

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534752
(P2004-534752A)

(43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 49/02	A 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	C 4 C 0 8 5
A 6 1 K 41/00	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-589052 (P2002-589052)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月3日 (2002.5.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月14日 (2003.11.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2002/001606
 (87) 国際公開番号 W02002/092136
 (87) 国際公開日 平成14年11月21日 (2002.11.21)
 (31) 優先権主張番号 101 23 505.4
 (32) 優先日 平成13年5月15日 (2001.5.15)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

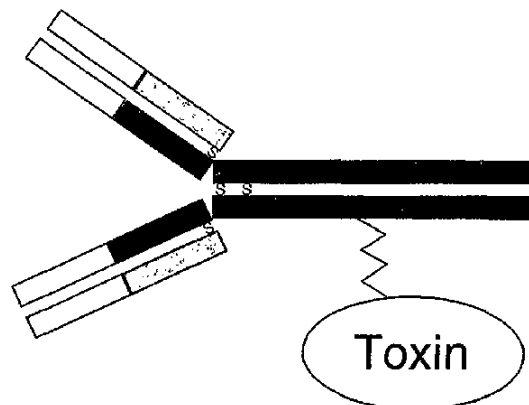
(71) 出願人 503420268
 スロカ・ヨアヒム
 ドイツ連邦共和国、1 4 7 9 7 ダムス
 ルフ、ベルリナー・ストラッセ、4 1 ツェ
 ー
 (71) 出願人 503420280
 ベルクター・ヴォルフガング
 ドイツ連邦共和国、3 0 6 2 5 ハノーバ
 ー、ハイデリング、4 5
 (71) 出願人 503420279
 コビルケ・ハルトムート
 ドイツ連邦共和国、1 4 7 9 7 ダムス
 ルフ、レーニナー・ストラッセ、4
 (74) 代理人 100069556
 弁理士 江崎 光史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵黄抗体 (I G Y) からの免疫コンジュゲート、そのコンフュクシヨニングならびに診断および治療への使用方法

(57) 【要約】

本発明は、卵黄抗体 (I g Y) からの免疫コンジュゲート、その製造ならびに診断および治療への使用に関する。本発明の課題は、診断的使用および治療的使用のための従来の免疫コンジュゲートに対する代替の生成物を提案することである。本発明による免疫コンジュゲートは、哺乳類からの単クローン抗体および免疫血清ならびに常用のニワトリからの I g Y 製剤を純度および抗原ターゲットティングに関して優れている。そのうえ、ヒト抗 I g Y 抗体の形成はできるだけ回避されるべきであり、かつ、該免疫コンジュゲートは、動物保護に適合しかつ大量に安価に製造されることができなければならない。この課題は、本発明によれば、S P F ニワトリの、好ましくはトランスジェニック S P F ニワトリの、無傷の卵黄抗体 (I g Y)、I g Y フラグメント、F a b 構成体またはヒト化卵黄抗体からの多クローン性 I g Y コンジュゲートによって解決される。該抗体または該抗体フラグメントは免疫効果をもつ成分として、シグナル物質、作用物質または増幅分子でもよい少なくとも1つの別の成分と結合されているものとする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト I g G の定常領域を有する多クローン性 I g Y である、トランスジェニック S P F ニワトリもしくはヨーロッパ薬局方および D A B 1 0 に従った特定病原体除去 (S P F) ニワトリの卵からの多クローン性 I g Y 製剤ならびに少なくとも 1 つのシグナル物質および / または作用物質および / または増幅分子から成る、卵黄抗体 (I g Y) からの免疫コンジュゲート。

【請求項 2】

上記多クローン性 I g Y 製剤が精製された卵黄抗体 (I g Y)、I g Y フラグメント、F a b 構成体またはキメラ卵黄抗体である、請求項 1 記載の卵黄抗体 (I g Y) からの免疫コンジュゲート。 10

【請求項 3】

調製に使用される上記 I g Y 製剤が、鳥類の抗体の可変領域とヒト I g G の定常領域との化学結合によって得られたヒト化卵黄抗体を含むことを特徴とする、請求項 1 記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 4】

上記 I g Y 製剤が一価もしくは二価の抗体フラグメント、好ましくは F a b または F (a b) 2、から成ることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 5】

上記 I g Y 製剤が二種特異性、三種特異性もしくは多特異性の F a b 構成体から成ることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の免疫コンジュゲート。 20

【請求項 6】

上記シグナル物質が診断用放射性核種、酵素、色素および / または光増感剤であることを特徴とする、請求項 1 記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 7】

上記作用物質が治療用の放射性核種、細胞増殖抑制剤、毒素、化学療法剤、プロドラッグ、酵素、光増感剤および / または線維素溶解薬剤であることを特徴とする、請求項 1 記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 8】

上記 I g Y 製剤が増幅分子、好ましくはビオチン、または補体システムのタンパク質と結合していることを特徴とする、請求項 1 記載の免疫コンジュゲート。 30

【請求項 9】

上記シグナル物質もしくは作用物質が共役結合により、または助剤、例えばキレート剤、増幅分子および / または該増幅分子に対して高親和性の分子、を用いて上記 I g Y 製剤に、あるいは二種特異性、三種特異性もしくは多特異性の I g Y 構成体の 1 つ以上の腕の可変領域を介して結合していることを特徴とする、上記請求項のいずれか 1 項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 10】

上記 I g Y 製剤が腫瘍抗原に対して、ホルモンに対して、R N A 断片および / または D N A 断片に対して、感染性病原体もしくはその (表面) 抗原に対して、白血球抗原に対して、細胞内分子に対して、受容体分子に対して、あるいは凝固因子に対して特異的であることを特徴とする、上記請求項のいずれか 1 項に記載の免疫コンジュゲート。 40

【請求項 11】

上記免疫コンジュゲートがプレターゲットングの範囲内で先ずインビボで特異抗原に結合した後で好ましくはビオチン / アビジンもしくはビオチン / ストレプトアビジンを介してシグナル物質もしくは作用物質と結合する、上記請求項のいずれか 1 項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 12】

上記免疫コンジュゲートがプレターゲットングの範囲内で先ずインビボで特異抗原に結合した後で二次ヒト抗 I g Y 抗体を介してシグナル物質もしくは作用物質ないしは増幅分 50

子と結合する、上記請求項のいずれか1項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項13】

少なくともIgY製剤およびシグナル物質もしくは作用物質および/または増幅分子ならびに付加的なコンポーネント、例えば、薄層クロマトグラフィー、分離塔、装置用のスタンド、洗浄 および溶離緩衝液による品質管理のためのセットを含む、請求項1から10までのいずれか1項に記載された免疫コンジュゲートの製造のための卵黄抗体(IgY)のコンフェクショニング。

【請求項14】

薄層クロマトグラフィーによる品質管理のためのセットおよび適用のための装置を少なくとも含む、請求項1から10までのいずれか1項に記載された免疫コンジュゲートのコン

10

【請求項15】

上記IgY製剤が凍結乾燥された形で存在するかあるいは、最適なpH値に調整された、添加剤、例えば安定剤、と組み合わせられた懸濁液の形で存在する、請求項11または12に記載のコンフェクショニング。

【請求項16】

特に非感染性の炎症、感染性疾患、凝固障害、自己免疫疾患および腫瘍の疾患に対する、診断剤もしくは治療剤の製造のための、請求項1から10までのいずれか1項に記載された免疫コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、請求項1, 13, 14および16の特徴部に記載の、卵黄抗体(IgY)からの免疫コンジュゲート、そのコンフェクショニング(Konfektionierung)ならびに診断および治療への使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明のより良い理解のために、本願に記載の術語は、本明細書では次のとおりより詳細に定義され、かつ、本願の範囲内では他の意味を持たないこととする。

【0003】

30

「特定病原体除去ニワトリ」(要するに「SPFニワトリ」):
ヨーロッパ薬局方およびDAB10の基準に従ってSPF母親動物の血統を引きかつ日齢初日からSPF条件下に維持される動物のことである。この動物は、ヒト病原性刺激体および家禽病原性刺激体(menschen- und geflügelpathogene Erreger)ならびにこれらの抗体を有していない。

【0004】

「IgY」(英語: イムノグロブリンヨーク(immunoglobulin yolk)):

本明細書では、家禽卵の卵黄から抽出され、かつ、ニワトリの血清中におけるIgGに相応する免疫グロブリンのことである。この鳥類の免疫グロブリンは、構造的に、とりわけ、Fcフラグメントにおける定常ドメインの数が多いことによる該免疫グロブリンのより

40

【0005】

「特異性IgY」:
は、本明細書では、IgY全体のうちの、免疫に使用される抗原を認識する部分として定義されており、一方で非特異性IgYは、IgY全体のうちの、抗原性作用物質または非病原性刺激体および病原性刺激体(apathogenen und pathogenen Erregern)との動物の接触による免疫とは無関係に形成される部分を表す。

【0006】

「無傷の抗体」:

50

これは、フラグメント化されていない、つまり1つのFcフラグメントと2つのFabフラグメントを有し、この場合、Fcは重い鎖の定常領域でありかつFabは重い鎖および軽い鎖の可変領域である免疫グロブリンのこととする。

【0007】

「IgYフラグメント」:

「IgYフラグメント」で、本明細書では、Fcフラグメントの残基を持たないかもしくはわずかにだけ有する鳥類の免疫グロブリンのFabフラグメントを表している。この場合、本明細書ではこれ以降「Fab」という語は、簡略化のためにF(ab)₂といったフラグメントも表すこととする。

【0008】

「Fab構成体」:

「Fab構成体」という語は、1つもしくはそれ以上の異なる抗原決定基を認識し(単一特異性構成体、二種特異性構成体または三種特異性構成体など)かつしたがって1つもしくはそれ以上の機能を満たすことができる、即ち一価、二価もしくは三価で作用する、2つ以上の異なるFabフラグメントから成る人工的な形成物(二価もしくは三価の構成体など)を表すこととする。

【0009】

「抗原決定基」:

これは、抗原にある、抗体によって特異的に認識される分子構造である(「エピトープ」とも呼ばれる)。

【0010】

「IgY製剤」:

これは、卵黄から抽出された、さらに場合によっては精製された卵黄抗体(IgY)、IgYフラグメント、Fab構成体またはキメラ卵黄抗体のこととする。

【0011】

「シグナル物質」:

この語で、病理学的もしくは生理学的な所見の分析的判定、視覚的判定もしくは画像判定を可能にする全ての物質を意味することとする。

【0012】

「作用物質」:

この語で、治療に利用可能である全ての物質、例えば酵素、抗生物質、抗ウイルス剤および、毒素もしくは放射性核種といった細胞毒素、を表している。この場合、該作用物質が同時にシグナル物質の性質を満たすことは、ありえないことではない。

【0013】

「プロドラッグ」:

この語で、無傷の前駆体から体の中でその場で活性の作用物質に変換される全ての物質が表されることとする。

【0014】

「ブースター」および「追加免疫」:

SPFニワトリの免疫に関してこの2つの語が取り上げられる。ブースターは、最大のIgY力価を達成するのに用いられる。追加免疫は、再度の抗体曝露を意味し、この抗体曝露によって最大のIgY力価が産卵期間(Legperiode)の終わりまで持続される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

公知技術水準から、マウスからの単クローン抗体(マウスMAbs)またはヒトからの単クローン抗体(ヒトMAbs)を基礎とする免疫コンジュゲートが公知である。シグナル物質(色素、蛍光色素、診断用放射性核種)または作用物質(例えば毒素、治療用放射性核種、光増感剤、プロドラッグ)をこれら抗体に結合させるための数多くの方法が確立さ

10

20

30

40

50

れた。これによって、例えばE L I S A、R I A、蛍光顕微鏡検査、フローサイトメトリー (D u c h f l u s s z y t o m e t r i e)、シンチグラフィ、S P E C T (英語 : シングルフォトンエミッションコンピューテッドトモグラフィ (s i n g l e p h o t o n e m i s s i o n c o m p u t e d t o m o g r a p h y))、P E T (陽電子射出断層撮影) および光免疫診断 (P h o t o i m m u n d i a g n o s t i k) と いった検査ないしは例えば放射免疫療法、免疫毒素療法または光力学療法といった治療を実施することが可能である。

【 0 0 1 6 】

単クローン抗体の欠点にはとりわけ抗体の単一特異性があり、かつ単クローン抗体の比較的高費用でコスト集約的な開発および製造がある。大量生産は通常大きな発酵槽で行われなければならない、それというのも、マウスの腹水内での製造が一方で多くの国で広く禁止されているからである。

10

【 0 0 1 7 】

哺乳類 (ヒツジ、ウマ、ブタなど) および免疫になった / 感染した提供者からの多クローン性免疫血清 (例えば高い p 2 4 抗体力価を有する H I V 感染者の血液からの) は、種々の診断方法および受動免疫療法において重要である。この免疫血清の多クローン性は、複合抗原の改善されたターゲティングの見地に立って重要である。しかしながら、哺乳類または慣習的なニワトリの免疫血清は、定義づけが比較的不適切である多特異性抗体混合物を含有しており、その際、所望の特異性抗体は極めて僅かな部分を形成し、これに対して非特異性の、したがって望ましくない抗体が大部分を成す。哺乳類からの免疫血清の獲得は、動物保護の見地に立ってあまり是認することができず、したがってより多くの国で既に広く禁止されている。免疫血清をヒトの給血から獲得することは、費用が高く、危険がないということは決してなく (例えば H I V、H C V および場合によってはプリオンといった病原体の感染)、倫理的に問題があり、かつしたがって幅広い応用に対して実施可能ではない。

20

【 0 0 1 8 】

鳥類起源の多クローン抗体、特に卵黄抗体 (I g Y) は、公知技術水準で同様に公知である。I g Y は今日、さまざまな製造業者によって、インビトロ診断用に哺乳類からの免疫血清もしくは多クローン抗体に対する代替物として提供される。専門書にはこれについての例も、卵黄抗体をインビトロ診断に使用可能にするために、該卵黄抗体をビオチン、F I T C もしくはセイヨウワサビ (ホースラディッシュ) ペルオキシダーゼ (P O D) と結合させることができる (S C H A D E ら著、2001年 [1]) といったように記載されている。

30

【 0 0 1 9 】

常用のニワトリに由来する鳥類の抗体の経口使用も公知である。I g Y が哺乳類においては系統学的な距離ゆえに補体因子 C 1 にも F c 受容体にも結合せず、したがって哺乳類の防御システムと効果的に相互に作用することができないために、そしてまた一方で I g Y がアレルギー反応を引き起こすことがあるために、人間医学における非経口的な使用はこれまで幅広く排除されてきた。さらに、常用のニワトリの卵黄からの I g Y の製造はあまり効率的ではなく、かつ純度および親和性に関して質的に劣る生成物を生じさせるという事情がある。この理由は、常用のニワトリが他の刺激体に対する多数の非特異性抗体を産生し、したがって標的免疫原に対する応答が比較的弱くかつ短時間しか持続しないということである。したがって常用のニワトリの場合の I g Y 全体における特異性 I g Y の割合は、10% を大きく下回る (米国特許第 4 5 5 0 0 1 9 号明細書 ; H A N S E N ら著、1998年 [2] ; B O U H O U R S ら著、1998年 [3] ; G A S S M A N N ら著、1990年 [4]) 。

40

【 0 0 2 0 】

次の公知技術が、I g Y を用いた H I V 感染の受動免疫療法に関する独国特許 1 9 5 0 4 7 5 5 明細書に記載されている。この I g Y は、特定病原体除去 (S P F) ニワトリからの H I V コア抗原 p 2 4 および p 1 7 に対して向けられている。ヒト免疫血清を用いた受

50

動免疫療法も公知である。しかし、免疫血清および多クローン抗体に比べ I g Y は比較的容易にかつ安価に製造することができる。この S P F ニワトリは、実施例 2 に記載された免疫プロトコル下に基礎免疫およびブースターの後に第 16 月齢まで週に 5 ~ 7 個の卵を産む。この場合、経験によれば 1 個の卵黄が所望の特異性の I g Y を少なくとも 50 m g 含有しているので、S P F ニワトリの 250 ~ 350 個の卵から特異性 I g Y を約 15,000 m g 獲得できることが明らかである。さらに、S P F ニワトリへの負荷は、この動物のために規定された、種類相応の動物飼育ゆえに、従来の肥育鶏および産卵鶏の飼育の場合より極めてわずかである。このことによって、例えば従来のニワトリ飼育の場合には通常である、その中に 2 つの強制予防接種を含む 19 までの経済的に重大な意味をもつ伝染病に対する通常の能動免疫はもはや行われぬ。このことは、従来のニワトリの I g Y 10 製剤が劣っていることおよび、特異性 I g Y の単離が困難でありかつ価格を上昇させることの原因である。S P F ニワトリの飼育は、ヒト病原性細菌および家禽病原性細菌の無い状態で行われる。このような細菌を排除するために規則的な飼料、水および免疫状態の管理が実施される。該動物の S P F 状態を覆い隠さないようにするために、飼料への抗生物質の添加は不要である。

【0021】

医学的な見地から I g Y の利点は一般的に、特異抗原による複数の抗原決定基の認識にあり、このことにより標的抗原の改善されたターゲッティングが保証され、かつ、その免疫システムが抗原認識に関して哺乳動物およびヒトの免疫システムと異なる家禽に由来する抗体が重要であるという事実にある。このことは標的抗原のターゲッティングをも改善し 20、それというのも、鳥類の免疫システムが（系統的に条件付けられて）人間のヒト免疫システムと異なる抗原決定基を認識するからである。したがって鳥類の抗体は、エピトープを認識するのに、インビボで患者の本来存在する抗体と競合する必要があまりない。さらに、鳥類の抗体がヒトの補体システムとも、Fc 受容体、プロテイン A もしくはプロテイン G とも多くの場合に反応しないという、一般に欠点とされていることが本質的なものではなく、それどころか利点であることを証明することが可能である。

【0022】

したがって本発明の課題は、従来の免疫コンジュゲートに対する代替の生成物であって、診断への使用および治療への使用に適しており、その際、哺乳類からの単クローン抗体および免疫血清ならびに常用のニワトリからの I g Y 製剤を純度および抗原ターゲッティング 30 に関して優れている生成物を開発しかつ提供することである。そのうえ、ヒト抗 I g Y 抗体の形成はできるだけ回避されるべきであり、かつ、該免疫コンジュゲートは、動物保護に適合しかつ大量に安価に製造されることができなければならない。

【0023】

次に発明の説明のはじめに、例えば一貫して以下の発明の説明およびさらに特許請求の範囲において理解される更なる用語が定義されなければならない。これら用語は、本願の範囲内で他の意味を持たないものとする。

【0024】

「放射免疫コンジュゲート (Radioimmunokonjugat)」:

これは、本願の場合には、診断用および/または治療用放射性核種および/または増幅分子 (Verstaerker-Molekeuel) と結合しておりかつ核医学診断および/または放射免疫療法の分野に応用される、S P F 雌鶏もしくはトランスジェニック S P F 雌鶏に由来する I g Y 製剤の化合物のことである。 40

【0025】

「免疫毒素」:

これは、毒素 (植物性毒素、細胞増殖抑制剤、化学療法剤、抗生物質など) と結合しておりかつ免疫毒素療法の分野に応用される、I g Y 製剤の化合物のことである。

【0026】

「特異的ターゲッティング」:

これは、シグナル物質もしくは作用物質が免疫グロブリンによって所望の標的抗原に結合 50

される過程を表す。

【0027】

「プレターゲティング」：

本明細書では、他の生物種の別の抗体または他の適当な分子（本明細書ではさらに「増幅分子」という用語にまとめられる）が抗原結合部（Antigenbindung）とシグナル物質もしくは作用物質との間のなんらかの相に挿入されることによって、IgY製剤のシグナルもしくは作用物質の増幅を生じさせる使用のことである。

【0028】

「キメラ卵黄抗体」：

これは、

i) ニワトリのFabフラグメントがヒトIgGのFcフラグメントと生化学的に相互に結合されたヒト化免疫グロブリン、または

ii) IgYの定常領域についての遺伝子部分が多少とも完全にヒトIgGの定常領域によって置換されているトランスジェニックSPFニワトリのヒト化免疫グロブリン

を表す。

【0029】

「IgYコンジュゲート」：

この用語は、本明細書の場合には多クローン性IgY製剤（免疫成分）ならびにシグナル物質および/または作用物質（診断成分もしくは治療成分）および/または増幅分子から成る化合物を内容とする。

【0030】

上記課題は、本発明によれば、SPFニワトリの、好ましくはトランスジェニックSPFニワトリの、無傷の卵黄抗体（IgY）、IgYフラグメント、Fab構成体またはヒト化卵黄抗体からの多クローン性IgYコンジュゲートによって解決される。該抗体または該抗体フラグメントは免疫効果をもつ成分として、シグナル物質、作用物質または増幅分子でもよい少なくとも1つの別の成分と結合されているものとする。

【0031】

本発明は、本発明によるIgYコンジュゲートの、医学における診断的かつ治療的使用ならびに動物モデル（例えばマウス、ヒツジまたはヒトではない霊長類）における実験的使用に関する。該IgYコンジュゲートの使用は、非経口的適用に限定されておらず、使用目的に応じて外的適用（例えば黒色腫の場合）および経口的適用（例えば食道癌の場合）も含む。

【0032】

そのうえ本発明は、各成分の形での、標識セット（Markierungsbesteck）（いわゆるキット）の形での、またはすぐに使用できる製剤の形での、すぐに使用できる診断剤もしくは医薬品としてのIgYコンジュゲートのコンフェクションに関する。標的抗原として全てのタンパク質、ペプチド、糖タンパク質、核酸、多糖およびリポタンパク質が考慮の対象となる。本発明は、とりわけ腫瘍抗原、ホルモン、受容体タンパク質、RNA断片およびDNA断片、感染性病原体、プリオンまたはこれら標的抗原の抗原決定基の部分に対するIgYコンジュゲートに関する。この場合、本発明によるIgYコンジュゲートは、免疫に使用される抗原の複雑度に応じて多少とも多特異性のIgYを含んでいてもよい。

【0033】

本発明の別の側面は、

i) ビオチニル化IgYを標的抗原に結合させ、かつ標識化されたアビジンもしくはストレプトアビジンのための剤として使用するか、あるいは

ii) 結合されていないIgYを標的抗原に結合させ、かつヒト抗IgYコンジュゲートもしくはヒト化抗IgYコンジュゲートのための剤として使用する

プレターゲティング方法に関する。

(i) の場合にはビオチンとアビジンもしくはストレプトアビジンとの強い結合が利用さ

10

20

30

40

50

れ、そのためにI g Yコンジュゲート中のビオチン成分を増幅分子と呼ぶこともできる。

【0034】

そして本発明は、例えば外科的手術、化学療法剤、免疫調節剤およびパラ免疫誘導物質(Paraimmunitaetsinducer)との組合せといった、I g Yコンジュゲートの診断的および/または治療的性質を改善させる、本発明によるI g Yコンジュゲートの調製および使用にも関する。

【0035】

次に、本発明に直接関係している成分、その機能、作用様式および本発明によるI g Yコンジュゲートの使用の特性を詳細に示し、かつ溶液を詳細に示す。

【0036】

10

a) 免疫学的成分

本発明によればこの免疫学的に効果のある成分は、

(i) 無傷の卵黄抗体(I g Y)、I g Yフラグメント、F a b構成体、または
(i i) キメラ卵黄抗体、即ちトランスジェニックS P Fニワトリの卵に由来する生化学的にヒト化されたI g Yないしは好ましくは遺伝子工学によりヒト化されたI g Yから成る。この場合、F a b構成体は一価でも、二価でも、三価でもよく、かつ、単一特異的にも、二種特異的にも、三種特異的にも作用することができる(即ち1個、2個もしくは種々の3個の抗原決定基を認識する)。F a bフラグメントは、酵素的消化により得ることができる。キメラ抗体は、鳥類のフラグメントと他の生物のF cフラグメント(本明細書の場合には好ましくはヒトF cフラグメント)との結合によって得ることができる。超可変領域がニワトリのI g Yに由来しかつ全ての定常領域がヒトのI g Gに由来することにはかならないヒト化されたI g Yは、トランスジェニックニワトリにおいて得ることができる。キメラ抗体によって、I g Yに対する望ましくない抗体の形成が減少もしくは阻止されうるばかりではなく、ヒトのI g Gの定常領域の天然のエフェクターメカニズムを利用することもできる。

20

【0037】

b) シグナル物質

本発明によるI g Yコンジュゲートは、診断的成分として、例えば放射性核種(放出体、例えばテクネチウム 99m、インジウム 111、ヨウ素 123、ヨウ素 125、ヨウ素 131、タリウム 201、セレン 75、ガリウム 67、キセノン 133)、酵素(例えばペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびガラクトシダーゼ)、光増感剤(ポルフィリン誘導体など)または色素(例えば蛍光色素、コロイド金)といったシグナル物質を含有する。シンチグラフィ診断のために問題提起、投与経路、抗体の親和性および放射性核種に応じて10~1850 MBq(0.27~50 mCi)の放射能が必要である。詳細には、例えばヨウ素 131には37~370 MBq(1~10 mCi)(好ましくは37~74 MBq(1~3 mCi))、ヨウ素 123には185~370 MBq(5~10 mCi)、テクネチウム 99mには74~1480 MBq(2~40 mCi)(好ましくは74~740 MBq(2~20 mCi))、インジウム 111およびガリウム 67には74~185 MBq(2~5 mCi)、あるいはセレン 75には約10 MBq(0.27 mCi)が考慮の対象となる。

30

40

【0038】

c) 作用物質

本発明によるI g Yコンジュゲートは代替的もしくは付加的に治療的成分として放射性核種を含有していてもよい(放出体、放出体またはオージェ電子放出体)、例えばリン 32、ストロンチウム 89、イットリウム 90、ヨウ素 125、ヨウ素 131、サマリウム 153、エルビウム 169、レニウム 186、レニウム 188、K r 85、ホルミウム 166、アスタチン 211、ピスマス 212、ピスマス 213、ラジウム 224、アクチニウム 225。診断の場合と同様に、放射免疫療法の場合に必要な放射能は次のような多くの因子に依存する: 疾患の種類、罹患細胞の放射線感受性、治療すべき細胞の量、疾患の蔓延および分布パターン(Verteilung s

50

m u s t e r)、抗原発現、投与経路、抗体の親和性および放射性核種のエネルギースペクトル。したがって例えばヨウ素 131 の場合には 370 MBq ~ 11.1 GBq (10 ~ 300 mCi) の広い範囲内の放射能が考慮の対象となる。この放射能は通常1回で適用されるが、分割的に数週間から数か月(好ましくは3 ~ 6週間)のインターバルを置いてか、ないしは再発が生じた際に総線量 40 ~ 80 GBq (1 ~ 2 Ci) までで繰り返し投与することもできる。腫瘍特異性 IgY と細胞分裂抑制剤との結合は、従来の化学療法欠点を減少させることができる。腫瘍学の最大の問題に、ステージング検査の際に診断の正確さが制限されていること(特に、微小癌組織の転移の存在を証明もしくは排除することができる技術の不足)ならびに、その高い毒性と同時に低い特異性ゆえに細胞分裂抑制剤の治療の幅が僅かであることが含まれる。これらの要因から繰り返し繰り返し、治療手続きについての著しい不正確さが生じる。抗体によって媒介されかつ副作用のより少ない特異的な細胞性塞栓は、化学療法のための決定を容易にするであろうし、したがって費用にかかる、高価な、および/または負荷のかかるステージング検査を節約するのも助けるであろう。本発明の範囲内では卵黄抗体は、種々の細胞分裂抑制剤と結合させることもできる(例えばアルキル化剤、ピンカアルカロイド、挿入抗生物質 (i n t e r k a l i e r e n d e A n t i b i o t i k a)、代謝拮抗物質、タキソール)。本発明による IgY コンジュゲートは、治療効果のある成分として毒素を含有していてもよい(リシン A、アプリン、シュドモナス エキソトキシン、ジフテリア毒素、ゲロニンなど)。化学療法剤(細胞分裂抑制剤、抗生物質、抗ウイルス物質)、線維素溶解薬剤(例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、r t P A)、プロドラッグの活性化のための酵素(例えば、還元された葉酸塩および還元されていない葉酸塩の加水分解による分裂を触媒する細菌性カルボキシペプチダーゼ C P G 2) またはプロドラッグ自体は、本発明による IgY コンジュゲート中の治療的成分として適当である。そして本発明による IgY コンジュゲートは、光化学療法を用いて罹患細胞を狙いをつけて破壊することを可能にする光増感剤を作用成分として含有していてもよい。光増感剤は、例えばフォトフリンでもよいし、5 アミノレブリン酸でもよいし、フォスカン (F o s c a n) でもよい。

10

20

【0039】

d) 増幅分子

本発明による IgY コンジュゲートは、アビジンビオチン もしくはストレプトアビジンビオチン結合を基礎としてシグナルもしくは作用を増幅する(いわゆるプレターゲットィング) ために、診断的かつ治療的使用のためにビオチンを含有していてもよい。さらに IgY コンジュゲートのシグナルもしくは作用は、IgY 分子に結合させることができる更なる成分によって増幅することができる(例えば補体)。

30

【0040】

e) アジュバント、相補的措置

本発明による IgY コンジュゲートは、治療目的の最適化のために他の作用物質と有意義に結合させることができる。鳥類の抗体は、ヒト抗 IgY 抗体の形成を引き起こすことができる。IgY コンジュゲートの繰り返しの使用によって、その場合、診断もしくは治療に使用される抗体の中和が生じるか、あるいはそれどころかアレルギー反応が生じる。このことは、例えばシクロスポリンを用いた免疫システムのサブレーションによって阻止することができる。その一方で放射性ヨウ素の使用によって甲状腺の望ましくない放射線による負荷が生じる可能性がある。したがってこの場合には、甲状腺の機能を IgY ヨウ素 131 による放射免疫療法の前にヨウ化カリウムもしくは過塩素酸ナトリウムの投与によって遮断することが有意義である。さらに、ウイルス性感染の免疫療法の場合には遊離ウイルス粒子を IgY コンジュゲートが捕捉してしまい、すると該 IgY コンジュゲートは、ウイルスを複製する細胞の特異的ターゲットィングにもはや利用することができない。したがって、ウイルス複製を抗ウイルス作用もしくは抗レトロウイルス作用を有する1つ以上の化学療法剤を用いた前処理によって阻止すること、ならびに新たな抗体発現の場合によってはこの治療の一時的な中止によって開始もしくは誘発することは有意義である。さらにウイルス粒子の遊離は、細胞膜を安定させる剤(例えばインターフェロン)

40

50

によって阻止することができる。潜伏性ウイルス感染（例えばHIV もしくはEBV感染）の場合には他方では、感染された細胞の抗原発現を刺激する（例えばインターロイキン2の使用によって）か、またはIgYコンジュゲートの効果を他の抗ウイルス作用物質（例えばC型肝炎の治療の場合のインターフェロン および/またはリバビリン）によって高めることが必要となる場合がある。同様に細菌感染の治療の場合には、相補的に更なる作用物質（抗生物質）を使用することは、有意義である場合がある。これと同様に腫瘍の疾患の場合には、例えば放射免疫療法を細胞増殖抑制剤の添加によって補完するかあるいは、免疫毒素療法を局所的な体外放射線によって補完することが必要となる場合がある。ごく一般的に免疫調節剤もしくはパラ免疫誘導物質は、放射免疫療法、免疫毒素療法もしくは光力学療法の効果に有利に作用することもできる。

10

【0041】

f) 標識方法

マウス単クローン抗体およびヒト単クローン抗体の放射性標識には既に数年前から多くの確立された方法が利用されている（Peters JH, Baumgarten H (編): "Monoclonal Antibodies" Springer-Verlag 刊, Berlin 1992年）。金属の放射性核種、例えばテクネチウム 99m、インジウム 111またはアスタチン 211は、多くの場合、錯化剤、例えばジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）もしくはデフェロキサミン（DFA）、によってかまたは抗体のジスルフィド架橋の部分的な還元（例えば2メルカプトエタノールによる）によって安定的に抗体に結合される。多くの放射性ヨウ素アイソトープは、直接の求電子置換によって抗体の活性化芳香族基（とりわけチロシンのフェノール環）に結合させることもできる。ヨウ素陽イオンを得るための酸化剤として通常、ヨウ素酸カリウム（KIO₃）、溶解クロロミンTないしは、担体（例えばポリスチレン ビード）に結合したクロロミンT（ヨードビード）またはヨードゲン（1, 3, 4, 6 テトラクロロ 3, 6 ジフェニルグリコウリル（1, 3, 4, 6 - Tetrachlor - 3, 6 - diphenyl - glycouril））が使用される。各抗体は、少なくとも1つの放射性原子で標識されることができる。抗体の特異的結合能が損なわれることなく、より高い比放射能を達成するために、コンジュゲーションを標的抗原の存在下に行うことができ、次にこの標的抗原は元通り分離され、このことによって超可変領域の範囲内での放射性核種の結合が妨げられる。蛍光色素、光増感剤、細胞増殖抑制剤、毒素は、抗体のアミノ基との反応に基づく方法で、また部分的には市販のスペーサーを介してかまたは抗体中へのSH基の導入によって、抗体に結合することができる。他の方法は、抗体の分割および、シグナル物質もしくは作用物質が結合することができるSH基の遊離に基づいている。そのうえ、抗体の炭水化物基は、過ヨウ素酸塩で酸化することができ、これによりアルデヒド基が生じ、このアルデヒド基を介してシグナル物質および作用物質を結合させることができる。そして作用物質を有する二価および三価のFab構成体は、該分子の1つもしくは2つのFabフラグメントに結合されることができかつこの遊離Fabフラグメントを介して標的抗原に結合することができる。

20

30

【0042】

g) コンフュクション

本発明の範囲内では放射免疫コンジュゲートのために、IgY製剤を有する標識セット（製剤キット）を提供することができ、その結果、この放射免疫コンジュゲートは使用者によってその場でしばしば短寿命の放射性核種で標識されることができる。著しく長い半減期の場合には、放射性核種と結合したIgY製剤（即ち完成した放射免疫コンジュゲート）を使用者に直接提供することもできる。標識セットないしは完成した製剤の場合にはIgY製剤または完成した放射免疫コンジュゲートは、適当な添加剤（例えば安定剤）を含有する、場合によっては適当な緩衝液（好ましくはPBS、pH 7.4）中の、無菌の等張の注射液として、さらに適当な包装（場合によっては+4 ~ 20 で冷却された、場合によっては鉛容器中の、プラスチック / ガラスアンプル、突刺し（Durc h s t e c h f l a s c h e））に入れられて、存在する。標識セットの場合にはIgY製剤は、こ

40

50

の第1のアンプル/突刺し栓瓶)中に入れられており、第2のアンプル/突刺し栓瓶中には還元剤(例えばテクネチウム 99mを用いた標識の場合)ないしは酸化剤(例えばヨウ素 131を用いた標識の場合)が入れられている。放射免疫コンジュゲートの精製のために各標識セットはカラムクロマトグラフィー カラムを含んでいてもよく、かつ、品質管理のために例えば薄層クロマトグラフィー セットを含んでいてもよい。必要に応じて標識セットは、1つもしくは同時にいくつかの使用のためのIgY製剤または完成したIgYコンジュゲートを含むことができる。

【発明の効果】

【0043】

本発明によれば次の使用分野および応用が想定されている。

10

a) 一般使用分野: 本発明によるIgYコンジュゲートは、多くの抗原と次のとおり反応することができる。即ち、生理的分子と、腫瘍特異性抗原と、感染性病原体およびその抗原と、プリオンと、ならびにRNA断片もしくはDNA断片またはこれに会合した分子と反応することができる。シグナル物質もしくは作用物質(放射性核種、酵素、線維素溶解薬剤、色素、光増感剤、毒素)に応じて、本発明によるIgYコンジュゲートは、腫瘍、感染、凝固障害および自己免疫疾患のインビトロおよびインビボの診断および/または治療に使用することができる。

【0044】

b) 生理的標的抗原: 本発明によるIgYコンジュゲートのための標的として考慮の対象となる生理的分子には、CD分類に相応する白血球抗原(NK細胞の抗原、B細胞抗原、骨髄性抗原、抗原前駆体(Progenitor antigene)、活性化抗原、接着分子、サイトカイン受容体)、ならびに細胞内分子(例えばサイトケラチン)、受容体(アンドロゲン、エストロゲン、ドーパミン D2 もしくはソマトスタチン受容体など)または例えば凝固因子(例えばフィブリンまたはプラスミノゲン)が含まれる。

20

【0045】

c) 病原性標的抗原: IgYコンジュゲートのためのターゲットとして考慮の対象となる腫瘍特異性抗原には同様に特定の高発現白血球抗原(例えばCD20、CD22)、高発現アンドロゲン もしくはエストロゲン受容体、カルシトニンおよびチレオグロブリンが含まれるが、狭い意味において腫瘍マーカー、例えばEgp34、Ca15₃、シアリル Lea 抗原、BCA225、黒色腫関連抗原(MAA)、CEA、17_{1A}、PAP、ニューロン特異エノラーゼ(NSE)、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)、プロモデオキシウリジン(BrdU)、Ki₆₇、PCNA、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)および変異p53も含まれる。本発明によるIgYコンジュゲートのためのターゲットとなりうる感染性病原体には、細菌(バチルス・アンスラシス(Bacillus anthracis)、ボレリア菌(Borrelia)、ブルセラ菌(Brucella)、ミコバクテリア(Mycobacterium)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、サルモネラ菌(Salmonella)、ぶどう状球菌(Staphylococcus)、トキソプラズマ・ゴンディ(Toxoplasma gondii)、トレポネーマ(Treponema)、トリパノソーマ(Trypanosoma)、ウイルス(HIV₁、HIV₂、HTLV₁、HTLV₂、HCVおよび他のフラビウイルス、HBV、EBV、HSV、HHV₈、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、風疹ウイルス、パピローマウイルス、デングウイルス、ハンタウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、フィロウイルス)、原生動物(プラスモディウム属(Plasmodium)、トキソプラズマ属(Toxoplasma)、アカントアメーバ(Acanthamoeba)、マイコプラズマ属(Mycoplasma)、菌類(カンジダ(Candida)、アスペルギルス(Aspergillus)、寄生虫(カイチュウ、エキノコックス(Echinococcus)、リーシュマニア(Leishmania)、ロア・ロア(Loa Loa)、オンコセルカ・ウォルウルス(Onchocerca volvulus)、マンソネラ(Mansonella)、ブルギ

30

40

50

ア属系状虫 (*Brugia-Filarien*)、キスチケルクス (*Cysticercus*)、住血吸虫属 (*Schistosoma*)、バンクロフト系状虫) および感染粒子 (プリオン) が含まれる。感染性病原体の抗原決定基は、例えば、EBV 関連抗原 (EBNA 1 3、LMP 1 2) の発現が特徴であるパーキットリンパ腫、鼻咽腔癌、ホジキン病、T細胞性リンパ腫および免疫芽球性リンパ腫において、HHV 8 にも関連するカポジ肉腫および AIDS 関連リンパ腫において、あるいは HTLV 1 感染に関連する成人 T細胞白血病 (ATL) において、あるいは、HPV に関連している可能性がある生殖器癌において腫瘍の診断および/または治療の際にも、本発明による IgY コンジュゲートのためのターゲットとして役割を果たすことができる。

【0046】

d) 投与形態：必要に応じて、本発明による IgY コンジュゲートは、インビトロでもインビボでも投与することができる。この投与はインビボの場合には、(例えば光力学療法の分野では) 外的もしくは経口的に、ならびに (例えばシンチグラフィ、SPECT、放射免疫療法または免疫毒素療法では) 非経口的に行うことができる。非経口という用語には、本明細書の場合には静脈内、動脈内、皮下、皮内、髄腔内、間質、腔内および病変内 (*intralaeionale*) もしくは腫瘍内の投与経路が含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0047】

次に本発明を詳細な実施例につき詳しく図解しかつ説明する。図面および記述から認めることができる特徴は、本発明の他の実施の形態にそれぞれ単独で適用することもできるし、いくつかを任意に組み合わせて適用することもできる。次の適用および実施方法は実施例を示しているにすぎず、これらの実施例とて、SPFニワトリを基礎とする本発明による IgY コンジュゲートのもつ可能性を余すところなく示すことは決してできない。したがって当業者は、本発明の特許請求の範囲に属する更なる実施および適用を導き出す。

【実施例 1】

【0048】

本発明による IgY コンジュゲートの製造のために SPFニワトリもしくはトランスジェニック SPFニワトリを好ましくは第 14 週齢時に標的抗原ないしは該標的抗原のフラグメント 50 ~ 1000 μg (好ましくは 50 ~ 200 μg) および完全フロインドアジュバントを用いて皮下ないしは (好ましくは) 筋肉内により免疫にする。その後で産卵期間のほぼ全体にわたって分散させて、最大の IgY 力価を達成するまでの 3 回のブースターならびに最大の IgY 力価を維持するための 3 回の追加をそれぞれ同じ抗原 50 ~ 1000 μg (好ましくは 50 ~ 200 μg) および不完全フロインドアジュバントを用いて行う。注射液は、例えばそれぞれ抗原懸濁剤 1 ml およびアジュバント 0.5 ml を含有する。それに従って SPF 状態のニワトリのための有利な免疫計画は、例えば次のような時間経過となる：

0 日 *	=	第 1 免疫 (基本免疫)	筋肉内注射	
28 日	=	第 2 免疫 (第 1 ブースター)	筋肉内注射	
56 日	=	第 3 免疫 (第 2 ブースター)	筋肉内注射	IgY 獲得
84 日	=	第 4 免疫 (第 3 ブースター)	筋肉内注射	IgY 獲得
168 日	=	第 5 免疫 (第 1 追加)	筋肉内注射	IgY 獲得
252 日	=	第 6 免疫 (第 2 追加)	筋肉内注射	IgY 獲得
336 日	=	第 7 免疫 (第 3 追加)	筋肉内注射	IgY 獲得
490 日	=	IgY 獲得のための利用の終了		

* = 第 14 週齢

SPF 条件下で飼育されたニワトリの卵を 12 ~ 14 か月の期間にわたって集めかつ処理することができる。卵黄を先ず卵白から分離し、かつ、Schadeら著 (「Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application」Springer-Verlag 刊、Berlin 2001 年 [1]) による標準方法で処理することができる。SPFニワトリの決定的な利点は、該動

10

20

30

40

50

物がそのSPF雌鶏からの血統とSPF条件下での飼育ゆえに免疫や固有の感染性疾患によって免疫学的にあらかじめ負荷されていないことである。したがって該動物は、該動物を免疫にした抗原に対して特に強い免疫応答で反応し、その結果、特異性抗体の割合が、従来のニワトリの免疫の場合に比べ何倍も高くなる（特異性IgY50～90%）。さらに該動物の場合にはブースター後の特異抗原の高い力価を数回の追加免疫によって第16月齢まで安定して維持することができる。このことは、本発明によるIgYコンジュゲートにとって本質的に重要であり、それというのも、特に高い親和性の抗体が形成される形でリンパ球集団が免疫記憶の繰り返される刺激によって変化することが十分に証明されているからである。したがってSPFニワトリの卵からのIgY製剤は、特異抗原に対する親和性に関しても従来のニワトリからのIgY製剤と異なる。より低い抗体の超可変領域の構造に比べより良好に抗原に適合するこの抗体の超可変領域の構造によってより高い親和性が分子レベルで生じている。したがってSPFニワトリからの本発明によるIgYコンジュゲートは、最終的に分子レベルで（即ち該IgYコンジュゲートの超可変領域の特別な構造によって）再現可能に、従来のニワトリからのIgYコンジュゲートと異なる。

10

20

30

40

50

【実施例2】

【0049】

この実施例にはトランスジェニックニワトリからのヒト化IgYの製造が記載されている。トランスフェクションは、例えば米国特許第5162215号明細書、米国特許第6020465号明細書および国際公開第00/75300号パンフレットに記載されている自体公知の方法で行うことができる。このトランスフェクションは、雄鶏の精子への顕微注射によって行うこともできる。次に人工受精によって形質を卵細胞内に導入しかつ子へとさらに渡す。代替的にこのトランスフェクションを精子のレトロウイルス感染によって行うことができる。その際、複製能欠損レトロウイルスがFcフラグメントのためのヒト遺伝子を有する。SPFニワトリの免疫グロブリン遺伝子座への定常ヒトIgGドメインの遺伝子断片の統合を相位的組換えによって行う。ヒト「ノックイン」遺伝子ターゲティングベクターはとりわけ、置換すべき遺伝子のエキソン、選択マーカー（例えばネオマイシン耐性）、定常ヒトIgG領域のエキソンおよびプロモーターについて相同である配列を有する。一時的なCreリコンビナーゼの発現によってネオマイシンおよびチミジンキナーゼカセットの欠失ならびに定常の鳥類のIgY領域の欠失が起こる可能性がある。このようにしてトランスジェニックニワトリが得られ、該ニワトリはヒト化IgYのためのその遺伝子を生殖細胞系を介してその子へとさらに渡す。トランスジェニックニワトリの選択は、ニワトリの血液中または卵中でのヒト定常領域を有するIgYの検出によって行うことができる。ヒト化抗体の検出にはELISA、ウエスタンブロット法またはPCRが適当である。

【実施例3】

【0050】

無傷の抗体によって、血液からの該抗体の緩慢な消失（HWZ：1～3日間）ゆえに免疫シンチグラフィの場合に、示すべき病変と背景との最適なコントラストが得られるまでのしばしば長い検査時間が得られる。治療的使用の場合には、無傷の抗体が充実性腫瘍中または血液脳関門の向こう側に達しにくいことにむしろ問題がある。このような理由から、Fabフラグメントを基礎とするコンジュゲートによって一定の状況の中で決定的な利点を得られる。Fabフラグメントの製造のためにSPFニワトリもしくはトランスジェニックSPFニワトリを実施例1に記載したように標的抗原ないしは該標的抗原のフラグメント50～1000μg（好ましくは50～200μg）を用いて免疫にする。卵を上記のとおり処理し、かつIgYを特異抗原（標的抗原）でのアフィニティークロマトグラフィーにより単離する。無傷の抗体を次に酵素的に、例えばペプシンを用いてヒンジ領域の範囲内で分離し、その結果、FabフラグメントとFcフラグメントとが得られる。特異性Fabフラグメントを特異抗原でのアフィニティークロマトグラフィーによりFcフラグメントおよび非特異性Fabフラグメントから分離かつ単離することができる。このようにして得られた特異性Fabフラグメントを除菌する。該特異性Fabフラグメン

トを臨床的な使用に、第2の突刺し栓瓶の中に標識用の還元剤が入れられた標識セットの形で、短寿命の診断用の放射性核種（例えばテクネチウム 99m）とのコンジュゲーションのために提供することができる。放射免疫コンジュゲートをより長い寿命の診断用もしくは治療用の放射性核種（例えばヨウ素 131）を用いて製造業者のもとで集中的に標識することもでき、かつさらに販売することもできる。この場合には使用者への発送は、放射性核種の崩壊および抗体の解離による製品の品質の損失を最小にとどめるために、現行の放射線防護基準に従って標識の日のうちに行う。集中的な標識は、IgY製剤を化学療法剤、毒素、蛍光色素、線維素溶解薬剤、酵素またはプロドラッグと結合する場合にも可能である。

【実施例4】

10

【0051】

不明瞭な品位の放射線医学的な病巣は、今日では顆粒球シンチグラフィを用いて鑑別診断的に明瞭にすることができる。目下使用されているマウス単クローン抗体は、前骨髄球、骨髄球および顆粒球に発現した非特異性交叉反応性抗原を認識し、NCA 95 (= CD66b) も NCA 90 (= CD66c) も認識しない。該マウス単クローン抗体を診断用の放射性核種（放出体）で標識し、静脈内投与する。血液中および炎症病巣において該マウス単クローン抗体は顆粒球に結合する。このようにして炎症プロセス、例えば骨髄炎、シンチグラフィにより検出することができる。本発明による放射免疫コンジュゲートの製造のためにSPFニワトリをNCA 90もしくはNCA 95ないしはこれらのフラグメントで、実施例1に記載されているように、免疫にしかつブスターを行う。NCA 90もしくはNCA 95 特異性のIgYを再度NCA 90もしくはNCA 95でのアフィニティークロマトグラフィーにより単離する。次にこの無菌のIgYを、例えば等張NaCl中にIgY 1mgと還元剤が入れられた第2の突刺し栓瓶とを含む標識セットとして、テクネチウム 99mを用いた標識用に市場に出すことができる。使用者によってその場で調製された抗NCA IgY Tc 99mは、一緒に提供されている前記カラムを用いて結合していない放射性核種を分離除去しかつ高速液体クロマトグラフィー（HPLC）もしくは好ましくは薄層クロマトグラフィー（TLC）による最終産物の放射化学的純度についての最終的な品質管理した後に、静脈内投与することができる。1つの抗原決定基を認識しかつ結合することしかできない従来の単クローン抗体と異なり、多クローン性の卵黄抗体を用いてNCA 95もしくはNCA 90の異なる抗原決定基を同時に認識し、そのことにより、バックグラウンドに対してより高い特異的なアップテークを伴った、より良好なイメージが得られる。

20

30

【実施例5】

【0052】

IgYコンジュゲートをセンチネルリンパ節の検出に使用することもできる。例えば悪性黒色腫、乳癌もしくは前立腺癌の場合に行われる広範囲にわたるリンパ節切除は、通常、高い罹患率を伴う。したがって腫瘍の流出範囲に存在するリンパ節への転移の検出は、治療の手続きにとって最高に重要な情報である。これまでこの検出は、Tc 99m標識コロイド状ヒト血清アルブミンを用いて行われるかまたはTc 99m ナノコロイドを用いて行われる。粒径は、直径100~1000nmである。ラジオコロイドの腫瘍周囲の（peritumoral）注射後に通常、注射後（p.i.）15分間~約6時間にわたり3回の連続した平面的撮影をガンマカメラにて行う。この方法の欠点は、粒径および欠如した腫瘍特異性にある。このことによって、一方では注射箇所放射能の大部分が残留しかつセンチネルリンパ節の表示がブルーミングによって困難になる。したがってまたもう一方ではリンパ節が、その罹患が証明されることなく表示される。これに対して同様の方法でリンパ球特異性ないしは腫瘍特異性の放射免疫コンジュゲートを使用すると、これら欠点が部分的もしくは全体的に回避される。溶解したIgYもしくはFabコンジュゲートはリンパ管を経てコロイド状アルブミンより速く流れるので、その結果、残留放射能が注射箇所に残るのはわずかであり、これによりセンチネルリンパ節がさらに強く表示される。そのうえ、抗体がリンパ節内で特異的にリンパ球ないしは転移した腫瘍に結

40

50

合することによって特異的な表示が得られる。これらリンパ節は手術中に適当なガンマプローブ (Gamma sonde) を用いて狙いをつけて探し出しかつさらに切除することもできる。センチネルリンパ節の表示に対して代替的もしくは付加的に、診断用に使用される I g Y コンジュゲートまたは第 2 の I g Y コンジュゲートが治療用放射性核種 (例えば I 131) または毒素 (例えばタキソール) を有する場合には、リンパ節ないしはリンパ節転移の十分に選択的な照射または化学療法を行うことができる。黒色腫のリンパ節転移の検出は、p 210、黒色腫関連抗原 (M A A)、に対する放射免疫コンジュゲートによって行うことができる。本発明による放射免疫コンジュゲートの製造のために S P F ニワトリを実施例 1 と同様にして p 210 50 ~ 1000 μ g (好ましくは 50 ~ 200 μ g) を用いて免疫にする。I g Y を卵黄から単離する。精製した I g Y を次に除菌することができ、さらに凍結乾燥してもよいし、無菌かつ等張の P B S (p H 7.4) 中に懸濁させてもよい。この市販の製剤キットには例えば第 1 の突刺し栓瓶の中に特異性 I g Y 100 mg が含まれ、かつ第 2 の突刺し栓瓶の中に T c 99 m での標識のための還元剤が含まれる。計画した検査の直前に I g Y 製剤を T c 99 m 10 ~ 1000 M B q (好ましくは 20 ~ 100 M B q) と結合させる。本発明による放射免疫コンジュゲートの腫瘍周囲の注射後に通常、注射の 24 時間後まで (好ましくは注射の 3 ~ 6 時間後に平面的撮影を 3 面でガンマカメラで行いかつ場合によっては関連する領域の補足的な S P E C T を行う。さらに関連するリンパ節を引き続き手術中に適当な携帯測定器 (H a n d m e s s g e r a e t) を用いて検出することができかつ狙いをつけて切除することができる。

10

20

【実施例 6】

【0053】

神経内分泌腫瘍の診断を放射免疫コンジュゲートを用いたシンチグラフィにより行う。褐色細胞腫、神経芽細胞腫、カルチノイドおよびパラガングリオーマは、全ての生物にわたり分布している神経内分泌系 (A P U D 系) の細胞から成る。したがってこれら細胞は一般的にソマトスタチン受容体を有し、このソマトスタチン受容体によってこれら細胞がインジウム 111 標識オクトレオチド (ソマトスタチン類似化合物) を用いてシンチグラフィにより表示されることができる。しかしながら、ソマトスタチン類似化合物は受容体に 1 : 1 の比でしか結合しない。これに対して多クローン性 I g Y は、受容体のいくつかの抗原決定基を認識する。このことから、より良好なターゲティングとより感度の高い画像診断が得られる。ソマトスタチン受容体に対する I g Y 製剤の製造のためにまたもや S P F ニワトリを実施例 1 と同様にして免疫にする。この特異性 I g Y は、実施例 3, 4 もしくは 5 の場合と同様に標識セットの形で提供することができる。この場合、該特異性 I g Y は使用者によりその場で 放出体 (例えばテクネチウム 99 m) で標識することができる。特異性 I g Y T c 99 m (10 ~ 1000 M B q、好ましくは 50 ~ 200 M B q) 100 mg の静脈内投与の 1 ~ 24 時間後に平面的撮影を 2 面で実施しかつ場合によっては S P E C T を実施する。手術中にしばしば発見しづらい神経内分泌腫瘍は、引き続いての手術の際に適当なプローブを用いて容易につきとめることができ、さらに切除することができる。

30

40

【実施例 7】

【0054】

放射免疫コンジュゲートのさらなる使用は、非ホジキンリンパ腫の治療である。悪性の低い非ホジキンリンパ腫には化学療法が効きづらい。放射免疫療法がこの場合には特に効果があることが判明している。たいていの研究の場合にはヨウ素 131 で標識されたマウス単クローン抗体が C D 20、全ての B 細胞性リンパ腫の 95% の細胞表面に発現される抗原、に対して使用されてきた。しかしながら単クローン抗体は、この抗原の 1 つの抗原決定基しか認識しない。したがって結合比は、1 : 1 でしかない。これに対して、より良好なターゲティングが、抗原のいくつかのエピトープを同時に認識する C D 20 特異性 I g Y で達成することができる。このことにより骨髄の放射線被曝も少なくなり、かつ、骨髄移植が必要とされることがなく、より高い放射線量を適用することができる。放射線

50

量の削減は、アビジン もしくはストレプトアビジン標識された単クローン抗体および放射能標識されたビオチンを用いたプレターゲティング方法によって達成することもできる。同様に保護が請求されるプレターゲティングによって、当然のことながら、I g Yを用いた放射免疫療法の治療効果もがいま一度改善されることができ。このためにS P FニワトリをC D 2 0 5 0 ~ 1 0 0 0 μ g (好ましくは5 0 ~ 2 0 0 μ g)を用いて実施例1と同様にして免疫にする。約1 2 ~ 1 4 か月の産卵期間にわたって卵が得られ、この卵からI g Y全体を単離しかつC D 2 0にてアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。プレターゲティングのために特異性I g Yを除菌し、アビジン(もしくはストレプトアビジン)と結合させ、かつ凍結乾燥させるか、または場合によっては更なるアジュバントとともに等張N a C l (場合によってはP B S、p H 7 . 4)中に溶解する。この標識セットにはこの場合には好ましくは、I g Y アビジン コンジュゲート(1 0 0 μ g ~ 5 m g、好ましくは1 m g)が入った突刺し栓瓶、凍結乾燥もしくは溶解された形のビオチン(1 ~ 1 0 0 0 μ g)が入った第2の突刺し栓瓶および、酸化剤(例えばヨードゲン)が入った第3の突刺し栓瓶が、ヨウ素 1 3 1 (1 ~ 4 G B q)による標識のために含まれており、そのうえ、クロマトグラフィー カラムおよびT L Cキットといった更なる補助手段が含まれている。代替的にビオチンは、製造業者のもとで集中的に標識されてもよく、かつI g Y アビジン コンジュゲートと一緒に出荷されてもよい。治療に際し、リンパ球を標識するために、先ずI g Y アビジン コンジュゲートを静脈内投与する。数日後までにヨウ素 1 3 1 標識ビオチンの静脈内投与を行う。代替的に放射免疫療法を 放出体、例えばアスタチン 2 1 1を用いて実施してもよい。

10

20

【実施例8】

【0055】

全ての乳癌の約半分がエストロゲン受容体を有しかつホルモン依存である。したがってエストロゲン受容体に対する卵黄抗体は、該受容体へのエストロゲン結合を競合的に阻止できるだけではない。放射免疫コンジュゲートとして該卵黄抗体は、転移の表示と内部放射線療法ともにも適当である。S P Fニワトリの免疫のために、エストロゲン受容体の細胞外抗原決定基を有するペプチドを使用する。S P Fニワトリの免疫ならびに卵の処理およびI g Yの精製は実施例1に従って行うことができ、コンフュクショニングはその他の上記実施例に従って行うことができる。

【実施例9】

【0056】

市販の抗体、例えばU R O 7は、腎細胞癌を認識しかつ健康な腎臓組織には結合しない。したがって腎細胞癌およびその転移を狙いをつけて放射免疫コンジュゲートを用いて検出および/または処置することができる。適当な抗原を確認するためにタンパク質を、均質化した腎細胞癌細胞から電気泳動により分離かつ単離する。S P Fニワトリを該抗原を用いて免疫にし、かつ、獲得された卵黄抗体を腎細胞癌細胞および生理的組織を用いて特異性および交叉反応性について検査する。悪性細胞のみを認識する選択された抗体を治療用の放射性核種、例えばヨウ素 1 3 1、または細胞毒素、例えばリシンA、と結合させかつ治療に使用する。

【実施例10】

【0057】

放射免疫コンジュゲートの別の使用は、H I V感染の治療にある。H I V感染の場合にはレトロウイルスのゲノムが宿主細胞の染色体の中に導入される。従来の複製抑制ではH I V感染を治療することはできない。H I Vを複製する宿主細胞は、次にH I V構造タンパク質(p 2 4、g p 1 2 0およびg p 4 1)をその細胞表面に発現させる。この構造タンパク質に対する抗体はこれら細胞を認識しかつ該細胞に結合する。該抗体は放射性核種または他の細胞毒素と結合している場合には、該抗体はこれら細胞および、ひいてはH I Vの産生箇所を狙いをつけて破壊することができる。該細胞の効果的なターゲティングの前提条件は、血液中の遊離ウイルスの数を例えば、抗レトロウイルス剤を用いた相補的な複製抑制によって減少させることである。これによって、H I V感染を効果的に治療する

30

40

50

新たな可能性が与えられる。冒頭に記載した理由から、SPFニワトリの特異性IgYからの多クローン性コンジュゲートの使用は、例えば独国特許第19809785号明細書に記載されている単クローン抗体に比して利点を有する。抗体を得るためにSPFニワトリをHIV p24、HIV 1 gp120もしくはHIV 1 gp41を用いて実施例1と同様にして免疫にする。約12~14か月の産卵期間にわたって、限定された条件下で飼育されたSPFニワトリの卵を集める。卵黄を卵白から分離し、さらにIgYを常法に従って単離する。HIV特異抗体を、特異抗原でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、その結果、非特異性IgYが分離される。無菌のIgY製剤を治療用の放射性核種（例えばヨウ素131もしくはアスタチン211）と結合させる。通常、例えば1回の治療的使用につき特異性IgY100 μ gをヨウ素131 1~4GBqで標識する。HIV感染の場合にはとりわけ、感染した細胞の比較的少ない数（リンパ腫の場合の悪性の変質細胞の数に比して）ゆえに既にかなりわずかな放射能で治療的に効果があることが証明されることが可能である。標識は、種々の確立されている方法で行うことができる。したがってIgYヨウ素131は、好ましくはヨードゲン法によって製造することができる。放射免疫コンジュゲートのコンジュゲーション後の収量ならびに、結合していない放射性核種の分離除去後の放射免疫コンジュゲートの純度は、HPLCもしくはTLCを用いて管理することができる。無菌条件下で製造され、および/または除菌された放射免疫コンジュゲートは、等張溶液として注入することができる。

【実施例11】

【0058】

さらにIgYコンジュゲートは、自己免疫疾患の治療に使用するものとする。CD4陽性T細胞は、自己免疫疾患の病因において、かつ器官の移植後の拒絶反応において重大な役割を果たす。CD4受容体に対する単クローン抗体は、クローン病(M. Crohn)、エリテマトーデス、リウマチ様関節炎の場合には、およびマウスにおける皮膚移植後では、しかしながら臨床的にはわずかな効果しか示さない。CD4陽性細胞の有効な消失を起こすために、該抗体を治療用の放射性核種、細胞増殖抑制剤もしくは毒素と結合させることができる。SPFニワトリを実施例1と同様にしてCD4もしくはCD4フラグメントに対して免疫にし、IgY全体を卵黄から単離し、そしてCD4特異性IgYをCD4にてアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。場合によっては抗体を酵素により切断し、そして鳥類のFcフラグメントをヒトFcフラグメントで置換する。その際、IgY製剤は、（好ましくは静脈内での）臨床的使用にコンジュゲーションされていないともよいし、あるいは本発明によるIgYコンジュゲートとして、放射性核種で標識された形で販売されてもよい。

【実施例12】

【0059】

血栓症の治療のためのIgYコンジュゲートの使用は、さらなる応用を示している。血栓症は、一般的に、全身投与される線維素溶解薬剤（ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼもしくはrtPA）で処理される。ストレプトキナーゼは、生体に特有のプロテアーゼによって素早く分解される。これに対してウロキナーゼおよびrtPAは、肝臓内で迅速に代謝される。したがって、線維素溶解薬剤を血栓に固定することが重要である（Bodeら著「J Biol Chem」1989年；264（2）：944~8；Lijnenら著「Thromb Res」1990年；57（3）：333~42）。SPFニワトリもしくはトランスジェニックSPFニワトリをヒトフィブリンに対して、実施例1に記載された方法で免疫にする。特異性IgYを単離しかつ精製する。場合によっては該抗体を酵素により切断し、そしてFcフラグメントを分離除去する。無傷の抗体またはFabフラグメント（5~50mg）を次にrtPA（5~50mg）と好ましくは1:1の比で結合させる。このIgYコンジュゲートは、凍結乾燥させてかもしくは注射目的のために無菌溶液中で、適当な包装サイズで、深大腿静脈血栓症（tiefe Beinvenenthrombose）、肺動脈塞栓症、脳血管障害（cerebrovasculäre Insulte）または心筋梗塞の治療用に提供することができる。代替的

にSPFニワトリの第2グループをrt PAに対して(好ましくは活性部位の外側の領域)免疫にしてもよい。第1のグループのFabフラグメントを第2のグループのFabフラグメントとハイブリッド形成させてもよい。このようにしてフィブリン特異性の二価のFab構成体を得ることができ、このFab構成体には1本の腕を介してrt PAが結合している。

【実施例13】

【0060】

光力学的な診断もしくは療法のためにIgY製剤を光増感剤と結合させる。光力学療法は、とりわけ表皮癌および粘膜癌、カポジ肉腫および黒色腫の治療のための最小限に侵襲的な方法である。この方法は、感光物質による腫瘍選択性の強化に基づいており、これら感光物質はその光力学的効果(蛍光ないしは細胞を損傷させるラジカルの形成および腫瘍の血管形成の破壊)を光の吸収によって発揮する。光力学的療法の成果は、悪性組織および健康な組織の中での光増感剤の相対的分布に決定的に左右される。腫瘍細胞への光増感剤の固定は、例えば食道癌または悪性黒色腫の場合に腫瘍特異性の抗体によって著しく強化することができる。この場合、適当な光源を用いて診断もしくは治療を行うことができる。診断的な使用の場合には悪性の変質した細胞の固有の蛍光が紫色光線下に生じる。光力学的療法の場合には悪性の変質した組織が赤色光線の作用下に壊死する。

文献：

[1] Schadeら著：「Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application」Springer Lab Manual、Berlin 2001年)；

[2] Hansenら著、「J Immunol Methods」1998年、215(1~2)：1~7；

[3] Bouhoursら著、「Glycoconj J」1998年、15(1)：93~9；

[4] Gassmannら著、「FASEB J」1990年、4(8)：2528~32

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1a】図1aはニワトリのIgYを示す。

【図1b】図1bはヒトを含む哺乳類のIgGを示す。

【図2】図2は無傷のIgYを基礎とする放射免疫コンジュゲートを示す。

【図3】図3は一価のIgY Fabフラグメントを基礎とする放射免疫コンジュゲートを示す。

【図4】図4は二価のIgY F(ab')₂フラグメントを基礎とする放射免疫コンジュゲートを示す。

【図5】図5は相互に結合されたIgY Fabフラグメント(三価のFab構成体)を基礎とする放射免疫コンジュゲートを示す。

【図6】図6はヒト化IgY(IgY Fab + ヒトFc)を基礎とする放射免疫コンジュゲートを示す。

【図7】図7は無傷のIgYを基礎とする免疫毒素を示す。

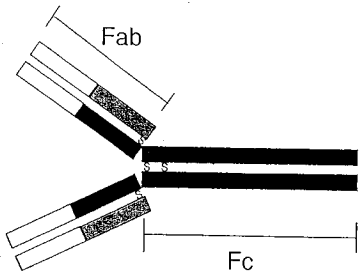
10

20

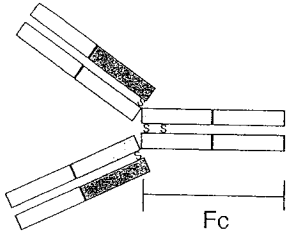
30

40

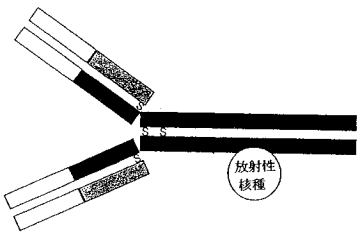
【 図 1 a 】



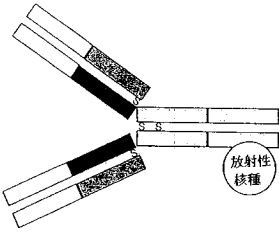
【 図 1 b 】



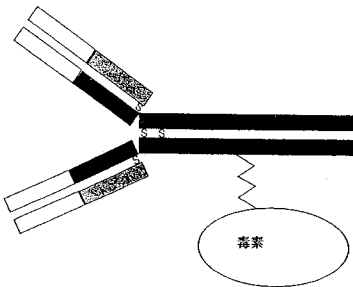
【 図 2 】



【 図 6 】



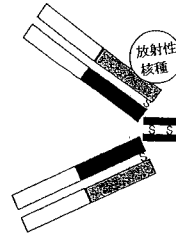
【 図 7 】



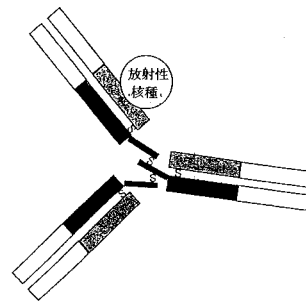
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/092136 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 51/10, 47/48 (30) Angaben zur Priorität: 101 23 505.4 15. Mai 2001 (15.05.2001) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/D1/02/01606

(71) Anmelder und

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Mai 2002 (03.05.2002)

(72) Erfinder: BERGTER, Wolfgang [DE/DE]; Heidering 45, 30625 Hannover (DE); KOBILKE, Hartmut [DE/DE]; Lehliner Strasse 4, 14797 Damsdorf (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

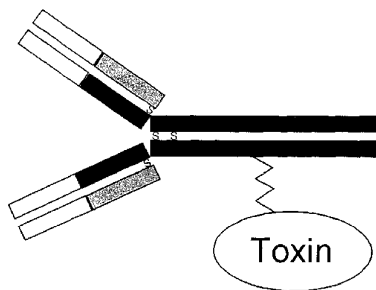
(74) Anwalt: HEITSCH, Wolfgang, Göhlsdorfer Strasse 25 g, 14778 Jeserig (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IMMUNOCONJUGATES MADE OF EGG-YOLK ANTIBODIES (IGY), PRODUCTION AND USE THEREOF IN DIAGNOSIS AND THERAPY

(54) Bezeichnung: IMMUNKONJUGATE AUS EIDOTTER-ANTIKÖRPERN (IGY), DEREN KONFEKTIONIERUNG UND ANWENDUNG IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE



(57) Abstract: The invention relates to immunconjugates made of egg-yolk antibodies (IgY), the production and use thereof in diagnoses and therapy. The aim of the invention is to provide alternative products to traditional immunconjugates for use in diagnoses and therapy. The inventive immunconjugates are superior to monoclonal antibodies and immune serums from mammals in addition to IgY preparations from conventional hens in terms of purity and antigen targeting. The invention seeks to avoid the formation of human anti-IgY antibodies as far as possible, and to produce immunconjugates in large quantities at a low price in a manner which is compatible with animal welfare. This is achieved by polyclonal IgY conjugates from intact egg-yolk antibodies (IgY), IgY fragments, Fab constructions or humanized egg-yolk antibodies from SPF hens, preferably from transgenic SPF hens. The antibodies or antibody fragments are conjugated as immunologically effective components with at least one other component such as a signaling substance, an active substance or an amplifier module.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Immunkonjugate aus Eidotter-Antikörpern (IgY), deren Konfektionierung und Anwendung in Diagnostik und Therapie. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, alternative Produkte zu herkömmlichen Immunkonjugaten für den diagnostischen und therapeutischen Einsatz vorzuschlagen. Die erfindungsgemäßen Immunkonjugate sind den monoklonalen Antikörpern und Immunsereen aus Säugtieren sowie den IgY-Präparationen aus herkömmlichen Hühnern hinsichtlich Reinheit und Antigen-Targeting überlegen. Die Bildung von humanen anti-IgY-Antikörpern soll zudem möglichst vermieden werden, und die Immunkonjugate sollen sich tierschutzgerecht und in großen Mengen preisgünstig herstellen lassen. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch polyklonale IgY-Konjugate aus intakten Eidotter-Antikörpern (IgY), IgY-Fragmenten, Fab-Konstruktionen oder humanisierten Eidotter-Antikörpern vom SPF-Huhn, vorzugsweise vom transgenen SPF-Huhn. Die Antikörper bzw. Antikörperfragmente sollen als immunologisch wirksame Komponente mit mindestens einer weiteren Komponente konjugiert sein, wobei es

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/092136 A2

WO 02/092136 A2 

- (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI, GH, GM, IR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR),
OAPI-Patent (BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
cansisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, *Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

sich um einen Signalstoff, einen Wirkstoff oder ein Verstärker-Molekül handeln kann.

10 **Immunkonjugate aus Eidotter-Antikörpern (IgY), deren Konfektionierung
und Anwendung in Diagnostik und Therapie**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Immunkonjugate aus Eidotter-Antikörpern (IgY), deren Konfektionierung und Anwendung in Diagnostik und Therapie nach den Merkmalen der Ansprüche 1, 13, 14 und 16.
15

[0002] Zum besseren Verständnis der Erfindung werden die in der Anmeldung vorkommenden Fachtermini hier näher definiert und sollen im Rahmen dieser Anmeldung keine andere Bedeutung haben:
20

[0003] „Spezifiziert Pathogenfreie Hühner“ (kurz „SPF-Hühner“):
Es werden solche Tiere verstanden, die nach den Richtlinien von Europäischer Pharmakopoe und DAB10 von SPF-Muttertieren abstammen und vom ersten Lebenstag an unter SPF-Bedingungen gehalten werden. Diese Tiere sind frei von menschen- und geflügelpathogenen Erregern und deren Antikörpern.
25

[0004] „IgY“ (engl.: immunoglobulin yolk):
Hier werden Immunglobuline bezeichnet, die aus dem Eidotter von Geflügeleiern extrahiert werden und die dem IgG im Serum der Hühner entsprechen. Diese aviären Immunglobuline unterscheiden sich vom IgG des Säugers strukturell vor allem durch ihr höheres Molekulargewicht infolge der größeren Zahl konstanter Domänen im Fc-Fragment.
30

[0005] „Spezifisches IgY“:
Ist hier definiert als der Anteil des gesamten IgY, der das zur Immunisierung verwendete Antigen erkennt, während unspezifisches IgY den Anteil des gesamten IgY bezeichnet, der unabhängig von der Immunisierung durch den Kontakt der Tiere mit antigen wirkenden Stoffen oder apathogenen und pathogenen Erregern gebildet wird.
35

WO 02/092136

PCT/DE02/01606

2

[0006] „Intakte Antikörper“:

Es sollen Immunglobuline verstanden werden, die nicht fragmentiert sind, die also ein Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmente besitzen, wobei Fc die konstanten Regionen der schweren Ketten umfasst und Fab die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten.

5

[0007] „IgY-Fragmente“:

Mit „IgY-Fragmenten“ sind hier Fab-Fragmente aviärer Immunglobuline gemeint, die keinen oder nur noch einen geringen Rest des Fc-Fragments besitzen. Dabei sollen hier nachfolgend unter dem Begriff „Fab“ zur Vereinfachung auch Fragmente wie F(ab)₂ verstanden werden.

10

[0008] „Fab-Konstrukt“:

Der Begriff „Fab-Konstrukt“ soll synthetische Gebilde aus zwei oder mehr verschiedenen Fab-Fragmenten (bi- oder trivalente Konstrukte etc.) bezeichnen, die eine oder mehrere unterschiedliche antigene Determinanten erkennen (mono-, bi- oder trispezifische Konstrukte usw.) und somit eine oder mehrere Funktionen erfüllen können, d. h. mono-, bi- oder trifunktional wirken.

15

[0009] „Antigene Determinante“:

Dies ist diejenige Molekülstruktur auf einem Antigen, die von einem Antikörper spezifisch erkannt wird (auch „Epitop“ genannt).

20

[0010] „IgY-Präparation“:

Es sollen die aus dem Eidotter extrahierten und ggf. gereinigten Eidotter-Antikörper (IgY), IgY-Fragmente, Fab-Konstrukte oder chimäre Eidotter-Antikörper verstanden werden.

25

[0011] „Signalstoff“:

Hierunter sind alle Stoffe zu verstehen, die eine analytische, visuelle oder bildgebende Beurteilung eines pathologischen oder physiologischen Befundes ermöglichen.

30

[0012] „Wirkstoff“:

Es werden hierunter alle Stoffe bezeichnet, die therapeutisch nutzbar sind, z. B. Enzyme, Antibiotika, Virostatika und Zellgifte wie Toxine oder Radionuklide. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass der Wirkstoff zugleich die Qualität eines Signalstoffs erfüllt.

35

WO 02/092136

3

PCT/DE02/01606

[0013] „Prodrug“:

Hiermit seien alle Stoffe bezeichnet, die aus einer inaktiven Vorstufe im Körper vor Ort in einen aktiven Wirkstoff umgewandelt werden.

5 [0014] „Boosterung“ und „Auffrischungsimpunisierung“:

Im Zusammenhang mit der Immunisierung von SPF-Hühnern wird von diesen beiden Begriffen die Rede sein. Die Boosterungen dienen dazu, den maximalen IgY-Titer zu erreichen. Unter Auffrischungsimpunisierung wird die erneute Antigenexposition verstanden, durch die der maximale IgY-Titer bis zum Ende der Legeperiode aufrecht erhalten wird.

10

[0015] Bekannt sind aus dem Stand der Technik Immunkonjugate auf der Basis von monoklonalen Antikörpern aus der Maus (murine MAK) oder vom Menschen (humane MAK). Eine Vielzahl von Methoden wurden etabliert, um Signalstoffe (Farbstoffe, Fluorochrome, diagnostische Radionuklide) oder Wirkstoffe (z. B. Toxine, therapeutische Radionuklide, Photosensibilisatoren, Prodrugs) an diese Antikörper zu konjugieren. Damit lassen sich 15 Untersuchungen wie ELISA, RIA, Fluoreszenzmikroskopie, Durchflußzytometrie, Szintigraphien, SPECT (engl.: single photon emission computed tomography), PET (Positronen-Emissionstomographie) und Photoimmundiagnostik beziehungsweise Behandlungen wie Radioimmuntherapie, Immuntoxintherapie oder photodynamische Therapie durchführen.

20

[0016] Zu den Nachteilen der monoklonalen Antikörpertechnologie gehören vor allem die Monospezifität der Antikörper, sowie die relativ aufwendige und kostenintensive Entwicklung und Produktion der monoklonalen Antikörper. Die Massenproduktion muss im Allgemeinen in großen Fermentern erfolgen, da die Produktion im Aszites von Mäusen inzwischen in vielen Ländern weitgehend untersagt ist. 25

[0017] Polyklonale Immunsereen von Säugetieren (Schaf, Pferd, Schwein usw.) und immunisierten/infizierten Spendern (z. B. aus dem Blut von HIV-Infizierten mit hohem p24-Antikörper-Titer) spielen bei verschiedenen diagnostischen Verfahren und passiven Immuntherapien eine Rolle. Die Polyklonalität dieser Immunsereen ist unter dem Gesichtspunkt eines 30 besseren Targetings komplexer Antigene sinnvoll. Immunsereen von Säugern oder konventionellen Hühnern enthalten jedoch ein relativ schlecht definiertes polyspezifisches Antikörper-Gemisch, wobei die gewünschten spezifischen Antikörper den geringsten Anteil bilden, während unspezifische und somit unerwünschte Antikörper den Hauptanteil ausmachen. Die Ge-

WO 02/092136

4

PCT/DE02/01606

winnung von Immunsereen aus Säugetieren ist unter dem Gesichtspunkt des Tierschutzes kaum vertretbar und daher in mehreren Ländern bereits weitgehend verboten. Immunsereen aus humanen Blutspenden zu gewinnen ist teuer, keineswegs risikolos (Übertragung von Erregern wie HIV, HCV und möglicherweise Prionen), ethisch problematisch und daher für eine breite Anwendung nicht praktikabel.

5
10
15
20
25

[0018] Polyklonale Antikörper aviären Ursprungs, unter anderem Eidotter-Antikörper (IgY), sind im Stand der Technik ebenfalls bekannt. IgY wird heute von verschiedenen Herstellern für die in vitro-Diagnostik als Alternative zu Immunsereen von Säugern oder monoklonalen Antikörpern angeboten. In der Fachliteratur finden sich auch Beispiele dafür, wie Eidotter-Antikörper mit Biotin, FITC oder Meerrettich- (Horse Radish) Peroxidase (POD) gekoppelt werden können, um sie für die in vitro-Diagnostik nutzbar zu machen (SCHADE et al, 2001 [1]).

15
20
25

[0019] Bekannt ist auch die orale Verwendung aviärer Antikörper aus herkömmlichen Hühnern. Der parenterale Einsatz in der Humanmedizin wurde bisher weitgehend ausgeschlossen, einerseits weil IgY bei Säugern aufgrund des phylogenetischen Abstands weder an Komplement-Faktor C1 noch an Fc-Rezeptoren bindet und somit mit dem Abwehrsystem des Säugers nicht effektiv interagieren kann und andererseits weil IgY allergische Reaktionen auslösen kann. Hinzu kommt, dass die Herstellung von IgY aus dem Eidotter konventioneller Hühner weniger effizient ist und bezüglich Reinheit und Affinität zu qualitativ minderwertigen Produkten führt. Der Grund dafür ist, dass herkömmliche Hühner zahlreiche unspezifische Antikörper gegen andere Erreger bilden und die Antwort auf das Zielimmunogen daher relativ schwach ausfällt und nur kurz anhält. Daher liegt der Anteil von spezifischem IgY am Gesamt-IgY bei der Immunisierung konventioneller Hühner weit unter 10 % (US 4,550,019; HANSEN et al., 1998 [2]; BOUHOURS et al 1998 [3]; GASSMANN et al, 1990 [4]).

30

[0020] Den nächsten Stand der Technik beschreibt die DE 195 04 755, in der es um eine passive Immuntherapie der HIV-Infektion mit IgY geht. Das IgY ist gegen die HIV-core-Antigene p24 und p17 aus spezifiziert pathogenfreien (SPF-) Hühnern gerichtet. Passive Immuntherapien mit humanen Immunsereen sind ebenfalls bekannt. Im Vergleich zu Immunsereen und monoklonalen Antikörpern lässt sich IgY aber vergleichsweise leicht und preiswert herstellen. SPF-Hühner legen unter dem in Beispiel 2 beschriebenen Immunisierungsprotokoll nach Grundimmunisierung und Boosterung bis zum 16. Lebensmonat wöchentlich 5 - 7 Eier.

WO 02/092136

5

PCT/DE02/01606

Dabei hat sich gezeigt, dass aus den 250 - 350 Eiern eines SPF-Huhns rund 15.000 mg spezifisches IgY gewonnen werden kann, weil erfahrungsgemäß 1 Eidotter mindestens 50 mg IgY der gewünschten Spezifität enthält. Darüber hinaus sind die Belastungen von SPF-Hühnern wegen der für diese Tiere vorgeschriebene artgerechte Tierhaltung wesentlich geringer als bei 5 der herkömmlichen Mast- und Legehuhn-Haltung. Dadurch entfallen die üblichen aktiven Immunisierungen gegen bis zu 19 wirtschaftlich bedeutsame Infektionskrankheiten wie sie bei der herkömmlichen Hühnerzucht üblich sind, darunter zwei Pflichtimpfungen. Diese sind ja dafür verantwortlich, dass die IgY-Präparationen konventioneller Hühner minderwertig sind und dass sich die Isolierung spezifischer IgY erschwert und verteuert. Die Haltung von 10 SPF-Hühnern erfolgt frei von human- und geflügelpathogenen Keimen. Zum Ausschluss solcher Keime werden regelmäßige Futter-, Wasser- und Immunstatus-Kontrollen durchgeführt. Auf den Zusatz von Antibiotika im Futter wird verzichtet, um den SPF-Status der Tiere nicht zu kaschieren.

15 [0021] Aus medizinischer Sicht liegen die Vorteile von IgY allgemein in der Erkennung mehrerer antigener Determinanten durch die spezifischen Antikörper, was ein besseres Targeting des Zielantigens gewährleistet, und in der Tatsache, dass es sich um Antikörper aus Geflügel handelt, dessen Immunsystem sich hinsichtlich der Antigen-Erkennung von dem des Säugetiers und des Menschen unterscheidet. Dies verbessert ebenfalls das Targeting des Ziel- 20 antigens, denn das aviäre Immunsystem erkennt (phylogenetisch bedingt) andere antigene Determinanten als das menschliche humane Immunsystem. Daher müssen aviäre Antikörper in vivo weniger mit den natürlich vorhandenen Antikörpern des Patienten konkurrieren um Epitope zu erkennen. Darüber hinaus kann sich der vermeintliche Nachteil, dass aviäre Antikörper weder mit dem menschlichen Komplement-System noch mit Fc-Rezeptoren, Protein A 25 oder Protein G reagieren in vielen Fällen als unwesentlich oder gar als vorteilhaft erweisen.

[0022] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, alternative Produkte zu herkömmlichen Immunkonjugaten zu entwickeln und bereitzustellen, die sich für den diagnostischen Einsatz und therapeutische Anwendungen eignen und dabei den monoklonalen 30 Antikörpern und Immuseren aus Säugetieren, sowie den IgY-Präparationen aus herkömmlichen Hühnern hinsichtlich Reinheit und Antigen-Targeting überlegen sind. Die Bildung von humanen anti-IgY-Antikörpern soll zudem möglichst vermieden werden und die Immunkonjugate sollen sich tierschutzgerecht und in großen Mengen preisgünstig herstellen lassen.

WO 02/092136

PCT/DE02/01606

6

[0023] Eingang der Erfindungsbeschreibung sollen nachstehend weitere Begriffe definiert werden, wie sie durchgehend in der folgenden Erfindungsbeschreibung und auch in den Patentansprüchen verstanden werden. Sie sollen im Rahmen dieser Anmeldung keine andere Bedeutung haben:

5

[0024] „Radioimmunkonjugat“:

Hierunter werden in dieser Anmeldung Verbindungen aus IgY-Präparationen von SPF-Hennen oder transgenen SPF-Hennen verstanden, die mit diagnostischen und/oder therapeutischen Radionuklide und/oder Verstärkermolekülen konjugiert sind und im Rahmen der nuklearmedizinischen Diagnostik und/oder Radioimmuntherapie angewendet werden.

10

[0025] „Immuntoxin“:

Es werden Verbindungen aus IgY-Präparationen verstanden, die mit Toxinen (pflanzliches Toxin, Zytostatikum, Chemotherapeutikum, Antibiotikum etc.) konjugiert sind und im Rahmen der Immuntoxintherapie angewendet werden.

15

[0026] „Spezifisches Targeting“:

Hiermit wird der Vorgang bezeichnet, bei dem der Signal- oder Wirkstoff durch das Immunglobulin an das gewünschte Zielantigen gebunden wird.

20

[0027] „Pretargeting“:

Umfasst hier Anwendungen, die eine Verstärkung von Signalen oder Wirkungen der IgY-Präparationen erzeugen, indem weitere Antikörper einer anderen Spezies oder andere geeignete Moleküle (hier auch unter dem Oberbegriff „Verstärker-Molekül“ zusammengefasst) in irgendeiner Phase zwischen Antigenbindung und Signal- oder Wirkstoff zwischengeschaltet werden.

25

[0028] „Chimäre Eidotter-Antikörper“:

Es werden hiermit

30

- i) humanisierte Immunglobuline, bei denen Fab-Fragmente vom Huhn mit Fc-Fragmenten von humanem IgG biochemisch miteinander verknüpft wurden, oder
- ii) humanisierte Immunglobuline aus transgenen SPF-Hühnern, in denen die Genabschnitte für die konstanten Regionen von IgY mehr oder weniger vollständig durch die konstanten Regionen von humanem IgG ersetzt sind,

WO 02/092136

7

PCT/DE02/01606

bezeichnet.

[0029] „IgY-Konjugat“:

5 Dieser Begriff umfasst hier Verbindungen aus polyklonalen IgY-Präparationen (immunologische Komponente) und Signalstoffen und/oder Wirkstoffen (diagnostische oder therapeutische Komponente) und/oder Verstärkermolekülen.

[0030] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch polyklonale IgY-Konjugate aus intakten Eidotter-Antikörpern (IgY), IgY-Fragmenten, Fab-Konstrukten oder humanisier-
10 ten Eidotter-Antikörpern vom SPF-Huhn, vorzugsweise vom transgenen SPF-Huhn. Die Antikörper bzw. Antikörperfragmente sollen als immunologisch wirksame Komponente mit mindestens einer weiteren Komponente konjugiert sein, wobei es sich um einen Signalstoff, einen Wirkstoff oder ein Verstärker-Molekül handeln kann.

[0031] Die Erfindung betrifft diagnostische und therapeutische Anwendungen der erfindungsgemäßen IgY-Konjugate in der Medizin sowie experimentelle Anwendungen im
15 Tiermodell (beispielsweise Maus, Schaf oder nicht-humane Primaten). Ihre Anwendung ist nicht auf die parenterale Applikation beschränkt, sondern umfasst je nach Anwendungsziel auch äußerliche (z. B. beim Melanom) und enterale Applikationen (z. B. beim Ösophagus-
20 Karzinom).

[0032] Die Erfindung betrifft außerdem die Konfektion der IgY-Konjugate als gebrauchsfertige Diagnostika oder Arzneimittel, entweder in Form der einzelnen Komponenten, als Markierungsbestecke (sog. Kits) oder als gebrauchsfertige Präparate. Als Zielantigene
25 kommen alle Proteine, Peptide, Glykoproteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide und Lipoproteine in Betracht. Die Erfindung betrifft vor allem IgY-Konjugate gegen Tumorantigene, Hormone, Rezeptorproteine, RNS- und DNS-Abschnitte, infektiöse Erreger, Prionen oder einen Teil der antigenen Determinanten dieser Zielantigene. Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate können dabei je nach Komplexität des für die Immunisierung verwendeten Antigen-
30 gens mehr oder weniger polyspezifisches IgY enthalten.

WO 02/092136

8

PCT/DE02/01606

[0033] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Pretargeting-Methoden, wobei entweder

- i) biotinyliertes IgY an das Zielantigen bindet und als Vermittler für markiertes Avidin oder Streptavidin dient, oder
- 5 ii) unkonjugiertes IgY an das Zielantigen bindet und als Vermittler für humane oder humanisierte anti-IgY-Konjugate dient.

Im Fall (i) wird die starke Bindung zwischen Biotin und Avidin oder Streptavidin ausgenutzt, weshalb die Biotin-Komponente in dem IgY-Konjugat auch Verstärker-Molekül bezeichnet werden kann.

10

[0034] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch Zubereitungen und Anwendungen der erfindungsgemäßen IgY-Konjugate, durch die ihre diagnostischen und/oder therapeutischen Eigenschaften verbessert werden, wie Kombinationen mit chirurgischen Eingriffen, Chemotherapeutika, Immunmodulatoren und Paraimunitätsinducern.

15

[0035] Im Folgenden werden die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Erfindung stehenden Komponenten, deren Funktionen, Wirkweisen und die Anwendung der erfindungsgemäßen IgY-Konjugate näher charakterisiert und die Lösungen ausführlich dargestellt:

20

[0036] a) Immunologische Komponente

Erfindungsgemäß bestehen die immunologisch wirksamen Komponenten entweder aus

- (i) intakten Eidotter-Antikörpern (IgY), IgY-Fragmenten, Fab-Konstrukten, oder
- (ii) chimären Eidotter-Antikörpern, d. h. biochemisch humanisiertem IgY bzw. bevorzugt gentechnisch humanisiertem IgY aus Eiern transgener SPF-Hühner.

25

Dabei können die Fab-Konstrukte mono-, bi- oder trivalent sein und mono-, bi- oder trispezifisch wirken (d. h. eine, zwei oder verschiedene drei antigene Determinanten erkennen). Die Fab-Fragmente lassen sich durch enzymatische Verdauung erzeugen. Chimäre Antikörper können durch Verknüpfung des aviären Fragments mit dem Fc-Fragment eines anderen Organismus (hier vorzugsweise humanes Fc-Fragment) gewonnen werden. Humanisiertes IgY, bei dem nur noch die hypervariablen Regionen vom IgY des Huhns stammen und alle konstanten Regionen vom IgG des Menschen, kann in transgenen Hühnern erzeugt werden. Mit chimären Antikörpern lässt sich nicht nur die Bildung unerwünschter Antikörper gegen IgY reduzieren oder verhindern, sondern es lassen sich auch die natürlichen Effektor-Mechanismen der konstanten Regionen des humanen IgG nutzen.

30

[0037] b) Signalstoffe

Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate enthalten als diagnostische Komponente Signalstoffe wie Radionuklide (Gamma-Strahler wie Technetium-99m, Indium-111, Iod-123, Iod-125, Iod-131, Thallium-201, Selen-75, Gallium-67, Xenon-133), Enzyme (wie Peroxidasen, Alkalische Phosphatasen und Galaktosidase), Photosensibilisatoren (Porphyrin-Derivate etc.) oder Farbstoffe (z.B. Fluorochrome, kolloidales Gold). Für die szintigraphische Diagnostik sind je nach Fragestellung, Applikationsweg, Affinität der Antikörper und Radionuklid Aktivitäten von 10 - 1850 MBq (0,27 - 50 mCi) erforderlich. Im einzelnen kommen z.B. für Iod-131 37 - 370 MBq (1 - 10 mCi) (bevorzugt 37 - 74 MBq (1 - 3 mCi)) in Betracht, für Iod-123 185 - 370 MBq (5 - 10 mCi), für Technetium-99m 74 - 1480 MBq (2 - 40 mCi) (bevorzugt 74 - 740 MBq (2 - 20 mCi)), für Indium-111 und Gallium-67 74 - 185 MBq (2 - 5 mCi) oder für Selen-75 um 10 MBq (0,27 mCi).

[0038] c) Wirkstoffe

Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate können alternativ oder zusätzlich als therapeutische Komponente Radionuklide enthalten (Beta-Strahler, Alpha-Strahler oder Auger-Elektronen-Emitter), z.B. Phosphor-32, Strontium-89, Yttrium-90, Iod-125, Iod-131, Samarium-153, Erbium-169, Rhenium-186, Rhenium-188, Kr-85, Holmium-166, Astat-211, Wismuth-212, Wismuth-213, Radium-224, Actinium-225. Wie bei der Diagnostik hängen die benötigten Aktivitäten bei der Radioimmuntherapie von mehreren Faktoren ab: Art der Erkrankung, Strahlensensibilität der erkrankten Zellen, Masse der zu behandelnden Zellen, Ausdehnung und Verteilungsmuster der Erkrankung, Antigen- Expression, Applikationsweg, Affinität der Antikörper und Energiespektrum des Radionuklides. In Betracht kommen daher z.B. bei Iod-131 Aktivitäten in einem weiten Bereich von 370 MBq bis 11,1 GBq (10 - 300 mCi). Diese Aktivität wird im Allgemeinen einmalig appliziert, kann aber auch fraktioniert in Intervallen von mehreren Wochen bis Monaten (vorzugsweise 3 - 6 Wochen) bzw. bei Auftreten eines Rezidivs bis zu einer Gesamtdosis von 40 - 80 GBq (1 - 2 Ci) wiederholt verabreicht werden. Die Konjugation von tumorspezifischem IgY mit Zytostatika kann die Nachteile herkömmlicher Chemotherapien verringern. Zu den größten Problemen der Onkologie gehören die begrenzte diagnostische Sicherheit bei den Staging-Untersuchungen (besonders das Fehlen von Techniken, mit denen das Vorliegen von Mikrometastasen bewiesen oder ausgeschlossen werden kann) sowie die geringe therapeutische Breite der Zytostatika infolge ihrer hohen Toxizität bei gleichzeitig geringer Spezifität. Diese Faktoren führen immer wieder zu einer er-

WO 02/092136

10

PCT/DE02/01606

hebblichen Unsicherheit bezüglich des therapeutischen Procedere. Eine nebenwirkungsärmere, durch Antikörper vermittelte spezifische Zytostase würde die Entscheidung für eine Chemotherapie erleichtern und folglich aufwendige, teure und/oder belastende Staging-Untersuchungen einsparen helfen. Im Sinne der Erfindung können die Eidotter-Antikörper ebenso mit verschiedenen Zytostatika konjugiert werden (z. B. Alkylantien, Vinkaalkaloiden, interkalierende Antibiotika, Antimetaboliten, Taxol). Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate können ebenso als therapeutisch wirksame Komponente Toxine enthalten (Ricin A, Abrin, Pseudomonas-Exotoxin, Diphtherie-Toxin, Gelonin u. a.). Auch Chemotherapeutika (Cytostatika, Antibiotika, antivirale Substanzen), Fibrinolytika (z. B. Streptokinase, Urokinase, rt-PA), Enzyme zur Aktivierung von Prodrugs (z. B. bakterielle Carboxypeptidase CPG2, die die hydrolytische Spaltung von reduziertem und nicht-reduziertem Folat katalysiert) oder Prodrugs selbst eignen sich als therapeutische Komponenten in den erfindungsgemäßen IgY-Konjugaten. Schließlich können die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate photosensitive Substanzen als wirksame Komponente enthalten, die es ermöglichen, mit einer photodynamischen Therapie erkrankte Zellen gezielt zu zerstören. Photosensibilisatoren können z. B. Photofrin, 5-Aminolävulinäure oder Foscan sein.

[0039] d) Verstärker-Moleküle

Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate können für diagnostische und therapeutische Anwendungen Biotin enthalten, um auf der Basis von Avidin-Biotin- oder Streptavidin-Biotin-Bindungen das Signal oder die Wirkung zu verstärken (sogenanntes Pretargeting). Darüber hinaus können Signal oder Wirkung der IgY-Konjugate durch weitere Komponenten verstärkt werden, die an das IgY-Molekül konjugiert werden (z. B. Komplement).

[0040] e) Hilfsstoffe, komplementäre Maßnahmen

Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate können zur Optimierung des Therapieziels mit anderen Wirkstoffen sinnvoll kombiniert werden. Aviare Antikörper können die Bildung von humanen anti-IgY-Antikörpern auslösen. Bei mehrfacher Anwendung von IgY-Konjugaten kommt es dann zu einer Neutralisierung der diagnostisch oder therapeutisch eingesetzten Antikörper oder gar zu allergischen Reaktionen. Dies kann durch eine Suppression des Immunsystems beispielsweise mit Cyclosporin verhindert werden. Andererseits kann der Einsatz von radioaktivem Iod zu einer unerwünschten radioaktiven Belastung der Schilddrüse führen. Daher ist es in diesen Fällen sinnvoll, die Funktion der Schilddrüse vor einer Radioimmuntherapie mit IgY-Iod-131 durch Gabe von Kaliumiodid oder Natriumperchlorat zu blockieren. Bei

WO 02/092136

11

PCT/DE02/01606

5 einer Immuntherapie viraler Infektionen würden zudem freie Viruspartikel IgY-Konjugate abfangen, die dann nicht mehr für das spezifische Targeting Virus replizierender Zellen zur Verfügung stehen. Daher ist es sinnvoll, die virale Replikation durch eine Vorbehandlung mit einem oder mehreren antiviral oder antiretroviral wirkenden Chemotherapeutika zu hemmen und die erneute Antigen-Expression ggf. durch vorübergehendes Absetzen dieser Medikation zu triggern oder zu induzieren. Darüber hinaus könnte die Freisetzung der Viruspartikel durch Mittel, die die Zellmembran stabilisieren (z. B. Interferon-alpha), gehemmt werden. Bei latenten Virusinfektionen (z. B. HIV- oder EBV-Infektionen) kann es auf der anderen Seite erforderlich sein, die Antigen-Expression der infizierten Zellen zu stimulieren (z. B. durch Einsatz von Interleukin-2) oder die Effektivität der IgY-Konjugate durch andere antivirale Wirkstoffe (z. B. Interferon-alpha und/oder Ribavirin bei der Therapie der Hepatitis C) zu steigern. Ebenso kann es bei der Behandlung bakterieller Infektionen sinnvoll sein, komplementär weitere Wirkstoffe (Antibiotika) einzusetzen. Analog dazu kann es bei onkologischen Erkrankungen erforderlich sein, beispielsweise eine Radioimmuntherapie durch die Gabe von Cytostatika oder eine Immuntoxin-Therapie durch eine lokale externe Radiation zu ergänzen. Ganz allgemein können auch Immunmodulatoren oder Paraimunitätsinducer den Effekt einer Radioimmuntherapie, Immuntoxintherapie oder photodynamischen Therapie günstig beeinflussen.

20 [0041] f) Markierungsmethoden

Für die radioaktive Markierung von murinen und humanen monoklonalen Antikörpern stehen bereits seit Jahren zahlreiche etablierte Methoden zur Verfügung (Peters JH, Baumgarten H (Eds.): Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, Berlin 1992). Metallische Radionuklide wie Technetium-99m, Indium-111 oder Astat-211 werden meistens durch Komplexbildner - z. B. Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA) oder Deferoxamin (DFA) - oder durch partielle Reduktion der Disulfidbrücken des Antikörpers (z.B. mittels 2-Mercaptoethanol) stabil an Antikörper gebunden. Viele radioaktive Iod-Isotope können auch durch direkte elektrophile Substitution an aktivierte aromatische Gruppen der Antikörper (v. a. Phenolring des Tyrosins) konjugiert werden. Als Oxidationsmittel zur Erzeugung von Iodkationen werden in der Regel Kaliumiodat (KIO₃), gelöstes Chloramin T bzw. an Träger (z. B. Polystyrol-Perlen) gebundenes Chloramin T (Iodobeads) oder Iodogen (1,3,4,6-Tetrachlor-3 α ,6 α -diphenyl-glycouril) eingesetzt. Jeder einzelne Antikörper kann mit mindestens einem radioaktiven Atom markiert werden. Um eine höhere spezifische Aktivität zu erzielen, ohne dass die spezifische Bindungsfähigkeit der Antikörper beeinträchtigt wird, kann die Konjugation in Gegenwart des

WO 02/092136

12

PCT/DE02/01606

Zielantigen erfolgen, das anschließend wieder abgetrennt wird, wodurch eine Bindung des Radionuklides im Bereich der hypervariablen Regionen verhindert wird. Fluorochrome, Photosensibilisatoren, Cytostatika, Toxine können mit Methoden an Antikörper konjugiert werden, die auf Reaktionen mit den Aminogruppen der Antikörper beruhen, z. T. auch über kommerziell erhältliche Spacer oder durch Einführung von SH-Gruppen in die Antikörper. Andere Methoden beruhen auf der Spaltung der Antikörper und Freisetzung von SH-Gruppen, an die die Signal- oder Wirkstoffe konjugiert werden können. Außerdem können die Kohlenhydratreste der Antikörper mit Periodat oxidiert werden, wodurch Aldehydgruppen entstehen, über die Signal- und Wirkstoffe konjugiert werden können. Schließlich können bi- und trifunktionale Fab-Konstrukte mit einem Wirkstoff an einen oder zwei Fab-Fragmente des Moleküls gebunden werden und über das freie Fab-Fragment an das Zielantigen andocken.

[0042] g) Konfektion

Im Sinne der Erfindung können für Radioimmunkonjugate Markierungsbestecke (Präparations-Kits) mit IgY-Präparationen angeboten werden, so dass diese durch den Anwender vor Ort mit dem meist kurzlebigen Radionuklid markiert werden können. Bei ausreichend langer HWZ können auch die mit einem Radionuklid konjugierten IgY-Präparationen (d. h. fertige Radioimmunkonjugate) direkt an den Anwender geliefert werden. In den Markierungsbestecken bzw. fertigen Präparaten liegen die IgY-Präparationen oder fertigen Radioimmunkonjugate als sterile isotonische Injektionslösung ggf. in geeignetem Puffer (vorzugsweise PBS, pH 7,4) mit geeigneten Zusätzen (z. B. Stabilisatoren) und in geeigneter Verpackung (Kunststoff-/Glasampulle, Durchstechflasche, ggf. im Bleibehälter, ggf. gekühlt bei +4 bis -20°C) vor. Bei Markierungsbestecken befindet sich die IgY-Präparation in der ersten Ampulle/Durchstechflasche und in einer zweiten Ampulle/Durchstechflasche das Reduktionsmittel (z. B. bei Markierung mit Technetium-99m) bzw. das Oxidationsmittel (z. B. bei Markierung mit Iod-131). Für die Reinigung des Radioimmunkonjugats kann jedes Markierungsbesteck eine Chromatographie-Säule enthalten und zur Qualitätskontrolle beispielsweise ein Dünnschicht-Chromatographie-Set. Je nach Bedarf können die Markierungsbestecke die IgY-Präparationen oder die fertigen IgY-Konjugate für eine oder gleich mehrere Anwendungen enthalten.

[0043] Gemäß der Erfindung sind folgende Anwendungsbereiche und Applikationen vorgesehen:

WO 02/092136

13

PCT/DE02/01606

a) Anwendungsbereiche allgemein: Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate können mit einer Vielzahl von Antigenen reagieren: mit physiologischen Molekülen, mit tumorspezifischen Antigenen, mit infektiösen Erregern und deren Antigenen, mit Prionen sowie mit RNS- oder DNS-Abschnitten oder den damit assoziierten Molekülen. Je nach Signal- oder Wirkstoff (Radionuklid, Enzym, Fibrinolytikum, Farbstoff, Photosensibilisator, Toxin) können die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate zur in vitro- und in vivo-Diagnostik und/oder Therapie von Tumoren, Infektionen, Gerinnungsstörungen und Autoimmunkrankheiten verwendet werden.

[0044] b) Physiologische Zielantigene: Zu den physiologischen Molekülen, die als Target für die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate in Betracht kommen, zählen die Leukozytenantigene entsprechend der CD-Klassifikation (Antigene der NK-Zellen, B-Zell-Antigene, myeloische Antigene, Progenitorantigene, Aktivierungsantigene, Adhäsionsmoleküle, Zytokinrezeptoren), sowie intrazelluläre Moleküle (z. B. Zytokeratine), Rezeptoren (Androgen-, Östrogen-, Dopamin-D2- oder Somatostatinrezeptoren usw.) oder beispielsweise Gerinnungsfaktoren (z. B. Fibrin oder Plasminogen).

[0045] c) Pathologische Zielantigene: Zu den tumorspezifischen Antigenen, die als Target für IgY-Konjugate in Betracht kommen, zählen ebenfalls bestimmte überexprimierte Leukozytenantigene (z. B. CD20, CD22), überexprimierte Androgen- oder Östrogenrezeptoren, Calcitonin und Thyreoglobulin, aber auch im engeren Sinne Tumormarker wie Egp 34, Ca 15-3, Sialyl-Le^x-Antigen, BCA 225, Melanoma associated antigens (MAA), CEA, 17-1A, PAP, Neuronen spezifische Enolase (NSE), terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT), Bromdesoxyuridin (BrdU), Ki 67, PCNA, Myeloperoxidase (MPO) und mutiertes p53. Zu den infektiösen Erregern, die das Target für die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate bilden können, zählen Bakterien (Bacillus anthracis, Borrelien, Brucellen, Mycobacterien, Pseudomonas aeruginosa, Salmonellen, Staphylokokken, Toxoplasma gondii, Treponemen, Trypanosomen), Viren (HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HCV und andere Flaviviren, HBV, EBV, HSV, HHV-8, Coxsackieviren, Polioviren, Cytomegalo-Virus, Influenza-Viren, Rubellavirus, Papillomaviren, Dengueviren, Hantaviren, Arenaviren, Bunyaviren, Filoviren), Protozoen (Plasmodien, Toxoplasmen, Acanthamoeba), Mykoplasmen, Pilze (Candida, Aspergillus), Parasiten (Ascariden, Echinococcus, Leishmania, Loa-Loa, Onchocerca volvulus, Mansonella, Brugia-Filarien, Cysticercus, Schistosomen, Bancrofti-Filarie) und infektiöse Partikel (Prionen). Die antigenen Determinanten infektiöser Erreger können auch bei der Diagnostik und/oder Therapie von Tumoren als Target der erfindungsgemäßen IgY-Konjugate eine Rolle

WO 02/092136

14

PCT/DE02/01606

spielen, so bei Burkitt-Lymphomen, nasopharyngealen Karzinomen, M. Hodgkin, T-Zell-Lymphom und immunoblastischen Lymphomen, die sich durch Expression von EBV-assoziierten Antigenen (EBNA 1-3, LMP 1-2) auszeichnen, beim Kaposi-Sarkom und AIDS-assoziierten Lymphomen, die beide mit HHV-8 assoziiert sind, oder bei der adulten T-Zell-Leukämie (ATL), die mit der HTLV-I-Infektion assoziiert ist, oder bei Genitalkrebs, der mit HPV assoziiert sein kann.

[0046] d) Applikationsformen: Je nach Bedarf können die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate in vitro oder in vivo angewendet werden. Die Anwendung kann in vivo sowohl äußerlich oder enteral (z. B. im Rahmen einer photodynamischen Therapie) als auch parenteral (beispielsweise bei Szintigraphie, SPECT, Radioimmuntherapie oder Immuntoxin-Therapie) erfolgen. Der Begriff parenteral umfasst hier intravenöse, intraarterielle, subcutane, intracutane, intrathecale, interstitielle, intracavitäre und intraläsionale oder intratumorale Applikationswege.

[0047] Die Erfindung wird im Folgenden anhand detaillierter Ausführungsbeispiele näher erläutert und beschrieben. Die den Zeichnungen und der Beschreibung zu entnehmenden Merkmale können bei anderen Ausführungsformen der Erfindung einzeln für sich oder zu mehreren in beliebigen Kombinationen Anwendung finden. Die nachfolgenden Anwendungen und Ausführungsarten stellen lediglich Beispiele dar, die in keiner Weise die Möglichkeiten der erfindungsgemäßen IgY-Konjugate auf der Basis des SPF-Huhns erschöpfend darstellen können. Der Fachmann wird daher weitere Ausführungen und Anwendungen ableiten, die unter die Ansprüche der vorliegenden Erfindung fallen.

[0048] Die Zeichnungen zeigen:

- Figur 1: Immunglobulin vom Huhn und zum Vergleich vom Säuger
Figur 1a: IgY vom Huhn
Figur 1b: IgG vom Säuger inkl. Mensch
Figur 2: Radioimmunkonjugat auf der Basis von intaktem IgY
Figur 3: Radioimmunkonjugat auf der Basis eines monovalenten IgY-Fab-Fragments.
Figur 4: Radioimmunkonjugat auf der Basis eines bivalenten IgY-F(ab')₂-Fragments.
Figur 5: Radioimmunkonjugat auf der Basis von drei miteinander verknüpften IgY-Fab-Fragmenten (trivalentes Fab-Konstrukt).

WO 02/092136

15

PCT/DE02/01606

Figur 6: Radioimmunkonjugat auf der Basis von humanisiertem IgY (IgY-Fab + humanes Fc).

Figur 7: Immuntoxin auf der Basis von intaktem-IgY.

5 [0049] **Beispiel 1:**

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen IgY-Konjugate werden SPF-Hühner oder transgene SPF-Hühner vorzugsweise in der 14. Lebenswoche mit 50 - 1000 µg (vorzugsweise 50 - 200 µg) des Zielantigens bzw. eines Fragments davon und komplettem Freund's Adjuvans s.c. bzw. (vorzugsweise) i.m. immunisiert. Danach erfolgen verteilt über nahezu den gesamten Legezeitraum drei Boosterungen bis zum Erreichen des maximalen IgY-Titers und drei Auffrischungen bis zum Erreichen des maximalen IgY-Titers. Die Injektionslösung enthält z.B. jeweils 1 ml Antigen-Suspension und 0,5 ml Adjuvans. Ein bevorzugtes Immunisierungsschema für Hühner mit SPF-Status hat demnach etwa folgenden zeitlichen Ablauf:

15	Tag 0*	= 1. Immunisierung (Basisimmunisierung)	i.m.-Injektion	
	Tag 28	= 2. Immunisierung (1. Boosterung)	i.m.-Injektion	
	Tag 56	= 3. Immunisierung (2. Boosterung)	i.m.-Injektion	IgY-Gewinnung
	Tag 84	= 4. Immunisierung (3. Boosterung)	i.m.-Injektion	IgY-Gewinnung
	Tag 168	= 5. Immunisierung (1. Auffrischung)	i.m.-Injektion	IgY-Gewinnung
20	Tag 252	= 6. Immunisierung (2. Auffrischung)	i.m.-Injektion	IgY-Gewinnung
	Tag 336	= 7. Immunisierung (3. Auffrischung)	i.m.-Injektion	IgY-Gewinnung
	Tag 490	= Nutzungsende für IgY-Gewinnung		

* = 14. Lebenswoche

25

Während des Zeitraums von 12 - 14 Monaten lassen sich die Eier der unter SPF-Bedingungen gehaltenen Hühner sammeln und verarbeiten. Das Eigelb wird zunächst vom Eiweiß separiert und kann mit Standardmethoden nach Schade et al. (Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application. Springer-Verlag, Berlin 2001 [1]) aufgearbeitet werden. Der entscheidende Vorteil der SPF-Hühner ist, dass diese Tiere infolge ihrer Abstammung von SPF-Hennen und der Haltung unter SPF-Bedingungen weder durch Immunisierungen noch durch spezifische Infektionskrankheiten immunologisch vorbelastet sind. Daher reagieren diese Tiere mit einer besonders intensiven Immunantwort gegen das Antigen, mit dem sie immunisiert wurden, so dass der Anteil spezifischer Antikörper um ein vielfaches höher liegt (50 - 90%

30

WO 02/092136

16

PCT/DE02/01606

spezifisches IgY) als bei Immunisierung konventioneller Hühner. Darüber hinaus kann bei diesen Tieren der hohe Titer spezifischer Antikörper nach dem Boostern durch mehrfache Auffrischungs-Immunisierungen bis zum 16. Lebensmonat stabil gehalten werden. Dies hat wesentliche Bedeutung für die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate, denn es ist gut belegt, dass sich die Lymphozyten-Populationen durch eine wiederholte Stimulierung des immunologischen Gedächtnisses derart verändern, dass besonders hochaffine Antikörper gebildet werden. Daher unterscheiden sich die IgY-Präparationen aus Eiern von SPF-Hühnern auch hinsichtlich der Affinität zum spezifischen Antigen von IgY-Präparationen aus konventionellen Hühnern. Auf molekularer Ebene ist die höhere Affinität durch die Struktur der hypervariablen Region dieser Antikörper bedingt, die besser zum Antigen passt als die Struktur der hypervariablen Region weniger affiner Antikörper. Die erfindungsgemäßen IgY-Konjugate aus SPF-Hühnern unterscheiden sich daher letztendlich auf molekularer Ebene (d. h. durch die besondere Struktur ihrer hypervariablen Regionen) reproduzierbar von IgY-Konjugaten aus konventionellen Hühnern.

15

[0050] Beispiel 2:

In diesem Beispiel wird die Herstellung von humanisiertem IgY aus transgenen Hühnern beschrieben. Die Transfektion kann in an sich bekannter Weise wie in US 5,162,215, US 6,020,465 und WO 00/75300 beschrieben erfolgen. Sie kann auch durch Mikroinjektion in die Spermien des Hahns erfolgen. Durch künstliche Befruchtung wird das Merkmal dann in die Eizelle eingebracht und an die Nachkommen weitergegeben. Alternativ kann die Transfektion durch retrovirale Infektion der Spermien erfolgen. Dabei trägt ein replikationsdefizientes Retrovirus das humane Gen für das Fc-Fragment. Die Integration des Genabschnitts der konstanten humanen IgG-Domänen in den Immunglobulin-Genlocus des SPF-Huhns erfolgt durch homologe Rekombination. Der humane „knock-in“ Gene Targeting Vektor trägt u. a. Sequenzen, die homolog sind zu den Exons des zu ersetzenden Gens, einen Selektionsmarker (z. B. Neomycin-Resistenz), die Exons der konstanten humanen IgG-Regionen und Promotoren. Durch transiente Cre-Rekombinase-Expression kann die Deletion der Neomycin- und Thymidinkinase-Kassette und der konstanten aviären IgY-Region erfolgen. Auf diese Weise entstehen transgene Hühner, die ihre Gene für humanisiertes IgY über die Keimbahn an ihre Nachkommen weitergeben. Die Selektion der transgenen Hühner kann durch Nachweis von IgY mit humanen konstanten Regionen im Blut oder in den Eiern der Hühner erfolgen. Zur Detektion der humanisierten Antikörper eignen sich ELISA, Western-Blot oder PCR.

20
25
30

WO 02/092136

17

PCT/DE02/01606

[0051] Beispiel 3:

Intakte Antikörper bedingen wegen ihrer langsamen Elimination aus dem Blut (HWZ: 1-3 Tage) bei der Immunszintigraphie oft lange Untersuchungszeiten bis zum Erreichen eines optimalen Kontrasts zwischen darzustellender Läsion und Hintergrund. Bei therapeutischen Anwendungen liegt das Problem eher darin, dass intakte Antikörper schlecht in solide Tumore oder jenseits der Blut-Hirn-Schranke gelangen. Aus diesem Grund bieten Konjugate auf der Basis von Fab-Fragmenten in bestimmten Situationen entscheidende Vorteile. Zur Herstellung der Fab-Konjugate werden SPF-Hühner oder transgene SPF-Hühner wie in Beispiel 1 geschildert mit 50 - 1000 µg (vorzugsweise 50 - 200 µg) des Zielantigens bzw. eines Fragments davon immunisiert. Die Eier werden wie oben angegeben aufgearbeitet und IgY per Affinitätschromatographie am spezifischen Antigen (Zielantigen) isoliert. Die intakten Antikörper werden dann enzymatisch z. B. mit Pepsin im Bereich der Hinge-Region gespalten, so dass Fab- und Fc-Fragmente entstehen. Die spezifischen Fab-Fragmente können per Affinitätschromatographie am spezifischen Antigen von Fc-Fragmenten und unspezifischen Fab-Fragmenten getrennt und isoliert werden. Die so erhaltenen spezifischen Fab-Fragmente werden steril filtriert. Sie können für die klinische Anwendung in einem Markierungsbesteck, das in einer zweiten Durchstechflasche das Reduktionsmittel für die Markierung enthält, zur Konjugation mit einem kurzlebigen diagnostischen Radionuklid (z. B. Technetium-99m) angeboten werden. Radioimmunkonjugate können mit längerlebigen diagnostischen oder therapeutischen Radionukliden (z. B. Iod-131) auch zentral beim Hersteller markiert und dann vertrieben werden. In diesem Fall erfolgt der Versand an den Anwender entsprechend den gültigen Richtlinien des Strahlenschutzes noch am Tag der Markierung, um einen Qualitätsverlust des Produkts durch Zerfall des Radionuklides und Dissoziation der Antikörper zu minimieren. Eine zentrale Markierung ist auch möglich, wenn die IgY-Präparation mit einem Chemotherapeutikum, Toxin, Fluorochrom, Fibrinolytikum, Enzym oder Prodrug konjugiert wird.

[0052] Beispiel 4:

Radiologische Herde unklarer Dignität können heute mit Hilfe der Granulocyten-Szintigraphie differentialdiagnostisch abgeklärt werden. Die derzeit eingesetzten murinen monoklonalen Antikörper erkennen ein auf Promyelocyten, Myelocyten und Granulocyten exprimiertes Non-specific-cross-reacting-Antigen, entweder NCA-95 (= CD66b) oder NCA-90 (= CD66c). Sie werden mit diagnostischen Radionukliden (Gamma-Strahler) markiert und intravenös appliziert. Im Blut und am Entzündungsherd binden Sie an Granulocyten. Auf diese Weise können entzündliche Prozesse, z. B. eine Osteomyelitis, szintigraphisch nachgewie-

WO 02/092136

18

PCT/DE02/01606

sen werden. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Radioimmunkonjugate werden SPF-Hühner mit NCA-90 oder NCA-95 bzw. Fragmenten davon, wie in Beispiel 1 beschrieben, immunisiert und geboostert. Das NCA-90- bzw. NCA-95-spezifische IgY wird wiederum affinitätschromatographisch an NCA-90 oder NCA-95 isoliert. Das sterile IgY kann dann als

5 Markierungsbesteck, z. B. mit 1 mg IgY in isotoner NaCl und einer zweiten Durchstechflasche mit Reduktionsmittel, für die Markierung mit Technetium-99m in den Handel gebracht werden. Das vom Anwender vor Ort präparierte anti-NCA-IgY-Tc-99m kann nach Abtrennung ungebundener Radionuklide über die mitgelieferte Säule und abschließender Qualitätskontrolle hinsichtlich der radiochemischen Reinheit des Endprodukts durch Hoch-

10 leistungsfähigkeitschromatographie (HPLC) oder vorzugsweise Dünnschicht-Chromatographie (DC) intravenös verabreicht werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen monoklonalen Antikörpern, die nur eine antigene Determinate zu erkennen und binden in der Lage sind, werden mit den polyklonalen Eidotter-Antikörpern simultan verschiedene antigene Determinanten von NCA-95 oder NCA-90 erkannt, woraus eine bessere Bildgebung mit einem höheren spezifischen Uptake gegenüber dem Background resultiert.

15

[0053] Beispiel 5:

IgY-Konjugate können auch zum Nachweis von Wächter-Lymphknoten verwendet werden. Ausgedehnte Lymphadenektomien, wie sie bei malignen Melanomen, Mamma- oder Prostata-

20 Karzinomen erfolgen, sind im Allgemeinen mit einer hohen Morbidität verbunden. Daher ist der Nachweis einer Metastasierung in die im Abstromgebiet eines Tumors liegenden Lymphknoten eine für das therapeutische Procedere höchst wichtige Information. Bislang erfolgt er mit Tc-99m markiertem kolloidalem Humanalbumin oder mit Tc-99m-Nanokolloid. Die Partikelgröße liegt bei 100 - 1000 nm Durchmesser. Nach peritumorale Injektion des Radiokolloids werden typischerweise in einem Zeitraum von 15 Minuten bis etwa sechs Stunden p.i.

25 drei sequentielle planare Aufnahmen an der Gammakamera angefertigt. Der Nachteil dieser Methode liegt in der Partikelgröße und der fehlenden Tumorspezifität. Einerseits verbleibt dadurch ein großer Teil der Radioaktivität am Ort der Injektion und erschwert die Darstellung der Wächter-Lymphknoten durch Überstrahlung. Zum anderen werden Lymphknoten dargestellt, ohne dass ihr Befall dadurch bewiesen wäre. Werden hingegen in analoger Weise lymphozytenspezifische bzw. tumorspezifische Radioimmunkonjugate appliziert, so werden diese Nachteile teilweise oder ganz umgangen. Die gelösten IgY- oder Fab-Konjugate drainieren schneller über die Lymphbahnen als kolloidales Albumin, so dass weniger Restaktivität am Ort der Injektion verbleibt und die Wächter-Lymphknoten dadurch intensiver zur Darstellung

30

WO 02/092136

19

PCT/DE02/01606

kommen. Zu einer spezifischen Darstellung kommt es zudem dadurch, dass die Antikörper in den Lymphknoten spezifisch an Lymphozyten bzw. an metastasierte Tumorzellen binden. Diese Lymphknoten lassen sich auch intraoperativ mit einer geeigneten Gammasonde gezielt aufsuchen und dann resezieren. Alternativ oder zusätzlich zur Darstellung von Wächter-
5 Lymphknoten kann eine weitgehend selektive Bestrahlung oder Chemotherapie dieser Lymphknoten bzw. der Lymphknoten-Metastasen erfolgen, wenn das diagnostisch verwendete IgY-Konjugat oder ein zweites IgY-Konjugat ein therapeutisches Radionuklid (z. B. I-131) oder ein Toxin (z. B. Taxol) enthält. Der Nachweis von Lymphknotenmetastasen eines Melanoms kann durch Radioimmunkonjugate gegen p210, einem Melanom assoziierten Antigen
10 (MAA), erfolgen. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Radioimmunkonjugate werden SPF-Hühner mit 50 - 1000 µg (vorzugsweise 50 - 200 µg) p210 entsprechend Beispiel 1 immunisiert. IgY wird aus dem Eigelb isoliert. Das gereinigte IgY kann dann steril filtriert und lyophilisiert oder in steriler, isotoner PBS (pH 7,4) suspendiert werden. Das kommerziell verfügbare Präparationskit enthält z. B. in der ersten Durchstechflasche 100 mg spezifisches IgY
15 und in der zweiten Durchstechflasche das Reduktionsmittel für die Markierung mit Tc-99m. Unmittelbar vor der geplanten Untersuchung wird die IgY-Präparation mit 10 - 1000 MBq (vorzugsweise 20 - 100 MBq) Tc-99m konjugiert. Nach peritumorale Injektion des erfindungsgemäßen Radioimmunkonjugats erfolgen bis 24 Stunden p.i. (vorzugsweise drei bis sechs Stunden p.i. planare Aufnahmen in drei Ebenen unter der Gammakamera sowie ggf.
20 eine ergänzende SPECT der betreffenden Region. Darüber hinaus können die betroffenen Lymphknoten anschließend intraoperativ mit einem geeigneten Handmessgerät detektiert und gezielt entfernt werden.

[0054] Beispiel 6:

25 Die Diagnostik neuroendokriner Tumore erfolgt szintigraphisch mit Hilfe von Radioimmunkonjugaten. Phäochromozytome, Neuroblastome, Karzinoid und Paragangliome entstehen aus den Zellen des neuroendokrinen (APUD-) Systems, die über den gesamten Organismus verteilt sind. Sie besitzen daher im allgemeinen Somatostatin-Rezeptoren, durch die sie mit Hilfe von Indium-111 markiertem Octreotid (einem Somatostatin-Analogen) szintigraphisch
30 dargestellt werden können. Somatostatin-Analoga binden jedoch an die Rezeptoren nur im Verhältnis 1:1. Polyklonales IgY erkennt hingegen mehrere antigene Determinanten des Rezeptors. Daraus resultieren ein besseres Targeting und eine sensitivere bildgebende Diagnostik. Zur Herstellung der IgY-Präparation gegen Somatostatin-Rezeptoren werden wiederum SPF-Hühner entsprechend Beispiel 1 immunisiert. Das spezifische IgY kann wie in Beispiel

WO 02/092136

20

PCT/DE02/01606

3, 4 oder 5 in Form eines Markierungsbestecks angeboten werden. Es kann dann vom Anwender vor Ort mit einem Gamma-Strahler (z.B. Technetium-99m) markiert werden. 1 - 24 Stunden nach i.v.-Applikation von 100 mg spezifischem IgY-Tc-99m (10 - 1000 MBq, vorzugsweise 50 - 200 MBq) werden planare Aufnahmen in zwei Ebenen und ggf. eine SPECT durchgeführt. Die intraoperativ meist schlecht auffindbaren neuroendokrinen Tumoren können beim anschließenden operativen Eingriff mit einer geeigneten Sonde leicht lokalisiert und dann reseziert werden.

[0055] Beispiel 7:

10 Eine weitere Anwendung der Radioimmunkonjugate ist die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen. Niedrig maligne Non-Hodgkin-Lymphome sprechen schlecht auf eine Chemotherapie an. Die Radioimmuntherapie hat sich in diesen Fällen als besonders wirksam erwiesen. In den meisten Studien wurden mit Iod-131 markierte murine monoklonale Antikörper gegen CD20 verwendet, ein Antigen, das auf der Zelloberfläche von 95% aller B-Zell-
15 Lymphome exprimiert wird. Monoklonale Antikörper erkennen jedoch nur eine antigene Determinante dieses Antigens. Das Bindungsverhältnis beträgt daher nur 1:1. Ein besseres Targeting kann hingegen mit CD20-spezifischem IgY erzielt werden, das gleichzeitig mehrere Epitope auf dem Antigen erkennt. Dadurch wird auch die Strahlenbelastung des Knochenmarks reduziert, und es können höhere Strahlendosen appliziert werden, ohne dass eine Knochenmark-Transplantation erforderlich wird. Eine Verminderung der Strahlendosis kann auch durch Pretargeting-Methoden mit Avidin- oder Streptavidin-markierten monoklonalen Antikörpern und radioaktiv markiertem Biotin erreicht werden. Durch Pretargeting, wofür ebenfalls Schutz beantragt wird, kann allerdings auch der therapeutische Effekt einer Radioimmuntherapie mit IgY nochmals verbessert werden. SPF-Hühner werden hierfür mit 50 - 1000
20 µg (vorzugsweise 50 - 200 µg) CD20 wie in Beispiel 1 immunisiert. Über einen Legezeitraum von ca. 12 - 14 Monaten erhält man Eier, aus denen das Gesamt-IgY isoliert und an CD20 affinitätschromatographisch gereinigt wird. Für das Pretargeting wird das spezifische IgY steril filtriert, mit Avidin (oder Streptavidin) konjugiert und lyophilisiert oder ggf. mit weiteren Hilfsstoffen in isotoner NaCl (ggf. PBS, pH 7,4) gelöst. Das Markierungsbesteck enthält
25 in diesem Fall vorzugsweise eine Durchstechflasche mit dem IgY-Avidin-Konjugat (100 µg - 5 mg, vorzugsweise 1 mg), eine zweite Durchstechflasche mit Biotin in lyophilisierter oder gelöster Form (1 - 1000 µg) und eine dritte Durchstechflasche mit einem Oxidationsmittel (z.B. Iodogen) für die Markierung mit Iod-131 (1 - 4 GBq), außerdem weitere Hilfsmittel wie Chromatographie-Säule und DC-Kit. Alternativ kann Biotin vom Hersteller zentral markiert
30

WO 02/092136

21

PCT/DE02/01606

werden und zusammen mit dem IgY-Avidin-Konjugat ausgeliefert werden. Zur Behandlung werden zunächst die IgY-Avidin-Konjugate intravenös appliziert, um die Lymphocyten zu markieren. Ein bis mehrere Tage später erfolgt die intravenöse Applikation des Iod-131-markierten Biotin. Alternativ kann die Radioimmuntherapie mit einem Alpha-Strahler wie Astat-211 durchgeführt werden.

[0056] Beispiel 8:

Etwa die Hälfte aller Mamma-Karzinome besitzt Östrogen-Rezeptoren und ist hormonabhängig. Eidotter-Antikörper gegen Östrogenrezeptoren können daher nicht nur die Östrogenbindung an den Rezeptoren kompetitiv hemmen. Als Radioimmunkonjugat eignen sie sich auch zur Darstellung von Metastasen und zur internen Strahlentherapie. Für die Immunisierung der SPF-Hühner werden Peptide mit den extrazellulären antigenen Determinanten des Östrogenrezeptors verwendet. Die Immunisierung der SPF-Hühner sowie die Aufarbeitung der Eier und Reinigung des IgY können nach Beispiel 1 erfolgen, die Konfektionierung nach einem der anderen o. g. Beispiele.

[0057] Beispiel 9:

Kommerziell erhältliche Antikörper wie URO7 erkennen Nierenzellkarzinome und binden nicht an gesundes Nierengewebe. Nierenzellkarzinome und ihre Metastasen können daher gezielt mit Radioimmunkonjugaten nachgewiesen und/oder behandelt werden. Um ein geeignetes Antigen zu identifizieren, werden die Proteine von homogenisierten Nierenkarzinomzellen elektrophoretisch aufgetrennt und isoliert. SPF-Hühner werden mit diesen Antigenen immunisiert und die gewonnenen Eidotter-Antikörper mit Nieren-Karzinomzellen und physiologischen Geweben hinsichtlich Spezifität und Kreuzreaktivität untersucht. Die selektierten Antikörper, die ausschließlich maligne Zellen erkennen, werden mit einem therapeutischen Radionuklid wie Iod-131 oder einem Zellgift wie Ricin A konjugiert und therapeutisch eingesetzt.

[0058] Beispiel 10:

Eine weitere Anwendung der Radioimmunkonjugate wird in der Behandlung von HIV-Infektionen gesehen. Bei einer HIV-Infektion wird das retrovirale Genom in die Chromosomen der Wirtszelle eingebaut. Mit herkömmlichen Replikationshemmern kann die HIV-Infektion nicht geheilt werden. Die HIV replizierende Wirtszelle exprimiert dann HIV-Strukturproteine (p24, gp120 und gp41) auf ihrer Zelloberfläche. Antikörper gegen diese

WO 02/092136

22

PCT/DE02/01606

Strukturproteine erkennen diese Zellen und binden daran. Sind sie mit einem Radionuklid oder einem anderen Zellgift konjugiert, so können sie diese Zellen und damit die Produktionsorte von HIV gezielt zerstören. Voraussetzung für ein effektives Targeting der Zellen ist, dass die Zahl freier Viren im Blut beispielsweise durch eine komplementäre Replikationshemmung mit antiretroviralen Medikamenten reduziert wird. Damit eröffnen sich neuartige Möglichkeiten, die HIV-Infektion effektiv zu behandeln. Aus den eingangs genannten Gründen bietet die Verwendung polyklonaler Konjugate aus spezifischem IgY von SPF-Hühnern Vorteile gegenüber monoklonalen Antikörpern, wie sie in DE 198 09 785 beschrieben sind. Zur Gewinnung der Antikörper werden SPF-Hühner mit HIV p24, HIV-1 gp120 oder HIV-1 gp41 wie in Beispiel 1 immunisiert. Über einen Legezeitraum von rund 12 - 14 Monaten werden die Eier der unter definierten Bedingungen gehaltenen SPF-Hühner gesammelt. Das Eigelb wird vom Eiklar abgetrennt und das IgY nach einem der Standardverfahren isoliert. HIV spezifische Antikörper werden per Affinitätschromatographie am spezifischen Antigen gereinigt, so daß unspezifisches IgY abgetrennt wird. Die sterilen IgY-Präparation werden mit einem therapeutischen Radionuklid (z. B. Iod-131 oder Astat-211) konjugiert. Üblicherweise werden z. B. pro therapeutischer Anwendung 100 µg spezifisches IgY mit 1 - 4 GBq Iod-131 markiert. Im Falle der HIV-Infektion können sich u. a. wegen der relativ geringen Zahl infizierter Zellen (im Vergleich zur Zahl maligne entarteter Zellen bei Lymphomen) bereits wesentlich geringere Aktivitäten als therapeutisch wirksam erweisen. Die Markierung kann mit verschiedenen etablierten Methoden erfolgen. So könnte IgY-Iod-131 bevorzugt nach der Iodogen-Methode hergestellt werden. Sowohl die Ausbeute nach Konjugation des Radioimmunkonjugats als auch die Reinheit des Radioimmunkonjugats nach Abtrennung ungebundener Radionuklide können mit Hilfe von HPLC oder DC kontrolliert werden. Das unter sterilen Kautelen hergestellte und/oder sterilfiltrierte Radioimmunkonjugat kann als isotone Lösung infundiert werden.

[0059] Beispiel 11:

Des Weiteren sollen IgY-Konjugate zur Behandlung von Autoimmun-Krankheiten verwendet werden. CD4-positive T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmun-Krankheiten und bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation. Monoklonale Antikörper gegen den CD4-Rezeptor zeigten bei M. Crohn, Lupus Erythematodes, Rheumatoider Arthritis und nach Hauttransplantation bei Mäusen jedoch klinisch nur geringe Effekte. Um eine effektive Depletion von CD4-positiven Zellen zu bewirken, können die Antikörper mit einem therapeutischen Radionuklid, einem Cytostatikum oder einem Toxin konjugiert

WO 02/092136

23

PCT/DE02/01606

werden. SPF-Hühner werden entsprechend Beispiel 1 gegen CD4 oder CD4-Fragmente immunisiert, Gesamt-IgY wird aus dem Eidotter isoliert, und das CD4-spezifische IgY kann durch Affinitätschromatographie an CD4 gereinigt werden. Gegebenenfalls werden die Antikörper enzymatisch gespalten und die aviären Fc-Fragmente durch humane Fc-Fragmente ersetzt. Die IgY-Präparation kann dann für die (vorzugsweise intravenöse) klinische Anwendung unkonjugiert oder als erfindungsgemäßes IgY-Konjugat mit einem Radionuklid markiert vertrieben werden.

[0060] Beispiel 12:

Der Einsatz von IgY-Konjugaten zur Behandlung von Thrombosen stellt eine weitere Anwendung dar. Thrombosen werden im allgemeinen mit systemisch applizierten Fibrinolytika (Streptokinase, Urokinase oder rt-PA) behandelt. Streptokinase wird durch körpereigene Proteasen rasch abgebaut. Urokinase und rt-PA werden dagegen schnell in der Leber metabolisiert. Daher ist es sinnvoll, Fibrinolytika an den Thrombus zu fixieren (Bode et al., J Biol Chem 1989;264(2):944-8; Lijnen et al. Thromb Res 1990;57(3):333-42). SPF-Hühner oder transgene SPF-Hühner werden gegen humanes Fibrin in der in Beispiel 1 genannten Art und Weise immunisiert. Das spezifische IgY wird isoliert und gereinigt. Ggf. werden die Antikörper enzymatisch gespalten und die Fc-Fragmente abgetrennt. Intakte Antikörper oder Fab-Fragmente (5 - 50 mg) werden dann mit rt-PA (5 - 50 mg) vorzugsweise im Verhältnis 1:1 konjugiert. Diese IgY-Konjugate können lyophilisiert oder in steriler Lösung für Injektionszwecke in geeigneten Packungsgrößen für die Behandlung tiefer Beinvenenthrombosen, Lungenembolien, cerebrovaskulärer Insulte oder Myokardinfarkte angeboten werden. Alternativ kann eine zweite Gruppe SPF-Hühner gegen rt-PA (vorzugsweise eine Region außerhalb des aktiven Zentrums) immunisiert werden. Die Fab-Fragmente der ersten Gruppe können mit den Fab-Fragmenten der zweiten Gruppe hybridisiert werden. Auf diese Weise können fibrin-spezifische bifunktionale Fab-Konstrukte erzeugt werden, an die über einen Arm rt-PA konjugiert ist.

[0061] Beispiel 13:

Für die photodynamische Diagnostik oder Therapie werden IgY-Präparationen mit Photosensibilisatoren konjugiert. Die photodynamische Therapie stellt ein minimalinvasives Verfahren v. a. zur Behandlung von oberflächlichen Haut- und Schleimhautkarzinomen, Kaposi-Sarkomen und Melanomen dar. Sie beruht auf der tumorselektiven Anreicherung von lichtempfindlichen Substanzen, die ihre photodynamische Wirkung (Fluoreszenz bzw. Bildung

WO 02/092136

24

PCT/DE02/01606

zellschädigender Radikale und Zerstörung der Tumervaskularisierung) durch Absorption von Licht entfalten. Der Erfolg der photodynamischen Therapie hängt entscheidend von der relativen Verteilung des Photosensibilisators im malignen und gesunden Gewebe ab. Die Fixierung des Photosensibilisators an die Tumorzellen kann beispielsweise bei Ösophaguskarzinomen oder malignen Melanomen durch tumorspezifische Antikörper erheblich verstärkt werden. Mit einer geeigneten Lichtquelle können dann Diagnostik oder Therapie erfolgen. Beim diagnostischen Einsatz kommt es unter violettem Licht zur spezifischen Fluoreszenz der maligne entarteten Zellen. Bei der photodynamischen Therapie wird maligne entartetes Gewebe unter der Einwirkung von rotem Licht nekrotisch.

10

15

20

25

Literatur:

- [1] Schade et. al.: Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application. Springer Lab Manual, Berlin 2001);
- 30 [2] Hansen et al., J Immunol Methods 1998, 215(1-2): 1-7;
- [3] Bouhours et al., Glycoconj J 1998, 15(1):93-9;
- [4] Gassmann et al, FASEB J 1990, 4(8): 2528-32).

WO 02/092136

25

PCT/DE02/01606

Patentansprüche

1. Immunkonjugate aus Eidotter-Antikörpern (IgY), bestehend aus einer polyklonalen IgY-
Präparation aus Eiern von transgenen SPF-Hühnern, die polyklonales IgY mit konstanten
5 Regionen von humanem IgG bilden, oder von spezifiziert pathogenfreien (SPF)-Hühnern
gemäß Europäischer Pharmakopoe und DAB10 und mindestens einem Signal- und/oder
Wirkstoff und/oder Verstärker-Molekül.
2. Immunkonjugate aus Eidotter-Antikörpern (IgY) nach Anspruch 1, wobei die polyklonale
10 Igy-Präparation gereinigte Eidotter-Antikörper (IgY), IgY-Fragmente, Fab-Konstrukte
oder chimäre Eidotter-Antikörper sind.
3. Immunkonjugate nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die für die Zubereitung
verwendeten IgY-Präparationen humanisierte Eidotter-Antikörper enthalten, die durch
15 chemische Verknüpfung von variablen Regionen aviärer Antikörper mit konstanten Regio-
nen von humanem IgG erzeugt sind.
4. Immunkonjugate nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die IgY-
Präparation aus mono- oder bivalenten Antikörperfragmenten, vorzugsweise Fab oder
20 F(ab)₂, besteht.
5. Immunkonjugate nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die IgY-
Präparation aus bi-, tri- oder polyspezifischen Fab-Konstrukten besteht.
- 25 6. Immunkonjugate nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Signalstoff ein
diagnostisches Radionuklid, ein Enzym, ein Farbstoff und/oder ein Photosensibilisator ist.
7. Immunkonjugate nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Wirkstoff ein the-
rapeutisches Radionuklid, ein Zytostatikum, ein Toxin, ein Chemotherapeutikum, ein
30 Prodrug, ein Enzym, ein Photosensibilisator und/oder ein Fibrinolytikum ist.
8. Immunkonjugate nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die IgY-Präparation
mit einem Verstärker-Molekül, vorzugsweise mit Biotin oder einem Protein des Komple-
mentsystems konjugiert ist.

WO 02/092136

26

PCT/DE02/01606

9. Immunkonjugate nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Signal- oder Wirkstoff über kovalente Bindung oder mittels eines Hilfsstoffs wie eines Chelatbildners, eines Verstärker-Moleküls und/oder eines für das
- 5 Verstärker-Molekül hochaffinen Moleküls an die IgY-Präparation oder über die variable Region eines oder mehrerer Arme eines bi-, tri- oder polyspezifischen IgY-Konstrukts gebunden ist.
10. Immunkonjugate nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die IgY-Präparation spezifisch ist für Tumorantigene, für Hormone,
- 10 für RNA- und/oder DNA-Abschnitte, für infektiöse Erreger oder ihre (Oberflächen-)Antigene, für Leukozyten-Antigene, für intrazelluläre Moleküle, für Rezeptor-Moleküle oder für Gerinnungsfaktoren.
- 15 11. Immunkonjugate nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Immunkonjugate im Sinne eines Pretargeting erst in vivo nach Bindung an das spezifische Antigen vorzugsweise über Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin mit dem Signal- oder Wirkstoff konjugiert werden.
- 20 12. Immunkonjugate nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Immunkonjugate im Sinne eines Pretargeting erst in vivo nach Bindung an das spezifische Antigen über sekundäre humane anti-IgY-Antikörper mit dem Signal- oder Wirkstoff bzw. Verstärkermolekül konjugiert werden.
- 25 13. Konfektionierung von Eidotter-Antikörpern (IgY) zur Herstellung von Immunkonjugaten wie in den Ansprüchen 1 bis 10 beschrieben, enthaltend mindestens die IgY-Präparation und einen Signal- oder Wirkstoff und/oder ein Verstärker-Molekül sowie zusätzliche Komponenten, wie ein Set für die Qualitätskontrolle per Dünnschicht-Chromatographie, Trennsäulen, Ständer für die Apparatur, Wasch- und Elutionspuffer.
- 30 14. Konfektionierung von IgY-Konjugaten wie in den Ansprüchen 1 bis 10 beschrieben, enthaltend mindestens ein Set für die Qualitätskontrolle per Dünnschicht-Chromatographie und eine Applikationsvorrichtung.

WO 02/092136

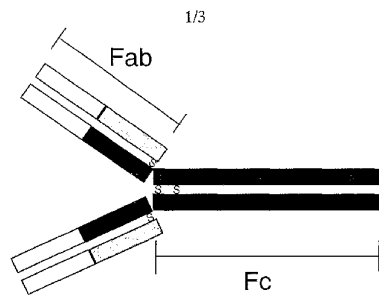
27

PCT/DE02/01606

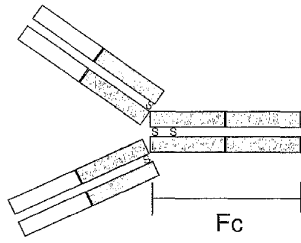
15. Konfektionierung nach den Ansprüchen 11 und 12, wobei die IgY-Präparation in lyophilisierter Form oder Suspension in Verbindung mit Zusatzstoffen wie Stabilisatoren, eingestellt auf einen optimalen pH-Wert, vorliegt.
- 5 16. Immunkonjugate wie in den Ansprüchen 1 bis 10 beschrieben, zur Herstellung eines Diagnostikums oder Therapeutikums, vorzugsweise für nicht-infektiöse Entzündungen, Infektionskrankheiten, Gerinnungsstörungen, Autoimmun-Krankheiten und onkologischen Erkrankungen.

WO 02/092136

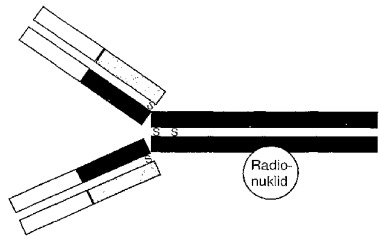
PCT/DE02/01606



Figur 1a



Figur 1b:

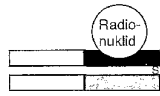


Figur 2:

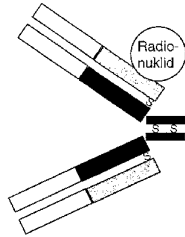
WO 02/092136

PCT/DE02/01606

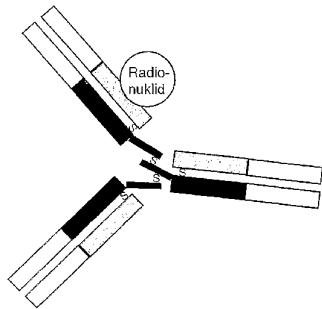
2/3



Figur 3:

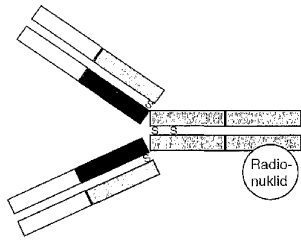


Figur 4:

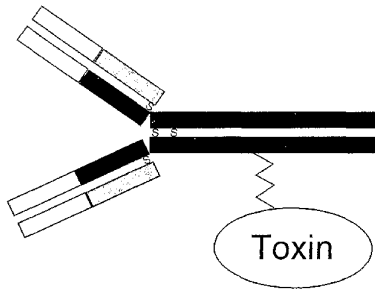


Figur 5:

3/3



Figur 6:



Figur 7:

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/092136 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 51/10, (30) Angaben zur Priorität: 101 23 505.4 15. Mai 2001 (15.05.2001) DE 47/48, 41/00, 49/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01606 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SROKA, Jonchim [DE/DL]; Berliner Strasse 41c, 14797 Damsdorf (DE).

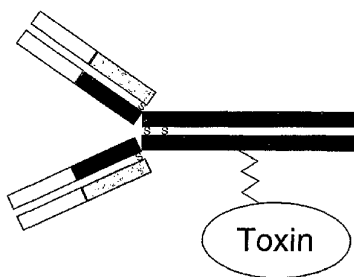
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 2002 (03.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch (71) Anmelder und (72) Erfinder: BERGTER, Wolfgang [DE/DE]; Heidering 45, 30625 Hannover (DE). KOBLKE, Hartmut [DE/DE]; Lehniner Strasse 4, 14797 Damsdorf (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch [Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IMMUNOCONJUGATES MADE OF EGG-YOLK ANTIBODIES (IGY), PRODUCTION AND USE THEREOF IN DIAGNOSES AND THERAPY

(54) Bezeichnung: IMMUNKONJUGAT: AUS EIDOTTER-ANTIKÖRPERN (IGY), DURCH KONFEKTIONIERUNG UND ANWENDUNG IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE



(57) Abstract: The invention relates to immunocjugates made of egg-yolk antibodies (IgY), the production and use thereof in diagnoses and therapy. The aim of the invention is to provide alternative products to traditional immunocjugates for use in diagnoses and therapy. The inventive immunocjugates are superior to monoclonal antibodies and immune serums from mammals in addition to IgY preparations from conventional hens in terms of purity and antigen targeting. The invention seeks to avoid the formation of human anti-IgY antibodies as far as possible, and to produce immunocjugates in large quantities at a low price in a manner which is compatible with animal welfare. This is achieved by polyclonal IgY conjugates from intact egg-yolk antibodies (IgY), IgY fragments, Fab constructions or humanized egg-yolk antibodies from SPF hens, preferably from transgenic SPF hens. The

antibodies or antibody fragments are conjugated as immunologically effective components with at least one other component such as a signaling substance, an active substance or an amplifier module.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Immunkonjugate aus Eidotter-Antikörpern (IgY), deren Konfektionierung und Anwendung in Diagnostik und Therapie. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, alternative Produkte zu herkömmlichen Immunkonjugaten für den diagnostischen und therapeutischen Einsatz vorzuschlagen. Die erfindungsgemäßen Immunkonjugate sind den monoklonalen Antikörpern und Immenserum aus Säugeltieren sowie den IgY-Präparationen aus herkömmlichen Hühnern hinsichtlich Reinheit und Antigen-Targeting überlegen. Die Bildung von humanen anti-IgY-Antikörpern soll zudem möglichst vermieden werden, und die Immunkonjugate sollen sich tierschutzgerecht und in großen Mengen preisgünstig herstellen lassen. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch polyklonale IgY-Konjugate aus intakten Eidotter-Antikörpern (IgY), IgY-Fragmenten, Fab-Konstruktionen oder humanisierten Eidotter-Antikörpern vom SPF-Huhn, vorzugsweise vom transgenen SPF-Huhn. Die Antikörper bzw. Antikörperfragmente sollen als immunologisch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/092136 A3

WO 02/092136 A3 

(74) **Anwalt:** HEITSCH, Wolfgang; Göhlisdorfer Strasse 25 g,
14778 Jessorig (DL).

TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, LU, MC, NL, PT, SI, TR),
OAPI-Patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts: 18. September 2003

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

wirksame Komponente mit mindestens einer weiteren Komponente konjugiert sein, wobei es sich um einen Signalstoff, einen Wirkstoff oder ein Verstärker-Molekül handeln kann.

【手続補正書】

【提出日】平成15年8月16日(2003.8.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヨーロッパ薬局方およびD A B 1 0に従った特定病原体除去(S P F)ニワトリの卵からの多クローン性I g Y製剤から成るか、あるいはトランスジェニックS P Fニワトリの卵からの多クローン性I g Y製剤から成る、非感染性の炎症、感染性疾患、凝固障害、自己免疫疾患および腫瘍の疾患に対する診断剤もしくは治療剤の製造のためのI g Yコンジュゲートであって、この場合、該I g Yコンジュゲートが、ヒトI g Gの定常領域を有する多クローン性I g Yを含みかつさらに少なくとも1つのシグナル物質および/または作用物質および/または増幅分子から成る、I g Yコンジュゲート。

【請求項2】

前記多クローン性I g Y製剤が精製された卵黄抗体(I g Y)、I g Yフラグメント、F a b構成体またはキメラ卵黄抗体である、請求項1記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項3】

調製に使用される前記I g Y製剤が、鳥類の抗体の可変領域とヒトI g Gの定常領域との化学結合によって得られたヒト化卵黄抗体を含むことを特徴とする、請求項1記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項4】

前記I g Y製剤が一価もしくは二価の抗体フラグメント、好ましくはF a bまたはF (a b)₂、から成ることを特徴とする、請求項1または2記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項5】

前記I g Y製剤が二種特異性、三種特異性もしくは多特異性のF a b構成体から成ることを特徴とする、請求項1または2記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項6】

前記シグナル物質が診断用放射性核種、酵素、色素および/または光増感剤であることを特徴とする、請求項1記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項7】

前記作用物質が治療用の放射性核種、細胞増殖抑制剤、毒素、化学療法剤、プロドラッグ、酵素、光増感剤および/または線維素溶解薬剤であることを特徴とする、請求項1記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項8】

前記I g Y製剤が増幅分子、好ましくはビオチン、または補体システムのタンパク質と結合していることを特徴とする、請求項1記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項9】

前記シグナル物質もしくは作用物質が共役結合により、または助剤、例えばキレート剤、増幅分子および/または該増幅分子に対して高親和性の分子、を用いて前記I g Y製剤に、あるいは二種特異性、三種特異性もしくは多特異性のI g Y構成体の1つ以上の腕の可変領域を介して結合していることを特徴とする、前記請求項のいずれか1項に記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項10】

前記I g Y製剤が腫瘍抗原に対して、ホルモンに対して、R N A断片および/またはD N A断片に対して、感染性病原体もしくはその(表面)抗原に対して、白血球抗原に対して、細胞内分子に対して、受容体分子に対して、あるいは凝固因子に対して特異的であることを特徴とする、前記請求項のいずれか1項に記載のI g Yコンジュゲート。

【請求項 1 1】

前記免疫コンジュゲートがプレターゲッティングの範囲内で先ずインビボで特異抗原に結合した後で好ましくはビオチン/アビジンもしくはビオチン/ストレプトアビジンを介してシグナル物質もしくは作用物質と結合する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の I g Y コンジュゲート。

【請求項 1 2】

前記免疫コンジュゲートがプレターゲッティングの範囲内で先ずインビボで特異抗原に結合した後で二次ヒト抗 I g Y 抗体を介してシグナル物質もしくは作用物質ないしは増幅分子と結合する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の I g Y コンジュゲート。

【請求項 1 3】

薄層クロマトグラフィー、分離塔、装置用のスタンド、洗浄 および溶離緩衝液による品質管理用セット少なくとも 1 個が添えられた、請求項 1 から 1 2 までのいずれか 1 項に記載された I g Y コンジュゲートのコンフェクショニング。

【請求項 1 4】

前記 I g Y コンジュゲートが凍結乾燥された形で用意されているかあるいは、最適な pH 値に調整された、添加剤、例えば安定剤、と組み合わせられた懸濁液の形で用意されている、請求項 1 3 記載のコンフェクショニング。

【請求項 1 5】

適用のための装置が添えられた、請求項 1 3 記載の I g Y コンジュゲートのコンフェクショニング。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 1】

本発明は、請求項 1 および 1 3 の特徴部に記載の、卵黄抗体 (I g Y) からの I g Y コンジュゲートおよび、診断剤もしくは治療剤のためのそのコンフェクション (Kon f e k t i o n i e r u n g) に関する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

したがって本発明の課題は、従来の免疫コンジュゲートに対する代替の生成物であって、診断剤もしくは治療剤として適しており、その際、哺乳類からの単クローン抗体および免疫血清ならびに常用のニワトリからの I g Y 製剤を純度および抗原ターゲッティングに関して優れている生成物を開発しかつ提供することである。そのうえ、ヒト抗 I g Y 抗体の形成はできるだけ回避されるべきであり、かつ、該免疫コンジュゲートは、動物保護に適合しかつ大量に安価に製造されることができなければならない。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 1】

本発明は、卵黄抗体 (I g Y) からの I g Y コンジュゲートおよび診断剤への、または、ならびに動物モデル (例えばマウス、ヒツジまたはヒトではない霊長類) における実験的使用のための該 I g Y コンジュゲートのコンフェクショニングに関する。該 I g Y コンジ

ュゲートの使用は、非経口的適用に限定されておらず、使用目的に応じて外的適用（例えば黒色腫の場合）および経口的適用（例えば食道癌の場合）も含む。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

そのうえ本発明は、各成分の形での、標識セット（Markierungsbesteck）（いわゆるキット）の形での、またはすぐに使用できる製剤の形での、すぐに使用できる診断剤もしくは医薬品としてのIgYコンジュゲートのコンフュクシヨニングに関する。標的抗原として全てのタンパク質、ペプチド、糖タンパク質、核酸、多糖およびリポタンパク質が考慮の対象となる。本発明は、とりわけ腫瘍抗原、ホルモン、受容体タンパク質、RNA断片およびDNA断片、感染性病原体、プリオンまたはこれら標的抗原の抗原決定基の部分に対するIgYコンジュゲートに関する。この場合、本発明によるIgYコンジュゲートは、免疫に使用される抗原の複雑度に応じて多少とも多特異性のIgYを含んでいてもよい。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

d) 増幅分子

診断剤もしくは治療剤へとコンフュクシヨニングされる、本発明によるIgYコンジュゲートは、アビジンビオチンもしくはストレプトアビジンビオチン結合を基礎としてシグナルもしくは作用を増幅する（いわゆるプレターゲットィング）ためにビオチンを含有していてもよい。さらにIgYコンジュゲートのシグナルもしくは作用は、IgY分子に結合させることができる更なる成分によって増幅することができる（例えば補体）。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/01606
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K51/10 A61K47/48 A61K41/00 A61K49/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WD 95 02612 A (JACKOWSKI GEORGE ;SPECTRAL DIAGNOSTICS INC (CA); TAKAHASHI MIKOYO) 26 January 1995 (1995-01-26) claims 7-18	1,12-14
X	--- KIM, HYUN-OCK ET AL: "Reusability of Avidin - Biotinylated Immunoglobulin Y Columns in Immunoaffinity Chromatography" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY (1999), 268(2), 383-397 XP002905439 abstract --- -/-	1,7,11, 12,15,16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		**T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention **X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. **Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 May 2003		Date of mailing of the international search report 13/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DE 02/01606
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; YANG, TAO-LAN ET AL: "Studies on programmed cell death of cancer induced by Igy - ricin A" retrieved from STN Database accession no. 130:108365 XP002242617 abstract & YICHUAN XUEBAO (1998), 25(5), 392-397 , ---</p>	1-16
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LIU, LIANRUI ET AL: "Anti-stomach cancer immunoglobulin Y- ricin A conjugate for cancer targeting therapy" retrieved from STN Database accession no. 122:64353 XP002242618 abstract & CN 1 085 910 A (GENETICS INSTITUTE, PEOP. REP. CHINA) 27 April 1994 (1994-04-27) ---</p>	1-16
X	<p>LIU, L. R. ET AL: "Studies on antibody- Igy against stomach cancer" RECENT ADV. CHEM. MOL. BIOL. CANCER RES., INT. SYMP. (1993), MEETING DATE 1991, 195-200. EDITOR(S): DAI, QIANHUAN; ARMOUR, MARGARET-ANN; ZHENG, QINGYING. PUBLISHER: SCIENCE PRESS, BEIJING, PEOP. REP. CHINA. ' XP008017611 abstract; table 1 ---</p>	1-16
X	<p>DE 197 37 453 A (BIOLOG CHEMISCHES I HOPPEGARTE) 4 March 1999 (1999-03-04) claims ---</p>	1,13,14
X	<p>LEE S C ET AL: "PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-ANTIPLASMIN WITH CHICKEN IGY SPECIFIC TO ITS CARBOXY-TERMINAL PEPTIDE" PREPARATIVE BIOCHEMISTRY, NEW YORK, NY, US, vol. 27, no. 4, 1997, pages 227-237, XP002918319 abstract ---</p>	13,14
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/DE 02/01606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HORIE, NORIKO ET AL: "Sustained-release preparations containing emulsified compositions" retrieved from STN Database accession no. 132:227451 XP002242619 abstract & JP 2000 080027 A (TAIYO KAGAKU CO., LTD., JAPAN) 21 March 2000 (2000-03-21)	13-15
X	CIPOLLA A ET AL: "Campylobacter fetus diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates." ALTEX: ALTERNATIVEN ZU TIEREXPERIMENTEN. GERMANY 2001, vol. 18, no. 3, 2001, pages 165-170, XP008017617 ISSN: 0946-7785 page 167, column 2, paragraph 2.5	1-3,6, 10,13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE 02/01606
--

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(d) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 02/01606

Continuation of Box I, 2

The current Claims 1 to 16 relate to a disproportionately large number of possible compounds. In fact, they cover so many possible choices that they appear so unclear (and/or so broad) within the meaning of PCT Article 6 that it is impossible to carry out a meaningful search. Therefore the search was directed to the parts of the claims which can be considered clear (and/or concise), that is, a search was carried out for compounds as indicated in the embodiments, for example.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 on patent family members

International Application No.
 PCT/DE 02/01606

Patent document Cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9502612 A	26-01-1995	AU 4553993 A	13-02-1995
		WO 9502612 A1	26-01-1995
		EP 0710252 A1	08-05-1996
		US 5604105 A	18-02-1997
		US 5747274 A	05-05-1998
		US 5744358 A	28-04-1998
		US 5710008 A	20-01-1998
		ZA 9404547 A	17-02-1995
CN 1085910 A	27-04-1994	NONE	
DE 19737453 A	04-03-1999	DE 19737453 A1	04-03-1999
JP 2000080027 A	21-03-2000	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02/01606
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61K51/10 A61K47/48 A61K41/00 A61K49/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, CHEM ABS Data, PAJ, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 02612 A (JACKOWSKI GEORGE ;SPECTRAL DIAGNOSTICS INC (CA); TAKAHASHI MIKOYO) 26. Januar 1995 (1995-01-26) Ansprüche 7-18	1, 12-14
X	KIM, HYUN-OCK ET AL: "Reusability of Avidin - Biotinylated Immunoglobulin Y Columns in Immunoaffinity Chromatography" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY (1999), 268(2), 383-397 XP002905439 Zusammenfassung	1, 7, 11, 12, 15, 16
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ** Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *B* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *C* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgestellt) *D* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *E* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *F* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *G* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *H* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *I* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
28. Mai 2003		13/06/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bevollmächtigter Berte, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/DE 02/01606

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; YANG, TAO-LAN ET AL: "Studies on programmed cell death of cancer induced by IgY - ricin A" retrieved from STN Database accession no. 130:108365 XPO02242617 Zusammenfassung & YICHUAN XUEBAO (1998), 25(5), 392-397 , ---	1-16
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LIU, LIANRUI ET AL: "Anti-stomach cancer immunoglobulin Y- ricin A conjugate for cancer targeting therapy" retrieved from STN Database accession no. 122:64353 XPO02242618 Zusammenfassung & CN 1 085 910 A (GENETICS INSTITUTE, PEOP. REP. CHINA) 27. April 1994 (1994-04-27) ---	1-16
X	LIU, L. R. ET AL: "Studies on antibody- IgY against stomach cancer" RECENT ADV. CHEM. MOL. BIOL. CANCER RES., INT. SYMP. (1993), MEETING DATE 1991, 195-200. EDITOR(S): DAI, QIANHUAN; ARMOUR, MARGARET-ANN; ZHENG, QINGYING. PUBLISHER: SCIENCE PRESS, BEIJING, PEOP. REP. CHINA. ; XPO08017611 Zusammenfassung; Tabelle 1 ---	1-16
X	DE 197 37 453 A (BIOLOG CHEMISCHES I HOPPEGARTE) 4. März 1999 (1999-03-04) Ansprüche ---	1,13,14
X	LEE S C ET AL: "PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-ANTIPLASMIN WITH CHICKEN IGY SPECIFIC TO ITS CARBOXY-TERMINAL PEPTIDE" PREPARATIVE BIOCHEMISTRY, NEW YORK, NY, US, Bd. 27, Nr. 4, 1997, Seiten 227-237, XPO02918319 Zusammenfassung --- -/--	13,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internat. Aktenzeichen
 PCT/DE 02/01606

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HDRIE, NORIKO ET AL: "Sustained-release preparations containing emulsified compositions" retrieved from STN Database accession no. 132:227451 XPO02242619 Zusammenfassung & JP 2000 080027 A (TAIYO KAGAKU CO., LTD., JAPAN) 21. März 2000 (2000-03-21) -----	13-15
X	CIPOLLA A ET AL: "Campylobacter fetus diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates." ALTEX: ALTERNATIVEN ZU TIEREXPERIMENTEN. GERMANY 2001, Bd. 18, Nr. 3, 2001, Seiten 165-170, XPO08017617 ISSN: 0946-7785 Seite 167, Spalte 2, Absatz 2.5 -----	1-3,6, 10,13-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen
PCT/DE 02/01606

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02 /01606

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-16 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten können, nämlich Verbindungen recherchiert wurden, z.B. wie diese in den Ausführungsbeispielen angegeben sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internationales Akkordzeichen	
Angaben zu Veröffentlichung		zu selben Patentfamilie gehören		PCT/DE 02/01606	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung		
WO 9502612	A	26-01-1995	AU 4553993 A	13-02-1995	
			WO 9502612 A1	26-01-1995	
			EP 0710252 A1	08-05-1996	
			US 5604105 A	18-02-1997	
			US 5747274 A	05-05-1998	
			US 5744358 A	28-04-1998	
			US 5710008 A	20-01-1998	
			ZA 9404547 A	17-02-1995	
CN 1085910	A	27-04-1994	KEINE		
DE 19737453	A	04-03-1999	DE 19737453 A1	04-03-1999	
JP 2000080027	A	21-03-2000	KEINE		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A
	A 6 1 K 49/02	B
	A 6 1 K 43/00	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100092244
弁理士 三原 恒男

(74) 代理人 100093919
弁理士 奥村 義道

(74) 代理人 100111486
弁理士 鍛冶澤 實

(72) 発明者 ベルクター・ヴォルフガング
ドイツ連邦共和国、3 0 6 2 5 ハノーバー、ハイデリング、4 5

(72) 発明者 コビルケ・ハルトムート
ドイツ連邦共和国、1 4 7 9 7 ダムスドルフ、レーニナー・ストラッセ、4

F ターム(参考) 4C084 AA11 AA12 NA13 ZB262
4C085 AA13 AA25 AA26 BB11 CC04 DD88 HH03 JJ02 KB09 KB18
LL18

【要約の続き】

【選択図】図7

专利名称(译)	蛋黄抗体 (IGY) 的免疫偶联物 , 其成型及其在诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	JP2004534752A	公开(公告)日	2004-11-18
申请号	JP2002589052	申请日	2002-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	Surokayoahimu 伯格之三沃尔夫冈 コビルケハルトムート		
申请(专利权)人(译)	约阿希姆首诗 Berukuta沃尔夫冈 Kobiruke - 哈特穆特		
[标]发明人	ベルクターヴォルフガング コビルケハルトムート		
发明人	ベルクターヴォルフガング コビルケハルトムート		
IPC分类号	G01N33/531 A61K39/395 A61K41/00 A61K47/48 A61K51/00 A61K51/10 A61P7/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02		
CPC分类号	A61K41/0057 A61K41/0071 A61K47/6898 A61K51/1006 A61K51/1027 A61K51/1036 A61K51/1093 A61P29/00 B82Y5/00		
FI分类号	A61K49/02.A A61K39/395.C A61K41/00 A61P7/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 G01N33/531.A A61K49/02.B A61K43/00		
F-TERM分类号	4C084/AA11 4C084/AA12 4C084/NA13 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/DD88 4C085/HH03 4C085/JJ02 4C085/KB09 4C085/KB18 4C085/LL18		
优先权	10123505 2001-05-15 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及来自蛋黄抗体 (IgY) 的免疫缀合物 , 其制备以及在诊断和治疗中的用途。 本发明的目的是提出用于诊断和治疗用途的常规免疫缀合物的替代产品。 就哺乳动物的单克隆抗体和免疫血清和常规鸡的IgY制剂的纯度和抗原靶向性而言, 本发明的免疫缀合物是极好的。 此外, 应尽可能避免形成人抗IgY抗体, 并且免疫缀合物应与动物保护兼容, 并且廉价生产。 根据本发明, 该问题是通过来自SPF鸡, 优选转基因SPF鸡, 完整蛋黄抗体 (IgY) , IgY片段, Fab构建体或人源化蛋黄抗体的多克隆IgY缀合物来实现的。 将解决。 假定抗体或抗体片段与至少一种其他成分结合, 所述其他成分可以是信号物质, 激动剂或扩增分子, 作为具有免疫作用的成分。 [选择图]图7

