

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4880854号  
(P4880854)

(45) 発行日 平成24年2月22日(2012.2.22)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 C

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

請求項の数 19 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-575649 (P2001-575649)  
 (86) (22) 出願日 平成13年4月4日(2001.4.4)  
 (65) 公表番号 特表2003-530126 (P2003-530126A)  
 (43) 公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/003867  
 (87) 国際公開番号 W02001/077179  
 (87) 国際公開日 平成13年10月18日(2001.10.18)  
 審査請求日 平成20年2月13日(2008.2.13)  
 (31) 優先権主張番号 100 16 877.9  
 (32) 優先日 平成12年4月5日(2000.4.5)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

前置審査

(73) 特許権者 502364730  
 シンテック ディアグノスティクス ゲゼ  
 ルシャフト ミット ベシュレンクテル  
 ハフツング  
 スイス国 ツーク バーラー シュトラ  
 セ 8  
 (74) 代理人 100099483  
 弁理士 久野 琢也  
 (74) 代理人 100114890  
 弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ  
 ンハルト  
 (72) 発明者 イヴァン エフ ペーネス  
 スイス国 フォルヒ イム ドルナッハー  
 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高い免疫反応性を有するタンパク質及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療又は診断での使用のための免疫反応性タンパク質を含む調製物において、式：免疫反応性(IR)〔%〕＝100%－[100%×(上清中のMAk濃度/MAk出発濃度)]で測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異ならない分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が>90%であり、その際、免疫反応性タンパク質がCD66上のエピトープに結合する、BW431/26及びBW250/183から選択されるモノクローナル抗体であることを特徴とする調製物。

【請求項 2】

免疫反応性タンパク質が標識を有する、請求項1記載の調製物。

10

【請求項 3】

前記標識が、<sup>99</sup>mTc、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>90</sup>Y及びアスタチンから選択される放射性標識である、請求項2記載の調製物。

【請求項 4】

免疫反応性タンパク質を細胞培養での製造によって作製した、請求項1から3のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 5】

免疫反応性タンパク質を組み換え真核性宿主細胞での発現によって作製した、請求項4に記載の調製物。

【請求項 6】

20

C D 6 6 が、C D 6 6 a、C D 6 6 b、C D 6 6 c、C D 6 6 e である、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の調製物。

【請求項 7】

C D 6 6 が C D 6 6 e である、請求項 6 に記載の調製物。

【請求項 8】

治療又は診断での使用のための免疫反応性タンパク質の調製物の製造方法において、免疫反応性タンパク質を発現する宿主細胞を適当な培養培地中で流動床反応器 - 発酵を行い、かつ宿主細胞及び / 又は培養培地から該タンパク質を回収し、その際、式：免疫反応性 (IR) [%] = 100% - [100% × (上清中の M A k 濃度 / M A k 出発濃度)] で測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異なる分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が > 81% であり、その際、免疫反応性タンパク質が C D 6 6 上の、C D 4 5 上の、N - C A M 上の、F V I I I R A G 上の及び / 又は V E G F / V E G F - レセプター複合体上のエピトープに結合し、かつ V E G F にも V E G F - レセプターにも結合しない、B W 4 3 1 / 2 6、B W 2 5 0 / 1 8 3 及び B W 2 7 8 / 1 0 5 から選択されるモノクローナル抗体であることを特徴とする方法。

10

【請求項 9】

真核性宿主細胞を使用する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

免疫反応性タンパク質を宿主細胞及び / 又は培養培地から少カラム精製法によって回収し、その際、カラムクロマトグラフィー工程として 1 回だけアフィニティークロマトグラフィーを実施する、請求項 8 又は 9 記載の方法。

20

【請求項 11】

免疫反応性タンパク質を宿主細胞及び / 又は培養培地から慣用の精製法によって回収し、その際、カラムクロマトグラフィー工程としてアフィニティークロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー及びアニオン交換クロマトグラフィーを実施する、請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 12】

式：免疫反応性 (IR) [%] = 100% - [100% × (上清中の M A k 濃度 / M A k 出発濃度)] で測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異なる分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が > 90% であり、その際、免疫反応性タンパク質が C D 6 6 上の、C D 4 5 上の、N - C A M 上の、F V I I I R A G 上の及び / 又は V E G F / V E G F - レセプター複合体上のエピトープに結合し、かつ V E G F にも V E G F - レセプターにも結合しない、B W 4 3 1 / 2 6、B W 2 5 0 / 1 8 3 及び B W 2 7 8 / 1 0 5 から選択されるモノクローナル抗体である、請求項 8 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 13】

該調製物を、以下の工程

- 細胞培養培地を回収し、かつ細胞分離を行い、
- 濃縮し、
- 溶解し、界面活性剤処理によってウイルス不活性化をし、滅菌濾過し、
- アフィニティークロマトグラフィーを行い、
- 濃縮し、
- 溶解し、ゲルクロマトグラフィーにより再緩衝し、
- アニオン交換クロマトグラフィーを行い、
- 濃縮し、
- 溶解し、ゲルクロマトグラフィーにより再緩衝し、
- 所望のバルクの最終濃度に調整し、
- 滅菌濾過する

40

50

を含む製造方法 I に相応して製造する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

該調製物を、以下の工程

- 細胞培養培地を回収し、細胞分離を行い、滅菌濾過し、かつ貯蔵し、
- 融解し、回収し、引き続きマイクロ濾過及び限外濾過を行い、
- 希釈し、
- 界面活性剤で処理し、
- アフィニティークロマトグラフィーを行い、
- 希釈し、かつ滅菌濾過し、
- アニオン交換 - 膜吸着を行い、
- 限外濾過によりウイルス濾過を行い、
- 限外濾過及び透析濾過を行い、
- 濾過及び希釈を行い、
- 滅菌濾過を行う

10

を含む製造方法 I I に相応して製造する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 5】

炎症性過程及び／または骨髄転移過程の診断のための薬剤を製造するための、 - 線の担体としての請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載のタンパク質調製物の使用。

【請求項 1 6】

炎症性過程及び／または骨髄転移過程の診断が、前立腺癌、乳癌及び／またはリンパ腫からの転移の診断である、請求項 1 5 に記載のタンパク質調製物の使用。

20

【請求項 1 7】

- 線が T c - 9 9 m の担体である、請求項 1 5 または 1 6 に記載のタンパク質調製物の使用。

【請求項 1 8】

造血系の疾患の治療のための薬剤の製造のための - 線及び／または - 線の担体としての請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載のタンパク質調製物の使用。

【請求項 1 9】

造血系の疾患が白血病である、請求項 1 8 に記載のタンパク質調製物の使用。

【発明の詳細な説明】

30

【0 0 0 1】

本発明は分子の全体数に対して高い割合の免疫反応性分子を有する、有利には精製された形の免疫反応性のタンパク質の調製物に関する。これらのタンパク質は免疫反応性のタンパク質を発現する宿主細胞の流動床反応器中での発酵及び宿主細胞もしくは培養のために使用される培地からの該タンパク質の回収によって得られる。本発明によるタンパク質調製物は診断用及び治療用の組成物の製造のために充分適当である。

【0 0 0 2】

診断用タンパク質及び治療用タンパク質は原核細胞系（例えば E . c o l i i (Houston et al., 米国特許第 5 , 1 3 2 , 4 0 5 号明細書)）及び真核細胞系（例えばピチア パストリス、ベビーハムスター腎臓 (B H K - ) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O - ) 細胞、ハイブリドーマ、遺伝子導入動物及び植物 (Maeda et al., 米国特許第 4 , 8 7 3 , 3 1 6 号明細書)）のいずれにおいても発現させることができ、かつタンパク質化学的な方法によって精製することができる。

40

【0 0 0 3】

原核細胞系は栄養要求のない培地に基づいて、かつ僅かに要求が多い発酵系における微生物の迅速な増殖に基づいてより少ない炭化水素不含のタンパク質の廉価な製造を可能にする。

【0 0 0 4】

複雑な炭化水素を有する（糖 - ）タンパク質の製造のためには、前記に挙げた真核細胞系が使用され、これらは高価な発酵系及び高価な細胞培養培地の使用を必要とする。精製さ

50

れるべき（糖 - ）タンパク質調製物の状態はその場合、使用される細胞培養培地及び使用される発酵系によって決定的に影響される。とりわけ精製された（糖 - ）タンパク質調製物の原形質中の半値時間並びに規定の生物学的エフェクター機能に影響を有するタンパク質の糖付加における差異は先行文献（Stahl et al., PNAS, 73(1976), 4045-4049）に記載されている。

#### 【 0 0 0 5 】

炭化水素組成物に対する前記の影響の他に、精製された調製物中の機能的に活性な（糖 - ）タンパク質のパーセント割合は生成物の質を規定し、同様に細胞培養培地、発酵条件及び精製方法によって影響されうる重要なファクターである。

#### 【 0 0 0 6 】

放射性標識された機能的に活性な分子（例えば生理学的にインタクトなV領域を有するMAk）の割合を規定するための選択方法としてはLindmo他（Immunological Methods 72 (1984), 77）によって初めて記載された抗原過剰での定量的結合アッセイが使用される。この方法は、免疫反応性の及び結合性の放射性標識されたMAkの割合をタンパク質化学的な精製の後に定量的に測定することを可能にする。別の結合アッセイ、例えばSeitz他（European Journal of Nuclear Medicine 26(1999), 1265）によって、100%までの免疫反応性が記載されている免疫反応性試験は、放射性標識されたMAkの免疫反応性の成分を未標識のスタンダードと比較して相対的に測定することを可能にし、従って絶対的な免疫反応性フラクションの測定のためには不適である。またJagoda他（Journal of Immunological Methods 173(1994), 191-201）によって記載される免疫反応性の測定のためのアフィニティークロマトグラフィー法は、アフィニティークラム（10～20%）への比較的高い割合の非特異的結合の割合に基づいて免疫反応性成分の定量的測定のために条件付でのみ使用可能である。

#### 【 0 0 0 7 】

しかしながらまた、殆どの著者によって使用されるLindmo試験は、著者の方法の一般化可能性に対する要求にもかかわらず放射性標識されたMAkの評価のためだけに適当であり、その結合は高い抗原量の使用下に明らかなプラトーをもたらす。低い結合力のMAkに関して、又は細胞あたり高い抗原密度を発現する細胞が不足している場合には、しばしば明らかなプラトーは達成されない（Mattes, M. J., Int. J. Cancer: 61(1995), 286-288）。定義されたプラトーを達成する調査においてさえも、飽和曲線からの値のプロットに応じてLindmo他によって規定された方法に相応して、Y軸との交差点が多様な免疫反応性に導きうる2つの交差線をもたらす（Mattes, M.J., Int. J. Cancer: 61(1995), 286-288, Seite 287, Figur1B und E）。そのため必然的にLindmo法の使用において、最大の特異的に結合した放射活性割合及び無限の抗原過剰までに推定される値のいずれかを定めねばならない。これらの両方の値の間の差異が>10%である場合には、推定される免疫反応性値は信頼できるとはいえない（Mattes, M.J., Int. J. Cancer: 61(1995), 286-288, Seite 288）。

#### 【 0 0 0 8 】

前記に示される方法的概念を考慮して、慣用の発酵法、例えば攪拌発酵槽及び中空繊維モジュールで製造され、かつプロテインAカラムの他にイオン交換カラム及び多くの場合にはゲルクロマトグラフィーカラムを含む古典的なタンパク質化学的方法によって精製された調製物中の機能的に活性なMAk分子のパーセント割合は、Lindmo試験が使用される場合には40～80%の範囲で変動する（Mattes, M.J., Int. J. Cancer: 61(1995), 286-288; Jagoda et al., Journal of Immunological Methods 173(1994), 191-201; Morales-Morales et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 26(1999), 275-279; Boven et al., Blood, 67, No. 2(1986), 429-435）。この場合、使用される放射性標識法及び使用される放射線同位体は同様に重要な役割を担う。

#### 【 0 0 0 9 】

これは、製造に応じて調製物のMAk分子の20～60%が望ましくない診断又は治療の機能を促進しないことを意味する。

10

20

30

40

50

B r u y n c k 他 (Br. J. Cancer 67 (1993), 436-440) は、癌胎児性抗原 (C E A) のために特異的なアーム及び放射性標識されたキレート D T P A -  $^{90}\text{Y}$  に対するアームを有する腫瘍治療のための人化された二種特異性モノクローナル抗体の特徴付けを記載している。これらの抗体は二重免疫アフィニティークロマトグラフィー法によって精製された。放射線標識されていない二種特異的 M A k についての免疫反応性が記載される。

W O 8 6 / 0 5 2 0 2 号は流動床バイオリアクター及び細胞、とりわけモノクローナル抗体を得るためのハイブリドーマ細胞の培養のためのその使用を記載している。該方法によって高い免疫反応性を有する抗体を得ることができるという主張はみられない。

E P - A - 0 7 2 7 4 8 0 号はインビトロ細胞培養系を用いる試験物質の医薬的動力学もしくは毒学的動力学の測定のための方法及びそのために適当な装置として流動床バイオリアクターを記載している。モノクローナル抗体を得るためにこの流動床反応器を使用するという主張は見られない。

10

#### 【 0 0 1 0 】

文献から公知の例外は S c h u b i g e r 他 (Eur. J. Nucl. Med. 15: (1989), 605-608) によって記載される G r a n u l o s z i n t であり、その都度の標識法に依存して 9 3 % もしくは 4 0 % の免疫反応性が記載される。ただ、この M A k は腹水 (個人的な報告) の形で製造された。このインビボ法は経済的条件も最新の調節条件も満たさず、かつ本願では例外として考慮されねばならない。更に本願では、実際に特異的に結合する M A k 分子の割合が L i n d m o 試験で測定された値よりも低いことが判明した。これは、1 0 0 0 0 倍のモル過剰の非標識の特異的 M A k を添加するにもかかわらず放射性標識された M A k の、例えば抗原過剰で使用される顆粒細胞への非特異的な結合によって左右される (Schubiger et al., Euro J. Nucl. Med., 15 (1989), 605-608)。その結果として、免疫反応性値は非特異的結合の減算後に < 9 0 % である。

20

#### 【 0 0 1 1 】

放射性標識された診断用モノクローナル抗体の場合に、低減された M A k の免疫反応性が特に不利である。それというのも特異的な標的構造に結合しない放射線標識された分子が血液中を循環し、非特異的な背景に寄与し、部分的に肝臓中で受容され、かつ核医学的判断による解釈を困難にするからである。放射性標識された治療用抗体の場合には標的組織に結合しない M A k 分子の割合が非特異的かつ不所望な標的でない組織の照射のために寄与する。

30

#### 【 0 0 1 2 】

従ってとりわけ放射性標識されたモノクローナル抗体の製造のために、経済的及び調節的にインビトロで許容される、できるだけ高い免疫反応性の成分を有する M A k 調製物の製造を可能にする方法を開発する非常に大きな意味合いがある。

#### 【 0 0 1 3 】

目下のところ、高価なかつ以下の医薬品製造のために不適な免疫親和性クロマトグラフィー法の使用によってのみ非常に高い免疫反応性成分を獲得することが可能である。この場合、タンパク質化学的に活性な分子とは異ならない機能的に不活性な分子の機能的な活性な分子は抗原カラムへの結合によって機能的に不活性な分子から分離され、かつそれによって濃縮される。免疫親和性クロマトグラフィーのために必要な試薬の製造における高い費用並びに精製時の高い損失にもかかわらず、機能的に活性な M A k の割合は調査目的のために使用される調製物中で < 8 1 % である。

40

#### 【 0 0 1 4 】

標識されていない M A k の免疫反応性割合も放射性標識された M A k の免疫反応性割合も非特異的結合によって影響なく正確に測定できるために、“変更された L i n d m o 試験 (modifizierter Lindmo-Test)” が開発され、これは例 3 に詳細に記載されている。この変更された L i n d m o 試験において非特異的に結合する M A k 分子 (例えば 1 0 0 0 0 倍の弱い M A k の過剰の存在時の放射性標識の後に見いだされる、Schubiger et al., Euro J. Nucl. Med., 15 (1989), 605-608) の割合は見積もられた免疫反応性値に影響しない。

50

## 【 0 0 1 5 】

モノクローナル抗体 B W 2 5 0 / 1 8 3 (Eur. J. Nucl. Med. 14(1988), 523-528及びJ. Cancer 36(1985), 75-84) のための製造方法の製造の最適化のための作業範囲において、変更された L i n d m o 試験で免疫反応性が一般に > 9 5 % である M A k を含有する細胞培養上清を生成する発酵法を構成することに成功したことは意外であった。

## 【 0 0 1 6 】

この細胞培養上清から、慣用の精製方法の使用下に M A k 調製物を製造することが可能であり (また G M P に適した)、これらは 8 0 ~ 9 0 % の免疫反応性を有する。本願で観察されるべき精製の経過における約 1 0 % の免疫反応性の損失は多数のカラムクロマトグラフィー工程によって左右される。

10

## 【 0 0 1 7 】

更に、変更された L i n d m o 試験で細胞培養上清中の精製されていない M A k 分子と大きく異ならない (約 1 ~ 2 % の損失) 免疫反応性を有する M A k 調製物の製造を可能にする (また G M P に適した) “少カラム” 精製法 (“saeulenarmes” Reinigungsverfahren) を開発することに成功した。

## 【 0 0 1 8 】

この方法は異なる特異性の多数の M A k 及びタンパク質化学的組成物並びに別の免疫反応性タンパク質に使用でき、かつまたこの場合には匹敵する意外な結果をもたらす。

## 【 0 0 1 9 】

従って本発明は免疫反応性タンパク質の調製物に関し、その際、変更された L i n d m o 試験で測定された免疫反応性分子の分子の全体数に対するパーセント割合が > 8 1 %、有利には 9 0 %、特に有利には > 9 5 % である。免疫反応性タンパク質は細胞培養、特に真核性宿主細胞中での製造によって得られる。免疫反応性タンパク質を活性損失なく標識、特に放射性標識とカップリングさせることができる。

20

## 【 0 0 2 0 】

本発明の範囲における免疫反応性タンパク質は、少なくとも 1 つの抗体結合ドメインを有するタンパク質である。かかるタンパク質の例は抗体、特にモノクローナル抗体、キメラ化された抗体、人化された抗体、組み換え抗体、例えば単鎖抗体又はそのフラグメント、例えばタンパク質分解断片、例えば F a b フラグメント、F a b フラグメント又は F ( a b )<sub>2</sub> フラグメント又は組み換え抗体フラグメント、例えば単鎖 F v フラグメントである。

30

## 【 0 0 2 1 】

抗体及び抗体フラグメントの他に、また少なくとも 1 つの抗体結合ドメイン及び 1 つの他のドメイン、例えばエフェクタードメイン、例えば酵素又はサイトカインを有する融合タンパク質を使用してよい。このための例は s c F v - サイトカイン、例えば s c F v - I L 1、s c F v - I L 2、s c F v - I L 6、s c F v - I L 1 0、s c F v - I L 1 1、s c F v - I L 1 2、s c F v - T N F、s c F v - I F N、s c F v - I F N、s c F v - I F 又は s c F v - 凝集剤、例えば s c F v - t T F、s c F v - (デオキシ) リボヌクレアーゼ又は酵素との融合物、例えば British J. Cancer 654(1992), 234-238 に記載される - グルクロニダーゼにヒンジリンカーを介して融合された人化された M A k B W 4 3 1 / 2 6 の V H - C H 1 重鎖並びに人化された M A k の人化された V L - C L 軽鎖からなる融合タンパク質である。

40

## 【 0 0 2 2 】

本発明によるタンパク質調製物は流動床反応器中での発酵によって得られる。かかる流動床反応器中で培養された宿主細胞、例えばハイブリドーマ細胞又は別の真核細胞を非常に高い密度でガラス球上で増殖させ、かつ最適に酸素及び栄養物質を供給してよい。死んだ細胞はガラス球から剥離し、かつ連続的に回収された培地で発酵装置から除去する。この場合、プロテアーゼ及び細胞残骸の量を発酵装置中で低く保ち、かつ生成したタンパク質の完全性が保証される。適当な流動床発酵反応器のための例はバイオリアクター P i l o t B 5 0 0 (Papasprou Biotechnologie GmbH)。

50

## 【 0 0 2 3 】

本発明のタンパク質調製物の免疫反応性の測定は例 3 に記載される変更された L i n d m o 試験によって行われる。この試験の実施において、抗原を含有する材料を過剰に使用して免疫反応性タンパク質、例えば M A k を定量的に結合させることが重要である。更に、抗原含有材料が十分な量のエピトープを有し、それによって非特異的な大表面によって引き起こされる吸着効果を見逃すことができることが重要である。従って固定化された細胞あたり  $> 10^4$  のエピトープ密度が有利である。この場合、免疫反応性のための検針点はコントロールの M A k ( 試験 M A k と同じアイソタイプであるが、重要でない結合領域 ) が重大な非特異的吸着を示さない点である。

## 【 0 0 2 4 】

以下に本発明による発酵法及び本発明による “ 少カラム ” 精製法の他に、得られる本発明によるタンパク質調製物並びに診断薬及び治療薬としてのその有利な使用が記載される。

## 【 0 0 2 5 】

両者の本発明による製造方法 I 及び I I は複数の個々の工程に分割できる 2 つの部分からなる：

## 【 0 0 2 6 】

## 【 表 1 】

製造方法 I (一般)	製造方法 I I (一般)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵</li> <li>- 慣用の精製法によるタンパク質化学的精製</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵</li> <li>- “少カラム” 精製法によるタンパク質化学的精製</li> </ul>

## 【 0 0 2 7 】

製造方法 I ( 特定の ) :

真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

- 1 . 細胞バンクからの細胞を融解し、かつ例えば T フラスコ中で培養する
- 2 . 例えばスピナー培養において細胞を増大させる
- 3 . 流動床反応器中で発酵させる

慣用の精製法によるタンパク質化学的精製

- 1 . 細胞培養培地を回収し、例えばマイクロ濾過によって細胞分離をし、滅菌濾過及び、例えば - 20 °C での貯蔵
- 2 . 例えば硫酸アンモニウム沈殿及び引き続いての遠心分離によって濃縮する
- 3 . 溶解し、界面活性剤処理によってウイルス失活させ、滅菌する
- 4 . プロテイン A 又は匹敵するアフィニティーシステムでアフィニティークロマトグラフィーをする
- 5 . 例えば硫酸アンモニウム沈殿及び引き続いての遠心分離によって濃縮する
- 6 . 溶解し、ゲルクロマトグラフィーによって再緩衝させる
- 7 . アニオン交換クロマトグラフィーを行う
- 8 . 例えば硫酸アンモニウム沈殿及び引き続いての遠心分離によって濃縮する
- 9 . 溶解し、ゲルクロマトグラフィーによって再緩衝させる

10. バルクの所望の最終濃度を調整する

11. 滅菌濾過する。

#### 【0028】

製造方法II（特定の）

真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

1. 細胞バンクからの細胞の融解及び、例えばTフラスコ中で培養する

2. 例えばスピナー培養中で細胞を増大させる

3. 流動床反応器中で発酵させる

“少カラム”精製法でのタンパク質化学的な精製

1. 細胞培養培地を回収し、例えばマイクロ濾過によって細胞分離をし、滅菌濾過及び、例えば - 20 °C での貯蔵 10

2. 滅菌及び細胞不含の培養を融解させ、マイクロ濾過及び限外濾過によって実施して回収する

3. 希釈する

4. 界面活性剤で処理する

5. プロテインA又は匹敵するアフィニティーシステムでアフィニティークロマトグラフィーを行う

6. 希釈及び滅菌濾過を行う

7. アニオン交換 - 膜吸着を行う

8. 限外濾過によりウイルス濾過を行う 20

9. 限外濾過及び透析濾過を行う

10. 濾過及び希釈を行う

11. 滅菌濾過を行う。

#### 【0029】

前記に示される個々の製造工程はそれぞれの個々の工程として当業者（細胞生物学／タンパク質化学者）に方法上公知であり、かつより詳細な記載は必要ない。それにもかかわらず該方法を例2に詳細に記載する。

#### 【0030】

製造方法Iでの新規事項は、慣用の精製方法と組み合わせた流動床反応器中での発酵である。 30

#### 【0031】

意想外にも精製されていない細胞培養上清（Tフラスコ、流動床反応器）中のMAKの免疫反応性は変更されたLindmo試験において > 90% である。慣用の精製の後には > 80% の免疫反応性が達成される。

#### 【0032】

製造方法IIの新規事項は、1つだけのカラムクロマトグラフィー（プロテインA上でのアフィニティークロマトグラフィー）を使用する“少カラム”精製法と組み合わせたの流動床反応器を用いた発酵である。他の全ての工程は膜による穏やかな濾過工程又は簡単な希釈工程を表す。それにもかかわらず、該方法では許可局に規定されたタンパク質化学的純度及びウイルス削減／ウイルス失活に関する要求を満たしている。 40

#### 【0033】

意想外にも、例えばMAKの製造されるべき（糖 - ）タンパク質の免疫反応性は全ての試験された段階（Tフラスコ、流動床反応器、精製されたタンパク質）においてMAK BW 250 / 183 に関して例1に示されるようにLindmo試験で > 90%、それどころか主に95%を示す。匹敵する高い免疫反応性値は、先行技術で記載されないインビトロ製造法での我々の知るところである。

#### 【0034】

類似の高い免疫反応性値は本発明による方法で別のMAK、例えばMAK BW 43 / 26（CD66eに関して選択的）（Eur. J. Nucl. Med. 14 (1988), 523-528及びInt. J. Cancer 36 (1985), 75-84）、MAK BW 278 / 105（FVIIIRAGのサブポビ 50



ュレーションに関して選択的) (J. Histochem. Cytochem. 34(1986), 209-214)、M A k B W 5 7 5 / 9 3 1 (N - C A M に関して選択的) (Pediatr. Hematol. Oncol. 6(1989), 73-83) 及び M A k Y T H 2 4 . 5 (C D 4 5 に関して選択的) (J. Immunol. 134(1985), 3056-3061 及び Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens (Hrsg. Mc Michael et al.), Oxford University Press, Oxford, pp 788-803) 並びにドイツ国特許出願 1 9 7 4 4 5 3 1 . 4 号に記載される幾つかの M A k (V E G F / V E G F - レセプター複合体に関して選択的であるが、V E G F にも V E G F - レセプターにも単独には結合しない) に関して判明した。この所見は、本発明による製造法が近似的に 1 0 0 % 免疫反応性である(糖-)タンパク質を発酵可能であり、かつ製造方法 I I の場合において、検出可能な免疫反応性の損失さえもなく廉価に穏やかかつ迅速に精製できることを裏付ける。

10

#### 【0035】

更に本発明による製造方法は F c 部を有さない多数の(糖-)タンパク質の G M P に適した製造のために使用でき、とりわけ B o s s l e t 他によって記載される融合タンパク質(British Journal of Cancer, 645(1992), 234-238)のために使用でき、その際、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーの代わりに代替のアフィニティークロマトグラフィー法が使用される(抗イディオタイプ、レクチンカラム、プロテイン L、ニッケル酸など)。

#### 【0036】

免疫反応性の他に、それぞれの製造段階で複数の品質コントロール(最終生成物における滅菌性、DNA 含量、タンパク質含量、特異性、pH 値、タンパク質組成、等電点、発熱原、プロテイン A 含量)が行われ、これは製造されるべき(糖-)タンパク質(M A k)の微生物学的、免疫学的かつタンパク質化学的な特性を試験することを可能にする。本発明ではその試験を先行技術なので検討しなかった。

20

#### 【0037】

更に本発明は以下の実施例によって図面と組み合わせて説明されるべきである。

#### 【0038】

図 1 は流動床発酵反応器を示してゐる。

#### 【0039】

該反応器(2)は担体球(4)、例えば有利には 0.4 ~ 0.7 mm の直径を有する開孔性の焼結ガラスからなる、酸処理(例えば 2.5 N の H C l 及び 5 % の硝酸)が施され、中和後に熱処理(例えば 220 °C で 6 時間)によって滅菌した球で部分的に充填されている。該反応器は更に反応器中の担体球の流動化のためにガス混合物(8)を送り込み、かつ再び導出するベンチレーションモジュール(6)を有する。更に該反応器は pH 電極、酸素電極、温度センサなどを備えている。培地は例えば 450 ~ 500 ml / 分の流速で循環(10)中を再循環する。該循環は新たな培地の入口(12)、ポンプ(14)及び試料採取バルブ(16)を有してよい。導管を通して、培地はそこに含まれるタンパク質の回収のために採取される。

30

#### 【0040】

図 2 は変更された L i n d m o 試験における抗体調製物についての結果曲線を示す。

40

#### 【0041】

図 3 及び図 4 は従来の技術の調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

#### 【0042】

図 5 ~ 図 7 は本発明による調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

#### 【0043】

以下に、M A k、実施例においては M A k B W 2 5 0 / 1 8 3 に関する典型的な免疫反応性測定の結果を示す。

#### 【0044】

50

## 例 1

MAk BW 250 / 183 (Eur. J. Nucl. Med. 14(1988), 523-528) の免疫反応性を、変更された Lindmo 試験 (実施は例 3 参照) によって、慣用の発酵及び精製の際に本願に記載される発酵法及び精製法 (製造方法 I 及び製造法 II) に対して精製の開始前 (細胞培養上清) 及び精製の完了後 (精製された MAk 最終生成物) に測定して比較する。

## 【0045】

細胞培養上清もしくは精製された MAk 最終生成物の MAk 含有試料を、例 3 に正確に記載されるように処理し、かつ変更された Lindmo 試験を指示通りに実施した。ネガティブコントロールとして、同じアイソタイプ (IgG<sub>1</sub>)、同じ軽鎖 ( )、匹敵する等電点及び無関係の特異性の MAk を使用した。ポジティブコントロールは抗原カラムを通して分析規模で精製された 91 ~ 94 % の免疫反応性を有する MAk BW 250 / 183 のバッチである。

## 【0046】

以下に細胞培養上清並びに精製された MAk 最終生成物の個々の免疫反応性測定の結果を示す。

## 【0047】

1. 慣用の発酵法及び慣用の精製法 (先行技術)

a) 慣用の発酵 (KF) 後の精製されていない細胞培養上清 (ZKUE)

第 1 表 :

## 【0048】

## 【表 2】

	ngでの 確認質量	ngでの 出発質量	免疫反応性
ネガティブコントロール	-	50,0	-
ポジティブコントロール	3,2	48,0	93,3 %
250/183, ZKÜ, KF, 試料 1	7,5	40,7	81,6 %
250/183, ZKÜ, KF, 試料 2	8,2	38,6	78,8 %
250/183, ZKÜ, KF, 試料 3	8,5	40,2	78,9 %
3つの試料のIR平均値 :			79,7 %

## 【0049】

結果曲線を図 2 A に示す。

## 【0050】

b) 慣用の発酵 (KF) 及び慣用の精製 (KR) 後の精製された MAk 最終生成物 (MAk)

第 2 表 :

## 【0051】

## 【表 3】

	ngでの 確認質量	ngでの 出発質量	免疫反応性
ネガティブコントロール	-	50,0	-
ポジティブコントロール	3,2	48,0	93,3 %
250/183, MAk, KF + KR, 試料 1	7,3	24,8	70,6 %
250/183, MAk, KF + KR, 試料 2	8,1	28,8	71,9 %
250/183, MAk, KF + KR, 試料 3	8,4	32,4	<u>74,1 %</u>
3つの試料のIR平均値：			<b>72,2 %</b>

10

【 0 0 5 2 】

結果曲線を図 2 B に示す。

【 0 0 5 3 】

20

2. 流動床反応器中での発酵及び慣用の精製方法又は“少カラム”精製方法（本発明）

a) 流動床発酵（WF）後の細胞培養上清（ZKUE）

第3表：

【 0 0 5 4 】

【表4】

	ngでの 確認質量	ngでの 出発質量	免疫反応性
ネガティブコントロール	-	50,0	-
ポジティブコントロール	3,5	45,2	92,4 %
250/183, ZKÜ, WF, 試料 1	3,7	183,5	98,0 %
250/183, ZKÜ, WF, 試料 2	4,0	137,8	97,1 %
250/183, ZKÜ, WF, 試料 3	3,9	123,0	<u>96,8 %</u>
3つの試料のIR平均値：			<b>97,3 %</b>

30

40

【 0 0 5 5 】

結果曲線を図 2 C に示す。

【 0 0 5 6 】

b) 流動床発酵（WF）及び慣用の精製（KR）後の精製されたMAk最終生成物（MAk）

第4表：

【 0 0 5 7 】

【表5】

	ngでの確認 質量	ngでの出発質量	免疫反応性
ネガティブコントロール	-	50,0	-
ポジティブコントロール	3,5	45,2	92,4 %
250/183, MAk, WF + KR, 試料 1	3,6	39,5	90,9 %
250/183, MAk, WF + KR, 試料 2	4,1	35,6	88,5 %
250/183, MAk, W + KR, 試料 3	3,9	34,6	88,7 %
3つの試料のIR平均値 :			89,3 %

【 0 0 5 8 】

結果曲線を図 2 D に示す。

【 0 0 5 9 】

c ) 流動床発酵 ( WF ) 及び “ 少カラム ” 精製 ( SR ) の後の精製された生成物 ( MA k )

第 5 表 :

【 0 0 6 0 】

【 表 6 】

	ngでの確認 質量	ngでの出発質量	免疫反応性
ネガティブコントロール	-	50,0	-
ポジティブコントロール	3,5	45,2	92,4 %
250/183, MAk, WF + SR, 試料 1	3,5	81,4	95,7 %
250/183, MAk, WF + SR, 試料 2	3,9	99,5	96,1 %
250/183, MAk, W + SR, 試料 3	4,0	100,5	96,0 %
3つの試料のIR平均値 :			95,9 %

【 0 0 6 1 】

結果曲線を図 2 E に示す。

【 0 0 6 2 】

例 1 の結果を以下の第 6 表にまとめる :

MA k BW 2 5 0 / 1 8 3 の免疫反応性

【 0 0 6 3 】

【 表 7 】

	慣用の発酵及び慣用の精製法	製造方法 1 流動床反応器－発酵 及び慣用の精製法	製造方法 2 流動床反応器－発酵 及び“少カラム”精 製法
細胞培養上清	80 %	97 %	97 %
精製されたMAk 最終生成物	72 %	89 %	96 %

10

20

## 【 0 0 6 4 】

MAk BW 2 5 0 / 1 8 3 の免疫反応性は明らかに発酵条件及び精製条件に依存する。慣用の発酵において、いずれにせよ細胞上清中では既に 8 0 % 以下に達するが、流動床反応器による新規の発酵法においては、しかしながら 9 7 % を有する免疫反応性は明らかに高い。

## 【 0 0 6 5 】

また精製法は MAk の免疫反応性に影響を及ぼす。新規の“少カラム”精製法は明らかに慣用の精製法よりも穏やかである（慣用の方法での免疫反応性の低下は新規の“少カラム”精製法での 1 % だけの低下に対して 8 % である）。

30

## 【 0 0 6 6 】

匹敵する結果は同様に別の MAk、例えば MAk BW 4 3 1 / 2 6 (Eur. J. Nucl. Med. 14(1988), 523-528 及び Int. J. Cancer 36(1985), 75-84)、MAk BW 5 7 5 / 9 3 1 (Pediatr. Hematol. Oncol. 6(1989), 73-83)、MAk YTH 2 4 . 5 (J. Immunol. 134(1985), 3056-3061 及び Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens (Hrsg. Mc Michael et al.), Oxford University Press, Oxford, pp 788-803)、MAk BW 2 7 8 / 1 0 5 (J. Histochem. Cytochem. 34(1986), 209-214)、特許出願 1 9 7 4 4 5 3 1 . 4 号に記載される MAk 並びに British J. Cancer 645, 234-238, 1992 に記載される融合タンパク質で達成できる。

## 【 0 0 6 7 】

40

第 7 表：

発酵法及び精製法に依存する免疫反応性

## 【 0 0 6 8 】

## 【 表 8 】

MAkの名称	慣用の発酵法及び慣用の精製法	製造方法 1	製造方法 2
		流動床反応器－発酵及び慣用の精製法	流動床反応器－発酵及び“少カラム”精製法
BW 431/26, ZKÜ*	85 %	96 %	96 %
BW 431/26, GME*	79 %	87 %	94 %
BW 575/931, ZKÜ*	75 %	93 %	93 %
BW 575/931, GME*	67 %	85 %	91 %
YTH 24.5, ZKÜ*	83 %	98 %	98 %
YTH 24.5, GME*	77 %	89 %	96 %
BW 278/105, ZKÜ*	87 %	94 %	94 %
BW 278/105, GME*	81 %	85 %	92 %
融合タンパク質 ZKU*	84 %	97 %	97 %
融合タンパク質 GME*	76 %	88 %	96 %

## 【 0 0 6 9 】

Z K U E : 細胞培養上清

G M E : 精製された M A k 生成物

全ての試験された M A k 及び非常に複雑な ( 糖 - ) タンパク質との比較可能な調査結果は融合タンパク質 ( 天然条件下のテトラマーの分子量 5 0 0 k D a ) に到達するので、匹敵する値が原核性及び真核性の系において発酵可能な全ての M A k 及び ( 糖 - ) タンパク質によって得られ、かつ有利な調査結果を一般化できることから出発することが必要である。

## 【 0 0 7 0 】

慣用の製造法によるか、製造方法 I 及び I I により精製された M A k - バッチのいずれも S c h w a r z 及び S t e i n s t r a e s s e r により記載された方法 ( J . N u c l . M e d

10

20

30

40

50

., 25(1987), 721) に相応する放射性標識の後に、精製されたMAkタンパク質の免疫反応性と、変更されたLindmo試験の精度の範囲で同一な免疫反応性を示す。該データは以下の第8表にまとめる：

【0071】

【表9】

		製造方法1	製造方法2
	慣用の発酵法及び慣用の精製法	流動床反応器－発酵及び慣用の精製法	流動床反応器－発酵及び“少カラム”精製法
精製されたMAk最終生成物			
未標識	72 %	89 %	96 %
Tc-99m標識	70 %	89 %	95 %

【0072】

期待されない臨床的調査結果

慣用の製造方法（慣用のタンパク質化学的精製により行われる攪拌発酵槽中でのバッチ式発酵；免疫反応性72%）又は新規の製造方法II（流動床反応器二引き続いて“少カラム”精製法；免疫反応性96%）のいずれかによりGMPに適宜に製造されたMAk BW250/183の調製物のアリコートにSchwarz及びStreinstreiserによって記載された方法に相応してTc-99mで標識した。MAkに結合されたアイソトープの割合は両方の調製物中で99.9%であった。この放射生化学的に同一のMAk調製物によって炎症性疾患もしくは骨髄転移の疑いがある患者に10～20mCiの用量を静脈内に与えた。 - カメラを用いて、全身シンチレーション図を放射性標識されたMAkの静脈内添加の後に2～25時間の時間にわたり前側及び背側から撮影した。

【0073】

意想外にも免疫反応性>90%を有するMAkバッチ（製造法II）での注入の後のシンチレーション図では、有利には優先的に骨髄がシャープな輪郭で、かつ脾臓が多かれ少なかれ示された（例3参照：図面GRAN91、GRAN81及びGRAN71）。慣用の発酵法及び精製法により製造されたMAkバッチ（免疫反応性70～80%）の場合には骨髄が示される他は、非常に明瞭に肝臓及び脾臓が確認された（例3参照：GRAN11及びGRAN21）。更にこれらの写真では、軽く霞みかつある程度不鮮明なシンチレーション図が認められるより高いバックグラウンドを示す。

【0074】

結果としては、免疫反応性>90%を有するMAkバッチを受容した患者のエピトープ陰性の正常組織は免疫反応性<80%を有するMAkバッチで処理された患者よりも実質的に少なく負荷された。患者の観察は核医学において像付与（シンチレーション図）のための顆粒細胞に対する特異的なMAkの免疫反応性の高さの意味を裏付ける。しかしながらイメージ付与だけでなく、 - 線及び - 線での治療のためにも、免疫反応性>90%を有するMAkバッチは明らかな利点を示す。このように、例えば免疫反応性90%を有するMAkバッチの標識の後に文献から公知の方法を用いてRe<sup>188</sup>/186、Y<sup>90</sup>

又はアスタチンをカップリングさせ、優先的な骨髄照射を行うことができる (Visser et al., J. Nucl. Med. 34(1993), 1953-1963; Griffith et al., Cancer Res. 51(1991), 4594-4602; Denora et al., Anticancer Res. 17(1997), 1735-1744)。

【0075】

こうして治療調査の範囲で急性骨髄性白血病又は慢性骨髄性白血病を有する19人の患者の集団を治療した。このために、MAk BW250/183 (免疫反応性>90%)のバッチをRe<sup>188</sup>で標識し (比活性; 5~7.5 GBq/mg)、かつ6.5~12.4 GBqを静脈内に適用した。

【0076】

線量測定による調査は以下の表にまとめられるデータを提供した。

10

【0077】

第9表:

Re-188標識されたMAk BW250/183での放射線免疫治療後の線量測定的調査

【0078】

【表10】

性別	年齢	疾患	マーカー	KM移植のデータ	Gyでの器官-線量				
					KM	Mz	Lb	Nie	Lu*
女性	39	AML	T(8;21)	2/98	12,0	7,3	3,8	5,3	n.d
女性	38	AML	なし	3/98	13,0	13,2	6,2	11,3	n.d
男性	52	AML	なし	3/98	8,0	7,0	5,0	11,0	n.d
男性	45	AML	なし	4/98	13,0	12,0	4,0	11,0	n.d
男性	50	CML	T(12;13)	4/98	12,8	18,6	n.d	7,6	n.d
女性	19	c-ALL	なし	5/98	5,9	12,3	1,8	7,1	n.d
男性	44	c-ALL	Ph+	6/98	15,2	12,7	3,2	5,3	0,3
女性	17	AML	なし	7/98	18,4	10,3	4,1	5,0	n.d
男性	50	AML	T(15;17)	8/98	10,9	8,6	2,7	4,4	0,4
女性	32	AML	欠失 染色体 . 6	9/98	15,7	6,8	3,0	5,1	0,9
男性	56	B-CLL	なし	9/98	15,7	4,0	2,3	4,5	n.d
女性	36	AML	なし	9/98	13,0	5,6	2,3	15,1	0,6
男性	45	c-ALL	Ph+	11/98	6,5	11,5	2,7	4,5	n.d
女性	19	AML	T(9;11)	11/98	11,4	n.d	7,2	10,1	1,1
女性	40	2. AML (MDS)	なし	12/98	13,8	18,2	5,3	10,1	0,3
男性	51	AML	トリソミー 6,8,21 欠失 11q23	12/98	14,3	6,7	5,9	8,9	0,4
男性	20	CML	Ph+	12/98	11,9	14,3	7,0	5,5	n.d
女性	47	2. AML 形質細胞腫 , MDS	T(16;19) P(11;12)	12/98	16,2	7,6	3,7	5,6	0,5
男性*	59	AML	なし	12/98	19,0	14,0	6,0	8,2	0,7

\*KM:骨髄、Mz:脾臓、Lb:肝臓、Nie:腎臓、Lu:肺

50



## 【0079】

該データは、R e - 1 8 8 標識されたM A k B W 2 5 0 / 1 8 3 (免疫反応性 > 9 0 % )での放射線免疫治療を用いて白血病を有する患者の骨髓及び脾臓に高い照射線量を局在させることができることを示している。

## 【0080】

患者の集団は2年以内に40～50%の再発リスクを有する患者からなった。意外にも放射性免疫治療は重大な副作用を誘導しなかった。それに応じて、12グレイの全身照射及びシクロホスファミド投与からなる標準的治療を行った。全ての19人の患者は完全な緩解がもたらされ、これは標準的治療と組み合わせる白血病の治療におけるM A k 2 5 0 / 1 8 3での放射線免疫治療の将来的な役割のための示唆をもたらす。この場合、放射線免疫治療は副作用の多い全身照射に換わることが可能であると思われる。

10

## 【0081】

免疫反応性 > 9 0 %を有するM A k B W 2 5 0 / 1 8 3の使用の更なる利点は、適用あたり1mgから適用あたり0.5mgに投与されるM A k量を低減できることにある。この低減は2%未満のH A M A (ヒト抗マウス抗体)頻度に導き、かつそれによって健常者のバックグラウンド-H A M A値と大きく異ならない。

## 【0082】

更に意外にもR E S (細網内皮系)における骨髓の早期の転移は免疫反応性 9 0 %を有するM A k調製物で見いだされ、約80%の免疫反応性を有する調製物の場合には過剰照射に基づいて肺及び肝臓の活性増大によって明確に検出できなかった。

20

## 【0083】

まとめると、本願ではM A k B W 2 5 0 / 1 8 3の高い免疫反応性バッチを使用することによって、-線、-線又は-線と組み合わせて生じるイメージの質、診断効率、線量測定及び治療効率に関する意外な利点は定性的にも定量的にも見込まれず、かつより効率的な炎症プロセスの診断及び転移の診断並びに白血病及び他の造血系の疾患の治療のための道を開くことが期待されると思われる。

## 【0084】

例2

製造方法I

真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

30

液体窒素中に貯蔵されている作業細胞バンクからのアンプルを融解し、かつそこに存在する細胞を標準的細胞培養条件(合成されたタンパク質不含の細胞培養培地)下にTフラスコ中で培養した。全細胞数が $6 \sim 10 \times 10^7$ 細胞に達した後に、4～6個のTフラスコの内容物を500mlのスピナー容器中で標準的細胞培養条件下で再び培養した。細胞数が $1.5 \sim 2 \times 10^8$ 細胞に達した後に、これらの細胞をそれぞれ1000ml容量を有する2つのスピナー容器中に移し、かつ再び培養した。細胞数が $1.2 \sim 1.5 \times 10^9$ 細胞に達した後に、これらの細胞を900mlの細胞培養培地及び200mlのS i r a n<sup>(R)</sup>担体を含む流動床反応器(Bioreaktor Pilot B 500, Papaspyrou Biotechnologie GmbH, Technologiezentrum Juelich, D-52428 Juelich)中に接種し、かつPapaspyrou Biotechnologie社の取扱指示に相応して36.5で60日間培養した。酸素含量、pH値、グルコース濃度並びにM A k含量を1～4日間隔で調節した。発酵の間に、細胞培養上清を連続的に回収し、かつ4で貯蔵した。

40

## 【0085】

慣用の方法によるタンパク質化学的精製

再処理されるべき培養超濃縮物の容量を共に確認し、かつ攪拌下に1.5倍量の飽和硫酸アンモニウム溶液を緩慢に添加した。該懸濁液を4で3日まで、澄明な上清が生じるようになるまで放置する。これをデカンテーションし、該調製物を上清の残量で懸濁し、>5000gで30分間にわたって室温で遠心分離する。沈殿物を遠心分離カップ中で一緒にし(M A k - 硫酸アンモニウムペースト)、かつ引き続き開始バッファー(1部の沈殿物に対して1～4部のバッファー)で溶解させる。

50

## 【0086】

プロテインA作業のために算出された量の溶解された沈殿物を攪拌下にトライトンX-100水溶液と100g/lで混合し、トライトンX-100の最終濃度は0.5%であった(1000mlの溶解された沈殿物に対して50mlのトライトンX-100溶液)。該バッチをスプレーフィルタ(Spritzenfilter)を介して(0.2μm)滅菌濾過する。該バッチを4で2~18時間放置する(ウイルス不活性MAk溶液)。

## 【0087】

引き続き直ちにプロテインA画分を実施する。試料の導入はできるだけ無菌条件下にかつポンプを用いて行われ、その際、流速は1時間あたり1倍乃至2倍のカラム容量に相当しうるので、MAkとプロテインAとの接触は少なくとも30分間保証される。完全な溶液の導入後に、プロテインA上に結合していないタンパク質及びトライトンを開始バッファーによってカラムから洗浄し、かつ流出物の吸光度/透過率が開始バッファーの開始値に再び到達するまですすぐ(期間:0.5~3時間)。MAkの溶出は溶出バッファー、pH3.0によって行われる。溶出液を碎氷で冷却された、約1/10のカラム容量の2Mのトリス/HCl、pH8.0が装入された容器(秤量されたガラスビン)中に収容する。溶出はレコーダの出発値にほぼ到達するまで行われる(精製されたMAk溶液)。

10

## 【0088】

容量の測定の後に、攪拌しながら1.5倍量の飽和硫酸アンモニウム溶液を緩慢に添加し、60分間攪拌する。引き続き該懸濁液を4で、澄明な上清が生じるまで3日以下放置する。該バッチを振盪し、かつ>5000gで30分間にわたり室温で遠心分離する。該上清をデカンテーションで除去し、かつ沈殿物を遠心分離ピーカ中にまとめ(MAk-硫酸アンモニウムペースト)、かつトリス/HCl-NaClバッファーでできるだけ濃縮して溶解する(1部の沈殿物に対して1~3部のバッファー)。

20

## 【0089】

澄明になったタンパク質溶液を直ちに、Sephadex G-25を含有するトリス/HCl-NaClバッファー、pH7.5で平衡化された再生されたカラムに施与する。塩析する(umsalzen)タンパク質溶液の容量は高くてもカラム容量の15%であるべきである。カラムから排出される溶液を流量測光器に、かつ引き続きpH/イオンモニタに導く。MAk溶液が完全に施与されたら、該カラムをトリス/HCl-NaClバッファー、pH7.5で1cm<sup>2</sup>及び1時間あたり約20mlのカラム中の流速で後すすぎする。カラムの排出容量を流れるMAkを、ラインレコーダで近似的に吸光度/透過率の出発地(約95%)が再び確認されるまでUV-ラインレコーダ-プロフィールに相応して滅菌受容器中に回収する。pH/イオンモニタは更なる導電率の変化を示さない(再緩衝されたMAk溶液)。

30

## 【0090】

溶液の導電率を調節し、場合により塩化ナトリウム溶液、10g/l又は水の添加によって注入を目的としてバッファーの導電性に調整する。

## 【0091】

該生成物を準備されたQ-セファロースカラムにおいてできる限り無菌条件で1時間あたり150mlの適用速度で施す(1mlのQ-セファロースあたり2~5mgのタンパク質)。溶出はトリス/HCl-NaCl-バッファー、pH7.5で1cm<sup>2</sup>及び1時間あたり約25mlの流速において実施する。カラムから排出される溶液を流量測光器を介して、引き続きpH/イオンモニタを介して導く。カラムの流動中を移動するMAkを滅菌装置中でUVラインレコーダ-プロフィールに相応して、ラインレコーダにおいて吸光度/透過率のほぼ出発値(約95%)が再び記録されるまで回収する(発熱物質が排除されたMAk溶液)。

40

## 【0092】

MAkを含有する溶出液のアニオン交換クロマトグラフィー後のpH値を1NのHCl又は1Nの水酸化ナトリウム溶液でpH6.9に調整する。

## 【0093】

50

容量の測定後に、攪拌しながら再び 1.5 倍量の飽和硫酸アンモニウム溶液を緩慢に添加し、かつ 60 分間攪拌する。引き続き該懸濁液を一晚 4 で、澄明な上清が生じるまで放置する。該バッチを振盪し、かつ 8525 g で 60 分間室温で遠心分離する。上清をデカンテーションにより分離し、沈殿物を遠心分離ピーカ中にまとめ (MAK - 硫酸アンモニウムペースト)、かつリン酸ナトリウム - NaCl - ソルビトール - バッファー、pH 7.2 でできるだけ濃縮して溶解させる (1 部の沈殿物に対して 1 ~ 3 部のバッファー)。

#### 【0094】

澄明になったタンパク質溶液を直ちに、リン酸ナトリウム - NaCl - ソルビトール - バッファー、pH 7.2 で平衡化されたセファデックス G - 25 を含有する再生されたカラムにおいてできる限り滅菌条件下に施す (多くてカラム容量の 15%)。カラムから排出される溶液を流量測光器を介し、かつ引き続き pH / イオンモニタを介して導く。これらのカラムをリン酸ナトリウム - NaCl - ソルビトールバッファー、pH 7.2 (流速  $1 \text{ cm}^2$  及び 1 時間あたり約 20 ml) で後すすぎする。カラムの流出容量中を移動する MAK を滅菌受容器中に UV - ラインレコーダ - プロフィールに相当して、ラインレコーダにおいて吸光度 / 透過率のほぼ出発値 (約 95%) が再び記録されるまで回収する。pH / イオンモニタは更なる導電性の変化を示さない (MAK - バルク溶液、濃縮)。

#### 【0095】

溶液の pH 値を調節し、かつ 1 N の HCl 又は 1 N の水酸化ナトリウムを用いて pH 7.2 に調整する。

#### 【0096】

マウス - IgG 濃度に関する調査された値及び容量をもとに、“最終バルク”をリン酸ナトリウム - NaCl - ソルビトールバッファー、pH 7.2 を用いて所望の最終濃度に希釈する。

#### 【0097】

該生成物を 0.2  $\mu\text{m}$  の 1 回のフィルタを介して滅菌濾過し、等分し、かつ “最終バルク” を -20 で貯蔵する。

#### 【0098】

#### 製造方法 II

#### 真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

液体窒素中に貯蔵されている作業細胞バンクからのアンプルを融解し、かつそこに存在する細胞を標準的な細胞培養条件 (合成されたタンパク質不含の細胞培養培地) 下で T フラスコ中で培養する。全細胞数が  $6 \sim 10 \times 10^7$  細胞に達したら、4 ~ 6 つの T フラスコの内容物を 500 ml のスピナー容器中で標準的な細胞培養条件下に再び培養する。細胞数が  $1.5 \sim 2 \times 10^8$  細胞に達したら、これらの細胞をそれぞれ 1000 ml の容量を有する 2 つのスピナー容器に移し、かつ更に培養する。細胞数が  $1.2 \sim 1.5 \times 10^9$  細胞に達したら、細胞を 900 ml の細胞培養培地及び 250 ml の Siran<sup>(R)</sup> 担体を含有する流動床反応器 (Bioreaktor Pilot B 500, Papaspyrou Biotechnologie GmbH, Technologiezentrum Juelich, D-52428 Juelich) 中に接種し、かつ Papaspyrou Biotechnologie 社の取扱手順に相応して 36.5 で 60 日間培養する。酸素含量、pH 値、グルコース濃度並びに MAK 含量を 1 ~ 4 日間隔で調節する。発酵の間に、細胞培養上清を連続的に回収し、かつ 4 で貯蔵する。

#### 【0099】

#### “少カラム”方法によるタンパク質化学的精製

18 l の細胞培養培地が回収されたら、“タンジェンシャルフロー”マイクロ濾過を用いて、引き続き 0.2  $\mu\text{m}$  フィルタによる滅菌濾過によって実施する。細胞不含及び滅菌の細胞培養回収物を、更なる精製のために十分な細胞培養回収物が存在するまで -20 で貯蔵する (約 250 l の細胞培養培地からの細胞培養回収物)。予定されるバッチサイズが達成されたら、滅菌の細胞培養回収物を融解し、マイクロ濾過によって澄明化し、かつ超遠心分離によって 100 ~ 150 倍に濃縮する。次いで超遠心分離物を 2 倍に濃縮された

10

20

30

40

50

同容量の開始バッファー（ $\text{pH } 8.6$ ）と混合し、滅菌濾過する。滅菌条件下に滅菌されたトライトン X - 100 溶液（ $100 \text{ g}$  のトライトン /  $1 \text{ l}$ ）を  $0.5\%$  のトライトンの最終濃度になるまで攪拌下に添加する。エンベロープを有するウイルスの失活のために、該溶液を  $4 \sim 18$  時間  $4^\circ\text{C}$  で放置する。

【0100】

次いでトライトンで処理された超濃縮物を、予め  $5 \text{ カラム容量}$  の開始バッファーで平衡化されているプロテイン A - セファロース - 4 - ファストフロー（Fast-Flow）カラムにポンプ導入する。結合していないタンパク質及びトライトン X - 100 を  $5 \text{ カラム容量}$  の開始バッファーでカラムから洗浄する。引き続きプロテイン A に結合する M A k を溶出バッファー（ $\text{pH } 3.0$ ）でカラムから溶出させ、かつ  $130 \text{ ml}$  の中和バッファー（ $\text{pH } 8$ ）中に収容する。次いで中和バッファー中に収容された M A k の  $\text{pH}$  を必要に応じて  $\text{NaOH}$  を用いて  $\text{pH } 7 \sim 7.5$  に調整し、同容量の  $2 \times$  膜吸着バッファー（ $\text{pH } 7.5$ ）で希釈し、滅菌濾過する。引き続き、M A k 溶液を滅菌条件下に、予め W F I 及び吸着バッファー（ $\text{pH } 7.5$ ）で平衡化された膜吸着器（Membranadsorber）にポンプ導入する。M A k を含有する、事実上含有する発熱物質及び DNA 不含の流量を滅菌容器に回収し、バッファー（ $\text{pH } 7.5$ ）を用いて  $500 \mu\text{g}$  の M A k /  $\text{ml}$  に調整する。次いで希釈された M A k 溶液を超遠心分離によって V i r a g a r d 中空繊維モジュールを用いて潜在的に有するウイルスを排除する。ウイルス不含の M A k を含有する透過物を超遠心分離によって  $4 \sim 5 \text{ mg}$  の M A k /  $\text{ml}$  の濃度に濃縮し、かつエンドバッファー（ $\text{pH } 7.2$ ）に対して透析濾過する。滅菌濾過、エンドバッファー中での希釈及び再度の滅菌濾過の後に M A k をバルク品として充填する。

【0101】

例 3

L i n d m o による変更された定量的な免疫反応性試験

導入

ハイブリドーマ上清中の免疫反応性のモノクローナル抗体の含量を測定するために、抗原過剰で高感度（ $1 \sim 2 \text{ ng}$  のマウス I g /  $\text{ml}$ ）E L I S A システムと組み合わせて結合されないモノクローナル抗体の割合の測定のために使用した。この試験は実質的に L i n d m o によって開発された免疫反応性試験に対して 2 つの利点を有する。

【0102】

a) 該試験は精製されていなくても精製されていても非放射線標識及び放射線標識の M A k の免疫反応性の測定を可能にする。

【0103】

b) 該試験は非特異的な結合の不在下に免疫反応性の測定を可能にする。

【0104】

材料

10

20

30

## 1. 1 化学薬品及び材料

名称	注文先	注文番号	
ホルムアルデヒド溶液、37%	Merck	818708	
リン酸二水素ナトリウム-1-水和物	Merck	6346	
リン酸水素二ナトリウム-2-水和物	Merck	30412	
PBS	Behringwerke		
グリシン	Merck	104201	
96ウェルのマイクロタイタープレート B型	Nunc	4-60445	
ヤギ抗マウスIgG (“捕捉体”)	Sigma	M8642	10
Enzygnostのための Tween/PBS	Behringwerke	OSWE96	
カゼイン	Sigma	C5890	
アルカリ性ホスファターゼとカップリング されたヤギ抗マウスIgG抗体	SBS	107-04	
4-メチルウンベリフェリル- ホスフェート	Sigma	M8276	
SDS	Sigma	L5750	

## 1. 2 装置

遠心分離器	Heraeus		20
ミニチューブ、1.0ml	Kuehn&Bayer	64698446	
回転装置	Heidolph	Reo×2	
分析秤	Mettler	DE100	
マグネットスターラー	IKA	RCT	
pHメーター	WTW		
ムーリネット (Moulinette)	moulinex		
フルオロスキャン11	Merlin		

必要な溶液の製造リリーによる4%のホルムアルデヒド溶液

- 100mlの37%ホルムアルデヒド溶液に
  - 900mlの二回蒸留水を添加する。この溶液中に
  - 4gのリン酸二水素ナトリウム及び
  - 6.5gのリン酸水素二ナトリウムを攪拌下に溶解させる。
- 【0105】
- 溶液のpH値はpH7.0であった。

【0106】洗浄溶液：0.05Mのトリス-クエン酸バッファー、pH7.4

- 6.06gのトリス、
- 19.5gのクエン酸-1-水和物及び
- 4.25gの水酸化ナトリウム
- を1lの二回蒸留水に溶解させる。

【0107】ブロッキング溶液：PBS中1%のカゼイン、pH7.2

- 10gのカゼインを
- 1lの冷PBS、pH7.2+フェノールレッド中で
- 30分間攪拌させ、
- 引き続き3000rpmで遠心分離し、かつ
- 上清を折り畳みフィルタを介して濾過する。

【0108】

- 溶液のpH値をNaOHで調整する。

## 【 0 1 0 9 】

基質バッファー：0.5 Mのトリス、0.01%のMgCl<sub>2</sub>、pH 9.6

- 60.57 gのトリス及び
- 0.1 gの塩化マグネシウムを
- 1 lの二回蒸留水に溶解させる。

## 【 0 1 1 0 】

4 - メチル - ウンベリフェリル - ホスフェート (MUP) 溶液

- MUP 溶液の濃度は1 mgの4 - MPU / 4 mlの基質バッファーである。

## 【 0 1 1 1 】

停止溶液：0.2 Mのグリシン、0.2%のSDS、pH 11.7

- 15 gのグリシン及び
- 2 gのSDSを
- 1 lの二回蒸留水に溶解させる。

## 【 0 1 1 2 】

- 該溶液のpH値を5 NのNaOHで調整する。

## 【 0 1 1 3 】

変更されたLindmoにおける定量的免疫反応性試験の実施

1. 抗原を含有する材料の製造 (“抗原含有材料” ; ACM)

- BW 250 / 183のエピトープを発現するヒトの腫瘍異種移植片 (MZ - STO1, 胃ガン) の組織 (顆粒細胞の膜上に発現する “非特異的交差反応抗原” (NCA - 95)) をムーリネットを用いて2 ~ 5 mmの切片に切断し、かつ
- 室温で4%のリリーによるホルムアルデヒド溶液中で少なくとも16時間固定化する。

## 【 0 1 1 4 】

- 洗浄の後に固定化された組織をステンレススチールネットに通過させる。

## 【 0 1 1 5 】

- 固定化された細胞を、上清がある程度澄明になるまでPBS中で少なくとも10回洗浄し、引き続き
- ホルマリン中で1回洗浄する。

## 【 0 1 1 6 】

- この調製物をリリーによるホルマリン中で4で保管し (1部のACM及び1部のリリーによるホルマリン)、かつこれを “ACM” として呼称する。

## 【 0 1 1 7 】

2. 抗原過剰での結合アッセイ

- ACMをPBSで少なくとも10回洗浄し、かつ引き続き
- ペレットを懸濁し、かつ100 mMのグリシン (4倍のペレット容量) 中で4において30分間インキュベートする。

## 【 0 1 1 8 】

- 次いで該細胞を更にPBSで4回洗浄する。

## 【 0 1 1 9 】

- ACMの増加量 (0.1 ~ 50 mg) を1 mlのミニチューブ中に添加し、かつ25 ngのMAk BW 250 / 183を含有する500 µlのハイブリドーマ上清と一緒に室温で一晩インキュベートする (上向き回転)。

## 【 0 1 2 0 】

- ネガティブコントロールを同一のアイソタイプを示す (IgG<sub>1</sub>) 25 ngの抗マイコプラズマMAk BW 227 / 7と一緒にインキュベートする。

## 【 0 1 2 1 】

- ACMを遠心分離し、
- 上清を除去し、かつ
- ACMペレットに結合しなかった残りのマウスIgG分子に関して分析する。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

3 . 結合しないマウス I g G 分子の割合の E L I S A システムにおける測定  
マイクロタイタープレートの抗原による被覆

- 9 6 ウェルのポリスチレン - マイクロタイタープレートを 5 0  $\mu$  l のヤギ抗マウス I g G 抗血清を用いて 1 ウェルあたり 2 . 5  $\mu$  l / m l で一晩インキュベートする。

【 0 1 2 3 】

- ウサギ抗マウス I g G 抗血清を引き続き吸い取り、かつこれらのプレートを 0 . 0 5 M のトリス - クエン酸バッファー、p H 7 . 4 で 4 回洗浄する（洗浄プロセス = 1 ウェルあたり 2 0 0  $\mu$  l をピペティングし、かつ吸い取る）。

【 0 1 2 4 】

- マイクロタイタープレートをセルロース上で逆さにして一晩乾燥させる。

【 0 1 2 5 】

- 乾燥パトローネで密閉し、前処理されたマイクロタイタープレートの貯蔵時間は少なくとも 6 ヶ月である。

【 0 1 2 6 】

遊離の結合部位のブロッキング

- 2 0 0  $\mu$  l のブロッキング溶液を 1 ウェルあたりにピペティングし、かつ該プレートを室温で 6 0 分間インキュベートする。

【 0 1 2 7 】

- 引き続きブロッキング溶液を吸い取る。

【 0 1 2 8 】

試料適用

- 結合されていないマウス - I g G 分子の総数に関して分析されるべき 5 0  $\mu$  l の A C M 上清を 1 ウェルあたりに適用し、かつ室温で 6 0 分間インキュベートする。

【 0 1 2 9 】

- 次いでマイクロタイタープレートを前記のように洗浄溶液で 3 回洗浄する。

【 0 1 3 0 】

増幅及び検出

- 5 0  $\mu$  l の、アルカリ性ホスファターゼとカップリングされた 1 : 2 5 0 で希釈したヤギ抗マウス I g G 抗体を 1 ウェルあたりに適用し、かつ室温で 3 0 分間インキュベートする。

【 0 1 3 1 】

- マイクロタイタープレートを前記のように洗浄溶液で 3 回洗浄する。

【 0 1 3 2 】

- 5 0  $\mu$  l の M U P 溶液を 1 ウェルあたりに適用し、かつ室温で 3 0 分間インキュベートする。

【 0 1 3 3 】

- 基質反応を室温で 3 0 分間インキュベートした後で 1 0 0  $\mu$  l の停止溶液の添加によって停止させる。

【 0 1 3 4 】

- 引き続き蛍光を測定する：励起波長は 3 5 5 n m であり、かつ放出波長は 4 6 0 n m である。

【 0 1 3 5 】

この試験の感度は 1 ~ 2 n g のマウス I g G / m l の範囲にある。

【 0 1 3 6 】

免疫反応性の数学的測定

$I R [\%] = 100\% - [100\% \times ( \text{上清中の M A k 濃度} / \text{M A k 出発濃度} )]$

免疫反応性の計算は検針点で行われる。この点是非特異的コントロール（非特異的結合）のプラトー値のまさにさらなる低下が存在しないようなその A C M 容量（E L I S A 経過曲線の X 軸）にある。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 7 】

例 4

T c - 9 9 m 標識された M A k B W 2 5 0 / 1 8 3 の注入により記録されるシンチレーショングラム

T c - 9 9 m での標識のために使用される M A k バッチはその製造方法に基づいてそれらの免疫反応性において異なる。これらのデータを以下の第 1 0 表にまとめる。

【 0 1 3 8 】

【表 1 1】

MAkバッチ	製造方法	免疫反応性	シンチレーション図
MAk BW 250/183	慣用の発酵及び慣用の精製法	70 - 80 %	イメージGRAN11 (図 3) イメージGRAN21 (図 4)
MAk BW 250/183	流動床反応器—発酵 及び“少カラム”精 製法	> 90 %	イメージGRAN91 (図 5) イメージGRAN81 (図 6) イメージGRAN71 (図 7)

10

20

【図面の簡単な説明】

30

【図 1】 図 1 は流動床発酵反応器を示してゐる。

【図 2】 図 2 は変更された L i n d m o 試験における抗体調製物についての結果曲線を示す。

【図 3】 図 3 は従来の技術の調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

【図 4】 図 4 は従来の技術の調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

【図 5】 図 5 は本発明による調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

【図 6】 図 6 は本発明による調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

40

【図 7】 図 7 は本発明による調製物からの T C - 9 9 m 標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

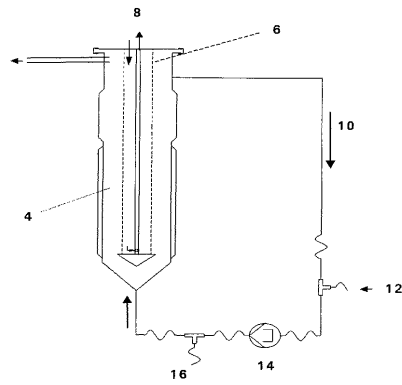
【符号の説明】

2 反応器、 4 担体球、 6 ベンチレーションモジュール、 8 ガス混合物、  
10 循環、 12 新たな培地の入口、 14 ポンプ、 16 試料採取バルブ、  
18 導管

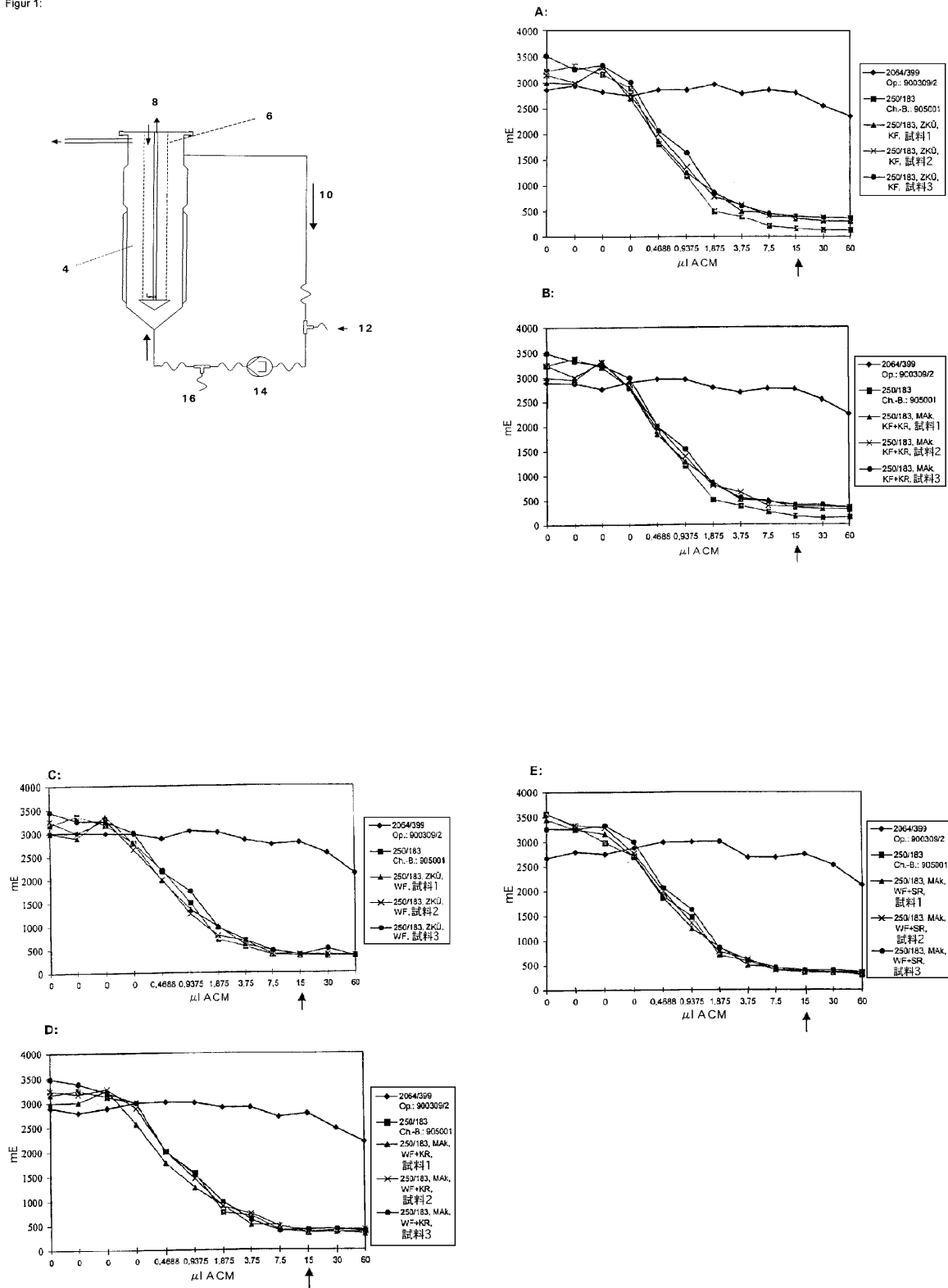


【図 1】

Figur 1:

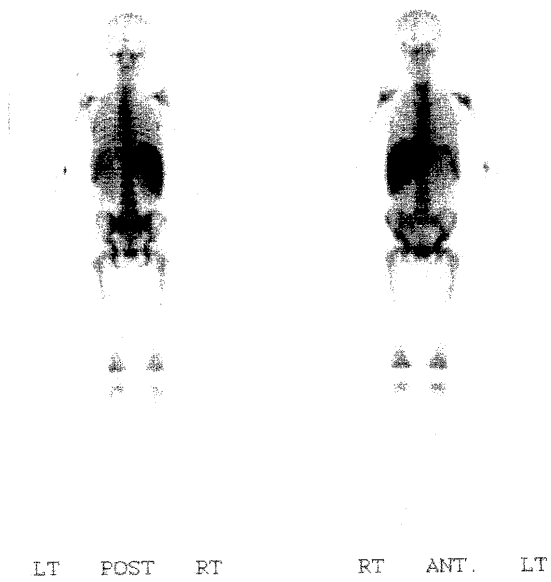


【図 2】



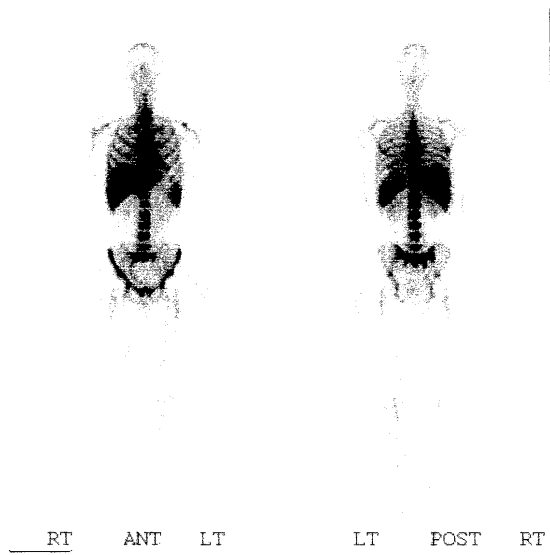
【図 3】

Fig. 3

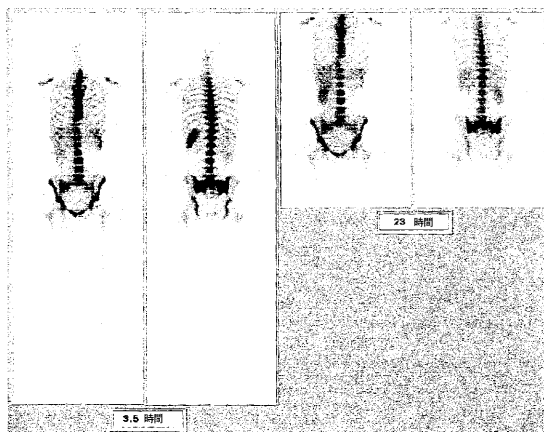


【図 4】

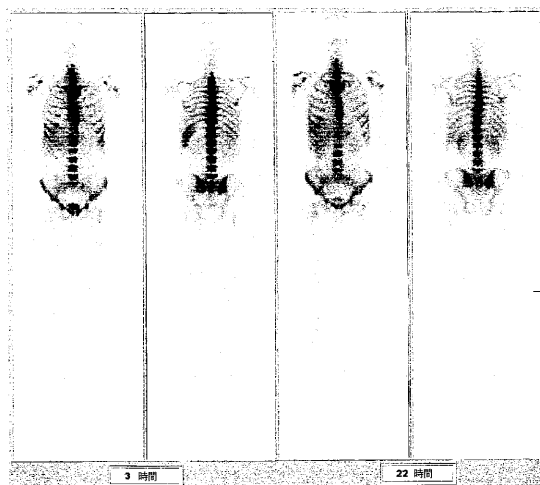
Fig. 4



【図 5】

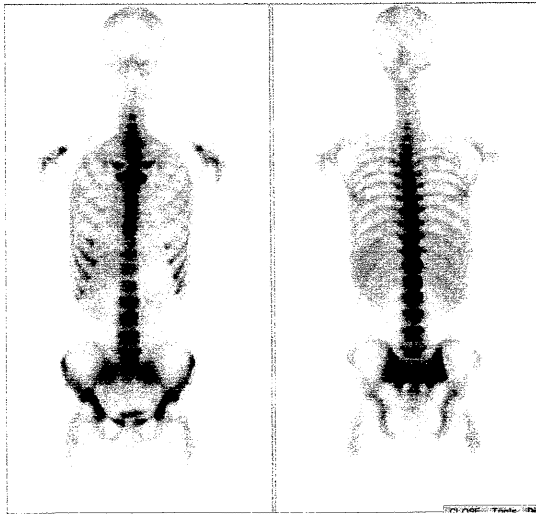


【図 6】



【 図 7 】

Fig. 7



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08  
C 0 7 K 1/22 (2006.01) C 0 7 K 1/22

(72)発明者 ジルケ トムセン - ボスレート  
ドイツ連邦共和国 ベルリン アム カールシュラーク 9

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 Br. J. Cancer, 1993年 3月, Vol.67, No.3, pp.436-440  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987年, Vol.506, pp.129-146  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1990年, Vol.589, pp.443-457  
村山敬一 他, 東ソー研究報告, 1994年 2月 1日, Vol.38, pp.79-87  
Nat. Biotechnol., 1999年 9月, Vol.17, No.9, pp.897-901  
Journal of Immunological Methods, 1991年 11月 22日, Vol.144, No.2, pp.175-183

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)  
C12N 15/00-15/90  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed