

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-172702

(P2019-172702A)

(43) 公開日 令和1年10月10日(2019.10.10)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|------------------------------|-------------|-------------|
| C07K 19/00 (2006.01) | C07K 19/00 | 4B065 |
| C07K 1/20 (2006.01) | C07K 1/20 | 4H045 |
| C07K 14/705 (2006.01) | C07K 14/705 | |
| C07K 16/00 (2006.01) | C07K 16/00 | |
| C07K 1/18 (2006.01) | C07K 1/18 | |

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 14 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------------|----------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2019-128325 (P2019-128325) | (71) 出願人 | 500239823 エルジー・ケム・リミテッド |
| (22) 出願日 | 令和1年7月10日 (2019.7.10) | | 大韓民国 07336 ソウル, ヨンドゥンポ-グ, ヨイ-デロ 128 |
| (62) 分割の表示 | 特願2017-535373 (P2017-535373) の分割 | (74) 代理人 | 100110364 弁理士 実広 信哉 |
| 原出願日 | 平成27年12月29日 (2015.12.29) | (74) 代理人 | 100122161 弁理士 渡部 崇 |
| (31) 優先権主張番号 | 10-2014-0195766 | (72) 発明者 | サン・ウー・パク 大韓民国・テジョン・34122・ユソン-グ・ムンジーロ・188 |
| (32) 優先日 | 平成26年12月31日 (2014.12.31) | (72) 発明者 | ファ・ヨン・イ 大韓民国・テジョン・34122・ユソン-グ・ムンジーロ・188 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 韓国 (KR) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 目的とする含量で不純物を含むTNFR-Fc融合タンパク質の製造方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、目的とする含量で疎水性クロマトグラムのピーク3を含む、TNFR-Fc融合タンパク質の混合物を製造する方法、及び疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を調節する方法に関するもので、具体的に、(a)哺乳類細胞で生産されたTNFR-Fc融合タンパク質の混合液を含む試料を塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で前平衡化された芳香族官能基を含む疎水性クロマトグラフィー媒質を使用するTNFR-Fc融合タンパク質の混合物の製造方法、及び所定の濃度の塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液を用いた疎水性クロマトグラフィーによる疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を調節する方法に関するものである。

【解決手段】本発明は、疎水性クロマトグラフィーを用いてTNFR-Fc融合タンパク質を生産するにあつて、所定の濃度の塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で平衡化して疎水性クロマトグラフィーを行うことにより、疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を調節し、これを目的とする含量で含むようにTNFR-Fc融合タンパク質を製造する方法を提供することができる。したがって、前記提示された方法は、動物細胞培養から遺伝子組換え技術で生産されたエタネルセプトのような組換えタンパク質を含む生物医薬品の製造に有用に使用することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記段階を含む、目的とする含量で疎水性クロマトグラムのピーク 3 を含む、TNFR-Fc 融合タンパク質の混合物を製造する方法：

(a) 哺乳類細胞で生産された TNFR-Fc 融合タンパク質の混合液を含む試料を塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液 (equilibration buffer; EQ buffer) で前 - 平衡化された芳香族官能基を含む疎水性クロマトグラフィー (hydrophobic interaction chromatography; HIC) 媒質が充填されたカラムに注入する段階；及び

(b) 前記平衡緩衝液と同じ濃度で塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む溶出緩衝液でタンパク質を溶出させて溶出液を収集する段階。

10

【請求項 2】

前記目的とする疎水性クロマトグラムのピーク 3 の目的とする含量が、9 ~ 18 % である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記芳香族官能基が、フェニル基である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 (a) 段階の TNFR-Fc 融合タンパク質の混合液が、疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量が 20 % を超えるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

平衡緩衝液及び溶出緩衝液が、7 ~ 15 mM リン酸ナトリウムを含む緩衝液である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記平衡緩衝液及び溶出緩衝液が、pH 6 ~ 8.5 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

目的とする疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量に応じて平衡緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を調節することを特徴とする方法であって、

試料の疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量が 20 % 超過 ~ 45 % 以下であり、目的とする疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量が 2 ~ 17 % である場合、1 ~ 1.4 M 濃度の塩化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化させることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

目的とする疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量に応じて平衡緩衝液中の硫酸アンモニウムを添加することを特徴とする方法であって、

試料の疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量が 45 % を超過し、目的とする疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量が 10 ~ 20 % である場合、0.45 ~ 0.55 M 濃度の硫酸アンモニウムを含む緩衝液で平衡化させることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記哺乳類細胞が、pCUCBin-mSig-TNFCept ベクターを形質転換させた CHO 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記哺乳類細胞で生産された TNFR-Fc 融合タンパク質の混合液を含む試料が、細胞培養液を親和性クロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィー、またはこれらの両方を利用して部分精製したものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記疎水性クロマトグラフィーが、順次ローディング、平衡化、ストリップ及び CIP 工程から構成されるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

1.0 ~ 1.5 M 濃度の塩化ナトリウムまたは 0.45 ~ 0.55 M 濃度の硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で疎水性クロマトグラフィー媒質を前 - 平衡化する段階；及び前

50

記前 - 平衡化されたクロマトグラフィー媒質に同じ塩濃度になるように準備した TNFR-Fc 融合タンパク質を含む試料をローディングする段階を含む、エタネルセプトに含有された疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量を調節する方法。

【請求項 13】

前記塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液が、pH 6 ~ 8.5 である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ローディングする試料と比較して、ピーク 3 の含量が減少する方向に調節されたものである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

ピーク 3 の含量が 20% を超える試料において、ピーク 3 の含量を 2 ~ 17% 水準に減少させるものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

ピーク 3 の含量が 45% を超える試料において、ピーク 3 の含量を 10 ~ 20% の水準に減少させるものである、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、目的とする含量で疎水性クロマトグラムのピーク 3 を含む、TNFR-Fc 融合タンパク質の混合物を製造する方法及び疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量を調節する方法に関するもので、具体的に、(a) 哺乳類細胞で生産された TNFR-Fc 融合タンパク質の混合液を含む試料を塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で前 - 平衡化された芳香族官能基を含む疎水性クロマトグラフィー媒質を使用する TNFR-Fc 融合タンパク質の混合物の製造方法、及び所定の濃度の塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液を用いた疎水性クロマトグラフィーによる疎水性クロマトグラムのピーク 3 の含量を調節する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

エタネルセプト (Etanercept) は、体内で細胞表面の TNF- 受容体 (TNF-receptor) と TNF- が結合することを競争的に阻害して、TNF- と関連された免疫反応を抑制する役割をする生物学的炎症調節剤 (biological inflammation modulator) である。このようなエタネルセプトは、水溶性のヒト p75 TNF (tumor necrosis factor) 受容体 (TNFR) とヒト免疫グロブリン G サブクラス (subclass) 1 の Fc 部位が結合された TNFR-Fc 融合タンパク質であって、融合タンパク質の 2 つが二硫化結合 (disulfide bond) で結合された同質二量体 (homodimer) の形態を有し、分子量が 150 kDa に及ぶ巨大分子である (非特許文献 1 及び非特許文献 2)。

【0003】

このような融合タンパク質の典型的な形態は 1990 年代初にテキサス大学、サウスウエスタンメディカルセンター (University of Texas Southwestern Medical Center) のブルース A ビュートラー (Bruce A. Beutler) などによって初めて合成され、2002 年にアムジェン (Amgen) 社によりエンブレル (Enbrel (登録商標)) という商品名で発売された。エタネルセプトは TNF- 阻害剤として関節リウマチ、乾癬、強直性脊椎炎などに使われており、血管炎、アルツハイマー病及びクローン病に適用するための臨床研究が進行中である。

【0004】

TNFR-Fc 融合タンパク質は、TNFR の 235 個のアミノ酸とヒンジを含む Fc 部分の 232 個のアミノ酸を融合して作製することができ、遺伝子組換え技術を利用して生産する場合、二量体 (dimer) の形態で存在して生物学的活性を示す。前記 TNFR は、4 つのドメインと膜 (transmembrane) 領域に分けられ、これを構成する総計 235 個のアミノ酸のうちシステインの数が 22 個であり、これらのシステインはすべてジスルフィ

10

20

30

40

50

ド結合を成し立体構造を形成している。しかし、動物細胞などを用いてTNFR-Fc融合タンパク質を生産する場合、システインがランダムに結合して天然タンパク質と同一なジスルフィド結合を成していない場合が発生する。また、一部のTNFR部分が切断されて正しい形態のTNFR-Fc二量体が生成されない場合が発生する。正しいジスルフィド結合を成していないTNFR-Fcの場合、TNF-との結合能力が急激に減少して適切な生物学的活性を示さない。また、TNFRの一部または全部が切断された場合も、同様に生物学的活性を示さないことがある。

【0005】

したがって、TNFR-Fc二量体を遺伝子組換え技術と動物細胞の培養技術を利用して生産する場合、活性型タンパク質、ジスルフィド結合が正しくない非活性型タンパク質、凝集体及び切断された形態のタンパク質などが同時に生産されるため、これらのタンパク質を分離精製する技術が必要である。

10

【0006】

さらに、エタネルセプトの開発会社であるImmunex Corporation社により開示された組換えタンパク質の生産方法に関する特許(特許文献1)によると、疎水性クロマトグラフィー(hydrophobic interaction chromatography; HIC)分析を通じて3つのピークで存在することを確認し、前記ピークが順番にS186とD235の位置でクリップされた(Clipped)形態のエタネルセプト、活性型TNFR-Fc融合タンパク質及び凝集体、ジスルフィドスクランブルされたTNFR-Fcなどを含む非常に低い生物活性を有する多様な形態のエタネルセプトで構成されていることを確認した。これは組換えタンパク質の生産方法を利用して活性型TNFR-Fc融合タンパク質を製造する方法を開示した特許文献2でも同一のピークパターンを開始しており、既存のTNFR-Fc融合タンパク質の分離に使用されている疎水性クロマトグラフィーは不純物、例えば、凝集体、ジスルフィドスクランブルされたTNFR-Fc融合タンパク質、切断型TNFR-Fc融合タンパク質のような活性型TNFR-Fc融合タンパク質以外の成分を除去して不純物を最小化し、活性型TNFR-Fc融合タンパク質を高純度で取得することだけを目的としていた。

20

【0007】

一方、バイオシミラーは、既存の許可された製品に比べて品質、安全性、効能の面において同等な物質を意味し、更に詳細には、オリジネーター製品(Originator product)の不純物成分及び含量においても類似な組成を持たなければ、生物医薬品として使用することができない。例えば、エタネルセプト(Pfizer)の場合、生物学的活性が低い、前記の従来技術を通じて疎水性クロマトグラフィーのピーク3を構成するものと公知された、成分(以下、ピーク3と称する)を約9~18%含有しており、これらの成分は薬効(potency)だけでなく、薬理にも影響を与えることができる。したがって、これをバイオシミラー製品として開発するためにはオリジネーター製品と同様の水準でピーク3の含量を調節することが必要である。しかし、従来組換えタンパク質の生産方法で製造されたTNFR-Fcを含む試料をHICを用いて精製する方法が試みられていたが(特許文献2)、これは不純物を除去して活性型のTNFR-Fc、つまりピーク2の成分を高純度で取得するためのものにすぎず、不純物の一種である生物活性が低いピーク3の含量をオリジネーター製品と同様の水準に調節しようとする試みはなかった。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許7,294,481号

【特許文献2】韓国登録特許第10-1454316号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Goldenberg, Clinical Therapeutics, 21(1): 75-87, 1999

【非特許文献2】Moreland et al., Ann. Intern. Med., 130(6): 478-486, 1999

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0010】**

本発明者らは、疎水性クロマトグラフィーを用いてTNFR-Fc融合タンパク質を生産するにあつて、ピーク3の含量を調節し、これを一定の水準で含むTNFR-Fc融合タンパク質の製造方法を開発するために鋭意研究努力した結果、芳香族官能基を含む疎水性クロマトグラフィー(hydrophobic interaction chromatography; HIC)媒質(medium)を利用し、これを所定の濃度の塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液で前-平衡化した後、試料をローディングして溶出させることにより、既存のオリジネーター製品と同様の水準でピーク3の含量が調節されたTNFR-Fc融合タンパク質を生産しうることを確認し、本発明を完成した。

10

【課題を解決するための手段】**【0011】**

本発明の目的は、目的とする含量で疎水性クロマトグラムのピーク3を含む、TNFR-Fc融合タンパク質の混合物を製造する方法、及び疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を調節する方法を提供することにある。

【発明の効果】**【0012】**

本発明は、疎水性クロマトグラフィーを用いて、TNFR-Fc融合タンパク質を生産するにあつて、所定の濃度の塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で平衡化して疎水性クロマトグラフィーを行うことにより、疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を調節し、これを目的とする含量で含むようにTNFR-Fc融合タンパク質を製造する方法を提供することができる。したがって、前記提示された方法は、動物細胞の培養から遺伝子組換え技術で生産されたエタネルセプトのような組換えタンパク質を含む生物医薬品の製造において有用に使用することができる。

20

【図面の簡単な説明】**【0013】**

【図1】本発明の一実施例によるフェニルセファローズ高性能レジン(Phenyl Sepharose High Performance resin)を用いたHICフロースルー工程クロマトグラムを示した図である。

30

【発明を実施するための形態】**【0014】**

前記課題を解決するための本発明の一つの態様として、目的とする含量で疎水性クロマトグラムのピーク3を含む、TNFR-Fc融合タンパク質の混合物を製造する方法を提供する。

【0015】

前記方法は、好ましくは(a)哺乳類細胞で生産されたTNFR-Fc融合タンパク質の混合液を含む試料を塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液(equilibrium buffer; EQ buffer)で前-平衡化された芳香族官能基を含む疎水性クロマトグラフィー(hydrophobic interaction chromatography; HIC)媒質が充填されたカラムに注入する段階;及び(b)前記平衡緩衝液と同じ濃度で塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む溶出緩衝液でタンパク質を溶出させ、溶出液を収集する段階を含めて行うことができる。

40

【0016】

前記TNFR-Fc融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換させた宿主細胞でTNFR-Fc融合タンパク質を生産する場合、TNFR-Fcに結合する生物学的活性を示す二量体(dimer)形態のTNFR-Fc融合タンパク質が形成されること以外に、TNFRタンパク質のシステインがランダムに結合して天然型TNFRタンパク質と同一でないジスルフィド結合を形成したり、TNFRタンパク質の一部が切断されて正しい形態のTNFR-Fc二量体が形成されていないという問題点があっ

50

た。これらの成分は、疎水性クロマトグラムでそれぞれ分離されたピークに表れ、既存の研究ではこれをそれぞれピーク1、ピーク2及びピーク3と定義し、各ピークは切断型タンパク質、活性型タンパク質及びその他の凝集体またはジスルフィドスクランブルされたTNFR-Fcなどの生物活性が低い成分を含んでいることが確認された。このようなTNFR-Fc融合タンパク質はエタネルセプトを含み、ブロックバスター医薬品として販売されている。しかし、既存の臨床的または市販用で許可された製品は、前記ピーク3を9~18%で含有しており、これは薬効及び/または薬理に影響を与えることができる水準であり、特に、バイオシミラー医薬品の許可に当たっては既存の許可された製品またはオリジネーター製品との同等性を要求し、さらに、バイオシミラーの場合、生産に使用される分離精製工程などの製造工程により不純物の含有程度などが異なり、これは医薬品の効能に影響を与える可能性があるため、疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を同等に調節することは非常に重要である。しかし、前記組換えタンパク質の生産技術を利用してTNFR-Fc融合タンパク質を生産する場合、提供される各成分の含量は一定でなく、調節が不可能である。したがって、前記様々な形態のTNFR-Fc融合タンパク質を含む混合液を精製する過程により単純に生物活性が低い成分を除去するのではなく、これを一定の水準に含有するように調節することができる方法を必要とする。本発明の前記方法は、疎水性クロマトグラフィーを用いてTNFR-Fc融合タンパク質の混合液から活性型TNFR-Fc融合タンパク質を分離することにあたって、目的とする含量で凝集体またはジスルフィドスクランブルされたTNFR-Fc融合タンパク質などを含む疎水性クロマトグラムのピーク3を含有するように精製するのに有用に使用することができる。

【0017】

本発明の方法は、既存の不純物の除去にのみ使用されていた疎水性クロマトグラフィーを哺乳類細胞で生産されたTNFR-Fc融合タンパク質の混合液を含む試料を様々な濃度の塩、特に塩化ナトリウムで平衡化させた場合、疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を所望の水準に調節しうることを最初に究明し、このような結果は報告されたことない。

【0018】

本発明において、用語「TNFR (tumor necrosis factor receptor) タンパク質」は、TNF- に結合する受容体タンパク質を意味する。前記TNFRタンパク質はTNFR I (p55) タンパク質またはTNFR II (p75) タンパク質の両方を含み、好ましくはTNFR II タンパク質であるが、これに限定されない。また、前記TNFR II はTNFRSF1B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B) と混用することができる。前記TNFR II タンパク質は4つのドメイン及び膜通過 (transmembrane) 領域に分けられ、その例として235個のアミノ酸から構成されている4つのドメイン及び膜通過領域を含むTNFR II タンパク質であってもよいが、これに限定されない。前記TNFR I タンパク質及びTNFR II タンパク質についての情報は、米国国立衛生研究所 GenBank のような公知のデータベースから得ることができ、その例として Accession number が NP_001056 または P20333 のタンパク質であってもよいが、これらに限定されない。

【0019】

前記TNFRタンパク質は人体内に過発現されると多様な疾患を起こすものとして知られているTNF- に結合する活性を有するため、これを利用して自己免疫疾患のようなTNF- により媒介される疾病の治療に利用することができる。そのため、免疫グロブリンのFc領域をTNFRタンパク質に融合させて半減期を増大させた融合タンパク質の形態で製作して利用することができる。

【0020】

本発明において、用語、「TNFR (tumor necrosis factor receptor) -Fc融合タンパク質」は、TNFRタンパク質すべてまたは一部分が免疫グロブリンのFc領域と酵素作用によって結合されるか、または遺伝子操作を通じて前記二つのポリペプチドが一つのポリペプチドで発現された結果物を意味する。前記TNFR-Fc融合タンパク質はT

N F R タンパク質と免疫グロブリンの F c 領域とが直接結合されたり、ペプチドリンカー (peptide linker) を通じて結合されてもよいが、これに限定されない。前記 T N F R - F c 融合タンパク質の例としてエタネルセプトが含まれてもよい。

【0021】

前記 T N F R - F c 融合タンパク質は T N F R タンパク質の全部または一部を免疫グロブリン F c 領域と融合して製作することができ、その例として T N F R I I タンパク質の 1 ~ 2 3 5 番のアミノ酸部位とヒンジ (hinge) 部位を含む免疫グロブリン F c 領域の 2 3 2 個のアミノ酸を融合することができるが、これらに限定されない。また、前記 T N F R - F c 融合タンパク質は発現しようとする宿主細胞に応じてコドン最適化 (codon optimization) することができ、その例として前記 T N F R - F c 融合タンパク質は配列番号 1 のアミノ酸配列と定義される C H O 細胞に特異的にコドン最適化された T N F R - F c 融合タンパク質であってもよいが、これらに限定されない。前記 T N F R - F c 融合タンパク質は配列番号 1 のアミノ酸配列だけでなく、前記配列と 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、よりさらに好ましくは 95% 以上、最も好ましくは 98% 以上の類似性を示すアミノ酸配列であり、実質的に T N F - に結合する活性を有するタンパク質であれば、すべて含む。また、このような類似性を有する配列として前記 T N F R - F c 融合タンパク質と同一または相応する生物学的活性を有するアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質変異体も本発明の範囲内に含まれることは自明である。また、前記 T N F R - F c 融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 のヌクレオチド配列だけではなく、前記配列と 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、よりさらに好ましくは 95% 以上、最も好ましくは 98% 以上の類似性を示すヌクレオチド配列として、実質的に T N F - に結合する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであれば、すべて含む。また、このような類似性を有する配列として前記 T N F R - F c 融合タンパク質と同一または相応する生物学的活性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質変異体をコードするヌクレオチド配列も、本発明の範囲内に含まれるは自明である。前記本発明の一実施例では、C H O 細胞に特異的にコドンを最適化した。

【0022】

本発明において、用語、「免疫グロブリン (immunoglobulin; Ig) の F c 領域」は、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域、重鎖不変領域 1 (C H 1) と軽鎖不変領域 (C L 1) を除いた部分を除外した、重鎖不変領域 2 (C H 2)、重鎖不変領域 (C H 3) 及びヒンジ (hinge) 部分を含む免疫グロブリンの一部を意味する。また、本発明の免疫グロブリン F c 領域は、天然型アミノ酸配列だけでなく、この配列誘導体を含む。アミノ酸配列誘導体とは、天然型アミノ酸配列中の一つ以上のアミノ酸残基が欠失、挿入、非保存的または保存的置換、またはこれらの組み合わせによって異なる配列を有することを意味する。また、前記免疫グロブリン F c 領域は、I g G、I g M、I g E、I g A、または I g D 由来またはこれらの組み合わせ (combination) またはこれらの混成 (hybrid) による F c 領域であってもよい。好ましくは、結合タンパク質の半減期を向上させることが公知となった I g G 由来であり、さらに好ましくは I g G 1 由来であるが、これらに限定されない。

【0023】

一方、本発明において用語、「組み合わせ (combination)」は、二量体または多量体を形成するとき、同一起源短鎖免疫グロブリン F c 領域を暗号化するポリペプチドが異なる起源の短鎖ポリペプチドと結合を形成することを意味する。つまり、I g G F c、I g A F c、I g M F c、I g D F c 及び I g E F c 断片からなるグループから選択された 2 つ以上の断片から二量体または多量体の製造が可能である。

【0024】

本発明において、用語、「混成 (hybrid)」は、短鎖の免疫グロブリン F c 領域内に 2

10

20

30

40

50

つ以上の異なる起源の免疫グロブリンFc断片に該当する配列が存在することを意味する用語である。本発明の場合、様々な形態のハイブリッドが可能である。つまり、IgGFc、IgMFc、IgAFc、IgEFc及びIgDFcのCH1、CH2、CH3、及びCH4からなるグループから1~4つのドメインからなるドメインのハイブリッドが可能であり、ヒンジを含むことができる。一方、IgGもIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4のサブクラスに分けることができ、本発明では、これらの組み合わせ、またはこれらの混成化も可能である。

【0025】

前記TNFR-Fc融合タンパク質は、前記融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを哺乳類細胞に導入して発現させることにより得ることができる。

10

【0026】

本発明では、TNFR-Fc融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターとしてpCUCBin-mSig-TNFCeptベクターを使用し、これをCHO細胞に形質導入してTNFR-Fc融合タンパク質を発現させた。前記の方法で得られたTNFR-Fc融合タンパク質は、活性型TNFR-Fc融合タンパク質、切断型TNFR-Fc融合タンパク質、非活性型TNFR-Fc融合タンパク質及び/またはTNFR-Fc融合タンパク質凝集体など多様な形態のTNFR-Fc融合タンパク質が混合されており、このことから、活性型TNFR-Fc融合タンパク質だけでなく、非活性型TNFR-Fc融合タンパク質を所定の割合で含有するように精製する必要がある。本発明の製造方法を用いる場合には、端片、前記活性型融合タンパク質と一緒に精製された凝集体などを含むピーク3の含量を調節することができるため、これを目的とする含量で含有するように調節することができる。

20

【0027】

一般的に哺乳類細胞の培養液は、目的とするタンパク質以外に様々なタンパク質などをさらに含むため、これらを除くために、好ましくは、前記哺乳類細胞で生産されたTNFR-Fc融合タンパク質の混合液を含む試料は細胞培養液を親和性クロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィー、またはこれらの両方を利用して部分精製して準備することができる。

【0028】

本発明の具体的な実施例では、形質転換させたCHO細胞の培養液について、まず親和性クロマトグラフィーを行い、その溶出液に対して陰イオンクロマトグラフィーを行って得られた溶出液を試料として使用した。

30

【0029】

その例として、前記疎水性クロマトグラフィーに使用されるカラムに充填された媒質は、芳香族官能基としてフェニル基を含む媒質を使用してもよい。本発明の具体的な実施例では、GEHealthcare社から生産されたフェニルセファロス高性能レジン(Phenyl Separose High Performance resin)を充填したカラムを使用した。これに限定されない。

【0030】

その例として、前記目的とする疎水性クロマトグラムのピーク3の目的とする含量は9~18%であってよい。例えば、前記(a)段階のTNFR-Fc融合タンパク質の混合液の疎水性クロマトグラムのピーク3の含量が20%を超過する場合は、本発明の方法を適用して精製することにより、ピーク3の含量は9~18%の水準に下げることができる。

40

【0031】

その例として、前記使用される平衡緩衝液と溶出緩衝液は7~15mMリン酸ナトリウムを含む緩衝液であってよい。本発明の具体的な実施例では10mMリン酸ナトリウムを含む緩衝液を使用した。これに限定されない。

【0032】

50

その例として、前記使用される平衡緩衝液と溶出緩衝液のpHは6～8.5の範囲であってもよい。前記範囲外のpHの緩衝液は、標的タンパク質の変性を引き起こす可能性があるため、組換えタンパク質の疎水性クロマトグラフィーに使用に困難がありうる。

【0033】

その例として、本発明に係る製造方法は目的とする疎水性クロマトグラムのピーク3の含量に応じて平衡緩衝液中の塩化ナトリウムの濃度を調節することを特徴とする方法であり、目的とする疎水性クロマトグラムのピーク3の含量が2～17%である場合、1～1.4Mの濃度の塩化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化させることにより達成しうる。具体的には、ピーク3の含量が21%であるローディングサンプルについて1.1M塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液を用いた場合、ピーク3の含量を5.3～17.0%に下げることができ、1.2M塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液を用いた場合、2.9～15.7%、1.3M塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液を用いた場合、2.5～14.8%、1.4M塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液を用いた場合、2.2～13.7%に下げることができた。

10

【0034】

また、本発明に係る製造方法は、目的とする疎水性クロマトグラムのピーク3の含量に応じて平衡緩衝液中の硫酸アンモニウムを添加することを特徴とする方法であって、試料の疎水性クロマトグラムのピーク3の含量が45%を超過する場合には、0.45～0.55Mの濃度の硫酸アンモニウムを含む緩衝液で平衡化させるのが特徴である。

【0035】

例えば、組換えタンパク質の生産方法を通じて取得した培養液が疎水性クロマトグラムのピーク3を過量、例えば、45%を超えるように含有した場合、硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で平衡化して疎水性クロマトグラフィーを行い、20～30%水準にピーク3の含量を下げた後、前述した塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液を用いた疎水性クロマトグラフィーを行うことにより、ピーク3の含量を10%台に下げることができる。

20

【0036】

前記疎水性クロマトグラフィーは、順次ローディング、平衡化、ストリップ及びCIP(cleaning-in-place)工程で構成される一連の工程を経て行うことができる。

【0037】

前記ストリップ工程は、カラム上に残留するタンパク質をすべて分離して溶出させるために行うものであり、前記のストリップ工程は塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含まないことを除いては、平衡緩衝液と同じ組成の緩衝液を用いて行うことができる。

30

【0038】

CIPは、生物医薬品を製造するにあって、安全でコスト効率的な装置を管理するための過程でクロマトグラフィー媒質から不純物を効率的に除去してこれを再利用することができるようにする。前記CIPは約0.5N濃度の水酸化ナトリウム溶液を用いて行うことができるが、これに限定されない。必要に応じてCIPは数回繰り返して実施することができるが、これに限定されない。

【0039】

もう一つの様態として、1.0～1.5Mの濃度の塩化ナトリウムまたは0.45～0.55Mの濃度の硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液で疎水性クロマトグラフィー媒質を前平衡化する段階；及び前記前平衡化されたクロマトグラフィー媒質に同じ塩濃度を有するように準備したTNFR-Fc融合タンパク質を含む試料をローディングする段階を含む、エタネルセプトに含有された疎水性クロマトグラムのピーク3の含量を調節する方法を提供する。

40

【0040】

その例として、前述したように、前記平衡緩衝液のpHは6～8.5であってもよい。

【0041】

本発明の塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液を利用する方法は、最終生成物におけるピーク3の含量が、ローディングする試料と比較して減少する方向に

50

調節されたのが特徴である。

【0042】

その例として、塩化ナトリウムを含む平衡緩衝液を用いて、ピーク3の含量が20%を超過する試料におけるピーク3の含量を2~17%の水準に減少させることができる。

【0043】

他の例として、硫酸アンモニウムを含む平衡緩衝液を用いて、ピーク3の含量が45%を超過する試料におけるピーク3の含量を18%以下の水準に減少させることができる。

【実施例】

【0044】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、ひたすら本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例により制限されるものではない。

10

【0045】

[実施例1] エタネルセプトの製造及びHICフロースルー(Flow-Through)

エタネルセプトを製造するために、CHO細胞にTNFR-Fc融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター(pCUCBin-mSig-TNFCePT)を形質転換させて培養し、MTXを用いて選別したCHO細胞培養液に親和性クロマトグラフィー(affinity chromatography)と陰イオンクロマトグラフィー(anion chromatography)を順次的に適用した。

20

【0046】

まず、親和性クロマトグラフィーは具体的には下記のように行った。親和性樹脂であるMabSelectSURE(登録商標)(GE Healthcare)をXK26カラム(GE Healthcare)に充填し、100~200mM塩化ナトリウムを含有した20mMトリス-HCl pH8.0緩衝溶液を十分に流してカラムを平衡化した後、用意した培養液を流して親和樹脂と結合させてpH3.4~3.0の溶出緩衝液で溶出させた。2Mトリスを用いて溶出液のpHを7.0~8.0に調節した。

【0047】

前記親和性クロマトグラフィーを介して得られた溶出液について陰イオンクロマトグラフィーを下記のように行った。具体的には陰イオン樹脂であるFractogelEMD TMAE(Merck)をLRC15カラム(Pall Life Sciences)に充填し、pH7.5~8.5のトリスを含有した緩衝溶液を十分に流してカラムを平衡化した後、親和性クロマトグラフィーからの溶出液を流してタンパク質を陰イオン樹脂と結合させて、100~200mM塩化ナトリウム含有トリス溶出緩衝液で溶出させた。

30

【0048】

前記親和性クロマトグラフィー及び陰イオンクロマトグラフィーを順番に実行して、得られた溶出液に下記のようにHICフロースルー工程を適用した。このとき、回収されるピーク3の含量はブチル-NPR(TSK、14947)分析カラムを用いて、0.1Mリン酸ナトリウムpH6.0、1.8Mアンモニウム(A緩衝液)及び0.1Mリン酸ナトリウムpH6.0(B緩衝液)によって線形勾配で測定した。

40

【0049】

[実験例1] 塩化ナトリウムを使用したピーク3の含量の調節

HICフロースルー工程のために、10mMリン酸ナトリウムの塩化ナトリウムをそれぞれ1.1~1.4Mを含有する平衡緩衝液(EQ buffer)を準備し、すべての平衡緩衝液はpHが6.3になるようにした。HICにローディングする試料も平衡緩衝液と同じ濃度のリン酸ナトリウムと塩化ナトリウムを含むように製造した。

【0050】

フェニルセファロス高性能レジン(GE Healthcare)を用いたHICフロースルー工程は、図1に示されたように、ローディング、平衡化(EQ)、ストリップ及びCIP工程で行われ、ストリップ及びCIP段階の緩衝液としてはそれぞれ10mMリン酸ナトリウムpH6.3及び0.5N水酸化ナトリウムを用いた。

50

【0051】

溶出液 (elution pool) はローディング段階で 280 nm で吸光度を基準に 50 mAU 以上で収集し、平衡緩衝液の段階まで 5 CV (column volume) 画分を収集して評価し、その結果を使用した塩化ナトリウム濃度に応じて下記表 1 に示した。

【表 1】

| 平衡緩衝液条件 | ピーク 3 含量 (%) |
|---------------------------------|--------------|
| ローディングサンプル | 21 |
| 10 mMリン酸ナトリウム pH6.3、1.1M塩化ナトリウム | 5.3~17.0 |
| 10 mMリン酸ナトリウム pH6.3、1.2M塩化ナトリウム | 2.9~15.7 |
| 10 mMリン酸ナトリウム pH6.3、1.3M塩化ナトリウム | 2.5~14.8 |
| 10 mMリン酸ナトリウム pH6.3、1.4M塩化ナトリウム | 2.2~13.7 |

10

20

【0052】

表 1 に示されたように、使用された塩化ナトリウム濃度が増加することに応じてピーク 3 の含量は減少する傾向を示し、結論的に塩化ナトリウムの使用濃度によりピーク 3 の含量を 2.2 ~ 17.0 % の範囲内で調節することができることを確認した。

30

【0053】

【実験例 2】 硫酸アンモニウムを用いたピーク 3 の含量調節

硫酸アンモニウムを用いた HIC フロースルー工程のために、20 mM トリス-HCl pH 8.0 緩衝液に 0.5 M 硫酸ナトリウムを含有するように平衡緩衝液 (EQ buffer) を準備した。HIC ローディングサンプルも 20 mM トリス-HCl pH 8.0 及び 0.5 M 硫酸アンモニウムを含有するようにしてローディングサンプルを製造した。

【0054】

フェニルセファロス高性能レジン (GE Healthcare) を XK16 (GE Healthcare) に 5 cm 充填して HIC フロースルー工程を実施した。実験例 1 のように、前記工程はローディング、平衡化、ストリップ及び CIP 工程で行われ、ストリップ及び CIP 段階の緩衝液としてはそれぞれ 20 mM トリス-HCl pH 7.0 及び 0.5 N 水酸化ナトリウムを用いた。

40

【0055】

溶出液 (elution pool) はローディング段階で 280 nm で吸光度を基準に 50 mAU 以上から収集し、平衡緩衝液の段階まで 5 CV 画分を収集して評価し、その結果、ピーク 3 を 46.1 % 含有したローディングサンプルについて HIC フロースルー工程を行ったとき、前記工程の後、ピーク 3 の含量は 12 % 水準に調節されたことを確認した。

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | | | F I | | | テーマコード(参考) |
|----------------|-------------|------------------|---------|-------|---|------------|
| C 0 7 K | 1/22 | (2006.01) | C 0 7 K | 1/22 | | |
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | | |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/09 | Z | |

(72)発明者 スン・ウォン・チェ
大韓民国・テジョン・3 4 1 2 2・ユソン - グ・ムンジ - 口・1 8 8

(72)発明者 チュル・ホ・ジュン
大韓民国・テジョン・3 4 1 2 2・ユソン - グ・ムンジ - 口・1 8 8

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA91X AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA44
4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74
GA21

【外国語明細書】

2019172702000001.pdf