

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 530126**

(P2003 - 530126A)

(43)公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/02		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395			E 4 B 0 6 4
			H 4 C 0 8 5
			T 4 H 0 4 5
			U

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 62数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 575649(P2001 - 575649)	(71)出願人	シンテック ディアグノスティクス ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
(86)(22)出願日	平成13年4月4日(2001.4.4)		スイス国 ツーク バーラー シュトラ セ 8
(85)翻訳文提出日	平成14年10月7日(2002.10.7)	(72)発明者	イヴァン エフ ベーネス
(86)国際出願番号	PCT/EP01/03867		スイス国 フォルヒ イム ドルナッハ 7
(87)国際公開番号	W001/077179	(72)発明者	ジルケ トムセン - ボスレート
(87)国際公開日	平成13年10月18日(2001.10.18)		ドイツ連邦共和国 ベルリン アム カー ルシュラーク 9
(31)優先権主張番号	100 16 877.9	(74)代理人	弁理士 矢野 敏雄 (外4名)
(32)優先日	平成12年4月5日(2000.4.5)		
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高い免疫反応性を有するタンパク質及びその製造方法

(57)【要約】

本発明は (糖 - ) タンパク質、特に > 8 1 %、有利には > 9 0 %の免疫反応性を有するモノクローナル抗体に関する。本発明によるモノクローナル抗体は流動床反応器を使用して完溶のタンパク質化学的精製方法又は有利には少カラム精製方法と組み合わせて製造される。こうして製造されたモノクローナル抗体は - 線、例えば T c - 9 9 mで標識された形で炎症性疾患及び骨髄転移のインピボ診断のために適当である。 - 線又は - 線、例えばアスタチン又は R e - 1 8 8 もしくは Y - 9 0で標識された形において、本発明によるモノクローナル抗体を、例えば白血病の治療のために使用できる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 免疫反応性のタンパク質の調製物において、変更されたL i n d m o 試験で測定された免疫反応性分子のパーセント割合が分子の全体数に対して > 81%であることを特徴とする調製物。

【請求項2】 変更されたL i n d m o 試験で測定された免疫反応性分子のパーセント割合が > 90%である、請求項1記載の調製物。

【請求項3】 免疫反応性のタンパク質を、細胞培養での製造、特に組み換え真核性宿主細胞での発現によって作成した、請求項1又は2記載の調製物。

【請求項4】 免疫反応性のタンパク質が標識、特に放射性標識を有する、請求項1から3までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項5】 免疫反応性のタンパク質が少なくとも1種の抗体結合ドメインを有する、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項6】 免疫反応性のタンパク質が抗体及び抗体フラグメントから選択される、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項7】 免疫反応性のタンパク質が、少なくとも1つの抗体結合ドメイン及び少なくとも1つのエフェクタードメインを有する融合タンパク質から選択される、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項8】 免疫反応性のタンパク質が悪性細胞及び/又は非悪性細胞の細胞膜上のエピトープに結合する、請求項1から7までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項9】 免疫反応性のタンパク質が正常細胞及び/又は悪性細胞上の細胞質又は細胞外のエピトープに結合する、請求項1から5までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項10】 免疫反応性のタンパク質が、C D 6 6、有利にはC D 6 6 a、C D 6 6 b、C D 6 6 c、C D 6 6 e、特に有利にはC D 6 6 e上のエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項11】 免疫反応性のタンパク質がC D 4 5上のエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製

物。

【請求項12】 免疫反応性のタンパク質がN-CAM上のエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項13】 免疫反応性のタンパク質が、VEGF/VEGFレセプター-複合体上のエピトープに結合し、かつVEGFにもVEGFレセプターにも結合しないモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項14】 免疫反応性のタンパク質が、BW431/26、BW250/183、YTH24.5及びBW278/105から選択されるモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項15】 免疫反応性のタンパク質の調製物の製造方法において、免疫反応性のタンパク質を発現する宿主細胞の適当な培養培地中での流動床反応器-発酵及び宿主細胞及び/又は培養培地からのタンパク質の回収を含むことを特徴とする製造方法。

【請求項16】 真核性宿主細胞を使用する、請求項15記載の方法。

【請求項17】 免疫反応性のタンパク質を、宿主細胞及び/又は培養培地からの少カラム精製法によって回収する、請求項15又は16記載の方法。

【請求項18】 免疫反応性のタンパク質を、宿主細胞及び/又は培養培地から慣用の精製法によって回収する、請求項16記載の方法。

【請求項19】 変更されたLindmo試験で測定された機能的に活性な分子のパーセント割合が分子の全体数に対して>81%である、請求項15から18までのいずれか1項記載の方法。

【請求項20】 変更されたLindmo試験で測定された機能的に活性な分子のパーセント割合が分子の全体数に対して>90%である、請求項15から19までのいずれか1項記載の方法。

【請求項21】 調製物を製造方法Iに相応して製造する、請求項18記載の方法。

【請求項22】 調製物を製造方法IIに相応して製造する、請求項17記

載の方法。

【請求項23】 タンパク質がBW250/183、BW413/26、YTH24.5及びBW278/105から選択されるモノクローナル抗体又は匹敵するマウスの、人化された又は組み換え操作されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントである、請求項15から22までのいずれか1項記載の方法。

【請求項24】 タンパク質が、VEGF/VEGFレセプター-複合体上のエピトープに結合し、かつVEGFにもVEGFレセプターにも結合しないモノクローナル抗体、又は匹敵するマウスの、人化された又は組み換え操作されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントである、請求項15から22までのいずれか1項記載の方法。

【請求項25】 タンパク質が、少なくとも1つの抗体結合ドメイン及び少なくとも1つのエフェクタードメインを有する融合タンパク質である、請求項15から22までのいずれか1項記載の方法。

【請求項26】 炎症性過程及び骨髄置換過程、例えば前立腺癌、乳癌及びリンパ腫からの転移の診断のための薬剤を製造するための、 $\alpha$ -線、例えばTc-99mの担体としての請求項1から14までのいずれか1項記載のタンパク質調製物の使用。

【請求項27】 造血系の疾患、有利には白血病の治療のための薬剤の製造のための $\alpha$ -線及び $\beta$ -線の担体としての請求項1から14までのいずれか1項記載のタンパク質調製物の使用。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

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

**【0002】**

診断用タンパク質及び治療用タンパク質は原核細胞系（例えば *E. coli* (Houston et al., 米国特許第5,132,405号明細書)）及び真核細胞系（例えばピチア パストリス、ベビーハムスター腎臓 (BHK-) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO-) 細胞、ハイブリドーマ、遺伝子導入動物及び植物 (Maeda et al., 米国特許第4,873,316号明細書)）のいずれにおいても発現させることができ、かつタンパク質化学的な方法によって精製することができる。

**【0003】**

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

**【0004】**

複雑な炭化水素を有する（糖 - ）タンパク質の製造のためには、前記に挙げた真核細胞系が使用され、これらは高価な発酵系及び高価な細胞培養培地の使用を必要とする。精製されるべき（糖 - ）タンパク質調製物の状態はその場合、使用される細胞培養培地及び使用される発酵系によって決定的に影響される。とりわけ精製された（糖 - ）タンパク質調製物の原形質中の半値時間並びに規定の生物学的エフェクター機能に影響を有するタンパク質の糖付加における差異は先行文献 (Stahl et al., PNAS, 73(1976),4045-4049) に記載されている。

**【0005】**

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

#### 【0006】

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

#### 【0007】

しかしながらまた、殆どの著者によって使用されるLindmo試験は、著者の方法の一般化可能性に対する要求にもかかわらず放射性標識されたMAkの評価のためだけに適当であり、その結合は高い抗原量の使用下に明らかなプラトーをもたらす。低い結合力のMAkに関して、又は細胞あたり高い抗原密度を発現する細胞が不足している場合には、しばしば明らかなプラトーは達成されない(Mattes, M. J., Int. J. Cancer: 61(1995),286-288)。定義されたプラトーを達成する調査においてさえも、飽和曲線からの値のプロットに応じてLindmo他によって規定された方法に相応して、Y軸との交差点が多様な免疫反応性に導きうる2つの交差線をもたらす(Mattes, M.J., Int. J. Cancer: 61(1995), 286-288, Seite 287, Figur1B und E)。そのため必然的にLindmo法の使

用において、最大の特異的に結合した放射活性割合及び無限の抗原過剰までに推定される値のいずれかを定めねばならない。これらの両方の値の間の差異が > 10%である場合には、推定される免疫反応性値は信頼できるとはいえない (Mattes, M.J., Int. J.Cancer: 61(1995), 286-288, Seite 288)。

#### 【0008】

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

#### 【0009】

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

#### 【0010】

文献から公知の例外はSchubiger他 (Eur.J.Nucl.Med.15:(1989),605-608) によって記載されるGranuloszintであり、その都度の標識法に依存して93%もしくは40%の免疫反応性が記載される。ただ、このMAkは腹水(個人的な報告)の形で製造された。このインビボ法は経済的条件も最新の調節条件も満たさず、かつ本願では例外として考慮されねばならない。更に本願では、実際に特異的に結合するMAk分子の割合がLindmo試験で測定された値よりも低いことが判明した。これは、10000倍のモル過剰の非標識の特異的MAkを添加するにもかかわらず放射性標識されたMAkの、例えば抗原過剰で使用される顆粒細胞への非特異的な結合によって左右される (Schubiger et al., Euro J. Nucl. Med., 15(1989), 605-608)。その結果として、免疫反

応性値は非特異的結合の減算後に < 90% である。

#### 【0011】

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

#### 【0012】

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

#### 【0013】

目下のところ、高価なかつ以下の医薬品製造のために不適な免疫親和性クロマトグラフィー法の使用によってのみ非常に高い免疫反応性成分を獲得することが可能である。この場合、タンパク質化学的に活性な分子とは異ならない機能的に不活性な分子の機能的な活性な分子は抗原カラムへの結合によって機能的に不活性の分子から分離され、かつそれによって濃縮される。免疫親和性クロマトグラフィーのために必要な試薬の製造における高い費用並びに精製時の高い損失にもかかわらず、機能的に活性なMAkの割合は調査目的のために使用される調製物中で < 81% である。

#### 【0014】

標識されていないMAkの免疫反応性割合も放射性標識されたMAkの免疫反応性割合も非特異的結合によって影響なく正確に測定できるために、“変更されたLindmo試験(modifizierter Lindmo-Test)”が開発され、これは例3に詳細に記載されている。この変更されたLindmo試験において非特異的に結合するMAk分子(例えば10000倍の弱いMAkの過剰の存在時の放射性標識の後に見いだされる、Schubiger et al., Euro J. Nucl. Med., 15 (1989),

605-608)の割合は見積もられた免疫反応性値に影響しない。

【0015】

モノクローナル抗体BW250/183 (Eur. J. Nucl. Med. 14(1988), 523-528及びJ. Cancer 36(1985), 75-84)のための製造方法の製造の最適化のための作業範囲において、変更されたLindmo試験で免疫反応性が一般に>95%であるMAkを含有する細胞培養上清を生成する発酵法を構成することに成功したことは意外であった。

【0016】

この細胞培養上清から、慣用の精製方法の使用下にMAk調製物を製造することが可能であり(またGMPに適した)、これらは80~90%の免疫反応性を有する。本願で観察されるべき精製の経過における約10%の免疫反応性の損失は多数のカラムクロマトグラフィー工程によって左右される。

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

従って本発明は免疫反応性タンパク質の調製物に関し、その際、変更されたLindmo試験で測定された免疫反応性分子の分子の全体数に対するパーセント割合が>81%、有利には90%、特に有利には>95%である。免疫反応性タンパク質は細胞培養、特に真核性宿主細胞中での製造によって得られる。免疫反応性タンパク質を活性損失なく標識、特に放射性標識とカップリングさせることができる。

【0020】

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

#### 【0021】

抗体及び抗体フラグメントの他に、また少なくとも1つの抗体結合ドメイン及び1つの他のドメイン、例えばエフェクタードメイン、例えば酵素又はサイトカインを有する融合タンパク質を使用してよい。このための例はscFv-サイトカイン、例えばscFv-IL1、scFv-IL2、scFv-IL6、scFv-IL10、scFv-IL11、scFv-IL12、scFv-TNF、scFv-IFN、scFv-IFN、scFv-IF又はscFv-凝集剤、例えばscFv-tTF、scFv-(デオキシ)リボヌクレアーゼ又は酵素との融合物、例えばBritish J. Cancer 654(1992),234-238に記載される-グルクロニダーゼにヒンジリンカーを介して融合された人化されたMAkBW431/26のVH-CH1重鎖並び人化されたMAkの人化されたVL-CL軽鎖からなる融合タンパク質である。

#### 【0022】

本発明によるタンパク質調製物は流動床反応器中での発酵によって得られる。かかる流動床反応器中で培養された宿主細胞、例えばハイブリドーマ細胞又は別の真核細胞を非常に高い密度でガラス球上で増殖させ、かつ最適に酸素及び栄養物質を供給してよい。死んだ細胞はガラス球から剥離し、かつ連続的に回収された培地で発酵装置から除去する。この場合、プロテアーゼ及び細胞残骸の量を発酵装置中で低く保ち、かつ生成したタンパク質の完全性が保証される。適当な流動床発酵反応器のための例はバイオリアクターPilot B 500 (Papasprou Biotechnologie GmbH)。

#### 【0023】

本発明のタンパク質調製物の免疫反応性の測定は例3に記載される変更された

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

【0024】

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

【0025】

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

【0026】

【表1】

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

【0027】

製造方法 I (特定の) :

真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

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

慣用の精製法によるタンパク質化学的な精製

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

【0028】

製造方法II (特定の)

真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

1. 細胞バンクからの細胞の融解及び、例えばTフラスコ中で培養する
2. 例えばスピナー培養中で細胞を増大させる
3. 流動床反応器中で発酵させる

“少カラム”精製法でのタンパク質化学的な精製

1. 細胞培養培地を回収し、例えばマイクロ濾過によって細胞分離をし、滅

菌濾過及び、例えば - 20 での貯蔵

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

3. 希釈する

4. 界面活性剤で処理する

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

6. 希釈及び滅菌濾過を行う

7. アニオン交換 - 膜吸着を行う

8. 限外濾過によりウイルス濾過を行う

9. 限外濾過及び透析濾過を行う

10. 濾過及び希釈を行う

11. 滅菌濾過を行う。

#### 【0029】

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

#### 【0030】

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

#### 【0031】

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

#### 【0032】

製造方法IIの新規事項は、1つだけのカラムクロマトグラフィー（プロテインA上でのアフィニティークロマトグラフィー）を使用する“少カラム”精製法と組み合わせた流動床反応器を用いた発酵である。他の全ての工程は膜による穏やかな濾過工程又は簡単な希釈工程を表す。それにもかかわらず、該方法では

許可局に規定されたタンパク質化学的純度及びウイルス削減/ウイルス失活に関する要求を満たしている。

【0033】

意想外にも、例えばMAkの製造されるべき(糖-)タンパク質の免疫反応性は全ての試験された段階(Tフラスコ、流動床反応器、精製されたタンパク質)においてMAk BW250/183に関して例1に示されるようにLindm o試験で>90%、それどころか主に95%を示す。匹敵する高い免疫反応性値は、先行技術で記載されないインビトロ製造法での我々の知るところである。

【0034】

類似の高い免疫反応性値は本発明による方法で別のMAk、例えばMAk BW43/26(CD66eに関して選択的)(Eur. J. Nucl. Med. 14(1988),523-528及びInt. J. Cancer 36(1985),75-84)、MAk BW278/105(FVIIIRAGのサブポピュレーションに関して選択的)(J. Histochem. Cytochem. 34(1986),209-214)、MAk BW575/931(N-CAMに関して選択的)(...)及びMAk YTH24.5(CD45に関して選択的)(J. Immunol. 134(1985),3056-3061及びLeucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens (Hrsg. Mc Michael et al.), Oxford University Press, Oxford, pp 788-803)並びにドイツ国特許出願19744531.4号に記載される幾つかのMAk(VEGF/VEGF-レセプター複合体に関して選択的であるが、VEGFにもVEGF-レセプターにも単独には結合しない)に関して判明した。この所見は、本発明による製造法が近似的に100%免疫反応性である(糖-)タンパク質を発酵可能であり、かつ製造方法IIの場合において、検出可能な免疫反応性の損失さえもなく廉価に穏やかかつ迅速に精製できることを裏付ける。

【0035】

更に本発明による製造方法はFc部を有さない多数の(糖-)タンパク質のGMPに適した製造のために使用でき、とりわけBosslet他によって記載される融合タンパク質(British Journal of Cancer, 645(1992),234-238)のために使用でき、その際、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーの代わ

りに代替のアフィニティークロマトグラフィー法が使用される（抗イディオタイプ、レクチンカラム、プロテインL、ニッケル酸など）。

【0036】

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

【0037】

更に本発明は以下の実施例によって図面と組み合わせて説明されるべきである。

【0038】

図1は流動床発酵反応器を示してゐる。

【0039】

該反応器（2）は担体球（4）、例えば有利には0.4～0.7mmの直径を有する開孔性の焼結ガラスからなる、酸処理（例えば2.5NのHCl及び5%の硝酸）が施され、中和後に熱処理（例えば220で6時間）によって滅菌した球で部分的に充填されている。該反応器は更に反応器中の担体球の流動化のためにガス混合物（8）を送り込み、かつ再び導出するベンチレーションモジュール（6）を有する。更に該反応器はpH電極、酸素電極、温度センサなどを備えている。培地は例えば450～500ml/分の流速で循環（10）中を再循環する。該循環は新たな培地の入口（12）、ポンプ（14）及び試料採取バルブ（16）を有してよい。導管（18）を通過して、培地はそこに含まれるタンパク質の回収のために採取される。

【0040】

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

【0041】

図3及び図4は従来技術の調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

【0042】

図5～図7は本発明による調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

【0043】

以下に、MAk、実施例においてはMAk BW250/183に関する典型的な免疫反応性測定の結果を示す。

【0044】

例1

MAk BW250/183 (Eur. J. Nucl. Med. 14(1988), 523-528) の免疫反応性を、変更されたLindmo試験(実施は例3参照)によって、慣用の発酵及び精製の際に本願に記載される発酵法及び精製法(製造方法I及び製造法II)に対して精製の開始前(細胞培養上清)及び精製の完了後(精製されたMAk最終生成物)に測定して比較する。

【0045】

細胞培養上清もしくは精製されたMAk最終生成物のMAk含有試料を、例3に正確に記載されるように処理し、かつ変更されたLindmo試験を指示通りに実施した。ネガティブコントロールとして、同じアイソタイプ(IgG<sub>1</sub>)、同じ軽鎖( )、匹敵する等電点及び無関係の特異性のMAkを使用した。ポジティブコントロールは抗原カラムを通して分析規模で精製された91～94%の免疫反応性を有するMAk BW250/183のバッチである。

【0046】

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

【0047】

1. 慣用の発酵法及び慣用の精製法(先行技術)

a) 慣用の発酵(KF)後の精製されていない細胞培養上清(ZKUE)

第1表:

【0048】

【表2】

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

【0049】

結果曲線を図2Aに示す。

【0050】

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

第2表：

【0051】

【表3】

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

## 【0052】

結果曲線を図2Bに示す。

## 【0053】

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

a) 流動床発酵(WF)後の細胞培養上清(ZKUE)

第3表:

## 【0054】

【表4】

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

【0055】

結果曲線を図2Cに示す。

【0056】

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

第4表：

【0057】

【表5】

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

【0058】

結果曲線を図2Dに示す。

【0059】

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

第5表：

【0060】

【表6】

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

【0061】

結果曲線を図2Eに示す。

【0062】

例1の結果を以下の第6表にまとめる：

MAk BW250/183の免疫反応性

【0063】

【表7】

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

## 【0064】

MAk BW250/183の免疫反応性は明らかに発酵条件及び精製条件に依存する。慣用の発酵において、いずれにせよ細胞上清中では既に80%以下に達するが、流動床反応器による新規の発酵法においては、しかしながら97%を有する免疫反応性は明らかに高い。

## 【0065】

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

## 【0066】

匹敵する結果は同様に別のMAk、例えばMAk BW431/26 (Eur. J. Nucl. Med. 14(1988), 523-528及びInt. J. Cancer 36(1985), 75-84)、MAk BW575/931 (Pediatr. Hematol. Oncol. 6(1989), 73-83)、MAk YTH24.5 (J. Immunol. 134(1985), 3056-3061及びLeucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens (Hrsg. Mc Michael et al.), Oxford University Press, Oxford, pp 788-803)、MAk BW278/105 (J. Hi

stochem. Cytochem. 34(1986), 209-214)、特許出願19744531.4号に記載されるMAk並びにBritish J. Cancer 645, 234-238, 1992に記載される融合タンパク質で達成できる。

【0067】

第7表：

発酵法及び精製法に依存する免疫反応性

【0068】

【表8】

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

## 【0069】

ZKUE：細胞培養上清

GME：精製されたMAk生成物

全ての試験されたMAk及び非常に複雑な(糖-)タンパク質との比較可能な調査結果は融合タンパク質(天然条件下のテトラマーの分子量500kDa)に

到達するので、匹敵する値が原核性及び真核性の系において発酵可能な全てのMAk及び(糖-)タンパク質によって得られ、かつ有利な調査結果を一般化できることから出発することが必要である。

【0070】

慣用の製造法によるか、製造方法I及びIIにより精製されたMAk-バッチのいずれもSchwarz及びSteinstraesserにより記載された方法(J. Nucl. Med., 25(1987), 721)に相応する放射性標識の後に、精製されたMAkタンパク質の免疫反応性と、変更されたLindmo試験の精度の範囲で同一な免疫反応性を示す。該データは以下の第8表にまとめる：

【0071】

【表9】

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

【0072】

期待されない臨床的調査結果

慣用の製造方法(慣用のタンパク質化学的精製により行われる攪拌発酵槽中でのバッチ式発酵;免疫反応性72%)又は新規の製造方法II(流動床反応器二引き続いて“少カラム”精製法;免疫反応性96%)のいずれかによりGMPに適宜に製造されたMAk BW250/183の調製物のアリコート Schwarz及びSteinstraesserによって記載された方法に相応して

Tc-99mで標識した。MAkに結合されたアイソトープの割合は両方の調製物中で99.9%であった。この放射生化学的に同一のMAk調製物によって炎症性疾患もしくは骨髄転移の疑いがある患者に10~20mCiの用量を静脈内に与えた。 - カメラを用いて、全身シンチレーション図を放射性標識されたMAkの静脈内添加の後に2~25時間の時間にわたり前側及び背側から撮影した。

#### 【0073】

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

#### 【0074】

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

#### 【0075】

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

mg)、かつ6.5～12.4GBqを静脈内に適用した。

【0076】

線量測定(Dosimetrische Untersuchung)による調査は以下の表にまとめられるデータを提供した。

【0077】

第9表：

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

【0078】

【表10】

性別	年齢	疾患	マーカー	KM移植の データ	Gyでの器官一線量				
					KM	Mz	Lb	Nie	Lu*
女性	39	AML	T(8;21)	2/98	12,0	7,3	3,8	5,3	n.d
女性	38	AML	なし	3/98	13,0	13,2	6,2	11,3	n.d
男性	52	AML	なし	3/98	8,0	7,0	5,0	11,0	n.d
男性	45	AML	なし	4/98	13,0	12,0	4,0	11,0	n.d
男性	50	CML	T(12;13)	4/98	12,8	18,6	n.d	7,6	n.d
女性	19	c-ALL	なし	5/98	5,9	12,3	1,8	7,1	n.d
男性	44	c-ALL	Ph+	6/98	15,2	12,7	3,2	5,3	0,3
女性	17	AML	なし	7/98	18,4	10,3	4,1	5,0	n.d
男性	50	AML	T(15;17)	8/98	10,9	8,6	2,7	4,4	0,4
女性	32	AML	欠失 染色体 .6	9/98	15,7	6,8	3,0	5,1	0,9
男性	56	B-CLL	なし	9/98	15,7	4,0	2,3	4,5	n.d
女性	36	AML	なし	9/98	13,0	5,6	2,3	15,1	0,6
男性	45	c-ALL	Ph+	11/98	6,5	11,5	2,7	4,5	n.d
女性	19	AML	T(9;11)	11/98	11,4	n.d	7,2	10,1	1,1
女性	40	2. AML (MDS)	なし	12/98	13,8	18,2	5,3	10,1	0,3
男性	51	AML	トリソミー 6,8,21 欠失 11q23	12/98	14,3	6,7	5,9	8,9	0,4
男性	20	CML	Ph+	12/98	11,9	14,3	7,0	5,5	n.d
女性	47	2. AML 形質細胞腫 MDS	T(16;19) P(11;12)	12/98	16,2	7,6	3,7	5,6	0,5
男性*	59	AML	なし	12/98	19,0	14,0	6,0	8,2	0,7

\*KM:骨髄、Mz:脾臓、Lb:肝臓、Nie:腎臓、Lu:肺

### 【0079】

該データは、Re-188標識されたMAk BW250/183(免疫反応性>90%)での放射線免疫治療を用いて白血病を有する患者の骨髄及び脾臓に高い照射線量を局在させることができることを示している。

### 【0080】

患者の集団は2年以内に40~50%の再発リスクを有する患者からなった。意外にも放射性免疫治療は重大な副作用を誘導しなかった。それに応じて、12グレイの全身照射及びシクロホスファミド投与からなる標準的治療を行った。

全ての19人の患者は完全な緩解がもたらされ、これは標準的治療と組み合わせる白血病の治療におけるMAk 250 / 183での放射線免疫治療の将来的な役割のための示唆をもたらす。この場合、放射線免疫治療は副作用の多い全身照射に換わることが可能であると思われる。

#### 【0081】

免疫反応性 > 90%を有するMAk BW 250 / 183の使用の更なる利点は、適用あたり1mgから適用あたり0.5mgに投与されるMAk量を低減できることにある。この低減は2%未満のHAMMA（ヒト抗マウス抗体）頻度に導き、かつそれによって健常者のバックグラウンド - HAMMA値と大きく異ならない。

#### 【0082】

更に意想外にもRES（細網内皮系）における骨髓の早期の転移は免疫反応性90%を有するMAk調製物で見いだされ、約80%の免疫反応性を有する調製物の場合には過剰照射に基づいて肺及び肝臓の活性増大によって明確に検出できなかった。

#### 【0083】

まとめると、本願ではMAk BW 250 / 183の高い免疫反応性バッチを使用することによって - 線、 - 線又は - 線と組み合わせて生じるイメージの質、診断効率、線量測定及び治療効率に関する意想外な利点は定性的にも定量的にも見込まれず、かつより効率的な炎症プロセスの診断及び転移の診断並びに白血病及び他の造血系の疾患の治療のための道を開くことが期待されると思われる。

#### 【0084】

##### 例2

##### 製造方法I

##### 真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

液体室素中に貯蔵されている作業細胞バンクからのアンプルを融解し、かつそこに存在する細胞を標準的細胞培養条件（合成されたタンパク質不含の細胞培養培地）下にTフラスコ中で培養した。全細胞数が $6 \sim 10 \times 10^7$ 細胞に達した

後に、4～6個のTフラスコの内容物を500mlのスピナー容器中で標準的細胞培養条件下で再び培養した。細胞数が $1.5 \sim 2 \times 10^8$ 細胞に達した後に、これらの細胞をそれぞれ1000ml容量を有する2つのスピナー容器に移し、かつ再び培養した。細胞数が $1.2 \sim 1.5 \times 10^9$ 細胞に達した後に、これらの細胞を900mlの細胞培養培地及び200mlのSiran<sup>(R)</sup>担体を含む流動床反応器(Bioreaktor Pilot B 500, Papaspyrou Biotechnologie GmbH, Technologiezentrum Juelich, D-52428 Juelich)中に接種し、かつPapaspyrou Biotechnologie社の取扱指示に相応して36.5で60日間培養した。酸素含量、pH値、グルコース濃度並びにMAk含量を1～4日間隔で調節した。発酵の間に、細胞培養上清を連続的に回収し、かつ4で貯蔵した。

#### 【0085】

##### 慣用の方法によるタンパク質化学的精製

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

#### 【0086】

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

#### 【0087】

引き続き直ちにプロテインA画分を実施する。試料の導入はできるだけ無菌条件下にかつポンプを用いて行われ、その際、流速は1時間あたり1倍乃至2倍の

カラム容量に相当しうるので、MAkとプロテインAとの接触は少なくとも30分間保証される。完全な溶液の導入後に、プロテインA上に結合していないタンパク質及びトライトンを開始バッファーによってカラムから洗浄し、かつ流出物の吸光度/透過率が開始バッファーの開始値に再び到達するまでですすぐ(期間: 0.5~3時間)。MAkの溶出は溶出バッファー、pH3.0によって行われる。溶出液を砕氷で冷却された、約1/10のカラム容量の2Mのトリス/HCl、pH8.0が装入された容器(秤量されたガラスビン)中に収容する。溶出はレコーダの出発値にほぼ到達するまで行われる(精製されたMAk溶液)。

#### 【0088】

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

#### 【0089】

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

#### 【0090】

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

#### 【0091】

該生成物を準備されたQ - セファロースカラムにおいてできる限り無菌条件で1時間あたり150 mlの適用速度で施す(1 mlのQ - セファロースあたり2 ~ 5 mgのタンパク質)。溶出はトリス / HCl - NaCl - バッファ、pH 7.5で1 cm<sup>2</sup>及び1時間あたり約25 mlの流速において実施する。カラムから排出される溶液を流量測光器を介して、引き続きpH / イオンモニタを介して導く。カラムの流動中を移動するMAkを滅菌装置中でUVラインレコーダ - プロフィールに相応して、ラインレコーダにおいて吸光度 / 透過率のほぼ出発値(約95%)が再び記録されるまで回収する(発熱物質が排除されたMAk溶液)。

#### 【0092】

MAkを含有する溶出液のアニオン交換クロマトグラフィー後のpH値を1NのHCl又は1Nの水酸化ナトリウム溶液でpH 6.9に調整する。

#### 【0093】

容量の測定後に、攪拌しながら再び1.5倍量の飽和硫酸アンモニウム溶液を緩慢に添加し、かつ60分間攪拌する。引き続き該懸濁液を一晩4で、澄明な上清が生じるまで放置する。該バッチを振盪し、かつ8525 gで60分間室温で遠心分離する。上清をデカンテーションにより分離し、沈殿物を遠心分離ビーカー中にまとめ(MAk - 硫酸アンモニウムペースト)、かつリン酸ナトリウム - NaCl - ソルビトール - バッファ、pH 7.2でできるだけ濃縮して溶解させる(1部の沈殿物に対して1 ~ 3部のバッファ)。

#### 【0094】

澄明になったタンパク質溶液を直ちに、リン酸ナトリウム - NaCl - ソルビトール - バッファ、pH 7.2で平衡化されたセファデックスG - 25を含有する再生されたカラムにおいてできる限り滅菌条件下に施す(多くてカラム容量の15%)。カラムから排出される溶液を流量測光器を介し、かつ引き続きpH / イオンモニタを介して導く。これらのカラムをリン酸ナトリウム - NaCl -

ソルビトールバッファー、pH 7.2 (流速  $1 \text{ cm}^2$  及び1時間あたり約  $20 \text{ ml}$ ) で後すすぎする。カラムの流出容量中を移動するMAkを滅菌受容器中にUV-ラインレコーダ-プロフィールに相当して、ラインレコーダにおいて吸光度/透過率のほぼ出発値(約95%)が再び記録されるまで回収する。pH/イオンモニタは更なる導電性の変化を示さない(MAk-バルク溶液、濃縮)。

#### 【0095】

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

#### 【0096】

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

#### 【0097】

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

#### 【0098】

### 製造方法II

#### 真核細胞の培養及び流動床反応器中でのその発酵

液体室素中に貯蔵されている作業細胞バンクからのアンプルを融解し、かつそこに存在する細胞を標準的な細胞培養条件(合成されたタンパク質不含の細胞培養培地)下でTフラスコ中で培養する。全細胞数が  $6 \sim 10 \times 10^7$  細胞に達したら、4~6つのTフラスコの内容物を  $500 \text{ ml}$  のスピナー容器中で標準的な細胞培養条件下に再び培養する。細胞数が  $1.5 \sim 2 \times 10^8$  細胞に達したら、これらの細胞をそれぞれ  $1000 \text{ ml}$  の容量を有する2つのスピナー容器に移し、かつ更に培養する。細胞数が  $1.2 \sim 1.5 \times 10^9$  細胞に達したら、細胞を  $900 \text{ ml}$  の細胞培養培地及び  $250 \text{ ml}$  のSiran<sup>(R)</sup>担体を含有する流動床反応器(Bioreaktor Pilot B 500, Papaspyrou Biotechnologie GmbH, Technologiezentrum Juelich, D-52428 Juelich)中に接種し、かつPapaspyrou Biotechnologie社の取扱手順に相応して  $36.5^\circ\text{C}$  で6

0日間培養する。酸素含量、pH値、グルコース濃度並びにMAk含量を1～4日間隔で調節する。発酵の間に、細胞培養上清を連続的に回収し、かつ4で貯蔵する。

#### 【0099】

##### “少カラム”方法によるタンパク質化学的精製

181の細胞培養培地が回収されたら、“タンジェンシャルフロー”マイクロ濾過を用いて、引き続き0.2μmフィルタによる滅菌濾過によって実施する。細胞不含及び滅菌の細胞培養回収物を、更なる精製のために十分な細胞培養回収物が存在するまで-20で貯蔵する(約250lの細胞培養培地からの細胞培養回収物)。予定されるバッチサイズが達成されたら、滅菌の細胞培養回収物を融解し、マイクロ濾過によって澄清化し、かつ超遠心分離によって100～150倍に濃縮する。次いで超遠心分離物を2倍に濃縮された同容量の開始バッファー(pH8.6)と混合し、滅菌濾過する。滅菌条件下に滅菌されたトライトンX-100溶液(100gのトライトン/l)を0.5%のトライトンの最終濃度になるまで攪拌下に添加する。エンベロープを有するウイルスの失活のために、該溶液を4～18時間4で放置する。

#### 【0100】

次いでトライトンで処理された超濃縮物を、予め5カラム容量の開始バッファーで平衡化されているプロテインA-セファロース-4-ファストフロー(Fast-Flow)カラムにポンプ導入する。結合していないタンパク質及びトライトンX-100を5カラム容量の開始バッファーでカラムから洗浄する。引き続きプロテインAに結合するMAkを溶出バッファー(pH3.0)でカラムから溶出させ、かつ130mlの中和バッファー(pH8)中に収容する。次いで中和バッファー中に収容されたMAkのpHを必要に応じてNaOHを用いてpH7～7.5に調整し、同容量の2×膜吸着バッファー(pH7.5)で希釈し、滅菌濾過する。引き続き、MAk溶液を滅菌条件下に、予めWFI及び吸着バッファー(pH7.5)で平衡化された膜吸着器(Membranadsorber)にポンプ導入する。MAkを含有する、事実上含有する発熱物質及びDNA不含の流量を滅菌容器に回収し、バッファー(pH7.5)を用いて500μgのMAk/mlに調整

する。次いで希釈されたM A k 溶液を超遠心分離によってV i r a g a r d 中空繊維モジュールを用いて潜在的に有するウイルスを排除する。ウイルス不含のM A k を含有する透過物を超遠心分離によって4 ~ 5 m g のM A k / m l の濃度に濃縮し、かつエンドバッファー ( p H 7 . 2 ) に対して透析濾過する。滅菌濾過、エンドバッファー中での希釈及び再度の滅菌濾過の後にM A k をバルク品として充填する。

#### 【0101】

##### 例3

##### L i n d m o による変更された定量的な免疫反応性試験 導入

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

#### 【0102】

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

#### 【0103】

b ) 該試験は非特異的な結合の不在下に免疫反応性の測定を可能にする。

#### 【0104】

##### 材料

##### 1 . 1 化学薬品及び材料

名称	注文先	注文番号
ホルムアルデヒド溶液、37%	Merck	818708
リン酸二水素ナトリウム - 1 - 水和物	Merck	6346
リン酸水素二ナトリウム - 2 - 水和物	Merck	30412
P B S	Behringwerke	
グリシン	Merck	104201

96ウェルのマイクロタイタープレート B型	Nunc	4-60445
ヤギ抗マウスIgG (“捕捉体”) Enzygnostのための Tween/PBS	Sigma	M8642
カゼイン	Behringwerke	OSWE96
アルカリ性ホスファターゼとカップリング されたヤギ抗マウスIgG抗体	Sigma	C5890
4-メチル-ウンベリフェリル- ホスフェート	SBS	107-04
SDS	Sigma	M8276
1.2 装置		L5750
遠心分離器	Heraeus	
ミニチューブ、1.0ml	Kuehn&Bayer	64698446
回転装置	Heidolph	Reo x 2
分析秤	Mettler	DE100
マグネットスターラー	IKA	RCT
pHメーター	WTW	
ムーリネット (Moulinette)	moulinex	
フルオロスキャン11	Merlin	

#### 必要な溶液の製造

##### リリーによる4%のホルムアルデヒド溶液

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

【0105】

- 溶液のpH値はpH7.0であった。

【0106】

洗浄溶液：0.05 Mのトリス - クエン酸バッファー、pH 7.4

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

【0107】

ブロッキング溶液：PBS中1%のカゼイン、pH 7.2

- 10 gのカゼインを
- 1 lの冷PBS、pH 7.2 + フェノールレッド中で
- 30分間攪拌させ、
- 引き続き3000 rpmで遠心分離し、かつ
- 上清を折り畳みフィルタを介して濾過する。

【0108】

- 溶液のpH値をNaOHで調整する。

【0109】

基質バッファー：0.5 Mのトリス、0.01%のMgCl、pH 9.6

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

【0110】

4 - メチル - ウンベリフェリル - ホスフェート (MUP) 溶液

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

。

【0111】

停止溶液：0.2 Mのグリシン、0.2%のSDS、pH 11.7

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

【0112】

- 該溶液のpH値を5NのNaOHで調整する。

【0113】

変更されたLindmoにおける定量的免疫反応性試験の実施

1. 抗原を含有する材料の製造 (“抗原含有材料”; ACM)

- BW250/183のエピトープを発現するヒトの腫瘍異種移植片(MZ-STO1, 胃ガン)の組織(顆粒細胞の膜上に発現する“非特異的交差反応抗原”(NCA-95))をムーリネットを用いて2~5mmの切片に切断し、かつ
- 室温で4%のリリーによるホルムアルデヒド溶液中で少なくとも16時間固定化する。

【0114】

- 洗浄の後に固定化された組織をステンレススチールネットに通過させる。

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

2. 抗原過剰での結合アッセイ

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

【0118】

- 次いで該細胞を更にPBSで4回洗浄する。

【0119】

- ACMの増加量(0.1~50mg)を1mlのミニチューブ中に添加し、かつ25ngのMAk BW250/183を含有する500µlのハイブリ

ドーマ上清と一緒に室温で一晩インキュベートする（上向き回転）。

【0120】

- ネガティブコントロールを同一のアイソタイプを示す（IgG<sub>1</sub>）25 ngの抗マイコプラズマMAk BW227/7と一緒にインキュベートする。

【0121】

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

【0122】

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

- 96ウェルのポリスチレン - マイクロタイタープレートを50 µlのヤギ抗マウスIgG抗血清を用いて1ウェルあたり2.5 µl/mlで一晩インキュベートする。

【0123】

- ウサギ抗マウスIgG抗血清を引き続き吸い取り、かつこれらのプレートを0.05 Mのトリス - クエン酸バッファー、pH 7.4で4回洗浄する（洗浄プロセス = 1ウェルあたり200 µlをピペティングし、かつ吸い取る）。

【0124】

- マイクロタイタープレートをセルロース上で逆さにして一晩乾燥させる。

【0125】

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

【0126】

遊離の結合部位のブロッキング

- 200 µlのブロッキング溶液を1ウェルあたりにピペティングし、かつ該プレートを室温で60分間インキュベートする。

【0127】

- 引き続きブロッキング溶液を吸い取る。

【0128】

#### 試料適用

- 結合されていないマウス-IgG分子の総数に関して分析されるべき50  $\mu$ lのACM上清を1ウェルあたりに適用し、かつ室温で60分間インキュベートする。

【0129】

- 次いでマイクロタイタープレートを前記のように洗浄溶液で3回洗浄する。

【0130】

#### 増幅及び検出

- 50  $\mu$ lの、アルカリ性ホスファターゼとカップリングされた1:250で希釈したヤギ抗マウスIgG抗体を1ウェルあたりに適用し、かつ室温で30分間インキュベートする。

【0131】

- マイクロタイタープレートを前記のように洗浄溶液で3回洗浄する。

【0132】

- 50  $\mu$ lのMUP溶液を1ウェルあたりに適用し、かつ室温で30分間インキュベートする。

【0133】

- 基質反応を室温で30分間インキュベートした後で100  $\mu$ lの停止溶液の添加によって停止させる。

【0134】

- 引き続き蛍光を測定する：励起波長は355 nmであり、かつ放出波長は460 nmである。

【0135】

この試験の感度は1~2 ngのマウスIgG/mlの範囲にある。

【0136】

#### 免疫反応性の数学的測定

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

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

## 【0137】

## 例4

Tc-99m標識されたMAk BW250/183の注入により記録されるシンチレーシヨングラム

Tc-99mでの標識のために使用されるMAkバッチはその製造方法に基づいてそれらの免疫反応性において異なる。これらのデータを以下の第10表にまとめる。

## 【0138】

## 【表11】

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

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は流動床発酵反応器を示してゐる。

## 【図2】

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

## 【図3】

図3は従来の技術の調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

## 【図4】

図4は従来の技術の調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

## 【図5】

図5は本発明による調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

## 【図6】

図6は本発明による調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

## 【図7】

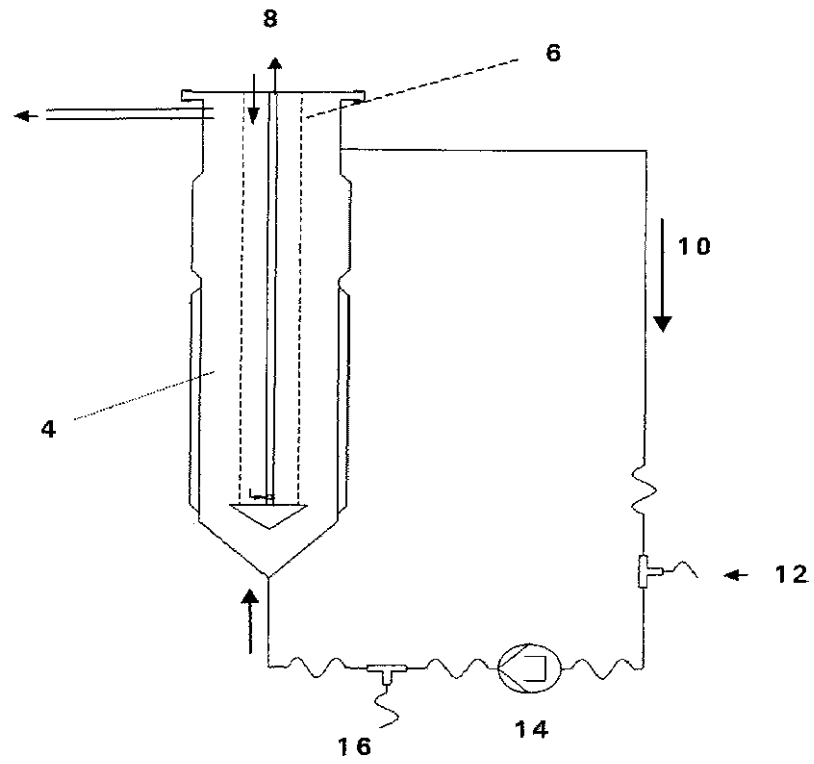
図7は本発明による調製物からのTC-99m標識されたモノクローナル抗体によるシンチレーション図を示す。

## 【符号の説明】

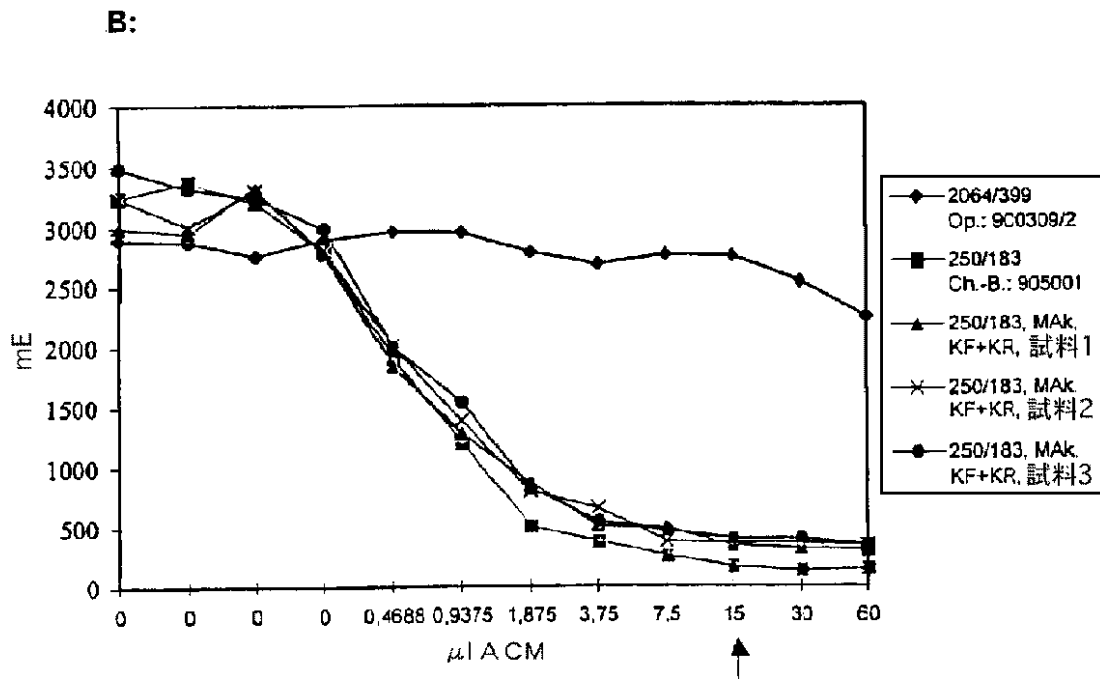
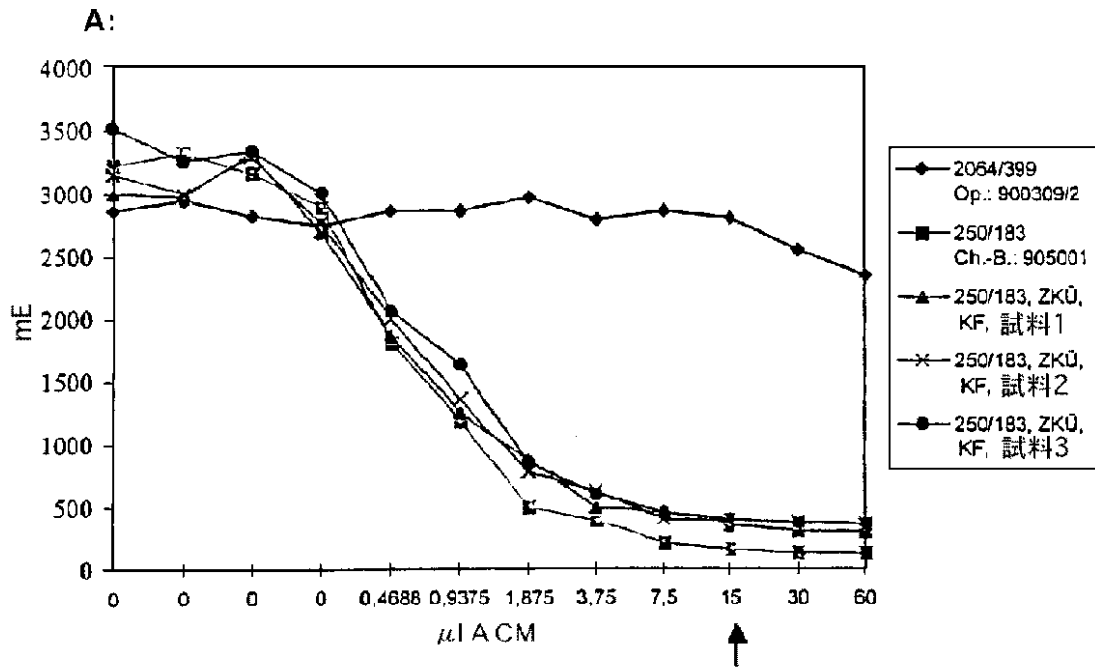
2 反応器、 4 担体球、 6 ベンチレーションモジュール、 8 ガス混合物、 10 循環、 12 新たな培地の入口、 14 ポンプ、 16 試料採取バルブ、 18 導管

【図1】

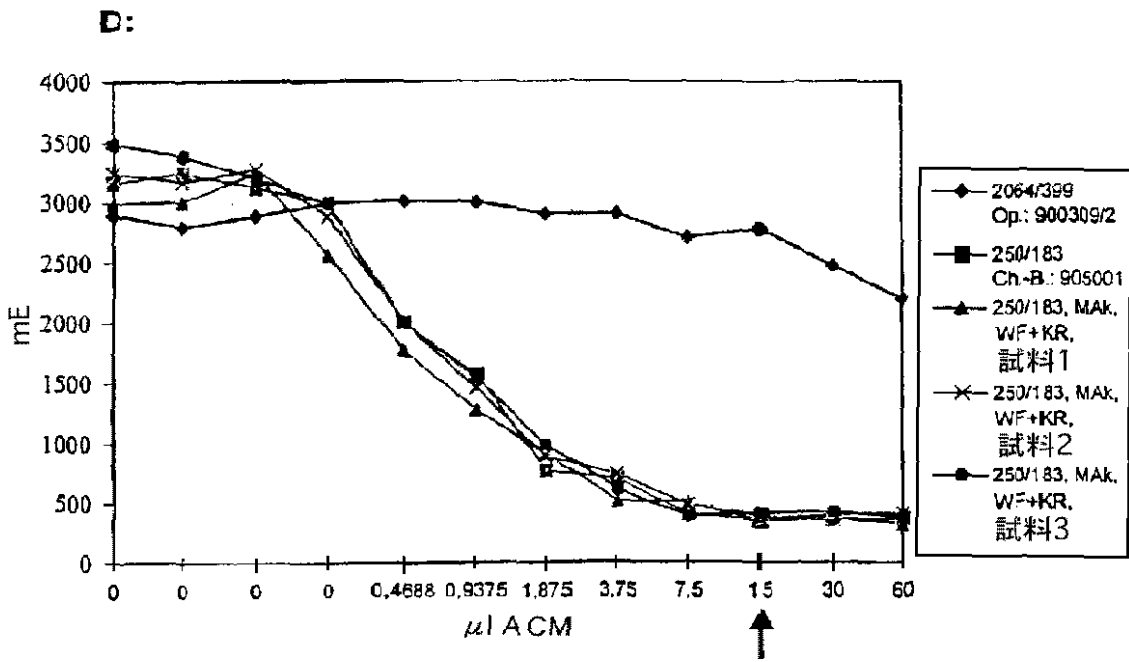
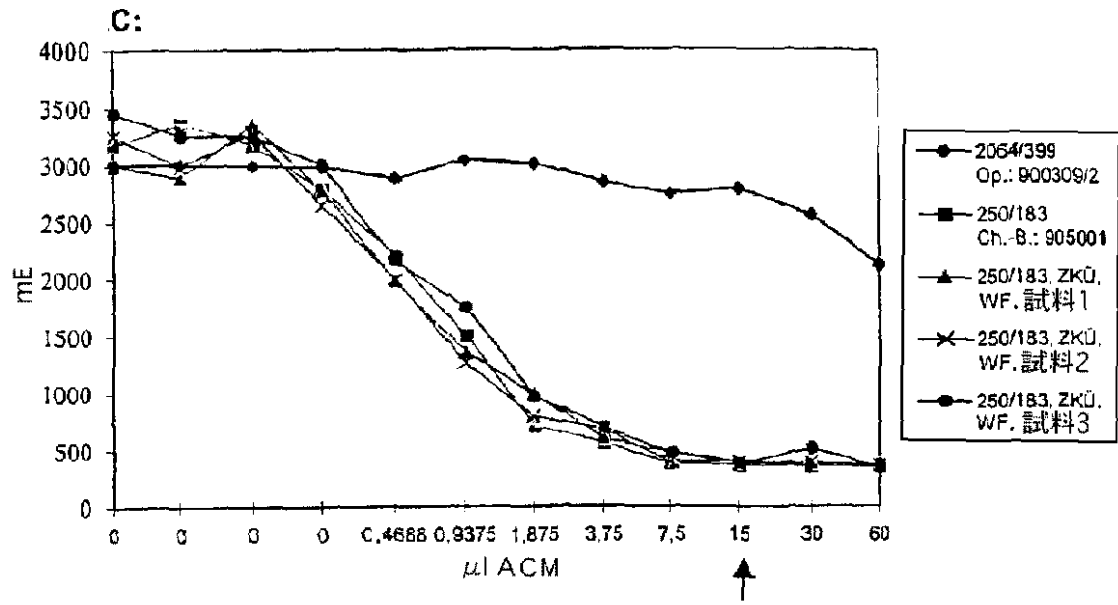
Figur 1:



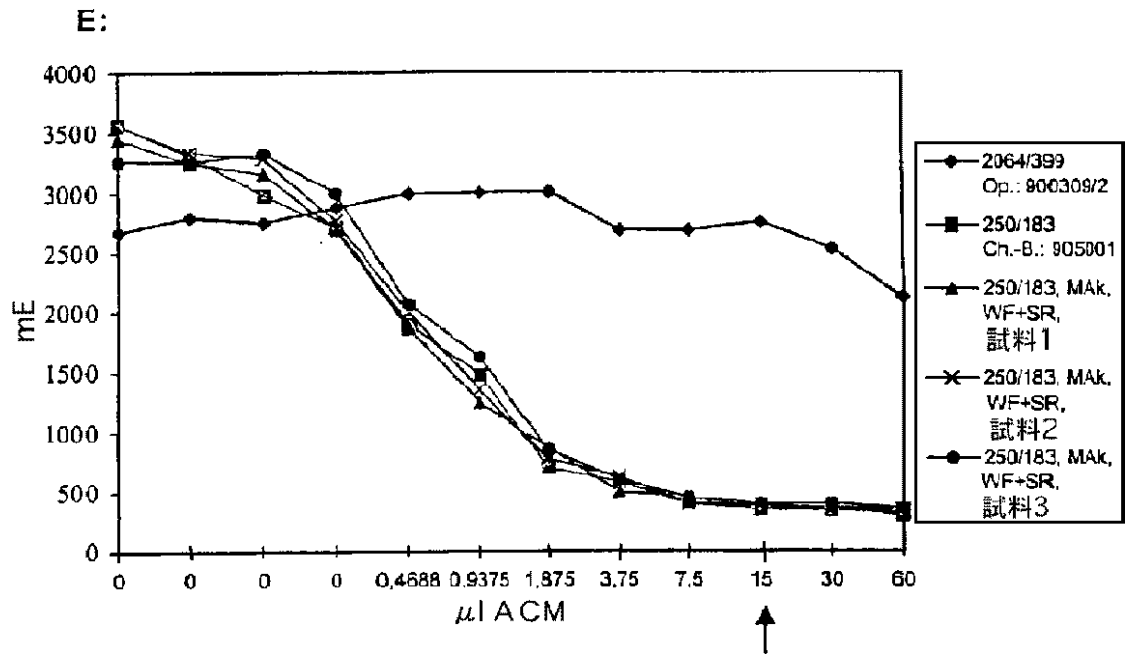
【図2A・B】



【図2C・D】



【図2E】



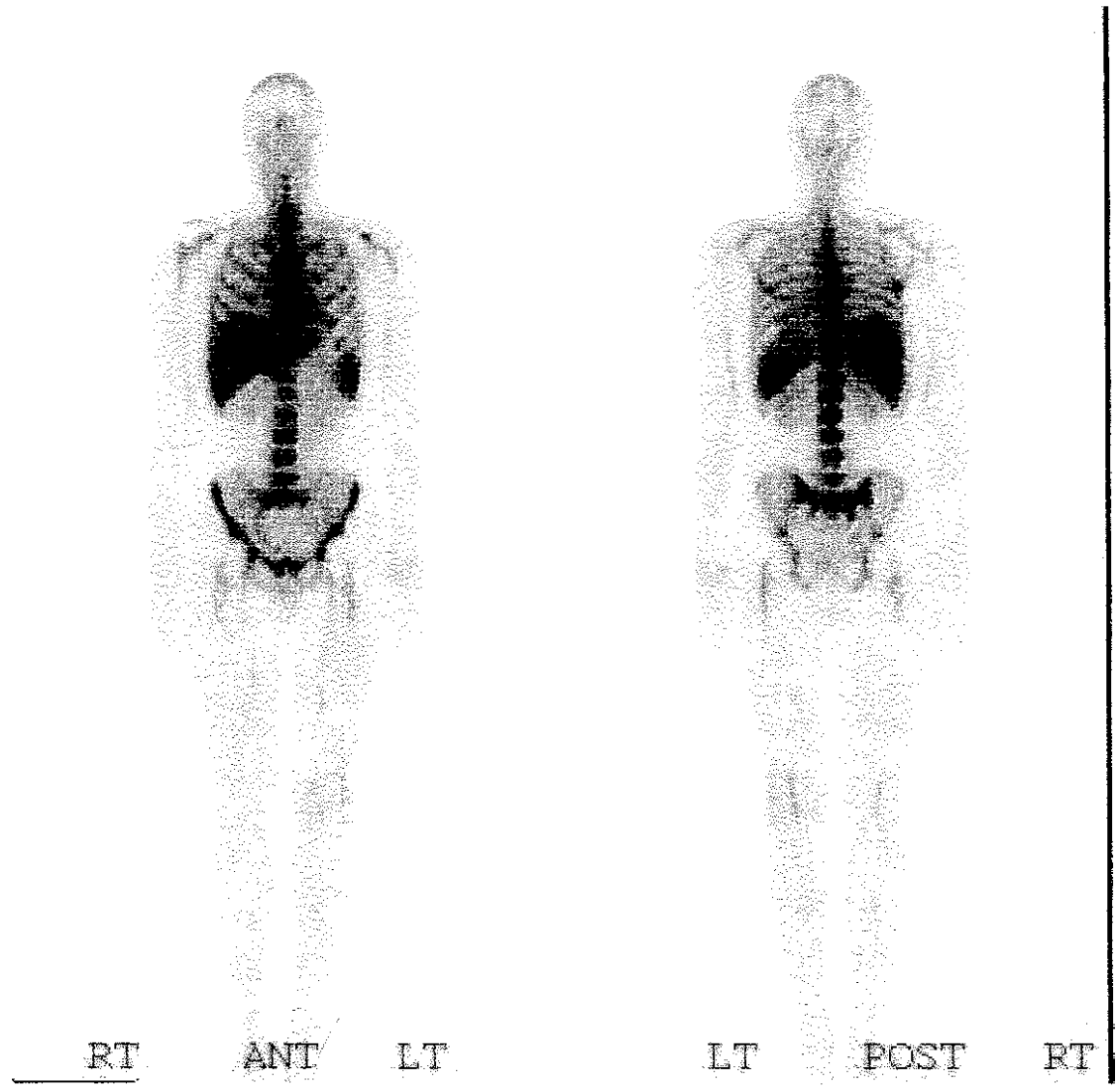
【図3】

Fig. 3

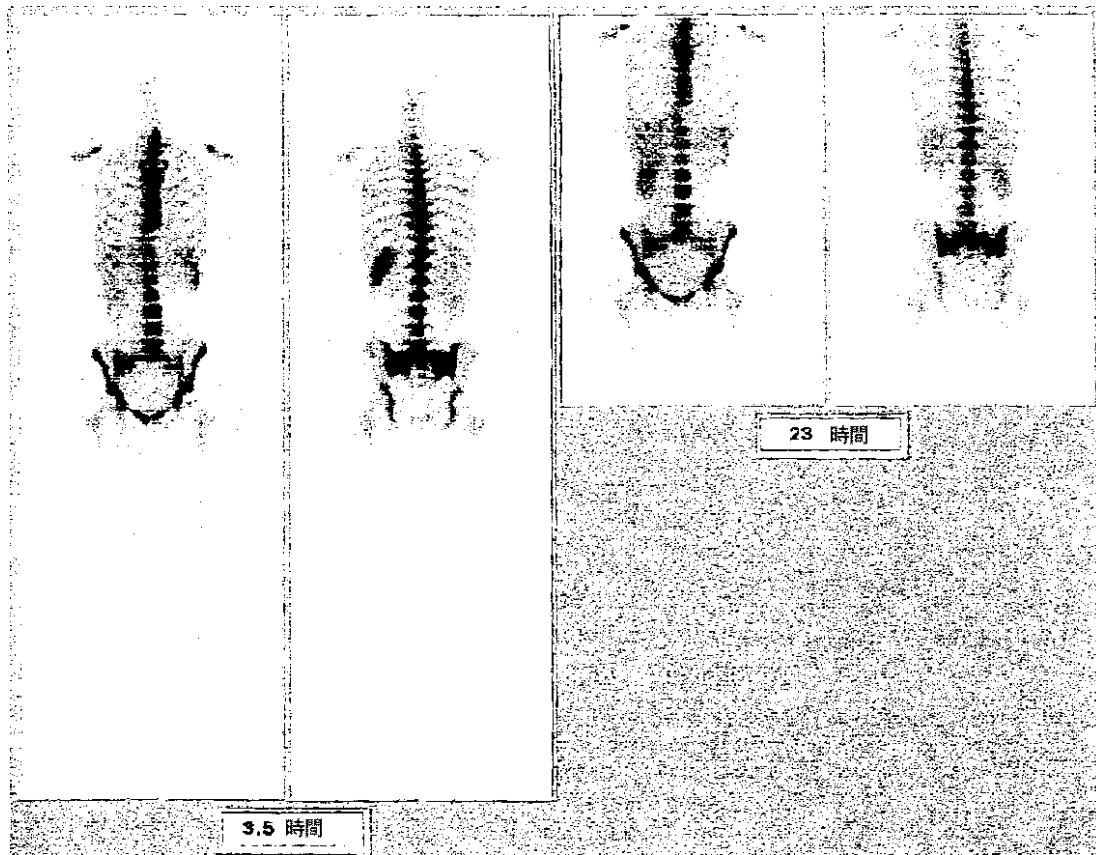


【図4】

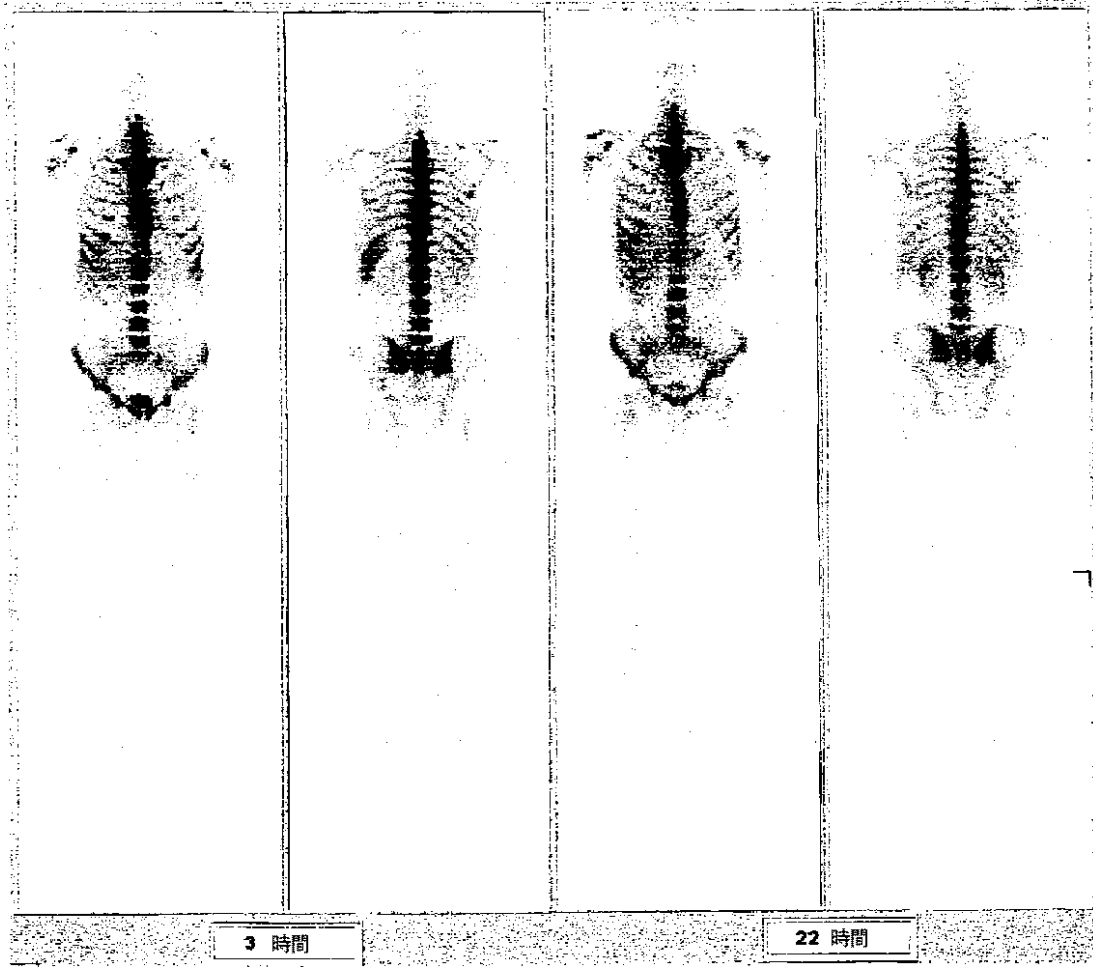
Fig. 4



【図5】

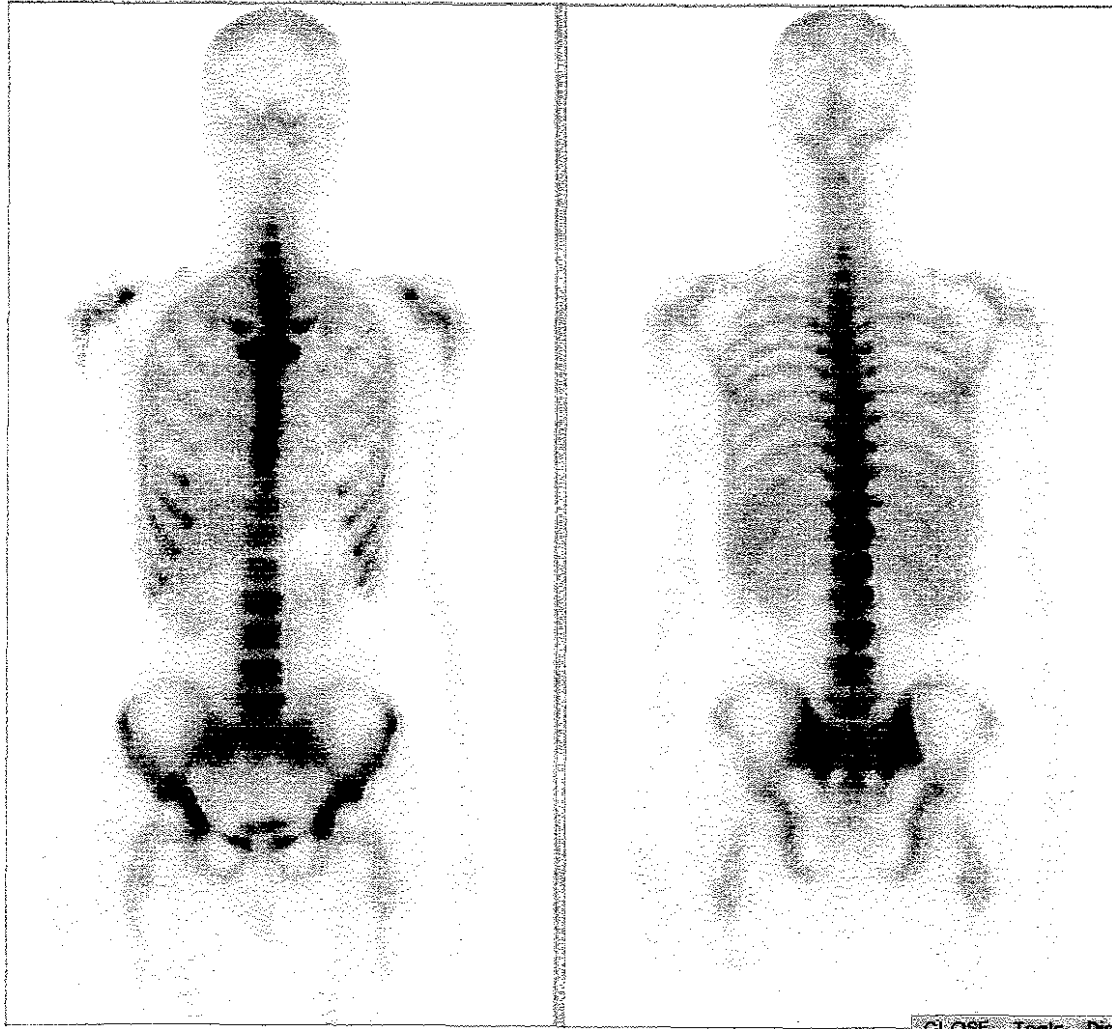


【図6】



【図7】

Fig. 7



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成14年1月9日(2002.1.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

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

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

WO86/05202号は流動床バイオリアクター及び細胞、とりわけモノクローナル抗体を得るためのハイブリドーマ細胞の培養のためのその使用を記載している。該方法によって高い免疫反応性を有する抗体を得ることができるという主張はみられない。

EP-A-0727480号はインビトロ細胞培養系を用いる試験物質の医薬的動力学もしくは毒学的動力学の測定のための方法及びそのために適当な装置として流動床バイオリアクターを記載している。モノクローナル抗体を得るためにこの流動床反応器を使用するという主張は見られない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0034】

類似の高い免疫反応性値は本発明による方法で別のMAk、例えばMAk BW43/26 (CD66eに関して選択的) (Eur. J. Nucl. Med. 14 (1988), 523-528及びInt. J. Cancer 36 (1985), 75-84)、MAk BW278/105 (FVIIIRAGのサブポピュレーションに関して選択的) (J. Histochem. Cytochem. 34(1986), 209-214)、MAk BW575/931 (N-CAMに関して選択的) (Pediatr. Hematol. Oncol. 6(1989), 73-83) 及びMAk YTH24.5 (CD45に関して選択的) (J. Immunol. 134(1985), 3056-3061及びLeucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens (Hrsg. Mc Michael et al.), Oxford University Press, Oxford, pp 788-803) 並びにドイツ国特許出願19744531.4号に記載される幾つかのMAk (VEGF/VEGF-レセプター複合体に関して選択的であるが、VEGFにもVEGF-レセプターにも単独には結合しない) に関して判明した。この所見は、本発明による製造法が近似的に100%免疫反応性である(糖-)タンパク質を発酵可能であり、かつ製造方法IIの場合において、検出可能な免疫反応性の損失さえもなく廉価に穏やかかつ迅速に精製できることを裏付ける。

## 【手続補正3】

【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】

該反応器(2)は担体球(4)、例えば有利には0.4~0.7mmの直径を有する開孔性の焼結ガラスからなる、酸処理(例えば2.5NのHCl及び5%の硝酸)が施され、中和後に熱処理(例えば220で6時間)によって滅菌した球で部分的に充填されている。該反応器は更に反応器中の担体球の流動化のためにガス混合物(8)を送り込み、かつ再び導出するベンチレーションモジュール(6)を有する。更に該反応器はpH電極、酸素電極、温度センサなどを備えている。培地は例えば450~500ml/分の流速で循環(10)中を再循環

する。該循環は新たな培地の入口(12)、ポンプ(14)及び試料採取バルブ(16)を有してよい。導管を通して、培地はそこに含まれるタンパク質の回収のために採取される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

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

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

結果としては、免疫反応性>90%を有するMAkバッチを受容した患者のエピトープ陰性の正常組織は免疫反応性<80%を有するMAkバッチで処理された患者よりも実質的に少なく負荷された。患者の観察は核医学において像付与(シンチレーション図)のための顆粒細胞に対する特異的なMAkの免疫反応性の高さの意味を裏付ける。しかしながらイメージ付与だけでなく、 $\alpha$ -線及び $\beta$ -線での治療のためにも、免疫反応性>90%を有するMAkバッチは明らかな利

点を示す。このように、例えば免疫反応性 90%を有するMAkバッチの標識の後に文献から公知の方法を用いて $Re^{188/186}$ 、 $Y^{90}$ 又はアスタチンをカップリングさせ、優先的な骨髄照射を行うことができる(Visser et al., J. Nucl. Med. 34(1993), 1953-1963; Griffith et al., Cancer Res. 51(1991), 4594-4602; Denora et al., Anticancer Res. 17(1997), 1735-1744)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0076】

線量測定による調査は以下の表にまとめられるデータを提供した。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 治療又は診断での使用のための免疫反応性タンパク質の調製物において、実施例3による変更されたLindmo試験において測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異なる分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が $> 81\%$ であることを特徴とする調製物。

【請求項2】 免疫反応性タンパク質が標識、特に $^{99m}Tc$ 、 $^{186}Re$ 、 $^{188}Re$ 、 $^{90}Y$ 及びアスタチンから選択される放射性標識を有する、請求項1記載の調製物。

【請求項3】 治療又は診断での使用のための放射性標識された免疫反応性タンパク質の調製物において、実施例3による変更されたLindmo試験において測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異なる

分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が > 90% であることを特徴とする調製物。

【請求項4】 免疫反応性タンパク質を細胞培養での製造、特に組み換え真核性宿主細胞での発現によって作成した、請求項1から3までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項5】 免疫反応性タンパク質が少なくとも1つの抗体結合ドメインを有する、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項6】 免疫反応性タンパク質が抗体及び抗体フラグメントから選択される、請求項1から5までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項7】 免疫反応性タンパク質が、少なくとも1つの抗体結合ドメイン及び少なくとも1つのエフェクタードメインを有する融合タンパク質から選択される、請求項1から5までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項8】 免疫反応性タンパク質が悪性及び/又は非悪性の細胞の細胞膜上のエピトープに結合する、請求項1から7までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項9】 免疫反応性タンパク質が正常及び/又は悪性の細胞上の細胞質性又は細胞外のエピトープに結合する、請求項1から7までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項10】 免疫反応性タンパク質がCD66、有利にはCD66a、CD66b、CD66c、CD66e、特に有利にはCD66e上のエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項11】 免疫反応性タンパク質がCD45上のエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項12】 免疫反応性タンパク質がN-CAM上のエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項13】 免疫反応性タンパク質が、VEGF/VEGFレセプター

- 複合体上のエピトープに結合するが、VEGFにもVEGFレセプターにも結合しないモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項14】 免疫反応性タンパク質がBW431/26、BW250/183、YTH24.5及びBW278/105から選択されるモノクローナル抗体である、請求項1から4までのいずれか1項記載の調製物。

【請求項15】 治療又は診断での使用のための免疫反応性タンパク質の調製物の製造方法において、免疫反応性タンパク質を発現する宿主細胞を適当な培養培地中で流動床反応器 - 発酵を行い、かつ宿主細胞及び/又は培養培地から該タンパク質を回収し、その際、実施例3による変更されたLindmo試験において測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異なる分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が>81%であることを特徴とする方法。

【請求項16】 真核性宿主細胞を使用する、請求項15記載の方法。

【請求項17】 免疫反応性タンパク質を宿主細胞及び/又は培養培地から少カラム精製法によって回収し、その際、カラムクロマトグラフィー工程として1回だけアフィニティークロマトグラフィーを実施する、請求項15又は16記載の方法。

【請求項18】 免疫反応性タンパク質を宿主細胞及び/又は培養培地から慣用の精製法によって回収し、その際、カラムクロマトグラフィー工程としてアフィニティークロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー及びアニオン交換クロマトグラフィーを実施する、請求項15又は16記載の方法。

【請求項19】 実施例3による変更されたLindmo試験において測定される、免疫反応性及び非免疫反応性のタンパク質化学的に異なる分子からなる分子の全体数に対する免疫反応性分子のパーセント割合が>90%である、請求項15から18までのいずれか1項記載の方法。

【請求項20】 該調製物を、以下の工程

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

を含む製造方法 I に相応して製造する、請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】 該調製物を、以下の工程

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

を含む製造方法 I I に相応して製造する、請求項 17 記載の方法。

【請求項 22】 タンパク質が BW250 / 183、BW431 / 26、YTH24 . 5 及び BW278 / 105 又は匹敵するマウスの人化された又は組み換え操作されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントから選択される、請求項 15 から 21 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項23】 タンパク質が、VEGF/VEGFレセプター-複合体上のエピトープに結合し、かつVEGFにもVEGFレセプターにも結合しないモノクローナル抗体又は匹敵するマウスの人化された又は組み換え操作されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントである、請求項15から21までのいずれか1項記載の方法。

【請求項24】 タンパク質が少なくとも1つの抗体結合ドメイン及び少なくとも1つのエフェクタードメインを有する融合タンパク質である、請求項15から21までのいずれか1項記載の方法。

【請求項25】 炎症性過程及び骨髄置換過程、例えば前立腺癌、乳癌及びリンパ腫からの転移の診断のための薬剤を製造するための、 $\alpha$ -線、例えばTc-99mの担体としての請求項1から14までのいずれか1項記載のタンパク質調製物の使用。

【請求項26】 造血系の疾患、有利には白血病の治療のための薬剤の製造のための $\alpha$ -線及び $\beta$ -線の担体としての請求項1から14までのいずれか1項記載のタンパク質調製物の使用。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In* national Application No PCT/EP 01/03867
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/00 A61K39/395 A61K49/00 C12P21/08 //(C12P21/08, C12R1:91)		
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) MEDLINE, CANCERLIT, LIFESCIENCES, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUYNCK A ET AL: "CHARACTERISATION OF A HUMANISED BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY FOR CANCER THERAPY" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 67, no. 3, 1993, pages 436-440, XP002901232 ISSN: 0007-0920 abstract page 436, right-hand column, paragraph 2 table II  --- -/--	1-6, 8, 9, 14, 26, 27
<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	Date of mailing of the international search report	
7 August 2001	22/08/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  COVONE-VAN HEES, M	

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/03867

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUX R ET AL: "Determination of immunoreactive fraction and kinetic parameters of a radiolabeled monoclonal antibody in the absence of antigen excess." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, (1991 NOV 22) 144 (2) 175-83. , XPO02174108 abstract page 176, left-hand column, paragraphs 2,3 see Discussion ----	1-6,8,9, 26,27
X	WO 86 05202 A (VERAX CORP) 12 September 1986 (1986-09-12) page 6, paragraph 3 page 19, paragraph 3 -page 21, paragraph 2 claims 21-31 ----	15-18, 23,24
X	EP 0 727 480 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 21 August 1996 (1996-08-21) column 2, line 36-45 ----	15,16, 23-25
A	SECCAMANI, E. ET AL: "Standardization of an immunoreactivity test for radiolabelled monoclonal antibodies" NUKLEARMEDIZIN, SUPPL. (STUTT GART) (1989), 25(TRENDS POSSIBILITIES NUCL. MED.), 709-11 , XPO01015440 the whole document ----	1-14
A	DE 195 21 388 A (IMMUNO GMBH, GERMANY) 19 December 1996 (1996-12-19) the whole document ----	1-27
A	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GUO XUEGANG ET AL: "A method to determine the affinity constant of an antibody and antigen density on cell surfaces" retrieved from STN Database accession no. 121:202700 HCA XPO02174109 abstract & RECENT ADV. CHEM. MOL. BIOL. CANCER RES., INT. SYMP. (1993), MEETING DATE 1991, 161-6. EDITOR(S): DAI, QIANHUAN; ARMOUR, MARGARET-ANN; ZHENG, QINGYING. PUBLISHER: SCIENCE PRESS, BEIJING, PEOP. REP. CHINA. , -----	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 01/03867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8605202 A	12-09-1986	AU 5452986 A	24-09-1986
		EP 0215820 A	01-04-1987
		US 4978616 A	18-12-1990
EP 0727480 A	21-08-1996	DE 19537033 A	22-08-1996
		DE 19528871 A	29-02-1996
		NL 1001033 C	15-12-1998
		NL 1001033 A	26-02-1996
		US 5601757 A	11-02-1997
DE 19521388 A	19-12-1996	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	39/395	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/00		35/02	
	35/02	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/18		19/00	
	19/00	C 1 2 P	21/02	
C 1 2 P	21/02		21/08	
	21/08	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53		33/574	A
	33/574	C 0 7 K	1/22	
// C 0 7 K	1/22	C 1 2 N	15/00	C
Fターム(参考)	4B024 AA01 AA12 BA43 BA44 CA02 HA01 4B064 AG27 CA19 CE10 DA05 DA14 4C085 AA13 AA14 AA21 BB01 BB11 BB17 CC01 CC02 CC05 CC07 CC08 CC21 DD23 DD24 DD32 DD33 DD34 DD35 DD62 DD63 EE01 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74			

专利名称(译)	具有高免疫反应性的蛋白质及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003530126A</a>	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001575649	申请日	2001-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	Shintech公司鹿ING亚诺斯政治GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tzungu		
申请(专利权)人(译)	Shintech公司鹿ING亚诺斯政治GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	イヴァンエフペーネス ジルケトムセンボスレート		
发明人	イヴァン エフ ペーネス ジルケ トムセン-ボスレート		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61K51/10 A61P7/00 A61P35/02 C07K1/22 C07K16/00 C07K16/18 C07K19/00 C12N15/02 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	A61K51/10 A61K2039/505 A61P7/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/00 C07K2319/00		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.H A61K39/395.T A61K39/395.U A61P7/00 A61P35/02 C07K16/18 C07K19/00 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/574.A C07K1/22 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CE10 4B064/DA05 4B064/DA14 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/CC01 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/DD23 4C085/DD24 4C085/DD32 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/DD35 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	10016877 2000-04-05 DE		
其他公开文献	JP2003530126A5 JP4880854B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及(糖基)蛋白,特别是具有>81%,优选>90%免疫反应性的单克隆抗体。使用流化床反应器结合完全可溶的蛋白质化学纯化方法或有利地小柱纯化方法来产生根据本发明的单克隆抗体。以这种方式产生的单克隆抗体适合于体内诊断为炎症疾病和骨髓转移瘤,以 $\gamma$ -射线标记的形式,例如Tc-99m。以 $\alpha$ -射线或 $\beta$ -射线标记的形式的根据本发明的单克隆抗体例如a或Re-188或Y-90可以用于例如白血病的治疗。

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