



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 222 T2** 2007.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 882 799 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 222.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP97/04259**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 913 427.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/022616**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.12.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12P 21/02** (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

31110996 **21.11.1996** **JP**

(73) Patentinhaber:

Kyowa Hakko Kogyo K.K., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

SHITARA, Kenya, Kanagawa 251, JP; ITO, Mikito, Tokyo 194, JP; HANAI, Nobuo, Kanagawa 229, JP; SHIBUYA, Masabumi, Saitama 333, JP

(54) Bezeichnung: **GEGEN HUMANEN VEGF-REZEPTOR FLT-1 GERICHTETER, MONOKLONALER ANTIKÖRPER.**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Diese Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der imstande ist, spezifisch an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 zu binden, und der zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen verwendbar ist, bei denen die Krankheitszustände sich durch abnormale Angiogenese fortschreiten, wie z. B. Proliferation oder Metastase solider Tumoren, Arthritis bei der rheumatoiden Arthritis, diabetische Retinopathie, Retinopathie Frühgeborener und Psoriasis; ein Hybridom, das imstande ist, den Antikörper zu bilden; ein Verfahren zur immunologischen Detektion des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers; die Verwendung des monoklonalen Antikörpers zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen wie z. B. soliden Tumoren, rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie, Retinopathie der Frühgeborenen, Psoriasis und dergleichen.

Stand der Technik

[0002] Die Angiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Ontogenese und Gewebsbildung bei Wirbeltieren, ist direkt an der Bildung des Corpus luteum während des Fortpflanzungszyklus, an der vorübergehenden Proliferation des Uterus-Endometriums und der Plazentabildung bei geschlechtsreifen (weiblichen) Individuen beteiligt. Im Hinblick auf pathologische Zustände ist die Angiogenese an der Proliferation oder Metastase solider Tumoren und an der Ausbildung oder Beschleunigung der Morbidität bei der diabetischen Retinopathie und der rheumatoiden Arthritis (J. Biol. Chem. 267: 10931 (1992)) beteiligt. Die Angiogenese erfolgt durch die Sekretion eines Angiogenesefaktors und umfasst die Bildung einer Röhre und die Hervorbringung eines neuen Blutgefäßes. Während dieses Vorgangs werden die Basalmembran und das Interstitium durch eine Protease zerstört, die von den Endothelzellen eines existierenden Blutgefäßes im Bereich des sezernierten Angiogenesefaktors sezerniert wird, gefolgt von anschließender Wanderung und Proliferation vaskulärer Endothelzellen (J. Biol. Chem. 267: 10931 (1992)). Zu den Faktoren, die die Angiogenese induzieren, gehören der Gefäßpermeabilitätsfaktor (nachfolgend „VPF“) und der Gefäßendothelwachstumsfaktor (nachfolgend „VEGF“) (nachfolgend „VPF/VEGF“). Diese Faktoren gelten als die wichtigsten Faktoren bei der pathologischen und nicht-pathologischen Angiogenese (Advances in Cancer Research 67: 281 (1995)).

[0003] VPF/VEGF ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40.000, das aus Homodimeren besteht, die als unabhängige Moleküle, nämlich 1983 als Gefäßpermeabilitätsfaktor (VPF) (Science 219: 983 (1983)) und 1989 als Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF) (Biochem. Biophys. Res. Comm. 161: 851 (1989)), beschrieben wurden, aber als das Ergebnis der cDNA-Klonierung wurde erkennbar, dass sie die gleiche Substanz sind (Science 246: 1306 (1989); Science 246: 1309 (1989)) (im Folgenden wird der Ausdruck „VPF/VEGF“ als „VEGF“ wiedergegeben). Über die oben beschriebene VEGF-Wirkung auf die Gefäßendothelzellen hinaus wurde auch gezeigt, dass VEGF eine wachstumsfördernde Wirkung (Biochem. Biophys. Res. Comm. 161: 851 (1989)), eine die Zellmigration fördernde Wirkung (J. Immunology 152: 4149 (1994)), eine die Sekretion von Metalloprotease fördernde Wirkung (J. Cell Physiol. 153: 557 (1992)) und eine die Sekretion von Urokinase und tPA fördernde Wirkung (Biochem. Biophys. Res. Comm. 181: 902 (1991)) besitzt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass VEGF eine die Angiogenese fördernde Wirkung (Circulation 92 suppl II: 365 (1995)) und eine die Gefäßpermeabilität erhöhende Wirkung (Science 219: 983 (1983)) als in vivo-Aktivitäten besitzt. Es wurde berichtet, dass VEGF ein Wachstumsfaktor mit extrem hoher Spezifität für Gefäßendothelzellen (Biochem. Biophys. Res. Comm. 161: 851 (1989)) ist, und dass infolge alternativen Spleißens der mRNA (J. Biol. Chem. 267: 26031 (1991)) vier Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht vorliegen.

[0004] Bei den von Angiogenese begleiteten Krankheiten wurde beschrieben, dass VEGF eine wichtige Rolle bei der Proliferation oder Metastase solider Tumoren und bei der Ausbildung von Krankheitszuständen der diabetischen Retinopathie und der rheumatoiden Arthritis spielt. Im Hinblick auf solide Tumoren wurde bei einer Anzahl von menschlichen Tumorgeweben VEGF-Bildung berichtet, z. B. bei Nierenkarzinomen (Cancer Research 54: 4233 (1994)), Brustkrebs (Human Pathology 26: 86 (1995)), Hirntumor (J. Clinical Investigation 91: 153 (1993)), Magen-Darm-Krebs (Cancer Research 53: 4727 (1993)) und Eierstockkrebs (Cancer Research 54: 276 (1994)). Außerdem haben die Ergebnisse einer Untersuchung der Korrelation zwischen der Menge der VEGF-Expression in den Tumoren und der Überlebensrate der Patienten bei Patienten mit Brusttumor gezeigt, dass die Tumor-Angiogenese bei Tumoren, die hohe VEGF-Niveaus exprimieren, aktiver ist als bei Tumoren mit niedriger VEGF-Expression, und dass die Überlebensrate bei Brustkrebspatienten mit Tumoren mit hoher VEGF-Expression geringer ist als bei Brustkrebspatienten mit Tumoren mit niedriger VEGF-Expression (Japanese J. Cancer Research 85: 1045 (1994)). Es wurde auch berichtet, dass ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF in einem Xenograft-Testsystem, in dem ein menschlicher Tumor durch subkutane Transplantation in

Nacktmäuse übertragen wurde, das Tumorwachstum inhibierte (Nature 362: 841 (1993)). Es wurde auch berichtet, dass bei einem metastatischen Modell eines menschlichen Tumors in Nacktmäusen ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF die Metastase des Tumors inhibierte (Cancer Research 56: 921 (1996)). Überdies wurde, da eine hohe VEGF-Konzentration in krebbsbedingten menschlichen Pleuralergüssen und Ascites detektiert wurde, die Möglichkeit vorgeschlagen, das VEGF ein an der Zurückhaltung von Pleuralergüssen und Ascites beteiligter Hauptfaktor ist (Biochimica et Biophysica Acta 1221: 211 (1994)).

[0005] Bei der diabetischen Retinopathie verursacht die abnormale Angiogenese Netzhautablösung und Blutungen des Glaskörpers, die zur Erblindung führen, und es wurde berichtet, dass die Angiogenese bei der diabetischen Retinopathie und das VEGF-Expressionsniveau in den Augäpfeln des Patienten positiv korreliert sind (New England J. Medicine 331: 1480 (1994)). Es wurde auch berichtet, dass bei einem Retinopathie-Affenmodell die Angiogenese inhibiert wird, wenn die VEGF-Wirkung durch intraokuläre Administration eines neutralisierenden monoklonalen Antikörpers gegen VEGF inhibiert wird (Arch. Ophthalmol. 114: 66 (1996)).

[0006] Das Fortschreiten des Krankheitsbildes der rheumatoiden Arthritis (Zerstörung von Knochen und Knorpeln) wird von Angiogenese begleitet, und es wurde berichtet, dass eine hohe VEGF-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis enthalten ist, und dass Makrophagen in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis VEGF bilden (Journal of Immunology 152: 4149 (1994); J. Experimental Medicine 180: 341 (1994)).

[0007] VEGF-Rezeptoren wurden beschrieben. Zu diesen gehören die fms-artige Tyrosinkinase (nachfolgend als „Flt-1“ bezeichnet) (Oncogene 5: 519 (1990); Science 255 989 (1992)) und der kinaseeinfügungsdomänenhaltige Rezeptor (nachfolgend als „KDR“ bezeichnet) (WO 92/14748; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9026 (1991); Biochem. Biophys. Res. Comm. 187: 1579 (1992), WO 94/11499), die in die Familie der Tyrosinkinasen vom Rezeptortyp gehören. Sowohl Flt-1 als auch KDR sind Membranproteine von jeweils 180 bis 200 Kilodalton Molekulargewicht mit einer aus 7 immunoglobulinartigen Regionen bestehenden extrazellulären Domäne und einer aus einer Tyrosinkinase-region bestehenden intrazellulären Domäne. Es wurde berichtet, dass VEGF an Flt-1 und KDR mit KD-Werten von 20 pM und 75 pM spezifisch bindet, und dass Flt-1 und KDR auf spezifische Weise in den Gefäßendothelzellen exprimiert werden (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7533 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8915 (1993)). Im Hinblick auf Flt-1 in verschiedenen Erkrankungen wurde berichtet, dass die Expression der mRNA von Flt-1 im Vergleich zu Gefäßendothelzellen in normalen Geweben in Tumorgefäßendothelzellen menschlicher Glioblastomgewebe (Nature 359: 845 (1992)) und in Tumorgefäßendothelzellen von Krebsgeweben menschlicher Verdauungsorgane (Cancer Research 53: 4727 (1993)) ansteigt. Überdies wurde berichtet, dass durch in situ-Hybridisierung eine Expression von Flt-1 mRNA in Gefäßendothelzellen von Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet wird (J. Experimental Medicine 180: 341 (1994)). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein VEGF/VEGF-Rezeptor Flt-1-System bei der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle spielt. Obwohl berichtet wurde, dass VEGF an Flt-1 bindet und die intrazelluläre Domäne autophosphoryliert wird (Science 255: 989 (1992)), ist die detaillierte Funktion des Rezeptormechanismus noch unklar. Es wurde jedoch entdeckt, dass Knock-out-Mäuse, in denen das Flt-1-Gen zerstört war, in einem embryonalen Alter von 8,5 bis 9,5 Tagen infolge abnormaler Blutgefäßbildung, verursacht durch abnormale Morphologie der Gefäßendothelzellen während der Blutinselbildung in der frühen Phase der Entwicklung und der nachfolgenden Angiogenese, sterben. Dies hat zu der Annahme geführt, dass Flt-1 eine für die Röhrenbildung der Gefäßendothelzellen bei der Angiogenese (Nature 376: 66 (1995)) essentielle Funktion besitzt.

[0008] In Anbetracht des Gesagten ist zu erwarten, dass ein Antikörper, der die biologischen Aktivitäten von VEGF durch Bindung an den VEGF-Rezeptor Flt-1 inhibieren kann, zur Diagnose und zur Behandlung von Erkrankungen verwendbar ist, bei denen die Krankheitszustände durch abnormale Angiogenese fortschreiten, wie z. B. Proliferation oder Metastase solider Tumoren, Arthritis bei rheumatoider Arthritis, diabetische Retinopathie, Retinopathie der Frühgeborenen und Psoriasis. Jedoch sind ein monoklonaler Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor Flt-1, der Zellen detektieren kann, in denen der VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimiert wird, und ein monoklonaler Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor Flt-1, der die biologischen Wirkungen von VEGF inhibieren kann, im Stand der Technik noch nicht beschrieben.

[0009] WO-A 95/21868 beschreibt einen von der Hybridomzelllinie DC101 (IgG1k), unter ATCC-Zugangsnummer ATCC HB 11534 hinterlegt, gebildeten Antikörper. Dieser Antikörper soll mit dem murinen flk-1 spezifisch reagieren. Flk-1 ist ein weiterer VEGF-Rezeptor, der von flt-1 und KDR verschieden ist.

[0010] Davis-Smyth und Mitarbeiter berichten, dass die zweite immunoglobulinartige Domäne von flt-1 die Ligandenbindung bestimmt (The EMBO Journal 15: 4919–4927 (1996)).

[0011] Die Aufmerksamkeit wurde auf die Entwicklung eines Verfahrens gerichtet, das zur Diagnose der Behandlung von Erkrankungen verwendbar ist, deren Krankheitszustände durch abnormale Angiogenese fortschreiten, wie z. B. Proliferation oder Metastase solider Tumoren, Arthritis bei rheumatoider Arthritis, diabetische Retinopathie, Retinopathie der Frühgeborenen und Psoriasis. Obwohl nichts über den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 berichtet wurde, wird angenommen, dass die Detektion der Orte der Angiogenese und die Inhibition der Angiogenese durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor zur Diagnose und Behandlung dieser Erkrankungen verwendbar sein werden. Infolgedessen wurde die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 erwartet.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagiert; ein Epitop erkennt, das in einem Bereich der Position 1 bis 338 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure und einschließlich einer Signalsequenz des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 vorkommt, die Bindung von menschlichem VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 inhibiert und dadurch auch die biologischen Aktivitäten von menschlichem VEGF hemmt. Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper reagiert bei Immunocytenfärbung spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1.

[0013] Zu Beispielen erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper gehören der monoklonale Antikörper KM1732, der der murinen IgG1-Subklasse angehört, der monoklonale Antikörper KM1748, der der murinen IgG2b-Subklasse angehört, und der monoklonale Antikörper KM1750, der der murinen IgG2b-Subklasse angehört. Diese monoklonalen Antikörper inhibieren die Bindung von menschlichem VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 und inhibieren auch die biologischen Aktivitäten eines menschlichen VEGF. Die vorliegende Erfindung betrifft auch das Hybridom KM1732 (FERM BP-5698), das den monoklonalen Antikörper KM1732 bildet, das Hybridom KM1748 (FERM BP-5699), das den monoklonalen Antikörper KM1748 bildet, und das Hybridom KM1750 (FERM BP-5700), das den monoklonalen Antikörper KM1750 bildet.

[0014] Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung unter Verwendung des erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpers in vitro ein Verfahren zur immunologischen Detektion des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1, ein Verfahren zur immunologischen Detektion von Zellen, in denen der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, und ein Verfahren zur immunologischen Detektion und Bestimmung von löslichem menschlichem VEGF-Rezeptor Flt-1. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, unter Verwendung des erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpers in vitro ein Verfahren zur Inhibition der Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 und ein Verfahren zur Inhibition biologischer Aktivitäten von menschlichem VEGF.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft ein diagnostisches Mittel für Krankheiten, deren Krankheitszustände durch abnormale Angiogenese fortschreiten, wie z. B. Proliferation oder Metastase solider Tumoren, Arthritis bei rheumatoider Arthritis, diabetische Retinopathie, Retinopathie von Frühgeborenen, Psoriasis und dergleichen.

[0016] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung fanden, dass ein monoklonaler Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1, der imstande ist, ein in einem Bereich der Positionen 1 bis 338 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 vorliegendes Epitop zu erkennen, bei Immunocytenfärbung spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagieren kann, und dass die biologischen Wirkungen des menschlichen VEGF durch die Inhibition der VEGF-Bindung an den VEGF-Rezeptor Flt-1 inhibiert werden können. Diagnose und Behandlung der oben beschriebenen Erkrankungen, deren Krankheitsbilder durch abnormale Angiogenese fortschreiten, wie z. B. Proliferation oder Metastasen solider Tumoren, Arthritis bei rheumatoider Arthritis, diabetische Retinopathie, Retinopathie der Frühgeborenen, Psoriasis und dergleichen, können unter Verwendung dieser monoklonalen Antikörper durchgeführt werden.

[0017] Infolgedessen stellt die vorliegende Erfindung Antikörper bereit, die spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagieren. Im Hinblick auf den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper wird ein monoklonaler Antikörper bereitgestellt, der ein Epitop erkennt, das in einem Bereich der Positionen 1 bis 338 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure (einschließlich einer Signalsequenz) des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 vorkommt, und der auch bei Immunocytenfärbung spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagiert. Die vorliegende Erfindung stellt auch einen monoklonalen Antikörper bereit, der die Bindung des menschlichen VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 inhibiert, und der auch die biologischen Wirkungen von menschlichem VEGF inhibiert. Zu den Beispielen des monoklonalen Antikörpers,

der das Epitop erkennt und bei Immunozytenfärbung auch spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagiert, gehören der monoklonale Antikörper KM1732, von dem Hybridom KM1732 (FERM BP-5698) gebildet, der monoklonale Antikörper KM1748, von dem Hybridom KM1748 gebildet (FERM BP-5699), und der monoklonale Antikörper KM1750, von dem Hybridom KM1750 gebildet (FERM BP-5700). Diese monoklonalen Antikörper inhibieren die Bindung des menschlichen VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1, und sie inhibieren auch die biologischen Wirkungen des menschlichen VEGF.

[0018] Der monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung kann ein beliebiger Antikörper sein, solange er die beanspruchten Eigenschaften hat, aber als bevorzugte Beispiele können diejenigen Antikörper angeführt werden, die durch das folgende Herstellungsverfahren etabliert werden. Das heißt, ein monoklonaler Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 kann erhalten werden, indem man menschliches VEGF-Rezeptor Flt-1-Protein als Antigen herstellt, ein Tier immunisiert, das imstande ist, ein Hybridom mit dem Antigen zu liefern, wie z. B. eine Maus, eine Ratte, einen Hamster, ein Kaninchen oder dergleichen, dadurch Plasmazellen mit Antigenespezifität induziert, durch Fusion der Zellen mit einer Myelomzelllinie ein Hybridom herstellt, das imstande ist, den monoklonalen Antikörper zu bilden, und nachfolgend das Hybridom kultiviert.

[0019] Zu den Beispielen weiterer monoklonaler Antikörper, die bei Immunozytenfärbung spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagieren, gehören der monoklonale Antikörper KM1730, der der murinen IgG1-Subklasse angehört, und der monoklonale Antikörper KM1731, der der murinen IgG2a-Subklasse angehört. KM1730 wird von dem Hybridom KM1730 (FERM BP-5697) gebildet, und KM1731 wird von dem Hybridom KM1731 gebildet (FERM BP-5718).

[0020] Das Herstellungsverfahren für den erfindungsgemäßen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 ist nachfolgend beschrieben.

1. Herstellungsverfahren für den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1

(1) Herstellung des Antigens

[0021] Zu den Beispielen der als Antigen zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 geeigneten Substanzen gehören Zellen, in denen der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche oder in einer Zellmembranfraktion davon exprimiert wird, lösliches menschliches VEGF-Rezeptor Flt-1-Protein mit einer extrazellulären Region unterschiedlicher Länge und ein Fusionsprotein des Proteins mit der Fc-Region des Antikörpers. Als zur Expression des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 auf der Zelloberfläche befähigte Zellen sind beispielhaft NIH3T3-F1t-1-Zellen (Oncogene 10: 135 (1995)) zu nennen. Bei einem Verfahren zur Expression des Antigens als lösliches menschliches VEGF-Rezeptor Flt-1-Protein mit extrazellulärer Region verschiedener Länge oder als Fusionsprotein des Proteins mit der Fc-Region des Antikörpers wird die gesamte Länge oder ein teilweises Fragment der cDNA, die den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 codiert (Oncogene 5: 519 (1990); Abstract of Papers, the 18th Annual meeting of Japan Molecular Biology Society, 2P-227 (Dezember, 1995)) in eine stromabwärts von dem Promotor eines geeigneten Vektors gelegene Stelle eingefügt, der so konstruierte rekombinante Vektor wird in Wirtszellen eingebracht, und die so erhaltenen Expressionszellen für den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 werden in einem geeigneten Medium kultiviert, wodurch die gesamte Länge eines Teilfragmentes des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 in den Zellen oder dem Zellkulturüberstand als solches oder als Fusionsprotein gebildet wird.

[0022] Als Wirtszellen können beliebige Bakterien-, Hefe-, Tier-, Insekten- und andere Zellen verwendet werden, solange sie das interessierende Gen exprimieren können. Zu Beispielen der Bakterien gehören die Gattung Escherichia, die Gattung Bacillus und dergleichen, wie z. B. Escherichia coli, Bacillus subtilis und dergleichen. Zu Beispielen der Hefe gehören Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe und dergleichen. Zu Beispielen von Tierzellen gehören Namalwa-Zellen, die menschliche Zellen sind, COS-Zellen, die Affenzellen sind, und CHO-Zellen, die Zellen des chinesischen Goldhamsters sind. Zu Beispielen von Insekten-Zellen gehören Sf9 und Sf21 (von Pharmingen hergestellt), High Five (von Invitrogen hergestellt) und dergleichen.

[0023] Wenn ein Bakterium wie Escherichia coli als Wirt verwendet wird, kann der Expressionsvektor vorzugsweise mit einem Promotor, einer Ribosomenbindungssequenz, der erfindungsgemäßen DNA, einem Transkriptionsterminator und gewünschtenfalls einer Promotorkontrollsequenz konstruiert werden. Zu Beispielen gehören das kommerziell verfügbare pGEX- (von Pharmacia hergestellt), das pET-System (von Novagen

hergestellt) und dergleichen.

[0024] Im Hinblick auf die Verfahren zum Einbringen des rekombinanten Vektors in ein Bakterium kann jedes der bekannten Verfahren zur Einbringung von DNA in Bakterien, wie z. B. ein Verfahren, in dem Kalziumionen verwendet werden (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110–2114 (1972)), ein Protoplastenverfahren (ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung Nr. 2483942/91) und dergleichen verwendet werden.

[0025] Wenn Hefe als Wirt verwendet wird, werden YEp13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419) oder dergleichen als Expressionsvektor verwendet.

[0026] Im Hinblick auf das Verfahren zur Einbringung des rekombinanten Vektors in Hefe kann jedes der bekannten Verfahren zur Einbringung von DNA in Hefe wie z. B. ein Elektroporationsverfahren (Methods. Enzymol. 194: 182–187 (1990)), ein Sphäroplastenverfahren (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1929–1933 (1978)), ein Lithiumacetatverfahren (J. Bacteriol. 153: 163–168 (1983)) und dergleichen verwendet werden.

[0027] Wenn Tierzellen als Wirt verwendet werden, können pAGE107 (ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung Nr. 22979/88; Cytotechnology 3: 133 (1990)), pAGE103 (J. Biochem. 101: 1307 (1987)), und dergleichen beispielhaft als verwendbare Expressionsvektoren genannt werden.

[0028] Jeder Promotor, der imstande ist, die Expression in Tierzellen zu bewirken, kann verwendet werden. Zu den Beispielen gehören der Promoter des IE (immediate early)-Gens des Zytomegalievirus (CMV), der SV40-Promoter, der Metallothionein-Promoter und dergleichen. Weiterhin kann der Enhancer des IE-Gens des menschlichen CMV zusammen mit dem Promoter verwendet werden.

[0029] Im Hinblick auf das Verfahren zur Einbringung des rekombinanten Vektors in Tierzellen kann jedes der bekannten Verfahren zur Einbringung von DNA in Tierzellen verwendet werden, wie z. B. ein Elektroporationsverfahren (Cytotechnology 3: 133 (1990)), ein Kalziumphosphatverfahren (ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung Nr. 227075/90), ein Lipofektionsverfahren (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987)) und dergleichen.

[0030] Wenn Insektenzellen als Wirt verwendet werden, kann das Protein durch das bekannte Verfahren exprimiert werden, das z. B. in Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1–34 und in Baculovirus expression vectors, A laboratory manual, beschrieben ist. Das heißt, der das rekombinante Gen einführende Vektor und das nachfolgend beschriebene Baculovirus werden gleichzeitig in Insektenzellen eingebracht, um ein rekombinantes Virus in dem Insektenzellkulturüberstand zu erhalten, und dann werden die Insektenzellen mit dem so erhaltenen rekombinanten Virus infiziert, um proteinexprimierende Insektenzellen zu erhalten.

[0031] Zu den Beispielen des das Gen einführenden Vektors gehören pVL1392, pVL1393, pBlueBacIII (alle von Invitrogen hergestellt) und dergleichen.

[0032] Zu den Beispielen des Baculovirus gehören das Nuclear Polyhedrosis Virus von *Autographa californica*, mit den Insekten der Barathra-Familie infiziert werden.

[0033] Im Hinblick auf das Verfahren zur gleichzeitigen Einführung des oben beschriebenen das rekombinante Gen einführenden Vektors und des oben beschriebenen Baculovirus in Insektenzellen zur Herstellung des rekombinanten Virus können beispielhaft das Kalziumphosphatverfahren (ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung Nr. 227075/90), das Lipofektionsverfahren (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987)) und dergleichen genannt werden.

[0034] Alternativ kann das interessierende Protein dadurch hergestellt werden, dass man unter Verwendung z. B. des BaculoGold Starter Kit, von Pharmingen hergestellt, ein rekombinantes Baculovirus herstellt und dann damit die oben genannten Insektenzellen wie z. B. Sf9, Sf21, High Five oder dergleichen mit dem rekombinanten Virus infiziert (Bio/Technology 6: 47 (1988)).

[0035] Im Hinblick auf das Genexpressionsverfahren wurden Techniken wie Sekretionsproduktion, Fusionsproteinexpression und dergleichen entwickelt, und jedes einzelne dieser Verfahren kann verwendet werden. Zum Beispiel kann die Genexpression in Übereinstimmung mit dem in Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab., Press, New York (1989) beschriebenen Verfahren oder durch direkte Expression durchgeführt werden.

[0036] Die Gesamtlänge oder ein Teilfragment des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 kann als solches oder als Fusionsprotein hergestellt werden, indem man einen auf die oben beschriebene Weise erhaltenen Transformanten in einem Kulturmedium kultiviert, wodurch man Bildung und Anreicherung des erfindungsgemäßen Proteins im resultierenden Kulturgemisch erreicht, und dann das Protein aus dem Kulturgemisch gewinnt.

[0037] Die Kultivierung des erfindungsgemäßen Transformanten in einem Kulturmedium wird in Übereinstimmung mit einem üblichen Verfahren durchgeführt, das zur Kultur der entsprechenden Wirtszelle verwendet wird.

[0038] Im Hinblick auf das Medium zur Verwendung bei der Kultur des Transformanten, der unter Verwendung eines Mikroorganismus wie z. B. Escherichia coli, einer Hefe oder dergleichen als Wirt erhalten wird, kann entweder ein natürliches oder ein synthetisches Medium verwendet werden, solange es Stoffe enthält, die von dem Mikroorganismus assimiliert werden können, wie z. B. Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze und dergleichen, und es zur effizienten Kultur des Transformanten geeignet ist (Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)). Die Kultur findet im allgemeinen unter aeroben Bedingungen statt, wie z. B. in einer Schüttelkultur, in einer untergetauchten Schüttelbelüftungskultur oder dergleichen, bei 15 bis 40 °C über einen Zeitraum von 16 bis 96 Stunden. Während der Kultur wird der pH-Wert kontrolliert auf einem Wert von 3,0 bis 9,0 gehalten. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt unter Verwendung einer anorganischen oder organischen Säure, einer Alkalilösung, von Harnstoff, Kalziumcarbonat, Ammoniak und dergleichen. Gewünschtenfalls können Antibiotika wie z. B. Ampicillin, Tetracyclin und dergleichen während der Kultur dem Medium zugesetzt werden.

[0039] Im Hinblick auf das Medium zur Verwendung bei der Kultur eines unter Verwendung von Tierzellen als Wirt erhaltenen Transformanten können RPMI 1640-Medium, Eagle's MEM-Medium oder ein beliebiges anderes Medium, weiter mit fötalem Kälberserum ergänzt, verwendet werden. Die Kultur findet im allgemeinen bei 35 bis 37 °C über einen Zeitraum von 3 bis 7 Tagen in Gegenwart von 5 % CO₂ statt. Gewünschtenfalls können Antibiotika wie z. B. Kanamycin, Penicillin und dergleichen während der Kultur dem Medium zugesetzt werden.

[0040] Im Hinblick auf das Medium zur Verwendung bei der Kultur eines unter Verwendung von Insektenzellen als Wirt erhaltenen Transformanten können TNM-FH-Medium (von Pharmingen hergestellt), Sf900IISFM (von Life Technologies hergestellt), ExCell 400 oder ExCell405 (beide von JRH Biosciences hergestellt) oder dergleichen verwendet werden. Die Kultur findet im allgemeinen bei 25 bis 30 °C über einen Zeitraum von 1 bis 4 Tagen statt, und gewünschtenfalls können Gentamicin und ähnliche Antibiotika während der Kultur dem Medium zugesetzt werden.

[0041] Obwohl Medien zur Kultur von Tierzellen und Insektenzellen Serum enthalten, ist es wünschenswert, ein serumfreies Medium zu verwenden, um die gesamte Länge oder ein Teilfragment des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 als solchen oder als Fusionsprotein effizient aufzureinigen.

[0042] Wenn der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 mit vollständiger Länge oder als teilweises Fragment sich als solcher oder als Fusionsprotein innerhalb der Wirtszelle ansammelt, werden die Zellen nach Abschluss der Kultur durch Zentrifugation geerntet, in einem wässrigen Puffer suspendiert und dann unter Verwendung eines Ultraschalloszillators, einer hydraulischen Hochdruckpresse oder dergleichen aufgebrochen, und im Anschluss daran wird das Protein aus einem durch Zentrifugation der so aufgeschlossenen Zellen hergestellten flüssigen Überstand gewonnen.

[0043] Bildet sich innerhalb der Zelle ein unlöslicher Einschlusskörper, so wird der unlösliche Einschlusskörper unter Verwendung eines proteindenaturierenden Mittels in Lösung gebracht, und die höher geordnete Struktur des Proteins wird dann wieder hergestellt, indem man das auf diese Weise in Lösung gebrachte Protein in eine Lösung hinein verdünnt oder es gegen eine Lösung dialysiert, die das proteindenaturierende Mittel nicht enthält oder die das Mittel enthält, jedoch in einer solch geringen Konzentration, dass das Protein nicht denaturiert wird.

[0044] Wenn der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 als vollständiges Protein oder Fragment als solcher oder als Fusionsprotein in den Bereich außerhalb der Zellen sezerniert wird, kann das exprimierte Protein aus dem Kulturüberstand gewonnen werden. Die Isolation und Reinigung können unter Verwendung von Trennmitteln erfolgen wie z. B. Lösungsmittelextraktion, fraktionierter Fällung mit organischen Lösungsmitteln, Aussalzen, Dialyse, Zentrifugation, Ultrazentrifugation, Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, hydrophobischer Chromatographie, Affinitätschromatographie, Reversphasenchromatographie, Kristallisati-

on, Elektrophorese und dergleichen, einzeln oder in Kombination.

(2) Immunisierung von Tieren und Herstellung von Antikörper bildenden Zellen

[0045] Obwohl beliebige Tiere wie z. B. Mäuse, Ratten, Hamster, Kaninchen und dergleichen zur Immunisierung verwendet werden können, solange ein Hybridom hergestellt werden kann, wird in dieser Erfindung ein Beispiel beschrieben, in dem Mäuse und Ratten verwendet werden. Eine Maus oder Ratte mit einem Alter von 3 bis 20 Wochen wird mit dem in dem obigen Schritt 1-(1) erhaltenen Protein als Antigen immunisiert, und Antikörper bildende Zellen werden aus Milz, Lymphknoten oder peripherem Blut des Tieres gewonnen. Die Immunisierung erfolgt, indem man das Antigen mehrfach durch subkutane, intravenöse oder intraperitoneale Injektion zusammen mit einem geeigneten Adjuvans verabreicht. Als Adjuvans ist beispielhaft ein vollständiges Freund'sches Adjuvans oder eine Kombination von Aluminiumhydroxidgel mit Pertussisvakzine zu nennen. 3 bis 7 Tage nach jeder Verabreichung wird eine Blutprobe aus dem Augenhintergrund oder aus der Schwanzvene des Tieres entnommen, die Probe wird z. B. durch Enzym-Immunoassay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), von Igaku Shoin (1976) veröffentlicht) und darauf überprüft, ob es mit dem verwendeten Antigen reaktiv ist, nämlich mit dem löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 oder mit NIH3T3-Zellen, in denen der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, und dann wird eine Maus oder Ratte, die im Serum einen hinreichenden Antikörpertiter zeigt, zur Verwendung als Quelle für Antikörper produzierende Zellen ausgewählt. Am dritten bis siebten Tag nach der letzten Verabreichung des Antigens wird der immunisierten Maus die Milz entnommen, um die Fusion der Milzzellen mit Myelomzellen in Übereinstimmung mit dem bekannten Verfahren (Antibodies – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988), im Folgenden als „Antibodies – A Laboratory Manual“ bezeichnet), durchzuführen.

3) Herstellung von Myelomzellen

[0046] Als Myelomzellen können alle Myelomzellen verwendet werden, die imstande sind, in vitro zu wachsen, zu welchen von Mäusen erhaltene etablierte Zellen gehören, wie z. B. die gegen 8-Azaguanin resistente Mäusemyelomzelllinie (BALB/c) P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (G. Kohler et al. Europ. J. Immunol. 6: 511 (1976)), SP2/O-Ag14(SP-2) (M. Shulman et al., Nature 276: 269 (1978)), P3-X63-Ag8653 (653) (J.F. Kearney et al., J. Immunol. 123: 1548 (1979)), P3-X63-Ag8(X63) (G. Kohler et al., Nature 256: 495 (1975)) und dergleichen. Diese Zelllinien werden gemäß dem bekannten Verfahren (Antibodies – A Laboratory Manual) kultiviert und subkultiviert, und bis zur Zellfusion werden 2×10^7 oder mehr der Zellen gesichert.

4) Zellfusion

[0047] Die im oben genannten Schritt (2) erhaltenen Antikörper bildenden Zellen und die im oben genannten Schritt (3) erhaltenen Myelomzellen werden gewaschen, mit Zellaggregationsmedium, Polyethylenglykol 1000 (PEG-1000) oder dergleichen gemischt, um die Zellfusion zu bewirken, und dann in einem Kulturmedium suspendiert. Zum Waschen der Zellen werden MEM-Medium oder PBS (1,83 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,21 g Kaliumdihydrogenphosphat, 7,65 g Natriumchlorid, 1 Liter destilliertes Wasser, pH 7,2) verwendet. Um selektiv die interessierenden fusionierten Zellen zu erhalten, wird als Medium zur Suspension der fusionierten Zellen HAT-Medium {Normalmedium [durch Zusatz von Glutamin (1,5 mM), 2-Mercaptoethanol (5×10^{-5} M), Gentamicin (10 µg/ml) und Fötalkälberserum (FCS) (10 %, von CSL hergestellt) zu RPMI-1640 Medium hergestellt], weiter ergänzt mit Hypoxanthin (10^{-4} M), Thymidin ($1,5 \times 10^{-5}$ M) und Aminopterin (4×10^{-7} M)] verwendet.

[0048] Nach der Kultur wird eine Probe des Kulturüberstandes entnommen und getestet, z. B. durch ein Enzymimmunoassayverfahren, das im nachfolgenden Schritt (5) beschrieben wird, um Näpfe auszuwählen, die spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 oder einem rekombinanten Protein wie z. B. einem Fusionsprotein mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1, im obigen Schritt (1) beschrieben, reagieren können. Danach wird zwei Mal durch Analyse mittels begrenzender Verdünnung eine Klonierung durchgeführt [unter Verwendung von HT-Medium (eines durch Weglassen von Aminopterin aus dem HAT-Medium hergestellten Mediums) zur ersten Analyse und dann von normalem Medium für die zweite Analyse], und ein Hybridom, das stabilen und hohen Antikörpertiter zeigt, wird als das Hybridom ausgewählt, das imstande ist, den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 zu bilden.

5) Selektion des monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1

[0049] Die Selektion eines zur Bildung des monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 befähigten Hybridoms erfolgt durch das nachfolgend beschriebene Enzymimmunoassayverfahren.

Enzymimmunoassay

[0050] Der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 oder ein rekombinantes Protein wie z. B. ein Fusionsprotein mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1, im oben genannten Schritt 1-(1) beschrieben, wird zur Beschichtung einer geeigneten Platte verwendet, und man lässt ihn mit einem ersten Antikörper reagieren, nämlich einem Hybridom-Zellkulturüberstand oder einem in dem nachfolgenden Schritt 1-(6) erhaltenen gereinigten Antikörper, und dann mit einem zweiten Antikörper, nämlich einem Antikörper gegen murines Immunglobulin oder gegen Rattenimmunglobulin, markiert mit Biotin, einem Enzym, einem chemolumineszenten Stoff, einer radioaktiven Verbindung oder dergleichen, und dann führt man eine für die verwendete Markierung geeignete Reaktion durch, um eine Probe, die spezifisch mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagiert, als zur Bildung des monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 befähigtes Hybridom auszuwählen. Zu den Beispielen der Hybridome gehören die Hybridome KM1730, KM1731, KM1732, KM1748 und KM1750. Die Hybridome KM1730, KM1732, KM1748 und KM1750 wurden am 8. Oktober 1996, und das Hybridom KM1731 wurde am 22. Oktober 1996 beim Nationalen Institut für Biowissenschaften und Humantechnologie, Büro für industrielle Wissenschaft und Technologie (Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan) hinterlegt, und sie erhielten die Bezeichnungen FERM BP-5697, FERM BP-5698, FERM BP-5699, FERM BP-5700 beziehungsweise FERM BP-5718.

6) Herstellung des monoklonalen Antikörpers

[0051] Die im oben beschriebenen Schritt 1-(3) erhaltenen, einen monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridomzellen werden mit Pristan (durch intraperitoneale Administration von 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan) gefolgt von zweiwöchiger Fütterung) behandelten 8 bis 10 Wochen alten Mäusen oder Nacktmäusen durch intraperitoneale Injektion einer Dosis von 2×10^7 bis 5×10^6 Zellen pro Tier verabreicht. Das Hybridom verursacht Ascitestumoren in 10 bis 21 Tagen. Die Ascitesflüssigkeit wird von den Mäusen oder Nacktmäusen gewonnen, zentrifugiert, einer Aussalzung mit 40 bis 50 gesättigtem Ammoniumsulfat oder einer Fällung mit Caprylsäure unterzogen und dann durch eine DEAE-Sephrose-Säule, Protein A-Säule oder Cellulofine GSL 2000 (von Seikagaku Kogyo hergestellt) geleitet, um eine IgG- oder IgM-Fraktion zu gewinnen, um einen gereinigten monoklonalen Antikörper zu erhalten.

[0052] Die Subklasse des gereinigten monoklonalen Antikörpers kann unter Verwendung eines Typing-Kit für murine monoklonale Antikörper oder eines Typing-Kit für monoklonale Rattenkörper bestimmt werden. Die Proteinmenge kann nach dem Lowry-Verfahren oder durch Berechnung anhand der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt werden.

[0053] Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, unter Verwendung des erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpers in vitro den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 oder Zellen, in denen der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, zu detektieren, ein Verfahren zur immunologischen Detektion und Bestimmung des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 und ein Verfahren zur Inhibition der Bindung von menschlichem VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 oder der biologischen Aktivitäten von menschlichem VEGF.

[0054] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein diagnostisches Mittel für Erkrankungen, deren Krankheitszustände durch abnormale Angiogenese fortschreiten wie z. B. Proliferation oder Metastase solider Tumoren, Arthritis bei rheumatoider Arthritis, diabetische Retinopathie, Retinopathie von Frühgeborenen, Psoriasis und dergleichen.

[0055] Die Verfahren zur Detektion und Bestimmung des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 sind nachfolgend beschrieben.

2. Detektion und Bestimmung des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1

[0056] Zu den Beispielen der Verfahren unter Verwendung des erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpers zur immunologischen Detektion des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 oder einer Zelle, in der der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, sowie zur immunologischen Detektion und Bestimmung von löslichem menschlichem VEGF-Rezeptor Flt-1 gehören Immunozytenfärbung, Western-Blotting, Sandwich-ELISA und dergleichen. Diese Verfahren sind nachfolgend beschrieben.

(1) Immunozytenfärbung unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers

[0057] Zuerst werden die Zellen, in denen der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, präpariert. Suspensionszellen werden als solche, adhätierende Zellen nach Ablösung der Zellen unter Verwendung von Trypsin-EDTA suspendiert, z. B. in einer Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung (PBS enthaltend 1 % BSA, 0,02 % EDTA und 0,05 % Natriumazid) und in Portionen von 1×10^5 bis 2×10^6 Zellen aufgeteilt. Ein im oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhaltener Kulturüberstand des den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridoms, der im oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhaltene gereinigte monoklonale Antikörper oder der durch ein bekanntes Verfahren mit Biotin markierte monoklonale Antikörper („Enzyme Antibody Method“: veröffentlicht von Gakusai Kikaku 1985) wird mit der Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung oder mit der Pufferlösung für die Verwendung bei der Immunozytenfärbung, weiter ergänzt mit 10 % Tiereserum, auf eine Konzentration von 0,1 bis 50 µg/ml verdünnt und in Portionen von 20 bis 500 µl zugesetzt, um die Reaktion unter Kühlung 30 Minuten lang durchzuführen. Wenn der im oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhaltene Kulturüberstand des den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridoms oder der im oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhaltene gereinigte monoklonale Antikörper in die Reaktion eingesetzt wird, werden die Zellen mit der Pufferlösung zur Verwendung bei der Färbung von Immunozyten gewaschen, um dann wird ein Antikörper gegen murines Immunglobulin oder gegen Rattenimmunglobulin, mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z. B. FITC, Phycoerythrin oder dergleichen markiert, der in der Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung auf eine Konzentration von ungefähr 0,1 bis 50 µg/ml verdünnt ist, in Portionen von 50 bis 500 µl zugesetzt, um die Reaktion unter Kühlung 30 Minuten lang durchzuführen. Wenn der mit Biotin markierte monoklonale Antikörper in die Reaktion eingesetzt wird, wird das Streptavidin in Portionen von 50 bis 500 µl zugesetzt, und dann wird die Reaktion unter Kühlung im Dunkel über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Nach dem Abschluss der Reaktion werden die Zellen mit der Pufferlösung zur Verwendung bei der Färbung von Immunozyten gründlich gewaschen und mit einem Zytometer analysiert.

(2) Detektion des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 durch Western-Blotting

[0058] Zellmembrankomponenten werden aus Zellen, in denen der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimiert wird, wie z. B. den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden NIH3T3-Zellen (nachfolgend als „NIH3T3-F1t-1“ bezeichnet), und aus Kontrollzellen, wie NIH3T3-Zellen (nachfolgend als „NIH3T3-Neo“ bezeichnet) (Oncogene 10: 135 (1995)) gewonnen, und die Membrankomponenten werden unter reduzierenden Bedingungen einer Elektrophorese nach dem SDS-PAGE-Verfahren in einer Menge von 0,1 bis 30 µl als Protein pro Spur unterzogen. Die so behandelten Proteine werden auf eine PVDF-Membran transferiert, und man lässt sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit PBS, enthaltend 1 % BSA, reagieren, um Blockierung zu bewirken. Man lässt sie mit dem Kulturüberstand des im oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhaltenen einen monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridoms oder in dem in dem oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhaltenen gereinigten monoklonalen Antikörper reagieren, wäscht sie mit 0,05 % Tween enthaltendem PBS und lässt sie dann 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit Peroxidase-markierten Ziege-Anti-Maus-IgG reagieren. Nach Waschen mit 0,05 % Tween enthaltendem PBS werden die Banden, an die der monoklonale Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bindet, unter Verwendung des ECL™-Western Blotting-Detektionsreagents (von Amersham hergestellt) oder dergleichen detektiert.

(3) Bestimmung des löslichen VEGF-Rezeptors Flt-1 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers

[0059] Eine geeignete Platte wird mit dem im oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhaltenen gereinigten monoklonalen Antikörper als Erstantikörper beschichtet, und man lässt ihn mit 0,056 bis 10.000 ng/ml des im oben beschriebenen Schritt 1-(1) erhaltenen monoklonale Antikörper gegen den gereinigten löslichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridoms oder mit einer Probe wie z. B. menschlichem Serum oder dergleichen reagieren. Nach gründlicher Waschung der Platte lässt man sie mit einem Zweitantikörper, nämlich einem mit Biotin, einem Enzym, einer chemolumineszenten Substanz, einer radioaktiven Verbindung oder dergleichen markierten monoklonalen Antikörper, reagieren, welcher Zweitantikörper einer der im oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhaltenen gereinigten monoklonalen Antikörper ist, aber andere Epitope als der als Erstantikörper verwendete monoklonale Antikörper erkennt, und dann führt man die für die verwendete Markierung geeignete Reaktion durch. Anhand der Reaktivität für den gereinigten löslichen VEGF-Rezeptor Flt-1 wird eine Eichkurve erstellt, und die Konzentration des löslichen VEGF-Rezeptors Flt-1 in den Proben wird berechnet.

[0060] Die Verfahren zur Inhibition der Bindung von menschlichem VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 und der biologischen Aktivitäten des menschlichen VEGF sind beispielhaft dargestellt.

(4) Test der Inhibition der Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor Flt-1 unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers

[0061] Methanol wird in 100 µl-Portionen den Näpfen einer 96-Loch-MultiScreen-IP-Platte (von Millipore hergestellt) zugesetzt, um der PVDF-Membran auf dem Plattenboden eine hydrophile Natur zu verleihen. Nach Waschen mit Wasser wird der menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 oder ein rekombinantes Protein wie etwa ein Fusionsprotein mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1, auf eine Konzentration von 0,1 bis 10 µg/ml verdünnt, in Portionen von 50 µl pro Napf zugesetzt, und dann lässt man ihn über Nacht bei 4 °C stehen, um seine Adsorption zu bewirken. Nach Waschen wird PBS, 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltend, in Portionen von 100 µl pro Napf zugesetzt, und die Reaktion wird eine Stunde lang bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Blockierung aller übrig gebliebenen aktiven Gruppen zu erreichen. Nach Waschen mit PBS wird der im oben beschriebene Schritt 1-(4) erhaltene Kulturüberstand des den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridoms oder der im oben beschriebene Schritt 1-(6) erhaltene gereinigte monoklonale Antikörper in Portionen von 50 µl pro Napf zugesetzt, und dann werden 0,1 bis 10 ng/ml ¹²⁵I-markiertes VEGF (von Amersham hergestellt) in Portionen von 50 µl pro Napf zugesetzt, woraufhin man die Reaktion 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur durchführt. Nach Waschen mit 0,05 % Tween-PBS werden die Näpfe bei 50 °C getrocknet, und ein Szintillator wird in Portionen von 20 bis 100 µl pro Napf zugesetzt, um die Radioaktivität des an jeden einzelnen Napf gebundenen ¹²⁵I-markierten VEGF unter Verwendung von Top Count (von Packard hergestellt) oder dergleichen zu messen.

(5) Test der Inhibition der Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierende Zellen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers

[0062] 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltendes PBS wird in Portionen von 100 µl den Näpfen einer 96-well- MultiScreen-HV-Platte (von Millipore hergestellt) zugesetzt, die Reaktion wird 1 Stunde lang bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Blockierung der aktiven Gruppen in den Näpfen zu bewirken, und dann werden NIH3T3-Flt-1-Zellen, in 0,05 % NaN₃ enthaltendem 1 % BSA-PBS suspendiert, in Portionen von 1 × 10⁴ bis 1 × 10⁵ pro Napf zugesetzt. Nach Waschen mit 1 % BSA-PBS wird der im oben beschriebene Schritt 1-(4) erhaltene Kulturüberstand des den monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bildenden Hybridoms oder der im oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhaltene gereinigte monoklonale Antikörper in Portionen von 50 µl pro Napf zugesetzt, und dann werden 0,1 bis 10 ng/ml ¹²⁵I-markiertes VEGF (von Amersham hergestellt) in Portionen von 50 µl pro Napf zugesetzt, woraufhin man die Reaktion 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur durchführt. Nach Waschen mit PBS werden die Näpfe bei 50 °C getrocknet, und ein Szintillator wird in Portionen von 20 bis 100 µl pro Napf zugesetzt, um die Radioaktivität des an jeden einzelnen Napf gebundenen ¹²⁵I-markierten VEGF unter Verwendung von Top Count (von Packard hergestellt) oder dergleichen zu messen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0063] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, das die Konstruktionsschritte des Plasmids pVL1393/Flt 3N zeigt.

[0064] [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, das die Konstruktionsschritte des Plasmids pVI1393/Flt 7N zeigt.

[0065] [Fig. 3](#) ist eine Graphik, die die Muster der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese von gereinigtem Flt-1 7N und Flt-1 3N zeigt (es wurde ein 5- bis 20 %iges Gradientengel verwendet. Von links nach rechts sind die Elektrophoresemuster von Molekulargewichtsmarkern, Flt-1 3N beziehungsweise Flt-1 7N gezeigt. Die Elektrophorese fand unter reduzierenden Bedingungen statt.

[0066] [Fig. 4](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Analyse der Wirkung der löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N in Form der Inhibition der Bindung von ¹²⁵I-menschlichem VEGF an einen auf eine Platte beschichteten löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 7N zeigt.

[0067] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Untersuchung der Bindungsreaktivität von monoklonalem Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 durch Enzymimmunoassay zeigt.

[0068] [Fig. 6](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von monoklonalem Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 in Form der Inhibition der Bindung von VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 zeigt.

[0069] [Fig. 7](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der monoklonalen Antikörper

per KM1732, KM1748 und KM1750 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 in Form der Inhibition der Bindung von menschlichem VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 zeigt.

[0070] [Fig. 8](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der monoklonalen Antikörper KM1732, KM1748 und KM1750 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 in Form der Inhibition der Bindung von menschlichem VEGF an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierende Zellen zeigt.

[0071] [Fig. 9](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Durchflusszytometrieanalyse der Reaktivität der monoklonalen Antikörper KM1730, KM1731, KM1732, KM1748 und KM1750 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit den den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden Zellen NIH3T3-F1t-1 und den Kontrollzellen NIH3T3-Neo zeigt.

[0072] [Fig. 10](#) ist eine Graphik, die die Ergebnisse der Untersuchung der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers KM1737 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 durch Western-Blotting zeigt. Spur 1 zeigt das Western-Blotting-Muster von NIH3T3-F1t-1-Zellen, und Spur 2 zeigt das Muster von NIH3T3-Neo-Zellen.

[0073] [Fig. 11](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Untersuchung des Bestimmungssystems für die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 3N und Flt-1 7N zeigt, durchgeführt unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers KM1732 und des biotinylierten monoklonalen Antikörpers KM1730 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1.

[0074] [Fig. 12](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Durchflusszytometrieanalysen der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit menschlichen Gefäßendothelzellen (HUVEC) zeigt.

[0075] [Fig. 13](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Durchflusszytometrieanalyse der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit menschlichen Gefäßendothelzellen (HUVEC) unter Bedingungen mit oder ohne Stimulation durch VEGF zeigt.

[0076] [Fig. 14](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse der Analyse der Veränderung der Expressionsmenge des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 in menschlichen Gefäßendothelzellen (HUVEC) unter Bedingungen mit oder ohne Stimulation durch VEGF zeigt. Die Menge der Expression von Flt-1 wird als relativer Reaktionswert des monoklonalen Antikörpers KM1730 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 dargestellt, wobei die Reaktivität eines Kontrollantikörpers als 1 definiert ist.

Beste Ausführungsform der Erfindung

Beispiel 1

1) Präparation des Antigens

(1) Konstruktion eines Expressionsvektors für den löslichen VEGF-Rezeptor Flt-1 3N

[0077] Ein Vektor wurde auf folgende Weise zur Verwendung bei der Expression eines Fragmentes des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 (nachfolgend als „löslicher menschlicher VEGF-Rezeptor Flt-1 3N“ bezeichnet), das dem Bereich der Positionen 1 bis 338 (einschließlich einer Signalsequenz) ausgehend von der N-terminalen Aminosäure des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 entspricht, hergestellt. Der lösliche menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 3N entspricht den drei auf der N-terminalen Seite gelegenen immunglobulinartigen Regionen der extrazellulären Domäne des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1.

[0078] Ein cDNA-Klon flt#3-7 (M. Shibuya et al., *Oncogene* 5: 519, 1990), der die vollständige den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 codierende cDNA enthält, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und TaqI teilweise verdaut, um ein 1.263 Basenpaar langes EcoRI-TaqI-DNA-Fragment vom 5'-Ende zu gewinnen, und das so gewonnene Fragment wurde in die 5'-wärtige EcoRI-Schnittstelle und die 3'-wärtige NotI-Schnittstelle stromabwärts von Transkriptionsinitiationspunkt des Polyhedringens eines Baculovirus-Genrekombinationsvektorplasmids pVL1393 (von Invitrogen hergestellt) eingefügt, wobei ein TaqI-NotI-Adapter verwendet wurde, in den auf künstliche Weise ein Stopcodon eingeführt worden war (ein synthetisches DNA-Fragment mit dem in den SEQ ID NO:1 und NO:2 gezeigten Nukleotidsequenzen), wodurch der Expressionsvektor pVL1393/Flt 3N ([Fig. 1](#)) für den löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 3N erhalten wurde.

(2) Konstruktion eines Expressionsvektors für den löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 7N

[0079] Ein Vektor wurde auf folgende Weise zur Verwendung bei der Expression eines Fragmentes des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 (nachfolgend als „löslicher menschlicher VEGF-Rezeptor Flt-1 3N“ bezeichnet), das dem Bereich der Positionen 1 bis 750 (einschließlich einer Signalsequenz) ausgehend von der N-terminalen Aminosäure des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 entspricht, hergestellt. Der lösliche menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 7N entspricht den sieben auf der N-terminalen Seite gelegenen immunglobulinartigen Regionen der extrazellulären Domäne des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1.

[0080] 2,5 Einheiten Taq-Polymerase wurden 100 µl einer 0,001 %igen (Gewicht/Volumen) Gelatinelösung mit 10 mM MgCl₂, enthaltend 10 pmol an Primern mit den in den SEQ ID NO:3 und NO:4 gezeigten Nukleotidsequenzen, 10 ng DNA des flt#3-7 Klon (Oncogene 5: 519 (1990)) und 10 mM an Desoxynukleotidtriphosphaten, zugesetzt. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 30 Mal wiederholt, wobei eine Reaktion nach einer 5-minütigen Vorbehandlung bei 95 °C aus Behandlungen von 90 Sekunden bei 95 °C, 90 Sekunden bei 50 °C und schließlich 90 Sekunden bei 72 °C bestand, wonach man ein DNA-Fragment isolierte. Das DNA-Fragment wurde mit HindIII (die 1893 bp Position in dem flt#3-7 Klon) und NotI verdaut, um ein 610 bp langes HindIII-NotI-DNA-Fragment zu erhalten, nämlich ein DNA-Fragment, das ein 1894–2499 bp-Fragment des flt#3-7 Klon, ein Stopcodon und eine NotI-Erkennungssequenz enthielt. Als nächstes wurde der flt#3-7 Klon mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII verdaut, um ein EcoRI-HindIII-Fragment von 1893 bp vom 5'-Ende zu isolieren. Das 610 bp lange HindIII-NotI-DNA-Fragment und das 1893 bp lange EcoRI-HindIII-Fragment wurden dann in die 5'-wärtige EcoRI-Schnittstelle und die 3'-wärtige NotI-Schnittstelle stromabwärts vom Transkriptionsinitiationspunkt des Polyhedringens eines Baculovirus-Genrekombinationsvektorplasmides pVL1393 eingefügt, wodurch der Expressionsvektor pVL1393/Flt 7N für den löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 7N hergestellt wurde ([Fig. 2](#)).

(3) Herstellung von rekombinantem Virus zur Verwendung bei der Expression von löslichem menschlichem VEGF-Rezeptor Flt-1 in Insektenzellen

[0081] Zur Herstellung eines Proteins in Insektenzellen ist es notwendig, ein rekombinantes Virus herzustellen, in das ein Gen von Interesse integriert ist, und der Herstellungsprozess besteht aus einem Schritt, in dem ein cDNA-Molekül, das ein interessierendes Protein codiert, in ein besonderes Plasmid eingefügt wird, das als Transfervektor bezeichnet wird, und einem nachfolgenden Schritt, in welchem ein Wildtypvirus und ein Transfervektor gemeinsam in Insektenzellen transfiziert werden, um durch homologe Rekombination ein rekombinantes Virus zu erhalten. Diese Schritte wurden unter Verwendung eines BaculoGold Starter Kit, von Pharmingen hergestellt (Produkt Nr. PM-21001 K), auf die folgende Weise in Übereinstimmung mit dem Handbuch durchgeführt.

[0082] Ein rekombinantes Baculovirus wurde auf die folgende Weise durch Einführung einer filamentösen Baculovirus-DNA (BaculoGold Baculovirus DNA, von Pharmingen hergestellt) hergestellt, und die so hergestellte Transfervektor-DNA wurde unter Verwendung eines Lipofectin-Verfahrens (Protein, Nucleic Acid, Enzyme, 37: 2701 (1992)) in Sf9-Insektenzellen (von Pharmingen hergestellt) eingebracht, die unter Verwendung von TMN-FH-Insektenmedium (von Pharmingen hergestellt) kultiviert worden waren.

[0083] 1 µg des in dem oben genannten Schritt (2) hergestellten pVL1393/Flt7N oder des in dem oben beschriebenen Schritt (1) hergestellten pVL1393/Flt3N und 20 ng an filamentöser Baculovirus-DNA wurden in 12 µl destilliertem Wasser aufgelöst, die Lösung wurde mit einem Gemisch von 6 µl Lipofectin und 6 µl destilliertem Wasser gemischt, und das resultierende Gemisch ließ man 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen. Getrennt hiervon wurden 1×10^6 Sf9-Zellen in 2 ml Sf900-II-Medium (von Gibco hergestellt) suspendiert und in eine Zellkultur-Plastik-Petrischale mit 35 mm Durchmesser gefüllt. Dieser wurde das gesamte Volumen der zuvor beschriebenen Lösung von Plasmid-DNA, filamentöser Baculovirus-DNA und Lipofectingemisch zugesetzt, gefolgt von 3 Tagen Kultur bei 27 °C, um 1 ml des das rekombinante Virus enthaltenden Kulturüberstandes zu gewinnen. Der resultierenden Petrischale wurde 1 ml Sf900-II-Medium zugesetzt, und es wurden 3 Tage Kultur bei 27 °C durchgeführt, um weitere 1,5 ml des das rekombinante Virus enthaltenden Kulturüberstandes zu gewinnen.

[0084] Als nächstes ließ man das so erhaltene rekombinante Virus zur Verwendung bei der Proteinexpression folgendermaßen wachsen.

[0085] 2×10^7 Sf9-Zellen wurden in 10 ml Sf900-II-Medium suspendiert, in eine 175 cm²-Flasche (von Greiner hergestellt) gefüllt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Adhäsion der Zellen an

die Flasche zu bewirken. Der flüssige Überstand wurde anschließend verworfen, 15 ml frisches TMV-FH-Insektenmedium und 1 ml des oben beschriebenen das rekombinante Virus enthaltenden Kulturüberstandes wurden zugesetzt, und die Kultur wurde 3 Tage lang bei 27 °C fortgesetzt. Nach der Kultur wurde der flüssige Überstand 10 Minuten lang bei 1.500 g zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen, wodurch man eine rekombinante Viruslösung zur Verwendung bei der Proteinexpression erhielt.

[0086] Der Titer der so erhaltenen rekombinanten Viruslösung wurde anhand des in dem BaculoGold Starter Kit Handbuches (Pharmigen) beschriebenen Verfahrens berechnet.

[0087] 6×10^6 Sf9-Zellen wurden in 4 ml Sf900-II-Medium suspendiert, in Zellkultur-Plastik-Petrischalen von 60 mm Durchmesser gefüllt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Adhäsion der Zellen an die Schale zu bewirken. Als nächstes wurde der flüssige Überstand verworfen, 400 µl frisches Sf900-II-Medium und die oben beschriebene rekombinante Viruslösung, 1:10.000 mit Sf900-II-Medium verdünnt, wurden der Schale zugesetzt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, das Medium wurde entfernt, und dann wurden 5 ml eines 1 % niedrig schmelzende Agarose enthaltenen Mediums (Agarplaque Agarose, von Pharmigen hergestellt) (durch Mischen von 1 ml sterilisierter 5 %iger wässriger Lösung von Agarplaque plus-Agarose mit 4 ml TMN-FH-Insektenmedium hergestellt und bei 42 °C gelagert) in die Schale gegossen. Nachdem man sie 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen hatte, klebte man die Schale mit Vinylband ab, um das Austrocknen zu verhindern, stellte sie in einen versiegelbaren Plastikbehälter und unterzog sie dann 6-tägiger Kultur bei 27 °C. 1 ml PBS, enthaltend 0,01 % Neutralrot, wurde der Schale zugesetzt, um 1 weiteren Tag Kultur durchzuführen, und dann wurde die Anzahl der so gebildeten Plaques gezählt. Durch das oben beschriebene Verfahren wurde gefunden, dass jede der rekombinanten Viruslösungen Viruspartikel in einer Menge von ungefähr 1×10^7 plaquebildenden Einheiten (nachfolgend als „PFU“ bezeichnet) pro ml enthielt.

(4) Expression der löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N in Insektenzellen und ihre Reinigung

[0088] Die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N wurden auf die folgende Weise erhalten. 4×10^7 High Five-Zellen wurden in 30 ml EX-CELL™ 400-Medium (von JRH Biosciences hergestellt), in einer 175-cm²-Flasche (von Greiner hergestellt) enthalten, suspendiert und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Adhäsion der Zellen an die Flasche zu bewirken. 1 ml einer ungefähr 1 bis 3×10^8 PFU/ml an rekombinanten Viruspartikeln enthaltenden Lösung, in dem obigen Schritt (3) aus den Transfervektoren pVL1393/Flt 7N und pVL1393/Flt 3N erhalten, wurde der Flasche zugesetzt, um eine 2-stündige Infektion bei Raumtemperatur durchzuführen. Der Kulturüberstand wurde entfernt, und 30 ml frisches EX-CELL™ 400-Medium wurden zugesetzt, um 3 bis 4 Tage Kultur bei 27 °C durchzuführen. Nach dem Abschluss der Kultur wurde der Kulturüberstand geerntet und 10 Minuten lang bei 1.500 g zentrifugiert, um einen flüssigen Überstand zu erhalten.

[0089] Eine Säule wurde mit etwa 60 ml Heparin-Sepharose-CL-6B-Gel (von Pharmacia Biotech AB hergestellt) befüllt und mit 600 ml eines 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute gewaschen. Nach dem Waschen wurden 1.000 ml des die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N enthaltenden Kulturmediums, auf die oben beschriebene Weise hergestellt, bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute durch die Heparin-Sepharose-CL-6B-Säule geleitet. Nach Waschen mit 600 ml des 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute wurden 600 ml eines 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers mit einem Dichtegradienten von 0 M bis 1,1 M NaCl durch die Säule geleitet, um die Elution der an die Heparin-Sepharose adsorbierten Proteine zu erreichen, und das Eluat wurde in Aliquots von jeweils 8 ml aufgeteilt. Die in jeder Fraktion enthaltenen Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert, und 60 bis 80 ml der die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N enthaltenden Fraktionen wurden gewonnen und unter Verwendung von CentriPrep 10 (von Amicon hergestellt) eingeeengt. Nach der Einengung wurden lösliches menschliches Flt-1 7N und Flt-1 3N als 5 ml bzw. 13 ml Lösung erhalten (die Proteinkonzentrationen waren 331 µg/ml und 204 µg/ml).

(5) Überprüfung der Reinheit der löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N

[0090] Die Reinheit der so gereinigten löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N wurde durch SDS-PAGE überprüft. Die SDS-PAGE wurde in Übereinstimmung mit einem bekannten Verfahren (Anticancer Research 12: 1121, 1992) durchgeführt. Unter Verwendung eines Gradientengels von 5 bis 20 % (von Atto hergestellt) als Gel wurde eine Elektrophorese von Flt-1 7N und Flt-1 3N, jeweils 2 µg Protein pro Spur, unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, und das resultierende Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau

gefärbt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#) dargestellt. Die Reinheit von Flt-1 7N und Flt-1 3N wurde auf 95 % oder mehr bestimmt.

(6) Reinigung des Kontrollantigenproteins für die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1N und Flt-1 3N

[0091] Das Kontrollantigenprotein (negative Kontrollprotein) für die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N wurde auf die folgende Weise erhalten. 4×10^7 High Five-Zellen wurden in 30 ml EX-CELL™ 400-Medium (von JRH Biosciences hergestellt), in einer 175-cm²-Flasche (von Greiner hergestellt) enthalten, suspendiert und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehengelassen, um die Adhäsion der Zellen an die Flasche zu bewirken, und 3 bis 4 Tage lang bei 27 °C kultiviert. Nach dem Abschluss der Kultur wurde der Kulturüberstand geerntet und 10 Minuten lang bei 1.500 g zentrifugiert, um einen flüssigen Überstand zu erhalten.

[0092] Eine Säule wurde mit etwa 20 ml Heparin-Sepharose-CL-6B-Gel (von Pharmacia Biotech AB hergestellt) befüllt und mit 200 ml eines 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute gewaschen. Nach dem Waschen wurden 500 ml des Kulturmediums der High Five-Zellen auf die oben beschriebene Weise hergestellt, bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute durch die Heparin-Sepharose-CL-6B-Säule geleitet. Nach Waschen mit 200 ml des 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute wurden 200 ml eines 1 M NaCl enthaltenden 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers durch die Säule geleitet, um die Elution der an die Heparin-Sepharose adsorbierten Proteine zu erreichen, und das Eluat wurde in Aliquots von jeweils 8 ml aufgeteilt. Die 1 M NaCl-Fraktion wurde unter Verwendung von CentriPrep 10 (von Amicon hergestellt) eingeeengt. Es wurden 7 ml des Kontrollantigenproteins erhalten (Proteinkonzentration 867 µg/ml).

(7) Überprüfung der Bindungsaktivität der löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N für menschliches VEGF

[0093] Die Bindungsaktivität der löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N für menschliches VEGF wurde auf die folgende Weise bestimmt.

[0094] Methanol wurde in 100 µl-Portionen den Näpfen einer 96 Well Immobilon™-P-Filtrationsplatte (von Millipore hergestellt) zugesetzt, um der PVDF-Membran auf dem Plattenboden eine hydrophile Natur zu verleihen. Nach Waschen mit Wasser wurde das auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnte lösliche menschliche Flt-1 7N in einer Menge von 50 µl/Napf zugesetzt und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen, um seine Adsorption zu bewirken. Nach dem Waschen wurde 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltendes PBS in einer Menge von 100 µl/Napf zugesetzt, und die Reaktion fand 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, um die Blockierung der übrig gebliebenen aktiven Gruppen zu erreichen. Nach Waschen mit PBS wurde jeder der in dem oben beschriebenen Schritt (4) erhaltenen gereinigten löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N in einer Menge von 50 µl/Napf zugesetzt (Endkonzentration 1 bis 1.000 ng/ml), dann setzte man ¹²⁵I-markiertes menschliches VEGF (Endkonzentration 3 ng/ml; von Amersham hergestellt) in einer Menge von 50 µl/Napf zu und führte anschließend die Reaktion 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur durch. Nach Waschen mit 0,05 % Tween-PBS wurden die Näpfe bei 50 °C getrocknet, und Microscinti-0 (von Packard hergestellt) wurde in einer Menge von 20 µl/Napf zugesetzt, um unter Verwendung von Top Count (von Packard hergestellt) die Radioaktivität des an jeden einzelnen Napf gebundenen ¹²⁵I-markierten menschlichen VEGF zu messen.

[0095] Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) dargestellt. Es wurde gezeigt, dass die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N auf dosisabhängige Weise die Bindung von ¹²⁵I-markiertem menschlichem VEGF an den löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 7N inhibieren. Da die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N ein ähnliches Ausmaß an Bindungsaktivität des menschlichen VEGF zeigten, wurde entdeckt, dass menschliches VEGF an den Flt-1 3N-Teil bindet (die Positionen 1 bis 338 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure einschließlich einer Signalfrequenz).

(8) Expression von menschlichem VEGF in Insektenzellen

[0096] Das menschliche VEGF wurde auf die folgende Weise erhalten. 4×10^7 High Five-Zellen wurden in 30 ml EX-CELL™ 400-Medium (von JRH Biosciences hergestellt), in einer 175-cm²-Flasche (von Greiner hergestellt) enthalten, suspendiert und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Adhäsion der Zellen an die Flasche zu bewirken. 1 ml einer ungefähr 1 bis 3×10^8 PFU/ml an rekombinanten Hu-

man-VEGF-Baculoviruspartikeln enthaltene Lösung, in Übereinstimmung mit dem bekannten Verfahren (Cell Growth and Differentiation 7: 213 (1996)) erhalten, wurde der Flasche zugesetzt, um eine 2-stündige Infektion bei Raumtemperatur durchzuführen. Der Kulturüberstand wurde entfernt, und 30 ml frisches EX-CELL™ 400-Medium wurden zugesetzt, um 3 bis 4 Tage Kultur bei 27 °C durchzuführen. Nach Abschluss der Kultur wurde der Kulturüberstand geerntet und 10 Minuten lang bei 1.500 g zentrifugiert, um einen flüssigen Überstand zu erhalten.

[0097] Eine Säule wurde mit etwa 40 ml Heparin-Sepharose-CL-6B-Gel (von Pharmacia Biotech AB hergestellt) befüllt und mit 400 ml eines 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute gewaschen. Nach dem Waschen wurden 1.500 ml des auf die oben beschriebene Weise hergestellten, menschliches VEGF enthaltenden Kulturmediums bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute durch die Heparin-Sepharose-CL-6B-Säule geleitet. Nach Waschen mit 400 ml des 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers bei einem Durchfluss von 0,5 ml/Minute wurden 120 ml jeweils eines 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)-Puffers mit 0,2 M, mit 0,5 M und mit 1 M NaCl in dieser Reihenfolge durch die Säule geleitet, um die schrittweise Elution der an die Heparin-Sepharose adsorbierten Proteine zu erreichen, und das Eluat wurde in Aliquots von jeweils 8 ml aufgeteilt. Die in jeder Fraktion enthaltenen Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert, und 120 ml der menschliches VEGF-enthaltenden Fraktionen (0,5 M- bis 1 M-NaCl-Fraktionen) wurden gewonnen. Nach Einengung unter Verwendung von CentriPrep 10 (von Amicon hergestellt) wurde menschliches VEGF als 4 ml Lösung (Proteinkonzentration 1,2 mg/ml) erhalten.

2. Immunisierung von Tieren und Herstellung von Antikörper bildenden Zellen

[0098] Ein 50 µg-Aliquot jedes der in dem oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhaltenen Antigene wurde zusammen mit 2 mg Aluminiumhydroxidgel und 1×10^9 Pertussisvakzinezellen (von Chiba Serum Institute hergestellt) 5 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen (SLC Japan), B6C3F1-Mäusen (Charles River Japan) oder weiblichen SD-Ratten (SLC Japan) verabreicht, und 2 Wochen danach beginnend wurden ein Mal in der Woche insgesamt vier Mal 10 bis 50 µg des Proteins verabreicht. Weiterhin wurden 1×10^7 NIH3T3-F1t-1-Zellen sechsmal drei 5 Wochen alten weiblichen BALB/c (SLC Japan) Mäusen verabreicht. Blutproben wurden aus dem Augenhintergrund oder der Schwanzvene entnommen, ihre Serumantikörpertiter wurden durch das nachfolgend beschriebene Enzymimmunoassay untersucht, und den Mäusen oder Ratten, die einen hinreichenden Antikörpertiter zeigten, wurde 3 Tage nach der letzten Immunisierung die Milz entnommen. In diesem Zusammenhang wurde bei den 5 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen, denen NIH3T3-F1t-1-Zellen verabreicht worden waren, keine Immunisierung ausgelöst, so dass der Antikörpertiter auf lösliches Flt-1 7N nicht gesteigert wurde.

[0099] Die so ausgeschnittene Milz wurde in MEM-Medium (von Nissui Pharmaceutical hergestellt) in Stücke geschnitten, mit einer Pinzette zerkleinert und dann zentrifugiert (1.200 rpm, 5 Minuten). Der resultierende Überstand wurde verworfen, und das so erhaltene Sediment wurde 1 bis 2 Minuten lang mit Tris-Ammoniumchloridpuffer (pH 7,65) behandelt, um die Erythrozyten zu entfernen, drei Mal mit MEM-Medium gewaschen und für die Zellfusion verwendet.

3. Enzymimmunoassay

[0100] Im Hinblick auf die Messung der aus mit löslichen menschlichen Flt-1 7N und Flt-1 3N, im oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhalten, immunisierten Mäusen oder Ratten gewonnenen Antiseren und Hybridom-Kulturüberstände wurden die aus den Insektenzellkulturüberständen von 1-(4) erhaltenen löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N als Antigene verwendet. Man setzte eine auf 1 bis 10 µg/ml in PBS verdünnte Lösung jedes der löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N und als Kontrollantigen die Heparinsäulen-Adsorptionsfraktion des High Five-Zellkulturüberstands, in dem oben beschriebenen Schritt 1-(6) erhalten, in Portionen von 50 µl/Napf einer 96-Loch-Platte für den EIA (von Greiner hergestellt) zu und ließ sie über Nacht bei 4 °C zur Beschichtung stehen. Nach dem Waschen wurde 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltendes PBS in Portionen von 100 µl/Napf zugesetzt, und die Reaktion fand 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, um die Blockierung der übrig gebliebenen aktiven Gruppen zu bewirken. Nach Verwerfen des 1 %-igen BSA-PBS wurden Antiserum immunisierter Mäuse oder immunisierter Ratten und Hybridom-Kulturüberstand in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, um die Reaktion 2 Stunden lang durchzuführen. Nach Waschen mit 0,05 % Tween-PBS wurde Peroxidase-markiertes Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin oder Peroxidase-markiertes Kaninchen-Anti-Ratten-Immunglobulin (beide von DAKO hergestellt) in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, und die Reaktion fand 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, die Platte wurde mit 0,05 % Tween-PBS gewaschen, und die Entwicklung der Farbe wurde unter Verwendung von ABTS-Substratlösung (2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonsäure)-Ammoniumsalz) ausgelöst

und die maximale Absorption bei einer OD von 415 nm unter Verwendung von E max (von Molecular Devices hergestellt) gemessen.

4. Herstellung von Mäusemyelomzellen

[0101] Die gegen 8-Azaguanin resistente murine Myelomzelllinie P3U1 wurde in normalem Medium kultiviert, um 2×10^{-7} oder mehr der Zellen zur Verwendung als Elternzelllinie bei der Zellfusion zu sichern.

5. Herstellung von Hybridomen

[0102] Die im obigen Abschnitt 2 erhaltenen Mäusemilzzellen oder Rattenmilzzellen und die im obigen Abschnitt 4 erhaltenen Myelomzellen wurden in einem Verhältnis von 10:1 gemischt und zentrifugiert (1.200 rpm, 5 Minuten), der Überstand wurde verworfen, die gefällten Zellen wurden gründlich abgelöst, und unter Rühren bei 37 °C wurde anschließend eine gemischte Lösung von 2 g Polyethylenglykol 1000 (PEG-1000), 2 ml MEM-Medium und 0,7 ml DMSO in einer Menge von 0,2 bis 1 ml 10^8 Mäusemyelomzellen zugesetzt, gefolgt von mehrfachem Zusatz von 1 bis 2 ml MEM-Medium in Zeitintervallen von 1 bis 2 Minuten, und schließlich wurde das Gesamtvolumen durch Zusatz von MEM-Medium auf 50 ml eingestellt. Nach der Zentrifugation (5 Minuten bei 900 rpm) wurde der Überstand verworfen, und die so erhaltenen Zellen wurden vorsichtig abgelöst und dann vorsichtig in 100 ml HAT-Medium suspendiert, indem man sie wiederholt in eine gradierte Pipette einsaugte und wieder ausstieß.

[0103] Die Suspension wurde in 100 µl-Portionen den Näpfen einer 96-Loch-Kulturplatte zugesetzt und 10 bis 14 Tage lang bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ in einem 5 % CO₂-Inkubator kultiviert. Der resultierende Kulturüberstand wurde durch das im Beispiel 1–3 beschriebenen Enzymimmunoassayverfahren untersucht, um diejenigen Näpfe zu selektieren, die spezifisch mit den in dem oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhaltenen löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N oder Flt-1 3N reagierten, aber nicht mit dem in Schritt 1-(6) erhaltenen Kontrollantigen reagierten, und dann wurde die Klonierung zwei Mal wiederholt, indem man das Medium auf HT-Medium und normales Medium umstellte, um Hybridome zu etablieren, die imstande waren, monoklonale Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 zu bilden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 1

Tier	Stück	Immunogen	Quelle für die Durchmusterung	Durchmusterter Näpfe	Anzahl etablierter Hybridome
BALB/C-Maus	3	NIH3T3-Flt-1	Flt 7N	-	-
SD-Ratte	1	Flt 7N	Flt 7N	1008	3 (KM1733, 1735, 1736)
BALB/C-Maus	1	Flt 7N	Flt 7N	672	5 (KM1737, 1739, 1740, 1742, 1743)
SD-Ratte	1	Flt 7N	Flt 7N	1176	3 (KM1745, 1746, 1747)
B3C3F1-Maus	1	Flt 7N	Flt 3N	672	3 (KM1748, 1749, 1750)
BALB/C-Maus	1	Flt 7N	Flt 3N	420	3 (KM1730, 1731, 1732)

[0104] Als die aus einer BALB/C-Maus und zwei SD-Ratten, mit dem in dem oben beschriebenen Schritt 1-(4) hergestellten löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 7N immunisiert, unter Verwendung des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 7N in ungefähr 672 Nöpfen bzw. ungefähr 2.184 Nöpfen durchmustert wurden, wurden 5 Klone bzw. 6 Klone monoklonaler Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 erhalten, und sie erhielten die Bezeichnungen KM1737, KM1739, KM1740, KM1742 und KM1743 beziehungsweise KM1733, KM1735, KM1736, KM1745, KM1746 und KM1747. Keiner dieser Klone zeigte die Wirkung, dass er die Bindung menschlichen VEGFs an Flt-1 inhibierte, wie im folgenden Abschnitt 8 gezeigt. Weiterhin reagierten KM1735, KM1736, KM1742, KM1743 und KM1745 beim im nachfolgenden Abschnitt 10 beschriebenen Immunozytenfärbungsverfahren mit den den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden Zellen, aber die Reaktion war im Vergleich zu KM1730, KM1731 und KM1732 extrem schwach.

[0105] Als hingegen aus einer B3C3F1-Maus und einer BALB/C-Maus, mit dem in dem oben beschriebenen Schritt 1-(4) hergestellten löslichen menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 7N immunisiert, in ungefähr 672 Nöpfen beziehungsweise ungefähr 420 Nöpfen unter Verwendung des löslichen menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 3N durchmustert wurden, wurden für jeden der monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 jeweils 3 Klone erhalten, und sie erhielten die Bezeichnungen KM1748, KM1749 und KM1750 beziehungsweise KM1730, KM1731 und KM1732. Von diesen Klonen zeigten die drei Klone KM1732, KM1748 und KM1750 die Wirkung, die Bindung von menschlichem VEGF an Flt-1 zu inhibieren, wie im folgenden Abschnitt 8 gezeigt. Weiterhin reagierten drei Klone KM1730, KM1731 und KM1732 bei dem Immunozytenfärbungsverfahren, im nachfolgenden Abschnitt 10 beschrieben, ausgeprägt stark mit den dem menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden Zellen.

[0106] Die Antikörperklasse dieser monoklonalen Antikörper wurde durch ein Enzymimmunoassay unter Verwendung des Subclass Typing Kit (von Zymed hergestellt) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2

Monoklonaler Antikörper	Antikörper-Subklasse
KM1733	Maus IgG2a
KM1735	Ratte IgG1
KM1736	Ratte IgG2a
KM1737	Maus IgG1
KM1739	Maus IgG1
KM1740	Maus IgG1
KM1742	Maus IgG1
KM1743	Maus IgG1
KM1745	Ratte IgG2a

KM1746	Ratte IgG1
KM1747	Ratte IgG1
KM1748	Maus IgG2b
KM1749	Maus IgG1
KM1750	Maus IgG2b
KM1730	Maus IgG1
KM1731	Maus IgG2a
KM1732	Maus IgG1

[0107] Alle in der vorliegenden Erfindung etablierten monoklonalen Antikörper gehörten der Klasse IgG an.

6. Reinigung der monoklonalen Antikörper

[0108] Die im obigen Abschnitt 5 erhaltenen Hybridomas wurden in Dosierungen von 5 bis 20×10^6 Zellen pro Tier Pristan-behandelten weiblichen Nacktmäusen (BALB/C) im Alter von 8 Wochen durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Hybridome führten innerhalb von 10 bis 21 Tagen zur Ascitestumorbildung. Die Ascitesflüssigkeit wurde von jeder Ascitesflüssigkeit enthaltenden Maus gewonnen (1 bis 8 ml pro Tier), zentrifugiert (5 Minuten lang bei 3.000 rpm), um Feststoffe zu entfernen, und dann durch ein Caprylsäurefällungsverfahren gereinigt (Antibodies – A Laboratory Manual).

7. Überprüfung der Spezifität der monoklonaler Antikörper

[0109] Die Spezifität der im oben beschriebenen Abschnitt 5 beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 wurde unter Verwendung des in dem oben beschriebenen Abschnitt 3 beschriebenen Enzymimmunoassayverfahrens überprüft.

[0110] Die Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) dargestellt. Unter den monoklonalen Antikörpern, die erhalten wurden, indem man Hybridome aus mit Flt-1 7N immunisierten Mäusen und Ratten herstellte und unter Verwendung von Flt-1 7N selektierte (KM1733, KM1735, KM 1736, KM 1737, KM 1739, KM 1740, KM 1742, KM 1743, KM 1745, KM 1746 und KM1747) reagierte nur KM1740 mit Flt-1 7N und mit Flt-1 3N, was zeigt, dass es ein Epitop erkennt, das in einem Bereich der Positionen 1 bis 338 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure (einschließlich einer Signalsequenz) von Flt-1 vorkommt. Da die übrigen 10 Klone mit Flt-1 7N, aber nicht mit Flt-1 3N reagierten, wurde gezeigt, dass sie ein Epitop erkennen, das in einem Bereich der Positionen 339 bis 750 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure (einschließlich einer Signalfrequenz) von Flt-1 vorkommt. Andererseits wurde, da alle der durch Herstellung von Hybridomen aus mit Flt-1 7N immunisierten Mäusen gewonnenen und unter Verwendung von Flt-1 3N selektierten Hybridome (KM1748, KM1749, KM1750, KM1730, KM1731 und KM1732) mit Flt-1 7N und Flt-1 3N reagierten, gezeigt, dass sie ein Epitop erkennen, das in einem Bereich der Positionen 1 bis 338 von der N-terminalen Aminosäure von Flt-1 (einschließlich der Signalsequenz) vorkommt.

8. Überprüfung der inhibitorischen Aktivität monoklonaler Antikörper gegen Flt-1 auf die Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1

[0111] Die inhibitorische Aktivität der in dem oben beschriebenen Abschnitt 5 beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 auf die Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 wurde auf die folgende Weise überprüft.

[0112] Methanol wurde in 100 µl-Portionen den Näpfen einer 96-Loch-MultiScreen-IP-Platte (von Millipore hergestellt) zugesetzt, um der PVDF-Membran am Boden der Platte eine hydrophile Natur zu verleihen. Nach Waschen mit Wasser wurde der lösliche menschliche VEGF-Rezeptor Flt-1 7N, mit PBS auf eine Konzentration von 1,6 µg/ml verdünnt, in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt und dann über Nacht bei 4 °C stehen gelassen, um seine Adsorption zu bewirken. Nach dem Waschen wurde 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltendes PBS in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, und die Reaktion fand 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, um die Blockierung der restlichen aktiven Gruppen zu bewirken. Nach Waschen mit PBS wurde jeder Hybri-

domkulturüberstand oder ein gereinigter monoklonaler Antikörper, mit 0,5 M NaCl enthaltendem 1 % BSA-PBS verdünnt (0,01 bis 7,29 µg/ml), in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, dann wurden 3 ng/ml an ¹²⁵I-markierten menschlichem VEGF (von Amersham hergestellt) in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, dann erfolgte die Reaktion 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit 0,05 Tween-PBS wurden die Näpfe bei 50 °C getrocknet, und Microscinti-0 (von Packard hergestellt) wurde in Portionen von 30 µl/Napf zugesetzt, um unter Verwendung von Top Count (von Packard hergestellt) die Radioaktivität des an jeden Napf gebundenen ¹²⁵I-markierten menschlichen VEGFs zu messen.

[0113] Die Ergebnisse der Untersuchung der Aktivitäten der Hybridomkulturüberstände sind in [Fig. 6](#) gezeigt. Unter den 17 etablierten monoklonalen Antikörpern inhibierten drei monoklonale Antikörper, KM1748, KM1750 und KM1732, die Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit Inhibitionsraten von 62,6 %, 66,3 % beziehungsweise 83,1 %.

[0114] Allgemein wird die Durchmusterung von monoklonale Antikörper bildenden Hybridomen unter Verwendung des gleichen Proteins wie das als Immunogen verwendete Antigen durchgeführt. Insgesamt 11 unter Verwendung von Flt-1 7N als Immunogen selektierte monoklonale Antikörper zeigten keine Bindungsinhibitionsaktivität, und unter 6 unter Verwendung von Flt-1 3N selektierten monoklonalen Antikörpern (KM 1748, KM 1749, KM 1750, KM 1730, KM 1731 und KM 1732) zeigten KM 1748, KM1750 und KM1732 die Bindungsinhibitionsaktivität. Es war eine unerwartete Wirkung, dass monoklonale Antikörper mit Bindungsinhibitionsaktivität durch die Verwendung von Flt-1 3N beim Durchmustern der Hybridomas erhalten wurden. Somit wurde entdeckt, dass Flt-1 3N von hoher Bedeutung für die Etablierung monoklonaler Antikörper mit Bindungsinhibitionsaktivität ist.

[0115] [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse der Überprüfung der Bindungsinhibitionsaktivität unter Verwendung der gereinigten monoklonalen Anti-Flt-1-Antikörper KM1732, KM1748 und KM1750. Diese Antikörper KM1732, KM1748 und KM1750 inhibierten die Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 auf konzentrationsabhängige Weise. Die KM1732-, KM1748- und KM1750-Konzentrationen, die eine 50 %ige Inhibition der Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bezeichnen (IC₅₀), waren 1,1, 1,3 beziehungsweise 2,0 µg/ml. Andererseits zeigte ein als Kontrolle verwendeter monoklonaler Anti-Sialyl-Le^a-Antikörper KM231 der murinen IgG1-Klasse (Anticancer Research, 10, 1579 (1990)) keine Inhibitionsaktivität.

9. Überprüfung der inhibitorischen Aktivität von monoklonalen Anti-Flt-1 Antikörpern auf die Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierende Zellen

[0116] Die inhibitorische Aktivität der monoklonalen Antikörper KM1732, KM1748 und KM1750 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 auf die Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 wurde auf die folgende Weise überprüft.

[0117] 1 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltendes PBS wurde in Portionen von 100 µl den Näpfen einer 96-Loch-MultiScreen-HV-Platte (von Millipore hergestellt) zugesetzt, die Reaktion fand 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, um die Blockierung der aktiven Gruppen in den Näpfen zu bewirken, und dann wurden in 0,05 % NaN₃ enthaltendem 1 % BSA-PBS suspendierte NIH3T3-Flt-1-Zellen in Portionen von 5 × 10⁴ Zellen pro Napf zugesetzt. Nach Waschen mit 1 % BSA-PBS wurde ein gereinigter monoklonaler Antikörper (0,01 bis 7,29 µg/ml) in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, dann wurden 3 ng/ml an ¹²⁵I-markiertem menschlichem VEGF (von Amersham hergestellt) in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, und die Reaktion fand 2 Stunden lang unter Kühlung statt. Nach Waschen mit PBS wurden die Näpfe bei 50 °C getrocknet, und Microscinti-0 (von Packard hergestellt) wurde in Portionen von 30 µl/Napf zugesetzt, um unter Verwendung von Top Count (von Packard hergestellt) die Radioaktivität des an jeden einzelnen Napf gebundenen ¹²⁵I-markierten menschlichen VEGF zu messen.

[0118] [Fig. 8](#) zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Bindungsinhibitionsaktivität unter Verwendung der gereinigten monoklonalen Anti-Flt-1-Antikörper KM1732, KM1748 und KM1750. Diese Antikörper inhibierten auf konzentrationsabhängige Weise die Bindung menschlichen VEGFs an NIH3T3-Flt-1-Zellen. Die KM1732-, KM1748- und KM1750-Konzentrationen, die eine 50 %ige Inhibition der Bindung menschlichen VEGFs an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bezeichnen (IC₅₀), waren 0,050, 0,037 beziehungsweise 0,041 µg/ml. Andererseits zeigte ein als Kontrolle verwendeter monoklonaler Anti-Sialyl-Le^a-Antikörper KM231 der murinen IgG1-Klasse (Anticancer Research, 10, 1579 (1990)) keine Inhibitionsaktivität.

10. Überprüfung der Reaktivität monoklonaler Antikörper mit den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden Zellen

[0119] Die Spezifität der im oben beschriebenen Abschnitt 5 beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 wurde unter Verwendung eines Immunozytenfärbungsverfahrens in Übereinstimmung mit dem folgenden Protokoll überprüft.

[0120] Insgesamt 5×10^5 Zellen sowohl der den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden NIH3T3-Zellen (NIH3T3-F1t-1) als auch der NIH3T3-Kontrollzellen (NIH3T3-Neo) (Oncogene, 10, 135 (1995)) wurden in 100 μ l einer Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung (1 % BSA, 0,02 % EDTA und 0,05 % Natriumazid enthaltendes PBS) suspendiert und in eine 96-Loch-Rundbodenplatte gefüllt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 350 x g wurde der flüssige Überstand verworfen, und die resultierenden Zellen wurden mit 50 μ l eines Hybridomkulturüberstands oder gereinigten Antikörpers (10 μ g/ml) gemischt, und die Reaktion fand 30 Minuten lang bei 4 °C statt. Nach der Reaktion wurden jedem Napf 200 μ l der Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung zugesetzt, und die Zellen wurden durch 1-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 350 x g gewaschen, gefolgt vom Verwerfen des resultierenden Überstandes. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die Zellen mit 50 μ l der Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung, enthaltend 1 μ g/ml eines FITC-markierten Antikörpers gegen Mäuseimmunglobulin oder eines FITC-markierten Antikörpers gegen Rattenimmunglobulin (von Wako Pure Chemical Industries hergestellt) gemischt, und die Reaktion fand 30 Minuten lang bei 4 °C statt. Nach dieser Reaktion wurde der oben beschriebene Waschschritt drei Mal wiederholt, und dann wurde die Analyse unter Verwendung eines Durchflusszytometers (von Coulter hergestellt) durchgeführt.

[0121] Die Ergebnisse sind in [Fig. 9](#) gezeigt. Die monoklonalen Antikörper KM1730, KM1731 und KM1732 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagierten nicht mit den Kontrollzellen, aber sie reagierten in erheblichem Maße spezifisch mit den Flt-1 exprimierenden Zellen. Weder der monoklonale Antikörper KM1748 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 (10 μ g/ml) noch der Hybridomkulturüberstand von KM1748 reagierten mit den Kontrollzellen. Jeder reagierte spezifisch in erheblichem Maß mit den Flt-1 exprimierenden Zellen (B). Im Endergebnis wurde entdeckt, dass die monoklonalen Antikörper KM1730, KM1731, KM1732, KM1748 und KM1750 spezifisch den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 auf der Zelloberfläche erkennen. Andererseits reagierten KM1735, KM1736, KM1742, KM1743 und KM 1745 im Vergleich zu KM 1730, KM 1731, KM 1732, KM 1748 und KM 1750 mit den den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 exprimierenden Zellen nur schwach.

11. Detektion des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 durch Western-Blotting unter Verwendung monoklonaler Antikörper

[0122] Zellmembranbestandteile wurden gemäß einem bekannten Verfahren (Cancer Research 46: 4438 (1986)) von NIH3T3-F1t-1-Zellen und NIH3T3-Kontrollzellen (NIH3T3-Neo) gewonnen und einer Elektrophorese nach dem SDS-PAGE-Verfahren unterzogen. Die SDS-PAGE wurde gemäß einem bekannten Verfahren durchgeführt (Anticancer Research 12: 1121 (1992)), indem man 15 μ g, als Protein pro Spur, der Zellmembranbestandteile unter reduzierenden Bedingungen der Elektrophorese unter Verwendung eines 5 bis 20 %-Gradientengels (von Atto hergestellt) unterzog. Die so behandelten Proteine wurden gemäß einem bekannten Verfahren (Anticancer Research 12: 1121, (1992)) auf eine PVDF-Membran übertragen. Als nächstes ließ man die PVDF-Membran 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 1 % BSA enthaltendem PBS reagieren, um die Blockierung zu bewirken, dann ließ man sie über Nacht bei 4 °C mit dem Kulturüberstand des monoklonalen Antikörpers KM1737 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagieren. Die so behandelte Membran wurde mit 0,05 % Tween enthaltendem PBS gewaschen, und dann ließ man sie 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit Peroxidase-markierten Ziege-Anti-Maus-IgG (5.000-fach verdünnt: von Chemicon hergestellt) reagieren. Nach Waschen mit 0,05 Tween enthaltendem PBS wurden die Banden, an die der monoklonale Antikörper KM1737 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 band, unter Verwendung von ECL™ Western Blotting-Detektionsreagentien (von Amersham hergestellt) detektiert.

[0123] Die Ergebnisse sind in [Fig. 10](#) dargestellt. Es wurde bestätigt, dass der monoklonale Antikörper KM1737 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit einem Molekulargewicht von 180 Kilodalton, der in den NIH3T3-F1t-1-Zellen exprimiert wird, detektieren kann.

12. Detektion des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern

[0124] Der monoklonale Antikörper KM1732 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 wurde mit PBS

auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und in Portionen von 50 µl/Napf einer 96-Loch-Platte für den EIA (von Greiner hergestellt) zugesetzt und über Nacht bei 4 °C zur Beschichtung stehen gelassen. Nach dem Waschen wurde 1 Rinderserumalbumin (BSA) enthaltendes PBS in Portionen von 100 µl/Napf zugesetzt, und die Reaktion fand 1 Stunde lang bei Raumtemperatur statt, um die Blockierung der restlichen aktiven Gruppen zu bewirken. Nach dem Verwerfen des 1 % BSA-PBS ließ man die im oben beschriebenen Schritt 1-(4) erhaltenen und mit 1 % BSA-PBS auf eine Konzentration von 1.000 bis 0,0056 ng/ml verdünnten gereinigten löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 7N und Flt-1 3N über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper reagieren. Nach Waschen mit 0,05 % Tween-PBS wurde der nach einem bekannten Verfahren („Enzyme Antibody Method“: veröffentlicht von Gakusai Kikaku, 1985) mit Biotin markierte monoklonale Antikörper KM1730 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit 1 % BSA-PBS auf eine Konzentration von 0,1 µg/ml verdünnt und in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, um die Reaktion 2 Stunden lang bei Raumtemperatur durchzuführen. Nach Waschen mit 0,05 % Tween-PBS wurde 4.000-fach mit 1 % BSA-PBS verdünnte avidin-markierte Peroxidase (von Vector hergestellt) in Portionen von 50 µl/Napf zugesetzt, um die Reaktion bei Raumtemperatur 1 Stunde lang durchzuführen. Nach Waschen mit 0,05 % Tween-PBS wurde die Farbentwicklung unter Verwendung von ABTS-Substratlösung (2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonsäure)-Ammoniumsalz) ausgelöst, um die Absorption bei OD415 nm unter Verwendung von E max (von Molecular Devices hergestellt) zu messen.

[0125] Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) gezeigt. Als Ergebnis wurde gefunden, dass die löslichen menschlichen VEGF-Rezeptoren Flt-1 3N und Flt-1 7N durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers KM1732 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 und des biotinmarkierten monoklonalen Antikörpers KM1730 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 bei Minimalkonzentration von 0,46 ng/ml beziehungsweise 1,37 ng/ml gemessen werden können.

13. Überprüfung der Reaktivität monoklonaler Antikörper mit menschlichen Gefäßendothelzellen (HUVEC)

[0126] Die Reaktivität der in dem oben beschriebenen Abschnitt 5 beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 mit menschlichen Gefäßendothelzellen (HUVEC) wurde auf die folgende Weise durch Immunozytenfärbung überprüft.

[0127] Insgesamt 2×10^5 menschliche Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurden in 100 µl einer Pufferlösung zur Anwendung in der Immunozytenfärbung (1 % BSA, 0,02 % EDTA und 0,05 % Natriumazid enthaltendes PBS) suspendiert und in eine 96-Loch-Rundbogenplatte gefüllt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 350 x g wurde der flüssige Überstand verworfen, und die resultierenden Zellen wurden individuell mit jeweils 50 µl (10 µg/ml) jedes der biotinylierten gereinigten Antikörper KM1730 und KM1750 und der Kontrollantikörper gemischt und anschließend 30 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Als Kontrollantikörper für KM1730 wurde ein monoklonaler Antikörper KM1135 gegen MxA (WO 96/05230) vom Typ IgG1, der gleichen Subklasse wie KM1730, verwendet. Als Kontrollantikörper für KM1750 wurde ein monoklonaler Antikörper KM365 gegen die Gamma-Kette des T-Zell-Rezeptors (ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung Nr. 491/90) vom Typ IgG2b, der gleichen Subklasse wie KM1750, verwendet. Danach wurden jedem Napf 200 µl der Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung zugesetzt, und die Zellen wurden durch 1-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 350 x g gewaschen, und der resultierende Überstand wurde verworfen. Nachdem dieser Waschschrift noch zwei Mal wiederholt worden war, wurden die Zellen mit 20 µl der Pufferlösung zur Verwendung bei der Immunozytenfärbung, enthaltend Avidin-PE (Steptoavidin-R-Phycoerythrin) (von Gibco hergestellt) in einer Konzentration von 5 µg/ml, gemischt, und die Reaktion fand 30 Minuten lang bei 4 °C statt. Nach der Reaktion wurde der oben beschriebene Waschschrift drei Mal wiederholt, und dann wurde die Analyse unter Verwendung eines Durchflusszytometers (von Coulter hergestellt) durchgeführt.

[0128] Die Ergebnisse sind in [Fig. 12](#) dargestellt. Die monoklonalen Antikörper KM1730 und KM1750 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 reagierten im Vergleich zu ihren Kontrollantikörpern mit HUVEC. Diese Ergebnisse zeigen, dass die monoklonalen Antikörper KM1730 und KM1750 den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 auf menschlichen Gefäßendothelzellen detektieren können.

14. Steigerung der Expressionsmenge von Flt-1 auf HUVEC durch VEGF-Stimulation

[0129] Als Modell für Gefäßendothelzellen in einer Angiogeneseregion wurden Veränderungen der Expression des menschlichen VEGF-Rezeptors Flt-1 vor und nach Stimulation mit VEGF unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers KM1730 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 gemäß dem folgenden Protokoll untersucht.

[0130] Insgesamt 4 bis 6×10^5 Zellen jeder der vier HUVEC-Chargen (Charge #4031, #4102, #2477 und #4723; von Clonetics erworben) wurden in 20 ml eines weiterhin mit 5 % fötalem Kälberserum (FBS), 10 ng/ml menschlichen rekombinanten epidermalen Wachstumsfaktors (hEGF), 1 mg/ml Hydrocortison, 50 mg/ml Gentamicin und 50 ng/ml Amphotericin ergänztem, aus E-BM bestehendem Medium (von KURABO hergestellt) (Kontrollmedium) suspendiert, und die Suspension wurde weiterhin mit 1,2 mg/ml Rinderhirnextrakt (BBE) (von KURABO hergestellt) als Wachstumsfaktor gemischt und einer 2 bis 3-tägigen Kultivierung bei 37 °C unterzogen. Nachdem die Zellen sich auf 1 bis 2×10^6 Zellen vermehrt hatten, wurde das Medium entfernt und durch 20 ml frisches Kontrollmediums ersetzt, um insgesamt 2 Tage Kultur durchzuführen. Nach 1-tägiger Kultur wurde menschliches VEGF zu einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugesetzt, und die Zellen wurden nach der Kultur für einen weiteren Tag als VEGF-stimulierte Zellen verwendet. 2 Tage lang ohne Zusatz von VEGF kultivierte Zellen wurden als Kontrollzellen (nicht-VEGF-stimulierte Zellen) verwendet. Nach der Kultur wurden die Zellen geerntet, um die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers KM1730 gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 durch das Immunocytenfärbungsverfahren in Übereinstimmung mit dem im obigen Abschnitt 13 beschriebenen Protokoll zu untersuchen.

[0131] Die Ergebnisse der Untersuchung seiner Reaktivität mit HUVEC der Charge #2477 sind in [Fig. 13](#) dargestellt. KM1730 reagierte mit nicht-VEGF-stimulierten HUVEC, aber stärker mit VEGF-stimulierten HUVEC: Die Reaktivität des Kontrollantikörpers KM1135 änderte sich, unabhängig von VEGF-Stimulation oder nicht-VEGF-Stimulation, nicht. Die [Fig. 14](#) zeigt die Veränderungen der Flt-1-Expression in vier Chargen HUVEC (Chargen #4031, #4102, #2477 und #4723) durch VEGF-Stimulation. Die Flt-1-Expressionsmenge, die die Reaktivität von KM1730 als Index ausdrücken kann, ist als relativer Wert dargestellt, wobei die Reaktivität des Kontrollantikörpers als 1 definiert ist. Es wurde entdeckt, dass alle der vier HUVEC-Chargen Flt-1 ohne VEGF-Stimulation exprimieren können, und dass die Flt-1-Expressionsmenge durch die VEGF-Stimulation gesteigert wird.

[0132] Der Anstieg der Flt-1-Expressionsmenge und der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers gegen Flt-1 bei den VEGF-stimulierten menschlichen Gefäßendothelzellen (HUVEC) als Angiogenesemodell zeigt, dass der monoklonale Antikörper für die Diagnose oder Behandlung von Erkrankungen verwendbar ist, deren Krankheitsbilder durch die Beschleunigung der Angiogenese fortschreiten, die durch VEGF ausgelöst wird, wie z. Tumoren, rheumatoide Arthritis, diabetischer Retinopathie und dergleichen.

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0133] Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Bereitstellung monoklonaler Antikörper, die spezifisch an den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1 binden, der als spezifisch in Gefäßendothelzellen menschlicher Angiogeneseregionen exprimiert gilt. Die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung sind verwendbar zur immunologischen Detektion menschlicher Angiogeneseregionen durch Immunocytenfärbung und zur Diagnose oder, durch die Inhibition der biologischen Wirkungen von menschlichem VEGF, zur Behandlung von Erkrankungen, deren Krankheitsbilder durch abnormale Angiogenese fortschreiten, wie z. B. Proliferation oder Metastasen solider Tumoren, Arthritis bei rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie, Retinopathie der Frühgeborenen, Psoriasis und dergleichen.

SEQUENZPROTOKOLL

SEQ ID NO:1

Sequenzlänge: 23
Sequenztyp: Nukleinsäure
Strängigkeit: einzeln
Topologie: linear
Molekültyp: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
Sequenz:
CGACAAACCA ATATAATCTA AGC 23

SEQ ID NO:2

Sequenzlänge: 25
Sequenztyp: Nukleinsäure
Strängigkeit: einzeln
Topologie: linear
Molekültyp: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
Sequenz:
GGCCGCTTAG ATTATATTGG TTTGT 25

SEQ ID NO:3

Sequenzlänge: 21
Sequenztyp: Nukleinsäure
Strängigkeit: einzeln
Topologie: linear
Molekültyp: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
Sequenz:
GGAATCTACA TTTGCATAGC T 21

SEQ ID NO:4

Sequenzlänge: 33
Sequenztyp: Nukleinsäure
Strängigkeit: einzeln
Topologie: linear
Molekültyp: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
Sequenz:
TTATGCGGCC GCTTATCCTT GAACAGTGAG GTA 33

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Monoklonaler Antikörper gegen den menschlichen VEGF-Rezeptor Flt-1

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) ADRESSE:

(A) ADRESSAT: Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
(B) STRASSE: 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku
(C) ORT: Tokyo 100
(E) LAND: Japan

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGERTYP: Floppy-Disk
(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS / MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.25

(vi) DATEN BETREFFEND DIE VORLIEGENDE ANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: EP 97913427.7 (PCT/JP97/04259)
(B) EINREICHUNGSDATUM: 20. 08. 1998

(viii) VERTRETER:

(A) NAME: Kinzebach, Werner, Dr.
(B) AKTENZEICHEN: M/39246

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: (089) 998397-0
(B) TELEFAX: (089) 987304

(2) INFORMATIONEN BETREFFEND SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

- (D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CGACAAACCA ATATAATCTA AGC 23

(2) INFORMATIONEN BETREFFEND SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
(A) LÄNGE: 25
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

GGCCGCTTAG ATTATATTGG TTTGT 25

(2) INFORMATIONEN BETREFFEND SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
(A) LÄNGE: 21
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

GGAATCTACA TTTGCATAGC T 21

(2) INFORMATIONEN BETREFFEND SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
(A) LÄNGE: 33
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure, synthetische DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

TTATGCGGCC GCTTATCCTT GAACAGTGAG GTA 33

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper, der mit humanem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor Flt-1 (fms-artiger Tyrosinkinase) spezifisch reagiert, ein Epitop erkennt, das in einem Bereich der Positionen 1 bis 338 ausgehend von der N-terminalen Aminosäure und einschließlich einer Signalsequenz des humanen

VEGF-Rezeptors Flt-1 vorkommt, die Bindung von humanem VEGF an humanen VEGF-Rezeptor Flt-1 hemmt und dadurch biologische Aktivitäten von humanem VEGF hemmt.

2. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, nämlich ein monoklonaler Antikörper, der mit einem Hybridom erhältlich ist, das ausgewählt ist unter dem der murinen IgG1-Unterklasse angehörenden FERM BP-5698 (KM1732); dem der murinen IgG2b-Unterklasse angehörenden FERM BP-5699 (KM1748); und dem der murinen IgG2b-Unterklasse angehörenden FERM BP-5700 (KM1750).

3. Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 produziert und ausgewählt ist unter FERM BP-5698 (KM1732); FERM BP-5699 (KM1748) und FERM BP-5700 (KM1750).

4. Pharmazeutisches Mittel, das wenigstens einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 beinhaltet.

5. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 zur Verwendung in der Therapie oder Diagnose.

6. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2, wobei man ein Hybridom so kultiviert, dass es den Antikörper herstellt, und den Antikörper gewinnt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Hybridom ein Hybridom nach Anspruch 3 ist.

8. In vitro-Verfahren für den immunologischen Nachweis von humanem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor Flt-1 (fms-artiger Tyrosinkinase), wobei man den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 verwendet.

9. In vitro-Verfahren für den immunologischen Nachweis von Zellen, die den humanen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor (Flt-1 (fms-artige Tyrosinkinase) auf ihrer Oberfläche exprimieren, wobei man den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 verwendet.

10. In vitro-Verfahren für den immunologischen Nachweis und die Bestimmung von löslichem humanen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor Flt-1 (fms-artiger Tyrosinkinase), wobei man den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 verwendet.

11. In vitro-Verfahren zur Hemmung der Bindung von humanem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor Flt-1 (fsm-artiger Tyrosinkinase), wobei man den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 verwendet.

12. In vitro-Verfahren zur Hemmung biologischer Aktivitäten von humanem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), wobei man den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 verwendet.

13. Verwendung wenigstens eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Hemmung der Angiogenese.

14. Verwendung wenigstens eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Diagnose oder Behandlung einer Erkrankung, die ausgewählt ist unter der Proliferation oder Metastase solider Tumoren, rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie, Retinopathie Frühgeborener und Psoriasis.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

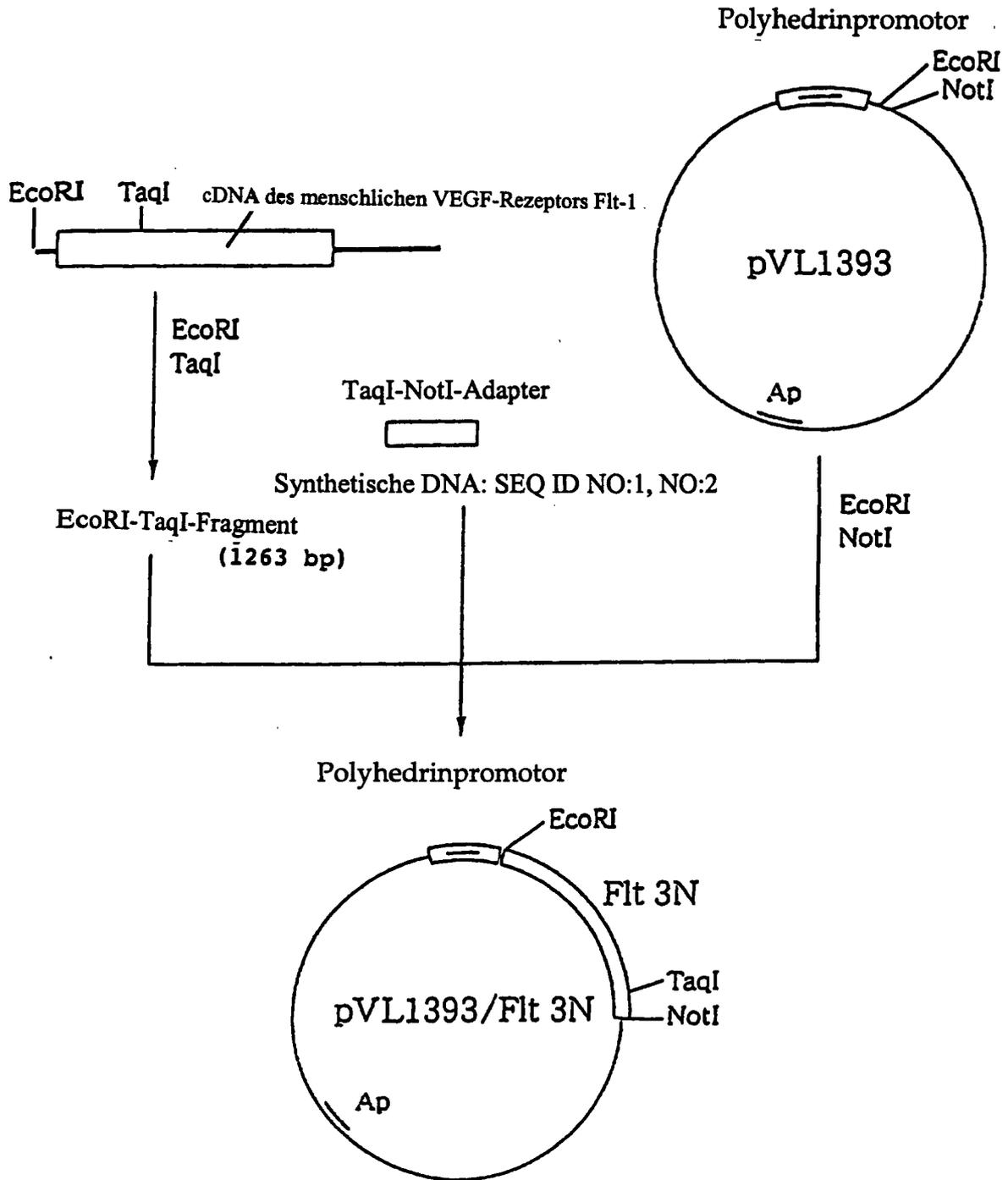


Fig. 2

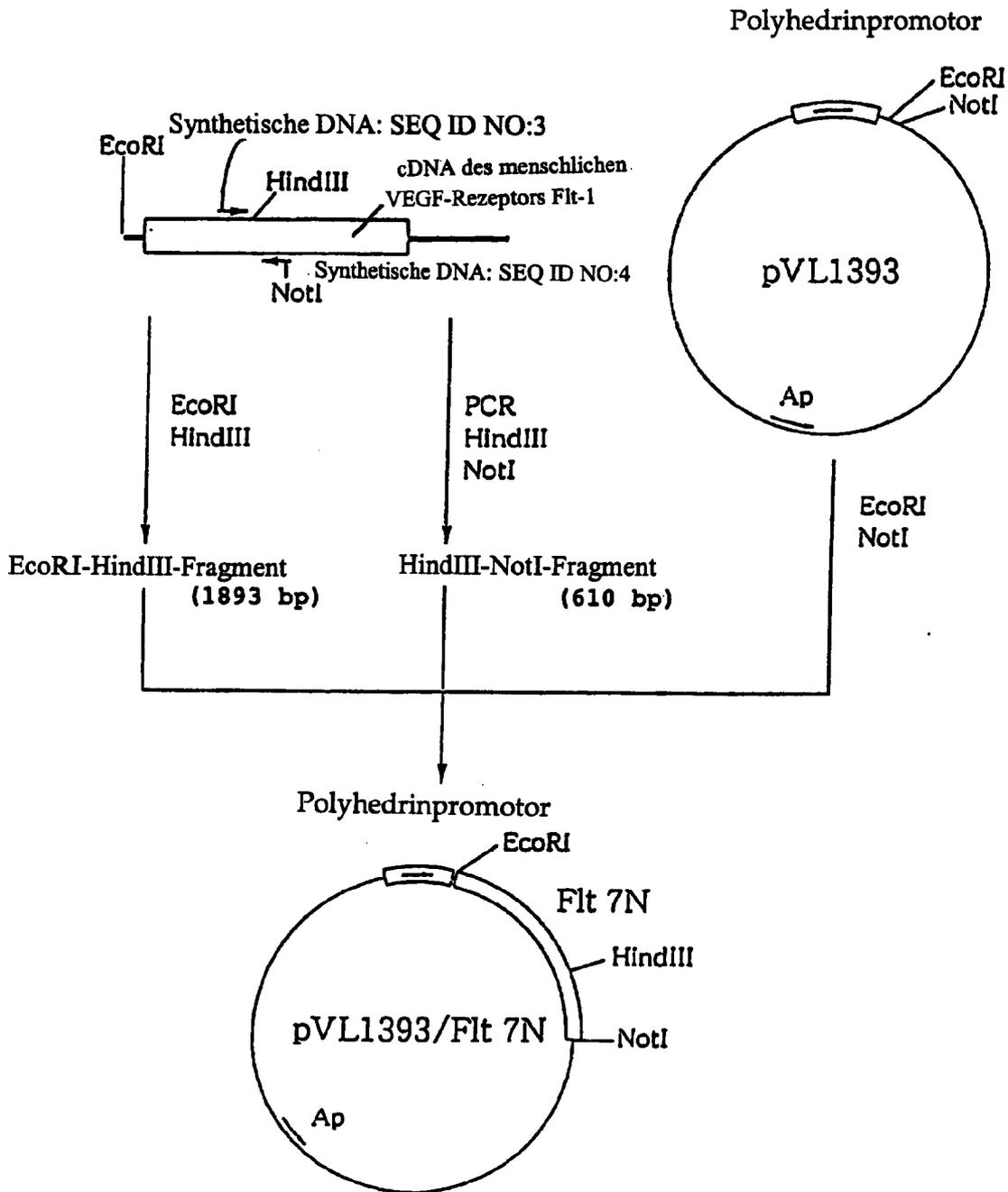


Fig. 3

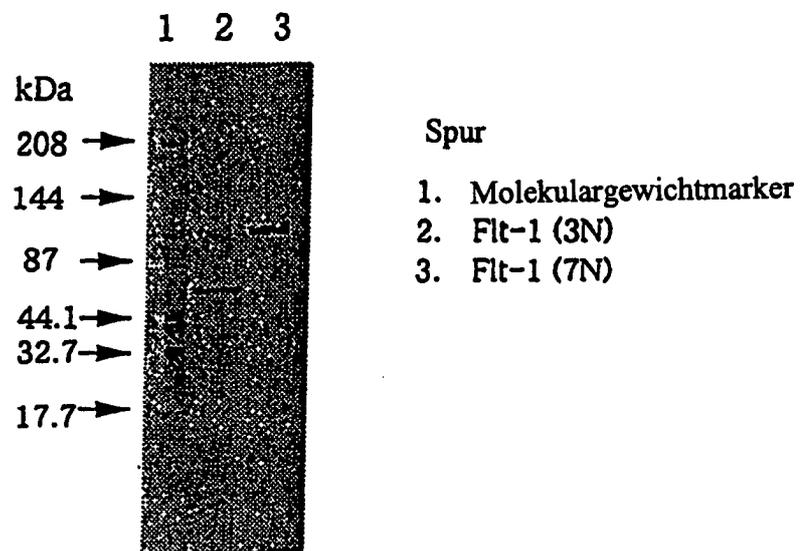


Fig. 4

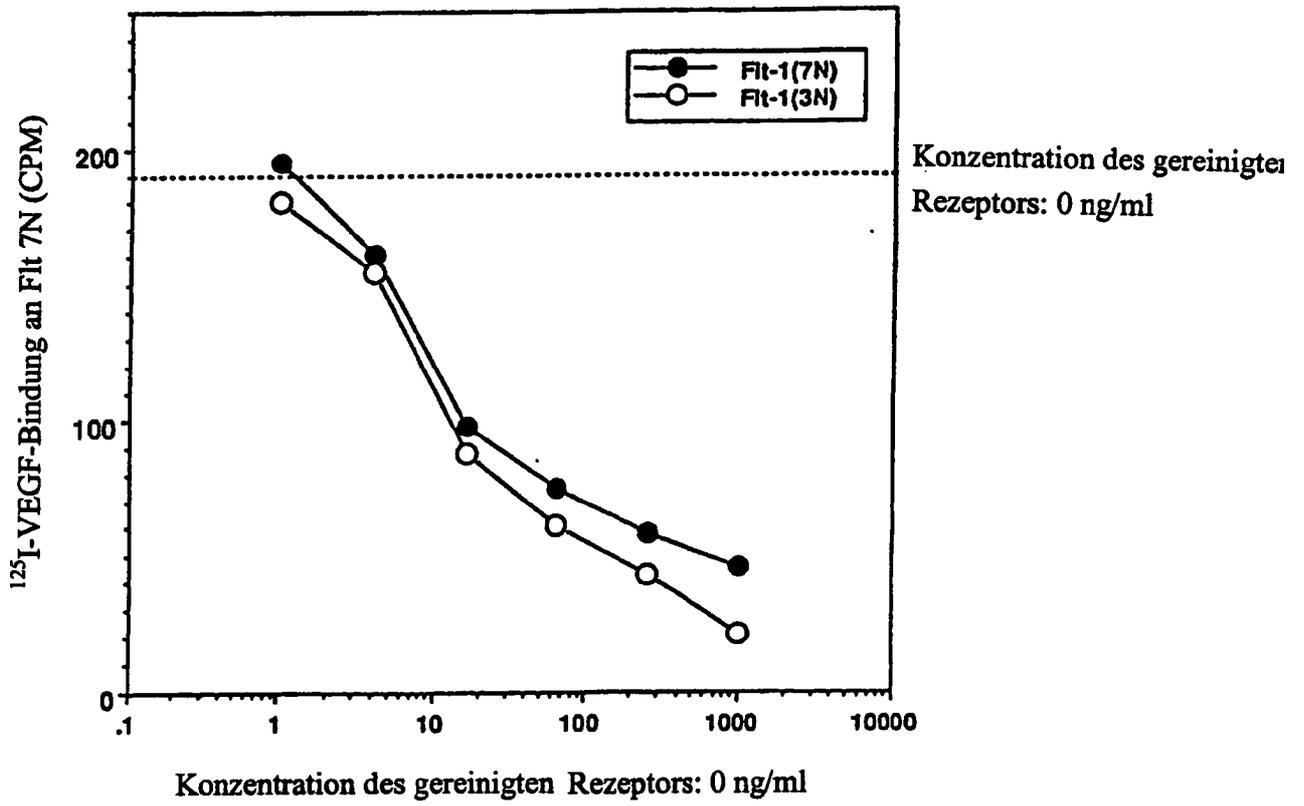


Fig. 7

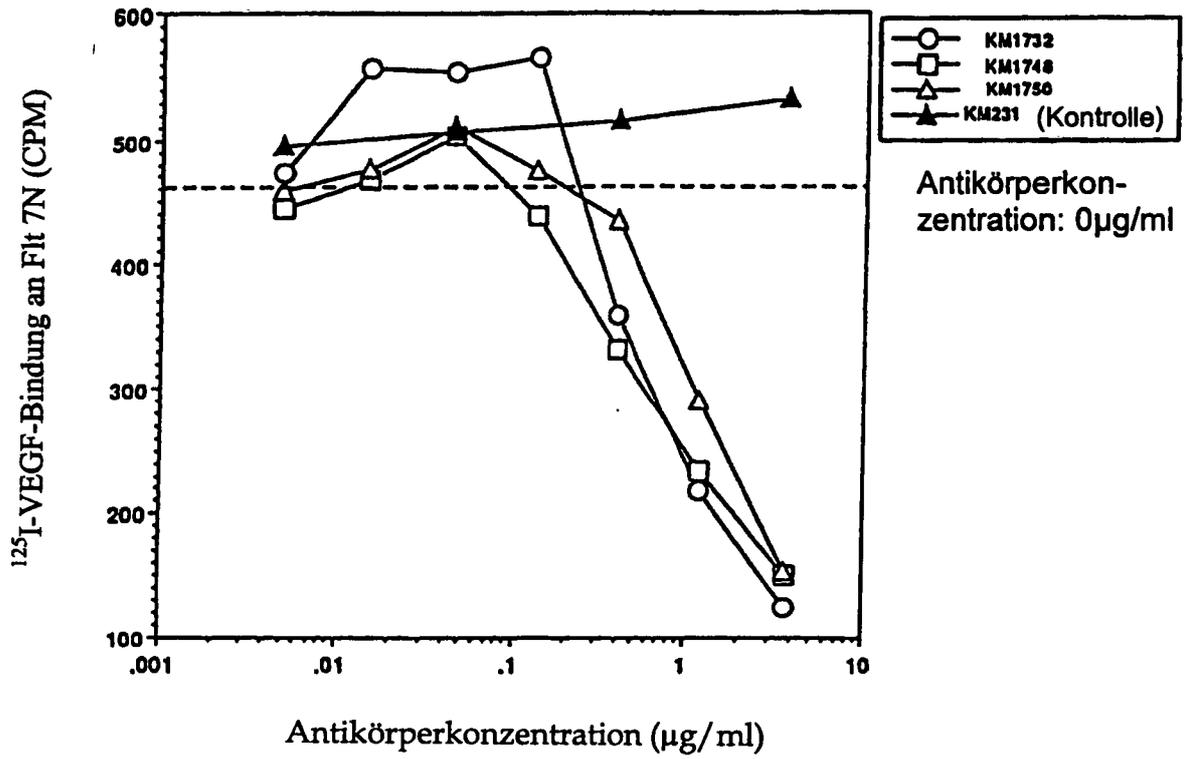


Fig. 8

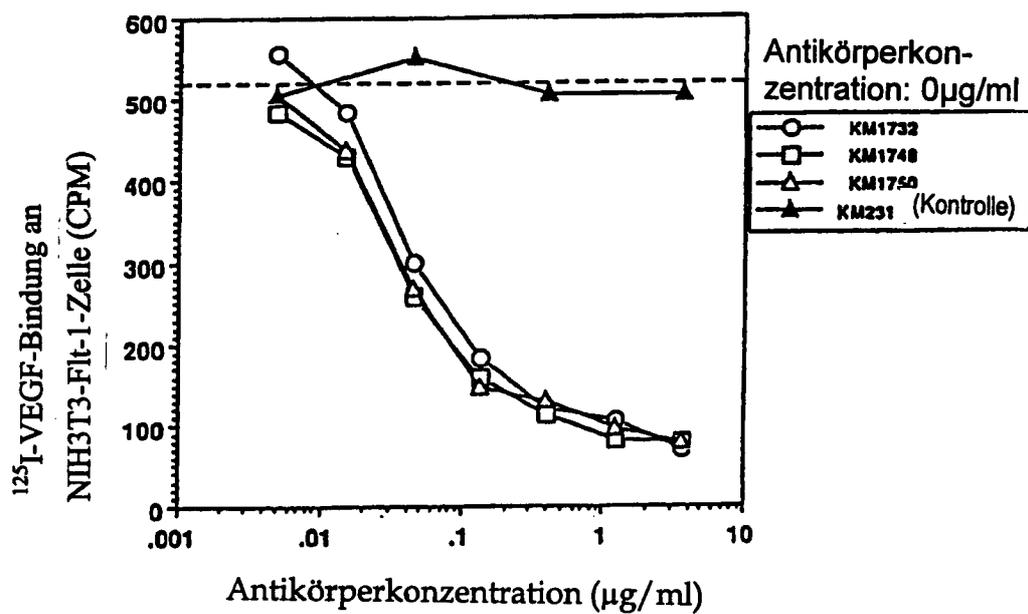


Fig. 9

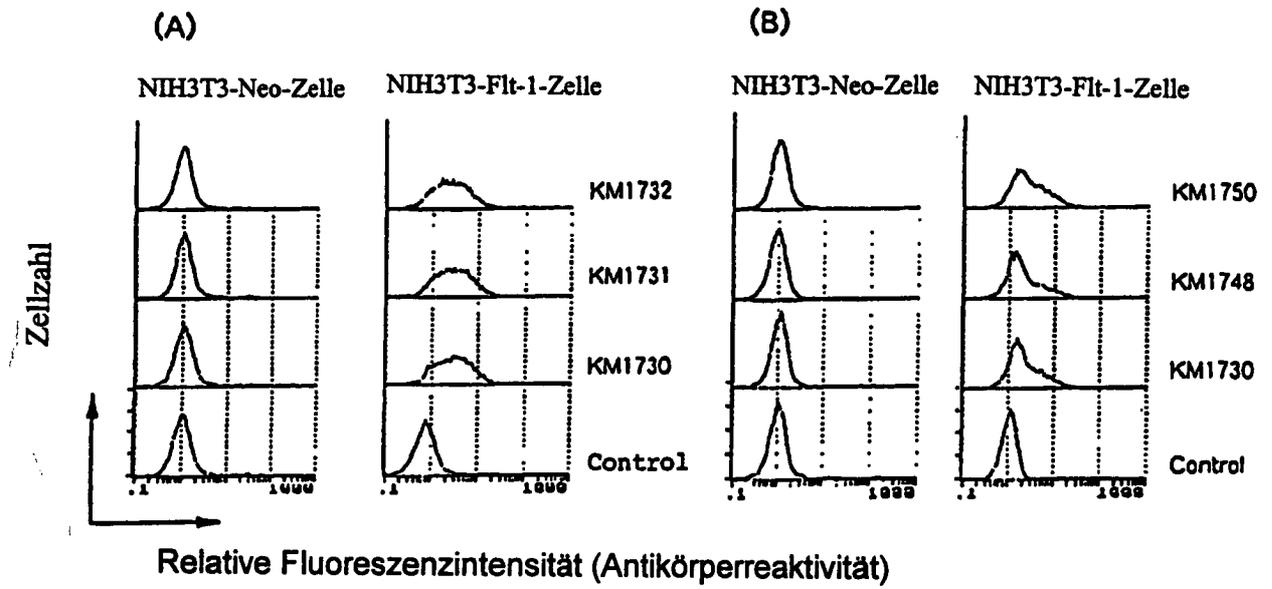


Fig. 10

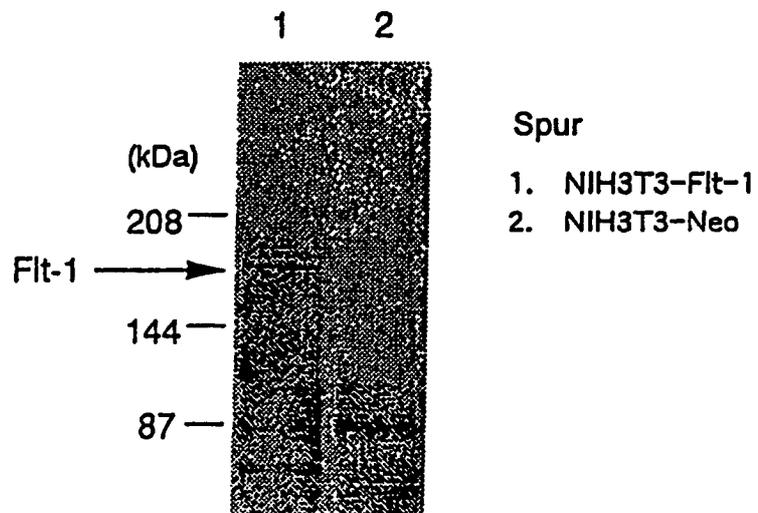


Fig. 11

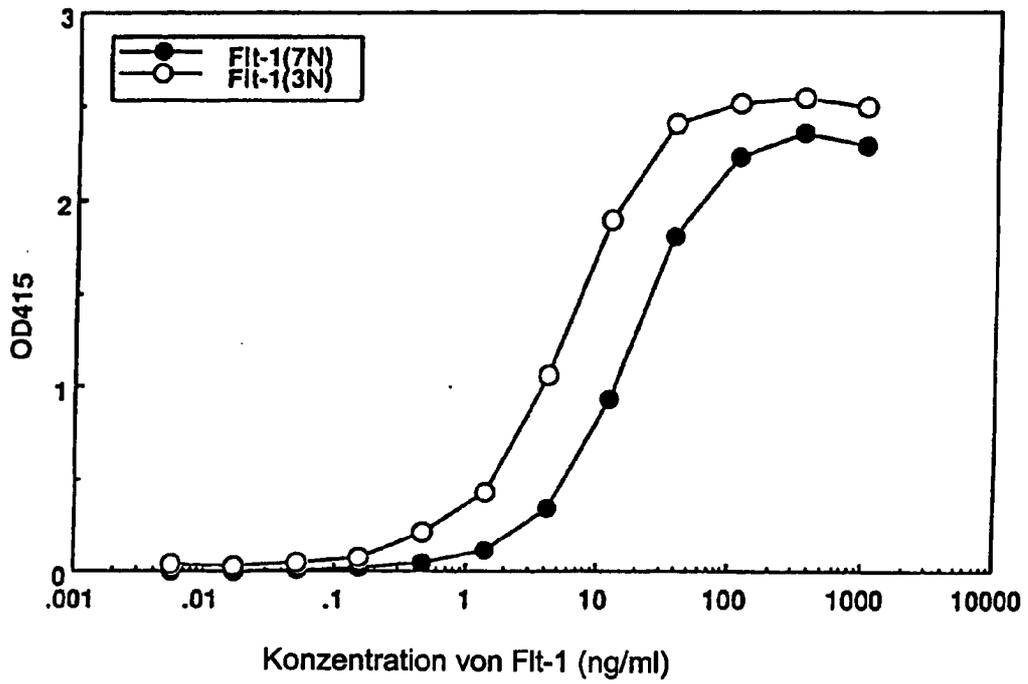


Fig. 12

HUVEC

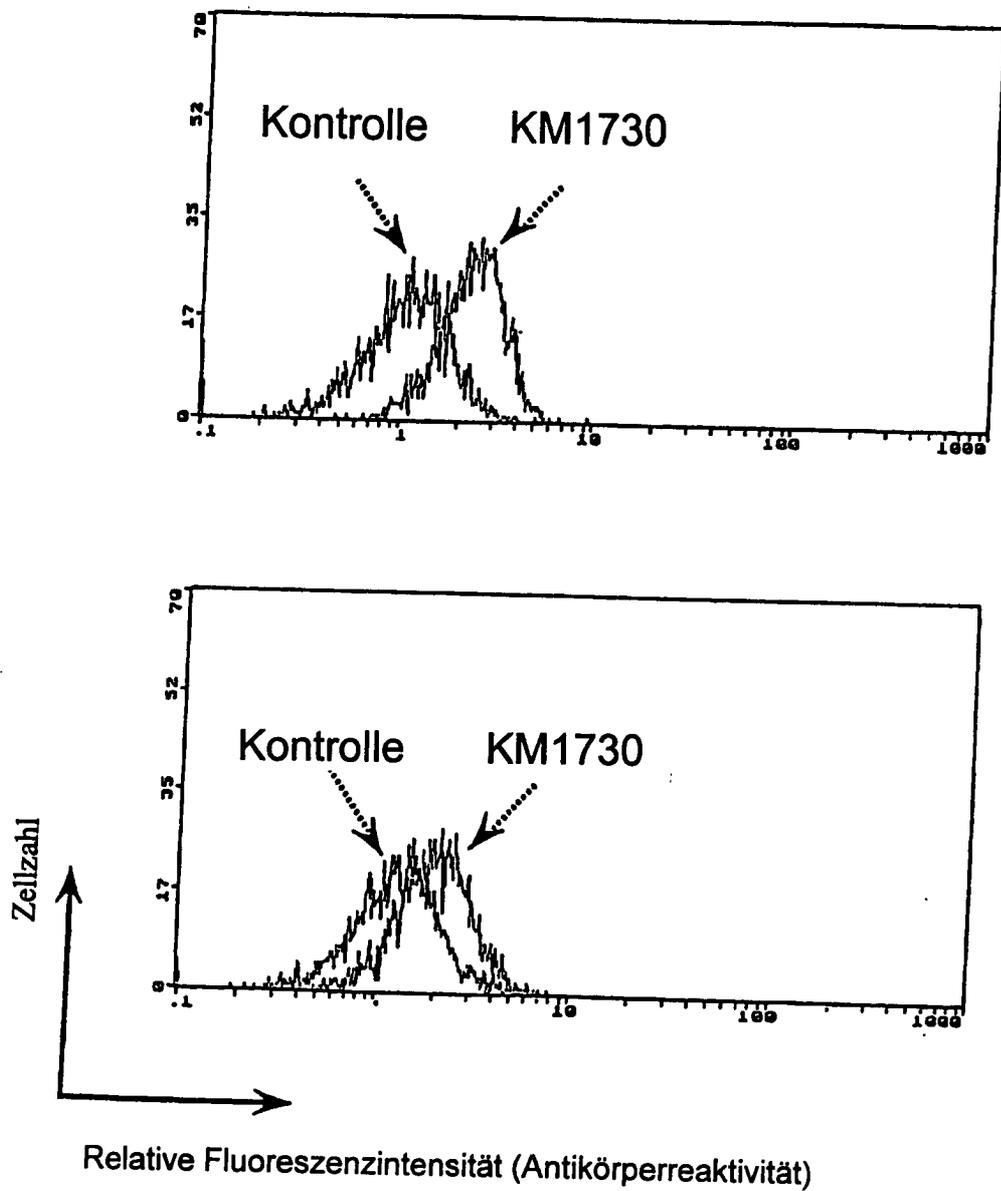


Fig. 13

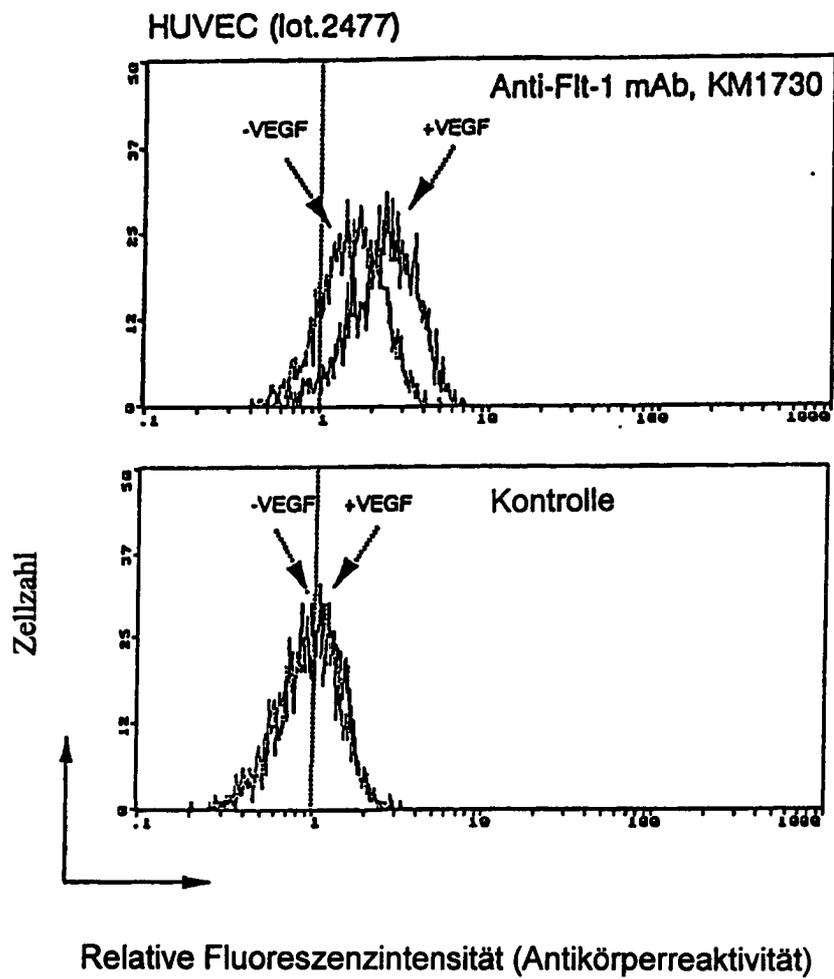


Fig. 14

