

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-508135

(P2017-508135A)

(43) 公表日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 30/88 (2006.01)	G O 1 N 30/88 2 O 1 X	4 C O 5 8
G O 1 N 30/50 (2006.01)	G O 1 N 30/50	4 D O 1 7
A 6 1 L 2/08 (2006.01)	G O 1 N 30/88 2 O 1 R	4 G O 6 6
B O 1 D 15/36 (2006.01)	G O 1 N 30/88 2 O 1 Y	
B O 1 D 15/38 (2006.01)	A 6 1 L 2/08 1 O O	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-546935 (P2016-546935)	(71) 出願人	500034653 ジェンザイム・コーポレーション アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 142, ケンブリッジ, ケンダル ストリ ート 500
(86) (22) 出願日	平成27年1月16日 (2015.1.16)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月9日 (2016.9.9)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/011705	(72) 発明者	ラフル・ゴダワット アメリカ合衆国ニュージャージー州088 07, ブリッジウォーター, メールコード : 55エー-505エー, コーポレートド ライブ55, サノフィ
(87) 国際公開番号	W02015/109151		
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015.7.23)		
(31) 優先権主張番号	61/928, 929		
(32) 優先日	平成26年1月17日 (2014.1.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/001, 498		
(32) 優先日	平成26年5月21日 (2014.5.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無菌クロマトグラフィー樹脂および製造方法におけるその使用

(57) 【要約】

本明細書に、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する（例えば、殺菌する）方法であって、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することを含み、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射への曝露後／その際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、方法が提供される。また、低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を含む低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラム、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種のキレート剤および／または酸化防止剤を含む組成物、これらの低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラムの1つを用いて低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーを実行する方法、ならびに精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドな、連続的な方法も提供

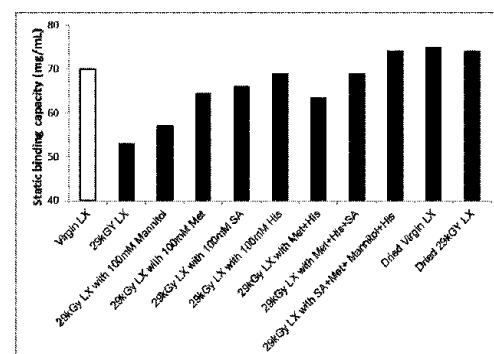


FIG. 14

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法であって、
クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤
を含む組成物を含む容器を、該容器および該クロマトグラフィー樹脂の該バイオバーデン
を低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露すること：を含み、該少なくとも 1 種の
酸化防止剤および／またはキレート剤は、該線量のガンマ線照射への曝露後の該クロマト
グラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、前記方法。

【請求項 2】

曝露に先立って、組成物を容器中に配置することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法 10

【請求項 3】

容器が貯蔵容器である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

容器がクロマトグラフィーカラムである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

容器が充填されたクロマトグラフィーカラムである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

組成物が、少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中の堆積 20
したクロマトグラフィー樹脂のスラリーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

組成物が固体混合物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

組成物が、還元グルタチオン、還元チオレドキシン、還元システイン、カロテノイド、
メラトニン、リコピン、トコフェロール、還元ユビキノン、アスコルベート、ビリルビン
、尿酸、リボ酸、フラボノイド、フェノールプロパノイド酸、リドカイン、ナリングニン
、フラレン、グルコース、マンニトール、4-ヒドロキシ-2, 2, 6, 6-テトラメ
チルピペリジン-1-オキシル、およびジメチルメトキシクロマノール：からなる群から
選択される少なくとも 1 種の酸化防止剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

組成物が、マンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびメチオニン 30
：からなる群から選択される少なくとも 1 種の酸化防止剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

組成物がマンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびメチオニンを
含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

液体が：

(i) 75 mM～約 125 mM のマンニトール；

(i i) 75 mM～約 125 mM のメチオニン； 40

(i i i) 75 mM～約 125 mM のアスコルビン酸ナトリウム；

(i v) 75 mM～約 125 mM のヒスチジン；

(v) 30 mM～約 70 mM のメチオニンおよび約 30 mM～約 70 mM のヒスチジン；

(v i) 約 10 mM～約 50 mM のメチオニン、約 10 mM～約 50 mM のヒスチジン、
および約 10 mM～約 50 mM のアスコルビン酸ナトリウム；または

(v i i) 約 5 mM～約 45 mM のアスコルビン酸ナトリウム、約 5 mM～約 45 mM の
メチオニン、約 5 mM～約 45 mM のマンニトール、および約 5 mM～約 45 mM のヒス
チジン

を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

液体が緩衝溶液である、請求項 6 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

組成物が、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DMPS)、ジメルカプトコハク酸 (DMSA)、メタロチオネイン、およびデスフェロキサミン：からなる群から選択される少なくとも 1 種のキレート剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

組成物が、アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂：からなる群から選択される少なくとも 1 種のクロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 15】

組成物が、タンパク質リガンドを含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

タンパク質リガンドがプロテイン A である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

組成物がアニオン交換クロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

アニオン交換クロマトグラフィー樹脂が N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含む、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

線量が約 15 kGy ~ 約 45 kGy である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

線量が約 20 kGy ~ 約 30 kGy である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

線量が約 23 kGy ~ 約 27 kGy である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

曝露が、約 -25 °C ~ 約 0 °C (両端を含む) の温度で実行される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 23】

曝露が、約 0 °C ~ 約 25 °C (両端を含む) の温度で実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 3 に記載の方法により生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

【請求項 25】

約 1×10^{-8} ~ 約 1×10^{-5} の滅菌保証レベル (SAL) を有する、請求項 24 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

【請求項 26】

約 1×10^{-7} ~ 約 1×10^{-6} の滅菌保証レベル (SAL) を有する、請求項 25 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

40

【請求項 27】

アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂：からなる群から選択される少なくとも 1 種の樹脂を含む、請求項 24 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

【請求項 28】

タンパク質リガンドを含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 27 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

50

【請求項 29】

タンパク質リガンドがプロテイン A である、請求項 28 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

【請求項 30】

アニオン交換クロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 27 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

【請求項 31】

アニオン交換クロマトグラフィー樹脂が N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含む、請求項 30 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂。

【請求項 32】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを作成する方法であって、
請求項 24 に記載の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を準備すること；
および
該クロマトグラフィー樹脂を殺菌環境中で低減したバイオバーデンのカラムに充填すること；
を含む、前記方法。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の方法により生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 34】

請求項 5 に記載の方法により生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 35】

充填されたカラム内の樹脂が、約 1×10^{-8} ～ 約 1×10^{-5} の滅菌保証レベル (SAL) を有する、請求項 34 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 36】

樹脂が約 1×10^{-7} ～ 約 1×10^{-6} の滅菌保証レベル (SAL) を有する、請求項 35 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 37】

充填されたカラム内の樹脂が、アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂：からなる群から選択される少なくとも 1 種の樹脂を含む、請求項 34 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 38】

樹脂が、タンパク質リガンドを含むアフィニティーまたは擬似アフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 37 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 39】

リガンドがプロテイン A である、請求項 38 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 40】

樹脂がアニオン交換クロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 37 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

【請求項 41】

アニオン交換クロマトグラフィー樹脂が N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含む、請求項 40 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物であって、該少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤は、該組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射による処理の際に該クロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、前記組成物。

【請求項 4 3】

少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中の堆積したクロマトグラフィー樹脂のスラリーである、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

固体混合物である、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

還元グルタチオン、還元チオレドキシン、還元システイン、カロテノイド、メラトニン、リコピン、トコフェロール、還元ユビキノン、アスコルベート、ビリルビン、尿酸、リボ酸、フラボノイド、フェノールプロパノイド酸、リドカイン、ナリングニン、フラレーン、グルコース、マンニトール、4-ヒドロキシ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、およびジメチルメトキシクロマノール：からなる群から選択される少なくとも 1 種の酸化防止剤を含む、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

マンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびメチオニン：からなる群から選択される少なくとも 1 種の酸化防止剤を含む、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

マンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびメチオニンを含む、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

液体が：

- (i) 75 mM～約 125 mM のマンニトール；
- (i i) 75 mM～約 125 mM のメチオニン；
- (i i i) 75 mM～約 125 mM のアスコルビン酸ナトリウム；
- (i v) 75 mM～約 125 mM のヒスチジン；
- (v) 30 mM～約 70 mM のメチオニンおよび約 30 mM～約 70 mM のヒスチジン；
- (v i) 約 10 mM～約 50 mM のメチオニン、約 10 mM～約 50 mM のヒスチジン、および約 10 mM～約 50 mM のアスコルビン酸ナトリウム；または
- (v i i) 約 5 mM～約 45 mM のアスコルビン酸ナトリウム、約 5 mM～約 45 mM のメチオニン、約 5 mM～約 45 mM のマンニトール、および約 5 mM～約 45 mM のヒスチジン

を含む、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

液体が緩衝溶液である、請求項 4 3 または 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、2, 3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DMPS)、ジメルカプトコハク酸 (DMSA)、メタロチオネイン、およびデスフェロキサミン：からなる群から選択される少なくとも 1 種のキレート剤を含む、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

クロマトグラフィー樹脂が、アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂：からなる群から選択される少なくとも 1 種の樹脂を含む、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

樹脂が、タンパク質リガンドを含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

タンパク質リガンドがプロテイン A である、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーを実行する方法であって、

(a) 請求項 3 3 または 3 4 に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを準備すること；および

(b) 該低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムおよび低減したバイオバーデンの緩衝液を用いて閉鎖系でカラムクロマトグラフィーを実行することを含む、前記方法。

10

【請求項 5 5】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いる低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーが、少なくとも 4 日の期間連続的に実行される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いる低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーが、少なくとも 5 日の期間連続的に実行される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いる低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーが、少なくとも 7 日の期間連続的に実行される、請求項 5 6 に記載の方法。

20

【請求項 5 8】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いる低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーが、少なくとも 1 4 日の期間連続的に実行される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いる低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーが、少なくとも 2 8 日の期間連続的に実行される、請求項 5 8 に記載の方法。

30

【請求項 6 0】

(a) の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム内の樹脂が、ガンマ線照射で処理されていない同じ樹脂と比較して約 7 5 % ~ 約 1 0 0 % の結合能力パーセントを有する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 1】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム内の樹脂が、アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂：からなる群から選択される少なくとも 1 種の樹脂を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

40

【請求項 6 2】

樹脂が、タンパク質リガンドを含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

タンパク質リガンドがプロテイン A である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

樹脂がアニオン交換クロマトグラフィー樹脂を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、

50

クローズドな、連続的な方法であって、

(a) 実質的に細胞を含まない、組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；
および

(b) 請求項 33 または 34 に記載の少なくとも 1 つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含むマルチカラムクロマトグラフィーシステム (MCCS) に該液体培養培地を連続的に供給すること；

を含み

低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、該液体培養培地から、該精製された組換えタンパク質である該 MCCS からの溶出液まで連続的に稼動する、前記方法。

10

【請求項 66】

MCCS が少なくとも 2 つの異なる単位操作を実行する、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

カラム切り替えを含む、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 68】

MCCS が組換えタンパク質を捕獲する、およびウィルスを不活化するという単位操作を実行する、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 69】

MCCS が組換えタンパク質を捕獲する、および精製するという単位操作を実行する、請求項 65 に記載の方法。

20

【請求項 70】

MCCS が少なくとも 2 つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含む、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 71】

MCCS が定期的向流クロマトグラフィーシステムである、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 72】

MCCS が、アフィニティーもしくは擬似アフィニティークロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、もしくはサイズ排除クロマトグラフィー、またはこれらの任意の組合せのための複数のカラムを含む、請求項 65 に記載の方法。

30

【請求項 73】

MCCS がアフィニティークロマトグラフィー用のカラムを含み、アフィニティークロマトグラフィーがプロテイン A 結合捕獲機構、基質結合捕獲機構、抗体—または抗体フラグメント結合捕獲機構、アプタマー結合捕獲機構、および補因子結合捕獲機構：からなる群から選択される捕獲機構によって方法において実行される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

アフィニティークロマトグラフィーがプロテイン A 結合捕獲機構によって方法において実行され、組換えタンパク質が抗体または抗体フラグメントである、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドな、連続的な方法であって、

(a) 実質的に細胞を含まない、組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；

(b) 該液体培養培地を第 1 のマルチカラムクロマトグラフィーシステム (MCCS1) に連続的に供給すること；

(c) 該 MCCS1 を用いて該液体培養培地中の該組換えタンパク質を捕獲すること；

(d) 該組換えタンパク質を含む該 MCCS1 からの溶出液を生産し、該溶出液を第 2 のマルチカラムクロマトグラフィーシステム (MCCS2) に連続的に供給すること；

(e) 該組換えタンパク質を該溶出液から該 MCCS2 に連続的に供給し、その後該組換えタンパク質を溶出することにより該精製された組換えタンパク質を生産すること；

50

を含み、

該方法は低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、該液体培養培地から、該精製された組換えタンパク質まで連続的に稼動し、ならびに

該MCCS1および／またはMCCS2内の少なくとも1つのカラムは請求項33または34に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含有する、前記方法。

【請求項76】

MCCS1および／またはMCCS2が少なくとも2つの異なる単位操作を実行する、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

カラム切り替えを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項78】

MCCS1が組換え治療用タンパク質を捕獲する、およびウィルスを不活化するという単位操作を実行する、請求項75に記載の方法。

【請求項79】

MCCS2が組換えタンパク質を精製する、およびポリッシュするという単位操作を実行する、請求項75に記載の方法。

【請求項80】

MCCS1および／またはMCCS2が少なくとも2つのクロマトグラフィーカラムを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項81】

MCCS1が第1の定期的向流クロマトグラフィーシステム（PCCS1）である、請求項75に記載の方法。

【請求項82】

捕獲が、アフィニティークロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、もしくはサイズ排除クロマトグラフィー、またはこれらの任意の組合せを用いて実行される、請求項75に記載の方法。

【請求項83】

アフィニティークロマトグラフィーが、プロテインA結合捕獲機構、基質結合捕獲機構、抗体—または抗体フラグメント結合捕獲機構、アプタマー結合捕獲機構、および補因子結合捕獲機構：からなる群から選択される捕獲機構によって実行される、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

アフィニティークロマトグラフィーがプロテインA結合捕獲機構によって実行され、組換えタンパク質が抗体または抗体フラグメントである、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

MCCS2が第2の定期的向流（PCCS2）クロマトグラフィーシステムである、請求項75に記載の方法。

【請求項86】

組換えタンパク質が治療用の組換えタンパク質である、請求項65または75に記載の方法。

【請求項87】

精製された治療用の組換えタンパク質を医薬組成物中に配合することをさらに含む、請求項86に記載の方法。

【請求項88】

少なくとも4日の期間連続的に実行される、請求項65または75に記載の方法。

【請求項89】

少なくとも5日の期間連続的に実行される、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

少なくとも7日の期間連続的に実行される、請求項89に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 1】

少なくとも 1 4 日の期間連続的に実行される、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

少なくとも 2 8 日の期間連続的に実行される、請求項 9 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 4 年 1 月 1 7 日に出願された米国仮特許出願 6 1 / 9 2 8 , 9 2 9 号、および 2 0 1 4 年 5 月 2 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 0 0 1 , 4 9 8 号の優先権を主張し、これらは各々その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

10

【0 0 0 2】

本発明は、組換えタンパク質に関するバイオテクノロジーおよびバイオ製造の方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

組換えタンパク質をコードする核酸を含む哺乳類細胞は、しばしば、治療用または商業用に重要なタンパク質を製造するために使用されている。多様な製品パイプラインに関する現在の環境において、バイオテクノロジー系の会社は、非常に自由度が高くて対費用効果の良い治療用タンパク質原薬製造のための革新的な解決策の開発へと増々駆り立てられている。組換えタンパク質を効率的に単離する方策の 1 つは、(例えば、閉鎖系を用いる) 連続クロマトグラフィーを包含するプロセスによるものである。連続クロマトグラフィーの 1 つの知られている制限は、夾雑製品、生産収率の低下、および系内の流量の減少(または圧力の上昇)をもたらすことになる系内の夾雑する作用物質(例えば、増大したバイオバーデン)の存在である。例えば、系内の増大したバイオバーデンはその系の完全なシャットダウンを引き起こす可能性がある。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

本発明は、クロマトグラフィー樹脂のガンマ線照射がクロマトグラフィー樹脂の結合能力を低下させるという発見に少なくとも部分的に基づいている。この発見に鑑みて、本明細書に、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法であって、クロマトグラフィー樹脂および少なくとも 1 種の酸化防止剤および/またはキレート剤を含む組成物を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することを含み、少なくとも 1 種の酸化防止剤および/またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射への曝露後/その際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、方法が提供される。また、クロマトグラフィー樹脂(および場合により、ガンマ線照射の曝露後/その際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量の少なくとも 1 種の酸化防止剤および/またはキレート剤)を含む組成物を含む容器を、約 0 . 1 k G y / 時~約 6 k G y / 時の割合で、および/または約 4 °C~約 2 5 °C の温度で、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に相当するガンマ線照射に曝露することを含む、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法も提供される。また、本明細書に記載の方法のいずれかにより製造された低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を含有する低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラム、クロマトグラフィー樹脂および少なくとも 1 種のキレート剤および/または酸化防止剤を含む組成物、これらの低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラムの少なくとも 1 つを使用する低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーを実行する方法、ならびにこれらの低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラムの少なくとも 1 つの使用を含む精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造する一体化

30

40

50

され、クローズドなまたは実質的にクローズドな、連続的な方法も提供される。本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィー樹脂のいずれも、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれも、カラムクロマトグラフィーを実行する方法のいずれも、また本明細書に記載された方法のいずれも、無菌、絶対的に無菌、殺菌、または低減したバイオバーデンであることができる。本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィー樹脂のいずれも、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィーカラムのいずれも、また本明細書に記載された方法のいずれも、殺菌された無菌、絶対的に無菌、殺菌、または低減したバイオバーデンであることができる。

【0005】

本明細書に、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法であって、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することを含み、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射に曝露した後にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、方法が提供される。これらの方法のいくつかの実施形態は、曝露に先立って組成物を容器中に配置することをさらに含む。いくつかの例において、照射は、約0.1 kGy／時～約6 kGy／時の割合で、および／または約4℃～約25℃の温度で実行する。これらの方法のいずれかのいくつかの例において、容器は貯蔵容器、クロマトグラフィーカラム、または充填されたクロマトグラフィーカラムである。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、組成物は少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中の堆積したクロマトグラフィー樹脂のスラリーである。いくつかの例において、液体は：(i) 75 mM～約125 mM（例えば、80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のマンニトール；(ii) 75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）；(iii) 75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のアスコルビン酸ナトリウム；(iv) 75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のヒスチジン；(v) 30 mM～約70 mM（例えば、約35 mM～約65 mM、約40 mM～約60 mM、または約45 mM～約55 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）および約30 mM～約70 mM（例えば、約35 mM～約65 mM、約40 mM～約60 mM、または約45 mM～約55 mM）のヒスチジン；(vi) 約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のヒスチジン、および約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のアスコルビン酸ナトリウム；または(vii) 約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のアスコルビン酸ナトリウム、約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のマンニトール、および約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のヒスチジンを含む。いくつかの例において、液体は緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝溶液、例えば、50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0のようなリン酸ナトリ

10

20

30

40

50

ウム緩衝溶液)である。

【0006】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、組成物は固体混合物である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、組成物は：還元グルタチオン、還元チオレドキシン、還元システイン、カロテノイド、メラトニン、リコピン、トコフェロール、還元ユビキノン、アスコルベート、ビリルビン、尿酸、リボ酸、フラボノイド、フェノールプロパノイド酸 (phenol propanoic acid)、リドカイン、ナリングニン、フラレン、グルコース、マンニトール、4-ヒドロキシ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル (oxyl)、およびジメチルメトキシクロマノールからなる群から選択される少なくとも1種の酸化防止剤を含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、組成物はマンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、メチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン)、およびヒスチジンから選択される少なくとも1 (1、2、3、または4) 種の酸化防止剤を含む。いくつかの実施形態において、組成物はマンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、メチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン)、およびヒスチジンを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、組成物は：エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、2, 3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DMPS)、ジメルカプトコハク酸 (DMSA)、メタロチオネイン、およびデスフェロキサミンからなる群から選択される少なくとも1種のキレート剤を含む。

10

20

【0007】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、組成物は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティーまたは擬似アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂 (またはこれらの任意の組合せ) からなる群から選択される少なくとも1種のクロマトグラフィー樹脂を含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、クロマトグラフィー樹脂は多モード (例えば、二モード) クロマトグラフィー樹脂 (例えば、アニオン交換基および疎水性相互作用基を有するクロマトグラフィー樹脂、またはカチオン交換基および疎水性相互作用基の両方を有するクロマトグラフィー樹脂) であることができる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、組成物は、タンパク質リガンド (例えば、プロテインAまたはプロテインG) を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、組成物はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂 (例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換クロマトグラフィー樹脂) を含む。

30

【0008】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、線量は約2 kGy～約45 kGy (例えば、約20 kGy～約30 kGy、約23 kGy～約27 kGy、約2 kGy～約40 kGy、約2 kGy～約35 kGy、約2 kGy～約30 kGy、約2 kGy～約25 kGy、約10 kGy～約45 kGy、約10 kGy～約40 kGy、約10 kGy～約35 kGy、約10 kGy～約30 kGy、または約10 kGy～約25 kGy) である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、曝露は約-25℃～約0℃ (両端を含む)、または約0℃～約25℃ (両端を含む) (例えば、約4℃～約25℃) の温度で実行される。

40

【0009】

また本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂も提供される。本明細書に提供される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂のいずれかのいくつかの例においては、約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-5} (例えば、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-6}) の滅菌保証レベル (SAL) を有する。例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィー樹脂は

50

低減したバイオバーデンを有し、無菌であり、殺菌され、または絶対的に無菌であることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィー樹脂は殺菌されており、かつ低減したバイオバーデンを有し、無菌であり、または絶対的に無菌であることができる。本明細書に提供される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂のいずれかのいくつかの例は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティーまたは擬似アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも1種の樹脂を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテインAまたはプロテインG）を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂（例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換クロマトグラフィー樹脂）を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は多モードのクロマトグラフィー樹脂（例えば、二モードのクロマトグラフィー樹脂）である。

【0010】

また、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを作成する方法であって、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂のいずれかを準備すること；およびそのクロマトグラフィー樹脂を殺菌環境で低減したバイオバーデンのカラム中に充填すること；を含む、方法も提供される。また、クロマトグラフィーカラム内に含まれている充填されたクロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤（例えば、本明細書に提供される代表的な組成物のいずれか）を含む組成物にガンマ線を照射することにより生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムも提供される。本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれも約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-5} （例えば、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-6} ）の滅菌保証レベル（SAL）を有することができる。本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィーカラムのいずれも低減したバイオバーデンを有し、無菌であり、絶対的に無菌であり、または殺菌されていることができる。例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産されるクロマトグラフィーカラムのいずれも殺菌されていることができ、かつ低減したバイオバーデンを有し、無菌であり、または絶対的に無菌であることができる。

【0011】

本明細書に提供される低減され充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれかのいくつかの実施形態において、充填されたカラム内の樹脂は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも1種の樹脂を含む。本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれかのいくつかの実施形態において、樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテインAまたはプロテインG）を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれかのいくつかの例において、樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂（例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換クロマトグラフィー樹脂）を含む。

【0012】

また、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物であって、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤が、組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射による処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、組成物も

提供される。本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの例において、組成物は少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中の堆積したクロマトグラフィー樹脂のスラリーである。いくつかの例において、液体は：(i) 75 mM～約125 mM（例えば、80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のマンニトール；(ii) 75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）；(iii) 75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のアスコルビン酸ナトリウム；(iv) 75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のヒスチジン；(v) 30 mM～約70 mM（例えば、約35 mM～約65 mM、約40 mM～約60 mM、または約45 mM～約55 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）および約30 mM～約70 mM（例えば、約35 mM～約65 mM、約40 mM～約60 mM、または約45 mM～約55 mM）のヒスチジン；(vi) 約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のヒスチジン、および約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のアスコルビン酸ナトリウム；または(vii) 約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のアスコルビン酸ナトリウム、約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のマンニトール、および約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のヒスチジンを含む。いくつかの例において、液体は緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝溶液、例えば、50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0のようなリン酸ナトリウム緩衝溶液）である。

【0013】

本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの例において、組成物は固体混合物である。

【0014】

本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの実施形態は：還元グルタチオン、還元チオレドキシン、還元システイン、カロテノイド、メラトニン、リコピン、トコフェロール、還元ユビキノン、アスコルベート、ビリルビン、尿酸、リボ酸、フラボノイド、フェノールプロパノイド酸、リドカイン、ナリングニン、フラーレン、グルコース、マンニトール、4-ヒドロキシ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、およびジメチルメトキシクロマノールからなる群から選択される少なくとも1種の酸化防止剤を含むことができる。本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの実施形態はマンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、メチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、およびヒスチジンから選択される少なくとも1（1、2、3、または4）種の酸化防止剤を含むことができる。本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの例はマンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、メチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、およびヒスチジンを含む。本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの例は：エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、2, 3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸ナトリウム（DMPS）、ジメルカプトコハク酸（DMSA）、メタロチオネイン、およびデスフェロキサミンからなる群から選択される少な

くとも1種のキレート剤を含むことができる。本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの例において、クロマトグラフィー樹脂は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも1種の樹脂を含むことができる。本明細書に提供される組成物のいずれかのいくつかの例において、樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテインAまたはプロテインG）を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。

【0015】

また、低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーを実行する方法であって、
（a）本明細書に記載の方法のいずれかにより生産された低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれかを準備すること；および（b）低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムおよび低減したバイオバーデンの緩衝液を閉鎖系で用いてカラムクロマトグラフィーを実行すること：を含む、方法も提供される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いる低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーは、少なくとも4日（例えば、少なくとも5日、少なくとも7日、少なくとも14日、少なくとも28日、または少なくとも60日）の期間連続的に実行される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、（a）における低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム内の樹脂は、ガンマ線照射で処理されてない同じ樹脂と比較して約65%～約100%（例えば、約75%～約100%）の結合能力パーセントを有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム内の樹脂は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティーまたは擬似アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも1種の樹脂を含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテインAまたはプロテインG）を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂を含む。

【0016】

また、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドなまたは実質的にクローズドな、連続的な方法であって、（a）実質的に細胞を含まない組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；および（b）その液体培養培地を、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産された低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれかの少なくとも1つを含むマルチカラムクロマトグラフィーシステム（MCCS）に連続的に供給すること：を含み、低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、液体培養培地から、精製された組換えタンパク質であるMCCSからの溶出液まで連続的に稼動する、方法が提供される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCSは少なくとも2つの異なる単位操作を実行する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、方法はカラム切り替えを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、MCCSは組換えタンパク質を捕獲する、およびウィルスを不活化するという単位操作を実行するか、または組換えタンパク質を捕獲し精製するという単位操作を実行する。

【0017】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCSは少なくとも2つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、MCCSは定期的向流クロマトグラフィーシステムである。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、MCCSはアフィニティークロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン

交換クロマトグラフィー、もしくはサイズ排除クロマトグラフィー、またはこれらの任意の組合せのための複数のカラムを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCSはアフィニティークロマトグラフィーのためのカラムを含み、アフィニティークロマトグラフィーはプロテインA結合捕獲機構、基質結合捕獲機構、抗体または抗体フラグメント結合捕獲機構、アプタマー結合捕獲機構、および補因子結合捕獲機構：からなる群から選択される捕獲機構によって方法において実行される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、アフィニティークロマトグラフィーはプロテインA結合捕獲機構によって方法において実行され、組換えタンパク質は抗体または抗体フラグメントである。

【0018】

また、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドなまたは実質的にクローズドな、連続的な方法であって、(a) 実質的に細胞を含まない組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；(b) その液体培養培地を第1のマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS1)に連続的に供給すること；(c) MCCS1を用いて液体培養培地中の組換えタンパク質を捕獲すること；(d) 組換えタンパク質を含むMCCS1から溶出液を生成し、その溶出液を第2のマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS2)に連続的に供給すること；および(e) 溶出液から組換えタンパク質をMCCS2中に連続的に供給し、続いて組換えタンパク質を溶出することにより精製された組換えタンパク質を生産すること：を含み、この方法は、低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、液体培養培地から、精製された組換えタンパク質まで連続的に稼動し、ならびにMCCS1および／またはMCCS2内の少なくとも1つのカラムは本明細書に記載の方法のいずれかにより生産された低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれかの少なくとも1つを含有する、方法も提供される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCS1および／またはMCCS2は少なくとも2つの異なる単位操作を実行する。本明細書に記載の方法のいくつかの例はカラム切り替えを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、MCCS1は組換え治療用タンパク質を捕獲する、およびウィルスを不活化するという単位操作を実行する。本明細書に提供される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCS2は組換えタンパク質を精製しポリッシュするという単位操作を実行する。本明細書に提供される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCS1および／またはMCCS2は少なくとも2つのクロマトグラフィーカラムを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、MCCS1は第1の定期的向流クロマトグラフィーシステム(PCCS1)である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、捕獲はアフィニティークロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、もしくはサイズ排除クロマトグラフィー、またはこれらの任意の組合せを用いて実行される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの例において、アフィニティークロマトグラフィーは：プロテインA結合捕獲機構、基質結合捕獲機構、抗体または抗体フラグメント結合捕獲機構、アプタマー結合捕獲機構、および補因子結合捕獲機構からなる群から選択される捕獲機構によって実行される。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、アフィニティークロマトグラフィーはプロテインA結合捕獲機構によって実行され、組換えタンパク質は抗体または抗体フラグメントである。

【0019】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、MCCS2は第2の定期的向流(PCCS2)クロマトグラフィーシステムである。本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、組換えタンパク質は治療用の組換えタンパク質である。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態は、精製された治療用組換えタンパク質を医薬組成物中に配合することをさらに含む。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態は少なくとも4日(例えば、少なくとも5日、少なくとも7日、少なくとも14日、または少なくとも28日)の期間連続的に実行することができる。

【0020】

また、(a) 実質的に乾燥したクロマトグラフィー樹脂を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することを含む、クロマトグラフィーのバイオバーデンを低減する方法も提供される。これらの方法のいくつかの実施形態は、工程(a)の前に、クロマトグラフィー樹脂を乾燥してクロマトグラフィー樹脂から液体を除去することをさらに含む。いくつかの実施形態において、実質的に乾燥したクロマトグラフィー樹脂は有意な量の酸化防止剤または有意な量のキレート剤を含有しない。いくつかの実施形態において、容器は貯蔵容器である。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー樹脂は物品(例えば、チップ、膜、またはカセット)の表面に共有結合される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー樹脂はタンパク質リガンド(例えば、プロテインAまたはプロテインG)を含む。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂(例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むクロマトグラフィー樹脂)である。いくつかの実施形態において、線量は約15 kGy~約45 kGy(例えば、約20 kGy~約30 kGy)である。また、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂も提供される。いくつかの実施形態において、生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は約 1×10^{-8} ~約 1×10^{-5} の滅菌保証レベル(SAL)(例えば、約 1×10^{-7} ~約 1×10^{-6} のSAL)を有する。いくつかの実施形態において、低減したクロマトグラフィー樹脂は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも1種の樹脂を含む。いくつかの実施形態において、低減したクロマトグラフィー樹脂はタンパク質リガンド(例えば、プロテインA)を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。いくつかの実施形態において、低減したクロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂(例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換クロマトグラフィー樹脂)を含む。また、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを作成する方法であって、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を準備すること；およびそのクロマトグラフィー樹脂を殺菌環境で低減したバイオバーデンのカラムに充填することを含む、方法も提供される。また、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムも提供される。

【0021】

また、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造する一体化され、クローズドな、連続的な方法であって、(a) 実質的に細胞を含まない組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；および(b) その液体培養培地を、本明細書に提供される方法のいずれかにより生産される少なくとも1つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含むマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS)に連続的に供給すること；を含み、低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、液体培養培地から、精製された組換えタンパク質であるMCCSからの溶出液まで連続的に稼動する、方法も提供される。また、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造する一体化され、クローズドな、連続的な方法であって、(a) 実質的に細胞を含まない組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；(b) その液体培養培地を第1のマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS1)に連続的に供給すること；(c) MCCS1を用いて液体培養培地中の組換えタンパク質を捕獲すること；(d) 組換えタンパク質を含むMCCS1から溶出液を生成し、その溶出液を第2のマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS2)に連続的に供給すること；および(e) 組換えタンパク質を溶出液からMCCS2に連続的に供給し、その後組換えタンパク質を溶出することにより精製された組換えタンパク質を生産すること；を含み、この方法は、低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、液

体培養培地から、精製された組換えタンパク質まで連続的に稼動し、ならびにM C C S 1 および／またはM C C S 2 内の少なくとも1つのカラムは本明細書に提供される方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含有する、方法が提供される。

【0022】

本明細書で使用する場合、ある名詞の前の不定冠詞、または「1つの」という単語は1つまたはそれ以上のその特定の名詞を表す。例えば、語句「低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラム」は「1つまたはそれ以上の低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラム」を表す。

【0023】

用語「バイオバーデン」は業界で公知であり、組成物（例えば、固体または液体）中および／または物品（複数可）の表面（例えば、外部および／または内部の表面）上に存在する自己複製する生物学的夾雑物のレベルを指す。例えば、バイオバーデンは、クロマトグラフィー樹脂または充填されたクロマトグラフィー樹脂を含有する組成物中に存在する自己複製する生物学的夾雑物（例えば、充填されたクロマトグラフィーカラム内の充填されたクロマトグラフィー樹脂中に存在する自己複製する生物学的夾雑物）を指すことができる。他の例において、バイオバーデンは、クロマトグラフィーカラムの内側の表面上および／またはクロマトグラフィーカラム内のクロマトグラフィー樹脂の内部の自己複製する生物学的夾雑物（例えば、クロマトグラフィーカラムの内側の表面上の生物学的夾雑物およびクロマトグラフィーカラム内の充填されたクロマトグラフィー樹脂内の生物学的夾雑物）を指すことができる。バイオバーデンはまた、液体（例えば、本明細書に記載の方法またはプロセスのいずれかで使用される緩衝液）中に存在する自己複製する生物学的夾雑物を指すこともできる。自己複製する生物学的夾雑物の非限定例は細菌（例えば、グラム陽性もしくはグラム陰性細菌、または細菌孢子）、マイコバクテリア、ウィルス（例えば、ベシウィルス、Cache Valley ウィルス、パルボウィルス、ヘルペスウィルス、およびブニヤウィルス）、寄生虫、真菌、酵母、および原虫であることができる。バイオバーデンを決定するための代表的な方法は本明細書に記載されている。バイオバーデンを決定するためのさらなる方法は当技術分野で公知である。

【0024】

「バイオバーデンの低減」という用語は、組成物（例えば、固体または液体）中および／または物品（複数可）の表面（例えば、外部および／または内部の表面）上に存在する自己複製する生物学的夾雑物のレベルの減少（例えば、検出可能な減少）を指すことが業界で公知である。クロマトグラフィー樹脂（例えば、充填されたクロマトグラフィー樹脂）、緩衝液、および／またはクロマトグラフィーカラム（例えば、充填されたクロマトグラフィーカラム）のバイオバーデンを低減する方法の非限定例は本明細書に記載されている。本明細書に記載の組成物のいずれかのバイオバーデンを低減する追加の方法は当技術分野で公知である。

【0025】

「低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂」という用語は、クロマトグラフィー樹脂中に存在する自己複製する生物学的夾雑物のレベルを減少させる（例えば、クロマトグラフィー樹脂を含有する組成物、例えばスラリー中に存在する自己複製する生物学的夾雑物のレベルの検出可能な減少）ように処理されているクロマトグラフィー樹脂を意味する。例えば、低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は、クロマトグラフィー樹脂中の自己複製する生物学的夾雑物のレベルを減少させるのに十分な線量のガンマ線照射に曝露された樹脂（例えば、クロマトグラフィー樹脂中の自己複製する生物学的夾雑物のレベルを減少させるのに十分な線量のガンマ線照射に曝露されたクロマトグラフィー樹脂を含有する組成物）であることができる。例えば、低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は、約1 k Gy～約15 k Gyの線量、約1 k Gy～約20 k Gyのガンマ線照射、約1 k Gy～約25 k Gyのガンマ線照射、約1 k Gy～約30 k Gyのガンマ線照射、または約1 k Gy～約35 k Gyのガンマ線照射に曝露されている樹脂で

あることができる。クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するための代表的な方法は本明細書に記載されている。クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するためのさらなる方法は当技術分野で公知である。

【0026】

用語「低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラム」は、未処理のクロマトグラフィー樹脂を含む同じクロマトグラフィーカラム内に存在する自己複製する生物学的夾雑物のレベル未満のレベルの自己複製する生物学的夾雑物を有する処理されたクロマトグラフィー樹脂（例えば、ガンマ線照射されたクロマトグラフィー樹脂）を含むクロマトグラフィーカラム（例えば、充填されたクロマトグラフィーカラム）を意味する。例えば、低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラムは少なくともまたは約 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、または 1×10^{-10} の滅菌保証レベルを有する処理されたクロマトグラフィー樹脂を含むことができる。

10

【0027】

用語「低減したバイオバーデンの緩衝液」は業界で公知であり、同じ未処理の液体で見られる自己複製する夾雑作用物質（複数可）のレベル未満のレベルの自己複製する夾雑作用物質（複数可）を有する処理された（例えば、ろ過、オートクレーブ処理、および／またはガンマ線照射された）液体（例えば、処理された緩衝溶液）を意味する。例えば、低減したバイオバーデンの緩衝液は少なくともまたは約 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、または 1×10^{-10} の滅菌保証レベルを有することができる。

20

【0028】

「絶対無菌」または「絶対的に無菌」は自己複製する生物学的夾雑物を完全に含まない組成物または方法を記述するために使用される用語である。例えば、この用語は、ガンマ線照射されたクロマトグラフィー樹脂、クロマトグラフィーカラムの内面および内容物（例えば、クロマトグラフィー樹脂）、および／または緩衝液に適用することができる。絶対的に無菌の組成物または方法は（当技術分野で公知のように）クリーンであることができる。

【0029】

「無菌の」または「無菌」は約または 1.0×10^{-6} 未満（例えば、約または 1.0×10^{-7} 未満、約または 1.0×10^{-8} 未満、約または 1.0×10^{-9} もしくは 1×10^{-10} 未満）の滅菌保証レベルを有する組成物または方法を記述するのに使用される用語である。組成物または方法が無菌であるかどうかの決定は当技術分野で公知の多くの確認された生産方法を用いて試験することができる。例えば、無菌の組成物または方法は生きている自己複製する生物学的夾雑物（例えば、本明細書に記載されている自己複製する生物学的夾雑物のいずれか）を完全に含まないことができる。無菌の組成物または方法もまた（当技術分野で公知のように）クリーンであることができる。

30

【0030】

用語「滅菌」は組成物を（本明細書に定義されているように）無菌にするのに使用される確立された方法を意味する。ある組成物に対して（本明細書に定義されている）無菌が達成されたかどうかを決定するために、処理プロセス中耐性指示菌の自己複製する生物学的夾雑物（例えば、細菌）の不活化率を測定することができる。

40

【0031】

用語「滅菌保証レベル」すなわち「SAL」は業界で公知であり、1つのバッチの処理単位で絶対無菌を達成する信頼度レベルを意味する。この確率は通常、検証中に実行される不活化研究の結果に基づいて計算され、 1×10^{-n} の形で表される。

【0032】

用語「殺菌」は疾患を起こすかまたは症状を引き起こす自己複製する生物学的夾雑物（例えば、本明細書に記載された自己複製する生物学的夾雑物のいずれか）を含まない組成物または方法を記述するために使用される。殺菌された組成物または方法も（当技術分野で公知のように）クリーンであることができる。

50

【0033】

用語「単位操作」は専門用語であり、液体培養培地から組換えタンパク質を精製する方法において実行することができる機能的な工程を意味する。例えば、一単位の動作は、ろ過すること（例えば、夾雑物細菌、酵母、ウイルスおよび／もしくはマイコバクテリア、および／または、組換えタンパク質を含む流体から出てくる微粒子状物質の除去）、捕獲すること、エпитープタグ除去、精製すること、保持もしくは貯蔵すること、ポリッシュすること、ウイルス不活性化、組換えタンパク質を含む流体のイオン濃度および／またはpHを調節すること、ならびに、望ましくない塩を除去することであってよい。

【0034】

用語「捕獲する」は、液体培養培地または希釈された液体培養培地中に存在する1つまたはそれ以上の他の成分（例えば、哺乳類細胞中に存在するかまたはそれから分泌される培養培地タンパク質または1つもしくはそれ以上の他の成分（例えば、DNA、RNA、または他のタンパク質））から、組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）を部分的に精製または単離し（例えば、重量で少なくともまたは約5%、例えば、少なくとももしくは約10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または少なくとももしくは約95%純粋）、濃縮するために実行される工程を意味する。典型的には、捕獲は、（例えば、アフィニティークロマトグラフィーの使用によって）組換えタンパク質が結合するクロマトグラフィー樹脂を用いて実行される。液体培養培地または希釈済み液体培養培地から組換えタンパク質を捕獲する非限定的な方法は、本明細書に記載されており、他の方法も当技術分野で公知である。組換えタンパク質は、少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜（例えば、本明細書に記載のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜のいずれか）を用いて、液体培養培地から捕獲することができる。

【0035】

用語「精製する」は、組換えタンパク質を含む流体中に存在する1つもしくはそれ以上の他の不純物（例えば、かさ高い不純物）または成分（例えば、哺乳類細胞中に存在するかまたはそれから分泌される液体培養培地タンパク質または1つもしくはそれ以上の他の成分（例えば、DNA、RNA、他のタンパク質、内毒素、ウィルス、等））から組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）を単離するために実行される工程を意味する。例えば、精製することは、最初にある捕獲する工程の最中または後に実行することができる。精製は、組換えタンパク質または夾雑物のいずれかに結合するクロマトグラフィー樹脂、膜または任意の他の固体担体を用いて（例えば、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アニオン交換もしくはカチオン交換クロマトグラフィー、または分子ふるいクロマトグラフィーの使用によって）、実行することができる。組換えタンパク質は、少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜（例えば、本明細書に記載のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜のいずれか）を用いて、組換えタンパク質を含む流体から精製することができる。

【0036】

「ポリッシュすること」という用語は専門用語であり、所望される最終的な純度に近い組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）を含む流体から、微量または少量の残留夾雑物または残留不純物を除去するために実行される、工程を意味する。例えば、ポリッシュすることは、組換えタンパク質を含む流体が、標的とする組換えタンパク質に選択的に結合しまたは組換えタンパク質を含む流体中に存在する少量の夾雑物もしくは不純物に選択的に結合する、クロマトグラフィーカラム（複数可）または膜型吸着材（複数可）を通過することにより、実行することができる。このような例において、クロマトグラフィーカラム（複数可）または膜型吸着材（複数可）の溶出液／ろ液は、組換えタンパク質を含む。

【0037】

「ろ過すること」という用語は、液体（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにおいて存在する液体培養培地または流体）から望ましくない生物型夾雑物（例えば、哺乳類細胞、細菌、酵母細胞、ウイルスまたはマイコバクテリア）および／または粒子状物質（例えば、沈殿したタンパク質）の少なくとも一部（例えば、少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%）を除去することを意味する。

【0038】

「溶出液／ろ液」という用語は専門用語であり、検出可能な量の組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）を含んでいるクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から排出される、流体を意味する。

【0039】

用語「一体化された方法」は、特定の結果（例えば、組換えタンパク質の液体培養培地からの精製）を達成するように協力して機能する構造要素を用いて実行される方法を意味する。

【0040】

用語「連続的な方法」は、システムの少なくとも一部を介して流体を連続的に供給する方法を意味する。例えば、連続的な方法は、組換えタンパク質を含む液体培養培地をバイオリアクターからMCCSを介して連続的に供給する方法である。連続的な方法の別の例は、組換えタンパク質を含む液体培養培地をバイオリアクターから第1および第2のMCCS（MCCS1およびMCCS2）を介して連続的に供給する方法である。さらなる例は、組換えタンパク質を含む液体培養培地をMCCSを介して連続的に供給する方法、組換えタンパク質を含む液体培養培地をMCCS1およびMCCS2を介して連続的に供給する方法、または組換えタンパク質を含む流体をMCCS2を介して連続的に供給する方法を含む。

【0041】

用語「クローズドな方法」は専門用語であり、組換えタンパク質と接触する方法の構成要素（例えば、クロマトグラフィー樹脂および／または緩衝液）または組換えタンパク質を含む液体が、かなりの時間夾雑作用物質に意図的に曝露されない（例えば、かなりの時間意図的に空気に曝露されない）ように実行される方法を意味する。

【0042】

「治療用タンパク質原薬」という用語は、十分に精製されており、または、汚染をもたらすタンパク質、脂質および核酸（例えば、液体培養培地中に存在するまたは宿主細胞に由来した（例えば、哺乳類宿主細胞、酵母宿主細胞または細菌宿主細胞に由来した）夾雑タンパク質、脂質および核酸）、ならびに、生物型夾雑物（例えば、ウイルス型夾雑物および細菌型夾雑物）から十分に単離されており、さらなる大幅な精製および／または汚染除去工程（複数可）を全く用いないで医薬品中に配合することができる、組換えタンパク質（例えば、免疫グロブリン、タンパク質フラグメント、人為的改変タンパク質または酵素）を意味する。

【0043】

「マルチカラムクロマトグラフィーシステム」または「MCCS」という用語は、相互接続されているまたは切り替え処理を受けることになる合計で2つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜からできたシステムを意味する。マルチカラムクロマトグラフィーシステムの非限定的な例は、相互接続されているまたは切り替え処理を受けることになる合計で2つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜を含んでいる、定期的向流クロマトグラフィーシステム（PCC）である。マルチカラムクロマトグラフィーシステムのさらなる例は、本明細書で記載されており、当技術分野で公知でもある。

【0044】

用語「実質的に含まない」は、指定された物質（例えば、哺乳類細胞または哺乳類細胞に由来する夾雑タンパク質、核酸、炭水化物、もしくは脂質）を少なくともまたは約90%含まない（例えば、少なくとももしくは約95%、96%、97%、98%、または少

10

20

30

40

50

なくとももしくは約 99% 含まない、または約 100% 含まない) 組成物 (例えば、液体培養培地) を意味する。

【0045】

「哺乳類細胞」という用語は、任意の哺乳類 (例えば、ヒト、ハムスター、マウス、ミドリザル、ラット、ブタ、ウシまたはウサギ) から作られたまたは任意の哺乳類に由来した任意の細胞を意味する。例えば、哺乳類細胞は、不死化細胞であってよい。いくつかの実施形態において、哺乳類細胞は、分化細胞である。いくつかの実施形態において、哺乳類細胞は、未分化細胞である。哺乳類細胞の非限定的な例は、本明細書で記載されている。哺乳類細胞のさらなる例は、当技術分野で公知である。

【0046】

「培養」または「細胞培養」という用語は、制御下にある一組の物理的条件下における哺乳類細胞の維持または増殖を意味する。

【0047】

「哺乳類細胞の培養物」という用語は、制御下にある一組の物理的条件下で維持または増殖される複数の哺乳類細胞を含有する、液体培養培地を意味する。

【0048】

「液体培養培地」という用語は、細胞 (例えば、哺乳類細胞) がインビトロで成長または増殖できるようにするのに十分な栄養素を含む、流体を意味する。例えば、液体培養培地は、次のうち 1 つまたはそれ以上を含み得る: アミノ酸 (例えば、20 個のアミノ酸)、プリン (例えば、ヒポキサンチン)、ピリミジン (例えば、チミジン)、コリン、イノシトール、チアミン、葉酸、ビオチン、カルシウム、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チミジン、シアノコバラミン、ピルベート、リボ酸、マグネシウム、グルコース、ナトリウム、カリウム、鉄、銅、亜鉛および重炭酸ナトリウム。いくつかの実施形態において、液体培養培地は、哺乳類由来の血清を含み得る。いくつかの実施形態において、液体培養培地は、哺乳類由来の血清または別の抽出物を含まない (組成が明らかな液体培養培地 (defined liquid culture medium))。いくつかの実施形態において、液体培養培地は、微量金属、哺乳類成長ホルモンおよび/または哺乳類成長因子を含み得る。液体培養培地の別の例は、最少培地 (例えば、無機塩、炭素源および水のみを含む培地) である。液体培養培地の非限定的な例は、本明細書で記載されている。液体培養培地のさらなる例が、当技術分野で公知であり、市販されてもいる。液体培養培地は、任意の密度の哺乳類細胞を含み得る。例えば、本明細書で使用されるとき、バイオリアクターから抜き出されたある体積の液体培養培地は、哺乳類細胞を実質的に含み得ない。

【0049】

「動物由来成分無含有の液体培養培地」という用語は、哺乳類に由来したいかなる成分 (例えば、タンパク質または血清) も含まない液体培養培地を意味する。

【0050】

「血清無含有の液体培養培地」という用語は、哺乳類血清を含まない液体培養培地を意味する。

【0051】

「血清含有液体培養培地」という用語は、哺乳類血清を含む液体培養培地を意味する。

【0052】

「既知組成液体培養培地 (chemically-defined liquid culture medium)」という用語は専門用語であり、化学的組成のすべてが既知になっている液体培養培地を意味する。例えば、既知組成液体培養培地は、ウシ胎児血清、ウシ血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンを含まないが、こうした製造物はアルブミンと脂質との複雑な混合物を典型的には含む。

【0053】

「タンパク質無含有の液体培養培地」という用語は、いかなるタンパク質も (例えば、検出可能ないかなるタンパク質も) 含まない、液体培養培地を意味する。

10

20

30

40

50

【0054】

「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリンタンパク質（例えば、可変ドメイン配列、フレームワーク配列および／または定常ドメイン配列）に関する少なくとも15個のアミノ酸（例えば、少なくとも20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個または100個のアミノ酸）からできたアミノ酸配列を含む、ポリペプチドを意味する。免疫グロブリンは、例えば少なくともアミノ酸15個の軽鎖免疫グロブリン、例えば少なくともアミノ酸15個の重鎖免疫グロブリンを含み得る。免疫グロブリンは単離された抗体（例えば、IgG、IgE、IgD、IgA、またはIgM）、例えば、IgGのサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）である。免疫グロブリンは、抗体フラグメント、例えば、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメントまたはscFvフラグメントであってよい。免疫グロブリンは、二重特異性抗体もしくは三重特異性抗体、または二量体抗体、三量体抗体もしくは多量体抗体、またはジアボディ、Affibody（登録商標）もしくはNanobody（登録商標）であってよい。免疫グロブリンは、少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む人為的改変タンパク質（例えば、融合タンパク質）であってよい。免疫グロブリンの非限定的な例は、本明細書に記載されており、免疫グロブリンのさらなる例は、当技術分野で公知である。

10

【0055】

「タンパク質フラグメント」または「ポリペプチドフラグメント」という用語は、長さがアミノ酸少なくとももしくは約4個分、アミノ酸少なくとももしくは約5個分、アミノ酸少なくとももしくは約6個分、アミノ酸少なくとももしくは約7個分、アミノ酸少なくとももしくは約8個分、アミノ酸少なくとももしくは約9個分、アミノ酸少なくとももしくは約10個分、アミノ酸少なくとももしくは約11個分、アミノ酸少なくとももしくは約12個分、アミノ酸少なくとももしくは約13個分、アミノ酸少なくとももしくは約14個分、アミノ酸少なくとももしくは約15個分、アミノ酸少なくとももしくは約16個分、アミノ酸少なくとももしくは約17個分、アミノ酸少なくとももしくは約18個分、アミノ酸少なくとももしくは約19個分、またはアミノ酸少なくとももしくは約20個分、または長さがアミノ酸20個分超になっている、ポリペプチド配列の一部を意味する。組換えタンパク質フラグメントは、本明細書に記載の方法のいずれかを用いて製造することができる。

20

30

【0056】

「人為的改変タンパク質」という用語は、有機体（例えば、哺乳類）内部に存在する内因性核酸によって自然にコードされない、ポリペプチドを意味する。人為的改変タンパク質の例には、酵素（例えば、人為的改変酵素の安定性および／または触媒活性の増大をもたらす1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を受けている）、融合タンパク質、抗体（例えば、二価抗体、三価抗体またはジアボディ）、および、少なくとも1つの組換え足場配列を含む抗原結合性タンパク質が挙げられる。

【0057】

「分泌されたタンパク質」または「分泌された組換えタンパク質」という用語は、元々含まれていた少なくとも1つの分泌シグナル配列が、哺乳類細胞内部で翻訳され、哺乳類細胞中の分泌シグナル配列が酵素によって少なくとも部分的に開裂されると、細胞外の空間（例えば、液体培養培地）に少なくとも一部が分泌される、タンパク質（例えば、組換えタンパク質）を意味する。分泌されたタンパク質として取り扱われるために、「分泌された」タンパク質が、細胞から完全にかい離している必要がないことについては、当業者ならば理解されよう。

40

【0058】

「灌流型バイオリアクター」という用語は、第1の液体培養培地中の複数の細胞（例えば、哺乳類細胞）を含んでいるバイオリアクターを意味し、ここで、バイオリアクター内に存在する細胞の培養は、第1の液体培養培地を定期的または連続的に抜き出すこと、および同時またはすぐ後に、実質的に同じ体積の第2の液体培養培地をバイオリアクターに

50

添加することを含む。いくつかの例において、培養期間（例えば、1日を基準とした際の培養培地再供給比率）中における増分による期間（例えば、約24時間の期間、約1分から約24時間の間の期間、または24時間超の期間）にわたって、抜き出しおよび添加が実行される第1の液体培養培地の体積の増分による変化（例えば、増大または減少）がある。毎日抜き出して置き換える培地の割合は、培養されている特定の細胞、初期の播種密度、および、特定の時間における細胞密度に応じて変動し得る。「RV」または「反応器容積」は、培養プロセスの開始時に存在する培養培地の体積（例えば、播種後に存在する培養培地の合計体積）を意味する。

【0059】

「流加型バイオリアクター」という用語は専門用語であり、第1の液体培養培地中の複数の細胞（例えば、哺乳類細胞）を含んでいるバイオリアクターを意味し、ここで、バイオリアクター内に存在する細胞の培養は、細胞培養物から第1の液体培養培地または第2の液体培養培地が大幅にまたは顕著に抜き出されることなく、第1の液体培養培地に第2の液体培養培地を定期的または連続的に添加することを含む。第2の液体培養培地は、第1の液体培養培地と同じであってよい。流加型培養のいくつかの例において、第2の液体培養培地は、濃縮された形態になった第1の液体培養培地である。流加型培養のいくつかの例において、第2の液体培養培地は、乾燥粉末として添加される。

【0060】

「清澄化済み液体培養培地」という用語は、細菌細胞または酵母細胞を実質的に無含有（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%または99%無含有）である、細菌細胞培養または酵母細胞培養から入手した液体培養培地を意味する。

【0061】

そうではないとの規定がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。方法および材料は、本発明における使用のために本明細書に記載されているが、当技術分野で公知になっている適切な他の方法および材料もまた、使用され得る。材料、方法および例は、説明用のものにすぎず、限定を加えるものになる意図はない。本明細書で言及されたすべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリおよび他の参考資料は、参照によって全部分を本明細書に組み入れる。矛盾する場合、本明細書の方が

【0062】

本発明に関する他の特色および利点については、下記の詳細な記載および図面および特許請求の範囲から明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、未処理のGE Mab Select SuReTM樹脂、25kGyガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM樹脂、15kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT 203樹脂、および15kGyガンマ線を照射したKaneka KanCap A樹脂に対する樹脂の静的結合曲線を示すグラフである（mg/mLタンパク質）。

【図2】図2は、30kGyガンマ線照射後のGE Mab Select SuReTM樹脂および30kGyガンマ線照射後のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT 203樹脂に由来する上澄みの280nm吸光度（プロテインA吸光度）を示す表である。

【図3】図3は、未処理のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT 203樹脂（バージン溶出液）または15kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT 203樹脂（ガンマ溶出液）を用いて実行された複数のサイクルのクロマトグラフィーでの溶出液中のタンパク質の量を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図4】図4は、未処理のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂を用いて実行された連続クロマトグラフィー中のサイクル7およびサイクル11の溶出プロファイルを示すクロマトグラフである。

【図5】図5は、15kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂を用いて実行された連続クロマトグラフィー中のサイクル7およびサイクル11の溶出プロファイルを示すクロマトグラフである。

【図6】図6は、未処理のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（バージン）または15kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（ガンマ）を用いて実行された複数のサイクルの連続クロマトグラフィーでの溶出液中のタンパク質の量を示すグラフである。 10

【図7】図7は、未処理のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（バージン）または15kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（ガンマ）を用いて実行された複数のサイクルのクロマトグラフィーで結合したタンパク質のグラフである。

【図8】図8は、未処理のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（バージン）または29kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（ガンマ）を用いて実行された複数のサイクルのクロマトグラフィーでの溶出液中のタンパク質の量を示すグラフである。 20

【図9】図9は、未処理のJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（バージン）、15kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（15kGy）、または29kGyガンマ線を照射したJSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂（29kGy）を用いて実行された複数のサイクルのクロマトグラフィーでの溶出液中のタンパク質（抗- $\alpha\beta$ TCR (IgG1) または抗-TGF β (IgG4)）の量を示すグラフである。

【図10】図10は、ヒトで特定の病気を治療するのに使用することができる酵素である代表的な組換えタンパク質のリストである。 30

【図11】図11は、モノクローナルIgG1を含有する培養培地を使用して各々の樹脂を装填したとき、複数のクロマトグラフィーサイクルでの未処理（バージン）および29-kGyガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM樹脂の溶出液中のタンパク質のグラフである。

【図12】図12は、モノクローナルIgG1を含有する培養培地を使用して各々の樹脂を装填したとき、複数のクロマトグラフィーサイクルでの未処理（バージン）および29-kGyガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM樹脂に結合したタンパク質の量のグラフである。

【図13】図13は、いろいろな平衡濃度のモノクローナルIgG4抗体を装填した後未処理（バージン）および29-kGyガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂に結合したタンパク質の量のグラフである（mg 結合タンパク質 / mL樹脂）。 40

【図14】図14は、未処理のGE Mab Select SuReTM LX樹脂（バージンLX）、29-kGyガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂（29kGY LX）、乾燥した未処理のGE Mab Select SuReTM LX樹脂、および乾燥した29-kGyガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂、ならびに少なくとも1種の酸化防止剤を含有する7種の異なる供試緩衝液の1つの存在下で29kGyの線量のガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂の2mg/mLの平衡IgG4抗体濃度における静的結合能力（mg タンパク質 / mL樹脂）のグラフである。 50

【図15】図15は、未処理のGE Mab Select SuReTM LX樹脂（バージョン）または25mMマンニトール、25mMヒスチジン、25mMアスコルビン酸ナトリウム、25mMメチオニン、50mMリン酸ナトリウム、pH 6.0の存在下29kGyの線量でガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂を用いて実行された複数のクロマトグラフィーサイクルでの溶出液中のタンパク質の量のグラフである。

【図16】図16は、未処理のGE Mab Select SuReTM LX樹脂（バージョン）または25mMマンニトール、25mMヒスチジン、25mMアスコルビン酸ナトリウム、25mMメチオニン、50mMリン酸ナトリウム、pH 6.0の存在下29kGyの線量でガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂を用いて実行された複数のクロマトグラフィーサイクルで結合したタンパク質の量のグラフである。

【図17】図17は、未処理のGE Mab Select SuReTM LX樹脂（バージョンLX）および25mMマンニトール、25mMヒスチジン、25mMアスコルビン酸ナトリウム、25mMメチオニン、50mMリン酸ナトリウム、pH 6.0の存在下29kGyの線量でガンマ線を照射したGE Mab Select SuReTM LX樹脂を用いた複数のクロマトグラフィーサイクルでのIgG1抗体溶出液を示す非還元ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルである。

【発明を実施するための形態】

【0064】

本明細書に、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法であって、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することを含み、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射への曝露後／その際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、方法が提供される。また、本明細書に記載の方法のいずれかにより製造された低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を含有する低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラム、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種のキレート剤および／または酸化防止剤を含む組成物、これらの低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラムの少なくとも1つを用いて低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーを実行する方法、ならびにこれらの低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーカラムの少なくとも1つを使用することを含む、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドなまたは実質的にクローズドな、連続的な方法が提供される。これらの方法およびプロセスの非限定的な局面は以下に記載される。当技術分野では理解できるように、以下に記載する様々な局面は制限されることなく任意の組合せで 사용할ことができる。

【0065】

クロマトグラフィー樹脂ならびに抗酸化物質および／またはキレート剤を含有する組成物

本明細書に、クロマトグラフィー樹脂（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知のクロマトグラフィー樹脂のいずれか）ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の酸化防止剤および／またはキレート剤のいずれか）を含む組成物であって、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤は組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射での処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、組成物が提供される。例えば、クロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティーもしくは擬似アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂の少なくとも1種、またはこれらの任意の組合せで

あることができる。いくつかの例において、クロマトグラフィー樹脂はタンパク質またはペプチドリガンドを含む樹脂（例えば、タンパク質またはペプチドリガンドを有するアフィニティークロマトグラフィー樹脂、例えば、プロテインAまたはプロテインGクロマトグラフィー樹脂）である。

【0066】

組成物は、例えば、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中の堆積したクロマトグラフィー樹脂のスラリーであることができる。例えば、液体はメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびマンニトールの少なくとも1（例えば、1、2、3、または4）種を含有することができる。いくつかの例において、液体はメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびマンニトールを含有する。いくつかの例において、液体は：（i）75 mM～約125 mM（例えば、80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のマンニトール；（ii）75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）；（iii）75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のアスコルビン酸ナトリウム；（iv）75 mM～約125 mM（例えば、約80 mM～約120 mM、約85 mM～約115 mM、約90 mM～約110 mM、または約95 mM～約105 mM）のヒスチジン；（v）約30 mM～約70 mM（例えば、約35 mM～約65 mM、約40 mM～約60 mM、または約45 mM～約55 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）および約30 mM～約70 mM（例えば、約35 mM～約65 mM、約40 mM～約60 mM、または約45 mM～約55 mM）のヒスチジン；（vi）約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のヒスチジン、および約10 mM～約50 mM（例えば、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、または約25 mM～約35 mM）のアスコルビン酸ナトリウム；または（vii）約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のアスコルビン酸ナトリウム、約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のマンニトール、および約5 mM～約45 mM（例えば、約10 mM～約40 mM、約15 mM～約35 mM、または約20 mM～約30 mM）のヒスチジンを含む。いくつかの例において、液体は緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝溶液、例えば、50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0のようなリン酸ナトリウム緩衝溶液）である。いくつかの例において、液体は緩衝溶液（例えば、リン酸ナトリウム緩衝溶液（例えば、50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0）のようなリン酸緩衝溶液である。

【0067】

いくつかの例において、組成物は固体混合物（例えば、乾燥した固体混合物または湿潤したもしくは湿った固体混合物）であることができる。固体混合物はメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびマンニトールのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、または4）種を含むことができる。いくつかの例において、固体混合物はメチオニン（または代わりにシステインもしくはグルタチオン）、アスコルビン酸ナトリウム、ヒスチジン、およびマンニトールを含有する。いくつかの例において、組成物は少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体に充填されたクロマトグラフィー樹脂である。このような液体

10

20

30

40

50

の非限定例は本明細書に記載されている。

【0068】

また、本明細書に、クロマトグラフィー樹脂（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知のクロマトグラフィー樹脂のいずれか）ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の酸化防止剤および／またはキレート剤のいずれか）を含む容器（例えば、プラスチック容器またはクロマトグラフィーカラム）であって、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤は組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射での処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する、容器も提供される。例えば、容器（例えば、プラスチック容器またはクロマトグラフィーカラム）は、例えば、少なくとも約1 mL、5 mL、少なくとも約10 mL、少なくとも約20 mL、少なくとも約30 mL、少なくとも約40 mL、少なくとも約50 mL、少なくとも約60 mL、少なくとも約70 mL、少なくとも約80 mL、少なくとも約90 mL、少なくとも約100 mL、少なくとも約110 mL、少なくとも約120 mL、少なくとも約130 mL、少なくとも約140 mL、少なくとも約150 mL、少なくとも約160 mL、少なくとも約170 mL、少なくとも約180 mL、少なくとも約190 mL、少なくとも約200 mL、少なくとも約210 mL、少なくとも約220 mL、少なくとも約230 mL、少なくとも約240 mL、少なくとも約250 mL、少なくとも約300 mL、少なくとも約350 mL、少なくとも約400 mL、または少なくとも約500 mLの内容積を有することができる。例えば、容器は、例えば、約1 mL～約500 mL、約1 mL～約50 mL、約5 mL～約500 mL、約5 mL～約400 mL、約5 mL～約350 mL、約5 mL～約300 mL、約5 mL～約250 mL、約5 mL～約200 mL、約5 mL～約150 mL、約5 mL～約100 mL、または約5 mL～約50 mLの内容積を有することができる。いくつかの例において、容器内のクロマトグラフィー樹脂は少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中の堆積したクロマトグラフィー樹脂のスラリーである。いくつかの例において、容器は充填されたクロマトグラフィー樹脂（例えば、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む液体中に充填された）を含む。

【0069】

本明細書に提供される組成物のいずれも少なくとも1（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）種の酸化防止剤および／または少なくとも1（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）種のキレート剤を含有することができる。本明細書に提供される組成物のいずれかに含まれる酸化防止剤（複数可）のいずれも、次の反応性の酸素および／または窒素種：ヒドロキシルラジカル、カーボネートラジカル、スーパーオキシドアニオン、ペルオキシラジカル、ペルオキシナイトライト、二酸化窒素、および一酸化窒素の1つまたはそれ以上をクエンチする能力を有することができる。本明細書に提供される組成物のいずれかに含まれることができる酸化防止剤の非限定例には：還元グルタチオン、還元チオレドキシン、還元システイン、カロテノイド、メラトニン、リコピン、トコフェロール、還元ユビキノン、アスコルベート、ビリルビン、尿酸、リボ酸、フラボノイド、フェノールプロパノイド酸、リドカイン、ナリングニン、フラーレン、グルコース、マンニトール、4-ヒドロキシ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド、およびジメチルメトキシクロマノールがある。酸化防止剤の追加の非限定例には、抗酸化酵素（例えば、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼ、カタラーゼ、およびチオレドキシンレダクターゼ）がある。本明細書に提供される組成物のいずれかに含まれることができる酸化防止剤のさらなる例としては、マンニトール、アスコルビン酸ナトリウム、メチオニン、およびヒスチジンがある。酸化防止剤のさらなる例には、システイン、タウリン、メルカプトプロピオニルグリシン、N-アセチルシステイン、ニンニク油、ジアリルスルフィド、ジヒドロリポ酸、およびジアリルトリスルフィドである。抗酸化酵素を酸化防止剤として含むいくつかの実施形態はその酵素に対する1つまたはそれ以上の基質をさらに含むことがで

きる。酸化防止剤は、例えばスピントラップ、酸化還元感受性染料 (redox sensitive dye)、および化学発光アッセイを含めて当技術分野で公知の幾つかの方法を用いて確認することができる。

【0070】

本明細書に提供される組成物のいずれかに含まれるキレート剤 (複数可) のいずれも、高い親和性 (例えば、約 $1\ \mu\text{M}$ 以下、約 $800\ \text{nM}$ 以下、約 $700\ \text{nM}$ 以下、約 $600\ \text{nM}$ 以下、約 $500\ \text{nM}$ 以下、約 $400\ \text{nM}$ 以下、約 $300\ \text{nM}$ 以下、約 $250\ \text{nM}$ 以下、約 $200\ \text{nM}$ 以下、約 $150\ \text{nM}$ 以下、約 $100\ \text{nM}$ 以下、約 $80\ \text{nM}$ 以下、約 $60\ \text{nM}$ 以下、約 $40\ \text{nM}$ 以下、約 $20\ \text{nM}$ 以下、または約 $1\ \text{nM}$ 以下) で酸化還元活性金属 (redox active metal) (例えば、 Cu^{2+} および Fe^{2+}) と結合する能力を有することができる。本明細書に提供される組成物のいずれかに含まれることができるキレート剤 (複数可) の非限定例にはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、2, 3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DMPS)、ジメルカプトコハク酸 (DMSA)、メタロチオネイン、およびデスフェロキサミンがある。

【0071】

本明細書に提供される組成物のいずれかの中のキレート剤 (複数可) および/または抗酸化物質 (複数可) の各々の濃度は、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ (例えば、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $30\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $25\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $20\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $10\ \text{mM}$ 、約 $0.1\ \text{mM}$ ~ 約 $5.0\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $25\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $15\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $10\ \text{mM}$ 、約 $0.5\ \text{mM}$ ~ 約 $5\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $120\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $30\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $25\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $30\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $25\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $1\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $30\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $25\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $30\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $90\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $70\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $50\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $50\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $50\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $50\ \text{mM}$ ~ 約 $80\ \text{mM}$ 、約 $50\ \text{mM}$ ~ 約 $60\ \text{mM}$ 、約 $80\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $80\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$ 、約 $80\ \text{mM}$ ~ 約 $100\ \text{mM}$ 、約 $100\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、または約 $100\ \text{mM}$ ~ 約 $125\ \text{mM}$) であることができる。

【0072】

いくつかの例において、本明細書に提供される組成物は $5\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ のマンニトール (例えば、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $30\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $40\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $50\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ 、約 $60\ \text{mM}$ ~ 約 $140\ \text{mM}$ 、約 $70\ \text{mM}$ ~ 約 $130\ \text{mM}$ 、約 $80\ \text{mM}$ ~ 約 $120\ \text{mM}$ 、約 $90\ \text{mM}$ ~ 約 $110\ \text{mM}$ 、約 $95\ \text{mM}$ ~ 約 $105\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $50\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $45\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $40\ \text{mM}$ 、約 $5\ \text{mM}$ ~ 約 $35\ \text{mM}$ 、約 $10\ \text{mM}$ ~ 約 $35\ \text{mM}$ 、約 $15\ \text{mM}$ ~ 約 $35\ \text{mM}$ 、または約 $20\ \text{mM}$ ~ 約 $30\ \text{mM}$ のマンニトール) ; $5\ \text{mM}$ ~ 約 $150\ \text{mM}$ (

例えば、約 10 mM～約 150 mM、約 20 mM～約 150 mM、約 30 mM～約 150 mM、約 40 mM～約 150 mM、約 50 mM～約 150 mM、約 60 mM～約 140 mM、約 70 mM～約 130 mM、約 80 mM～約 120 mM、約 90 mM～約 110 mM、約 95 mM～約 105 mM、約 30 mM～約 70 mM、約 35 mM～約 65 mM、約 40 mM～約 60 mM、約 45 mM～約 55 mM、約 20 mM～約 50 mM、約 25 mM～約 45 mM、約 30 mM～約 40 mM、約 30 mM～約 35 mM、約 5 mM～約 45 mM、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、または約 20 mM～約 25 mM) のメチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン) ; 5 mM～150 mM のアスコルビン酸ナトリウム (例えば、約 10 mM～約 150 mM、約 20 mM～約 150 mM、約 30 mM～約 150 mM、約 40 mM～約 150 mM、約 50 mM～約 150 mM、約 60 mM～約 140 mM、約 70 mM～約 130 mM、約 80 mM～約 120 mM、約 90 mM～約 110 mM、約 95 mM～約 105 mM、約 10 mM～約 50 mM、約 15 mM～約 45 mM、約 20 mM～約 40 mM、約 25 mM～約 35 mM、約 30 mM～約 35 mM、約 5 mM～約 45 mM、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、約 20 mM～約 25 mM のアスコルビン酸ナトリウム) ; および 5 mM～約 150 mM (例えば、約 10 mM～約 150 mM、約 20 mM～約 150 mM、約 30 mM～約 150 mM、約 40 mM～約 150 mM、約 50 mM～約 150 mM、約 60 mM～約 140 mM、約 70 mM～約 130 mM、約 80 mM～約 120 mM、約 90 mM～約 110 mM、約 95 mM～約 105 mM、約 30 mM～約 70 mM、約 35 mM～約 65 mM、約 40 mM～約 60 mM、約 45 mM～約 55 mM、約 20 mM～約 50 mM、約 25 mM～約 45 mM、約 30 mM～約 40 mM、約 30 mM～約 35 mM、約 5 mM～約 45 mM、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、または約 20 mM～約 25 mM) のヒスチジンのうちの 1 つまたはそれ以上を含有する。

【0073】

組成物のいずれかの非限定例は (i) 約 75 mM～約 125 mM (例えば、約 80 mM～約 120 mM、約 85 mM～約 115 mM、約 90 mM～約 110 mM、または約 95 mM～約 105 mM) のマンニトール (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) ; (ii) 約 75 mM～約 125 mM (例えば、約 80 mM～約 120 mM、約 85 mM～約 115 mM、約 90 mM～約 110 mM、または約 95 mM～約 105 mM) のメチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン) (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) ; (iii) 約 75 mM～約 125 mM (例えば、約 80 mM～約 120 mM、約 85 mM～約 115 mM、約 90 mM～約 110 mM、または約 95 mM～約 105 mM) のアスコルビン酸ナトリウム (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) ; (iv) 約 75 mM～約 125 mM (例えば、約 80 mM～約 120 mM、約 85 mM～約 115 mM、約 90 mM～約 110 mM、または約 95 mM～約 105 mM) のヒスチジン (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) ; (v) 約 30 mM～約 70 mM (例えば、約 35 mM～約 65 mM、約 40 mM～約 60 mM、または約 45 mM～約 55 mM) のメチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン) および約 30 mM～約 70 mM (例えば、約 35 mM～約 65 mM、約 40 mM～約 60 mM、または約 45 mM～約 55 mM) のヒスチジン (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) ; (vi) 約 10 mM～約 50 mM (例えば、約 15 mM～約 45 mM、約 20 mM～約 40 mM、約 25 mM～約 35 mM、または約 30 mM～約 35 mM) のメチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン)、約 10 mM～約 50 mM (例えば、約 15 mM～約 45 mM、約 20 mM～約 40 mM、約 25 mM～約 35 mM、または約 30 mM～約 35 mM) のヒスチジン、および約 10 mM～約 50 mM (例えば、約 15 mM～約 45 mM、約 20 mM～約 40 mM、約 25 mM～約 35 mM、または約 30 mM

M～約 35 mM) のアスコルビン酸ナトリウム (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) ; または (vii) 約 5 mM ～約 45 mM (例えば、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、または約 23 mM～約 27 mM) のアスコルビン酸ナトリウム、約 5 mM ～約 45 mM (例えば、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、または約 23 mM～約 27 mM) のメチオニン (または代わりにシステインもしくはグルタチオン)、約 5 mM～約 45 mM (例えば、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、または約 23 mM～約 27 mM) のマンニトール、および約 5 mM～約 45 mM (例えば、約 10 mM～約 40 mM、約 15 mM～約 35 mM、約 20 mM～約 30 mM、または約 23 mM～約 27 mM) のヒスチジン (例えば、緩衝溶液中、例えば、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0 のようなリン酸塩緩衝液中) を含有する。

10

【0074】

本明細書に提供される組成物のいずれかのバイオバーデンを低減するのに十分なガンマ線照射の非限定的な線量は以下に記載される。本明細書に提供される組成物のいずれかのバイオバーデンを低減するのに十分なガンマ線照射の追加の線量は当技術分野で公知である。例えば、本明細書に記載の組成物のいずれも、本明細書に記載されている線量のいずれかで、ガンマ線照射の割合のいずれかで、および／またはガンマ線照射を実行する温度のいずれかで (任意の組合せで) ガンマ線を照射することができる。組成物のバイオバーデンは、例えば、組成物中に存在する自己複製する生物学的夾雑物 (複数可) を含有するであろう組成物から、例えば消化、超音波処理、振盪、ボルテックス混合、フラッシュ、ブレンド、または綿棒で拭き取ることによりサンプルをとり、サンプル中に存在する自己複製する生物学的夾雑物 (複数可) のレベルを (例えば、生物学的夾雑物が自己複製するのを可能にする成長培地にサンプルを入れることにより、例えばサンプルをシャーレに蒔くか、またはサンプルを膜に通すことにより) 定性化または定量化することによって決定することができる。

20

【0075】

組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射での処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤の量は、例えば実施例に記載されている方法を用いて決定することができる。例えば、ある量の少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤の存在下でガンマ線照射により処理されたクロマトグラフィー樹脂の結合能力の低減のレベルを、少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤の不在下で同じ線量のガンマ線照射により処理されたクロマトグラフィー樹脂の結合能力の低減のレベルと比較することができ、ここで少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤の不在下でガンマ線を照射したクロマトグラフィー樹脂と比較したときの少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤の存在下でガンマ線を照射したクロマトグラフィー樹脂の結合能力の低減のレベルの減少は、その少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤がガンマ線照射による処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在していたことを示す。クロマトグラフィー樹脂の結合能力を決定するための代表的な方法は実施例に記載されている。クロマトグラフィー樹脂の結合能力を決定する方法のさらなる例は当技術分野で公知である。

30

40

【0076】

クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法

本明細書に、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法が提供される。これらの方法は、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露する工程を含み、ここで少なくとも 1 種の酸化防止剤および／またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射への曝露後 (またはその際) クロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で

50

存在する。

【0077】

また、クロマトグラフィー樹脂（ならびに場合によりガンマ線照射への曝露後／その際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量の少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤）を含む組成物を含む容器を、約0.1 kGy／時～約6 kGy／時（例えば、約0.1 kGy／時～約5.5 kGy／時、約0.1 kGy／時～約5.0 kGy／時、約0.1 kGy／時～約4.5 kGy／時、約0.1 kGy／時～約4.0 kGy／時、約0.1 kGy／時～約3.5 kGy／時、約0.1 kGy／時～約3.0 kGy／時、約0.1 kGy／時～約2.5 kGy／時、約0.1 kGy／時～約2.0 kGy／時、約0.1 kGy／時～約1.5 kGy／時、約0.1 kGy／時～約1.0 kGy／時、約0.5 kGy／時～約6 kGy／時、約0.5 kGy／時～約5.5 kGy／時、約0.5 kGy／時～約5.0 kGy／時、約0.5 kGy／時～約4.5 kGy／時、約0.5 kGy／時～約4.0 kGy／時、約0.5 kGy／時～約3.5 kGy／時、約0.5 kGy／時～約3.0 kGy／時、約0.5 kGy／時～約2.5 kGy／時、約0.5 kGy／時～約2.0 kGy／時）の割合で、および／または約4℃～約25℃（例えば、約4℃～約20℃、約4℃～約15℃、約4℃～約10℃、約10℃～約25℃、約10℃～約20℃、約10℃～約15℃、または約15℃～約25℃）の温度で、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分なガンマ線の線量でガンマ線照射に曝露することを含む、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法が提供される。この段落に記載された方法において、これらの方法により生産されるガンマ線を照射したクロマトグラフィー樹脂の結合能力のレベルは、6.1 kGy／時より大きい割合および／または25℃より高い温度の一方または両方でガンマ線が照射されたガンマ線を照射したクロマトグラフィー樹脂の結合能力のレベルより高い。

【0078】

クロマトグラフィー樹脂は当技術分野で公知の方法を用いてガンマ線照射に曝露することができる。例えば、コバルト-60またはセシウム-137のような同位体をガンマ線源として使用することができる。クロマトグラフィー樹脂は約-25℃～約0℃（両端を含む）、または約0℃～約25℃（両端を含む）の温度でガンマ線照射に曝露することができる。クロマトグラフィー樹脂は約0.1 kGy～約100 kGy、約1 kGy～約100 kGy、約1 kGy～約90 kGy、約1 kGy～約80 kGy、約1 kGy～約70 kGy、約1 kGy～約65 kGy、約5 kGy～約65 kGy、約10 kGy～約60 kGy、約10 kGy～約55 kGy、約10 kGy～約50 kGy、約10 kGy～約45 kGy、約10 kGy～約40 kGy、約10 kGy～約35 kGy、約10 kGy～約30 kGy、約15 kGy～約50 kGy、約15 kGy～約45 kGy、約15 kGy～約40 kGy、約15 kGy～約35 kGy、約20 kGy～約30 kGy、または約23 kGy～約27 kGyの線量のガンマ線照射に曝露することができる。クロマトグラフィー樹脂は約 1×10^{-6} 以下、約 1×10^{-7} 以下、約 10×10^{-8} 以下、約 1×10^{-11} 以下、もしくは約 1×10^{-12} 以下、または約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-10} 、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-9} 、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-8} 、 1×10^{-6} ～約 1×10^{-7} 、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-10} 、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-9} 、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-8} 、約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-10} 、もしくは約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-9} のクロマトグラフィー樹脂の滅菌保証レベルをもたらしのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することができる。

【0079】

クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分なガンマ線照射の線量は当技術分野で公知の方法を用いて決定することができる。例えば、ある線量のガンマ線照

射で処理されたクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンレベルを未処理の（例えば、コントロールの、ガンマ線照射されてない）クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンレベルと比較することができ、未処理のクロマトグラフィー樹脂と比較したときのガンマ線を照射したクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンのレベルの減少は、その線量のガンマ線照射がクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに充分であることを示す。組成物（例えば、クロマトグラフィー樹脂）中のバイオバーデンのレベルを決定する代表的な方法は本明細書に記載されている。組成物（例えば、クロマトグラフィー樹脂）中のバイオバーデンのレベルを決定するさらなる方法は当技術分野で公知である。

【0080】

これらの方法のいずれかにおけるクロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、サイズ排除クロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、もしくはアフィニティークロマトグラフィー樹脂、またはこれらの任意の組合せであることができる。アフィニティークロマトグラフィー樹脂の非限定例としては、タンパク質またはペプチドリガンド（例えば、約5個のアミノ酸～約100個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約90個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約80個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約70個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約60個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約40個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約30個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約25個のアミノ酸、または約5個のアミノ酸～約20個のアミノ酸）、酵素の小分子基質もしくは補因子、アプタマー、阻害剤（例えば、競合タンパク質阻害剤）または金属を挙げる
20
ことができる。いくつかの実施形態において、アフィニティークロマトグラフィー樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテインA）を含む。アフィニティークロマトグラフィー樹脂の追加の例は補因子リガンド、基質リガンド、金属リガンド、製品リガンド、またはアプタマーリガンドを含む。いくつかの例において、クロマトグラフィー樹脂は二モードの（b i o m o d a l）クロマトグラフィー樹脂（例えば、アニオン交換クロマトグラフィー樹脂および疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂）である。クロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂（例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換クロマトグラフィー樹脂）であることができる。

【0081】

クロマトグラフィー樹脂を含む容器はプラスチック容器（例えば、円筒状のチューブ、密閉もしくはクランプ留めしたボックス、または密閉したバッグ）であることができる。これらの方法で使用される容器の非限定例には貯蔵容器またはクロマトグラフィーカラムがある。例えば、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物は密閉容器中に存在することができる（例えば、密閉容器中のスラリーまたは密閉容器（例えば、クロマトグラフィーカラム）中の充填されたクロマトグラフィー樹脂）。本明細書に記載の方法で使用される容器は使い捨て式のクロマトグラフィーカラムであることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法で使用される容器はプリスターパック内に入れた使い捨て式クロマトグラフィーカラムである。容器（例えば、貯蔵容器またはクロマトグラフィーカラム）は約1 mL～約1 L（例えば、約1 mL～約900 mL、約1 mL～約800 mL、約1 mL～約700 mL、約1 mL～約600 mL、約1 mL～約500 mL、約1 mL～約450 mL、約1 mL～約400 mL、約1 mL～約350 mL、約1 mL～約300 mL、約1 mL～約250 mL、約1 mL～約200 mL、約1 mL～約150 mL、約1 mL～約100 mL、約1 mL～約75 mL、約1 mL～約50 mL、約1 mL～約40 mL、約1 mL～約30 mL、または約1 mL～約20 mL）の内部総容積を有することができる。

【0082】

容器中に含まれるクロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含有する組成物は固体混合物（例えば、乾燥または湿潤固体混合物）で存在することができる。例えば、容器は少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含有する液体（例えば、緩衝溶液）中の堆積したクロマトグラフィー樹脂の

10

20

30

40

50

スラリーを含むことができる。いくつかの実施形態において、容器は充填されたクロマトグラフィー樹脂を含むことができる。例えば、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも１種の酸化防止剤および／またはクロマトグラフィー樹脂を含む組成物を含む容器は充填されたクロマトグラフィーカラム（例えば、樹脂が少なくとも１種の酸化防止剤および／またはクロマトグラフィー樹脂を含有する液体（例えば、緩衝溶液）に充填された場合）である。いくつかの実施形態は、曝露に先立って、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも１種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含有する組成物を容器内に配置することを含む。

【0083】

本明細書に記載の酸化防止剤および／またはキレート剤のいずれも本明細書に記載の代表的な濃度の任意の組合せを用いて任意の組合せで 사용할 ことができる。例えば、組成物は：還元グルタチオン、還元チオレドキシン、還元システイン、カロテノイド、メラトニン、リコピン、トコフェロール、還元ユビキノン、アスコルベート、ビリルビン、尿酸、リポ酸、フラボノイド、フェノールプロパノイド酸、リドカイン、ナリングニン、フラレーン、グルコース、マンニトール、４-ヒドロキシ-２，２，６，６-テトラメチルペリジンを１-オキシル、およびジメチルメトキシクロマノールから選択される少なくとも１種の酸化防止剤、および／または：EDTA、DMPS、DMSA、メタロチオネイン、およびデスフェロキサミンから選択される少なくとも１種のキレート剤を含むことができる。

【0084】

組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射による処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な少なくとも１種の酸化防止剤および／またはキレート剤の量を決定／確認するための代表的な方法は本明細書に記載されている。組成物のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射による処理の際にクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な少なくとも１種の酸化防止剤および／またはキレート剤の量を決定／確認するためのさらなる方法は当技術分野で公知である。

【0085】

また、本明細書に、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂（例えば、貯蔵容器、例えば密閉された貯蔵容器に入れて提供される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂）も提供される。本明細書に記載の方法のいずれかを用いて生成される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は約 1×10^{-6} 以下、約 1×10^{-7} 以下、約 10×10^{-8} 以下、約 1×10^{-11} 以下、もしくは約 1×10^{-12} 以下、または約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-12}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-11}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-10}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-9}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-7}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-11}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-9}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-8}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-12}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-11}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-10}$ 、または約 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9}$ の滅菌保証レベルを有することができる。本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は、同じタンパク質を使用して、本明細書に記載の方法により生産されたクロマトグラフィー樹脂およびコントロールの未処理のクロマトグラフィー樹脂の両方の結合能力を試験するとき、そのバイオバーデンを低減するために処理されてない（例えば、ガンマ線を照射されてない）同じクロマトグラフィー樹脂の結合能力の少なくとも 74%（例えば、少なくとも 76%、少なくとも 78%、少なくとも 80%、少なくとも 82%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、

10

20

30

40

50

または100%)または約74%~95%、約74%~約95%、約76%~約95%、少なくとも約78%~約95%、約80%~約95%、もしくは約74%~約90%、約76%~約90%、約78%~約90%、または約80%~約90%である結合能力を有することができる。

【0086】

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを作成する方法

また、本明細書に、低減した充填されたクロマトグラフィーカラムを作成する方法であって、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産された低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を準備すること、およびそのクロマトグラフィー樹脂を殺菌したまたは低減したバイオバーデンの環境で低減したバイオバーデンのカラム中に充填することを
10
含む、方法も提供される。いくつかの実施形態において、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは、充填されたクロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および/またはキレート剤を含むカラムを、カラムおよび充填されたクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することによって生産することができ、ここで少なくとも1種の酸化防止剤および/またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射への曝露後充填されたクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を改善するのに十分な量で存在する。

【0087】

また、本明細書に記載の方法により生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム(複数可)も提供される。本明細書に記載の方法により生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム(複数可)のいずれも、約 1×10^{-6} 以下、約 1×10^{-7} 以下、約 10×10^{-8} 以下、約 1×10^{-11} 以下、または約 1×10^{-12} 以下、または約 1×10^{-6} ~約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-6} ~約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-6} ~約 1×10^{-10} 、約 1×10^{-6} ~約 1×10^{-9} 、約 1×10^{-6} ~約 1×10^{-8} 、 1×10^{-6} ~約 1×10^{-7} 、約 1×10^{-7} ~約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-7} ~約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-7} ~約 1×10^{-10} 、約 1×10^{-7} ~約 1×10^{-9} 、約 1×10^{-7} ~約 1×10^{-8} 、約 1×10^{-8} ~約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-8} ~約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-8} ~約 1×10^{-10} 、または約 1×10^{-8} ~約 1×10^{-9} の滅菌保証レベルを有
20
することができる。本明細書に記載の方法により生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム(複数可)のいずれも：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂(例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知のアフィニティークロマトグラフィー樹脂のいずれか)、親水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも1種のクロマトグラフィー樹脂を含有することができる。例えば、本明細書に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムのいずれもタンパク質リガンド(例えば、プロテインA)を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含むことができる。本明細書に記載の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムはアニオン交換クロマトグラフィー樹脂(例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換
30
クロマトグラフィー樹脂)を含むことができる。

【0088】

低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーを実行する方法

本明細書に記載の方法は本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムの使用を含み、また本明細書に記載の方法は本明細書に提供される少なくとも1つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含む1つまたは2つのMCCSの使用を含む。ガンマ線を照射されたクロマトグラフィー樹脂は本明細書に記載の任意の種類の樹脂(または当技術分野で公知の任意の種類のクロマトグラフィー樹脂)であることができる。

【0089】

10

20

30

40

50

低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは本明細書に記載の方法のいずれかを用いて製造することができる。例えば、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは、クロマトグラフィー樹脂（複数可）ならびに少なくとも1種の抗酸化物質および／またはキレート剤（例えば、本明細書に記載のような組成物のいずれか）を含む組成物をクロマトグラフィーカラムに充填し、その充填されたカラムを（例えば、本明細書に記載の曝露および条件のいずれかを用いて）ガンマ線照射に曝露することによって生産することができる。他の例において、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは、クロマトグラフィー樹脂ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む容器をある線量のガンマ線照射に曝露し、得られた低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂をクロマトグラフィーカラムに充填することによって生産することができる。このような方法において、（ガンマ線照射への曝露中容器内に存在する）クロマトグラフィー樹脂は容器内のスラリーとして存在することができ、クロマトグラフィーカラムは低減したバイオバーデンのフード内で充填される。他の方法において、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤と共に容器内に存在するクロマトグラフィー樹脂を容器内で固体混合物としてガンマ線照射に曝露することができ、得られた低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂のスラリーを（例えば、低減したバイオバーデンのフード内で製造された）低減したバイオバーデンの緩衝液を用いて製造することができ、低減したバイオバーデンのフード内で得られたスラリーを使用してクロマトグラフィーカラムを充填する。これらの例のいくつかにおいて、充填に先立って、クロマトグラフィーカラムを処理（例えば、オートクレーブ処理、ガンマ線照射、またはエチレンオキサイドへの曝露）してバイオバーデンを低減することができる。

10

20

【0090】

本明細書に記載の方法のいずれかで使用される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは約 1×10^{-3} ～約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-4} ～約 1×10^{-12} 、 1×10^{-5} ～約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-5} ～約 1×10^{-10} 、約 1×10^{-5} ～約 1×10^{-9} 、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-9} 、または約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-8} （両端を含む）の滅菌保証レベル（SAL）を有することができる。

【0091】

低減したバイオバーデンの緩衝液

30

本明細書に記載の方法およびプロセスは1種またはそれ以上の低減したバイオバーデンの緩衝液を用いて実行することができる。当技術分野では理解されるように、低減したバイオバーデンの緩衝液はクロマトグラフィーのサイクルで使用される任意の種類の緩衝液（例えば、クロマトグラフィーのサイクルまたは本明細書に記載の単位操作のいずれかの工程で使用される緩衝液）であることができる。緩衝液のバイオバーデンを低減するための代表的な方法には、ろ過（ $0.2 \mu\text{m}$ 孔径のろ過）、オートクレーブ処理、およびガンマ線照射がある。緩衝液のバイオバーデンを低減するさらなる方法は当技術分野で公知である。低減したバイオバーデンの緩衝液は約 1×10^{-3} ～約 1×10^{-12} 、約 1×10^{-4} ～約 1×10^{-12} 、 1×10^{-5} ～約 1×10^{-11} 、約 1×10^{-5} ～約 1×10^{-10} 、約 1×10^{-5} ～約 1×10^{-9} 、約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-9} 、または約 1×10^{-6} ～約 1×10^{-8} （両端を含む）の滅菌保証レベルを有することができる。

40

【0092】

組換え治療用タンパク質

本明細書に記載の組換えタンパク質は組換え治療用タンパク質であることができる。本明細書で提供された方法によって製造され得る組換え治療用タンパク質の非限定的な例には、免疫グロブリン（軽鎖および重鎖免疫グロブリンを含める）、抗体または抗体フラグメント（例えば、本明細書に記載の抗体フラグメントのいずれか）、酵素（例えば、ガラクトシダーゼ（例えば、アルファーガラクトシダーゼ）、Myozyme（登録商標）またはCerezyme（登録商標））、タンパク質（例えば、ヒトエリスロポエチン、腫

50

瘍壊死因子 (TNF)、またはインターフェロンアルファもしくはベータ)、または免疫原性もしくは抗原性タンパク質もしくはタンパク質フラグメント (例えば、ワクチンにおける使用のためのタンパク質) が挙げられる。各種のリソソーム貯蔵疾患を治療するのに使用することができる組換え治療用酵素の非限定例が図10に示されている。組換え治療用タンパク質は、少なくとも1つの多機能性組換えタンパク質足場を含む、人為的改変抗原結合性ポリペプチドであってよい (例えば、Gebauerら、Current Opin. Chem. Biol. 13: 245~255、2009年; および米国特許出願公開第2012/0164066号 (参照によって全部分を本明細書に組み入れる) で記載された、抗原結合性組換えタンパク質を参照されたい。)。抗体である組換え治療用タンパク質の非限定的な例には、パニツムマブ、オマリズマブ、アバゴボマブ (abagovomab)、アブシキシマブ、アクトクスマブ、アダリムマブ、アダカツムマブ、アフエリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブ (alacizumab)、アラシズマブ、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブ、アマツキシマブ、アナツモマブ (anatumomab)、アポリズマブ、アチヌマブ (atimumab)、トシリズマブ、バシリキシマブ (basilizimab)、ベクトムマブ (bectumomab)、ベリムマブ、ベバシズマブ、ビシロマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、ダクリズマブ、デンスマブ (densumab)、エクリズマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エファングマブ、エルツマキシソマブ (ertumaxomab)、エタラシズマブ、ゴリムマブ、インフリキシマブ、ナタリズマブ、バリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブおよびトラスツズマブが挙げられる。本明細書に記載の方法によって製造され得る組換え治療用抗体のさらなる例は、当技術分野で公知である。本方法によって製造および精製され得る組換え治療用タンパク質のさらなる非限定的な例には、アルグルコシダーゼアルファ、ラロニダーゼ、アバタセプト、ガルスルファーゼ、ルトロピンアルファ、抗血友病因子、アガルシダーゼベータ、インターフェロンベーター1a、ダーベポエチンアルファ、テネクトプラゼ、エタネルセプト、凝固第IX因子、卵胞刺激ホルモン、インターフェロンベーター1a、イミグルセラゼ、ドルナーゼアルファ、エポエチンアルファおよびアルテプラゼが挙げられる。

【0093】

分泌された可溶性組換え治療用タンパク質は、細胞 (例えば、哺乳類細胞) から液体培養培地を除去または物理的に分離することにより、液体培養培地 (例えば、第1の液体培養培地および/または第2の液体培養培地) から回収することができる。細胞 (例えば、哺乳類細胞) から液体培養培地を除去するための相異なる種々の方法は、当技術分野で公知であり、例えば、遠心分離、ろ過、ピペット操作および/または吸引が挙げられる。分泌された組換え治療用タンパク質は、その後、様々な種類のクロマトグラフィー (例えば、アフィニティークロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、もしくは疎水性相互作用クロマトグラフィー、またはこれらの任意の組合せ) および/またはろ過 (例えば、分子量カットオフろ過) を始めとする様々な生化学的技術を用いて、液体培養培地から回収し、さらに精製することができる。

【0094】

クロマトグラフィーのサイクル

当技術分野で周知のように、クロマトグラフィーのサイクルにおける工程は、クロマトグラフィー樹脂、サイクルにおいて各々の工程を実行するのに使用される緩衝液、および標的とする組換えタンパク質 (例えば、組換え治療用タンパク質) の生物物理学的な特性に応じて異なることができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラムは、標的とする組換えタンパク質を含む流体をアフィニティークロマトグラフィーカラムに装填し、カラムを洗浄して望ましくない生物学的材料 (例えば、夾雑するタンパク質および/または小分子) を除去し、カラムに結合した標的とする組換えタンパク質を溶出し、カラムを再平衡化する工程を含むことができる。標的とする組換えタンパク質が装填工程でクロマトグラフィー樹脂に結合するカチオンおよび/またはアニオン交換クロマトグラフィ

ーカラムを用いるクロマトグラフィーのサイクルは、標的とするタンパク質を含む流体をカラムに装填し、カラムを洗浄して望ましくない生物学的材料を除去し、カラムに結合した標的とする組換えタンパク質を溶出し、カラムを再平衡化する工程を含むことができる。他の例において、望ましくない生物学的材料が装填工程中にクロマトグラフィー樹脂に結合するが標的とする組換えタンパク質は結合しないカチオンおよび／またはアニオン交換クロマトグラフィーカラムを用いるクロマトグラフィーのサイクルは、標的とするタンパク質を含む流体をカラムに装填し、通過画分中の標的とする組換えタンパク質を収集し、カラムを再平衡化する工程を含むことができる。当技術分野で周知のように、クロマトグラフィーサイクルにおける単一の工程のいずれも単一の緩衝液または複数の緩衝液（例えば、2種またはそれ以上の緩衝液）を含むことができ、クロマトグラフィーサイクルにおける単一の工程のいずれか1つまたはそれ以上が緩衝液勾配を含むことができる。クロマトグラフィーの単一のサイクルの様々な周知の局面の組合せのいずれも、例えば、異なるクロマトグラフィー樹脂（複数可）、流量（複数可）、緩衝液（複数可）、カラムのボイド容積（複数可）、カラムのベッド容積（複数可）、各々の工程で使用される緩衝液の体積（複数可）、標的とするタンパク質を含む流体の体積（複数可）、ならびに各々の工程で使用される緩衝液（複数可）の数および種類を、任意の組合せでこれらの方法に使用することができる。

10

【0095】

低減したバイオバーデンのカラムクロマトグラフィーを実行する方法

本明細書に、低減したバイオバーデンのクロマトグラフィーを実行する方法が提供される。これらの方法は、本明細書に記載の方法のいずれかを用いて生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを準備すること、およびその低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを用いてカラムクロマトグラフィーを実行することを含む。低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは本明細書に記載のクロマトグラフィー樹脂のいずれかの少なくとも1種を任意の組合せを含むことができる。例えば、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム内に存在するクロマトグラフィー樹脂は、タンパク質リガンド（例えば、プロテインA）を含むアフィニティー樹脂であることができ、またはアニオン交換クロマトグラフィー樹脂を含むことができる。低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは本明細書に記載の代表的な内容積のいずれかを有することができる。低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは本明細書に記載または当技術分野で公知の任意の形状（例えば、円筒、近円筒状形、楕円形状）を有することができる。これらの方法で実行されるカラムクロマトグラフィーは組換えタンパク質（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の組換え治療用タンパク質のいずれか）を精製または単離するために使用することができる。いくつかの例において、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムは、マルチカラムクロマトグラフィーシステム（MCCS）の一部であり、例えば、定期的向流クロマトグラフィーシステム（PCCS）の一部であることができる。

20

30

【0096】

実行されるカラムクロマトグラフィーは本明細書に記載または当技術分野で公知の少なくとも1つのサイクルのクロマトグラフィーを含むことができる。例えば、少なくとも1つのサイクルのクロマトグラフィーは：組換えタンパク質を含む液体にクロマトグラフィー樹脂を曝露することにより組換えタンパク質を捕獲し；クロマトグラフィー樹脂を洗浄緩衝液に曝露することによりクロマトグラフィー樹脂を洗浄し、クロマトグラフィー樹脂を溶出緩衝液に曝露することにより組換えタンパク質を溶出し；クロマトグラフィー樹脂を再生緩衝液に曝露することによりクロマトグラフィー樹脂を再生する工程を含むことができる。いくつかの例において、組換えタンパク質を含む液体は液体培養培地（例えば、灌流またはバッチ培養物から収集された液体培養培地）または希釈された液体培養培地（例えば、緩衝液中に希釈された培養培地）である。

40

【0097】

50

カラムクロマトグラフィーは、閉鎖され一体化されたシステム（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的な閉鎖され一体化されたシステムのいずれか）を用いて実行することができる。例えば、カラムクロマトグラフィーは、緩衝液が低減したバイオバーデンの緩衝液である閉鎖され一体化されたシステムを用いて実行することができる。当技術分野で周知のように、低減したバイオバーデンの緩衝液は様々な異なる方法を用いて生産することができる（例えば、ろ過、オートクレーブ処理、または加熱処理により製造される）。

【0098】

カラムクロマトグラフィーは2またはそれ以上（例えば、3もしくはそれ以上、4もしくはそれ以上、5もしくはそれ以上、6もしくはそれ以上、7もしくはそれ以上、8もしくはそれ以上、9もしくはそれ以上、10もしくはそれ以上、11もしくはそれ以上、12もしくはそれ以上、13もしくはそれ以上、14もしくはそれ以上、15もしくはそれ以上、20もしくはそれ以上、25もしくはそれ以上、30もしくはそれ以上、35もしくはそれ以上、40もしくはそれ以上、45もしくはそれ以上、50もしくはそれ以上、55もしくはそれ以上、60もしくはそれ以上、65もしくはそれ以上、70もしくはそれ以上、75もしくはそれ以上、80もしくはそれ以上、85もしくはそれ以上、90もしくはそれ以上、95もしくはそれ以上、または100もしくはそれ以上）のサイクルのクロマトグラフィーを含むことができる。いくつかの例において、カラムクロマトグラフィーは少なくとも3日（例えば、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、少なくとも10日、少なくとも11日、少なくとも12日、少なくとも13日、少なくとも14日、少なくとも15日、少なくとも16日、少なくとも17日、少なくとも18日、少なくとも19日、少なくとも20日、少なくとも21日、少なくとも22日、少なくとも23日、少なくとも24日、少なくとも25日、少なくとも30日、少なくとも35日、少なくとも40日、少なくとも45日、少なくとも50日、少なくとも55日、少なくとも60日、少なくとも65日、少なくとも75日、少なくとも80日、少なくとも85日、少なくとも90日、少なくとも95日、または少なくとも100日）の期間にわたって連続的に実行される。

【0099】

いくつかの実施形態において、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラム内のクロマトグラフィー樹脂は、ガンマ線照射で処理していない同じ樹脂と比較して（両方の樹脂の結合能力を試験するのに同じタンパク質を使用したとき）（例えば、ガンマ線照射への曝露の直後に評価する）、約75%～約100%（例えば、約76%～約98%、約76%～約96%、約76%～約94%、約76%～約92%、約76%～約90%、約78%～約100%、約78%～約98%、約78%～約96%、約78%～約94%、約78%～約92%、約78%～約90%、約80%～約100%、約80%～約98%、約80%～約96%、約80%～約94%、約80%～約92%、約80%～約90%、約82%～約100%、約82%～約98%、約82%～約96%、約82%～約94%、約82%～約92%、約82%～約90%、約84%～約100%、約84%～約98%、約84%～約96%、約84%～約94%、約84%～約92%、約84%～約90%、約86%～約100%、約86%～約98%、約86%～約96%、約86%～約94%、約86%～約92%、約88%～約100%、約88%～約98%、約88%～約96%、約88%～約94%、約90%～約100%、約90%～約98%、約90%～約96%、約92%～約100%、または約92%～約98%）の結合能力パーセントを有する。

【0100】

組換えタンパク質を製造するための一体化され、クローズドなまたは実質的にクローズドな、連続的な方法

本明細書に、精製された組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）を製造するための一体化され、クローズドなまたは実質的にクローズドな、連続的な方法が提供される。これらの方法は、実質的に細胞を含まない組換えタンパク質（例えば組換え治療

10

20

30

40

50

用タンパク質)を含有する液体培養培地を準備することを含む。

【0101】

いくつかの方法は、本明細書に提供される少なくとも1つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含むマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS)に液体培養培地を連続的に供給することを含み、ここでこれらの方法は低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化され、かつ液体培養培地から、精製された組換えタンパク質(例えば治療用タンパク質原薬)であるMCCSからの溶出液まで連続的に稼動する。

【0102】

いくつかの方法は、液体培養培地を第1のMCCS(MCCS1)に連続的に供給し、MCCS1を用いて液体培養培地から組換えタンパク質を捕獲し、組換えタンパク質を含むMCCS1からの溶出液を生成し、その溶出液を第2のMCCS(MCCS2)に連続的に供給し、溶出液からの組換えタンパク質をMCCS2に連続的に供給し、その後組換えタンパク質を溶出することにより、精製された組換えタンパク質を生産することを含み、ここでMCCS1および/またはMCCS2内の少なくとも1つのカラムは本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムであり、これらの方法は低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化され、かつ液体培養培地から、精製された組換えタンパク質まで連続的に稼動する。

【0103】

いくつかの例において、MCCS、MCCS1、および/またはMCCS2で使用されるクロマトグラフィーカラムは各々が本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムである。いくつかの実施形態は、精製された組換えタンパク質を医薬組成物に配合する工程をさらに含む。

【0104】

本明細書に記載の方法により、組換えタンパク質を含む液体培養培地からの精製された組換えタンパク質の連続的で時間効率の良い生産が提供される。例えば、治療用タンパク質を含む液体培養培地のMCCSまたはMCCS1への供給から、それぞれMCCSまたはMCCS2からの組換えタンパク質の溶出までの経過時間は、例えば、約4時間～約48時間(両端を含む)、例えば、約4時間～約40時間、約4時間～約35時間、約4時間～約30時間、約4時間～約28時間、約4時間～約26時間、約4時間～約24時間、約4時間～約22時間、約4時間～約20時間、約4時間～約18時間、約4時間～約16時間、約4時間～約14時間、約4時間～約12時間、約6時間～約12時間、約8時間～約12時間、約6時間～約20時間、約6時間～約18時間、約6時間～約14時間、約8時間～約16時間、約8時間～約14時間、約8時間～約12時間、約10時間～20時間、約10時間～18時間、約10時間～16時間、約10時間～14時間、約12時間～約14時間、約10時間～約40時間、約10時間～約35時間、約10時間～約30時間、約10時間～約25時間、約15時間～約40時間、約15時間～約35時間、約15時間～約30時間、約20時間～約40時間、約20時間～約35時間、または約20時間～約30時間(両端を含む)であることができる。他の例において、組換えタンパク質を含む液体培養培地のMCCSまたはMCCS1への供給から、それぞれMCCSまたはMCCS2からの組換えタンパク質の溶出までの経過時間は、例えば、約4時間超～約40時間未満(両端を含む)、例えば、約4時間超～約39時間未満、約38時間、約37時間、約36時間、約35時間、約34時間、約33時間、約32時間、約31時間、約30時間、約29時間、約28時間、約27時間、約26時間、約25時間、約24時間、約23時間、約22時間、約21時間、約20時間、約19時間、約18時間、約17時間、約16時間、約15時間、約14時間、約13時間、約12時間、約11時間、約10時間、約9時間、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、または約4.5時間(両端を含む)である。

【0105】

これらの方法のいずれかで使用することができるMCCS(MCCS、MCCS1、お

10

20

30

40

50

よび／またはMCCS2)の非限定的な局面は米国仮特許出願第61/775,060号および同第61/856,390号(各々参照によって本明細書に組み入れる)に記載されている。

【0106】

いくつかの代表的な方法は保持する工程を利用しない(例えば、方法全体でリザーバ(例えば、停留タンク(break tank))を使用しない)。他の方法においては、方法全体で最大1、2、3、4、または5個のリザーバ(例えば、停留タンク)が使用される。本明細書に記載の方法のいずれも方法全体で最大1、2、3、4、または5個のリザーバ(例えば、停留タンク)を利用することができ、ここで各々の停留タンクは、例えば、約5分～約6時間未満(両端を含む)、例えば、約5分～約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、または約30分(両端を含む)の全期間の間組換えタンパク質のみを保持する。

10

【0107】

いくつかの方法は1、2、3、4、5、または6個のリザーバ(例えば、停留タンク)を利用し、例えば、1mL～約300mL(両端を含む)、例えば、1mL～約280mL、約260mL、約240mL、約220mL、約200mL、約180mL、約160mL、約140mL、約120mL、約100mL、約80mL、約60mL、約40mL、約20mL、または約10mL(両端を含む)である容量を有することができる。MCCSまたはMCCS1に供給される前に流体を保持するために(本明細書に記載の方法のいずれかで)使用されるいずれのリザーバ(複数可)(例えば、停留タンク(複数可))も、例えば、MCCSの第1のカラムすなわちMCCS1の装填体積の1mL～約100%(両端を含む)、例えば、1mL～約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%(両端を含む)である容量を有することができる。MCCS1からの溶出液がMCCS2に入る前にその溶出液を保持するためにリザーバ(複数可)(例えば、停留タンク(複数可))を使用することができ、このリザーバは、例えば、MCCS2の第1のカラムの装填体積の1mL～約100%(両端を含む)、例えば、1mL～約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%(両端を含む)である容量を有することができる。

20

【0108】

これらの方法の様々なさらなる局面は以下に詳細に記載され、本明細書に提供される方法において制限されることなく任意の組合せで使用することができる。提供される方法の代表的な局面が以下に記載されているが、当業者には理解されるように、本明細書に記載の方法に追加の工程を加えることができ、他の材料を使用して本明細書に記載の方法のいずれかの工程を実行することができる。

30

【0109】

液体培養培地

実質的に細胞を含まない組換えタンパク質(例えば、組換え治療用タンパク質)を含む液体培養培地は任意の起源に由来することができる。例えば、液体培養培地は組換え細胞培養物(例えば、組換え細菌、酵母、または哺乳類細胞培養物)から得ることができる。液体培養培地は、流加式細胞(例えば、哺乳類細胞)培養物(例えば、組換えタンパク質を分泌する哺乳類細胞の培養物を含む流加式バイオリアクター)または灌流細胞(例えば、哺乳類細胞)培養物(例えば、組換えタンパク質を分泌する哺乳類細胞の培養物を含む灌流バイオリアクター)から得ることができる。液体培養培地はまた、組換えタンパク質を分泌する細菌または酵母細胞の培養物からの清澄化液体培養培地であることもできる。

40

【0110】

組換え細胞培養物から得た液体培養培地をろ過または清澄化して、細胞および／またはウィルスを実質的に含まない液体培養培地を得ることができる。細胞を除去するために液体培養培地をろ過または清澄化する方法は当技術分野で公知である(例えば、0.2- μ mのろ過およびAlternating Tangential Flow(ATFTM

50

）システムを用いるる過）。組換え細胞はまた、遠心分離を用い、実質的に細胞を含まない液体培養培地である上澄みを除去して液体培養培地から除去することもでき、または液体培養培地を含む容器（例えば、バイオリアクター）の重力方向の底部（*gravitational bottom*）に細胞を沈降させ、沈降した組換え細胞から遠い液体培養培地（実質的に細胞を含まない液体培養培地を除去することによっても液体培養培地から除去することができる）。

【0111】

液体培養培地は、本明細書に記載または当技術分野で公知の組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）のいずれかを産生する組換え細胞（例えば、組換え細菌、酵母、または哺乳類細胞）の培養物から得ることができる。本明細書に記載のいずれかの方法のいくつかの例は、組換えタンパク質（例えば、組換え治療用タンパク質）を産生する組換え細胞（例えば、組換え細菌、酵母、または哺乳類細胞）を培養する工程をさらに含むことができる。

10

【0112】

液体培養培地は本明細書に記載または当技術分野で公知のあらゆる種類の液体培養培地であることができる。例えば、液体培養培地は：動物由来の成分を含まない液体培養培地、血清を含まない液体培養培地、血清を含有する液体培養培地、既知組成の液体培養培地、およびタンパク質を含まない液体培養培地からなる群から選択することができる。本明細書に記載の方法のいずれにおいても、培養物から得られた液体培養培地は、MCCSまたはMCCS1に供給される前に第2の流体（例えば、緩衝液）の添加により希釈することができる。

20

【0113】

実質的に細胞を含まない組換えタンパク質を含む液体培養培地は、液体培養培地をMCCSまたはMCCS1に供給する前に（例えば、約15℃未満（例えば、約10℃未満、約4℃未満、約0℃未満、約-20℃未満、約-50℃未満、約-70℃未満、または約-80℃未満）の温度で）少なくとも1日（例えば、少なくとも約2日、少なくとも約5日、少なくとも約10日、少なくとも約15日、少なくとも約20日、または少なくとも約30日）貯蔵することができる。あるいは、いくつかの例において、液体培養培地はバイオリアクターから直接MCCSまたはMCCS1に供給される（例えば、ろ過または清澄化工程の後バイオリアクターから直接MCCSまたはMCCS1に供給される）。

30

【0114】

マルチカラムクロマトグラフィーシステム

本明細書に記載の方法は、MCCSまたは2つまたはそれ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つのまたは6つの）マルチカラムクロマトグラフィーシステム（MCCS）（例えば、MCCS1およびMCCS2）の使用を含む。MCCSは、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフィーカラム、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフィー膜、または少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムと少なくとも1つのクロマトグラフィー膜との組合せを含み得る。非限定的な例において、MCCS（例えば、本明細書の方法のいずれかにおけるMCCS、MCCS1および／またはMCCS2）は、4つのクロマトグラフィーカラム、3つのクロマトグラフィーカラムおよび1つのクロマトグラフィー膜、3つのクロマトグラフィーカラム、2つのクロマトグラフィーカラム、2つのクロマトグラフィー膜、ならびに、2つのクロマトグラフィーカラムおよび1つのクロマトグラフィー膜を含み得る。クロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜の組合せのさらなる例については、当業者ならば限定を伴うことなく、MCCS（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにおけるMCCS、MCCS1および／またはMCCS2）における使用のために想定することができる。MCCS内に存在する個々のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜は、同一であってもよいし（例えば、同じ形状、容積、樹脂、捕獲機構および単位操作を有していてもよいし）、または異なってもよい（例えば、異なる形状、容積、樹脂、捕獲機構および／または単位操作のうち1つまたはそれ以上を有していてもよい）。MCCS（例えば、本明細書に記載の方法の

40

50

いずれかにおけるMCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2)内に存在する個々のクロマトグラフィーカラム(複数可)および／またはクロマトグラフィー膜(複数可)は、同じ単位操作(例えば、捕獲する単位操作、精製する単位操作またはポリッシュする単位操作)を実行することもできるし、または異なる単位操作(例えば、例えば捕獲すること、精製すること、ポリッシュすること、ウイルスを不活性化すること、組換えタンパク質を含む流体のイオン濃度および／またはpHを調節すること、ならびにろ過することからできた群より選択される異なる単位操作)を実行することもできる。例えば、本明細書に記載の方法の例において、MCCSまたはMCCS 1内の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜は組換えタンパク質を捕獲するという単位操作を実行する。

10

【0115】

MCCS内に存在し得る(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2内に存在し得る)1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム(複数可)は、例えば、上下限も含めて約1mLから約2mLの間、約5mL、約10mL、約15mL、約20mL、約25mL、約30mL、約35mL、約40mL、約45mL、約50mL、約55mL、約60mL、約65mL、約70mL、約75mL、約80mL、約85mL、約90mL、約95mL、または約100mLの間の樹脂体積を有し得る。MCCS(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2内に存在し得る)内に存在し得る1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム(複数可)は、約2mLから約100mLの間、約2mLから約90mLの間、約2mLから約80mLの間、約2mLから約70mLの間、約2mLから約60mLの間、約2mLから約50mLの間、約5mLから約50mLの間、約2mLから約45mLの間、約5mLから約45mLの間、約2mLから約40mLの間、約5mLから約40mLの間、約2mLから約35mLの間、約5mLから約35mLの間、約2mLから約30mLの間、約5mLから約30mLの間、約2mLから約25mLの間、約5mLから約25mLの間、約15mLから約60mLの間、約10mLから約60mLの間、約10mLから約50mLの間、および約15mLから約50mLの間の樹脂体積を有し得る。本明細書に記載の方法のいずれかにおいて使用される、MCCS(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2)内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム(複数可)は、実質的に同じ樹脂体積を有していてもよいし、または相異なる樹脂体積を有していてもよい。MCCS(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2)内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム(複数可)のために使用される流量は、例えば約0.2mL/分から約25mL/分の間(例えば、約0.2mL/分から約20mL/分の間、約0.5mL/分から約20mL/分の間、約0.2mL/分から約15mL/分の間、約0.5mL/分から約15mL/分の間、約0.5mL/分から約10mL/分の間、約0.5mL/分から約14mL/分の間、約1.0mL/分から約25.0mL/分の間、または約1.0mL/分から約15.0mL/分の間)であってよい。

20

30

【0116】

MCCS内(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2内)の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム(複数可)は、実質的に同じ形状を有していてもよいし、または実質的に異なる形状を有していてもよい。例えば、MCCS内(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2内)の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム(複数可)は、円形シリンダー状になった実質的に同じ形状を有していてもよいし、または、長円形シリンダー状になった実質的に同じ形状を有していてもよい。

40

【0117】

MCCS内に存在し得る(例えば、MCCS、MCCS 1および／またはMCCS 2内に存在し得る)1つまたはそれ以上のクロマトグラフィー膜(複数可)は、例えば約1mLから約500mLの間(例えば、約1mLから約475mLの間、約1mL～約450mL、約1mL～約425mL、約1mL～約400mL、約1mL～約375mL、約1mL～約350mL、約1mL～約325mL、約1mL～約300mL、約1mL～

50

約 275 mL、約 1 mL～約 250 mL、約 1 mL～約 225 mL、約 1 mL～約 200 mL、約 1 mL～約 175 mL、約 1 mL～約 150 mL、約 1 mL～約 125 mL、約 1 mL～約 100 mL、約 2 mL～約 100 mL、約 5 mL～約 100 mL、約 1 mL～約 80 mL、約 2 mL～約 80 mL、約 5 mL～約 80 mL、約 1 mL～約 60 mL、約 2 mL～約 60 mL、約 5 mL～約 60 mL、約 1 mL～約 40 mL、約 2 mL～約 40 mL、約 5 mL～約 40 mL、約 1 mL～約 30 mL、約 2 mL～約 30 mL、約 5 mL～約 30 mL、約 1 mL から約 25 mL の間、約 2 mL から約 25 mL の間、約 1 mL から約 20 mL の間、約 2 mL から約 20 mL の間、約 1 mL から約 15 mL の間、約 2 mL から約 15 mL の間、約 1 mL から約 10 mL の間、または約 2 mL から約 10 mL の間) のベッドボリュームを有し得る。

10

【0118】

1つまたはそれ以上の（例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24）異なる種類の低減したバイオバーデンの緩衝液が、本明細書に記載の方法のいずれかにおけるMCCS、MCCS1および／またはMCCS2の使用中に用いられ得る。当技術分野で公知のように、本明細書に記載の方法でMCCS、MCCS1、および／またはMCCS2に使用される低減したバイオバーデンの緩衝液の1つまたはそれ以上の種類は、MCCS、MCCS1、および／またはMCCS2のクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）に存在する樹脂、組換えタンパク質の生物物理学的な性質、ならびにMCCS、MCCS1、および／またはMCCS2の特定のクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜により実行される単位操作（例えば、本明細書に記載の代表的な単位操作のいずれか）に依存する。本明細書に記載の方法のいずれかにおけるMCCS、MCCS1および／またはMCCS2の使用中に用いられるバッファの体積および種類は、当業者によって決定することもできる（例えば、以下でより詳細に論述している）。例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにおけるMCCS、MCCS1および／またはMCCS2の使用中に用いられるバッファの体積および種類（複数可）は、精製された組換えタンパク質（例えば、組換えタンパク質薬物生成物）における次のもののうち1つまたはそれ以上を最適化するために選択することができる：組換えタンパク質の総合的収率、組換えタンパク質の活性、組換えタンパク質の純度の水準、および、組換えタンパク質を含む流体（例えば、液体培養培地）からの生物型夾雑物の除去（例えば、活性ウイルス、マイコバクテリア、酵母、細菌または哺乳類細胞の非存在）。

20

30

【0119】

MCCS、MCCS1および／またはMCCS2は、定期的向流クロマトグラフィーシステム（PCCS）であってよい。PCCSは例えば、2つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムからの組換えタンパク質の連続的な溶出を可能にするために切り替えられる、2つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム（例えば、3つのカラムまたは4つのカラム）を含み得る。PCCSは、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを含み得、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフィー膜を含み得、または少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび少なくとも1つのクロマトグラフィー膜を含み得る。カラム動作（サイクル）は一般に、装填工程、洗浄工程、溶出工程および再生工程からなる。PCCSにおいては、サイクル方式にして同じ工程を別々に連続的に稼働させるために、複数のカラムが使用される。カラムが直列で動作するため、1つのカラムから出てくる通過画分および洗浄剤は、別のカラムによって捕捉される。こうしたPCCSに特有の特色は、バッチモード時のクロマトグラフィー中に典型的であるのと同様に、動的結合能力ではなく静的結合能力に近くなった樹脂のローディングを可能にする。連続的なサイクル運転および溶出の結果として、PCCSに入り込む流体が連続的に処理され、組換えタンパク質を含む溶出液が連続的に製造される。

40

【0120】

PCCSサイクルで1つの工程から別の工程に進むためにカラム切り替え方策が使用さ

50

れる。PCCSで使用することができるカラム切り替えの例は米国仮特許出願第61/775,060号および同第61/856,390号に記載されている。例えば、カラム切り替え方法はカラム毎に2つの自動化された切り替え操作を使用することができる：その第1は最初の生成物の破過に関連し、第2はカラム飽和に対応する。カラム切り替え操作をいつ発生させるべきかという決定は、PCCS内に存在する各クロマトグラフィーカラムから出てくる溶出液中の組換えタンパク質濃度を監視すること（例えば、UV監視によって実行される監視）によって決定することができる。例えば、カラム切り替えは、フィードバック制御を用いた組換えタンパク質濃度のインライン測定が可能な任意のPATツールにより、決定することができる。PATツールは、フィードバック制御を用いた組換えタンパク質濃度の実時間インライン測定が可能である。当技術分野で公知になっているのと同様に、カラム転換は、MCCS、MCCS1および／またはMCCS2内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜を流体（例えば、バッファー）が通過する時間または通過する量に基づいて設計することもできる。

10

【0121】

PCCSにおいて、PCCS内に存在する各クロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜上における組換えタンパク質の滞留時間（RT）は、第1のカラム／膜からの破過がPCCS内の別のカラム／膜によって捕捉され得るため、カラム／膜のサイズ増大を伴うことなく短縮され得る。連続的な方法によるシステムは、式： $V = D * RT$ を用いてカラム／膜容積（V）およびRTを変化させることにより、任意の滯留速度（D）で液体培養培地を処理するように設計され得る。

20

【0122】

本記載の方法において使用されるMCCSまたはMCC1および／もしくはMCCS2によって実行され得る1つまたはそれ以上の単位操作には例えば、捕組換えタンパク質を捕獲すること、組換えタンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化すること、組換えタンパク質を精製すること、組換えタンパク質をポリッシュすること、（例えば、本明細書に記載の例示的な任意の停留タンク（複数可）を用いて）組換えタンパク質を含む流体を保持すること、組換えタンパク質を含む流体から出てくる粒子状材料および／または細胞をろ過または除去すること、ならびに、組換えタンパク質を含む流体のイオン濃度および／またはpHを調節することが挙げられる。

30

【0123】

いくつかの実施形態において、MCCSまたはMCCS1は組換えタンパク質を捕獲するという単位操作を実行する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜を含む。捕獲する単位操作は、例えば捕獲機構を利用する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー樹脂を用いて、実行することができる。捕獲機構の非限定的な例には、タンパク質A結合式捕獲機構、抗体結合式または抗体フラグメント結合式捕獲機構、基質結合式捕獲機構、アプタマー結合式捕獲機構、タグ結合式捕獲機構（例えば、ポリHisタグに基づいた捕獲機構）および補因子結合式捕獲機構が挙げられる。捕獲はまた、カチオン交換もしくはアニオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、または疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行するのに使用することができる樹脂を用いて実行することもできる。組換えタンパク質を捕捉するために使用され得る非限定的な樹脂は、本明細書に記載されている。組換えタンパク質を捕捉するために使用され得る樹脂のさらなる例は、当技術分野で公知である。

40

【0124】

組換えタンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化する単位操作は、（例えば、少なくとも30分の期間（例えば、約30分から1.5時間の間の期間、約30分から1.25時間の間の期間、約0.75時間から1.25時間の間の期間、または約1時間の期間）にわたって約3.0から5.0の間（例えば、約3.5から約4.5の間、約3.5から約4.25の間、約3.5から約4.0の間、約3.5から約3.8の間、ま

50

たは約 3.75) の pH で組換えタンパク質を含む流体をインキュベートすることができる、例えばクロマトグラフィーカラム、クロマトグラフィー膜または保持タンクを含む) M C C S、M C C S 1 および / または M C C S 2 を用いて、実行することができる。

【0125】

組換えタンパク質を精製する単位操作は、例えば捕捉システムを利用する樹脂を含んでいる例えばクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を含む、1 つまたはそれ以上の M C C S (例えば、M C C S、M C C S 1 および / または M C C S 2) を用いて、実行することができる。捕獲機構の非限定的な例には、タンパク質 A 結合式捕獲機構、抗体結合式または抗体フラグメント結合式捕獲機構、基質結合式捕獲機構、アプタマー結合式捕獲機構、タグ結合式捕獲機構 (例えば、ポリ His タグに基づいた捕獲機構) および補因子結合式捕獲機構が挙げられる。精製することは、カチオン交換もしくはアニオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行するために使用され得る樹脂を用いて、実行することもできる。組換えタンパク質を精製するために使用され得る非限定的な樹脂は、本明細書に記載されている。組換えタンパク質を精製するために使用され得る樹脂のさらなる例は、当技術分野で公知である。

【0126】

組換えタンパク質をポリッシュする単位操作は、例えばカチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行するために使用され得る樹脂を含んでいる、例えばクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を含む、1 つまたはそれ以上の M C C S (例えば、M C C S、M C C S 1 および / または M C C S 2) を用いて、実行することができる。組換えタンパク質をポリッシュするために使用され得る非限定的な樹脂は、本明細書に記載されている。組換えタンパク質をポリッシュするために使用され得る樹脂のさらなる例は、当技術分野で公知である。

【0127】

組換えタンパク質を含む流体を保持する単位操作は、少なくとも 1 つのリザーバ (例えば、停留タンク) を含む、または M C C S もしくは M C C S 1 および M C C S 2 とを合算して最大で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つのリザーバ (複数可) (例えば、停留タンク (複数可)) を含む、M C C S (例えば、M C C S、M C C S 1 および / または M C C S 2) を用いて、実行することができる。例えば、上記保持する単位操作を達成するために使用され得るリザーバ (複数可) (例えば、停留タンク (複数可)) はそれぞれ、約 1 mL から約 1 L の間 (例えば、約 1 mL から約 800 mL の間、約 1 mL から約 600 mL の間、約 1 mL から約 500 mL の間、約 1 mL から約 400 mL の間、約 1 mL から約 350 mL の間、約 1 mL から約 300 mL の間、約 10 mL から約 250 mL の間、約 10 mL から約 200 mL の間、約 10 mL から約 150 mL の間または約 10 mL から約 100 mL の間) の体積を有し得る。本明細書に記載の方法において使用されるリザーバ (複数可) (例えば、停留タンク (複数可)) は、例えば上下限も含めて 1 mL から約 300 mL の間、例えば、上下限も含めて 1 mL から約 280 mL、約 260 mL、約 240 mL、約 220 mL、約 200 mL、約 180 mL、約 160 mL、約 140 mL、約 120 mL、約 100 mL、約 80 mL、約 60 mL、約 40 mL、約 20 mL または約 10 mL の間である、容量を有し得る。流体が M C C S または M C C S 1 に進入するまで流体を保持しておくために (本明細書に記載の方法のいずれかにおいて) 使用される、任意のリザーバ (複数可) (例えば、停留タンク (複数可)) は、例えば上下限も含めて 1 mL から第 1 の M C C S の第 1 のカラムの負荷量の約 100 % の間、上下限も含めて約 1 mL から M C C S または M C C S 1 の第 1 のカラムの負荷量の約 90 %、約 80 %、約 70 %、約 60 %、約 50 %、約 40 %、約 30 %、約 20 %、約 10 % または約 5 % の間である、容量を有し得る。溶出液が M C C S 2 に入る前に (組換えタンパク質を含む) M C C S 1 からの溶出液を保持するのに使用されるリザーバ (複数可) (例えば、停留タンク (複数可)) のいずれも、例えば、M C C S 2 の第 1 のカラムの装填体積の 1 mL

10

20

30

40

50

～約100%（両端を含む）、例えば、約1mL～約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%（両端を含む）の容量を有することができる。

【0128】

リザーバ（複数可）（例えば、停留タンク（複数可））はそれぞれ、少なくとも10分（例えば、少なくとも20分、少なくとも30分、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも4時間または少なくとも6時間）にわたって、組換えタンパク質を含む流体を保持することができる。他の例において、リザーバ（複数可）（例えば、停留タンク（複数可））は、例えば上下限も含めて約5分から約6時間未満の間、例えば上下限も含めて約5分から約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間または約30分の間という合計時間での期間にわたって、組換えタンパク質のみを保持する。リザーバ（複数可）（例えば、停留タンク（複数可））は、組換えタンパク質を含む流体の保持と（例えば、25℃未満、15℃未満または10℃未満の温度における）冷蔵の両方を実行するために使用され得る。リザーバは、円形シリンダー、長円形シリンダー、または、ほぼ長方形で密封済みの不透過性袋を含めて、任意の形状を有し得る。

【0129】

組換えタンパク質を含む流体をろ過する単位操作は、例えばフィルターを含むまたは分子ふるい樹脂を含んでいるクロマトグラフィーカラムもしくはクロマトグラフィー膜を含む、MCCS（例えば、MCCS、MCCS1および／またはMCCS2）を用いて、実行することができる。当技術分野で公知であるとおりの、沈殿した任意の材料および／または細胞（例えば、沈殿した折り畳まれていないタンパク質；沈殿した望ましくない宿主細胞タンパク質；沈殿した脂質；細菌；酵母細胞；真菌細胞；マイコバクテリア；および／または哺乳類細胞）を除去することができる、多種多様なサブミクロンフィルター（例えば、1μm未満、0.5μm未満、0.3μm未満、約0.2μm、0.2μm未満、100nm未満、80nm未満、60nm未満、40nm未満、20nm未満または10nm未満の細孔径を有するフィルター）が、当技術分野で入手可能である。約0.2μmまたは0.2μm未満の細孔径を有するフィルターは、組換えタンパク質を含む流体から細菌を効果的に除去することが知られている。当技術分野で公知であるとおりの、分子ふるい樹脂を含んでいるクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜もまた、組換えタンパク質を含む流体をろ過する単位操作を実行するために、MCCS（例えば、MCCS、MCCS1および／またはMCCS2）内に使用することができる。

【0130】

組換えタンパク質を含む流体のイオン濃度および／またはpHを調節する単位操作は、バッファー調節リザーバ（例えば、インラインバッファー調節リザーバ）を含んでいて利用する、MCCS（例えば、MCCS、MCCS1および／またはMCCS2）を用いて、実行することができる。このバッファー調節リザーバは、（例えば、MCCS、MCCS1および／もしくはMCCS2内部にあるカラムどうしの間、または、終わってから二番目のMCCS（例えば、MCCS1）内にある最後のカラムの後から、組換えタンパク質を含む流体が次のMCCS（例えば、MCCS2）の第1のカラムに送り込まれる前までの間に）組換えタンパク質を含む流体中に新たなバッファー溶液を添加する。当技術分野で理解され得るのと同様に、インラインバッファー調節リザーバは、任意のサイズ（例えば、100mL超）であってよく、任意の緩衝液（例えば、次のもののうち1つまたはそれ以上を有する緩衝液：組換えタンパク質を含む流体に比較して増大もしくは減少するpH、組換えタンパク質を含む流体に比較して増大もしくは減少するイオン（例えば、塩）濃度、および／または、MCCS（例えば、MCCS、MCCS1および／またはMCCS2）内の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムもしくは少なくとも1つのクロマトグラフィー膜中に存在する樹脂への結合において組換えタンパク質と競合して濃度が増大もしくは減少する作用物質）を収容し得る。

【0131】

MCCS、MCCS1および／またはMCCS2は、2つまたはそれ以上の単位操作を

実行することができる。例えば、MCCS、MCCS1および／またはMCCS2はそれぞれ、少なくとも次の単位操作を実行することができる：組換えタンパク質を捕獲すること、および組換えタンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化すること；組換えタンパク質を捕獲すること、組換えタンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化すること、ならびに組換えタンパク質を含む液体のイオン濃度および／またはpHを調節すること；組換えタンパク質を精製すること、および組換えタンパク質をポリッシュすること；組換えタンパク質を精製すること、組換えタンパク質をポリッシュすること、ならびに、組換えタンパク質を含む流体をろ過することまたは組換えタンパク質を含む流体から沈殿物および／もしくは特定の物質を除去すること；ならびに、組換えタンパク質を精製すること、組換えタンパク質をポリッシュすること、組換えタンパク質を含む流体をろ過することまたは組換えタンパク質を含む流体から沈殿物および／もしくは特定の微粒子状物質を除去すること、ならびに組換えタンパク質を含む液体のイオン濃度および／またはpHを調節すること。

10

【0132】

組換えタンパク質を捕獲する

本方法は、MCCSまたはMCCS1を用いて組換えタンパク質を捕獲する工程を含む。当技術分野において認識することができるように、組換えタンパク質を含む液体培養培地は、種々の異なる手段を用いてMCCSまたはMCCS1上に連続的に供給することができる。例えば、液体培養培地はMCCSまたはMCCS1中に能動的にポンプで送ることができ、または液体培養培地は重力を用いてMCCSまたはMCCS1中に供給することができる。液体培養培地はMCCSまたはMCCS1中に供給する前にリザーバ（例えば、保持タンク）に貯蔵することができ、または、液体培養培地は細胞（例えば、組換えタンパク質を培地中に分泌する哺乳類細胞）の培養物を含むバイオリアクターからMCCSまたはMCCS1中に能動的にポンプで送ることができる。

20

【0133】

液体培養培地は約0.2mL/分～約25mL/分（例えば、約0.2mL/分～約20mL/分、約0.5mL/分～約20mL/分、約0.2mL/分～約15mL/分、約0.5mL/分～約15mL/分、約0.5mL/分～約10mL/分、約0.5mL/分～約14mL/分、約1.0mL/分から約25.0mL/分の間、約1.0mL/分から約15.0mL/分の間）の流量でMCCSまたはMCCS1中に供給する（装填する）ことができる。組換えタンパク質を含む液体培養培地は本明細書に記載のまたは当技術分野で公知の典型的な出所のいずれかに由来することができる。

30

【0134】

いくつかの例は、さらに、液体培養培地をMCCSまたはMCCS1中に供給する前にろ過する任意選択の工程を含む。本明細書に記載の組換えタンパク質を含む液体培養培地もしくは流体をろ過する典型的な手段のいずれか、または当技術分野で公知の任意のろ過手段を、組換えタンパク質を含む液体培養培地をMCCSまたはMCCS1中に供給する前にろ過するために使用することができる。

【0135】

本明細書に記載の方法において、組換えタンパク質の液体培養培地からの捕獲はMCCSまたはMCCS1を用いて実行される。当技術分野において認識することができるように、組換えタンパク質の捕獲を達成するためには、MCCSまたはMCCS1の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたは少なくとも1つのクロマトグラフィー膜が、捕獲機構（例えば、本明細書に記載の典型的な捕獲機構のいずれか）を利用する樹脂を含むか、またはカチオン交換、アニオン交換、もしくは分子ふるいクロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行することができる樹脂を含まなければならない。例えば、組換えタンパク質が抗体または抗体フラグメントであれば、捕獲システムはプロテインA-結合捕獲機構または抗原-結合捕獲機構（この場合捕獲抗原は組換え抗体または抗体フラグメントにより特異的に認識される）であることができる。組換えタンパク質が酵素であれば、捕獲機構は、組換え酵素を捕獲するために酵素に特異的に結合する抗

40

50

体もしくは抗体フラグメントを、組換え酵素を捕獲するために酵素の基質を、組換え酵素を捕獲するために酵素の補因子を、または、組換え酵素がタグを含む場合、組換え酵素内に存在するタグに特異的に結合するタンパク質、金属キレート、もしくは抗体（もしくは抗体フラグメント）を使用することができる。組換えタンパク質を捕獲するために使用することができる非限定的な樹脂は本明細書に記載されており、組換えタンパク質を捕獲するのに使用することができる追加の樹脂は当技術分野で公知である。プロテインA-結合捕獲機構を利用する樹脂の1つの非限定的な例はMab Select SuRe（商標）樹脂（GE Healthcare, Piscataway, NJ）、JSR Life Sciences Amsphere ProA JWT203（Sunnyvale, CA）、およびKaneka KanCap A（Osaka, Japan）である。

10

【0136】

組換えタンパク質を捕獲するために使用することができるMCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の典型的な非限定的な大きさおよび形状は本明細書中に記載されている。MCCSまたはMCCS1中に供給される（装填される）液体培養培地は、例えば、約0.05mg/mL～約100mg/mLの組換えタンパク質（例えば、約0.1mg/mL～約90mg/mL、約0.1mg/mL～約80mg/mL、約0.1mg/mL～約70mg/mL、約0.1mg/mL～約60mg/mL、約0.1mg/mL～約50mg/mL、約0.1mg/mL～約40mg/mL、約0.1mg/mL～約30mg/mL、約0.1mg/mL～約20mg/mL、約0.5mg/mL～約20mg/mL、約0.1mg/mL～15mg/mL、約0.5mg/mL～約15mg/mL、約0.1mg/mL～約10mg/mL、または約0.5mg/mL～約10mg/mLの組換えタンパク質）を含むことができる。捕獲する単位操作を実行するために使用される樹脂に組換えタンパク質が結合するのに必要とされる平均時間は、例えば、約5秒～約10分（例えば、約10秒～約8分、約10秒～約7分、約10秒～約6分、約10秒～約5分、約30秒～約5分、約1分～約5分、約10秒～約4分、約30秒～約4分、または約1分～約4分）であることができる。

20

【0137】

当技術分野において認識することができるように、MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を用いて組換えタンパク質を捕獲するためには、MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を装填し、洗浄し、溶離し、再生するという連続したクロマトグラフィー工程を実行しなければならない。本明細書に記載の連続したクロマトグラフィー工程の各々に割り当てられる典型的な流量、バッファー容積、および／または時間の長さのいずれかを、これらの異なる連続したクロマトグラフィー工程の1つまたはそれ以上（例えば、組換えタンパク質を捕獲するのに使用されるMCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を装填し、洗浄し、溶離し、再生するという連続したクロマトグラフィー工程の1つまたはそれ以上）で 사용할ことができる。MCCSまたはMCCS1（例えば、PCCSまたはPCCS1）でクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜を捕獲するのに使用することができる各々の連続したクロマトグラフィー工程に割り当てられる非限定的な流量、バッファー容積、および／または時間の長さは以下に提供される。加えて、MCCSおよび／またはMCCS1に使用することができる典型的なバッファーは以下に記載される。

30

40

【0138】

捕獲する単位操作を実行することができる樹脂（例えば、本明細書に記載の捕獲するのに使用することができる典型的な樹脂のいずれか）を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜を含むMCCSまたはMCCS1は、上に記載した装填流量（供給速度）のいずれかを用いて、組換えタンパク質を含む液体培養培地を装填することができる。いくつかの例において、捕獲する単位操作を実行するこ

50

とができる樹脂を含有する単一のクロマトグラフィーカラムまたは単一のクロマトグラフィー膜が、例えば、約10分～約90分（例えば、約15分から約90分の間、約20分から約80分の間、約30分から約80分の間、約40分から約80分の間、約50分から約80分の間、および約60分から約80分の間）で装填される。MCCSまたはMCCS1が、捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含む少なくとも2つのクロマトグラフィーカラムを直列に含むいくつかの例において、2つのクロマトグラフィーカラムを連続して装填するのに必要とされる時間は、例えば、約50分～約180分（例えば、約60分から約180分の間、約70分から約180分の間、約80分から約180分の間、約90分から約180分の間、約100分から約180分の間、約110分から150分の間、および約125分から約145分の間）である。

10

【0139】

捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含むMCCSまたはMCCS1内の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上への組換えタンパク質の装填の後、その少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を少なくとも1種の洗浄用バッファーで洗浄する。当技術分野において認識することができるように、少なくとも1種（例えば、2、3、または4種）の洗浄用バッファーとは、組換えタンパク質ではない全てのまたは大部分のタンパク質を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から溶出する一方で、組換えタンパク質と樹脂との相互作用を乱さないことを意味する。

【0140】

洗浄バッファーは、約0.2 mL/分～約25 mL/分（例えば、約0.2 mL/分～約20 mL/分、約0.5 mL/分～約20 mL/分、約0.2 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約10 mL/分、約0.5 mL/分～約14 mL/分、約1.0 mL/分～約25.0 mL/分、約1.0 mL/分～約15.0 mL/分）の流量で少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を通過させることができる。使用される洗浄バッファーの容積（例えば、1より多くの洗浄バッファーを使用するときの洗浄バッファーの合計総容積）は、例えば、約1XCカラム容積(CV)～約15XC CV（例えば、約1XC CV～約14XC CV、約1XC CV～約13XC CV、約1XC CV～約12XC CV、約1XC CV～約11XC CV、約2XC CV～約11XC CV、約3XC CV～約11XC CV、約4XC CV～約11XC CV、約5XC CV～約11XC CV、または約5XC CV～約10XC CV）であることができる。洗浄の合計時間は、例えば、約2分～約3時間（例えば、約2分～約2.5時間、約2分～約2.0時間、約5分～約1.5時間、約10分～約1.5時間、約10分～約1.25時間、約20分～約1.25時間、または約30分～約1時間）であることができる。

20

30

【0141】

捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含むMCCSまたはMCCS1内の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の洗浄の後、捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含むMCCSまたはMCCS1内の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に溶出バッファーを通すことによって、組換えタンパク質を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から溶離する。溶出バッファーは、捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を、約0.2 mL/分～約25 mL/分（例えば、約0.2 mL/分～約20 mL/分、約0.5 mL/分～約20 mL/分、約0.2 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約10 mL/分、約0.5 mL/分から約6.0 mL/分の間、約1.0 mL/分から約5.0 mL/分の間、約0.5 mL/分から約14 mL/分の間、約1.0 mL/分から約25.0 mL/分の間、約1.0 mL/分から約15.0 mL/分の間）の流量で通過することができる。精製する単位操作を実行することができる樹脂を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の各々から組換えタンパク質を溶離するために使用される溶出バッファ

40

50

一の容積は、例えば、約1 X カラム容積 (CV) ~ 約15 X CV (例えば、約1 X CV ~ 約14 X CV、約1 X CV ~ 約13 X CV、約1 X CV ~ 約12 X CV、約1 X CV ~ 約11 X CV、約2 X CV ~ 約11 X CV、約3 X CV ~ 約11 X CV、約4 X CV ~ 約11 X CV、約5 X CV ~ 約11 X CV、または約5 X CV ~ 約10 X CV) であることができる。溶離する合計時間は、例えば、約2分~約3時間 (例えば、約2分~約2.5時間、約2分~約2.0時間、約2分~約1.5時間、約2分~約1.5時間、約2分~約1.25時間、約2分~約1.25時間、約2分~約1時間、約2分から約40分の間、約10分から約40分の間、または約20分から約40分の間) であることができる。これらの方法で 사용할 ことができる溶出バッファの非限定的な例は捕獲機構および/または組換えタンパク質に依存する。例えば、溶出バッファは、異なる濃度の塩 (例えば、増大した塩濃度)、異なる pH (例えば、増大または低減した塩濃度)、または捕獲する単位操作を実行することができる樹脂に対する結合に関して組換えタンパク質と競合する分子を含むことができる。本明細書に記載の各々の典型的な捕獲機構に対するかかる溶出バッファの例は当技術分野で周知である。

【0142】

捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含むMCCSまたはMCCS1内の少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から組換えタンパク質を溶離した後、次の容積の液体培養培地を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に装填することができる前に、その少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を、再生バッファを用いて平衡化しなければならない。再生バッファは、捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を、例えば、約0.2 mL/分~約25 mL/分 (例えば、約0.2 mL/分~約20 mL/分、約0.5 mL/分~約20 mL/分、約0.2 mL/分~約15 mL/分、約0.5 mL/分~約15 mL/分、約0.5 mL/分~約10 mL/分、約0.5 mL/分から約6.0 mL/分の間、約1.0 mL/分から約5.0 mL/分の間、約0.5 mL/分から約14 mL/分の間、約1.0 mL/分から約25.0 mL/分の間、約5.0 mL/分から約15.0 mL/分の間、または約1.0 mL/分から約15.0 mL/分の間) の流量で通すことができる。捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を平衡化するために使用される再生バッファの容積は、例えば、約1 X カラム容積 (CV) ~ 約15 X CV (例えば、約1 X CV ~ 約14 X CV、約1 X CV ~ 約13 X CV、約1 X CV ~ 約12 X CV、約1 X CV ~ 約11 X CV、約2 X CV ~ 約11 X CV、約3 X CV ~ 約11 X CV、約2 X CV ~ 約5 X CV、約4 X CV ~ 約11 X CV、約5 X CV ~ 約11 X CV、または約5 X CV ~ 約10 X CV) であることができる。

【0143】

本明細書に記載の方法のいくつかで、MCCSまたはMCCS1は、組換えタンパク質を含む流体を、低い pH (例えば、pH 4.6未満、4.4未満、4.2未満、4.0未満、3.8未満、3.6未満、3.4未満、3.2未満、または3.0未満) に、例えば、約1分~1.5時間 (例えば、約1時間) 保持し、組換えタンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活化するリザーバを含んでいる。ウイルスを不活化する単位操作を実行するために使用することができるリザーバの一例は、例えば、組換えタンパク質を含む流体をMCCS2中に供給する前に、その組換えタンパク質を含む流体を例えば約1分~1.5時間保持することができる攪拌フラスコ (stir flask) (例えば、500 mL攪拌フラスコ、例えば、プログラムされた攪拌プレート (programmed stir plate) 付きの500 mL攪拌フラスコ) である。ウイルスの不活化の単位操作を実行するために使用されるリザーバは、プログラムされた攪拌プレート (例えば、リザーバ内で流体を、例えば4時間毎に混合する (例えば、定期的に混合する) ようにプログラムされた攪拌プレート) 付きの500 mL攪拌フラスコであることができる。ウイルスの不活化の単位操作を実行するために使用することができるリザーバのもう

1つ別の例は、例えば、組換えタンパク質を含む流体をMCCS2中に供給する前に、その組換えタンパク質を含む流体を例えば約1分～1.5時間保持することができるプラスチックバッグ（例えば、500mLプラスチックバッグ）である。いくつかの例において、組換えタンパク質を含む流体は、ウイルスの不活化の単位操作を実行するために使用されるリザーバ中に供給されるとき、既に低いpH（例えば、pH4.6未満、4.4未満、4.2未満、4.0未満、3.8未満、3.6未満、3.4未満、3.2未満、または3.0未満）を有していることができる。当業者には認識することができるように、ウイルスを不活化する単位操作を実行するために様々な他の手段を使用することができる。例えば、組換えタンパク質を含む流体のUV照射も、ウイルスを不活化する単位操作を実行するために使用することができる。組換えタンパク質を含む流体中に存在するウイルスの不活化の単位操作を実行するために使用することができるリザーバの非限定的な例が本明細書中に記載されている。

10

【0144】

MCCSまたはMCCS1は4つのクロマトグラフィーカラムを含むPCCSを含むことができ、ここで4つのクロマトグラフィーカラムのうちの少なくとも3つは（例えば、捕獲する単位操作を実行することができる樹脂を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムのいずれか（例えば、本明細書に記載されているもののいずれか））を含むMCCSを用いて、組換えタンパク質を液体培養培地から捕獲する単位操作を実行する。これらの例において、PCCの第4のカラムは、組換えタンパク質を含む流体中のウイルスを不活化する単位操作を実行することができる（例えば、組換えタンパク質を含む流体のウイルスの不活化を達成するために使用することができる本明細書中に記載の典型的なカラムのいずれか）。

20

【0145】

いくつかの例において、組換えタンパク質を含む流体がMCCS1（例えば、PCCS1）から連続的に溶出され、MCCS2（例えば、PCCS2）に連続的に供給される。MCCSまたはMCCS1（例えば、PCCSまたはPCCS1）の溶出液中に回収される組換えタンパク質の割合（％）は、例えば、少なくとも70％、少なくとも72％、少なくとも74％、少なくとも76％、少なくとも78％、少なくとも80％、少なくとも82％、少なくとも84％、少なくとも86％、少なくとも88％、少なくとも90％、少なくとも92％、少なくとも94％、少なくとも96％、または少なくとも98％であることができる。MCCS1（例えば、PCCS1）からの溶出液は当技術分野で公知の種々の手段（例えば、配管）を用いてMCCS2（例えば、PCCS2）中に供給することができる。MCCS1（例えば、PCCS1）の溶出液は、例えば、約0.2mL/分～約25mL/分（例えば、約0.2mL/分～約20mL/分、約0.5mL/分～約20mL/分、約0.2mL/分～約15mL/分、約0.5mL/分～約15mL/分、約0.5mL/分～約10mL/分、約0.5mL/分から約6.0mL/分の間、約1.0mL/分から約5.0mL/分の間、約0.5mL/分から約14mL/分の間、約1.0mL/分から約25.0mL/分の間、約5.0mL/分～約15.0mL/分、約15mL/分～約25mL/分、または約1.0mL/分から約15.0mL/分の間）の流量でMCCS2（例えば、PCCS2）中に供給することができる。

30

40

【0146】

本明細書に記載のいくつかの方法は、さらに、MCCS1（例えば、PCCS1）からの溶出液のイオン濃度および/またはpHを、その溶出液がMCCS2（例えば、PCCS2）中に供給される前に調節する工程を含むことができる。本明細書に記載されているように、MCCS1（例えば、PCCS1）からの溶出液のイオン濃度および/またはpHは、（その溶出液がMCCS2中に供給される前に）その溶出液に（例えば、インラインバッファー調節リザーバを使用することにより）バッファーを添加することによって調節することができる。このバッファーは、例えば、約0.1mL/分～約15mL/分（例えば、約0.1mL/分～約12.5mL/分、約0.1mL/分～約10.0mL/分、約0.1mL/分～約8.0mL/分、約0.1mL/分～約6mL/分、約0.1

50

m L / 分 ~ 約 4 m L / 分、または約 0.5 m L / 分 ~ 約 5 m L / 分) の流量で M C C S 1 からの溶出液に添加することができる。

【0147】

本明細書に記載の方法は、さらに、M C C S 1 からの溶出液を M C C S 2 中に供給する前にその M C C S 1 からの溶出液を保持または貯蔵する（かつ場合により冷蔵する）工程を含むことができる。本明細書に記載されているように、この保持または貯蔵する工程は本明細書に記載のリザーバのいずれか（例えば、バックアップタンク）を用いて実行することができる。

【0148】

本明細書に記載の方法はまた、M C C S 1 からの溶出液を M C C S 2 中に供給する前にその溶出液をろ過する工程も含むことができる。本明細書に記載のろ過方法または典型的なフィルターのいずれも M C C S 1 からの溶出液を M C C S 2 中に供給する前にその溶出液をろ過するために使用することができる。

【0149】

組換えタンパク質をポリッシュおよび精製する

M C C S、M C C S 1、および／または M C C S 2 は組換えタンパク質を精製しポリッシュするという単位操作を実行するのに使用することができる。例えば、M C C S 2 を使用して組換えタンパク質を精製しポリッシュする操作を実行することができ、M C C S 2 からの溶出液はタンパク質原薬である。M C C S、M C C S 1 および／または M C C S 2 は、組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つ（例えば、2 つ、3 つ、または 4 つ）のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜、および組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つ（例えば、2 つ、3 つ、または 4 つ）のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を含むことができる。

【0150】

組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜は、捕獲機構（例えば、本明細書に記載されているかまたは当技術分野で公知の捕獲機構のいずれか）を利用する樹脂、またはアニオン交換、カチオン交換、分子ふるいクロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行するために使用することができる樹脂を含むことができる。組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜はアニオン交換、カチオン交換、分子ふるいクロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行するために使用することができる樹脂（例えば、本明細書に記載されているかまたは当技術分野で公知のアニオン交換、カチオン交換、分子ふるいクロマトグラフィーまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを実行するための典型的な樹脂のいずれか）を含むことができる。

【0151】

組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムもしくはクロマトグラフィー膜の大きさ、形状、および容積、ならびに／または組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つのクロマトグラフィー膜の大きさおよび形状は、本明細書に記載のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の典型的な大きさ、形状、および容積の組合せのいずれかであることができる。当業者には認識することができるように、組換えタンパク質を精製またはポリッシュする工程は、例えば、組換えタンパク質を精製またはポリッシュする単位操作を実行するために使用される少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を装填する工程、洗浄する工程、溶離する工程、および平衡化する工程を含むことができる。通例、精製する単位操作を実行するために使用されるクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から出て来る溶出バッファーは組換えタンパク質を含む。通例、ポリッシュする単位操作を実

10

20

30

40

50

行するために使用されるクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から出て来る装填および／または洗浄バッファーは組換えタンパク質を含む。

【0152】

例えば、組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の大きさは、例えば、約2.0 mL～約200 mL（例えば、約2.0 mL～約180 mL、約2.0 mL～約160 mL、約2.0 mL～約140 mL、約2.0 mL～約120 mL、約2.0 mL～約100 mL、約2.0 mL～約80 mL、約2.0 mL～約60 mL、約2.0 mL～約40 mL、約5.0 mL～約40 mL、約2.0 mL～約30 mL、約5.0 mL～約30 mL、または約2.0 mL～約25 mL）の容積を有することができる。組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたは少なくとも1つのクロマトグラフィー膜上に装填されるときに組換えタンパク質を含む流体の流量は、例えば、約0.1 mL/分～約25 mL/分（例えば、約0.1 mL/分～約12.5 mL/分、約0.1 mL/分～約10.0 mL/分、約0.1 mL/分～約8.0 mL/分、約0.1 mL/分～約6 mL/分、約0.1 mL/分～約4 mL/分、約0.1 mL/分～約3 mL/分、約0.1 mL/分～約2 mL/分、または約0.2 mL/分～約4 mL/分）であることができる。組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に装填される流体中の組換えタンパク質の濃度は、例えば、約0.05 mg/mL～約100 mg/mLの組換えタンパク質（例えば、約0.1 mg/mL～約90 mg/mL、約0.1 mg/mL～約80 mg/mL、約0.1 mg/mL～約70 mg/mL、約0.1 mg/mL～約60 mg/mL、約0.1 mg/mL～約50 mg/mL、約0.1 mg/mL～約40 mg/mL、約0.1 mg/mL～約30 mg/mL、約0.1 mg/mL～約20 mg/mL、約0.5 mg/mL～約20 mg/mL、約0.1 mg/mL～15 mg/mL、約0.5 mg/mL～約15 mg/mL、約0.1 mg/mL～約10 mg/mL、または約0.5 mg/mL～約10 mg/mLの組換えタンパク質）であることができる。精製する単位操作を実行するために使用される少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜内の樹脂は、アニオン交換またはカチオン交換クロマトグラフィーを実行するために使用することができる樹脂であることができる。精製する単位操作を実行するために使用される少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜内の樹脂はカチオン交換樹脂（例えば、Capt o-S樹脂、GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ）であることができる。

【0153】

組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上への組換えタンパク質の装填の後、少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を少なくとも1種の洗浄用バッファーで洗浄する。当技術分野において認識することができるように、少なくとも1種（例えば、2種、3種、または4種）の洗浄用バッファーは、組換えタンパク質ではないあらゆるタンパク質を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から溶離する一方で、組換えタンパク質と樹脂の相互作用またはその他の点で組換えタンパク質の溶離を乱さないことを意味する。

【0154】

洗浄バッファーは少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を約0.2 mL/分～約25 mL/分（例えば、約0.2 mL/分～約20 mL/分、約0.5 mL/分～約20 mL/分、約0.2 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約10 mL/分、約0.5 mL/分から約14 mL/分の間、約1.0 mL/分から約25.0 mL/分の間、または約1.0 mL/分から約15.0 mL/分の間）の流量で通ることができる。使用される洗浄バッファ

一の容積（例えば、1種より多くの洗浄バッファーを使用する場合は洗浄バッファーの合計総容積）は、例えば、約1XCラム容積(CV)～約15XC CV（例えば、約1XC CV～約14XC CV、約1XC CV～約13XC CV、約1XC CV～約12XC CV、約1XC CV～約11XC CV、約2XC CV～約11XC CV、約3XC CV～約11XC CV、約4XC CV～約11XC CV、約2.5XC CV～約5.0XC CV、約5XC CV～約11XC CV、または約5XC CV～約10XC CV）であることができる。洗浄の合計時間は、例えば、約2分～約3時間（例えば、約2分～約2.5時間、約2分～約2.0時間、約5分～約1.5時間、約10分～約1.5時間、約10分～約1.25時間、約20分～約1.25時間、約30分～約1時間、約2分から約10分の間、約2分から約15分の間、または約2分から約30分の間）であることができる。

10

【0155】

組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の洗浄後、組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に溶出バッファーを通すことによって組換えタンパク質を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から溶離する。溶出バッファーは、組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に、約0.2 mL/分～約25 mL/分（例えば、約0.2 mL/分～約20 mL/分、約0.5 mL/分～約20 mL/分、約0.2 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約10 mL/分、約0.5 mL/分から約6.0 mL/分の間、約1.0 mL/分から約5.0 mL/分の間、約0.5 mL/分から約14 mL/分の間、約1.0 mL/分から約25.0 mL/分の間、または約1.0 mL/分から約15.0 mL/分の間）の流量で通すことができる。組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の各々から組換えタンパク質を溶離するために使用される溶出バッファーの容積は、例えば、約1XCラム容積(CV)～約25XC CV（例えば、約1XC CV～約20XC CV、約15XC CV～約25XC CV、約1XC CV～約14XC CV、約1XC CV～約13XC CV、約1XC CV～約12XC CV、約1XC CV～約11XC CV、約2XC CV～約11XC CV、約3XC CV～約11XC CV、約4XC CV～約11XC CV、約5XC CV～約11XC CV、または約5XC CV～約10XC CV）であることができる。溶離する合計時間は、例えば、約2分～約3時間（例えば、約2分～約2.5時間、約2分～約2.0時間、約2分～約1.5時間、約2分～約1.5時間、約2分～約1.25時間、約2分～約1.25時間、約2分～約1時間、約2分から約40分の間、約10分から約40分の間、約20分から約40分の間、または約30分から1.0時間の間）であることができる。これらの方法に使用することができる溶出バッファーの非限定的な例は樹脂および/または組換えタンパク質の生物物理学的な性質に依存する。例えば、溶出バッファーは、異なる濃度の塩（例えば、増大した塩濃度）、異なるpH（例えば、上昇または低下した塩濃度）、または樹脂と結合することに関して組換えタンパク質と競合する分子を含むことができる。本明細書に記載の典型的な捕獲機構の各々に対してかかる溶出バッファーの例は当技術分野で周知である。

20

30

40

【0156】

組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜からの組換えタンパク質の溶離の後、かつ組換えタンパク質を含む流体の次の容積を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に装填することができる前に、その少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を、再生バッファーを用いて平衡化しなければならない。再生バッファーは、組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に、例えば、約0.2 mL/分～約25 mL/分（例えば、約0.2 mL/分～約20

50

mL/分、約0.5 mL/分～約20 mL/分、約0.2 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約15 mL/分、約0.5 mL/分～約10 mL/分、約0.5 mL/分から約6.0 mL/分の間、約1.0 mL/分から約5.0 mL/分の間、約0.5 mL/分から約14 mL/分の間、約1.0 mL/分から約25.0 mL/分の間、約5.0 mL/分から約15.0 mL/分の間、または約1.0 mL/分から約15.0 mL/分の間)の流量で通すことができる。組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる樹脂を含む少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を平衡化するために使用される再生バッファの容積は、例えば、約1XC₁カラム容積(CV)～約15XC₁CV(例えば、約1XC₁CV～約14XC₁CV、約1XC₁CV～約13XC₁CV、約1XC₁CV～約12XC₁CV、約1XC₁CV～約11XC₁CV、約2XC₁CV～約11XC₁CV、約3XC₁CV～約11XC₁CV、約2XC₁CV～約5XC₁CV、約2.5XC₁CV～約7.5XC₁CV、約4XC₁CV～約11XC₁CV、約5XC₁CV～約11XC₁CV、または約5XC₁CV～約10XC₁CV)であることができる。組換えタンパク質を精製する単位操作を実行するために使用する少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の溶出液中の組換えタンパク質の濃度は、例えば、約0.05 mg/mL～約100 mg/mLの組換えタンパク質(例えば、約0.1 mg/mL～約90 mg/mL、約0.1 mg/mL～約80 mg/mL、約0.1 mg/mL～約70 mg/mL、約0.1 mg/mL～約60 mg/mL、約0.1 mg/mL～約50 mg/mL、約0.1 mg/mL～約40 mg/mL、約2.5 mg/mL～約7.5 mg/mL、約0.1 mg/mL～約30 mg/mL、約0.1 mg/mL～約20 mg/mL、約0.5 mg/mL～20 mg/mL、約0.1 mg/mL～約15 mg/mL、約0.5 mg/mL～約15 mg/mL、約0.1 mg/mL～約10 mg/mL、または約0.5 mg/mL～約10 mg/mLの組換えタンパク質)であることができる。

10

20

【0157】

組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜は、カチオン交換、アニオン交換、または分子篩クロマトグラフィーを実行するために使用することができる樹脂を含むことができる。当技術分野において認識することができるように、組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を用いて組換えタンパク質をポリッシュすることは、例えば、組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を装填する工程、追跡する(chasing)工程、および再生する工程を含むことができる。例えば、装填、追跡、および再生する工程を用いてポリッシュを実行する場合、組換えタンパク質は、組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用される少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜中の樹脂と結合せず、組換えタンパク質は装填および追跡工程で少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜から溶離され、再生工程は、組換えタンパク質を含む追加の流体を少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に装填することができる前に、少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜からあらゆる不純物を除去するために使用される。装填、追跡、および再生工程の各々で使用される典型的な流量とバッファ容積は以下に記載する。

30

40

【0158】

組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の大きさ、形状、および容積、ならびに/または組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィー膜の大きさおよび形状は、本明細書に記載のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の典型的な大きさ、形状、および容積の組合せのいずれかであることができる。例えば、組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つの

50

クロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜の大きさは、例えば、約 0.5 mL～約 200 mL（例えば、約 0.5 mL～約 180 mL、約 0.5 mL～約 160 mL、約 0.5 mL～約 140 mL、約 0.5 mL～約 120 mL、約 0.5 mL～約 100 mL、約 0.5 mL～約 80 mL、約 0.5 mL～約 60 mL、約 0.5 mL～約 40 mL、約 5.0 mL～約 40 mL、約 0.5 mL～約 30 mL、約 5.0 mL～約 30 mL、約 0.5 mL～約 25 mL、約 0.2 mL～約 10 mL、または約 0.2 mL～約 5 mL）の容積を有することができる。組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に装填されるとき組換えタンパク質を含む流体の流量は、例えば、約 0.1 mL/分～約 25 mL/分（例えば、約 0.1 mL/分～約 12.5 mL/分、約 0.1 mL/分～約 10.0 mL/分、約 0.1 mL/分～約 8.0 mL/分、約 0.1 mL/分～約 6 mL/分、約 0.1 mL/分～約 4 mL/分、約 0.1 mL/分～約 3 mL/分、約 2 mL/分～約 6 mL/分、約 0.1 mL/分～約 2 mL/分、または約 0.2 mL/分～約 4 mL/分）であることができる。組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に装填される組換えタンパク質を含む流体の総容積は、例えば、約 1.0 mL～約 250 mL（例えば、約 1.0 mL～約 225 mL、約 1.0 mL～約 200 mL、約 1.0 mL～約 175 mL、約 1.0 mL～約 150 mL、約 1.0 mL～約 125 mL、約 1.0 mL～約 100 mL、約 1.0 mL～約 75 mL、約 1.0 mL～約 50 mL、または約 1.0 mL～約 25 mL）であることができる。ポリッシュを実行するために使用される少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜内の樹脂はアニオン交換またはカチオン交換樹脂であることができる。ポリッシュする単位操作を実行するために使用される少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜内の樹脂はカチオン交換樹脂（例えば、Sartobind（登録商標）Q樹脂、Sartorius, Goettingen, Germany）であることができる。

【0159】

装填工程後、追跡工程を実行する（例えば、追跡バッファーを少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に通して、少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に実質的に結合しない組換えタンパク質を収集する）。これらの例において、追跡バッファーは、少なくとも 1 つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に、約 0.2 mL/分～約 50 mL/分（例えば、約 1 mL/分～約 40 mL/分、約 1 mL/分～約 30 mL/分、約 5 mL/分～約 45 mL/分、約 10 mL/分～約 40 mL/分、約 0.2 mL/分～約 20 mL/分、約 0.5 mL/分～約 20 mL/分、約 0.2 mL/分～約 15 mL/分、約 0.5 mL/分～約 15 mL/分、約 0.5 mL/分～約 10 mL/分、約 0.5 mL/分から約 14 mL/分の間、約 1.0 mL/分から約 25.0 mL/分の間、または約 1.0 mL/分から約 15.0 mL/分の間）の流量で通すことができる。使用される追跡バッファーの容積は、例えば、約 1 X カラム容積 (CV)～約 100 X CV（例えば、約 1 X CV～約 90 X CV、約 1 X CV～約 80 X CV、約 1 X CV～約 70 X CV、約 1 X CV～約 60 X CV、約 1 X CV～約 50 X CV、約 1 X CV～約 40 X CV、約 1 X CV～約 30 X CV、約 1 X CV～約 20 X CV、約 1 X CV～約 15 X CV、約 5 X CV～約 20 X CV、または約 5 X CV～約 30 X CV、約 1 X CV～約 14 X CV、約 1 X CV～約 13 X CV、約 1 X CV～約 12 X CV、約 1 X CV～約 11 X CV、約 2 X CV～約 11 X CV、約 3 X CV～約 11 X CV、約 4 X CV～約 11 X CV、約 2.5 X CV～約 5.0 X CV、約 5 X CV～約 11 X CV、または約 5 X CV～約 10 X CV）であることができる。追跡の合計時間は、例えば、約 1 分～約 3 時間（例えば、約 1 分～約 2.5 時間、約 1 分～約 2.0 時間、約 1 分～約 1.5 時間、約 2 分～約 1.5 時間、約 1 分～約 1.25 時間、約 2 分～約 1.25 時間、約 1 分～約 5 分、約 1 分～約 10 分、約 2 分～約

10

20

30

40

50

4分、約30分～約1時間、約2分から約10分の間、約2分から約15分の間、または約2分から約30分の間)であることができる。装填工程および追跡工程でカラムを通して来る溶出液中に存在する組換えタンパク質の合わせた濃度は、例えば、約0.1mg/mL～約100mg/mLの組換えタンパク質(例えば、約0.1mg/mL～約90mg/mL、約0.1mg/mL～約80mg/mL、約0.1mg/mL～約70mg/mL、約0.1mg/mL～約60mg/mL、約0.1mg/mL～約50mg/mL、約0.1mg/mL～約40mg/mL、約2.5mg/mLから約7.5mg/mLの間、約0.1mg/mL～約30mg/mL、約0.1mg/mL～約20mg/mL、約0.5mg/mL～約20mg/mL、約0.1mg/mL～約15mg/mL、約0.5mg/mL～約15mg/mL、約0.1mg/mL～約10mg/mL、約0.5mg/mL～約10mg/mL、または約1mg/mL～約5mg/mLの組換えタンパク質)であることができる。

【0160】

追跡する工程の後、そしてポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜上に組換えタンパク質を含む流体の次の容積を装填することができる前に、少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を再生バッファーを用いて再生しなければならない。再生バッファーは、組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜に、例えば、約0.2mL/分～約50mL/分(例えば、約1mL/分～約40mL/分、約1mL/分～約30mL/分、約5mL/分～約45mL/分、約10mL/分～約40mL/分、約0.2mL/分～約20mL/分、約0.5mL/分～約20mL/分、約0.2mL/分～約15mL/分、約0.5mL/分～約15mL/分、約0.5mL/分～約10mL/分、約0.5mL/分から約14mL/分の間、約1.0mL/分から約25.0mL/分の間、または約1.0mL/分から約15.0mL/分の間)の流量で通すことができる。ポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜を再生するために使用される再生バッファーの容積は、例えば、約1XCラム容積(CV)～約500XC(例えば、約1XC～約450XC、約1XC～約400XC、約1XC～約350XC、約1XC～約300XC、約1XC～約250XC、約1XC～約200XC、約1XC～約150XC、約1XC～約100XC、約1XC～約90XC、約1XC～約80XC、または約1XC～約70XC、約1XC～約60XC、約1XC～約50XC、約1XC～約40XC、約1XC～約30XC、約1XC～約20XC、約1XC～約15XC、約5XC～約20XC、約5XC～約30XC、約1XC～約14XC、約1XC～約13XC、約1XC～約12XC、約1XC～約11XC、約2XC～約11XC、約3XC～約11XC、約4XC～約11XC、約2.5XC～約5.0XC、約5XC～約11XC、または約5XC～約10XC)であることができる。

【0161】

他の例において、ポリッシュする単位操作を実行するために使用される1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび/またはクロマトグラフィー膜は、組換えタンパク質を含む流体中に存在する不純物を選択的に結合するかまたは保持する樹脂を含み、1つまたはそれ以上のカラムおよび/または膜の樹脂の結合能力に達するかまたは達したと実質的に同等になったら、1つまたはそれ以上のカラムおよび/または膜を再生する代わりに、1つまたはそれ以上のカラムおよび/または膜を取り替える(例えば、実質的に類似のカラムおよび/または膜と取り替える)。

【0162】

本明細書に記載のこれらの方法のいくつかの例において、MCCS2は、例えば、3つのクロマトグラフィーカラムおよび1つのクロマトグラフィー膜を含むPCCSを含み、

ここでPCCS内の3つのクロマトグラフィーカラムは（例えば、タンパク質を精製する単位操作を実行するために使用することができる少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムを用いて）組換えタンパク質を精製する単位操作を実行し、PCCS内のクロマトグラフィー膜は組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行する。これらの例で、治療用タンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができるPCCS内のクロマトグラフィー膜は、組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができる、本明細書に記載の典型的なクロマトグラフィー膜のいずれかであることができる。本明細書に記載のカラムスイッチング法のいずれかを使用して、この例においてPCCS内の第1の3つのクロマトグラフィーカラムおよびクロマトグラフィー膜を切り替えることができる時を決定することができる。

10

【0163】

この例のいくつかの実施形態は、さらに、PCCS内の3つのクロマトグラフィーカラムからの溶出液をPCCS内のクロマトグラフィー膜中に供給する前にその溶出液のイオン濃度および／またはpHを調節する工程を含むことができる。本明細書に記載されているように、PCCS内の3つのクロマトグラフィーカラムからの溶出液のイオン濃度および／またはpHは（この例においてはこの溶出液をPCCS内のクロマトグラフィー膜中に供給する前に）（例えば、インラインバッファー調節リザーバの使用により）PCCS内の3つのクロマトグラフィーカラムの溶出液にバッファーを添加することによって調節することができる。バッファーは、例えば、約0.1 mL／分～約15 mL／分（例えば、約0.1 mL／分～約12.5 mL／分、約0.1 mL／分～約10.0 mL／分、約0.1 mL／分～約8.0 mL／分、約0.1 mL／分～約6 mL／分、約0.1 mL／分～4 mL／分、または約0.5 mL／分～約5 mL／分）の流量で溶出液に添加することができる。

20

【0164】

これらの例は、さらに、この例においてはPCCS内の3つのクロマトグラフィーカラムからの溶出液をクロマトグラフィー膜（組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができるクロマトグラフィー膜）中に供給する前にその溶出液を保持または貯蔵する工程を含むことができる。本明細書に記載されているように、この保持または貯蔵する工程は本明細書に記載のリザーバのいずれか（例えば、バックアップタンク）を用いて実行することができる。

30

【0165】

これらの例はまた、典型的なPCCSシステム内におけるクロマトグラフィー膜からの溶出液（組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができるクロマトグラフィー膜の溶出液）をろ過する工程を含むこともできる。本明細書に記載のろ過のための典型的なフィルターまたは方法のいずれかを用いて、この典型的なPCCSにおけるクロマトグラフィー膜からの溶出液（組換えタンパク質をポリッシュする単位操作を実行するために使用することができるクロマトグラフィー膜の溶出液）をろ過することができる。

【0166】

当技術分野において認識することができるように、精製された組換えタンパク質は、本明細書に記載の方法のいずれかを用いてMCCSまたはMCCS2から定期的に溶離することができる。例えば、本明細書に記載の方法のいずれも、例えば、MCCSまたはMCCS1およびMCCS2に使用されるクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜に応じて、例えば、約30秒～約5時間（例えば、約1分から約4時間の間、約1分から約3時間の間、約1分から約2時間の間、約1分から約1.5時間の間、約1分から約1時間の間、または約1分から約30分の間）の持続時間の間、例えば、約1分～約6時間（例えば、約1分から約5時間の間、約1分から約4時間の間、約1分から約3時間の間、約1分から約2時間の間、約1分から約1時間の間、または約1分から30分の間）の頻度で、精製された組換えタンパク質を溶離することができる。

40

【0167】

50

培養する方法

本明細書に記載の方法のいくつかは、さらに、液体培養培地を含むバイオリアクター（例えば、灌流またはフェドバッチバイオリアクター）で、組換えタンパク質を分泌する細胞（例えば、組換え哺乳類細胞）を培養する工程を含み、ここでは細胞（例えば、哺乳類細胞）を実質的に含まないある容積の液体培養培地がバイオリアクター（例えば、灌流バイオリアクター）から連続的または定期的に除去され、MCCSまたはMCCS1中に供給される。バイオリアクターは、例えば、約1L～約10,000L（例えば、約1L～約50L、約50L～約500L、約500L～約1000L、500L～約5000L、約500L～約10,000L、約5000L～約10,000L、約1Lから約10,000Lの間、約1Lから約8,000Lの間、約1L～約6,000L、約1Lから約5,000Lの間、約100Lから約5,000Lの間、約10Lから約100Lの間、約10Lから約4,000Lの間、約10Lから約3,000Lの間、約10Lから約2,000Lの間、または約10Lから約1,000Lの間）の容積を有することができる。バイオリアクター内に存在する液体培養培地の量は、例えば、約0.5L～約5,000L（例えば、約0.5L～約25L、約25L～約250L、約250L～約500L、250L～約2500L、約250L～約5,000L、約2500L～約5,000L、約0.5Lから約5,000Lの間、約0.5Lから約4,000Lの間、約0.5Lから約3,000Lの間、約0.5Lから約2,500Lの間、約50Lから約2,500Lの間、約5Lから約50Lの間、約5Lから約2,000Lの間、約5Lから約1,500Lの間、約5Lから約1,000Lの間、または約5Lから約500Lの間）であることができる。細胞の培養は、例えば、フェドバッチバイオリアクターまたは灌流バイオリアクターを用いて実行することができる。細胞の培養（例えば、哺乳類細胞の培養）の非限定的な例およびいろいろな局面は以下に記載されており、いかなる組合せで使用することもできる。

【0168】

細胞

本明細書に記載の方法のいくつかで培養される細胞は細菌（例えば、グラム陰性細菌）、酵母（例えば、サッカロマイセス・セレビジアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、ハンセンラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、クルイベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ヤロウィア・リポリチカ（*Yarrowia lipolytica*）、またはアークスラ・アデニニボランス（*Arxula adeninivorans*））、または哺乳類細胞であることができる。哺乳類細胞は懸濁液中で、または接着細胞として増殖する細胞であることができる。本明細書に記載の方法のいずれかで培養することができる哺乳類細胞の非限定的な例として：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、CHO DG44細胞またはCHO-K1s細胞）、Sp2.0、骨髓腫細胞（例えば、NS/0）、B-細胞、ハイブリドーマ細胞、T-細胞、ヒト胚性腎臓（HEK）細胞（例えば、HEK 293EおよびHEK 293F）、アフリカミドリザル腎臓上皮（Vero）細胞、およびメイデン・ダービー（Madin-Darby）イヌ（コッカーズパニエル（*Cocker Spaniel*））腎臓上皮（MDCK）細胞がある。接着細胞を培養するいくつかの例で、培養物はまた複数のマイクロキャリア（例えば、1つまたはそれ以上の細孔を含むマイクロキャリア）を含むこともできる。本明細書に記載の方法のいずれかで培養することができる追加の哺乳類細胞は当技術分野で公知である。

【0169】

哺乳類細胞は、組換えタンパク質（例えば、組換えタンパク質）をコードする組換え核酸（例えば、哺乳類細胞のゲノムに安定に組み込まれた核酸）を含むことができる。典型的な組換えタンパク質をコードする組換え核酸の非限定的な例は、本明細書に記載の方法を用いて生成することができる組換えタンパク質と共に以下に記載する。いくつかの例に

において、バイオリアクター（例えば、本明細書に記載のバイオリアクターのいずれか）で培養される哺乳類細胞はより大きい培養物から誘導された。

【0170】

組換えタンパク質をコードする核酸は分子生物学および分子遺伝学で公知の多種多様な方法を用いて哺乳類細胞中に導入することができる。非限定的な例として、トランスフェクション（例えば、リポフェクション）、形質導入（例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、またはレトロウイルス感染）、およびエレクトロポレーションがある。いくつかの例において組換えタンパク質をコードする核酸は哺乳類細胞の染色体中に安定に組み込まれない（一過性トランスフェクション）が、他の場合には核酸が組み込まれる。あるいは、または加えて、組換えタンパク質をコードする核酸はプラスミド内および／または哺乳類の人工染色体（例えば、ヒト人工染色体）内に存在することができる。あるいは、または加えて、核酸はウイルスベクター（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルスベクター）を用いて細胞に導入することができる。核酸はプロモーター配列（例えば、 β -アクチンプロモーターおよびCMVプロモーターのような強力なプロモーター、または誘導性プロモーター）に機能可能に結合することができる。所望により、核酸を含むベクターはまた、選択可能なマーカー（例えば、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、またはネオマイシン耐性を哺乳類細胞に授与する遺伝子）を含むこともできる。

10

【0171】

いくつかの例において、組換えタンパク質は分泌タンパク質であり、哺乳類細胞により細胞外培地（例えば、第1および／または第2の液体培養培地）中に放出される。例えば、可溶性の組換えタンパク質をコードする核酸配列は、組換えタンパク質のN-またはC-末端に、分泌シグナルペプチドをコードする配列を含むことができ、これは哺乳類細胞内に存在する酵素により開裂され、その後細胞外培地（例えば、第1および／または第2の液体培養培地）中に放出される。

20

【0172】

培養培地

液体培養培地は当技術分野で公知である。液体培養培地（例えば、第1および／または第2の組織培養培地）は哺乳類の血清（例えば、ウシ胎児血清およびウシ血清）、および／または成長ホルモンまたは増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、および上皮増殖因子）を補充することができる。あるいは、または加えて、液体培養培地（例えば、第1および／または第2の液体培養培地）は既知組成液体培養培地、動物由来成分を含まない液体培養培地、無血清液体培養培地、または血清含有液体培養培地であることができる。既知組成液体培養培地、動物由来成分を含まない液体培養培地、無血清液体培養培地、および血清含有液体培養培地の非限定的な例は市販されている。

30

【0173】

液体培養培地は通例エネルギー源（例えば、グルコースのような炭水化物）、必須アミノ酸（例えば、20のアミノ酸+システインの基本的な組）、低濃度で必要とされるビタミンおよび／または他の有機化合物、遊離脂肪酸、および／または微量元素を含む。液体培養培地（例えば、第1および／または第2の液体培養培地）は、所望により、例えば、哺乳類ホルモンもしくは増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子）、塩およびバッファー（例えば、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、ヌクレオシドおよび塩基（例えば、アデノシン、チミジン、およびヒポキサンチン）、タンパク質および組織加水分解物、および／またはこれらの添加物の任意の組合せを補充することができる。

40

【0174】

本明細書に記載の方法のいずれかで細胞（例えば、哺乳類細胞）を培養するために使用することができる多種多様な異なる液体培養培地は当技術分野で公知である。同様に本方法で有用であり得る培地成分には、限定されることはないが、既知組成（CD）加水分解物、例えば、CDペプトン、CDポリペプチド（2またはそれ以上のアミノ酸）、および

50

C D増殖因子がある。液体の組織培養培地および培地成分の追加の例は当技術分野で公知である。

【0175】

熟練した実務者には認識されるように、本明細書に記載の第1の液体培養培地と第2の液体培養培地は同じタイプの培地または異なる培地であることができる。

【0176】

典型的なバイオリアクターの追加の特徴

本明細書に記載のバイオリアクターのいずれかの内面は、少なくとも1つのコーティング（例えば、ゼラチン、コラーゲン、ポリ-L-オルニチン、ポリスチレン、およびラミニンの少なくとも1つのコーティング）、ならびに当技術分野で公知のように、 O_2 、 CO_2 、および N_2 を液体培養培地中にスパージするための1つまたはそれ以上の口、および液体培養培地をかき混ぜるための攪拌機構を有し得る。バイオリアクターは制御加湿雰囲気中で（例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%より高い湿度、または100%の湿度で）細胞培養物をインキュベートすることができる。バイオリアクターはまた、バイオリアクターからある体積の液体培養培地を取り出すことができる機械的装置、および場合により、その機械的装置内に、液体培養培地のバイオリアクターからの移動過程の間に液体培養培地から細胞を除去するフィルター（例えば、米国仮特許出願第61/878,502号に記載されているATFシステムまたは細胞ろ過システム）を装備することもできる。

【0177】

温度

哺乳類細胞の培養工程は約31℃～約40℃の温度で実行することができる。熟練した実務者には認識されるように、温度は、培養工程中特定の時点で、例えば、1時間または1日単位で変えることができる。例えば、温度は、バイオリアクターに細胞（例えば、哺乳類細胞）を最初に播種した後約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、もしくは約20日またはそれ以上で変化またはシフトする（例えば、上昇もしくは低下する）ことができる。例えば、温度は上方へシフト（例えば、最大もしくは約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または最大もしくは約20℃の変化）することができる。例えば、温度は下方へシフト（例えば、最大もしくは約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または最大もしくは約20℃の変化）することができる。

【0178】

CO_2

本明細書に記載の培養工程は、さらに、バイオリアクター内の液体培養培地を最高または約15%の CO_2 （例えば、最高もしくは約14% CO_2 、12% CO_2 、10% CO_2 、8% CO_2 、6% CO_2 、5% CO_2 、4% CO_2 、3% CO_2 、2% CO_2 、または最高もしくは約1% CO_2 ）を含む雰囲気に曝露することを含むことができる。

【0179】

灌流バイオリアクター

本明細書に記載の培養工程は灌流バイオリアクターを用いて実行することができる。灌流バイオリアクター内での細胞（例えば、哺乳類細胞）の培養は、第1の容積の第1の液体培養培地（例えば、任意の濃度の哺乳類細胞を含む、例えば、実質的に細胞を含まない第1の容積の第1の液体培養培地）のバイオリアクターからの除去、および第2の容積の第2の液体培養培地を第1の液体培養培地に添加することを含む。除去と添加は同時とし

くは順次に、またはこれら2つの組合せで実行することができる。さらに、除去と添加は、（例えば、バイオリアクターの容積または第1の液体培養培地の容積の0.1%～800%（例えば、1%から700%の間、1%から600%の間、1%から500%の間、1%から400%の間、1%から350%の間、1%から300%の間、1%から250%の間、1%から100%の間、100%から200%の間、5%から150%の間、10%から50%の間、15%から40%の間、8%から80%の間、または4%から30%の間）の容積をある所与の時間期間にわたって（例えば、24時間の期間にわたって、約1時間～約24時間の増加する時間期間にわたって、または24時間を超える増加する時間期間にわたって）除去し取り替える速度で）連続的に、または定期的に（例えば、3日毎に一回、2日毎に一回、1日に一回、1日に二回、1日に三回、1日に四回、または1日に五回）、またはこれらの任意の組合せで実行することができる。定期的に実行する場合、（例えば、約24時間の期間内、約1時間～約24時間の増加する時間期間内、または24時間を超える増加する時間期間内に）除去されるかまたは取り替えられる容積は、例えば、バイオリアクターの容積または第1の液体培養培地の容積の0.1%～800%（例えば、1%から700%の間、1%から600%の間、1%から500%の間、1%から400%の間、1%から300%の間、1%から200%の間、1%から100%の間、100%から200%の間、5%から150%の間、10%から50%の間、15%から40%の間、8%から80%の間、または4%から30%の間）であることができる。除去される第1の液体培養培地の第1の容積および添加される第2の液体培養培地の第2の容積は、いくつかの例において、培養期間の全体または一部の間、各々の24時間の期間（または代わりに、約1時間～約24時間の増加する時間期間もしくは24時間を超える増加する時間期間）にわたっておよそ同じに保つことができる。当技術分野で公知のように、第1の液体培養培地の第1の容積を除去する速度（容積／単位時間）および第2の液体培養培地の第2の容積を添加する速度（容積／単位時間）は変えることができる。第1の液体培養培地の第1の容積を除去する速度（容積／単位時間）および第2の液体培養培地の第2の容積を添加する速度（容積／単位時間）はほぼ同じであることができ、または異なることができる。

【0180】

あるいは、除去され添加される容積は培養期間中各々の24時間の期間（または代わりに、1時間～約24時間の増加する時間期間もしくは24時間を超える増加する時間期間）にわたって変化する（例えば、次第に増大する）ことができる。例えば、培養期間中各々の24時間の期間（あるいは、約1時間～24時間超の増加する時間期間または24時間を超える増加する時間期間）内に除去される第1の液体培養培地の容積および添加される第2の液体培養培地の容積は、培養期間中、バイオリアクター容積または第1の液体培養培地容積の0.5%～約20%である容積から、バイオリアクター容積または第1の液体培養培地容積の約25%～約150%まで（例えば、次第に、または互い違いの増加量によって）増大することができる。

【0181】

熟練した実務者には認識されるように、第1の液体培養培地と第2の液体培養培地は同じタイプの培地であることができる。他の例において、第1の液体培養培地と第2の液体培養培地は異なることができる。

【0182】

第1の液体培養培地の第1の容積は、例えば、第1の容積の第1の液体培養培地をバイオリアクターから（例えば、実質的に細胞を含まない第1の容積の第1の液体培養培地をバイオリアクターから）除去することができる機械系により除去することができる。代わりに、または加えて、第1の容積の第1の液体培養培地は、細胞（例えば、哺乳類細胞）を排除する分子量カットオフを有する無菌膜を通る第1の容積の第1の液体培養培地の染み出しまたは重力流により除去することができる。

【0183】

第2の容積の第2の液体培養培地は、自動的に、例えば、注入ポンプにより第1の液体

培養培地に添加することができる。

【0184】

いくつかの例において、第1の容積の第1の液体培養培地（例えば、実質的に哺乳類細胞を含まない第1の容積の第1の液体培養培地）の除去、および第2の容積の第2の液体培養培地の第1の液体培養培地への添加は、バイオリアクターに哺乳類細胞を播種した後少なくとも1時間以内（例えば、2時間以内、3時間以内、4時間以内、5時間以内、6時間以内、7時間以内、8時間以内、9時間以内、10時間以内、12時間以内、14時間以内、16時間以内、18時間以内、24時間以内、36時間以内、48時間以内、72時間以内、96時間以内、または96時間後）には起こらない。

【0185】

フェドバッチバイオリアクター

本明細書に記載の培養工程はフェドバッチバイオリアクターを用いて実行することができる。フェドバッチバイオリアクターでの細胞の培養は、大半の培養期間にわたって、第1の液体培養培地への第2の容積の第2の液体培養培地の添加（例えば、定期的または連続的な添加）を含む。第2の液体培養培地の添加は、連続的に（例えば、バイオリアクターの容積または第1の液体培養培地容積の0.1%~300%（例えば、1%~250%、1%~100%、100%~200%、5%~150%、10%~50%、15%~40%、8%~80%、または4%~30%）の容積をある所与の時間期間にわたって（例えば、24時間の期間にわたって、約1時間~約24時間の増加する時間期間にわたって、または24時間を超える増加する時間期間にわたって）添加する速度で）、または定期的に（例えば、3日毎に一回、2日毎に一回、1日に一回、1日に二回、1日に三回、1日に四回、または1日に五回）、またはこれらの任意の組合せで実行することができる。定期的に実行する場合、（例えば、約24時間の期間内、約1時間~約24時間の増加する時間期間内、または24時間を超える増加する時間期間内に）添加される容積は、バイオリアクターの容積または第1の液体培養培地容積の、例えば、0.1%~300%（例えば、1%~200%、1%~100%、100%~200%、5%~150%、10%~50%、15%~40%、8%~80%、または4%~30%）であることができる。添加される第2の液体培養培地の第2の容積は、いくつかの例において、培養期間の全体または一部の間、各々の24時間の期間（または、代わりに、約1時間~約24時間の増加する時間期間または24時間を超える増加する時間期間）にわたってほぼ同じに保つことができる。当技術分野で公知のように、第2の容積の第2の液体培養培地を添加する速度（容積/単位時間）は培養期間の全体または一部の間変えることができる。例えば、添加される第2の液体培養培地の容積は、培養期間中、各々の24時間の期間（または代わりに、1時間~約24時間の増加する時間期間または24時間を超える増加する時間期間）にわたって変化する（例えば、次第に増大する）ことができる。例えば、培養期間中、各々の24時間の期間（または代わりに、約1時間~24時間超の増加する時間期間または24時間を超える増加する時間期間）内に添加される第2の液体培養培地の容積は、培養期間の間中、（例えば、次第にまたは互い違いの増加によって）バイオリアクター容積または第1の液体培養培地容積の0.5%~約20%である容積からバイオリアクター容積または第1の液体培養培地容積の約25%~約150%まで増大することができる。第2の容積の第2の液体培養培地を添加する速度（容積/単位時間）は培養期間の全体または一部にわたってほぼ同じであることができる。

【0186】

熟練した実務者には認識されるように、第1の液体培養培地と第2の液体培養培地は同じタイプの培地であることができる。他の例において、第1の液体培養培地と第2の液体培養培地は異なることができる。第2の液体培養培地の容積は自動的に、例えば、注入ポンプにより第1の液体培養培地に添加することができる。

【0187】

いくつかの例において、第1の液体培養培地への第2の容積の第2の液体培養培地の添加は、バイオリアクターへの哺乳類細胞の播種から少なくとも1時間以内（例えば、2時

10

20

30

40

50

間以内、3時間以内、4時間以内、5時間以内、6時間以内、7時間以内、8時間以内、9時間以内、10時間以内、12時間以内、14時間以内、16時間以内、18時間以内、24時間以内、36時間以内、48時間以内、72時間以内、96時間以内、または96時間後)には起こらない。フェドバッチ培養における細胞培養培地は通例培養期間の終了時に収穫され、本明細書に記載の方法のいずれかで使用される。しかし、フェドバッチ培養の細胞培養培地はまた培養期間中の1つまたはそれ以上の時点で収穫され、本明細書に記載の方法のいずれかで使用されることもできる。

【0188】

熟練した実務者には認識されるように、種々の培養パラメーター(例えば、容器、容積、培養物容積を交換する頻度率、攪拌頻度、温度、培地、およびCO₂濃度)のいずれかをこれらの方法を実行するためにいかなる組合せで使用することもできる。さらに、本明細書に記載されているかまたは当技術分野で公知の哺乳類細胞のいずれも組換えタンパク質を産生するために使用することができる。

【0189】

代表的な生物学的製造システム

MCCSまたはMCCS1およびMCCS2を含む本明細書に記載の方法を実行するのに有用な生物学的製造システムの例は米国仮特許出願第61/775,060号および同第61/856,390号(参照によって組み入れる)に記載されている。これらの代表的なシステムでは、本明細書に提供される少なくとも1(例えば、少なくとも2、3、4、5、または6)の低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムがMCCS内またはMCCS1および/またはMCCS2内に存在する。例えば、システム全体は本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを合計で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20含むことができる。例えば、MCCS、MCCS1、および/またはMCCS2は(または各々が)1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の本明細書に提供される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含むことができる。

【0190】

例えば、有用なシステムは、入口を含むMCCS1および出口を含むMCCS2、または入口および出口を含むMCCSを含むことができる。いくつかの実施形態において、MCCS1およびMCCS2は互いに流体連通している。これらのシステムはまた、流体が入口に流入し、MCCS1およびMCCS2を通過し、出口を通して製造システムから出て行くことができるように構成することもできる。これらのシステムにより、液体培養培地からの治療用原薬の連続的で時間効率の良い生産が可能になる。例えば、治療用のタンパク質を含む流体(例えば、液体培養培地)のMCCS1への供給から、精製された組換えタンパク質(例えば、治療用タンパク質原薬)のMCCS2の出口からの溶出までの経過時間は、例えば、約4時間~約48時間(両端を含む)であることができる。

【0191】

いくつかの代表的なシステムは停留タンクを含まない。他の例において、システムは(例えば、各々の停留タンクが、例えば約5分~約6時間(両端を含む)の全期間の間治療用のタンパク質を保持するのみである場合)システム全体で最大1、2、3、4、または5の停留タンクを含むことができる。停留タンク(複数可)は1mL~約300mL(両端を含む)の容量を有することができる。流体がMCCS1またはMCCSに入る前に停留タンク(複数可)に入るようにシステム内に配置された停留タンク(複数可)はいずれも、それぞれMCCS1またはMCCSの第1のカラムの装填体積の1mL~約100%(両端を含む)である容量を有することができる。流体がMCCS2に入る前に(そしてMCCS1を出た後に)停留タンク(複数可)に入るようにシステム内に配置された停留タンク(複数可)はいずれも、例えば、MCCS2の第1のカラムの装填体積の1mL~約100%(両端を含む)である容量を有することができる。

【0192】

追加の代表的なシステムの構造および特徴

MCCSまたはMCCS1は、流体（例えば、実質的に細胞を含まない液体培養培地）がそれぞれMCCSまたはMCCS1に入るために通過することができる入口を含むことができる。入口はこのような目的のために当技術分野で公知のいかなる構造であることもできる。入口への流体管の挿入後その入口からの流体の有意な漏出を起こすことなく流体がその入口を通してMCCSまたはMCCS1に入るように流体管を挿入することが可能な、例えば、ネジ、リブ、またはシールを含むことができる。本システムに使用することができる非限定的な入口は公知であり、当業者は理解できるであろう。

【0193】

MCCSまたはMCCS1は少なくとも2つのクロマトグラフィーカラム、少なくとも2つのクロマトグラフィー膜、または少なくとも1つのクロマトグラフィーカラムおよび少なくとも1つのクロマトグラフィー膜、ならびに入口を有することができる。MCCSまたはMCCS1は、本明細書に記載の代表的なMCCSのいずれかであることができるか、または本明細書に記載のMCCSの（任意の組合せの）代表的な特徴のいずれか1つまたはそれ以上を有することができる。MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は本明細書に記載の代表的な形状、大きさ、体積（ベッド容積）、および／または単位操作のいずれか1つまたはそれ以上を有することができる。

【0194】

MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的な樹脂のいずれか1つまたはそれ以上を含むことができる。例えば、MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）の1つまたはそれ以上に含まれる樹脂は、ある捕獲機構（例えば、プロテインA結合捕獲機構、プロテインG結合捕獲機構、抗体または抗体フラグメント結合捕獲機構、基質結合捕獲機構、補因子結合捕獲機構、アプタマー結合捕獲機構、および／またはタグ結合捕獲機構）を利用する樹脂であることができる。MCCSまたはMCCS1のクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）の1つまたはそれ以上に含まれる樹脂はカチオン交換樹脂、アニオン交換樹脂、分子ふるい樹脂、もしくは疎水性相互作用樹脂、またはこれらの任意の組合せであることができる。組換えタンパク質を精製するのに使用することができる樹脂のさらなる例は当技術分野で公知であり、MCCSまたはMCCS1内に存在する1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜に含ませることができる。MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜は同じおよび／または異なる樹脂（例えば、本明細書に記載または組換えタンパク質の精製に使用されることが当技術分野で公知の樹脂のいずれか）を含むことができる。

【0195】

MCCSまたはMCCS1内に存在する2つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー樹脂は1つまたはそれ以上の単位操作（例えば、組換えタンパク質の捕獲、組換えタンパク質の精製、組換えタンパク質のポリッシュ、ウィルスの不活化、組換えタンパク質を含む流体のイオン濃度および／またはpHの調節、または組換えタンパク質を含む流体のろ過）を実行することができる。非限定例において、MCCSまたはMCCS1は、流体（例えば、液体培養培地）から組換えタンパク質を捕獲する、および組換えタンパク質を含む流体中に存在するウィルスを不活化するという単位操作を実行することができる。MCCSまたはMCCS1は本明細書に記載または当技術分野で公知の2またはそれ以上の単位操作の任意の組合せを実行することができる。

【0196】

MCCSまたはMCCS1内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は切り替え機構（例えば、カラム切り替え機構）

により互いに連結または移動することができる。MCCSまたはMCCS1はまた1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、または5つ）のポンプ（例えば、自動化された、例えば、自動化されたぜん動ポンプ）を含むこともできる。カラム切り替え事象は、MCCSまたはMCCS1を通過する流体（例えば、MCCSまたはMCCS1内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜への投入物および／またはそれ（ら）からの溶出液）中のある特定のレベルの組換えタンパク質に対応するUV吸光度、ある特定の体積の液体（例えば、緩衝液）、または特定の経過時間により検出されるある一定レベルの組換えタンパク質の検出によって始動させることができる。カラム切り替えとは一般に、MCCSまたはMCCS1内の少なくとも2つの異なるクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜（例えば、MCCS1またはMCCS2内に存在する2つまたはそれ以上の異なるクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜）が、本方法の少なくとも一部の異なる工程（例えば、平衡化、装填、溶出、または洗浄）を実質的に同時に通過できるようにする機構を意味する。

10

【0197】

MCCSまたはMCCS1は定期的向流クロマトグラフィーシステム（PCCS）であることができる。例えば、MCCSまたはMCCS1であるPCCS（すなわち、それぞれ、PCCSまたはPCCS1）は4つのクロマトグラフィーカラムを含むことができ、ここで最初の3つのカラムは流体（例えば、液体培養培地）から組換えタンパク質を捕獲するという単位操作を実行し、PCCSの4つめのカラムは組換えタンパク質を含む流体中のウィルスを不活化するという単位操作を実行する。MCCSまたはMCCS1であるPCCSはカラム切り替え機構を利用することができる。PCCシステムは、例えば、4、5、6、7、または8つのカラム、またはそれ以上までのカラムを稼働させることができる改良されたAKTAシステム（GE Healthcare, Piscataway, NJ）を利用することができる。

20

【0198】

MCCSまたはMCCS1は：1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のUV監視装置、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のバルブ、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のpH計、および／または1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の導電率計を装備することができる。MCCSまたはMCCS1はまた、（例えば、UV吸光度、液体の体積、または経過時間に基づいて）カラム切り替えがいつ起こるべきかを検知し、カラム切り替え事象に影響を及ぼす（始動させる）ためのソフトウェア（例えば、Unicornベースのソフトウェア、GE Healthcare, Piscataway, NJ）を利用するオペレーティングシステムも装備することができる。

30

【0199】

MCCSまたはMCCS1は、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20-1、20-2、20-3、または20-4）のインライン緩衝液調節リザーバおよび／または緩衝液リザーバをさらに含むことができる。他の例において、MCCSまたはMCCS1は、MCCSまたはMCCS1内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜中に容易には通過することができない流体を保持することができる1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、または6つ）の停留タンクを含むことができる。本明細書に記載のシステムはMCCS、MCCS1、および／またはMCCS2内に1つまたはそれ以上の停留タンク（例えば、本明細書に記載の停留タンク）を含むことができる。本明細書に記載のシステムの他の例は、MCCS、MCCS1、またはMCCS2内に停留タンクを含まないか、またはシステム全体に停留タンクを含まない。本明細書に記載のシステムの他の例はシステム全体に最大で1、2、3、4、または5つの停留タンク（例えば、本明細書に記載のいずれかの停留タンク（複数可）

40

50

）を含む。

【0200】

第2のMCCS

代表的なシステムにおける第2のMCCS（MCCS2）は少なくとも2つのクロマトグラフィーカラム、少なくとも2つのクロマトグラフィー膜、または少なくとも1つのクロマトグラフィーカラム（複数可）および少なくとも1つのクロマトグラフィー膜（複数可）、ならびに出口を含む。MCCS2は、本明細書に記載の代表的なMCCSのいずれかであることができ、または本明細書に記載のMCCSの代表的な特徴のいずれか1つまたはそれ以上を（任意の組合せで）有することができる。MCCS2内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は：本明細書に記載の形状、大きさ、体積（ベッド容積）、および／または単位操作のいずれか1つまたはそれ以上を有することができる。クロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的な樹脂のいずれかを含むことができる。例えば、MCCS2内に存在する1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜に含まれる樹脂は、捕獲機構（例えば、プロテインA結合捕獲機構、プロテインG結合捕獲機構、抗体もしくは抗体フラグメント結合捕獲機構、基質結合捕獲機構、補因子結合捕獲機構、タグ結合捕獲機構、および／またはアプタマー結合捕獲機構）を利用する樹脂であることができる。有用な樹脂としては、例えば、カチオン交換樹脂、アニオン交換樹脂、分子ふるい樹脂、および疎水性相互作用樹脂がある。樹脂のさらなる例は当技術分野で公知である。MCCS2内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜は同じおよび／または異なる樹脂（例えば、本明細書に記載の、または当技術分野で組換えタンパク質の精製に使用することが知られている樹脂のいずれか）を含むことができる。

【0201】

MCCS2内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は1つまたはそれ以上の単位操作（例えば、本明細書に記載の単位操作のいずれかまたは本明細書に記載の単位操作の任意の組合せ）を実行することができる。非限定例において、MCCS2は流体から組換えタンパク質を精製する、および組換えタンパク質を含む流体中に存在する組換えタンパク質をポリッシュするという単位操作を実行することができる。他の非限定例において、MCCS2は流体中に存在する組換えタンパク質を精製する、流体中に存在する組換えタンパク質をポリッシュする、および組換えタンパク質を含む流体をろ過するという単位操作を実行することができる。別の例において、MCCS2は流体中に存在する組換えタンパク質を精製する、流体中に存在する組換えタンパク質をポリッシュする、組換えタンパク質を含む流体をろ過する、および組換えタンパク質を含む流体のイオン濃度および／またはpHを調節するという単位操作を実行することができる。MCCS2は本明細書に記載または当技術分野で公知の単位操作の2つまたはそれ以上の任意の組合せを実行することができる。

【0202】

MCCS2内に存在するクロマトグラフィーカラム（複数可）および／またはクロマトグラフィー膜（複数可）は切り替え機構（例えば、カラム切り替え機構）により互いに対して連結または移動することができる。MCCS2はまた、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、または5）のポンプ（例えば、自動化された、例えば、自動化されたぜん動ポンプ）を含むこともできる。カラム切り替え事象は、MCCS2を通過する流体（例えば、MCCS2内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜への投入物および／またはそれからの溶出液）中のある特定のレベルの組換えタンパク質に対応するUV吸光度、特定の体積の液体（例えば、緩衝液）、または特定の経過時間により検出されるあるレベルの組換えタンパク質の検出によって始動させることができる。

【0203】

MCCS2は定期的向流クロマトグラフィーシステム（すなわち、PCCS2）であることができる。例えば、PCCS2は、組換えタンパク質を流体から精製するという単位操作を実行する3つのカラム、および流体中に存在する組換えタンパク質をポリッシュするという単位操作を実行するクロマトグラフィー膜を含むことができる。例えば、組換えタンパク質を流体から精製するという単位操作を実行する3つのカラムは、例えば、カチオン交換樹脂を含むことができ、ポリッシュするという単位操作を実行するクロマトグラフィー膜はカチオン交換樹脂を含むことができる。PCCS2はカラム切り替え機構を利用することができる。PCCS2は、例えば、4、5、6、7、または8つのカラム、またはそれ以上まで稼働させることができる改良されたAKTAシステム（GE Healthcare, Piscataway, NJ）を利用することができる。

10

【0204】

MCCS2は：1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のUV監視装置、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のバルブ、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のpH計、および／または1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の導電率計を装備することができる。MCCS2はまた、（例えば、UV吸光度、液体の体積、または経過時間に基づいて）カラム切り替え事象がいつ起こるべきかを検知し、カラム切り替え事象に影響を及ぼすためのソフトウェア（例えば、Unicornベースのソフトウェア、GE Healthcare, Piscataway, NJ）を利用するオペレーティングシステムを装備することもできる。

20

【0205】

MCCS2は、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20-1、20-2、20-3、または20-4）のインライン緩衝液調節リザーバおよび／または緩衝液リザーバをさらに含むことができる。他の例において、MCCS2は、MCCS2内の1つまたはそれ以上のクロマトグラフィーカラムおよび／またはクロマトグラフィー膜中に容易に通過することができない流体を保持することができる1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、または6つ）の停留タンク（例えば、本明細書に記載の停留タンクのいずれか）を含むことができる。

30

【0206】

MCCS2は、治療用タンパク質原薬がシステムを出て行くのに通ることができる出口を含む。出口は、例えば、流体管を挿入することができるネジ、リブ、もしくはシール、または精製された組換えタンパク質（例えば、治療用タンパク質原薬）を保持もしくは貯蔵するように設計されたバイアルを含むことができる。出口は、精製された組換えタンパク質（例えば、治療用タンパク質原薬）が低減したバイオバーデンのバイアルまたは貯蔵容器中に直接流入することができるように、低減したバイオバーデンのバイアルまたはその他のこのような貯蔵容器を出口に対して密閉するために使用することができる表面を含むことができる。本システムに使用することができる非限定的な出口は公知であり、当業者により理解されよう。

40

【0207】

本明細書に記載のシステムはまた、MCCS1とMCCS2との間に配置された流体管を含むこともできる。本明細書に記載の流体管のいずれも、例えば、例えばポリエチレン、ポリカーボネート、またはプラスチックで作成されたチューブであることができる。MCCS1とMCCS2との間に配置された流体管は、次のもの：流体管と流体連通しており、当該インライン緩衝液調節リザーバ（複数可）内に貯蔵されている緩衝液が流体管内に存在する流体に加えられるように位置している1つまたはそれ以上のインライン緩衝液調節リザーバ；流体管と流体連通しており、MCCS2中に容易に供給することができない、流体管内に存在するあらゆる過剰の流体を保持することができるように位置している停留タンク（例えば、本明細書に記載の停留タンク（複数可）のいずれか）；ならびに流

50

体内に存在する流体をろ過する（例えば、細菌を除去する）ことができるように流体管内に配置された1つまたはそれ以上のフィルターの1つまたはそれ以上を任意の組合せでさらに含むことができる。インライン緩衝液調節リザーバのいずれも、例えば、約0.5 L～50 Lの体積の緩衝液を（例えば、25℃、15℃、または10℃以下の温度で）含むことができる。

【0208】

本明細書に記載のシステムは場合により、MCCS2内の最終のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜と出口との間に配置された流体管を含むことができる。本明細書に記載のシステムは、MCCS2内の最終のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜と出口との間に配置された流体管と流体接続している1つまたはそれ以上のフィルターをさらに含むことができ、その結果このフィルターはMCCS2内の最終のクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィー膜と出口との間に配置された流体管中に存在する流体から、例えば沈殿した物質、微粒子状物質、または細菌を除去することができる。

10

【0209】

本明細書に提供されるシステムのいくつかの例はまた、MCCSまたはMCCS1の入口と流体連通しているバイオリアクターも含む。本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的なバイオリアクターのいずれも本システムに使用することができる。

【0210】

本明細書に提供されるシステムのいくつかの例はまたポンプシステムも含む。ポンプシステムは1つまたはそれ以上の次のもの：1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のポンプ（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知のポンプのいずれか）、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、または5つ）のフィルター（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知のフィルターのいずれか）、1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）のUV検出器、および1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、または5つ）の停留タンク（例えば、本明細書に記載の停留タンクのいずれか）を含むことができる。本明細書に提供されるシステムのいくつかの例は、ポンプとMCCSまたはMCCS1の入口との間に配置された流体管（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的な流体管のいずれか）をさらに含む。いくつかの例において、この特定の流体管は1つまたはそれ以上（例えば、2、3、または4つ）のポンプ（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知のポンプのいずれか）および／または1つまたはそれ以上（例えば、2、3、または4つ）の停留タンク（例えば、本明細書に記載の代表的な停留タンクのいずれか）を含むことができ、ここでこれらのポンプ（複数可）および／または停留タンク（複数可）は流体管内に存在する流体と流体接続している。

20

30

【0211】

本明細書に記載のシステムのいくつかの例は、ポンプと入口との間で流体管に連結されたさらなる流体管をさらに含み、このさらなる流体管の一端はバイオリアクターに流体接続し、他端はポンプと入口との間の流体管と流体接続する。このさらなる流体管は、バイオリアクターから除去された液体培養培地から細胞を除去することができるフィルター（例えば、ATF細胞保持システム）を含むことができる。

40

【0212】

本明細書に提供されるシステムによって、精製された組換えタンパク質（例えば、治療用タンパク質原薬）の連続的な生産が可能になる。当技術分野で公知のように、本システムにより、精製された組換えタンパク質（例えば、治療用タンパク質原薬）の定期的な溶出が可能になり得る。本明細書に記載のシステムはまた、少なくとも約5日、少なくとも約10日、少なくとも約15日、少なくとも約20日、少なくとも約25日、少なくとも約30日、少なくとも約40日、少なくとも約50日、少なくとも約60日、少なくとも約70日、少なくとも約80日、少なくとも約90日、または少なくとも約100日の連続的な期間にわたり、少なくとも約5 g／日、少なくとも約10 g／日、少なくとも約1

50

5 g／日、少なくとも約 20 g／日、少なくとも約 30 g／日、または少なくとも約 40 g／日の正味の収率の精製された組換えタンパク質（例えば、治療用タンパク質原薬）をもたらし得る。

【0213】

実質的に乾燥したクロマトグラフィー樹脂の使用を含む、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法

また、本明細書に、（a）実質的に乾燥したクロマトグラフィー樹脂を含む容器を、容器およびクロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露することを含む、クロマトグラフィー樹脂のバイオバーデンを低減する方法も提供される。これらの方法のいくつかの実施形態は、工程（a）に先立って、クロマトグラフィー樹脂を乾燥してクロマトグラフィー樹脂から液体を除去することをさらに含む。クロマトグラフィー樹脂の乾燥は加熱処理（例えば、オーブン）または乾燥器を用いて実行することができる。クロマトグラフィー樹脂を乾燥するための別の方法は当技術分野で公知である。

【0214】

本明細書に記載のガンマ線照射のための条件および線量のいずれもこれらの方法に使用することができる。例えば、ガンマ線照射の線量は約 15 kGy～約 45 kGy（例えば、約 20 kGy～約 30 kGy）であることができる。本明細書に記載の容器およびクロマトグラフィー樹脂のいずれもこれらの方法に使用することができる。例えば、容器は貯蔵容器またはクロマトグラフィーカラムであることができる。これらの方法におけるクロマトグラフィー樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテイン A または プロテイン G）を含むことができる。いくつかの例において、クロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂（例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むクロマトグラフィー樹脂）を含むことができる。いくつかの例において、クロマトグラフィー樹脂は物品（例えば、チップ、膜、またはカセット）の表面に共有結合される。いくつかの実施形態において、実質的に乾燥したクロマトグラフィー樹脂は有意な量の酸化防止剤も有意な量のキレート剤も含有しない。また、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂も提供される。

【0215】

いくつかの例において、生産される低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂は約 1×10^{-8} ～約 1×10^{-5} の滅菌保証レベル（SAL）（例えば、約 1×10^{-7} ～約 1×10^{-6} の SAL）を有する。生産される低減したクロマトグラフィー樹脂は：アニオン交換クロマトグラフィー樹脂、カチオン交換クロマトグラフィー樹脂、アフィニティークロマトグラフィー樹脂、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂、およびサイズ排除クロマトグラフィー樹脂からなる群から選択される少なくとも 1 種の樹脂を含むことができる。いくつかの例において、生産される低減したクロマトグラフィー樹脂はタンパク質リガンド（例えば、プロテイン A）を含むアフィニティークロマトグラフィー樹脂を含む。いくつかの例において、生産される低減したクロマトグラフィー樹脂はアニオン交換クロマトグラフィー樹脂（例えば、N-ベンジル-N-メチル-エタノールアミン基を含むアニオン交換クロマトグラフィー樹脂）を含む。また、低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを作成する方法であって、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産された低減したバイオバーデンのクロマトグラフィー樹脂を準備すること；およびそのクロマトグラフィー樹脂を殺菌環境中で低減したバイオバーデンのカラムに充填することを含む、方法も提供される。また、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムも提供される。

【0216】

また、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドな、連続的な方法であって、（a）実質的に細胞を含まない、組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；および（b）その液体培養培地を、本明細

書に提供される方法のいずれかにより生産された少なくとも1つの低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含むマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS)中に連続的に供給すること：を含み、低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、液体培養培地から、精製された組換えタンパク質であるMCCSからの溶出液まで連続的に稼動する、方法も提供される。また、精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドな、連続的な方法であって、(a)実質的に細胞を含まない、組換えタンパク質を含む液体培養培地を準備すること；(b)その液体培養培地を第1のマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS1)に連続的に供給すること；(c)MCCS1を用いて液体培養培地中の組換えタンパク質を捕獲すること；(d)組換えタンパク質を含むMCCS1から溶出液を生成し、その溶出液を第2のマルチカラムクロマトグラフィーシステム(MCCS2)に連続的に供給すること；および(e)組換えタンパク質を溶出液からMCCS2中に連続的に供給し、その後組換えタンパク質を溶出することにより精製された組換えタンパク質を生産すること：を含み、この方法は低減したバイオバーデンの緩衝液を利用し、一体化されており、液体培養培地から、精製された組換えタンパク質まで連続的に稼動し、ならびにMCCS1および／またはMCCS2内の少なくとも1つのカラムは本明細書に提供される方法のいずれかにより生産された低減したバイオバーデンの充填されたクロマトグラフィーカラムを含有する、方法も提供される。本明細書に記載の精製された組換えタンパク質を低減したバイオバーデンで製造するための一体化され、クローズドな、連続的な方法の代表的な局面のいずれもこれらの方法に使用することができる。

10

20

【0217】

低減したバイオバーデンの膜、樹脂、コートされた材料、チップ、およびカセットを生産する方法

また、本明細書に、低減したバイオバーデンの膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットを生産する方法であって、膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセット(例えば、セルロースー、アガロースー、もしくは糖をベースとする膜、樹脂、コートされた材料、チップ、もしくはカセット)；および少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤を含む組成物を含む容器を、容器および膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットのバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ線照射に曝露する：ことを含み、少なくとも1種の酸化防止剤および／またはキレート剤は、その線量のガンマ線照射への曝露後膜、樹脂、コートされた材料、チップ、およびカセットに対する損傷を改善するのに十分な量で存在する、方法も提供される。いくつかの例において、カセットは樹脂を含有するカセット(例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的な樹脂のいずれか)である。いくつかの実施形態において、膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットはその表面の少なくとも1つまたは一部に共有結合したプロテインAまたはプロテインGリガンドを含む。いくつかの実施形態において、組成物は膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセット、ならびに少なくとも1種の酸化防止剤および／または少なくとも1種のキレート剤を含む液体を含む。本明細書に記載の酸化防止剤(複数可)および／またはキレート剤(複数可)の代表的な組合せおよび濃度のいずれもこれらの方法のいずれかで使用することができる。本明細書に記載の代表的な液体のいずれもこれらの方法のいずれかで使用することができる。いくつかの実施形態において、組成物は乾燥した材料である。また、本明細書に、本明細書に記載の方法のいずれかにより生産される低減したバイオバーデンの膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットも提供される。いくつかの例において、容器は密閉された貯蔵容器または器である。

30

40

【0218】

また、本明細書に、実質的に乾燥した膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセット(例えば、セルロースー、アガロースー、または糖をベースとする膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセット)を含む容器を、容器および膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットのバイオバーデンを低減するのに十分な線量のガンマ

50

線照射に曝露する：ことを含む、低減したバイオバーデンの膜、樹脂、コートされた材料、チップ、およびカセットを生産する方法も提供される。いくつかの例は、曝露する工程に先立って膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットを乾燥する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットはその表面に共有結合しているプロテインAまたはプロテインGリガンドを含む。いくつかの例において、カセットは樹脂を含有するカセット（例えば、本明細書に記載または当技術分野で公知の代表的な樹脂のいずれか）である。また、本明細書に、本明細書に記載の方法のいずれかを用いて生産される低減したバイオバーデンの膜、樹脂、コートされた材料、チップ、またはカセットも提供される。

【0219】

以下の実施例で本発明をさらに例証するが、これらの実施例は特許請求の範囲に記載の本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0220】

いろいろなクロマトグラフィー樹脂の静的結合能力に対するガンマ線照射の効果

3つの異なるプロテインAアフィニティークロマトグラフィー樹脂：すなわち、GE Mab Select SuRe（商標）（85 μ mの粒径、およびプロテインAをアガロースに連結するエポキシ官能基を有する、高度に架橋したアガロース樹脂）、JSR Life Sciences Amsphere ProA JWT203（～50 μ mの粒径、およびプロテインAをポリメタクリレートに連結するエポキシ官能基を有する多孔質ポリメタクリレート樹脂）、ならびにKaneka KanCap A（65～85 μ mの粒径、および還元的アミノ化を介してセルロースに結合されたプロテインAを有する高度に架橋したセルロース）の静的結合能力に対するガンマ線照射の効果を試験するために一組の実験を実行した。3種の樹脂の各々を15 kGyのガンマ線照射で処理したが、Mab Select SuRe（商標）は25 kGyの放射線量で処理し、GE Mab Select SuRe（商標）樹脂のコントロールサンプルは未処理のままとし、抗-TGF β 抗体（IgG4）を装填し、溶出液中の抗-TGF β 抗体のレベルを決定した。この実施例での各々の樹脂のガンマ線照射は50 mMホスフェート、pH7.0中で実行した。ガンマ線を照射した樹脂および未処理のコントロール樹脂の各々の静的結合曲線を図1に示す。これらのデータは、ガンマ線照射が3種の試験したプロテインAクロマトグラフィー樹脂の各々の結合能力を低下させ、JSR Life Sciences Amsphere ProA JWT203樹脂が15 kGyのガンマ線照射に応答して最も小さい結合能力の低下を示すことを示している。

【0221】

JSR Life Sciences Amsphere ProA JWT203樹脂またはGE Mab Select SuRe（商標）樹脂のガンマ線照射の結果プロテインAのクロマトグラフィー樹脂からの開裂（および放出）が起こるかどうかを決定するために次の実験を実行した。これらの実験において、JSR Life Sciences Amsphere ProA JWT203樹脂またはGE Mab Select SuRe（商標）樹脂は30 kGyのガンマ線照射で処理した後、280 nmでの吸光度を測定することによって上澄み中のプロテインAのレベルを決定した。この実験からのデータは、これらの2つの試験した樹脂のいずれもガンマ線照射処理の後殆どプロテインAを放出しないことを示している（図2）。

【0222】

これらのデータは、ガンマ線照射の結果アフィニティークロマトグラフィー樹脂の結合能力が即時に低下すること、および結合能力のこのような損失は樹脂からのタンパク質リガンドの開裂に起因するのではないことを示している。

【実施例2】

【0223】

複数サイクルのクロマトグラフィーの間の樹脂の結合能力に対する複数のガンマ線照射

複数サイクルのクロマトグラフィーの間のクロマトグラフィー樹脂の結合能力に対するガンマ線照射の効果を試験するために次の一組の実験を実行した。これらの実験はJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂を用いて実行した。というのは、この樹脂が実施例1でガンマ線照射に応答して最少量の結合能力の損失を示したからである。この実施例における各々の樹脂のガンマ線照射は50mMホスフェート、pH7.0中で実行した。

【0224】

複数サイクルのクロマトグラフィーにわたってJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の抗-TGFβ抗体(IgG4)に結合する能力に対する15kGyのガンマ線照射の効果を試験するために第1の実験を実行した。未処理のJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂も陽性のコントロールとして使用して複数サイクルのクロマトグラフィーを実行した。各々のサイクルの終了時に、樹脂を0.1NのNaOHで洗浄した。各々のサイクルからの溶出液中の抗-TGFβ抗体の量を決定した。データは、15kGyのガンマ線照射の結果、JSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の結合能力は即時に(すなわち、第1のサイクルで)約20%~25%低下するが、結合能力は複数の追加のサイクルのクロマトグラフィーにわたって非常に遅い割合で(すなわち、未処理の樹脂の結合能力の低下の割合に匹敵する割合で)低下するだけであることを示している(図3、6、および7)。

【0225】

15kGyのガンマ線を照射したJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の最初のサイクルのクロマトグラフィー後の結合能力の最小の低下も、これらの実験におけるサイクル7およびサイクル11のクロマトグラフの比較から明らかである(図4および5)。これらの図は、未処理および15kGyのガンマ線を照射したJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の両方で、複数サイクルのクロマトグラフィーにわたってこれらの樹脂の結合能力の観察可能な変化があるとしても控えめなだけであることを示している。

【0226】

複数サイクルのクロマトグラフィーにわたる、未処理のまま、または29kGyのガンマ線照射で処理したJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の結合能力の変化を試験するために追加の実験を実行した。これらの実験では、各々のサイクルの終了時に樹脂を0.1NのNaOHで洗浄し、各々のサイクルの開始時に樹脂に抗-αβTCRモノクローナル抗体(IgG1)を装填した。得られたデータは再び、未処理の樹脂と比較して、29kGyのガンマ線を照射した樹脂の結合能力の約20%~25%の最初の降下を示す(図8)。未処理および29kGyのガンマ線を照射した樹脂の結合能力は複数の追加のサイクルのクロマトグラフィーの間(未処理および29kGyのガンマ線を照射した樹脂に対してほぼ同じ割合で)控えめに低下したのみである(図8)。

【0227】

複数サイクルのクロマトグラフィーにわたって、未処理の、15kGyのガンマ線を照射した、および29kGyのガンマ線を照射したJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の結合能力を試験するために最終の組の実験を実行した。各々のサイクルの終了時に樹脂を0.1NのNaOHで洗浄し、樹脂にモノクローナル抗-TGFβ(IgG4)抗体またはモノクローナル抗-αβTCR(IgG1)抗体(abTCR)のいずれかを装填した。データは、15kGyおよび29kGyのガンマ線照射による照射の結果JSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の結合能力が実質的に同じレベルで低下すること、また、15kGyおよび29kGyのガンマ線を照射したJSRLifeSciences Amsphere ProA JWT203樹脂の結合能力のレベルが複数サイクルのクロマトグラフィーにわたって未処理の樹脂と同じ割合で控えめに低下すること(図9)

を示している。

【0228】

これらのデータは、タンパク質リガンドを有するクロマトグラフィー樹脂のガンマ線照射の結果結合能力が即時に低下すること、また、結合能力の損失が複数ラウンドのクロマトグラフィーにわたって比較的安定なままであることを示している。これらのデータは、ガンマ線照射の結果ガンマ線照射中にクロマトグラフィー樹脂（例えば、アフィニティークロマトグラフィー樹脂のような、タンパク質またはペプチドリガンドを含有するクロマトグラフィー樹脂）に対して酸化的損傷が起こること、また、ガンマ線照射中のクロマトグラフィー樹脂（例えば、アフィニティークロマトグラフィー樹脂のような、タンパク質またはペプチドリガンドを含有するクロマトグラフィー樹脂）の結合能力の損失が少なくとも1種のキレート剤および／または酸化防止剤の存在下でクロマトグラフィー樹脂にガンマ線を照射することによって防止、改善、または低減することができるということを示唆している。

10

【実施例3】

【0229】

GE Mab Select SuRe（商標）樹脂の結合能力に対するガンマ線照射の効果

複数サイクルのクロマトグラフィーの間の別のタンパク質リガンドクロマトグラフィー樹脂（GE Mab Select SuRe（商標）樹脂）の結合能力に対するガンマ線照射の効果を決定するために一組の実験を実行した。樹脂を50mMリン酸ナトリウム、pH7.0中に交換した後、30mLのNalgeneボトル内で29kGyのガンマ線照射により処理した。次いで、樹脂を直径0.66cm、床高さ3cmのカラム（1mLカラム）に充填した。その後このカラムを、複数サイクルのクロマトグラフィーにわたって細胞培養培地中のモノクローナルIgG1抗体を捕獲するのに使用した。未処理のGE Mab Select SuRe（商標）樹脂も陽性のコントロールとして使用して複数のサイクルのクロマトグラフィーを実行した。各々のサイクルの終了時に、樹脂を0.1NのNaOHで洗浄した。各々のサイクルからの溶出液中のIgG1の量を決定した。データは、29kGyのガンマ線照射の結果GE Mab Select SuRe（商標）樹脂の結合能力が即時に（すなわち、第1のサイクルで）約25%～約30%低下したことを示している。（図11および12）。第1のサイクルのクロマトグラフィーの後、29kGyのガンマ線を照射したGE Mab Select SuRe（商標）樹脂は複数の追加のサイクルのクロマトグラフィーにわたり結合能力の非常に遅い割合（すなわち、複数のクロマトグラフィーサイクルの間の未処理の樹脂の結合能力の低下の割合に匹敵する割合）の低下を示したのみである（図11および12）。これらのデータは実施例2に記載したJSRプロテインA樹脂に対して得られたデータと同様であり、ガンマ線照射に起因する樹脂結合能力の損失の機構は類似であるように見える。

20

30

【実施例4】

【0230】

Mab Select SuRe（商標）LX樹脂の静的結合能力に対するガンマ線照射の効果

40

実施例1に記載したデータは、ガンマ線照射が3つの異なるプロテインAクロマトグラフィー樹脂（GE Mab Select SuRe（商標）、JSR Life Sciences Amsphere（商標）ProA JWT203、およびKaneka KanCapA（商標））の静的結合能力を低下させることを示している。ガンマ線照射を別のプロテインAクロマトグラフィー樹脂：GE Mab Select SuRe（商標）LXで試験した。GE Mab Select SuRe（商標）LX樹脂はアガロース骨格およびMab Select SuRe（商標）樹脂と同様なプロテインAリガンドを有しているが、Mab Select SuRe（商標）樹脂と比較してそれより高いリガンド密度を有する。樹脂緩衝液を20%エタノールから50mMリン酸ナトリウム、pH6.0に交換した後、29kGyのガンマ線照射に供した。樹脂の静的結合

50

は実施例 1 に記載したように決定した（但し、樹脂の静的結合能力はガンマ線照射の前後に決定した）。データは、ガンマ線照射の後樹脂の静的結合能力の同様な降下を示す（図 13）。この GE Mab Select SuRe（商標）LX 樹脂の静的結合能力のガンマ線照射で誘発された低下は、実施例 1 で試験したガンマ線照射後の 3 つのプロテイン A クロマトグラフィー樹脂で観察された静的結合能力の降下と同様である（図 1）。図 13 のデータは、Mab Select SuRe（商標）LX のガンマ線照射の結果樹脂の静的結合能力が即時に低下することを示している。

【実施例 5】

【0231】

クロマトグラフィー樹脂の結合能力のガンマ線照射で誘発される低下の低減

10

先の実施例のデータは、樹脂のバイオバーデンを低減する線量でのクロマトグラフィー樹脂のガンマ線照射が、樹脂の結合能力の降下：すなわち、コントロールの未処理樹脂の結合能力と比較して約 20%～約 40% の樹脂の結合能力の低下も起こすことを示している。ガンマ線照射により引き起こされる結合能力の低下の程度は樹脂に結合したプロテイン A リガンドおよび／または樹脂のビーズ化学に依存するようには見えない。この追加の組の実験は、ガンマ線照射の間に起こるクロマトグラフィー樹脂の結合能力の損失を防止する緩衝溶液を確認するために実行した。これらの実験で GE Mab Select SuRe（商標）LX をクロマトグラフィー樹脂として使用した。GE Mab Select SuRe（商標）LX は各々のビーズの多孔質マトリクス上に共有結合的に固定化されたプロテイン A を有する。この樹脂は最初に 20% エタノールから 1 つまたはそれ

20

以上の酸化防止剤を含む異なる緩衝液または酸化防止剤を含まないコントロールの緩衝液に緩衝液を交換した。試験した緩衝溶液を下記表 1 に示す。コントロール実験では、酸化防止剤の不在下で乾燥した組成物として樹脂にガンマ線を照射した。これらの樹脂サンプルを、含水率がガンマ線照射の間最小になるように 23℃ のオーブンで 2 日間乾燥した。表 1 に示した各々の樹脂サンプルに 30 mL の Nalgene ボトル内で 29 kGy の線量のガンマ線を照射した。実施例 1 に記載した方法を用いてガンマ線を照射した樹脂サンプルおよび未処理の（非照射の）樹脂サンプルに対して静的結合能力を決定した。

【0232】

【表 1】

表 1.試験した GE Mab Select SuRe(商標)LX 樹脂サンプルおよび緩衝溶液

樹脂	ベース緩衝液	クエンチャー
バージンの MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	なし
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	なし
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM マンニトール
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM メチオニン
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM アスコルビン酸 ナトリウム
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM ヒスチジン
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	50mM メチオニン+50mM ヒスチジン
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	33mM メチオニン+33mM ヒスチジン+33mM アスコル ビン酸ナトリウム
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	25mM アスコルビン酸 ナトリウム+25mM メチオニン +25mM マンニトール+25mM ヒスチジン
乾燥したバージンの MabSelect SuRe LX	なし	なし
乾燥した 29kGY MabSelect SuRe LX	なし	なし

【0233】

データは、1種またはそれ以上の酸化防止剤の存在下でクロマトグラフィー樹脂をガンマ線照射するとガンマ線照射により引き起こされる結合能力の損失を減少させることを示している（図14および表2）。25mMアスコルビン酸ナトリウム、25mMメチオニン、25mMマンニトール、25mMヒスチジン、50mMリン酸ナトリウム、pH6.0の緩衝液（以後「SMMH」緩衝液という）は樹脂の結合能力のガンマ線照射で誘発される損失を完全に軽減した（すなわち、未処理のコントロール樹脂と、SMMH緩衝液の存在下で29kGyの線量のガンマ線を照射した樹脂との間には結合能力の損失が全く観察されなかった）（図14および表2）。29kGyのガンマ線を照射した乾燥樹脂サンプルは未処理の樹脂サンプルと同じ結合能力を有していた。これらのデータは、乾燥したクロマトグラフィー樹脂のガンマ線照射が樹脂の結合能力のガンマ線照射で誘発される損失の程度を減少させる別の手段であることを示している。

【0234】

【表 2】

表 2.試験した GE Mab Select SuRe(商標)LX 樹脂サンプルの比結合能力

樹脂	ベース緩衝液	クエンチャー	SBC(mg/mL)
バージンの MabSelect SuRe	50mM リン酸ナトリウム, pH7.0	なし	50
29kGy MabSelect SuRe	50mM リン酸ナトリウム, pH7.0	なし	32.8
バージンの MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	なし	70
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	なし	53
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM マンニトール	57
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM メチオニン	64.5
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM アスコルビン酸 ナトリウム	66
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	100mM ヒスチジン	69
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	50mM メチオニン+50mM ヒスチジン	63.5
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	33mM メチオニン+33mM ヒスチジン+33mM アスコル ビン酸ナトリウム	69
29kGY MabSelect SuRe LX	50mM リン酸ナトリウム, pH6.0	25mM アスコルビン酸 ナトリウム+25mM メチオ ニン+25mM マンニトール +25mM ヒスチジン	74
乾燥したバージンの MabSelect SuRe LX	なし	なし	75
乾燥した 29kGY MabSelect SuRe LX	なし	なし	74

【 0 2 3 5 】

複数のクロマトグラフィーサイクルにわたる SMMH 緩衝液の存在下で 29 kGy の線量でガンマ線を照射した樹脂および未処理の樹脂の性能を試験するためにさらなる実験を実行した。各々の試験した樹脂を 0.66-cm の直径、3-cm の高さのカラムに充填した。カラムにモノクローナル IgG1 抗体を含有する細胞培養培地を装填した。静的結合能力実験で観察されたように（図 14）、動的結合能力は全てのサイクルの間未処理の樹脂と、SMMH 緩衝液の存在下で 29 kGy の線量のガンマ線を照射した樹脂とで匹敵していた（図 15 および 16）。加えて、他の重要な品質およびプロセス性能指標：サイズ排除クロマトグラフィー—高性能液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）で測定

される高分子量化学種の割合および溶出液中の宿主細胞タンパク質（HCP）の濃度も匹敵していた（表3）。図17は、未処理の樹脂およびSMMH緩衝液の存在下で29kGyの線量のガンマ線を照射した樹脂からの複数のサイクルにわたる溶出液の匹敵する純度を示す非変性ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルである。

【0236】

【表3】

表3.未処理のGE Mab Select SuRe(商標)LX樹脂およびSMMH緩衝液の存在下でガンマ線を照射したGE Mab Select SuRe(商標)LX樹脂の高分子量化学種および溶出液中の宿主細胞タンパク質の割合

プロテインA溶出液	% HMWS	HCP (ng/mg)	プロテインA溶出液	% HMWS	HCP (ng/mg)
バージン溶出サイクル1	1.55	173	SMMH溶出サイクル1	1.82	107.6
バージン溶出サイクル3	1.73	247.2	SMMH溶出サイクル2	1.75	N/A
バージン溶出サイクル5	1.89	289.5	SMMH溶出サイクル3	1.59	146.2

高分子量化学種の割合(%)は Tosoh G3000 SWxl カラムを用いてサイズ排除クロマトグラフィー-高性能液体クロマトグラフィー(SEC-HPLC)によって測定し、宿主細胞タンパク質濃度は ELISA アッセイを用いて測定した。

【0237】

クロマトグラフィー樹脂の結合能力のガンマ線照射で誘発される損失を低減する能力について追加の緩衝溶液を試験した。これらの実験では、単一のクロマトグラフィーサイクルを実行して結合能力を動的モードで決定した。各々の試験した緩衝液について、上記と同様なカラム（0.66-cm直径×3-cm高さ）に充填し、モノクローナルIgG1を含有する細胞培養培地を装填した。静的結合能力実験で観察されたように（図14）、少なくとも1種の酸化防止剤を含有する各々の緩衝液はガンマ線照射により引き起こされる樹脂の結合能力の損失を低減した（表4）。これらのデータは、少なくとも1種の酸化防止剤の存在がガンマ線照射により引き起こされる樹脂の結合能力の損失を低減することができるということを示している。加えて、これらのデータはまた、（酸化還元活性金属に結合して反応性の酸素および窒素種を生成するのを防止する）キレート剤もまたガンマ線照射により引き起こされる樹脂の結合能力の損失を減少させることができるということも示唆している。

【0238】

10

20

30

【表 4】

表 4. IgG1 を含有する細胞培養物収穫物を用いた GE MabSelect SuRe LX 樹脂(未処理およびクエンチャーの存在下または不在下での 29kGy 照射)での単一のクロマトグラフィーサイクルのデータ

樹脂条件	溶出液中の タンパク質 (mg)	結合した タンパク質 (mg)
バージンの MabSelect SuRe LX	70	68
SMMH を用いた 29kGy MabSelect SuRe LX	69	67
100mM のヒスチジンをを用いた 29kGy MabSelect SuRe LX	68	67
100mM のメチオニンをを用いた 29kGy MabSelect SuRe LX	64	63
100mM の SA をを用いた 29kGy MabSelect SuRe LX	62	61
29kGY MabSelect SuRe LX	51	51

【0239】

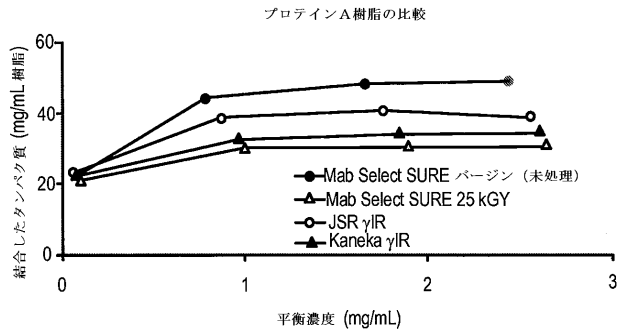
概して、これらのデータは、少なくとも 1 種の酸化防止剤および／または少なくとも 1 種のキレート剤の存在下でのクロマトグラフィー樹脂のガンマ線照射が、ガンマ線照射により引き起こされる樹脂の結合能力の損失を減少させることができるということを示唆している。データはまた、少なくとも 1 種の酸化防止剤および／または少なくとも 1 種のキレート剤の存在が、固定化されたプロテイン A リガンド、ならびに樹脂ベースマトリクスを、ガンマ線照射中に形成されるフリーラジカルにより引き起こされる損傷から保護することも示唆している。少なくとも 1 種の酸化防止剤および／または少なくとも 1 種のキレート剤の存在はまた、マトリクスおよび／または官能基に対して損傷を引き起こす可能性がある線量での材料のガンマ線照射を含む他のバイオプロセス用途にも使用することができる。例えば、少なくとも 1 種の酸化防止剤および／または少なくとも 1 種のキレート剤を含有する組成物は、セルロース膜およびその他のセルロースー、アガロースー、もしくは糖をベースとする樹脂、膜、または材料に対するガンマ線照射で誘発される損傷を防止するために使用することができる。

【0240】

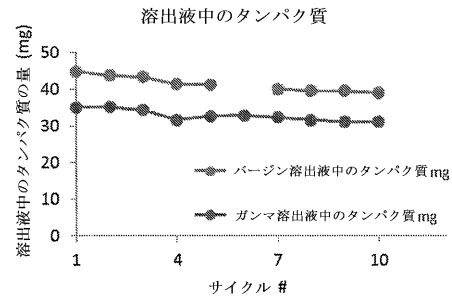
他の実施形態

本発明をその詳細な説明と共に記載して来たが、以上の記載は説明することを意図したものであり、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲を限定するものではないことと理解されたい。他の局面、利点、および変更は以下の特許請求の範囲内に入る。

【図 1】



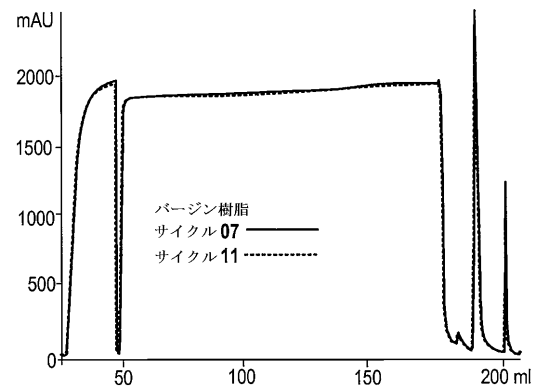
【図 3】



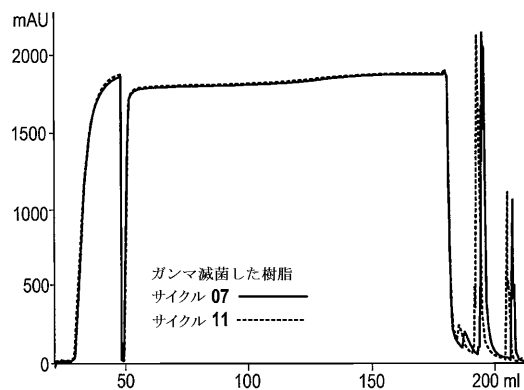
【図 2】

樹脂	A ₂₈₀
Mab Select SuRe (30 kGY)	0.07
JSR Amsphere (30 kGY)	0.14

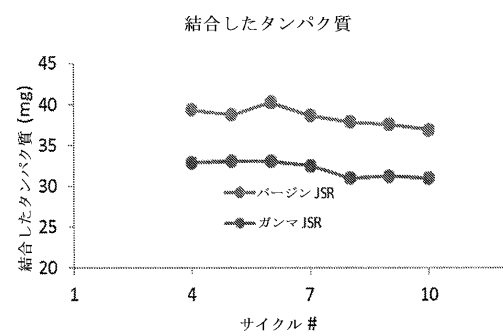
【図 4】



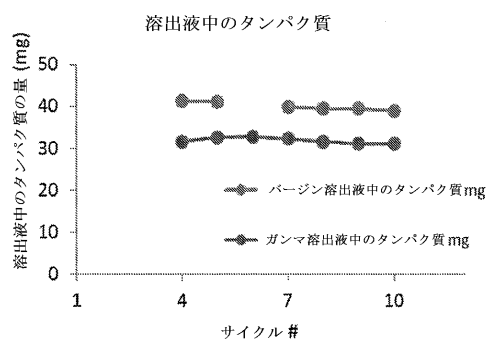
【図 5】



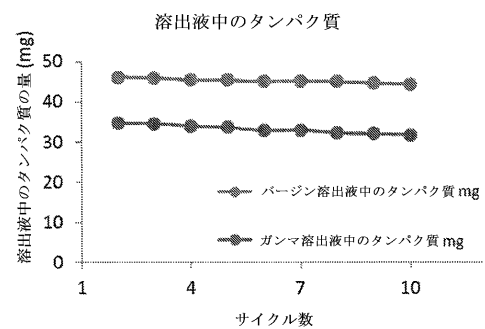
【図 7】



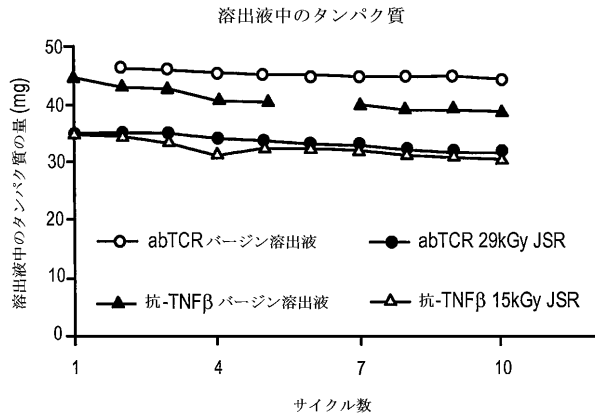
【図 6】



【図 8】



【図 9】

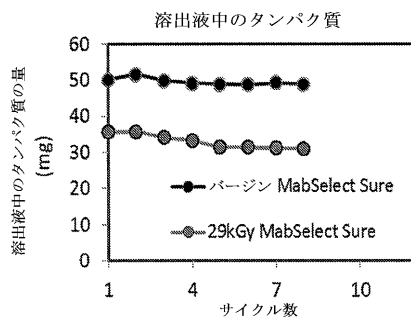


【図 10】

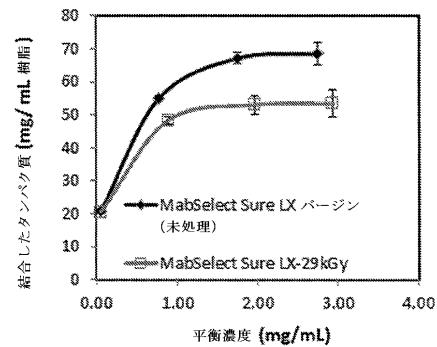
リソソーム貯蔵疾患および関連する酵素欠陥	
疾患	酵素欠陥
ポンペ病	酸性α-グルコシダーゼ (例えば Myozyme®, Lumizyme®)
MPSI* (ハーラー病)	α-L-イズロニダーゼ (例えば Aldurazyme®)
MPSII (ハンター病)	イズロン酸スルファターゼ
MPSIII (サンフィリポ)	ヘパランN-スルファターゼ
MPS IV (モルキオ A)	ガラクトース-6-スルファターゼ
MPS IV (モルキオ B)	酸性β-ガラクトシダーゼ
MPS VII (スライ病)	β-グルコニダーゼ
I 細胞病	N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ
シンドラー病	α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ (α-ガラクトシダーゼ B)
ウォルマン病	酸性リパーゼ
コレステロールエステル蓄積症	酸性リパーゼ
ファバー病	リソソーム酸性セラミダーゼ
ニーマン・ピック病	酸性スフィンゴミエリナーゼ
ゴーシェ病	β-グルコシダーゼ (例えば Cerezyme®, Ceredase®)
クラッペ病	ガラクトシルセラミダーゼ
ファブリー病	α-ガラクトシダーゼ A
GM1 ガングリオシドーシス	酸性β-ガラクトシダーゼ
ガラクトシアリドーシス	β-ガラクトシダーゼおよびニューラミニダーゼ
テイ・サックス病	ヘキシサミニダーゼ A
サンドホフ病	ヘキシサミニダーゼ A および B

*MPS = ムコ多糖症

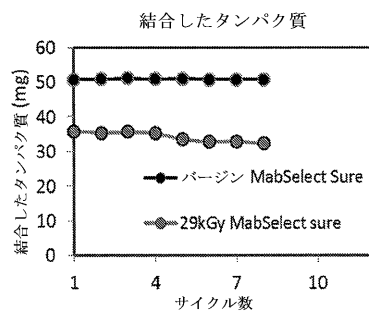
【図 11】



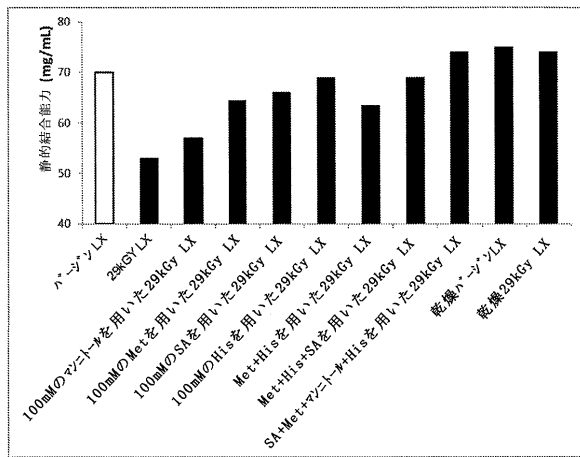
【図 13】



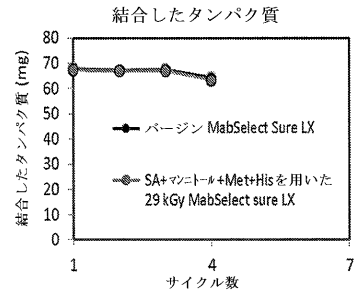
【図 12】



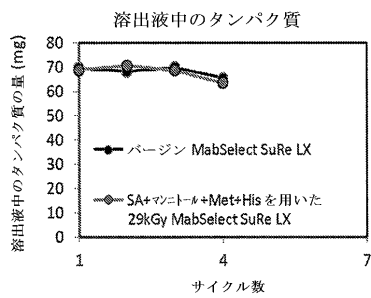
【図 1 4】



【図 1 6】

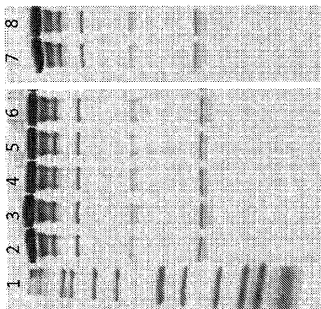


【図 1 5】



【図 1 7】

レーン	サンプル
1	マーカー
2	バージン LX 溶出 サイクル2
3	バージン LX 溶出 サイクル3
4	バージン LX 溶出 サイクル6
5	29 kGy SMMH サイクル2
6	29kGy SMMH サイクル3
7	バージン LX サイクル1
8	29kGy SMMH サイクル1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/011705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. B01D15/18 B01D15/20 A61L2/08
ADD.

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)

B01D A61L

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/045546 A1 (PROMETIC BIOSCIENCES LTD [GB]; BURTON MARK [GB]) 5 June 2003 (2003-06-05)	1-7, 13, 14, 17, 19-27, 30-37, 40, 42-44, 50, 51
Y	page 2, line 18 - line 31 page 3, line 30 - page 5, line 6 page 6, line 1 - line 9 examples	15, 16, 18, 29, 38, 39, 41, 52, 53
A	----- -/--	8-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family 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 application or patent 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

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2015

Date of mailing of the international search report

30/04/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fourgeaud, Damien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/011705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2012/255642 A1 (GEBAUER KLAUS [SE]) 11 October 2012 (2012-10-11) paragraph [0024] - paragraph [0025] paragraph [0040] table 1b	24-33, 54-64 15,16, 29,38, 39,52, 53,65-92
X Y	----- US 2007/244307 A1 (ENGSTRAND CARINA [SE] ET AL) 18 October 2007 (2007-10-18) paragraph [0040] - paragraph [0042]; claims 14,15,26; examples	24-27, 30,31 18,41
A	----- US 2013/068671 A1 (GEBAUER KLAUS [SE] ET AL) 21 March 2013 (2013-03-21) paragraph [0085] paragraph [0104]	1-92
X	----- DEGENHARDT A ET AL: "SEPARATION AND PURIFICATION OF ANTHOCYANINS BY HIGH-SPEED COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY AND SCREENING FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 48, no. 2, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 338-343, XP002906738, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/JF990876T paragraph CCC; page 339, left-hand column	42-45, 49,51
X	----- A KOSTOVA ET AL: "Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixturesI. Adsorption isotherms", SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY, vol. 54, no. 3, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 340-348, XP055182781, ISSN: 1383-5866, DOI: 10.1016/j.seppur.2006.10.005 the whole document	42,43, 46-49
X	----- STYSKIN E L ET AL: "Gas chromatography of phenolic antioxidants", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 77, no. 1, 14 March 1973 (1973-03-14) , pages 11-19, XP026480260, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)93926-8 [retrieved on 1973-03-14] abstract; table 1	42,45,51
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/011705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI 10 May 1995 (1995-05-10) Thomson Scientific, London, GB; AN 1996-018874 XP002738451, & RU 2 034 853 C1 (TOMSK ENG CONS MAT RES INST) 10 May 1995 (1995-05-10)	24
A	abstract	1
Y	----- EP 2 682 168 A1 (MILLIPORE CORP [US]) 8 January 2014 (2014-01-08) paragraph [0160] - paragraph [0170]; claims -----	65-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/011705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03045546	A1	05-06-2003	AU 2002343100 A1 10-06-2003 WO 03045546 A1 05-06-2003
US 2012255642	A1	11-10-2012	CA 2781707 A1 30-06-2011 CN 102655919 A 05-09-2012 EP 2516034 A1 31-10-2012 GB 2476580 A 29-06-2011 GB 2499339 A 14-08-2013 JP 2013515251 A 02-05-2013 US 2012255642 A1 11-10-2012 WO 2011076386 A1 30-06-2011
US 2007244307	A1	18-10-2007	AU 2005296351 A1 27-04-2006 AU 2005296352 A1 27-04-2006 BR P10518207 A 04-11-2008 BR P10518216 A 04-11-2008 CA 2582113 A1 27-04-2006 CA 2583578 A1 27-04-2006 EP 1807205 A1 18-07-2007 EP 1827691 A1 05-09-2007 JP 4831436 B2 07-12-2011 JP 5064225 B2 31-10-2012 JP 2008517906 A 29-05-2008 JP 2008518885 A 05-06-2008 KR 20070067159 A 27-06-2007 KR 20070072532 A 04-07-2007 RU 2007112990 A 27-11-2008 RU 2007112991 A 27-11-2008 RU 2010110437 A 27-09-2011 US 2007244307 A1 18-10-2007 US 2007259453 A1 08-11-2007 US 2011118442 A1 19-05-2011 US 2015073128 A1 12-03-2015 WO 2006043895 A1 27-04-2006 WO 2006043896 A1 27-04-2006
US 2013068671	A1	21-03-2013	CN 102947696 A 27-02-2013 EP 2577289 A1 10-04-2013 JP 2013527473 A 27-06-2013 US 2013068671 A1 21-03-2013 WO 2011152788 A1 08-12-2011
RU 2034853	C1	10-05-1995	NONE
EP 2682168	A1	08-01-2014	CA 2882552 A1 03-01-2014 CN 104395341 A 04-03-2015 EP 2682168 A1 08-01-2014 EP 2867256 A1 06-05-2015 WO 2014004281 A1 03-01-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
B 0 1 J 20/26 (2006.01)	B 0 1 D	15/36	
B 0 1 J 20/34 (2006.01)	B 0 1 D	15/38	
B 0 1 D 15/34 (2006.01)	B 0 1 J	20/26	H
	B 0 1 J	20/34	G
	B 0 1 D	15/34	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, KR, 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

- (72)発明者 ヴィーナ・ワリコー
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター. メールコード: 55エー
505エー. コーポレートドライブ55. サノフィ
- (72)発明者 ロハン・パティル
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター. メールコード: 55エー
505エー. コーポレートドライブ55. サノフィ
- (72)発明者 コンスタンティン・コンスタンティノフ
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター. メールコード: 55エー
505エー. コーポレートドライブ55. サノフィ
- (72)発明者 ヴェンカット・キショア・リヤカラ
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター. メールコード: 55エー
505エー. コーポレートドライブ55. サノフィ

Fターム(参考) 4C058 AA24 BB06 KK03 KK21 KK42
4D017 AA09 BA07 CA14 DA03 DB10 EA05
4G066 AA04D AA50D AB01D AB02D AB05D AB06D AB07D AB09D AB10D AB11D
AB13D AB16D AB26D AB27D AC02C AC03B AC03D AC17C AC33C AC35C
AC37C BA36 CA54 DA07 EA02 GA11

【要約の続き】

される。