

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4109204号
(P4109204)

(45) 発行日 平成20年7月2日(2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月11日(2008.4.11)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/02 (2006.01)
C O 7 K 1/18 (2006.01)
C O 7 K 1/20 (2006.01)
C O 7 K 1/22 (2006.01)
C O 7 K 14/505 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 K
 C O 7 K 1/18
 C O 7 K 1/20
 C O 7 K 1/22
 C O 7 K 14/505

請求項の数 16 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-578576 (P2003-578576)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月26日(2002.3.26)
 (65) 公表番号 特表2005-520550 (P2005-520550A)
 (43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2002/000971
 (87) 国際公開番号 W02003/080852
 (87) 国際公開日 平成15年10月2日(2003.10.2)
 審査請求日 平成17年1月14日(2005.1.14)

(73) 特許権者 504359293
 レック・フアーマシューテイカルズ・デー
 ・デー
 スロベニア国、1 5 2 6・リュブリヤナ、
 ペロブスコバ・5 7
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 所望エリスロポエチングリコアイソフォームプロフィールの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エリスロポエチン(EPO)含有組成物を、

(a) 色素アフィニティークロマトグラフィー(dye affinity chromatography)、

(b) 疎水性クロマトグラフィー及び

(c) 陰イオン交換クロマトグラフィー

のクロマトグラフィー段階に供することを含み、上記クロマトグラフィー段階が、以下に示す順序：

(a)、(b)、(c)又は(a)、(c)、(b)であって、各々、場合により

(d) ゲルクロマトグラフィー

を伴うものだけから成ることを特徴とし、製造されるEPO含有組成物のEPO1分子あたりの荷電シアル酸の含量により表されるEPOグリコアイソフォーム(glyco-isosform)プロフィールが上記クロマトグラフィー段階後に出発EPO含有組成物に比べて変化している、グリコアイソフォーム混合物の形態のエリスロポエチン(EPO)の製造方法。

【請求項 2】

上記色素アフィニティークロマトグラフィーを基質結合トリアジン色素で実施する、請求項1に記載のEPOの製造方法。

【請求項 3】

10

20

上記疎水性クロマトグラフィーをブチル化基質担体で実施する、請求項 1 又は 2 に記載の E P O の製造方法。

【請求項 4】

ろ過、限外ろ過及び／又はろ過透析の少なくとも 1 つの間欠的段階を実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表される E P O グリコアイソフォームプロフィールが変化することにより、E P O 1 分子当たり 3 シアル酸基までの範囲に相当する E P O グリコアイソフォームの割合が低下している E P O グリコアイソフォーム混合物が提供される、請求項 1 に記載の E P O の製造方法。

10

【請求項 6】

E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表される E P O グリコアイソフォームプロフィールが変化することにより、E P O 1 分子当たり 4 シアル酸基までの範囲に相当する E P O グリコアイソフォームの割合が低下している E P O グリコアイソフォーム混合物が提供される、請求項 1 に記載の E P O の製造方法。

【請求項 7】

E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表される E P O グリコアイソフォームプロフィールが変化することにより、E P O 1 分子当たり 5 シアル酸基までの範囲に相当する E P O グリコアイソフォームの割合が低下している E P O グリコアイソフォーム混合物が提供される、請求項 1 に記載の E P O の製造方法。

20

【請求項 8】

E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表される E P O グリコアイソフォームプロフィールが変化することにより、E P O 1 分子につき 6－14 の範囲に相当するシアル酸含量を有する E P O グリコアイソフォームの混合物が提供される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の E P O の製造方法。

【請求項 9】

上記 E P O グリコアイソフォーム混合物が、上記クロマトグラフィー段階の 1 又はそれ以上の条件を調整することによって製造される、請求項 8 に記載の E P O の製造方法。

【請求項 10】

E P O 1 分子当たり 7－13 シアル酸基の範囲に相当する、E P O 1 分子についての含量のシアル酸を有する E P O グリコアイソフォーム混合物が製造される、請求項 8 又は 9 に記載の E P O の製造方法。

30

【請求項 11】

E P O 1 分子当たり 8－13 シアル酸基の範囲に相当する、E P O 1 分子についての含量のシアル酸を有する E P O グリコアイソフォーム混合物が製造される、請求項 8 又は 9 に記載の E P O の製造方法。

【請求項 12】

E P O 含有組成物における E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表される E P O グリコアイソフォーム混合物のプロフィールの測定を、少なくとも 1 つの選択クロマトグラフィー段階の前及び／又は後に、次の段階を含む測定方法：

40

培養上清からの E P O 含有組成物、多数のクロマトグラフィー段階を含む E P O の単離及び精製工程の中間段階及び終了時の E P O 含有組成物、並びに医薬組成物からの E P O 含有組成物、からなる群から選択される E P O 含有組成物を提供する段階、

上記 E P O 含有組成物をゲル基質中で等電点電気泳動（I E F）に供する段階、

上記ゲルからタンパク質を膜に移す段階、及び

上記膜上で E P O を免疫検出する段階

であって、前記測定方法が、グリコアイソフォーム混合物の形態の E P O を製造する工程の前、グリコアイソフォーム混合物の形態の E P O を製造する工程中、場合によりそれに加えて上記 E P O 製造工程の終了時、及び上記医薬組成物の製造後、からなる群から選択される段階に実施されるもの

50

を実施することによって行う、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の E P O の製造方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載のグリコアイソフォーム混合物の形態のエリスロポエチン (E P O) を製造すること、及び

製造した E P O と薬学的に適合し得る担体との混合物を提供することを含む、医薬組成物の製造方法。

【請求項 1 4】

E P O 含有組成物における E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表されるエリスロポエチン (E P O) グリコアイソフォームプロファイルの測定方法であって、

培養上清からの E P O 含有組成物、多数のクロマトグラフィー段階を含む E P O の単離及び精製工程の中間段階及び終了時の E P O 含有組成物、並びに医薬組成物からの E P O 含有組成物、からなる群から選択される E P O 含有組成物を提供する段階、

上記 E P O 含有組成物をゲル基質中で等電点電気泳動 (I E F) に供する段階、

上記ゲルからタンパク質を膜に移す段階、及び

上記膜上で E P O を免疫検出する段階

を含み、前記測定方法が、グリコアイソフォーム混合物の形態の E P O を製造する工程の前、グリコアイソフォーム混合物の形態の E P O を製造する 工程中、場合によりそれに加えて上記 E P O 製造工程の終了時、及び上記医薬組成物の製造後、からなる群から選択される段階に実施され、グリコアイソフォーム混合物の形態の E P O を製造する方法が請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の方法であるか又は上記医薬組成物の製造が請求項 1 3 に記載の方法である、測定方法。

【請求項 1 5】

E P O グリコアイソフォームを E P O の単離及び精製工程中に少なくとも 2 回測定する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

E P O 1 分子あたりの荷電シアル酸の含量により表される所定の E P O グリコアイソフォームプロファイルを得るためにクロマトグラフィー段階の条件を制御するのに使用される、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、特定の組合せのクロマトグラフィー段階を使用することによるエリスロポエチン (E P O) の単離のための新しい方法に関する。この方法は、高い純度と E P O グリコアイソフォームの所望プロファイルを備えたエリスロポエチンの生産を可能にする。

【0 0 0 2】

E P O は、赤血球系前駆細胞の赤血球への増殖と分化において主要な役割を果たす糖タンパク質である。組換え D N A テクノロジーで得られる E P O (組換え E P O) は臨床応用に使用される。

【0 0 0 3】

E P O は、タンパク質の荷電糖鎖部分の数が異なるグリコアイソフォームの混合物として存在する。E P O グリコアイソフォームの種々の混合物の群は、E P O - α 、E P O - β 及び E P O - ω を含む。

【背景技術】

【0 0 0 4】

E P O 及びその生産のための方法は、例えば欧州特許第 1 4 8 6 0 5 号、同第 2 0 5 5 6 4 号及び同第 2 5 5 2 3 1 号に述べられている。

【0 0 0 5】

E P O は、遺伝的に改変された哺乳類細胞も包含する、種々のソースから単離することができる。学術及び特許文献から既知である単離／精製の方法は様々なクロマトグラフィ

10

20

30

40

50

一段階を含む。最も一般的に使用されるのは、陰イオン交換クロマトグラフィー及び逆相 HPLC (RP-HPLC) である。他のクロマトグラフィー法も使用される：ヒドロキシアパタイト、疎水性、陽イオン交換、アフィニティー (すなわちイムノアフィニティー) 及びサイズ排除 (ゲルろ過) クロマトグラフィー。中間段階が共通するものもある：塩析、濃縮、ろ過透析 (diafiltration)、限外ろ過、透析、エタノールによる沈殿等。

【0006】

EPO の単離のためのプロセスは、いくつかの欧州特許および欧州特許出願に、また科学文献にも記載されている。

【0007】

RP-HPLC の使用を含む、EPO の単離のための方法は、欧州特許第 205564 号、同第 148605 号、同第 830376 号、同第 267678 号、同第 228452 号、同第 1127063 号、同第 209539 号及び Lai ら (1986) J Biol Chem, 261 (7) : 3116-21、Broudy ら (1988) Arch Biochem Biophys, 265 (2) : 329-336、Zou ら (1988) Se Pu、Inoue ら (1994) Biol Phar Bull, 17 (2) : 180-4、Qian ら (1986) Blood, 68 (1) : 258-62、Krystall ら (1986) Blood 67 (1) : 71-9 及び Lange ら (1984) Blood Cells, 10 (2-3) : 305-14 に述べられている。RP-HPLC は、ほとんどの場合、有機非極性溶媒の使用を必要とする。有機非極性溶媒は毒性であり、環境を汚染し、また所望タンパク質から分離することが難しい。

【0008】

結合モノクローナル抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィーを含む EPO の単離のための方法は、Sasaki ら (1987) Methods Enzymol, Yanagawa ら (1984) J Biol Chem, 259 (5) : 2707-10 及び Ghanem ら (1994) Prep Biochem, 24 (2) : 127-42 に述べられている。モノクローナル抗体は哺乳類タンパク質であり、大規模生産についてのそれらの安定性は疑わしく、また適切な清掃と衛生の実行は困難である。またウイルスによる感染の危険性もある。

【0009】

欧州特許第 358463 号では、EPO の分離のためのイオン交換クロマトグラフィーと結合レクチンによるクロマトグラフィーの組合せが述べられている。この方法は低い収率しか提供しない。

【0010】

塩析及びゲルろ過と組み合わせたレクチン基質の使用が欧州特許第 1010758 号に述べられている。やはり低い収率しか得られない。

【0011】

EPO の精製のためのジヒドロキシボロニル基質の使用が欧州特許第 820468 号に述べられている。これは、ヒト医療においては使用できない低い純度である。

【0012】

欧州特許第 1127063 号は、硫酸アンモニウムによる沈殿、疎水性クロマトグラフィー、陰イオン及び陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過又は前記クロマトグラフィーの種々の組合せを使用することによる EPO の単離を述べている。この方法は、ヒト医療における使用に適する高い純度を備えた、大規模生産できる EPO を提供する。硫酸アンモニウムの使用は規模の拡張性に関する問題を引き起こす可能性があり、付加的な装置を必要とし、相の変更の必要性がある。

【0013】

欧州特許第 984062 号は、基質結合染色によるクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーを使用することによる EPO の単離を述べている。所望プロフィールのアイソフォ

ームの単離、あるいはクロマトグラフィー段階の組合せによってEPOグリコアイソフォームを変化させる可能性は記述されていない。

【0014】

欧州特許第640619号では、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用することによる特定EPOグリコアイソフォームの単離が述べられている。しかし、種々のEPOグリコアイソフォームの混合物の製造方法についての記述はない。さらに、その方法では高純度のEPOを単離することは不可能である。

【0015】

欧州特許第428267号は、分取等電点電気泳動段階を含む特定EPOグリコアイソフォームの単離のための方法、及びRP-HPLC精製段階後に実施する陰イオン交換クロマトグラフィー段階を含む、1分子当り12個又はそれ以上のシアル酸を有するEPOグリコアイソフォームの混合物の単離のための方法を述べている。さらに、この方法は、アイソフォーム、特に12個未満のシアル酸を有するものの所望混合物を目標とする管理が不可能である。所望プロフィールのアイソフォームの単離、あるいはクロマトグラフィー段階の組合せによってEPOグリコアイソフォームを変化させる可能性は記述されていない。

10

【0016】

EPO類似体の正確な数のEPOグリコアイソフォームの単離のための方法が欧州特許第1037921号に述べられている。その方法はRP-HPLCを使用する。

【0017】

20

キャピラリー等電点電気泳動を使用することによる特定EPOグリコアイソフォームの分離が、Cifuentesら(1999)、J Chromatogr A, 15(2):453-63に述べられている。しかし、この方法では尿素が使用されており、臨床適用を妨げる。キャピラリー等電点電気泳動の使用は産業における大規模生産には適さない。

【0018】

種々のクロマトグラフィー法を使用した工程によるEPOグリコアイソフォームの分離は、Gokanaら(1997) J Chromatogr A, 791:109-18にも述べられている。その方法は、結合モノクローナル抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィーの使用を含む。これは、臨床応用にとって有害なウイルス感染の危険性を上昇させ、大規模生産のための安定性は疑問であり、適切な清掃と衛生の実行は困難である。さらにこの方法は、通常は毒性有機溶媒を必要とするRP-HPLCの使用を含む。それ故、この系を産業応用に使用することは難しい。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

EPOを生産するための方法を改善することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明は、請求項1に記載のEPOを生産するための方法を提供する。本発明はまた、請求項12に記載の医薬組成物の製造のための方法及び請求項13に記載のEPO含有組成物におけるEPOグリコアイソフォームプロフィールの測定のための方法を提供する。

40

【0021】

「グリコアイソフォーム」の語は、単一等電点を有し、同じアミノ酸配列を有するEPO製剤を指す。異なるEPOグリコアイソフォームは、主としてEPO1分子当りの荷電糖鎖部分(シアル酸)の含量が異なる。

【0022】

シアル酸の含量はEPOグリコアイソフォームの酸性に寄与し、それ故、等電点電気泳動(IEF)ゲルにおける各々のバンドの位置を定義する。

【0023】

50

I E Fゲルにおけるバンド位置の数字割当ては任意である。より大きな数は酸性度の上昇、すなわちシアル酸のより高い含量を示す。従って、E P O α (エポエチン α - E p r e x (商標)) は3 - 8のE P Oグリコアイソフォームを含み、B R P標準品(欧州薬局方の標準品 - エリスロポエチンB R Pバッチ1) は1 - 8のE P Oグリコアイソフォームを含み、E P O β (エポエチン β - N e o r e c o r m o n (商標)) は1 - 8のE P Oグリコアイソフォームを含む。B R P標準品は、現在欧州市場で入手可能な2つのE P O製剤の50 : 50混合物である(エポエチン α 及びエポエチン β)。

【0024】

L a iら(1986) J B i o l C h e m及び欧州特許第428267号によれば、E P O α はE P O 1分子当たり9 - 14シアル酸基を含むE P Oグリコアイソフォームの混合物として記述されており、これらのE P Oグリコアイソフォームは対応して3 - 8の任意数に割り当てることができる(本発明のE P Oグリコアイソフォームの表示のために使用する)。

【0025】

本発明の本質的要素は、出発E P Oグリコアイソフォームプロファイルが変化する又は修飾されるように特定クロマトグラフィー段階の組合せを使用することによる、高い純度とE P Oグリコアイソフォームの所望プロファイルを備えたE P Oの生産である。本発明の方法に適用されるクロマトグラフィー段階は、少なくとも(a) 色素アフィニティークロマトグラフィー、及び(b)疎水性クロマトグラフィー及び/又は(c)陰イオン交換クロマトグラフィーを含む。好ましい実施態様では、本発明の方法は(d)ゲルろ過クロマトグラフィーをさらに含む。以下、本願明細書において、(a)色素アフィニティークロマトグラフィーに関連して、「染料」を「色素」と同義に使用する。

【0026】

本発明に従ったE P Oの生産方法では、上記クロマトグラフィー段階の各々を使用することによってE P Oグリコアイソフォームのプロファイルが変化する又は修飾される。好ましくは(d)と共に、(a)から(c)のすべてのクロマトグラフィー段階を実施することによって、より洗練された、所定のE P Oグリコアイソフォームプロファイルが得られる。そのため、単離工程の間にE P Oグリコアイソフォームのプロファイルを制御することが可能であり、それ故高い純度を有するE P Oグリコアイソフォームの正確な所望混合物(E P O α 、E P O β その他)を得ることができる。

【0027】

E P Oグリコアイソフォームの所望プロファイルは、個々の工程因子を調整することによって、特に上記クロマトグラフィー段階のために適切な基質を選択すること、それぞれのクロマトグラフィー法の洗浄/溶出段階において適切な条件を適用すること及び/又はクロマトグラフィーカラムから溶出した適切な分画を収集することによって適切に入手される。

【0028】

本発明はまた、グリコアイソフォーム混合物形態でE P Oを製造する多段階工程の間の選択中間段階で、及び場合により工程全体の開始時及び/又は終了時にも得られる、E P Oを含有する試料を、ポリアクリルアミドなどの適切なゲル基質によるI E Fに供すること、及びその後固相での免疫検出を実施することにより、E P Oグリコアイソフォームのプロファイルを分析するための方法も提供する。すなわち、該分析は、単離及び精製工程の途中で間欠的インプロセス(i n - p r o c e s s)段階として、好ましくは少なくとも2回実施する。免疫検出は、ニトロセルロース膜などの適切な膜上でのウエスタンブロット手法に基づいて実施することができる。この方法により、精製工程中の試料のインプロセス管理が可能となる。この方法は、それ故、E P Oグリコアイソフォームの特定の所望プロファイルを備えたE P Oの生産のための方法の研究、最適化手順及び産業応用にとって有用である。上記で定義したような本発明の所望E P Oグリコアイソフォームプロファイルを有するE P Oを生産するための方法と組み合わせたとき、このインプロセス分析は、選択クロマトグラフィー段階で、場合により各々の段階の前及び後に、インライン管

理 (in line control) を可能にする。所望の EPO グリコアイソフォーム プロフィールの変化の有効性及び所望 EPO グリコアイソフォーム プロフィールの見地から精製段階で調整すべき条件についての管理を可能にする。それ故、この分析は EPO の標的開発と生産を可能にする。それ故、プロフィールを指定した EPO の生産を実施することができる。高く且つ均一な製品特異性及び高い製品品質がそれによって維持される。

【発明の効果】

【0029】

本発明は、高純度と EPO グリコアイソフォームの所望プロフィールを備えた生物学的に活性な EPO の大規模製造 (高生産量) を可能にする。本発明は、それ故、EPO の工業生産に適する。

10

【0030】

本発明により、同時にいくつかの利点を得られる。本発明の方法は、EPO グリコアイソフォームの所望プロフィールを提供する。前記 EPO 純度は高く、HPLC 及びゲル電気泳動によって測定したとき、総タンパク質の少なくとも 99% を超える純度、好都合には総タンパク質の 99.9% を超える純度を達成する。該方法は EPO の大規模製造に適する。RP-HPLC 精製段階を実施する必要がないので、毒性非極性有機溶媒を回避することができる。さらに、動物由来のタンパク質又は他の物質は使用されない。それ故、ウイルス等による汚染の危険性、従って患者の感染の危険性が避けられ、臨床的安全性が改善される。得られる EPO はヒト医療における使用に適する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

本発明は、特定クロマトグラフィー法を適用する様々な方法に関する。本発明の基本的概念によれば、グリコアイソフォーム混合物の形態のエリスロポエチン (EPO) を製造するための方法は、EPO 含有組成物を (a) 染料アフィニティークロマトグラフィー及び (b) 疎水性クロマトグラフィーのクロマトグラフィー段階に供することを含み、EPO グリコアイソフォームプロフィールが、上記クロマトグラフィー段階後に出発 EPO 含有組成物に比べて変化する。本発明に従った EPO グリコアイソフォームプロフィールの語は、全混合物中に様々な比率で存在する、定義された EPO グリコアイソフォームの混合物を意味する。これらの段階 (a) 及び (b) によって、EPO 1 分子当たり低い数のシアル酸、例えば 3 まで、好ましくは 4 まで、特に 5 まで (5 を含む) のシアル酸基を有する EPO グリコアイソフォームの割合を低下させる、好ましくは排除することによってプロフィールを変化させることが可能であることが認められた。この低い数の EPO グリコアイソフォームの割合が低下すること、好ましくは排除されることは、得られる EPO 生成物にとって安定性及び生物活性の見地から有益である。

30

【0032】

クロマトグラフィー段階に供し、それによってプロフィールを変化させるための出発 EPO 含有組成物は、適切には、組換えヒト EPO (rHuEPO) が発現される細胞培養又は増殖培地の培養上清から得られる組成物である。rHuEPO は、遺伝的にトランスフェクトされた哺乳類宿主細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 又はベビーハムスター腎細胞 (BHK) から発現される。該細胞は、ローラーボトル、スピナーフラスコ又はバイオリアクターにおいて培養することができる。細胞増殖及び培養は、バッチ工程又は連続工程によって実施できる。連続工程を実施するときは、適切な期間のバイオリアクターでの灌流培養及び連続採集として実施しうる。培地から細胞及びおそらくは他の汚染物質を除去するために、培養上清を、例えば硫酸アンモニウムを使用する沈殿段階に供しうる。好ましくは該上清をろ過に供する。EPO 含有溶液又はろ液を、その後、染料アフィニティークラムに適用する。

40

【0033】

段階 (a) の染料アフィニティークロマトグラフィーは、適切な基質結合染料で、好ましくはトリアジン染料を使用して実施する。特に好ましい基質結合染料は Cibacron

50

on 3 Gであり、適切なカラム材料はBlue Sepharose 6 Fast Flowである。EPOグリコアイソフォームプロフィールが影響されうる1つの因子は、溶出緩衝液のpHである。溶出緩衝液のpHは、好ましくは5.0-9.0、より好ましくは6.0-8.0に調整する。様々な種類の溶出法が使用でき、好ましくは直線（勾配）又は段階溶出法、最も好ましくは段階溶出法が使用できる。様々な塩が溶出のために使用でき、好ましくはNaCl及びKCl、最も好ましくはNaClが使用できる。

【0034】

段階（b）の疎水性クロマトグラフィーは疎水性基質を用いて実施する。適切な基質物質は、ブチルに例示されるアルキル基、又はフェニルに例示されるアリール基などの疎水基によって修飾されるSepharoseである。EPO1分子当り低い数のシアル酸基を有するEPOグリコアイソフォームの割合の良好な低下又は排除が、イソプロピル、フェニル又はエーテルなどの疎水基を有するSource基質（ポリスチレンジビニルベンゼン）材料、フェニル、ブチル及びエーテルなどの疎水基を有するToyopearl基質、好ましくはButyl Sepharose 4 Fast Flowなどのブチル修飾基質担体の使用によって得られる。様々な種類の溶出法が使用でき、好ましくは直線（勾配）又は段階溶出法、最も好ましくは段階溶出法が使用できる。

【0035】

グリコアイソフォームプロフィールの所望変化は、陰イオン交換クロマトグラフィーのさらなる段階（c）を実施することによってさらに改善できる。この手段により、該プロフィールは、所望に応じてより洗練され、制御されたEPOグリコアイソフォーム混合物を提供するように有意に変更されうる。好ましい陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、DEAE Sepharose Fast Flow又はSource 30Q（第四級荷電アミノエチルリガンド）又はSource 15Q（第四級荷電アンモニウムリガンド）などのDEAE Sepharose、好ましくはSource 15Qである。

【0036】

本発明の方法が（d）ゲルクロマトグラフィーのクロマトグラフィー段階をさらに含むとき、所望EPOグリコアイソフォーム混合物に関してさらなる選択工程が実現できる。該EPOグリコアイソフォームは、ゲルクロマトグラフィーカラムからプールされる分画に依存して異なる。好ましいゲルクロマトグラフィーカラム材料は、Superdex 200又はSephacryl S-200である。

【0037】

上述したようなEPOを製造するための方法において、クロマトグラフィー段階は、好ましくは、以下に示す順序で次の段階：

（a）、（b）、場合により（c）及び／又は（d）；

（a）、（c）、場合により（b）及び／又は（d）；あるいは

（a）、（b）、（c）又は（a）、（c）、（b）、各々の場合により（d）

から成る。クロマトグラフィー段階に示されている順序は、有効な精製及び所望EPOグリコアイソフォーム調整の両方の見地から好都合である。間欠的段階として、好ましくは緩衝液交換、特にろ過、限外ろ過及び／又はろ過透析を実施する。しかし、段階（a）と（b）の間に緩衝液を交換する必要はない。特に、限外ろ過及びろ過透析段階を段階（b）と（c）の間に実施し、さらなる限外ろ過段階を段階（c）と（d）の間に実施する。他の従来の精製方法がそれらに加えて適用できるが、省くこともできる。特に、有機溶媒のさらなる使用を必要とするHPLC及びヒドロキシアパタイトのクロマトグラフィー段階を回避することができる。場合によりさらなる緩衝液交換又はろ過手法を補足して、段階（a）-（d）だけを適用することにより、既に高品質のEPOを高収率、高純度及びEPOグリコアイソフォームの所望プロフィールで単離することが可能となる。それ故その生成物をヒト医療における臨床適用のために直接使用することができる。

【0038】

本発明の製造方法において、EPOグリコアイソフォームプロフィールの変化は、EPO1分子当り規定された数のシアル酸基を有するEPOグリコアイソフォームの混合物を

製造することを対象とする。所望EPOグリコアイソフォーム混合物は、(i)適切な基質を選択すること、(ii)クロマトグラフィー条件を調整すること及び／又は(iii)上記クロマトグラフィー段階(a)－(d)の1又はそれ以上においてカラムから溶出した所望分画を収集することによって、適切に製造され、正確に制御される。高い生物活性と安定性を有する、均一で十分に定義されたEPOグリコアイソフォーム混合物を生産するために、クロマトグラフィー段階を、好ましくは、6－14の範囲に対応するEPO 1分子当りのシアル酸基の特定含量が得られるように調整する。所望する場合、製造されるEPOグリコアイソフォーム混合物は、それ故、EPO α (8－13のシアル酸基数)又はEPO β (6－13)又は7－13の範囲のシアル酸基数を有するEPOに対応する。さらに、混合物中の特定EPOアイソフォーム又はすべてのアイソフォームの割合も変化させる。

10

【0039】

上述したそれぞれのクロマトグラフィー段階の条件は、適切なクロマトグラフィー基質を使用すること、クロマトグラフィー条件を調整すること及び／又は溶出分画を選択することによって調整できる。pH範囲、塩濃度又は勾配及び温度に関する適切なクロマトグラフィー条件を下記の表に示す。

【0040】

【表1】

一般的範囲:

クロマトグラフィー	pH 範囲	塩濃度範囲/勾配	温度範囲℃
染料アフィニティー	5～9	0～2.5 M	2～20
疎水性	6～8	2.5～0 M	4～25
陰イオン交換	6～8	0～0.30 M	4～25
ゲルろ過	6～8	0.15～1 M	2～20

20

【0041】

【表2】

好ましい範囲:

クロマトグラフィー	pH 範囲	塩濃度範囲/勾配	温度範囲℃
染料アフィニティー	6.5～7.5	0～2.5 M	2～6
疎水性	6.5～7.5	2.5～0 M	18～23
陰イオン交換	6.5～7.5	0～0.30 M	18～23
ゲルろ過	7.2～7.5	0.15～0.5 M	2～6

30

【0042】

得られる所望グリコアイソフォーム混合物を有するEPO生成物は、治療上有効な量のEPOを含有する医薬組成物の製造に適する。本発明の方法によって得られるEPOを従来の医薬適合性の担体と混合する。好ましい医薬組成物は、EPO、緩衝液、ポリソルベート、種々のアミノ酸、場合により糖類及び塩を含有する。

40

【0043】

本発明はさらに、

・培養上清から、及び／又は多数のクロマトグラフィー段階を含むEPOの単離及び精製工程の中間段階又は終了時に、及び／又は医薬組成物から、EPO含有組成物を提供すること、

・上記EPO含有組成物をゲル基質中で等電点電気泳動(IEF)に供すること、

・上記ゲルからタンパク質を膜に移すこと、及び

・上記膜上でEPOを免疫検出すること

の段階を含む、EPO含有組成物におけるエリスロポエチン(EPO)グリコアイソフォ

50

ームプロファイルの測定のための方法を提供する。

【0044】

I E Fのために使用される適切なゲル基質はポリアクリルアミドである。ゲルから膜への転写、好ましくはニトロセルロース膜への転写は、簡単な拡散転写又はエレクトロブロット法によって実施できる。免疫検出法は、E P O特異的抗体及び適切に標識された二次抗体を使用して実施される。該膜上でのE P Oに特異的な免疫検出法と組み合わせたI E Fの使用は、哺乳類細胞培養の試料及び上述したような本発明の各々のクロマトグラフィー段階後の試料において、E P Oグリコアイソフォームのプロファイルの信頼しうる分析を可能にする。この方法は、精製の工程中に試料を管理すること、すなわちインプロセス管理を可能にする。この方法は、それ故、E P Oグリコアイソフォームの特定プロファイル 10
を備えたE P Oの生産方法の研究、最適化手順及び産業応用によって使用されうる。E P Oグリコアイソフォームのプロファイルは、精製E P Oの濃縮試料、タンパク質の複雑な混合物（細胞培養）、及び低濃度のE P Oを含む及び特定クロマトグラフィー段階後の溶液において、及び他のタンパク質を含むすべての試料又は溶液において測定することができる。この分析はE P O及び一部のE P O類似体に特異的であり、感受性がある。測定されたE P Oグリコアイソフォームプロファイルは、細胞培養から又はクロマトグラフィー段階の種々の溶出液から生じる種々の試料においてE P Oグリコアイソフォーム組成物及び定量的比率の直接比較を可能にする。E P Oグリコアイソフォームプロファイルを測定する方法は、好ましくは、上述したような本発明のエリスロポエチン（E P O）を製造する工程中にインプロセス管理として適用される。 20

【0045】

下記の実施例は本発明の様々な実施態様を例示するために提供するものであり、いかなる意味においても本発明を限定することを意図しない。

【実施例1】

【0046】

ポリアクリルアミドゲルにおけるI E F及びニトロセルロース膜上での免疫検出
この方法をE P Oグリコアイソフォームのプロファイルの分析のために使用した。E P Oグリコアイソフォームのプロファイルを種々の試料（タンパク質の複雑な混合物中、低濃度のE P Oを含む試料中）において測定することができた。分析結果は、種々の試料におけるE P O品質の直接比較を可能にした。本実施例1は、細胞培養からのE P OのI E F分析及び免疫検出を示し、あとの実施例2及び3は、E P Oの単離及び／又は精製の個々のクロマトグラフィー段階後の溶出液からの結果を示す。 30

【0047】

I E F分析用に調製する試料については、限外ろ過膜（MwCO（m o l e c u l a r w e i g h t c u t o f f、分画分子量）10000Da）を使用してろ過透析に供した。ろ過透析段階は10kDaより小さい分子を排除し、試料の脱塩と濃縮を導く。試料の最終濃度は、ゲルに負荷する試料15-20µl中E P O 0.5-1.5µgである。

【0048】

ポリアクリルアミドI E Fゲルの調製：アクリルアミドの総濃度は5％であり、架橋の程度は3％、厚さは0.5mm、及び尿素と総両性電解質の最終濃度はそれぞれ5Mと2％であった。両性電解質の役割は、ゲル中でpH3から6までのpH勾配を得ることである（例えば：総両性電解質70％：pH3-5；総両性電解質30％：pH3-10）。電極溶液は両性電解質の選択に適合させ、例えば陽極の電解質は0.1Mグルタミン酸及び0.5Mリン酸から成り、陰極の電解質はβ-アラニンの0.1M溶液であった。 40

【0049】

図1に示すように、I E Fを使用することによって細胞培養の培養上清試料中のE P Oグリコアイソフォームを分離した。レーン1-3では、E P O産生細胞培養懸濁液（CHO細胞）の試料を、培養の開始から6日目（レーン1）、10日目（レーン2）及び11日目（レーン3）に採取し、ゲルに負荷した。レーン4では、E P O B R P バッチ1を 50

ゲルに負荷した。

【0050】

プレフォーカシング：定電力 $P = 12\text{ W}$ で 25 分間（ $25 \times 11\text{ cm}$ のゲルサイズについて）。試料（ $15 - 20\text{ }\mu\text{ l}$ ）を陰極の近くに負荷した。

【0051】

フォーカシング：定電力 $P = 15\text{ W}$ で 75 分間（ $25 \times 11\text{ cm}$ のゲルサイズについて）。電気泳動中、ゲルを $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保持した。電気泳動のための条件は、種々のソースからの両性電解質の種々の特徴を考慮して変化させる。

【0052】

拡散転写：ゲルから膜へのタンパク質の拡散転写を次のように実施した。膜をゲル上に置き、数層のろ紙をその膜上に置いた。ゲル、膜及びろ紙は同じ大きさであった。膜とろ紙をあらかじめ転写緩衝液中で湿らせた。

【0053】

転写緩衝液： 48 mM トリス-HCl、 39 mM グリシン、 0.037% SDS、 20% 容量メタノール、 $\text{pH } 8.3$ 。転写時間は $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 90 分間である。

【0054】

ニトロセルロース膜上での免疫検出：

転写後、脱脂粉乳遮断液の 5% 溶液を使用してニトロセルロースを遮断した。次に、一次抗体としてのマウスモノクローナル抗 hEPO 抗体（IgG）と共に膜をインキュベートした。 10 mM トリス-HCl、 150 mM NaCl、 $\text{pH } 7.4$ を使用して膜を洗浄した。その後、二次抗体としてのホースラディッシュペルオキシダーゼと複合したウサギポリクローナル抗体（IgG）と共に膜をインキュベートした。

【0055】

染色反応のために、ペルオキシダーゼについての基質、例えば 4-クロロ-1-ナフトールを使用した。

【0056】

特異的 EPO グリコアイソフォームを、EPO BRP と比較することによって特定した。デンストメトリーを使用してバンドの強度を測定した。その後、特定 EPO グリコアイソフォームのプロフィールを算定した。

【0057】

この方法によって得た電気泳動図を図 1 に示す。

【0058】

電気泳動図で認められる別々のバンドに 3-9 の任意の数字を割り当てる。それらは、陰極から陽極へアイソフォームの酸性度の上昇に従って割り当てる（より高い数は、より多くのシアル酸を有する、それ故より低い pI を有するアイソフォームを示す）。図 1 及びその後の図面において、電気泳動図における任意の数と EPO 1 分子当りのシアル酸基の数の相関は次のとおりである：アイソフォーム 9、8、7、6・・・は、それぞれ 1 分子当たり 14、13、12、11・・・シアル酸基に帰せられる。

【0059】

図 2 は、図 1 で提示した CHO 細胞培養懸濁液培養に由来する試料中の EPO グリコアイソフォームの相対比率のプロフィールを示す。膜上のバンドの強度（図 1）を、デンストメトリーを用いて測定している。各々のバンドの強度を、各々の試料（レーン）について検出されたすべてのバンドの強度の合計の相対的割合（相対強度、%）として示している。

【0060】

図 1 及び 2 は、本発明に従って免疫検出と組み合わせた IEF 分析が、多くの他のタンパク質が存在する粗細胞培養からの EPO グリコアイソフォーム生産に対して良好で特異的な制御を可能にすることを示している。この分析により、目標とするグリコアイソフォームプロフィールの見地から、さらなる単離及び精製のための良好な基礎を提供する、採集のための適切な時点を見出すことができる。

10

20

30

40

50

【0061】

図4及び6は、本発明に従ったEPOグリコアイソフォーム混合物の製造工程中のEPOグリコアイソフォーム分析についてのさらなる電気泳動図を示す（それぞれ実施例2b及び2d）。

【実施例2】

【0062】

種々のクロマトグラフィー段階によるEPOグリコアイソフォームプロファイルの変化

実施例2a：基質結合染色Cibachron Blue 3Gでのクロマトグラフィー

EPO産生CHO細胞培養懸濁液をバイオリアクターにおいて調製し、最初に10 μ mプレフィルターで、次に0.2 μ m膜滅菌フィルターでろ過して細胞を分離した。基質結合染色Cibachron Blue 3Gを使用している液を最初のクロマトグラフィーカラムに負荷した。クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

カラム 基質Blue Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech；

粒径45-165 μ m；

CV（カラム容量）=7.85ml、H（カラムの長さ）=10cm、

D（カラムの直径）=1cm

温度 室温

流速 1.5ml/分；115cm/時

緩衝液A 10mMリン酸ナトリウム、2.5M塩化ナトリウム、pH=7.0

試料 150ml；6mg

緩衝液A 5CV（カラム容量）でカラムを平衡させた。試料を負荷した後、カラムを最初に緩衝液A 3CV、次に緩衝液AとBの混合物（90：10）5CVで洗浄した。大部分のEPOは緩衝液B（5CV）で溶出した。同じ分離を、pH6.4と8.0の緩衝液A及びBを使用して実施した。

【0063】

緩衝液Bでの溶出後のプール分画を、ポリアクリルアミドゲル中IEFを用いて分析し、タンパク質をニトロセルロース膜に移して、実施例1で述べたように免疫検出を実施した。膜上のバンドの強度をデンストメトリーで測定した。各々のバンドの強度を、各々の試料（レーン）について検出されたすべてのバンドの強度の合計の相対的割合（相対強度、%）として示している。電気泳動図で認められる別々のバンドに-3から9までの任意の数字を割り当てる（実施例1で定義したように、指示される数字とEPO1分子当りのシアル酸の含量の間に相関が存在する）。この分析は、図3に示すように洗浄及び溶出緩衝液の異なるpHを使用することによって、EPOグリコアイソフォームの異なるプロファイルが得られることを示した。

【0064】

実施例2b：疎水性クロマトグラフィー（1）

所望グリコアイソフォームプロファイルを有するBlue Sepharose 6 Fast Flowカラム（pH7の緩衝液B）からの溶出液を、Butyl Sepharose 4 Fast Flow（Amersham Pharmacia Biotech）カラムに負荷した。疎水性クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

カラム 基質Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech；

平均粒径90 μ m；

CV=1ml、H=2.5cm、D=0.7cm

温度 室温

流速 1ml/分 150cm/時

緩衝液A 10mMリン酸ナトリウム、2.5M塩化ナトリウム、pH=7.0

緩衝液B 10mMリン酸ナトリウム、1.0M塩化ナトリウム、30%（V/V

10

20

30

40

50

）イソプロパノール、 $\text{pH} = 7.0$

緩衝液C 10 mMリン酸ナトリウム、30% (V/V) イソプロパノール、 $\text{pH} = 7.0$

試料 150 ml、0.9 mg

緩衝液Aでカラムを平衡させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液A 3 CV、次に緩衝液B 8 CVで洗浄した。大部分のEPOは緩衝液Cで溶出した。緩衝液Cでカラムを洗浄することによって得たEPOグリコアイソフォームのプロフィールを、図4に示すように、ポリアクリルアミドゲル中IEF及びニトロセルロース膜上でのEPOの免疫検出によって分析した。

レーン1: Blue Sepharose Fast Flowクロマトグラフィーカラムからの溶出後の試料（精製手順の段階1）（実施例2a、緩衝液B、 $\text{pH} 7.0$ ） 10

レーン2: 細胞培養上清（精製手順の段階1の前）

レーン3: Butyl Sepharose 4 Fast Flowカラムからの溶出後の試料（緩衝液Cによる溶出後のプール分画）。

【0065】

IEF及び免疫検出分析は、実施例1におけるように実施し、評価した。

【0066】

図4から明らかになるように、より低いシアル酸含量を有するEPOグリコアイソフォームの大部分が排除されるクロマトグラフィー条件が確立された。

【0067】

限外ろ過のためのシステム、MINITAN (Millipore) を使用してプール分画を濃縮した。ろ過透析は、10 mMリン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.0$ を緩衝液として使用して実施した。

【0068】

実施例2c: 疎水性クロマトグラフィー (2)

所望グリコアイソフォームプロフィールを有するBlue Sepharose 6 Fast Flowカラム ($\text{pH} 7$ の緩衝液B) からの溶出液を、Butyl Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) カラムに負荷した。疎水性クロマトグラフィーを次の条件下で実施した:

カラム 基質Butyl Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech; 30

平均粒径 $90 \mu\text{m}$;

CV = 1 ml、H = 2.5 cm、D = 0.7 cm

温度 室温

流速 1 ml/分; 150 cm/時

緩衝液A 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液、2.5 M塩化ナトリウム、 $\text{pH} = 7.0$

緩衝液C 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液、30% (V/V) イソプロパノール、 $\text{pH} = 7.0$

試料 緩衝液Aに溶解したEPO BRP標準品; 0.5 ml; 0.25 mg 40

緩衝液Aでカラムを平衡させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液A 3 CV、次に緩衝液AとCの混合物 (50:50) 5 CVで洗浄した。緩衝液A中、緩衝液Cの直線勾配でカラムからEPOを溶出した (45分で緩衝液Cの50%から100%までの直線勾配 (= 45 CV))。3つの重複するピークがクロマトグラムに認められる。EPOは分画15-23中に溶出した。次に分画15、19及び21を、実施例1で述べたようにIEF及び免疫検出を使用して分析した。図5に示す結果は、EPOグリコアイソフォームのプロフィールが分画ごとに異なることを示している。

【0069】

低いpI (より高いシアル酸含量) を有するEPOグリコアイソフォームは、より高いpIを有するものよりも早期の分画中に溶出される。この特徴は、この方法がEPOグリ 50

コアイソフォームの所望プロフィールを備えた分画を収集することを可能にすることを示唆する。

【0070】

実施例 2 d：陰イオン交換クロマトグラフィー（1）

所望グリコアイソフォームプロフィールを有する、実施例 2 c で述べたような Butyl Sepharose 4 Fast Flow カラムからの溶出液を、DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) カラムに負荷した。陰イオン交換クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

試料	0.2 mg	10
カラム	基質 DEAE Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech ; 平均粒径 90 μm ; CV = 1 ml、H = 2.5 cm、D = 0.7 cm	
温度	室温	
流速	1 ml / 分 ; 158 cm / 時	
緩衝液 A	10 mM リン酸ナトリウム、pH = 7.0	
緩衝液 B	10 mM リン酸ナトリウム、pH = 7.0 ; 0.03 M 塩化ナトリウム	
緩衝液 C	10 mM リン酸ナトリウム、pH = 7.0 ; 0.1 M 塩化ナトリウム	
緩衝液 D	10 mM リン酸ナトリウム、pH = 7.0 ; 0.3 M 塩化ナトリウム	20

緩衝液 A でカラムを平衡させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液 A 3 CV、次に緩衝液 B 5 CV で洗浄した。大部分の EPO は緩衝液 C (8 CV) で溶出した。残りのタンパク質は緩衝液 D で溶出した。カラムを 2 M 塩化ナトリウムで再生した。

【0071】

緩衝液 C でカラムを洗浄することによって得た EPO グリコアイソフォームのプロフィールを、実施例 1 で述べたように IEF 及びニトロセルロース膜上での EPO の免疫検出によって分析した。その結果を図 6 に示す。

レーン 1：DEAE Sepharose Fast Flow からの溶出液（緩衝液 C による溶出後のプール分画）

レーン 2：EPO BRP バッチ 1。 30

【0072】

上述した条件は、EPO BRP 標準品のプロフィールと基本的に同様のプロフィールを得ることを可能にした。

【0073】

実施例 2 e：陰イオン交換クロマトグラフィー（2）

所望グリコアイソフォームプロフィールを有する、実施例 2 c で述べたような Butyl Sepharose Fast Flow カラムからの溶出液を、DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) カラムに負荷した。陰イオン交換クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

カラム	基質 DEAE Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech ; 平均粒径 90 μm ; CV = 1 ml、H = 2.5 cm、D = 0.7 cm	40
温度	室温	
流速	1 ml / 分 ; 150 cm / 時	
緩衝液 A	10 mM リン酸ナトリウム、pH = 7.0	
緩衝液 B	10 mM リン酸ナトリウム、pH = 7.0 ; 0.1 M 塩化ナトリウム	
試料	緩衝液 A に溶解した EPO BRP 標準品 ; 0.5 ml ; 0.25 mg	

緩衝液 A でカラムを平衡させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液 A 3 CV、次に緩衝液 A と B の混合物 (94 : 6) 5 CV で洗浄した。緩衝液 A 中、緩衝液 B の割合を連 50

続的に上昇させてカラムからEPOを溶出した（60分で緩衝液Bの6%から11.5%までの直線勾配（=60CV））。3つの重複するピークがクロマトグラムに認められた。EPOは分画8-24中に溶出した。

【0074】

分画11、14、プール分画21と22（21+22）及び24を、IEFを用いて分析した。タンパク質をニトロセルロース膜に移し、EPOを免疫検出して、バンドの強度を実施例1で述べたようにデンストメトリーで測定した。

【0075】

IEF分析は、EPOグリコアイソフォームのプロフィールが分画ごとに異なることを示した（図7）。より高いpI（より低いシアル酸）を有するEPOグリコアイソフォームはより早くカラムから溶出される。それ故この方法は、EPOグリコアイソフォームの所望プロフィールの生産のために使用することができる。

【0076】

実施例2f：陰イオン交換クロマトグラフィー（3）

所望グリコアイソフォームプロフィールを有する、実施例2cで述べたようなButyl Sepharose Fast Flowカラムからの溶出液をSOURCE 15Q（Amersham Pharmacia Biotech）カラムに負荷した。陰イオン交換クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

カラム 基質SOURCE 15Q, Amersham Pharmacia Biotech;

粒径15 µm;

CV=1 ml、H=3 cm、D=0.64 cm

温度

室温

流速

1 ml/分; 180 cm/時

緩衝液A

10 mMリン酸ナトリウム、pH=7.0

緩衝液B

10 mMリン酸ナトリウム、pH=7.0; 1 M塩化ナトリウム

試料

緩衝液Aに溶解したEPO BRP標準品; 0.5 ml; 0.25 mg

緩衝液Aでカラムを平衡させた。負荷後に、カラムを緩衝液A 3 CV、次に緩衝液AとBの混合物（94:6）5 CVで洗浄した。緩衝液A中、緩衝液Bの割合を連続的に上昇させてカラムからEPOを溶出した（60分で緩衝液Bの6%から11.5%までの直線勾配（=60CV））。3つの重複するプロフィールがクロマトグラムに認められる。EPOは分画8-31中に溶出した。IEF分析は、EPOグリコアイソフォームのプロフィールが分画ごとに異なることを示した（図8）。分画13、19及び26をIEFで分析し、次にタンパク質をニトロセルロース膜に移して、EPOを実施例1で述べたように免疫検出した。

【0077】

より高いpI（より低いシアル酸含量）を有するEPOグリコアイソフォームはより早くカラムから溶出される。それ故この方法は、EPOグリコアイソフォームの所望プロフィールの単離のために使用することができる。

【0078】

実施例2g：ゲルろ過

実施例2dで述べたようなDEAE Sepharose Fast Flow（Amersham Pharmacia Biotech）カラムからの溶出液をSuperdex 200（Amersham Pharmacia Biotech）カラムに負荷した。ゲルろ過を次の条件下で実施した：

試料 0.09 mg; 0.5 ml

カラム 基質Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech;

平均粒径13 µm;

CV=24 ml、H=30 cm、D=1 cm

流速 0.2 ml/分; 15.2 cm/時
 緩衝液 A 10 mMリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム、pH = 7.2
 EPOは、カラムから分画59-68中に溶出した。

【0079】

図9は、Superdex 200カラムからの溶出後のEPOグリコアイソフォームのプロフィールを示す。分画61、63、65及び67をIEFで分析し、次にタンパク質をニトロセルロース膜に移して、EPOを免疫検出し、バンドの強度を実施例1で述べたようにデンストメトリーで測定した。

【0080】

IEF分析は、EPOグリコアイソフォームが個々の分画間で異なることを明らかにした。より低いpI（より高いシアル酸含量）を有するEPOグリコアイソフォームはより早くカラムから溶出される。それ故この方法は、カラムからの溶出後に適切な分画を選択することにより、EPOグリコアイソフォームの所望プロフィールの単離を可能にする。

【0081】

実施例2h：所望EPOグリコアイソフォーム混合物の製造

図10は、実施例2eのDEAE Sepharose Fast Flowカラム及び実施例2fのSource 15Qカラムからの勾配溶出後のEPOグリコアイソフォームのプロフィールを示す。EPO BRPバッチ1をカラムに負荷した。Source Qからのプール分画13-31及びDEAE Sepharose Fast Flowからのプール分画14-28を、IEFを使用して分析した。比較のためにEPO BRP及びEPO α (Eprex)も分析した。次にタンパク質をニトロセルロース膜に移し、EPOを免疫検出して、バンドの強度を実施例1で述べたようにデンストメトリーで測定した。両方の陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに関して、所望EPO α アイソフォームプロフィールとの良好な相関がみられる。

【実施例3】

【0082】

EPOグリコアイソフォームの所望プロフィール：EPO α のプロフィールを得るための方法

EPO産生CHO細胞培養懸濁液をバイオリアクターにおいて調製し、最初に10 μ mプレフィルターで、次に0.2 μ m膜滅菌フィルターでろ過して細胞を分離した。基質結合染色Cibachron Blue 3Gを使用してろ液を最初のクロマトグラフィーカラムに負荷した。クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

カラム 基質Blue Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech;

粒径45-165 μ m;

カラム容量 (CV) = 30 ml、カラムの長さ (H) = 15 cm、カラムの直径 (D) = 1.6 cm

温度 室温

流速 5 ml/分; 150 cm/時

緩衝液 A 10 mMリン酸ナトリウム、pH = 7.0

緩衝液 B 10 mMリン酸ナトリウム、2.5 M塩化ナトリウム、pH = 7.0

試料 400 ml; 36 mg タンパク質

緩衝液 A 5 CVでカラムを平衡化させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液 A 5 CV、次に緩衝液 A と緩衝液 B の混合物 (92:8) 4 CVで洗浄した。カラムを緩衝液 B (6 CV) で洗浄することによってEPOが溶出した溶出液をさらにその後のクロマトグラフィー段階のために使用した。

【0083】

最初のクロマトグラフィー段階からの溶出液を第二クロマトグラフィー段階（疎水性クロマトグラフィー）のカラムに負荷した。疎水性クロマトグラフィーを次の条件下で実施した：

カラム 基質 Butyl Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech;

平均粒径 $90\text{ }\mu\text{m}$;

$CV = 1\text{ ml}$ 、 $H = 2.5\text{ cm}$ 、 $D = 0.7\text{ cm}$

温度 室温

流速 1 ml/分 ; 150 cm/時

緩衝液 A 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、 2.5 M 塩化ナトリウム、 $\text{pH} = 7.0$

緩衝液 B 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、 30% (V/V) イソプロパノール、 $\text{pH} = 7.0$

試料 90 ml 、 1.5 mg

緩衝液 A 5 CV でカラムを平衡化させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液 A 5 CV 、次に緩衝液 A と B の混合物 ($1:1$) 12 CV で洗浄した。緩衝液 B (15 CV)で EPO が溶出した溶出液をその後のクロマトグラフィー段階のために使用した。

【0084】

第二クロマトグラフィー段階からの溶出液を濃縮し、限外ろ過用のシステム、Centricon YM-10 (Millipore) を使用して緩衝液 B を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、 $\text{pH} = 7.0$ に置換した。濃縮物を第三クロマトグラフィー段階 (陰イオン交換クロマトグラフィー) のカラムに負荷した。クロマトグラフィーを次の条件下で実施した:

カラム 基質 SOURCE 15Q, Amersham Pharmacia Biotech;

粒径 $15\text{ }\mu\text{m}$;

$CV = 1\text{ ml}$ 、 $H = 3\text{ cm}$ 、 $D = 0.64\text{ cm}$

温度 室温

流速 1 ml/分 ; 180 cm/時

緩衝液 A 10 mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH} = 7.0$

緩衝液 B 10 mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH} = 7.0$; 1 M 塩化ナトリウム

試料 2 ml ; 0.4 mg

緩衝液 A 5 CV でカラムを平衡化させた。試料を負荷した後、カラムを緩衝液 A 5 CV で洗浄した。緩衝液 A 中、緩衝液 B の直線勾配で EPO を溶出した (60 分で緩衝液 B の 0 から 13% までの直線勾配 ($=60\text{ CV}$))。EPO は分画 $20-56$ 中に溶出し、所望グリコアイソフォームプロフィールは分画 $37-51$ 中に認められた。

【0085】

Blue Sepharose 6 Fast Flow、Butyl Sepharose 4 Fast Flow 及び Source 15Q を使用した3つの連続的クロマトグラフィー段階後の単離 EPO のグリコアイソフォームの最終プロフィールを図 11 に示す。

【0086】

Source 15Q からのプール分画 $37-51$ を、図 1 で述べたように IEF で分析した。比較のために他の2つの試料を負荷した: すなわち、EPO α (Eprex) 及びバイオリクターでの細胞培養からの非精製培養上清である。図 11 から明らかなように、所望の EPO グリコアイソフォームプロフィールと EPO α の間の卓越した相関が、3つの特徴的クロマトグラフィー段階だけを使用することによってみられた。同時に、得られる EPO 生成物の純度は、HPLC 及びゲル電気泳動によって測定したとき 99% 以上であった。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図 1】図 1 は、EPO を発現する CHO 細胞の培養 6 日目、10 日目及び 11 日目の上清試料中の EPO グリコアイソフォームの分離を示す。分離は実施例 1 に従って IEF 及

10

20

30

40

50

び免疫検出を使用して実施した。

【図2】図2は、図1に示したCHO細胞懸濁液培養に由来する試料中のEPOグリコアイソフォームの相対比率のプロフィールを示す。

【図3】図3は、実施例2aにおいて溶出緩衝液のために使用したpH条件に依存する、染料アフィニティークロマトグラフィーカラムからの溶出後のEPOグリコアイソフォームの相対比率のプロフィールを示す。

【図4】図4は、実施例2bで得られるようなIEF及び膜上でのEPOの免疫検出後のEPOグリコアイソフォームの電気泳動図を示す。レーン1：染料アフィニティークロマトグラフィーカラムからの溶出後の試料（精製手順の段階1）（実施例2a、緩衝液B、pH7.0）レーン2：細胞培養上清（精製手順の段階1の前）レーン3：疎水性クロマトグラフィーカラムからの溶出後の試料。

10

【図5】図5は、実施例2cで得られるようなカラムからの勾配溶出による疎水性クロマトグラフィー実施後の種々のEPOグリコアイソフォーム分画の相対比率のプロフィールを示す。

【図6】図6は、IEF及び膜上でのEPOの免疫検出によって分析したときの、実施例2dで得られるDEAEカラムの陰イオン交換クロマトグラフィー実施後のEPOグリコアイソフォームの電気泳動図を示す。レーン1：DEAEカラムからの溶出液レーン2：EPO BRP標準品

【図7】図7は、実施例2eで得られるDEAEカラムからの勾配溶出による陰イオン交換クロマトグラフィー実施後の種々のEPOグリコアイソフォーム分画の相対比率のプロフィールを示す。

20

【図8】図8は、実施例2fで得られるSource 15Qカラムからの勾配溶出によるもう1つの陰イオン交換クロマトグラフィー実施後の種々のEPOグリコアイソフォーム分画の相対比率のプロフィールを示す。

【図9】図9は、ゲルクロマトグラフィー、次いでIEF分析の実施後の種々のEPOグリコアイソフォーム分画の相対比率のプロフィールを示す。（実施例2g）。

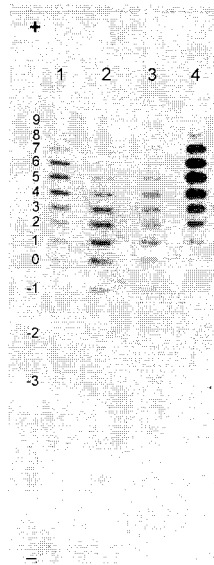
【図10】図10は、EPO標準品と比較して、DEAE及びSource 15Qカラムからの勾配溶出後にプールした分画中に存在するEPOグリコアイソフォームの相対比率のプロフィールを示す（実施例2h）。

【図11】図11は、IEFで分析したとき、染料アフィニティー、疎水性及び陰イオン交換クロマトグラフィー段階を含む3つの連続的クロマトグラフィー段階後のEPOグリコアイソフォームの相対比率のプロフィールを示す。比較のために、バイオリアクターからの、細胞培養上清からのEPO α 及び非精製EPOをIEFによって分析した。この特定の場合には、アイソフォーム8は、ゲルに負荷した物質の量が少なかったため検出されなかった。

30

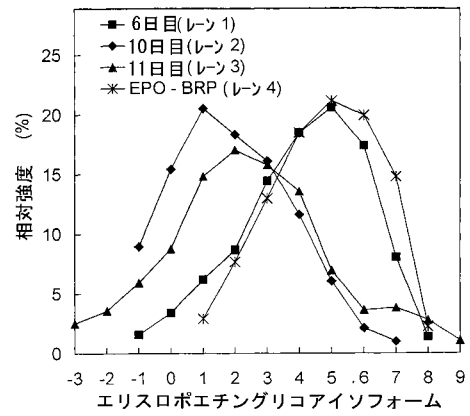
【図 1】

Fig. 1



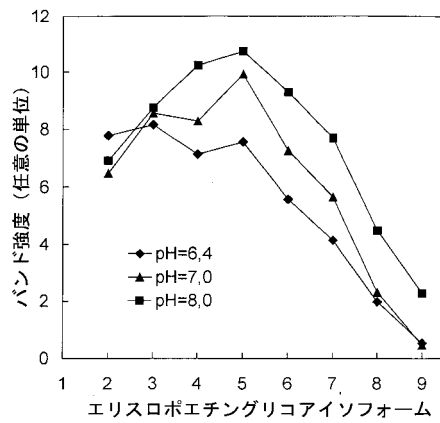
【図 2】

Fig. 2



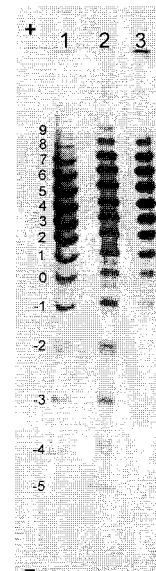
【図 3】

Fig. 3



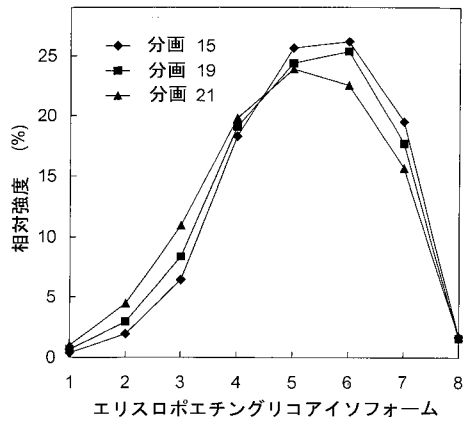
【図 4】

Fig. 4



【図 5】

Fig. 5



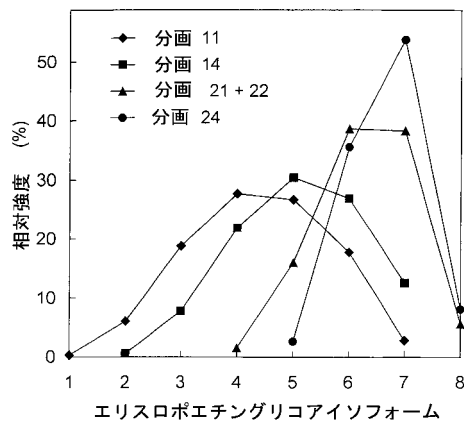
【図 6】

Fig. 6



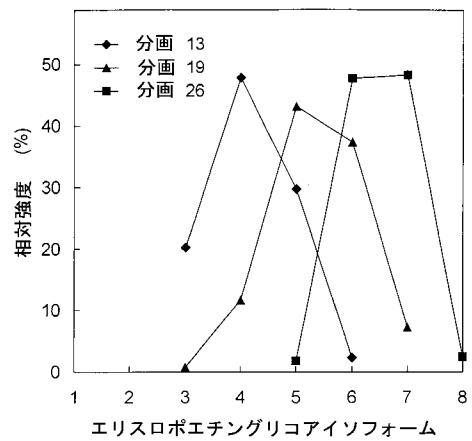
【図 7】

Fig. 7



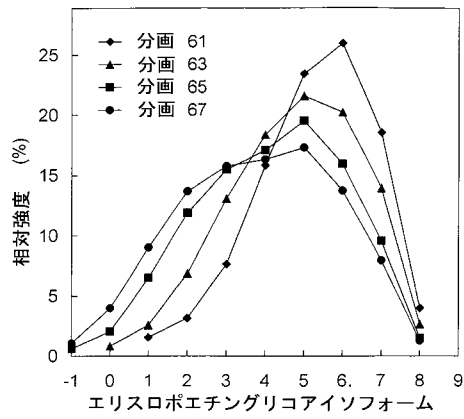
【図 8】

Fig. 8



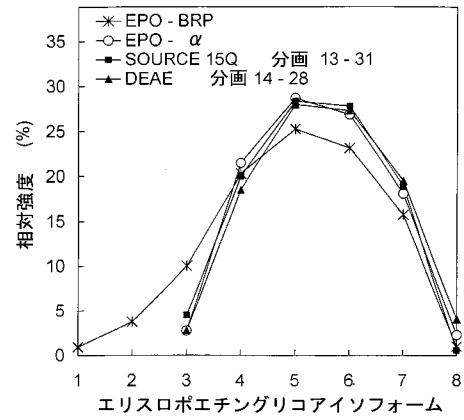
【図 9】

Fig. 9



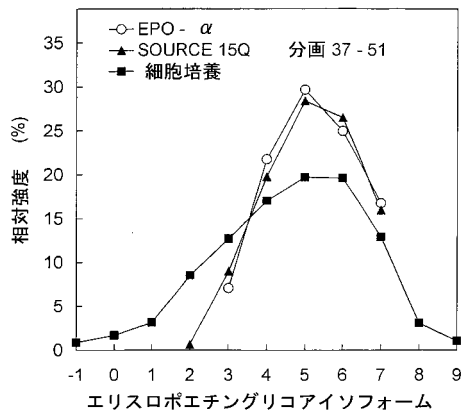
【図 10】

Fig. 10



【図 11】

Fig. 11



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N	27/447	(2006.01)	G 0 1 N 27/26 3 1 5 Z
G 0 1 N	30/46	(2006.01)	G 0 1 N 30/46 A
B 0 1 J	20/281	(2006.01)	G 0 1 N 30/48 G
G 0 1 N	30/88	(2006.01)	G 0 1 N 30/48 R
G 0 1 N	33/483	(2006.01)	G 0 1 N 30/88 J
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/483 F
			G 0 1 N 33/53 V

- (72)発明者 スベテイナー, モニカ
スロベニア国、１０００・リュブリャナ、ロズナ・ドリナ・セー・イー・ヴェー／３０
- (72)発明者 スベテツク, イエルカ
スロベニア国、１０００・リュブリャナ、ブルスニコバ・１３
- (72)発明者 ガンタールークセーラ, マテイア
スロベニア国、１０００・リュブリャナ、シセンカ・９
- (72)発明者 ブリンク, マトヤス
スロベニア国、１０００・リュブリャナ、レボリエバ・５
- (72)発明者 フランキー, アンドレイ
スロベニア国、１０００・リュブリャナ、ゴラズドバ・７

審査官 田中 耕一郎

- (56)参考文献 特表２００１－５２５３３８（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５０６９２４（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５１１３４３（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５２５３４２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９６／０３５７１８（ＷＯ，Ａ１）

- (58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 1/00 - C07K 19/00
C12P 1/00 - C12P 41/00
G01N 33/00 - G01N 33-98

专利名称(译)	产生所需促红细胞生成素糖酵母形态的方法		
公开(公告)号	JP4109204B2	公开(公告)日	2008-07-02
申请号	JP2003578576	申请日	2002-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	カ奇制药公司		
申请(专利权)人(译)	Retsuku杉机宇泰Karuzu日复一日		
当前申请(专利权)人(译)	Retsuku杉机宇泰Karuzu日复一日		
[标]发明人	スベティーナモニカ スベテツクイエルカ ガンタールクセーラマティア ブリンクマトヤス フランキーアンドレイ		
发明人	スベティーナ,モニカ スベテツク,イエルカ ガンタールクセーラ,マティア ブリンク,マトヤス フランキー,アンドレイ		
IPC分类号	C12P21/02 C07K1/18 C07K1/20 C07K1/22 C07K14/505 G01N27/447 G01N30/46 B01J20/281 G01N30/88 G01N33/483 G01N33/53 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/505		
FI分类号	C12P21/02.K C07K1/18 C07K1/20 C07K1/22 C07K14/505 G01N27/26.315.Z G01N30/46.A G01N30/48.G G01N30/48.R G01N30/88.J G01N33/483.F G01N33/53.V		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
审查员(译)	田中一郎		
其他公开文献	JP2005520550A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过使用特定色谱步骤的组合以改变起始EPO二醇-异构体谱或改变起始EPO二醇-异构体谱的方式生产高纯度和具有所需EPO二醇-异构体谱的促红细胞生成素 (EPO) 的方法。改性。所应用的色谱步骤至少包括 (a) 染料亲和色谱, 和 (b) 疏水色谱和/或 (c) 阴离子交换色谱。在一个优选的实施方案中, 该方法进一步包括 (d) 凝胶过滤色谱。本发明还提供了一种用于确定含EPO的组合物中的促红细胞生成素 (EPO) 二醇同工型的方法。

好ましい範囲:

操作	pH範囲	塩濃度範囲/勾配	温度範囲℃
染料アフィニティー	6.5~7.5	0~2.5 M	2~6
疎水性	6.5~7.5	2.5~0 M	18~23
陰イオン交換	6.5~7.5	0~0.30 M	18~23
ゲルろ過	7.2~7.5	0.15~0.5 M	2~6