

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 7월 7일 (07.07.2016)



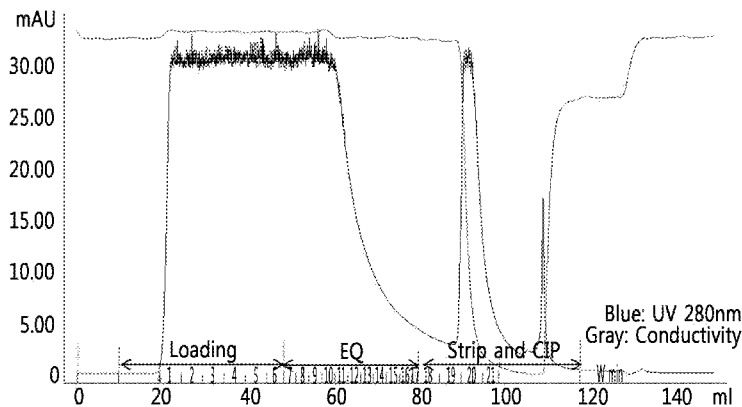
(10) 국제공개번호
WO 2016/108569 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 19/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/014393
- (22) 국제출원일: 2015년 12월 29일 (29.12.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0195766 2014년 12월 31일 (31.12.2014) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엘지생명과학 (LG LIFE SCIENCES LTD.) [KR/KR]; 03184 서울시 종로구 새문안로 58, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박상우 (PARK, Sang Woo); 34122 대전시 유성구 문지로 188, Daejeon (KR). 이화영 (LEE, Hwa Young); 34122 대전시 유성구 문지로 188, Daejeon (KR). 최순웅 (CHOI, Soon Woong); 34122 대전시 유성구 문지로 188, Daejeon (KR). 정철호 (JUNG, Chul Ho); 34122 대전시 유성구 문지로 188, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING TNFR-FC FUSION PROTEIN CONTAINING TARGET CONTENT OF IMPURITIES

(54) 발명의 명칭 : 목적하는 함량으로 불순물을 포함하는 TNFR-FC 융합 단백질의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a TNFR-Fc fusion protein mixture containing a target content of hydrophobic chromatogram peak 3, and to a method for adjusting the content of hydrophobic chromatogram peak 3 and, specifically, to a method for preparing a TNFR-Fc fusion protein mixture using a hydrophobic chromatograph medium containing an aromatic functional group, which is pre-equilibrating with an equilibration buffer comprising sodium chloride or ammonium sulfate, on a sample comprising a TNFR-Fc fusion protein mixture liquid produced from mammal cells, and to a method for adjusting the content of hydrophobic chromatogram peak 3 by hydrophobic chromatography using an equilibration buffer containing a predetermined concentration of sodium chloride or ammonium sulfate. The present invention can provide a method for producing a TNFR-Fc fusion protein by, in the production of the TNFR-Fc fusion protein using hydrophobic chromatography, performing hydrophobic chromatography through the equilibration using an equilibration buffer containing a predetermined concentration of sodium chloride or ammonium sulfate, thereby adjusting the content of hydrophobic chromatogram peak 3 to contain a target content of hydrophobic chromatogram peak 3. Therefore, the method presented above can be favorably used in the manufacturing of biological medicines comprising a recombinant protein, such as etanercept produced from animal cell culture through genetic recombinant technology.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/108569 A1



공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 목적하는 함량으로 소수성 크로마토그램의 피크 3을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물을 제조하는 방법 및 소수성 크로마토그램 피크 3 함량을 조절하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 (a) 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료를 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 전-평형화된 방향족 작용기를 포함하는 소수성 크로마토그래피 매질을 사용하는 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물의 제조방법 및 소정의 농도의 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액을 이용한 소수성 크로마토그래피에 의한 소수성 크로마토그램 피크 3 함량을 조절하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 소수성 크로마토그래피를 이용하여 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산함에 있어서, 소정의 농도의 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 평형화하여 소수성 크로마토그래피를 수행함으로써 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량을 조절하여 이를 목적하는 함량으로 포함하도록 TNFR-Fc 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공할 수 있다. 따라서, 상기 제시된 방법은 동물세포 배양으로부터 유전자 재조합 기술로 생산된 에타너셉트와 같은 재조합 단백질을 포함하는 생물의약품의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 목적하는 함량으로 불순물을 포함하는 TNFR-Fc 융합 단백질의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 목적하는 함량으로 소수성 크로마토그램의 피크 3을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물을 제조하는 방법 및 소수성 크로마토그램 피크 3 함량을 조절하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 (a) 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료를 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 전-평형화된 방향족 작용기를 포함하는 소수성 크로마토그래피 매질을 사용하는 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물의 제조방법 및 소정의 농도의 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액을 이용한 소수성 크로마토그래피에 의한 소수성 크로마토그램 피크 3 함량을 조절하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 에타너셉트(Etanercept)는 체내에서 세포 표면의 TNF- α 수용체(TNF- α receptor)와 TNF- α 가 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여, TNF- α 와 관계된 면역반응을 억제하는 역할을 하는 생물학적 염증 조절제(biological inflammation modulator)이다. 이러한 에타너셉트는 수용성의 인간 p75 TNF(tumor necrosis factor) 수용체(TNFR)와 인간 면역글로블린 G 서브클래스(subclass) 1의 Fc 부위가 결합된 TNFR-Fc 융합 단백질로서, 융합 단백질 2개가 이황화 결합(disulfide bond)으로 연결된 동형이량체(homodimer)의 형태를 가지며, 분자량이 150 kDa에 이르는 거대분자이다(Goldenberg, *Clinical Therapeutics*, 21(1): 75-87, 1999; Moreland *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 130(6): 478-486, 1999).
- [4] 이러한 융합 단백질의 전형적인 형태는 1990년대 초반에 텍사스대학교, 사우스웨스턴 메디컬 센터(University of Texas Southwestern Medical Center)의 브루스 A 보이틀러(Bruce A. Beutler) 등에 의해 처음 합성되었고, 2002년에 암젠(Amgen) 사에 의해 엔브렐(Enbrel®)이라는 상품명으로 출시되었다. 에타너셉트는 TNF- α 저해제로 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염 등에 사용되고 있으며, 혈관염, 알츠하이머병 및 크론병에 적용하기 위한 임상 연구가 진행 중에 있다.
- [5] TNFR-Fc 융합 단백질은 TNFR의 235개 아미노산과 hinge를 포함한 Fc 부분의 232개의 아미노산을 융합하여 제작할 수 있으며 유전자 재조합 기술을 이용하여 생산할 경우 이합체(dimer) 형태로 존재하여 생물학적 활성을 나타낸다. 상기 TNFR은 4개의 도메인과 막(transmembrane) 영역으로 나뉘며 이를 구성하는 총 235개의 아미노산 중 시스테인의 개수가 22개로서 이들 시스테인은 모두

다이설파이드 결합을 이루어 입체구조를 형성하고 있다. 그러나 동물세포 등을 이용하여 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산하는 경우 시스테인이 무작위로 결합하여 천연 단백질과 동일한 다이설파이드 결합을 이루지 않는 경우가 발생한다. 또한, 일부 TNFR 부분이 절단되어 올바른 형태의 TNFR-Fc 이합체가 생산되지 않는 경우가 발생한다. 올바른 다이설파이드 결합을 이루지 않은 TNFR-Fc의 경우 TNF- α 와의 결합능력이 급격히 감소하여 적절한 생물학적 활성을 나타내지 않는다. 또한, TNFR의 일부 또는 전부가 절단된 경우에도 마찬가지로 생물학적 활성을 나타내지 않을 수 있다.

[6] 따라서, TNFR-Fc 이합체를 유전자 재조합 기술과 동물세포 배양기술을 이용하여 생산하는 경우 활성형 단백질, 다이설파이드 결합이 올바르지 않은 비활성형 단백질, 응집체 및 절단된 형태의 단백질 등이 동시에 생산되므로 이들 단백질을 분리 정제하는 기술이 필요하다.

[7]

[8] 더욱이, 에타너셉트의 개발사인 Immunex Corporation 사에 의해 개시된 재조합 단백질의 생산 방법에 관한 특허(US patent 7,294,481)에 따르면, 소수성 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography; HIC) 분석을 통해 3개의 피크로 존재함을 확인하였으며, 상기 피크들이 차례로 S186과 D235 위치에서 Clipped 형태의 에타너셉트, 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질 및 응집체, 다이설파이드 스크램블드 TNFR-Fc 등을 포함하는 매우 낮은 생물활성을 갖는 다양한 형태의 에타너셉트로 구성됨을 확인하였다. 이는 재조합 단백질 생산 방법을 이용하여 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질을 제조하는 방법을 개시한 한국등록특허 제10-1454316호에서도 동일한 피크패턴을 개시하고 있으며, 기존의 TNFR-Fc 융합 단백질의 분리에 사용되는 소수성 크로마토그래피는 불순물 예컨대, 응집체, 다이설파이드 스크램블드 TNFR-Fc 융합 단백질, 절단형 TNFR-Fc 융합 단백질과 같은 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질 이외의 성분을 제거하여 불순물을 최소화하고 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질을 고순도로 수득하는 것만을 목적으로 하고 있었다.

[9]

[10] 한편, 바이오시밀러는 기존 허가된 제품과 비교하여 품질, 안전성, 효능 측면에서 동등한 물질을 의미하여, 더욱 세부적으로는 Originator product의 불순물 성분 및 함량에 있어서도 유사한 조성을 가져야 생물의약품으로서 이용될 수 있다. 예컨대, 에타너셉트(Pfizer)의 경우 생물학적 활성이 낮은, 상기 종래 기술을 통해 소수성 크로마토그래피의 피크 3을 구성하는 것으로 공지된, 성분(이하 피크 3이라 칭함)을 약 9 내지 18% 함유하고 있으며, 이들 성분은 약효(potency)뿐만 아니라 약리에도 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 이를 바이오시밀러 제품으로 개발하기 위해서는 Originator product와 유사한 수준으로 피크 3의 함량을 조절하는 것이 필요하다. 그러나, 종래 재조합 단백질 생산 방법으로 제조된 TNFR-Fc를 포함하는 시료를 HIC를 이용하여 정제하는

방법이 시도되기는 하였으나(한국등록특허 제10-1454316호), 이는 불순물을 제거하고 활성형의 TNFR-Fc 즉, 피크 2의 성분을 고순도로 수득하기 위한 것일 뿐, 불순물의 일종인 생물활성이 낮은 피크 3의 함량을 Originator product와 유사한 수준으로 조절하고자 하는 시도는 없었다.

[11]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

[12] 본 발명자들은 소수성 크로마토그래피를 이용하여 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산함에 있어서 피크 3의 함량을 조절하여 이를 일정 수준으로 포함하는 TNFR-Fc 융합 단백질의 제조방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 방향족 작용기를 포함하는 소수성 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography; HIC) 매질(medium)을 이용하고 이를 소정의 농도의 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액으로 전-평형화한 후 시료를 로딩하여 용출시킴으로써 기존의 Originator product인 제품과 유사한 수준으로 피크 3의 함량이 조절된 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 목적은 목적하는 함량으로 소수성 크로마토그램의 피크 3을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물을 제조하는 방법 및 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

[16] 본 발명은 소수성 크로마토그래피를 이용하여 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산함에 있어서, 소정의 농도의 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 평형화하여 소수성 크로마토그래피를 수행함으로써 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량을 조절하여 이를 목적하는 함량으로 포함하도록 TNFR-Fc 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공할 수 있다. 따라서, 상기 제시된 방법은 동물세포 배양으로부터 유전자 재조합 기술로 생산된 에타너셉트와 같은 재조합 단백질을 포함하는 생물의약품의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 페닐 세파로스 고성능 레진(Phenyl Sepharose High Performance resin)을 이용한 HIC Flow-Through 공정 크로마토그램을 나타낸 도이다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 하나의 양태로서, 목적하는 함량으로 소수성 크로마토그램의 피크 3을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [21]
- [22] 상기 방법은 바람직하게는 (a) 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료를 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액(equilibration buffer; EQ buffer)으로 전-평형화된 방향족 작용기를 포함하는 소수성 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography; HIC) 매질이 충전된 컬럼에 주입하는 단계; 및 (b) 상기 평형 완충액과 동일한 농도로 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 용출 완충액으로 단백질을 용출시켜 용출액을 수집하는 단계를 포함하여 수행될 수 있다.
- [23]
- [24] 상기 TNFR-Fc 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터로 형질전환시킨 숙주세포로 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산하는 경우, TNF- α 에 결합하는 생물학적 활성을 나타내는 이량체(dimer) 형태의 TNFR-Fc 융합 단백질이 형성되는 것 외에도 TNFR 단백질의 시스테인이 무작위로 결합하여 천연형 TNFR 단백질과 동일하지 않은 다이설파이드 결합을 형성하거나, TNFR 단백질의 일부분이 절단되어 올바른 형태의 TNFR-Fc 이량체가 형성되지 않는 문제점이 있었다. 이들 성분은 소수성 크로마토그램에서 각각 분리된 피크로 나타나며, 기존의 연구에서는 이를 각각 피크 1, 피크 2 및 피크 3이라고 정의하였으며, 각 피크는 절단형 단백질, 활성형 단백질 및 기타 응집체 또는 다이설파이드 스크램블드 TNFR-Fc 등의 생물활성이 낮은 성분들을 포함하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 TNFR-Fc 융합 단백질은 에타너셉트를 포함하여, 블록버스터 의약품으로 판매되고 있다. 그러나, 기존의 임상적 또는 시판용으로 허가된 제품은 상기 피크 3을 9 내지 18%로 함유하고 있으며, 이는 약효 및/또는 약리에 영향을 미칠 수 있는 수준으로, 특히 바이오시밀러 의약품의 허가에 있어서는 기존의 허가된 제품 또는 originator product와의 동등성을 요구하며, 더욱이 바이오시밀러의 경우 생산에 사용되는 분리 정제 공정 등 제조 공정에 따라 불순물의 함유 정도 등이 달라지며 이는 의약품의 효능에 영향을 미칠 수 있으므로 소수성 크로마토그램의 피크 3 함량을 동등하게 조절하는 것은 매우 중요하다. 그러나, 상기 재조합 단백질 생산 기법을 이용하여 TNFR-Fc 융합 단백질을 생산하는 경우, 제공되는 각 성분의 함량은 일정하지 않으며, 조절이 불가능하다. 따라서, 상기 다양한 형태의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 혼합액을 정제하는 과정을 통해 단순히 생물활성이 낮은 성분을 제거하는 것이 아니라 이를 일정 수준으로 함유하도록 조절할 수 있는 방법을 필요로 한다. 본 발명의 상기 방법은 소수성 크로마토그래피를 이용하여 TNFR-Fc 융합 단백질의 혼합액으로부터 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질을 분리함에 있어서, 목적하는

함량으로 응집체 또는 다이설파이드 스크램블드 TNFR-Fc 융합 단백질 등을 포함하는 소수성 크로마토그램의 피크 3을 함유하도록 정제하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.

- [25] 본 발명의 방법은 기존에 불순물의 제거에만 사용되던 소수성 크로마토그래피를 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료를 다양한 농도의 염, 특히 염화나트륨으로 평형화시킬 경우 소수성 크로마토그램의 피크 3의 함량을 목적하는 수준으로 조절할 수 있음을 최초로 규명하였으며, 이와 같은 결과는 보고된 바 없다.
- [26]
- [27] 본 발명에서 용어, "TNFR(tumor necrosis factor receptor) 단백질"은 TNF- α 에 결합하는 수용체 단백질을 의미한다. 상기 TNFR 단백질은 TNFRI(p55) 단백질 또는 TNFRII(p75) 단백질을 모두 포함하며, 바람직하게는 TNFRII 단백질이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 TNFRII는 TNFRSF1B(Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B)와 혼용될 수 있다. 상기 TNFRII 단백질은 4개의 도메인 및 막통과(transmembrane) 영역으로 나뉘며, 그 예로 235개의 아미노산으로 구성되어 있는 4개의 도메인 및 막 통과 영역을 포함하는 TNFRII 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 TNFRI 단백질 및 TNFRII 단백질에 대한 정보는 미국 국립 보건원 GenBank와 같은 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 Accession number가 NP_001056 또는 P20333인 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [28] 상기 TNFR 단백질은 인체 내에 과발현되면 여러 질환을 일으키는 것으로 알려져 있는 TNF- α 에 결합하는 활성을 지니므로, 이를 이용하여 자가면역질환과 같은 TNF- α 에 의해 매개되는 질병의 치료에 이용할 수 있다. 이를 위하여 면역글로불린의 Fc 영역을 TNFR 단백질에 융합시켜 반감기를 증대시킨 융합 단백질의 형태로 제작하여 이용할 수 있다.
- [29] 본 발명에서 용어, "TNFR(tumor necrosis factor receptor)-Fc 융합 단백질"은 TNFR 단백질 전부 또는 일부분이 면역글로불린의 Fc 영역과 효소 작용에 의하여 연결되거나, 또는 유전자 조작을 통하여 상기 두 폴리펩타이드가 하나의 폴리펩타이드로 발현된 결과물을 의미한다. 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 TNFR 단백질과 면역글로불린의 Fc 영역이 직접 연결되거나 펩타이드 링커(peptide linker)를 통하여 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 TNFR-Fc 융합 단백질의 예로 에타너셉트가 포함될 수 있다.
- [30] 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 TNFR 단백질의 전부 또는 일부분을 면역글로불린 Fc 영역과 융합하여 제작할 수 있으며, 그 예로 TNFRII 단백질의 1번 내지 235번 아미노산 부위와 힌지(hinge) 부위를 포함하는 면역글로불린 Fc 영역의 232개의 아미노산을 융합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 발현하고자 하는 숙주세포에 따라 코돈 최적화(codon optimization)될 수 있으며, 그 예로 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 서열번호 1의

아미노산 서열로 정의되는 CHO 세포에 특이적으로 코돈 최적화된 TNFR-Fc 융합 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 TNF- α 에 결합하는 활성을 갖는 단백질이라면 모두 포함한다. 또한, 이러한 유사성을 갖는 서열로서 상기 TNFR-Fc 융합 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 또한, 상기 TNFR-Fc 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 뉴클레오티드 서열로서 실질적으로 TNF- α 에 결합하는 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드라면 모두 포함한다. 또한, 이러한 유사성을 갖는 서열로서 상기 TNFR-Fc 융합 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 상기 본 발명의 일 실시예에서는 CHO 세포에 특이적으로 코돈을 최적화하였다.

- [31] 본 발명에서 용어, "면역글로불린(immunoglobulin; Ig)의 Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변영역, 중쇄불변영역 1(CH1)과 경쇄불변영역(CL1)을 제외한 부분을 제외한, 중쇄불변영역2(CH2), 중쇄불변영역3(CH3) 및 힌지(hinge) 부분을 포함하는 면역글로불린의 일부분을 의미한다. 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연형 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환, 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgM, IgE, IgA 또는 IgD 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이며, 더욱 바람직하게는 IgG1 유래이나, 이에 제한되지 않는다.
- [32] 한편, 본 발명에서 용어, "조합(combination)"은 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [33] 본 발명에서 용어, "혼성(hybrid)"은 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개

이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다. 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다.

- [34] 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 포유류 세포에 도입하여 발현시킴으로써 획득할 수 있다.
- [35] 본 발명에서는 TNFR-Fc 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로서 pCUCBin-mSig-TNFcept 벡터를 사용하였고, 이를 CHO 세포에 형질도입하고 TNFR-Fc 융합 단백질을 발현시켰다. 상기의 방법으로 획득된 TNFR-Fc 융합 단백질에는 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질, 절단형 TNFR-Fc 융합 단백질, 비활성형 TNFR-Fc 융합 단백질 또는/및 TNFR-Fc 융합 단백질 응집체 등 다양한 형태의 TNFR-Fc 융합 단백질이 혼합되어 있어, 이로부터 활성형 TNFR-Fc 융합 단백질 뿐만 아니라, 비활성형 TNFR-Fc 융합 단백질을 소정의 비율로 함유하도록 정제할 필요성이 있다. 본 발명의 제조 방법을 이용하는 경우에는 단편, 상기 활성형 융합 단백질과 함께 정제되는 응집체 등을 포함하는 피크 3의 함량을 조절할 수 있으므로, 이를 목적하는 함량으로 함유하도록 조절할 수 있다.
- [36] 일반적으로 포유류 세포의 배양액은 목적하는 단백질 이외에 다양한 단백질 등을 추가로 포함하므로 이들을 제거하기 위하여, 바람직하게는 상기 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료는 세포 배양액을 친화성 크로마토그래피, 음이온 크로마토그래피 또는 이들 모두를 이용하여 부분 정제하여 준비할 수 있다.
- [37] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 형질감염시킨 CHO 세포의 배양액에 대해 먼저 친화성 크로마토그래피를 수행하고 그 용출액에 대해 음이온 크로마토그래피를 수행하여 획득한 용출액을 시료로 사용하였다.
- [38]
- [39] 그 예로, 상기 소수성 크로마토그래피에 사용되는 컬럼에 충전된 매질은 방향족 작용기로서 페닐기를 포함하는 매질을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 GE Healthcare 사로부터 생산된 페닐 세파로스 고성능 레진(Phenyl Sepharose High Performance resin)을 충전한 컬럼을 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [40]
- [41] 그 예로, 상기 목적하는 소수성 크로마토그램의 피크 3의 목적하는 함량은 9 내지 18%일 수 있다. 예컨대, 상기 (a) 단계의 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액의

소수성 크로마토그램의 피크 3 함량이 20%를 초과하는 경우 본 발명의 방법을 적용하여 정제함으로써 피크 3 함량은 9 내지 18% 수준으로 낮출 수 있다.

[42]

[43] 그 예로, 상기 사용되는 평형 완충액 및 용출 완충액은 7 내지 15 mM 인산나트륨을 포함하는 완충액일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 10 mM 인산나트륨을 포함하는 완충액을 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[44]

[45] 그 예로, 상기 사용되는 평형 완충액 및 용출 완충액의 pH는 6 내지 8.5 범위일 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 pH의 완충액은 표적 단백질의 변성을 야기할 수 있으므로 제조합 단백질의 소수성 크로마토그래피에 사용되기 어려울 수 있다.

[46]

[47] 그 예로, 본 발명에 따른 제조방법은 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량에 따라 평형 완충액 중의 염화나트륨의 농도를 조절하는 것을 특징으로 하는 방법으로서, 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량이 2 내지 17%인 경우 1 내지 1.4 M 농도의 염화나트륨을 포함하는 완충액으로 평형화시킴으로써 달성할 수 있다. 구체적으로, 피크 3 함량이 21%인 로딩 샘플에 대해 1.1 M 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액을 이용한 경우 피크 3 함량을 5.3 ~ 17.0%로 낮출 수 있으며, 1.2 M 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액을 이용한 경우 2.9 ~ 15.7%로, 1.3 M 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액을 이용한 경우 2.5 ~ 14.8%로, 1.4 M 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액을 이용한 경우 2.2 ~ 13.7%로 낮출 수 있었다.

[48]

[49] 또한, 본 발명에 따른 제조방법은 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량에 따라 평형 완충액 중의 황산암모늄을 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법으로서, 시료의 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량이 45%를 초과하는 경우, 0.45 내지 0.55 M 농도의 황산암모늄을 포함하는 완충액으로 평형화시키는 것이 특징이다.

[50]

예컨대, 제조합 단백질 생산 방법을 통해 수득한 배양액이 소수성 크로마토그램 피크 3을 과량 예컨대, 45%를 초과하도록 함유한 경우 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 평형화하여 소수성 크로마토그래피를 수행하여 20 내지 30% 수준으로 피크 3의 함량을 낮춘 후, 전술한 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액을 이용한 소수성 크로마토그래피를 수행함으로써 피크 3의 함량을 10% 대로 낮출 수 있다.

[51]

[52] 상기 소수성 크로마토그래피는 순차적인 로딩, 평형화, 스트립 및 CIP(cleaning-in-place) 공정으로 구성되는 일련의 공정을 통해 수행할 수 있다.

[53]

상기 스트립 공정은 컬럼 상에 잔류하는 단백질을 모두 분리하여 용출시키기 위하여 실시하는 것으로, 상기 스트립 공정은 염화나트륨 또는 황산암모늄을

포함하지 않는 것을 제외하고는 평형 완충액과 동일한 조성의 완충액을 이용하여 수행할 수 있다.

[54] CIP는 생물의약품을 생산함에 있어서 안전하고 비용 효율적인 장치 관리를 위한 과정으로 크로마토그래피 매질로부터 불순물을 효율적으로 제거하여 이를 재사용할 수 있도록 한다. 상기 CIP는 약 0.5 N 농도의 수산화나트륨 용액을 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 필요에 따라 CIP는 수회 반복하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[55]

[56] 또 하나의 양태로서, 1.0 내지 1.5 M 농도의 염화나트륨 또는 0.45 내지 0.55 M 농도의 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 소수성 크로마토그래피 매질을 전-평형화하는 단계; 및 상기 전-평형화된 크로마토그래피 매질에 동일한 염농도를 갖도록 준비한 TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 시료를 로딩하는 단계를 포함하는, 에타너셉트에 함유된 소수성 크로마토그램의 피크 3의 함량을 조절하는 방법을 제공한다.

[57]

[58] 그 예로, 전술한 바와 같이, 상기 평형 완충액의 pH는 6 내지 8.5일 수 있다.

[59] 본 발명의 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액을 이용하는 방법은 최종 생성물에 있어서 피크 3의 함량이 로딩하는 시료와 비교하여 감소하는 방향으로 조절된 것이 특징이다.

[60]

[61] 그 예로, 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액을 이용하여 피크 3의 함량이 20%를 초과하는 시료에 있어서 피크 3의 함량을 2 내지 17% 수준으로 감소시킬 수 있다.

[62] 다른 예로, 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액을 이용하여 피크 3의 함량이 45%를 초과하는 시료에 있어서 피크 3의 함량을 18% 이하의 수준으로 감소시킬 수 있다.

[63]

발명의 실시를 위한 형태

[64] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[65]

[66] 실시예 1: 에타너셉트의 제조 및 HIC Flow-Through

[67]

[68] 에타너셉트를 제조하고자, CHO 세포에 TNFR-Fc 용합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터(pCUCBin-mSig-TNfcept)를 형질감염시켜 배양하고, MTX를 이용하여 선별한 CHO 세포 배양액에 대해 친화성

크로마토그래피(affinity chromatography)와 음이온 크로마토그래피(anion chromatography)를 순차적으로 적용하였다.

- [69] 먼저, 친화성 크로마토그래피는 구체적으로 하기와 같이 진행하였다. 친화성 수지인 MabSelect SuRe™(GE Healthcare)를 XK26 컬럼(GE Healthcare)에 충전하여 100 내지 200 mM 염화나트륨을 함유한 20 mM 트리스-HCl pH 8.0 완충용액을 충분히 흘려주어 컬럼을 평형화한 후, 준비한 배양액을 흘려주어 친화 수지와 결합시키고 pH 3.4 내지 pH 3.0의 용출 완충액으로 용출시켰다. 2 M 트리스를 이용하여 용출액의 pH를 7.0 내지 8.0으로 조절하였다.
- [70] 상기 친화성 크로마토그래피를 통해 수득한 용출액에 대해 음이온 크로마토그래피를 하기와 같이 진행하였다. 구체적으로 음이온 수지인 Fractogel EMD TMAE(Merck)를 LRC15 컬럼(Pall Life Sciences)에 충전하여 pH 7.5 내지 8.5의 트리스를 함유한 완충용액을 충분히 흘려주어 컬럼을 평형화한 후, 친화성 크로마토그래피로부터의 용출액을 흘려주어 단백질을 음이온 수지와 결합시키고 100 내지 200 mM 염화나트륨 함유 트리스 용출 완충액으로 용출시켰다.
- [71]
- [72] 상기 친화성 크로마토그래피 및 음이온 크로마토그래피를 차례로 수행하여 수득한 용출액에 하기와 같이 HIC Flow-Through 공정을 적용하였다. 이때, 회수되는 Peak 3의 함량은 부틸-NPR(TSK, 14947) 분석 컬럼을 이용하여 0.1 M 인산나트륨 pH 6.0, 1.8 M 암모늄(A 완충액) 및 0.1 인산나트륨 pH6.0(B 완충액)에 의해 선형구배로 측정하였다.
- [73]
- [74] 실험 예 1: 염화나트륨을 이용한 Peak 3 함량 조절
- [75]
- [76] HIC Flow-Through 공정을 위하여 10 mM 인산나트륨에 염화나트륨을 각각 1.1 M 내지 1.4 M 함유하는 평형 완충액(EQ buffer)을 준비하였으며, 모든 평형 완충액은 pH가 6.3이 되도록 하였다. HIC에 로딩하는 시료 역시 평형 완충액과 동일한 농도의 인산나트륨과 염화나트륨을 포함하도록 제조하였다.
- [77] 페닐 세파로스 고성능 레진(GE Healthcare)을 이용한 HIC Flow-Through 공정은 도 1에 나타난 바와 같이, 로딩, 평형화(EQ), 스트립 및 CIP 공정으로 이루어지며, 스트립 및 CIP 단계의 완충액으로는 각각 10 mM 인산나트륨 pH 6.3과 0.5 N 수산화나트륨을 이용하였다.
- [78] 용출액(elution pool)은 로딩 단계에서 280 nm에서 흡광도를 기준으로 50 mAU 이상에서 수집하여 평형 완충액 단계까지 5CV(column volume) 분획을 수집하여 평가하였으며, 그 결과를 사용한 염화나트륨 농도에 따라 하기 표 1에 나타내었다.

[79] [표1]

평형 완충액 조건	Peak 3 함량 (%)
로딩 샘플	21
10 mM 인산나트륨 pH 6.3, 1.1 M 염화나트륨	5.3 ~ 17.0
10 mM 인산나트륨 pH 6.3, 1.2 M 염화나트륨	2.9 ~ 15.7
10 mM 인산나트륨 pH 6.3, 1.3 M 염화나트륨	2.5 ~ 14.8
10 mM 인산나트륨 pH 6.3, 1.4 M 염화나트륨	2.2 ~ 13.7

[80] 표 1에 나타난 바와 같이, 사용한 염화나트륨 농도가 증가함에 따라 Peak 3의 함량은 감소하는 경향을 나타내었으며, 결론적으로 염화나트륨의 사용 농도에 따라 Peak 3의 함량을 2.2 ~ 17.0% 범위에서 조절할 수 있음을 확인하였다.

[81]

[82] 실험 예 2: 황산암모늄을 이용한 Peak 3 함량 조절

[83]

[84] 황산암모늄을 이용한 HIC Flow-Through 공정을 위하여 20 mM 트리스-HCl pH 8.0 완충액에 0.5 M 황산나트륨을 함유하도록 평형 완충액(EQ buffer)을 준비하였다. HIC 로딩 샘플 또한 20 mM 트리스-HCl pH 8.0 및 0.5 M 황산암모늄을 함유하도록 하여 로딩 샘플을 제조하였다.

[85] 페닐 세파로스 고성능 레진(GE Healthcare)을 XK16(GE Healthcare)에 5 cm 충전하여 HIC Flow-Through 공정을 실시하였다. 실험 예 1에서와 같이 상기 공정은 로딩, 평형화, 스트립 및 CIP공정으로 이루어졌으며, 스트립 및 CIP 단계의 완충액으로는 각각 20 mM 트리스-HCl pH 7.0과 0.5 N 수산화나트륨을 이용하였다.

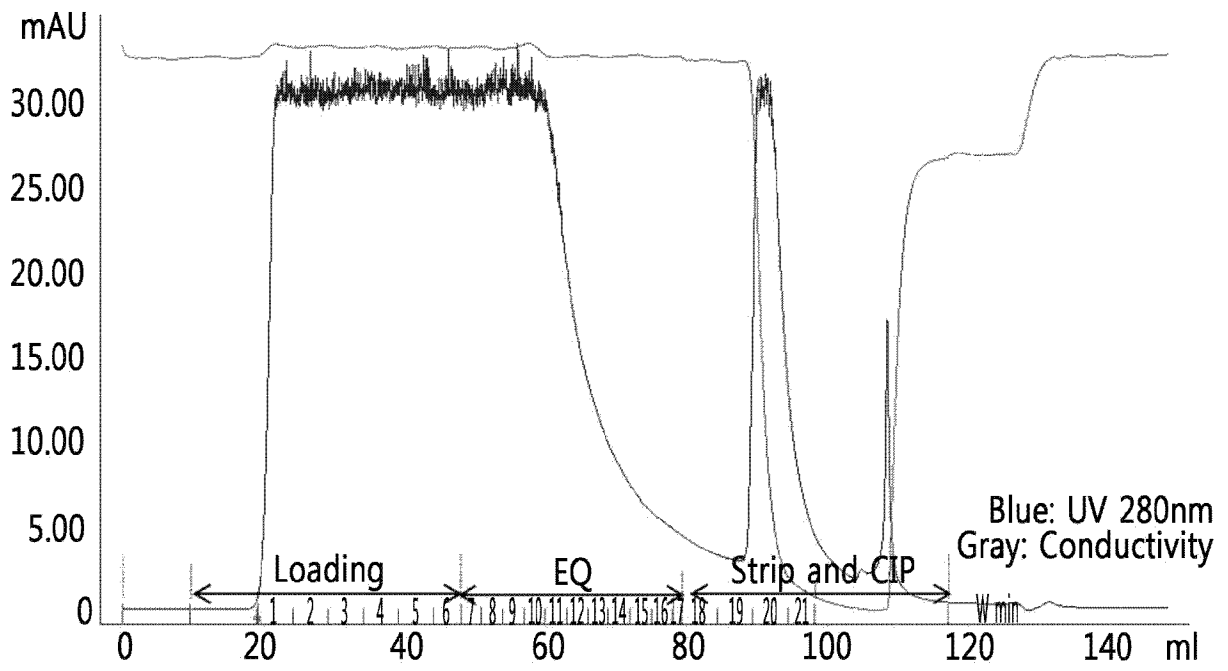
[86] 용출액(elution pool)은 로딩 단계에서 280 nm에서 흡광도를 기준으로 50 mAU 이상에서 수집하여 평형 완충액 단계까지 5CV 분획을 수집하여 평가하였으며, 그 결과, Peak 3을 46.1% 함유한 로딩 샘플에 대해 HIC Flow-Through 공정을 수행하였을 때, 상기 공정 후 Peak 3의 함량은 12% 수준으로 조절되었음을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 단계를 포함하는, 목적하는 함량으로 소수성 크로마토그램의 피크 3을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질 혼합물을 제조하는 방법:
 (a) 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료를 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액(equilibration buffer; EQ buffer)으로 전-평형화된 방향족 작용기를 포함하는 소수성 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography; HIC) 매질이 충전된 컬럼에 주입하는 단계; 및
 (b) 상기 평형 완충액과 동일한 농도로 염화나트륨 또는 황산암모늄을 포함하는 용출 완충액으로 단백질을 용출시켜 용출액을 수집하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 목적하는 소수성 크로마토그램의 피크 3의 목적하는 함량은 9 내지 18%인 것인 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 방향족 작용기는 페닐기인 것인 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 (a) 단계의 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액은 소수성 크로마토그램의 피크 3의 함량이 20%를 초과하는 것인 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 평형 완충액 및 용출 완충액은 7 내지 15 mM 인산나트륨을 포함하는 완충액인 것인 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 평형 완충액 및 용출 완충액은 pH가 6 내지 8.5인 것인 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량에 따라 평형 완충액 중의 염화나트륨의 농도를 조절하는 것을 특징으로 하는 방법으로서,
 시료의 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량이 20% 초과 내지 45% 이하이고, 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량이 2 내지 17%인 경우 1 내지 1.4 M 농도의 염화나트륨을 포함하는 완충액으로 평형화시키는 것을 특징으로 함.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량에 따라 평형 완충액 중의 황산암모늄을 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법으로서,
 시료의 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량이 45%를 초과하고, 목적하는 소수성 크로마토그램 피크 3의 함량이 10 내지 20%인 경우 0.45 내지 0.55 M 농도의 황산암모늄을 포함하는 완충액으로 평형화시키는 것을 특징으로 함.

- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 포유류 세포는 pCUCBin-mSig-TNFcept 벡터를 형질감염시킨 CHO 세포인 것인 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 포유류 세포에서 생산된 TNFR-Fc 융합 단백질 혼합액을 포함하는 시료는 세포 배양액을 친화성 크로마토그래피, 음이온 크로마토그래피 또는 이들 모두를 이용하여 부분 정제한 것인 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 소수성 크로마토그래피는 순차적인 로딩, 평형화, 스트립 및 CIP 공정으로 구성되는 것인 방법.
- [청구항 12] 1.0 내지 1.5 M 농도의 염화나트륨 또는 0.45 내지 0.55 M 농도의 황산암모늄을 포함하는 평형 완충액으로 소수성 크로마토그래피 매질을 전-평형화하는 단계; 및 상기 전-평형화된 크로마토그래피 매질에 동일한 염농도를 갖도록 준비한 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 시료를 로딩하는 단계를 포함하는,
에타너셉트에 함유된 소수성 크로마토그램의 피크 3의 함량을 조절하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 염화나트륨을 포함하는 평형 완충액은 pH가 6 내지 8.5인 것인 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
로딩하는 시료와 비교하여 피크 3의 함량이 감소하는 방향으로 조절된 것인 방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
피크 3의 함량이 20%를 초과하는 시료에 있어서 피크 3의 함량을 2 내지 17% 수준으로 감소시키는 것인 방법.
- [청구항 16] 제13항에 있어서,
피크 3의 함량이 45%를 초과하는 시료에 있어서 피크 3의 함량을 10 내지 20% 수준으로 감소시키는 것인 방법.

[도 1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/014393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, C07K 16/00(2006.01)i

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)

C07K 19/00; C07K 1/16; C07K 1/20; C07K 14/705; C07K 16/00; C07K 1/22; C07K 16/24; C07K 1/18; A61K 47/12; A61K 9/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
 Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: TNFR-FC fusion protein, hydrophobic chromatography, peak3, sodium chloride, ammonium sulfate, sodium phosphate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0020644 A (HANWHA CHEMICAL CORPORATION) 27 February 2013 See abstract; paragraphs [0087]-[0091]; claims 1-22.	1-16
A	US 2014-0072560 A1 (COHERUS BIOSCIENCES, INC.) 13 March 2014 See abstract; paragraphs [0025], [0031], [0100], [0199]; claims 1-19.	1-16
A	EVANS et al., "Purification of an Fc-fusion Biologic: Clearance of Multiple Product related Impurities by Hydrophobic Interaction Chromatography" Journal of Chromatography A, Vol. 1177, pp. 265-271 (2008) See the entire document.	1-16
A	KR 10-2014-0043934 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 11 April 2014 See the entire document.	1-16
A	KR 10-2014-0083037 A (COHERUS BIOSCIENCES, INC.) 03 July 2014 See the entire document.	1-16
A	KR 10-2012-0118013 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH.) 25 October 2012 See the entire document.	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search

12 APRIL 2016 (12.04.2016)

Date of mailing of the international search report

14 APRIL 2016 (14.04.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/014393

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0020644 A	27/02/2013	EP 2753634 A1	16/07/2014
		JP 2014-521364 A	28/08/2014
		US 2014-0316114 A1	23/10/2014
		WO 2013-025079 A1	21/02/2013
US 2014-0072560 A1	13/03/2014	AU 2013-315750 A1	05/03/2015
		CA 2882551 A1	20/03/2014
		CN 104902914 A	09/09/2015
		CO 7400876 A2	30/09/2015
		EA 201590542 A1	30/07/2015
		EP 2895188 A1	22/07/2015
		JP 2015-533797 A	26/11/2015
		KR 10-2015-0056601 A	26/05/2015
		WO 2014-043103 A1	20/03/2014
KR 10-2014-0043934 A	11/04/2014	CA 2840951 A1	17/01/2013
		CN 103814044 A	21/05/2014
		EP 2729482 A1	14/05/2014
		JP 2014-520814 A	25/08/2014
		US 2014-0187751 A1	03/07/2014
		WO 2013-009526 A1	17/01/2013
KR 10-2014-0083037 A	03/07/2014	CA 2851628 A1	25/04/2013
		CA 2851635 A1	25/04/2013
		CA 2851639 A1	25/04/2013
		CA 2851642 A1	25/04/2013
		CA 2851646 A1	25/04/2013
		CA 2851651 A1	25/04/2013
		CA 2878508 A1	16/01/2014
		CN 103998060 A	20/08/2014
		CN 103998061 A	20/08/2014
		CN 104010654 A	27/08/2014
		CN 104010657 A	27/08/2014
		CN 104010658 A	27/08/2014
		CN 104011073 A	27/08/2014
		CN 104661651 A	27/05/2015
		EP 2768525 A1	27/08/2014
		EP 2768531 A1	27/08/2014
		EP 2768532 A1	27/08/2014
		EP 2768533 A1	27/08/2014
		EP 2768535 A1	27/08/2014
		EP 2768854 A1	27/08/2014
		EP 2869816 A1	13/05/2015
		EP 2869817 A1	13/05/2015
		JP 2014-530254 A	17/11/2014
		JP 2014-530255 A	17/11/2014
		JP 2014-530256 A	17/11/2014
		JP 2014-530862 A	20/11/2014
		JP 2014-530863 A	20/11/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/014393

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2014-530864 A	20/11/2014
		JP 2015-525762 A	07/09/2015
		JP 2015-525763 A	07/09/2015
		KR 10-2014-0079491 A	26/06/2014
		KR 10-2014-0091705 A	22/07/2014
		KR 10-2014-0091706 A	22/07/2014
		KR 10-2014-0091707 A	22/07/2014
		KR 10-2014-0097184 A	06/08/2014
		KR 10-2015-0030704 A	20/03/2015
		WO 2013-059405 A1	25/04/2013
		WO 2013-059406 A1	25/04/2013
		WO 2013-059407 A1	25/04/2013
		WO 2013-059408 A1	25/04/2013
		WO 2013-059410 A1	25/04/2013
		WO 2013-059412 A1	25/04/2013
		WO 2014-011629 A1	16/01/2014
		WO 2014-011672 A1	16/01/2014
KR 10-2012-0118013 A	25/10/2012	AU 2011-208659 B2	28/05/2015
		CA 2784959 A1	28/07/2011
		CN 102712673 A	03/10/2012
		CN 102712673 B	30/04/2014
		EP 2526114 A1	28/11/2012
		EP 2526114 B1	18/06/2014
		JP 2013-517318 A	16/05/2013
		JP 5567691 B2	06/08/2014
		US 2013-0197197 A1	01/08/2013
		WO 2011-089212 A1	28/07/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, C07K 16/00(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 19/00; C07K 1/16; C07K 1/20; C07K 14/705; C07K 16/00; C07K 1/22; C07K 16/24; C07K 1/18; A61K 47/12; A61K 9/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TNFR-FC 융합 단백질, 소수성 크로마토그래피, 피크3, 염화나트륨, 황산암모늄, 인산 나트륨

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0020644 A (한화케미칼 주식회사) 2013.02.27 요약; 단락 [0087]-[0091]; 청구항 1-22 참조.	1-16
A	US 2014-0072560 A1 (COHERUS BIOSCIENCES, INC.) 2014.03.13 요약; 단락 [0025], [0031], [0100], [0199]; 청구항 1-19 참조.	1-16
A	EVANS 등, 'Purification of an Fc-fusion biologic: Clearance of multiple product related impurities by hydrophobic interaction chromatography' Journal of Chromatography A, Vol.1177, pp.265-271 (2008) 전체 문헌 참조.	1-16
A	KR 10-2014-0043934 A (마크 샤프 앤드 돔 코포레이션) 2014.04.11 전체 문헌 참조.	1-16
A	KR 10-2014-0083037 A (코히러스 바이오사이언시즈, 인코포레이티드) 2014.07.03 전체 문헌 참조.	1-16
A	KR 10-2012-0118013 A (베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하) 2012.10.25 전체 문헌 참조.	1-16

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2016년 04월 12일 (12.04.2016)	국제조사보고서 발송일 2016년 04월 14일 (14.04.2016)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0020644 A	2013/02/27	EP 2753634 A1	2014/07/16
		JP 2014-521364 A	2014/08/28
		US 2014-0316114 A1	2014/10/23
		WO 2013-025079 A1	2013/02/21
US 2014-0072560 A1	2014/03/13	AU 2013-315750 A1	2015/03/05
		CA 2882551 A1	2014/03/20
		CN 104902914 A	2015/09/09
		CO 7400876 A2	2015/09/30
		EA 201590542 A1	2015/07/30
		EP 2895188 A1	2015/07/22
		JP 2015-533797 A	2015/11/26
		KR 10-2015-0056601 A	2015/05/26
		WO 2014-043103 A1	2014/03/20
		KR 10-2014-0043934 A	2014/04/11
CN 103814044 A	2014/05/21		
EP 2729482 A1	2014/05/14		
JP 2014-520814 A	2014/08/25		
US 2014-0187751 A1	2014/07/03		
WO 2013-009526 A1	2013/01/17		
KR 10-2014-0083037 A	2014/07/03	CA 2851628 A1	2013/04/25
		CA 2851635 A1	2013/04/25
		CA 2851639 A1	2013/04/25
		CA 2851642 A1	2013/04/25
		CA 2851646 A1	2013/04/25
		CA 2851651 A1	2013/04/25
		CA 2878508 A1	2014/01/16
		CN 103998060 A	2014/08/20
		CN 103998061 A	2014/08/20
		CN 104010654 A	2014/08/27
		CN 104010657 A	2014/08/27
		CN 104010658 A	2014/08/27
		CN 104011073 A	2014/08/27
		CN 104661651 A	2015/05/27
		EP 2768525 A1	2014/08/27
		EP 2768531 A1	2014/08/27
		EP 2768532 A1	2014/08/27
		EP 2768533 A1	2014/08/27
		EP 2768535 A1	2014/08/27
		EP 2768854 A1	2014/08/27
		EP 2869816 A1	2015/05/13
		EP 2869817 A1	2015/05/13
		JP 2014-530254 A	2014/11/17
		JP 2014-530255 A	2014/11/17
		JP 2014-530256 A	2014/11/17
		JP 2014-530862 A	2014/11/20
		JP 2014-530863 A	2014/11/20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2014-530864 A	2014/11/20
		JP 2015-525762 A	2015/09/07
		JP 2015-525763 A	2015/09/07
		KR 10-2014-0079491 A	2014/06/26
		KR 10-2014-0091705 A	2014/07/22
		KR 10-2014-0091706 A	2014/07/22
		KR 10-2014-0091707 A	2014/07/22
		KR 10-2014-0097184 A	2014/08/06
		KR 10-2015-0030704 A	2015/03/20
		WO 2013-059405 A1	2013/04/25
		WO 2013-059406 A1	2013/04/25
		WO 2013-059407 A1	2013/04/25
		WO 2013-059408 A1	2013/04/25
		WO 2013-059410 A1	2013/04/25
		WO 2013-059412 A1	2013/04/25
		WO 2014-011629 A1	2014/01/16
		WO 2014-011672 A1	2014/01/16
KR 10-2012-0118013 A	2012/10/25	AU 2011-208659 B2	2015/05/28
		CA 2784959 A1	2011/07/28
		CN 102712673 A	2012/10/03
		CN 102712673 B	2014/04/30
		EP 2526114 A1	2012/11/28
		EP 2526114 B1	2014/06/18
		JP 2013-517318 A	2013/05/16
		JP 5567691 B2	2014/08/06
		US 2013-0197197 A1	2013/08/01
		WO 2011-089212 A1	2011/07/28