

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成27年7月30日(2015.7.30)

【公表番号】特表2014-520814(P2014-520814A)

【公表日】平成26年8月25日(2014.8.25)

【年通号数】公開・登録公報2014-045

【出願番号】特願2014-519246(P2014-519246)

【国際特許分類】

C 07 K 19/00 (2006.01)

C 07 K 1/22 (2006.01)

【F I】

C 07 K 19/00

C 07 K 1/22

【手続補正書】

【提出日】平成27年6月12日(2015.6.12)

【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】

- a) 真核発現系において産生されたFc融合タンパク質を含むサンプルを準備し、
- b) サンプル中に存在するFc融合タンパク質をプロテインAアフィニティクロマトグラフィー樹脂に結合させ、
- c) プロテインA樹脂からFc融合タンパク質を溶出し、ここで、溶出産物から第2サンプル(プロテインA産物(PAP)と称されうる)を得、
- d) PAPをカチオン交換(CEX)クロマトグラフィー樹脂に結合させ、
- e) CEX樹脂から第2サンプルを溶出し、ここで、溶出産物から第3サンプル(CEX産物(CEXP)と称されうる)を得、
- f) CEXPをアニオン交換(AEX)クロマトグラフィー樹脂に結合させ、そして、
- g) AEX樹脂から第3サンプルを溶出し、ここで、溶出産物から精製Fc融合タンパク質組成物を得る、

工程を含む、サンプル中に存在する1以上の不純物からFc融合タンパク質を精製する方法。

【請求項2】

Fc融合タンパク質がp75TNFR:Fcである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

50mMシトラート(pH5.0)~100mMシトラート(pH4.0)の勾配を用いて工程c)における溶出を行う、請求項1記載の方法。

【請求項4】

工程b)が、

b') 3~7の範囲のpHおよび10ms/cm~50ms/cmの範囲の伝導度を有するバッファーで結合Fc融合タンパク質を洗浄することを更に含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

工程e)における溶出を、直線イオン強度勾配として、25mMアルギニンを含む25mMリン酸ナトリウムバッファー(pH4.0)を使用して行う、請求項1記載の方

法。

【請求項 6】

工程 d ) が、

d ' ) 3 ~ 7 の範囲の pH および 10 m s / c m ~ 50 m s / c m の範囲の伝導度を有するバッファーで結合 Fc 融合タンパク質を洗浄することを更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

工程 g ) における溶出を、直線イオン強度勾配として、12.5 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) を使用して行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

工程 d ) が、

d ' ) 3 ~ 7 の範囲の pH および 10 m s / c m ~ 50 m s / c m の範囲の伝導度を有するバッファーで結合 Fc 融合タンパク質を洗浄することを更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

プロテイン A クロマトグラフィー樹脂が P O R O S M a b C a p t u r e A である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

C E X クロマトグラフィー工程を、Poros HS、Poros XS、SP Sepharose、Toyopearl SP、SP Sepharose BB、Source 30S、TSK Gel SP-5 PW-HR 20 および Toyopearl SP 650 から選択される強力チオノン交換樹脂上で行い、A E X クロマトグラフィー工程を、Poros HQ、Q-Sepharose、Q-Ceramic Hyper D、Toyopearl Q.UNO Q から選択される強アニオノン交換樹脂上で行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

C E X クロマトグラフィー樹脂が Poros HS 強力チオノン交換樹脂であり、A E X クロマトグラフィー樹脂が Poros HQ 強アニオノン交換樹脂である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

Fc 融合タンパク質を含むサンプルが哺乳類細胞培養プロスまたは酵母発酵プロスである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

Fc 融合タンパク質を含むサンプルが酵母発酵プロスであり、工程 a ) が、

a ' ) Fc 融合タンパク質を含むサンプルの pH を 8 ~ 9 の pH に調節し、サンプルをリフォールディング剤および解離剤と接触させることを更に含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

リフォールディング剤が、アルギニン、グリセロール、EDTA、TMAO、PEG-3500 または酸化還元試薬から選択され、解離剤が、尿素または塩酸グアニジンから選択される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

Fc 融合タンパク質を含むサンプルの pH を 8.6 に調節する、請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

工程 g ) において得られた精製 Fc 融合タンパク質組成物が、> 99 % の純度を有する産物を与える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

工程 g ) において得られた精製 Fc 融合タンパク質組成物が > 18 mMol の T S A レベルにより特徴づけられる、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 18】**

請求項 1 記載の方法により得られる精製された Fc 含有融合タンパク質。

**【請求項 19】**

請求項 1 記載の方法により得られる精製された TNFR : Fc タンパク質。

**【請求項 20】**

CHO 細胞培養発現系において製造され、請求項 1 記載の方法により精製された、> 99 % の純度および > 18 mMol の TSA レベルを有する高度に精製された TNFR : Fc タンパク質。