

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-535526
(P2022-535526A)

(43)公表日 令和4年8月9日(2022.8.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	1/18 (2006.01)	C 0 7 K	1/18	4 B 0 6 4	
C 0 7 K	1/22 (2006.01)	C 0 7 K	1/22	4 D 0 1 7	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	4 H 0 4 5	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		
B 0 1 D	15/20 (2006.01)	B 0 1 D	15/20		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全129頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-571606(P2021-571606)	(71)出願人	509012625
(86)(22)出願日	令和2年6月4日(2020.6.4)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年1月31日(2022.1.31)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/036126		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87)国際公開番号	WO2020/247634		ウェイ 1
(87)国際公開日	令和2年12月10日(2020.12.10)	(74)代理人	110002077
(31)優先権主張番号	62/857,734		園田・小林特許業務法人
(32)優先日	令和1年6月5日(2019.6.5)	(72)発明者	ウォン, マーク エル.
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		8 0, サウス サンフランシスコ, デ
	最終頁に続く	(72)発明者	キチョ, ドナ エフ.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
			8 0, サウス サンフランシスコ, デ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 過負荷クロマトグラフィーカラムの再生のための方法

(57)【要約】

本発明は、再利用のためにクロマトグラフィー材料を洗浄または再生するための方法を提供する。本発明の方法は、イオン交換クロマトグラフィーカラムを、イオン交換クロマトグラフィーカラムが過負荷モードで使用される複数のポリペプチド製品の大規模製造において再利用するために、洗浄または再生するために使用し得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であって、前記クロマトグラフィー材料がポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、前記方法が、

a) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液が酢酸ナトリウム (NaOAc) を含む、ステップ、

b) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

c) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記再生緩衝液が約 50 ～ 約 600 mM の NaOAc を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 4.0 ～ 11 である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 8.3 である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

約 3 ～ 約 12 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

約 10 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

約 2 ～ 約 12 材料体積の消毒緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 1 ～ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であって、前記クロマトグラフィー材料がポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、前記方法が、

a) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

b) 酸洗浄液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、

c) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH および約 1 M の NaCl を含む、ステップ、ならびに

d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって

40

50

、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【請求項 13】

前記再生緩衝液および第 2 の再生緩衝液が、約 25 ～ 約 600 mM の NaOAc を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記再生緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、請求項 12 または 13 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 2.0 ～ 7.0 である、請求項 12 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 4.0 である、請求項 12 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

約 3 ～ 約 12 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 12 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

約 7 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 12 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記酸洗浄液が約 1.67 M の NaOAc および約 0.3 M のリン酸である、請求項 12 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

約 1 ～ 約 5 材料体積の前記酸洗浄液が、前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 12 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

約 3 材料体積の前記酸洗浄液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 12 ～ 21 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 23】

約 2 ～ 約 12 材料体積の消毒緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 12 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

約 4 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 12 ～ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 1 ～ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 12 ～ 24 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 3 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 12 ～ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であって、前記クロマトグラフィー材料がポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、前記方法が、

a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消

50

毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、ならびに

c) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【請求項 28】

前記再生緩衝液が約 25 ～ 約 75 mM のトリスおよび約 50 ～ 約 100 mM の NaOAc を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記再生緩衝液が、約 50 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 7 ～ 9 である、請求項 27 ～ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 8.0 である、請求項 27 ～ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

約 3 ～ 約 12 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 27 ～ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

約 10 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 27 ～ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

約 2 ～ 約 12 材料体積の消毒緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 27 ～ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 27 ～ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 1 ～ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 27 ～ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 27 ～ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、前記方法が、

a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、

c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、

e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

f) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

g) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【請求項 39】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成

10

20

30

40

50

物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、前記方法が、

- a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、
- c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、
- d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および
- g) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

10

【請求項 40】

前記負荷密度が 70 g/L 以上である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、前記方法が、

- a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ
- c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、
- d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および
- g) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

20

30

【請求項 42】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の少なくとも約 2 倍である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の約 2 倍～約 100 倍である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の約 10 倍である、請求項 42 に記載の方法。

40

【請求項 45】

前記平衡化緩衝液が、約 20 mM ～約 60 mM の酢酸ナトリウムを含む、請求項 38～44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

前記平衡化緩衝液が約 40 mM の酢酸ナトリウムを含む、請求項 38～45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記平衡化緩衝液の pH が約 $\text{pH } 5.0$ ～約 $\text{pH } 6.0$ である、請求項 38～46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

50

前記平衡化緩衝液のpHが約pH5.5である、請求項38～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が約3～7材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、請求項38～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約5材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、請求項38～49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

前記再生緩衝液が約50～約600mMのNaOAcを含む、請求項38～50のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項52】

前記再生緩衝液が約350mMのNaOAcを含む、請求項38～51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

前記再生緩衝液のpHが約pH4.0～11である、請求項38～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

前記再生緩衝液のpHが約pH8.3である、請求項38～53のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項55】

約3～約12材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項38～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

約10材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項38～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

約2～約12材料体積の消毒緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項38～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

約10材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項38～57のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項59】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項38～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約4材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項38～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、前記方法が、

40

a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、

b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ

c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、

e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

50

f) 酸洗浄液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、

g) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH および約 1 M の NaCl を含む、ステップ、ならびに

h) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【請求項 62】

前記負荷密度が約 1000 g / L 以下である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記負荷密度が約 20 g / L 以上である、請求項 61 または 62 に記載の方法。

10

【請求項 64】

前記負荷密度が約 70 g / L 以上である、請求項 61 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の少なくとも約 2 倍である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 66】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の約 2 倍 ~ 約 100 倍である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 67】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の約 10 倍である、請求項 61 に記載の方法。

20

【請求項 68】

前記平衡化緩衝液が、約 50 mM ~ 約 100 mM の NaOAc および約 25 mM ~ 約 75 mM のトリスを含む、請求項 61 ~ 67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

前記平衡化緩衝液が約 85 mM の酢酸ナトリウムおよび約 50 mM のトリスを含む、請求項 61 ~ 68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記平衡化緩衝液の pH が約 pH 6.0 ~ 約 pH 10.0 である、請求項 61 ~ 69 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 71】

前記平衡化緩衝液の pH が約 pH 8.0 である、請求項 61 ~ 70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 5 ~ 約 15 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、請求項 61 ~ 71 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が約 10 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、請求項 61 ~ 72 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 74】

前記再生緩衝液が約 25 ~ 約 600 mM の NaOAc を含む、請求項 61 ~ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

前記再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、請求項 61 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

前記再生緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、請求項 61 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

50

前記再生緩衝液のpHが約pH2.0～7.0である、請求項61～76のいずれか一項に記載の方法。

【請求項78】

前記再生緩衝液のpHが約pH4.0である、請求項61～77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項79】

約3～約12材料体積の前記再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項61～78のいずれか一項に記載の方法。

【請求項80】

約7材料体積の前記再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項61～79のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項81】

前記酸洗浄液が約167MのNaOAcおよび約0.3Mのリン酸である、請求項61～80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項82】

約1～約5材料体積の前記酸洗浄液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項61～81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項83】

約3材料体積の前記酸洗浄液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項61～82のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項84】

約2～約12材料体積の消毒緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項61～83のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

約4材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項61～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項86】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項61～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約3材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項61～86のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項88】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、前記方法が、

- a) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、
- c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、
- d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、ならびに
- g) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む、方法。

40

【請求項89】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフ

50

イー材料が再利用に適しており、前記方法が、

- a) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、
- c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、
- d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、ならびに
- g) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【請求項 90】

前記負荷密度が 70 g/L 以上である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物から前記ポリペプチドを精製するための方法であって、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、前記方法が、

- a) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 前記組成物を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ
- c) 前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、
- d) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液を前記イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、前記消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、ならびに
- g) 前記イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、前記保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【請求項 92】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の少なくとも約 2 倍である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の約 2 倍～約 100 倍である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 94】

前記負荷密度が、前記ポリペプチドに対する前記イオン交換クロマトグラフィー材料の前記動的結合容量の約 10 倍である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 95】

前記平衡化緩衝液が約 20 mM ～約 60 mM の酢酸ナトリウムを含む、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 96】

前記平衡化緩衝液が約 40 mM の酢酸ナトリウムを含む、請求項 88～95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

前記平衡化緩衝液の pH が約 $\text{pH } 5.0$ ～約 $\text{pH } 6.0$ である、請求項 88～96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記平衡化緩衝液の pH が約 $\text{pH } 5.5$ である、請求項 88～97 のいずれか一項に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 99】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 3 ～ 7 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、請求項 88 ～ 98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 5 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、請求項 88 ～ 99 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 101】

前記再生緩衝液が約 25 ～ 約 75 mM のトリスおよび約 50 ～ 約 100 mM の NaOAc を含む、請求項 88 ～ 100 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 102】

前記再生緩衝液が約 50 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、請求項 88 ～ 101 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 7 ～ 9 である、請求項 88 ～ 102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記再生緩衝液の pH が約 pH 8.0 である、請求項 88 ～ 103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

20

約 3 ～ 約 12 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 88 ～ 104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

約 10 材料体積の再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 88 ～ 105 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

約 2 ～ 約 12 材料体積の消毒緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 88 ～ 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液が前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項 88 ～ 107 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 109】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 1 ～ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 88 ～ 108 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 110】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される、請求項 88 ～ 109 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料がクロマトグラフィーカラム内にある、請求項 1 ～ 110 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 112】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が陽イオン交換クロマトグラフィー材料である、請求項 1 ～ 111 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 113】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が支持マトリックスに連結されたスルホプロピル部分を含む、請求項 1 ～ 112 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

前記支持マトリックスが架橋ポリ（スチレンジビニルベンゼン）を含む、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

50

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が P O R O S (商標) H S 5 0 材料である、請求項 1 ～ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、混合モード陽イオン交換材料である、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記混合モード陽イオン交換材料が、C a p t o M M C (商標)、C a p t o M M C (商標) I m p R e s、N u v i a (商標) c P r i m e (商標)、または T o y o p e a r l M X T r p - 6 5 0 M である、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が陰イオン交換クロマトグラフィー材料である、請求項 1 ～ 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、支持マトリックスに連結された、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミンもしくは第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、またはジエチルアミノエチル官能基を含む、請求項 1 ～ 1 1 1、または 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、混合モード陰イオン交換材料である、請求項 1 ～ 1 1 1、1 1 8 または 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記混合モード陰イオン交換材料が、C a p t o A d h e r e (商標) または C a p t o A d h e r e (商標) I m p R e s である、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記イオン交換クロマトグラフィー材料が、前記ポリペプチドの大規模生産のために使用される、請求項 1 ～ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記ポリペプチドが、抗体、免疫アドヘシン、F c 含有タンパク質または免疫コンジュゲートである、請求項 1 ～ 1 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記ポリペプチドが抗体である、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記モノクローナル抗体が I g G モノクローナル抗体である、請求項 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記抗体が抗原結合断片である、請求項 1 2 4 ～ 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記抗原結合断片が、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、s c F v、d i - s c F v、b i - s c F v、タンデム (d i , t r i) - s c F v、F v、s d A b、三官能性抗体、B i T E、ダイアボディまたはトリアボディである、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記抗体が、二重特異性抗体である、請求項 1 2 4 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 3 1】

10

20

30

40

50

前記抗体が、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗HER2抗体、抗IL6抗体、抗IgE抗体、抗IL13抗体、抗Flu-A抗体、抗TIGIT抗体、抗PD-L1抗体、抗VEGF-A抗体、抗VEGF-A/ANG2抗体、抗CD79b抗体、抗ST2抗体、抗D因子抗体、抗第IX因子抗体、抗第X因子抗体、抗Abeta、抗タウ抗体、抗CEA抗体、抗CEA/CD3抗体、抗CD20/CD3抗体、抗FcRH5/CD3抗体、抗Her2/CD3抗体、抗FGFR1/KLB抗体、FAP-4-1 BBL融合タンパク質、およびFAP-IL2v融合タンパク質からなる群から選択される、請求項124～127のいずれか一項に記載の方法。

【請求項132】

前記抗体が、オクレリズマブ、ベルツズマブ、トラスツズマブ、トシリズマブ、ファリシマブ、ボラツズマブ、ガンテネルマブ、シビサタマブ、クレネズマブ、モスネツズマブ、チラゴルマブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、アテゾリズマブ、オビヌツズマブ、ランパリズマブ、レプリキズマブ、オマリズマブ、ラニビズマブ、エミシズマブ、セリクレルマブ、プラシネズマブ、RO6874281、およびRO7122290からなる群から選択される、請求項124～127のいずれか一項に記載の方法。

【請求項133】

前記ポリペプチドが、前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する前に親和性クロマトグラフィー材料を使用して精製され、前記イオン交換クロマトグラフィー材料が陽イオン交換クロマトグラフィー材料である、請求項124～132のいずれか一項に記載の方法。

【請求項134】

前記親和性材料が、プロテインAクロマトグラフィー、プロテインGクロマトグラフィー、プロテインA/Gクロマトグラフィー、プロテインLクロマトグラフィー、FcXLクロマトグラフィー、プロテインXLクロマトグラフィー、カップクロマトグラフィー、およびカップXLクロマトグラフィーからなる群から選択される、請求項133に記載の方法。

【請求項135】

プロテインA親和性材料が、MAbSelect材料、MAbSelect SuRe（商標）材料、またはMAbSelect SuRe（商標）LX材料である、請求項134に記載の方法。

【請求項136】

前記緩衝液が、約15～20材料体積／時間で前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項1～135のいずれか一項に記載の方法。

【請求項137】

前記再生緩衝液が約10材料体積／時間で前記イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、請求項1～136のいずれか一項に記載の方法。

【請求項138】

前記ポリペプチドが宿主細胞内で産生される、請求項1～137のいずれか一項に記載の方法。

【請求項139】

前記宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞である、請求項138に記載の方法。

【請求項140】

前記不純物が、IgG断片、宿主細胞タンパク質、または宿主細胞核酸の1つまたは複数を含む、請求項1～139のいずれか一項に記載の方法。

【請求項141】

前記ポリペプチドがCHO細胞で産生され、前記不純物がCHO宿主細胞タンパク質（CHOP）および／またはCHO核酸を含む、請求項140に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年6月5日出願の米国仮出願第62／857,734号の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、クロマトグラフィーのための方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

過負荷（OL）陽イオン交換クロマトグラフィーは、樹脂の利用率およびプラント効率を改善するプロセスを強化しながら、結合および溶出モードと同等の不純物除去機能を備えていることが示されている。樹脂は、樹脂の動的結合容量を超える強い結合条件下で負荷される。生成物のブレイクスルーが回収されている間、不純物は優先的に樹脂に結合する。高い負荷密度（通常、500 g／L超）により、高濃度の宿主細胞タンパク質が樹脂に結合したままである。このように、精製プロセスの消毒フェーズ（0.5 N水酸化ナトリウム）中にカラムは欠陥を生じる（高いカラム圧力、80 psi超）（図1）。必要なのは、クロマトグラフィーのラン間で不純物が持ち越されることなく、消毒フェーズでの圧力上昇を最小限に抑える改善されたプロセスである。

【0004】

過負荷クロマトグラフィーの方法は、米国特許出願公開第2013／0079272 A 1号および米国特許出願公開第2014／0301977 A 1号に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0005】

特許出願および刊行物を含む本明細書に引用される全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【発明の概要】

【0006】

簡単な説明

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー材料）を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a）再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b）消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5 NのNaOHを含む、ステップ、およびc）イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1 NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50～約600 mMの酢酸ナトリウム（NaOAc）を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350 mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH4.0～11である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH8.3である。いくつかの実施形態において、約3～約12材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約2～約12材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積の消毒緩衝液が通過し、イオン交換クロマトグラフィー材料を再生緩衝液が通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約4材料体積の保存緩衝液に保存される。

【0007】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、c) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5 NのNaOHおよび約1 MのNaClを含む、ステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1 NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液および第2の再生緩衝液は、約25 ~ 約600 mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350 mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約40 mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH 2.0 ~ 7.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH 4.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH 5.0である。いくつかの実施形態において、約3 ~ 約12材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約7材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、約167 MのNaOAcおよび約0.3 Mのリン酸である。いくつかの実施形態において、約1 ~ 約5材料体積の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3材料体積の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約2 ~ 約12材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約4材料体積の消毒緩衝液が通過し、イオン交換クロマトグラフィー材料を再生緩衝液が通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約1 ~ 5材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約3材料体積の保存緩衝液に保存される。

10

20

30

40

50

【0008】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー材料）を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5 NのNaOHを含む、ステップ、およびc) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1 NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約25 ~ 約75 mMのトリスおよび約50 ~ 約100 mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50 mMのトリスおよび約85 mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH 7 ~ 9である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH 8.0である。いくつかの実施形態において、約3 ~ 約12材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約2 ~ 約12材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約1 ~ 5材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約4材料体積の保存緩衝液に保存される。

【0009】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、陽

イオン交換クロマトグラフィー材料)を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約 20 mM ～約 60 mM の酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約 40 mM の酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液の pH は、約 $\text{pH } 5.0$ ～約 $\text{pH } 6.0$ である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液の pH は、約 $\text{pH } 5.5$ である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 3 ～ 7 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 5 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 50 ～約 600 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 350 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 $\text{pH } 4.0$ ～ 11 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 $\text{pH } 8.3$ である。いくつかの実施形態において、約 3 ～約 12 材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 2 ～約 12 材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 1 ～ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される。

10

20

30

【0010】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約 0.5 N の NaOH および約 1 M の NaCl を含む、ステップ、および h) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、負荷密度は、約 1000 g/L 以下である。いくつかの実施形態において、負荷密度は、約 20 g/L 以上である。いくつかの実施形態において、負荷密度は、約 70 g/L 以上である。いくつかの実施形態において、負荷密度は、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍である。いくつかの実施形態において、負荷密度は、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の約 2 倍～約 100 倍である。いくつかの実施

40

50

形態において、負荷密度は、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の約10倍である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mM～約100mMのNaOAcおよび約25mM～約75mMのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約85mMの酢酸ナトリウムおよび約50mMのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約pH6.0～約pH10.0である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約pH8.0である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約5～約15材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約10材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約25～約600mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約40mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH2.0～7.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH4.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH5.0である。いくつかの実施形態において、約3～約12材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約7材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、約167MのNaOAcおよび約0.3Mのリン酸である。いくつかの実施形態において、約1～約5材料体積の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3材料体積の酸洗浄液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約2～約12材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約4材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約3材料体積の保存緩衝液に保存される。

10

20

30

40

50

【0011】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。

【0012】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液によって平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が20g/L以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、

消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、負荷密度は、70 g/L 以上である。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液によって平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) 10
ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。

【0014】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液によって平衡化するステップ、b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチド 20
に対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。 30
いくつかの実施形態において、負荷密度は、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍である。いくつかの実施形態において、負荷密度は、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の約 2 倍～約 100 倍である。いくつかの実施形態において、負荷密度は、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の約 10 倍である。

【0015】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液によって平衡化するステップ、b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチド 40
に対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。

【0016】

10

20

30

40

50

上記の局面のいくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約 20 mM～約 60 mM の酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約 40 mM の酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液の pH は、約 pH 5.0～約 pH 6.0 である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液の pH は、約 pH 5.5 である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 3～7 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 5 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 25～約 75 mM のトリスおよび約 50～約 100 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 50 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 pH 7～9 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 pH 8.0 である。いくつかの実施形態において、約 3～約 12 材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 2～約 12 材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 1～5 材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される。

10

20

【0017】

上述のいくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、クロマトグラフィーカラム内にある。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、支持マトリックスに連結されたスルホプロピル部分を含む。いくつかの実施形態において、支持マトリックスは、架橋されたポリ（スチレンジビニルベンゼン）を含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、POROS（商標）HS50 材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陽イオン交換材料である。いくつかの実施形態では、混合モード陽イオン交換材料は、Capt o MMC（商標）、Capt o MMC（商標）ImpRes、Nuvia（商標）cPrime（商標）、または Toy opearl MX Trp-650M である。

30

【0018】

本発明のいくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、支持マトリックスに結合した、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、もしくは第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、またはジエチルアミノエチル官能基を含み得る。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換材料である。いくつかの実施形態において、混合モード陰イオン交換材料は、Capt o Adhere（商標）または Capt o Adhere（商標）ImpRes である。

40

【0019】

本発明のいくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの大規模生産のために使用される。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗体、免疫アドヘシン、Fc 含有タンパク質、または免疫コンジュゲートである。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、IgG モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗原結合断片は、Fab 断

50

片、F a b ' 断片、F (a b ') 2 断片、s c F v、d i - s c F v、b i - s c F v、タンデム (d i , t r i) - s c F v、F v、s d A b、三官能性抗体、B i T E、ダイアボディまたはトリアボディである。いくつかの実施形態において、抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 4 0 抗体、抗 H E R 2 抗体、抗 I L 6 抗体、抗 I g E 抗体、抗 I L 1 3 抗体、抗 F l u A 抗体、抗 T I G I T 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 V E G F - A 抗体、抗 V E G F - A / A N G 2 抗体、抗 C D 7 9 b 抗体、抗 S T 2 抗体、抗 D 因子抗体、抗第 I X 因子抗体、抗第 X 因子抗体、抗 A b e t a、抗タウ抗体、抗 C E A 抗体、抗 C E A / C D 3 抗体、抗 C D 2 0 / C D 3 抗体、抗 F c R H 5 / C D 3 抗体、抗 H e r 2 / C D 3 抗体、抗 F G F R 1 / K L B 抗体、F A P - 4 - 1 B B L 融合タンパク質、および F A P - I L 2 v 融合タンパク質からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗体は、オクレリズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、トシリズマブ、ファリシマブ、ボラツズマブ、ガンテルマブ、シビサタマブ、クレネズマブ、モスネツズマブ、チラゴルマブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、アテゾリズマブ、オビヌツズマブ、ランパリズマブ、レブリキズマブ、オマリズマブ、ラニビズマブ、エミシズマブ、セリクレルマブ、プラシネズマブ、R O 6 8 7 4 2 8 1 および R O 7 1 2 2 2 9 0 からなる群から選択される。

10

【0020】

本発明のいくつかの実施形態において、ポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する前に、親和性クロマトグラフィー材料を使用して精製され、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、親和性材料は、プロテインAクロマトグラフィー、プロテインGクロマトグラフィー、プロテインA/Gクロマトグラフィー、プロテインLクロマトグラフィー、F c X L クロマトグラフィー、プロテインX L クロマトグラフィー、カップクロマトグラフィーおよびカップX L クロマトグラフィーからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、プロテインA親和性材料は、M A b S e l e c t 材料、M A b S e l e c t S u R e (商標) 材料、またはM A b S e l e c t S u R e (商標) L X 材料である。いくつかの実施形態において、緩衝液は、約15~20材料体積/時間でイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約10材料体積/時間でイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

20

【0021】

本発明のいくつかの実施形態において、ポリペプチドは、宿主細胞において産生される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である。いくつかの実施形態において、不純物は、1つまたは複数のI g G 断片、宿主細胞タンパク質、または宿主細胞核酸を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、C H O 細胞において産生され、不純物は、C H O 宿主細胞タンパク質 (C H O P) および/またはC H O 核酸を含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、再生フェーズなしで実行された過負荷クロマトグラフィーランのクロマトグラムである。樹脂の汚れは、消毒フェーズの開始時の圧カスパイク中に観察される。

40

【0023】

【図2】図2は、抗体m A b 1 の過負荷クロマトグラフィーからのP O R O S (商標) 5 0 H S クロマトグラムの例を示している。

【0024】

【図3】図3は、2回の評価ランからの再生フェーズのサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) のクロマトグラムを示している。評価ラン1の再生緩衝液は、50mMのトリス、85mMのN a O A c p H 8 . 0 であった。評価ラン2の再生緩衝液は350mMのN a O A c p H 8 . 3 であった。

【0025】

【図4】図4は、抗体m A b 1 の評価ランAのクロマトグラムを示す。

50

【0026】

【図5】図5は、抗体mAb1の評価ランBのクロマトグラムを示す。

【0027】

【図6】図6は、抗体mAb2の評価ランAのクロマトグラムを示す。

【0028】

【図7】図7は、抗体mAb2の評価ランBのクロマトグラムを示す。

【0029】

【図8】図8Aおよび8Bは、POROS（商標）50HSモックラン洗浄手順のSEC-HPLCクロマトグラムを示す。図8Aにおける、再生緩衝液の順序は1.) 50mMのトリス、85mMのNaOAc pH8.0、続いて2.) 350mMのNaOAc pH8.3である。図8Bにおける、再生緩衝液の順序は、1.) 350mMのNaOAc pH8.3、続いて2.) 50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0である。

10

【0030】

【図9】図9は、Capto（商標）Adhere樹脂におけるロボットによる不純物マッピングスクリーニングを示す。mAb3、チャイニーズハムスター卵巣細胞タンパク質（CHOP）および高分子量（HMW）ポリペプチドの結合が示されている。

【0031】

【図10】図10A～10Eは、mAb3についての、それぞれ、評価ランA～Eのクロマトグラムを示している。

20

【発明を実施するための形態】

【0032】

発明の詳細な説明

本明細書に提供されるのは、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であり、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびc) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびc) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

30

【0033】

本明細書に提供されるのは、再利用のために陽イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であり、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に再生緩衝液を通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびc) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、再利用のために陽イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、c) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

40

【0034】

本明細書に提供されるのは、再利用のために陰イオン交換クロマトグラフィー材料を洗

50

浄する方法であり、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に消毒緩衝液を通すステップ、c) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、再利用のために陰イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびc) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

10

【0035】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、c) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む、ステップ、およびd) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換材料は、陰イオン交換材料である。いくつかの実施形態では、イオン交換材料は、混合モード陰イオン交換材料である。

20

【0036】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

30

40

【0037】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオ

50

ン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1 0 0 0 g / L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1 0 0 0 g / L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

10

【0038】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1 0 0 0 g / L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1 0 0 0 g / L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

20

30

【0039】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 2 0 g / L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつか

40

50

の局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

10

【0040】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

20

30

【0041】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生

40

50

緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

【0042】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについてのイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについてのイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

【0043】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについての陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについての陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

【0044】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについての陰イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについての陰イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

【0045】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む、ステップ、およびh) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、Capto (商標) Adhere クロマトグラフィー材料である。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー (例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー) は、ポリペプチドの大規模生産において使用される。いくつかの実施形態において、タンパク質は、抗体、例えばモノクローナル抗体である。

【0047】

定義

「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、本明細書において、任意の長さ

のアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。ポリマーは、直鎖状であっても分岐状であってもよく、改変アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。これらの用語は、自然に、または介入、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、もしくはは任意の他の操作または改変、例えば、標識成分とのコンジュゲートにより改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の1つまたは複数の類似体を含むポリペプチド、ならびに当該技術分野で既知の他の改変もまたこの定義に含まれる。本明細書で使用される用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、特に抗体を包含する。

【0048】

「精製された」ポリペプチド（例えば、抗体または免疫アドヘシン）は、ポリペプチドがその天然環境下で存在するよりもさらに純粋な形態で存在するように、および／または実験室条件下で最初に合成および／または増幅される際にポリペプチドの純度が上昇していることを意味する。純度は、相対用語であり、必ずしも絶対純度を意味しない。

【0049】

本明細書で使用される「過負荷クロマトグラフィー」は、目的の生成物が、生成物についてのクロマトグラフィー材料の動的結合容量を超えて負荷されるクロマトグラフィー手順を指す。不純物は生成物よりも強く結合し、タンパク質のブレイクスルーが達成された後に、精製された生成物の溶出がもたらされる。いくつかの例において、目的の生成物は、動的結合容量に達した後、フロースルーの画分に収集される。

【0050】

本明細書で使用される、クロマトグラフィー材料の「材料体積」は、クロマトグラフィー手順で使用されるクロマトグラフィー材料の総体積である。例えば、クロマトグラフィー材料がカラム内にある場合、材料の体積はカラム内のクロマトグラフィー材料の総体積である。この例において、「材料体積」は「カラム体積」とも称し得る。

【0051】

目的の抗原、例えば、腫瘍関連ポリペプチド抗原標的「と結合する」ポリペプチドは、ポリペプチドが、抗原を発現する細胞または組織を標的とする際に、診断および／または治療剤として有用であり、他のポリペプチドと有意には交差反応しないような十分な親和性で抗原と結合するものである。このような実施形態において、ポリペプチドの「非標的」ポリペプチドへの結合の程度は、蛍光活性化細胞選別（FACS）分析または放射性免疫沈降法（RIA）によって決定されるように、ポリペプチドのその特定の標的ポリペプチドへの結合の約10%未満である。

【0052】

標的分子へのポリペプチドの結合に関して、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープへの「特異的結合」、またはそれに「特異的に結合する」、またはそれに「特異的な」という用語は、非特異的相互作用と測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般的に結合活性を有しない類似の構造の分子である対照分子の結合と比較して、分子の結合を決定することによって測定し得る。例えば、特異的結合は、標的に類似している対照分子、例えば、過剰な非標識標的との競合によって決定し得る。この場合、標識した標的のプロープに対する結合が、過剰な非標識標的によ

【0053】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広義に使用され、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成された多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を包含するが、これは、それらが所望の生物活性を呈する場合に限る。「免疫グロブリン」（Ig）という用語は、本明細書で抗体と互換的に使用される。

【0054】

抗体は、種々の構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子であり、それらの構造は全て免疫グロブリン折り畳みに基づく。例えば、IgG抗体は、ジスルフィド結合して

10

20

30

40

50

機能的抗体を形成する2つの「重」鎖および2つの「軽」鎖を有する。各重鎖および軽鎖はそれ自体、「定常」(C)領域および「可変」(V)領域を含む。V領域が抗体の抗原結合特異性を決定する一方で、C領域は、構造的サポートを提供し、免疫エフェクタとの非抗原特異的相互作用において機能する。抗体または抗体の抗原結合断片の抗原結合特異性は、抗体が特定の抗原に特異的に結合する能力である。

【0055】

抗体の抗原結合特異性は、V領域の構造的特徴によって決定される。可変性は、可変ドメインの110アミノ酸長にわたって均等に分布していない。代わりに、V領域は、各々9~12アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極度に可変性の短い領域によって分離されている、15~30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不変の伸長部からなる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、主にβシート構成を採用する4つのFRを含み、これらは、3つの超可変領域(「HVR」)により連結され、これらは、βシート構造を連結し、いくつかの場合にはその一部を形成するループを形成する。各鎖内の超可変領域は、FRによって共に近接近して保持されており、他方の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体の抗体依存性細胞傷害性(ADCC)への寄与等の種々のエフェクタ機能を呈する。

【0056】

各V領域は、典型的には、3つの超可変領域、例えば、各々が「超可変ループ」を含む相補性決定領域(「CDR」)、および4つのフレームワーク領域を含む。したがって、特定の所望の抗原に対して実質的な親和性で結合するために必要とされる最小の構造単位である抗体結合部位は、典型的には、3つのCDRと、適切な立体構造でCDRを保持し、提示するためにそれらの間に散在する少なくとも3つ、好ましくは4つのフレームワーク領域とを含む。古典的な4鎖抗体は、V_HドメインおよびV_Lドメインによって協働して決定される抗原結合部位を有する。ラクダ抗体およびサメ抗体等の特定の抗体は、軽鎖を欠き、重鎖のみによって形成される結合部位に依存する。単一ドメインの操作された免疫グロブリンは、V_HおよびV_Lとの間に協働がない場合、結合部位が重鎖または軽鎖のみによって形成されるように調製され得る。

【0057】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部分の配列が抗体間で広く異なり、かつ各特定の抗体の特定の抗原に対する結合および特異性において使用されるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等に分布していない。これは、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの両方において超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、主にβシート構成を採用する4つのFRを含み、これらは、3つの超可変領域により連結され、これらは、βシート構造を連結し、いくつかの場合にはその一部を形成するループを形成する。各鎖内の超可変領域は、FRによって共に近接近して保持されており、他方の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体の抗体依存性細胞傷害性(ADCC)への寄与等の種々のエフェクタ機能を呈する。

【0058】

「超可変領域」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ

酸残基（例えば、 V_L のおよそ24～34（L1）、50～56（L2）および89～97（L3）残基の周辺、および V_H のおよそ31～35B（H1）、50～65（H2）、および95～102（H3）残基の周辺（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）および／または「超可変ループ」からのそれらの残基（例えば、 V_L の残基26～32（L1）、50～52（L2）および91～96（L3）、および V_H の26～32（H1）、52A～55（H2）および96～101（H3）（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）を含む。

10

【0059】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書において定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0060】

「抗体断片」は、好ましくはその抗原結合領域を含む、インタクトな抗体の一部を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、およびFv断片、ダイアボディ、タンデムダイアボディ（taDb）、トリアボディ、直鎖抗体（例えば、米国特許第5,641,870号、実施例2、Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)）、一アーム抗体、単一可変ドメイン抗体、ミニボディ、一本鎖抗体分子、抗体断片から形成された多重特異性抗体（例えば、Db-Fc、taDb-Fc、taDb-CH3、(scFv)₄-Fc、sc-Fv、di-scFv、bi-scFv、またはタンデム(di, tri)-scFv)、二重特異性T細胞誘導抗体(BiT E)、および三官能性抗体が挙げられる。

20

【0061】

抗体のパイン消化により、各々単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と、容易に結晶化するその能力を反映して命名された残りの「Fc」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片が産生される。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有しながら依然として抗原に架橋し得る、 $F(ab')_2$ 断片が得られる。

【0062】

「Fv」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、緊密な非共有結合にある1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この構成において、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、 V_H-V_L 二量体の表面上に抗原結合部位を決定する。まとめると、6つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分）でさえも、抗原を認識してそれに結合する能力を有するが、全結合部位よりも親和性が低い。

30

【0063】

Fab断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端における少数の残基の付加によって、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が少なくとも1つの遊離チオール基を有するFab'に対する、本明細書における表記である。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

40

【0064】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つの明らかに異なる型のうちの1つに割り当て得る。

【0065】

抗体は、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに割り当て得

50

る。インタクトな抗体には5つの主要なクラス、すなわち、Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mが存在し、これらのいくつかは、さらに、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig AおよびIg A 2に分けられてもよい。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元配置は周知である。

【0066】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在している。いくつかの実施形態において、Fvポリペプチドは、scFvが抗原結合に所望の構造を形成することを可能にする、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvに関する概説については、PluckthunのThe Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【0067】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小抗体断片を指し、これらの断片は、同一のポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン（V_L）に結合した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む（V_H-V_L）。同一鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインは、他の鎖の相補的ドメインと対合させられ、2つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号、国際公開第93/11161号、およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)にさらに詳述されている。

【0068】

「多重特異性抗体」という用語は、最も広義に使用され、特にポリエピトープ特異性を有する抗体を包含する。このような多重特異性抗体としては、重鎖可変ドメイン（V_H）および軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む抗体であって、V_HV_L単位がポリエピトープ特異性を有する抗体、2つ以上のV_LドメインおよびV_Hドメインを有し、各V_HV_L単位が異なるエピトープに結合する抗体、2つ以上の単一可変ドメインを有し、各単一可変ドメインが異なるエピトープに結合する抗体、全長抗体、抗体断片、例えば、Fab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、トリアボディ、三官能性抗体、共有結合または非共有結合している抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。「ポリエピトープ特異性」は、同一または異なる標的（複数可）上の2つ以上の異なるエピトープに、特異的に結合することができる能力を指す。「単一特異性」は、1つのエピトープのみに結合する能力を指す。一実施形態によれば、多重特異性抗体は、5 μ M $\sim$ 0.001 pM、3 μ M $\sim$ 0.001 pM、1 μ M $\sim$ 0.001 pM、0.5 μ M $\sim$ 0.001 pM、または0.1 μ M $\sim$ 0.001 pMの親和性で各エピトープに結合するIg G抗体である。

【0069】

「単一ドメイン抗体」（sdAb）または「単一可変ドメイン（SVD）抗体」という表現は、一般的に、単一可変ドメイン（V_HまたはV_L）が抗原結合を付与し得る抗体を指す。言い換えれば、単一可変ドメインは、標的抗原を認識するために他の可変ドメインと相互作用する必要はない。単一ドメイン抗体の例としては、ラクダ科動物（ラマおよびラクダ）ならびに軟骨魚類（例えば、テンジクザメ）由来の抗体、ならびにヒトおよびマウス抗体由来の組換え方法から得られる抗体が挙げられるNature (1989) 341:544-546、Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56、Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235、Trends Biotechnol (2003):21:484-490、国際公開第2005/035572号、国際公開第03/035694号、FEBS Lett (1994)

339:285-290、国際公開第00/29004号、国際公開第02/051870号)。

【0070】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、同一である、および／または同一のエピトープに結合し、モノクローナル抗体の産生中に生じ得る想定されるバリエーションを除くが、かかるバリエーションは、一般的に、少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。モノクローナル抗体は、その特異性に加えて、他の免疫グロブリンによって汚染されない点でも有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本明細書に示す方法にしたがって使用されるモノクローナル抗体は、最初に Kohler et al., Nature 256:495 (1975) によって記載されたハイブリドーマ法によって作製されても、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) に記載の技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離し得る。

10

20

【0071】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、具体的には、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体内の対応する配列と同一または相同である一方で、鎖（複数可）の残りの部分が、他の種に由来するか、または他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体内の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびに所望の生物学的活性を呈する限り、このような抗体の断片が含まれる（米国特許第4,816,567号；Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)）。本明細書における目的のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、アカゲザル、またはカニクイザルなどの旧世界ザル）に由来する可変ドメイン抗原結合配列と、ヒト定常領域配列とを含む、「霊長類化」抗体が含まれる（米国特許第5,693,780号）。

30

【0072】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、もしくは非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基で置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基に置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、抗体の性能をさらに改良するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、上述のFR置換（複数可）を除いて、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつFRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFRである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、任意選択的に、免疫グロブリンの定常領域、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分を含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) を参照されたい。

40

50

【0073】

本明細書において「インタクトな抗体」は、重および軽可変ドメイン、ならびにFc領域を含むものである。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリエーションであり得る。好ましくは、インタクトな抗体は、1つまたは複数のエフェクタ機能を有する。

【0074】

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽（L）鎖および2つの同一の重（H）鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖が1つのジスルフィド共有結合により重鎖に連結される一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン（VH）を有し、いくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（VL）を有し、他端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。

【0075】

「ネイキッド抗体」は、（本明細書における定義では）細胞傷害性部分または放射性標識等の異種分子にコンジュゲートされていない抗体である。

【0076】

いくつかの実施形態において、抗体の「エフェクタ機能」は、抗体のFc領域（天然配列Fc領域またはアミノ酸配列バリエーションFc領域）に起因し得る生物学的活性を指し、これは抗体アイソタイプによって異なる。抗体エフェクタ機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞傷害性、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ADCC）、食作用、細胞表面受容体の下方調節が挙げられる。

【0077】

「抗体依存性細胞媒介細胞傷害性」および「ADCC」は、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応を指す。ADCCの媒介のための主要な細胞であるNK細胞がFcγRIIIのみを発現する一方で、単球は、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現については、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)の第464頁、表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されるようなインビトロADCCアッセイを行ってもよい。このようなアッセイに有用なエフェクタ細胞としては、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。これに代えて、またはこれに加えて、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95: 652-656 (1998)に開示されるような動物モデルにおいて評価されてもよい。

【0078】

「ヒトエフェクタ細胞」は、1つまたは複数のFcRを発現し、かつエフェクタ機能を実行する白血球である。いくつかの実施形態において、細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクタ機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞、および好中球が挙げられ、このうちPBMCおよびNK細胞が好ましい。

【0079】

「Fc受容体」または「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載するために使用される。いくつかの実施形態において、FcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、これらの受容体のアレルバリエーションおよび選択的スプライシング形態を含む、FcγR

10

20

30

40

50

I、FcγRII、およびFcγRIIIサブクラスを受容体を含む。FcγRII受容体としては、FcγRIIA（「活性化受容体」）およびFcγRIIB（「阻害受容体」）が挙げられ、これらは、主にそれらの細胞質ドメインの点で異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメイン内に免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害受容体FcγRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）を含有する（M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997) を参照されたい）。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)、Capellet al., Immunomethods 4: 25-34 (1994)、およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995) に総説されている。今後特定されるものを含む他のFcRは、本明細書において「FcR」という用語により包含されている。この用語はまた、母体のIgGの胎児への転移を担う新生児受容体である、FcRnも包含する（Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) およびKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)）。

10

20

30

40

50

【0080】

クロマトグラフィーに関して本明細書で使用される「連続的（sequential）」という用語は、第1のクロマトグラフィーに続いて第2のクロマトグラフィーを有することを指す。さらなるステップが第1のクロマトグラフィーと第2のクロマトグラフィーとの間に含まれていてもよい。

【0081】

クロマトグラフィーに関して本明細書で使用される「連続（continuous）」という用語は、直接接続されているか、または2つのクロマトグラフィー材料の間の連続流を可能にする何らかの他の機構を介して接続された第1のクロマトグラフィー材料と第2のクロマトグラフィーとを有することを指す。

【0082】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、典型的には自然界に見出されるかまたは生成される成分の少なくともいくつかから分離された分子を指す。例えば、ポリペプチドは、それが産生された細胞の成分の少なくともいくつかから分離されている場合、「単離された」と呼ばれる。ポリペプチドが発現後に細胞によって分泌される場合、ポリペプチドを含む上清を、それを産生した細胞から物理的に分離することは、ポリペプチドを「単離する」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、それが典型的には自然界に見られるより大きなポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドの場合はゲノムDNAまたはミトコンドリアDNA等）の一部ではない場合、または、例えば、RNAポリヌクレオチドの場合、それが産生された細胞の成分の少なくともいくつかから分離されている場合、「単離された」と呼ばれる。したがって、宿主細胞内のベクターに含まれるDNAポリヌクレオチドは、「単離された」と呼ばれ得る。

【0083】

「混入物」は、所望のポリペプチド生成物とは異なる物質を指す。混入物としては、宿主細胞物質、例えばCHO宿主細胞タンパク質（CHOP）、浸出プロテインA、核酸；所望のポリペプチドのバリエーション、断片、凝集体または誘導体、他のポリペプチド、エンドトキシン、ウイルス混入物、細胞培養培地成分等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例においては、混入物は、例えば、細菌細胞、例えば大腸菌（E. coli）細胞、昆虫細胞、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、真菌細胞からの宿主細胞タンパク質（HCP）であり得るが、これらに限定されない。

【0084】

本明細書における値またはパラメータへの「約」という言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする変形を含む（かつ記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は、「X」の記載を含む。

【0085】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される、単数形「a（1つの）」、「or（または）」、および「the（その）」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。本明細書に記載の本発明の局面および変形は、局面および変形「からなる」および／または「本質的にからなる」を含むことが理解される。

【0086】

クロマトグラフィー洗浄の方法

クロマトグラフィー

本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄または再生する方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィーは過負荷モードで使用される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において使用される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0087】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウム (NaOAc) を含む、ステップ、b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびc) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0088】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50～約600mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50mM～600mM、100mM～600mM、150mM～600mM、200mM～600mM、250mM～600mM、300mM～600mM、350mM～600mM、400mM～600mM、450mM～600mM、500mM～600mM、550mM～600mM、50mM～550mM、50mM～450mM、50mM～400mM、50mM～350mM、50mM～300mM、50mM～250mM、50mM～200mM、50mM～150mM、50mM～100mM、100mM～550mM、150mM～500mM、200mM～450mM、250mM～400mM、または300mM～400mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、または650mMのいずれかのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350mMのNaOAcを含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約70mM～100mM、75mM～95mM、または80mM～90mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、85mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約70mM～100mM、75mM～95mM、または80mM～90mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含み、さらにトリスを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約70mM～100mM、75mM～95mM、または80mM～90mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含み、さらに約25mM～75mM、30mM～75mM、35mM～40mM、45mM～75mM、50mM～75mM、25mM～70mM、25mM～65mM、25mM～60mM、25mM～55mM、または25mM～50mMのいずれかのトリスを含む。いくつかの実施形態に

において、再生緩衝液は、約70mM～100mM、75mM～95mM、または80mM～90mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含み、さらに約25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、または75mMのいずれかのトリスを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH4.0～約pH11.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH4.0～約pH10.5、約pH4.0～約pH10.0、約pH4.0～約pH9.5、約pH4.0～約pH9.0、約pH4.0～約pH8.5で、約pH4.0～約pH8.0、約pH5.5～約pH11.0、約pH5.5～約pH10.5、約pH5.5～約pH10.0、約pH5.5～約pH9.5、約pH5.5～約pH9.0、約pH5.5～約pH8.5、約pH5.5～約pH8.0、約pH6.0～約pH11.0、約pH6.5～約pH11.0、約pH7.0～約pH11.0、約pH7.5～約pH11.0、約pH8.0～約pH11.0、約pH6.0～約pH11.0、約pH6.5～約pH10.5、約pH7.0～約pH10.0、約pH7.5～約pH9.5、または約pH8.0～約pH9.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約pH7.5、約pH8.0、約pH8.1、約pH8.2、約pH8.3、約pH8.4、約pH8.5、または約pH9.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH8.3である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH8.3で約350mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH8である。いくつかの実施形態では、再生緩衝液のpHは、約pH8.0で約50mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む。

10

20

【0090】

いくつかの実施形態において、約3～約12、約3～約11、約3～約10、約3～約9、約3～約8、約3～約7、約3～約6、約3～約5、約3～約4、約4～約12、約5～約12、約6～約12、約7～約12、約8～約12、約9～約12、約10～約12、約11～約12、約5～約12、約5～約10、約8～約12、または約9～約11の材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

30

【0091】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、c) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む、ステップ、およびd) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、Capto（商標）Adhereクロマトグラフィー材料である。

40

【0092】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50～約600mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50mM～600mM、100mM～600mM、150mM～600mM、200mM～600mM、250mM～600mM、300mM～600mM、350mM～600mM、400mM～600mM、4

50

50 mM～600 mM、500 mM～600 mM、550 mM～600 mM、50 mM～550 mM、50 mM～450 mM、50 mM～400 mM、50 mM～350 mM、50 mM～300 mM、50 mM～250 mM、50 mM～200 mM、50 mM～150 mM、50 mM～100 mM、100 mM～550 mM、150 mM～500 mM、200 mM～450 mM、250 mM～400 mM、または300 mM～400 mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、または650 mMのいずれかのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350 mMのNaOAcを含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH2.0～約pH7.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH2.0～約pH6.5、約pH2.0～約pH6.0、約pH2.0～約pH5.5、約pH2.0～約pH5.0、約pH2.0～約pH4.5、約pH2.0～約pH4.0、約pH2.0～約pH3.5、約pH2.0～約pH3.0、約pH2.0～約pH2.5、約pH2.5～約pH7.0、約pH3.0～約pH7.0、約pH3.5～約pH7.0、約pH4.0～約pH7.0、約pH4.5～約pH7.0、約pH5.0～約pH7.0、約pH5.5～約pH7.0、約pH6.0～約pH7.0、または約pH6.5～約pH7.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約pH2.0、約pH8.0、約pH2.5、約pH3.0、約pH3.5、約pH4.0、約pH4.5、約pH5.0、約pH5.5、約pH6.0、約pH6.5、または約pH7.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、350 mMのNaOAc、pH4.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、350 mMのNaOAc、pH5.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、40 mMのNaOAc、pH4.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、40 mMのNaOAc、pH5.0である。

【0094】

いくつかの実施形態において、約3～約12、約3～約11、約3～約10、約3～約9、約3～約8、約3～約7、約3～約6、約3～約5、約3～約4、約4～約12、約5～約12、約6～約12、約7～約12、約8～約12、約9～約12、約10～約12、約11～約12、約5～約12、約5～約10、約8～約12、または約9～約11の材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約7材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0095】

いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcを含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、リン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcおよびリン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.1 M超～約0.5 M未満の任意の濃度である。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.100 M、0.120 M、0.130 M、0.140 M、0.150 M、0.160 M、0.161 M、0.162 M、0.163 M、0.164 M、0.167 M、0.168 M、0.169 M、0.170 M、0.180 M、0.190 M、0.200 M、0.250 M、0.300 M、0.350 M、0.400 M、0.450 M、または0.500 Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のリン酸の濃度は、約0.10 M、0.15 M、0.20 M、0.25 M、0.30 M、0.35 M、0.40 M、0.45 M、0.50 M、0.55 M、または0.60 Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、約0.167 MのNaOAcおよび約0.3 Mのリン酸を含む。

10

20

30

40

50

【0096】

いくつかの実施形態において、約1～約5、約1～約4、約1～約3、約1～約2、約2～約5、約2～約4、約2～約3、約3～約5、約3～約4、約4～約5の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約1、2、3、4、または5のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0097】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 第1の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、b) 第2の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、第2の再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、およびc) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通し、

消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む、ステップ、およびd) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、Capto（商標）Adhereクロマトグラフィー材料である。

【0098】

いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液は、約50～約600mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液は、約25mM～600mM、30mM～600mM、40mM～600mM、50mM～600mM、75mM～600mM、100mM～600mM、125mM～600mM、150mM～600mM、175mM～600mM、200mM～600mM、225mM～600mM、250mM～600mM、275mM～600mM、300mM～600mM、325mM～600mM、350mM～600mM、375mM～600mM、400mM～600mM、450mM～600mM、500mM～600mM、550mM～600mM、25mM～550mM、25mM～500mM、25mM～475mM、25mM～450mM、25mM～425mM、25mM～400mM、25mM～375mM、25mM～550mM、25mM～325mM、25mM～300mM、25mM～275mM、25mM～250mM、25mM～225mM、25mM～200mM、25mM～175mM、25mM～150mM、25mM～125mM、25mM～100mM、25mM～90mM、25mM～80mM、25mM～70mM、25mM～60mM、25mM～50mM、25mM～40mM、または25mM～30mMのいずれかの濃度範囲のNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600mMのいずれかのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350mMのNaOAcを含む。

【0099】

いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液のpHは、約pH2.0～約pH7.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩

衝液および／または第2の再生緩衝液のpHは、約pH2.0～約pH6.5、約pH2.0～約pH6.0、約pH2.0～約pH5.5、約pH2.0～約pH5.0、約pH2.0～約pH4.5、約pH2.0～約pH4.0、約pH2.0～約pH3.5、約pH2.0～約pH3.0、約pH2.0～約pH2.5、約pH2.5～約pH7.0、約pH3.0～約pH7.0、約pH3.5～約pH7.0、約pH4.0～約pH7.0、約pH4.5～約pH7.0、約pH5.0～約pH7.0、約pH5.5～約pH7.0、約pH6.0～約pH7.0、または約pH6.5～約pH7.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約pH2.0、約pH8.0、約pH2.5、約pH3.0、約pH3.5、約pH4.0、約pH4.5、約pH5.0、約pH5.5、約pH6.0、約pH6.5、または約pH7.0である。

10

【0100】

いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH4.0であり、第2の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH4.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH5.0であり、第2の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH5.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH4.0であり、第2の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH4.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH5.0であり、第2の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH5.0である。

20

【0101】

いくつかの実施形態において、約3～約12、約3～約11、約3～約10、約3～約9、約3～約8、約3～約7、約3～約6、約3～約5、約3～約4、約4～約12、約5～約12、約6～約12、約7～約12、約8～約12、約9～約12、約10～約12、約11～約12、約5～約12、約5～約10、約8～約12、または約9～約11の材料体積（例えば、カラム体積）の第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10の材料体積（例えば、カラム体積）の第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

30

【0102】

いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcを含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、リン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcおよびリン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.1M超～約0.5M未満の任意の濃度である。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.100M、0.120M、0.130M、0.140M、0.150M、0.160M、0.161M、0.162M、0.163M、0.164M、0.167M、0.168M、0.169M、0.170M、0.180M、0.190M、0.200M、0.250M、0.300M、0.350M、0.400M、0.450M、または0.500Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のリン酸の濃度は、約0.10M、0.15M、0.20M、0.25M、0.30M、0.35M、0.40M、0.45M、0.50M、0.55M、または0.60Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、約0.167MのNaOAcおよび約0.3Mのリン酸を含む。

40

【0103】

いくつかの実施形態において、約1～約5、約1～約4、約1～約3、約1～約2、約2～約5、約2～約4、約2～約3、約3～約5、約3～約4、約4～約5の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。い

50

くつかの実施形態において、約 1、2、3、4、または 5 のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 3 の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0104】

いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は NaOH を含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.1 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.9 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.8 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.7 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.6 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.5 N の NaOH、約 0.2 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.3 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.4 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.5 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.2 N ~ 約 0.8 N の NaOH、約 0.3 N ~ 約 0.7 N の NaOH、または約 0.4 N ~ 約 0.6 N の NaOH を含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.1 N、0.2 N、0.3 N、0.4 N、0.5 N、0.6 N、0.7 N の NaOH、0.8 N、0.9 N、または 1.0 N の NaOH のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.5 N の NaOH を含む。

10

【0105】

いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、NaOH および NaCl を含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.1 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.9 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.8 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.7 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.6 N の NaOH、約 0.1 N ~ 約 0.5 N の NaOH、約 0.2 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.3 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.4 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.5 N ~ 約 1.0 N の NaOH、約 0.2 N ~ 約 0.8 N の NaOH、約 0.3 N ~ 約 0.7 N の NaOH、または約 0.4 N ~ 約 0.6 N の NaOH を含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.1 N、0.2 N、0.3 N、0.4 N、0.5 N、0.6 N、0.7 N の NaOH、0.8 N、0.9 N、または 1.0 N の NaOH のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.5 M ~ 約 1.5 M の NaCl、0.75 M ~ 約 1.5 M の NaCl、約 1.0 M の NaCl ~ 約 1.5 M の NaCl、約 1.25 M の NaCl ~ 約 1.5 M の NaCl、約 0.5 M の NaCl ~ 約 1.25 M の NaCl、約 0.5 M の NaCl ~ 約 1.0 M の NaOH、または約 0.5 M の NaCl ~ 約 0.75 M の NaCl を含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.5 M、0.75 M、1.0 M、1.25 M、または 1.5 M の NaCl のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.5 N の NaOH および約 1 M の NaCl を含む。

20

30

【0106】

いくつかの実施形態において、約 3 ~ 約 12、約 3 ~ 約 11、約 3 ~ 約 10、約 3 ~ 約 9、約 3 ~ 約 8、約 3 ~ 約 7、約 3 ~ 約 6、約 3 ~ 約 5、約 3 ~ 約 4、約 4 ~ 約 12、約 5 ~ 約 12、約 6 ~ 約 12、約 7 ~ 約 12、約 8 ~ 約 12、約 9 ~ 約 12、約 10 ~ 約 12、約 11 ~ 約 12、約 5 ~ 約 12、約 5 ~ 約 10、約 8 ~ 約 12、または約 9 ~ 約 11 の材料体積（例えば、カラム体積）の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積（例えば、カラム体積）の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 4 材料体積（例えば、カラム体積）の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

40

【0107】

いくつかの実施形態において、保存緩衝液は NaOH を含む。いくつかの実施形態において、保存緩衝液は、約 0.05 N ~ 約 0.5 N の NaOH、0.05 N ~ 約 0.4 N の NaOH、0.05 N ~ 約 0.4 N の NaOH、0.05 N ~ 約 0.3 N の NaOH、0

50

． 0.5 N ～ 約 0.2 N の NaOH、 0.05 N ～ 約 0.1 N の NaOH、 0.1 N ～ 約 0.5 N の NaOH、 0.2 N ～ 約 0.5 N の NaOH、 0.3 N ～ 約 0.05 N の NaOH、 または 0.4 N ～ 約 0.5 N の NaOH を含む。いくつかの実施形態において、保存緩衝液は、約 0.05 N、 0.06 N、 0.07 N の NaOH、 0.08 N、 0.09 N、 0.1 N、 0.2 N、 0.3 N、 0.4 N または 0.5 N の NaOH のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、保存緩衝液は、約 0.1 N の NaOH を含む。

【0108】

いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 1 ～ 約 10、約 1 ～ 約 8、約 1 ～ 約 6、約 1 ～ 約 5、約 1 ～ 約 4、約 1 ～ 約 3、約 1 ～ 約 2、約 2 ～ 約 10、約 3 ～ 約 20、約 4 ～ 約 10、約 5 ～ 約 10、約 1 ～ 約 7、約 2 ～ 約 6、約 3 ～ 約 5 の材料体積（例えば、カラム体積）の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 の材料体積（例えば、カラム体積）のいずれかの保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 4 材料体積（例えば、カラム体積）の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 3 材料体積（例えば、カラム体積）の保存緩衝液に保存される。

【0109】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 350 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8.3 で含む、ステップ、b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 約 10 材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 350 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8.3 で含む、ステップ、b) 約 10 材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0110】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のために陽イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 350 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8.3 で含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、再利用のために陽イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 350 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8.3 で含む、ステップ、b

）約 10 材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。

【0111】

いくつかの局面において、本発明は、再利用のために陰イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 350 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8.3 で含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、再利用のために陰イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 350 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8.3 で含む、ステップ、b) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の酢酸ナトリウムを pH 8.0 で含む、ステップ、b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、本発明は、再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 約 10 材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の酢酸ナトリウムを pH 8.0 で含む、ステップ、b) 約 10 材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0113】

いくつかの実施形態において、本発明は、再利用のために陽イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の酢酸ナトリウムを pH 8.0 で含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および c) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実

施形態において、本発明は、再利用のために陽イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 約10材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約25mMのトリスおよび85mMの酢酸ナトリウムをpH8.0で含む、ステップ、b) 約10材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびc) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。

【0114】

いくつかの実施形態において、本発明は、再利用のために陰イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約25mMのトリスおよび約85mMの酢酸ナトリウムをpH8.0で含む、ステップ、b) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびc) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、本発明は、再利用のために陰イオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法を提供し、クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法は、a) 約10材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約25mMのトリスおよび85mMの酢酸ナトリウムをpH8.0で含む、ステップ、b) 約10材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびc) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。

【0115】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0116】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料

を保存緩衝液に保存するステップを含む。

【0117】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

10

【0118】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

20

【0119】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

30

【0120】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用してポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

40

【0121】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し

50

、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについてのイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。

10

【0122】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについての陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

20

【0123】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液を用いて平衡化するステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドについての陰イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、およびg) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップを含む。

30

【0124】

いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約10mM～約100mM、約20mM～約100mM、約30mM～約100mM、約40mM～約100mM、約10mM～約90mM、約10mM～約80mM、約10mM～約70mM、約10mM～約60mM、約10mM～約50mM、約10mM～約40mM、約10mM～約70mM、約20mM～約60mM、または約30mM～約50mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、または100mMのいずれかのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約40mMのNaOAcを含む。

40

【0125】

いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約4.0～約8.0、約5.0～約8.0、約6.0～約8.0、約7.0～約8.0、約4.0～約7.0、約4.0～約6.0、約4.0～約5.0、約4.0～約7.0、約4.5～約6.5、または約5.0～約6.0である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約4.

50

0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、または8.0のいずれかである。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約5.5である。

【0126】

いくつかの実施形態において、約3～約10、約3～約9、約3～約8、約3～約7、約3～約6、約3～約5、約3～約4、約4～約10、約5～約10、約6～約10、約7～約10、約8～約10、約9～約10、約3～約8、約4～約7、または約5～約6の材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前に、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、または10のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約5材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前に、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換材料は、組成物を負荷した後、十分な量のポリペプチドが画分に収集されるまで、平衡化緩衝液で洗浄される。

10

【0127】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50～約600mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約350mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約25～約75mMのトリスおよび約50～約100mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約50mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH4.0～11.0である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH8.3である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液のpHは、約pH8.0である。いくつかの実施形態では、再生緩衝液は、約pH8.3で約350mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約pH8.0で約50mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、約3～約12材料体積の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

20

【0128】

いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.1N～約1NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、約2～約12材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

30

【0129】

いくつかの実施形態において、保存緩衝液は、約0.05N～約0.5NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.1NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約4材料体積の保存緩衝液に保存される。

40

【0130】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、1000g/L以下のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約1000g/L以下、900g/L以下、800g/L以下、750g/L以下、700g/L以下、600g/L以下、500g/L以下、400g/L以下、300g/L以下、250g/L以下、200g/L以下、100g/L以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20g/L～約1000g/L、約50g/L～約1000g/L、約100g/L～約1000g/L、約200g/L～約1000g/L、約250g/L～約1000g/L、約300g/L～約1000g/L、約400g/L～約1000g/L、約500g/L～約1000g/L

50

L、約600g/L～約1000g/L、約700g/L～約1000g/L、約750g/L～約1000g/L、約800g/L～約1000g/L、または約900g/L～約1000g/Lクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20g/L～約900g/L、約20g/L～約800g/L、約20g/L～約750g/L、約20g/L～約700g/L、約20g/L～約600g/L、約20g/L～約500g/L、約20g/L～約400g/L、約20g/L～約300g/L、約20g/L～約250g/L、約20g/L～約200g/L、約20g/L～約100g/L、約20g/L～約75g/L、または約20g/L～約50g/Lのいずれかのクロマトグラフィー材料のいずれかである。

【0131】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、20g/L以上のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20g/L以上、50g/L以上、75g/L以上、100g/L以上、200g/L以上、250g/L以上、300g/L以上、400g/L以上、500g/L以上、600g/L以上、700g/L以上、750g/L以上、800g/L以上、900g/L以上、1000g/L以上、1200g/L以上、1400g/L以上、1500g/L以上、1750g/L以上、または2000g/L以上のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20g/L～約2000g/L、約50g/L～約2000g/L、約100g/L～約2000g/L、約200g/L～約2000g/L、約250g/L～約2000g/L、約300g/L～約2000g/L、約400g/L～約2000g/L、約500g/L～約2000g/L、約600g/L～約2000g/L、約700g/L～約2000g/L、約750g/L～約2000g/L、約800g/L～約2000g/L、約900g/L～約2000g/L、約1000g/L～約2000g/L、約1250g/L～約2000g/L、または約1500g/L～約2000g/Lクロマトグラフィー材料のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20g/L～約1750g/L、約20g/L～約1500g/L、約20g/L～約1250g/L、約20g/L～約1200g/L、または約20g/L～約1100g/Lクロマトグラフィー材料のいずれかである。

【0132】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を、約2倍（2倍）、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、75倍、80倍、90倍、または100倍のいずれかで超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を、2倍～100倍、5倍～100倍、10倍～100倍、20倍～100倍、25倍～100倍、30倍～100倍、40倍～100倍、50倍～100倍、60倍～100倍、70倍～100倍、75倍～100倍、80倍～100倍、または90倍～100倍超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2倍～100倍、2倍～75倍、2倍～50倍、2倍～25倍、2倍～20倍、2倍～15倍、2倍～14倍、2倍～13倍、2倍～12倍、2倍～11倍、2倍～10倍、2倍～9倍、2倍～8倍、2倍～7倍、2倍～6倍、2倍～5倍、2倍～4倍、または2倍～3倍超える。

【0133】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対す

10

20

30

40

50

るイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、g) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む、ステップ、およびh) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、Capto (商標) Adhere クロマトグラフィー材料である。

10

【0134】

いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mM～約100mM、約55mM～約100mM、約60mM～約100mM、約65mM～約100mM、約70mM～約100mM、約75mM～約100mM、約80mM～約100mM、約85mM～約100mM、約90mM～約100mM、約95mM～約100mM、約50mM～約95mM、約50mM～約90mM、約50mM～約85mM、約50mM～約80mM、約50mM～約75mM、約50mM～約70mM、約50mM～65mM、約50mM～約60mM、または約50mM～約55mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM、または100mMのいずれかのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約85mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約20mM～約80mM、約30mM～約80mM、約40mM～約80mM、約50mM～約80mM、約60mM～約80mM、約70mM～約80mM、約20mM～約70mM、約20mM～約60mM、約20mM～約50mM、約20mM～約40mM、または約20mM～約30mMのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、または70mMのいずれかのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mMのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mMのトリスおよび85mMのNaOAcを含む。

20

30

【0135】

いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約6.0～約10.0、約7.0～約10.0、約8.0～約10.0、約9.0～約10.0、約9.0～約9.0、約6.0～約8.0、または約6.0～約7.0である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5または10.0のいずれかである。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは約8.0である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mMのトリスおよび85mMのNaOAc、約pH8.0を含む。

40

【0136】

いくつかの実施形態において、約3～約10、約3～約9、約3～約8、約3～約7、約3～約6、約3～約5、約3～約4、約4～約10、約5～約10、約6～約10、約7～約10、約8～約10、約9～約10、約3～約8、約4～約7、または約5～約6の材料体積 (例えば、カラム体積) の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前に、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、または10のいずれかの材料体積 (例えば、カラム体積) の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実

50

施形態において、約 5 材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前に、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換材料は、組成物を負荷した後、十分な量のポリペプチドが画分に収集されるまで、平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷した後にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷した後にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0137】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 50～約 600 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 25 mM～600 mM、30 mM～600 mM、40 mM～600 mM、50 mM～600 mM、75 mM～600 mM、100 mM～600 mM、125 mM～600 mM、150 mM～600 mM、175 mM～600 mM、200 mM～600 mM、225 mM～600 mM、250 mM～600 mM、275 mM～600 mM、300 mM～600 mM、325 mM～600 mM、350 mM～600 mM、375 mM～600 mM、400 mM～600 mM、450 mM～600 mM、500 mM～600 mM、550 mM～600 mM、25 mM～550 mM、25 mM～500 mM、25 mM～475 mM、25 mM～450 mM、25 mM～425 mM、25 mM～400 mM、25 mM～375 mM、25 mM～550 mM、25 mM～325 mM、25 mM～300 mM、25 mM～275 mM、25 mM～250 mM、25 mM～225 mM、25 mM～200 mM、25 mM～175 mM、25 mM～150 mM、25 mM～125 mM、25 mM～100 mM、25 mM～90 mM、25 mM～80 mM、25 mM～70 mM、25 mM～60 mM、25 mM～50 mM、25 mM～40 mM、または 25 mM～30 mM のいずれかの濃度範囲の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または 600 mM のいずれかの NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 350 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 40 mM の NaOAc を含む。

【0138】

いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 pH 2.0～約 pH 7.0 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 pH 2.0～約 pH 6.5、約 pH 2.0～約 pH 6.0、約 pH 2.0～約 pH 5.5、約 pH 2.0～約 pH 5.0、約 pH 2.0～約 pH 4.5、約 pH 2.0～約 pH 4.0、約 pH 2.0～約 pH 3.5、約 pH 2.0～約 pH 3.0、約 pH 2.0～約 pH 2.5、約 pH 2.5～約 pH 7.0、約 pH 3.0～約 pH 7.0、約 pH 3.5～約 pH 7.0、約 pH 4.0～約 pH 7.0、約 pH 4.5～約 pH 7.0、約 pH 5.0～約 pH 7.0、約 pH 5.5～約 pH 7.0、約 pH 6.0～約 pH 7.0、または約 pH 6.5～約 pH 7.0 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 pH 2.0、約 pH 8.0、約 pH 2.5、約 pH 3.0、約 pH 3.5、約 pH 4.0、約 pH 4.5、約 pH 5.0、約 pH 5.5、約 pH 6.0、約 pH 6.5、または約 pH 7.0 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液の pH は、約 4.0 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 pH 4.0 の約 350 mM の NaOAc である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 pH 5.0 の約 350 mM の NaOAc である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 pH 4.0 の約 40 mM の NaOAc である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 pH 4.0 の約 40 mM の NaOAc である。

【0139】

いくつかの実施形態において、約 3～約 12、約 3～約 11、約 3～約 10、約 3～約 9、約 3～約 8、約 3～約 7、約 3～約 6、約 3～約 5、約 3～約 4、約 4～約 12、約

5～約12、約6～約12、約7～約12、約8～約12、約9～約12、約10～約12、約11～約12、約5～約12、約5～約10、約8～約12、または約9～約11の材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約7材料体積（例えば、カラム体積）の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0140】

いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcを含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、リン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcおよびリン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.1M超～約0.5M未満の任意の濃度である。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.100M、0.120M、0.130M、0.140M、0.150M、0.160M、0.161M、0.162M、0.163M、0.164M、0.167M、0.168M、0.169M、0.170M、0.180M、0.190M、0.200M、0.250M、0.300M、0.350M、0.400M、0.450M、または0.500Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のリン酸の濃度は、約0.10M、0.15M、0.20M、0.25M、0.30M、0.35M、0.40M、0.45M、0.50M、0.55M、または0.60Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、約0.167MのNaOAcおよび約0.3Mのリン酸を含む。

10

20

【0141】

いくつかの実施形態において、約1～約5、約1～約4、約1～約3、約1～約2、約2～約5、約2～約4、約2～約3、約3～約5、約3～約4、約4～約5の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約1、2、3、4、または5のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0142】

いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.1N～約1NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5M～約1.5MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5MのNaCl～約2MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約1.0MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、約1～約10材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約4材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

30

【0143】

いくつかの実施形態において、保存緩衝液は、約0.05N～約0.5NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.1NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約3材料体積の保存緩衝液に保存される。

40

【0144】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、1000g/L以下のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約1000g/L以下、900g/L以下、800g/L以下、750g/L以下、700g/L以下、600g/L以下、500g/L以下、400g/L以下、300g/L以下、250

50

g/L以下、200 g/L以下、100 g/L以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20 g/L～約1000 g/L、約50 g/L～約1000 g/L、約100 g/L～約1000 g/L、約200 g/L～約1000 g/L、約250 g/L～約1000 g/L、約300 g/L～約1000 g/L、約400 g/L～約1000 g/L、約500 g/L～約1000 g/L、約600 g/L～約1000 g/L、約700 g/L～約1000 g/L、約750 g/L～約1000 g/L、約800 g/L～約1000 g/L、または約900 g/L～約1000 g/Lクロマトグラフィー材料のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20 g/L～約900 g/L、約20 g/L～約800 g/L、約20 g/L～約750 g/L、約20 g/L～約700 g/L、約20 g/L～約600 g/L、約20 g/L～約500 g/L、約20 g/L～約400 g/L、約20 g/L～約300 g/L、約20 g/L～約250 g/L、約20 g/L～約200 g/L、約20 g/L～約100 g/L、約20 g/L～約75 g/L、または約20 g/L～約50 g/Lクロマトグラフィー材料のいずれかである。

10

【0145】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、20 g/L以上のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20 g/L以上、50 g/L以上、75 g/L以上、100 g/L以上、200 g/L以上、250 g/L以上、300 g/L以上、400 g/L以上、500 g/L以上、600 g/L以上、700 g/L以上、750 g/L以上、800 g/L以上、900 g/L以上、1000 g/L以上、1200 g/L以上、1400 g/L以上、1500 g/L以上、1750 g/L以上、または2000 g/L以上のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20 g/L～約2000 g/L、約50 g/L～約2000 g/L、約100 g/L～約2000 g/L、約200 g/L～約2000 g/L、約250 g/L～約2000 g/L、約300 g/L～約2000 g/L、約400 g/L～約2000 g/L、約500 g/L～約2000 g/L、約600 g/L～約2000 g/L、約700 g/L～約2000 g/L、約750 g/L～約2000 g/L、約800 g/L～約2000 g/L、約900 g/L～約2000 g/L、約1000 g/L～約2000 g/L、約1250 g/L～約2000 g/L、または約1500 g/L～約2000 g/Lクロマトグラフィー材料のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約20 g/L～約1750 g/L、約20 g/L～約1500 g/L、約20 g/L～約1250 g/L、約20 g/L～約1200 g/L、または約20 g/L～約1100 g/Lクロマトグラフィー材料のいずれかである。

20

30

【0146】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を、約2倍（2倍）、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、75倍、80倍、90倍、または100倍のいずれかで超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を、2倍～100倍、5倍～100倍、10倍～100倍、20倍～100倍、25倍～100倍、30倍～100倍、40倍～100倍、50倍～100倍、60倍～100倍、70倍～100倍、75倍～100倍、80倍～100倍、または90倍～100倍超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2倍～100倍、2倍～75倍、2倍～50倍、2倍～25倍、2倍～20倍、2倍～15倍、2倍～14倍、2倍～13倍、2倍～12倍、2倍～11倍、2倍～10倍、2倍～9倍、2倍～8倍、2倍～7倍、2倍～6倍、2倍～5倍、2倍～4倍、または2倍～3倍で超える。

40

【0147】

50

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料は再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 第1の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、f) 第2の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、第2の再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含み、再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、h) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、i) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が、約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびj) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、C a p t o (商標) A d h e r e クロマトグラフィー材料である。

【0148】

いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mM~約100mM、約55mM~約100mM、約60mM~約100mM、約65mM~約100mM、約70mM~約100mM、約75mM~約100mM、約80mM~約100mM、約85mM~約100mM、約90mM~約100mM、約95mM~約100mM、約50mM~約95mM、約50mM~約90mM、約50mM~約85mM、約50mM~約80mM、約50mM~約75mM、約50mM~約70mM、約50mM~65mM、約50mM~約60mM、または約50mM~約55mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM、または100mMのいずれかのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約85mMのNaOAcを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約20mM~約80mM、約30mM~約80mM、約40mM~約80mM、約50mM~約80mM、約60mM~約80mM、約70mM~約80mM、約20mM~約70mM、約20mM~約60mM、約20mM~約50mM、約20mM~約40mM、または約20mM~約30mMのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、または70mMのいずれかのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mMのトリスを含む。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mMのトリスおよび85mMのNaOAcを含む。

【0149】

いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約6.0~約10.0、約7.0~約10.0、約8.0~約10.0、約9.0~約10.0、約9.0~約9.0、約6.0~約8.0、または約6.0~約7.0である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは、約6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5または10.0のいずれかである。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液のpHは約8.0である。いくつかの実施形態において、平衡化緩衝液は、約50mMのトリスおよび85mMのNaOAc、約pH8.0を含む。

【0150】

いくつかの実施形態において、約 3～約 10、約 3～約 9、約 3～約 8、約 3～約 7、約 3～約 6、約 3～約 5、約 3～約 4、約 4～約 10、約 5～約 10、約 6～約 10、約 7～約 10、約 8～約 10、約 9～約 10、約 3～約 8、約 4～約 7、または約 5～約 6 の材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前に、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 3、4、5、6、7、8、9、または 10 のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 5 材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷する前に、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、イオン交換材料は、組成物を負荷した後、十分な量のポリペプチドが画分に収集されるまで、平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態において、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷した後にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 10 材料体積（例えば、カラム体積）の平衡化緩衝液が、組成物を負荷した後にイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

10

【0151】

いくつかの実施形態において、第 1 の再生緩衝液および／または第 2 の再生緩衝液は、約 50～約 600 mM の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、第 1 の再生緩衝液および／または第 2 の再生緩衝液は、約 25 mM～600 mM、30 mM～600 mM、40 mM～600 mM、50 mM～600 mM、75 mM～600 mM、100 mM～600 mM、125 mM～600 mM、150 mM～600 mM、175 mM～600 mM、200 mM～600 mM、225 mM～600 mM、250 mM～600 mM、275 mM～600 mM、300 mM～600 mM、325 mM～600 mM、350 mM～600 mM、375 mM～600 mM、400 mM～600 mM、450 mM～600 mM、500 mM～600 mM、550 mM～600 mM、25 mM～550 mM、25 mM～500 mM、25 mM～475 mM、25 mM～450 mM、25 mM～425 mM、25 mM～400 mM、25 mM～375 mM、25 mM～550 mM、25 mM～325 mM、25 mM～300 mM、25 mM～275 mM、25 mM～250 mM、25 mM～225 mM、25 mM～200 mM、25 mM～175 mM、25 mM～150 mM、25 mM～125 mM、25 mM～100 mM、25 mM～90 mM、25 mM～80 mM、25 mM～70 mM、25 mM～60 mM、25 mM～50 mM、25 mM～40 mM、または 25 mM～30 mM のいずれかの濃度範囲の NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、第 1 の再生緩衝液は、約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または 600 mM のいずれかの NaOAc を含む。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 350 mM の NaOAc を含む。

20

30

【0152】

いくつかの実施形態において、第 1 の再生緩衝液および／または第 2 の再生緩衝液の pH は、約 pH 2.0～約 pH 7.0 である。いくつかの実施形態において、第 1 の再生緩衝液および／または第 2 の再生緩衝液の pH は、約 pH 2.0～約 pH 6.5、約 pH 2.0～約 pH 6.0、約 pH 2.0～約 pH 5.5、約 pH 2.0～約 pH 5.0、約 pH 2.0～約 pH 4.5、約 pH 2.0～約 pH 4.0、約 pH 2.0～約 pH 3.5、約 pH 2.0～約 pH 3.0、約 pH 2.0～約 pH 2.5、約 pH 2.5～約 pH 7.0、約 pH 3.0～約 pH 7.0、約 pH 3.5～約 pH 7.0、約 pH 4.0～約 pH 7.0、約 pH 4.5～約 pH 7.0、約 pH 5.0～約 pH 7.0、約 pH 5.5～約 pH 7.0、約 pH 6.0～約 pH 7.0、または約 pH 6.5～約 pH 7.0 である。いくつかの実施形態において、再生緩衝液は、約 pH 2.0、約 pH 8.0、約 pH 2.5、約 pH 3.0、約 pH 3.5、約 pH 4.0、約 pH 4.5、約 pH 5.0、約 pH 5.5、約 pH 6.0、約 pH 6.5、または約 pH 7.0 である。

40

【0153】

50

いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH4.0であり、第2の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH4.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH5.0であり、第2の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH5.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH4.0であり、第2の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH4.0である。いくつかの実施形態において、第1の再生緩衝液は、約350mMのNaOAcかつ約pH5.0であり、第2の再生緩衝液は、約40mMのNaOAcかつ約pH5.0である。

【0154】

いくつかの実施形態において、約3～約12、約3～約11、約3～約10、約3～約9、約3～約8、約3～約7、約3～約6、約3～約5、約3～約4、約4～約12、約5～約12、約6～約12、約7～約12、約8～約12、約9～約12、約10～約12、約11～約12、約5～約12、約5～約10、約8～約12、または約9～約11の材料体積（例えば、カラム体積）の第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約10の材料体積（例えば、カラム体積）の第1の再生緩衝液および／または第2の再生緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0155】

いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcを含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、リン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、NaOAcおよびリン酸を含む。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.1M超～約0.5M未満の任意の濃度である。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のNaOAcの濃度は、約0.100M、0.120M、0.130M、0.140M、0.150M、0.160M、0.161M、0.162M、0.163M、0.164M、0.167M、0.168M、0.169M、0.170M、0.180M、0.190M、0.200M、0.250M、0.300M、0.350M、0.400M、0.450M、または0.500Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液中のリン酸の濃度は、約0.10M、0.15M、0.20M、0.25M、0.30M、0.35M、0.40M、0.45M、0.50M、0.55M、または0.60Mのいずれかである。いくつかの実施形態において、酸洗浄液は、約0.167MのNaOAcおよび約0.3Mのリン酸を含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、約1～約5、約1～約4、約1～約3、約1～約2、約2～約5、約2～約4、約2～約3、約3～約5、約3～約4、約4～約5の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約1、2、3、4、または5のいずれかの材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約3の材料体積（例えば、カラム体積）の酸洗浄液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0157】

いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.1N～約1NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5NのNaOHを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5M～約1.5MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約1.0MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約0.5NのNaOHおよび約1MのNaClを含む。いくつかの実施形態において、約1～約10材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラ

フィー材料を通過する。いくつかの実施形態において、約 4 材料体積の消毒緩衝液が、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する。

【0158】

いくつかの実施形態において、保存緩衝液は、約 0.05 N ~ 約 0.5 N の NaOH を含む。いくつかの実施形態において、消毒緩衝液は、約 0.1 N の NaOH を含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 1 ~ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、約 3 材料体積の保存緩衝液に保存される。

【0159】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、1000 g/L 以下のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 1000 g/L 以下、900 g/L 以下、800 g/L 以下、750 g/L 以下、700 g/L 以下、600 g/L 以下、500 g/L 以下、400 g/L 以下、300 g/L 以下、250 g/L 以下、200 g/L 以下、100 g/L 以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L ~ 約 1000 g/L、約 50 g/L ~ 約 1000 g/L、約 100 g/L ~ 約 1000 g/L、約 200 g/L ~ 約 1000 g/L、約 250 g/L ~ 約 1000 g/L、約 300 g/L ~ 約 1000 g/L、約 400 g/L ~ 約 1000 g/L、約 500 g/L ~ 約 1000 g/L、約 600 g/L ~ 約 1000 g/L、約 700 g/L ~ 約 1000 g/L、約 750 g/L ~ 約 1000 g/L、約 800 g/L ~ 約 1000 g/L、または約 900 g/L ~ 約 1000 g/L クロマトグラフィー材料のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L ~ 約 900 g/L、約 20 g/L ~ 約 800 g/L、約 20 g/L ~ 約 750 g/L、約 20 g/L ~ 約 700 g/L、約 20 g/L ~ 約 600 g/L、約 20 g/L ~ 約 500 g/L、約 20 g/L ~ 約 400 g/L、約 20 g/L ~ 約 300 g/L、約 20 g/L ~ 約 250 g/L、約 20 g/L ~ 約 200 g/L、約 20 g/L ~ 約 100 g/L、約 20 g/L ~ 約 75 g/L、または約 20 g/L ~ 約 50 g/L クロマトグラフィー材料のいずれかである。

【0160】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、20 g/L 以上のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、75 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L 以上、400 g/L 以上、500 g/L 以上、600 g/L 以上、700 g/L 以上、750 g/L 以上、800 g/L 以上、900 g/L 以上、1000 g/L 以上、1200 g/L 以上、1400 g/L 以上、1500 g/L 以上、1750 g/L 以上、または 2000 g/L 以上のクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L ~ 約 2000 g/L、約 50 g/L ~ 約 2000 g/L、約 100 g/L ~ 約 2000 g/L、約 200 g/L ~ 約 2000 g/L、約 250 g/L ~ 約 2000 g/L、約 300 g/L ~ 約 2000 g/L、約 400 g/L ~ 約 2000 g/L、約 500 g/L ~ 約 2000 g/L、約 600 g/L ~ 約 2000 g/L、約 700 g/L ~ 約 2000 g/L、約 750 g/L ~ 約 2000 g/L、約 800 g/L ~ 約 2000 g/L、約 900 g/L ~ 約 2000 g/L、約 1000 g/L ~ 約 2000 g/L、約 1250 g/L ~ 約 2000 g/L、または約 1500 g/L ~ 約 2000 g/L クロマトグラフィー材料のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L ~ 約 1750 g/L、約 20 g/L ~ 約 1500 g/L、約 20 g/L ~ 約 1250 g/L、約 20 g/L ~ 約 1200 g/L、または約 20 g/L ~ 約 1100 g/L クロマトグラフィー材料のいずれかである。

【0161】

いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を、約 2 倍（2 倍）、

10

20

30

40

50

3 倍、4 倍、5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、20 倍、25 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、75 倍、80 倍、90 倍、または100 倍のいずれかで超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を、2 倍～100 倍、5 倍～100 倍、10 倍～100 倍、20 倍～100 倍、25 倍～100 倍、30 倍～100 倍、40 倍～100 倍、50 倍～100 倍、60 倍～100 倍、70 倍～100 倍、75 倍～100 倍、80 倍～100 倍、または90 倍～100 倍超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2 倍～100 倍、2 倍～75 倍、2 倍～50 倍、2 倍～25 倍、2 倍～20 倍、2 倍～15 倍、2 倍～14 倍、2 倍～13 倍、2 倍～12 倍、2 倍～11 倍、2 倍～10 倍、2 倍～9 倍、2 倍～8 倍、2 倍～7 倍、2 倍～6 倍、2 倍～5 倍、2 倍～4 倍、または2 倍～3 倍で超える。

10

【0162】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40 mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000 g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH 8.3で約350 mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5 NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1 NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40 mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000 g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約10 材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH 8.3で約350 mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 約10 材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5 NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1 NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約1000 g/L以下、900 g/L以下、800 g/L以下、750 g/L以下、700 g/L以下、600 g/L以下、500 g/L以下、400 g/L以下、300 g/L以下、250 g/L以下、200 g/L以下、100 g/L以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

20

30

40

【0163】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40 mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000 g/L以下である、ス

50

テップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 1000 g/L 以下、900 g/L 以下、800 g/L 以下、750 g/L 以下、700 g/L 以下、600 g/L 以下、500 g/L 以下、400 g/L 以下、300 g/L 以下、250 g/L 以下、200 g/L 以下、100 g/L 以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

【0164】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に

10

20

30

40

50

保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 1000 g/L 以下、900 g/L 以下、800 g/L 以下、750 g/L 以下、700 g/L 以下、600 g/L 以下、500 g/L 以下、400 g/L 以下、300 g/L 以下、250 g/L 以下、200 g/L 以下、100 g/L 以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

【0165】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、70 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L 以上、400 g/L 以上、500 g/L 以上、600 g/L 以上、700 g/L 以上、750 g/L 以上、800 g/L 以上、900 g/L 以上、1000 g/L 以上、1200 g/L 以上、1400 g/L 以上、1500 g/L 以上、1750 g/L 以上、または 2000 g/L 以上のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

【0166】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イ

オン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、70 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L 以上、400 g/L 以上、500 g/L 以上、600 g/L 以上、700 g/L 以上、750 g/L 以上、800 g/L 以上、900 g/L 以上、1000 g/L 以上、1200 g/L 以上、1400 g/L 以上、1500 g/L 以上、1750 g/L 以上、または 2000 g/L 以上のクロマトグラフィー材料である。

10

20

【0167】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約 pH 8.3 で約 350 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、70 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L

30

40

50

L以上、400g/L以上、500g/L以上、600g/L以上、700g/L以上、750g/L以上、800g/L以上、900g/L以上、1000g/L以上、1200g/L以上、1400g/L以上、1500g/L以上、1750g/L以上、または2000g/L以上のクロマトグラフィー材料である。

【0168】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH8.3で約350mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約10材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH8.3で約350mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 約10材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2倍〜100倍超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を約10倍超える。

【0169】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対する陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH8.3で約350mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグ

ラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対する陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約10材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH 8.3で約350mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 約10材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2倍～100倍を超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を約10倍を超える。

10

【0170】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対する陰イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH 8.3で約350mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約10材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が約pH 8.3で約350mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 約10材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2倍～100倍を超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を約10倍を超える。

20

30

40

【0171】

50

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がpH8.0で約25mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約10材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がpH8.0で約25mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 約10材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約1000g/L以下、900g/L以下、800g/L以下、750g/L以下、700g/L以下、600g/L以下、500g/L以下、400g/L以下、300g/L以下、250g/L以下、200g/L以下、100g/L以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

10

20

30

【0172】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がpH8.0で約25mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラ

40

50

フィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が $\text{pH } 8.0$ で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 1000 g/L 以下、 900 g/L 以下、 800 g/L 以下、 750 g/L 以下、 700 g/L 以下、 600 g/L 以下、 500 g/L 以下、 400 g/L 以下、 300 g/L 以下、 250 g/L 以下、 200 g/L 以下、 100 g/L 以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

10

【0173】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が $\text{pH } 8.0$ で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g/L 以下である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が $\text{pH } 8.0$ で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 1000 g/L 以下、 900 g/L 以下、 800 g/L 以下、 750 g/L 以下、 700 g/L 以下、 600 g/L 以下、 500 g/L 以下、 400 g/L 以下、 300 g/L 以下、 250 g/L 以下、 200 g/L 以下、 100 g/L 以下のいずれかのクロマトグラフィー材料である。

20

30

40

【0174】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が

50

約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、70 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L 以上、400 g/L 以上、500 g/L 以上、600 g/L 以上、700 g/L 以上、750 g/L 以上、800 g/L 以上、900 g/L 以上、1000 g/L 以上、1200 g/L 以上、1400 g/L 以上、1500 g/L 以上、1750 g/L 以上、または 2000 g/L 以上のクロマトグラフィー材料である。

10

20

30

40

50

【0175】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陽イ

オン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、70 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L 以上、400 g/L 以上、500 g/L 以上、600 g/L 以上、700 g/L 以上、750 g/L 以上、800 g/L 以上、900 g/L 以上、1000 g/L 以上、1200 g/L 以上、1400 g/L 以上、1500 g/L 以上、1750 g/L 以上、または 2000 g/L 以上のクロマトグラフィー材料である。

10

【0176】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度が約 20 g/L 以上である、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、約 20 g/L 以上、50 g/L 以上、70 g/L 以上、100 g/L 以上、200 g/L 以上、250 g/L 以上、300 g/L 以上、400 g/L 以上、500 g/L 以上、600 g/L 以上、700 g/L 以上、750 g/L 以上、800 g/L 以上、900 g/L 以上、1000 g/L 以上、1200 g/L 以上、1400 g/L 以上、1500 g/L 以上、1750 g/L 以上、または 2000 g/L 以上のクロマトグラフィー材料である。

20

30

40

【0177】

いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換

50

クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がpH8.0で約25mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約10材料体積の再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がpH8.0で約25mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 約10材料体積の消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を2倍〜100倍を超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を約10倍を超える。

10

20

30

40

50

【0178】

いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対する陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がpH8.0で約25mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、およびg) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約4材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、ステップ、b) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対する陽イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陽イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を 2 倍～100 倍超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を約 10 倍超える。

10

【0179】

いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対する陰イオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの局面において、本発明は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法を提供し、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法は、a) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の平衡化緩衝液で平衡化するステップであって、平衡化緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、ステップ、b) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料に組成物を負荷するステップであって、負荷密度がポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量を超える、ステップ、c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、d) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、e) 約 10 材料体積の再生緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が pH 8.0 で約 25 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、ステップ、f) 約 10 材料体積の消毒緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および g) 陰イオン交換クロマトグラフィー材料を約 4 材料体積の保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が、約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を 2 倍～100 倍超える。いくつかの実施形態において、組成物の負荷密度は、ポリペプチドに対するクロマトグラフィー材料の動的結合容量を約 10 倍超える。

20

30

40

【0180】

本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は、イオン交換材料（例えば、陽イオン交換材料または陰イオン交換材料）である。いくつかの実施形態において、イオン交換材料は、クロマトグラフィーカラム（例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムまたは陰イオン交換クロマトグラフィーカラム）内にある。

【0181】

いくつかの実施形態において、陽イオン交換材料は、負に荷電しており、かつ固相を通

50

るか、または通過した水溶液中の陽イオンとの交換のために遊離陽イオンを有する固相である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、陽イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。いくつかの実施形態において、陽イオン交換材料は、樹脂であり得る。陽イオン交換材料は、例えば、スルホン酸塩、カルボキシル、カルボキシメチルスルホン酸、スルホイソブチル、スルホエチル、カルボキシル、スルホプロピル、スルホニル、スルホキシエチル、またはオルトリン酸塩であるが、これらに限定されないカルボン酸官能基またはスルホン酸官能基を含み得る。上述のいくつかの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂である。上述のいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー膜である。本発明のいくつかの実施形態では、クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料ではない。いくつかの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において使用される。

10

【0182】

本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、イオン交換材料は、従来のクロマトグラフィー材料または対流クロマトグラフィー材料を利用し得る。従来のクロマトグラフィー材料としては、例えば、灌流材料（例えば、ポリ（スチレンージビニルベンゼン）樹脂）および拡散材料（例えば、架橋アガロース樹脂）が挙げられる。いくつかの実施形態において、ポリ（スチレンージビニルベンゼン）樹脂は、Poros（商標）樹脂であり得る。いくつかの実施形態において、架橋アガロース樹脂は、スルホプロピル-Sephacrose（登録商標）Fast Flow（「SPSFF」）樹脂であり得る。対流クロマトグラフィー材料は、膜（例えば、ポリエーテルスルホン）またはモノリス材料（例えば、架橋ポリマー）であり得る。ポリエーテルスルホン膜は、Mustangであり得る。架橋ポリマーモノリス材料は、架橋ポリ（グリシジルメタクリレート-コエチレンジメタクリレート）であり得る。

20

【0183】

陽イオン交換材料の例は、当該技術分野で公知であり、それらとしては、Mustang（登録商標）S、Sartobind（登録商標）S、SO₃ Monolith、SCeramic HyperD（商標）、Poros（商標）XS、Poros（商標）HS50、Poros（商標）HS20、SPSFF、SP-Sephacrose（登録商標）XL（SPXL）、CM Sepharose（登録商標）Fast Flow、Capto（商標）S、Fractogel（登録商標）Se HiCap、Fractogel（登録商標）SO₃、またはFractogel（登録商標）COOが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、Poros（商標）HS50である。いくつかの実施形態において、Poros（商標）HS樹脂は、Poros（商標）HS 50 μmまたはPoros（商標）HS 20 μm粒子であり得る。

30

【0184】

本明細書のいくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、正に荷電しており、かつ固相を通るか、または通過した水溶液中の陰イオンとの交換のために遊離陰イオンを有する固相である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、陰イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。一実施形態において、陰イオン交換材料は、樹脂であり得る。いくつかの実施形態において、陰イオン交換材料は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、もしくは第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、またはジエチルアミノエチル官能基を含み得る。上述のいくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー膜である。陰イオン交換材料の例は、当該技術分野で公知であり、それらとしては、Poros（商標）HQ 50、Poros（商標）PI 50、Poros（商標）D、Mustang（登録商標）Q、

40

50

Q Sepharose (登録商標) FF、および DEAE Sepharose (登録商標) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0185】

いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モードイオン交換クロマトグラフィー材料である。混合モードクロマトグラフィー材料は、以下の機能、陰イオン交換、陽イオン交換、水素結合、および疎水性相互作用の1つ以上が可能な官能基を含む。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。陽イオン交換混合モード材料の例には、Capto MMC (商標)、Capto MMC (商標) ImpRes、Nuvia (商標) cPrime (商標)、および Toyopearl MX Trp-650 M が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー材料である。陰イオン交換混合モード材料の例としては、Capto Adhere (商標) および Capto Adhere (商標) ImpRes が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0186】

いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、複数のポリペプチド製品を精製するために使用される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィー材料は、複数の抗体産物を精製するために使用される。いくつかの実施形態において、洗浄方法後のキャリーオーバーは、0.25 mg/mL 未満総タンパク質、1 ppm 未満 IgG 断片、1 ppm 未満 IgG 凝集体、1 ppm 未満浸出プロテインA、1 µg/mL 未満 CZE LIF、1 ppm 未満 CHOP、および 1 pg/mL 未満 CHO DNA の1つまたは複数を含む。

20

【0187】

いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドの精製において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられる。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、抗体の精製において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられる。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられて使用される。いくつかの実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられて使用される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷イオン交換クロマトグラフィーの前に実行される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷イオン交換クロマトグラフィーの後に実行される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷イオン交換クロマトグラフィーの前に実行され、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷イオン交換クロマトグラフィーの後に実行される。いくつかの実施形態において、過負荷イオン交換クロマトグラフィーは、混合モードクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換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 (HIC)、親和性クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーからなる群から選択される1つまたは複数のクロマトグラフィー手順と組み合わせられる。

30

40

【0188】

いくつかの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドの精製において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられる。いくつかの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、抗体の精製において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられる。いくつかの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー

50

一手順と組み合わせられて使用される。いくつかの実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順と組み合わせられて使用される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィーの前に実行される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィーの後に実行される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィーの前に実行され、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィーの後に実行される。いくつかの実施形態において、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィーは、混合モードクロマトグラフィー、陰イオン交換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（HIC）、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびさらなる陽イオン交換クロマトグラフィーからなる群から選択される1つまたは複数のクロマトグラフィー手順と組み合わせられる。

10

【0189】

モノクローナル抗体の2000L精製プロセスの例は、抗体を産生するCHO細胞を回収してフィードストリームを生成することを含む。フィードストリームを結合および溶出モードで30g/L樹脂以下の負荷密度でプロテインA親和性クロマトグラフィー（例えば、MabSelect SuRe（商標））に供し、プロテインA溶出液を結合および溶出モードで85g/L樹脂以下の負荷密度で陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、POROS（商標）XS）に供し、陽イオン交換溶出液をフロースルーモードで、100g/L樹脂以下の負荷密度で混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Q-Sepharose（登録商標）FF）に供し、そして、混合モード陰イオン交換画分を限外濾過／ダイアフィルトレーション（例えば、Pellicon（登録商標）3）に供し、最終濃度50g/Lで抗体を製剤化する。

20

【0190】

モノクローナル抗体の2000L精製プロセスの他の例は、抗体を産生するCHO細胞を回収してフィードストリームを生成することを含む。フィードストリームを結合および溶出モードで30g/L樹脂以下の負荷密度でプロテインA親和性クロマトグラフィー（例えば、MabSelect SuRe（商標））に供し、プロテインA溶出液を結合および溶出モードで41g/L樹脂以下の負荷密度で陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、POROS（商標）HS）に供し、陽イオン交換溶出液をフロースルーモードで、100g/L樹脂以下の負荷密度で混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Q-Sepharose（登録商標）FF）に供し、混合モード陰イオン交換画分を1.2~2.6kg/m²でフィルタ（例えば、1:1 Viresolve（登録商標）ProShield/Viresolve（登録商標）Pro）にかけてウイルスを除去し、そして、フィードストリームを限外濾過／ダイアフィルトレーションに供し、最終濃度50g/Lで抗体を製剤化する。

30

【0191】

モノクローナル抗体の12000L製造規模の精製プロセスの例は、抗体を産生するCHO細胞を回収してフィードストリームを生成することを含む。フィードストリームを界面活性剤ウイルス不活化ステップ（例えば、Triton-CG110）に供し、フィードストリームを結合および溶出モードで40g/L樹脂以下の負荷密度でプロテインA親和性クロマトグラフィー（例えば、MabSelect SuRe（商標））に供し、プロテインA溶出液を結合および溶出モードで1000g/L樹脂以下の負荷密度で陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、POROS（商標）HS）に供し、陽イオン交換溶出液をフロースルーモードで、350g/L樹脂以下の負荷密度で混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Capto（商標）Adhere）に供し、そして、混合モード陰イオン交換画分を限外濾過／ダイアフィルトレーション（例えば、Pellicon（登録商標）3）に供し、最終濃度60g/Lで抗体を製剤化する。

40

50

【0192】

モノクローナル抗体の12000L製造規模の精製プロセスの他の例は、抗体を産生するCHO細胞を回収してフィードストリームを生成することを含む。フィードストリームを結合および溶出モードで35g/L樹脂以下の負荷密度でプロテインA親和性クロマトグラフィー（例えば、MabSelect SuRe（商標））に供し、プロテインA溶出液を過負荷モードで800g/L樹脂以下の負荷密度で陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、POROS（商標）HS）に供し、陽イオン交換溶出液をフロースルーモードで、250g/L樹脂以下の負荷密度で混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Captor（商標）Adhere）に供し、混合モード陰イオン交換画分を9~10kg/m²でフィルタ（例えば、1:1 Viresolve（登録商標）ProShield/Viresolve（登録商標）Pro）にかけてウイルスを除去し、そして、フィードストリームを限外濾過／ダイアフィルトレーションに供し、最終濃度100g/Lで抗体を製剤化する。

10

【0193】

本発明のいくつかの局面において、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィーは、親和性クロマトグラフィー材料と組み合わせて使用される。親和性クロマトグラフィー材料の例としては、プロテインAおよび／またはプロテインGで誘導体化されたクロマトグラフィー材料が挙げられるが、これらに限定されない。親和性クロマトグラフィー材料の例としては、Prosep（登録商標）-VA、Prosep（登録商標）-VA Ultra Plus、プロテインA sepharose（登録商標）ファストフロー、Toyopearl（登録商標）プロテインA、およびMabSelect、MabSelect SuRe（商標）およびMabSelect SuRe（商標）LX、プロテインL、FcXL、プロテインXL、カップクロマトグラフィー、およびカップXLクロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。上述のいくつかの実施形態において、親和性クロマトグラフィー材料は、親和性クロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態において、親和性クロマトグラフィー材料は、親和性クロマトグラフィー膜である。

20

【0194】

本発明のいくつかの局面において、過負荷イオン交換クロマトグラフィー（例えば、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィー）は、混合モードクロマトグラフィー材料と組み合わせて使用される。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では、クロマトグラフィー材料は、以下の機能、陰イオン交換、陽イオン交換、水素結合、および疎水性相互作用の1つ以上が可能な官能基を含む混合モード材料である。いくつかの実施形態において、混合モード材料は、陰イオン交換および疎水性相互作用が可能な官能基を含む。混合モード材料は、リガンドとしてN-ベンジル-N-メチルエタノールアミン、4-メルカプト-エチル-ピリジン、ヘキシルアミン、またはフェニルプロピルアミンを含むか、または架橋ポリアリルアミンを含み得る。混合モード材料の例としては、Captor（商標）Adhere樹脂、QMA樹脂、Captor（商標）MMC樹脂、MEP HyperCell（商標）樹脂、HEA HyperCell（商標）樹脂、PPA HyperCell（商標）樹脂、またはChromaSorb（商標）膜またはSartobind（登録商標）STICが挙げられる。いくつかの実施形態において、混合モード材料は、Captor（商標）Adhere樹脂である。上述のいくつかの実施形態において、混合モード材料は混合モードクロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態において、混合モード材料は混合モード膜である。

30

40

【0195】

本発明のいくつかの局面において、過負荷イオン交換クロマトグラフィー（例えば、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィー）は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、正に荷電しており、かつ固相を通るか、または通過した水溶液中の陰イオンとの交換のために遊離陰イオンを有する固相である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの

50

実施形態において、陰イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。一実施形態において、陰イオン交換材料は、樹脂であり得る。いくつかの実施形態において、陰イオン交換材料は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、もしくは第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、またはジエチルアミノエチル官能基を含み得る。上述のいくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィー膜である。

【0196】

本発明のいくつかの局面において、過負荷イオン交換クロマトグラフィー（例えば、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィー）は、疎水性相互作用クロマトグラフィー材料と組み合わせて使用される。疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）は、疎水性に応じて生体分子を分離する液体クロマトグラフィー技術である。HICクロマトグラフィー材料の例としては、Toyopearl（登録商標）ヘキシル650、Toyopearl（登録商標）ブチル650、Toyopearl（登録商標）フェニル650、Toyopearl（登録商標）エーテル650、Source、Resource、Sephrose（登録商標）Hi-Trap、Octyl sepharose（登録商標）、Phenyl sepharose（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。上述のいくつかの実施形態において、HICクロマトグラフィー材料は、HICクロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態では、HICクロマトグラフィー材料は、HICクロマトグラフィー膜である。

【0197】

本発明のいくつかの局面において、過負荷イオン交換クロマトグラフィー（例えば、過負荷陽イオン交換クロマトグラフィー）は、ヒドロキシアパタイト（HA）クロマトグラフィー材料と組み合わせて使用される。ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料の例としては、HA Ultrogel（登録商標）、およびCHTヒドロキシアパタイトが挙げられるが、これらに限定されない。上述のいくつかの実施形態において、HAクロマトグラフィー材料は、HAクロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態において、HAクロマトグラフィー材料は、HAクロマトグラフィー膜である。

【0198】

いくつかの実施形態において、過負荷イオン交換クロマトグラフィーは、カラム内で実行される（すなわち、カラムクロマトグラフィー）。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の他のクロマトグラフィー手順は、カラム内で実行される。

【0199】

いくつかの実施形態において、本発明は、アルカリ安定クロマトグラフィー材料、例えばアルカリ安定クロマトグラフィーカラムを洗浄または再生するための方法を提供する。

【0200】

本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、流量は、約50材料体積／時間、約40材料体積／時間、または約30材料体積／時間いずれか未満である。流量は、約5材料体積／時間～約50材料体積／時間、約10材料体積／時間～約40材料体積／時間、または約18材料体積／時間～約36材料体積／時間のいずれかであり得る。いくつかの実施形態において、流量は、約9材料体積／時、約18材料体積／時間、約25材料体積／時間、約30材料体積／時間、約36材料体積／時間、または約40材料体積／時間のいずれかである。

【0201】

いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は、クロマトグラフィーカラム内にある。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、流量は、約50カラム体積（CV）／時間、40CV／時間、30CV／時間、20CV／時間、または15CV／時間のいずれか未満である。流量は、約5CV／時間～約50CV／時間、約10CV／時間～約40CV／時間、または約15CV／時間～約20CV／時間のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、流量は、約10CV／時間、約15CV／時

間、約 20 CV/時間、約 25 CV/時間、約 30 CV/時間、または約 40 CV/時間のいずれかである。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、流量は、約 100 cm/時間、75 cm/時間、または 50 cm/時間のいずれか未満である。流量は、約 25 cm/時間～約 150 cm/時間、約 25 cm/時間～約 100 cm/時間、約 50 cm/時間～約 100 cm/時間、または約 65 cm/時間～約 85 cm/時間のうちのいずれかであり得る。

【0202】

床高さは、使用されるクロマトグラフィー材料の高さである。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、床高さは、約 3 cm、約 10 cm、または約 15 cm のいずれかよりも大きい。床高さは、約 3 cm～約 35 cm、約 5 cm～約 15 cm、約 3 cm～約 10 cm、または約 5 cm～約 8 cm のいずれかであり得る。いくつかの実施形態において、床高さは、約 3 cm、約 5 cm、約 10 cm、約 15 cm、約 20 cm、約 25 cm、または約 30 cm のいずれかである。いくつかの実施形態において、床高さは、負荷中のポリペプチドまたは混入物の量に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は、カラム内で、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において使用される。いくつかの実施形態において、製造規模のクロマトグラフィー材料は、約 10 cm、約 15 cm、約 20 cm、約 25 cm または約 30 cm のいずれかの床高さを有する。

【0203】

床直径は、使用されるクロマトグラフィー材料の直径である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、床直径は、約 80 cm、約 100 cm、または約 120 cm のいずれかよりも大きい。いくつかの実施形態において、床直径は、約 50 cm、約 60 cm、約 70 cm、約 80 cm、約 90 cm、約 100 cm、約 110 cm、約 120 cm、約 130 cm、約 140 cm、約 150 cm、約 160 cm、約 170 cm、約 180 cm、約 190、または約 200 cm のいずれかである。いくつかの実施形態において、床直径は、負荷中のポリペプチドまたは混入物の量に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は、カラム内で、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において使用される。いくつかの実施形態において、製造規模のクロマトグラフィー材料は、約 50 cm、約 60 cm、約 70 cm、約 80 cm、約 90 cm、約 100 cm、約 110 cm、約 120 cm、約 130 cm、約 140 cm、約 150 cm、約 160 cm、約 170 cm、約 180 cm、約 190、または約 200 cm のいずれかの床直径を有していた。

【0204】

いくつかの実施形態において、クロマトグラフィーは、約 1 mL、約 2 mL、約 3 mL、約 4 mL、約 5 mL、約 6 mL、約 7 mL、約 8 mL、約 9 mL、約 10 mL、約 15 mL、約 20 mL、約 25 mL、約 30 mL、約 40 mL、約 50 mL、約 75 mL、約 100 mL、約 200 mL、約 300 mL、約 400 mL、約 500 mL、約 600 mL、約 700 mL、約 800 mL、約 900 mL、約 1 L、約 2 L、約 3 L、約 4 L、約 5 L、約 6 L、約 7 L、約 8 L、約 9 L、約 10 L、約 25 L、約 50 L、約 100 L、約 200 L、約 300 L、約 400 L、約 500 L、約 600 L、約 700 L、約 800 L、約 900 L、または約 1000 L を超える容量のカラムまたは容器内にある。いくつかの実施形態において、容器は、14 cm の床高さおよび 80 cm の床容積を有し、例えば大規模なプロテイン A カラムである。いくつかの実施形態において、容器は、19 cm の床高さおよび 100 cm の床容積を有し、例えば大規模な陰イオン交換カラムである。いくつかの実施形態において、容器は、30 cm の床高さおよび 120 cm の床容積を有し、例えば大規模なイオン交換カラムである。

【0205】

本明細書で使用される、負荷物は、クロマトグラフィー材料に負荷される組成物である。いくつかの実施形態において、負荷物は、異なるポリペプチドを単離するために以前に使用されたクロマトグラフィー材料に負荷されるポリペプチドである。負荷緩衝液は、目

10

20

30

40

50

的の産物を含む組成物をクロマトグラフィー材料に負荷するために使用される緩衝液である。クロマトグラフィー材料は、精製される組成物の負荷前に平衡化緩衝液で平衡化され得る。いくつかの例において、洗浄緩衝液は、組成物をクロマトグラフィー材料に負荷した後、かつ目的のポリペプチドを固相から溶出させる前に使用される。いくつかの実施形態において、洗浄緩衝液は、負荷緩衝液と同じである。いくつかの実施形態において、目的の産物のいくつか、例えば、ポリペプチドは、洗浄緩衝液（例えば、過負荷モード）によってクロマトグラフィー材料から除去し得る。

【0206】

本明細書で使用される溶出は、産物、例えばポリペプチドのクロマトグラフィー材料からの除去である。本発明のいくつかの実施形態において、溶出は、溶出手順が、最後の洗浄手順の後にタンパク質が負荷されなかったクロマトグラフィー材料に適用される「モック溶出」である。本発明のいくつかの実施形態において、モック溶出手順は、本明細書に記載の洗浄手順のいずれか1つにしたがってクロマトグラフィー材料に適用される。いくつかの実施形態において、モック溶出は、実際の産生ラン中にキャリーオーバー材料（例えば、混入物）が存在する可能性があるかどうかを決定するための試みにおいて、材料に適用されるタンパク質を溶出するために使用される溶出を模倣する。モック溶出は、洗浄手順の有効性を評価する手段として使用し得る。

【0207】

溶出緩衝液は、クロマトグラフィー材料から目的とするポリペプチドまたは他の産物を溶出させるために使用される緩衝液である。多くの場合、溶出緩衝液は、負荷緩衝液とは異なる物理的特徴を有する。例えば、溶出緩衝液は、負荷緩衝液とは異なる伝導度または負荷緩衝液とは異なるpHを有し得る。いくつかの実施形態において、溶出緩衝液は、負荷緩衝液よりも低い伝導度を有する。いくつかの実施形態において、溶出緩衝液は、負荷緩衝液よりも高い伝導度を有する。いくつかの実施形態において、溶出緩衝液は、負荷緩衝液よりも低いpHを有する。いくつかの実施形態において、溶出緩衝液は、負荷緩衝液よりも高いpHを有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、負荷緩衝液とは異なる伝導度および異なるpHを有する。溶出緩衝液は、より高いまたはより低い伝導度、およびより高いまたはより低いpHの任意の組み合わせを有し得る。

【0208】

伝導度とは、2つの電極間に電流を伝導する水溶液の能力を指す。溶液中で、電流は、イオン輸送により流れる。したがって、水溶液中に存在するイオンの量が増加すると、溶液は、より高い伝導度を有するようになる。伝導度の尺度の基本単位は、ジーメンズ（Siemens）（またはモー（mho））であり、mho（ms/cm）であり、種々のモデルのOrion伝導度計等の伝導度計を使用して測定し得る。電解質伝導度は溶液中のイオンの電流を搬送する能力であるため、溶液の伝導度は、その中のイオンの濃度を変化させることによって変更し得る。例えば、溶液中の緩衝剤の濃度および／または塩（例えば、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、または塩化カリウム）の濃度を変更して、所望の伝導度を達成してもよい。好ましくは、種々の緩衝液の塩濃度は、所望の伝導度を達成するために改変される。

【0209】

混入物

本発明は、ポリペプチドの大規模精製、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の産生において使用するためのクロマトグラフィー材料の再利用のための方法を提供する。本方法は、複数のポリペプチド製品のためのクロマトグラフィー材料の複数の使用を提供する。例えば、本発明の方法を使用して、第1の抗体をクロマトグラフィー材料上で工業規模で精製し、続いて本明細書に記載のクロマトグラフィー材料を洗浄／再生する方法、続いて第2の抗体産物の工業規模の精製を行うことができる。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、クロマトグラフィー材料を使用して精製された以前の産物の「キャリーオーバー」を低減するために使用される。いくつかの実施形態において、キャリーオーバー混入物としては、抗体全体、IgG断片、Fc、Fc断片、および抗

体凝集体が含まれるが、これらに限定されない。

【0210】

本明細書に記載する任意の方法のいくつかの実施形態において、少なくとも1つの混入物は、宿主細胞物質、例えばCHOP)、浸出プロテインA、核酸；所望のポリペプチドのバリエーション、断片、凝集体または誘導体、他のポリペプチド、エンドトキシン、ウイルス混入物、細胞培養培地成分、カルボキシペプチダーゼB、ゲンタマイシン等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例においては、混入物は、例えば、細菌細胞、例えば大腸菌(E. coli)細胞、昆虫細胞、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、真菌細胞からの宿主細胞タンパク質(HCP)であり得るが、これらに限定されない。

10

【0211】

浸出プロテインAは、それが結合している固相から分離または洗浄されたプロテインAである。例えば、浸出プロテインAは、プロテインAクロマトグラフィー材料から浸出し得る。プロテインAの量は、例えば、ELISAによって測定し得る。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、浸出プロテインAの量は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、または約90%減少する。浸出プロテインAの量は、約10%~約99%、約30%~約95%、約30%~約99%、約50%~約95%、約50%~約99%、約75%~約99%または約85%~約99%いずれかで減少し得る。いくつかの実施形態において、浸出プロテインAの量は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%のいずれかで減少する。いくつかの実施形態において、減少は、精製ステップ(複数可)から回収された組成物中の浸出プロテインAの量を、精製ステップ(複数可)前の組成物中の浸出プロテインAの量と比較することによって決定される。

20

【0212】

宿主細胞タンパク質(HCP)は、ポリペプチドが産生された細胞由来のタンパク質である。例えば、CHOPは宿主細胞由来のタンパク質、すなわちチャイニーズハムスター卵巣タンパク質である。CHOPの量は、酵素結合免疫吸着検定法(「ELISA」)またはメソスケールディスクバリー(「MSO」)によって測定し得る。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、溶出液中のHCP(例えば、CHOP)の量は、モック溶出において最小である。いくつかの実施形態において、モック溶出からの溶出液中の宿主細胞タンパク質のレベルは、洗浄方法がある場合とない場合、または洗浄方法の前後で比較される。

30

【0213】

宿主細胞DNA等のDNAの測定方法は、当該技術分野で公知であり、実施例のセクションに記載される。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、DNAの量は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、または約90%減少する。DNAの量は、約10%~約99%、約30%~約95%、約30%~約99%、約50%~約95%、約50%~約99%、約75%~約99%または約85%~約99%のいずれかで減少し得る。DNAの量は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、または約99%のいずれかで減少し得る。いくつかの実施形態において、減少は、精製ステップ(複数可)から回収された組成物中のDNAの量を、精製ステップ(複数可)前の組成物中のDNAの量と比較することによって決定される。

40

【0214】

断片ポリペプチドは、低分子量(LMW)タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、断片化されたポリペプチドは、目的のポリペプチドの断片である。LMWタンパク質の例としては、目的の抗体のFab(断片抗原結合)、Fc(断片、結晶化可能)領域、または両方または任意のランダムに断片化された部分の組合せが挙げられるが、これらに限定されない。断片化タンパク質(例えば、LMWタンパク質)の測定方法は、当

50

該技術分野で公知であり、実施例のセクションに記載されている。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、LMWタンパク質の量は、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%のいずれかよりも大きく減少する。LMWタンパク質の量は、約10%～約99%、約30%～約95%、約30%～約99%、約50%～約95%、約50%～約99%、約75%～約99%、または約85%～99%のいずれかで減少し得る。LMWタンパク質の量は、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または95%のいずれかで減少し得る。いくつかの実施形態において、減少は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の断片化されたタンパク質（例えば、LMWタンパク質）の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の断片化されたタンパク質（例えば、LMWタンパク質）の量と比較することによって決定される。

10

【0215】

凝集ポリペプチドは、高分子量（HMW）タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、凝集ポリペプチドは、目的のポリペプチドの多量体である。HMWタンパク質は、目的のポリペプチドの二量体、最大8倍の単量体、またはそれ以上であり得る。凝集タンパク質（例えば、HMWタンパク質）を測定する方法は当該技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、モック溶出におけるHMWのレベルは最小であり、例えば、約5ppm未満、約4ppm未満、約3ppm未満、約2ppm未満、または約1ppm未満である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、凝集タンパク質の量は、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%のいずれかよりも大きく減少する。凝集タンパク質の量は、約10%～約99%、約30%～約95%、約30%～約99%、約50%～約95%、約50%～約99%、約75%～約99%、または約85%～99%のいずれかで減少し得る。凝集タンパク質の量は、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または95%のいずれかで減少し得る。いくつかの実施形態において、減少は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の凝集タンパク質（例えば、HMWタンパク質）の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の凝集タンパク質（例えば、HMWタンパク質）の量と比較することによって決定される。

20

30

【0216】

細胞培養培地成分とは、細胞培養培地中に存在する成分を指す。細胞培養培地は、細胞の回収時の細胞培養培地であり得る。いくつかの実施形態において、細胞培養培地成分は、ゲンタマイシンである。ゲンタマイシンの量は、ELISAによって測定し得る。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、細胞培養培地成分の量は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、または約90%よりも大きく減少する。細胞培養培地成分の量は、約10%～約99%、約30%～約95%、約30%～約99%、約50%～約95%、約50%～約99%、約75%～約99%、または約85%～99%のいずれかで減少し得る。いくつかの実施形態において、細胞培養培地成分の量は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、または約98%のいずれかで減少する。いくつかの実施形態において、減少は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の細胞培養培地成分の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の細胞培養培地成分の量と比較することによって決定される。

40

【0217】

混入物を検出する方法

本発明は、再利用可能なクロマトグラフィー材料の洗浄の有効性を評価するための方法を提供する。例えば、ポリペプチドが以前に負荷され、少なくとも1回溶出されたクロマトグラフィー材料は、上記の本発明の方法の1つによって洗浄される。次に、洗浄手順後に追加のポリペプチドが材料に負荷されていない材料に対してモック溶出が実行される。

50

モック溶出は、以前に材料に負荷されたポリペプチドで使用された溶出手順にしたがっても、または溶出手順は、洗浄手順の後に精製されるポリペプチドの溶出手順にしたがってもよい。いくつかの実施形態において、モック溶出の前に、モック負荷が材料上で実行される。モック負荷は、ポリペプチドが負荷物に含まれていないことを除いて、同じ手順を使用してポリペプチドを材料に負荷する。いくつかの実施形態において、モック溶出からの溶出液は、1つまたは複数の画分に収集される。いくつかの実施形態において、モック溶出からの溶出液は、単一の画分に収集される。いくつかの実施形態において、溶出液、または溶出液のサンプルは、クロマトグラフィー材料の以前の負荷からのキャリーオーバーポリペプチド、IgG断片、浸出プロテインA、CHOPおよびCHO DNAを含む混入物質について分析される。

10

【0218】

ポリペプチドの定量化

モノクローナル抗体 (mAb) 等のポリペプチドの濃度は、UV-可視分光光度計 (8453モデルG1103A; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) またはNanoDrop (商標) 1000モデルND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) を使用して、280および320nmでの吸光度を介して決定し得る。再利用可能なクロマトグラフィー材料に以前に負荷されたポリペプチドまたは本発明の方法によって洗浄された材料に負荷されたポリペプチド (すなわち、不純物) 以外の種は、濃度が低すぎて、UV吸収に感知できるほどの影響を及ぼさない可能性がある。必要に応じて、サンプルを0.1~1.0吸光度単位の範囲の適切な非干渉希釈液で希釈し得る。サンプル準備およびUV測定は重複して実行され、平均値が記録される。mAb吸収係数は、1.42~1.645/mg·ml·cmの範囲であり得る。

20

【0219】

総タンパク質は、キャピラリーゾーン電気泳動/レーザー誘起蛍光検出アッセイによって決定し得る。

IgG検出

【0220】

インタクトなヒトIgGおよびヒトIgG断片は、インタクトなヒトIgG特異的またはIgG断片特異的ELISAを使用して検出し得る。ヒトFcは、ヒトFc特異的ELISAを使用して検出し得る。

30

IgG凝集体

【0221】

IgG凝集体は、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して検出し得る。IgG凝集体は典型的には、インタクトなIgGよりも大きい。

CHO宿主細胞タンパク質 (CHOP) 定量化

【0222】

ELISAを使用して、CHOPと呼ばれるCHO宿主細胞タンパク質のレベルを定量化し得る。抗CHOP抗体はマイクロタイタープレートウェルに固定化されている。CHOP、標準、および対照を含むサンプルの希釈液をウェル内でインキュベートした後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とコンジュゲートした抗CHOP抗体と共にインキュベートする。HRP酵素活性はo-フェニレンジアミンで検出でき、CHOPはマイクロタイタープレートリーダーで490nmの吸光度を読み取ることで定量化される。サンドイッチELISAの原理に基づいて、ペルオキシダーゼの濃度はCHOP濃度に対応する。ELISAのアッセイ範囲は典型的には5~320ng/mlであり、アッセイ内変動は10%未満である。CHOP値は、ng/mlの単位で報告され得る。あるいは、CHOP値をポリペプチド濃度で割って、結果をPPMで報告してもよい (100万分の1、例えば、CHOPのng/ポリペプチドのmg)。CHOP ELISAは、サンプル中の総CHOPレベルを定量化するために使用し得るが、個々のタンパク質の濃度を定量化するものではない。

40

50

【0223】

CHO DNAの定量化

産物サンプル中のCHO DNAは、リアルタイムPCR (TaqMan PCR) を使用して定量化し得る。サンプルおよび対照からのDNAは、QiagenのVirus BioRobotキットを使用して最初に抽出し得る。抽出されたサンプル、対照、および標準DNAを、ABIの配列検出システムを用いて、96ウェルプレートでPCRプライマーとプローブを使用したTaqManリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に供する。プライマーは、Cricketulus griseusゲノムの反復DNA配列の110塩基対セグメントによって決定される。プローブは、5'末端において蛍光レポーター色素、3'末端においてクエンチャー色素で標識されている。プローブがインタクトの場合、レポーターの発光スペクトルはクエンチャーによって抑制される。ポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性はプローブを加水分解してレポートを放出し、その結果、蛍光発光が増加する。配列検出器は、DNA増幅中に連続的に測定された蛍光発光の増加に直接比例して増幅産物を定量化する。DNAが閾値 (CT) を超えて増幅したサイクル数を、検量線に対して計算する。1 pg/mL ~ 10,000 pg/mLの範囲の検量線を作成し、これは、サンプル中のDNAの定量化に使用する。

10

【0224】

浸出プロテインA定量化

プロテインAプール中の浸出プロテインAのレベルは、サンドイッチプロテインA-ELISAによって決定し得る。ニワトリ抗黄色ブドウ球菌プロテインA抗体はマイクロタイタープレートウェルに固定化されている。サンプル処理手順は、サンドイッチELISAでサンプルを実行する前に、前処理ステップとしてマイクロ波支援加熱を使用したプロテインA/IgG複合体のサンプル希釈および解離を含み得る。プロテインAは、サンプルに存在する場合、コーティングされた抗体に結合し得る。結合したプロテインAは、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートした抗プロテイン抗体を使用して検出される。西洋ワサビペルオキシダーゼの酵素活性は、比色シグナルを生成する2成分TMB基質溶液により定量化される。

20

【0225】

ポリペプチド

本発明の方法は、複数のポリペプチドの精製に使用されるクロマトグラフィー材料を洗浄するために使用し得る。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は大規模、例えば、抗体またはその断片等のポリペプチドの製造規模の生産において使用される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー材料は、第1の抗体等の第1のポリペプチドの精製に使用され、次いで、材料は、本発明の方法によって洗浄され、次いで、クロマトグラフィー材料は、第2の抗体等の第2のポリペプチドを精製するために使用し得る。いくつかの実施形態において、洗浄は、第2の精製されたポリペプチドを含む調製物が第1のポリペプチドを本質的に含まない程度に効果的である。いくつかの実施形態において、第2の精製されたポリペプチド (例えば、第2の抗体) を含む調製物は、1 ppm未満の第1のポリペプチド (例えば、第1の抗体) を含む。いくつかの実施形態において、第2の精製されたポリペプチドは、1 ppm、2 ppm、3 ppm、4 ppm、5 ppm、10 ppm、20 ppm、30 ppm、40 ppm、50 ppmまたは100 ppmのいずれか1つ未満の第1のポリペプチドを含む。

30

40

【0226】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、治療用ポリペプチドを精製するために使用されるクロマトグラフィー材料を再利用するために使用される。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、アンタゴニストである。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、アゴニストである。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、エピトープタグ付加されている。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、生物学的および/または免疫学的活性を保持する。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、アンタゴニストである。いく

50

つかの実施形態において、ポリペプチドは、補体依存性細胞障害性を開始する。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗体または免疫アドヘシンである。

【0227】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド、第1のポリペプチドおよび／または第2のポリペプチドは、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約25,000ダルトン、約50,000ダルトン、約75,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、または約150,000ダルトンのいずれかよりも大きい分子量を有する。ポリペプチドは、約50,000ダルトン～約200,000ダルトンまたは約100,000ダルトン～約200,000ダルトンのいずれかの分子量を有し得る。あるいは、本明細書で使用されるポリペプチドは、約120,000ダルトンまたは約25,000ダルトンの分子量を有し得る。

10

【0228】

pIは等電点であり、特定の分子または分子の表面が正味の電荷を帯びないpHである。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、ポリペプチド、例えば、第1のポリペプチドおよび／または第2のポリペプチドのpIは、約6～約10、約7～約9、または約8～9のいずれかであり得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、約6、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5、または約10のいずれかのpIを有する。

【0229】

本明細書に記載の方法を使用して洗浄される再利用可能なクロマトグラフィー材料を使用して精製されるポリペプチドは、一般的に、組換え技法を使用して産生される。組換えタンパク質を産生するための方法は、例えば、米国特許第5,534,615号および同第4,816,567号に記載され、具体的には、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、目的のタンパク質は、CHO細胞中で産生される（例えば、国際公開第94/11026号を参照のこと）。組換え技法を使用する場合、ポリペプチドは、細胞内に、ペリプラズム空間に産生され得るか、または培地に直接分泌され得る。

20

【0230】

本明細書に記載の方法によって洗浄された再利用可能なクロマトグラフィー材料を使用して精製されるポリペプチドは、培養培地または宿主細胞溶解物から回収し得る。ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、種々の物理的または化学的手段、例えば、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤によって破壊され得る。ポリペプチドが細胞内で産生される場合、第1のステップとして、粒子状残屑、宿主細胞、または溶解された断片のいずれかが、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)は、大腸菌のペリプラズム空間に分泌されるポリペプチドを単離するための手順を記載している。簡潔には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH3.5)、EDTA、およびフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)の存在下で、約30分間にわたって融解する。細胞残屑が遠心分離によって除去され得る。ポリペプチドが培地に分泌される場合、かかる発現系由来の上清は、一般的に、市販のポリペプチド濃縮フィルタ、例えば、Amicon（登録商標）またはMillipore Pellicon（登録商標）限外濾過ユニットを使用して最初に濃縮する。タンパク質分解を阻害するために、PMSF等のプロテアーゼ阻害剤が前述のステップのいずれかに含まれてもよく、外来性混入物の増殖を防止するために、抗生物質が含まれてもよい。

30

40

【0231】

本発明の方法によって洗浄される再利用可能なクロマトグラフィー材料を使用して精製し得るポリペプチドの例としては、免疫グロブリン、免疫アドヘシン、抗体、酵素、ホルモン、融合タンパク質、Fc含有タンパク質、免疫コンジュゲート、サイトカイン、およびインターロイキンが挙げられるが、これらに限定されない。ポリペプチドの例としては、哺乳動物のタンパク質、例えば、レニン、ホルモン、ヒト成長ホルモンおよびウシ成

50

長ホルモンを含む成長ホルモン、成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、リポタンパク質、アルファ-1-アンチトリプシン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、プロインスリン、卵胞刺激ホルモン、カルシトニン、黄体形成ホルモン、グルカゴン、凝固因子、例えば第V因子、第X因子、組織因子、およびフォン・ヴィレブランド因子、抗凝固因子、例えばプロテインC、心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント、プラスミノゲン活性化因子、例えばウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノゲン活性化因子（t-PA）；ボンベシン；トロニン；造血成長因子；腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ；エンケファリナーゼ；RANTES（活性化時に調節され、T細胞が正常に発現および分泌している）、ヒトマクロファージ炎症性タンパク質（MIP-1-アルファ）、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、ミュー管抑制物質、リラキシンA鎖；リラキシンB鎖、プロリラキシン、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、酵素、微生物タンパク質、例えばベクターラクタマーゼ；DNase；IgE；細胞傷害性Tリンパ球関連抗原（CTLA）、例えばCTLA-4；インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子（VEGF）；ホルモンまたは成長因子の受容体、プロテインAまたはD；リウマチ因子；神経栄養因子、例えば骨由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフィン-5、もしくはニューロトロフィン-6（NT-3、NT-4、NT-5、もしくはNT-6）、または神経成長因子、例えばNGF-β；血小板由来増殖因子（PDGF）；線維芽細胞増殖因子、例えばaFGFおよびbFGF；上皮成長因子（EGF）；形質転換成長因子（TGF）、例えばTGF-アルファおよびTGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、またはTGF-β5を含むTGF-ベータ；インスリン様成長因子IおよびII（IGF-IおよびIGF-II）；des（1-3）-IGF-I（脳IGF-I）、インスリン様成長因子結合タンパク質（IGFBP）、サイトカイン、CDタンパク質、例えばCD3、CD4、CD8、CD19およびCD20；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素、融合ポリペプチド、すなわち、2つ以上の異種性ポリペプチドまたはその断片上に構成されるポリペプチド、Fc含有ポリペプチド、例えば第2のポリペプチドに融合した、免疫グロブリンFc領域を含む融合タンパク質またはその断片、免疫コンジュゲート、骨形成タンパク質（BMP）、インターフェロン、例えばインターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、およびインターフェロン-ガンマ；コロニー刺激因子（CSF）、例えばM-CSF、GM-CSF、およびG-CSF；インターロイキン（IL）、例えばIL-1～IL-10；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス抗原、例えばAIDSエンベロプの一部；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレシン；調節タンパク質；インテグリン、例えばCD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4およびVCAM；腫瘍関連抗原、例えばCA125（卵巣がん抗原）、またはHER2、HER3、もしくはHER4受容体、免疫アドヘシン、ならびに上述のタンパク質のいずれかの断片および／またはバリエーション、ならびにタンパク質、例えば上記のタンパク質のいずれかに結合する抗体、例えば抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0232】

抗体

本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法によって洗浄された再利用可能なクロマトグラフィー材料を使用して精製され得るポリペプチド、例えば、第1のポリペプチド、第2のポリペプチドまたはその後の任意のポリペプチドは抗体である。

【0233】

抗体の分子標的としては、CDタンパク質およびそれらのリガンド、例えば、限定するものではないが、(i) CD3、CD4、CD8、CD19、CD11a、CD20、CD22、CD34、CD40、CD79α（CD79a）、およびCD79β（CD79b）、(ii) ErbB受容体ファミリーのメンバー、例えば、EGF受容体、HER2、HER3、またはHER4受容体、(iii) 細胞接着分子、例えば、LFA-1、M

a c 1、p 1 5 0、9 5、V L A-4、I C A M-1、V C A M、および $\alpha v / \beta 3$ インテグリン例えば、それらのアルファサブユニットまたはベータサブユニットのいずれか（例えば、抗 C D 1 1 a、抗 C D 1 8、または抗 C D 1 1 b 抗体）、(i v) 成長因子、例えば、V E G F、I g E、血液型抗原、f l k 2 / f l t 3 受容体、肥満 (O B) 受容体、m p l 受容体、C T L A-4、プロテイン C、B R 3、c-m e t、組織因子、 $\beta 7$ 等、ならびに (v) 細胞表面および膜貫通腫瘍関連抗原 (T A A)、例えば、米国特許第 7, 5 2 1, 5 4 1 号に記載されているものが挙げられる。

【0234】

他の例示的な抗体としては、限定されるものではないが、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 4 0 抗体、抗 H E R 2 抗体、抗 I L 6 抗体、抗 I g E 抗体、抗 I L 1 3 抗体、抗 F l u A 抗体、抗 T I G I T 抗体、抗 P D-L 1 抗体、抗 V E G F-A 抗体、抗 V E G F-A / A N G 2 抗体、抗 C D 7 9 b 抗体、抗 S T 2 抗体、抗因子 D 抗体、抗第 I X 因子抗体、抗第 X 因子抗体、抗 A b e t a、抗タウ抗体、抗 C E A 抗体、抗 C E A / C D 3 抗体、抗 C D 2 0 / C D 3 抗体、抗 F c R H 5 / C D 3 抗体、抗 H e r 2 / C D 3 抗体、抗 F G F R 1 / K L B 抗体、F A P-4-1 B B L 融合タンパク質、F A P-I L 2 v 融合タンパク質、抗エストロゲン受容体抗体、抗プロゲステロン受容体抗体、抗 p 5 3 抗体、抗 E G F R 抗体、抗カテプシン D 抗体、抗 B c l-2 抗体、抗 E-カドヘリン抗体、抗 C A 1 2 5 抗体、抗 C A 1 5-3 抗体、抗 C A 1 9-9 抗体、抗 c-e r b B-2 抗体、抗 P-糖タンパク質抗体、抗 C E A 抗体、抗網膜芽細胞腫タンパク質抗体、抗 r a s 腫瘍性タンパク質抗体、抗 L e w i s X 抗体、抗 K i-6 7 抗体、抗 P C N A 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 5 抗体、抗 C D 7 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 C D 9 / p 2 4 抗体、抗 C D 1 0 抗体、抗 C D 1 1 a 抗体、抗 C D 1 1 c 抗体、抗 C D 1 3 抗体、抗 C D 1 4 抗体、抗 C D 1 5 抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 C D 2 3 抗体、抗 C D 3 0 抗体、抗 C D 3 1 抗体、抗 C D 3 3 抗体、抗 C D 3 4 抗体、抗 C D 3 5 抗体、抗 C D 3 8 抗体、抗 C D 4 1 抗体、抗 L C A / C D 4 5 抗体、抗 C D 4 5 R O 抗体、抗 C D 4 5 R A 抗体、抗 C D 3 9 抗体、抗 C D 1 0 0 抗体、抗 C D 9 5 / F a s 抗体、抗 C D 9 9 抗体、抗 C D 1 0 6 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 C D 7 1 抗体、抗 c-m y c 抗体、抗サイトケラチン抗体、抗ビメンチン抗体、抗 H P V タンパク質抗体、抗 κ 軽鎖抗体、抗 λ 軽鎖抗体、抗メラノソーム抗体、抗前立性特異的抗原抗体、抗 S-1 0 0 抗体、抗タウ抗原抗体、抗フィブリン抗体、抗ケラチン抗体および抗 T n-抗原抗体が挙げられる。いくつかの実施形態において、抗体は、オクレリズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、トシリズマブ、ファリシマブ、ボラツズマブ、ガンテネルマブ、シビサタマブ、クレネズマブ、モスネツズマブ、チラゴルマブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、アテゾリズマブ、オビヌツズマブ、ランパリズマブ、レプリキズマブ、オマリズマブ、ラニビズマブ、エミシズマブ、セリクレルマブ、ブラシネズマブ、R O 6 8 7 4 2 8 1 および R O 7 1 2 2 2 9 0 からなる群から選択される。

【0235】

ポリクローナル抗体

いくつかの実施形態において、抗体は、ポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原およびアジュバントの複数回の皮下 (s c) または腹腔内 (i p) 注入により動物において産生される。二機能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を介するコンジュゲート)、N-ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C l₂、または R¹ N=C=N R (式中、R および R¹ は異なるアルキル基である) を使用して、関連抗原を、免疫化される種において免疫原性であるポリペプチド、例えば、キーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシン阻害剤にコンジュゲートすることが有用であり得る。

【0236】

例えば、1 0 0 μ g または 5 μ g のポリペプチドまたはコンジュゲート (それぞれ、ウサギまたはマウスの場合) を、3 体積のフロイント完全アジュバントと組み合わせ、複数

の部位で溶液を皮内注入することにより、動物を、抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、動物を、複数の部位での皮下注入により、完全フロイントアジュバント中の最初の量の $1/5 \sim 1/10$ のペプチドまたはコンジュゲートで追加免疫する。7～14日後、動物を採血し、血清を抗体力価についてアッセイする。力価が水平状態になるまで動物を追加免疫する。いくつかの実施形態において、動物は、同一抗原のコンジュゲートであるが、異なるポリペプチドにコンジュゲートされ、かつ／または異なる架橋試薬によりコンジュゲートされたもので追加免疫される。コンジュゲートは、ポリペプチド融合物として組換え細胞培養で作製することもできる。ミョウバン等の凝集剤も免疫応答を増強するために好適に使用される。

【0237】

10

モノクローナル抗体

いくつかの実施形態において、本発明の方法によって洗浄される再利用可能なクロマトグラフィー材料上で精製される抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、実質的に同種の抗体の集団から得られ、すなわち、その集団に含まれる個々の抗体は、同一であり、および／または同一エпитープに結合するが、モノクローナル抗体の産生中に生じる想定されるバリエーションは除外されるが、かかるバリエーションは、一般的に少量で存在する。したがって「モノクローナル」という修飾語は、個別のまたはポリクローナル抗体の混合物ではない抗体の特徴を示す。

【0238】

20

例えば、モノクローナル抗体は、Kohler et al.、Nature 256 : 495 (1975) によって最初に記載されるハイブリドーマ法を使用して作製されてもよいし、または組換えDNA法によって作製されてもよい（米国特許第4,816,567号）。

【0239】

ハイブリドーマ法において、マウス、またはハムスター等の他の適切な宿主動物が、本明細書に記載されるように免疫化され、免疫化のために使用されるポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することができるリンパ球が誘発される。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。その後、リンパ球は、ポリエチレングリコール等の好適な融合剤を使用して骨髓腫細胞に融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。

30

【0240】

そのように調製されたハイブリドーマ細胞は、融合されていない親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を好ましくは含有する好適な培養培地に播種され、成長する。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（HAT培地）を含み、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の成長を阻害する。

【0241】

40

いくつかの実施形態において、骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体産生を支援し、HAT培地などの培地に感受性を示すものである。とりわけ、いくつかの実施形態において、骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株、例えば、Salik Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、ならびにAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞に由来するものである。ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株は、ヒトモノクローナル抗体の産生についても記載されている（Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Br

50

odeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0242】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地は、抗原に対して指向されるモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。いくつかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、または放射免疫アッセイ (RIA) もしくは酵素結合免疫吸収アッセイ (ELISA) 等のインビトロ結合アッセイによって決定される。

【0243】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980) の Scatchard 分析により決定し得る。

【0244】

所望の特異性、親和性、および／または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定された後、クローンは、限界希釈手順によりサブクロニングし、標準的な方法により成長させてもよい (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的に好適な培養培地としては、例えば、D-MEM 培地または RPMI-1640 培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで成長し得る。

【0245】

サブクロンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、ポリペプチド A-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィー等によって、培養培地、腹水、または血清から好適に分離される。

【0246】

モノクローナル抗体をコードする DNA は、従来の手順を使用して (例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより) 容易に単離および配列決定される。いくつかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞は、かかる DNA の供給源としての機能を果たす。一旦単離されると、DNA は発現ベクター内に配置され得、次いで、宿主細胞、例えば大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞等にトランスフェクションされて、組換え宿主細胞内のモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードする DNA の細菌における組換え発現に関する概説論文として、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 (1993) および Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992) が挙げられる。

【0247】

さらなる一実施形態において、抗体または抗体断片は、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990) に記載される技法を使用して作製された抗体ファージライブラリから単離され得る。Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) は、それぞれ、ファージライブラリを使用したマウスおよびヒト抗体の単離を記載する。その後の刊行物は、鎖シャッフリングによる高親和性 (nM 範囲) ヒト抗体の産生 (Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992))、ならびに極めて大きいファージライブラリを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換えを記載している (Waterhouse et al., Nuc. Aci

10

20

30

40

50

ds. Res. 21: 2265-2266 (1993))。したがって、これらの技法は、モノクローナル抗体を単離するための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技法に代わる実行可能な別法である。

【0248】

DNAはまた、例えば、コード配列を、相同的なマウス配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインに置換することによるか（米国特許第4,816,567号、Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1984))、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより改変してもよい。

【0249】

典型的には、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインの代わりに置換されるか、またはそれらは、抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換されて、抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位、および異なる抗原に対して特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製する。

【0250】

本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG、またはIgMである。いくつかの実施形態において、抗体は、IgGモノクローナル抗体である。

ヒト化抗体

【0251】

いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト化抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野で記載されている。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、非ヒトである入手源からそれに導入される1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は、本質的には、Winterおよび共同研究者らの方法（Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)；Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988)；Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988))にしたがって、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって行うことができる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクトな可変ドメインより少ない部分が、非ヒト種由来の対応する配列により置換されているキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基および恐らくいくつかのFR残基が齧歯類抗体における類似部位由来の残基により置換されているヒト抗体である。

【0252】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメイン、重鎖および軽鎖の両方の選択は、抗原性を低減させるのに非常に重要である。いわゆる「最良適合」法にしたがって、齧歯類抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してスクリーニングする。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域（FR）として認められる（Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)；Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987))。他の方法は、軽または重鎖可変領域の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する。同一のフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用されてもよい（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992)；Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993))。

【0253】

抗体は、抗原に対する高親和性および他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するために、本方法のいくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、ヒト化抗体は、親およびヒト化配列の三次元モデルを使用した、親配列および種々の概念上のヒト化産物の分析プロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、一般的に入手可能であり、当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の推定される三次元立体構造を例示および表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示されたものを調べることで、候補免疫グロブリン配列が機能する際の残基の可能性のある役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このような方法で、標的抗原（複数可）に対する親和性の増大等の所望の抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント配列および移入配列から選択し、組み合わせ得る。一般的に、超可変領域残基は、抗原結合への影響に直接かつ最も実質的に関与する。

10

【0254】

ヒト抗体

いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト抗体である。ヒト化の代替物として、ヒト抗体が生成され得る。例えば、免疫化すると内在性免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体の完全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することが現在では可能である。例えば、キメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖接合領域（J_H）遺伝子のホモ接合型欠失により、内在性抗体産生の完全な阻害がもたらされることが記載されている。かかる生殖系列変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移行により、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生がもたらされる。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993)、および米国特許第5,591,669号、同第5,589,369号、および同第5,545,807号を参照のこと。

20

【0255】

あるいは、ファージディスプレイ技法（McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)）は、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、ヒト抗体および抗体断片をインビトロで産生するために使用し得る。この技法によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、M13またはfd等の糸状バクテリオファージの主要または非主要なコートポリペプチド遺伝子中にインフレームでクローン化され、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。糸状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むため、抗体の機能的特性に基づく選択により、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択ももたらされる。したがって、ファージは、B細胞のいくつかの特性を模倣する。ファージディスプレイは、種々のフォーマットで行うことができ、それらの概説については、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)を参照のこと。V遺伝子セグメントのいくつかの源は、ファージディスプレイのために使用することができる。Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模なランダムコンビナトリアルライブラリから、抗オキサゾロン抗体の多種多様なアレイを単離した。非免疫化ヒトドナーからV遺伝子のレパートリーを構築してもよく、かつ、多様なアレイの抗原（自己抗原を含む）に対する抗体を、本質的にMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、または Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)に記載の技術にしたがって単離し得る。米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号も参照のこと。

30

40

【0256】

また、ヒト抗体は、インビトロ活性化B細胞により生成され得る（米国特許第5,56

50

7, 610号および同第5, 229, 275号を参照のこと)。

【0257】

抗体断片

いくつかの実施形態において、抗体は、抗体断片である。抗体断片を産生するために種々の技法が開発されている。従来、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化により得られていた(例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)、およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照されたい)。しかしながら、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞から直接産生することができる。例えば、抗体断片は、上記で考察される抗体ファージライブラリから単離し得る。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収され、化学的にカップリングして、F(ab')₂断片を形成し得る(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。他の手法によると、F(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離し得る。抗体断片を産生するための他の技法は、当業者に明らかである。他の実施形態において、最適な抗体は、一本鎖Fv断片(scFv)である。国際公開第93/16185号、米国特許第5,571,894号、および米国特許第5,587,458号を参照のこと。抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されるように、「直鎖抗体」であってもよい。かかる直鎖抗体断片は、単一特異的または二重特異的であり得る。

10

20

【0258】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の抗体の断片が提供される。いくつかの実施形態において、抗体断片は、抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗原結合フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、scFv、di-scFv、bi-scFv、タンデム(di, tri)-scFv、Fv、sdAb、三官能性抗体、BiTE、ダイアボディ、トリアボディからなる群から選択される。

【0259】

二重特異性抗体

いくつかの実施形態において、抗体は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得る。あるいは、二重特異性抗体結合アームは、細胞に対する細胞防御機序に集中するために、白血球上のトリガリング分子、例えばT細胞受容体分子(例えば、CD2もしくはCD3)、またはIgG(FcγR)に対するFc受容体、例えばFcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、およびFcγRIII(CD16)に結合するアームと組合せ得る。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製し得る。

30

【0260】

二重特異性抗体の作製方法は、当該技術分野で公知である。完全長二重特異性抗体の従来の産生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づき、これらの2つの鎖は、異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな分類のために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の混合物を産生する可能性があり、これらのうちの1つのみが正しい二重特異性構造を有する。通常親和性クロマトグラフィーステップによって行われる正しい分子の精製は、幾分厄介であり、産物収率は低い。同様の手順が、国際公開第93/08829号、およびTrauncker et al., J. EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

40

【0261】

異なる手法によると、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部

50

位) が、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。いくつかの実施形態において、融合は、ヒンジ、C H 2、およびC H 3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。いくつかの実施形態において、軽鎖結合に必要な部位を含有する第1の重鎖定常領域(C H 1)は、融合物のうちの少なくとも1つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合物、所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAが別個の発現ベクターに挿入され、好適な宿主生物に共トランスフェクションされる。これにより、構築時に使用される不均等な比率の3つのポリペプチド鎖が最適収率を提供する実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互割合を調整する際に優れた柔軟性が提供される。しかしながら、等しい比率での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合に、またはそれらの比率が特に重要でない場合に、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖をコードする配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

【0262】

このアプローチのいくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、一方のアームにある第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにある(第2の結合特異性を提供する)ハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対から構成される。二重特異性分子の半分のみでの免疫グロブリン軽鎖の存在により容易な分離方法が提供されるため、この非対称構造が望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促進することが見出された。このアプローチは、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)を参照されたい。

20

【0263】

米国特許第5,731,168号に記載される別のアプローチにしたがって、一对の抗体分子間の界面を操作して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にしてもよい。いくつかの実施形態において、界面は、抗体定常ドメインのC H 3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面由来の1つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きい側鎖(複数可)と同一または類似のサイズの補償「キャビティ」は、大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはトレオニン)で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に作製される。これにより、ホモ二量体等の他の望ましくない最終生成物と比べてヘテロ二量体の収率を増加させるための機構が提供される。

30

【0264】

二重特異性抗体は、架橋または「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の一方がアビジンにカップリングし、他方がビオチンにカップリングし得る。かかる抗体は、例えば、望ましくない細胞に対して免疫系細胞の標的とするために(米国特許第4,676,980号)、およびHIV感染を処置するために(国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号、および欧州特許第03089号)提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製することができる。適切な架橋剤が当該技術分野で周知であり、いくつかの架橋技術とともに米国特許第4,676,980号に開示されている。

40

【0265】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技法も本文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製することができる。Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)は、インタクトな抗体がタンパク質分解的に切断されて、F(ab')₂断片を生成する手順を記載している。これらの断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在の下で還元されて、隣接するジチオールを安定させ、分子間ジスルフィド形成を阻止する。その後、生成されたF(ab')断片は、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換される。その後、F(ab')-TNB誘導体の一方がメルカプトエチルアミンでの還元によってF(ab')-チオールに再変

50

換され、等モル量の他方の Fab'-TNB 誘導体と混合されて、二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用し得る。

【0266】

二重特異性抗体断片を組換え細胞培養から直接作製および単離するための様々な技法も記載されている。例えば、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体が産生された。Kostelný et al., J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992)。Fos タンパク質および Jun タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合によって2つの異なる抗体の Fab' 部分に結合させた。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、その後、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生にも利用することができる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) により記載されている「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的機構を提供している。この断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーにより、軽鎖可変ドメイン (VL) に接続された重鎖可変ドメイン (VH) を含む。したがって、ある断片の VH ドメインおよび VL ドメインが他の断片の相補的 VL ドメインおよび VH ドメインと対合させられ、それにより、2つの抗原結合部位が形成される。一本鎖 Fv (sFv) 二量体を使用することによって二重特異性抗体断片を作製するための別の方法も報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994) を参照されたい。

【0267】

2を超える結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る。Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)。

【0268】

多価抗体

いくつかの実施形態では、抗体は、多価抗体である。多価抗体は、その抗体が結合する抗原を発現する細胞によって、二価抗体よりも速く内部移行（および／または異化）され得る。本明細書に提供される抗体は、3つ以上の抗原結合部位を有する (IgM クラス以外の) 多価抗体（例えば、四価抗体）であってもよく、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に産生され得る。多価抗体は、二量体化ドメインおよび3つ以上の抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、Fc 領域またはヒンジ領域を含む（か、またはそれからなる）。このシナリオでは、抗体は、Fc 領域と、Fc 領域のアミノ末端側に3つ以上の抗原結合部位とを含む。本明細書における好ましい多価抗体は、3つ～約8つであるが、好ましくは4つの抗原結合部位を含む（またはそれらからなる）。多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖（および好ましくは2つのポリペプチド鎖）を含み、このポリペプチド鎖（複数可）は、2つ以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖（複数可）は、VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc を含み得、VD1 は第1の可変ドメインであり、VD2 は第2の可変ドメインであり、Fc は Fc 領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1 および X2 はアミノ酸またはポリペプチドを表し、n は0または1である。例えば、このポリペプチド鎖（複数可）は、VH-CH1-可撓性リンカー-VH-CH1-Fc 領域鎖、または VH-CH1-VH-CH1-Fc 領域鎖を含み得る。本明細書における多価抗体は、好ましくは、少なくとも2つ（好ましくは4つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含む。本明細書における多価抗体は、例えば、約2つ～約8つの軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。本明細書に企図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、任意に、CL ドメインをさらに含む。

【0269】

いくつかの実施形態において、抗体は、多重特異性抗体である。多重特異性抗体の例としては、限定するものではないが、重鎖可変ドメイン (VH) および軽鎖可変ドメイン (VL) を含む抗体 (VHVL 単位がポリエピトープ特異性を有する)、2つ以上の VL ド

メインおよびV_Hドメインを有する抗体（各V_HV_L単位が異なるエピトープに結合する）、2つ以上の単一可変ドメインを有する抗体（各単一可変ドメインが異なるエピトープに結合する）、全長抗体、抗体断片、例えば、Fab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、トリアボディ、三官能性抗体、共有結合または非共有結合している抗体断片が挙げられる。いくつかの実施形態において、その抗体は、ポリエピトープ特異性、例えば、同じまたは異なる標的（複数可）上の2つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する能力を有する。いくつかの実施形態において、その抗体は、単一特異性であり、例えば、1つのエピトープにのみ結合する抗体である。一実施形態によれば、多重特異性抗体は、5 μM～0.001 pM、3 μM～0.001 pM、1 μM～0.001 pM、0.5 μM～0.001 pM、または0.1 μM～0.001 pMの親和性で各エピトープに結合するIgG抗体である。

10

【0270】

他の抗体改変

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介細胞毒性（ADCC）および／または補体依存性細胞毒性（CDC）を増強するために、エフェクタ機能に関して本明細書に提供される抗体を修飾することが望ましい場合がある。これは、1つまたは複数のアミノ酸置換を抗体のFc領域内に導入することによって達成され得る。あるいはまたはさらに、システイン残基（複数可）を、Fc領域内に導入して、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にしてもよい。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善された内部移行能力、および／または増加した補体媒介性細胞殺滅および抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有し得る。Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. J., Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体はまた、Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993) に記載される、ヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製され得る。あるいは、二重Fc領域を有し、それにより、増強された補体溶解およびADCC能力を有し得る、抗体を操作することができる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照のこと。

20

【0271】

抗体の血清半減期を増大するために、アミノ酸代替物が、米国特許出願公開第2006/0067930号に記載される抗体において作製され得、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0272】

ポリペプチドバリエーションおよび改変

本明細書に記載の抗体を含むポリペプチドのアミノ酸配列改変（複数可）を、本明細書に記載の方法によって洗浄される再利用可能なクロマトグラフィー材料において使用し得る。

【0273】

バリエーションポリペプチド

「ポリペプチドバリエーション」とは、ポリペプチドの完全長天然配列、シグナルペプチドを欠くポリペプチド配列、シグナルペプチドを有するかまたは有しないポリペプチドの細胞外ドメインと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する本明細書に定義されるポリペプチド、好ましくは活性ポリペプチドを意味する。かかるポリペプチドバリエーションとしては、例えば、1つまたは複数のアミノ酸残基が完全長天然アミノ酸配列のN末端またはC末端に付加または欠失されたポリペプチドが挙げられる。通常、TATポリペプチドバリエーションは、完全長天然配列ポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠くポリペプチド配列、シグナルペプチドを有するかまたは有しないポリペプチドの細胞外ドメインと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%のうちの任意のアミノ酸配列同一

40

50

性を有する。任意選択的に、バリエーションポリペプチドは、天然ポリペプチド配列と比較して1つ以下の保存的アミノ酸置換を有し、あるいは天然ポリペプチド配列と比較して約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、または約10個のうちのいずれか以下の保存的アミノ酸置換を有する。

【0274】

バリエーションポリペプチドは、N末端またはC末端で切断され得るか、または例えば、全長天然ポリペプチドと比較して、内部残基を欠損し得る。特定のバリエーションポリペプチドは、所望の生物学的活性にとって不可欠ではないアミノ酸残基を欠損し得る。切断、欠失、および挿入を有するこれらのバリエーションポリペプチドは、いくつかの従来の技法のうちのいずれかによって調製され得る。所望のバリエーションポリペプチドは、化学的に合成されてもよい。別の好適な技法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって所望のバリエーションポリペプチドをコードする核酸断片を単離および増幅することを伴う。核酸断片の所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドは、PCRにおいて5'プライマーおよび3'プライマーで用いられる。好ましくは、バリエーションポリペプチドは、本明細書に開示される天然ポリペプチドと少なくとも1つの生物学的および／または免疫学的活性を共有する。

10

【0275】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体または細胞毒性ポリペプチドに融合される抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入バリエーションとしては、抗体の血清半減期を増大する酵素またはポリペプチドへの抗体のN末端またはC末端の融合が挙げられる。

20

【0276】

例えば、ポリペプチドの結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションは、適切なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。かかる修飾としては、例えば、ポリペプチドのアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／またはそれへの挿入、および／またはその置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせが作製されて最終構築物に到達するが、但し、最終構築物が所望の特徴を有することを条件とする。アミノ酸変化は、ポリペプチド（例えば、抗体）の翻訳後プロセスも改変し得、例えば、グリコシル化部位の数または位置を変化し得る。

30

【0277】

どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を及ぼすことなく挿入、置換、または欠失され得るかを決定する際の手引きは、ポリペプチドの配列を同種の既知のポリペプチド分子の配列と比較すること、および相同性の高い領域にできたアミノ酸配列変化の数を最小限に抑えることによって見出され得る。

【0278】

変異誘発の好ましい位置であるポリペプチド（例えば、抗体）のある特定の残基または領域の特定に有用な方法は、Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)によって記載される「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。ここで、残基または標的残基群（例えば、Arg、Asp、His、Lys、およびGlu等の荷電残基）が特定され、中性または負荷電アミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）で置き換えられて、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を及ぼす。その後、置換への機能的感受性を示すそれらのアミノ酸位置は、その置換部位でのまたはその置換部位に対する更なるまたは他のバリエーションの導入により洗練される。したがって、アミノ酸配列変異を導入する部位が予め決定されているが、変異の本質はそれ自体予め決定されている必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の性能を分析するために、alaスキャニングまたはランダム突然変異生成を標的コドンまたは領域で実行し、発現された抗体バリエーションを所望の活性に関してスクリーニングする。

40

【0279】

50

他の種類のバリエーションは、アミノ酸置換バリエーションである。これらのバリエーションは、異なる残基に置き換えられた抗体分子内に少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換変異誘発において最も興味深い部位は、超可変領域を含むが、FR改変も企図される。保存的置換は、以下の表1において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。かかる置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表1に「例示的な置換」と表示されるか、またはアミノ酸クラスを参照して以下にさらに記載されるより実質的な変化が導入され、産物がスクリーニングされ得る。

【表1】

表1. 例示的なアミノ酸置換

オリジナル残基	例示置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【0280】

ポリペプチドの生物学的特性の実質的な修飾は、(a) 置換領域中のポリペプチド骨格の構造、例えば、シートもしくは螺旋立体配座、(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖のバルク、を維持するそれらの効果において大いに異なる置換を選択することによって達成される。アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性に従って群分けされ得る(A. L. Lehninger, Biochemistry second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) 非極性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 非荷電極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)

【0281】

あるいは、自然発生する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群に分け得る。

(1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

(2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、

- (3) 酸性：A s p、G l u、
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0282】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0283】

抗体の適切な立体配座の維持に関与しない任意のシステイン残基も概してセリンで置換されて、分子の酸化的安定性が改善され、異常な架橋が阻止され得る。逆に、システイン結合（複数可）をポリペプチドに付加して、その安定性を改善してもよい（特に、抗体がFv断片等の抗体断片である場合）。

【0284】

特に好ましい型の置換バリエーションは、親抗体（例えば、ヒト化抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を伴う。一般的に、さらなる開発のために選択される結果として生じるバリエーション（複数可）は、それらが生成される親抗体に対して改善された生物学的特性を有する。かかる置換バリエーションを生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟を伴う。簡潔には、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7つの部位）が、各部位に全ての可能なアミノ置換を生成するように突然変異される。このように作製された抗体バリエーションは、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子産物への融合物として糸状ファージ粒子からの一価様式で提示される。その後、ファージ提示バリエーションは、本明細書に開示されるそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変の候補超可変領域部位を特定するために、アラニンスキャニング変異誘発を実施して、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、または加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と標的との間の接触点を特定することが有益であり得る。そのような接触残基および隣接残基は、本明細書に詳述される技術に従う置換の候補である。かかるバリエーションが生成されると、バリエーションのパネルが本明細書に記載のスクリーニングに供され、1つまたは複数の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体が更なる開発のために選択され得る。

【0285】

ポリペプチドの別の種類のアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを改変する。ポリペプチドは、非アミノ酸部分を含み得る。例えば、ポリペプチドは、グリコシル化されてもよい。かかるグリコシル化は、宿主細胞もしくは宿主生物でのポリペプチドの発現中に天然に生じてもよいし、またはヒト介入に起因する計画的な修飾であってもよい。改変とは、ポリペプチドに見られる1つまたは複数の炭水化物部分の欠失、および／またはポリペプチド中に存在しない1つまたは複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

【0286】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合またはO結合のいずれかである。N結合型とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチド内でのこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。O結合型グリコシル化とは、糖類、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用され得る。

【0287】

グリコシル化部位のポリペプチドへの付加は、（N結合グリコシル化部位のための）上

述のトリペプチド配列のうちの1つまたは複数を含むようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成される。この改変は、元の抗体の配列への1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加またはそれによる置換によって行うこともできる（O結合型グリコシル化部位の場合）。

【0288】

ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に、またはグリコシル化の標的としての機能を果たすアミノ酸残基をコードするコドンの変異置換によって達成され得る。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、様々なエンドーおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【0289】

他の修飾としては、グルタミニルおよびアスパラギニル残基のそれぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基への脱アミド化、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化、N末端アミンのアセチル化、ならびに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

キメラポリペプチド

【0290】

本明細書に記載のポリペプチドは、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合したポリペプチドを含むキメラ分子を形成するための方法で修飾され得る。いくつかの実施形態では、キメラ分子は、ポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的に、ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に位置する。かかるエピトープタグ形態のポリペプチドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。エピトープタグの提供により、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別の種類の親和性マトリックスを使用してポリペプチドが親和性精製によって容易に精製されることも可能になる。

【0291】

代替的な実施形態では、キメラ分子は、ポリペプチドと免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合を含み得る。二価の形態のキメラ分子は、「免疫アドヘシン」と称される。

【0292】

本明細書に使用される場合、「免疫アドヘシン」という用語は、異種ポリペプチドの結合特異性と、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクタ機能とを組み合わせ、抗体様分子を指す。構造的には、免疫アドヘシンは、抗体（すなわち、「異種性」）の抗原認識および結合部位以外である所望の結合特異性を持つアミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。免疫アドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には、少なくとも受容体またはリガンドの結合部位を含む連続するアミノ酸配列である。免疫アドヘシンにおける免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、またはIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1およびIgA-2を含む）、IgE、IgDまたはIgMなどの任意の免疫グロブリンから得られ得る。

【0293】

Ig融合物は、好ましくは、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域の代わりに、可溶性の（膜貫通ドメインが欠失または不活性化されている）形態のポリペプチドの置換を含む。特定の好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合体には、IgG1分子のヒンジ、CH2およびCH3、またはヒンジ、CH1、CH2およびCH3領域が含まれる。

【0294】

ポリペプチドコンジュゲート

ポリペプチド製剤において使用するためのポリペプチドは、細胞毒性剤、例えば化学療法剤、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性複合体）と複合化され得る。

10

20

30

40

50

【0295】

かかる複合体の生成において有用な化学療法剤を使用することができる。さらに、使用することができる酵素的に活性な毒素およびそれらの断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*からの）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンシンタンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、*momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaonarria officinalis*阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが含まれる。多様な放射性同位体は、放射性複合ポリペプチドの産生のために利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる、ポリペプチドと細胞毒性剤とのコンジュゲートは、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（アジブイミド酸ジメチルHCL等）、活性エステル（スベリン酸ジサクシニミジル等）、アルデヒド（グルタレルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン（tolylene）2, 6-ジイソシアネート等）、およびビス-活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等）等の多様な二機能性タンパク質カップリング剤を使用して作製される。例えば、Vittetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されているように、リシン免疫トキシンを調製することができる。炭素-14で標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドのポリペプチドへの複合のための例示的なキレート剤である。

【0296】

ポリペプチドと、1つまたは複数の小分子毒素、例えば、カリケアマイシン、マイタンシノイド、トリコテセン、およびCC1065、ならびに毒素活性を有する、これらの毒素の誘導体との複合体はまた、本明細書において企図される。

【0297】

マイタンシノイドは、チューブリン重合の阻害によって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカの低木である*Maytenus serrata*から最初に単離された。その後、特定の微生物もまた、マイタンシノールおよびC-3マイタンシノールエステル等のマイタンシノイドを産生することが発見された。合成マイタンシノールならびにその誘導体および類似体もまた、企図される。ポリペプチド-マイタンシノイド複合体を作製するための当該技術分野で既知の多くの連結基があり、例えば、米国特許第5, 208, 020号に開示されているものを含む。連結基としては、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光不安定性基、ペプチターゼに不安定な基、またはエステラーゼに不安定な基が含まれるが、ジスルフィドおよびチオエーテル基が好ましい。

【0298】

結合の種類に応じて、リンカーが様々な位置でマイタンシノイド分子に結合され得る。例えば、エステル結合が従来のカップリング技法を使用したヒドロキシル基との反応によって形成され得る。反応は、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾したC-14位、ヒドロキシル基で修飾したC-15位、およびヒドロキシル基を有するC-20位で生じ得る。好ましい一実施形態では、結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類似体のC-3位に形成される。

【0299】

対象となる別の複合体は、1つまたは複数のカリケアマイシン分子に複合化されたポリペプチドを含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモルを下回る濃度で二

本鎖DNA切断をもたらすことができる。カリケアマイシンファミリーの複合体の調製については、例えば、米国特許第5,712,374号を参照のこと。使用できるカリケアマイシンの構造類似体には、 γ_1 I、 α_2 I、 α_3 I、N-アセチル- γ_1 I、PSAG、および θ_1 Iが含まれるが、これらに限定されない。本抗体がコンジュゲートされ得る別の抗腫瘍薬物は、抗葉酸剤であるQFAである。カリケアマイシンもQFAもいずれも、細胞内作用部位を有し、原形質膜を容易には通過しない。したがって、ポリペプチド（例えば、抗体）媒介性内部移行を通したこれらの薬剤の細胞取り込みによって、それらの細胞毒性効果を大いに増強する。

【0300】

本明細書に記載されるポリペプチドに複合され得る他の抗腫瘍薬剤には、BCNU、ストレプトゾマイシン、ビンクリスチン、および5-フルオロウラシル、集合的にLLE33288複合体に既知の薬剤ファミリー、ならびにエスペラミシンが含まれる。

10

【0301】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドと核酸分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼ、またはDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ、DNase）との間の複合体であり得る。

【0302】

さらに別の実施形態では、ポリペプチド（例えば、抗体）は、腫瘍前標的化において利用するために「受容体」（ストレプトアビジン等）とコンジュゲートさせてもよく、この場合、ポリペプチド受容体コンジュゲートが患者に投与され、続いて除去剤を使用して血液循環から非結合コンジュゲートが除去された後、細胞毒性薬剤（例えば、放射性ヌクレオチド）とコンジュゲートされている「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

20

【0303】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法剤）を活性抗癌剤に転化させるプロドラッグ活性化酵素にコンジュゲートしてもよい。免疫コンジュゲートの酵素構成成分としては、プロドラッグにおいて、それをより活性化細胞毒性形態に変換するような方法で作用し得る任意の酵素が含まれる。

【0304】

有用である酵素としては、リン酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；硫酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ；無毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬物、5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン（例えば、カテプシンBおよびL）等のプロテアーゼ；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用な β -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ等の炭水化物切断酵素、 β -ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用な β -ラクタマーゼ、ならびにアミン窒素において、フェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基でそれぞれ誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用なペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼ等のペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、「アブザイム」としても当該技術分野で公知の酵素活性を有する抗体が、プロドラッグを遊離活性薬物に変換するために使用され得る。

30

40

【0305】

その他

ポリペプチドの別の種類の共有結合修飾は、ポリペプチドを様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールのコポリマーのうちの1つに連結することを含む。ポリペプチドはまた、例えば、コアセルベーション技法もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシ

50

メチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタシレート）マイクロカプセル）によって、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中、またはマイクロエマルジョン中に封入され得る。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Gennaro, A. R., Ed., (1990)において開示されている。

【0306】

製剤および方法における使用のためのポリペプチドの取得

本明細書に記載される方法で洗浄される再利用可能なクロマトグラフィー材料を使用して精製されるポリペプチドは、組換え方法を含む、当該技術分野で周知の方法を使用して得られ得る。以下のセクションは、これらの方法に関する手引きを提供する。

10

【0307】

ポリヌクレオチド

本明細書で同義に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。

【0308】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ポリペプチドmRNAを保有し、検出可能なレベルでそれを発現すると考えられている組織から調製されたcDNAライブラリを含むが、これに限定されない、任意の供給源から得られ得る。したがって、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト組織から調製されたcDNAライブラリから簡便に得られ得る。ポリペプチドをコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリから、または既知の合成手順（例えば、自動核酸合成）によっても得られ得る。

20

【0309】

例えば、ポリヌクレオチドは、軽鎖または重鎖等の全体の免疫グロブリン分子鎖をコードし得る。完全な重鎖は、重鎖可変領域（VH）だけでなく、重鎖定常領域（CH）も含み、これは典型的には以下の3つの定常ドメイン、CH1、CH2およびCH3、および「ヒンジ」領域を含む。場合によっては、定常領域の存在が望ましい。

【0310】

ポリヌクレオチドによってコードされ得る他のポリペプチドには、抗原結合抗体断片、例えば、単ドメイン抗体（「dAb」）、Fv、scFv、Fab'、およびF(ab')₂、および「ミニボディ」が含まれる。ミニボディは、（典型的には）CH1およびCKまたはCLドメインが切除されている二価抗体断片である。ミニボディは、従来の抗体より小さいので、それらは臨床／診断用途では良好な組織浸透を達成するはずであるが、二価であって、dAbのような一価抗体断片よりも高い結合親和性を保持しなければならない。したがって、別途文脈が規定しない限り、「抗体」という用語は、本明細書で 사용되는場合、全ての抗体分子だけでなく、上記で考察される型の抗原結合抗体断片も包含する。好ましくは、コードされたポリペプチド中に存在する各フレームワーク領域は、対応するヒト受容体フレームワークに対して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。したがって、例えば、フレームワーク領域は、受容体フレームワーク領域に対して、合計で3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ酸置換を含み得る。

30

40

【0311】

適切には、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、単離および／または精製され得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドである。

【0312】

「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、分子がその通常または自然環境から除去または分離されているか、またはその通常または自然環境に存在しないような方法で産生されていることを示すことを意図している。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、精製されたポリヌクレオチドである。精製されたという用語は、少なくともい

50

くつかの混入分子または物質が除去されたことを示すことを意図している。

【0313】

適切には、ポリヌクレオチドは、関連するポリヌクレオチドが組成物中に存在する優勢な（すなわち、最も豊富な）ポリヌクレオチドを構成するように、実質的に精製される。

【0314】

ポリヌクレオチドの発現

以下の記載は、主に、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換またはトランスフェクションされた細胞を培養することによるポリペプチドの産生に関する。もちろん、ポリペプチドを調製するために、当該技術分野で公知の代替方法を用いることができることが企図される。例えば、適切なアミノ酸配列またはその一部は、固相技術（例えば、Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis W. H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963))を用いる直接ペプチド合成によって産生することができる。インビトロでのタンパク質合成は、手動技術または自動化によって行うことができる。自動合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer（カリフォルニア州フォスターシティ）を使用し、製造業者の指示書を用いて達成することができる。ポリペプチドの種々の部分を、別々に化学的合成し、化学的または酵素的な方法を用いて組み合わせて、所望のポリペプチドを生成することができる。

【0315】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、ポリペプチドの産生のために発現ベクター（複数可）に挿入される。用語「制御配列」とは、特定の宿主生物における操作可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。制御配列には、プロモータ（例えば、天然に関連するまたは異種性のプロモータ）、シグナル配列、エンハンサエレメント、および転写終結配列が含まれるが、これらに限定されない。

【0316】

ポリヌクレオチドは、他のポリヌクレオチド配列と機能的関係に置かれる場合に「作動可能に連結」している。例えば、プレ配列または分泌リーダーのための核酸は、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合に、ポリペプチドのための核酸に作動可能に連結され、プロモータまたはエンハンサは、配列の転写に影響する場合に、コード配列に作動可能に連結され、あるいはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置付けられる場合に、コード配列に作動可能に連結される。一般的に、「作動可能に連結される」は、連結される核酸配列が連続的であり、分泌リーダーの場合には、連続的であり、かつ読み相（reading phase）にあることを意味する。しかしながら、エンハンサは連続的である必要はない。連結は、簡便な制限部位でのライゲーションによって達成される。かかる部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプタまたはリンカーが従来の慣例に従って使用される。

【0317】

抗体の場合、軽鎖と重鎖は同じまたは異なる発現ベクターにクローン化することができる。免疫グロブリン鎖をコードする核酸セグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする発現ベクター（複数可）中の制御配列に作動可能に連結されている。

【0318】

ポリヌクレオチド配列（例えば、可変重鎖および／または可変軽鎖コード配列および任意の発現制御配列）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに応じて変化する周知の方法によって宿主細胞に移すことができる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞に一般的に利用されているが、リン酸カルシウム処理、エレクトロポレーション、リポフェクション、微粒子銃またはウイルスベクターのトランスフェクションは、他の細胞宿主に使用し得る。（一般的に、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring

g Harbor Press, 2nd ed., 1989)を参照のこと。哺乳動物細胞を形質転換するために使用される他の方法には、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、エレクトロポレーション、およびマイクロインジェクションの使用が含まれる。トランスジェニック動物を作製するために、導入遺伝子を受精卵母細胞にマイクロインジェクションするか、胚性幹細胞のゲノムに組み込んで、そのような細胞の核を脱核卵母細胞に移すことができる。

【0319】

ベクター

「ベクター」という用語は、発現ベクターおよび形質転換ベクターならびにシャトルベクターを含む。

【0320】

「発現ベクター」という用語は、インビボまたはインビトロで発現することができるコンストラクトを意味する。

【0321】

「形質転換ベクター」という用語は、ある実体から別の実体に移すことができるコンストラクトを意味し、これは、同一種のものであっても、異なる種のものであってもよい。コンストラクトが、ある種から別の種に、例えば大腸菌プラスミドからバチルス属のような細菌に移すことができる場合、形質転換ベクターは「シャトルベクター」と呼ばれることもある。それは、大腸菌プラスミドからアグロバクテリウム、そして植物に移すことができるコンストラクトでさえあり得る。

【0322】

ポリペプチドの発現を提供するために、以下に記載されるように、ベクターを適切な宿主細胞に形質転換することができる。様々なベクターが一般的に公開されている。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列は、種々の手順によってベクターへ挿入することができる。一般的に、DNAは、当該技術分野で公知の技術を用いて適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（複数可）に挿入される。これらの成分の1つ以上を含有する好適なベクターの構築は、当業者に公知である標準的なライゲーション技術を用いる。

【0323】

ベクターは、例えば、複製起点、任意選択でポリヌクレオチドの発現のためのプロモータ、および任意選択でプロモータの調節因子を備えたプラスミド、ウイルスまたはファージベクターであり得る。ベクターは、当該技術分野で周知の1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子を含み得る。

【0324】

これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、または宿主染色体DNAの統合部分として、宿主生物において複製可能である。

【0325】

宿主細胞

宿主細胞は、例えば、細菌、酵母または他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞であり得る。

【0326】

遺伝子操作されたトランスジェニック多細胞宿主生物を使用して、ポリペプチドを産生することができる。生物は、例えば、トランスジェニック哺乳動物生物（例えば、トランスジェニックヤギまたはマウス系統）であり得る。

【0327】

好適な原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性の生物などの真正細菌、例えば、大腸菌などの腸内細菌科を挙げることができるが、これらに限定されない。大腸菌K12株MM294（ATCC31,446）、大腸菌X1776（ATCC31,537）、大腸菌株W3110（ATCC27,325）、およびK5772（ATCC53,635）などの種々の大腸菌株が公的に入手可能である。他の適切な原核生物宿主細胞には、エ

10

20

30

40

50

シェリキアなどの腸内細菌科、例えば、大腸菌、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えば、サルモネラ・ティフィムリウム、セラチア属、例えば、セラチア・マルセッセンス、およびシゲラ属、ならびにバチルス属、例えば枯草菌およびバシラス・リケニフォルミス（例えば、バシラス・リケニフォルミス 41P）、シュードモナス属、例えば、緑膿菌、およびストレプトマイセス属が含まれる。これらの例は、限定するものではなく、例示的なものである。株 W3110 は、組換えポリヌクレオチド産物発酵のための一般的な宿主株であるため、1つの特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株 W3110 は、宿主に内在性のポリペプチドをコードする遺伝子における遺伝子変異をもたらすように改変されていてもよく、かかる宿主の例は、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌 W3110 株 1A2、完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌 W3110 株 9E4、完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan'* を有する大腸菌 W3110 株 27C7 (ATCC 55, 244)、完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'* を有する大腸菌 W3110 株 37D6、非カナマイシン耐性 *degP* 欠損変異を有する株 37D6 である、大腸菌 W3110 株 40B4、および変異ペリプラズムプロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えば、PCR または他の核酸ポリメラーゼ反応が適切である。

10

20

【0328】

これらの原核生物宿主では、発現ベクターを作製することができ、これは典型的には、宿主細胞と適合性のある発現制御配列（例えば、複製起点）を含む。さらに、ラクトースプロモータシステム、トリプトファン (*trp*) プロモータシステム、ベータラクタマーゼプロモータシステム、またはファージラムダ由来のプロモータシステム等の、任意の数の種々の周知のプロモータが存在する。プロモータは、典型的には、任意選択でオペレーター配列を用いて発現を制御し、転写および翻訳を開始および完了するためのリボソーム結合部位配列等を有する。

【0329】

真核微生物を発現に使用することができる。糸状真菌または酵母等の真核微生物は、ポリペプチドのコードベクターに好適なクローニングまたは発現宿主である。出芽酵母は、一般的に使用される下等真核生物宿主微生物であるその他には、分裂酵母、クリベロミセス属宿主、例えば、*K. ラクティス* (MW98-8C、CBS683、CBS4574)、*K. フラジリス* (ATCC12, 424)、*K. ブルガリカス* (ATCC16, 045)、*K. ウィケラミイ* (ATCC24, 178)、*K. ワルチー* (ATCC56, 500)、*K. ドロソフィラルム* (ATCC 36, 906)、*K. サーモトリーサラン*、および *K. マルシアナス*、*ヤロウイア* (EP 402, 226)、*ピキアパストリス*；カンジダ、トリコデルマ リージア、アカパンカビ；シュワンニオミセス属、例えばシュワンニオミセス・オシデンタリス、糸状菌、例えばアカパンカビ、ペニシリウム、トリポクラジウム、およびアスペルギルス宿主、例えば *A. ニデュランス* および *A. ニガー* が含まれる。メチルトロピック酵母が本明細書に適しており、ハンセンラ、カンジダ、クロッケラ、ピキア、サッカロミセス、トルロプシス、およびロドトルラからなる属から選択されるメタノール上で増殖できる酵母が含まれるが、これらに限定されない。サッカロミセスは、好ましい酵母宿主であり、発現制御配列（例えば、プロモータ）、複製起点、終結配列などを必要に応じて有する適切なベクターを有する。典型的なプロモータには、3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の解糖系酵素が含まれる。誘導性酵母プロモータとしては、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソチトクローム C、およびマルトースおよびガラクトースの利用に関与する酵素からのプロモータが挙げられる。

30

40

【0330】

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養を使用して、本明細書に記載のポリペプチドを発現および産生することもでき、場合によってはそれが好ましい (Winnacker,

50

From Genes to Clones VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987) を参照のこと)。いくつかの実施形態では、異種性ポリペプチド（例えば、インタクトな免疫グロブリン）を分泌することができる多数の適切な宿主細胞株が当該技術分野で開発されており、CHO細胞株、様々なCos細胞株、HeLa細胞、好ましくは、骨髄腫細胞株、または形質転換されたB細胞またはハイブリドーマを含むため、真核細胞が好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、CHO細胞である。

【0331】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、脊椎動物宿主細胞である。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、以下のものが挙げられる：SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株統（COS-7、ATCC CRL 1651）、ヒト胎児腎臓株（293または浮遊培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）、チャイニーズハムスター卵巢細胞／-DHFR（CHOまたはCHO-DP-12株）、マウスセルトリ細胞、サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL 2）；犬の腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）；TRI細胞、MRC5細胞、FS4細胞、およびヒト肝癌株（Hep G2）。

10

20

【0332】

製剤および製剤の製造方法

本明細書に記載の方法によって精製されたポリペプチド（例えば、抗体）を含む製剤および製剤を作製する方法も本明細書に提供される。例えば、精製されたポリペプチドは、薬学的に許容され得る担体と組み合わせることができる。

【0333】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド製剤は、所望の純度を有するポリペプチドを、任意の薬学的に許容され得る担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって凍結乾燥製剤または水溶液の形態で保存用に調製することができる。

30

【0334】

本明細書で使用される「担体」には、用いられる投与量および濃度でそれに曝露されている細胞または哺乳動物にとって無毒である、薬学的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤が含まれる。多くの場合、生理的に許容され得る担体は、pH緩衝水溶液である。

【0335】

許容され得る担体、賦形剤、または安定剤は、レシピエントに対し、用いられる投薬量および濃度で非毒性であり、これらには、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤、防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールなど）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど）、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど）、単糖、二糖、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）、EDTAなどのキレート剤、糖（スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなど）、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、なら

40

50

びに／または非イオン性界面活性剤（T W E E N（商標）、P L U R O N I C S（商標）、もしくはポリエチレングリコール（P E G）など）が挙げられる。

【0336】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド製剤中のポリペプチドは、機能的活性を維持する。

【0337】

インビボ投与のために使用される製剤は、滅菌性である必要がある。これは、滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成される。

【0338】

本明細書の製剤は、治療されている特定の適応症に対して必要な2つ以上の活性化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する活性化合物を含有してもよい。例えば、ポリペプチドに加えて、追加のポリペプチド（例えば、抗体）を1つの製剤に含めることが望ましい場合がある。代替的に、または加えて、組成物は、化学治療剤、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、および／または心臓保護剤をさらに含んでもよい。このような分子は、意図される目的に有効な量で、組み合わせて好適に存在する。

【0339】

製品

本明細書に記載の方法によって精製されるポリペプチドおよび／または本明細書に記載の方法によって精製されるポリペプチドを含む製剤は、製品に含まれ得る。製品は、ポリペプチドおよび／またはポリペプチド製剤を含む容器を含み得る。好ましくは、製品は、（a）本明細書に記載のポリペプチド、および／またはポリペプチド製剤を含む組成物を容器内に含む容器、ならびに（b）製剤の投与に関する指示を有する添付文書を含む。

【0340】

製品は、容器と、容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書とを備えている。好適な容器としては例えば、瓶、バイアル、シリンジ、プリスターパックなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなど様々な材料から形成され得る。容器は、製剤を保持または収容し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈用溶液袋またはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性物質はポリペプチドである。ラベルまたは添付文書は、提供されているポリペプチドおよび任意の他の薬物の投薬量および間隔についての具体的な指示により、本組成物が対象において使用されることを示す。製品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを含む、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。いくつかの実施形態では、容器は、シリンジである。いくつかの実施形態では、シリンジは、注入デバイス内にさらに収容される。いくつかの実施形態では、注入デバイスは、自己注入器である。

【0341】

「添付文書」は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌症についての情報、パッケージ製品と組み合わせられる他の治療薬、および／またはその使用に関する警告等を含む、治療薬の商用のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0342】

例示的な実施形態

本発明は、以下の例示的な実施形態を提供する。

【0343】

実施形態1．再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であって、クロマトグラフィー材料がポリペプチドの精製において過負荷モードで使用され、本方法が、

a）再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウム（N a O A c）を含む、ステップ、

10

20

30

40

50

b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

c) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0344】

実施形態 2. 再生緩衝液が約 50 ~ 約 600 mM の NaOAc を含む、実施形態 1 に記載の方法。

【0345】

実施形態 3. 再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、実施形態 1 または 2 に記載の方法。

【0346】

実施形態 4. 再生緩衝液の pH が約 pH 4.0 ~ 11 である、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0347】

実施形態 5. 再生緩衝液の pH が約 pH 8.3 である、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0348】

実施形態 6. 約 3 ~ 約 12 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0349】

実施形態 7. 約 10 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0350】

実施形態 8. 約 2 ~ 約 12 材料体積の消毒緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0351】

実施形態 9. 約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0352】

実施形態 10. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 1 ~ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0353】

実施形態 11. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0354】

実施形態 12. 再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であって、クロマトグラフィー材料がポリペプチドの精製において過負荷モードで使用される方法であって、

a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

b) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、

c) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH および約 1 M の NaCl を含む、ステップ、および

d) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0355】

実施形態 13. 再生緩衝液および第 2 の再生緩衝液が、約 25 ~ 約 600 mM の NaOAc を含む、実施形態 12 に記載の方法。

【0356】

実施形態 14. 再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、実施形態 12 または 1

10

20

30

40

50

3に記載の方法。

【0357】

実施形態15．再生緩衝液が約40mMのNaOAcを含む、実施形態12または13に記載の方法。

【0358】

実施形態16．再生緩衝液のpHが約pH2.0～7.0である、実施形態12～15のいずれか1つに記載の方法。

【0359】

実施形態17．再生緩衝液のpHが約pH4.0である、実施形態12～16のいずれか1つに記載の方法。

【0360】

実施形態18．約3～約12材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態12～17のいずれか1つに記載の方法。

【0361】

実施形態19．約7材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態12～18のいずれか1つに記載の方法。

【0362】

実施形態20．酸洗浄液が約167MのNaOAcおよび約0.3Mのリン酸である、実施形態12～19のいずれか1つに記載の方法。

【0363】

実施形態21．約1～約5材料体積の酸洗浄液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態12～20のいずれか1つに記載の方法。

【0364】

実施形態22．約3材料体積の酸洗浄液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態12～21のいずれか1つに記載の方法。

【0365】

実施形態23．約2～約12材料体積の消毒緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態12～22のいずれか1つに記載の方法。

【0366】

実施形態24．約4材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態12～23のいずれか1つに記載の方法。

【0367】

実施形態25．イオン交換クロマトグラフィー材料が約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態12～24のいずれか1つに記載の方法。

【0368】

実施形態26．イオン交換クロマトグラフィー材料が約3材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態12～25のいずれか1つに記載の方法。

【0369】

実施形態27．再利用のためにイオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄する方法であって、クロマトグラフィー材料がポリペプチドの精製において過負荷モードで使用される方法であって、

a) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

b) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、および

c) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む、方法。

【0370】

実施形態28．再生緩衝液が約25～約75mMのトリスおよび約50～約100mMのNaOAcを含む、実施形態27に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0371】

実施形態29．再生緩衝液が約50mMのトリスおよび約85mMのNaOAcを含む、実施形態27または28に記載の方法。

【0372】

実施形態30．再生緩衝液のpHが約pH7～9である、実施形態27～29のいずれか1つに記載の方法。

【0373】

実施形態31．再生緩衝液のpHが約pH8.0である、実施形態27～30のいずれか1つに記載の方法。

【0374】

実施形態32．約3～約12材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態27～31のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

実施形態33．約10材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態27～32のいずれか1つに記載の方法。

【0376】

実施形態34．約2～約12材料体積の消毒緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態27～33のいずれか1つに記載の方法。

【0377】

実施形態35．約10材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態27～34のいずれか1つに記載の方法。

【0378】

実施形態36．イオン交換クロマトグラフィー材料が約1～5材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態27～35のいずれか1つに記載の方法。

【0379】

実施形態37．イオン交換クロマトグラフィー材料が約4材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態27～36のいずれか1つに記載の方法。

【0380】

実施形態38．イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、

- a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が約1000g/L以下である、ステップ、
- c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、
- d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約0.5NのNaOHを含む、ステップ、および
- g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約0.1NのNaOHを含む、ステップを含む、方法。

【0381】

実施形態39．イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、

- a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が20g/L以上である、ステップ、
- c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

10

20

30

40

50

- d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、
- e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、
- f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および
- g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0382】

実施形態 40. 負荷密度が 70 g / L 以上である、実施形態 39 に記載の方法。

【0383】

実施形態 41. イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、

- a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
- b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ

c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、

e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0384】

実施形態 42. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍である、実施形態 41 に記載の方法。

【0385】

実施形態 43. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍～約 100 倍である、実施形態 42 に記載の方法。

【0386】

実施形態 44. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 10 倍である、実施形態 42 に記載の方法。

【0387】

実施形態 45. 平衡化緩衝液が約 20 mM～約 60 mM の酢酸ナトリウムを含む、実施形態 38～44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0388】

実施形態 46. 平衡化緩衝液が約 40 mM の酢酸ナトリウムを含む、実施形態 38～45 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0389】

実施形態 47. 平衡化緩衝液の pH が約 pH 5.0～約 pH 6.0 である、実施形態 38～46 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0390】

実施形態 48. 平衡化緩衝液の pH が約 pH 5.5 である、実施形態 38～47 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0391】

実施形態 49. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 3～7 材料体積の平衡化緩衝液により洗浄される、実施形態 38～48 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0392】

10

20

30

40

50

実施形態 50. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 5 材料体積の平衡化緩衝液により洗浄される、実施形態 38～49 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0393】

実施形態 51. 再生緩衝液が約 50～約 600 mM の NaOAc を含む、実施形態 38～50 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0394】

実施形態 52. 再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、実施形態 38～51 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0395】

実施形態 53. 再生緩衝液の pH が約 pH 4.0～11 である、実施形態 38～52 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0396】

実施形態 54. 再生緩衝液の pH が約 pH 8.3 である、実施形態 38～53 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0397】

実施形態 55. 約 3～約 12 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 38～54 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0398】

実施形態 56. 約 10 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 38～55 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0399】

実施形態 57. 約 2～約 12 材料体積の消毒緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 38～56 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0400】

実施形態 58. 約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 38～57 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0401】

実施形態 59. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 1～5 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 38～58 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0402】

実施形態 60. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 4 材料体積の本緩衝液に保存される、実施形態 38～59 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0403】

実施形態 61. イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、

a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、
b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、

c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、

e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液が酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

f) 酸洗浄液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップ、

g) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH および約 1 M の NaCl を含む、ステップ、および

h) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0404】

10

20

30

40

50

実施形態 62. 負荷密度が約 1000 g/L 以下である、実施形態 61 に記載の方法。

【0405】

実施形態 63. 負荷密度が約 20 g/L 以上である、実施形態 61 または 62 に記載の方法。

【0406】

実施形態 64. 負荷密度が約 70 g/L 以上である、実施形態 61～63 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0407】

実施形態 65. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍である、実施形態 61 に記載の方法。

10

【0408】

実施形態 66. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍～約 100 倍である、実施形態 61 に記載の方法。

【0409】

実施形態 67. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 10 倍である、実施形態 61 に記載の方法。

【0410】

実施形態 68. 平衡化緩衝液が約 50 mM～約 100 mM の酢酸ナトリウムおよび約 25 mM～約 75 mM のトリスを含む、実施形態 61～67 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0411】

20

実施形態 69. 平衡化緩衝液が約 85 mM の酢酸ナトリウムおよび約 50 mM のトリスを含む、実施形態 61～68 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0412】

実施形態 70. 平衡化緩衝液の pH が約 pH 6.0～約 pH 10.0 である、実施形態 61～69 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0413】

実施形態 71. 平衡化緩衝液の pH が約 pH 8.0 である、実施形態 61～70 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0414】

実施形態 72. イオン交換クロマトグラフィー材料が、約 5～約 15 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、実施形態 61～71 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0415】

実施形態 73. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 10 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、実施形態 61～72 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0416】

実施形態 74. 再生緩衝液が約 25～約 600 mM の NaOAc を含む、実施形態 61～73 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0417】

実施形態 75. 再生緩衝液が約 350 mM の NaOAc を含む、実施形態 61～74 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0418】

実施形態 76. 再生緩衝液が約 40 mM の NaOAc を含む、実施形態 61～74 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0419】

実施形態 77. 再生緩衝液の pH が約 pH 2.0～7.0 である、実施形態 61～76 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0420】

実施形態 78. 再生緩衝液の pH が約 pH 4.0 である、実施形態 61～77 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0421】

50

実施形態 79. 約 3 ～ 約 12 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 61 ～ 78 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0422】

実施形態 80. 約 7 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 61 ～ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0423】

実施形態 81. 酸洗浄液が約 167 M の NaOAc および約 0.3 M のリン酸である、実施形態 61 ～ 80 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0424】

実施形態 82. 約 1 ～ 約 5 材料体積の酸洗浄液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 61 ～ 81 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

【0425】

実施形態 83. 約 3 材料体積の酸洗浄液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 61 ～ 82 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0426】

実施形態 84. 約 2 ～ 約 12 材料体積の消毒緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 61 ～ 83 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0427】

実施形態 85. 約 4 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 61 ～ 84 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【0428】

実施形態 86. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 1 ～ 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 61 ～ 85 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0429】

実施形態 87. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 3 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 61 ～ 86 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0430】

実施形態 88. イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、 30

a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、

b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が約 1000 g / L 以下である、ステップ、

c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、

e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。 40

【0431】

実施形態 89. イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、

a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、

b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が 20 g / L 以上である、ステップ、

c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、 50

e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0432】

実施形態 90. 負荷密度が 70 g/L 以上である、実施形態 89 に記載の方法。

【0433】

実施形態 91. イオン交換クロマトグラフィー材料を使用して、ポリペプチドおよび不純物を含む組成物からポリペプチドを精製するための方法であって、イオン交換クロマトグラフィー材料が再利用に適しており、本方法が、

a) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で平衡化するステップ、

b) 組成物をイオン交換クロマトグラフィー材料に負荷するステップであって、負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィーの動的結合容量を超える、ステップ、

c) ポリペプチドを含む画分を収集するステップ、

d) イオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化緩衝液で洗浄するステップ、

e) 再生緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、再生緩衝液がトリスおよび酢酸ナトリウムを含む、ステップ、

f) 消毒緩衝液をイオン交換クロマトグラフィー材料に通すステップであって、消毒緩衝液が約 0.5 N の NaOH を含む、ステップ、および

g) イオン交換クロマトグラフィー材料を保存緩衝液に保存するステップであって、保存緩衝液が約 0.1 N の NaOH を含む、ステップを含む、方法。

【0434】

実施形態 92. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍である、実施形態 91 に記載の方法。

【0435】

実施形態 93. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 2 倍～約 100 倍である、実施形態 91 に記載の方法。

【0436】

実施形態 94. 負荷密度が、ポリペプチドに対するイオン交換クロマトグラフィー材料の動的結合容量の少なくとも約 10 倍である、実施形態 91 に記載の方法。

【0437】

実施形態 95. 平衡化緩衝液が約 20 mM～約 60 mM の酢酸ナトリウムを含む、実施形態 94 に記載の方法。

【0438】

実施形態 96. 平衡化緩衝液が約 40 mM の酢酸ナトリウムを含む、実施形態 88～95 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0439】

実施形態 97. 平衡化緩衝液の pH が約 pH 5.0～約 pH 6.0 である、実施形態 88～96 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0440】

実施形態 98. 平衡化緩衝液の pH が約 pH 5.5 である、実施形態 88～97 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0441】

実施形態 99. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 3～7 材料体積の平衡化緩衝液で洗浄される、実施形態 88～98 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0442】

実施形態 100. イオン交換クロマトグラフィー材料が約 5 材料体積の平衡化緩衝液で

10

20

30

40

50

洗浄される、実施形態 88～99 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0443】

実施形態 101．再生緩衝液が、約 25～約 75 mM のトリスおよび約 50～約 100 mM の NaOAc を含む、実施形態 88～100 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0444】

実施形態 102．再生緩衝液が約 50 mM のトリスおよび約 85 mM の NaOAc を含む、実施形態 88～101 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0445】

実施形態 103．再生緩衝液の pH が約 pH 7～9 である、実施形態 88～102 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0446】

実施形態 104．再生緩衝液の pH が約 pH 8.0 である、実施形態 88～103 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0447】

実施形態 105．約 3～約 12 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 88～104 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0448】

実施形態 106．約 10 材料体積の再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 88～105 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0449】

実施形態 107．約 2～約 12 材料体積の消毒緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 88～106 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0450】

実施形態 108．約 10 材料体積の消毒緩衝液が通過し、再生緩衝液がイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態 88～107 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0451】

実施形態 109．イオン交換クロマトグラフィー材料が約 1 から 5 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 88～108 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0452】

実施形態 110．イオン交換クロマトグラフィー材料が約 4 材料体積の保存緩衝液に保存される、実施形態 88～109 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0453】

実施形態 111．イオン交換クロマトグラフィー材料が、クロマトグラフィーカラム内にある、実施形態 1～110 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0454】

実施形態 112．イオン交換クロマトグラフィー材料が陽イオン交換クロマトグラフィー材料体である、実施形態 1～111 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0455】

実施形態 113．イオン交換クロマトグラフィー材料が、支持マトリックスに連結されたスルホプロピル部分を含む、実施形態 1～112 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0456】

実施形態 114．支持マトリックスが架橋ポリ（スチレンジビニルベンゼン）を含む、実施形態 113 の方法。

【0457】

実施形態 115．イオン交換クロマトグラフィー材料が P O R O S（商標）H S 50 材料である、請求項 1～114 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0458】

実施形態 116．イオン交換クロマトグラフィー材料が、混合モード陽イオン交換材料である、実施形態 1～115 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0459】

10

20

30

40

50

実施形態 117. 混合モード陽イオン交換材料が、Capto MMC (商標)、Capto MMC (商標) ImpRes、Nuvia (商標) cPrime (商標)、または Toyopearl MX Trp-650M である実施形態 116 に記載の方法。

【0460】

実施形態 118. 陰イオン交換クロマトグラフィー材料が陰イオン交換クロマトグラフィー材料である、実施形態 1～111 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0461】

実施形態 119. イオン交換クロマトグラフィー材料が、支持マトリックスに連結された、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミンもしくは第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、またはジエチルアミノエチル官能基を含む、実施形態 1～111 または 118 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0462】

実施形態 120. イオン交換クロマトグラフィー材料が、混合モード陽イオン交換材料である、実施形態 1～111、118 または 119 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0463】

実施形態 121. 混合モード陰イオン交換材料が、Capto Adhere (商標) または Capto Adhere (商標) ImpRes である、実施形態 120 に記載の方法。

【0464】

実施形態 122. イオン交換クロマトグラフィー材料がポリペプチドの大規模生産に使用される、実施形態 1～121 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0465】

実施形態 123. ポリペプチドが抗体、免疫アドヘシン、Fc 含有タンパク質、または免疫コンジュゲートである、実施形態 1～122 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0466】

実施形態 124. ポリペプチドが抗体である、実施形態 123 に記載の方法。

【0467】

実施形態 125. 抗体がモノクローナル抗体である、実施形態 124 に記載の方法。

【0468】

実施形態 126. モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、実施形態 125 に記載の方法。

30

【0469】

実施形態 127. モノクローナル抗体が IgG モノクローナル抗体である、実施形態 125 または 126 の方法。

【0470】

実施形態 128. 抗体が抗原結合断片である、実施形態 124～127 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0471】

実施形態 129. 抗原結合断片が、Fab 断片、Fab' 断片、F(ab')₂ 断片、scFv、di-scFv、bi-scFv、タンデム(di, tri)-scFv、Fv、sdAb、三官能性抗体、BiTE、ダイアボディまたはトリアボディである、実施形態 128 に記載の方法。

40

【0472】

実施形態 130. 抗体が、二重特異性抗体である、実施形態 124～129 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0473】

実施形態 131. 抗体が、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗HER2抗体、抗IL6抗体、抗IgE抗体、抗IL13抗体、抗Flu-A抗体、抗TIGIT抗体、抗PD-L1抗体、抗VEGF-A抗体、抗VEGF-A/ANG2抗体、抗CD79b抗体、抗ST2抗体、抗D因子抗体、抗第IX因子抗体、抗第X因子抗体、抗Abeta、抗タ

50

ウ抗体、抗CEA抗体、抗CEA／CD3抗体、抗CD20／CD3抗体、抗FcRH5／CD3抗体、抗Her2／CD3抗体、抗FGFR1／KLB抗体、FAP-4-1 BBL融合タンパク質、およびFAP-IL2v融合タンパク質からなる群から選択される、実施形態124～127のいずれか1つに記載の方法。

【0474】

実施形態132．抗体が、オクレリズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、トシリズマブ、ファリシマブ、ボラツズマブ、ガンテネルマブ、シビサタマブ、クレネズマブ、モスネツズマブ、チラゴルマブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、アテゾリズマブ、オビヌツズマブ、ランパリズマブ、レブリキズマブ、オマリズマブ、ラニビズマブ、エミシズマブ、セリクレルマブ、プラシネズマブ、RO6874281およびRO7122290からなる群から選択される、実施形態124～127のいずれか1つに記載の方法。

10

【0475】

実施形態133．ポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー材料を通過する前に、親和性クロマトグラフィー材料を使用して精製され、イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である、実施形態124～132のいずれか1つに記載の方法。

【0476】

実施形態134．親和性材料が、プロテインAクロマトグラフィー、プロテインGクロマトグラフィー、プロテインA／Gクロマトグラフィー、プロテインLクロマトグラフィー、FcXLクロマトグラフィー、プロテインXLクロマトグラフィー、カップクロマトグラフィー、およびカップXLクロマトグラフィーからなる群から選択される、実施形態133に記載の方法。

20

【0477】

実施形態135．プロテインA親和性材料が、MAbSelect材料、MAbSelect SuRe（商標）材料、またはMAbSelect SuRe（商標）LX材料である、実施形態134に記載の方法。

【0478】

実施形態136．緩衝液が約15～20材料体積／時間でイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態1～135のいずれか1つに記載の方法。

【0479】

実施形態137．再生緩衝液が約10材料体積／時間でイオン交換クロマトグラフィー材料を通過する、実施形態1～136のいずれか1つに記載の方法。

30

【0480】

実施形態138．ポリペプチドが宿主細胞内で産生される、実施形態1～137のいずれか1つに記載の方法。

【0481】

実施形態139．宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である、実施形態138に記載の方法。

【0482】

実施形態140．不純物が、IgG断片、宿主細胞タンパク質、または宿主細胞核酸の1つまたは複数を含む、実施形態1～139のいずれか1つに記載の方法。

40

【0483】

実施形態141．ポリペプチドがCHO細胞で産生され、不純物がCHO宿主細胞タンパク質（CHOP）および／またはCHO核酸を含む、実施形態140の方法。

【0484】

本明細書に開示される特徴は全て、任意の組み合わせで組み合わせられてもよい。本明細書に開示される各特徴は、同じ、同等、または同様の目的を果たす代替の特徴に置き換えられてもよい。したがって、別途明確に示されない限り、開示される各特徴は、一般的な一連の同等または同様の特徴の一例にすぎない。

【0485】

50

本発明のさらなる詳細が、以下の非限定的な実施例により例示されている。本明細書における全ての参考文献の開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0486】

以下の実施例は、単に本発明の例示となるよう意図されており、したがって、決して本発明を限定するものと解釈されるべきではない。以下の実施例および詳細な説明は、限定するものではなく、例証として提供されている。

【0487】

実施例1．陽イオン交換過負荷再生洗浄ステップの開発

過負荷陽イオン交換クロマトグラフィー材料の消毒中の汚れを減らし、クロマトグラフィーラン間の不純物のキャリーオーバーを最小限に抑えるために、再生ステップを開発した。

【0488】

材料および方法

原料

本試験は、CHO細胞株を使用して、400 Lパイロットプラントランから得られた調整済み抗体Mab Select SuRe（商標）（MSS）プールを使用して実行された。400 Lの細胞培養産物を、連続（密閉）遠心分離、その後の深層濾過、および最終的な滅菌グレード（0.2 μm）のろ過によって回収した。

【0489】

緩衝液

表2に記載されている緩衝液を、本実施例のPOROS（商標）50HS（OL）クロマトグラフィープロセスで使用した。

【表2】

表2．POROS（商標）50HS（OL）クロマトグラフィー緩衝液

緩衝液	pH	導電率 (mS/cm)
平衡化／洗浄 40mM酢酸ナトリウム	5.5±0.10	2.7±0.3
CEX OL再生洗浄 50mMトリス、85mM酢酸ナトリウム	8.00±0.10	8.6±0.7
CEX OL再生洗浄 350mM酢酸ナトリウム	8.30±0.10	20±2
消毒 0.5M NaOH	N/A	1:1後55±5 水で希釈
保存 0.1N NaOH	N/A	22±5

【0490】

装置

全てのラボスケールのクロマトグラフィー開発作業は、GE Healthcare AKTA（商標）Avant 150およびOmniFit（登録商標）0.66cm直径のカラムを使用して実行した。

【0491】

精製方法

以下に示す方法は、POROS（商標）50HS（過負荷モード）およびCaptor（商標）Adhereステップの方法である。可能な限り、スケールに依存しないパラメータが提供されている。

【0492】

陽イオン交換過負荷（OL）クロマトグラフィー（POROS（商標）50 HS）

POROS（商標）50HSクロマトグラフィーを、原料がpH5.5で負荷される過

負荷モードで操作し、その後、同じ平衡緩衝液で負荷後洗浄を行った。過負荷モードでは、収量損失を相殺するために高負荷密度が必要になるため、水酸化ナトリウムで消毒および保存する前に、結合したタンパク質不純物を洗い流すために、酢酸ナトリウムを用いるより高いpHおよび導電率の再生ステップが必要である。過負荷モードを利用する場合、POROS（商標）50HS受信は、mAbの動的結合容量を超える最適な結合容量で負荷された。これにより、タンパク質関連の不純物（例えば、vHMWSおよびHMWS）およびプロセス関連の不純物（例えば、CHOP）が樹脂に競合的に結合し、mAbのブレイクスルーを引き起こし、これにより、ブレイクスルーが過負荷プールとして収集される。負荷密度を上昇させると、回収率が上昇する。

【0493】

POROS（商標）50HSクロマトグラフィーの標的パラメータ、フェーズ情報、およびラン条件を表3に記載する。図2は、代表的なPoros Overloadクロマトグラムを示す。

【表3】

表3. POROS（商標）50HSクロマトグラフィープロセス、フェーズ情報、および実行条件

樹脂	POROS（商標）50HS	
モード	過負荷	
負荷密度	1000 g/L以下	
負荷	調整済みMa b S e l e c t S u R e（商標）プール、pH5.5	
流速	15~20 CV/hr（再生フェーズでは10 CV/hr）	
床高さ	20 cm	
プーリング基準	0.5~0.5 OD	
ステップ	緩衝液	CV
平衡化	40 mM 酢酸ナトリウム、pH5.5	5
負荷	調整済みMa b S e l e c t S u R e（商標）プール、pH5.5	—
洗浄	40 mM 酢酸ナトリウム、pH5.5	5
再生緩衝液	評価： 1.) 50 mM トリス、85 mM 酢酸ナトリウム、pH8.0 2.) 350 mM 酢酸ナトリウム、pH8.3	10
消毒	0.5 N NaOH	10
保存	0.1 N NaOH	4

【0494】

分析方法

産物タンパク質濃度

MAb濃度は、280 nmおよび320 nmにおいて石英キュベットを備えたAgilent 8453分光光度計を使用して決定した。サンプルを精製水（PW）で希釈して、280 nmで0.1~1.0 AUの吸光度に到達させる。次の式を使用してタンパク質濃度を計算した：

タンパク質濃度 = $(A_{280} - A_{320}) / (\text{吸光係数} \times \text{経路長}) \times \text{希釈係数}$

総タンパク質 (mg) = タンパク質濃度 (mg/mL) × プール容量 (mL)

サイズバリエーションのサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）

【0495】

超高分子量種（vHMWS）、高分子量種（HMWS）、総凝集体（vHMWS + HMWS）、モノマー、および断片の相対比率は、TSK G3000SWXL（7.8 x 300 mm）分析用HPLCカラム（Tosoh Bioscience）を使用したサイズ排除クロマトグラフィー（SEC-HPLC）によって決定された。ラン条件を表4に

詳述する。カラムは、表に記載されているランニング緩衝液で0.5 mL/分で30分間ランを行い、280 nmでモニタリングした。自動サンプルチャンバーは2～8 °Cの範囲で5 °Cに設定されているが、但し、カラムコンパートメントは周囲温度に設定されている。サンプルは、25～50 μgのターゲット質量負荷で適切に注入された。本アッセイに使用されるHPLCシステムはAgilent 1100/1200である。

【表4】

表4. SECのラン条件

カラム	TSK G3000SWXL (7.8 x 300 mm)
販売者	Tosoh Bioscience (パーツ番号08541、VWRカタログ番号100368-358)
流速	0.5 mL/分
温度	環境
ラン時間	30分
ランモード	アイソクラティック
移動相	0.20 Mのリン酸カリウム、0.25 Mの塩化カリウム、pH 6.2 ± 0.1
UV検出	280 nm
ターゲット注射	25～50 μg

10

【0496】

分析操作アッセイ

20

以下のアッセイは、プロセス開発およびラン分析中に実行された：

Taqman PCRによるCHO DNA

キャピラリーゾーン電気泳動/レーザー誘起蛍光 (CZE-LIF) によるキャリーオーバー

グラム陰性菌のエンドトキシンを検出するための速度論的アッセイによるエンドトキシン。

【0497】

再生洗浄ステップの開発

mAb1 POROS (商標) 50 HS (OL) カラム再生ステップおよびキャリーオーバー試験

30

CEx過負荷クロマトグラフィー操作には、POROS (商標) 50 HS樹脂から結合している不純物、特に凝集体を効果的に除去するための再生ステップが含まれる。不純物を効果的に除去するために、2つの再生緩衝液を評価した、350 mMの酢酸ナトリウム、pH 8.3、および50 mMのトリス、85 mMの酢酸ナトリウム、pH 8.0。

【0498】

再生緩衝液の評価中に、2回のCEx過負荷ランを最大1000 g/L樹脂で深し、2つの再生フェーズが組み込まれた (各緩衝液の5 CV持続時間) が、ランごとに、再生緩衝液のシーケンスが変化した。以下は、試験された再生緩衝液のシーケンスを使用した2つの評価ランである。

評価ランA：

40

再生フェーズ1：50 mMのトリス、85 mMのNaOAc、pH 8.0

再生フェーズ2：350 mMのNaOAc、pH 8.3

評価ランB：

再生フェーズ1：350 mMのNaOAc、pH 8.3

再生フェーズ2：50 mMのトリス、85 mMのNaOAc、pH 8.0

【0499】

典型的なアウトプットを分析し (KPI、不純物クリアランスおよび産物品質)、いずれのランでも同様の性能が得られた。しかしながら、これらのアウトプットに加えて、第1の再生フェーズ中のカラム流出物を収集し、カラムからの凝集体除去の評価のためにSEC上で分析し、これを図3に要約する。(第1の再生フェーズカラム流出液のSECク

50

ロマトグラムのオーバーレイ)。図3は、350mMのNaOAc pH8.3緩衝液を使用したフェーズのvHMWSレベルが高いことを示しており、これは、カラムからより多くの凝集体が除去されており、したがって、より優れた再生洗浄緩衝液であることを示している。いずれの再生緩衝液を使用しても、カラムの汚れは観察されなかった。

【0500】

評価ランのクロマトグラムを分析すると（図4、評価ランAのクロマトグラム、および図5、評価ランBのクロマトグラム）、350mMのNaOAc pH8.3再生緩衝液を使用する後の再生フェーズ2でODピークが観察されず、これは、使用後にカラムにタンパク質が残っていないことを示している。いずれの再生緩衝液を使用しても、プロセス中に圧カスパイクは観察されなかった。分析観察アッセイでは、残存タンパク質のキャリアオーバーは観察されなかった（表5）。

10

【表5】

表5. タンパク質のキャリアオーバーの結果

キャリアオーバーデータ	総タンパク質 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CHO DNA (pg/ml)	エンドトキシン (EU/ml)
ラボスケールカラム (11ラン実行後)	<0.25	<1	未検証
パイロットプラントカラム (2ランの実行後)	<0.25	<1	<0.1

20

【0501】

mAb2 POROS（商標）50HS（OL）カラム再生ステップおよびキャリアオーバー試験

CExカラム再生ステップは、Poros（商標）50HS樹脂から不純物を効果的に除去し、消毒段階でのラン間のキャリアオーバーおよび樹脂汚れを防ぐために最適化された。2つの再生緩衝液を試験した。50mMのトリス、85mMの酢酸ナトリウム、pH8.0および350mMの酢酸ナトリウム、pH8.3。再生緩衝液の評価中に、2回のCEx過負荷ランを最大800g/L樹脂で深し、2つの再生フェーズが組み込まれた（各緩衝液の5 CV持続時間）が、ランごとに、再生緩衝液のシーケンスが変化する。以下は、試験された再生緩衝液のシーケンスを使用した2つの評価ランである。

30

評価ランA：

再生フェーズ1：50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0

再生フェーズ2：350mMのNaOAc、pH8.3

評価ランB：

再生フェーズ1：350mMのNaOAc、pH8.3

再生フェーズ2：50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0

【0502】

評価ランのクロマトグラムを分析すると（図6、評価ランAのクロマトグラム、および図7、評価ランBのクロマトグラム）、350mMのNaOAc pH8.3再生緩衝液を使用する後の再生フェーズ2でODピークが観察されず、これは、使用後にカラムにタンパク質が残っていないことを示している。いずれの再生緩衝液を使用しても、プロセス中に圧カスパイクは観察されなかった。

40

【0503】

洗浄手順を確認するために、各再生緩衝液を使用して1回の産物接触ランを実行した。表6に詳述されている手順を使用した、産物接触ランの後、モックラン（負荷フェーズなしで実行されたラン）を実行した。模擬ランでは、タンパク質のキャリアオーバーを評価するために、2つの再生緩衝液を以前のタンパク質接触ランと交互に使用した。以下は、評価のランシーケンスの概要である：

1.) 50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0再生フェーズを使用したタンパク質接触ラン

50

2.) 350mMのNaOAc、pH8.3再生フェーズを使用したモックラン

3.) 350mMのNaOAc、pH8.3再生フェーズを使用したタンパク質接触ラン

4.) 50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0再生フェーズを使用したモックラン

【表6】

表6. Poros (商標) 50HSモックラン洗浄手順

ステップ	フェーズ期間 (CV)	緩衝液
平衡化	5	40mMのNaOAc、pH5.5
溶出 (モックプール) *	4	500mM NaOAc、pH5.5
平衡化	4	40mM NaOAc、pH5.5
再生	5	350mM NaOAc、pH8.3
消毒	4	0.5N NaOH
保存	3	0.1N NaOH

*試験した2つの再生緩衝液のモックプールを収集し、Y:99 (総タンパク質) およびY:77 (CHO DNA) 分析に提出した。

【0504】

タンパク質接触ランおよびモックランの両方からの再生フェーズを収集し、SECで実行した (図8Aおよび8B)。モックプールを収集し、CHO DNA (Y:77) および総タンパク質 (Y:99) を分析した。

【0505】

表7に記載されている結果は、両方の再生緩衝液について同等の性能を示し、CHO DNAおよび総タンパク質は、カラムでの産物接触ランの後、LOQ以下に減少した。タンパク質接触およびモックランの再生溶液のSEC分析は、350mMのNaOAc、pH8.3が、タンパク質接触ラン中に50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0よりも効果的に結合したタンパク質を溶出できることを示した。50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0を使用した場合、後続のモックランで350mMのNaOAc、pH8.3を使用した際に溶出する追加のタンパク質によって示されるように、タンパク質接触ランは依然としてカラムにタンパク質が結合したままであった (図8Aおよび8B)。

【表7】

表7. Poros (商標) 50HSモックラン「キャリーオーバー」洗浄結果

緩衝液	CHO DNA、Y:77 (pg/mL)	総タンパク質、Y:99* (μg/mL)
50mM トリス、85mM NaOAc、 pH8.0	≤1	≤0.25
350mM NaOAc、pH8.3	≤1	≤0.25

*キャリーオーバー (Y99) サンプルは、サンプル収集から30分以内に0.1% P20で処理し、分析前に-70℃以下で保存した。

【0506】

結論

350mMのNaOAc pH8.3および50mMのトリス、85mMのNaOAc、pH8.0の再生により、mAb2およびmAb1のPoros (商標) 50HS樹脂汚れが効果的に軽減された。いずれかの緩衝液を使用した消毒フェーズ間でも、最小限の圧力上昇が観察された。350mMのNaOAc再生緩衝液は、CEX過負荷クロマトグラフィーのプラットフォーム再生緩衝液として50mMのトリス、NaOAc pH8.0緩衝液よりも選択された。

【0507】

実施例2マルチモーダル陰イオン交換過負荷再生洗浄ステップの開発

過負荷マルチモーダル陰イオン交換クロマトグラフィー材料の消毒中の汚れを減らし、クロマトグラフィーラン間の不純物のキャリーオーバーを最小限に抑えるために、再生ステップを開発した。

【0508】

材料および方法

原料

本試験は、CHO細胞株を使用して、400 Lパイロットプラントランから得られた調整済み抗体MabSelect SuRe（商標）（MSS）プールを使用して実行された。400 Lの細胞培養産物を、連続（密閉）遠心分離、その後の深層濾過、および最終的な滅菌グレード（0.2 μm）のろ過によって回収した。

過負荷（OL）クロマトグラフィー（Capto（商標）Adhere）

【0509】

「過負荷」操作中、タンパク質のブレイクスルーが発生し始める点を介して、産物と不純物の両方が強い結合を示す条件下（ $\log K_p > 2.0$ ）でカラムに負荷する。不純物が産物タンパク質よりも強く結合する場合（すなわち、不純物 $\log K_p > \text{Mab} \log K_p$ ）、産物タンパク質が不純物による置換を受けるように、最適な性能が実現され得る。これにより、ブレイクスルー後に溶離液が生成され、これは、産物が濃縮されており、不純物が減少している。

【0510】

Capto（商標）Adhere過負荷クロマトグラフィー試験の場合、原料は、図9に示すように高い $\log K_p$ （結合条件）であるpH8.0で負荷される。充填負荷の後に、平衡化緩衝液による負荷後の洗浄が続く。結果を表8および9に概要する。試験した再生緩衝液を表10に列挙する。

【0511】

全てのラボスケールのクロマトグラフィー開発作業は、GE Healthcare AKTA Avant 150およびOmniFit 0.66 cm直径のカラムを使用して実行した。

【表8】

表8. Capto（商標）Adhereクロマトグラフィープロセス、フェーズ情報、およびラン条件

樹脂	Capto（商標）Adhere
モード	過負荷
負荷密度	300 g/L
負荷	調整済みMabSelect SuReプール、pH8.0
流速	150 cm/hr
床高さ	20 cm
プーリング基準	0.5~0.5 OD

10

20

30

40

50

【表 9】

ステップ／フェーズ	緩衝液	カラム体積 (CV)
平衡化	50 mM トリス、85 mM 酢酸ナトリウム、pH 8.0	5
負荷	調整済み Mab Select SuRe プール、pH 8.0	適宜
洗浄	50 mM トリス、85 mM 酢酸ナトリウム、pH 8.0	10
再生洗浄 1	緩衝液の評価： 1.) 350 mM 酢酸ナトリウム、pH 8.3 2.) 40 mM NaOAc pH 4.0 3.) 40 mM NaOAc pH 5.0 4.) 350 mM NaOAc pH 4.0 5.) 350 mM NaOAc pH 5.0	7
再生洗浄 2	詳細については、上記の緩衝液リストおよび表 3.1-1 を参照されたい。	5
酸洗浄液	0.167 M 酢酸、0.3 M リン酸	3
消毒	0.5 N NaOH、1 M NaCl	4
保存	0.1 N NaOH	3

10

【表 10】

表 10. C a p t o (商標) A d h e r e 再生洗浄緩衝液

再生洗浄緩衝液	pH	導電率 (mS/cm)
350 mM 酢酸ナトリウム	8.3 ± 0.1	20.0 ± 3
40 mM 酢酸ナトリウム	4.0 ± 0.1	1.0 ± 1.0
40 mM 酢酸ナトリウム	5.0 ± 0.1	2.6 ± 1.0
350 mM 酢酸ナトリウム	4.0 ± 0.1	6.6 ± 5
350 mM 酢酸ナトリウム	5.0 ± 0.1	18.0 ± 5

20

【0512】

分析方法

産物タンパク質濃度

30

M A B 濃度は、278 nm で S o l o V P E を使用して決定した。次の式を使用してタンパク質濃度を計算した：

$$\text{タンパク質濃度} = (A_{280} - A_{320}) / (\text{吸光係数} \times \text{経路長}) \times \text{希釈係数}$$

【0513】

$$\text{総タンパク質 (mg)} = \text{タンパク質濃度 (mg/ml)} \times \text{プール容量 (ml)}$$

【0514】

再生洗浄ステップの開発

M A B 3 C a p t o (商標) A d h e r e (O L) カラム再生試験の概要

【0515】

過負荷クロマトグラフィー操作には、結合した不純物を効果的に除去するための再生ステップが含まれる。評価された再生緩衝液を表 10 に示す。再生緩衝液の評価では、カラムに 300 g/L 樹脂を負荷し、2 つの再生フェーズを組み込んだ。ランごとに、再生緩衝液のシーケンスを変更した。試験した再生緩衝液のシーケンスを表 11 に概要し、以下に詳述する。

40

【表 1 1】

表 1 1：再生洗浄フェーズに使用される緩衝液のシーケンス。番号は、再生緩衝液が使用された順序を示す。

再生緩衝液	ランA	ランB	ランC	ランD	ランE
350mM NaOAc、pH8.3 mS/cm*	1				
40mM NaOAc、pH4.0	2	1		2	
350mM NaOAc、pH4.0		2		1	
40mM NaOAc、pH5.0			1		2
350mM NaOAc、pH5.0			2		1

10

*7CVの代わりに5CVのフェーズ期間を使用した

評価ランA：

再生フェーズ1：350mM 酢酸ナトリウム、pH8.3

再生フェーズ2：40mM 酢酸ナトリウム、pH4.0

評価ランB：

再生フェーズ1：40mM 酢酸ナトリウム、pH4.0

再生フェーズ2：350mM 酢酸ナトリウム、pH4.0

評価ランC：

再生フェーズ1：40mM 酢酸ナトリウム、pH5.0

再生フェーズ2：350mM 酢酸ナトリウム、pH5.0

評価ランD：

再生フェーズ1：350mM 酢酸ナトリウム、pH4.0

再生フェーズ2：40mM 酢酸ナトリウム、pH4.0

評価ランE：

再生フェーズ1：350mM 酢酸ナトリウム、pH5.0

再生フェーズ2：40mM 酢酸ナトリウム、pH5.0

20

【0516】

結果

フェーズ全体の質量均衡（%タンパク質回収）および圧力プロファイルと比較して、再生緩衝液の有効性を決定した。再生緩衝フェーズでの%回収が高いほど、再生緩衝液がより効果的であることを示す。表12は、各ランのフェーズ間の質量均衡の概要を示す。主な試験の比較を以下に要約する。

30

【表 1 2】

表 1 2：質量均衡の概要（%タンパク質回収）

ラン	質量均衡（%タンパク質回収）					総質量均衡 %タンパク質 回収
	プール	再生洗浄1	再生洗浄2	酸洗浄	消毒洗浄	
A	75.9	6.7	21.3	0.2	0.2	104.3
B	72.3	28.1	0.2	0.1	0.2	100.9
C	72.3	27.2	0.4	0.7	0.2	100.8
D	72.6	27.7	0.0	0.1	0.1	100.5
E	72.1	26.6	0.6	0.6	0.1	100.0

40

【0517】

評価ランA：

350mMのNaOAc pH8.3緩衝液は、最も効果の低い再生洗浄液である。少量のタンパク質が溶出されたが、その後の再生緩衝液（40mM NaOAc、pH4.0）は、フェーズでの%回収がより高いことからわかるように、より効果的であった。最小限のタンパク質が、2回目の再生フェーズ後もカラムに残存する。図10Aに示すよう

50

に、カラム汚れは観察されなかった（圧カスパイクはなかった）。

【0518】

評価ランB vs ランD：40mM vs 350mM NaOAc pH4.0

40mMおよび350mM NaOAc pH4.0緩衝液は同等の効果を有していた。両方の再生洗浄緩衝液は、最初の再生洗浄フェーズとして使用すると同様のタンパク質回収率を有していた。最初の再生フェーズの後、最小限のタンパク質がカラムに残存する。図10Bおよび図10Dに示すように、カラム汚れは観察されなかった（圧カスパイクはなかった）。

【0519】

評価ランC vs ランE：40mMのNaOAc vs 350mMのNaOAc pH5.0

40mMのNaOAc pH5.0緩衝液は、350mMのNaOAc pH5.0と比較して、カラムからタンパク質を溶出する効果が向上した。350mMのNaOAc pH5.0を再生洗浄1として使用した場合、再生洗浄2の間に、より多くの残存タンパク質が溶出する（ランE）。再生洗浄2でUVシグナルの増加が観察される（図4、5）。図10Cおよび図10Eに示すように、カラム汚れは観察されなかった（圧カスパイクはなかった）。

【0520】

評価ランB vs ランC：pH4.0 vs pH5.0

pH4.0および5.0はどちらも、プーリングフェーズ後に残存している結合タンパク質を十分に溶出するが、pH4.0の再生緩衝液は、結合タンパク質の溶出においてpH5.0よりもより効果的である。クロマトグラムを比較して示しているように、pH4.0条件では、再生フェーズ2後での残存タンパク質の溶出がより少ない（図10B～10E）。

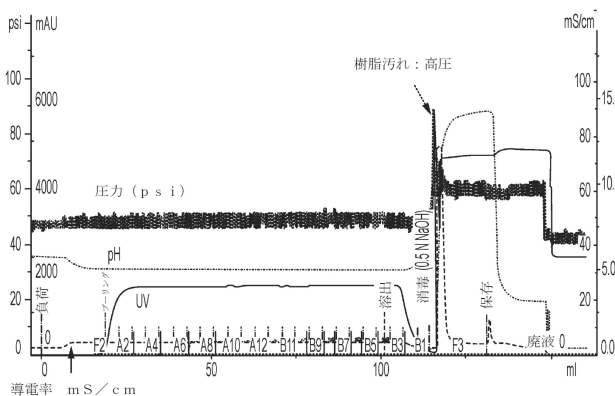
【0521】

結論

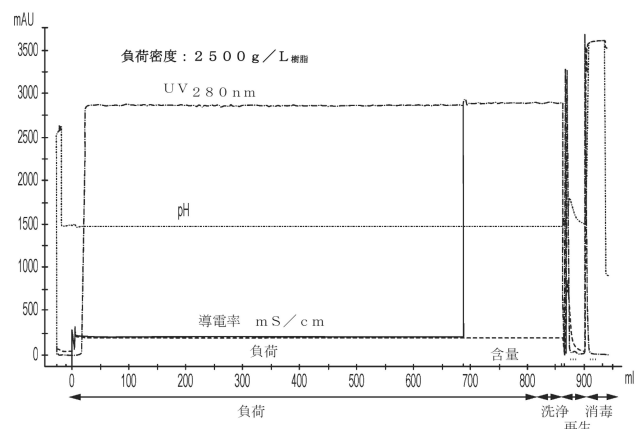
Capto（商標）Adhere再生緩衝液としては、pHが低いほど効果的である。40mMおよび350mM pH4.0および5.0は、350mM NaOAc pH8.3と比較して、より効果的なCapto Adhere再生洗浄緩衝液である。この評価では、40mMおよび350mM NaOAc pH4.0再生緩衝液が最も効果的な再生緩衝液であった。これは、mAB3について、低pHでの樹脂へのタンパク質結合が減少したこと、および高pHでの結合が増加した頃（すなわち、タンパク質溶出効率の低下）を示す結合等温線データと一致する（図9）。消毒フェーズでは、最小限の圧力上昇が観察された。将来の再生緩衝液研究のために、消毒フェーズの前にタンパク質をカラムから溶出するために、再生洗浄緩衝液の数を増やす可能性がある。

【図面】

【図1】



【図2】



10

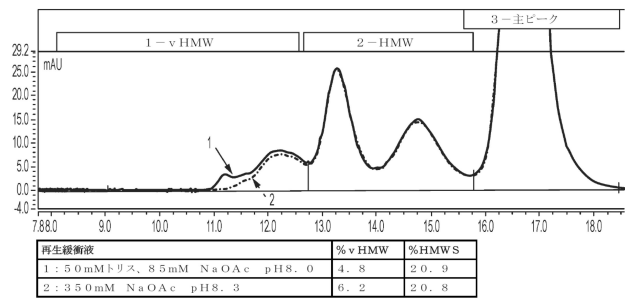
20

30

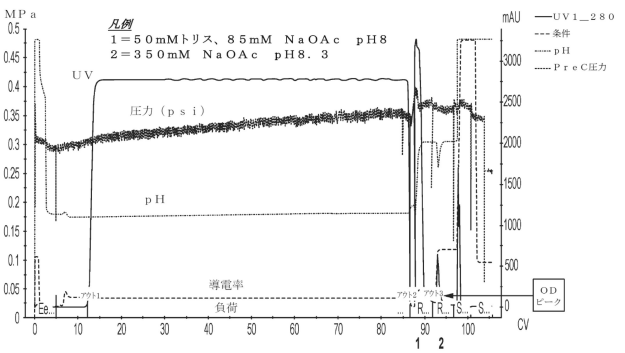
40

50

【図 3】

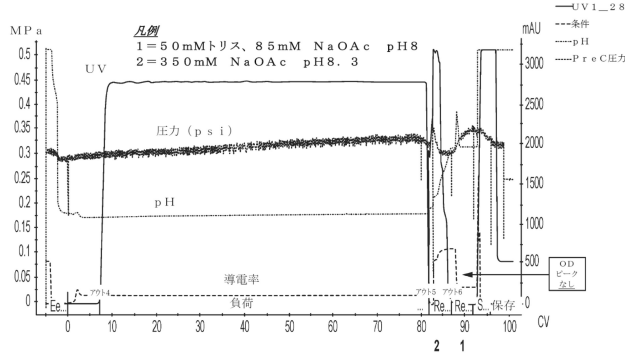


【図 4】

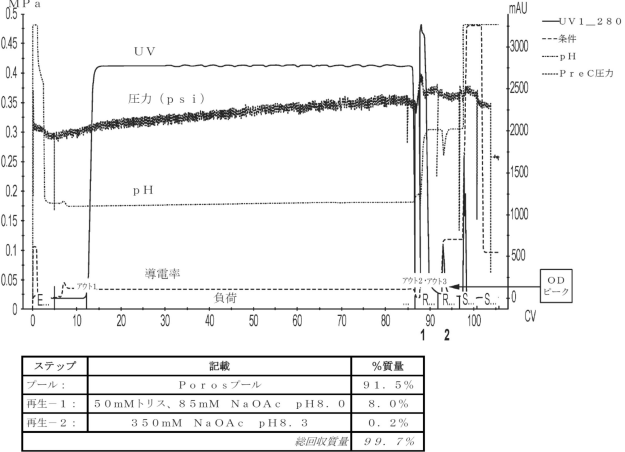


10

【図 5】



【図 6】



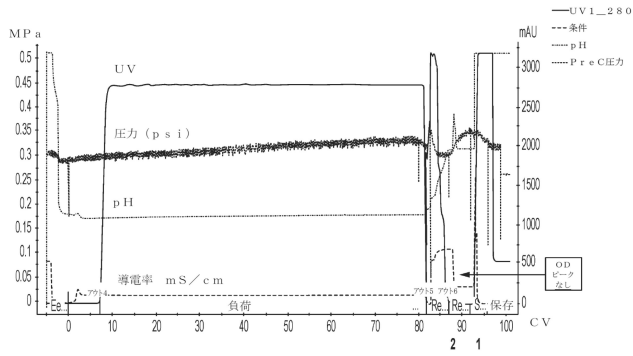
20

30

40

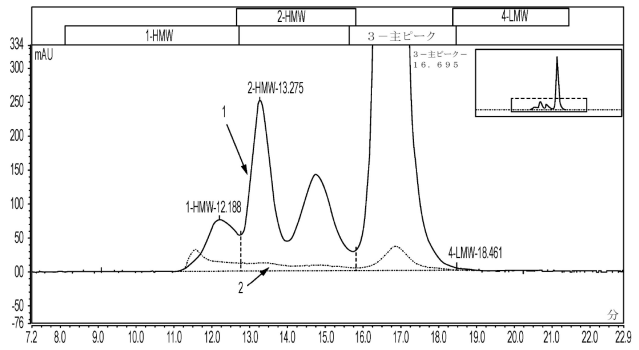
50

【図 7】



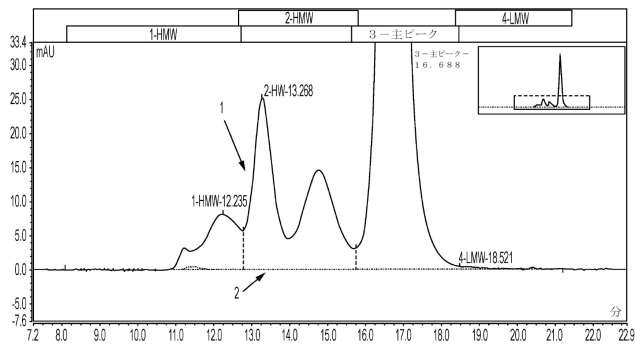
ステップ	記載	質量均衡
ブール:	P o r o s ブール	91.9%
再生-2:	3.50mM NaOAc pH8.3	8.3%
再生-1:	50mM トリス, 8.5mM NaOAc pH8.0	0.1%
総回収質量		100.3%

【図 8 A】



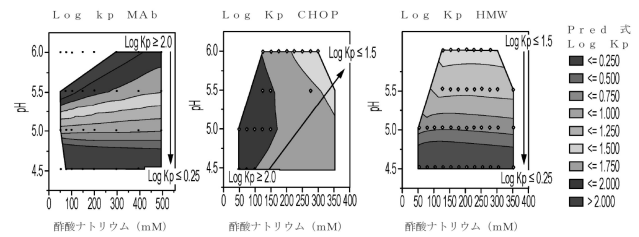
10

【図 8 B】



【図 9】

Capto Adhere



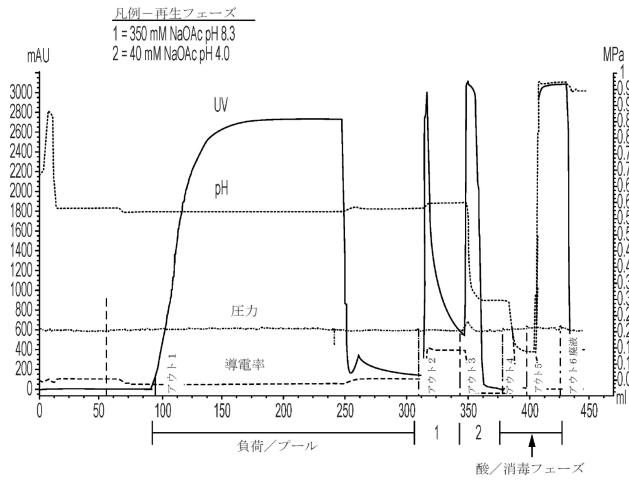
20

30

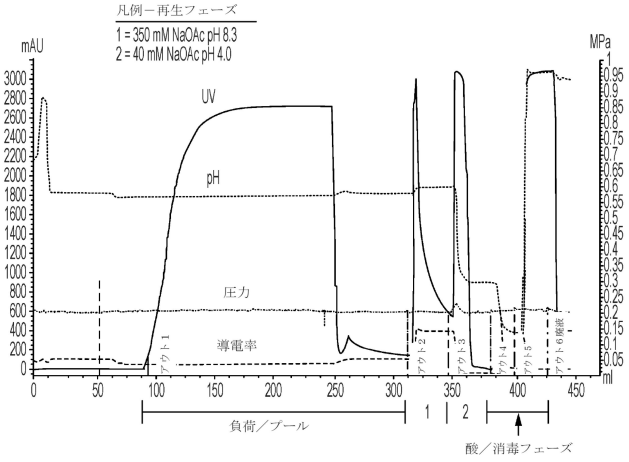
40

50

【図 10 A】

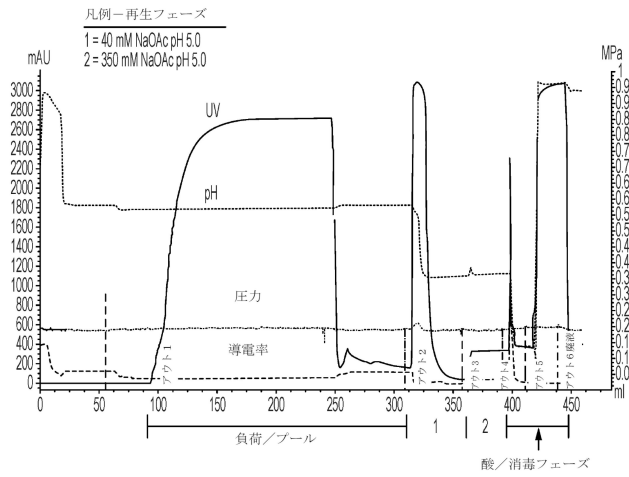


【図 10 B】

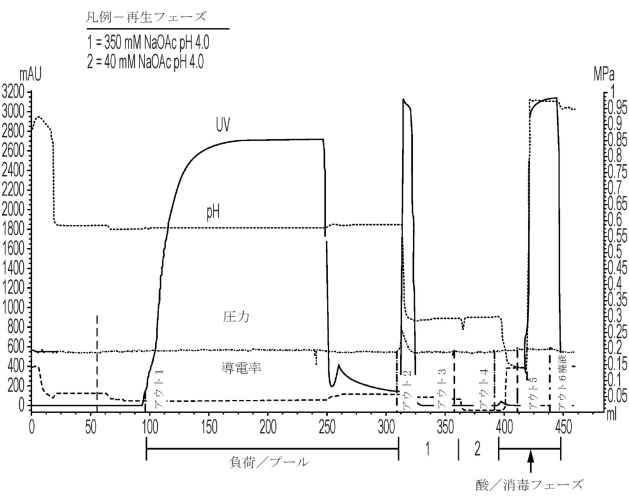


10

【図 10 C】



【図 10 D】



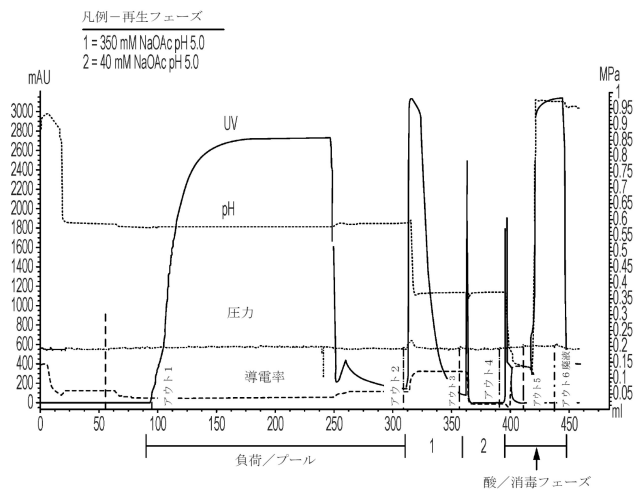
20

30

40

50

【図 10 E】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/036126

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01D15/42 B01D15/36 B01D15/20 B01J20/34 C07K1/18 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 G01N B01J C07K		
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	HUI F LIU ET AL: "Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1218, no. 39, 28 September 2011 (2011-09-28), pages 6943-6952, XP002668917, ISSN: 0021-9673, DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.CHROMA.2011.08.008 [retrieved on 2011-08-12] figure 1	1-141
X	EP 3 299 380 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 28 March 2018 (2018-03-28) paragraph [0308]; table 14 paragraph [0311]; table 16	1-141
-/--		
☒ 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 September 2020		21/09/2020
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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/036126

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/178375 A1 (UNIVERCELLS S A [BE]) 4 October 2018 (2018-10-04) example 1 -----	1-11, 38-60
X	EP 2 377 527 A1 (GENENTECH INC [US]) 19 October 2011 (2011-10-19) example 2; table 11 -----	1-141
X	WO 2013/096322 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 27 June 2013 (2013-06-27) page 41, line 30 - page 43, line 23 -----	1
X	WO 2016/144824 A1 (GENENTECH INC [US]; F HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH]) 15 September 2016 (2016-09-15) paragraph [0330] - paragraph [0332] -----	27
A	EP 2 327 414 A1 (BIOMARIN PHARM INC [US]) 1 June 2011 (2011-06-01) page 39; table 16 -----	1-141

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036126

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3299380	A1	28-03-2018	AU 2011258254 A1	10-01-2013
			BR 112012029904 A2	08-08-2017
			CA 2799915 A1	01-12-2011
			CN 102905718 A	30-01-2013
			CN 107365346 A	21-11-2017
			EP 2575847 A1	10-04-2013
			EP 3299380 A1	28-03-2018
			ES 2637613 T3	13-10-2017
			HK 1246328 A1	07-09-2018
			HR P20171095 T1	06-10-2017
			JP 5934190 B2	15-06-2016
			JP 6272941 B2	31-01-2018
			JP 2013530156 A	25-07-2013
			JP 2016190851 A	10-11-2016
			JP 2018087192 A	07-06-2018
			KR 20130086544 A	02-08-2013
			MX 344248 B	09-12-2016
			MY 161534 A	28-04-2017
			NZ 603648 A	24-12-2014
			PL 2575847 T3	31-10-2017
			RU 2012156271 A	27-06-2014
			SG 185737 A1	30-01-2013
			SG 102017104390 A	30-01-2018
			SI 2575847 T1	29-09-2017
			US 2013079272 A1	28-03-2013
			US 2019300566 A1	03-10-2019
			WO 2011150110 A1	01-12-2011
			ZA 201208673 B	24-02-2016

WO 2018178375	A1	04-10-2018	BE 1025090 A1	24-10-2018
			CA 3058269 A1	04-10-2018
			CO 2019011205 A2	17-01-2020
			EP 3601315 A1	05-02-2020
			KR 20190135495 A	06-12-2019
			PE 20191839 A1	31-12-2019
			WO 2018178375 A1	04-10-2018

EP 2377527	A1	19-10-2011	AT 526017 T	15-10-2011
			AU 2008209404 A1	31-07-2008
			BR P10806367 A2	06-09-2011
			CA 2673851 A1	31-07-2008
			CN 101646431 A	10-02-2010
			EP 2120915 A2	25-11-2009
			EP 2377527 A1	19-10-2011
			ES 2374330 T3	15-02-2012
			ES 2426158 T3	21-10-2013
			HK 1135920 A1	30-12-2011
			IL 199550 A	30-04-2015
			JP 5361738 B2	04-12-2013
			JP 2010516773 A	20-05-2010
			KR 20090113264 A	29-10-2009
			NZ 577933 A	22-12-2011
			RU 2009131765 A	27-02-2011
			US 2008193981 A1	14-08-2008
			WO 2008091740 A2	31-07-2008
			ZA 200904482 B	29-09-2010

WO 2013096322	A1	27-06-2013	AR 089362 A1	20-08-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		AU 2012355356 A1	10-07-2014	
		AU 2018200194 A1	01-02-2018	
		AU 2020201070 A1	05-03-2020	
		BR 112014015101 A2	13-06-2017	
		CA 2859376 A1	27-06-2013	
		CN 104125963 A	29-10-2014	
		CN 108892706 A	27-11-2018	
		EP 2794635 A1	29-10-2014	
		EP 3492486 A1	05-06-2019	
		ES 2697676 T3	25-01-2019	
		HK 1203526 A1	30-10-2015	
		HR P20181846 T1	28-12-2018	
		IL 233158 A	31-07-2019	
		JP 6605202 B2	13-11-2019	
		JP 2015503524 A	02-02-2015	
		JP 2018109024 A	12-07-2018	
		JP 2020040952 A	19-03-2020	
		KR 20140114834 A	29-09-2014	
		KR 20200008022 A	22-01-2020	
		MX 360453 B	01-11-2018	
		NZ 626949 A	25-11-2016	
		PL 2794635 T3	28-02-2019	
		RU 2014130017 A	10-02-2016	
		SG 11201403437T A	30-07-2014	
		SI 2794635 T1	31-12-2018	
		TR 201815709 T4	21-11-2018	
		US 2014348845 A1	27-11-2014	
		US 2020102346 A1	02-04-2020	
		WO 2013096322 A1	27-06-2013	

WO 2016144824	A1	15-09-2016	AR 103852 A1	07-06-2017
			AU 2016230018 A1	21-09-2017
			CA 2978256 A1	15-09-2016
			CN 107531749 A	02-01-2018
			EP 3265557 A1	10-01-2018
			EP 3636749 A1	15-04-2020
			ES 2761726 T3	20-05-2020
			HK 1247936 A1	05-10-2018
			HR P20192217 T1	21-02-2020
			JP 2018516229 A	21-06-2018
			KR 20170122216 A	03-11-2017
			PL 3265557 T3	31-03-2020
			SG 11201707186Y A	30-10-2017
			SI 3265557 T1	28-02-2020
			US 2016370369 A1	22-12-2016
			US 2019056399 A1	21-02-2019
			WO 2016144824 A1	15-09-2016

EP 2327414	A1	01-06-2011	AR 042019 A1	08-06-2005
			AU 2003290642 A1	03-06-2004
			BR 0316039 A	13-09-2005
			CA 2502928 A1	27-05-2004
			CN 1726046 A	25-01-2006
			CY 1116164 T1	08-02-2017
			DK 2327414 T3	13-04-2015
			EP 1565209 A2	24-08-2005
			EP 2327414 A1	01-06-2011
			ES 2445028 T3	27-02-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		ES 2533770 T3	15-04-2015
		HK 1157215 A1	31-07-2015
		IL 168435 A	31-07-2014
		JP 4459059 B2	28-04-2010
		JP 2006510356 A	30-03-2006
		MX PA05004880 A	22-07-2005
		PT 1565209 E	13-02-2014
		PT 2327414 E	13-04-2015
		SI 2327414 T1	29-05-2015
		TW 1327919 B	01-08-2010
		US 2004101524 A1	27-05-2004
		WO 2004043373 A2	27-05-2004

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)
B 0 1 D	15/36 (2006.01)	B 0 1 D	15/36
G 0 1 N	30/50 (2006.01)	G 0 1 N	30/50

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,N
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

イーエヌエー ウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ブラウン, ジェイソン エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウ
エイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 パーシオン, ジョセフィン ケー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウ
エイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 リム, エイミー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウ
エイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B064 AG27 CE11 DA01 DA20

4D017 AA09 BA07 CA13 CA17 DA03 DB10

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA60 FA74 GA23