die Endothelzellendurchlässigkeit in Haut-, Retina- und Tumorgewebe erhöht. Collins et al., Brit. J. Pharmacology 109: 195 (1993); Connolly et al., J. Clin. Invest. 84: 1470 (1989); Shweiki et al., Nature 359: 843 (1992) ; Monacci et al., Am. J. Physiol. 264: C995 (1993) ; Stone et al., J. Neurosci. 15: 4738 (1995); Detmar et al., J. Invest. Dermatol. 108: 263 (1997); Weindel et al., Neurosurgery 35: 437 (1994). Die potentiellen Wirkungen und die Rolle von VEGF (und von dessen Rezeptoren, insbesondere des flt-1-Rezeptors) auf die Endothelzellen- und Blut-Hirn-Schrankendurchlässigkeit wurden ebenfalls untersucht. Siehe beispielsweise Rosenstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 7086 (1998); Dobrogowska, aaO; Kovacs et al., Stroke 27: 1865 (1996). Eine relativ diffuse VEGF-mRNA-Expression wurde in Hirn ausgewachsener Ratten, jedoch mit einer ziemlich geringen Menge beobachtet. Monacci et al., Am. J. Physiol. 146: 368–378 (1993). Jedoch wurde gezeigt, dass ein verringerter Sauerstoffdruck eine VEGF-Expression auslöst [Dor und Keshet, Trends in Cardiovascular Med., 7: 289–294 (1998)], und es wurde gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen von VEGF, flt-1 und flk-1 in Rattenhirn nach der Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie auftreten. Hayashi et al., Stroke 28: 2039 (1997); Kovacs et al., aaO; Lennmyr et al., J. Neuropathology and Experimental Neurology, 57: 874 (1998). Die Rolle von VEGF bei der Pathogenese von Schlaganfall und BBB-Abbau ist unklar, wobei in der Literatur widersprechende experimentelle

Beobachtungen angegeben werden. Beispielsweise zeigten Nag et al., J. Neuropathology and Experimental Neurology 56: 912 (1997), in deren Rindenstranggläsiationsrattenmodell das Vorhandensein von muralem VEGF in permeablen Pialgefäß und Arteriolen innerhalb des geschädigten Gewebes und aus dieser Beobachtung wurde gefolgert, dass VEGF einer der mehreren Faktoren ist, die einen BBB-Abbau und eine Ödembildung vermitteln können. Andererseits wird in Hayashi et al., J. Cerebral Blood Flow and Metabolism, 18: 887 (1998) berichtet, dass VEGF selbst, wenn er topisch auf der Oberfläche eines reperfurierten Rattenhirns nach vorübergehendem zerebralen Arterienverschluss appliziert wurde, eine ischämische Herzschädigung, Infarktvolumen und Ödembildung verringerte.

[0011] Die WO 94/10202 (D1) offenbart Antagonisten von VEGF und sie stellt fest, dass die Antagonisten zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen, die durch eine unerwünschte oder übermäßige Endothelzellproliferation oder Revaskularisation gekennzeichnet sind, verwendbar sind.

[0012] Die WO 98/16551 (D2) offenbart Antagonisten von VEGF und sie stellt fest, dass die Antagonisten zur Behandlung von Indikationen, bei denen eine Modulation des Endothelzellenwachstums und der Angiogenese gewünscht ist, verwendbar sind.

[0013] Die WO 00/29584 (D6), die unter Artikel 54(3) EPÜ fällt, offenbart Antagonisten von VEGF und sie stellt fest, dass die Antagonisten zur Behandlung von neoplastischen und nicht-neoplastischen Zuständen verwendbar sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung eines hVEGF-Antagonisten bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prävention eines Ödems in Verbindung mit einem ischämischen Schlaganfall bei einem Säuger gemäß der Definition in den Ansprüchen bereit.

[0015] Weitere Ausführungsformen der Erfindung sind wie in den Ansprüchen 2–12 beschrieben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0016] **Fig. 1** zeigt die Wirkung von Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpern (A4.6.1 oder B2.6.2) oder eines irrelevanten-Anti-Hepatocytenwachstumsfaktor-Antikörpers (Anti-HGF) auf die Bindung der Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper an hVEGF.

[0017] **Fig. 2** zeigt die Wirkung von Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpern (A4.6.1 oder B2.6.2) oder eines irrelevanten-Anti-HGF-Antikörpers auf die biolo-

gische Aktivität von hVEGF in Kulturen von bovinen Nebennierenrindenkapillarendothel (ACE) zellen.

[0018] [Fig. 3](#) zeigt die Wirkung von Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpern (A4.6.1, B2.6.2 oder A2.6.1) auf die Bindung von hVEGF an bovine ACE-Zellen.

[0019] [Fig. 4](#) zeigt die Wirkung einer Behandlung mit Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 auf die Wachstumsrate von NEG55-Tumoren bei Mäusen.

[0020] [Fig. 5](#) zeigt die Wirkung einer Behandlung mit Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 auf die Größe von NEG55-Tumoren bei Mäusen nach einer fünfwochigen Behandlung.

[0021] [Fig. 6](#) zeigt die Wirkung einer Behandlung mit Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 (VEGF Ab) auf das Wachstum von SK-LMS-1-Tumoren bei Mäusen.

[0022] [Fig. 7](#) zeigt die Wirkung einer Behandlung mit variierenden Dosen von Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 (VEGF Ab) auf das Wachstum von A673-Tumoren bei Mäusen.

[0023] [Fig. 8](#) zeigt die Wirkung von Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 auf das Wachstum und Überleben von NEG55(G55)-Glioblastomzellen in Kultur.

[0024] [Fig. 9](#) zeigt die Wirkung von Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 auf das Wachstum und Überleben von A673-Rhabdomyosarcomzellen in Kultur.

[0025] [Fig. 10](#) zeigt die Wirkung von Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper A4.6.1 auf durch humane Synovia induzierte Chemotaxis humaner Endothelzellen.

[0026] [Fig. 11](#) zeigt die Wirkung einer Behandlung mit fIgG auf das Ausmaß von ödematischem Gewebe, das durch hohe Signalintensität auf dem T2-gewichteten MR-Bild gezeigt wird.

[0027] [Fig. 12](#) zeigt repräsentative T2-gewichtete MR-Bilder, die 24 h nach dem Einsetzen von Ischämie aufgezeichnet wurden, für sowohl die Kontrollgruppe (oberes Feld) als auch die Behandlungsgruppe (unteres Feld), die eine Verringerung von ödematischem Gewebe in der Behandlungsgruppe zeigen.

[0028] [Fig. 13](#) zeigt die Wirkung einer Behandlung mit fIgG auf die Größe eines Infarkts, was unter Verwendung von hochauflösender anatomischer MRI 8–12 Wochen nach dem Einsetzen von Ischämie bestimmt wurde.

[0029] [Fig. 14A](#)–B zeigt ein Alignment der Aminosäuresequenzen für die leichten bzw. schweren variablen Domänen von affinitätsgereiften Anti-VEGF-Antikörpern im Vergleich mit dem F(ab)-12-Antikörper (SEQ ID NO: 1 in [Fig. 14A](#) angegeben; SEQ ID NO: 9 in [Fig. 14B](#) angegeben). Die CDRs sind unterstrichen und mit L, leichte Ketten, oder H, schwere Ketten, und den Zahlen 1–3 bezeichnet. Die affinitätsgereiften Sequenzen sind mit YO234-1 (SEQ ID NO: 2 in [Fig. 14A](#) angegeben, SEQ ID NO: 10 in [Fig. 14B](#) angegeben); YO238-3 (SEQ ID NO: 3 in [Fig. 14A](#) angegeben, SEQ ID NO: 11 in [Fig. 14B](#) angegeben) ; YO313-1 (SEQ ID NO: 4 in [Fig. 14A](#) angegeben, SEQ ID NO: 12 in [Fig. 14B](#) angegeben); und YO317 (SEQ ID NO: 5 in [Fig. 14A](#) angegeben, SEQ ID NO: 13 in [Fig. 14B](#) angegeben) bezeichnet. Unterschiede gegenüber F(ab)-12 sind eingerahmt angegeben.

[0030] [Fig. 15A](#)–B zeigt ein Alignment der Aminosäuresequenzen für die leichten bzw. schweren variablen Domänen von affinitätsgereiften Anti-VEGF-Antikörpern im Vergleich mit dem F(ab)-12-Antikörper (SEQ ID NO: 1 in [Fig. 14A](#) und [Fig. 15A](#) angegeben; SEQ ID NO: 9 in [Fig. 14B](#) und [Fig. 15B](#) angegeben). Die CDRs sind unterstrichen und mit L, leichte Ketten, oder H, schwere Ketten, und den Zahlen 1–3 bezeichnet. Die affinitätsgereiften Sequenzen sind mit YO192 (SEQ ID NO: 6 in [Fig. 15A](#) angegeben, SEQ ID NO: 14 in [Fig. 15B](#) angegeben); YO238-3 (SEQ ID NO: 3 in [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) angegeben, SEQ ID NO: 11 in [Fig. 14B](#) und [Fig. 15B](#) angegeben) ; YO239-19 (SEQ ID NO: 7 in [Fig. 15A](#) angegeben, SEQ ID NO: 15 in [Fig. 15B](#) angegeben); und YO313-2 (SEQ ID NO: 8 in [Fig. 15A](#) angegeben, SEQ ID NO: 16 in [Fig. 15B](#) angegeben) bezeichnet. Unterschiede gegenüber F(ab)-12 sind eingerahmt angegeben.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0031] Die vorliegende Erfindung stellt die Herstellung von Medikamenten bereit, die Antagonisten von hVEGF enthalten, die eine oder mehrere der biologischen Aktivitäten von hVEGF hemmen, maskieren oder neutralisieren können. Antagonisten von hVEGF wirken durch Eingreifen in die Bindung von hVEGF an einen zellulären Rezeptor. Daher werden vom Umfang der Erfindung Antikörper, monoklonale Antikörper und humanisierte Antikörper oder Fragmente derselben, die an hVEGF oder einen hVEGF-Rezeptor binden, umfasst. Ebenfalls vom Umfang der Erfindung werden Fragmente und Aminosäuresequenzvarianten von hVEGF, die an hVEGF-Rezeptor binden, jedoch nicht die biologische Aktivität von nativem hVEGF zeigen, umfasst. Ebenfalls vom Umfang der Erfindung werden Varianten des hVEGF-Rezeptors und Fragmente der Aminosäuresequenz derselben, die hVEGF binden können, umfasst.

[0032] Der hier verwendete Ausdruck "hVEGF" bezeichnet den humanen vaskulären Endothelzellen-

wachstumsfaktor von 165 Aminosäuren und verwandte vaskuläre Endothelzellenwachstumsfaktoren von 121, 189 und 206 Aminosäuren gemäß der Beschreibung bei Leung et al., Science 246: 1306 (1989) und Houck et al., Mol. Endocrin. 5: 1806 (1991), zusammen mit den natürlich vorkommenden Allel- und prozessierten Formen dieser Wachstumsfaktoren.

[0033] Der hier verwendete Ausdruck "hVEGF-Rezeptor" oder "hVEGFr" bezeichnet einen zellulären Rezeptor für hVEGF, üblicherweise einen Zelloberflächenrezeptor, der sich auf vaskulären Endothelzellen findet, sowie Fragmente und Varianten desselben, die die Fähigkeit zur Bindung von hVEGF beibehalten. Typischerweise sind die hVEGF-Rezeptoren und Fragmente und Varianten desselben, die hVEGF-Antagonisten sind, in isolierter Form und nicht in einer Zellmembran integriert oder an einer Zelloberfläche fixiert, wie dies in der Natur der Fall sein kann. Ein Beispiel für einen hVEGF-Rezeptor ist die fms-ähnliche Tyrosinkinase (flt oder flt-1), ein Transmembranrezeptor in der Tyrosinkinasefamilie. DeVries et al., Science 255: 989 (1992); Shibuya et al., Oncogene 5: 519 (1990). Der flt-Rezeptor voller Länge umfasst eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Die extrazelluläre Domäne ist an der Bindung von hVEGF beteiligt, während die intrazelluläre Domäne an der Signalübertragung beteiligt ist.

[0034] Ein weiteres Beispiel für einen hVEGF-Rezeptor ist der flk-1-Rezeptor (auch als KDR bezeichnet). Matthews et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 9026 (1991); Terman et al., Oncogene 6: 1677 (1991); Terman et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 1579 (1992).

[0035] Die Bindung von hVEGF an den flt-Rezeptor führt zur Bildung von mindestens zwei Komplexen mit hohem Molekulargewicht mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 205000 und 300000 Dalton. Es wird angenommen, dass der Komplex mit 300000 Dalton ein Dimer ist, das zwei Rezeptormoleküle an ein einziges hVEGF-Molekül gebunden umfasst.

[0036] Varianten von HVEGFr werden ebenfalls vom vorliegenden Umfang umfasst. Repräsentative Beispiele umfassen gestutzte Formen eines Rezeptors, wobei mindestens die Transmembran- und Cytoplasmadomäne von dem Rezeptormolekül voller Länge deletiert sind, und Fusionsproteine, wobei Nicht-hVEGFr-Polymeren oder -Polypeptide mit dem hVEGFr oder vorzugsweise gestutzten Formen desselben konjugiert sind. Ein Beispiel für ein derartiges Nicht-hVEGF-Polypeptid ist ein Immunglobulin. In diesem Fall ist beispielsweise eine Sequenz der extrazellulären Domäne des hVEGFr für die Fv-Domäne der leichten oder (vorzugsweise) schweren Kette eines

Immunglobulins substituiert, wobei der C-Terminus der extrazellulären Domäne des Rezeptors kovalent an den Aminoterminalen des CH1-, Gelenk-, CH2- oder eines anderen Fragments der schweren Kette gebunden ist. Derartige Varianten werden auf die gleiche Weise wie bekannte Immunadhäsine hergestellt. Siehe beispielsweise Gascoigne et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 2936 (1987); Capon et al., Nature 337: 525 (1989); Aruffo et al., Cell 61: 1303 (1990); Ashkenazi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 10535 (1991); Bennett et al., J. Biol. Chem. 266: 23060 (1991). Beispiele für verschiedene flt-IgG-Fusionsproteine sind im folgenden Beispiel 3 beschrieben. Gestutzte Formen der extrazellulären Domäne des hVEGF-Rezeptors, die zur Verwendung in der Erfindung betrachtet werden, umfassen ECD-Fragmente (beispielsweise mit einer oder mehreren deletierten Aminosäuren in der ECD-Sequenz) und ECD-Formen mit einer oder mehreren deletierten Immunglobulin-ähnlichen Domänen in der ECD. Das Beispiel 3B beschreibt beispielsweise eine gestutzte Form von ECD, die nur die ersten drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen von flt an ein Fc-IgG fusioniert umfasst. Vorzugsweise umfasst eine gestutzte Form des ECD, die bei der Herstellung eines Antagonistenmoleküls verwendet wird, (eine) ausreichend(e) Immunglobulin-ähnliche Domäne(n), um eine gewünschte Bindung an hVEGF sicherzustellen.

[0037] In anderen Ausführungsformen sind der hVEGFr oder Fragmente oder Varianten desselben mit einem nicht-proteinartigen Polymer, wie Polyethylenglykol (PEG) (siehe beispielsweise Davis et al., US-Patent 4 179 337; Goodson et al., BioTechnology 8: 343–346 (1990); Abuchowski et al., J. Biol. Chem. 252: 3578 (1977); Abuchowski et al., J. Biol. Chem. 252: 3582 (1977)) oder Kohlehydraten (siehe beispielsweise Marshall et al., Arch. Biochem. Biophys. 167: 77 (1975)) konjugiert. Dies kann zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit des hVEGFr und Verringerung der Möglichkeit, dass der Rezeptor in dem Säuger, dem er verabreicht wird, immunogen ist, dienen.

[0038] Der hVEGFr wird in im wesentlichen der gleichen Weise wie Antikörper für hVEGF verwendet, wobei die Affinität des Antagonisten und dessen Valenz für hVEGF berücksichtigt wird. Eine Sequenz einer extrazellulären Domäne des hVEGF-Rezeptors, entweder als solche oder an ein Immunglobulinpolypeptid oder ein anderes Trägerpolypeptid fusioniert, ist als Antagonist von hVEGF aufgrund deren Fähigkeit zur Maskierung von hVEGF, das in einem Wirt vorhanden ist, jedoch nicht an hVEGFr auf einer Zelloberfläche gebunden ist, besonders günstig.

[0039] hVEGFr und Fragmente und Varianten desselben sind auch bei Screeningassays zur Identifizierung von Agonisten und Antagonisten von hVEGF verwendbar. Beispielsweise überexprimieren Wirts-

zellen, die mit DNA mit Codierung für hVEGFr (beispielsweise fit oder flk-1) transfiziert sind, das Rezeptorpolypeptid auf der Zelloberfläche, was derartige rekombinante Wirtszellen zur Analyse der Fähigkeit einer Testverbindung (beispielsweise eines kleinen Moleküls, linearen oder cyclischen Peptids oder Polypeptids), an hVEGFr zu binden, ideal geeignet macht. hVEGFr und hVEGFr-Fusionsproteine, beispielsweise ein hVEGFr-IgG-Fusionsprotein, können in ähnlicher Weise verwendet werden. Beispielsweise wird das Fusionsprotein an einen immobilisierten Träger gebunden und die Fähigkeit einer Testverbindung, radioaktiv markierten hVEGF von der hVEGFr-Domäne des Fusionsproteins zu verdrängen, bestimmt.

[0040] Der Ausdruck "rekombinant", der in Bezug auf hVEGF, hVEGF-Rezeptor, Antikörper oder andere Proteine verwendet wird, bezeichnet Proteine, die durch rekombinante DNA-Expression in einer Wirtszelle produziert werden. Die Wirtszelle kann prokaryotisch (beispielsweise eine Bakterienzelle, wie *E. coli*) oder eukaryotisch (beispielsweise eine Hefe- oder Säugerzelle) sein.

Antagonistenantikörper

[0041] Der hier verwendete Ausdruck "monoklonaler Antikörper" bezeichnet einen Antikörper, der aus einer Population von im wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten wurde, d. h. die die Population umfassenden individuellen Antikörper sind hinsichtlich Spezifität und Affinität mit Ausnahme von möglichen natürlich vorkommenden Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können, identisch. Es ist anzumerken, dass in Folge von derartigen natürlich vorkommenden Mutationen und dgl. eine monoklonale Antikörperzusammensetzung der Erfahrung, die vorwiegend Antikörper enthält, die spezifisch hVEGF oder hVEGFr binden können, auch geringe Mengen anderer Antikörper enthalten kann.

[0042] Daher bezeichnet die Modifizierung "monoklonal" den Charakter des Antikörpers, dass er aus einer derartigen im wesentlichen homogenen Population von Antikörpern erhalten wurde, und sie soll nicht bedeuten, dass die Produktion des Antikörpers durch ein spezielles Verfahren erforderlich ist. Beispielsweise können monoklonale Antikörper der Erfahrung unter Verwendung des Hybridomverfahrens, das zum ersten Mal von Kohler & Milstein, Nature 256: 495 (1975) beschrieben wurde, hergestellt werden oder durch Gentechnik hergestellt werden. Siehe beispielsweise Cabilly et al., US-Patent 4 816 567.

[0043] Bei dem Hybridomverfahren wird eine Maus oder ein anderes passendes Wirtstier mit einem Antigen auf subkutanem, intraperitonealem oder intramuskulärem Weg immunisiert, um Lymphocyten auszulösen, die Antikörper, die spezifisch an das bzw.

die zur Immunisierung verwendeten Protein(e) binden, produzieren oder produzieren können. Alternativ können Lymphocyten *in vitro* immunisiert werden. Die Lymphocyten werden dann mit Myelomzellen unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie Polyethylenglykol, unter Bildung einer Hybridomzelle fusioniert. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, S. 59–103 (Academic Press, 1986).

[0044] Das Antigen kann hVEGF oder hVEGFr sein. Das Antigen ist optional ein Fragment oder ein Teil oder eine Variante von einem von hVEGF oder hVEGFr mit einem oder mehreren Aminosäureresten, die an der Bindung von hVEGF an einen von dessen Rezeptoren teilnehmen. Beispielsweise ist die Immunisierung mit einer Sequenz einer extrazellulären Domäne eines hVEGFr (beispielsweise ein gestütztes hVEGFr-Polypeptid, dem mindestens Transmembran- und intrazelluläre Domänen fehlen) zur Produktion von Antikörpern, die Antagonisten von hVEGF sind, besonders günstig, da es eine Region bzw. Regionen innerhalb der extrazellulären Domäne sind, die an der hVEGF-Bindung beteiligt sind.

[0045] Die auf diese Weise hergestellten Hybridomzellen werden in einem geeigneten Kulturmedium, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht-fusionierten Stammmyelomzellen hemmen, ausgesetzt und gezüchtet. Wenn beispielsweise den Stammmyelomzellen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT oder HRPT) fehlt, umfasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium), wobei diese Substanzen das Wachstum von HPRT-defizienten Zellen verhindern.

[0046] Bevorzugte Myelomzellen sind solche, die effizient fusionieren, eine stabile hochgradige Expression von Antikörper durch die ausgewählten Antikörper produzierenden Zellen unterstützen und gegenüber einem Medium, wie HAT-Medium, empfindlich sind. Von diesen sind bevorzugte Myelomzelllinien murine Myelomlinien, wie die von MOPC-21- und MPC-11-Maustumoren abgeleiteten, die von Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, erhältlich sind, SP-2-Zellen, die von der American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA, erhältlich sind, und P3X63Ag8U.1-Zellen, die bei Yelton et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1 (1978) beschrieben sind. Humane Myelom- und Maus-humane-Heteromyelomzelllinien wurden auch für die Produktion humaner monoklonaler Antikörper beschrieben. Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, S. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).

[0047] Kulturmedium, in dem Hybridomzellen wachsen, wird auf die Produktion von gegen das Antigen gerichteten monoklonalen Antikörpern getestet. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität von durch Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörpern durch Immunpräzipitation oder durch einen In-vitro-Bindungstest, beispielsweise Radioimmunoassay (RIA) oder enzymgekoppelten Immunsorptions-test (ELISA), bestimmt. Die monoklonalen Antikörper der Erfindung sind solche, die eine Immunpräzipitation mit hVEGF oder hVEGFr vorzugsweise ergeben oder die vorzugsweise an mindestens eines dieser Antigene in einem Bindungstest binden und die eine biologische Aktivität von hVEGF hemmen können.

[0048] Nach der Identifizierung von Hybridomzellen, die Antagonistenantikörper der gewünschten Spezifität, Affinität und Aktivität produzieren, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und durch Standardverfahren gezüchtet werden. Go ding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, S. 59–104 (Academic Press, 1986). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium oder RPMI-1640-Medium. Ferner können die Hybridomzellen in vivo als Aszitestumore in einem tierischen Lebewesen gezüchtet werden.

[0049] Die durch die Subklone sezernierten monoklonalen Antikörper werden durch herkömmliche Immunglobulinreinigungsverfahren, beispielsweise Protein-A-Sepharose-, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, von dem Kulturmedium, der Aszitesflüssigkeit oder Serum in geeigneter Weise abgetrennt.

[0050] DNA mit Codierung für monoklonale Antikörper der Erfindung wird unter Verwendung herkömmlicher Verfahren (beispielsweise durch Verwendung von Oligonucleotidsonden, die spezifisch an Gene mit Codierung für die schweren und leichten Ketten muriner Antikörper binden können) ohne weiteres isoliert und sequenziert. Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als bevorzugte Quelle derartiger DNA. Wenn die DNA isoliert ist, kann sie in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszellen, wie Affen-COS-Zellen, Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen oder Myelomzellen, die nicht in anderer Weise ein Immunglobulinprotein produzieren, transfiziert werden, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erhalten.

[0051] Die DNA kann optional modifiziert werden, um den Charakter des durch deren Expression produzierten Immunglobulins zu ändern. Beispielsweise werden humanisierte Formen muriner Antikörper durch Substitution einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) der variablen Domäne des murinen Antikörpers durch die entsprechende

Region eines humanen Antikörpers produziert. In einigen Ausführungsformen werden ausgewählte Aminosäurereste der Gerüstregion (FR) des murinen Antikörpers ebenfalls durch die entsprechenden Aminosäurereste in dem humanen Antikörper substituiert. Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4285 (1992); Carter et al., BioTechnology 10: 163 (1992). Chimäre Formen muriner Antikörper werden auch durch Substitution der codierenden Sequenz für ausgewählte humane Domänen der schweren und leichten konstanten Kette anstelle der homologen murinen Sequenzen produziert. Cabilly et al., US-Patent 4 816 567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851 (1984).

[0052] Spezielle humanisierte Antikörper, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden, umfassen die humanisierten und affinitätsgereinigten Anti-hVEGF-Antikörper gemäß der Beschreibung in den veröffentlichten PCT-Anmeldungen WO 98/45331 (veröffentlicht am 15. Oktober 1998) und WO 98/45332 (veröffentlicht am 15. Oktober 1998). Derartige humanisierte oder affinitätsgereinigte Anti-hVEGF-Antikörper können unter Verwendung der Verfahren und Techniken gemäß der Beschreibung in WO 98/45331 und WO 98/45332 hergestellt oder gemacht werden. Vorzugsweise umfasst in den oben als Bezug angegebenen PCT-Anmeldungen der Anti-hVEGF-Antikörper das humanisierte F(ab) der Bezeichnung F(ab)-12 oder den affinitätsgereinigten Antikörper der Bezeichnung YO 317. Die [Fig. 14A–B](#) und [Fig. 15A–B](#) erläutern die Aminosäuresequenzen (leichte und schwere Ketten) für diese Anti-hVEGF-Antikörper zusammen mit anderen affinitätsgereinigten Anti-VEGF-Antikörpern der Bezeichnung YO192, YO238-3, YO239-19, YO 313-2, YO243-1 und YO313-1. Alle derartigen Anti-VEGF-Antikörper werden zur Verwendung in den hier beschriebenen Verfahren in Betracht gezogen. Wie in diesen veröffentlichten PCT-Anmeldungen offenbart ist, wurde gezeigt, dass mehrere der humanisierten und affinitätsgereinigten Antikörper die VEGF-Aktivität in verschiedenen Arten von In-vitro-Assays verringern oder hemmen und daher als VEGF-Antagonisten wirken.

[0053] Die vom Umfang der Erfindung umfassten Antikörper umfassen daher variante Antikörper, wie chimäre (einschließlich "humanisierte") Antikörper und Hybridanntikörper, die Immunglobulinketten mit der Fähigkeit zur Bindung von hVEGF oder hVEGFr und eines Nicht-hVEGF-Epitops umfassen.

[0054] Die hier angegebenen Antikörper umfassen alle Herkunftsarten und Immunglobulinklassen (beispielsweise IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) und -unterklassen sowie Antikörperfragmente (beispielsweise Fab, F(ab')₂ und Fv), sofern sie zur Bindung von hVEGF oder hVEGFr fähig sind und zur antagonistischen

Wirkung auf eine biologische Aktivität von hVEGF fähig sind.

[0055] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besitzt der Antikörper eine Affinität für das Immunisierungsantigen von mindestens etwa 10^9 l/mol, was beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107: 220 (1980) bestimmt wurde. Ferner hemmt der monoklonale Antikörper typischerweise die mitogene oder angiogene Aktivität von hVEGF zu mindestens etwa 50%, vorzugsweise mehr als 80% und noch besser mehr als 90%, was beispielsweise durch einen In-vitro-Zellüberlebens- oder Proliferationstest, beispielsweise gemäß der Beschreibung in Beispiel 2 oder gemäß der Beschreibung in WO 98/45331 und WO 98/45332, bestimmt wurde.

[0056] Für einige therapeutische und diagnostische Anwendungen ist es günstig, wenn der monoklonale Antikörper gegenüber weniger als allen unterschiedlichen Molekülformen von hVEGF reaktiv ist. Beispielsweise kann es günstig sein, einen monoklonalen Antikörper zu besitzen, der zur spezifischen Bindung an das hVEGF-Polypeptid der Sequenz mit 165 Aminosäuren, jedoch nicht an die hVEGF-Polypeptide der Sequenz mit 121 oder 189 Aminosäuren fähig ist. Derartige Antikörper werden durch Vergleichs-ELISA-Tests oder Vergleichsimmunpräzipitation der verschiedenen hVEGF-Polypeptide ohne weiteres identifiziert.

Konjugate mit cytotoxischen Einheiten

[0057] In einigen Ausführungsformen ist es günstig, eine cytotoxische Einheit mit einem hVEGF-spezifischen monoklonalen Antikörper oder mit hVEGFr konjugiert bereitzustellen. In diesen Ausführungsformen dient das Cytotoxin zur Ausschaltung oder Abtötung von Zellen, die hVEGF oder dessen Rezeptor exprimieren oder binden. Das Konjugat wird durch die Domäne, die zur Bindung an hVEGF oder hVEGFr fähig ist, auf die Zelle zielgerichtet. Daher werden monoklonale Antikörper, die zur Bindung an hVEGF oder hVEGFr fähig sind, mit Cytotoxinen konjugiert. In ähnlicher Weise wird hVEGFr mit einem Cytotoxin konjugiert. Während die monoklonalen Antikörper optimal allein zur Neutralisation der Aktivität von hVEGF (ohne das Cytotoxin) fähig sind, ist es in dieser Ausführungsform nicht notwendig, dass der monoklonale Antikörper oder Rezeptor zu mehr als der Bindung an hVEGF oder hVEGFr fähig ist.

[0058] Typischerweise ist das Cytotoxin ein Proteincytotoxin, beispielsweise Diphtherie-, Ricin- oder Pseudomonastoxin, obwohl im Falle bestimmter Immunglobulinklassen die Fc-Domäne des monoklonalen Antikörpers selbst der Bereitstellung des Cytotoxins dienen kann (beispielsweise im Falle von IgG2-Antikörpern, die zur Fixierung von Komplement und

Beteiligung an antikörperabhängiger zellulärer Cytoxizität (ADCC) fähig sind). Jedoch muss das Cytotoxin nicht proteinartig sein und es kann Chemotherapeutika umfassen, die bisher beispielsweise zur Behandlung von Tumoren verwendet wurden.

[0059] Das Cytotoxin wird an einen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment desselben typischerweise durch eine Rückgratamidbindung innerhalb der (oder anstelle eines Teils der oder der gesamten) Fc-Domäne des Antikörpers gebunden. Wenn die Targetingfunktion durch hVEGFr geliefert wird, wird die cytotoxische Einheit an einer beliebigen Domäne des Rezeptors, die an der hVEGF-Bindung nicht teilnimmt, substituiert; vorzugsweise wird die Einheit anstelle der oder an den Transmembran- und/oder cytoplasmatischen Domänen des Rezeptors substituiert. Die optimale Substitutionsstelle wird durch Routinearbeiten bestimmt und ist dem Fachmann üblicher Erfahrung geläufig.

[0060] Konjugate, die Proteinfusionen sind, werden in einer rekombinanten Zellkultur durch Expression eines Gens mit Codierung für das Konjugat ohne weiteres hergestellt. Alternativ werden die Konjugate durch kovalente Vernetzung der cytotoxischen Einheit mit einer Aminosäurerestseitenkette oder einem C-terminalen Carboxyl des Antikörpers oder des Rezeptors unter Verwendung von als solchen bekannten Verfahren, beispielsweise Disulfidaustausch oder Verknüpfung durch eine Thioesterbindung unter Verwendung von beispielsweise Iminothiolat und Methyl-4-mercaptopbutyramidat, hergestellt.

Konjugate mit anderen Einheiten

[0061] Die monoklonalen Antikörper und hVEGFr, die Antagonisten von hVEGF sind, können auch mit Substanzen, die nicht ohne weiteres als Cytotoxine von sich aus klassifiziert werden können, die jedoch die Aktivität der Zusammensetzungen hier erhöhen, konjugiert werden. Beispielsweise werden monoklonale Antikörper oder hVEGFr, die an hVEGF oder hVEGFr binden können, mit heterologen Polypeptiden, wie Virussequenzen, mit zellulären Rezeptoren, mit Cytokinen, wie TNF, Interferonen oder Interleukinen, mit Polypeptiden mit Prokoagulanzaktivität und mit anderen biologisch oder immunologisch aktiven Polypeptiden fusioniert. Derartige Fusionen werden durch rekombinante Verfahren ohne weiteres durchgeführt. Typischerweise werden derartige Nicht-Immunglobulinpolypeptide für die konstante(n) Domäne(n) eines Anti-hVEGF-Antikörpers oder für die Transmembran- und/oder intrazelluläre Domäne eines hVEGFr substituiert. Alternativ werden sie für eine variable Domäne einer Antigenbildungsstelle eines hier beschriebenen Anti-hVEGF-Antikörpers substituiert.

[0062] In bevorzugten Ausführungsformen werden derartige Nicht-Immunglobulinpolypeptide an die konstanten Domänen eines hier beschriebenen Antikörpers gebunden oder für diese substituiert. Bennett et al., J. Biol. Chem. 266: 23060–23067 (1991). Alternativ werden sie für das Fv eines Antikörpers hier substituiert, wobei ein chimärer mehrwertiger Antikörper erhalten wird, der mindestens eine verbleibende Antigenbindungsstelle mit Spezifität für hVEGF oder hVEGFr und eine Surrogatantigenbindungsstelle mit einer gegenüber der des Ausgangsantikörpers verschiedenen Funktion oder Spezifität umfasst.

Heterospezifische Antikörper

[0063] Monoklonale Antikörper mit der Fähigkeit zur Bindung an hVEGF oder hVEGFr müssen nur eine einzige Bindungsstelle für die aufgezählten Epitope, typischerweise einen einzigen schweren/leichten Kette-Komplex oder ein Fragment desselben enthalten. Je-doch tragen derartige Antikörper optional auch Antigenbindungsdomänen, die zur Bindung eines Epitops, das sich nicht innerhalb von einem von hVEGF oder hVEGFr findet, fähig sind. Beispielsweise erzeugt die Substitution der entsprechenden Aminosäuresequenz oder Aminosäurereste eines nativen Anti-hVEGF- oder Anti-hVEGFr-Antikörpers durch die komplementaritätsbestimmenden und, falls nötig, Gerüstreste eines Antikörpers mit Spezifität für ein anderes Antigen als hVEGF oder hVEGFr einen polyspezifischen Antikörper, der eine Antigenbindungsstelle mit Spezifität für hVEGF oder hVEGFr und eine andere Anti-genbindungsstelle mit Spezifität für das Nicht-hVEGF- oder -hVEGFr-Antigen umfasst. Diese Antikörper sind mindestens zweiwertig, können jedoch in Abhängigkeit von der Zahl der Antigenbindungsstellen, die die gewählte Antikörperklasse besitzt, mehrwertig sein. Beispielsweise sind Antikörper der IgM-Klasse mehrwertig.

[0064] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung können derartige Antikörper ein hVEGF- oder hVEGFr-Epitop und entweder (a) ein bei der Blutgerinnung aktives Polypeptid, beispielsweise Protein C oder Gewebefaktor, (b) ein cytotoxisches Protein, wie Tumornekrosefaktor (TNF), oder (c) einen nicht-hVEGFr-Zelloberflächenrezeptor, wie den CD4- oder HER-2-Rezeptor, binden (Maddon et al., Cell 42: 93 (1985); Coussens et al., Science 230: 1137 (1985)). Heterospezifische mehrwertige Antikörper werden günstigerweise durch Cotransformation einer Wirtszelle mit DNA mit Codierung der schweren und leichten Ketten beider Antikörper und anschließende Gewinnung des Teils exprimierter Antikörper mit den gewünschten Antigenbindungseigenschaften durch Immunaffinitätschromatographie oder dgl. hergestellt. Alternativ werden derartige Antikörper durch In-vitro-Rekombination monospezifischer Antikörper hergestellt.

Einwertige Antikörper

[0065] Einwertige Antikörper mit der Fähigkeit zur Bindung an hVEGFr sind als Antagonisten von hVEGF besonders günstig. Ohne Beschränkung der Erfindung auf einen speziellen Mechanismus der biologischen Aktivität wird angenommen, dass die Aktivierung von zellulären hVEGF-Rezeptoren durch einen Mechanismus erfolgt, wobei die Bindung von hVEGF an zelluläre hVEGF-Rezeptoren die Aggregation der Rezeptoren induziert und wiederum intrazelluläre Rezeptorkinaseaktivität aktiviert. Da einwertige Anti-hVEGF-Rezeptor-Antikörper eine derartige Aggregation nicht induzieren können und den hVEGF-Rezeptor durch diesen Mechanismus nicht aktivieren können, sind sie ideale Antagonisten von hVEGF.

[0066] Es ist jedoch anzumerken, dass diese Antikörper gegen die hVEGF-Bindungsstelle des Rezeptors gerichtet sein sollten oder in anderer Weise die hVEGF-Bindung an dem hVEGF-Rezeptor, beispielsweise durch sterische Hinderung des Zugangs von hVEGF zum Rezeptor, stören können sollten. Wie hier an anderer Stelle beschrieben, sind jedoch Anti-hVEGFr-Antikörper, die die hVEGF-Bindung nicht stören können, verwendbar, wenn sie mit Nicht-Immunglobulineinheiten, beispielsweise Cytoxinen, konjugiert sind.

[0067] Verfahren zur Herstellung einwertiger Antikörper sind einschlägig bekannt. Beispielsweise umfasst ein Verfahren die rekombinante Expression der leichten Kette und modifizierten schweren Kette eines Immunglobulins. Die schwere Kette wird allgemein an einem beliebigen Punkt in der Fc-Region gestutzt, um die Querverbindung der schweren Kette zu verhindern. Alternativ werden die relevanten Cysteinreste durch einen anderen Aminosäurerest substituiert oder deletiert, um eine Querverbindung zu verhindern. In-vitro-Verfahren sind ebenfalls zur Herstellung einwertiger Antikörper geeignet. Beispielsweise werden Fab-Fragmente durch enzymatische Spaltung eines intakten Antikörpers hergestellt.

Antagonistenvarianten von hVEGF

[0068] Zusätzlich zu den hier beschriebenen Antikörpern umfassen andere verwendbare Antagonisten von hVEGF Fragmente und Aminosäuresequenzvarianten von natürlichem hVEGF, die an den hVEGF-Rezeptor binden, jedoch nicht die biologische Aktivität von natürlichem hVEGF zeigen. Beispielsweise umfassen derartige Antagonisten Fragmente und Aminosäuresequenzvarianten, die eine Rezeptorbindungsdomäne von hVEGF umfassen, denen jedoch eine biologische Aktivität verliehende Domäne fehlt oder die in anderer Weise fehlerhaft hinsichtlich der Aktivierung zellulärer hVEGF-Rezeptoren sind, beispielsweise im Falle eines Fragments oder einer Aminosäuresequenzvariante, die fehlerhaft hinsichtlich von

deren Fähigkeit zur Induktion der Aggregation oder Aktivierung von zellulären hVEGF-Rezeptoren ist. Der Ausdruck "Rezeptorbindungsdomäne" bezeichnet die Aminosäuresequenzen in hVEGF, die an der hVEGF-Rezeptorbindung beteiligt sind. Der Ausdruck "Domäne biologischer Aktivität" oder "biologische Aktivität verleihende Domäne" bezeichnet eine Aminosäuresequenz in hVEGF, die eine spezielle biologische Aktivität des Faktors, beispielsweise mitogene, angiogene oder Gefäßpermeabilitätsaktivität, verleiht.

[0069] Die Beobachtung, dass hVEGF scheinbar zur Bildung eines Komplexes mit zwei oder mehreren hVEGFr-Molekülen auf der Oberfläche einer Zelle fähig ist, legt nahe, dass hVEGF mindestens zwei discrete Stellen zur Bindung an hVEGFr aufweist und dass es an derartige zelluläre Rezeptoren in sequentieller Weise, zunächst an einer Stelle und dann an der anderen bindet, bevor eine Aktivierung erfolgt, gemäß einem Wachstumshormon, Prolactin und dgl. (siehe beispielsweise Cunningham et al., Science 254: 821 (1991); deVos et al., Science 255: 306 (1992); Fuh et al., Science 256: 1677 (1992)). Entsprechend werden Antagonistenvarianten von hVEGF gewählt, in denen eine Rezeptorbindungsstelle von hVEGF (typischerweise die Stelle, die an der ersten Bindung von hVEGF an hVEGFr beteiligt ist) unmodifiziert bleibt (oder bei Modifikation zur Verstärkung der Bindung variiert wird), während eine zweite Rezeptorbindungsstelle von hVEGF typischerweise durch nichtkonservative Aminosäurerestsubstitution(en) oder -deletion(en) modifiziert wird, um diese Bindungsstelle dysfunktional zu machen.

[0070] Rezeptorbindungsdomänen in hVEGF und hVEGF-Bindungsdomänen in hVEGFr werden durch einschlägig bekannte Verfahren bestimmt, die Röntgenuntersuchungen, Mutationsanalysen und Antikörperbindungsstudien umfassen. Die Mutationsansätze umfassen die Techniken von Zufallssättigungsmutagenese gekoppelt mit der Selektion von Escape-Mutanten und Insertionsmutagenese. Eine weitere, zur Identifizierung von Rezeptorbindungsdomänen in Liganden geeignete Strategie ist als Alanin(Ala)-Scanning-Mutagenese bekannt. Cunningham et al., Science 244, 1081-1985 (1989). Dieses Verfahren umfasst die Identifizierung von Regionen, die geladene Aminosäureseitenketten enthalten. Die in jeder Region identifizierten geladenen Reste (d. h. Arg, Asp, His, Lys und Glu) werden durch Ala ersetzt (eine Region pro mutiertes Molekül) und die Rezeptorbindung der erhaltenen Liganden wird getestet, um die Bedeutung der speziellen Region bei der Rezeptorbindung festzustellen. Ein weiteres starkes Verfahren zur Lokalisierung von Rezeptorbindungsdomänen gelingt durch die Verwendung neutralisierender Anti-hVEGF-Antikörper. Kim et al., Growth Factors 7: 53 (1992). Üblicherweise wird eine Kombination von diesen und ähnlichen Verfahren zur Lokali-

sierung der an der Rezeptorbindung beteiligten Domänen verwendet.

[0071] Der in Bezug auf hVEGF verwendete Ausdruck "Aminosäuresequenzvariante" bezeichnet Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, die sich in gewissem Maße von den Aminosäuresequenzen der nativen Formen von hVEGF unterscheiden. Üblicherweise besitzen Antagonist-Aminosäuresequenzvarianten mindestens etwa 70% Homologie mit mindestens einer Rezeptorbindungsdomäne eines nativen hVEGF und vorzugsweise sind sie mindestens etwa 80%, vorzugsweise mindestens etwa 90% homolog zu einer Rezeptorbindungsdomäne eines nativen hVEGF. Die Aminosäuresequenzvarianten besitzen Substitutionen, Deletionen und/oder Insertionen an bestimmten Positionen innerhalb der Aminosäuresequenz von nativem hVEGF derart, dass die Varianten die Fähigkeit zur Bindung an hVEGF-Rezeptor beibehalten (und dadurch mit nativem hVEGF zur Bindung an hVEGF-Rezeptor konkurrieren), jedoch eine oder mehrere der biologischen Wirkungen von hVEGF, wie Endothelzellproliferation, Angiogenese oder Gefäßpermeabilität, nicht induzieren können.

[0072] "Homologie" ist als der Prozentsatz von Resten in der Aminosäuresequenzvariante, die mit den Resten in der Aminosäuresequenz einer Rezeptorbindungsdomäne eines nativen hVEGF nach Alinieren der Sequenzen und Einführung von Lücken, falls nötig, um die maximale prozentuale Homologie zu erreichen identisch sind, und ohne die Berücksichtigung konservativer Substitutionen als Teil des Prozentsatzes der Aminosäurehomologie definiert. Verfahren und Computerprogramme zum Alignment sind einschlägig bekannt. Ein derartiges Computerprogramm ist "Align 2" des Autors Genentech, Inc., das mit Nutzerdokumentation im United States Copyright Office, Washington, DC 20559, am 10. Dezember 1991 eingereicht wurde. Der Fachmann kann unter Verwendung routinemässiger Fertigkeiten passende Parameter zur Ermittlung eines Alignment einschließlich von Algorithmen, die zum Erreichen eines maximalen Alignment über die Strecke der Sequenzen, die verglichen werden, bestimmen.

[0073] Substitutionsvarianten sind solche, bei denen mindestens ein Aminosäurerest in einer nativen Sequenz entfernt und eine unterschiedliche Aminosäure an dessen Stelle an der gleichen Position insertiert wurde. Die Substitutionen können einzeln sein, wobei nur eine Aminosäure in dem Molekül substituiert wurde, oder sie können mehrere sein, wobei zwei oder mehrere Aminosäuren in dem gleichen Molekül substituiert wurden.

[0074] Insertionsvarianten sind solche, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren unmittelbar benachbart zu einer Aminosäure an einer speziellen Position in einer nativen Sequenz insertiert wurden. Unmittel-

bar benachbart zu einer Aminosäure bedeutet eine Verbindung mit entweder der funktionalen α -Carboxy- oder α -Aminogruppe der Aminosäure.

[0075] Deletionsvarianten sind solche, bei denen ein oder mehrere Aminosäurereste in einer nativen Sequenz entfernt wurden. Üblicherweise sind bei Deletionsvarianten ein oder zwei Aminosäurereste in einer speziellen Region des Moleküls deletiert.

[0076] Fragmente und Aminosäuresequenzvarianten von hVEGF werden durch einschlägig bekannte Verfahren, beispielsweise positionsspezifische Mutagenese der DNA mit Codierung für den nativen Faktor, ohne weiteres hergestellt. Die mutierte DNA wird in einen passenden Expressionsvektor insertiert und Wirtszellen werden dann mit dem rekombinanten Vektor transfiziert. Die rekombinanten Wirtszellen werden in einem geeigneten Kulturmedium gezüchtet und das in den Wirtszellen exprimierte gewünschte Fragment oder die gewünschte Aminosäuresequenzvariante werden dann aus der rekombinanten Zellkultur durch chromatographische oder andere Reinigungsverfahren gewonnen.

[0077] Alternativ werden Fragmente und Aminosäurevarianten von hVEGF in vitro, beispielsweise durch Proteolyse von nativem hVEGF, oder durch Synthese unter Verwendung von Standard-Festphasen-peptidsyntheseverfahren gemäß der Beschreibung bei Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963)) hergestellt, obwohl andere äquivalente, einschlägig bekannte chemische Synthesen verwendet werden können. Eine Festphasensynthese wird am C-Terminus des Peptids durch Kopplung einer geschützten α -Aminosäure an ein geeignetes Harz initiiert. Die Aminosäuren werden an die Peptidkette unter Verwendung von einschlägig bekannten Techniken zur Bildung von Peptidbindungen gekoppelt.

Therapeutische Verwendungen

[0078] Die hier verwendeten Ausdrücke "behandeln", "Behandlung", "Therapie" und "therapeutisch" bezeichnen eine kurative Therapie, prophylaktische Therapie und präventive Therapie.

[0079] Für therapeutische Anwendungen werden die Antagonisten der Erfindung an einen Säuger, vorzugsweise einen Menschen, in einer akzeptablen Dosierungsform, die solche umfasst, die einem Menschen intravenös als Bolus oder durch kontinuierliche Infusion über einen Zeitraum auf intramuskulärem, intraperitonealem, intrazerebrospinalem, subkutanem, intraartikulärem, intrasynovialem, intraduralem, intrathekalen, oralem, topischem oder Inhalationsweg verabreicht werden können, verabreicht. Eine intravenöse Infusion wird als besonders günstig zur beispielsweise Behandlung eines zerebralen Ödems angenommen.

[0080] Derartige Dosierungsformen umfassen Träger, die inhärent nichttoxisch und nichttherapeutisch sind. Beispiele für derartige Träger umfassen Ionen-austauscher, Aluminiumoxid, Aluminiumstearat, Le-cithin, Serumproteine, wie humanes Serumalbumin, Puffersubstanzen, wie Phosphate, Glycin, Sorbinsäure, Kaliumsorbit, partielle Glyceridgemische gesättigter pflanzlicher Fettsäuren, Wasser, Salze oder Elektrolyte, wie Protaminsulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Zinksalze, kolloidales Siliciumdioxid, Magnesiumtrisilicat, Polyvinylpyrrolidon, Substanzen auf Cellulosebasis und Polyethylenglykol. Träger für topische oder gelbasierte Formen eines Antagonisten umfassen Polysaccharide, wie Natriumcarboxymethylcellulose oder Methylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylate, Polyoxyethylen-Polyoxypropyle-Blockpolymere, Polyethylenglykol und Holzwachsalkohole. Herkömmliche Depotformen können in geeigneter Weise verwendet werden. Derartige Formen umfassen beispielsweise Mikrokapseln, Nanokapseln, Liposome, Pflaster, Inhalationsformen, Nasensprays, sublinguale Tabletten und Zubereitungen mit nachhaltiger Freisetzung. Der Antagonist wird in derartigen Vehikeln typischerweise mit einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml bis 100 mg/ml formuliert.

[0081] Geeignete Beispiele für Zubereitungen mit nachhaltiger Freisetzung umfassen semipermeable Matrices fester hydrophober Polymere, die den Antagonist enthalten, wobei die Matrices in der Form von Formteilen, beispielsweise Filmen oder Mikrokapseln, sind. Beispiele für Matrices mit nachhaltiger Freisetzung umfassen Polyester, Hydrogele (beispielsweise Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) gemäß der Beschreibung von Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167 (1981), und Langer, Chem. Tech., 12: 98–105 (1982), oder Poly(vinylalkohol), Polylactide (US-Patent 3 773 919), Copolymere von L-Glutaminsäure und γ -Ethy-L-giutamat (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547 (1983), nicht-abbaubares Ethylen-vinylacetat (Langer et al., aaO), abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere, wie Lupron Depot (injizierbare Mikrokügelchen, die aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolidacetat bestehen) und Poly-D-(–)-3-hydroxybuttersäure. Während Polymere, wie Ethylen-vinylacetat und Milchsäure-Glykolsäure, die Freisetzung von Molekülen über mehr als 100 Tage ermöglichen, setzen bestimmte Hydrogele Proteine über kürzere Zeiträume frei. Wenn verkapselte Polypeptidantagonisten im Körper über einen langen Zeitraum verbleiben, können sie in Folge des Einwirkens von Feuchtigkeit bei 37°C de-naturieren oder aggregieren, was zu einem Verlust an biologischer Aktivität und möglichen Änderungen der Immunogenität führt. Rationale Strategien können zur Stabilisierung in Abhängigkeit vom beteiligten Mechanismus ersonnen werden. Beispielsweise kann, wenn entdeckt wurde, dass der Aggregationsmechanismus eine intermolekulare S-S-Bin-

dungsbildung durch Thiodisulfidaustausch ist, eine Stabilisierung durch Modifizierung von Sulfhydrylresten, Lyophilisierung aus sauren Lösungen, Kontrolle des Feuchtigkeitsgehalts, Verwendung passender Additive und Entwicklung spezifischer Polymermatrixzusammensetzungen erreicht werden.

[0082] hVEGF-Antagonistenzusammensetzungen mit nachhaltiger Freisetzung umfassen auch in Liposomen gefangene Antagonistenantikörper oder hVEGFr. Die Antagonisten enthaltende Liposome werden durch einschlägig bekannte Verfahren, beispielsweise gemäß der Beschreibung in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); US-Patent 4 485 045, US-Patent 4 544 545, hergestellt. Üblicherweise sind die Liposomen der kleine (etwa 200–800 Å) unilamellare Typ, wobei der Lipidgehalt mehr als etwa 30 Mol Cholesterin beträgt, wobei der ausgewählte Anteil für die optimale HRG-Therapie eingestellt wird. Liposome mit verstärkter Zirkulationsdauer sind in US-Patent 5 013 556 offenbart.

[0083] Eine weitere Verwendung der vorliegenden Erfindung umfasst die Einarbeitung eines hVEGF-Antagonisten in Formteile.

[0084] Eine passende und wirksame Dosierung eines Antagonisten hängt von der Art einer zu behandelnden Erkrankung oder eines zu behandelnden Zustands, die hier definiert sind, der Schwere und dem Verlauf der Erkrankung oder des Zustands, der Tatsache, ob die Antagonisten für präventive oder therapeutische Zwecke verabreicht werden, einer vorherigen Therapie, der klinischen Geschichte des Patienten und dem Ansprechen auf den Antagonisten und dem Urteil des behandelnden Arztes ab. Eine wirksame Dosierung eines Antagonisten ist typischerweise die Menge eines Antagonisten, die verabreicht wird, um eine maximale der gewünschten Hemmung der biologischen Aktivität von VEGF zu erreichen. Der Antagonist wird dem Patienten günstigerweise auf einmal oder über eine Reihe von Behandlungen verabreicht.

[0085] Die hVEGF-Antagonisten sind bei der Behandlung eines Ödems, das mit ischämischem Schlaganfall in Verbindung steht, verwendbar.

[0086] Hierbei wird der Ausdruck "Ödem" in einem allgemeinen Sinn verwendet und er umfasst Zustände im Körper oder in Begleitung eines ischämischen Schlaganfalls, die durch eine Zunahme des extravaskulären Gewebewassergehalts entweder aufgrund von erhöhtem freiem extrazellulärem Wasser allein oder in Kombination mit erhöhtem intrazellulärem Wasser gekennzeichnet sind. Die Zunahme des Hirnvolumens kann beispielsweise das Ergebnis eines erhöhten zerebralen Blutvolumens und/oder eines erhöhten Gewebewassergehalts sein. Der hier

verwendete Ausdruck "Ödem" umfasst die pathologischen Zustände, die einschlägig als vasogenes Ödem und cytotoxisches Ödem bezeichnet werden. Typischerweise ist der als vasogenes Ödem bezeichnete Zustand dadurch gekennzeichnet, dass er mit dem Bruch der Blut-Hirn-Schanke (BBB) verbunden ist, während ein cytotoxisches Ödem dadurch gekennzeichnet ist, dass es mit einem intakten BBB verbunden ist. Hirnödem wird allgemein in dem Übersichtsartikel von Hariri, Neurosurgical Intensive Care 5: 687 (1994) beschrieben.

[0087] Es wird in Betracht gezogen, dass die hVEGF-Antagonisten der vorliegenden Erfindung allein oder in Kombination mit anderen Therapien zur Verringerung oder Hemmung eines derartigen Ödems im Hirn verabreicht werden können.

[0088] Ferner ist bei Säugern, die einen Schlaganfall haben oder erlitten haben, die Entwicklung oder Bildung eines Hirnödems häufig. Es ist einschlägig bekannt, dass ein Schlaganfall bei einem Patienten als verschiedene spezielle Arten eines Schlaganfalls in Abhängigkeit von beispielsweise der Ätiologie oder Pathologie der Unterbrechung der Durchblutung, den betroffenen Zellarten oder Geweben und dem Vorhandensein einer Blutextravasation in Gewebe (wie Hirngewebe) gekennzeichnet oder klassifiziert werden kann. Die verschiedenen Arten eines Schlaganfalls, die klinisch charakterisiert wurden, umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, thrombotischen Schlaganfall, embolischen Schlaganfall, häodynamischen Schlaganfall, Iakunären Schlaganfall und hämorrhagische Schlaganfälle, die von intrazerebraler, subarachnoidal, intraventrikulärer oder subduraler Hämorrhagie abgeleitet sind oder davon herühren. Der erfahrene Mediziner erkennt ohne weiteres die Natur derartiger Schlaganfallzustände und er versteht diese und kann das Vorhandensein oder die Symptome derartiger Zustände bei Patienten detektieren und diagnostizieren. Die vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren ziehen in Betracht, dass die hVEGF-Antagonistenmoleküle bei der Behandlung von ischämischen Schlaganfallzuständen, insbesondere zur Verringerung oder Hemmung eines Ödems und zum Schutz vor einer Zell- und Gewebebeschädigung verwendet werden können. Die hVEGF-Antagonisten können als Akutbehandlung nach dem Einsetzen eines ischämischen Schlaganfalls zur Verringerung oder Hemmung von beispielsweise einem Hirnödem verabreicht werden, um dadurch die Erholung des Säugers von dem ischämischen Schlaganfall zu verstärken. Die Verwendung der hVEGF-Antagonisten ist insofern vorteilhaft, als die Behandlung die Durchführung einer Operation (wie einer Kraniotomie) an dem Säuger zur Verringerung oder Linderung von intrakranalem Druck aufgrund einer übermäßigen Wasseransammlung in Hirngeweben verhindern oder vermeiden kann. Es wird auch in Betracht gezogen, dass bei einer Verringerung oder

Prävention eines derartigen Ödems durch die hVEGF-Antagonisten eine Verringerung (d. h. Schutzwirkung) der Menge von Gehirn und neuronalem Gewebe, das durch intrakranialen Druck und Ödem typischerweise geschädigt werden kann, erfolgt.

[0089] In Abhängigkeit von der Art und Schwere der Erkrankung oder des Zustands, die behandelt werden, sind etwa 1 kg bis 15 mg/kg Antagonist eine Anfangskandidatendosierung zur Verabreichung an den Patienten, entweder beispielsweise durch eine oder mehrere getrennte Verabreichungen oder durch kontinuierliche Infusion. Eine typische Tagesdosis kann in Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren im Bereich von etwa 1 µg/kg bis 100 mg/kg oder mehr liegen. Für wiederholte Verabreichungen über mehrere Tage oder länger wird die Behandlung in Abhängigkeit von dem Zustand wiederholt, bis eine gewünschte Verringerung der Krankheitssymptome erfolgt. Jedoch können andere Dosierungsprotokolle günstig sein. Beispielsweise kann es bei dem Verfahren zur Behandlung eines Hirnödems oder ischämischen Schlaganfalls günstig sein, den (die) hVEGF-Antagonisten unmittelbar bei der Detektion oder Diagnose bei dem Patienten innerhalb von mehreren Stunden der Läsion oder des Einsetzens eines Schlaganfalls oder innerhalb von 1 bis 4 Tagen danach zu verabreichen. Das gewünschte Verabreichungsprotokoll hängt typischerweise vom Urteil des behandelnden Mediziners ab. Der Fortschritt der hVEGF-Antagonistentherapie wird durch herkömmliche Techniken und Tests, die beispielsweise radiographische Techniken (insbesondere Magnetic Resonance Imaging, MRI) für Ödembildung in Verbindung mit einem ischämischen Schlaganfall oder die Überwachung des intrakranialen Drucks wegen einem Hirnödem umfassen, überwacht.

[0090] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Wirksamkeit des Antagonisten zur Prävention oder Behandlung eines Zustands oder einer Erkrankung durch eine serielle Verabreichung des Antagonisten oder eine Verabreichung in Kombination mit einem weiteren Mittel, das für diese Zwecke wirksam ist, beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF), einem Antikörper mit der Fähigkeit zur Hemmung oder Neutralisation der angiogenen Aktivität von saurem oder basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) oder Hepatocytenwachstumsfaktor (HGF), einem Antikörper mit der Fähigkeit zur Hemmung oder Neutralisation der Koagulationsaktivitäten von Gewebefaktor, Protein C oder Protein S (siehe Esmon et al., PCT-Patentveröffentlichung WO 91/01753, veröffentlicht am 21. Februar 1991), einem Antikörper mit der Fähigkeit zur Bindung an den HER2-Rezeptor (siehe Hudziak et al., PCT-Patentveröffentlichung WO 98/06692, veröffentlicht am 27. Juli 1989), oder einem oder mehreren herkömmlichen therapeutischen Mitteln, beispielsweise Alkylierungsmitteln, Folsäureantagonisten, Antimetaboliten

des Nucleinsäurestoffwechsels, Antibiotika, Pyrimidinanaloga, 5-Fluoruracil, Cisplatin, Purinnucleosiden, Aminen, Aminosäuren, Triazolnucleosiden oder Corticosteroiden, verbessert werden. Derartige weitere Mittel können in der zu verabreichenden Zusammensetzung vorhanden sein oder getrennt verabreicht werden. Insbesondere bei der Behandlung eines Ödems bei einem ischämischen Schlaganfall kann der Antagonist seriell oder in Kombination mit Mitteln, wie antiviralen, antimykotischen oder antiparasitischen Mitteln, Antibiotika, Thrombolytika (wie t-PA), osmotischen Therapeutika (beispielsweise Mannit) oder Steroiden (wie Decadron oder Prednison), verabreicht werden. Die Verwendung derartiger Mittel in Kombination mit dem Antagonisten ist dem praktizierenden Arzt üblicher Erfahrung geläufig und natürlich hängt die Wahl derartiger Mittel beispielsweise von der behandelten Erkrankung oder dem behandelten Zustand ab.

[0091] Ferner wird in Betracht gezogen, dass der hVEGF-Antagonist seriell mit hVEGF, insbesondere bei der Behandlung eines ischämischen Schlaganfalls, verabreicht werden kann. Bei der Diagnose oder Detektion eines ischämischen Schlaganfalls kann der hVEGF-Antagonist unmittelbar oder innerhalb von etwa 1 bis 4 Tagen nach dem Einsetzen des ischämischen Schlaganfalls verabreicht werden. Es wird angenommen, dass es nach der Beendigung der Verabreichung des Antagonisten zur Verringerung oder Hemmung einer Ödembildung vorteilhaft sein kann, dem Patienten eine Menge von hVEGF zu verabreichen, die ausreichend ist, um die Revaskularisation zu stimulieren oder zu fördern. Vorzugsweise ist der hVEGF eine rekombinante Form von hVEGF und er wird in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger verabreicht.

[0092] Die folgenden Beispiele werden nur zur Erläuterung angeboten und sollen die Erfindung in keiner Weise beschränken.

BEISPIELE

[0093] Im Handel erhältliche Reagenzien, die in den Beispielen angegeben wurden, wurden nach den Vorschriften des Herstellungs, falls nicht anders angegeben, verwendet. Die Quelle der Zellen, die in den folgenden Beispielen und durchgängig in der Beschreibung durch ATCC-Hinterlegungsnummern identifiziert sind, ist die American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

BEISPIEL 1

Herstellung von Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpern

[0094] Zur Gewinnung von mit Schlüssellochnacktschnecken-Hämocyanin (KLH) konjugiertem hVE-

GF zur Immunisierung wurde rekombinanter hVEGF (165 Aminosäuren), Leung et al., Science 246: 1306 (1989), mit KLH mit einem Verhältnis von 4:1 in Gegenwart von 0,05% Glutaraldehyd gemischt und das Gemisch 3 h unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) bei 4°C über Nacht dialysiert.

[0095] Balb/c-Mäuse wurden alle zwei Wochen viermal durch intraperitoneale Injektionen mit mit 20 µg KLH konjugierten 5 µg hVEGF immunisiert und mit der gleichen Dosis hVEGF, der mit KLH konjugiert war, vier Tage vor der Zellfusion zur Verstärkung immunisiert.

[0096] Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden mit P3X63Ag8U.1-Myelomzellen, Yelton et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1 (1978) unter Verwendung von 35% Polyethylenglykol (PEG) gemäß der Beschreibung von Yarmush et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 2899 (1980) fusioniert. Hybridome wurden in HAT-Medium selektiert.

[0097] Überstände von Hybridomzellkulturen wurden auf Anti-hVEGF-Antikörperproduktion durch einen ELISA-Assay unter Verwendung von mit hVEGF beschichteten Mikrotiterplatten gescreent. Antikörper, der in jeder der Vertiefungen an hVEGF gebunden war, wurde unter Verwendung von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG-Immunglobulin und dem chromogenen Substrat p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, S. 597 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Hybridomzellen, von denen auf diese Weise bestimmt wurde, dass sie Anti-hVEGF-Antikörper produzieren, wurden durch Grenzverdünnung subkloniert und zwei dieser Klone mit der Bezeichnung A4.6.1 und B2.6.2 wurden für weitere Untersuchungen gewählt.

BEISPIEL 2

Charakterisierung von Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpern

A. Antigenspezifität

[0098] Die Bindungsspezifitäten der durch die Hybridome A4.6.1 und B2.6.2 produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper wurden durch ELISA bestimmt. Die monoklonalen Antikörper wurden zu den Vertiefungen von Mikrotiterplatten, die zuvor mit hVEGF, FGF, HGF oder epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) beschichtet worden waren, gegeben. Gebundener Antikörper wurde mit mit Peroxidase konjugierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-Immunglobulinen detektiert. Die Ergebnisse dieser Assays zeigten, dass die durch die A4.6.1- und B2.6.2-Hybridome produzierten monoklonalen Antikörper an hVEGF, jedoch

nicht detektierbar an die anderen Proteinwachstumsfaktoren binden.

B. Epitopkartierung

[0099] Ein ELISA kompetitiver Bindung wurde verwendet, um zu bestimmen, ob die durch die A4.6.1- und B2.6.2-Hybridome produzierten monoklonalen Antikörper an die gleichen oder verschiedene Epitope (Stellen) innerhalb von hVEGF binden. Kim et al., Infect. Immun. 57: 944 (1989). Individuelle unmarkierte Anti-hVEGF-monoklonale-Antikörper (A4.6.1 oder B2.6.2) oder irrelevanter Anti-HGF-Antikörper (IgG1-Isotyp) wurden zu den Vertiefungen von Mikrotiterplatten, die zuvor mit hVEGF beschichtet wurden, gegeben. Biotinylierte Anti-hVEGF-monoklonale-Antikörper (BIO-A4.6.1 oder BIO-B2.6.2) wurden dann zugegeben. Das Verhältnis von biotinyliertem Antikörper zu unmarkiertem Antikörper betrug 1: 1000. Die Bindung der biotinylierten Antikörper wurde durch Zugabe von mit Avidin konjugierter Peroxidase und anschließend o-Phenyldiamindihydrochlorid und Wasserstoffperoxid sichtbar gemacht. Die Farbreaktion, die die Menge von gebundenem biotinyliertem Antikörper anzeigen, wurde durch Messung der optischen Dichte (O.D) bei einer Wellenlänge von 495 nm bestimmt.

[0100] Wie in Fig. 1 gezeigt ist, wurde in jedem Fall die Bindung des biotinylierten Anti-hVEGF-Antikörpers durch den entsprechenden unmarkierten Antikörper, jedoch nicht durch den anderen unmarkierten Anti-hVEGF-Antikörper oder den Anti-HGF-Antikörper gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch die A4.6.1- und B2.6.2-Hybridome produzierten monoklonalen Antikörper an verschiedene Epitope innerhalb von hVEGF binden.

C. Isotypbestimmung

[0101] Die Isotypen der durch die A4.6.1- und B2.6.2-Hybridome produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper wurden durch ELISA bestimmt. Proben von Kulturmedium (Überstand), in denen die einzelnen Hybridome wuchsen, wurden zu den Vertiefungen von Mikrotiterplatten, die zuvor mit hVEGF beschichtet wurden, gegeben. Die eingefangenen Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper wurden mit verschiedenen isotypspezifischen, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulinen inkubiert und die Bindung der konjugierten Antikörper an die Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper wurde durch die Zugabe von p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Die Farbreaktion wurde bei 405 nm mit einer ELISA-Plattenlesevorrichtung ermittelt.

[0102] Durch dieses Verfahren wurde der Isotyp der durch sowohl das A4.6.1- als auch B2.6.2-Hybridom

produzierten monoklonalen Antikörper als IgG1 bestimmt.

D. Bindungsaffinität

[0103] Die Affinitäten der durch die A4.6.1- und B2.6.2-Hybridome produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper für hVEGF wurden durch Assays kompetitiver Bindung bestimmt. Eine vorbestimmte suboptimale Konzentration eines monoklonalen Antikörpers wurde zu Proben gegeben, die 20000–40000 cpm ^{125}I -hVEGF (1–2 ng) und verschiedene bekannte Mengen von nichtmarkiertem hVEGF (1–1000 ng) enthielten. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurden 100 μl von Ziegen-Anti-Maus-Ig-Antiserum (Pel-Freez, Rogers, AR, USA) zugegeben, und die Gemische wurden eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Komplexe aus Antikörper und gebundenem Protein (Immunkomplexe) wurden durch Zugabe von 500 μl von 6 Polyethylenglykol (PEG, Molekulargewicht 8000) bei 4°C ausgefällt, worauf eine Zentrifugation mit 2000 $\times G$ während 20 min bei 4°C folgte. Die Menge von an dem Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper gebundenem ^{125}I -hVEGF in jeder Probe wurde durch Zählen des pelletisierten Materials in einem Gammazähler bestimmt.

[0104] Affinitätskonstanten wurden aus den Daten durch Scatchard-Analyse berechnet. Die Affinität des durch das A4.6.1-Hybridom produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpers wurde als $1,2 \times 10^9 \text{ l/mol}$ berechnet. Die Affinität des durch das B2.6.2-Hybridom produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpers wurde als $2,5 \times 10^9 \text{ l/mol}$ berechnet.

E. Hemmung der mitogenen Aktivität von hVEGF

[0105] Rindernebennierenrindenkapillarendothel (ACE) zellen, Ferrara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 5773 (1987), wurden mit einer Dichte von 10^4 Zellen/ml in 12-Mehrfachvertiefungen-Platten ausgesät und 2,5 ng/ml hVEGF wurde zu jeder Vertiefung in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen der durch die A4.6.1- oder B2.6.2-Hybridome produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper oder eines irrelevanten Anti-HGF-monoklonalen-Antikörpers gegeben. Nach Kultivieren während 5 Tagen wurden die Zellen in jeder Vertiefung in einem Coulter Counter gezählt. Als Kontrolle wurden ACE-Zellen in Abwesenheit von zugesetztem hVEGF kultiviert.

[0106] Wie in [Fig. 2](#) gezeigt ist, zeigten die beiden Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper die Fähigkeit des zugesetzten hVEGF, das Wachstum oder Überleben der Rinder-ACE-Zellen zu unterstützen. Der durch das A4.6.1-Hybridom produzierte monoklonale Antikörper hemmte die mitogene Aktivität von hVEGF vollständig (mehr als etwa 90% Hemmung), während der durch das B2.6.2-Hybridom produzierte monoklonale Antikörper die mitogene Aktivität von hVEGF nur partiell hemmte.

monoklonale Antikörper die mitogene Aktivität von hVEGF nur partiell hemmte.

F. Hemmung der hVEGF-Bindung

[0107] Rinder-ACE-Zellen wurden mit einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/0,5 ml/Vertiefung in 24-Vertiefungen-Mikrotiterplatten in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das 10% Kälberserum, 2 mM Glutamin und 1 ng/ml basischen Fibroblastenwachstumsfaktor enthielt, ausgesät. Nach dem Kultivieren über Nacht wurden die Zellen einmal in Bindungspuffer (gleiche Volumina von DMEM und F12-Medium + 25 mM HEPES und 1 Rinderserumalbumin) bei 4°C gewaschen.

[0108] 12000 cpm ^{125}I -hVEGF (etwa 5×10^4 cpm/ng/ml) wurden 30 min mit 5 μg des durch A4.6.1-, B2.6.2- oder A2.6.1-Hybridom produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörpers vorinkubiert (250 μl Gesamtvolumen), und danach wurden die Gemische zu den Rinder-ACE-Zellen in den Mikrotiterplatten gegeben. Nach Inkubation der Zellen während 3 h bei 4°C wurden die Zellen dreimal mit Bindungspuffer bei 4°C gewaschen, durch Zugabe von 0,5 ml 0,2 N NaOH solubilisiert und in einem Gammazähler gezählt.

[0109] Wie in [Fig. 3](#) (oberer Teil) gezeigt ist, hemmten die durch die A4.6.1- und B2.6.2-Hybridome produzierten Anti-hVEGF-monoklonalen-Antikörper die Bindung von hVEGF an die Rinder-ACE-Zellen. Im Gegensatz dazu hatte der durch das A2.6.1-Hybridom produzierte Anti-hVEGF-monoklonale-Antikörper keine offensichtliche Wirkung auf die Bindung von hVEGF an die Rinder-ACE-Zellen. Konsistent mit den in dem oben beschriebenen Zellproliferationsassay erhaltenen Ergebnissen hemmte der durch das A4.6.1-Hybridom produzierte monoklonale Antikörper die Bindung von hVEGF in einem größeren Ausmaß als der durch das B2.6.2-Hybridom produzierte monoklonale Antikörper.

[0110] Wie in [Fig. 3](#) (unterer Teil) gezeigt ist, hemmte der durch das A4.6.1-Hybridom produzierte monoklonale Antikörper die Bindung von hVEGF an die Rinder-ACE-Zellen mit einem 1:250-Molverhältnis von hVEGF zu Antikörper.

G. Kreuzreaktivität mit anderen VEGF-Isoformen

[0111] Um zu bestimmen, ob der durch das A4.6.1-Hybridom produzierte Anti-hVEGF-monoklonale-Antikörper mit den Formen von hVEGF mit 121 und 189 Aminosäuren reaktiv ist, wurde der Antikörper auf dessen Fähigkeit zur Immunpräzipitation dieser Polypeptide getestet.

[0112] Humane 293-Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, die die Nucleotidcodierungssequenz der hVEGF-Polypeptide mit 121 und 189 Aminosäuren

gemäß der Beschreibung, Leung et al., Science 246: 1306 (1989), umfassten. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in Medium übertragen, dem Cystein und Methionin fehlte. Die Zellen wurden 30 min in diesem Medium inkubiert und dann wurden 100 μ Ci/ml von jeweils 35 S-Methionin und 35 S-Cystein zu dem Medium gegeben und die Zellen weitere 2 h inkubiert. Die Markierung wurde durch Übertragung der Zellen in serumfreies Medium und Inkubation während 3 h vertrieben. Die Zellkulturmedien wurden gewonnen und die Zellen wurden durch Inkubation während 30 min in Lysepuffer (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Desoxycholat, 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM Tris, pH-Wert 8,0) lysiert. Zellreste wurden von den Lysaten durch Zentrifugation mit 200 \times G während 30 min entfernt.

[0113] 500- μ l-Proben von Zellkulturmedien und Zelllysaten wurden mit 2 μ l von A4.6.1-Hybridom-Antikörper (2,4 mg/ml) 1 h bei 4°C inkubiert und dann mit 5 μ l Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Immunglobulin 1 h bei 4°C inkubiert. Immunkomplexe von 35 S-markiertem hVEGF und Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper wurden mit Protein-A-Sepharose (Pharmacia) gefällt und dann SDS – 12% Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen unterzogen. Das Gel wurde auf einen Röntgenfilm zur Analyse der immunpräzipitierten radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie einwirken gelassen.

[0114] Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass der durch das A4.6.1-Hybridom produzierte Anti-hVEGF-monoklonale-Antikörper eine Kreuzreaktion mit der Form von hVEGF sowohl mit 121 Aminosäuren als auch mit 189 Aminosäuren einging.

BEISPIEL 3

Herstellung von VEGF-Rezeptor/IgG-Fusionsproteinen

A.

[0115] Die Nucleotid- und Aminosäurecodierungssequenzen des flt-hVEGF-Rezeptors sind in Shibuyat et al., Oncogene 5: 519–524 (1990) offenbart. Die codierende Sequenz der gesamten extrazellulären Domäne des flt-hVEGF-Rezeptors wurde mit der codierenden Sequenz der schweren Kette von humanem IgG1 in einem zweistufigen Verfahren fusioniert.

[0116] Positionsspezifische Mutagenese wurde zur Einführung einer BstBI-Restriktion in DNA mit Codierung für flt an einer Stelle 5' zu dem Codon für die Aminosäure 759 von flt und zur Umwandlung der singulären BstEII-Restriktionsstelle in dem Plasmid pBSSK- FC, Bennett et al., J. Biol. Chem. 266: 23060–23067 (1991), in eine BstBI-Stelle verwendet. Das modifizierte Plasmid wurde mit EcoRI und Bst-

BI verdaut und das gebildete große Fragment von Plasmid-DNA wurde mit einem EcoRI-BStBI-Fragment der flt-DNA mit Codierung für die extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 1-758) des flt-hVEGF-Rezeptors zusammenligiert.

[0117] Das gebildete Konstrukt wurde mit Clal und NotI verdaut, wobei ein Fragment von etwa 3,3 kb erzeugt wurde, das dann in die multiple Klonierungsstelle des Säugerexpressionsvektors pHEBO2 (Leung et al., Neuron 8: 1045 (1992)) durch Ligation inseriert wird. Die Enden des 3,3-kb-Fragments werden beispielsweise durch Addition von Linkern modifiziert, um die Insertion des Fragments in den Vektor in der richtigen Orientierung zur Expression zu erhalten.

[0118] Säugerwirtszellen (beispielsweise CEN4-Zellen (Leung et al., aaO)) werden mit dem pHEBO2-Plasmid, das das flt-Insert enthält, durch Elektroporation transfiziert. Transfizierte Zellen werden in Medium, das etwa 10 fetales Rinderserum, 2 mM Glutamin und Antibiotika enthält, kultiviert und bei etwa 75% Konfluenz in serumfreies Medium übertragen. Das Medium wird 3–4 Tage vor der Gewinnung konditioniert, und das flt-IgG-Fusionsprotein wird aus dem konditionierten Medium durch Chromatographie auf einer Protein-A-Affinitätsmatrix im wesentlichen gemäß der Beschreibung bei Bennett et al., J. Biol. Chem. 266: 23060–23067 (1991) gereinigt.

B.

[0119] Humane flt-IgG (als hflt(1-3)-IgG bezeichnet) -cDNA wurde gemäß der Beschreibung bei Davis-Smyth et al., EMBO J. 15: 4919–4927 (1996) konstruiert. Diese gestutzte Rezeptorform umfasste nur die ersten drei immunglobulinähnlichen Domänen von humanem fit an ein Fc-IgG fusioniert. Siehe Ferrara et al., Nature Medicine 4: 336 (1998).

[0120] Ein murines flt-IgG (als mflt(1-3)-IgG bezeichnet) wurde durch PCR-Amplifikation von Maus-cDNA eines 17 Tage alten Embryos (Clontech, Palo Alto, CA) unter Verwendung von Primern gemäß der Beschreibung bei Ferrara et al., aaO, konstruiert. Die Gestaltung des 3'-PCR-Primers stellte sicher, dass die Expression des mflt-1(1-3) in Frame mit einem murinen IgG2b-Fc-Klon war. Das gebildete 1-kb-Fragment wurde zunächst in einen TA-Klonierungsvektor (Invitrogen, San Diego, CA) als Clal-BstEII-Fragment kloniert. Dieses Fragment wurde an das 5'-Ende von murinem IgG2b-Fc in einem pRK-Vektor ligiert. Dieses Plasmid ermöglichte die Expression eines mflt(1-3)-IgG-Fusionsproteins bei Transfektion in Säugerzellen.

[0121] Zur Expression in CHO-Zellen wurden die cDNAs in einen dicistronischen Vektor, der die Expression des Markers Dihydrofolatreduktase mit der Ex-

pression des von fit abgeleiteten Fusionsproteins verknüpft, subkloniert. Siehe Lucas et al., Nucleic Acid Res. 24: 1774–1779 (1996). Plasmide wurden in DP 12-Zellen, ein Derivat der CHO-KIDUXBII-Zelllinie, die von L. Chasin (Columbia University, New York) entwickelt wurde, durch Lipofektion eingeführt und auf Wachstum in Glycin-Hypoxanthin-Thymidin(G-H-T)-freiem Medium selektiert. Chisholm et al., DNA Cloning 4: A Practical Approach, Mammalian Systems (Hrsg. Glover & Hames) S. 1–39 (Oxford Press, 1995). Klone der ersten Selektionsrunde wurden anschließend mit zunehmenden Konzentrationen von Methotrexat ausplattiert. Die Klone wurden dann auf die Produktion von humanem oder murinem Fc durch ELISA gescreent. Klone, die die höchste Produktion zeigten, wurden zur Suspensionskultur angepasst, und serumfreie Kulturen wurden geerntet und durch Protein-A-Sepharose gereinigt. Proteinkonzentrationen wurden durch Aminosäureanalyse bestimmt. Der Endotoxingehalt des gereinigten Endmaterials überstieg 0,5 eu/mg nicht.

[0122] Gemäß der Beschreibung bei Ferrara et al., aaO, waren sowohl das murine flt(1-3)-IgG-Fusionsprotein als auch das humane flt(1-3)-IgG-Fusionsprotein hinsichtlich der Hemmung der Bioaktivität von VEGF in dem getesteten Nagetiermodell aktiv.

BEISPIEL 4

Hemmung des Tumorwachstums mit hVEGF-Antagonisten

[0123] Verschiedene in Kultur wachsende humane Tumorzelllinien wurden auf die Produktion von hVEGF durch ELISA getestet. Es wurde ermittelt, dass Ei-erstock-, Lungen-, Kolon-, Magen-, Brust- und Hirntumorzelllinien hVEGF produzierten. Drei Zelllinien, die hVEGF produzierten, NEG 55 (auch als G55 bezeichnet) (humane Gliomzelllinie, von Dr. M. Westphal, Department of Neurosurgery, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Deutschland, erhalten, auch als G55 bezeichnet), A-673 (humane Rhabdomyosarcomzelllinie, von der American Type Culture Collection (ATCC) als Zelllinie Nummer CRL 1598 erhalten) und SK-LMS-1 (Leiomyosarcomzelllinie, von der ATCC als Zelllinie Nummer HTB 88 erhalten), wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

[0124] Sechs bis zehn Wochen alte weibliche Beige/nackte Mäuse (Charles River Laboratory, Wilmington, Massachusetts, USA) erhielten subkutan $1\text{--}5 \times 10^6$ Tumorzellen in 100–200 µl PBS injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Feststellung von Tumorwachstum erhielten die Mäuse intraperitoneal einmal oder zweimal pro Woche verschiedene Dosen von A4.6.1-Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper, einem irrelevanten Anti-gp120-monoklonalen-Antikörper (5B6) oder PBS injiziert. Die Tumogröße wurde jede Woche gemessen und am Ende der

Untersuchung wurden die Tumore herausgeschnitten und gewogen.

[0125] Die Wirkung verschiedener Mengen von A4.6.1-Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper auf das Wachstum von NEG-55-Tumoren in Mäusen ist in [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) gezeigt. [Fig. 4](#) zeigt, dass Mäuse, die mit 25 µg oder 100 µg von A4.6.1-Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper ab einer Woche nach der Inokulation von NEG-55-Zellen behandelt wurden, im Vergleich zu Mäusen, die mit entweder irrelevantem Antikörper oder PBS behandelt wurden, eine wesentlich verringerte Rate des Tumorwachstums aufwiesen. [Fig. 5](#) zeigt, dass fünf Wochen nach der Inokulation der NEG-55-Zellen die Größe der Tumore in mit A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper behandelten Mäusen etwa 50% (im Falle von mit 25-µg-Dosierungen des Antikörpers behandelten Mäusen) bis 85% (im Falle von mit 100-µg-Dosierungen des Antikörpers behandelten Mäusen) geringer als die Größe von Tumoren in mit irrelevantem Antikörper oder PBS behandelten Mäusen war.

[0126] Die Wirkung einer Behandlung mit A4.6.1-Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper auf das Wachstum von SK-LMS-1-Tumoren bei Mäusen ist in [Fig. 6](#) gezeigt. Fünf Wochen nach der Inokulation der SK-LMS-1-Zellen war die durchschnittliche Größe von Tumoren in mit dem A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper behandelten Mäusen etwa 75% geringer als die Größe von Tumoren in mit irrelevantem Antikörper oder PBS behandelten Mäusen.

[0127] Die Wirkung einer Behandlung mit A4.6.1-Anti-hVEGF-monoklonalem-Antikörper auf das Wachstum von A673-Tumoren bei Mäusen ist in [Fig. 7](#) gezeigt. Vier Wochen nach der Inokulation der A673-Zellen war die durchschnittliche Größe von Tumoren bei mit A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper behandelten Mäusen etwa 60% (im Falle von mit 10-µg-Dosierungen des Antikörpers behandelten Mäusen) bis mehr als 90% (im Falle von mit 50-400-µg-Dosierungen des Antikörpers behandelten Mäusen) geringer als die Größe von Tumoren in mit irrelevantem Antikörper oder PBS behandelten Mäusen.

BEISPIEL 5

Analyse der direkten Wirkung von Anti-hVEGF-Antikörper auf in Kultur wachsende Tumorzellen

[0128] Humane Glioblastomzellen NEG55 oder Rhabdomyosarcomzellen A673 wurden mit einer Dichte von 7×10^3 Zellen/Vertiefung in Mehrfachvertiefungenplatten (12 Vertiefungen/Platte) in F12/DMEM-Medium, das 10% fetales Kälberserum, 2 mM Glutamin und Antibiotika enthielt, ausgesät. A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper wurde dann zu den Zellkulturen bis zu einer Endkonzentration von 0–20,0 µg Antikörper/ml gegeben. Nach fünf Tagen wurden die

in den Vertiefungen wachsenden Zellen durch Einwirken von Trypsin dissoziiert und in einem Coulter Counter gezählt.

[0129] [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Wie offensichtlich ist, hatte der A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper keine signifikante Wirkung auf das Wachstum der NEG55- oder A673-Zellen in Kultur. Diese Ergebnisse zeigen, dass der A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper nicht cytotoxisch ist, und sie legen stark nahe, dass die beobachteten Antitumorwirkungen des Antikörpers auf dessen Hemmung einer VEGF-vermittelten Revaskularisation beruhen.

BEISPIEL 6

Wirkung von Anti-hVEGF-Antikörper auf Endothelzellenchemotaxis

[0130] Chemotaxis von Endothelzellen und anderen Zellen einschließlich von Monozyten und Lymphozyten spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von rheumatoider Arthritis. Endothelzellenmigration und -proliferation begleiten die Angiogenese, die im rheumatischen Synovium erfolgt. Vaskularisiertes Gewebe (Pannus) dringt in den Gelenkknorpel ein und zerstört diesen.

[0131] Um zu bestimmen, ob hVEGF-Antagonisten in diesen Prozess eingreifen, testeten wir die Wirkung des A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörpers auf die durch Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis stimulierte Endothelzellenchemotaxis. Als Kontrolle testeten wir auch die Wirkung des A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörpers auf die durch Synovia von Patienten mit Osteoarthritis stimulierte Endothelzellenchemotaxis (die Angiogenese, die bei rheumatoider Arthritis auftritt, tritt bei Osteoarthritis nicht auf).

[0132] Die Endothelzellenchemotaxis wurde unter Verwendung von modifizierten Boyden-Kammern gemäß etablierter Verfahren getestet. Thompson et al., Cancer Res. 51: 2670 (1991); Phillips et al., Proc. Exp. Biol. Med. 197: 458 (1991). Etwa 10^4 humane Nabelschnurvenenendothelzellen wurden an gelatinebeschichteten Filtern (Porengröße 0,8 µm) in 48-Vertiefungen-Mehrfachvertiefungenmikrokammern in Kulturmedium, das 0,1% fetales Rinderserum enthielt, anheften gelassen. Nach etwa 2 h wurden die Kammern invertiert und Testproben (Synovia von rheumatoider Arthritis, Synovia von Osteoarthritis, basischer FGF (bFGF) (bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml) oder PBS) und A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper (bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml) wurden zu den Vertiefungen gegeben. Nach 2 bis 4 h wurden Zellen, die migriert waren, angefärbt und gezählt.

[0133] [Fig. 10](#) zeigt die gemittelten Ergebnisse dieser Untersuchungen. Die in der Spalte mit der Bezeichnung "Synovia" und am Ende der Seite für die Kontrollen angegebenen Werte sind die durchschnittliche Zahl von Endothelzellen, die in Gegenwart von Synovia, bFGF oder PBS allein migrierten. Die Werte in der Spalte mit der Bezeichnung "Synovia + mAB VEGF" sind die durchschnittliche Zahl von Endothelzellen, die in Gegenwart von Synovia plus zugesetztem A4.6.1-Anti-hVEGF-Antikörper migrierten. Die Werte in der Spalte mit der Bezeichnung "% Unterdrückung" geben die prozentuale Verringerung der Synovia-induzierten Endothelzellenmigration aufgrund der Zugabe von Anti-hVEGF-Antikörper an. Wie angegeben, hemmte der Anti-hVEGF-Antikörper die Fähigkeit zur Induktion von Endothelzellenmigration von Synovia von rheumatoider Arthritis (53,40 durchschnittliche prozentuale Hemmung), jedoch nicht von Synovia von Osteoarthritis (13,64 durchschnittliche prozentuale Hemmung).

BEISPIEL 7

Wirkung eines VEGF-Antagonisten auf ein Hirnödem

[0134] Ein In-vivo-Assay wurde durchgeführt, um die Wirkungen eines flt-IgG-Antagonisten auf ein Hirnödem zu bestimmen. Der Verlust der BBB-Integrität und die Bildung eines Hirnödems erfolgen häufig bei der Pathogenese eines zerebralen Infarkts. Es wird angenommen, dass der Abbau der BBB bei einem ischämischen Schlaganfall überwiegend nach den ersten 24 h des Einsetzens eines Schlaganfalls erfolgt. Ferner wird angenommen, dass die vorteilhaften Wirkungen einer prompten und adäquaten Wiederherstellung der Durchblutung nach einem akuten ischämischen Ereignis durch eine Reperfusionsläsion des zerebralen Mikrogefäßsystems, das die BBB umfasst, unterminiert werden können, was zur Bildung eines Hirnödems beiträgt. Klatzo et al., Hrsg., Brain Edema, Tokio, Springer (1984), S. 1–5. Der im folgenden beschriebene In-vivo-Assay wurde gestaltet, um diese Aspekte des klinischen Zustands zu reflektieren.

[0135] Eine fokale kortikale Ischämie wurde in Maus-Hirn durch Verschluss der mittleren Hirnarterie (MCA) unter Verwendung der zuvor von Chen et al., Stroke 17: 738–743 (1986) beschriebenen Techniken induziert. Die Mäuse (C57BL-6J, 18–25 g) wurden mit 1,5% Isofluran in Sauerstoff anästhesiert. Die rechte MCA wurde durch eine Kraniotomie freigelegt und mit 11-0-Nahtmaterial ligiert. Die ipsilaterale Carotis communis wurde ebenfalls für die ischämische Periode verschlossen. Die Gefäße blieben 45 min verschlossen. Vor der Chirurgie wurden die Tiere willkürlich in zwei Gruppen geteilt und entweder murines flt-IgG (gemäß der Beschreibung im obigen Beispiel 3B, ebenfalls bei Ferrara et al., Nature Medicine 4:

336 (1998) beschrieben) oder ein irrelevanter muriner Kontrollantikörper Anti-GP120, der zu dem gleichen Isotyp wie das Fc in dem fIgG gehörte [Ferrara et al., aaO], wurde intraperitoneal mit einer Dosis von 10 mg/kg 12 h vor der Chirurgie, zum Zeitpunkt der Reperfusion und erneut 1 und 2 Tage nach der Chirurgie verabreicht. Der Grad der Ödembildung wurde durch T2-gewichtete MR-Bildgebung 24 h nach dem Einsetzen von Ischämie festgestellt. Die tatsächliche Größe des Infarkts wurde 8–12 Wochen später unter Verwendung von hochauflösender anatomischer MRI festgestellt. Ein Teilsatz von Tieren ($n = 12$) wurde zur Verifizierung der Infarktgröße unter Verwendung herkömmlicher Histologietechniken verwendet.

[0136] Wie in **Fig. 11** gezeigt ist, bewirkte die Verabreichung von fIgG eine signifikante Verringerung des Volumens eines Hirnödems, das durch die Region von Hyperintensität auf dem T2-gewichteten MRI-Scan, das einen Tag nach dem Einsetzen von Ischämie aufgenommen wurde, definiert ist (27 Verringerung, $p = 0,01$ Student-t-Test, $n = 15$ und 16 bei Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen). Repräsentative T2-gewichtete MR-Bilder, die das Auftreten eines kortikalen Ödems als Region hoher Signalintensität im Vergleich zur kontralateralen Seite zeigen, sind in **Fig. 12** angegeben. In diesem Modell führt das Fortschreiten einer ischämischen Läsion zur Abnahme von kortikalem Gewebe und Kavitation. Das letztendliche Infarktvolumen kann daher aus hochauflösenden anatomischen Bildern durch Wiedergabe der Menge von nicht-betroffenem Kortex und Vergleichen desselben mit der kontralateralen Hemisphäre abgeschätzt werden. Wie in **Fig. 13** gezeigt ist, wird die Größe des kortikalen Infarkts durch die Verabreichung von fIgG signifikant verringert, was 8–12 Wochen später ermittelt wurde (26% Verringerung der Infarktgröße, $p = 0,009$ Student-t-Test, $n = 11$ und 14 bei Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen). Es gab eine gute Korrelation zwischen dem durch MRI ermittelten und dem unter Verwendung herkömmlicher Histologie bestimmten Infarktvolumen ($R^2 = 0,633$). Entsprechend zeigten die behandelten Tiere eine Verringerung der Entwicklung eines Hirnödems, was ferner verstärkte Neuroprotektion ergeben kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der biologischen Aktivität von VEGF Hirnödem und -läsion, die mit ischämischer Reperfusion in Verbindung stehen, verringern kann.

Patentansprüche

1. Verwendung eines hVEGF-Antagonisten bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Säugers mit einem Ödem in Verbindung mit einem ischämischen Schlaganfall oder zur Prävention eines Ödems bei einem Säuger, wobei das Ödem mit einem ischämischen Schlaganfall in Verbindung steht,

wobei der hVEGF-Antagonist in die Bindung von hVEGF an einen zellulären Rezeptor eingreift, und wobei der hVEGF-Antagonist (i) einen Antikörper oder ein Fragment desselben, die an hVEGF oder hVEGF-Rezeptor binden, (ii) ein Fragment oder eine Aminosäuresequenzvariante von hVEGF, die an hVEGF-Rezeptor binden, jedoch nicht eine biologische Aktivität von nativem hVEGF zeigen, oder (iii) einen hVEGF-Rezeptor oder eine Variante desselben, die hVEGF binden können, umfasst.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der ischämische Schlaganfall ein thrombotischer Schlaganfall, embolischer Schlaganfall, hämodynamischer Schlaganfall oder lakunärer Schlaganfall ist.

3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–2, wobei das Medikament zur Behandlung des Säugers unmittelbar nach der Detektion oder Diagnose des Schlaganfalls dient.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–2, wobei das Medikament zur Behandlung des Säugers innerhalb von 1 bis 4 Tagen nach dem Beginn des Schlaganfalls dient.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Säuger ein Mensch ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der hVEGF-Antagonist einen Anti-hVEGF-Antikörper umfasst.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Anti-hVEGF-Antikörper einen chimären Antikörper umfasst.

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei der Anti-hVEGF-Antikörper einen humanisierten Antikörper umfasst.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei der Antikörper einen monoklonalen Antikörper umfasst.

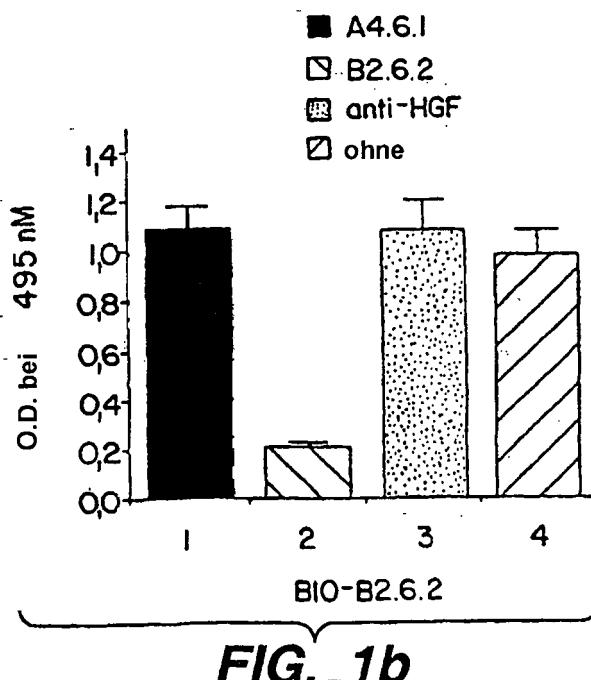
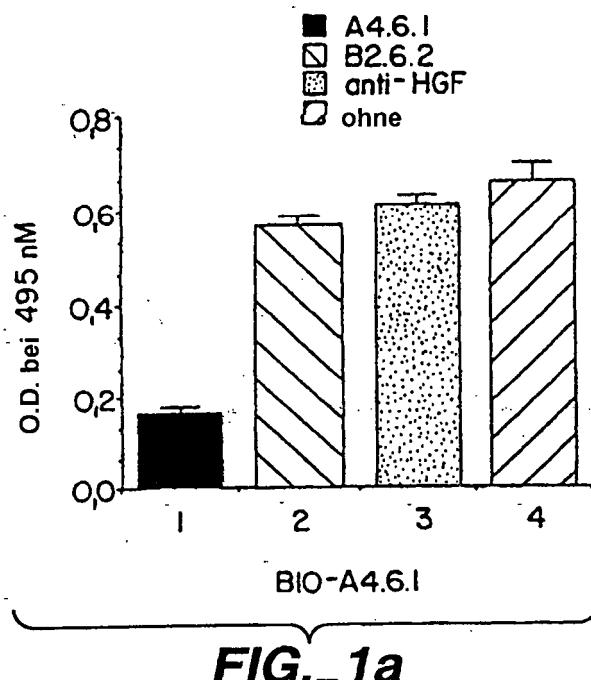
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der hVEGF-Antagonist ein hVEGF-Rezeptor-Fusionsprotein umfasst.

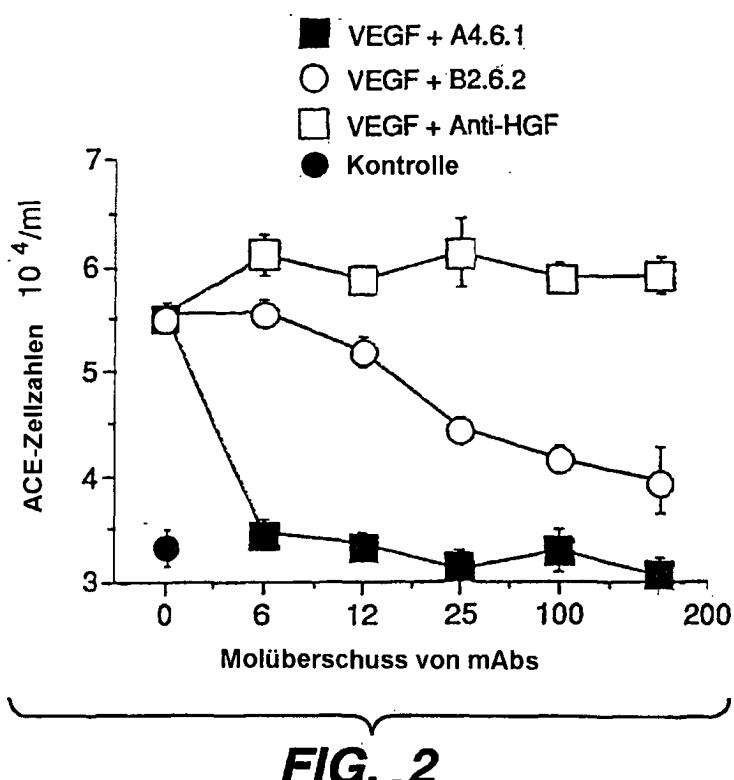
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das hVEGF-Rezeptor-Fusionsprotein eine Sequenz einer extrazellulären Domäne eines hVEGF-Rezeptors in Fusion an ein Immunglobulin umfasst.

12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, wobei das hVEGF-Rezeptor-Fusionsprotein ein fIgG-Fusionsprotein umfasst.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





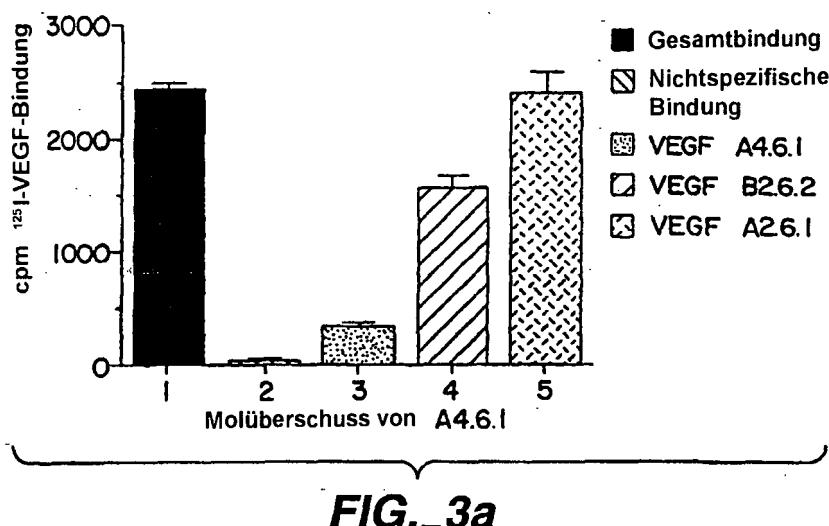


FIG._3a

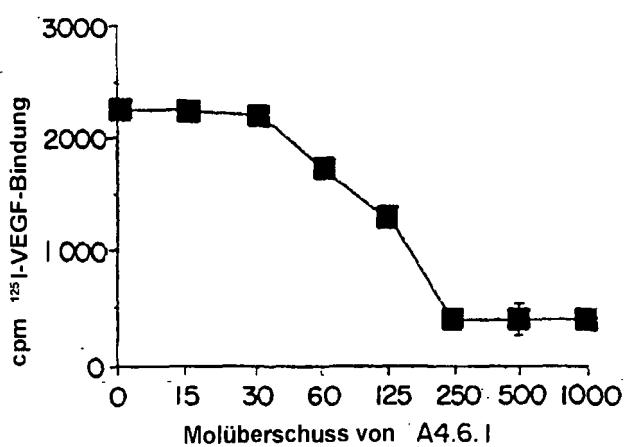


FIG._3b

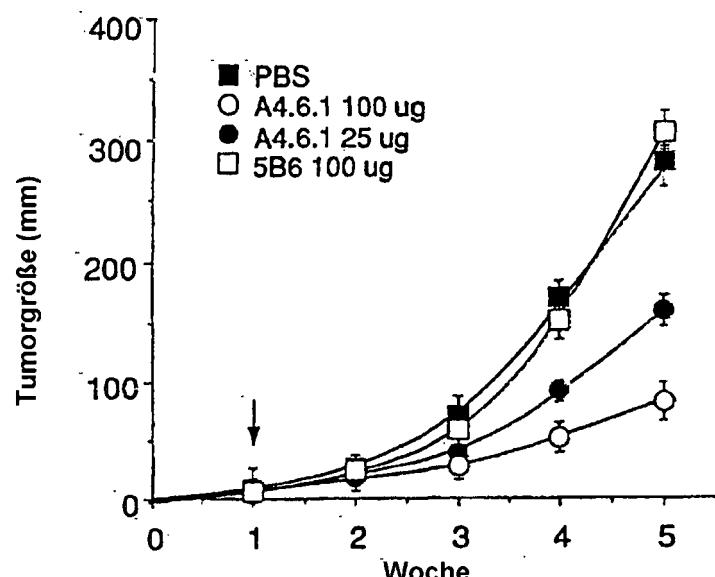


FIG._4

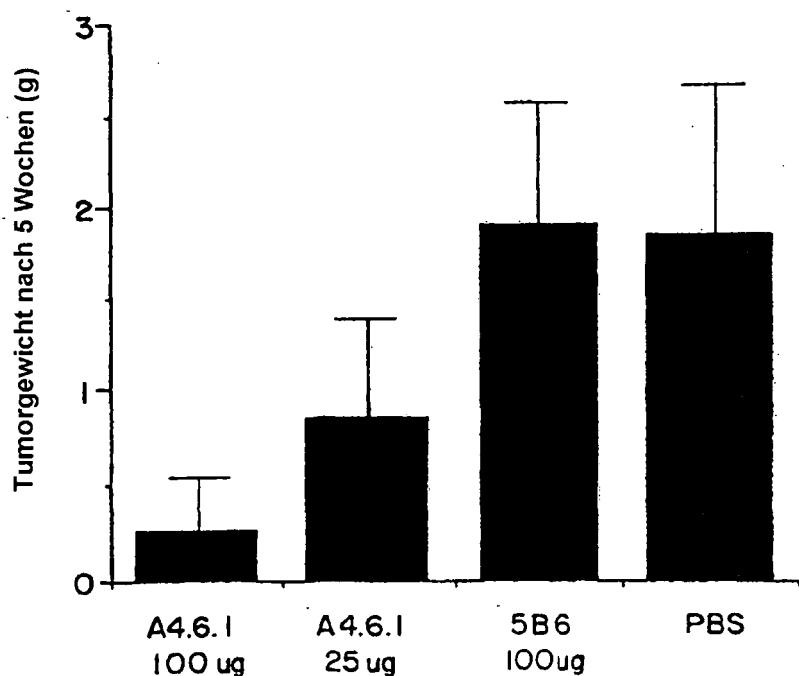
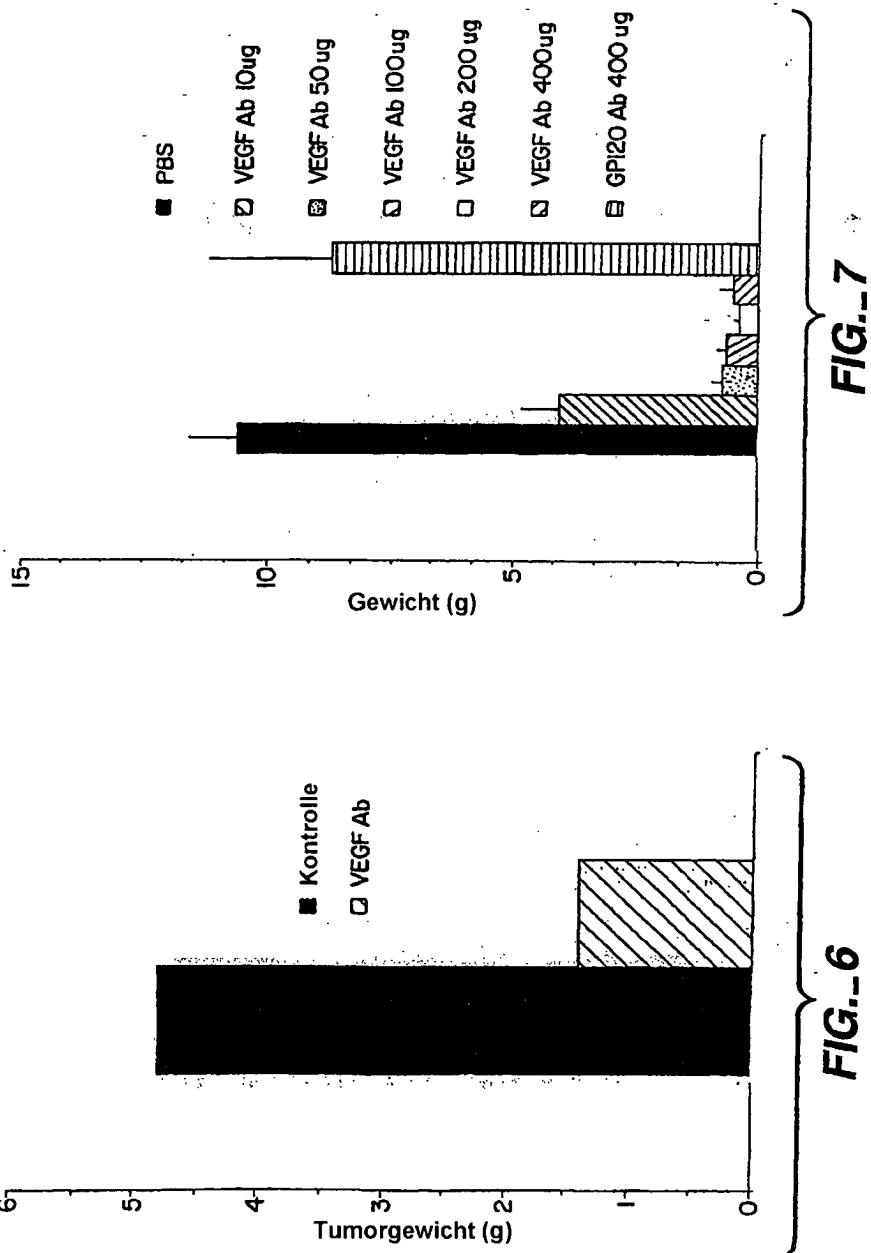


FIG._5



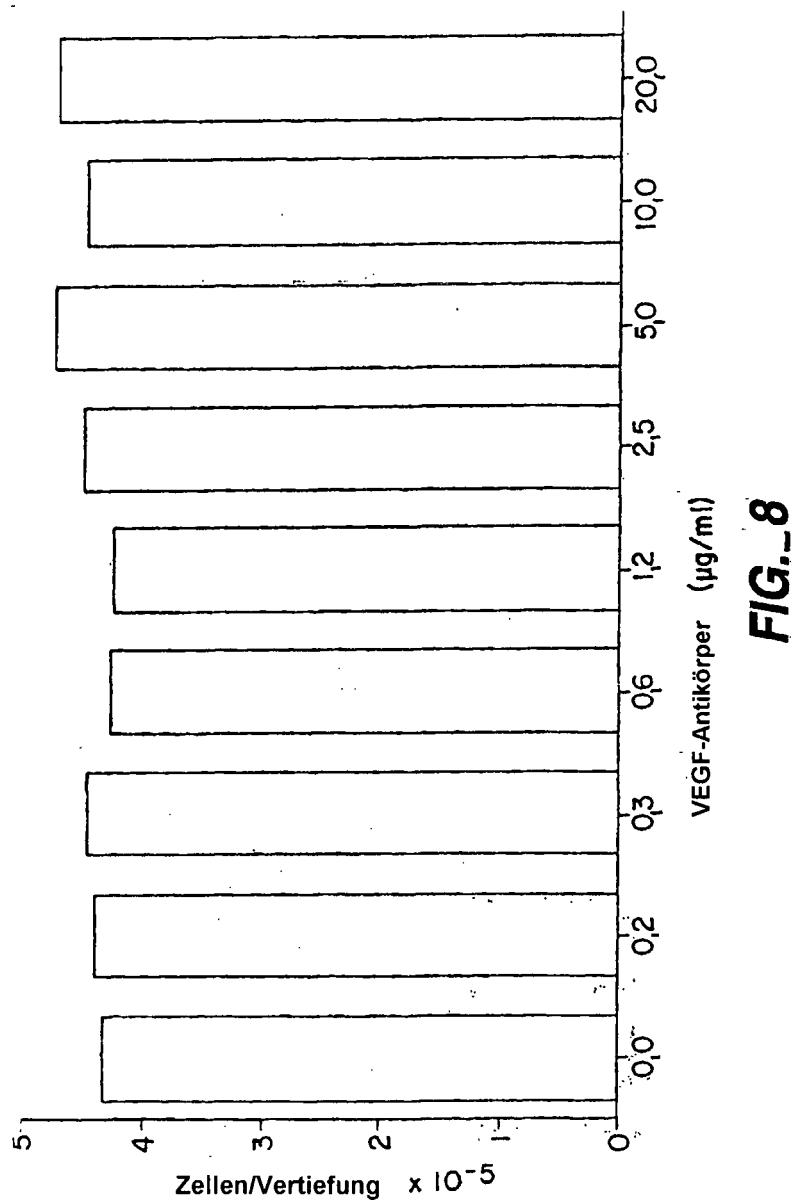
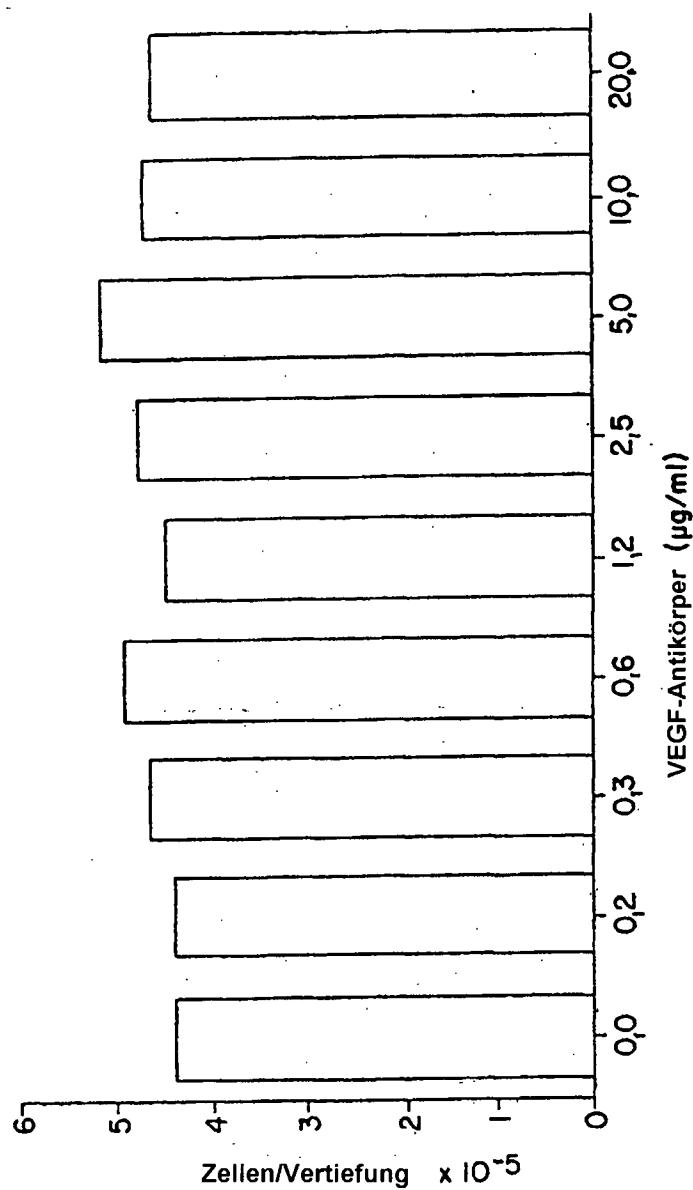


FIG.-8



F/G.-9

Probenart	Proben-Nr.	Assay-Daten	Synovia	Synovia mAB VEGF	% Unterdrückung
Rheumatoide Synovia	318	5.7.92	5,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	48
	150	5.7.92	7,0 ± 0,3	2,8 ± 0,4	60
	312	5.7.92	6,7 ± 0,4	3,7 ± 0,3	45
	264	5.7.92	6,2 ± 0,4	3,1 ± 0,3	50
	267	5.7.92	5,7 ± 0,6	4,4 ± 0,3	23
	202	5.22.92	10,0 ± 0,5	3,4 ± 0,6	66
	314	5.22.92	7,5 ± 0,3	3,1 ± 0,6	59
	237	5.22.92	6,1 ± 0,5	2,2 ± 0,3	64
	206	5.22.92	6,7 ± 0,5	2,2 ± 0,3	67
	317	5.22.92	5,2 ± 0,3	2,5 ± 0,6	52
Osteo-arthritis-Synovia	165	6.2.92	4,0 ± 0,3	2,8 ± 0,4	30
	211	6.2.92	3,4 ± 0,5	3,0 ± 0,2	11,7
	195	6.2.92	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,3	5,7
	122	6.2.92	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,4	13,5
	16	6.2.92	4,1 ± 0,3	3,8 ± 0,5	7,3

Mittlere %-Unterdrückung für RA-Fluida 53,4 4,2

Mittlere %-Unterdrückung für OA-Fluida 13,6 3,9

Die Synoviafluida wurden 1:50 verdünnt.

Kontrollen:

6.2.92 PBS 3,3 0,30
 bFGF 1µg/ml 3,7 0,38

5.22.92 PBS 1,2 0,38
 bFGF 1µg/ml 7,8 0,31

5.2.92 PBS 1,3 0,18
 bFGF 1µg/ml 9,0 0,41

FIG._10

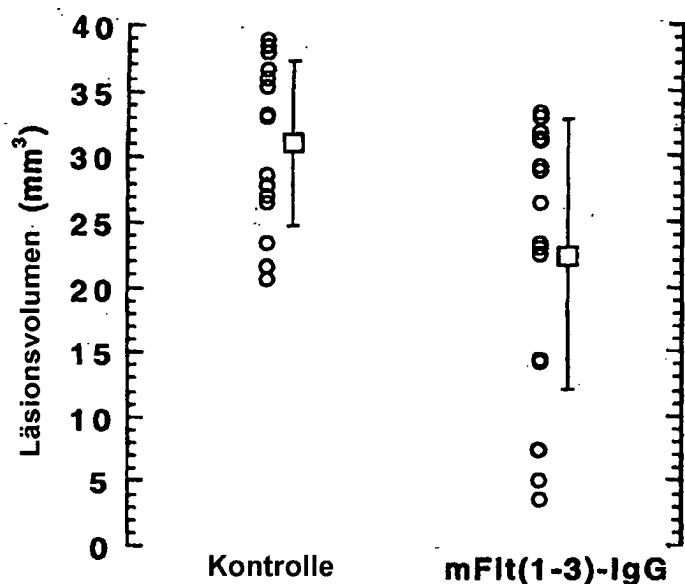


FIG. - 11

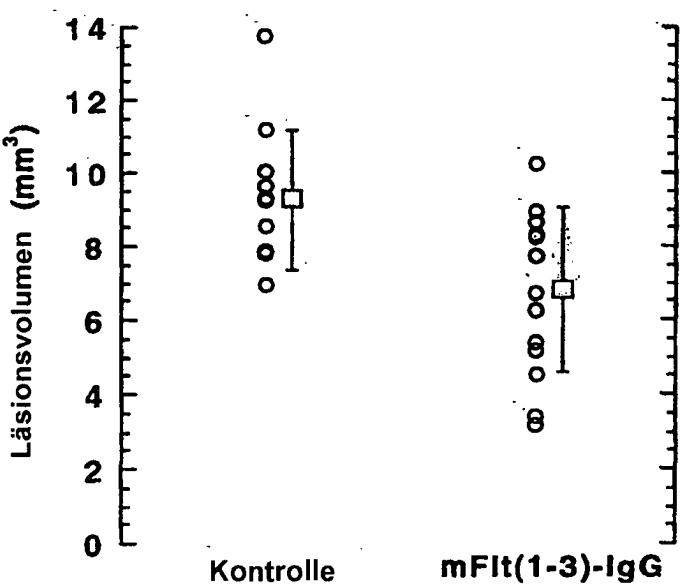


FIG. - 13

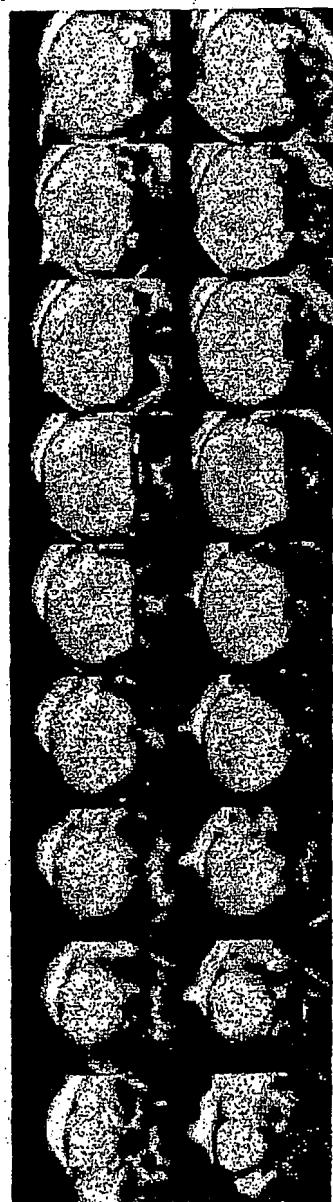


FIG. 12

F(ab)-12	10	20	30	40
Y0243-1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
Y0238-3	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0313-1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0317	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
			CDR-L1	
F(ab)-12	50	60	70	80
Y0243-1	GKAPKVLIFYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
Y0238-3	GKAPKVLIFYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
Y0313-1	GKAPKVLIFYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
Y0317	GKAPKVLIFYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
			CDR-L2	
F(ab)-12	90	100	110	
Y0243-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0238-3	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0313-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
Y0317	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	
			CDR-L3	

FIG._14A

F(ab)-12	10	20	30	40
Y0243-1	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA
Y0238-3	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNWVRQA
Y0313-1	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA
Y0317	EVOLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	HYGMNWVRQA
			CDR-H1	
F(ab)-12	50	60	70	80
Y0243-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0238-3	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0313-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
Y0317	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKRRFTF	SLDTSKSTAY
			CDR-H2	CDR-7
F(ab)-12	90	100	110	
Y0243-1	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL
Y0238-3	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL
Y0313-1	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL
Y0317	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL
			CDR-H3	

FIG._14B

= Unterschiede gegenüber F(ab)-12

F (ab) -12	D I QMT I QSPSSLSASVGDRVTITCSASQDI I SNYLNWYQQ	10	20	30
Y0192	D I Q I T I QSPSSLSASVGDRVTIT I OR I NE I Q I LSNYLNWYQQ			
Y0238-3	D I Q I T I QSPSSLSASVGDRVTIT I OR I NE I Q I LSNYLNWYQQ			
Y0239-19	D I Q I T I QSPSSLSASVGDRVTIT I OR I NE I Q I LSNYLNWYQQ			
Y0313-2	D I Q I T I QSPSSLSASVGDRVTIT I OR I NE I Q I LSNYLNWYQQ			
		CDR-L1		
F (ab) -12	KPGKAPKVLI I YFTSSL I HSGVPSRF I SGSGSG I GTDFTLTIS	40	50	60
Y0192	KPGKAPKVLI I YFTSSL I HSGVPSRF I SGSGSG I GTDFTLTIS			70
Y0238-3	KPGKAPKVLI I YFTSSL I HSGVPSRF I SGSGSG I GTDFTLTIS			
Y0239-19	KPGKAPKVLI I YFTSSL I HSGVPSRF I SGSGSG I GTDFTLTIS			
Y0313-2	KPGKAPKVLI I YFTSSL I HSGVPSRF I SGSGSG I GTDFTLTIS			
		CDR-L2	80	90
F (ab) -12	S I LOPEDFATYYC I QQ I YST I PWTFG I QG I TR I VEIKRTV	100		
Y0192	S I LOPEDFATYYC I QQ I YST I PWTFG I QG I TR I VEIKRTV			
Y0238-3	S I LOPEDFATYYC I QQ I YST I PWTFG I QG I TR I VEIKRTV			
Y0239-19	S I LOPEDFATYYC I QQ I YST I PWTFG I QG I TR I VEIKRTV			
Y0313-2	S I LOPEDFATYYC I QQ I YST I PWTFG I QG I TR I VEIKRTV			
		CDR-L3		

FIG.- 15A

= Unterschiede gegenüber F(ab)-12

F (ab) -12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVR	CDR-H1
Y0192	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVR	
Y0238-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY <u>D</u> FTNYGMNWVR	
Y0239-19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVR	
Y0313-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY <u>D</u> FTNYGMNWVR	
	40	40
F (ab) -12	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	CDR-H2
Y0192	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
Y0238-3	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
Y0239-19	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
Y0313-2	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
	50	50
F (ab) -12	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	CDR-H3
Y0192	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
Y0238-3	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
Y0239-19	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
Y0313-2	QAPGKGLEWVGWINTYGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA	
	60	60
F (ab) -12	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY G---SSHWYFDVWQGQTL	CDR-7
Y0192	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY G---SSHWYFDVWQGQTL	
Y0238-3	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY G---SSHWYFDVWQGQTL	
Y0239-19	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY YNERIKSHWYFDVWQGQTL	
Y0313-2	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY YNERIKSHWYFDVWQGQTL	
	80	80
F (ab) -12	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY G---SSHWYFDVWQGQTL	CDR-100
Y0192	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY G---SSHWYFDVWQGQTL	
Y0238-3	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY G---SSHWYFDVWQGQTL	
Y0239-19	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY YNERIKSHWYFDVWQGQTL	
Y0313-2	YIQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YY YNERIKSHWYFDVWQGQTL	

FIG.- 15B