

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4777599号
(P4777599)

(45) 発行日 平成23年9月21日 (2011. 9. 21)

(24) 登録日 平成23年7月8日 (2011. 7. 8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 X

A 6 1 P 37/06 (2006. 01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 5 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2002-531212 (P2002-531212)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月25日 (2001. 9. 25)
 (65) 公表番号 特表2004-509977 (P2004-509977A)
 (43) 公表日 平成16年4月2日 (2004. 4. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2001/002972
 (87) 国際公開番号 W02002/026830
 (87) 国際公開日 平成14年4月4日 (2002. 4. 4)
 審査請求日 平成20年3月10日 (2008. 3. 10)
 (31) 優先権主張番号 00/12384
 (32) 優先日 平成12年9月28日 (2000. 9. 28)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 503118457
 イムティックス・サンスタ
 フランス国エフー69348 リヨン・セ
 デックス 07, アヴニユ・ドゥブル,
 58, ボワット・ポスタル 7055
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠武
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト抗胸腺細胞免疫グロブリンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンの製造方法であって、

(a) ヒト胸腺細胞の細胞調製物を特定病原体未感染 (S P F) 動物に注入すること

;

(b) 当該 S P F 動物によって生産された免疫血清を回収すること;

(c) ヒト由来の生物学的材料上での吸着をすることなしに、血清から抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンを単離すること、
 からなる工程を含み、

S P F 動物がウサギである、

前記製造方法。

【請求項 2】

前記単離工程 (c) が、イオン交換クロマトグラフィーおよび / または 1 回またはそれ以上の沈降を使用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記イオン交換クロマトグラフィーが、カラム上でのイオン交換クロマトグラフィーである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (a) で用いられるヒト胸腺細胞の細胞調製物が、培養の系統の細胞からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (a) で用いられるヒト胸腺細胞の細胞調製物が、新鮮なヒト胸腺細胞の精製により得られる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒト抗胸腺細胞免疫グロブリンの製造方法に関する。

【0002】

ヒト抗胸腺細胞抗体または免疫グロブリン (Ig s) は、選択的免疫抑制薬として知られている。それらは、免疫反応において、血液および種々のリンパ系の組織の循環性リンパ球の量を種々の機構により減少させる、または全くなすことにより、および循環性リンパ球のレセプターを遮断すること、または変質させることにより、作用する。それらの使用は、臓器移植において、移植拒絶反応の予防および治療のために、ならびに急性の移植片対宿主反応の治療に必要とされる。これらの免疫グロブリンは、延髄形成不全症 (medullary aplasia) の治療においても、提案されている。

10

【0003】

このようなタイプの免疫グロブリンの製造は、主に、例えばウマまたはウサギといった動物にリンパ球を注入、およびその後の、免疫血清からの抗胸腺細胞免疫グロブリンの抽出により行われた。しかし、このような製造の純度のレベルは不十分であり、このような免疫グロブリンは特に治療には使用できなかった (R. D. Guttman, 1967, J. Exp. Med., 126: 1099 - 1127)。抗ヒト赤血球または抗ヒト基底膜免疫グロブリンは、特に、免疫形成期にある動物によって生産された。これらの免疫グロブリンの出現について、いくつかの仮説により説明されており、胸腺細胞の浮遊液が痕跡量の赤血球を含む説 (J. M. Rolland, 1972, Pathology, 4 (2): 85 - 122)、または共通の表面抗原が T 細胞、B 細胞および赤血球の間に存在する説が、現在のところ最も有力な仮説である。

20

【0004】

その後、製造における純度の改善のために、技術が開発された。これらの技術として、血球吸着、すなわち赤血球上での吸着、の工程が検討された。

この血球吸着の工程は、例えば当初の免疫血清中の抗赤血球抗体などの、望ましくない抗体の大部分を除去することを可能にする。

30

【0005】

特に、抗基底膜抗体の吸収のために、ヒト組織 (例えば胎盤など) 上における抗組織抗体の除去の工程もまた、しばしば検討された。

これらの技術により製造された、例えば、チモグロブリン (Thymoglobuline) (登録商標) (Imtix - Sangstat)、テセラック (Tecelac) (登録商標) (Biote st)、あるいは ATGF (登録商標) (Fresenius) または ATGAM (Upjohn) などの、いくつかの抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンは、現在市場において入手可能である。

【0006】

しかし、ヒト組織または赤血球上での吸着の工程を含む上述の方法は、依然として欠点を有する。

40

特に、これらの方法を行うことにより、血清中に含まれる γ - グロブリンの濃度における 30%、すなわち目的の抗体のわずかとはいえない割合の減少が認められる。さらに、望ましくない抗赤血球抗体の除去は完全ではない。また、これらの抗体は治療を受ける患者の溶血性貧血の症状を引き起こす原因と考えられている。最後に、たとえ精製され安全性を高めたものであっても、抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンの単離方法における、赤血球などのヒト由来物の使用は、感染の潜在的危険性を増加させる。

【0007】

従って、本発明の発明者は、抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンの製造のための改良方法の開発を検討した。

50

本発明は、ヒト由来の生物学的材料上における吸着の工程を含まない、特に治療に使用するために十分なほど純度が高い、抗胸腺細胞免疫グロブリンの製造方法に関する。

【0008】

より具体的には、本発明の主題は抗精製ヒト胸腺細胞免疫グロブリンの製造方法であり：
(a) ヒト胸腺細胞の細胞調製物を特定病原体未感染(SPF)動物に注入すること；
(b) 当該動物によって生産された免疫血清を回収すること；
(c) ヒト由来の生物学的材料上での吸着をすることなしに、血清から抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンを単離すること、
からなる工程を含む、前記製造方法である。

【0009】

さらに詳細には、「血清からの免疫グロブリン」という表現は、免疫形成後の血清からのγ-グロブリンの全フラクションを意味することを意図している。

「ヒト由来の生物学的材料上での吸着」という表現は、特に、赤血球上での血球吸着またはヒト組織(特に胎盤など)、ストロマまたはこれらの組織の粗抽出物上での吸着を意味することを意図している。

【0010】

SPF動物とは、健康基準に従って、その環境および飼料が厳格に管理されて飼育された動物である。「管理された健康状態にある」動物との言及もなされる。該SPF動物は、閉ざされており殺菌されている区画で飼育され、空気環境は、例えばHEPAフィルターを通して(殺菌濾過)濾過されており、水及び食料は、与える前に汚染除去される。このような飼育により、直接的な環境から、いかなる病原性の要因をも取り除くことが可能となる(Yanabeら、Exp. Animal 48(2)、101-106(1999))。ここで用語「病原」は、目的とする使用に関連して、臨床上の疾患を引き起こしうる、および/または動物の生物学的応答を変化させうる感染性要因を意味する。SPF状態は、標的とする微生物の検出のために、または反対にそれらが存在しないことを立証するために、微生物の、および管理方法(臨床的、血清学的、組織学的、または培養を使用することについて)のリストを参考にする。

【0011】

好ましくは、免疫血清の製造のための使用は、ヤギまたはウマにおいて、より好ましくはウサギにおいて行われる。実際、IgG1のみがウサギの免疫血清中に存在することは、抗体の精製の工程を容易にする。ウサギIgGもまたヒトFc受容体に対して高い親和性を示し、このことは、ヒトT細胞に対して強力な細胞毒性を有する抗体の開発を可能にする。

【0012】

ヒト胸腺の細胞の試料は、培養の細胞系統から、または、好ましくはヒト胸腺の断片から、または場合によっては、例えば脾臓、扁桃腺、リンパ節、胸部気管または末梢血液の懸濁液から精製された新鮮な胸腺細胞から、入手することができる。特にヒト胸腺の断片は、小児における心臓手術に続く外科的行為において容易に除去されうる。いかなる汚染をも防止し、血清学的に陽性の結果を示す汚染された胸腺断片を除去するために、ウイルス試験は提供者の血液について行われる。

【0013】

ヒト胸腺細胞の注入およびSPF動物からの免疫血清の回収は、当該技術分野における当業者にとって標準的な技術により行われる。血清からの抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンの単離により、望ましくないタンパク質の除去が可能となる。当該単離は、例えば、好ましくはカラムにおいてのイオン交換クロマトグラフィー、および/または、1回またはそれ以上の沈降により実行されうる。

【0014】

有利なことに、その様な沈降は、免疫グロブリン沈降試薬を用いて2つの連続する工程において実行されうる。当該試薬としては、好ましくは硫酸ナトリウムが用いられる。

【0015】

クロマトグラフィーの工程は、例えば陰イオンなどのイオン交換樹脂（D E A E）による、ロードされた（l o a d e d）不純物の保持を可能にする。I g Gに関しては、カラムによっては保持されず、速やかにカラムから除去されことから、選択的にこれらを得ることが可能となる。特異的な親和性を持つカラムにおけるクロマトグラフィーであって、残存する望ましくない抗体を除去するものもまた有益である。

【0016】

本発明の主題は、本発明の方法を用いて調製されうる、単離された抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンでもある。

これらの免疫グロブリンは、例えば免疫抑制の目的で患者に注入されたときのように、リンパ球と接触するにいたった際にリンパ球を認識するので、これらの免疫グロブリンは、指定された「抗ヒトリンパ球免疫グロブリン」ともなり得る。

【0017】

さらに本発明はまた、患者の血液、およびリンパ系組織における循環性リンパ球の量を減少させることを意図する医薬品の製造のためのこれらの免疫グロブリンの使用をも指向する。

【0018】

本発明の主題は、得られた治療有効量の免疫グロブリンを、リンパ球の量を低減させることが必要な患者に投与する治療有情の処置の方法でもある。これらの免疫グロブリンは、特に臓器移植に関連して有用である。

【0019】

以下に示す実施例2.1において明らかであるように、上記の方法により調製された抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンは、血球吸着工程を含む方法により調製された抗胸腺免疫グロブリンと比べて、より強力な比活性を示す。

【0020】

ヒト由来の生物学的材料上での吸着工程を省くことにより、ヒト由来物と何ら接触させることなしに免疫グロブリンを製造することが可能となる。このことは、起こりうるウイルスの汚染、またはプリオンタイプのこれまで知られていない要因による汚染の排除につながる。さらに、血球吸着に関連する汚染、すなわちこの工程により生じる溶血反応中のヒト赤血球によるヘモグロビンの放出による汚染が回避される。

【0021】

本発明の方法により、他の血球（赤血球、好中球など）との交差反応が可能である免疫グロブリンの数が有意に低減されている、抗胸腺細胞免疫グロブリンの試料を得ることが可能となる。さらに、血球吸着が抗胸腺抗体の調製に使用されないという事実により、安全面での改善のみならず、調製方法の長さおよびコストの低減が可能となる。実際、工業的条件において相対的に制限される抗胸腺免疫グロブリンの製造を行う際には、血球吸着は従来から、新鮮でホルマリン処理された保存赤血球を使用し、処理される大量の細胞を必要とする。

【0022】

以下の実施例は本発明を例示するが、その技術的範囲を限定するものではない。

【0023】

【実施例】

[実施例1] 免疫グロブリンの製造

1.1 胸腺細胞の精製

ヒト胸腺断片を、取り出しおよび摩砕の後、ろ過し、懸濁液とする。

【0024】

その後、細胞懸濁液をナイロン布でろ過し、5、1800rpmで遠心分離にかける。20mLのフィコールを、2~7×10⁹の細胞を含む細胞溶液に加え、当該混合物を5、2000rpmで遠心分離する。続いて1800rpmの遠心分離を2回行う。その後、細胞試料は5で一晩貯蔵し、SPFウサギに注入する前に希釈する。当該胸腺細胞は、凍結によっても保存することができる。

【 0 0 2 5 】

1 . 2 抗体の単離

ウサギ免疫血清は、20日(D20)と30日(D30)の間の数回の出血において回収し、貯蔵のために凍結することができる。調製時に、徐々に周囲温度に戻した血清のバッチが形成される。

【 0 0 2 6 】

ウサギの血清のこれらのバッチは、補体タンパク質の除去のため、30～45分間 56 ± 2 の温度下におかれることにより非動化される。

ウサギ血清は、周囲温度での陰イオン交換樹脂(DEAD)によるカラムクロマトグラフィー、その後の硫酸ナトリウムを用いての2度の沈降により、免疫グロブリン画分として精製される。

10

【 0 0 2 7 】

さらなる、濾過、濃縮およびダイアフィルトレーション(diafiltration)の工程の後に、抗胸腺細胞免疫グロブリンは、そのウイルスについての安全性を確かにするために、10時間60の温度で低温殺菌される。

【 0 0 2 8 】

一つの変法として、免疫グロブリン画分のろ過、濃縮、ダイアフィルトレーションおよび沈降(例えば、コーンタイプ(cone type)のアルコール性分画または硫酸アンモニウム分画)は、クロマトグラフィー工程の前に行うことができる。

【 0 0 2 9 】

製剤化およびろ過による消毒の後、免疫グロブリン溶液は、5～25mg/mLの溶液の液体状態で、または一つの変法としては凍結乾燥状態で、保存されうる。物理化学試験、安全性試験(発熱要因、抗血小板活性の存在)、無菌性および純度試験およびリンパ球障害性活性試験(インビトロでのロゼット形成の阻害およびサルにおける同種皮膚移植片生着)を含む、一連の品質管理が実行される。

20

【 0 0 3 0 】

[実施例2] 従来の免疫グロブリン(血球吸着により入手)に対しての、本発明の方法を用いて得られた免疫グロブリンの効果および安全性についての比較分析

3 . 1 インビトロでの比活性の測定

免疫グロブリンの2バッチを、標準抗胸腺細胞免疫グロブリン(ATG)バッチおよび血球吸着をしないATGバッチとして、比活性の比較試験に用いた。

30

【 0 0 3 1 】

該ATGの比活性を決定するため、すなわちヒトリンパ球に結合可能な免疫グロブリンの量を算定するために、間接免疫蛍光法と組み合わせたフローサイトメトリーの技術を使用する。サル全血(すべての血球を含む)を、種々の濃度においてATGバッチとインキュベートした。結合していない過剰量の免疫グロブリンは洗い流し、フルオレシニンイソシアネート(FITC)で標識化した第2の抗体を、結合ATG(bound ATG)結合させるために加える。その後、フローサイトメトリーを用いて細胞のサイズの画分として、細胞を分取した後に、細胞表面でのATGの結合量が明らかとなる。

【 0 0 3 2 】

結果は、血球吸着しないATGのより強い比活性を示した。リンパ球への同様の結合を達成するためには、 $2.73 \mu\text{g/mL}$ の血球吸着しないATGが必要な場合に、 $7.23 \mu\text{g/mL}$ 、すなわち2.65倍より多くの標準ATGが必要となる。従って、血球吸着の工程はATGの結合能および比活性を減少させる。

40

【 0 0 3 3 】

3 . 2 サルについての皮膚移植試験におけるインビボのATGの活性の測定

始めにこの試験を行うために、3群: 対照群($n = 5$)、5mg/kgのATGを投与された群($n = 8$)および5mg/kgの血球吸着されていないATGを投与された群($n = 3$)、のサルが選抜された。標準バッチの比活性と同等の比活性とするために血球吸着しないATGについて50/50希釈が行われた。

50

【 0 0 3 4 】

皮膚移植テストとして、第 0 日目 (D 0) に、各動物の背部の皮膚の 4 カ所の同種移植 (少なくとも 2 つの H L A 抗原性決定基が異なる動物由来のもの) および自己移植を行う。その後、A T G の所定量が、第 1 日目から 3 週間インビボに投与される。

【 0 0 3 5 】

その結果によれば、同種移植の平均生残時間は、標準 A T G 処理群では 2 3 日 ($\pm 4 . 1 6$)、血球吸着しない A T G 処理群では 2 1 . 3 日 ($\pm 7 . 3$) であり、処置したサル の 2 群において同等である。

【 0 0 3 6 】

皮膚移植の生残時間の延長は、A T G の投与により誘引されたリンパ球の減少に関連して いる。このリンパ球減少は、第 5 日目 (D 5) リンパ球のレベルが最も減少し、第 2 0 日 目 (D 2 0) 頃までに通常の値まで徐々に回復するという、2 バッチ間に類似する経過を たどる。

10

【 0 0 3 7 】

結果として、血球吸着しない A T G の希釈されたバッチは、霊長類におけるインビボ効果 に関して、希釈しない標準 A T G バッチと同等である。

3 . 3 A T G 投与後の溶血性貧血の危険性の評価

同じ研究に関して、試験終了まで定期的に血液検査を行い、処置されたサル の 2 群 において、ヘモグロビンレベルの評価が一致することが示される。当該レベルの減少は、第 9 日 目 (D 9) まで観察され、その後当該レベルは通常値まで徐々に回復する。以下の 2 つ の現象はこの経過の原因である。第 1 に、貧血は、血液サンプルの反復的な採取の後の医原 性のタイプのものである。この貧血はサル の 3 群において一致している。第 2 に、A T G において特異的な効果は、処理群において第 1 日目 (D 1) からヘモグロビンレベルの実 質的な減少を引き起こし、この減少は標準 A T G、または血球吸着しない A T G と一致す るものである。

20

【 0 0 3 8 】

さらに、貧血についての起こりうる溶血性の原因の検出のために、ハプトグロビンおよび オロムコイド (o r o m u c o i d) のレベルもまた測定する。血球溶血の場合には、ハ プトグロビンは測定不能となる。一方、これらの 2 つのレベルは 2 つの群において第 4 日 目 (D 4) から増加し、この増加は炎症性の活性を反映するものである。

30

【 0 0 3 9 】

血球吸着しない A T G を処理した動物のにおいて評価された血液学的安全性は、血球吸着 した A T G を処理した動物における場合と同様に満足のいくものである。

フロントページの続き

- (72)発明者 ティオリエ, ジェローム
フランス国エフ - 6 9 0 0 5 リヨン, リュー・デ・シュヴォーシェウール, 1 8
- (72)発明者 ソルラン, ローラン
フランス国エフ - 6 9 6 7 0 ヴォーニュレ, アヴニユ・セリュラス, 2 5

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開平 0 9 - 1 5 2 4 3 0 (J P , A)
Transplant.Proc., Vol.29, Suppl.7A(1997)p.10S-12S
J. Immunol.Methods, Vol.245, No.1-2(2000.Nov.)p.45-54

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
PubMed