

【公報種別】特許公報の訂正
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和5年3月28日(2023.3.28)

【特許番号】特許第7239509号(P7239509)
 【登録日】令和5年3月6日(2023.3.6)
 【特許公報発行日】令和5年3月14日(2023.3.14)
 【年通号数】登録公報(特許)2023-048
 【出願番号】特願2020-25917(P2020-25917)

【訂正要旨】特許権者の住所の誤載により、下記のとおり全文を訂正する。

10

【国際特許分類】

C 1 2 P 19/04(2006.01)
C 0 8 B 37/00(2006.01)
A 6 1 P 37/04(2006.01)
A 6 1 P 31/04(2006.01)
A 6 1 K 39/09(2006.01)

【F I】

C 1 2 P 19/04 C
 C 0 8 B 37/00 P
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 K 39/09

20

【記】別紙のとおり

30

40

50

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7239509号
(P7239509)

(45)発行日 令和5年3月14日(2023.3.14)

(24)登録日 令和5年3月6日(2023.3.6)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 C
C 0 8 B 37/00 (2006.01)	C 0 8 B 37/00 P
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09

請求項の数 23 外国語出願 (全157頁)

(21)出願番号	特願2020-25917(P2020-25917)	(73)特許権者	593141953 ファイザー・インク アメリカ合衆国 1 0 0 0 1 - 2 1 9 2 ニューヨーク州 ニューヨーク市 ハドソン・ブルバード・イースト 6 6
(22)出願日	令和2年2月19日(2020.2.19)	(74)代理人	100133927 弁理士 四本 能尚
(65)公開番号	特開2020-146032(P2020-146032 A)	(72)発明者	リン チュウ アメリカ合衆国 1 0 9 0 1 ニューヨーク州 サファーン市 ポッター・レーン 5
(43)公開日	令和2年9月17日(2020.9.17)	(72)発明者	スコット アンドリュー クック アメリカ合衆国 6 3 0 1 1 ミゾーリ州 ポールウィン市 オークモント・サークル 4 0 9
審査請求日	令和3年7月2日(2021.7.2)	(72)発明者	ニシス マーチャント
(31)優先権主張番号	62/808907		
(32)優先日	平成31年2月22日(2019.2.22)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細菌多糖類を精製するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細菌多糖を、夾雑物と一緒に前記多糖を含む溶液から精製するための方法であって、凝集剤を添加することを含む凝集ステップを含み、前記凝集剤がミョウバンを含み、前記夾雑物が細菌細胞の破片、ならびに細菌細胞のタンパク質および核酸を含む、方法。

【請求項 2】

ミョウバンが、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンおよびアンモニウムミョウバンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

凝集剤の濃度が、約 0 . 1 ~ 約 2 0 % (w / v) である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

溶液が、下流のプロセシングの前にフロックの沈降を可能にするためにいくらかの時間にわたって保持される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記凝集ステップが、酸性 pH で実施される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

存在する場合、沈降ステップが、約 4 ~ 約 3 0 の温度で実施される、請求項 4 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

存在する場合、沈降ステップが、約 30 ~ 約 95 の温度で実施される、請求項 4 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

凝集の後に、懸濁液がデカンテーション、沈降化、濾過または遠心分離によって清澄化される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

多糖含有溶液が、濾過される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記濾過が深層濾過である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

濾液が、精密濾過にかけられる、請求項 9 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 12】

濾液が、限外濾過および透析濾過によってさらに処理される、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記限外濾過ステップが、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

置換液が、キレート剤を含む、請求項 12 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記透析濾過ステップが、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される、請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 16】

多糖を含有する溶液が、活性炭濾過ステップによって処理される、請求項 8 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

濾液が、精密濾過にかけられる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

濾液が、限外濾過および透析濾過によってさらに清澄化される、請求項 16 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 19】

置換液が、キレート剤を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記透析濾過ステップが、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される、請求項 18 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記精製された多糖の溶液が、サイジングによってホモジナイズされる、請求項 18 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記精製された多糖の溶液が、滅菌濾過される、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記細菌多糖が、莢膜多糖である、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌多糖類を精製するため、特に、多糖類を産生する細菌の細胞溶解物から不純物を除去するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細菌多糖類、特に、莢膜多糖類は、様々な細菌疾患に関与する細菌の表面上に見出される重要な免疫原である。このため、それらはワクチンの設計における重要な成分となっている。それらは、特に、担体タンパク質に連結された場合、免疫応答を惹起するのに有用であることがわかっている。

10

【0003】

細菌多糖類は、典型的には、細菌（例えば、連鎖球菌（*Streptococci*）（例えば、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）、化膿連鎖球菌（*S. pyogenes*）、溶血性連鎖球菌（*S. agalactiae*）またはC&G群連鎖球菌（*Streptococci*））、ブドウ球菌（*Staphylococci*）（例えば、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*））、ヘモフィルス（*Haemophilus*）（例えば、ヘモフィルス・インフルエンザ（*Haemophilus influenzae*））、ナイセリア（*Neisseria*）（例えば、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*））およびエシェリキア（*Escherichia*）（例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）））の発酵によって産生される。

20

【0004】

典型的には、細菌多糖類は、複合培地中でのバッチ式培養、フェドバッチ式培養または連続式培養を使用して産生される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】WO2007/052168

WO2009/081276

30

WO2010151544

WO2011/051917

WO2007084856

WO2008/118752

WO2006/110381

WO2007116028

WO2015110941

WO2015110940

WO2014097099

WO93/15760

40

WO95/08348

WO96/129094

WO2011041003

WO2014027302

WO2015121783

WO00/10599

米国特許第4,673,574号

米国特許第4,808,700号

米国特許第4,459,286号

米国特許第4,709,017号

50

米国特許第 4, 9 5 0, 7 4 0 号
 米国特許第 5, 9 1 7, 0 1 7 号
 米国特許第 6, 4 5 5, 6 7 3 号
 米国特許第 5, 8 4 3, 7 1 1 号
 WO 2 0 0 4 / 0 8 1 5 1 5
 WO 2 0 0 6 / 0 3 2 4 9 9
 WO 0 0 / 3 7 1 0 5
 WO 0 0 / 3 9 2 9 9
 WO 0 1 / 9 8 3 3 4
 WO 0 3 / 0 5 4 0 0 7
 WO 2 0 0 9 / 0 0 0 8 2 6
 EP 0 3 7 2 5 0 1
 EP 0 5 9 4 6 1 0 B
 EP 0 3 7 8 8 8 1
 EP 0 4 2 7 3 4 7
 WO 9 3 / 1 7 7 1 2
 WO 9 4 / 0 3 2 0 8
 WO 9 8 / 5 8 6 6 8
 EP 0 4 7 1 1 7 7
 WO 9 1 / 0 1 1 4 6
 WO 0 2 / 0 9 1 9 9 8
 WO 0 1 / 7 2 3 3 7
 WO 0 0 / 6 1 7 6 1
 WO 2 0 0 4 / 0 8 3 2 5 1
 WO 0 1 / 9 8 3 3 4
 WO 0 3 / 0 5 4 0 0 7
 EP 0 5 9 4 6 1 0 B
 米国特許第 5, 6 1 4, 3 8 2 号
 CN 1 0 3 4 9 5 1 6 1
 WO 0 0 / 0 7 6 2 1
 WO 9 9 / 4 4 6 3 6
 GB - 2 2 2 0 2 2 1
 EP 0 6 8 9 4 5 4
 WO 0 0 / 5 6 3 5 8
 EP 0 8 3 5 3 1 8
 EP 0 7 3 5 8 9 8
 EP 0 7 6 1 2 3 1
 WO 9 9 / 5 2 5 4 9
 WO 0 1 / 2 1 2 0 7
 WO 0 1 / 2 1 1 5 2
 WO 0 0 / 6 2 8 0 0
 WO 0 0 / 2 3 1 0 5
 WO 9 9 / 1 1 2 4 1
 WO 9 8 / 5 7 6 5 9
 EP 2 1 2 9 6 9 3
 WO 2 0 1 5 1 1 0 9 4 2

10

20

30

40

【非特許文献】

【0006】

【文献】Fattom B (1990) Infect Immun. 58(7): 2367

~ 74

50

Uchidaら(1973) J. Biol. Chem. 218: 3838~3844
 NichollsおよびYoule in Genetically Engineered Toxins、Ed: Frankel、Maecel Dekker Inc. (1992)

Kuoら(1995) Infect Immun 63: 2706~2713

Falugira(2001) Eur J Immunol 31: 3816~3824

Baraldoiら(2004) Infect Immun 72: 4884~4887

Douglasら(1987) J. Bacteriol. 169(11): 4967~4971

Uchidaら(1971) Nature New Biology 233: 8-11

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発酵後に細菌多糖類の大規模生産において使用することができるロバストで有効な精製プロセスが必要である。

【0008】

多くのプロセスは、莢膜多糖類の沈降のステップ(例えば、アルコールによる沈降または陽イオン洗剤処理)を含む。上清からの沈降物のその後の分離(例えば、遠心分離による)および再溶解は労力を要し、また多糖の損失をもたらし、それにより、収量を低減させ得る。

20

【0009】

さらに、多くの精製プロセスは、クロマトグラフィーおよび複数膜分離などの、多くの高価な、労働集約的な、技術的に要求の多い操作を含む、いくつかのステップを必要とする。これらのプロセスにおける不純物の除去は、多くの労働集約的な費用のかかるステップにおいて行われる。タンパク質レベルは、可溶性タンパク質の物理的および化学的特性のため、最も満たすことが困難な仕様である。

【0010】

かくして、ワクチンへの組込みにとって好適な実質的に精製された細菌糖類を産生するためには、細菌溶解物中の可溶性タンパク質レベルを低減し、現在の精製プロセスの非効率性を除去するための単純化された精製プロセスが必要である。

30

【課題を解決するための手段】

【0011】

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、多糖の精製のためのプロセスの流れ図である。

【図2】図2は、様々な時点でのタンパク質除去および肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)血清型8発酵プロスの透明度に対する2% w/v ミヨウバンのpHの効果の図である。1時間後(左バー)、4時間後(中央バー)、24時間(右バー)。

【図3】図3は、様々な時点でのタンパク質除去および肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)血清型8発酵プロスの透明度に対するpH 3.5のミヨウバンの%の効果の図である。1.0% ミヨウバン(左バー)、2.0% ミヨウバン(中央バー)、3.0% ミヨウバン(右バー)。

40

【図4】図4は、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)血清型33F発酵プロスの酸滴定の図である。

【図5】図5は、pH 3.5での肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)血清型33Fのミヨウバン凝集の図である。

【図6】図6は、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)血清型22Fの凝集プロスの粒径に対する加熱の効果の図である。実験のために、凝集温度を、室温(RT)(小さい方の粒径分布曲線(9.8 μmでピーク))および/または45 (大きい方の粒径分布曲線(65 μmでピーク))で保持した。

50

【発明を実施するための形態】

【0013】

1. 細菌多糖類の精製プロセス

1.1 出発材料

本発明の方法を使用して、夾雑物と一緒に細菌多糖類を含む溶液から前記多糖類を精製することができる。

【0014】

1.1.1 細菌細胞

本発明に従って精製される細菌多糖の供給源は、細菌細胞、特に、病原性細菌である。

【0015】

本発明による使用のためのグラム陽性細菌の非限定例は、連鎖球菌 (*Streptococci*) (例えば、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*)、溶血性連鎖球菌 (*S. agalactiae*) または C & G 群連鎖球菌 (*Streptococci*)、ブドウ球菌 (*Staphylococci*) (例えば、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*))、腸球菌 (*Enterococci*)、バチルス (*Bacillus*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、リステリア (*Listeria*)、エリジペロスリックス (*Erysipelothrix*)、およびクロストリジウム (*Clostridium*) である。本発明と共に使用するためのグラム陰性細菌の非限定例は、ヘモフィルス (*Haemophilus*) (例えば、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*))、ナイセリア (*Neisseria*) (例えば、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)) およびエシェリキア (*Escherichia*) (例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)) である。

【0016】

ある実施形態では、本発明による使用のための細菌多糖類の供給源は、エロモナス・ハイドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*) および他の種 (*spp.*) ; バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*) ; バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) ; クロストリジウム (*Clostridium*) のボツリヌス菌 (*Botulinum*) 神経毒産生種 ; ブルセラ・アボルトゥス (*Brucella abortus*) ; ブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*) ; ブルセラ・スイス (*Brucella suis*) ; パークホルデリア・マレイ (*Burkholderia mallei*) (以前は、シュードモナス・マレイ (*Pseudomonas mallei*)) ; パークホルデリア・シュードマレイ (*Burkholderia pseudomallei*) (以前は、シュードモナス・シュードマレイ (*Pseudomonas pseudomallei*)) ; カンプイロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) ; クラミジア・シッタシ (*Chlamydia psittaci*) ; クラミジア・トラコマトイス (*Chlamydia trachomatis*)、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*) ; クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) ; クロストリジウム・パーフリンジェンス (*Clostridium perfringens*) ; コクシジオイデス・イミティス (*Coccidioides immitis*) ; コクシジオイデス・ポサダシイ (*Coccidioides posadasii*) ; コウドリア・ルミナンチウム (*Cowdria ruminantium*) (心水病) ; コクシエラ・バーネッティ (*Coxiella burnetii*) ; エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) ; 腸管毒素産生性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EPEC)、病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EPEC)、腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) - O157:H7 (EHEC)、および腸管細胞侵入性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EIEC) などの腸毒性大腸菌 (*Escherichia coli*) 群 (EEC 群) ; エールリヒア・シャフェンシス (*Ehr*

10

20

30

40

50

lichia chajfeensis) などのエールリヒア種 (Ehrlichia spp.); 野兔病菌 (Francisella tularensis); レジオネラ・ニューモフィラ (Legionella pneumophila); リベロバクター・アフリカヌス (Liberobacter africanus); リベロバクター・アジアティクス (Liberobacter asiaticus); リステリア・モノシトゲネス (Listeria monocytogenes); クレブシエラ (Klebsiella)、エンテロバクター (Enterobacter)、プロテウス (Proteus)、シトロバクター (Citrobacter)、アエロバクター (Aerobacter)、プロビデンシア (Providencia)、およびセラチア (Serratia) などの雑多な腸内細菌; マイコバクテリウム・ボビス (Mycobacterium bovis); マイコバクテリウム・ツベルクロシス (Mycobacterium tuberculosis); マイコプラズマ・カプリコルム (Mycoplasma capricolum); マイコプラズマ・ミコイデス亜種ミコイデス (Mycoplasma mycoides ssp. mycoides); ペロノスクレロスポラフィリピネシス (Peronosclerosporaphilippinensis); さび病菌 (Phakopsora pachyrhizi); プレシオモナス・シゲロイデス (Plesiomonas shigelloides); ラルストニア・ソラナセラム (Ralstonia solanacearum) レース 3、次亜種 2; リケッチア・プロワゼキイ (Rickettsia prowazekii); リケッチア・リケッチイ (Rickettsia rickettsii); サルモネラ種 (Salmonella spp.); スクレロフトラ・レイジア・バル・ゼア (Schlerophthora rayssiae var. zeae); シゲラ種 (Shigella spp.); 黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus); 連鎖球菌 (Streptococcus); ジャガイモがんしゅ病菌 (Synchytrium endobioticum); ビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae) non-01; ビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae) 01; ビブリオ・パラヘモリティカス (Vibrio parahaemolyticus) および他のビブリオ属; ビブリオ・バルニフィカス (Vibrio vulnificus); キサントモナス・オリザエ (Xanthomonas oryzae); ピアス病菌 (Xylella fastidiosa) (柑橘類の斑入り萎黄病菌株); エルシニア・エンテロコリチカ (Yersinia enterocolitica) およびエルシニア・シュードツベルクローシス (Yersinia pseudotuberculosis); ならびにエルシニア・ペスティス (Yersinia pestis) からなる群から選択される。

10

20

30

【0017】

精製にとって望ましい多糖を、細胞壁などの細胞成分と結合させることができる。細胞壁との結合とは、多糖が、細胞壁自体の成分である、および/または直接的、もしくは中間分子を介して間接的に、細胞壁に付着する、または細胞壁の一過的なコーティングである(例えば、ある特定の細菌株は、当業界では「エキソ多糖類」としても知られる、莢膜多糖類を発散する)ことを意味する。

【0018】

一部の実施形態では、細菌から抽出される多糖は、莢膜多糖、莢膜下多糖、またはリボ多糖である。

40

【0019】

好ましい実施形態では、多糖は、莢膜多糖である。

【0020】

ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 5型または黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 8型である。

【0021】

50

さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) である。さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、b型ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) である。

【0022】

さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 A (MenA)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 W135 (MenW135)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 Y (MenY)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 X (MenX) または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 C (MenC) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 A (MenA) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 W135 (MenW135) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 Y (MenY) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 C (MenC) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 X (MenX) である。

【0023】

さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、大腸菌 (*Escherichia coli*) である。さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) である。

【0024】

さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌 (GBS)) である。一部の実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、GBS Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII および VIII 型からなる群から選択される。一部の実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、GBS Ia、Ib、II、III および V 型からなる群から選択される。

【0025】

さらなる実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、大腸菌 (*Escherichia coli*) である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、腸管毒素産生性大腸菌 (*Escherichia coli*) (ETEC)、病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EPEC)、腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) - O157:H7 (EHEC)、または腸管細胞侵入性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EIEC) などの腸毒性大腸菌 (*Escherichia coli*) 群 (EEC群) の大腸菌 (*Escherichia coli*) 部分である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、尿路病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) である (UPEC)。

【0026】

ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、血清型 O157:H7、O26:H11、O111:H- および O103:H2 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、血清型 O6:K2:H1 および O18:K1:H7 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、血清型 O45:K1、O17:K52:H18、O19:H34 および O7:K1 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型 O104:H4 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、尿路病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型 O1:K12:H7 である。あ

10

20

30

40

50

る実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型 O127:H6 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型 O139:H28 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型 O128:H2 である。

【0027】

好ましい実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) である。好ましくは、細菌莢膜多糖類の供給源は、血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、6C、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24B、24F、29、31、33F、34、35B、35F、38、72 および 73 からなる群から選択される肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24F、29、31、33F、35B、35F、38、72 および 73 からなる群から選択される肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、血清型 8、10A、11A、12F、15B、22F および 33F からなる群から選択される肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 1 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 2 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 3 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 4 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 5 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6A である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6B である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6C である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 7F である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 8 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 9V である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 9N である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 10A である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 11A である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 12F である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 14 である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 15A である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 15B である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)

10

20

30

40

50

血清型15Cである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型16Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型17Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型18Cである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型19Aである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型19Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型20である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型20Aである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型20Bである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型22Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型23Aである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型23Bである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型23Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型24Bである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型24Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型29である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型31である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型33Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型34である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型35Bである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型35Fである。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型38である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型72である。ある実施形態では、細菌莢膜多糖類の供給源は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型73である。

【0028】

本発明において使用されるそれぞれの多糖類を精製するために使用される細菌株を、確立された菌株保存機関または臨床標本から取得することができる。

【0029】

1.1.2 細菌細胞の増殖

典型的には、多糖類を、細菌を培地（例えば、固体または好ましくは、液体培地）中で増殖させることによって産生させる。次いで、細菌細胞を処理することによって、多糖類を調製する。

【0030】

したがって、ある実施形態では、本発明の方法のための出発材料は、細菌培養物、好ましくは、液体細菌培養物（例えば、発酵ブロス）である。

【0031】

細菌培養物は、典型的には、バッチ式培養、フェドバッチ式培養または連続式培養によ

10

20

30

40

50

って得られる（例えば、WO2007/052168またはWO2009/081276を参照されたい）。連続培養中に、新鮮な培地を、固定速度で培養物に添加し、細胞および培地を、一定の培養物容量を維持する速度で除去する。

【0032】

生物の集団は、種バイアルから種ボトルへとスケールアップされることが多く、生産規模の発酵容量に達するまで、容量を増加させる1または複数の種発酵器を通過させる。

【0033】

1.1.3 出発材料を得るための細菌細胞の予備処理

一般には、少量の多糖が、細菌増殖中に培養培地中に放出され、したがって、出発材料は、遠心分離された細菌培養物に由来する上清であってもよい。

【0034】

しかしながら、典型的には、出発材料は、多糖が放出されるように、細菌自体を処理することによって調製されるであろう。

【0035】

必要に応じて、細胞増殖後、細菌細胞を不活化する。これは、特に、病原性細菌が使用される場合に当てはまる。不活化のための好適な方法は、例えば、Fattomら(1990) *Infect Immun.* 58(7): 2367~74に記載されたような、例えば、フェノール：エタノールを用いた処理である。以下の実施形態では、細菌細胞を予め不活化するか、または不活化しなくてもよい。

【0036】

多糖類を、化学的、物理的または酵素的処理を含む様々な方法によって、細菌から放出させることができる（例えば、WO2010151544、WO2011/051917またはWO2007084856を参照されたい）。

【0037】

ある実施形態では、細菌細胞（不活化された、または不活化されていない）を、その元の培養培地中の懸濁液中で処理する。プロセスは、したがって、その元の培養培地中の懸濁液中の細胞から始まってもよい。

【0038】

別の実施形態では、細菌細胞を、莢膜多糖の放出の前に遠心分離する。プロセスは、したがって、湿った細胞ペーストの形態にある細胞から始まってもよい。あるいは、細胞を、乾燥形態で処理する。しかしながら、典型的には、遠心分離後、細菌細胞を、プロセスにおける次のステップにとって好適である水性媒体、例えば、緩衝剤または蒸留水中に再懸濁する。細胞を、再懸濁の前にこの媒体で洗浄してもよい。

【0039】

ある実施形態では、細菌細胞（例えば、その元の培養培地中の懸濁液中にある、湿った細胞ペーストの形態にある、乾燥形態にある、または遠心分離後に水性媒体中に再懸濁された）を、溶解剤で処理する。

【0040】

「溶解剤」は、細胞壁破壊を助ける任意の薬剤である。

【0041】

ある実施形態では、溶解剤は、洗剤である。本明細書で使用される用語「洗剤」とは、細菌細胞の溶解を誘導することができる任意の陰イオン性または陽イオン性洗剤を指す。本発明の方法の中での使用のためのそのような洗剤の代表的な例としては、デオキシコール酸ナトリウム(DOC)、N-ラウリルサルコシン(NLS)、ケノデオキシコール酸ナトリウム、およびサポニンが挙げられる(WO2008/118752、13頁、14行~14頁、10行を参照されたい)。本発明の一実施形態では、細菌細胞を溶解するために使用される溶解剤は、DOCである。

【0042】

ある実施形態では、溶解剤は、非動物由来溶解剤である。一実施形態では、非動物由来溶解剤は、デカンスルホン酸、tert-オクチルフェノキシ5ポリ(オキシエチレン)

10

20

30

40

50

エタノール（例えば、Igepal（登録商標）CA-630、カタログ番号9002-93-1、Sigma Aldrich、St. Louis、MOから入手可能）、オクチルフェノールエチレンオキシド凝縮物（例えば、Triton（登録商標）X-100、Sigma Aldrich、St. Louis、MOから入手可能）、N-ラウリルサルコシナトリウム（NLS）、ラウリルイミノジプロピオン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、ケノデオキシコレート、ヒオデオキシコレート、グリコデオキシコレート、タウロデオキシコレート、タウロケノデオキシコレート、およびコレートからなる群から選択される。ある実施形態では、非動物由来溶解剤は、NLSである。

【0043】

ある実施形態では、細菌細胞（例えば、その元の培養培地中の懸濁液中にある、湿った細胞ペーストの形態にある、乾燥形態にある、または遠心分離後に水性媒体中に再懸濁された）を、多糖が放出されるように酵素的に処理する。ある実施形態では、細菌細胞を、リソスタフィン、ムタノリシン、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼおよびムタノリシンと、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼとの組合せからなる群から選択される酵素によって処理する。これらのものは、細菌ペプチドグリカンに作用して、本発明と共に使用するための莢膜糖を放出させるが、群特異的炭水化物抗原の放出をももたらす。ある実施形態では、細菌細胞を、II型ホスホジエステラーゼ（PDE2）によって処理する。

10

【0044】

必要に応じて、多糖の放出後、酵素を不活化する。不活化のための好適な方法は、例えば、熱処理または酸処理である。

20

【0045】

ある実施形態では、細菌細胞（例えば、その元の培養培地中の懸濁液中にある、湿った細胞ペーストの形態にある、乾燥形態にある、または遠心分離後に水性媒体中に再懸濁された）を、多糖が放出されるようにオートクレーブする。

【0046】

さらなる実施形態では、細菌細胞（例えば、その元の培養培地中の懸濁液中にある、湿った細胞ペーストの形態にある、乾燥形態にある、または遠心分離後に水性媒体中に再懸濁された）を、多糖が放出されるように化学的に処理する。そのような実施形態では、化学的処理は、例えば、塩基または酸を使用する加水分解であってもよい（例えば、WO2007084856を参照されたい）。

30

【0047】

ある実施形態では、細菌細胞の化学的処理は、塩基抽出（例えば、水酸化ナトリウムを使用する）である。塩基抽出は、莢膜糖と、ペプチドグリカン骨格との間のホスホジエステル結合を切断することができる。ある実施形態では、塩基は、NaOH、KOH、LiOH、NaHCO₃、Na₂CO₃、K₂CO₃、KCN、Et₃N、NH₃、H₂N₂H₂、NaH、NaOMe、NaOEtおよびKOtBuからなる群から選択される。塩基処理後、反応混合物を中和することができる。これを、酸の添加によって達成することができる。ある実施形態では、塩基処理後、反応混合物を、HCl、H₃PO₄、クエン酸、酢酸、亜硝酸、および硫酸からなる群から選択される酸によって中和する。

【0048】

40

ある実施形態では、細菌細胞の化学的処理は、酸処理（例えば、硫酸）である。ある実施形態では、酸は、HCl、H₃PO₄、クエン酸、酢酸、亜硝酸、および硫酸からなる群から選択される。酸処理後、反応混合物を中和することができる。これを、塩基の添加によって達成することができる。ある実施形態では、酸処理後、反応混合物を、NaOH、KOH、LiOH、NaHCO₃、Na₂CO₃、K₂CO₃、KCN、Et₃N、NH₃、H₂N₂H₂、NaH、NaOMe、NaOEtおよびKOtBuからなる群から選択される塩基によって中和する。

【0049】

1.2 凝集

本発明の方法は、凝集ステップを含む。本発明者らは、プロセスが、夾雑物が少ない精

50

製された多糖をもたらすことを見出した。

【 0 0 5 0 】

本発明者のプロセスは、迅速かつ単純であり得る。

【 0 0 5 1 】

したがって、本発明の方法では、上記のセクション 1 . 1 の方法のいずれかによって得られた溶液を、凝集によって処理する。

【 0 0 5 2 】

本発明では、用語「凝集」とは、コロイドが、凝集剤の添加のため、フロックまたはフレークの形態で懸濁液から出てくるプロセスを指す。

【 0 0 5 3 】

凝集ステップは、「凝集剤」を、夾雑物と共に細菌多糖類を含む溶液に添加することを含む。ある実施形態では、夾雑物は、細菌細胞の破片、細菌細胞のタンパク質および核酸を含む。ある実施形態では、夾雑物は、細菌細胞のタンパク質および核酸を含む。

【 0 0 5 4 】

以下にさらに開示されるように、凝集ステップは、凝集剤の添加の前または後に、pHの調整をさらに含んでもよい。特に、溶液を酸性化することができる。

【 0 0 5 5 】

さらに、凝集剤の添加および/またはpHの調整を、所望のレベルに調整された温度で実施することができる。

【 0 0 5 6 】

これらのステップを、任意の順序で実施することができる：

- 凝集剤の添加、次いで、pHの調整、次いで、温度の調整または；
- 凝集剤の添加、次いで、温度の調整、次いで、pHの調整または；
- pHの調整、次いで、凝集剤の添加、次いで、温度の調整または；
- pHの調整、次いで、温度の調整、次いで、凝集剤の添加または；
- 温度の調整、次いで、凝集剤の添加、次いで、pHの調整または；
- 温度の調整、次いで、pHの調整、次いで、凝集剤の添加。

【 0 0 5 7 】

さらに、凝集剤の添加および/またはpHの調整の後、溶液を、いくらかの時間にわたって保持して、下流のプロセッシングの前にフロックを沈降させることができる。

【 0 0 5 8 】

本発明では、「凝集剤」とは、夾雑物と一緒に目的の多糖を含む溶液中で、目的の多糖を、溶液中に有意に留まらせながら、コロイドおよび他の懸濁された粒子の、フロックまたはフレークの形態での凝集を引き起こすことによって凝集を促進させることができる薬剤を指す。

【 0 0 5 9 】

本発明のある実施形態では、凝集剤は、多価陽イオンを含む。ある実施形態では、凝集剤は、多価陽イオンである。好ましい実施形態では、前記多価陽イオンは、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される。ある実施形態では、凝集剤は、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される少なくとも2つの多価陽イオンの混合物である。ある実施形態では、凝集剤は、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される少なくとも3つの多価陽イオンの混合物である。ある実施形態では、凝集剤は、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される4つの多価陽イオンの混合物である。

【 0 0 6 0 】

ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、ポリエチレンイミン（PEI）、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからな

10

20

30

40

50

る群から選択される薬剤を含む。ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される。ある実施形態では、凝集剤は、ポリエチレンイミン（PEI）である。ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバンを含む。ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバンである。ある実施形態では、凝集剤は、カリウムミョウバンを含む。ある実施形態では、凝集剤は、カリウムミョウバンである。ある実施形態では、凝集剤は、ナトリウムミョウバンを含む。ある実施形態では、凝集剤は、ナトリウムミョウバンである。ある実施形態では、凝集剤は、アンモニウムミョウバンを含む。ある実施形態では、凝集剤は、アンモニウムミョウバンである。

10

【0061】

ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、ポリエチレンイミン（PEI）、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される薬剤の混合物（例えば、2、3または4つの薬剤）である。ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される。

20

【0062】

ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される2つの薬剤の混合物である。ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される少なくとも3つの薬剤の混合物である。

30

【0063】

ある実施形態では、凝集剤は、キトサン、アイシングラス、ワサビノキ（*Moringa oleifera*）種子（ワサビノキ）、ゼラチン、ストリクノス・ポタトルム（*Strychnos potatorum*）種子（ニルマリナツの木）、グアーガムおよびアルギネート（例えば、ワカメ抽出物）からなる群から選択される薬剤を含む。ある実施形態では、凝集剤は、キトサン、アイシングラス、ワサビノキ（*Moringa oleifera*）種子（ワサビノキ）、ゼラチン、ストリクノス・ポタトルム（*Strychnos potatorum*）種子（ニルマリナツの木）、グアーガムおよびアルギネート（例えば、ワカメ抽出物）からなる群から選択される。

40

【0064】

凝集剤の濃度は、使用される薬剤、目的の多糖および凝集ステップのパラメータ（例えば、温度など）に依存し得る。

【0065】

凝集剤がミョウバンを含むか、またはミョウバンである実施形態では、約0.1~20

50

% (w/v) の凝集剤濃度を使用することができる。好ましくは、約 0.5 ~ 10% (w/v) の凝集剤濃度を使用する。さらにより好ましくは、約 1 ~ 5% (w/v) の凝集剤濃度を使用する。

【0066】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0067】

ある実施形態では、約 0.1、約 0.25、約 0.5、約 1.0、約 1.5、約 2.0、約 2.5、約 3.0、約 3.5、約 4.0、約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 6.0、約 6.5、約 7.0、約 7.5、約 8.0、約 8.5、約 9.0、約 9.5 または約 10% (w/v) の凝集剤濃度が使用される。ある実施形態では、約 10.5、約 11.0、約 11.5、約 12.0、約 12.5、約 13.0、約 13.5、約 14.0、約 14.5、約 15.0、約 15.5、約 16.0、約 16.5、約 17.0、約 17.5、約 18.0、約 18.5、約 19.0、約 19.5 または約 20.0% (w/v) の凝集剤濃度が使用される。ある実施形態では、約 0.5、約 1.0、約 1.5、約 2.0、約 2.5、約 3.0、約 3.5、約 4.0、約 4.5 または約 5.0% (w/v) の凝集剤濃度が使用される。ある実施形態では、約 1.0、約 1.5、約 2.0、約 2.5、約 3.0、約 3.5 または約 4.0% (w/v) の凝集剤濃度が使用される。

10

【0068】

本発明の一部の実施形態では、凝集剤は、ある特定の期間にわたって添加される。本発明の一部の実施形態では、凝集剤は、数秒（例えば、1 ~ 10 秒）~ 約 1 カ月の期間にわたって添加される。本発明の一部の実施形態では、凝集剤は、約 2 秒 ~ 約 2 週間の期間にわたって添加される。本発明の一部の実施形態では、凝集剤は、約 1 分 ~ 約 1 週間の期間にわたって添加される。一部の実施形態では、凝集剤は、約 1 分、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間または約 24 時間 ~ 約 2 日の期間にわたって添加される。

20

30

【0069】

したがって、ある特定の実施形態では、凝集剤は、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間または約 12 時間 ~ 約 1 日の期間にわたって添加される。

【0070】

好ましくは、凝集剤は、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間または約 12 時間 ~ 約 1 日の期間にわたって添加される。

40

【0071】

ある特定の実施形態では、凝集剤は、約 15 分 ~ 約 3 時間の期間にわたって添加される。ある特定の実施形態では、凝集剤は、約 30 分 ~ 約 120 分の期間にわたって添加される。

【0072】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

50

【 0 0 7 3 】

凝集剤を、約 2 秒、約 1 0 秒、約 3 0 秒、約 1 分、約 5 分、約 1 0 分、約 1 5 分、約 2 0 分、約 2 5 分、約 3 0 分、約 3 5 分、約 4 0 分、約 4 5 分、約 5 0 分、約 5 5 分、約 6 0 分、約 6 5 分、約 7 0 分、約 7 5 分、約 8 0 分、約 8 5 分、約 9 0 分、約 9 5 分、約 1 0 0 分、約 1 0 5 分、約 1 1 0 分、約 1 1 5 分、約 1 2 0 分、約 1 2 5 分、約 1 3 0 分、約 1 3 5 分、約 1 4 0 分、約 1 4 5 分、約 1 5 0 分、約 1 5 5 分、約 1 6 0 分、約 1 7 0 分、約 3 時間、約 3 . 5 時間、約 4 時間、約 4 . 5 時間、約 5 時間、約 5 . 5 時間、約 6 時間、約 6 . 5 時間、約 7 時間、約 7 . 5 時間、約 8 時間、約 8 . 5 時間、約 9 時間、約 1 0 時間、約 1 1 時間、約 1 2 時間、約 1 3 時間、約 1 4 時間、約 1 5 時間、約 1 6 時間、約 1 7 時間、約 1 8 時間、約 1 9 時間、約 2 0 時間、約 2 1 時間、約 2 2 時間、約 2 3 時間、約 2 4 時間、約 3 0 時間、約 3 6 時間、約 4 2 時間、約 4 8 時間、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 1 0 日、約 1 1 日、約 1 2 日、約 1 3 日、約 1 4 日または約 1 5 日の期間にわたって添加してもよい。

10

【 0 0 7 4 】

ある実施形態では、凝集剤は、攪拌せずに添加される。別の実施形態では、凝集剤は、攪拌下で添加される。別の実施形態では、凝集剤は、穏やかな攪拌下で添加される。別の実施形態では、凝集剤は、激しい攪拌下で添加される。

【 0 0 7 5 】

本発明者らはさらに驚くべきことに、凝集が酸性 pH で実施した場合に改善されることに気付いた。

20

【 0 0 7 6 】

したがって、本発明のある実施形態では、凝集ステップは、7 . 0、6 . 0、5 . 0 または 4 . 0 より下の pH で実施される。本発明の特定の実施形態では、凝集ステップは、7 . 0 ~ 1 . 0 の pH で実施される。ある実施形態では、凝集ステップは、5 . 5 ~ 2 . 5、5 . 0 ~ 2 . 5、4 . 5 ~ 2 . 5、4 . 0 ~ 2 . 5、5 . 5 ~ 3 . 0、5 . 0 ~ 3 . 0、4 . 5 ~ 3 . 0、4 . 0 ~ 3 . 0、5 . 5 ~ 3 . 5、5 . 0 ~ 3 . 5、4 . 5 ~ 3 . 5 または 4 . 0 ~ 3 . 5 の pH で実施される。ある実施形態では、凝集ステップは、約 5 . 5、約 5 . 0、約 4 . 5、約 4 . 0、約 3 . 5、約 3 . 0、約 2 . 5、約 2 . 0、約 1 . 5 または約 1 . 0 の pH で実施される。ある実施形態では、凝集ステップは、約 4 . 0、約 3 . 5、約 3 . 0 または約 2 . 5 の pH で実施される。ある実施形態では、凝集ステップは、約 3 . 5 の pH で実施される。

30

【 0 0 7 7 】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【 0 0 7 8 】

ある実施形態では、前記酸性 pH は、上記のセクション 1 . 1 の方法のいずれかによって得られたか、または酸を用いてセクション 1 . 2 に開示されたようにさらに清澄化された溶液を酸性化することによって得られる。ある実施形態では、前記酸は、HCl、H₃PO₄、クエン酸、酢酸、亜硝酸、および硫酸からなる群から選択される。ある実施形態では、前記酸は、アミノ酸である。ある実施形態では、前記酸は、グリシン、アラニンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸である。ある実施形態では、前記酸は、HCl (塩酸) である。ある実施形態では、前記酸は、硫酸である。

40

【 0 0 7 9 】

ある実施形態では、酸は、攪拌せずに添加される。好ましくは、酸は、攪拌下で添加される。ある実施形態では、酸は、穏やかな攪拌下で添加される。ある実施形態では、酸は、激しい攪拌下で添加される。

【 0 0 8 0 】

本発明の一部の実施形態では、凝集剤の添加 (および任意選択の酸性化) の後、溶液を、いくらかの時間にわたって保持して、下流のプロセッシングの前にフロックを沈降させる。

【 0 0 8 1 】

本発明の一部の実施形態では、凝集ステップは、数秒 (例えば、2 ~ 1 0 秒) ~ 約 1 分

50

の沈降時間を用いて実施される。好ましくは、沈降時間は、少なくとも約 2、少なくとも約 3、少なくとも約 4、少なくとも約 5、少なくとも約 10、少なくとも約 15、少なくとも約 20、少なくとも約 25、少なくとも約 30、少なくとも約 35、少なくとも約 40、少なくとも約 45、少なくとも約 50、少なくとも約 55、少なくとも約 60、少なくとも約 65、少なくとも約 70、少なくとも約 75、少なくとも約 80、少なくとも約 85、少なくとも約 90、少なくとも約 95、少なくとも約 100、少なくとも約 105、少なくとも約 110、少なくとも約 115、少なくとも約 120、少なくとも約 125、少なくとも約 130、少なくとも約 135、少なくとも約 140、少なくとも約 145、少なくとも約 150、少なくとも約 155 または少なくとも約 160 分である。好ましくは、沈降時間は、1 週間未満であるが、沈降時間は、より長くてもよい。

10

【0082】

したがって、ある特定の実施形態では、沈降時間は、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 120、約 140、約 160、約 180、約 220、約 240、約 300、約 360、約 420、約 480、約 540、約 600、約 660、約 720、約 780、約 840、約 900、約 960、約 1020、約 1080、約 1140、約 1200、約 1260、約 1320、約 1380、約 1440 分、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日または約 6 日～1 週間である。

【0083】

本発明の一部の実施形態では、沈降時間は、数秒（例えば、1～10 秒）～約 1 カ月である。一部の実施形態では、沈降時間は、約 2 秒～約 2 週間である。本発明の一部の実施形態では、沈降時間は、約 1 分～約 1 週間である。一部の実施形態では、沈降時間は、約 1 分、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間または約 24 時間～約 2 日である。

20

【0084】

したがって、ある特定の実施形態では、沈降時間は、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間または約 12 時間～約 1 日である。

30

【0085】

好ましくは、沈降時間は、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間または約 12 時間～約 1 日である。

40

【0086】

ある特定の実施形態では、沈降時間は、約 15 分～約 3 時間である。ある特定の実施形態では、沈降時間は、約 30 分～約 120 分である。

【0087】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0088】

ある特定の実施形態では、沈降時間は、約 2 秒、約 10 秒、約 30 秒、約 1 分、約 5 分

50

、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約75分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約105分、約110分、約115分、約120分、約125分、約130分、約135分、約140分、約145分、約150分、約155分、約160分、約170分、約3時間、約3.5時間、約4時間、約4.5時間、約5時間、約5.5時間、約6時間、約6.5時間、約7時間、約7.5時間、約8時間、約8.5時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約30時間、約36時間、約42時間、約48時間、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日、約11日、約12日、約13日、約14日または約15日である。

10

【0089】

好ましくは、沈降時間は、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約60、約90、約120、約180、約220、約240、約300、約360、約420、約480、約540、約600、約660、約720、約780、約840、約900、約960、約1020、約1080、約1140、約1200、約1260、約1320、約1380または約1440分～約2日である。ある特定の実施形態では、沈降時間は、約5分～約1日である。ある特定の実施形態では、沈降時間は、約5分～約120分である。

【0090】

沈降時間は、約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約75分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約105分、約110分、約115分、約120分、約125分、約130分、約135分、約140分、約145分、約150分、約155分または約160分であってもよい。

20

【0091】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0092】

ある実施形態では、任意選択の沈降ステップは、攪拌せずに行われる。ある実施形態では、任意選択の沈降ステップは、攪拌下で行われる。別の実施形態では、任意選択の沈降ステップは、穏やかな攪拌下で行われる。別の実施形態では、任意選択の沈降ステップは、激しい攪拌下で行われる。

30

【0093】

本発明のある実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および/またはpHの調整は、約4～約30の温度で実施される。ある実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および/またはpHの調整は、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29または約30の温度で実施される。ある実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および/またはpHの調整は、約20の温度で実施される。本発明者らは驚くべきことに、凝集が、高温で実施した場合にさらに改善され得ることに気付いた。したがって、本発明の特定の実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および/またはpHの調整は、約30～約95の温度で実施される。ある実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および/またはpHの調整は、約35～約80の温度、約40～約70の温度、約45～約65の温度、約50～約60の温度、約50～約55の温度、約45～約55の温度または約45～約55の温度で実施される。ある実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および/またはpHの調整は、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58

40

50

、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される。ある実施形態では、凝集剤の添加、溶液の沈降および / または pH の調整は、約 50 の温度で実施される。

【0094】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0095】

ある実施形態では、凝集剤の添加は、上記の温度のいずれかで実施される。

【0096】

ある実施形態では、凝集剤の添加後の溶液の沈降は、上記の温度のいずれかで実施される。

【0097】

ある実施形態では、pH の調整は、上記の温度のいずれかで実施される。

【0098】

ある実施形態では、凝集剤の添加および凝集剤の添加後の溶液の沈降は、上記温度のいずれかで実施される。

【0099】

ある実施形態では、凝集剤の添加および pH の調整は、上記の温度のいずれかで実施される。

【0100】

ある実施形態では、凝集剤の添加、凝集剤の添加後の溶液の沈降および pH の調整は、上記の温度のいずれかで実施される。

【0101】

ある実施形態では、凝集ステップは、pH を調整せずに凝集剤を添加すること（上記で開示されたように）を含む。

【0102】

ある実施形態では、凝集ステップは、pH を調整せずに、凝集剤を添加すること、および溶液を沈降させること（上記で開示されたように）を含む。

【0103】

ある実施形態では、凝集ステップは、凝集剤を添加すること、pH を調整すること、および溶液を沈降させること（上記で開示されたように）を含む。ある実施形態では、凝集剤は、pH を調整する前に添加される。別の実施形態では、pH は、凝集剤を添加する前に調整される。

【0104】

ある実施形態では、凝集ステップは、凝集剤を添加すること、溶液を沈降させること、および pH を調整すること（上記で開示されたように）を含む。ある実施形態では、凝集剤の添加および溶液の沈降は、pH を調整する前に行われる。別の実施形態では、pH は、凝集剤を添加し、溶液を沈降させる前に調整される。ある実施形態では、凝集剤の添加および pH の調整は、溶液を沈降させる前に行われる。別の実施形態では、pH は、凝集剤を添加し、溶液を沈降させる前に調整される。

【0105】

ある実施形態では、凝集ステップは、凝集剤を添加すること、pH を調整すること、および温度を調整すること（上記で開示されたように）を含む。

【0106】

これらのステップを、任意の順序で実施することができる：

- 凝集剤の添加、次いで、pH の調整、次いで、温度の調整または；
- 凝集剤の添加、次いで、温度の調整、次いで、pH の調整または；
- pH の調整、次いで、凝集剤の添加、次いで、温度の調整または；
- pH の調整、次いで、温度の調整、次いで、凝集剤の添加または；

10

20

30

40

50

- 温度の調整、次いで、凝集剤の添加、次いで、pHの調整または；
- 温度の調整、次いで、pHの調整、次いで、凝集剤の添加。

【0107】

さらに、凝集剤の添加および/またはpHの調整の後、溶液を、いくらかの時間にわたって保持して、下流のプロセッシングの前にフロックを沈降させることができる。

【0108】

1.3 固体/液体の分離

凝集した材料を、任意の好適な固体/液体分離法によって目的の多糖から分離することができる。

【0109】

したがって、本発明のある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション1.2で得られたもの）を、デカンテーション、沈降化、濾過または遠心分離によって清澄化する。ある実施形態では、次いで、多糖含有溶液を、保存および/またはさらなるプロセッシングのために収集する。

【0110】

本発明のある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション1.2で得られたもの）を、デカンテーションによって清澄化する。フロックを沈降させるために液体間に十分な密度差がある場合、液体を分離するためにデカンターが使用される。操作するデカンターにおいて、3つの異なるゾーンが存在するであろう：透明な重い液体、分離している分散した液体（分散ゾーン）、および透明な軽い液体。清浄な溶液を産生するために、一般的には、少量の溶液を容器中に残す必要がある。デカンターを、連続的操作のために設計することができる。

【0111】

本発明のある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション1.2で得られたもの）を、沈降化によって清澄化する（沈降）。沈降化は、重力沈降による液体混合物から透明な流体およびより高い固体含量のスラリーへの懸濁された固体粒子の分離である。沈降化を、増粘剤、清澄化剤または分級器中で行うことができる。増粘および清澄化は、大量の液体の処理のために使用される場合、比較的安価なプロセスであるため、それらを、濾過に対する供給原料の予備濃縮のために使用することができる。

【0112】

本発明のある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション1.2で得られたもの）を、遠心分離によって清澄化する。ある実施形態では、前記遠心分離は、連続遠心分離である。ある実施形態では、前記遠心分離は、バケット遠心分離である。ある実施形態では、次いで、多糖含有上清を、保存および/またはさらなるプロセッシングのために収集する。

【0113】

一部の実施形態では、懸濁液を、約1,000g、約2,000g、約3,000g、約4,000g、約5,000g、約6,000g、約8,000g、約9,000g、約10,000g、約11,000g、約12,000g、約13,000g、約14,000g、約15,000g、約16,000g、約17,000g、約18,000g、約19,000g、約20,000g、約25,000g、約30,000g、約35,000g、約40,000g、約50,000g、約60,000g、約70,000g、約80,000g、約90,000g、約100,000g、約120,000g、約140,000g、約160,000gまたは約180,000gで遠心分離する。一部の実施形態では、懸濁液を、約8,000g、約9,000g、約10,000g、約11,000g、約12,000g、約13,000g、約14,000g、約15,000g、約16,000g、約17,000g、約18,000g、約19,000g、約20,000gまたは約25,000gで遠心分離する。

【0114】

一部の実施形態では、懸濁液を、約5,000g～約25,000gで遠心分離する。

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、懸濁液を、約 8,000 g ~ 約 20,000 g で遠心分離する。一部の実施形態では、懸濁液を、約 10,000 g ~ 約 15,000 g で遠心分離する。一部の実施形態では、懸濁液を、約 10,000 g ~ 約 12,000 g で遠心分離する。

【0115】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0116】

一部の実施形態では、懸濁液を、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 55、少なくとも 60、少なくとも 65、少なくとも 70、少なくとも 75、少なくとも 80、少なくとも 85、少なくとも 90、少なくとも 95、少なくとも 100、少なくとも 105、少なくとも 110、少なくとも 115、少なくとも 120、少なくとも 125、少なくとも 130、少なくとも 135、少なくとも 140、少なくとも 145、少なくとも 150、少なくとも 155 または少なくとも約 160 分、遠心分離する。好ましくは、遠心分離時間は、24 時間未満である。

10

【0117】

したがって、ある特定の実施形態では、懸濁液を、約 5、約 10、約 15、約 20、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 120、約 140、約 160、約 180、約 220、約 240、約 300、約 360、約 420、約 480、約 540、約 600、約 660、約 720、約 780、約 840、約 900、約 960、約 1020、約 1080、約 1140、約 1200、約 1260、約 1320 または約 1380 分 ~ 1440 分、遠心分離する。

20

【0118】

好ましくは、懸濁液を、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 60、約 90、約 120、約 180、約 240、約 300、約 360、約 420、約 480、または約 540 分 ~ 約 600 分、遠心分離する。ある特定の実施形態では、懸濁液を、約 5 分 ~ 約 3 時間、遠心分離する。ある特定の実施形態では、懸濁液を、約 5 分 ~ 約 120 分、遠心分離する。

【0119】

懸濁液を、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 75 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 105 分、約 110 分、約 115 分、約 120 分、約 125 分、約 130 分、約 135 分、約 140 分、約 145 分、約 150 分または約 155 分 ~ 約 160 分、遠心分離してもよい。

30

【0120】

懸濁液を、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分または約 55 分 ~ 約 60 分、遠心分離してもよい。

【0121】

懸濁液を、約 5、約 10、約 15、約 20、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 120、約 140、約 160、約 180、約 220、約 240、約 300、約 360、約 420、約 480、約 540、約 600、約 660、約 720、約 780、約 840、約 900、約 960、約 1020、約 1080、約 1140、約 1200、約 1260、約 1320、約 1380 分または約 1440 分、遠心分離してもよい。

40

【0122】

懸濁液を、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 75 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 105 分、約 110 分、約 115 分、約 120 分、約 125 分、約 130 分、約 135 分、約 140 分、約 145 分、約 150 分、約 155 分または約 160 分、遠心分離してもよい。

50

【 0 1 2 3 】

懸濁液を、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分または約 60 分、遠心分離してもよい。

【 0 1 2 4 】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【 0 1 2 5 】

本発明のある実施形態では、遠心分離は、連続遠心分離である。前記実施形態では、供給速度は、50 ~ 5000 ml / 分、100 - 4000 ml / 分、150 - 3000 ml / 分、200 - 2500 ml / 分、250 - 2000 ml / 分、300 - 1500 ml / 分、300 - 1000 ml / 分、200 - 1000 ml / 分、200 - 1500 ml / 分、400 - 1500 ml / 分、500 - 1500 ml / 分、500 - 1000 ml / 分、500 - 2000 ml / 分、500 - 2500 ml / 分または 1000 ~ 2500 ml / 分であってもよい。

10

【 0 1 2 6 】

ある実施形態では、供給速度は、約 10、約 25、約 50、約 75、約 100、約 150、約 200、約 250、約 300、約 350、約 400、約 450、約 500、約 550、約 600、約 650、約 700、約 750、約 800、約 850、約 900、約 950、約 1000、約 1050、約 1100、約 1150、約 1200、約 1250、約 1300、約 1350、約 1400、約 1450、約 1500、約 1650、約 1700、約 1800、約 1900、約 2000、約 2100、約 2200、約 2300、約 2400、約 2500、約 2600、約 2700、約 2800、約 2900、約 3000、約 3250、約 3500、約 3750、約 4000、約 4250、約 4500 または約 5000 ml / 分であってもよい。

20

【 0 1 2 7 】

本発明のある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション 1 . 2 で得られたもの）を、濾過によって清澄化する。濾過においては、粒子を保持し、透明な濾液を通過させる多孔性媒体に混合物を通過させることによって、液体中の懸濁された固体粒子を除去する。濾過は、重力によりスクリーン上または真空、圧力もしくは遠心分離によりフィルター上で実施される。固体を、脱水濾過である、フィルター媒体の表面上に保持するか、または深層濾過である、フィルター媒体内に捕捉することができる。ある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション 1 . 2 で得られたもの）を、精密濾過によって清澄化する。ある実施形態では、精密濾過は、接線流精密濾過である。別の実施形態では、精密濾過は、デッドエンド濾過（垂直濾過）である。ある実施形態では、精密濾過は、DE ダイアトマイトとしても知られる、珪藻土（DE）をフィルター補助剤として使用して、固体 / 液体分離を容易にし、その効率を増強するデッドエンド濾過である。したがって、ある実施形態では、凝集後、懸濁液（上記のセクション 1 . 2 で得られたもの）を、珪藻土（DE）を含むデッドエンド精密濾過によって清澄化する。DE を、深層フィルターの不可欠な部分としてデッドエンドフィルター中に含浸させる（または含有させる）ことができる。

30

【 0 1 2 8 】

別の形式では、DE を、凝集溶液（セクション 1 . 2 の後に得られたもの）に粉末形態で添加することができる。後者の場合、DE で処理された凝集溶液を、深層濾過によってさらに清澄化することができる。

40

【 0 1 2 9 】

ある実施形態では、フィルターが約 0 . 01 ~ 2 ミクロン、約 0 . 05 ~ 2 ミクロン、約 0 . 1 ~ 2 ミクロン、約 0 . 2 ~ 2 ミクロン、約 0 . 3 ~ 2 ミクロン、約 0 . 4 ~ 2 ミクロン、約 0 . 45 ~ 2 ミクロン、約 0 . 5 ~ 2 ミクロン、約 0 . 6 ~ 2 ミクロン、約 0 . 7 ~ 2 ミクロン、約 0 . 8 ~ 2 ミクロン、約 0 . 9 ~ 2 ミクロン、約 1 ~ 2 ミクロン、約 1 . 25 ~ 2 ミクロン、約 1 . 5 ~ 2 ミクロン、または約 1 . 75 ~ 2 ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

50

【0130】

ある実施形態では、フィルターが約0.01~1ミクロン、約0.05~1ミクロン、約0.1~1ミクロン、約0.2~1ミクロン、約0.3~1ミクロン、約0.4~1ミクロン、約0.45~1ミクロン、約0.5~1ミクロン、約0.6~1ミクロン、約0.7~1ミクロン、約0.8~1ミクロンまたは約0.9~1ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0131】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0132】

ある実施形態では、フィルターが約0.01、約0.05、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.45、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約1.6、約1.7、約1.8、約1.9または約2ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0133】

ある実施形態では、フィルターが約0.45ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0134】

ある実施形態では、フィルターが、100~5000 L/m²、200~5000 L/m²、300~5000 L/m²、400~5000 L/m²、500~5000 L/m²、750~5000 L/m²、1000~5000 L/m²、1500~5000 L/m²、2000~5000 L/m²、3000~5000 L/m²または4000~5000 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【0135】

ある実施形態では、フィルターが、100~2500 L/m²、200~2500 L/m²、300~2500 L/m²、400~2500 L/m²、500~2500 L/m²、750~2500 L/m²、1000~2500 L/m²、1500~2500 L/m²、または2000~2500 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0136】

ある実施形態では、フィルターが、100~1500 L/m²、200~1500 L/m²、300~1500 L/m²、400~1500 L/m²、500~1500 L/m²、750~1500 L/m²または1000~1500 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0137】

ある実施形態では、フィルターが、100~1250 L/m²、200~1250 L/m²、300~1250 L/m²、400~1250 L/m²、500~1250 L/m²、750~1250 L/m²または1000~1250 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0138】

ある実施形態では、フィルターが、100~1000 L/m²、200~1000 L/m²、300~1000 L/m²、400~1000 L/m²、500~1000 L/m²または750~1000 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0139】

ある実施形態では、フィルターが、100~750 L/m²、200~750 L/m²、300~750 L/m²、400~750 L/m²または500~750 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0140】

ある実施形態では、フィルターが、100~600 L/m²、200~600 L/m²

50

、300～600 L/m²、400～600 L/m²または400～600 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0141】

ある実施形態では、フィルターが、100～500 L/m²、200～500 L/m²、300～500 L/m²または400～500 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0142】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0143】

ある実施形態では、フィルターが、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950、約1000、約1050、約1100、約1150、約1200、約1250、約1300、約1350、約1400、約1450、約1500、約1550、約1600、約1650、約1700、約1750、約1800、約1850、約1900、約1950、約2000、約2050、約2100、約2150、約2200、約2250、約2300、約2350、約2400、約2450または約2500 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0144】

上記の固体/液体分離法を、独立形式で、または任意の順序で2つの組合せで、または任意の順序で3つの組合せで使用することができる。

20

【0145】

1.4 濾過（例えば、深層濾過）

一度、上記のセクション1.2の凝集ステップおよび/または上記のセクション1.3の固体/液体分離ステップによって溶液を処理したら、多糖含有溶液（例えば、上清）を、必要に応じてさらに清澄化することができる。

【0146】

ある実施形態では、溶液を濾過し、それによって、さらに清澄化された溶液を産生する。ある実施形態では、濾過を、上記のセクション1.2の方法のいずれかによって得られた溶液に直接適用する。ある実施形態では、濾過を、上記のセクション1.3に記載の固体/液体分離ステップによってさらに清澄化された溶液に適用する。

30

【0147】

ある実施形態では、深層濾過、活性炭を通す濾過、サイズ濾過、透析濾過および限外濾過からなる群から選択される濾過ステップによって、溶液を処理する。ある実施形態では、透析濾過ステップ、特に、接線流濾過によって、溶液を処理する。ある実施形態では、深層濾過ステップによって溶液を処理する。

【0148】

深層フィルターは、多孔性濾過媒体を使用して、媒体の表面上だけというよりもむしろ、媒体全体にわたって粒子を保持する。濾過媒体の複雑かつチャネル様の性質のため、粒子は、表面上とは反対に、その構造内で媒体全体にわたって保持される。

40

【0149】

ある実施形態では、深層フィルター設計が、カセット、カートリッジ、ディープベッド（例えば、サンドフィルター）およびレンズ状フィルターからなる群から選択される深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0150】

ある実施形態では、深層フィルターが、約0.01～100ミクロン、約0.05～100ミクロン、約0.1～100ミクロン、約0.2～100ミクロン、約0.3～100ミクロン、約0.4～100ミクロン、約0.5～100ミクロン、約0.6～100ミクロン、約0.7～100ミクロン、約0.8～100ミクロン、約0.9～100ミクロン、約1～100ミクロン、約1.25～100ミクロン、約1.5～100ミクロン

50

ン、約1.75～100ミクロン、約2～100ミクロン、約3～100ミクロン、約4～100ミクロン、約5～100ミクロン、約6～100ミクロン、約7～100ミクロン、約8～100ミクロン、約9～100ミクロン、約10～100ミクロン、約15～100ミクロン、約20～100ミクロン、約25～100ミクロン、約30～100ミクロン、約40～100ミクロン、約50～100ミクロンまたは約75～100ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0151】

ある実施形態では、深層フィルターが、約0.01～75ミクロン、約0.05～75ミクロン、約0.1～75ミクロン、約0.2～75ミクロン、約0.3～75ミクロン、約0.4～75ミクロン、約0.5～75ミクロン、約0.6～75ミクロン、約0.7～75ミクロン、約0.8～75ミクロン、約0.9～75ミクロン、約1～75ミクロン、約1.25～75ミクロン、約1.5～75ミクロン、約1.75～75ミクロン、約2～75ミクロン、約3～75ミクロン、約4～75ミクロン、約5～75ミクロン、約6～75ミクロン、約7～75ミクロン、約8～75ミクロン、約9～75ミクロン、約10～75ミクロン、約15～75ミクロン、約20～75ミクロン、約25～75ミクロン、約30～75ミクロン、約40～75ミクロンまたは約50～75ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0152】

ある実施形態では、深層フィルターが、約0.01～50ミクロン、約0.05～50ミクロン、約0.1～50ミクロン、約0.2～50ミクロン、約0.3～50ミクロン、約0.4～50ミクロン、約0.5～50ミクロン、約0.6～50ミクロン、約0.7～50ミクロン、約0.8～50ミクロン、約0.9～50ミクロン、約1～50ミクロン、約1.25～50ミクロン、約1.5～50ミクロン、約1.75～50ミクロン、約2～50ミクロン、約3～50ミクロン、約4～50ミクロン、約5～50ミクロン、約6～50ミクロン、約7～50ミクロン、約8～50ミクロン、約9～50ミクロン、約10～50ミクロン、約15～50ミクロン、約20～50ミクロン、約25～50ミクロン、約30～50ミクロン、約40～50ミクロンまたは約50～50ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【0153】

ある実施形態では、深層フィルターが、約0.01～25ミクロン、約0.05～25ミクロン、約0.1～25ミクロン、約0.2～25ミクロン、約0.3～25ミクロン、約0.4～25ミクロン、約0.5～25ミクロン、約0.6～25ミクロン、約0.7～25ミクロン、約0.8～25ミクロン、約0.9～25ミクロン、約1～25ミクロン、約1.25～25ミクロン、約1.5～25ミクロン、約1.75～25ミクロン、約2～25ミクロン、約3～25ミクロン、約4～25ミクロン、約5～25ミクロン、約6～25ミクロン、約7～25ミクロン、約8～25ミクロン、約9～25ミクロン、約10～25ミクロン、約15～25ミクロンまたは約20～25ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0154】

ある実施形態では、深層フィルターが、約0.01～10ミクロン、約0.05～10ミクロン、約0.1～10ミクロン、約0.2～10ミクロン、約0.3～10ミクロン、約0.4～10ミクロン、約0.5～10ミクロン、約0.6～10ミクロン、約0.7～10ミクロン、約0.8～10ミクロン、約0.9～10ミクロン、約1～10ミクロン、約1.25～10ミクロン、約1.5～10ミクロン、約1.75～10ミクロン、約2～10ミクロン、約3～10ミクロン、約4～10ミクロン、約5～10ミクロン、約6～10ミクロン、約7～10ミクロン、約8～10ミクロンまたは約9～10ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0155】

ある実施形態では、深層フィルターが、約0.01～8ミクロン、約0.05～8ミクロン、約0.1～8ミクロン、約0.2～8ミクロン、約0.3～8ミクロン、約0.4

50

～ 8 ミクロン、約 0.5 ～ 8 ミクロン、約 0.6 ～ 8 ミクロン、約 0.7 ～ 8 ミクロン、約 0.8 ～ 8 ミクロン、約 0.9 ～ 8 ミクロン、約 1 ～ 8 ミクロン、約 1.25 ～ 8 ミクロン、約 1.5 ～ 8 ミクロン、約 1.75 ～ 8 ミクロン、約 2 ～ 8 ミクロン、約 3 ～ 8 ミクロン、約 4 ～ 8 ミクロン、約 5 ～ 8 ミクロン、約 6 ～ 8 ミクロンまたは約 7 ～ 8 ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【 0 1 5 6 】

ある実施形態では、深層フィルターが、約 0.01 ～ 5 ミクロン、約 0.05 ～ 5 ミクロン、約 0.1 ～ 5 ミクロン、約 0.2 ～ 5 ミクロン、約 0.3 ～ 5 ミクロン、約 0.4 ～ 5 ミクロン、約 0.5 ～ 5 ミクロン、約 0.6 ～ 5 ミクロン、約 0.7 ～ 5 ミクロン、約 0.8 ～ 5 ミクロン、約 0.9 ～ 5 ミクロン、約 1 ～ 5 ミクロン、約 1.25 ～ 5 ミクロン、約 1.5 ～ 5 ミクロン、約 1.75 ～ 5 ミクロン、約 2 ～ 5 ミクロン、約 3 ～ 5 ミクロンまたは約 4 ～ 5 ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【 0 1 5 7 】

ある実施形態では、深層フィルターが、約 0.01 ～ 2 ミクロン、約 0.05 ～ 2 ミクロン、約 0.1 ～ 2 ミクロン、約 0.2 ～ 2 ミクロン、約 0.3 ～ 2 ミクロン、約 0.4 ～ 2 ミクロン、約 0.5 ～ 2 ミクロン、約 0.6 ～ 2 ミクロン、約 0.7 ～ 2 ミクロン、約 0.8 ～ 2 ミクロン、約 0.9 ～ 2 ミクロン、約 1 ～ 2 ミクロン、約 1.25 ～ 2 ミクロン、約 1.5 ～ 2 ミクロン、約 1.75 ～ 2 ミクロン、約 2 ～ 2 ミクロン、約 3 ～ 2 ミクロンまたは約 4 ～ 2 ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【 0 1 5 8 】

ある実施形態では、深層フィルターが、約 0.01 ～ 1 ミクロン、約 0.05 ～ 1 ミクロン、約 0.1 ～ 1 ミクロン、約 0.2 ～ 1 ミクロン、約 0.3 ～ 1 ミクロン、約 0.4 ～ 1 ミクロン、約 0.5 ～ 1 ミクロン、約 0.6 ～ 1 ミクロン、約 0.7 ～ 1 ミクロン、約 0.8 ～ 1 ミクロンまたは約 0.9 ～ 1 ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【 0 1 5 9 】

ある実施形態では、深層フィルターが、約 0.05 ～ 50 ミクロン、0.1 ～ 25 ミクロン、0.2 ～ 10 ミクロン、0.1 ～ 10 ミクロン、0.2 ～ 5 ミクロンまたは 0.25 ～ 1 ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【 0 1 6 0 】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【 0 1 6 1 】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ～ 2500 L/m²、5 ～ 2500 L/m²、10 ～ 2500 L/m²、25 ～ 2500 L/m²、50 ～ 2500 L/m²、75 ～ 2500 L/m²、100 ～ 2500 L/m²、150 ～ 2500 L/m²、200 ～ 2500 L/m²、300 ～ 2500 L/m²、400 ～ 2500 L/m²、500 ～ 2500 L/m²、750 ～ 2500 L/m²、1000 ～ 2500 L/m²、1500 ～ 2500 L/m²または2000 ～ 2500 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【 0 1 6 2 】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ～ 1000 L/m²、5 ～ 1000 L/m²、10 ～ 1000 L/m²、25 ～ 1000 L/m²、50 ～ 1000 L/m²、75 ～ 1000 L/m²、100 ～ 1000 L/m²、150 ～ 1000 L/m²、200 ～ 1000 L/m²、300 ～ 1000 L/m²、400 ～ 1000 L/m²、500 ～ 1000 L/m²または750 ～ 1000 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【 0 1 6 3 】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ～ 750 L/m²、5 ～ 750 L/m²、1

50

0 ~ 750 L/m²、25 ~ 750 L/m²、50 ~ 750 L/m²、75 ~ 750 L/m²、100 ~ 750 L/m²、150 ~ 750 L/m²、200 ~ 750 L/m²、300 ~ 750 L/m²、400 ~ 750 L/m²または500 ~ 750 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0164】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ~ 500 L/m²、5 ~ 500 L/m²、10 ~ 500 L/m²、25 ~ 500 L/m²、50 ~ 500 L/m²、75 ~ 500 L/m²、100 ~ 500 L/m²、150 ~ 500 L/m²、200 ~ 500 L/m²、300 ~ 500 L/m²または400 ~ 500 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0165】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ~ 400 L/m²、5 ~ 400 L/m²、10 ~ 400 L/m²、25 ~ 400 L/m²、50 ~ 400 L/m²、75 ~ 400 L/m²、100 ~ 400 L/m²、150 ~ 400 L/m²、200 ~ 400 L/m²または300 ~ 400 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0166】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ~ 300 L/m²、5 ~ 300 L/m²、10 ~ 300 L/m²、25 ~ 300 L/m²、50 ~ 300 L/m²、75 ~ 300 L/m²、100 ~ 300 L/m²、150 ~ 300 L/m²または200 ~ 300 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【0167】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ~ 200 L/m²、5 ~ 200 L/m²、10 ~ 200 L/m²、25 ~ 200 L/m²、50 ~ 200 L/m²、75 ~ 200 L/m²、100 ~ 200 L/m²または150 ~ 200 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0168】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ~ 100 L/m²、5 ~ 100 L/m²、10 ~ 100 L/m²、25 ~ 100 L/m²、50 ~ 100 L/m²または75 ~ 100 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0169】

ある実施形態では、深層フィルターが、1 ~ 50 L/m²、5 ~ 50 L/m²、10 ~ 50 L/m²または25 ~ 50 L/m²のフィルター能力を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0170】

上記の範囲のいずれかの中の任意の全数が、本開示の実施形態として企図される。

【0171】

ある実施形態では、供給速度が1 ~ 1000 LMH (リットル/m²/時間)、10 ~ 1000 LMH、25 ~ 1000 LMH、50 ~ 1000 LMH、100 ~ 1000 LMH、125 ~ 1000 LMH、150 ~ 1000 LMH、200 ~ 1000 LMH、250 ~ 1000 LMH、300 ~ 1000 LMH、400 ~ 1000 LMH、500 ~ 1000 LMH、600 ~ 1000 LMH、700 ~ 1000 LMH、800 ~ 1000 LMHまたは900 ~ 1000 LMHである深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0172】

ある実施形態では、供給速度が1 ~ 500 LMH、10 ~ 500 LMH、25 ~ 500 LMH、50 ~ 500 LMH、100 ~ 500 LMH、125 ~ 500 LMH、150 ~ 500 LMH、200 ~ 500 LMH、250 ~ 500 LMH、300 ~ 500 LMHまたは400 ~ 500 LMHである深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0173】

ある実施形態では、供給速度が1 ~ 400 LMH、10 ~ 400 LMH、25 ~ 400

50

LMH、50～400LMH、100～400LMH、125～400LMH、150～400LMH、200～400LMH、250～400LMHまたは300～400LMHである深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0174】

ある実施形態では、供給速度が1～250LMH、10～250LMH、25～250LMH、50～250LMH、100～250LMH、125～250LMH、150～250LMHまたは200～250LMHである深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0175】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

10

【0176】

ある実施形態では、供給速度が約1、約2、約5、約10、約25、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約310、約320、約330、約340、約350、約360、約370、約380、約390、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950または約1000LMHである深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0177】

1.5 任意選択のさらなる濾過

一度、上記のセクション1.4の濾過ステップによって溶液を処理したら、得られた溶液(すなわち、濾液)を、必要に応じてさらに清澄化することができる。

20

【0178】

ある実施形態では、溶液を、精密濾過にかける。ある実施形態では、精密濾過は、デッドエンド濾過(垂直濾過)である。ある実施形態では、精密濾過は、接線流精密濾過である。

【0179】

ある実施形態では、フィルターが約0.01～2ミクロン、約0.05～2ミクロン、約0.1～2ミクロン、約0.2～2ミクロン、約0.3～2ミクロン、約0.4～2ミクロン、約0.45～2ミクロン、約0.5～2ミクロン、約0.6～2ミクロン、約0.7～2ミクロン、約0.8～2ミクロン、約0.9～2ミクロン、約1～2ミクロン、約1.25～2ミクロン、約1.5～2ミクロン、または約1.75～2ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0180】

ある実施形態では、フィルターが約0.01～1ミクロン、約0.05～1ミクロン、約0.1～1ミクロン、約0.2～1ミクロン、約0.3～1ミクロン、約0.4～1ミクロン、約0.45～1ミクロン、約0.5～1ミクロン、約0.6～1ミクロン、約0.7～1ミクロン、約0.8～1ミクロンまたは約0.9～1ミクロンの名目保持範囲を有する深層濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0181】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0182】

ある実施形態では、フィルターが約0.01、約0.05、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.45、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約1.6、約1.7、約1.8、約1.9または約2ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0183】

ある実施形態では、フィルターが約0.45ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過

50

ステップによって、溶液を処理する。

【0184】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $750 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $1000 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $1500 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $2000 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ 、 $3000 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ または $4000 \sim 5000 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0185】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $750 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $1000 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $1500 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、または $2000 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0186】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ 、 $750 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ または $1000 \sim 1500 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0187】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ 、 $750 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ または $1000 \sim 1250 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【0188】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ または $750 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0189】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 750 \text{ L/m}^2$ または $500 \sim 750 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0190】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 600 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 600 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 600 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 600 \text{ L/m}^2$ または $400 \sim 600 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0191】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 500 \text{ L/m}^2$ または $400 \sim 500 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0192】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0193】

ある実施形態では、フィルターが、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950、約1000、約1050、約1100、約1150、約1200、約1250、約1300、約1350、約1400、約1450、約1500、約1550、約1600、約1650、約1700、約1750、約1800、約1850、約1900、約1950、約2000、約2050、約2100、約2150、約2200、約2250、約2300、約2350、約2400

50

、約2450または約2500 L / m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0194】

1.6 限外濾過および/または透析濾過

一度、上記のセクション1.4に記載の方法のいずれかによって、および/または上記のセクション1.5に記載の濾過ステップによって溶液を濾過したら、得られた溶液(すなわち、濾液)を、必要に応じて、限外濾過および/または透析濾過によってさらに清澄化してもよい。

【0195】

限外濾過(UF)は、薄い生成物流を濃縮するためのプロセスである。UFは、膜の孔径または分子量カットオフ(MWCO)に基づいて溶液中の分子を分離する。

10

【0196】

本発明のある実施形態では、溶液(例えば、上記のセクション1.5または1.6で得られた濾液)を、限外濾過によって処理する。

【0197】

ある実施形態では、限外濾過によって溶液を処理し、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 1000 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 750 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 500 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 300 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 100 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 50 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 30 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 1000 kDa、約10 kDa ~ 1000 kDa、約20 kDa ~ 1000 kDa、約30 kDa ~ 1000 kDa、約40 kDa ~ 1000 kDa、約50 kDa ~ 1000 kDa、約75 kDa ~ 1000 kDa、約100 kDa ~ 1000 kDa、約150 kDa ~ 1000 kDa、約200 kDa ~ 1000 kDa、約300 kDa ~ 1000 kDa、約400 kDa ~ 1000 kDa、約500 kDa ~ 1000 kDaまたは約750 kDa ~ 1000 kDaの範囲にある。

20

【0198】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 500 kDa、約10 kDa ~ 500 kDa、約20 kDa ~ 500 kDa、約30 kDa ~ 500 kDa、約40 kDa ~ 500 kDa、約50 kDa ~ 500 kDa、約75 kDa ~ 500 kDa、約100 kDa ~ 500 kDa、約150 kDa ~ 500 kDa、約200 kDa ~ 500 kDa、約300 kDa ~ 500 kDaまたは約400 kDa ~ 500 kDaの範囲にある。

30

【0199】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 300 kDa、約10 kDa ~ 300 kDa、約20 kDa ~ 300 kDa、約30 kDa ~ 300 kDa、約40 kDa ~ 300 kDa、約50 kDa ~ 300 kDa、約75 kDa ~ 300 kDa、約100 kDa ~ 300 kDa、約150 kDa ~ 300 kDaまたは約200 kDa ~ 300 kDaの範囲にある。

40

【0200】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 100 kDa、約10 kDa ~ 100 kDa、約20 kDa ~ 100 kDa、約30 kDa ~ 100 kDa、約40 kDa ~ 100 kDa、約50 kDa ~ 100 kDaまたは約75 kDa ~ 100 kDaの範囲にある。

【0201】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa、約10 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa、約50 kDa、約60 kDa、約70 kDa、約80

50

kDa、約90kDa、約100kDa、約110kDa、約120kDa、約130kDa、約140kDa、約150kDa、約200kDa、約250kDa、約300kDa、約400kDa、約500kDa、約750kDaまたは約1000kDaである。

【0202】

ある実施形態では、限外濾過ステップの濃縮係数は、約1.5～10である。ある実施形態では、濃縮係数は、約2～8である。ある実施形態では、濃縮係数は、約2～5である。

【0203】

ある実施形態では、濃縮係数は、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5または約10.0である。ある実施形態では、濃縮係数は、約2、約3、約4、約5または約6である。

10

【0204】

本発明のある実施形態では、溶液（例えば、上記のセクション1.4または1.5で得られた濾液）を、透析濾過によって処理する。

【0205】

本発明のある実施形態では、本セクションの上記に開示された限外濾過（UF）後に得られた溶液を、透析濾過によってさらに処理する（UF/DF処理）。

【0206】

透析濾過（DF）は、生成物を、所望の緩衝溶液（または水のみ）中で交換するために使用される。ある実施形態では、透析濾過は、一定の容量下で保持された溶液の化学的特性を変化させるために使用される。望ましくない粒子は膜を通過するが、供給原料流の組成は、置換液（緩衝溶液、塩水溶液、緩衝塩水溶液または水）の添加によって、より望ましい状態に変化する。

20

【0207】

ある実施形態では、置換液は、水である。

【0208】

ある実施形態では、置換液は、塩水である。一部の実施形態では、塩は、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される。1つの特定の実施形態では、塩は、塩化ナトリウムである。一実施形態では、置換液は、約1mM、約5mM、約10mM、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約80mM、約90mM、約100mM、約110mM、約120mM、約130mM、約140mM、約150mM、約160mM、約170mM、約180mM、約190mM、約200mM、約250mM、約300mM、約350mM、約400mM、約450mMまたは約500mMの塩化ナトリウムである。1つの特定の実施形態では、置換液は、約1mM、約5mM、約10mM、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約80mM、約90mM、約100mM、約110mM、約120mM、約130mM、約140mM、約150mM、約160mM、約170mM、約180mM、約190mM、約200mM、約250mMまたは約300mMの塩化ナトリウムである。

30

40

【0209】

ある実施形態では、置換液は、緩衝溶液である。ある実施形態では、置換液は、緩衝剤が、N-(2-アセトアミド)-アミノエタンスルホン酸(ACES)、酢酸の塩(酢酸塩)、N-(2-アセトアミド)-イミノ二酢酸(ADA)、2-アミノエタンスルホン酸(AES、タウリン)、アンモニア、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(AMPD、アメジオール)、N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(AMP SO)、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミ

50

ノエタンスルホン酸 (BES)、炭酸水素ナトリウム (重炭酸塩)、N, N' - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - グリシン (ピシン)、[ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - イミノ] - トリス - (ヒドロキシメチルメタン) (ビス - トリス)、1, 3 - ビス [トリス (ヒドロキシメチル) - メチルアミノ] プロパン (ビス - トリス - プロパン)、ホウ酸、ジメチルアルシン酸 (カコジル酸塩)、3 - (シクロヘキシルアミノ) - プロパンスルホン酸 (CAPS)、3 - (シクロヘキシルアミノ) - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸 (CAPSO)、炭酸ナトリウム (炭酸塩)、シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸 (CHES)、クエン酸の塩 (クエン酸塩)、3 - [N - ビス (ヒドロキシエチル) アミノ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (DIPSO)、ギ酸の塩 (ギ酸塩)、グリシン、グリシルグリシン、N - (2 - ヒドロキシエチル) - ピペラジン - N' - エタンスルホン酸 (HEPES)、N - (2 - ヒドロキシエチル) - ピペラジン - N' - 3 - プロパンスルホン酸 (HEPPS, EPPS)、N - (2 - ヒドロキシエチル) - ピペラジン - N' - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (HEPPSO)、イミダゾール、リンゴ酸の塩 (リンゴ酸塩)、マレイン酸の塩 (マレイン酸塩)、2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸 (MES)、3 - (N - モルホリノ) - プロパンスルホン酸 (MOPS)、3 - (N - モルホリノ) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (MOPSO)、リン酸の塩 (リン酸塩)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (PIPES)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸) (POPISO)、ピリジン、コハク酸の塩 (コハク酸塩)、3 - { [トリス (ヒドロキシメチル) - メチル] - アミノ } - プロパンスルホン酸 (TAPS)、3 - [N - トリス (ヒドロキシメチル) - メチルアミノ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (TAPSO)、トリエタノールアミン (TEA)、2 - [トリス (ヒドロキシメチル) - メチルアミノ] - エタンスルホン酸 (TES)、N - [トリス (ヒドロキシメチル) - メチル] - グリシン (トリシン) およびトリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン (トリス) からなる群から選択される、緩衝溶液である。

10

20

【0210】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、酢酸の塩 (酢酸塩)、クエン酸の塩 (クエン酸塩)、ギ酸の塩 (ギ酸塩)、リンゴ酸の塩 (リンゴ酸塩)、マレイン酸の塩 (マレイン酸塩)、リン酸の塩 (リン酸塩) およびコハク酸の塩 (コハク酸塩) からなる群から選択される。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、クエン酸の塩 (クエン酸塩) である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、コハク酸の塩 (コハク酸塩) である。ある実施形態では、前記塩は、ナトリウム塩である。ある実施形態では、前記塩は、カリウム塩である。

30

【0211】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の pH は、約 4.0 ~ 11.0、約 5.0 ~ 10.0、約 5.5 ~ 9.0、約 6.0 ~ 8.0、約 6.0 ~ 7.0、約 6.5 ~ 7.5、約 6.5 ~ 7.0 または約 6.0 ~ 7.5 である。上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0212】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の pH は、約 4.0、約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 6.0、約 6.5、約 7.0、約 7.5、約 8.0、約 8.5、約 9.0、約 9.5、約 10.0、約 10.5 または約 11.0 である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の pH は、約 6.0、約 6.5、約 7.0、約 7.5、約 8.0、約 8.5 または約 9.0 である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の pH は、約 6.5、約 7.0 または約 7.5 である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の pH は、約 7.0 である。

40

【0213】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 0.01 mM ~ 100 mM、約 0.1 mM ~ 100 mM、約 0.5 mM ~ 100 mM、約 1 mM ~ 100 mM、約 2 mM ~ 100 mM、約 3 mM ~ 100 mM、約 4 mM ~ 100 mM、約 5 mM ~ 100 mM、約 6 mM ~ 100 mM、約 7 mM ~ 100 mM、約 8 mM ~ 100 mM、約 9 mM ~ 100 mM、約 10 mM ~ 100 mM、約 11 mM ~ 100 mM、約 12 mM ~ 100 mM、約 13

50

mM ~ 100 mM、約14 mM ~ 100 mM、約15 mM ~ 100 mM、約16 mM ~ 100 mM、約17 mM ~ 100 mM、約18 mM ~ 100 mM、約19 mM ~ 100 mM、約20 mM ~ 100 mM、約25 mM ~ 100 mM、約30 mM ~ 100 mM、約35 mM ~ 100 mM、約40 mM ~ 100 mM、約45 mM ~ 100 mM、約50 mM ~ 100 mM、約55 mM ~ 100 mM、約60 mM ~ 100 mM、約65 mM ~ 100 mM、約70 mM ~ 100 mM、約75 mM ~ 100 mM、約80 mM ~ 100 mM、約85 mM ~ 100 mM、約90 mM ~ 100 mMまたは約95 mM ~ 100 mMである。

【0214】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01 mM ~ 50 mM、約0.1 mM ~ 50 mM、約0.5 mM ~ 50 mM、約1 mM ~ 50 mM、約2 mM ~ 50 mM、約3 mM ~ 50 mM、約4 mM ~ 50 mM、約5 mM ~ 50 mM、約6 mM ~ 50 mM、約7 mM ~ 50 mM、約8 mM ~ 50 mM、約9 mM ~ 50 mM、約10 mM ~ 50 mM、約11 mM ~ 50 mM、約12 mM ~ 50 mM、約13 mM ~ 50 mM、約14 mM ~ 50 mM、約15 mM ~ 50 mM、約16 mM ~ 50 mM、約17 mM ~ 50 mM、約18 mM ~ 50 mM、約19 mM ~ 50 mM、約20 mM ~ 50 mM、約25 mM ~ 50 mM、約30 mM ~ 50 mM、約35 mM ~ 50 mM、約40 mM ~ 50 mM、約45 mM ~ 50 mMである。

10

【0215】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01 mM ~ 25 mM、約0.1 mM ~ 25 mM、約0.5 mM ~ 25 mM、約1 mM ~ 25 mM、約2 mM ~ 25 mM、約3 mM ~ 25 mM、約4 mM ~ 25 mM、約5 mM ~ 25 mM、約6 mM ~ 25 mM、約7 mM ~ 25 mM、約8 mM ~ 25 mM、約9 mM ~ 25 mM、約10 mM ~ 25 mM、約11 mM ~ 25 mM、約12 mM ~ 25 mM、約13 mM ~ 25 mM、約14 mM ~ 25 mM、約15 mM ~ 25 mM、約16 mM ~ 25 mM、約17 mM ~ 25 mM、約18 mM ~ 25 mM、約19 mM ~ 25 mMまたは約20 mM ~ 25 mMである。

20

【0216】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01 mM ~ 15 mM、約0.1 mM ~ 15 mM、約0.5 mM ~ 15 mM、約1 mM ~ 15 mM、約2 mM ~ 15 mM、約3 mM ~ 15 mM、約4 mM ~ 15 mM、約5 mM ~ 15 mM、約6 mM ~ 15 mM、約7 mM ~ 15 mM、約8 mM ~ 15 mM、約9 mM ~ 15 mM、約10 mM ~ 15 mM、約11 mM ~ 15 mM、約12 mM ~ 15 mM、約13 mM ~ 15 mMまたは約14 mM ~ 15 mMである。

30

【0217】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01 mM ~ 10 mM、約0.1 mM ~ 10 mM、約0.5 mM ~ 10 mM、約1 mM ~ 10 mM、約2 mM ~ 10 mM、約3 mM ~ 10 mM、約4 mM ~ 10 mM、約5 mM ~ 10 mM、約6 mM ~ 10 mM、約7 mM ~ 10 mM、約8 mM ~ 10 mMまたは約9 mM ~ 10 mMである。

【0218】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0219】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01 mM、約0.05 mM、約0.1 mM、約0.2 mM、約0.3 mM、約0.4 mM、約0.5 mM、約0.6 mM、約0.7 mM、約0.8 mM、約0.9 mM、約1 mM、約2 mM、約3 mM、約4 mM、約5 mM、約6 mM、約7 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約11 mM、約12 mM、約13 mM、約14 mM、約15 mM、約16 mM、約17 mM、約18 mM、約19 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約55 mM、約60 mM、約65 mM、約70 mM、約75 mM、約80 mM、約85 mM、約90 mM、約95 mMまたは約100 mMである。

40

【0220】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.1 mM、約0.2 mM、約1 mM

50

、約 5 m M、約 1 0 m M、約 1 5 m M、約 2 0 m M、約 3 0 m M、約 4 0 m M、または約 5 0 m M である。

【 0 2 2 1 】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 1 0 m M である。

【 0 2 2 2 】

ある実施形態では、置換液は、キレート剤を含む。ある実施形態では、置換液は、ミョウバンキレート剤を含む。一部の実施形態では、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、N - (2 - ヒドロキシエチル) エチレンジアミン - N , N ' , N ' - 三酢酸 (E D T A - O H)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸 (H E D T A)、エチレングリコール - ビス (2 - アミノエチルエーテル) - N , N , N ' , N ' - 四酢酸 (E G T A)、
1 , 2 - シクロヘキサンジアミン - N , N , N ' , N ' - 四酢酸 (C y D T A)、ジエチレントリアミン - N , N , N ' , N ' ' , N ' ' - 五酢酸 (D T P A)、1 , 3 - ジアミノプロパン - 2 - オール - N , N , N ' , N ' - 四酢酸 (D P T A - O H)、エチレンジアミン - N , N ' - ビス (2 - ヒドロキシフェニル酢酸) (E D D H A)、エチレンジアミン - N , N ' - ジプロピオン酸ジヒドロクロリド (E D D P)、エチレンジアミン - テトラキス (メチレンスルホン酸) (E D T P O)、ニトリロトリス (メチレンホスホン酸) (N T P O)、イミノ - 二酢酸 (I D A)、ヒドロキシイミノ - 二酢酸 (H I D A)、ニトリロ - 三酢酸 (N T P)、トリエチレントトラミン - 六酢酸 (T T H A)、ジメルカプトコハク酸 (D M S A)、2 , 3 - ジメルカプト - 1 - プロパンスルホン酸 (D M P S)、アルファリポ酸 (A L A)、ニトリロ三酢酸 (N T A)、チアミンテトラヒドロフルフリルジスルフィド (T T F D)、ジメルカプロール、ペニシラミン、デフェロキサミン (D F O A)、デフェラシロクス、ホスホネート、クエン酸の塩 (クエン酸塩) およびこれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 2 2 3 】

一部の実施形態では、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、N - (2 - ヒドロキシエチル) エチレンジアミン - N , N ' , N ' - 三酢酸 (E D T A - O H)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸 (H E D T A)、エチレングリコール - ビス (2 - アミノエチルエーテル) - N , N , N ' , N ' - 四酢酸 (E G T A)、1 , 2 - シクロヘキサンジアミン - N , N , N ' , N ' - 四酢酸 (C y D T A)、ジエチレントリアミン - N , N , N ' , N ' ' , N ' ' - 五酢酸 (D T P A)、1 , 3 - ジアミノプロパン - 2 - オール - N , N , N ' , N ' - 四酢酸 (D P T A - O H)、エチレンジアミン - N , N ' - ビス (2 - ヒドロキシフェニル酢酸) (E D D H A)、クエン酸の塩 (クエン酸塩) およびこれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 2 2 4 】

一部の実施形態では、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) である。

【 0 2 2 5 】

一部の実施形態では、キレート剤は、クエン酸の塩 (クエン酸塩) である。一部の実施形態では、キレート剤は、クエン酸ナトリウムである。

【 0 2 2 6 】

一般に、キレート剤は、1 ~ 5 0 0 m M の濃度で用いられる。ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、2 ~ 4 0 0 m M である。ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、1 0 ~ 4 0 0 m M である。ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、1 0 ~ 2 0 0 m M である。ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、1 0 ~ 1 0 0 m M である。ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、1 0 ~ 5 0 m M である。ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、1 0 ~ 3 0 m M である。

【 0 2 2 7 】

ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、約 0 . 0 1 m M、約 0 . 0 5 m M、約 0 . 1 m M、約 0 . 2 m M、約 0 . 3 m M、約 0 . 4 m M、約 0 . 5 m M、約 0 . 6 m M、約 0 . 7 m M、約 0 . 8 m M、約 0 . 9 m M、約 1 m M、約 2 m M、約 3 m M、約

4 m M、約 5 m M、約 6 m M、約 7 m M、約 8 m M、約 9 m M、約 10 m M、約 11 m M、約 12 m M、約 13 m M、約 14 m M、約 15 m M、約 16 m M、約 17 m M、約 18 m M、約 19 m M、約 20 m M、約 21 m M、約 22 m M、約 23 m M、約 24 m M、約 25 m M、約 26 m M、約 27 m M、約 28 m M、約 29 m M、約 30 m M、約 31 m M、約 32 m M、約 33 m M、約 34 m M、約 35 m M、約 36 m M、約 37 m M、約 38 m M、約 39 m M、約 40 m M、約 45 m M、約 50 m M、約 55 m M、約 60 m M、約 65 m M、約 70 m M、約 75 m M、約 80 m M、約 85 m M、約 90 m M、約 95 または約 100 m M である。

【0228】

ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、約 5 m M、約 10 m M、約 15 m M、約 20 m M、約 25 m M、約 30 m M、約 35 m M、約 40 m M、約 45 m M、約 50 m M、約 55 m M、約 60 m M、約 65 m M、約 70 m M、約 75 m M、約 80 m M、約 85 m M、約 90 m M、約 95 m M または約 100 m M である。

10

【0229】

ある実施形態では、置換液中のキレート剤の濃度は、約 15 m M、約 20 m M、約 25 m M、約 30 m M、約 35 m M、約 40 m M、約 45 m M または約 50 m M である。

【0230】

ある実施形態では、透析濾過緩衝溶液は、塩を含む。一部の実施形態では、塩は、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される。1つの特定の実施形態では、塩は、塩化ナトリウムである。ある実施形態では、透析濾過緩衝溶液は、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、約 50、約 55、約 60、約 65、約 70、約 80、約 90、約 100、約 110、約 120、約 130、約 140、約 150、約 160、約 170、約 180、約 190、約 200、約 250、約 300、約 350、約 400、約 450 または約 500 m M の塩化ナトリウムを含む。1つの特定の実施形態では、透析濾過緩衝溶液は、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、約 50、約 55、約 60、約 65、約 70、約 80、約 90、約 100、約 110、約 120、約 130、約 140、約 150、約 160、約 170、約 180、約 190、約 200、約 250 または約 300 m M の塩化ナトリウムを含む。

20

【0231】

本発明のある実施形態では、透析容量の数は、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 である。本発明のある実施形態では、透析容量の数は、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95 または約 100 である。本発明のある実施形態では、透析容量の数は、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14 または約 15 である。

30

40

【0232】

本発明のある実施形態では、限外濾過ステップおよび透析濾過ステップは、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過ステップおよび透析濾過ステップは、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される。

【0233】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0234】

ある実施形態では、限外濾過ステップおよび透析濾過ステップは、約 20、約 21

50

、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9
 、約 3 0 、約 3 1 、約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7
 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5
 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3
 、約 5 4 、約 5 5 、約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1
 、約 6 2 、約 6 3 、約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9
 、約 7 0 、約 7 1 、約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7
 、約 7 8 、約 7 9 または約 8 0 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過
 ステップおよび透析濾過ステップは、約 5 0 の温度で実施される。

【 0 2 3 5 】

本発明のある実施形態では、透析濾過ステップは、約 2 0 ~ 約 9 0 の温度で実施される。ある実施形態では、透析濾過ステップは、約 3 5 ~ 約 8 0 の温度、約 4 0 ~ 約 7 0 の温度、約 4 5 ~ 約 6 5 の温度、約 5 0 ~ 約 6 0 の温度、約 5 0 ~ 約 5 5 の温度、約 4 5 ~ 約 5 5 の温度または約 4 5 ~ 約 5 5 の温度で実施される。

【 0 2 3 6 】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【 0 2 3 7 】

ある実施形態では、透析濾過ステップは、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、
 約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 、約 3 0 、約 3 1 、
 約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、
 約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、
 約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3 、約 5 4 、約 5 5 、
 約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1 、約 6 2 、約 6 3 、
 約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9 、約 7 0 、約 7 1 、
 約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7 、約 7 8 、約 7 9 ま
 たは約 8 0 の温度で実施される。ある実施形態では、透析濾過ステップは、約 5 0 の
 温度で実施される。

【 0 2 3 8 】

本発明のある実施形態では、限外濾過ステップは、約 2 0 ~ 約 9 0 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 3 5 ~ 約 8 0 の温度、約 4 0 ~ 約 7 0 の温度、約 4 5 ~ 約 6 5 の温度、約 5 0 ~ 約 6 0 の温度、約 5 0 ~ 約 5 5 の温度、約 4 5 ~ 約 5 5 の温度または約 4 5 ~ 約 5 5 の温度で実施される。上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【 0 2 3 9 】

ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、
 約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 、約 3 0 、約 3 1 、
 約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、
 約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、
 約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3 、約 5 4 、約 5 5 、
 約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1 、約 6 2 、約 6 3 、
 約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9 、約 7 0 、約 7 1 、
 約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7 、約 7 8 、約 7 9 ま
 たは約 8 0 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 5 0 の
 温度で実施される。

【 0 2 4 0 】

1 . 7 活性炭濾過

一度、上記のセクション 1 . 2 の凝集ステップによって溶液を処理したら、多糖を含有する溶液を、必要に応じて、活性炭濾過ステップによってさらに清澄化することができる。

【 0 2 4 1 】

ある実施形態では、セクション 1 . 3 のステップの固体 / 液体分離によってさらに処理

10

20

30

40

50

されたセクション 1 . 3 の溶液（例えば、上清）を、活性炭濾過ステップによってさらに清澄化する。ある実施形態では、上記のセクション 1 . 4 に記載の方法のいずれかによって、および/または上記のセクション 1 . 5 に記載の濾過ステップによってさらに濾過された溶液を、活性炭濾過ステップによってさらに清澄化する。ある実施形態では、上記のセクション 1 . 6 に記載の限外濾過ステップおよび/または透析濾過ステップによってさらに清澄化された溶液を、活性炭濾過ステップによってさらに清澄化する。

【 0 2 4 2 】

活性炭濾過のステップは、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のさらなる除去を可能にする（W O 2 0 0 8 / 1 1 8 7 5 2 を参照されたい）。

【 0 2 4 3 】

ある実施形態では、活性炭（アクティブチャコールとも呼ばれる）を、タンパク質および核酸の夾雑物の大部分を吸着させるのに十分な量で溶液に添加した後、夾雑物が活性炭上に吸着されたら、それを除去する。ある実施形態では、活性炭を、粉末の形態で、顆粒炭素層として、圧縮炭素ブロックまたは押し出し炭素ブロックとして添加する（例えば、N o r i t のアクティブチャコールを参照されたい）。ある実施形態では、活性炭を、約 0 . 1 ~ 2 0 %（重量）、1 ~ 1 5 %（重量）、1 ~ 1 0 %（重量）、2 ~ 1 0 %（重量）、3 ~ 1 0 %（重量）、4 ~ 1 0 %（重量）、5 ~ 1 0 %（重量）、1 ~ 5 %（重量）または 2 ~ 5 %（重量）の量で添加する。次いで、混合物を攪拌し、静置する。ある実施形態では、混合物を、約 5、1 0、1 5、2 0、3 0、4 5、6 0、9 0、1 2 0、1 8 0、2 4 0 分またはそれより長く静置する。次いで、活性炭を除去する。活性炭を、例えば、遠心分離または濾過によって除去することができる。

【 0 2 4 4 】

好ましい実施形態では、溶液を、マトリックス中に固定された活性炭を介して濾過する。マトリックスは、溶液にとって浸透性の任意の多孔性フィルター媒体であってもよい。マトリックスは、支持材料および/または結合剤材料を含んでもよい。支持材料は、合成ポリマーまたは天然起源のポリマーであってもよい。好適な合成ポリマーは、ポリスチレン、ポリアクリルアミドおよびポリメチルメタクリレートを含んでもよいが、天然起源のポリマーは、セルロース、多糖およびデキストラン、アガロースを含んでもよい。典型的には、ポリマー支持材料は、機械的剛性を提供するための繊維ネットワークの形態にある。結合剤材料は、樹脂であってもよい。マトリックスは、膜シートの形態を有してもよい。ある実施形態では、マトリックス中に固定された活性炭は、フロースルー炭素カートリッジの形態にある。カートリッジは、マトリックス中に固定され、膜シートの形態で調製された粉末状活性炭を含有する自己含有性実体である。膜シートをプラスチック製の浸透性支持体中に捕捉して、ディスクを形成することができる。

【 0 2 4 5 】

あるいは、膜シートを、らせん状に巻いてもよい。フィルター表面積を増大させるために、いくつかのディスクを互いに積み重ねることができる。特に、互いに積み重ねられたディスクは、フィルターから炭素処理された試料を収集し、除去するための中心コアパイプを有する。積み重ねられたディスクの構成は、レンズ状であってもよい。

【 0 2 4 6 】

炭素フィルター中の活性炭は、様々な生材料、例えば、泥炭、褐炭、木材またはヤシ殻に由来するものであってもよい。

【 0 2 4 7 】

蒸気または化学処理などの、当業界で公知の任意のプロセスを使用して、炭を活性化することができる（例えば、木材ベースのリン酸活性炭）。

【 0 2 4 8 】

本発明では、マトリックス中に固定された活性炭を、筐体中に入れて、独立フィルターユニットを形成させることができる。それぞれのフィルターユニットは、精製しようとする溶液のためのそれ自身の注入口および排水口を有する。本発明において使用可能であるフィルターユニットの例は、C u n o I n c .（M e r i d e n、U S A）または P a

10

20

30

40

50

ll Corporation (East Hill, USA) からの炭素カートリッジである。特に、CUNO zeta carbon フィルターは、本発明における使用にとって好適である。これらの炭素フィルターは、活性炭粉末が所定の位置に捕捉され、樹脂に結合したセルロースマトリックスを含む。

【0249】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約0.01~100ミクロン、約0.05~100ミクロン、約0.1~100ミクロン、約0.2~100ミクロン、約0.3~100ミクロン、約0.4~100ミクロン、約0.5~100ミクロン、約0.6~100ミクロン、約0.7~100ミクロン、約0.8~100ミクロン、約0.9~100ミクロン、約1~100ミクロン、約1.25~100ミクロン、約1.5~100ミクロン、約1.75~100ミクロン、約2~100ミクロン、約3~100ミクロン、約4~100ミクロン、約5~100ミクロン、約6~100ミクロン、約7~100ミクロン、約8~100ミクロン、約9~100ミクロン、約10~100ミクロン、約15~100ミクロン、約20~100ミクロン、約25~100ミクロン、約30~100ミクロン、約40~100ミクロン、約50~100ミクロンまたは約75~100ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

10

【0250】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約0.01~50ミクロン、約0.05~50ミクロン、約0.1~50ミクロン、約0.2~50ミクロン、約0.3~50ミクロン、約0.4~50ミクロン、約0.5~50ミクロン、約0.6~50ミクロン、約0.7~50ミクロン、約0.8~50ミクロン、約0.9~50ミクロン、約1~50ミクロン、約1.25~50ミクロン、約1.5~50ミクロン、約1.75~50ミクロン、約2~50ミクロン、約3~50ミクロン、約4~50ミクロン、約5~50ミクロン、約6~50ミクロン、約7~50ミクロン、約8~50ミクロン、約9~50ミクロン、約10~50ミクロン、約15~50ミクロン、約20~50ミクロン、約25~50ミクロン、約30~50ミクロン、約40~50ミクロンまたは約50~50ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

20

【0251】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約0.01~25ミクロン、約0.05~25ミクロン、約0.1~25ミクロン、約0.2~25ミクロン、約0.3~25ミクロン、約0.4~25ミクロン、約0.5~25ミクロン、約0.6~25ミクロン、約0.7~25ミクロン、約0.8~25ミクロン、約0.9~25ミクロン、約1~25ミクロン、約1.25~25ミクロン、約1.5~25ミクロン、約1.75~25ミクロン、約2~25ミクロン、約3~25ミクロン、約4~25ミクロン、約5~25ミクロン、約6~25ミクロン、約7~25ミクロン、約8~25ミクロン、約9~25ミクロン、約10~25ミクロン、約15~25ミクロンまたは約20~25ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

30

【0252】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約0.01~10ミクロン、約0.05~10ミクロン、約0.1~10ミクロン、約0.2~10ミクロン、約0.3~10ミクロン、約0.4~10ミクロン、約0.5~10ミクロン、約0.6~10ミクロン、約0.7~10ミクロン、約0.8~10ミクロン、約0.9~10ミクロン、約1~10ミクロン、約1.25~10ミクロン、約1.5~10ミクロン、約1.75~10ミクロン、約2~10ミクロン、約3~10ミクロン、約4~10ミクロン、約5~10ミクロン、約6~10ミクロン、約7~10ミクロン、約8~10ミクロンまたは約9~10ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

40

【0253】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約0.01~8ミクロン、約0.05~8ミクロン、約0.1~8ミクロン、約0.2~8ミクロン、約0.3~8ミクロン、約0.4~8ミクロン、約0.5~8ミクロン、約0.6~8ミクロン、約0

50

． 7 ～ 8 ミクロン、約 0 . 8 ～ 8 ミクロン、約 0 . 9 ～ 8 ミクロン、約 1 ～ 8 ミクロン、約 1 . 2 5 ～ 8 ミクロン、約 1 . 5 ～ 8 ミクロン、約 1 . 7 5 ～ 8 ミクロン、約 2 ～ 8 ミクロン、約 3 ～ 8 ミクロン、約 4 ～ 8 ミクロン、約 5 ～ 8 ミクロン、約 6 ～ 8 ミクロンまたは約 7 ～ 8 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

【 0 2 5 4 】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約 0 . 0 1 ～ 5 ミクロン、約 0 . 0 5 ～ 5 ミクロン、約 0 . 1 ～ 5 ミクロン、約 0 . 2 ～ 5 ミクロン、約 0 . 3 ～ 5 ミクロン、約 0 . 4 ～ 5 ミクロン、約 0 . 5 ～ 5 ミクロン、約 0 . 6 ～ 5 ミクロン、約 0 . 7 ～ 5 ミクロン、約 0 . 8 ～ 5 ミクロン、約 0 . 9 ～ 5 ミクロン、約 1 ～ 5 ミクロン、約 1 . 2 5 ～ 5 ミクロン、約 1 . 5 ～ 5 ミクロン、約 1 . 7 5 ～ 5 ミクロン、約 2 ～ 5 ミクロン、約 3 ～ 5 ミクロンまたは約 4 ～ 5 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

10

【 0 2 5 5 】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約 0 . 0 1 ～ 2 ミクロン、約 0 . 0 5 ～ 2 ミクロン、約 0 . 1 ～ 2 ミクロン、約 0 . 2 ～ 2 ミクロン、約 0 . 3 ～ 2 ミクロン、約 0 . 4 ～ 2 ミクロン、約 0 . 5 ～ 2 ミクロン、約 0 . 6 ～ 2 ミクロン、約 0 . 7 ～ 2 ミクロン、約 0 . 8 ～ 2 ミクロン、約 0 . 9 ～ 2 ミクロン、約 1 ～ 2 ミクロン、約 1 . 2 5 ～ 2 ミクロン、約 1 . 5 ～ 2 ミクロン、約 1 . 7 5 ～ 2 ミクロン、約 2 ～ 2 ミクロン、約 3 ～ 2 ミクロンまたは約 4 ～ 2 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

【 0 2 5 6 】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約 0 . 0 1 ～ 1 ミクロン、約 0 . 0 5 ～ 1 ミクロン、約 0 . 1 ～ 1 ミクロン、約 0 . 2 ～ 1 ミクロン、約 0 . 3 ～ 1 ミクロン、約 0 . 4 ～ 1 ミクロン、約 0 . 5 ～ 1 ミクロン、約 0 . 6 ～ 1 ミクロン、約 0 . 7 ～ 1 ミクロン、約 0 . 8 ～ 1 ミクロンまたは約 0 . 9 ～ 1 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

20

【 0 2 5 7 】

ある実施形態では、上記に開示された活性炭フィルターは、約 0 . 0 5 ～ 5 0 ミクロン、0 . 1 ～ 2 5 ミクロン、0 . 2 ～ 1 0 ミクロン、0 . 1 ～ 1 0 ミクロン、0 . 2 ～ 5 ミクロンまたは 0 . 2 5 ～ 1 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する。

【 0 2 5 8 】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

30

【 0 2 5 9 】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、1 ～ 5 0 0 L M H、1 0 ～ 5 0 0 L M H、1 5 ～ 5 0 0 L M H、2 0 ～ 5 0 0 L M H、2 5 ～ 5 0 0 L M H、3 0 ～ 5 0 0 L M H、4 0 ～ 5 0 0 L M H、5 0 ～ 5 0 0 L M H、1 0 0 ～ 5 0 0 L M H、1 2 5 ～ 5 0 0 L M H、1 5 0 ～ 5 0 0 L M H、2 0 0 ～ 5 0 0 L M H、2 5 0 ～ 5 0 0 L M H、3 0 0 ～ 5 0 0 L M Hまたは 4 0 0 ～ 5 0 0 L M Hの供給速度で行われる。

【 0 2 6 0 】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、1 ～ 2 0 0 L M H、1 0 ～ 2 0 0 L M H、1 5 ～ 2 0 0 L M H、2 0 ～ 2 0 0 L M H、2 5 ～ 2 0 0 L M H、3 0 ～ 2 0 0 L M H、4 0 ～ 2 0 0 L M H、5 0 ～ 2 0 0 L M H、1 0 0 ～ 2 0 0 L M H、1 2 5 ～ 2 0 0 L M Hまたは 1 5 0 ～ 2 0 0 L M Hの供給速度で行われる。

40

【 0 2 6 1 】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、1 ～ 1 5 0 L M H、1 0 ～ 1 5 0 L M H、1 5 ～ 1 5 0 L M H、2 0 ～ 1 5 0 L M H、2 5 ～ 1 5 0 L M H、3 0 ～ 1 5 0 L M H、4 0 ～ 1 5 0 L M H、5 0 ～ 1 5 0 L M H、1 0 0 ～ 1 5 0 L M Hまたは 1 2 5 ～ 1 5 0 L M Hの供給速度で行われる。

【 0 2 6 2 】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、1 ～ 1 0 0 L M H、1 0 ～ 1 0 0 L M H、1 5 ～ 1 0 0 L M H、2 0 ～ 1 0 0 L M H、2 5 ～ 1 0 0 L M H、3 0 ～ 1 0 0 L M H、4 0 ～ 1 0 0 L M H、または 5 0 ～ 1 0 0 L M Hの供給速度で行われる。

50

【0263】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、1～75 LMH、5～75 LMH、10～75 LMH、15～75 LMH、20～75 LMH、25～75 LMH、30～75 LMH、35～75 LMH、40～75 LMH、45～75 LMH、50～75 LMH、55～75 LMH、60～75 LMH、65～75 LMH、または70～75 LMHの供給速度で行われる。

【0264】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、1～50 LMH、5～50 LMH、7～50 LMH、10～50 LMH、15～50 LMH、20～50 LMH、25～50 LMH、30～50 LMH、35～50 LMH、40～50 LMHまたは45～50 LMHの供給速度で行われる。

10

【0265】

上記の範囲のいずれかの中の任意の全数が、本開示の実施形態として企図される。

【0266】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップは、約1、約2、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約225、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約700、約800、約900、約950または約1000 LMHの供給速度で行われる。

20

【0267】

ある実施形態では、フィルターが、5～1000 L/m²、10～750 L/m²、15～500 L/m²、20～400 L/m²、25～300 L/m²、30～250 L/m²、40～200 L/m²または30～100 L/m²のフィルター能力を有する活性炭フィルターによって、溶液を処理する。

【0268】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0269】

ある実施形態では、フィルターが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約100、約125、約150、約175、約200、約225、約250、約275、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、または約1000 L/m²のフィルター能力を有する活性炭フィルターによって、溶液を処理する。

30

【0270】

夾雑物の含量が、1回目の活性炭濾過ステップの後に固定閾値よりも上である場合、前記ステップを反復してもよい。本発明のある実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回の活性炭濾過ステップを実施する。本発明のある実施形態では、1、2、または3回の活性炭濾過ステップを実施する。本発明のある実施形態では、1または2回の活性炭濾過ステップを実施する。

40

【0271】

ある実施形態では、溶液を、活性炭フィルターによって連続的に処理する。ある実施形態では、溶液を、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の活性炭フィルターによって連続的に処理する。ある実施形態では、溶液を、2、3、4または5個の活性炭フィルターによって連続的に処理する。ある実施形態では、溶液を、2個の活性炭フィルターによって連続的に処理する。ある実施形態では、溶液を、3個の活性炭フィルターによって連続的に処理する。ある実施形態では、溶液を、4個の活性炭フィルターによって連続的に処理する。ある実施形態では、溶液を、5個の活性炭フィルターによって連続的に処理する。

50

【0272】

ある実施形態では、活性炭濾過ステップを、1回通過モードで実施する。

【0273】

別の実施形態では、活性炭濾過ステップを、再循環モードで実施する。前記実施形態（再循環モード）では、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50サイクルの活性炭濾過を実施する。別の実施形態では、2、3、4、5、6、7、8、9または10サイクルの活性炭濾過を実施する。ある実施形態では、2または3サイクルの活性炭濾過を実施する。ある実施形態では、2サイクルの活性炭濾過を実施する。

10

【0274】

1.8 任意選択のさらなる濾過

一度、上記のセクション1.7の活性炭ステップによって溶液を処理したら、得られた溶液（すなわち、濾液）を、必要に応じてさらに濾過することができる。

【0275】

ある実施形態では、溶液を、精密濾過にかける。ある実施形態では、精密濾過は、デッドエンド濾過（垂直濾過）である。

【0276】

ある実施形態では、フィルターが約0.01~2ミクロン、約0.05~2ミクロン、約0.1~2ミクロン、約0.2~2ミクロン、約0.3~2ミクロン、約0.4~2ミクロン、約0.45~2ミクロン、約0.5~2ミクロン、約0.6~2ミクロン、約0.7~2ミクロン、約0.8~2ミクロン、約0.9~2ミクロン、約1~2ミクロン、約1.25~2ミクロン、約1.5~2ミクロン、または約1.75~2ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【0277】

ある実施形態では、フィルターが約0.01~1ミクロン、約0.05~1ミクロン、約0.1~1ミクロン、約0.2~1ミクロン、約0.3~1ミクロン、約0.4~1ミクロン、約0.45~1ミクロン、約0.5~1ミクロン、約0.6~1ミクロン、約0.7~1ミクロン、約0.8~1ミクロンまたは約0.9~1ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0278】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0279】

ある実施形態では、フィルターが約0.01、約0.05、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.45、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約1.6、約1.7、約1.8、約1.9または約2.0ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0280】

ある実施形態では、フィルターが約0.2ミクロンの名目保持範囲を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0281】

ある実施形態では、フィルターが、100~6000 L/m²、200~6000 L/m²、300~6000 L/m²、400~6000 L/m²、500~6000 L/m²、750~6000 L/m²、1000~6000 L/m²、1500~6000 L/m²、2000~6000 L/m²、3000~6000 L/m²または4000~6000 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0282】

ある実施形態では、フィルターが、100~4000 L/m²、200~4000 L/m²

50

m^2 、 $300 \sim 4000 L/m^2$ 、 $400 \sim 4000 L/m^2$ 、 $500 \sim 4000 L/m^2$ 、 $750 \sim 4000 L/m^2$ 、 $1000 \sim 4000 L/m^2$ 、 $1500 \sim 4000 L/m^2$ 、 $2000 \sim 4000 L/m^2$ 、 $2500 \sim 4000 L/m^2$ 、 $3000 \sim 4000 L/m^2$ 、 $3000 \sim 4000 L/m^2$ または $3500 \sim 4000 L/m^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0283】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 3750 L/m^2$ 、 $200 \sim 3750 L/m^2$ 、 $300 \sim 3750 L/m^2$ 、 $400 \sim 3750 L/m^2$ 、 $500 \sim 3750 L/m^2$ 、 $750 \sim 3750 L/m^2$ 、 $1000 \sim 3750 L/m^2$ 、 $1500 \sim 3750 L/m^2$ 、 $2000 \sim 3750 L/m^2$ 、 $2500 \sim 3750 L/m^2$ 、 $3000 \sim 3750 L/m^2$ 、 $3000 \sim 3750 L/m^2$ または $3500 \sim 3750 L/m^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0284】

ある実施形態では、フィルターが、 $100 \sim 1250 L/m^2$ 、 $200 \sim 1250 L/m^2$ 、 $300 \sim 1250 L/m^2$ 、 $400 \sim 1250 L/m^2$ 、 $500 \sim 1250 L/m^2$ 、 $750 \sim 1250 L/m^2$ または $1000 \sim 1250 L/m^2$ のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0285】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0286】

ある実施形態では、フィルターが約100、約200、約300、約400、約550、約600、約700、約800、約900、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1600、約1700、約1800、約1900、約2000、約2100、約2200、約2300、約2400、約2500、約2600、約2700、約2800、約2900、約3000、約3100、約3200、約3300、約3400、約3500、約3600、約3700、約3800、約3900、約4000、約4100、約4200、約4300、約4400、約4500、約4600、約4700、約4800、約4900、約5000、約5250、約5500、約5750または約6000 L/m^2 のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

30

【0287】

1.9 限外濾過/透析濾過

一度、上記のセクション1.7に記載の活性炭濾過ステップによって、および/または上記のセクション1.8に記載のさらなる濾過ステップによって溶液を処理したら、得られた溶液(すなわち、濾液)を、必要に応じて、限外濾過および/または透析濾過によってさらに清澄化してもよい。

【0288】

本発明のある実施形態では、溶液(例えば、上記のセクション1.7または1.8で得られたもの)を、限外濾過によって処理する。

【0289】

ある実施形態では、限外濾過によって溶液を処理し、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 1000 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 750 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 500 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 300 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 100 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 50 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約10 kDa ~ 30 kDaの範囲にある。ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 1000 kDa、約10 kDa ~ 1000 kDa、約20 kDa ~ 1000 kDa、約30 kDa ~ 1000 kDa、約40 kDa ~ 1000 kDa、約50 kDa ~ 1000 kDaの範囲にある。

40

50

Da ~ 1000 kDa、約75 kDa ~ 1000 kDa、約100 kDa ~ 1000 kDa、約150 kDa ~ 1000 kDa、約200 kDa ~ 1000 kDa、約300 kDa ~ 1000 kDa、約400 kDa ~ 1000 kDa、約500 kDa ~ 1000 kDa または約750 kDa ~ 1000 kDaの範囲にある。

【0290】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 500 kDa、約10 kDa ~ 500 kDa、約20 kDa ~ 500 kDa、約30 kDa ~ 500 kDa、約40 kDa ~ 500 kDa、約50 kDa ~ 500 kDa、約75 kDa ~ 500 kDa、約100 kDa ~ 500 kDa、約150 kDa ~ 500 kDa、約200 kDa ~ 500 kDa、約300 kDa ~ 500 kDa または約400 kDa ~ 500 kDaの範囲にある。

10

【0291】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 300 kDa、約10 kDa ~ 300 kDa、約20 kDa ~ 300 kDa、約30 kDa ~ 300 kDa、約40 kDa ~ 300 kDa、約50 kDa ~ 300 kDa、約75 kDa ~ 300 kDa、約100 kDa ~ 300 kDa、約150 kDa ~ 300 kDa または約200 kDa ~ 300 kDaの範囲にある。

【0292】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa ~ 100 kDa、約10 kDa ~ 100 kDa、約20 kDa ~ 100 kDa、約30 kDa ~ 100 kDa、約40 kDa ~ 100 kDa、約50 kDa ~ 100 kDa または約75 kDa ~ 100 kDaの範囲にある。

20

【0293】

ある実施形態では、膜の分子量カットオフは、約5 kDa、約10 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa、約50 kDa、約60 kDa、約70 kDa、約80 kDa、約90 kDa、約100 kDa、約110 kDa、約120 kDa、約130 kDa、約140 kDa、約150 kDa、約200 kDa、約250 kDa、約300 kDa、約400 kDa、約500 kDa、約750 kDa または約1000 kDaである。

【0294】

ある実施形態では、限外濾過ステップの濃縮係数は、約1.5 ~ 10.0である。ある実施形態では、濃縮係数は、約2.0 ~ 8.0である。ある実施形態では、濃縮係数は、約2.0 ~ 5.0である。

30

【0295】

ある実施形態では、濃縮係数は、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5 または約10.0である。ある実施形態では、濃縮係数は、約2.0、約3.0、約4.0、約5.0 または約6.0である。

【0296】

本発明の実施形態では、溶液（例えば、上記のセクション1.7または1.8で得られた濾液）を、透析濾過によって処理する。

40

【0297】

本発明の実施形態では、本セクションの上記に開示された限外濾過（UF）後に得られた溶液を、透析濾過によってさらに処理する（UF/DF処理）。

【0298】

透析濾過（DF）は、生成物を、所望の緩衝溶液（または水のみ）中で交換するために使用される。ある実施形態では、透析濾過は、一定の容量下で保持された溶液の化学的特性を変化させるために使用される。望ましくない粒子は膜を通過するが、供給原料流の組成は、置換液（緩衝溶液、塩水溶液、緩衝塩水溶液または水）の添加によって、より望ましい状態に変化する。

【0299】

50

ある実施形態では、置換液は、水である。

【0300】

ある実施形態では、置換液は、塩水である。一部の実施形態では、塩は、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される。1つの特定の実施形態では、塩は、塩化ナトリウムである。ある実施形態では、置換液は、約1、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約250、約300、約350、約400、約450または約500 mMの塩化ナトリウムである。1つの特定の実施形態では、置換液は、約1、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約250または約300 mMの塩化ナトリウムである。1つの特定の実施形態では、置換液は、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90または約100 mMの塩化ナトリウムである。

10

【0301】

ある実施形態では、置換液は、緩衝溶液である。ある実施形態では、置換液は、緩衝剤が、N-(2-アセトアミド)-アミノエタンスルホン酸(ACES)、酢酸の塩(酢酸塩)、N-(2-アセトアミド)-イミノ二酢酸(ADA)、2-アミノエタンスルホン酸(AES、タウリン)、アンモニア、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(AMPD、アメジオール)、N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(AMP SO)、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、炭酸水素ナトリウム(重炭酸塩)、N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-グリシン(ピシン)、[ビス-(2-ヒドロキシエチル)-イミノ]-トリス-(ヒドロキシメチルメタン)(ビス-トリス)、1,3-ビス[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン(ビス-トリス-プロパン)、ホウ酸、ジメチルアルシン酸(カコジル酸塩)、3-(シクロヘキシルアミノ)-プロパンスルホン酸(CAPS)、3-(シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CAP SO)、炭酸ナトリウム(炭酸塩)、シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸(CHES)、クエン酸の塩(クエン酸塩)、3-[N-ビス(ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIP SO)、ギ酸の塩(ギ酸塩)、グリシン、グリシルグリシン、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-エタンスルホン酸(HEPES)、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-3-プロパンスルホン酸(HEPPS、EPPS)、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(HEPPSO)、イミダゾール、リンゴ酸の塩(リンゴ酸塩)、マレイン酸の塩(マレイン酸塩)、2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸(MES)、3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸(MOPS)、3-(N-モルホリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)、リン酸の塩(リン酸塩)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)(POP SO)、ピリジン、コハク酸の塩(コハク酸塩)、3-{[トリス(ヒドロキシメチル)-メチル]-アミノ}-プロパンスルホン酸(TAPS)、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(TAPSO)、トリエタノールアミン(TEA)、2-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]-エタンスルホン酸(TES)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチル]-グリシン(トリシン)およびトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン(トリス)からなる群から選択される、緩衝溶液である。

20

30

40

【0302】

50

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、酢酸の塩（酢酸塩）、クエン酸の塩（クエン酸塩）、ギ酸の塩（ギ酸塩）、リンゴ酸の塩（リンゴ酸塩）、マレイン酸の塩（マレイン酸塩）、リン酸の塩（リン酸塩）およびコハク酸の塩（コハク酸塩）からなる群から選択される。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、クエン酸の塩（クエン酸塩）である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、コハク酸の塩（コハク酸塩）である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤は、リン酸の塩（リン酸塩）である。ある実施形態では、前記塩は、ナトリウム塩である。ある実施形態では、前記塩は、カリウム塩である。

【0303】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約4.0～11.0、約5.0～10.0、約5.5～9.0、約6.0～8.0、約6.0～7.0、約6.5～7.5、約6.5～7.0または約6.0～7.5である。上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

10

【0304】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5、約10.0、約10.5または約11.0である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5または約9.0である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約6.5、約7.0または約7.5である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約6.0である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約6.5である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤のpHは、約7.0である。

20

【0305】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01mM～100mM、約0.1mM～100mM、約0.5mM～100mM、約1mM～100mM、約2mM～100mM、約3mM～100mM、約4mM～100mM、約5mM～100mM、約6mM～100mM、約7mM～100mM、約8mM～100mM、約9mM～100mM、約10mM～100mM、約11mM～100mM、約12mM～100mM、約13mM～100mM、約14mM～100mM、約15mM～100mM、約16mM～100mM、約17mM～100mM、約18mM～100mM、約19mM～100mM、約20mM～100mM、約25mM～100mM、約30mM～100mM、約35mM～100mM、約40mM～100mM、約45mM～100mM、約50mM～100mM、約55mM～100mM、約60mM～100mM、約65mM～100mM、約70mM～100mM、約75mM～100mM、約80mM～100mM、約85mM～100mM、約90mM～100mMまたは約95mM～100mMである。

30

【0306】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01mM～50mM、約0.1mM～50mM、約0.5mM～50mM、約1mM～50mM、約2mM～50mM、約3mM～50mM、約4mM～50mM、約5mM～50mM、約6mM～50mM、約7mM～50mM、約8mM～50mM、約9mM～50mM、約10mM～50mM、約11mM～50mM、約12mM～50mM、約13mM～50mM、約14mM～50mM、約15mM～50mM、約16mM～50mM、約17mM～50mM、約18mM～50mM、約19mM～50mM、約20mM～50mM、約25mM～50mM、約30mM～50mM、約35mM～50mM、約40mM～50mM、約45mM～50mMである。

40

【0307】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約0.01mM～25mM、約0.1mM～25mM、約0.5mM～25mM、約1mM～25mM、約2mM～25mM、約3mM～25mM、約4mM～25mM、約5mM～25mM、約6mM～25mM、約7mM～25mM、約8mM～25mM、約9mM～25mM、約10mM～25mM、約11mM～25mM、約12mM～25mM、約13mM～25mM、約14mM～2

50

5 mM、約 1.5 mM ~ 2.5 mM、約 1.6 mM ~ 2.5 mM、約 1.7 mM ~ 2.5 mM、約 1.8 mM ~ 2.5 mM、約 1.9 mM ~ 2.5 mM または 約 2.0 mM ~ 2.5 mM である。

【0308】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 0.01 mM ~ 1.5 mM、約 0.1 mM ~ 1.5 mM、約 0.5 mM ~ 1.5 mM、約 1 mM ~ 1.5 mM、約 2 mM ~ 1.5 mM、約 3 mM ~ 1.5 mM、約 4 mM ~ 1.5 mM、約 5 mM ~ 1.5 mM、約 6 mM ~ 1.5 mM、約 7 mM ~ 1.5 mM、約 8 mM ~ 1.5 mM、約 9 mM ~ 1.5 mM、約 10 mM ~ 1.5 mM、約 11 mM ~ 1.5 mM、約 12 mM ~ 1.5 mM、約 13 mM ~ 1.5 mM または 約 14 mM ~ 1.5 mM である。

【0309】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 0.01 mM ~ 10 mM、約 0.1 mM ~ 10 mM、約 0.5 mM ~ 10 mM、約 1 mM ~ 10 mM、約 2 mM ~ 10 mM、約 3 mM ~ 10 mM、約 4 mM ~ 10 mM、約 5 mM ~ 10 mM、約 6 mM ~ 10 mM、約 7 mM ~ 10 mM、約 8 mM ~ 10 mM または 約 9 mM ~ 10 mM である。

【0310】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0311】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 0.01 mM、約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.5 mM、約 0.6 mM、約 0.7 mM、約 0.8 mM、約 0.9 mM、約 1 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、約 15 mM、約 16 mM、約 17 mM、約 18 mM、約 19 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM または 約 100 mM である。

【0312】

ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 1 mM、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 40 mM、または 約 50 mM である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 30 mM である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 25 mM である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 20 mM である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 15 mM である。ある実施形態では、透析濾過緩衝剤の濃度は、約 10 mM である。

【0313】

ある実施形態では、透析濾過緩衝溶液は、塩を含む。一部の実施形態では、塩は、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される。1つの特定の実施形態では、塩は、塩化ナトリウムである。1つの特定の実施形態では、透析濾過緩衝溶液は、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、約 50、約 55、約 60、約 65、約 70、約 80、約 90、約 100、約 110、約 120、約 130、約 140、約 150、約 160、約 170、約 180、約 190、約 200、約 250 または 約 300 mM の塩化ナトリウムを含む。

【0314】

本発明の実施形態では、透析容量の数は、少なくとも 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 である。本発明の実施形態では、透析容量の数は、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95 または 約 100 である。本発明の

10

20

30

40

50

実施形態では、透析容量の数は、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14 または約 15 である。

【0315】

本発明の実施形態では、限外濾過および透析濾過ステップは、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過および透析濾過ステップは、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される。上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0316】

ある実施形態では、限外濾過および透析濾過ステップは、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過および透析濾過ステップは、約 50 の温度で実施される。

【0317】

本発明の実施形態では、透析濾過ステップは、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される。ある実施形態では、透析濾過ステップは、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される。上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0318】

ある実施形態では、透析濾過ステップは、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される。ある実施形態では、透析濾過ステップは、約 50 の温度で実施される。

【0319】

ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される。上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0320】

ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、

10

20

30

40

50

約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される。ある実施形態では、限外濾過ステップは、約 50 の温度で実施される。

【0321】

1.10 ホモジナイゼーション/サイジング

多糖は、精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってよい。

【0322】

ある実施形態では、本発明の精製された多糖の溶液（例えば、セクション 1.9 に記載の限外濾過および/または透析濾過によって得られた）は、サイジングされない。

10

【0323】

ある実施形態では、多糖を、サイジング技術によってホモジナイズすることができる。機械的または化学的サイジングを用いることができる。化学的加水分解を、例えば、酢酸を使用して行うことができる。機械的サイジングを、高圧ホモジナイゼーション剪断を使用して行うことができる。

【0324】

したがって、ある実施形態では、セクション 1.9 に記載の限外濾過および/または透析濾過によって得られた精製された多糖の溶液を、標的分子量にサイジングする。

【0325】

本明細書で使用される場合、多糖の「分子量」という用語は、例えば、多角度レーザー光散乱検出器 (MALLS) と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって計算される分子量を指す。

20

【0326】

一部の実施形態では、精製された多糖は、約 5 kDa ~ 約 4,000 kDa の分子量にサイジングされる。他のそのような実施形態では、精製された多糖は、約 10 kDa ~ 約 4,000 kDa の分子量にサイジングされる。他のそのような実施形態では、精製された多糖は、約 50 kDa ~ 約 4,000 kDa の分子量にサイジングされる。さらなるそのような実施形態では、精製された多糖は、約 50 kDa ~ 約 3,500 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 3,000 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 2,500 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 2,000 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 1,750 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 1,500 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 1,250 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 1,000 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 750 kDa ; 約 50 kDa ~ 約 500 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 4,000 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 3,500 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 3,000 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 2,500 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 2,250 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 2,000 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 1,750 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 1,500 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 1,250 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 1,000 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 750 kDa ; 約 100 kDa ~ 約 500 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 4,000 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 3,500 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 3,000 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 2,500 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 2,000 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 1,750 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 1,500 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 1,250 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 1,000 kDa ; 約 200 kDa ~ 約 750 kDa ; または約 200 kDa ~ 約 500 kDa の分子量にサイジングされる。さらなるそのような実施形態では、精製された多糖は、約 250 kDa ~ 約 3,500 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 3,000 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 2,500 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 2,000 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 1,750 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 1,500 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 1,250 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 1,000 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 750 kDa ; 約 250 kDa ~ 約 500 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 4,000 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 3,500 kDa ; 約 300 kDa および約 3,000 kDa ; 約 300 kDa および約 2,500 kDa ; 約 300 kDa および約 2,250 kDa ;

30

40

50

Da ; 約 300 kDa ~ 約 2,000 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 1,750 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 1,500 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 1,250 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 1,000 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 750 kDa ; 約 300 kDa ~ 約 500 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 4,000 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 3,500 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 3,000 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 2,500 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 2,250 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 2,000 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 1,750 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 1,500 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 1,250 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 1,000 kDa ; 約 500 kDa ~ 約 750 kDa ; または約 500 kDa ~ 約 600 kDa の分子量にサイジングされる。

【0327】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0328】

一部の実施形態では、精製された多糖は、約 5 kDa、約 10 kDa、約 15 kDa、約 20 kDa、約 25 kDa、約 30 kDa、約 35 kDa、約 40 kDa、約 45 kDa、約 50 kDa、約 75 kDa、約 90 kDa、約 100 kDa、約 150 kDa、約 200 kDa、約 250 kDa、約 300 kDa、約 350 kDa、約 400 kDa、約 450 kDa、約 500 kDa、約 550 kDa、約 600 kDa、約 650 kDa、約 700 kDa、約 750 kDa、約 800 kDa、約 850 kDa、約 900 kDa、約 950 kDa、約 1000 kDa、約 1250 kDa、約 1500 kDa、約 1750 kDa、約 2000 kDa、約 2250 kDa、約 2500 kDa、約 2750 kDa、約 3000 kDa、約 3250 kDa、約 3500 kDa、約 3750 kDa または約 4,000 kDa の分子量にサイジングされる。

【0329】

好ましい実施形態では、精製された多糖類は、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) の血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23F または 33F に由来する莢膜多糖であり、莢膜多糖は、上記の範囲の1つの中にあるか、またはおよそ上記のサイズを有する分子量を有する。

【0330】

1.11 滅菌濾過

ある実施形態では、本発明の精製された多糖の溶液は、滅菌濾過される。

【0331】

したがって、ある実施形態では、セクション 1.9 に記載の限外濾過および/または透析濾過の後、必要に応じて、滅菌濾過ステップを行ってもよい。

【0332】

ある実施形態では、セクション 1.10 に記載のホモジナイゼーション/サイジングステップが行われる場合、その後、必要に応じて、滅菌濾過ステップを行ってもよい。

【0333】

ある実施形態では、セクション 1.2 ~ 1.8 に記載のステップのいずれかの後、必要に応じて、滅菌濾過ステップを行ってもよい。

【0334】

ある実施形態では、滅菌濾過は、デッドエンド濾過（垂直濾過）である。ある実施形態では、滅菌濾過は、接線流濾過である。

【0335】

ある実施形態では、フィルターが、約 0.01 ~ 0.2 ミクロン、約 0.05 ~ 0.2 ミクロン、約 0.1 ~ 0.2 ミクロンまたは約 0.15 ~ 0.2 ミクロンの名目保持範囲を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0336】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0337】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、フィルターが約0.05、約0.1、約0.15または約0.2ミクロンの名目保持範囲を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0338】

ある実施形態では、フィルターが約0.2ミクロンの名目保持範囲を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0339】

ある実施形態では、フィルターが、約25~1500 L/m²、50~1500 L/m²、75~1500 L/m²、100~1500 L/m²、150~1500 L/m²、200~1500 L/m²、250~1500 L/m²、300~1500 L/m²、350~1500 L/m²、400~1500 L/m²、500~1500 L/m²、750~1500 L/m²、1000~1500 L/m²または1250~1500 L/m²のフィルター能力を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

10

【0340】

ある実施形態では、フィルターが、約25~1000 L/m²、50~1000 L/m²、75~1000 L/m²、100~1000 L/m²、150~1000 L/m²、200~1000 L/m²、250~1000 L/m²、300~1000 L/m²、350~1000 L/m²、400~1000 L/m²、500~1000 L/m²または750~1000 L/m²のフィルター能力を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0341】

ある実施形態では、フィルターが、25~500 L/m²、50~500 L/m²、75~500 L/m²、100~500 L/m²、150~500 L/m²、200~500 L/m²、250~500 L/m²、300~500 L/m²、350~500 L/m²または400~500 L/m²のフィルター能力を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

20

【0342】

ある実施形態では、フィルターが、25~300 L/m²、50~300 L/m²、75~300 L/m²、100~300 L/m²、150~300 L/m²、200~300 L/m²または250~300 L/m²のフィルター能力を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0343】

ある実施形態では、フィルターが、25~250 L/m²、50~250 L/m²、75~250 L/m²、100~250 L/m²、または150~250 L/m²、200~250 L/m²のフィルター能力を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

30

【0344】

ある実施形態では、フィルターが、25~100 L/m²、50~100 L/m²または75~100 L/m²のフィルター能力を有する滅菌濾過ステップによって、溶液を処理する。

【0345】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0346】

ある実施形態では、フィルターが約25、約50、約75、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400または約1500 L/m²のフィルター能力を有する精密濾過ステップによって、溶液を処理する。

40

【0347】

1.12 最終材料

多糖を、最終的に液体溶液として調製することができる。

【0348】

多糖を、さらにプロセッシングすることができる（例えば、乾燥粉末として凍結乾燥する

50

、WO 2006/110381を参照されたい)。したがって、ある実施形態では、多糖は、乾燥粉末である。

【0349】

ある実施形態では、多糖は、凍結乾燥ケーキである。

【0350】

2 精製された多糖類の使用

本発明の方法によって精製された多糖を、抗原として使用することができる。プレーン多糖類を、ワクチンにおける抗原として使用する(23価非コンジュゲート化肺炎球菌多糖ワクチンPneumovaxを参照されたい)。

【0351】

本発明の方法によって精製された多糖を、担体タンパク質にコンジュゲートして、糖コンジュゲートを得ることもできる。

【0352】

2.1 糖コンジュゲート

本発明の方法によって精製された多糖を、担体タンパク質にコンジュゲートして、糖コンジュゲートを得ることができる。

【0353】

本発明の目的のために、用語「糖コンジュゲート」は、担体タンパク質に共有的に連結された糖を示す。一実施形態では、糖は、担体タンパク質に直接連結される。第2の実施形態では、糖は、スパーサー/リンカーを介して担体タンパク質に連結される。

【0354】

一般に、糖類の担体への共有的コンジュゲーションは、それが、それらをT細胞非依存的抗原からT細胞依存的抗原に変換するため、糖類の免疫原性を増強し、かくして、免疫記憶のプライミングを可能にする。コンジュゲーションは、特に、小児用ワクチンにとって有用である。

【0355】

本発明の方法によって精製された多糖類を活性化(例えば、化学的に活性化)して、それらが反応することができるように(例えば、リンカーを用いて、または担体タンパク質を用いて直接的に)した後、本明細書にさらに記載されるように、糖コンジュゲート中に組み込むことができる。

【0356】

精製された多糖を、例えば、上記のセクション1.11に開示された方法によって、コンジュゲーションの前に標的分子量にサイジングすることができる。したがって、ある実施形態では、精製された多糖は、コンジュゲーションの前にサイジングされる。ある実施形態では、本明細書に開示される精製された多糖を、コンジュゲーションの前にサイジングして、オリゴ糖を得ることができる。オリゴ糖は、少数の反復単位(典型的には、5~15の反復単位)を有し、典型的には、多糖のサイジング(例えば、加水分解)によって誘導される。

【0357】

しかし好ましくは、コンジュゲーションのために使用される糖は、多糖である。高分子量の多糖類は、抗原性表面上に存在するエピトープのため、ある特定の抗体免疫応答を誘導することができる。高分子量の多糖類の単離および精製は、好ましくは、本発明のコンジュゲートにおける使用のために企図される。

【0358】

したがって、ある実施形態では、多糖は、サイジングされるが、多糖のままである。

【0359】

ある実施形態では、多糖は、サイジングされない。

【0360】

一部の実施形態では、コンジュゲーション前の精製された多糖(サイジング後またはサイジングされない)は、5kDa~4,000kDaの分子量を有する。他のそのような

10

20

30

40

50

実施形態では、精製された多糖は、10 kDa ~ 4,000 kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態では、精製された多糖は、50 kDa ~ 4,000 kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態では、多糖は、50 kDa ~ 3,500 kDa ; 50 kDa ~ 3,000 kDa ; 50 kDa ~ 2,500 kDa ; 50 kDa ~ 2,000 kDa ; 50 kDa ~ 1,750 kDa ; 50 kDa ~ 1,500 kDa ; 50 kDa ~ 1,250 kDa ; 50 kDa ~ 1,000 kDa ; 50 kDa ~ 750 kDa ; 50 kDa ~ 500 kDa ; 100 kDa ~ 4,000 kDa ; 100 kDa ~ 3,500 kDa ; 100 kDa ~ 3,000 kDa ; 100 kDa ~ 2,500 kDa ; 100 kDa ~ 2,250 kDa ; 100 kDa ~ 2,000 kDa ; 100 kDa ~ 1,750 kDa ; 100 kDa ~ 1,500 kDa ; 100 kDa ~ 1,250 kDa ; 100 kDa ~ 1,000 kDa ; 100 kDa ~ 750 kDa ; 100 kDa ~ 500 kDa ; 200 kDa ~ 4,000 kDa ; 200 kDa ~ 3,500 kDa ; 200 kDa ~ 3,000 kDa ; 200 kDa ~ 2,500 kDa ; 200 kDa ~ 2,250 kDa ; 200 kDa ~ 2,000 kDa ; 200 kDa ~ 1,750 kDa ; 200 kDa ~ 1,500 kDa ; 200 kDa ~ 1,250 kDa ; 200 kDa ~ 1,000 kDa ; 200 kDa ~ 750 kDa ; または200 kDa ~ 500 kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態では、多糖は、250 kDa ~ 3,500 kDa ; 250 kDa ~ 3,000 kDa ; 250 kDa ~ 2,500 kDa ; 250 kDa ~ 2,000 kDa ; 250 kDa ~ 1,750 kDa ; 250 kDa ~ 1,500 kDa ; 250 kDa ~ 1,250 kDa ; 250 kDa ~ 1,000 kDa ; 250 kDa ~ 750 kDa ; 250 kDa ~ 500 kDa ; 300 kDa ~ 4,000 kDa ; 300 kDa ~ 3,500 kDa ; 300 kDa ~ 3,000 kDa ; 300 kDa ~ 2,500 kDa ; 300 kDa ~ 2,250 kDa ; 300 kDa ~ 2,000 kDa ; 300 kDa ~ 1,750 kDa ; 300 kDa ~ 1,500 kDa ; 300 kDa ~ 1,250 kDa ; 300 kDa ~ 1,000 kDa ; 300 kDa ~ 750 kDa ; 300 kDa ~ 500 kDa ; 500 kDa ~ 4,000 kDa ; 500 kDa ~ 3,500 kDa ; 500 kDa ~ 3,000 kDa ; 500 kDa ~ 2,500 kDa ; 500 kDa ~ 2,250 kDa ; 500 kDa ~ 2,000 kDa ; 500 kDa ~ 1,750 kDa ; 500 kDa ~ 1,500 kDa ; 500 kDa ~ 1,250 kDa ; 500 kDa ~ 1,000 kDa ; 500 kDa ~ 750 kDa ; または500 kDa ~ 600 kDaの分子量を有する。

10

20

30

【0361】

上記の範囲のいずれかの中の任意の数が、本開示の実施形態として企図される。

【0362】

一部の実施形態では、精製された多糖は、約5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、75 kDa、90 kDa、100 kDa、150 kDa、200 kDa、250 kDa、300 kDa、350 kDa、400 kDa、450 kDa、500 kDa、550 kDa、600 kDa、650 kDa、700 kDa、750 kDa、800 kDa、850 kDa、900 kDa、950 kDa、1000 kDa、1250 kDa、1500 kDa、1750 kDa、2000 kDa、2250 kDa、2500 kDa、2750 kDa、3000 kDa、3250 kDa、3500 kDa、3750 kDaまたは4,000 kDaの分子量を有する。

40

【0363】

ある実施形態では、精製された多糖は、莢膜糖（多糖またはオリゴ糖）である。

【0364】

ある実施形態では、精製された多糖は、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）5型または8型莢膜多糖である。

【0365】

50

さらなる実施形態では、精製された多糖は、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、b型ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) に由来する莢膜多糖である。

【0366】

さらなる実施形態では、精製された多糖は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群A (MenA)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群W135 (MenW135)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群Y (MenY)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群X (MenX) または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群C (MenC) に由来する莢膜多糖である。

10

【0367】

さらなる実施形態では、精製された多糖は、大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、腸管毒素産生性大腸菌 (*Escherichia coli*) (ETEC)、病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EPEC)、腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) - O157:H7 (EHEC)、または腸管細胞侵入性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EIEC) などの腸毒性大腸菌 (*Escherichia coli*) 群 (EEC群) の大腸菌 (*Escherichia coli*) 部分に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、尿路病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) (UPEC) に由来する莢膜多糖である。

20

【0368】

ある実施形態では、精製された多糖は、血清型O157:H7、O26:H11、O111:H- およびO103:H2 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、血清型O6:K2:H1 およびO18:K1:H7 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、血清型O45:K1、O17:K52:H18、O19:H34 およびO7:K1 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O104:H4 に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O1:K12:H7 に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O127:H6 に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O139:H28 に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O128:H2 に由来する莢膜多糖である。

30

【0369】

さらなる実施形態では、精製された多糖は、溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌 (GBS)) に由来する莢膜多糖である。一部の実施形態では、精製された多糖は、GBS Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII およびVIII型の莢膜多糖類からなる群から選択される莢膜多糖である。一部の実施形態では、精製された多糖は、GBS Ia、Ib、II、III およびV型の莢膜多糖類からなる群から選択される莢膜多糖である。

40

【0370】

好ましい実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に由来する莢膜多糖である。ある実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型1

50

、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 23B に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 23F に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 24B に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 24F に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 29 に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 31 に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 33F に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 34 に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 35B に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 35F に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 38 に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 72 に由来する莢膜多糖である。さらなる実施形態では、精製された多糖は、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 73 に由来する莢膜多糖である。

10

20

【0371】

任意の好適なコンジュゲーション反応を、必要に応じて任意の好適なリンカーと共に使用することができる。例えば、WO 2007116028、17～22頁を参照されたい。

【0372】

本明細書に記載の精製されたオリゴ糖または多糖類を化学的に活性化して、担体タンパク質と反応することができる糖類を作製することができる。

【0373】

ある実施形態では、糖コンジュゲートを、還元的アミノ化を使用して調製する。

30

【0374】

還元的アミノ化は、2つのステップ、(1) 精製された糖の酸化(活性化)、(2) 糖コンジュゲートを形成させるための活性化された糖および担体タンパク質(例えば、CRM₁₉₇、DT、TTまたはPD)の還元(例えば、WO 2015110941、WO 2015110940を参照されたい)。

【0375】

上記のように、酸化の前に、標的分子量(MW)範囲への多糖のサイジングを実施することができる。機械的または化学的加水分解を用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を使用して行うことができる。ある実施形態では、精製された多糖のサイズを、機械的ホモジナイゼーションによって減少させる。

40

【0376】

ある実施形態では、精製された多糖またはオリゴ糖を、
 (a) 前記精製された多糖またはオリゴ糖を、酸化剤と反応させるステップ；
 (b) 必要に応じて、クエンチング剤の添加によって酸化反応をクエンチするステップ；
 (c) ステップ(a)または(b)の活性化された多糖またはオリゴ糖を、担体タンパク質と混合するステップ；ならびに
 (d) 混合された、活性化された多糖またはオリゴ糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、糖コンジュゲートを形成させるステップ
 を含むプロセスによって担体タンパク質にコンジュゲートさせる。

50

【0377】

酸化ステップ (a) の後、糖は、活性化されると言われ、「活性化された多糖またはオリゴ糖」と呼ばれる。

【0378】

酸化ステップ (a) は、過ヨウ素酸塩との反応を含んでもよい。本発明の目的のために、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む；この用語はまた、メタ過ヨウ素酸 (IO_4^-) とオルト過ヨウ素酸塩 (IO_6^{5-}) の両方および過ヨウ素酸の様々な塩 (例えば、過ヨウ素酸ナトリウムおよび過ヨウ素酸カリウム) も含む。

【0379】

好ましい実施形態では、酸化剤は、過ヨウ素酸ナトリウムである。ある実施形態では、酸化のために使用される過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸塩である。ある実施形態では、酸化のために使用される過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムである。

10

【0380】

酸化ステップ (a) は、アルデヒド基を含有する活性化された糖を産生するための、前記多糖またはオリゴ糖の一次ヒドロキシルを選択的に酸化する酸化剤の存在下での、ピペリジン - N - オキシまたはピロリジン - N - オキシ化合物などの、安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物との反応を含んでもよい (WO 2 0 1 4 0 9 7 0 9 9 を参照されたい) 。ある態様では、前記安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物は、WO 2 0 1 4 0 9 7 0 9 9 の 3 頁、1 4 行 ~ 4 頁、7 行に開示された任意のものであり、酸化剤は、WO 2 0 1 4 0 9 7 0 9 9 の 4 頁、8 ~ 1 5 行に開示された任意のものである。ある態様では、前記安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物は、2, 2, 6, 6 - テトラメチル - 1 - ピペリジニルオキシ (TEMPO) であり、酸化剤は、N - クロロスクシンイミド (NCS) である。

20

【0381】

一実施形態では、クエンチング剤は、WO 2 0 1 5 1 1 0 9 4 1 (3 0 頁、3 ~ 2 6 行を参照されたい) に開示されたものである。

【0382】

ある実施形態では、還元反応 (d) は、水性溶媒中で実行される。ある実施形態では、還元反応 (d) は、非プロトン性溶媒中で実行される。ある実施形態では、還元反応 (d) は、DMSO (ジメチルスルホキシド) またはDMF (ジメチルホルムアミド) 溶媒中で実行される。

30

【0383】

ある実施形態では、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、BronstedもしくはLewis酸の存在下での水素化ホウ素ナトリウムもしくは亜鉛、ピリジンボラン、2 - ピコリンボラン、2, 6 - ジボラン - メタノール、ジメチルアミン - ボラン、t - BuMeⁱPrN - BH₃、ベンジルアミン - BH₃または5 - エチル - 2 - メチルピリジンボラン (PEMB) などのアミンボランである。好ましい実施形態では、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0384】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に残存する未反応のアルデヒド基があってもよく、これらのものを、好適なキャッピング剤を使用してキャップすることができる。一実施形態では、このキャッピング剤は、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) である。

40

【0385】

担体タンパク質へのコンジュゲーション後、糖コンジュゲートを、当業者には公知の様々な技術によって精製する (糖 - タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する) ことができる。これらの技術としては、透析、濃縮 / 透析濾過操作、接線流濾過沈降 / 溶出、カラムクロマトグラフィー (DEAEまたは疎水性相互作用クロマトグラフィー) 、および深層濾過が挙げられる。

【0386】

ある実施形態では、糖コンジュゲートを、シアニル化化学を使用して調製する。

50

【0387】

ある実施形態では、精製された多糖またはオリゴ糖を、臭化シアンを用いて活性化する。活性化は、多糖またはオリゴ糖のヒドロキシル基のシアニル化に対応する。かくして、活性化された多糖またはオリゴ糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接的に、またはスペーサー（リンカー）基を介してカップリングする。

【0388】

ある実施形態では、精製された多糖またはオリゴ糖を、シアン酸エステルを形成するための1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸（CDAP）を用いて活性化する。かくして、活性化された多糖またはオリゴ糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接的に、またはスペーサー（リンカー）基を介してカップリングする。

10

【0389】

ある実施形態では、スペーサーは、マレイミド活性化された担体タンパク質（例えば、N-[-マレイミドブチロキシ]スクシンイミドエステル（GMB5）を使用する）またはハロアセチル担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、N-スクシンイミジルプロモ酢酸（SBA; SIB）、N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸（SIAB）、スルホスクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸（スルホ-SIAB）、N-スクシンイミジルヨード酢酸（SIA）もしくはスクシンイミジル3-[プロモアセトアミド]プロピオン酸（SBAP））との反応後に得られるチオエーテル結合によって担体にカップリングすることができるチオール化された多糖またはオリゴ糖を得るためのシスタミンまたはシステアミンであってよい。好ましくは、シ

20

【0390】

ある実施形態では、カルボニルジイミダゾール（CDI）またはカルボニルジトリアゾール（CDT）などのビス求電子試薬を使用することにより、糖コンジュゲートを調製する。そのような実施形態では、コンジュゲーション反応は、好ましくは、直接的経路により、または二属リンカー（例えば、WO2011041003を参照されたい）を使用し、DMFまたはDMSOなどの非プロトン性溶媒中で行われる。

30

【0391】

ある実施形態では、WO2014027302に開示された糖コンジュゲートを作製する方法により、糖コンジュゲートを調製する。得られる糖コンジュゲートは、二価、ヘテロ二官能性スペーサー（2-（（2-オキソエチル）チオ）エチル）カルバメート（eTEC）を介して担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされた糖を含む。あるいは、WO2015121783に開示された糖コンジュゲートを作製する方法により、糖コンジュゲートを調製する。

【0392】

他の好適なコンジュゲーション技術は、カルボジイミド（例えば、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドヒドロクロリド）、EDC+スルホNHS、CMC（1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリノエチル）カルボジイミド）、DCC（N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド）、またはDIC（ジイソプロピルカルボジイミド））を使用する。

40

【0393】

ある実施形態では、多糖またはオリゴ糖を、リンカー、例えば、二官能性リンカーを介して担体タンパク質にコンジュゲートする。リンカーは、例えば、反応性アミノ基と反応性カルボン酸基、2つの反応性アミノ基または2つの反応性カルボン酸基を有する、ヘテロ二官能性またはホモ二官能性であってもよい。リンカーは、例えば、4~20個、4~

50

12個、5～10個の炭素原子を有する。あり得るリンカーは、アジピン酸ジヒドラジド (ADH) である。他のリンカーとしては、B-プロピオンアミド (WO00/10599)、ニトロフェニル-エチルアミン、ハロアルキルハライド、グリコシド結合 (米国特許第4,673,574号、米国特許第4,808,700号)、ヘキサンジアミンおよび6-アミノカプロン酸 (米国特許第4,459,286号) が挙げられる。

【0394】

担体タンパク質

糖コンジュゲートの成分は、精製された多糖またはオリゴ糖がコンジュゲートされる担体タンパク質である。用語「タンパク質担体」または「担体タンパク質」または「担体」は、本明細書では互換的に使用することができる。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に適しているべきである。

【0395】

好ましい実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、DT (ジフテリア毒素)、TT (破傷風トキソイド) またはTTの断片C、CRM₁₉₇ (ジフテリア毒素の非毒性的であるが、抗原的に同一のバリエーション)、他のDT変異体 (CRM₁₇₆、CRM₂₂₈、CRM₄₅ (Uchidaら (1973) J. Biol. Chem. 218:3838~3844)、CRM₉、CRM₁₀₂、CRM₁₀₃ またはCRM₁₀₇; ならびにNichollsおよびYoule in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc. (1992) により記載された他の突然変異; Glu-148からAsp、GlnもしくはSerおよび/またはAla158からGlyへの欠失または突然変異ならびに米国特許第4,709,017号および第4,950,740号に開示された他の突然変異; Lys516、Lys526、Phe530および/またはLys534の少なくとも1つまたは複数の残基の突然変異ならびに米国特許第5,917,017号および第6,455,673号に開示された他の突然変異; または米国特許第5,843,711号に開示された断片、一部の様式で解毒されたply、例えば、dPLY-GMBS (WO2004/081515、WO2006/032499) またはdPLY-ホルモル、PhtA、PhtB、PhtD、PhtEを含むPhtX (PhtA、PhtB、PhtDまたはPhtEの配列は、WO00/37105およびWO00/39299に開示されている) およびPhtタンパク質の融合物、例えば、PhtDE融合物、PhtBE融合物、PhtA-E (WO01/98334、WO03/054007、WO2009/000826) を含む、肺炎球菌ニューモリシン (ply) (Kuoら (1995) Infect Immun 63:2706~2713)、通常、髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis) 血清群Bから抽出されるOMPc (髄膜炎菌外膜タンパク質) (EP0372501)、PorB (髄膜炎菌 (N. meningitidis) 由来)、PD (ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) タンパク質D; 例えば、EP0594610Bを参照されたい)、またはその免疫学的機能等価物、合成ペプチド (EP0378881、EP0427347)、熱ショックタンパク質 (WO93/17712、WO94/03208)、百日咳タンパク質 (WO98/58668、EP0471177)、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子またはホルモン (WO91/01146)、様々な病原体由来抗原に由来する複数のヒトCD4+T細胞エピトープを含む人工タンパク質 (Falugira (2001) Eur J Immunol 31:3816~3824)、例えば、N19タンパク質 (Baraldoira (2004) Infect Immun 72:4884~4887)、肺炎球菌表面タンパク質PspA (WO02/091998)、鉄取込みタンパク質 (WO01/72337)、クロストリジウム・ディフィシレ (Clostridium difficile) の毒素AまたはB (WO00/61761)、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌接着タンパク質 (PsaA)、組換え緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 外毒素A (特に、その毒性変異体 (グルタミン酸553に置換を担持する外毒素Aなど (Douglasら (1987) J. Bacteriol. 169(11):496

10

20

30

40

50

7～4971))からなる群から選択される。オブアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)またはツベルクリンの精製されたタンパク質誘導体(PPD)などの他のタンパク質も、担体タンパク質として使用することができる。他の好適な担体タンパク質としては、コレラトキソイド(例えば、WO2004/083251に記載されている)、大腸菌(*Escherichia coli*)LT、大腸菌(*E. coli*)ST、および緑膿菌(*P. aeruginosa*)に由来する外毒素Aなどの不活化細菌毒素が挙げられる。

【0396】

好ましい実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、TT、DT、DT変異体(CRM197など)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*H. influenzae*)タンパク質D、PhtX、PhtD、PhtDE融合物(特に、WO01/98334およびWO03/054007に記載のもの)、解毒されたニューモリシン、PorB、N19タンパク質、PspA、OMPc、クロストリジウム・ディフィシレ(*C. difficile*)の毒素AまたはBおよびPsaAからなる群から独立に選択される。

10

【0397】

ある実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、DT(ジフテリアトキソイド)である。別の実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、TT(破傷風トキソイド)である。

【0398】

別の実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、PD(ヘモフィルス・インフルエンザ(*H. influenzae*)タンパク質D;例えば、EP0594610Bを参照されたい)である。

20

【0399】

好ましい実施形態では、精製された多糖またはオリゴ糖を、CRM197タンパク質にコンジュゲートする。CRM197タンパク質は、ジフテリア毒素の非毒性形態であるが、ジフテリア毒素と免疫学的に識別不可能である。CRM197は、毒素原性コリネファージベータ(Uchidaら(1971) *Nature New Biology* 233:8-11)のニトロソグアニジン突然変異誘発によって創出された非毒素原性ファージ197tox-により感染したコリネバクテリウム・ジフテリア(*Corynebacterium diphtheriae*)によって産生される。CRM197タンパク質は、ジフテリア毒素と同じ分子量を有するが、構造遺伝子中の単一の塩基変化(グアニンからアデニンへの)によってそれと異なる。この単一の塩基変化は、成熟タンパク質中のアミノ酸置換(グルタミン酸からグリシンへの)を引き起こし、ジフテリア毒素の有毒性を除去する。CRM197タンパク質は、糖類のための安全かつ有効なT細胞依存的担体である。CRM197およびその産生に関するさらなる詳細は、例えば、米国特許第5,614,382号に見出すことができる。

30

【0400】

ある実施形態では、精製された多糖またはオリゴ糖を、CRM197タンパク質またはCRM197のA鎖にコンジュゲートする(CN103495161を参照されたい)。ある実施形態では、精製された多糖またはオリゴ糖を、遺伝子組換え大腸菌(*E. coli*)による発現を介して得られるCRM197のA鎖にコンジュゲートする(CN103495161を参照されたい)。

40

【0401】

好ましくは、糖コンジュゲート中の、担体タンパク質の多糖またはオリゴ糖に対する比は、1:5～5:1;例えば、1:0.5～4:1、例えば、1:1～3.5:1、1.2:1～3:1、1.5:1～2.5:1;例えば、1:2～2.5:1または1:1～2:1(w/w)である。ある実施形態では、糖コンジュゲート中の、担体タンパク質の多糖またはオリゴ糖に対する比は、約1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1または1.6:1である。

【0402】

50

担体タンパク質へのコンジュゲーション後、糖コンジュゲートを、当業者には公知の様々な技術によって精製する（糖-タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する）ことができる。これらの技術としては、透析、濃縮/透析濾過操作、接線流濾過沈降/溶出、カラムクロマトグラフィー（DEAEまたは疎水性相互作用クロマトグラフィー）、および深層濾過が挙げられる。

【0403】

組成物は、少量の遊離担体を含んでもよい。所与の担体タンパク質が本発明の組成物中で遊離形態とコンジュゲート化形態の両方で存在する場合、非コンジュゲート化形態は、好ましくは、全体として組成物中の担体タンパク質の総量の5%以下であり、より好ましくは、2重量%未満で存在する。

10

【0404】

2.2 免疫原性組成物

ある実施形態では、本発明は、本明細書に開示される精製された多糖および/または糖コンジュゲートのいずれかを含む免疫原性組成物に関する。

【0405】

ある実施形態では、本発明は、本明細書に開示される糖コンジュゲートのいずれかを含む免疫原性組成物に関する。

【0406】

ある実施形態では、本発明は、セクション2.1に開示された1~25種の異なる糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物に関する。

20

【0407】

ある実施形態では、本発明は、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）の異なる血清型に由来する1~25種の糖コンジュゲート（1~25種の肺炎球菌コンジュゲート）を含む免疫原性組成物に関する。一実施形態では、本発明は、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）の7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25種の異なる血清型に由来する糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物に関する。一実施形態では、免疫原性組成物は、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）の16または20種の異なる血清型に由来する糖コンジュゲートを含む。ある実施形態では、免疫原性組成物は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、14、15、16、17、18、または19種の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、16種の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、19種の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、20種の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。

30

【0408】

ある実施形態では、前記免疫原性組成物は、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fに由来する糖コンジュゲートを含む。

【0409】

ある実施形態では、前記免疫原性組成物は、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）血清型1、5および7Fに由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

40

【0410】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）血清型6Aおよび19Aに由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0411】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）血清型3に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0412】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌（*S. pneum*

50

oniae) 血清型 22F および 33F に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0413】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 8、10A、11A、12F および 15B に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0414】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 2 に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0415】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 9N に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

10

【0416】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 17F に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0417】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 20 に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0418】

ある実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 8、10A、11A、12F、15B、22F および 33F に由来する糖コンジュゲートを含む。

20

【0419】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 2 に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0420】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 9N に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0421】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 17F に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

30

【0422】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 20 に由来する糖コンジュゲートをさらに含む。

【0423】

しかし、好ましい実施形態では、糖は、タンパク質担体の異なる分子にそれぞれ個別にコンジュゲートされる (タンパク質担体の各分子は、それにコンジュゲートされた 1 つの型の糖だけを有する)。前記実施形態では、莢膜糖類は、担体タンパク質に個別にコンジュゲートされると言われる。好ましくは、上記免疫原性組成物の全ての糖コンジュゲートを、担体タンパク質に個別にコンジュゲートする。

【0424】

上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 22F に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 33F に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 15B に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 12F に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) 血清型 10A に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫

40

50

原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 11A に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 8 に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 4、6B、9V、14、18C、19F および 23F に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 1、5 および 7F に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 6A および 19A に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。上記免疫原性組成物のいずれかの実施形態では、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 3 に由来する糖コンジュゲートを、CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。

10

【0425】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかの糖コンジュゲートを、全て個別に CRM₁₉₇ にコンジュゲートする。

【0426】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかの肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14 および / または 23F に由来する糖コンジュゲートを、PD に個別にコンジュゲートする。

20

【0427】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかの肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 18C に由来する糖コンジュゲートを、TT にコンジュゲートする。

【0428】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかの肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 19F に由来する糖コンジュゲートを、DT にコンジュゲートする。

【0429】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物のいずれかの肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14 および / または 23F に由来する糖コンジュゲートを、PD に個別にコンジュゲートし、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 18C に由来する糖コンジュゲートを、TT にコンジュゲートし、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 19F に由来する糖コンジュゲートを、DT にコンジュゲートする。

30

【0430】

ある実施形態では、上記免疫原性組成物は、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) の 8 ~ 20 種の異なる血清型を含む。

【0431】

ある実施形態では、本発明は、異なる髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群に由来する 1 ~ 5 種の糖コンジュゲート (1 ~ 5 種の髄膜炎菌コンジュゲート) を含む免疫原性組成物に関する。一実施形態では、本発明は、1、2、3、4 または 5 種の異なる髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群に由来する糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物に関する。一実施形態では、免疫原性組成物は、4 または 5 種の異なる髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) を含む。ある実施形態では、免疫原性組成物は、1、2、3、4 または 5 個の髄膜炎菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、2 個の髄膜炎菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、4 個の髄膜炎菌コンジュゲート組成物である。ある実施形態では、免疫原性組成物は、5 個の髄膜炎菌コンジュゲート組成物である。

40

【0432】

ある実施形態では、免疫原性組成物は、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 Y 莢膜糖 (MenY)、および / またはコンジュゲート化髄膜炎菌

50

(*N. meningitidis*) 血清群 C 莢膜糖 (Men C) を含む。

【0433】

ある実施形態では、免疫原性組成物は、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 A 莢膜糖 (Men A)、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 W135 莢膜糖 (Men W135)、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 Y 莢膜糖 (Men Y)、および/またはコンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 C 莢膜糖 (Men C) を含む。

【0434】

ある実施形態では、免疫原性組成物は、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 W 莢膜糖 (Men W135)、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 Y 莢膜糖 (Men Y)、および/またはコンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 C 莢膜糖 (Men C) を含む。

10

【0435】

ある実施形態では、免疫原性組成物は、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 A 莢膜糖 (Men A)、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 W135 莢膜糖 (Men W135)、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 Y 莢膜糖 (Men Y)、コンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 C 莢膜糖 (Men C) および/またはコンジュゲート化髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群 X 莢膜糖 (Men X) を含む。

20

【0436】

一部の実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物は、少なくとも 1、2 または 3 つのアジュバントをさらに含んでもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物は、1 つのアジュバントをさらに含んでもよい。用語「アジュバント」とは、抗原に対する免疫応答を増強する化合物または混合物を指す。抗原は、主に送達系として、主に免疫モジュレーターとして作用するか、または両方の強力な特徴を有してもよい。好適なアジュバントとしては、ヒトを含む哺乳動物中での使用にとって好適なものが挙げられる。

【0437】

ヒトにおいて使用することができる公知の好適な送達系型アジュバントの例としては、限定されるものではないが、ミョウバン (例えば、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)、リン酸カルシウム、リポソーム、MF59 (4.3% w/v スクアレン、0.5% w/v ポリソルベート 80 (Tween 80)、0.5% w/v ソルビタントリオレート (Span 85)) などの水中油エマルジョン、モンタニドなどの油中水エマルジョン、およびポリ (D, L-ラクチド-コ-グリコリド) (PLG) マイクロ粒子またはナノ粒子が挙げられる。

30

【0438】

ある実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物は、アジュバントとしてアルミニウム塩 (ミョウバン) (例えば、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム) を含む。好ましい実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物は、アジュバントとしてリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムを含む。

40

【0439】

本明細書に開示される免疫原性組成物の有効性を増強するためのさらなる例示的なアジュバントとしては、限定されるものではないが、(1) 例えば、(a) 10% スクアラン、0.4% Tween 80、5% プルロニック遮断ポリマー L121、およびマイクロメートル以下のエマルジョンにマイクロ流体化された、またはより大きい粒径のエマルジョンを生成するためにボルテックスされた thr-MDP を含有する SAF、ならびに (b) 2% スクアレン、0.2% Tween 80、およびモノホスホリルリピド A (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM)、および細胞壁骨格 (CWS)、好ましくは、M

50

PL + CWS (DETOX (商標)) などの1つまたは複数の細菌細胞壁成分を含有する RIBI (商標) アジュバント系 (RAS) (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) などの、水中油エマルジョン製剤 (ムラミルペプチド (以下を参照されたい) または細菌細胞壁成分などの他の特定の免疫刺激剤を含む、または含まない); (2) QS 21、STIMULON (商標) (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)、ABISCO (登録商標) (Isconova, Sweden)、または使用することができる ISCOMATRIX (登録商標) (Commonwealth Serum Laboratories, Australia) もしくは ISCOM (免疫刺激複合体) などの、それから生成される粒子 (ISCOM はさらなる洗剤を含まなくてもよい (例えば、WO 00 / 07621 を参照されたい)) などのサポニンアジュバント; (3) 完全 Freund アジュバント (CFA) および不完全 Freund アジュバント (IFA); (4) インターロイキン (例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 12 (例えば、WO 99 / 44636 を参照されたい))、インターフェロン (例えば、ガンインターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカイン; (5) 必要に応じて、肺炎球菌糖類 (例えば、WO 00 / 56358 を参照されたい) と共に使用した場合、ミョウバンの実質的な非存在下にある、モノホスホリルリピド A (MPL) または 3-O-脱アシル化 MPL (3dMPL) (例えば、GB - 2220221、EP 0689454 を参照されたい); (6) 3dMPL と、例えば、QS 21 および / または水中油エマルジョンとの組合せ (例えば、EP 0835318、EP 0735898、EP 0761231 を参照されたい); (7) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル (例えば、WO 99 / 52549 を参照されたい); (8) オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤 (例えば、WO 01 / 21207) またはオクトキシノールなどの少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルもしくはエステル界面活性剤 (例えば、WO 01 / 21152); (9) サポニンおよび免疫刺激オリゴヌクレオチド (例えば、CpG オリゴヌクレオチド) (例えば、WO 00 / 62800); (10) 免疫刺激剤および金属塩の粒子 (例えば、WO 00 / 23105 を参照されたい); (11) サポニンおよび水中油エマルジョン (例えば、WO 99 / 11241); (12) サポニン (例えば、QS 21) + 3dMPL + IM2 (必要に応じて、+ ステロール) (例えば、WO 98 / 57659); (13) 組成物の効能を増強するための免疫刺激剤として作用する他の物質が挙げられる。ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-25アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (ノル-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (MTP-PE) などが挙げられる。

【0440】

本発明のある実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物は、アジュバントとして CpG オリゴヌクレオチドを含む。

【0441】

免疫原性組成物を、液体形態 (すなわち、溶液もしくは懸濁液) または凍結乾燥形態で製剤化することができる。有利には、液体製剤を、その包装形態から直接投与することができ、かくして、それらは、そうでなければ凍結乾燥された本発明の組成物にとって必要とされる水性媒体中での復元が必要とされず、注射にとって理想的である。

【0442】

本開示の免疫原性組成物の製剤化を、当業界で認識された方法を使用して達成することができる。例えば、個々の多糖類および / またはコンジュゲートを、生理的に許容されるビヒクルと共に製剤化して、組成物を調製することができる。そのようなビヒクルの例としては、限定されるものではないが、水、緩衝塩水、ポリオール (例えば、グリセロール

10

20

30

40

50

、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール)およびデキストロース溶液が挙げられる。

【0443】

本開示は、本明細書に開示される多糖または糖コンジュゲートの組合せのいずれかと、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤とを含む免疫原性組成物を提供する。

【0444】

ある実施形態では、本開示の免疫原性組成物は、液体形態、好ましくは、水性液体形態にある。

【0445】

本開示の免疫原性組成物は、緩衝剤、塩、二価陽イオン、非イオン性洗剤、糖などの凍結防止剤、およびフリーラジカルスカベンジャーもしくはキレート剤などの酸化防止剤のうちの1つもしくは複数、またはそれらの任意の複数の組合せを含んでもよい。

10

【0446】

ある実施形態では、本開示の免疫原性組成物は、緩衝剤を含む。ある実施形態では、前記緩衝剤は、約3.5~約7.5のpKaを有する。一部の実施形態では、緩衝剤は、リン酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、ヒスチジン緩衝剤またはクエン酸緩衝剤である。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、1mM~10mMの最終濃度のコハク酸緩衝剤である。1つの特定の実施形態では、コハク酸緩衝剤の最終濃度は、約5mMである。

【0447】

ある実施形態では、本開示の免疫原性組成物は、塩を含む。一部の実施形態では、塩は、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される。1つの特定の実施形態では、塩は、塩化ナトリウムである。1つの特定の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、150mMの塩化ナトリウムを含む。

20

【0448】

ある実施形態では、本開示の免疫原性組成物は、界面活性剤を含む。ある実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート20(TWEEN(商標)20)、ポリソルベート40(TWEEN(商標)40)、ポリソルベート60(TWEEN(商標)60)、ポリソルベート65(TWEEN(商標)65)、ポリソルベート80(TWEEN(商標)80)、ポリソルベート85(TWEEN(商標)85)、TRITON(商標)N-101、TRITON(商標)X-100、オクトキシノール40、ノノキシノール-9、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンポリペプチドオレート、ポリオキシエチレン-660ヒドロキシステアレート(PEG-15、Soluto1 H15)、ポリオキシエチレン-35-リシノレート(CREMOPHOR(登録商標)EL)、大豆レシチンおよびポロキサマーからなる群から選択される。1つの特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート80である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、少なくとも0.0001重量%~10重量%(w/w)ポリソルベート80である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、少なくとも0.001重量%~1重量%(w/w)ポリソルベート80である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、少なくとも0.01重量%~1重量%(w/w)ポリソルベート80である。他の実施形態では、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%または0.1重量%(w/w)ポリソルベート80である。別の実施形態では、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、1重量%(w/w)ポリソルベート80である。

30

40

【0449】

1つの特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート20である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート20の最終濃度は、少なくとも0.0001重量%~10重量%(w/w)ポリソルベート20である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート20の最終濃度は、少なくとも0.001重量%~1重量%(w/w)ポリソルベート20である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート20の最終

50

濃度は、少なくとも0.01重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート20である。他の実施形態では、製剤中のポリソルベート20の最終濃度は、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%または0.1重量%(w/w)ポリソルベート20である。別の実施形態では、製剤中のポリソルベート20の最終濃度は、1重量%(w/w)ポリソルベート20である。

【0450】

1つの特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート40である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート40の最終濃度は、少なくとも0.0001重量%～10重量%(w/w)ポリソルベート40である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート40の最終濃度は、少なくとも0.001重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート40である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート40の最終濃度は、少なくとも0.01重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート40である。他の実施形態では、製剤中のポリソルベート40の最終濃度は、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%または0.1重量%(w/w)ポリソルベート40である。別の実施形態では、製剤中のポリソルベート40の最終濃度は、1重量%(w/w)ポリソルベート40である。

10

【0451】

1つの特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート60である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート60の最終濃度は、少なくとも0.0001重量%～10重量%(w/w)ポリソルベート60である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート60の最終濃度は、少なくとも0.001重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート60である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート60の最終濃度は、少なくとも0.01重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート60である。他の実施形態では、製剤中のポリソルベート60の最終濃度は、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%または0.1重量%(w/w)ポリソルベート60である。別の実施形態では、製剤中のポリソルベート60の最終濃度は、1重量%(w/w)ポリソルベート60である。

20

【0452】

1つの特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート65である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート65の最終濃度は、少なくとも0.0001重量%～10重量%(w/w)ポリソルベート65である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート65の最終濃度は、少なくとも0.001重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート65である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート65の最終濃度は、少なくとも0.01重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート65である。他の実施形態では、製剤中のポリソルベート65の最終濃度は、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%または0.1重量%(w/w)ポリソルベート65である。別の実施形態では、製剤中のポリソルベート65の最終濃度は、1重量%(w/w)ポリソルベート65である。

30

40

【0453】

1つの特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート85である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート85の最終濃度は、少なくとも0.0001重量%～10重量%(w/w)ポリソルベート85である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート85の最終濃度は、少なくとも0.001重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート85である。一部の前記実施形態では、製剤中のポリソルベート85の最終濃度は、少なくとも0.01重量%～1重量%(w/w)ポリソルベート85である。他の実施形態では、製剤中のポリソルベート85の最終濃度は、0.01重量%、0.02

50

重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%または0.1重量%(w/w)ポリソルベート85である。別の実施形態では、製剤中のポリソルベート85の最終濃度は、1重量%(w/w)ポリソルベート85である。

【0454】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫原性組成物は、5.5~7.5のpH、より好ましくは、5.6~7.0のpH、さらにより好ましくは、5.8~6.0のpHを有する。

【0455】

一実施形態では、本開示は、本明細書に開示される免疫原性組成物のいずれかを充填した容器を提供する。一実施形態では、容器は、バイアル、シリンジ、フラスコ、発酵器、バイオリアクター、バッグ、ジャー、アンプル、カートリッジおよび使い捨てペンからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、容器はシリコン処理される。

10

【0456】

ある実施形態では、本開示の容器は、ガラス、金属(例えば、スチール、ステンレススチール、アルミニウムなど)および/またはポリマー(例えば、熱可塑性物質、エラストマー、熱可塑性物質-エラストマー)製である。ある実施形態では、本開示の容器は、ガラス製である。

【0457】

一実施形態では、本開示は、本明細書に開示される免疫原性組成物のいずれかを充填したシリンジを提供する。ある特定の実施形態では、シリンジは、シリコン処理される、および/またはガラス製である。

20

【0458】

注射のための免疫原性組成物の典型的な用量は、0.1mL~2mL、より好ましくは、0.2mL~1mL、さらにより好ましくは、約0.5mLの容量を有する。

【0459】

2.3 抗原としての使用

本発明の方法によって精製された多糖または本明細書に開示されるコンジュゲートを、抗原として使用することができる。例えば、それらはワクチンの一部であってもよい。

【0460】

したがって、ある実施形態では、本発明の方法によって精製された多糖類または前記多糖類を使用して得られた糖コンジュゲートは、対象における免疫応答を生成するのに使用するためのものである。一態様では、対象は、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシまたはイヌなどの哺乳動物である。一態様では、対象は、ヒトである。

30

【0461】

ある実施形態では、本発明の方法によって精製された多糖類、前記多糖類を使用して得られた糖コンジュゲートまたは本明細書に開示される免疫原性組成物は、ワクチンにおける使用のためのものである。

【0462】

ある実施形態では、本発明の方法によって精製された多糖類、前記多糖類を使用して得られた糖コンジュゲートまたは本明細書に開示される免疫原性組成物は、薬剤としての使用のためのものである。

40

【0463】

本明細書に記載の免疫原性組成物を、対象における細菌感染、疾患または状態を防止する、処置するまたは改善するための様々な治療または予防方法において使用することができる。特に、本明細書に記載の免疫原性組成物を使用して、対象における肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*) b型、大腸菌(*E. coli*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)または溶血性連鎖球菌(*S. agalact*

50

ia e) 感染、疾患または状態を防止、処置または改善することができる。

【0464】

かくして、一態様では、本開示は、対象における肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b型、大腸菌 (*E. coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) または溶血性連鎖球菌 (*S. agalactiae*) と関連する感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善する方法であって、対象に、免疫学的有効量の本開示の免疫原性組成物 (特に、その対応する多糖または糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物) を投与することを含む方法を提供する。

10

【0465】

ある実施形態では、本開示は、対象における肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b型、大腸菌 (*E. coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) または溶血性連鎖球菌 (*S. agalactiae*) に対する免疫応答を誘導する方法であって、対象に、免疫学的有効量の本開示の免疫原性組成物 (特に、その対応する多糖または糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物) を投与することを含む方法を提供する。

【0466】

ある実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物は、ワクチンとしての使用のためのものである。そのような実施形態では、本明細書に記載の免疫原性組成物を使用して、対象における肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b型、大腸菌 (*E. coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) または溶血性連鎖球菌 (*S. agalactiae*) 感染を防止することができる。かくして、一態様では、本発明は、対象における肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b型、大腸菌 (*E. coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) または溶血性連鎖球菌 (*S. agalactiae*) による感染を防止する方法であって、対象に、免疫学的有効量の本開示の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

20

【0467】

一態様では、対象は、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシまたはイヌなどの哺乳動物である。一態様では、対象は、ヒトである。

【0468】

本開示の免疫原性組成物を使用して、全身または粘膜経路を介して免疫原性組成物を投与することによって、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b型、大腸菌 (*E. coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) または溶血性連鎖球菌 (*S. agalactiae*) 感染に感受性のヒトを保護または処置することができる。ある実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物を、筋肉内、腹腔内、皮内または皮下経路によって投与する。ある実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物を、筋肉内、腹腔内、皮内または皮下注射によって投与する。ある実施形態では、本明細書に開示される免疫原性組成物を、筋肉内または皮下注射によって投与する。

40

【0469】

50

一部の場合、本開示による免疫原性組成物のわずか1用量が必要とされるが、より高い免疫欠損の状態などの一部の環境下では、第2、第3または第4の用量を与えてもよい。初回ワクチン接種の後、対象は、十分に間隔を空けた1回または数回の追加免疫を受けてもよい。

【0470】

ある実施形態では、本開示による免疫原性組成物のワクチン接種のスケジュールは、単回用量である。

【0471】

ある実施形態では、本開示による免疫原性組成物のワクチン接種のスケジュールは、複数回用量スケジュールである。

【0472】

3 本発明の特定の実施形態を、以下の番号付き段落に記載する。

【0473】

1. 細菌多糖を、夾雑物と一緒に前記多糖を含む溶液から精製するための方法であって、凝集ステップを含む方法。

【0474】

2. 凝集剤が多価陽イオンを含む、段落1に記載の方法。

【0475】

3. 前記多価陽イオンが、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される、段落2に記載の方法。

【0476】

4. 前記凝集剤が、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される少なくとも2つの多価陽イオンの混合物である、段落2に記載の方法。

【0477】

5. 前記凝集剤は、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる群から選択される少なくとも3つの多価陽イオンの混合物である、段落2に記載の方法。

【0478】

6. 前記凝集剤が、アルミニウム、鉄、カルシウムおよびマグネシウムからなる少なくとも4つの多価陽イオンの混合物である、段落2に記載の方法。

【0479】

7. 凝集剤が、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロヒドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、ポリエチレンジアミン（PEI）、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される薬剤を含む、段落1に記載の方法。

【0480】

8. 凝集剤が、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロヒドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される、段落1に記載の方法。

【0481】

9. 凝集剤がポリエチレンジアミン（PEI）である、段落1に記載の方法。

【0482】

10. 凝集剤がミョウバンを含む、段落1に記載の方法。

【0483】

11. 凝集剤がミョウバンである、段落1に記載の方法。

【0484】

12. 凝集剤がカリウムミョウバンを含む、段落1に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0485】

13. 凝集剤がカリウムミョウバンである、段落1に記載の方法。

【0486】

14. 凝集剤がナトリウムミョウバンを含む、段落1に記載の方法。

【0487】

15. 凝集剤がナトリウムミョウバンである、段落1に記載の方法。

【0488】

16. 凝集剤がアンモニウムミョウバンを含む、段落1に記載の方法。

【0489】

17. 凝集剤がアンモニウムミョウバンである、段落1に記載の方法。

10

【0490】

18. 凝集剤が、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、ポリエチレンイミン（PEI）、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される2つの薬剤の混合物である、段落1に記載の方法。ある実施形態では、凝集剤は、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される。

20

【0491】

19. 凝集剤が、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、ポリエチレンイミン（PEI）、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される3つの薬剤の混合物である、段落1に記載の方法。

【0492】

20. 凝集剤が、ミョウバン（例えば、カリウムミョウバン、ナトリウムミョウバンまたはアンモニウムミョウバン）、アルミニウムクロロハイドレート、硫酸アルミニウム、酸化カルシウム、水酸化カルシウム、硫酸鉄（II）（硫酸鉄）、塩化鉄（III）（塩化鉄）、ポリアクリルアミド、改変ポリアクリルアミド、ポリDADMAC、アルミン酸ナトリウムおよびケイ酸ナトリウムからなる群から選択される4つの薬剤の混合物である、段落1に記載の方法。

30

【0493】

21. 凝集剤が、キトサン、アイシングラス、ワサビノキ（*Moringa oleifera*）種子（ワサビノキ）、ゼラチン、ストリクノス・ポタトルム（*Strychnos potatorum*）種子（ニルマリナツツの木）、グアーガムおよびアルギネート（例えば、ワカメ抽出物）からなる群から選択される薬剤を含む、段落1に記載の方法。ある実施形態では、凝集剤は、キトサン、アイシングラス、ワサビノキ（*Moringa oleifera*）種子（ワサビノキ）、ゼラチン、ストリクノス・ポタトルム（*Strychnos potatorum*）種子（ニルマリナツツの木）、グアーガムおよびアルギネート（例えば、ワカメ抽出物）からなる群から選択される。

40

【0494】

22. 凝集剤が、キトサン、アイシングラス、ワサビノキ（*Moringa oleifera*）種子（ワサビノキ）、ゼラチン、ストリクノス・ポタトルム（*Strychnos potatorum*）種子（ニルマリナツツの木）、グアーガムおよびアルギネート（例えば、ワカメ抽出物）からなる群から選択される薬剤である、段落1に記載の方法

50

。ある実施形態では、凝集剤は、キトサン、アイシングラス、ワサビノキ (*Moringa oleifera*) 種子 (ワサビノキ)、ゼラチン、ストリクノス・ポタトルム (*Strychnos potatorum*) 種子 (ニルマリナツツの木)、グアーガムおよびアルギネート (例えば、ワカメ抽出物) からなる群から選択される。

【0495】

23. 凝集剤の濃度が、約0.1~約20% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0496】

24. 凝集剤の濃度が、約0.5~約10% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0497】

25. 凝集剤の濃度が、約1~約5% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0498】

26. 凝集剤の濃度が、約0.1、約0.25、約0.5、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5または約10% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0499】

27. 凝集剤の濃度が、約10.5、約11.0、約11.5、約12.0、約12.5、約13.0、約13.5、約14.0、約14.5、約15.0、約15.5、約16.0、約16.5、約17.0、約17.5、約18.0、約18.5、約19.0、約19.5または約20.0% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0500】

28. 凝集剤の濃度が、約0.5、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5または約5.0% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0501】

29. 凝集剤の濃度が、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5または約4.0% (w/v) である、段落1~22のいずれか1つに記載の方法。

【0502】

30. 凝集剤が、数秒 (例えば、1~10秒) ~約1カ月の期間にわたって添加される、段落1~29のいずれか1つに記載の方法。

【0503】

31. 凝集剤が、約2秒~約2週間の期間にわたって添加される、段落1~29のいずれか1つに記載の方法。

【0504】

32. 凝集剤が、約1分~約1週間の期間にわたって添加される、段落1~29のいずれか1つに記載の方法。

【0505】

33. 凝集剤が、約1分、約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約110分、約120分、約130分、約140分、約150分、約160分、約170分、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間または約24時間~約2日の期間にわたって添加される、段落1~29のいずれか1つに記載の方法。

【0506】

10

20

30

40

50

34.凝集剤が、約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約110分、約120分、約130分、約140分、約150分、約160分、約170分、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間または約12時間～約1日の期間にわたって添加される、段落1～29のいずれか1つに記載の方法。

【0507】

35.凝集剤が、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約110分、約120分、約130分、約140分、約150分、約160分、約170分、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間または約12時間～約1日の期間にわたって添加される、段落1～29のいずれか1つに記載の方法。

10

【0508】

36.凝集剤が、約15分～約3時間の期間にわたって添加される、段落1～29のいずれか1つに記載の方法。

【0509】

37.凝集剤が、約30分～約120分の期間にわたって添加される、段落1～29のいずれか1つに記載の方法。

【0510】

38.凝集剤が、約2秒、約10秒、約30秒、約1分、約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約75分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約105分、約110分、約115分、約120分、約125分、約130分、約135分、約140分、約145分、約150分、約155分、約160分、約170分、約3.0時間、約3.5時間、約4.0時間、約4.5時間、約5.0時間、約5.5時間、約6.0時間、約6.5時間、約7.0時間、約7.5時間、約8.0時間、約8.5時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約30時間、約36時間、約42時間、約48時間、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日、約11日、約12日、約13日、約14日または約15日の期間にわたって添加される、段落1～29のいずれか1つに記載の方法。

20

【0511】

39.凝集剤が、攪拌せずに添加される、段落1～38のいずれか1つに記載の方法。

【0512】

40.凝集剤が、攪拌下で添加される、段落1～38のいずれか1つに記載の方法。

【0513】

41.凝集剤が、穏やかな攪拌下で添加される、段落1～38のいずれか1つに記載の方法。

40

【0514】

42.凝集剤が、激しい攪拌下で添加される、段落1～38のいずれか1つに記載の方法。

【0515】

43.溶液が、下流のプロセッシングの前にフロックの沈降を可能にするためにいくらかの時間にわたって保持される、段落1～42のいずれか1つに記載の方法。

【0516】

44.凝集ステップが、数秒(例えば、2～10秒)～約1分の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

【0517】

50

45．凝集ステップが、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約55、少なくとも約60、少なくとも約65、少なくとも約70、少なくとも約75、少なくとも約80、少なくとも約85、少なくとも約90、少なくとも約95、少なくとも約100、少なくとも約105、少なくとも約110、少なくとも約115、少なくとも約120、少なくとも約125、少なくとも約130、少なくとも約135、少なくとも約140、少なくとも約145、少なくとも約150、少なくとも約155または少なくとも約160分の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

10

【0518】

46．沈降時間が1週間未満である、段落1～43に記載の方法。

【0519】

47．凝集ステップが、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約120、約140、約160、約180、約220、約240、約300、約360、約420、約480、約540、約600、約660、約720、約780、約840、約900、約960、約1020、約1080、約1140、約1200、約1260、約1320、約1380、約1440分、約2日、約3日、約4日、約5日または約6日～1週間の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

20

【0520】

48．凝集ステップが、数秒（例えば、1～10秒）～約1カ月の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

【0521】

49．凝集ステップが、約2秒～約2週間の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

【0522】

50．凝集ステップが、約1分～約1週間の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

30

【0523】

51．凝集ステップが、約1分、約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約110分、約120分、約130分、約140分、約150分、約160分、約170分、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間または約24時間～約2日の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

【0524】

52．凝集ステップが、約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約80分、約85分、約90分、約95分、約100分、約110分、約120分、約130分、約140分、約150分、約160分、約170分、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間または約12時間～約1日の沈降時間を用いて実施される、段落1～43のいずれか1つに記載の方法。

40

【0525】

53．凝集ステップが、約15分、約20分、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、約65分、約70分、約80分、約85

50

分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 110 分、約 120 分、約 130 分、約 140 分、約 150 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間または約 12 時間～約 1 日の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0526】

54．凝集ステップが、約 15 分～約 3 時間の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0527】

55．凝集ステップが、約 30 分～約 120 分の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0528】

56．凝集ステップが、約 10 秒、約 30 秒、約 1 分、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 75 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 105 分、約 110 分、約 115 分、約 120 分、約 125 分、約 130 分、約 135 分、約 140 分、約 145 分、約 150 分、約 155 分、約 160 分、約 170 分、約 3 時間、約 3.5 時間、約 4 時間、約 4.5 時間、約 5 時間、約 5.5 時間、約 6 時間、約 6.5 時間、約 7 時間、約 7.5 時間、約 8 時間、約 8.5 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間、約 24 時間、約 30 時間、約 36 時間、約 42 時間、約 48 時間、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日、約 11 日、約 12 日、約 13 日、約 14 日または約 15 日の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0529】

57．凝集ステップが、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 60、約 90、約 120、約 180、約 220、約 240、約 300、約 360、約 420、約 480、約 540、約 600、約 660、約 720、約 780、約 840、約 900、約 960、約 1020、約 1080、約 1140、約 1200、約 1260、約 1320、約 1380 または約 1440 分および 2 日の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0530】

58．凝集ステップが、約 5 分～約 1 日の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0531】

59．凝集ステップが、約 5 分～約 120 分の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0532】

60．凝集ステップが、約 5 分、約 10 分、約 15 分、約 20 分、約 25 分、約 30 分、約 35 分、約 40 分、約 45 分、約 50 分、約 55 分、約 60 分、約 65 分、約 70 分、約 75 分、約 80 分、約 85 分、約 90 分、約 95 分、約 100 分、約 105 分、約 110 分、約 115 分、約 120 分、約 125 分、約 130 分、約 135 分、約 140 分、約 145 分、約 150 分、約 155 分または約 160 分の沈降時間を用いて実施される、段落 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0533】

61．沈降ステップが、攪拌せずに行われる、段落 43～60 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0534】

62．沈降ステップが、攪拌下で行われる、段落 43～60 のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【 0 5 3 5 】

63．沈降ステップが、穏やかな攪拌下で行われる、段落43～60のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 3 6 】

64．沈降ステップが、激しい攪拌下で行われる、段落43～60のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 3 7 】

65．前記凝集ステップが、酸性pHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 3 8 】

66．前記凝集ステップが、7.0、6.0、5.0または4.0より下のpHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 3 9 】

67．前記凝集ステップが、7.0～1.0のpHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 0 】

68．前記凝集ステップが、5.5～2.5、5.0～2.5、4.5～2.5、4.0～2.5、5.5～3.0、5.0～3.0、4.5～3.0、4.0～3.0、5.5～3.5、5.0～3.5、4.5～3.5または4.0～3.5のpHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 1 】

69．前記凝集ステップが、約5.5、約5.0、約4.5、約4.0、約3.5、約3.0、約2.5、約2.0、約1.5または約1.0のpHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 2 】

70．前記凝集ステップが、約4.0、約3.5、約3.0または約2.5のpHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 3 】

71．前記凝集ステップが、約3.5のpHで実施される、段落1～64のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 4 】

72．前記酸性pHが、酸を用いて溶液を酸性化することによって得られる、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 5 】

73．前記酸性pHが、HCl、H₃PO₄、クエン酸、酢酸、亜硝酸、および硫酸からなる群から選択される酸を用いて溶液を酸性化することによって得られる、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 6 】

74．前記酸性pHが、アミノ酸を用いて溶液を酸性化することによって得られる、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 7 】

75．前記酸性pHが、グリシン、アラニンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸を用いて溶液を酸性化することによって得られる、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 8 】

76．前記酸性pHが、硫酸を用いて溶液を酸性化することによって得られる、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 4 9 】

77．酸が、攪拌下で添加される、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【 0 5 5 0 】

10

20

30

40

50

78．酸が、穏やかな攪拌下で添加される、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【0551】

79．酸が、激しい攪拌下で添加される、段落65～71のいずれか1つに記載の方法。

【0552】

80．凝集剤の添加が、約4～約30の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

【0553】

81．凝集剤の添加が、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29または約30の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

10

【0554】

82．凝集剤の添加が、約20の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

【0555】

83．凝集剤の添加が、約30～約95の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

【0556】

84．凝集剤の添加が、約35～約80の温度、約40～約70の温度、約45～約65の温度、約50～約60の温度、約50～約55の温度、約45～約55の温度または約45～約55の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

20

【0557】

85．凝集剤の添加が、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79または約80の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

30

【0558】

86．凝集剤の添加が、約50の温度で実施される、段落1～79のいずれか1つに記載の方法。

【0559】

87．存在する場合、沈降ステップが、約4～約30の温度で実施される、段落43～86のいずれか1つに記載の方法。

【0560】

88．存在する場合、沈降ステップが、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29または約30の温度で実施される、段落43～86のいずれか1つに記載の方法。

40

【0561】

89．存在する場合、沈降ステップが、約20の温度で実施される、段落43～86のいずれか1つに記載の方法。

【0562】

90．存在する場合、沈降ステップが、約30～約95の温度で実施される、段落43～86のいずれか1つに記載の方法。

50

【 0 5 6 3 】

9 1 . 存在する場合、沈降ステップが、約 3 5 ~ 約 8 0 の温度、約 4 0 ~ 約 7 0 の温度、約 4 5 ~ 約 6 5 の温度、約 5 0 ~ 約 6 0 の温度、約 5 0 ~ 約 5 5 の温度、約 4 5 ~ 約 5 5 の温度または約 4 5 ~ 約 5 5 の温度で実施される、段落 4 3 ~ 8 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 4 】

9 2 . 存在する場合、沈降ステップが、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3 、約 5 4 、約 5 5 、約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1 、約 6 2 、約 6 3 、約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9 、約 7 0 、約 7 1 、約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7 、約 7 8 、約 7 9 または約 8 0 の温度で実施される、段落 4 3 ~ 8 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 5 6 5 】

9 3 . 存在する場合、沈降ステップが、約 5 0 の温度で実施される、段落 4 3 ~ 8 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 6 】

9 4 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 4 ~ 約 3 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 7 】

9 5 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 または約 3 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 5 6 8 】

9 6 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 2 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 9 】

9 7 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 3 0 ~ 約 9 5 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 5 7 0 】

9 8 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 3 5 ~ 約 8 0 の温度、約 4 0 ~ 約 7 0 の温度、約 4 5 ~ 約 6 5 の温度、約 5 0 ~ 約 6 0 の温度、約 5 0 ~ 約 5 5 の温度、約 4 5 ~ 約 5 5 の温度または約 4 5 ~ 約 5 5 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 7 1 】

9 9 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3 、約 5 4 、約 5 5 、約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1 、約 6 2 、約 6 3 、約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9 、約 7 0 、約 7 1 、約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7 、約 7 8 、約 7 9 または約 8 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 5 7 2 】

1 0 0 . 存在する場合、酸性化ステップが、約 5 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 7 3 】

1 0 1 . 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 4 ~ 約 3 0 の温度

50

で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0574】

102. 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29 または約 30 の温度で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0575】

103. 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 20 の温度で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0576】

104. 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 30 ~ 約 95 の温度で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0577】

105. 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0578】

106. 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0579】

107. 存在する場合、凝集剤の添加および沈降ステップが、約 50 の温度で実施される、段落 1 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0580】

108. 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 4 ~ 約 30 の温度で実施される、段落 72 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0581】

109. 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29 または約 30 の温度で実施される、段落 72 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0582】

110. 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 20 の温度で実施される、段落 72 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0583】

111. 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 30 ~ 約 95 の温度で実施される、段落 72 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0584】

112. 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される、段落 72 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 5 8 5 】

1 1 3 . 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3 、約 5 4 、約 5 5 、約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1 、約 6 2 、約 6 3 、約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9 、約 7 0 、約 7 1 、約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7 、約 7 8 、約 7 9 または約 8 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 8 6 】

1 1 4 . 凝集剤の添加および酸性化ステップが、約 5 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 8 7 】

1 1 5 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、約 4 ~ 約 3 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 8 8 】

1 1 6 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 または約 3 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 8 9 】

1 1 7 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、約 2 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 9 0 】

1 1 8 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、約 3 0 ~ 約 9 5 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 9 1 】

1 1 9 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、約 3 5 ~ 約 8 0 の温度、約 4 0 ~ 約 7 0 の温度、約 4 5 ~ 約 6 5 の温度、約 5 0 ~ 約 6 0 の温度、約 5 0 ~ 約 5 5 の温度、約 4 5 ~ 約 5 5 の温度または約 4 5 ~ 約 5 5 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 9 2 】

1 2 0 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 、約 5 1 、約 5 2 、約 5 3 、約 5 4 、約 5 5 、約 5 6 、約 5 7 、約 5 8 、約 5 9 、約 6 0 、約 6 1 、約 6 2 、約 6 3 、約 6 4 、約 6 5 、約 6 6 、約 6 7 、約 6 8 、約 6 9 、約 7 0 、約 7 1 、約 7 2 、約 7 3 、約 7 4 、約 7 5 、約 7 6 、約 7 7 、約 7 8 、約 7 9 または約 8 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 9 3 】

1 2 1 . 凝集剤の添加、沈降および酸性化ステップが、約 5 0 の温度で実施される、段落 7 2 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 9 4 】

1 2 2 . 凝集ステップが、pH調整なしに凝集剤を添加することを含む、段落 1 ~ 7 1 、8 0 ~ 9 3 または 1 0 1 ~ 1 0 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 9 5 】

1 2 3 . 凝集ステップが、凝集剤を添加すること、pHを調整すること、および溶液を沈降させることを含む、段落 1 ~ 1 2 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 5 9 6 】

1 2 4 . 凝集剤が、p Hを調整する前に添加される、段落 1 2 3 に記載の方法。

【 0 5 9 7 】

1 2 5 . p Hが、凝集剤を添加する前に調整される、段落 1 2 3 に記載の方法。

【 0 5 9 8 】

1 2 6 . p Hが、凝集剤を添加し、溶液を沈降させる前に調整される、段落 1 2 3 に記載の方法。

【 0 5 9 9 】

1 2 7 . p Hを調整する前に、凝集剤が添加され、溶液が沈降される、段落 1 2 3 に記載の方法。

10

【 0 6 0 0 】

1 2 8 . 凝集の後に、懸濁液がデカンテーション、沈降化、濾過または遠心分離によって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 1 】

1 2 9 . 凝集の後に、懸濁液がデカンテーションによって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 2 】

1 3 0 . 凝集の後に、懸濁液が液体遠心分離によって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 3 】

1 3 1 . 凝集の後に、懸濁液が沈降化によって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 6 0 4 】

1 3 2 . 凝集の後に、懸濁液がフローテーションによって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 5 】

1 3 3 . 凝集の後に、懸濁液が濾過によって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 6 】

1 3 4 . 凝集の後に、懸濁液が遠心分離によって清澄化される、段落 1 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 6 0 7 】

1 3 5 . 多糖含有溶液が、保存のために収集される、段落 1 2 7 ~ 1 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 8 】

1 3 6 . 多糖含有溶液が、さらなるプロセッシングのために収集される、段落 1 2 7 ~ 1 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 0 9 】

1 3 7 . 多糖含有溶液が、保存された後、さらにプロセッシングされる、段落 1 2 7 ~ 1 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 6 1 0 】

1 3 8 . 前記遠心分離が、連続遠心分離である、段落 1 3 4 ~ 1 3 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 1 1 】

1 3 9 . 前記遠心分離が、バケツト遠心分離である、段落 1 3 4 ~ 1 3 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 1 2 】

1 4 0 . 懸濁液が、約 1 , 0 0 0 g、約 2 , 0 0 0 g、約 3 , 0 0 0 g、約 4 , 0 0 0 g、約 5 , 0 0 0 g、約 6 , 0 0 0 g、約 8 , 0 0 0 g、約 9 , 0 0 0 g、約 1 0 , 0 0 0 g、約 1 1 , 0 0 0 g、約 1 2 , 0 0 0 g、約 1 3 , 0 0 0 g、約 1 4 , 0 0 0 g、約

50

15,000g、約16,000g、約17,000g、約18,000g、約19,000g、約20,000g、約25,000g、約30,000g、約35,000g、約40,000g、約50,000g、約60,000g、約70,000g、約80,000g、約90,000g、約100,000g、約120,000g、約140,000g、約160,000gまたは約180,000gで遠心分離される、段落134～139のいずれか1つに記載の方法。

【0613】

141. 懸濁液が、約8,000g、約9,000g、約10,000g、約11,000g、約12,000g、約13,000g、約14,000g、約15,000g、約16,000g、約17,000g、約18,000g、約19,000g、約20,000gまたは約25,000gで遠心分離される、段落134～139のいずれか1つに記載の方法。

10

【0614】

142. 懸濁液が、約5,000g～約25,000gで遠心分離される、段落134～139のいずれか1つに記載の方法。

【0615】

143. 懸濁液が、約8,000g～約20,000gで遠心分離される、段落134～139のいずれか1つに記載の方法。

【0616】

144. 懸濁液が、約10,000g～約15,000gで遠心分離される、段落134～139のいずれか1つに記載の方法。

20

【0617】

145. 懸濁液が、約10,000g～約12,000gで遠心分離される、段落134～139のいずれか1つに記載の方法。

【0618】

146. 懸濁液が、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100、少なくとも105、少なくとも110、少なくとも115、少なくとも120、少なくとも125、少なくとも130、少なくとも135、少なくとも140、少なくとも145、少なくとも150、少なくとも155または少なくとも約160分、遠心分離される、段落134～145のいずれか1つに記載の方法。

30

【0619】

147. 懸濁液が、24時間未満、遠心分離される、段落146に記載の方法。

【0620】

148. 懸濁液が、約5、約10、約15、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約120、約140、約160、約180、約220、約240、約300、約360、約420、約480、約540、約600、約660、約720、約780、約840、約900、約960、約1020、約1080、約1140、約1200、約1260、約1320または約1380分～1440分、遠心分離される、段落134～145のいずれか1つに記載の方法。

40

【0621】

149. 好ましくは、懸濁液は、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約60、約90、約120、約180、約240、約300、約360、約420、約480、または約540分～約600分、遠心分離される。

【0622】

150. 懸濁液が、約5分～約3時間、遠心分離される、段落134～145のいずれか1つに記載の方法。

50

【 0 6 2 3 】

1 5 1 . 懸濁液が、約 5 分～約 1 2 0 分、遠心分離される、段落 1 3 4 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 2 4 】

1 5 2 . 懸濁液が、約 5 分、約 1 0 分、約 1 5 分、約 2 0 分、約 2 5 分、約 3 0 分、約 3 5 分、約 4 0 分、約 4 5 分、約 5 0 分、約 5 5 分、約 6 0 分、約 6 5 分、約 7 0 分、約 7 5 分、約 8 0 分、約 8 5 分、約 9 0 分、約 9 5 分、約 1 0 0 分、約 1 0 5 分、約 1 1 0 分、約 1 1 5 分、約 1 2 0 分、約 1 2 5 分、約 1 3 0 分、約 1 3 5 分、約 1 4 0 分、約 1 4 5 分、約 1 5 0 分または約 1 5 5 分～約 1 6 0 分、遠心分離される、段落 1 3 4 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 6 2 5 】

1 5 3 . 懸濁液が、約 1 0 分、約 1 5 分、約 2 0 分、約 2 5 分、約 3 0 分、約 3 5 分、約 4 0 分、約 4 5 分、約 5 0 分または約 5 5 分～約 6 0 分、遠心分離される、段落 1 3 4 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 2 6 】

1 5 4 . 懸濁液が、約 5、約 1 0、約 1 5、約 2 0、約 3 0、約 4 0、約 5 0、約 6 0、約 7 0、約 8 0、約 9 0、約 1 0 0、約 1 2 0、約 1 4 0、約 1 6 0、約 1 8 0、約 2 2 0、約 2 4 0、約 3 0 0、約 3 6 0、約 4 2 0、約 4 8 0、約 5 4 0、約 6 0 0、約 6 6 0、約 7 2 0、約 7 8 0、約 8 4 0、約 9 0 0、約 9 6 0、約 1 0 2 0、約 1 0 8 0、約 1 1 4 0、約 1 2 0 0、約 1 2 6 0、約 1 3 2 0、約 1 3 8 0 分または約 1 4 4 0 分、遠心分離される、段落 1 3 4 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 6 2 7 】

1 5 5 . 懸濁液が、約 5 分、約 1 0 分、約 1 5 分、約 2 0 分、約 2 5 分、約 3 0 分、約 3 5 分、約 4 0 分、約 4 5 分、約 5 0 分、約 5 5 分、約 6 0 分、約 6 5 分、約 7 0 分、約 7 5 分、約 8 0 分、約 8 5 分、約 9 0 分、約 9 5 分、約 1 0 0 分、約 1 0 5 分、約 1 1 0 分、約 1 1 5 分、約 1 2 0 分、約 1 2 5 分、約 1 3 0 分、約 1 3 5 分、約 1 4 0 分、約 1 4 5 分、約 1 5 0 分、約 1 5 5 分または約 1 6 0 分、遠心分離される、段落 1 3 4 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 2 8 】

1 5 6 . 前記遠心分離が連続遠心分離であり、供給速度が 5 0 ~ 5 0 0 0 m l / 分、1 0 0 ~ 4 0 0 0 m l / 分、1 5 0 ~ 3 0 0 0 m l / 分、2 0 0 ~ 2 5 0 0 m l / 分、2 5 0 ~ 2 0 0 0 m l / 分、3 0 0 ~ 1 5 0 0 m l / 分、3 0 0 ~ 1 0 0 0 m l / 分、2 0 0 ~ 1 0 0 0 m l / 分、2 0 0 ~ 1 5 0 0 m l / 分、4 0 0 ~ 1 5 0 0 m l / 分、5 0 0 ~ 1 5 0 0 m l / 分、5 0 0 ~ 1 0 0 0 m l / 分、5 0 0 ~ 2 0 0 0 m l / 分、5 0 0 ~ 2 5 0 0 m l / 分または 1 0 0 0 ~ 2 5 0 0 m l / 分である、段落 1 3 4 ~ 1 3 8 または 1 4 0 ~ 1 5 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 6 2 9 】

1 5 7 . 前記遠心分離が連続遠心分離であり、供給速度が約 1 0、約 2 5、約 5 0、約 7 5、約 1 0 0、約 1 5 0、約 2 0 0、約 2 5 0、約 3 0 0、約 3 5 0、約 4 0 0、約 4 5 0、約 5 0 0、約 5 5 0、約 6 0 0、約 6 5 0、約 7 0 0、約 7 5 0、約 8 0 0、約 8 5 0、約 9 0 0、約 9 5 0、約 1 0 0 0、約 1 0 5 0、約 1 1 0 0、約 1 1 5 0、約 1 2 0 0、約 1 2 5 0、約 1 3 0 0、約 1 3 5 0、約 1 4 0 0、約 1 4 5 0、約 1 5 0 0、約 1 6 5 0、約 1 7 0 0、約 1 8 0 0、約 1 9 0 0、約 2 0 0 0、約 2 1 0 0、約 2 2 0 0、約 2 3 0 0、約 2 4 0 0、約 2 5 0 0、約 2 6 0 0、約 2 7 0 0、約 2 8 0 0、約 2 9 0 0、約 3 0 0 0、約 3 2 5 0、約 3 5 0 0、約 3 7 5 0、約 4 0 0 0、約 4 2 5 0、約 4 5 0 0 または約 5 0 0 0 m l / 分である、段落 1 3 4 ~ 1 3 8 または 1 4 0 ~ 1 5 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 6 3 0 】

1 5 8 . 多糖含有溶液が、濾過される、段落 1 ~ 1 5 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 6 3 1 】

50

159. 前記濾過が、深層濾過、活性炭を通す濾過、サイズ濾過、透析濾過および限外濾過からなる群から選択される、段落158に記載の方法。

【0632】

160. 前記濾過が透析濾過である、段落158に記載の方法。

【0633】

161. 前記濾過が接線流濾過である、段落160に記載の方法。

【0634】

162. 前記濾過が深層濾過である、段落158に記載の方法。

【0635】

163. 深層フィルター設計が、カセット、カートリッジ、ディープベッド（例えば、サンドフィルター）およびレンズ状フィルターからなる群から選択される、段落162に記載の方法。

10

【0636】

164. 深層フィルターが、約0.01~100ミクロン、約0.05~100ミクロン、約0.1~100ミクロン、約0.2~100ミクロン、約0.3~100ミクロン、約0.4~100ミクロン、約0.5~100ミクロン、約0.6~100ミクロン、約0.7~100ミクロン、約0.8~100ミクロン、約0.9~100ミクロン、約1~100ミクロン、約1.25~100ミクロン、約1.5~100ミクロン、約1.75~100ミクロン、約2~100ミクロン、約3~100ミクロン、約4~100ミクロン、約5~100ミクロン、約6~100ミクロン、約7~100ミクロン、約8~100ミクロン、約9~100ミクロン、約10~100ミクロン、約15~100ミクロン、約20~100ミクロン、約25~100ミクロン、約30~100ミクロン、約40~100ミクロン、約50~100ミクロンまたは約75~100ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158~159または162~163のいずれか1つに記載の方法。

20

【0637】

165. 深層フィルターが、約0.01~75ミクロン、約0.05~75ミクロン、約0.1~75ミクロン、約0.2~75ミクロン、約0.3~75ミクロン、約0.4~75ミクロン、約0.5~75ミクロン、約0.6~75ミクロン、約0.7~75ミクロン、約0.8~75ミクロン、約0.9~75ミクロン、約1~75ミクロン、約1.25~75ミクロン、約1.5~75ミクロン、約1.75~75ミクロン、約2~75ミクロン、約3~75ミクロン、約4~75ミクロン、約5~75ミクロン、約6~75ミクロン、約7~75ミクロン、約8~75ミクロン、約9~75ミクロン、約10~75ミクロン、約15~75ミクロン、約20~75ミクロン、約25~75ミクロン、約30~75ミクロン、約40~75ミクロンまたは約50~75ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158~159または162~163のいずれか1つに記載の方法。

30

【0638】

166. 深層フィルターが、約0.01~50ミクロン、約0.05~50ミクロン、約0.1~50ミクロン、約0.2~50ミクロン、約0.3~50ミクロン、約0.4~50ミクロン、約0.5~50ミクロン、約0.6~50ミクロン、約0.7~50ミクロン、約0.8~50ミクロン、約0.9~50ミクロン、約1~50ミクロン、約1.25~50ミクロン、約1.5~50ミクロン、約1.75~50ミクロン、約2~50ミクロン、約3~50ミクロン、約4~50ミクロン、約5~50ミクロン、約6~50ミクロン、約7~50ミクロン、約8~50ミクロン、約9~50ミクロン、約10~50ミクロン、約15~50ミクロン、約20~50ミクロン、約25~50ミクロン、約30~50ミクロン、約40~50ミクロンまたは約50~50ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158~159または162~163のいずれか1つに記載の方法。

40

【0639】

167. 深層フィルターが、約0.01~25ミクロン、約0.05~25ミクロン、約0.1~25ミクロン、約0.2~25ミクロン、約0.3~25ミクロン、約0.4~25ミクロン、約0.5~25ミクロン、約0.6~25ミクロン、約0.7~25ミ

50

クロン、約0.8～2.5ミクロン、約0.9～2.5ミクロン、約1～2.5ミクロン、約1.25～2.5ミクロン、約1.5～2.5ミクロン、約1.75～2.5ミクロン、約2～2.5ミクロン、約3～2.5ミクロン、約4～2.5ミクロン、約5～2.5ミクロン、約6～2.5ミクロン、約7～2.5ミクロン、約8～2.5ミクロン、約9～2.5ミクロン、約10～2.5ミクロン、約1.5～2.5ミクロンまたは約2.0～2.5ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つに記載の方法。

【0640】

168. 深層フィルターが、約0.01～1.0ミクロン、約0.05～1.0ミクロン、約0.1～1.0ミクロン、約0.2～1.0ミクロン、約0.3～1.0ミクロン、約0.4～1.0ミクロン、約0.5～1.0ミクロン、約0.6～1.0ミクロン、約0.7～1.0ミクロン、約0.8～1.0ミクロン、約0.9～1.0ミクロン、約1～1.0ミクロン、約1.25～1.0ミクロン、約1.5～1.0ミクロン、約1.75～1.0ミクロン、約2～1.0ミクロン、約3～1.0ミクロン、約4～1.0ミクロン、約5～1.0ミクロン、約6～1.0ミクロン、約7～1.0ミクロン、約8～1.0ミクロンまたは約9～1.0ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つに記載の方法。

10

【0641】

169. 深層フィルターが、約0.01～8ミクロン、約0.05～8ミクロン、約0.1～8ミクロン、約0.2～8ミクロン、約0.3～8ミクロン、約0.4～8ミクロン、約0.5～8ミクロン、約0.6～8ミクロン、約0.7～8ミクロン、約0.8～8ミクロン、約0.9～8ミクロン、約1～8ミクロン、約1.25～8ミクロン、約1.5～8ミクロン、約1.75～8ミクロン、約2～8ミクロン、約3～8ミクロン、約4～8ミクロン、約5～8ミクロン、約6～8ミクロンまたは約7～8ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つに記載の方法。

20

【0642】

170. 深層フィルターが、約0.01～5ミクロン、約0.05～5ミクロン、約0.1～5ミクロン、約0.2～5ミクロン、約0.3～5ミクロン、約0.4～5ミクロン、約0.5～5ミクロン、約0.6～5ミクロン、約0.7～5ミクロン、約0.8～5ミクロン、約0.9～5ミクロン、約1～5ミクロン、約1.25～5ミクロン、約1.5～5ミクロン、約1.75～5ミクロン、約2～5ミクロン、約3～5ミクロンまたは約4～5ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つに記載の方法。

30

【0643】

171. 深層フィルターが、約0.01～2ミクロン、約0.05～2ミクロン、約0.1～2ミクロン、約0.2～2ミクロン、約0.3～2ミクロン、約0.4～2ミクロン、約0.5～2ミクロン、約0.6～2ミクロン、約0.7～2ミクロン、約0.8～2ミクロン、約0.9～2ミクロン、約1～2ミクロン、約1.25～2ミクロン、約1.5～2ミクロン、約1.75～2ミクロン、約2～2ミクロン、約3～2ミクロンまたは約4～2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つに記載の方法。

40

【0644】

172. 深層フィルターが、約0.01～1ミクロン、約0.05～1ミクロン、約0.1～1ミクロン、約0.2～1ミクロン、約0.3～1ミクロン、約0.4～1ミクロン、約0.5～1ミクロン、約0.6～1ミクロン、約0.7～1ミクロン、約0.8～1ミクロンまたは約0.9～1ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つに記載の方法。

【0645】

173. 深層フィルターが、約0.05～5.0ミクロン、0.1～2.5ミクロン、0.2～1.0ミクロン、0.1～1.0ミクロン、0.2～5ミクロンまたは0.25～1ミクロンの名目保持範囲を有する、段落158～159または162～163のいずれか1つ

50

に記載の方法。

【0646】

174. 深層フィルターが、 $1 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $150 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $750 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $1000 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ 、 $1500 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ または $2000 \sim 2500 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0647】

175. 深層フィルターが、 $1 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $150 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ 、 $500 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ または $750 \sim 1000 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0648】

176. 深層フィルターが、 $1 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $150 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 750 \text{ L/m}^2$ 、 $400 \sim 750 \text{ L/m}^2$ または $500 \sim 750 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落155～156または159～170のいずれか1つに記載の方法。

【0649】

177. 深層フィルターが、 $1 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $150 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 500 \text{ L/m}^2$ または $400 \sim 500 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0650】

178. 深層フィルターが、 $1 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $150 \sim 400 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 400 \text{ L/m}^2$ または $300 \sim 400 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0651】

179. 深層フィルターが、 $1 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 300 \text{ L/m}^2$ 、 $150 \sim 300 \text{ L/m}^2$ または $200 \sim 300 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0652】

180. 深層フィルターが、 $1 \sim 200 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 200 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 200 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 200 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 200 \text{ L/m}^2$ 、 $75 \sim 200 \text{ L/m}^2$ 、 $100 \sim 200 \text{ L/m}^2$ または $150 \sim 200 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0653】

181. 深層フィルターが、 $1 \sim 100 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 100 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 100 \text{ L/m}^2$ 、 $25 \sim 100 \text{ L/m}^2$ 、 $50 \sim 100 \text{ L/m}^2$ または $75 \sim 100 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0654】

10

20

30

40

50

182. 深層フィルターが、 $1 \sim 50 \text{ L/m}^2$ 、 $5 \sim 50 \text{ L/m}^2$ 、 $10 \sim 50 \text{ L/m}^2$ または $25 \sim 50 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落158～159または162～173のいずれか1つに記載の方法。

【0655】

183. 供給速度が $1 \sim 1000 \text{ LMH}$ (リットル/ m^2 /時間)、 $10 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $25 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $50 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $100 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $125 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $150 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $200 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $250 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $300 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $400 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $500 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $600 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $700 \sim 1000 \text{ LMH}$ 、 $800 \sim 1000 \text{ LMH}$ または $900 \sim 1000 \text{ LMH}$ である、段落158～159または162～182のいずれか1つ

10

【0656】

184. 供給速度が $1 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $10 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $25 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $50 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $100 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $125 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $150 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $200 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $250 \sim 500 \text{ LMH}$ 、 $300 \sim 500 \text{ LMH}$ または $400 \sim 500 \text{ LMH}$ である、段落158～159または162～182のいずれか1つに記載の方法。

【0657】

185. 供給速度が $1 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $10 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $25 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $50 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $100 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $125 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $150 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $200 \sim 400 \text{ LMH}$ 、 $250 \sim 400 \text{ LMH}$ または $300 \sim 400 \text{ LMH}$ である、段落158～159または162～182のいずれか1つに記載の方法。

20

【0658】

186. 供給速度が $1 \sim 250 \text{ LMH}$ 、 $10 \sim 250 \text{ LMH}$ 、 $25 \sim 250 \text{ LMH}$ 、 $50 \sim 250 \text{ LMH}$ 、 $100 \sim 250 \text{ LMH}$ 、 $125 \sim 250 \text{ LMH}$ 、 $150 \sim 250 \text{ LMH}$ または $200 \sim 250 \text{ LMH}$ である、段落158～159または162～182のいずれか1つに記載の方法。

【0659】

187. 供給速度が、約1、約2、約5、約10、約25、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約260、約270、約280、約290、約300、約310、約320、約330、約340、約350、約360、約370、約380、約390、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950 または 約1000 LMH である、段落158～159または162～182のいずれか1つに記載の方法。

30

【0660】

188. 濾液が、精密濾過にかけられる、段落158～187のいずれか1つに記載の方法。

40

【0661】

189. 前記精密濾過が、デッドエンド濾過である、段落188に記載の方法。

【0662】

190. 前記精密濾過が、接線流精密濾過である、段落188に記載の方法。

【0663】

191. 精密濾過フィルターが、約0.01～2ミクロン、約0.05～2ミクロン、約0.1～2ミクロン、約0.2～2ミクロン、約0.3～2ミクロン、約0.4～2ミクロン、約0.45～2ミクロン、約0.5～2ミクロン、約0.6～2ミクロン、約0.7～2ミクロン、約0.8～2ミクロン、約0.9～2ミクロン、約1～2ミクロン、約1.25～2ミクロン、約1.5～2ミクロン、または約1.75～2ミクロンの名目

50

保持範囲を有する、段落 188 ~ 190 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0664】

192 . 精密濾過フィルターが、約 0 . 01 ~ 1 ミクロン、約 0 . 05 ~ 1 ミクロン、約 0 . 1 ~ 1 ミクロン、約 0 . 2 ~ 1 ミクロン、約 0 . 3 ~ 1 ミクロン、約 0 . 4 ~ 1 ミクロン、約 0 . 45 ~ 1 ミクロン、約 0 . 5 ~ 1 ミクロン、約 0 . 6 ~ 1 ミクロン、約 0 . 7 ~ 1 ミクロン、約 0 . 8 ~ 1 ミクロンまたは約 0 . 9 ~ 1 ミクロンの名目保持範囲を有する、段落 188 ~ 190 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0665】

193 . 精密濾過フィルターが、約 0 . 01、約 0 . 05、約 0 . 1、約 0 . 2、約 0 . 3、約 0 . 4、約 0 . 45、約 0 . 5、約 0 . 6、約 0 . 7、約 0 . 8、約 0 . 9、約 1、約 1 . 1、約 1 . 2、約 1 . 3、約 1 . 4、約 1 . 5、約 1 . 6、約 1 . 7、約 1 . 8、約 1 . 9 または約 2 ミクロンの名目保持範囲を有する、段落 188 ~ 190 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0666】

194 . 精密濾過フィルターが、約 0 . 45 ミクロンの名目保持を有する、段落 188 ~ 190 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0667】

195 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 5000 L / m²、200 ~ 5000 L / m²、300 ~ 5000 L / m²、400 ~ 5000 L / m²、500 ~ 5000 L / m²、750 ~ 5000 L / m²、1000 ~ 5000 L / m²、1500 ~ 5000 L / m²、2000 ~ 5000 L / m²、3000 ~ 5000 L / m² または 4000 ~ 5000 L / m² のフィルター能力を有する、段落 188 ~ 194 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0668】

196 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 2500 L / m²、200 ~ 2500 L / m²、300 ~ 2500 L / m²、400 ~ 2500 L / m²、500 ~ 2500 L / m²、750 ~ 2500 L / m²、1000 ~ 2500 L / m²、1500 ~ 2500 L / m² または 2000 ~ 2500 L / m² のフィルター能力を有する、段落 188 ~ 194 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0669】

197 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 1500 L / m²、200 ~ 1500 L / m²、300 ~ 1500 L / m²、400 ~ 1500 L / m²、500 ~ 1500 L / m²、750 ~ 1500 L / m² または 1000 ~ 1500 L / m² のフィルター能力を有する、段落 188 ~ 194 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0670】

198 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 1250 L / m²、200 ~ 1250 L / m²、300 ~ 1250 L / m²、400 ~ 1250 L / m²、500 ~ 1250 L / m²、750 ~ 1250 L / m² または 1000 ~ 1250 L / m² のフィルター能力を有する、段落 188 ~ 194 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0671】

199 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 1000 L / m²、200 ~ 1000 L / m²、300 ~ 1000 L / m²、400 ~ 1000 L / m²、500 ~ 1000 L / m² または 750 ~ 1000 L / m² のフィルター能力を有する、段落 188 ~ 194 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0672】

200 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 750 L / m²、200 ~ 750 L / m²、300 ~ 750 L / m²、400 ~ 750 L / m² または 500 ~ 750 L / m² のフィルター能力を有する、段落 188 ~ 194 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0673】

201 . 精密濾過フィルターが、100 ~ 600 L / m²、200 ~ 600 L / m²、300 ~ 600 L / m² または 400 ~ 600 L / m² のフィルター能力を有する、段落

50

188～194のいずれか1つに記載の方法。

【0674】

202．精密濾過フィルターが、 $100 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $200 \sim 500 \text{ L/m}^2$ 、 $300 \sim 500 \text{ L/m}^2$ または $400 \sim 500 \text{ L/m}^2$ のフィルター能力を有する、段落188～194のいずれか1つに記載の方法。

【0675】

203．精密濾過フィルターが、100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950、約1000、約1050、約1100、約1150、約1200、約1250、約1300、約1350、約1400、約1450、約1500、約1550、約1600、約1650、約1700、約1750、約1800、約1850、約1900、約1950、約2000、約2050、約2100、約2150、約2200、約2250、約2300、約2350、約2400、約2450または約 2500 L/m^2 のフィルター能力を有する、段落188～194のいずれか1つに記載の方法。

10

【0676】

204．濾液が、限外濾過および/または透析濾過によってさらに処理される、段落158～203のいずれか1つに記載の方法。

【0677】

205．濾液が、限外濾過によってさらに処理される、段落158～203のいずれか1つに記載の方法。

20

【0678】

206．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $5 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

【0679】

207．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $10 \text{ kDa} \sim 750 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

【0680】

208．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $10 \text{ kDa} \sim 500 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

30

【0681】

209．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $10 \text{ kDa} \sim 300 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

【0682】

210．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $10 \text{ kDa} \sim 100 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

【0683】

211．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $10 \text{ kDa} \sim 50 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

【0684】

212．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $10 \text{ kDa} \sim 30 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

40

【0685】

213．限外濾過膜の分子量カットオフが、約 $5 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $10 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $20 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $30 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $40 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $50 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $75 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $100 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $150 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $200 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $300 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $400 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ 、約 $500 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ または約 $750 \text{ kDa} \sim 1000 \text{ kDa}$ の範囲にある、段落204～205のいずれか1つに記載の方法。

50

【0686】

214. 限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa ~ 500 kDa、約10 kDa ~ 500 kDa、約20 kDa ~ 500 kDa、約30 kDa ~ 500 kDa、約40 kDa ~ 500 kDa、約50 kDa ~ 500 kDa、約75 kDa ~ 500 kDa、約100 kDa ~ 500 kDa、約150 kDa ~ 500 kDa、約200 kDa ~ 500 kDa、約300 kDa ~ 500 kDaまたは約400 kDa ~ 500 kDaの範囲にある、段落204 ~ 205のいずれか1つに記載の方法。

【0687】

215. 分子が5 kDa ~ 300 kDa、約10 kDa ~ 300 kDa、約20 kDa ~ 300 kDa、約30 kDa ~ 300 kDa、約40 kDa ~ 300 kDa、約50 kDa ~ 300 kDa、約75 kDa ~ 300 kDa、約100 kDa ~ 300 kDa、約150 kDa ~ 300 kDaまたは約200 kDa ~ 300 kDaである、段落204 ~ 205のいずれか1つに記載の方法。

10

【0688】

216. 限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa ~ 100 kDa、約10 kDa ~ 100 kDa、約20 kDa ~ 100 kDa、約30 kDa ~ 100 kDa、約40 kDa ~ 100 kDa、約50 kDa ~ 100 kDaまたは約75 kDa ~ 100 kDaの範囲にある、段落204 ~ 205のいずれか1つに記載の方法。

【0689】

217. 限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa、約10 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa、約50 kDa、約60 kDa、約70 kDa、約80 kDa、約90 kDa、約100 kDa、約110 kDa、約120 kDa、約130 kDa、約140 kDa、約150 kDa、約200 kDa、約250 kDa、約300 kDa、約400 kDa、約500 kDa、約750 kDaまたは約1000 kDaである、段落204 ~ 205のいずれか1つに記載の方法。

20

【0690】

218. 限外濾過ステップの濃縮係数が、約1.5 ~ 約10である、段落204 ~ 217のいずれか1つに記載の方法。

【0691】

219. 濃縮係数が、約2 ~ 約8である、段落204 ~ 217のいずれか1つに記載の方法。

30

【0692】

220. 濃縮係数が、約2 ~ 約5である、段落204 ~ 217のいずれか1つに記載の方法。

【0693】

221. 濃縮係数が、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5または約10.0である、段落204 ~ 217のいずれか1つに記載の方法。

【0694】

222. 濃縮係数が、約2、約3、約4、約5または約6である、段落204 ~ 217のいずれか1つに記載の方法。

40

【0695】

223. 前記限外濾過ステップが、約20 ~ 約90 の温度で実施される、段落204 ~ 222のいずれか1つに記載の方法。

【0696】

224. 前記限外濾過ステップが、約35 ~ 約80 の温度、約40 ~ 約70 の温度、約45 ~ 約65 の温度、約50 ~ 約60 の温度、約50 ~ 約55 の温度、約45 ~ 約55 の温度または約45 ~ 約55 の温度で実施される、段落204 ~ 222のいずれか1つに記載の方法。

50

【0697】

225. 前記限外濾過ステップが、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79 または約80の温度で実施される、段落204～222のいずれか1つに記載の方法。

10

【0698】

226. 前記限外濾過ステップが、約50の温度で実施される、段落204～222のいずれか1つに記載の方法。

【0699】

227. 限外濾過の濾液が、透析濾過によって処理される、段落158～226のいずれか1つに記載の方法。

【0700】

228. 置換液が水である、段落227に記載の方法。

【0701】

229. 置換液が塩水である、段落227に記載の方法。

20

【0702】

230. 塩が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される、段落229に記載の方法。

【0703】

231. 塩が、塩化ナトリウムである、段落229に記載の方法。

【0704】

232. 置換液が、約1mM、約5mM、約10mM、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約80mM、約90mM、約100mM、約110mM、約120mM、約130mM、約140mM、約150mM、約160mM、約170mM、約180mM、約190mM、約200mM、約250mM、約300mM、約350mM、約400mM、約450mMまたは約500mMの塩化ナトリウムである、段落229に記載の方法。

30

【0705】

233. 置換液が、緩衝溶液である、段落227に記載の方法。

【0706】

234. 置換液が、緩衝剤がN-(2-アセトアミド)-アミノエタンスルホン酸(ACES)、酢酸の塩(酢酸塩)、N-(2-アセトアミド)-イミノ二酢酸(ADA)、2-アミノエタンスルホン酸(AES、タウリン)、アンモニア、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(AMPD、アメジオール)、N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(AMP SO)、N,N-ビス-(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、炭酸水素ナトリウム(重炭酸塩)、N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-グリシン(ピシン)、[ビス-(2-ヒドロキシエチル)-イミノ]-トリス-(ヒドロキシメチルメタン)(ビス-トリス)、1,3-ビス[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン(ビス-トリス-プロパン)、ホウ酸、ジメチルアルシン酸(カコジル酸塩)、3-(シクロヘキシルアミノ)-プロパンスルホン酸(CAPS)、3-(シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CAPSO)、炭酸ナトリウム(炭酸塩)、シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸(ACES)、クエン酸の塩(クエン酸塩)、3-[N-ビス

40

50

(ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、ギ酸の塩(ギ酸塩)、グリシン、グリシルグリシン、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-エタンスルホン酸(HEPES)、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-3-プロパンスルホン酸(HEPPS、EPPS)、N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(HEPPSO)、イミダゾール、リンゴ酸の塩(リンゴ酸塩)、マレイン酸の塩(マレイン酸塩)、2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸(MES)、3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸(MOPS)、3-(N-モルホリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)、リン酸の塩(リン酸塩)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)(POPISO)、ピリジン、コハク酸の塩(コハク酸塩)、3-{[トリス(ヒドロキシメチル)-メチル]-アミノ}-プロパンスルホン酸(TAPS)、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(TAPSO)、トリエタノールアミン(TEA)、2-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]-エタンスルホン酸(TES)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)-メチル]-グリシン(トリシン)およびトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン(トリス)からなる群から選択される、緩衝溶液である、段落227に記載の方法。

10

【0707】

235. 置換液が、緩衝剤が酢酸の塩(酢酸塩)、クエン酸の塩(クエン酸塩)、ギ酸の塩(ギ酸塩)、リンゴ酸の塩(リンゴ酸塩)、マレイン酸の塩(マレイン酸塩)、リン酸の塩(リン酸塩)およびコハク酸の塩(コハク酸塩)からなる群から選択される緩衝溶液である、段落227に記載の方法。

20

【0708】

236. 置換液が、緩衝剤がクエン酸の塩(クエン酸塩)である緩衝溶液である、段落227に記載の方法。

【0709】

237. 置換液が、緩衝剤がコハク酸の塩(コハク酸塩)である緩衝溶液である、段落227に記載の方法。

【0710】

238. 前記塩が、ナトリウム塩である、段落234~237のいずれか1つに記載の方法。

30

【0711】

239. 前記塩が、カリウム塩である、段落234~237のいずれか1つに記載の方法。

【0712】

240. 透析濾過緩衝剤のpHが、約4.0~11.0、約5.0~10.0、約5.5~9.0、約6.0~8.0、約6.0~7.0、約6.5~7.5、約6.5~7.0または約6.0~7.5である、段落233~239のいずれか1つに記載の方法。

【0713】

241. 透析濾過緩衝剤のpHが、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5、約10.0、約10.5または約11.0である、段落233~239のいずれか1つに記載の方法。

40

【0714】

242. 透析濾過緩衝剤のpHが、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5または約9.0である、段落233~239のいずれか1つに記載の方法。

【0715】

243. 透析濾過緩衝剤のpHが、約6.5、約7.0または約7.5である、段落226~231のいずれか1つに記載の方法。

【0716】

50

244. 透析濾過緩衝剤のpHが、約7.0である、段落233～239のいずれか1つに記載の方法。

【0717】

245. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.01mM～100mM、約0.1mM～100mM、約0.5mM～100mM、約1mM～100mM、約2mM～100mM、約3mM～100mM、約4mM～100mM、約5mM～100mM、約6mM～100mM、約7mM～100mM、約8mM～100mM、約9mM～100mM、約10mM～100mM、約11mM～100mM、約12mM～100mM、約13mM～100mM、約14mM～100mM、約15mM～100mM、約16mM～100mM、約17mM～100mM、約18mM～100mM、約19mM～100mM、約20mM～100mM、約25mM～100mM、約30mM～100mM、約35mM～100mM、約40mM～100mM、約45mM～100mM、約50mM～100mM、約55mM～100mM、約60mM～100mM、約65mM～100mM、約70mM～100mM、約75mM～100mM、約80mM～100mM、約85mM～100mM、約90mM～100mMまたは約95mM～100mMである、段落233～244のいずれか1つに記載の方法。

10

【0718】

246. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.01mM～50mM、約0.1mM～50mM、約0.5mM～50mM、約1mM～50mM、約2mM～50mM、約3mM～50mM、約4mM～50mM、約5mM～50mM、約6mM～50mM、約7mM～50mM、約8mM～50mM、約9mM～50mM、約10mM～50mM、約11mM～50mM、約12mM～50mM、約13mM～50mM、約14mM～50mM、約15mM～50mM、約16mM～50mM、約17mM～50mM、約18mM～50mM、約19mM～50mM、約20mM～50mM、約25mM～50mM、約30mM～50mM、約35mM～50mM、約40mM～50mMまたは約45mM～50mMである、段落233～244のいずれか1つに記載の方法。

20

【0719】

247. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.01mM～25mM、約0.1mM～25mM、約0.5mM～25mM、約1mM～25mM、約2mM～25mM、約3mM～25mM、約4mM～25mM、約5mM～25mM、約6mM～25mM、約7mM～25mM、約8mM～25mM、約9mM～25mM、約10mM～25mM、約11mM～25mM、約12mM～25mM、約13mM～25mM、約14mM～25mM、約15mM～25mM、約16mM～25mM、約17mM～25mM、約18mM～25mM、約19mM～25mMまたは約20mM～25mMである、段落233～244のいずれか1つに記載の方法。

30

【0720】

248. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.01mM～15mM、約0.1mM～15mM、約0.5mM～15mM、約1mM～15mM、約2mM～15mM、約3mM～15mM、約4mM～15mM、約5mM～15mM、約6mM～15mM、約7mM～15mM、約8mM～15mM、約9mM～15mM、約10mM～15mM、約11mM～15mM、約12mM～15mM、約13mM～15mMまたは約14mM～15mMである、段落233～244のいずれか1つに記載の方法。

40

【0721】

249. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.01mM～10mM、約0.1mM～10mM、約0.5mM～10mM、約1mM～10mM、約2mM～10mM、約3mM～10mM、約4mM～10mM、約5mM～10mM、約6mM～10mM、約7mM～10mM、約8mM～10mMまたは約9mM～10mMである、段落233～244のいずれか1つに記載の方法。

【0722】

250. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.01mM、約0.05mM、約0.1mM、

50

約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.5 mM、約 0.6 mM、約 0.7 mM、約 0.8 mM、約 0.9 mM、約 1 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、約 15 mM、約 16 mM、約 17 mM、約 18 mM、約 19 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM または約 100 mM である、段落 233 ~ 244 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0723】

251. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 1 mM、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 30 mM、約 40 mM、または約 50 mM である、段落 233 ~ 244 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0724】

252. 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 10 mM である、段落 233 ~ 244 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0725】

253. 置換液が、キレート剤を含む、段落 233 ~ 252 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0726】

254. 置換液が、ミョウバンキレート剤を含む、段落 233 ~ 252 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0727】

255. 置換液が、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N',N'-三酢酸 (EDTA-OH)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸 (HEDTA)、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸 (EGTA)、1,2-シクロヘキサンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸 (CyDTA)、ジエチレントリアミン-N,N,N',N',N''-五酢酸 (DTPA)、1,3-ジアミノプロパン-2-オール-N,N,N',N'-四酢酸 (DPTA-OH)、エチレンジアミン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシフェニル酢酸) (EDDHA)、エチレンジアミン-N,N'-ジプロピオン酸ジヒドロクロリド (EDDP)、エチレンジアミン-テトラキス(メチレンスルホン酸) (EDTPO)、ニトリロトリス(メチレンホスホン酸) (NTPO)、イミノ-二酢酸 (IDA)、ヒドロキシイミノ-二酢酸 (HIDA)、ニトリロ-三酢酸 (NTP)、トリエチレントラミン-六酢酸 (TTHA)、ジメルカプトコハク酸 (DMSA)、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸 (DMPS)、アルファリポ酸 (ALA)、ニトリロ三酢酸 (NTA)、チアミンテトラヒドロフルフリルジスルフィド (TTFD)、ジメルカプロール、ペニシラミン、デフェロキサミン (DFOA)、デフェラシロクス、ホスホネート、クエン酸の塩 (クエン酸塩) およびこれらの組合せからなる群から選択されるキレート剤を含む、段落 233 ~ 252 のいずれか 1 つに記載の方法。

- 五

30

【0728】

256. 置換液が、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N',N'-三酢酸 (EDTA-OH)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸 (HEDTA)、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸 (EGTA)、1,2-シクロヘキサンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸 (CyDTA)、ジエチレントリアミン-N,N,N',N',N''-五酢酸 (DTPA)、1,3-ジアミノプロパン-2-オール-N,N,N',N'-四酢酸 (DPTA-OH)、エチレンジアミン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシフェニル酢酸) (EDDHA)、クエン酸の塩 (クエン酸塩) およびこれらの組合せからなる群から選択されるキレート剤を含む、段落 233 ~ 255 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0729】

50

257. 置換液が、キレート剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む、段落 233 ~ 254 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0730】

258. 置換液が、キレート剤としてクエン酸の塩 (クエン酸塩) を含む、段落 233 ~ 254 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0731】

259. 置換液が、キレート剤としてクエン酸ナトリウムを含む、段落 233 ~ 254 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0732】

260. 置換液中のキレート剤の濃度が、1 ~ 500 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0733】

261. 置換液中のキレート剤の濃度が、2 ~ 400 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0734】

262. 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 400 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0735】

263. 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 200 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0736】

264. 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 100 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0737】

265. 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 50 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0738】

266. 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 30 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0739】

267. 置換液中のキレート剤の濃度が、約 0.01 mM、約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.5 mM、約 0.6 mM、約 0.7 mM、約 0.8 mM、約 0.9 mM、約 1 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、約 15 mM、約 16 mM、約 17 mM、約 18 mM、約 19 mM、約 20 mM、約 21 mM、約 22 mM、約 23 mM、約 24 mM、約 25 mM、約 26 mM、約 27 mM、約 28 mM、約 29 mM、約 30 mM、約 31 mM、約 32 mM、約 33 mM、約 34 mM、約 35 mM、約 36 mM、約 37 mM、約 38 mM、約 39 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM または約 100 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

40

【0740】

268. 置換液中のキレート剤の濃度が、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM または約 100 mM である、段落 253 ~ 258 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0741】

269. 置換液中のキレート剤の濃度が、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM または約 50 mM である、段落 253 ~ 2

50

58のいずれか1つに記載の方法。

【0742】

270. 置換液が、塩を含む、段落233~269のいずれか1つに記載の方法。

【0743】

271. 塩が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される、段落270に記載の方法。

【0744】

272. 塩が、塩化ナトリウムである、段落270に記載の方法。

【0745】

273. 置換液が、約1、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約250または約300 mMの塩化ナトリウムを含む、段落270~272のいずれか1つに記載の方法。

10

【0746】

274. 透析容量の数が、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45または50である、段落227~273のいずれか1つに記載の方法。

【0747】

275. 透析容量の数が、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95または約100である、段落227~273のいずれか1つに記載の方法。

20

【0748】

276. 透析容量の数が、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15である、段落227~273のいずれか1つに記載の方法。

【0749】

277. 前記限外濾過ステップが、約20~約90の温度で実施される、段落227~276のいずれか1つに記載の方法。

30

【0750】

278. 前記透析濾過ステップが、約35~約80の温度、約40~約70の温度、約45~約65の温度、約50~約60の温度、約50~約55の温度、約45~約55の温度または約45~約55の温度で実施される、段落227~276のいずれか1つに記載の方法。

【0751】

279. 前記透析濾過ステップが、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79または約80の温度で実施される、段落227~276のいずれか1つに記載の方法。

40

【0752】

280. 前記透析濾過ステップが、約50の温度で実施される、段落227~276のいずれか1つに記載の方法。

【0753】

50

281. 前記限外濾過ステップおよび透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約20～約90の温度で実施される、段落204～277のいずれか1つに記載の方法。
【0754】

282. 前記限外濾過ステップおよび透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約35～約80の温度、約40～約70の温度、約45～約65の温度、約50～約60の温度、約50～約55の温度、約45～約55の温度または約45～約55の温度で実施される、段落204～277のいずれか1つに記載の方法。
【0755】

283. 前記限外濾過ステップおよび透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79または約80の温度で実施される、段落204～277のいずれか1つに記載の方法。
【0756】

284. 前記限外濾過ステップおよび透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約50の温度で実施される、段落204～277のいずれか1つに記載の方法。
【0757】

285. 多糖を含有する溶液（例えば、上清、濾液または保持液）が、活性炭濾過ステップによって処理される、段落1～284のいずれか1つに記載の方法。
【0758】

286. 活性炭が、粉末の形態で、顆粒炭素層として、圧縮炭素ブロックまたは押し出し炭素ブロックとして添加される（例えば、Noritのアクティブチャコールを参照されたい）、段落285のいずれか1つに記載の方法。
【0759】

287. 活性炭が、約0.1～20%（重量）、1～15%（重量）、1～10%（重量）、2～10%（重量）、3～10%（重量）、4～10%（重量）、5～10%（重量）、1～5%（重量）または2～5%（重量）の量で添加される、段落286に記載の方法。
【0760】

288. 混合物が攪拌され、静置される、段落286～287のいずれか1つに記載の方法。
【0761】

289. 混合物が攪拌され、約5、約10、約15、約20、約30、約45、約60、約90、約120、約180、約240分またはそれより長く静置される、段落286～287のいずれか1つに記載の方法。
【0762】

290. 活性炭がその後除去される、段落286～289のいずれか1つに記載の方法。
【0763】

291. 活性炭が、遠心分離または濾過によって除去される、段落286～290のいずれか1つに記載の方法。
【0764】

292. 溶液が、マトリックス中に固定された活性炭を介して濾過される、段落285に記載の方法。
【0765】

293. 前記マトリックスが、溶液にとって透過性の多孔性フィルター媒体である、段

落 2 8 5 に記載の方法。

【 0 7 6 6 】

2 9 4 . 前記マトリックスが、支持材料を含む、段落 2 9 2 ~ 2 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 6 7 】

2 9 5 . 前記マトリックスが、結合剤材料を含む、段落 2 9 2 ~ 2 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 6 8 】

2 9 6 . 前記支持材料が、合成ポリマーである、段落 2 9 4 ~ 2 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 6 9 】

2 9 7 . 前記支持材料が、天然起源のポリマーである、段落 2 9 4 ~ 2 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 7 0 】

2 9 8 . 前記合成ポリマーが、ポリスチレン、ポリアクリルアミドまたはポリメチルメタクリレートのうちいずれか 1 つを含む、段落 2 9 6 に記載の方法。

【 0 7 7 1 】

2 9 9 . 前記合成ポリマーが、ポリスチレン、ポリアクリルアミドおよびポリメチルメタクリレートからなる群から選択される、段落 2 9 6 に記載の方法。

【 0 7 7 2 】

3 0 0 . 天然起源の前記ポリマーが、セルロース、多糖、デキストランまたはアガロースのうちいずれか 1 つを含む、段落 2 9 7 に記載の方法。

【 0 7 7 3 】

3 0 1 . 前記天然のポリマーが、セルロース、多糖、デキストランおよびアガロースからなる群から選択される、段落 2 9 7 に記載の方法。

【 0 7 7 4 】

3 0 2 . 前記ポリマー支持材料が、存在する場合、機械的剛性を提供するための繊維ネットワークの形態にある、段落 2 9 4 ~ 3 0 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 7 5 】

3 0 3 . 前記結合材材料が、存在する場合、樹脂である、段落 2 9 4 ~ 3 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 7 6 】

3 0 4 . 前記マトリックスが、膜シートの形態を有する、段落 2 9 2 ~ 3 0 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 7 7 】

3 0 5 . マトリックス中に固定された活性炭が、フロースルー炭素カートリッジの形態にある、段落 2 9 2 ~ 3 0 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 7 8 】

3 0 6 . 膜シートがらせん状に巻かれる、段落 3 0 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 7 9 】

3 0 7 . いくつかのディスクが互いに積み重ねられる、段落 2 9 2 ~ 3 0 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 8 0 】

3 0 8 . 積み重ねられたディスクの構成がレンズ状である、段落 3 0 7 に記載の方法。

【 0 7 8 1 】

3 0 9 . 炭素フィルター中の活性炭が、泥炭、褐炭、木材またはヤシ殻に由来する、段落 2 9 2 ~ 3 0 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 8 2 】

3 1 0 . マトリックス中に固定された活性炭が、筐体中に入れられて、独立フィルターユニットを形成する、段落 2 9 2 ~ 3 0 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 7 8 3 】

3 1 1 . 活性炭フィルターが、活性炭粉末が所定の位置に捕捉され、樹脂に結合したセルロースマトリックスを含む、段落 2 9 2 ~ 3 1 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 7 8 4 】

3 1 2 . 活性炭フィルターが、約 0 . 0 1 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 0 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 1 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 2 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 3 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 4 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 6 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 7 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 8 ~ 1 0 0 ミクロン、約 0 . 9 ~ 1 0 0 ミクロン、約 1 ~ 1 0 0 ミクロン、約 1 . 2 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 1 . 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 1 . 7 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 2 ~ 1 0 0 ミクロン、約 3 ~ 1 0 0 ミクロン、約 4 ~ 1 0 0 ミクロン、約 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 6 ~ 1 0 0 ミクロン、約 7 ~ 1 0 0 ミクロン、約 8 ~ 1 0 0 ミクロン、約 9 ~ 1 0 0 ミクロン、約 1 0 ~ 1 0 0 ミクロン、約 1 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 2 0 ~ 1 0 0 ミクロン、約 2 5 ~ 1 0 0 ミクロン、約 3 0 ~ 1 0 0 ミクロン、約 4 0 ~ 1 0 0 ミクロン、約 5 0 ~ 1 0 0 ミクロンまたは約 7 5 ~ 1 0 0 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落 2 8 5 ~ 3 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 7 8 5 】

3 1 3 . 活性炭フィルターが、約 0 . 0 1 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 0 5 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 1 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 2 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 3 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 4 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 5 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 6 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 7 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 8 ~ 5 0 ミクロン、約 0 . 9 ~ 5 0 ミクロン、約 1 ~ 5 0 ミクロン、約 1 . 2 5 ~ 5 0 ミクロン、約 1 . 5 ~ 5 0 ミクロン、約 1 . 7 5 ~ 5 0 ミクロン、約 2 ~ 5 0 ミクロン、約 3 ~ 5 0 ミクロン、約 4 ~ 5 0 ミクロン、約 5 ~ 5 0 ミクロン、約 6 ~ 5 0 ミクロン、約 7 ~ 5 0 ミクロン、約 8 ~ 5 0 ミクロン、約 9 ~ 5 0 ミクロン、約 1 0 ~ 5 0 ミクロン、約 1 5 ~ 5 0 ミクロン、約 2 0 ~ 5 0 ミクロン、約 2 5 ~ 5 0 ミクロン、約 3 0 ~ 5 0 ミクロン、約 4 0 ~ 5 0 ミクロンまたは約 5 0 ~ 5 0 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落 2 8 5 ~ 3 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 7 8 6 】

3 1 4 . 活性炭フィルターが、約 0 . 0 1 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 0 5 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 1 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 2 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 3 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 4 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 5 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 6 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 7 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 8 ~ 2 5 ミクロン、約 0 . 9 ~ 2 5 ミクロン、約 1 ~ 2 5 ミクロン、約 1 . 2 5 ~ 2 5 ミクロン、約 1 . 5 ~ 2 5 ミクロン、約 1 . 7 5 ~ 2 5 ミクロン、約 2 ~ 2 5 ミクロン、約 3 ~ 2 5 ミクロン、約 4 ~ 2 5 ミクロン、約 5 ~ 2 5 ミクロン、約 6 ~ 2 5 ミクロン、約 7 ~ 2 5 ミクロン、約 8 ~ 2 5 ミクロン、約 9 ~ 2 5 ミクロン、約 1 0 ~ 2 5 ミクロン、約 1 5 ~ 2 5 ミクロンまたは約 2 0 ~ 2 5 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落 2 8 5 ~ 3 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 7 8 7 】

3 1 5 . 活性炭フィルターが、約 0 . 0 1 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 0 5 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 1 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 2 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 3 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 4 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 5 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 6 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 7 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 8 ~ 1 0 ミクロン、約 0 . 9 ~ 1 0 ミクロン、約 1 ~ 1 0 ミクロン、約 1 . 2 5 ~ 1 0 ミクロン、約 1 . 5 ~ 1 0 ミクロン、約 1 . 7 5 ~ 1 0 ミクロン、約 2 ~ 1 0 ミクロン、約 3 ~ 1 0 ミクロン、約 4 ~ 1 0 ミクロン、約 5 ~ 1 0 ミクロン、約 6 ~ 1 0 ミクロン、約 7 ~ 1 0 ミクロン、約 8 ~ 1 0 ミクロンまたは約 9 ~ 1 0 ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落 2 8 5 ~ 3 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 7 8 8 】

3 1 6 . 活性炭フィルターが、約 0 . 0 1 ~ 8 ミクロン、約 0 . 0 5 ~ 8 ミクロン、約 0 . 1 ~ 8 ミクロン、約 0 . 2 ~ 8 ミクロン、約 0 . 3 ~ 8 ミクロン、約 0 . 4 ~ 8 ミクロン、約 0 . 5 ~ 8 ミクロン、約 0 . 6 ~ 8 ミクロン、約 0 . 7 ~ 8 ミクロン、約 0 . 8 ~ 8 ミクロン、約 0 . 9 ~ 8 ミクロン、約 1 ~ 8 ミクロン、約 1 . 2 5 ~ 8 ミクロン、約

50

1.5～8ミクロン、約1.75～8ミクロン、約2～8ミクロン、約3～8ミクロン、約4～8ミクロン、約5～8ミクロン、約6～8ミクロンまたは約7～8ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落285～311のいずれか1つに記載の方法。

【0789】

317. 活性炭フィルターが、約0.01～5ミクロン、約0.05～5ミクロン、約0.1～5ミクロン、約0.2～5ミクロン、約0.3～5ミクロン、約0.4～5ミクロン、約0.5～5ミクロン、約0.6～5ミクロン、約0.7～5ミクロン、約0.8～5ミクロン、約0.9～5ミクロン、約1～5ミクロン、約1.25～5ミクロン、約1.5～5ミクロン、約1.75～5ミクロン、約2～5ミクロン、約3～5ミクロンまたは約4～5ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落285～311のいずれか1つに記載の方法。

10

【0790】

318. 活性炭フィルターが、約0.01～2ミクロン、約0.05～2ミクロン、約0.1～2ミクロン、約0.2～2ミクロン、約0.3～2ミクロン、約0.4～2ミクロン、約0.5～2ミクロン、約0.6～2ミクロン、約0.7～2ミクロン、約0.8～2ミクロン、約0.9～2ミクロン、約1～2ミクロン、約1.25～2ミクロン、約1.5～2ミクロン、約1.75～2ミクロン、約2～2ミクロン、約3～2ミクロンまたは約4～2ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落285～311のいずれか1つに記載の方法。

【0791】

319. 活性炭フィルターが、約0.01～1ミクロン、約0.05～1ミクロン、約0.1～1ミクロン、約0.2～1ミクロン、約0.3～1ミクロン、約0.4～1ミクロン、約0.5～1ミクロン、約0.6～1ミクロン、約0.7～1ミクロン、約0.8～1ミクロンまたは約0.9～1ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落285～311のいずれか1つに記載の方法。

20

【0792】

320. 活性炭フィルターが、約0.05～50ミクロン、0.1～25ミクロン、0.2～10ミクロン、0.1～10ミクロン、0.2～5ミクロンまたは0.25～1ミクロンの名目ミクロンレーティングを有する、段落285～311のいずれか1つに記載の方法。

30

【0793】

321. 活性炭フィルターが、1～500LMH、10～500LMH、15～500LMH、20～500LMH、25～500LMH、30～500LMH、40～500LMH、50～500LMH、100～500LMH、125～500LMH、150～500LMH、200～500LMH、250～500LMH、300～500LMHまたは400～500LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

【0794】

322. 活性炭フィルターが、1～200LMH、10～200LMH、15～200LMH、20～200LMH、25～200LMH、30～200LMH、40～200LMH、50～200LMH、100～200LMH、125～200LMHまたは150～200LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

40

【0795】

323. 活性炭フィルターが、1～150LMH、10～150LMH、15～150LMH、20～150LMH、25～150LMH、30～150LMH、40～150LMH、50～150LMH、100～150LMHまたは125～150LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

【0796】

324. 活性炭フィルターが、1～100LMH、10～100LMH、15～100

50

LMH、20～100LMH、25～100LMH、30～100LMH、40～100LMH、または50～100LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

【0797】

325．活性炭フィルターが、1～75LMH、5～75LMH、10～75LMH、15～75LMH、20～75LMH、25～75LMH、30～75LMH、35～75LMH、40～75LMH、45～75LMH、50～75LMH、55～75LMH、60～75LMH、65～75LMH、または70～75LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

【0798】

326．活性炭フィルターが、1～50LMH、5～50LMH、7～50LMH、10～50LMH、15～50LMH、20～50LMH、25～50LMH、30～50LMH、35～50LMH、40～50LMHまたは45～50LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

【0799】

327．活性炭フィルターが、約1、約2、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約225、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約700、約800、約900、約950または約1000LMHの供給速度で行われる、段落285～320のいずれか1つに記載の方法。

【0800】

328．フィルターが、5～1000L/m²、10～750L/m²、15～500L/m²、20～400L/m²、25～300L/m²、30～250L/m²、40～200L/m²または30～100L/m²のフィルター能力を有する活性炭フィルターによって、溶液が処理される、段落285～327のいずれか1つに記載の方法。

【0801】

329．フィルターが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約100、約125、約150、約175、約200、約225、約250、約275、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、または約1000L/m²のフィルター能力を有する活性炭フィルターによって、溶液が処理される、段落285～327のいずれか1つに記載の方法。

【0802】

330．1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回の活性炭濾過ステップが実施される、段落285～329のいずれか1つに記載の方法。

【0803】

331．1、2または3回の活性炭濾過ステップが実施される、段落285～329のいずれか1つに記載の方法。

【0804】

332．1または2回の活性炭濾過ステップが実施される、段落285～329のいずれか1つに記載の方法。

【0805】

333．溶液が、活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

【0806】

334．溶液が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

【0807】

10

20

30

40

50

335 . 溶液が、2、3、4または5個の活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

【0808】

336 . 溶液が、2個の活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

【0809】

337 . 溶液が、3個の活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

【0810】

338 . 溶液が、4個の活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

10

【0811】

339 . 溶液が、5個の活性炭フィルターによって連続的に処理される、段落285～332のいずれか1つに記載の方法。

【0812】

340 . 活性炭濾過ステップが、1回通過モードで実施される、段落285～339のいずれか1つに記載の方法。

【0813】

341 . 活性炭濾過ステップが、再循環モードで実施される、段落285～339のいずれか1つに記載の方法。

20

【0814】

342 . 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50サイクルの活性炭濾過が実施される、段落341に記載の方法。

【0815】

343 . 2、3、4、5、6、7、8、9または10サイクルの活性炭濾過が実施される、段落341に記載の方法。

【0816】

344 . 2または3サイクルの活性炭濾過が実施される、段落341に記載の方法。

30

【0817】

345 . 2サイクルの活性炭濾過が実施される、段落341に記載の方法。

【0818】

346 . 濾液が、さらに濾過される、段落285～345のいずれか1つに記載の方法。

【0819】

347 . 濾液が、精密濾過にかけられる、段落285～345のいずれか1つに記載の方法。

【0820】

348 . 前記精密濾過が、デッドエンド濾過（垂直濾過）である、段落347に記載の方法。

40

【0821】

349 . 前記精密濾過が、接線流精密濾過である、段落347に記載の方法。

【0822】

350 . 前記精密濾過フィルターが、約0.01～2ミクロン、約0.05～2ミクロン、約0.1～2ミクロン、約0.2～2ミクロン、約0.3～2ミクロン、約0.4～2ミクロン、約0.45～2ミクロン、約0.5～2ミクロン、約0.6～2ミクロン、約0.7～2ミクロン、約0.8～2ミクロン、約0.9～2ミクロン、約1～2ミクロン、約1.25～2ミクロン、約1.5～2ミクロン、または約1.75～2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落347～349のいずれか1つに記載の方法。

50

【 0 8 2 3 】

351. 前記精密濾過フィルターが、約0.01～1ミクロン、約0.05～1ミクロン、約0.1～1ミクロン、約0.2～1ミクロン、約0.3～1ミクロン、約0.4～1ミクロン、約0.45～1ミクロン、約0.5～1ミクロン、約0.6～1ミクロン、約0.7～1ミクロン、約0.8～1ミクロンまたは約0.9～1ミクロンの名目保持範囲を有する、段落347～349のいずれか1つに記載の方法。

【 0 8 2 4 】

352. 前記精密濾過フィルターが、約0.01、約0.05、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.45、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約1.6、約1.7、約1.8、約1.9または約2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落347～349のいずれか1つに記載の方法。

10

【 0 8 2 5 】

353. 前記精密濾過フィルターが、約0.2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落343～345のいずれか1つに記載の方法。

【 0 8 2 6 】

354. 前記精密濾過フィルターが、100～6000L/m²、200～6000L/m²、300～6000L/m²、400～6000L/m²、500～6000L/m²、750～6000L/m²、1000～6000L/m²、1500～6000L/m²、2000～6000L/m²、3000～6000L/m²または4000～6000L/m²のフィルター能力を有する、段落347～353のいずれか1つに記載の方法。

20

【 0 8 2 7 】

355. 前記精密濾過フィルターが、100～4000L/m²、200～4000L/m²、300～4000L/m²、400～4000L/m²、500～4000L/m²、750～4000L/m²、1000～4000L/m²、1500～4000L/m²、2000～4000L/m²、2500～4000L/m²、3000～4000L/m²または3500～4000L/m²のフィルター能力を有する、段落347～353のいずれか1つに記載の方法。

【 0 8 2 8 】

356. 前記精密濾過フィルターが、100～3750L/m²、200～3750L/m²、300～3750L/m²、400～3750L/m²、500～3750L/m²、750～3750L/m²、1000～3750L/m²、1500～3750L/m²、2000～3750L/m²、2500～3750L/m²、3000～3750L/m²または3500～3750L/m²のフィルター能力を有する、段落347～353のいずれか1つに記載の方法。

30

【 0 8 2 9 】

357. 前記精密濾過フィルターが、100～1250L/m²、200～1250L/m²、300～1250L/m²、400～1250L/m²、500～1250L/m²、750～1250L/m²または1000～1250L/m²のフィルター能力を有する、段落347～353のいずれか1つに記載の方法。

40

【 0 8 3 0 】

358. 前記精密濾過フィルターが、約100、約200、約300、約400、約550、約600、約700、約800、約900、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1600、約1700、約1800、約1900、約2000、約2100、約2200、約2300、約2400、約2500、約2600、約2700、約2800、約2900、約3000、約3100、約3200、約3300、約3400、約3500、約3600、約3700、約3800、約3900、約4000、約4100、約4200、約4300、約4400、約4500、約4600、約4700、約4800、約4900、約5000、約5250、約5500、約5750または約6000L/m²のフィルター能力を有する、段落347～353

50

のいずれか1つに記載の方法。

【0831】

359. 濾液が、限外濾過および/または透析濾過によってさらに清澄化される、段落285～359のいずれか1つに記載の方法。

【0832】

360. 濾液が、限外濾過によってさらに清澄化される、段落285～359のいずれか1つに記載の方法。

【0833】

361. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa～1000 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

10

【0834】

362. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約10 kDa～750 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0835】

363. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約10 kDa～500 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0836】

364. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約10 kDa～300 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0837】

365. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約10 kDa～100 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

20

【0838】

366. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約10 kDa～50 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0839】

367. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約10 kDa～30 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0840】

368. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa～1000 kDa、約10 kDa～1000 kDa、約20 kDa～1000 kDa、約30 kDa～1000 kDa、約40 kDa～1000 kDa、約50 kDa～1000 kDa、約75 kDa～1000 kDa、約100 kDa～1000 kDa、約150 kDa～1000 kDa、約200 kDa～1000 kDa、約300 kDa～1000 kDa、約400 kDa～1000 kDa、約500 kDa～1000 kDaまたは約750 kDa～1000 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

30

【0841】

369. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa～500 kDa、約10 kDa～500 kDa、約20 kDa～500 kDa、約30 kDa～500 kDa、約40 kDa～500 kDa、約50 kDa～500 kDa、約75 kDa～500 kDa、約100 kDa～500 kDa、約150 kDa～500 kDa、約200 kDa～500 kDa、約300 kDa～500 kDaまたは約400 kDa～500 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

40

【0842】

370. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa～300 kDa、約10 kDa～300 kDa、約20 kDa～300 kDa、約30 kDa～300 kDa、約40 kDa～300 kDa、約50 kDa～300 kDa、約75 kDa～300 kDa、約100 kDa～300 kDa、約150 kDa～300 kDaまたは約200 kDa～300 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0843】

50

371. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa ~ 100 kDa、約10 kDa ~ 100 kDa、約20 kDa ~ 100 kDa、約30 kDa ~ 100 kDa、約40 kDa ~ 100 kDa、約50 kDa ~ 100 kDaまたは約75 kDa ~ 100 kDaの範囲にある、段落359または360に記載の方法。

【0844】

372. 前記限外濾過膜の分子量カットオフが、約5 kDa、約10 kDa、約20 kDa、約30 kDa、約40 kDa、約50 kDa、約60 kDa、約70 kDa、約80 kDa、約90 kDa、約100 kDa、約110 kDa、約120 kDa、約130 kDa、約140 kDa、約150 kDa、約200 kDa、約250 kDa、約300 kDa、約400 kDa、約500 kDa、約750 kDaまたは約1000 kDaである、段落359または360に記載の方法。

10

【0845】

373. 前記限外濾過ステップの濃縮係数が、約1.5 ~ 約10.0である、段落359 ~ 371のいずれか1つに記載の方法。

【0846】

374. 前記限外濾過ステップの濃縮係数が、約2.0 ~ 約8.0である、段落359 ~ 371のいずれか1つに記載の方法。

【0847】

375. 前記限外濾過ステップの濃縮係数が、約2.0 ~ 約5.0である、段落359 ~ 371のいずれか1つに記載の方法。

20

【0848】

376. 前記限外濾過ステップの濃縮係数が、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5または約10.0である、段落359 ~ 371のいずれか1つに記載の方法。ある実施形態では、濃縮係数は、約2.0、約3.0、約4.0、約5.0または約6.0である。

【0849】

377. 前記限外濾過ステップが、約20 ~ 約90 の温度で実施される、段落359 ~ 376のいずれか1つに記載の方法。

【0850】

378. 前記限外濾過ステップが、約35 ~ 約80 の温度、約40 ~ 約70 の温度、約45 ~ 約65 の温度、約50 ~ 約60 の温度、約50 ~ 約55 の温度、約45 ~ 約55 の温度または約45 ~ 約55 の温度で実施される、段落359 ~ 376のいずれか1つに記載の方法。

30

【0851】

379. 前記限外濾過ステップが、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79または約80 の温度で実施される、段落359 ~ 376のいずれか1つに記載の方法。

40

【0852】

380. 前記限外濾過ステップが、約50 の温度で実施される、段落359 ~ 376のいずれか1つに記載の方法。

【0853】

381. 限外濾過の濾液が、透析濾過によって処理される、段落359 ~ 380のいずれか1つに記載の方法。

50

【 0 8 5 4 】

3 8 2 . 置換液が水である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 5 5 】

3 8 3 . 置換液が塩水である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 5 6 】

3 8 4 . 塩が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される、段落 3 8 3 に記載の方法。

【 0 8 5 7 】

3 8 5 . 塩が、塩化ナトリウムである、段落 3 8 3 に記載の方法。

【 0 8 5 8 】

3 8 6 . 置換液が、約 1 m M、約 5 m M、約 1 0 m M、約 1 5 m M、約 2 0 m M、約 2 5 m M、約 3 0 m M、約 3 5 m M、約 4 0 m M、約 4 5 m M、約 5 0 m M、約 5 5 m M、約 6 0 m M、約 6 5 m M、約 7 0 m M、約 8 0 m M、約 9 0 m M、約 1 0 0 m M、約 1 1 0 m M、約 1 2 0 m M、約 1 3 0 m M、約 1 4 0 m M、約 1 5 0 m M、約 1 6 0 m M、約 1 7 0 m M、約 1 8 0 m M、約 1 9 0 m M、約 2 0 0 m M、約 2 5 0 m M、約 3 0 0 m M、約 3 5 0 m M、約 4 0 0 m M、約 4 5 0 m M または約 5 0 0 m M の塩化ナトリウムである、段落 3 8 3 に記載の方法。

【 0 8 5 9 】

3 8 7 . 置換液が、緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 0 】

3 8 8 . 置換液が、緩衝剤が N - (2 - アセトアミド) - アミノエタンスルホン酸 (A C E S)、酢酸の塩 (酢酸塩)、N - (2 - アセトアミド) - イミノ二酢酸 (A D A)、2 - アミノエタンスルホン酸 (A E S、タウリン)、アンモニア、2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール (A M P)、2 - アミノ - 2 - メチル - 1 , 3 - プロパンジオール (A M P D、アメジオール)、N - (1 , 1 - ジメチル - 2 - ヒドロキシエチル) - 3 - アミノ - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (A M P S O)、N , N - ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - アミノエタンスルホン酸 (B E S)、炭酸水素ナトリウム (重炭酸塩)、N , N ' - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - グリシン (ビシン)、[ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - イミノ] - トリス - (ヒドロキシメチルメタン) (ビス - トリス)、1 , 3 - ビス [トリス (ヒドロキシメチル) - メチルアミノ] プロパン (ビス - トリス - プロパン)、ホウ酸、ジメチルアルシン酸 (カコジル酸塩)、3 - (シクロヘキシルアミノ) - プロパンスルホン酸 (C A P S)、3 - (シクロヘキシルアミノ) - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸 (C A P S O)、炭酸ナトリウム (炭酸塩)、シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸 (C H E S)、クエン酸の塩 (クエン酸塩)、3 - [N - ビス (ヒドロキシエチル) アミノ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (D I P S O)、ギ酸の塩 (ギ酸塩)、グリシン、グリシルグリシン、N - (2 - ヒドロキシエチル) - ピペラジン - N ' - エタンスルホン酸 (H E P E S)、N - (2 - ヒドロキシエチル) - ピペラジン - N ' - 3 - プロパンスルホン酸 (H E P P S、E P P S)、N - (2 - ヒドロキシエチル) - ピペラジン - N ' - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (H E P P S O)、イミダゾール、リンゴ酸の塩 (リンゴ酸塩)、マレイン酸の塩 (マレイン酸塩)、2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸 (M E S)、3 - (N - モルホリノ) - プロパンスルホン酸 (M O P S)、3 - (N - モルホリノ) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (M O P S O)、リン酸の塩 (リン酸塩)、ピペラジン - N , N ' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (P I P E S)、ピペラジン - N , N ' - ビス (2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸) (P O P S O)、ピリジン、コハク酸の塩 (コハク酸塩)、3 - { [トリス (ヒドロキシメチル) - メチル] - アミノ } - プロパンスルホン酸 (T A P S)、3 - [N - トリス (ヒドロキシメチル) - メチルアミノ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (T A P S O)、トリエタノールアミン (T E A)、2 - [トリス (ヒドロキシメチル) - メチルアミノ] - エタンスルホン酸 (T E S)、N - [トリス (ヒドロキシメチル) - メチル] - グリシン (トリシン) および トリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン (トリス) からなる群

10

20

30

40

50

から選択される、緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 1 】

3 8 9 . 置換液が、緩衝剤が酢酸の塩（酢酸塩）、クエン酸の塩（クエン酸塩）、ギ酸の塩（ギ酸塩）、リンゴ酸の塩（リンゴ酸塩）、マレイン酸の塩（マレイン酸塩）、リン酸の塩（リン酸塩）およびコハク酸の塩（コハク酸塩）からなる群から選択される緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 2 】

3 9 0 . 置換液が、緩衝剤がクエン酸の塩（クエン酸塩）である緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 3 】

3 9 1 . 置換液が、緩衝剤がコハク酸の塩（コハク酸塩）である緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 4 】

3 9 2 . 置換液が、緩衝剤がリン酸の塩（リン酸塩）である緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 5 】

3 9 3 . 前記塩が、ナトリウム塩である、段落 3 8 8 ~ 3 9 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 6 】

3 9 4 . 前記塩が、カリウム塩である、段落 3 8 8 ~ 3 9 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 7 】

3 9 5 . 置換液が、緩衝剤がリン酸カリウムである緩衝溶液である、段落 3 8 1 に記載の方法。

【 0 8 6 8 】

3 9 6 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 4 . 0 ~ 1 1 . 0、約 5 . 0 ~ 1 0 . 0、約 5 . 5 ~ 9 . 0、約 6 . 0 ~ 8 . 0、約 6 . 0 ~ 7 . 0、約 6 . 5 ~ 7 . 5、約 6 . 5 ~ 7 . 0 または約 6 . 0 ~ 7 . 5 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 6 9 】

3 9 7 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 4 . 0、約 4 . 5、約 5 . 0、約 5 . 5、約 6 . 0、約 6 . 5、約 7 . 0、約 7 . 5、約 8 . 0、約 8 . 5、約 9 . 0、約 9 . 5、約 1 0 . 0、約 1 0 . 5 または約 1 1 . 0 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 に記載の方法。

【 0 8 7 0 】

3 9 8 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 6 . 0、約 6 . 5、約 7 . 0、約 7 . 5、約 8 . 0、約 8 . 5 または約 9 . 0 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 7 1 】

3 9 9 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 6 . 5、約 7 . 0 または約 7 . 5 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 7 2 】

4 0 0 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 6 . 0 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 7 3 】

4 0 1 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 6 . 5 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 7 4 】

4 0 2 . 透析濾過緩衝剤の pH が、約 7 . 0 である、段落 3 8 1 ~ 3 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 7 5 】

4 0 3 . 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0 . 0 1 m M ~ 1 0 0 m M、約 0 . 1 m M ~ 1 0 0 m M、約 0 . 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 m M ~ 1 0 0 m M、約 2 m M ~ 1 0 0 m M、約

10

20

30

40

50

3 m M ~ 1 0 0 m M、約 4 m M ~ 1 0 0 m M、約 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 6 m M ~ 1 0 0 m M、約 7 m M ~ 1 0 0 m M、約 8 m M ~ 1 0 0 m M、約 9 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 1 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 2 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 3 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 4 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 6 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 7 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 8 m M ~ 1 0 0 m M、約 1 9 m M ~ 1 0 0 m M、約 2 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 2 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 3 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 3 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 4 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 4 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 5 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 5 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 6 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 6 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 7 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 7 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 8 0 m M ~ 1 0 0 m M、約 8 5 m M ~ 1 0 0 m M、約 9 0 m M ~ 1 0 0 m M または約 9 5 m M ~ 1 0 0 m M である、段落 3 8 7 ~ 4 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 8 7 6 】

4 0 4 . 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0 . 0 1 m M ~ 5 0 m M、約 0 . 1 m M ~ 5 0 m M、約 0 . 5 m M ~ 5 0 m M、約 1 m M ~ 5 0 m M、約 2 m M ~ 5 0 m M、約 3 m M ~ 5 0 m M、約 4 m M ~ 5 0 m M、約 5 m M ~ 5 0 m M、約 6 m M ~ 5 0 m M、約 7 m M ~ 5 0 m M、約 8 m M ~ 5 0 m M、約 9 m M ~ 5 0 m M、約 1 0 m M ~ 5 0 m M、約 1 1 m M ~ 5 0 m M、約 1 2 m M ~ 5 0 m M、約 1 3 m M ~ 5 0 m M、約 1 4 m M ~ 5 0 m M、約 1 5 m M ~ 5 0 m M、約 1 6 m M ~ 5 0 m M、約 1 7 m M ~ 5 0 m M、約 1 8 m M ~ 5 0 m M、約 1 9 m M ~ 5 0 m M、約 2 0 m M ~ 5 0 m M、約 2 5 m M ~ 5 0 m M、約 3 0 m M ~ 5 0 m M、約 3 5 m M ~ 5 0 m M、約 4 0 m M ~ 5 0 m M または約 4 5 m M ~ 5 0 m M である、段落 3 8 7 ~ 4 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 8 7 7 】

4 0 5 . 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0 . 0 1 m M ~ 2 5 m M、約 0 . 1 m M ~ 2 5 m M、約 0 . 5 m M ~ 2 5 m M、約 1 m M ~ 2 5 m M、約 2 m M ~ 2 5 m M、約 3 m M ~ 2 5 m M、約 4 m M ~ 2 5 m M、約 5 m M ~ 2 5 m M、約 6 m M ~ 2 5 m M、約 7 m M ~ 2 5 m M、約 8 m M ~ 2 5 m M、約 9 m M ~ 2 5 m M、約 1 0 m M ~ 2 5 m M、約 1 1 m M ~ 2 5 m M、約 1 2 m M ~ 2 5 m M、約 1 3 m M ~ 2 5 m M、約 1 4 m M ~ 2 5 m M、約 1 5 m M ~ 2 5 m M、約 1 6 m M ~ 2 5 m M、約 1 7 m M ~ 2 5 m M、約 1 8 m M ~ 2 5 m M、約 1 9 m M ~ 2 5 m M または約 2 0 m M ~ 2 5 m M である、段落 3 8 7 ~ 4 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 8 7 8 】

4 0 6 . 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0 . 0 1 m M ~ 1 5 m M、約 0 . 1 m M ~ 1 5 m M、約 0 . 5 m M ~ 1 5 m M、約 1 m M ~ 1 5 m M、約 2 m M ~ 1 5 m M、約 3 m M ~ 1 5 m M、約 4 m M ~ 1 5 m M、約 5 m M ~ 1 5 m M、約 6 m M ~ 1 5 m M、約 7 m M ~ 1 5 m M、約 8 m M ~ 1 5 m M、約 9 m M ~ 1 5 m M、約 1 0 m M ~ 1 5 m M、約 1 1 m M ~ 1 5 m M、約 1 2 m M ~ 1 5 m M、約 1 3 m M ~ 1 5 m M または約 1 4 m M ~ 1 5 m M である、段落 3 8 7 ~ 4 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 8 7 9 】

4 0 7 . 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0 . 0 1 m M ~ 1 0 m M、約 0 . 1 m M ~ 1 0 m M、約 0 . 5 m M ~ 1 0 m M、約 1 m M ~ 1 0 m M、約 2 m M ~ 1 0 m M、約 3 m M ~ 1 0 m M、約 4 m M ~ 1 0 m M、約 5 m M ~ 1 0 m M、約 6 m M ~ 1 0 m M、約 7 m M ~ 1 0 m M、約 8 m M ~ 1 0 m M または約 9 m M ~ 1 0 m M である、段落 3 8 7 ~ 4 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 8 8 0 】

4 0 8 . 透析濾過緩衝剤の濃度が、約 0 . 0 1 m M、約 0 . 0 5 m M、約 0 . 1 m M、約 0 . 2 m M、約 0 . 3 m M、約 0 . 4 m M、約 0 . 5 m M、約 0 . 6 m M、約 0 . 7 m M、約 0 . 8 m M、約 0 . 9 m M、約 1 m M、約 2 m M、約 3 m M、約 4 m M、約 5 m M、約 6 m M、約 7 m M、約 8 m M、約 9 m M、約 1 0 m M、約 1 1 m M、約 1 2 m M、約 1 3 m M、約 1 4 m M、約 1 5 m M、約 1 6 m M、約 1 7 m M、約 1 8 m M、約 1 9 m M、約 2 0 m M、約 2 5 m M、約 3 0 m M、約 3 5 m M、約 4 0 m M、約 4 5 m M、約 5 0

50

mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約75mM、約80mM、約85mM、約90mM、約95mMまたは約100mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0881】

409．透析濾過緩衝剤の濃度が、約0.1mM、約0.2mM、約1mM、約5mM、約10mM、約15mM、約20mM、約30mM、約40mM、または約50mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0882】

410．透析濾過緩衝剤の濃度が、約30mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0883】

411．透析濾過緩衝剤の濃度が、約25mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0884】

412．透析濾過緩衝剤の濃度が、約20mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0885】

413．透析濾過緩衝剤の濃度が、約15mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0886】

414．透析濾過緩衝剤の濃度が、約10mMである、段落387～402のいずれか1つに記載の方法。

【0887】

415．置換液が、キレート剤を含む、段落381～414のいずれか1つに記載の方法。

【0888】

416．置換液が、ミョウバンキレート剤を含む、段落381～414のいずれか1つに記載の方法。

【0889】

417．置換液が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N',N'-三酢酸(EDTA-OH)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、1,2-シクロヘキサンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸(CyDTA)、ジエチレントリアミン-N,N,N',N",N"-五酢酸(DTPA)、1,3-ジアミノプロパン-2-オール-N,N,N',N'-四酢酸(DPTA-OH)、エチレンジアミン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシフェニル酢酸)(EDDHA)、エチレンジアミン-N,N'-ジプロピオン酸ジヒドロクロリド(EDDP)、エチレンジアミン-テトラキス(メチレンスルホン酸)(EDTPO)、ニトリロトリス(メチレンホスホン酸)(NTPO)、イミノ-二酢酸(IDA)、ヒドロキシイミノ-二酢酸(HIDA)、ニトリロ-三酢酸(NTP)、トリエチレントラミン-六酢酸(TTHA)、ジメルカプトコハク酸(DMSA)、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸(DMPs)、アルファリボ酸(ALA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、チアミンテトラヒドロフルフリルジスルフィド(TTFD)、ジメルカプロール、ペニシラミン、デフェロキサミン(DFOA)、デフェラシロクス、ホスホネート、クエン酸の塩(クエン酸塩)およびこれらの組合せからなる群から選択されるキレート剤を含む、段落381～414のいずれか1つに記載の方法。

【0890】

418．置換液が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N',N'-三酢酸(EDTA-OH)、ヒドロキシエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、エチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル

10

20

30

40

50

) - N, N, N', N' - 四酢酸 (EGTA)、1, 2 - シクロヘキサンジアミン - N, N, N', N' - 四酢酸 (CyDTA)、ジエチレントリアミン - N, N, N', N'', N'' - 五酢酸 (DTPA)、1, 3 - ジアミノプロパン - 2 - オール - N, N, N', N' - 四酢酸 (DPTA-OH)、エチレンジアミン - N, N' - ビス (2 - ヒドロキシフェニル酢酸) (EDDHA)、クエン酸の塩 (クエン酸塩) およびこれらの組合せからなる群から選択されるキレート剤を含む、段落 381 ~ 414 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0891】

419 . 置換液が、キレート剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む、段落 381 ~ 414 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0892】

420 . 置換液が、キレート剤としてクエン酸の塩 (クエン酸塩) を含む、段落 381 ~ 414 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0893】

421 . 置換液が、キレート剤としてクエン酸ナトリウムを含む、段落 381 ~ 414 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0894】

422 . 置換液中のキレート剤の濃度が、1 ~ 500 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0895】

423 . 置換液中のキレート剤の濃度が、2 ~ 400 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0896】

424 . 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 400 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0897】

425 . 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 200 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0898】

426 . 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 100 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0899】

427 . 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 50 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0900】

428 . 置換液中のキレート剤の濃度が、10 ~ 30 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0901】

429 . 置換液中のキレート剤の濃度が、約 0.01 mM、約 0.05 mM、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.5 mM、約 0.6 mM、約 0.7 mM、約 0.8 mM、約 0.9 mM、約 1 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、約 15 mM、約 16 mM、約 17 mM、約 18 mM、約 19 mM、約 20 mM、約 21 mM、約 22 mM、約 23 mM、約 24 mM、約 25 mM、約 26 mM、約 27 mM、約 28 mM、約 29 mM、約 30 mM、約 31 mM、約 32 mM、約 33 mM、約 34 mM、約 35 mM、約 36 mM、約 37 mM、約 38 mM、約 39 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM または約 100 mM である、段落 415 ~ 421 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0902】

430 . 置換液中のキレート剤の濃度が、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20

10

20

30

40

50

mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約75mM、約80mM、約85mM、約90mM、約95mMまたは約100mMである、段落415～421のいずれか1つに記載の方法。

【0903】

431．置換液中のキレート剤の濃度が、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mMまたは約50mMである、段落415～421のいずれか1つに記載の方法。

【0904】

432．置換液が、塩を含む、段落387～431のいずれか1つに記載の方法。

10

【0905】

433．塩が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される、段落432に記載の方法。

【0906】

434．塩が、塩化ナトリウムである、段落432に記載の方法。

【0907】

435．置換液が、約1、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約250または約300mMの塩化ナトリウムを含む、段落432～434のいずれか1つに記載の方法。

20

【0908】

436．透析容量の数が、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45または50である、段落381～435のいずれか1つに記載の方法。

【0909】

437．透析容量の数が、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95または約100である、段落381～435のいずれか1つに記載の方法。

30

【0910】

438．透析容量の数が、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15である、段落381～435のいずれか1つに記載の方法。

【0911】

439．前記限外濾過ステップが、約20～約90の温度で実施される、段落381～438のいずれか1つに記載の方法。

【0912】

440．前記透析濾過ステップが、約35～約80の温度、約40～約70の温度、約45～約65の温度、約50～約60の温度、約50～約55の温度、約45～約55の温度または約45～約55の温度で実施される、段落381～438のいずれか1つに記載の方法。

40

【0913】

441．前記透析濾過ステップが、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64

50

、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される、段落 381 ~ 438 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0914】

442 . 前記透析濾過ステップが、約 50 の温度で実施される、段落 381 ~ 438 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0915】

443 . 前記限外濾過ステップが、約 20 ~ 約 90 の温度で実施される、段落 359 ~ 438 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0916】

444 . 前記限外濾過および透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約 35 ~ 約 80 の温度、約 40 ~ 約 70 の温度、約 45 ~ 約 65 の温度、約 50 ~ 約 60 の温度、約 50 ~ 約 55 の温度、約 45 ~ 約 55 の温度または約 45 ~ 約 55 の温度で実施される、段落 359 ~ 438 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0917】

445 . 前記限外濾過ステップおよび透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、約 61、約 62、約 63、約 64、約 65、約 66、約 67、約 68、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76、約 77、約 78、約 79 または約 80 の温度で実施される、段落 359 ~ 438 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0918】

446 . 前記限外濾過および透析濾過ステップが、両方とも行われる場合、約 50 の温度で実施される、段落 359 ~ 438 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0919】

447 . 前記精製された多糖の溶液が、サイジングによってホモジナイズされる、段落 359 ~ 446 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0920】

448 . 前記精製された多糖の溶液が、機械的サイジングにかけられる、段落 359 ~ 446 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0921】

449 . 前記精製された多糖の溶液が、高圧ホモジナイゼーション剪断にかけられる、段落 359 ~ 446 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0922】

450 . 前記精製された多糖の溶液が、化学的加水分解にかけられる、段落 359 ~ 446 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0923】

451 . 前記精製された多糖の溶液が、標的分子量にサイジングされる、段落 359 ~ 450 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0924】

452 . 前記精製された多糖の溶液が、約 5 kDa ~ 約 4,000 kDa の分子量にサイジングされる、段落 359 ~ 451 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0925】

453 . 前記精製された多糖の溶液が、約 10 kDa ~ 約 4,000 kDa の分子量にサイジングされる、段落 359 ~ 451 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0926】

10

20

30

40

50

454. 前記精製された多糖の溶液が、約50kDa～約4,000kDaの分子量にサイジングされる、段落359～451のいずれか1つに記載の方法。

【0927】

455. 前記精製された多糖の溶液が、約50kDa～約3,500kDa；約50kDa～約3,000kDa；約50kDa～約2,500kDa；約50kDa～約2,000kDa；約50kDa～約1,750kDa；約50kDa～約1,500kDa；約50kDa～約1,250kDa；約50kDa～約1,000kDa；約50kDa～約750kDa；約50kDa～約500kDa；約100kDa～約4,000kDa；約100kDa～約3,500kDa；約100kDa～約3,000kDa；約100kDa～約2,500kDa；約100kDa～約2,250kDa；約100kDa～約2,000kDa；約100kDa～約1,750kDa；約100kDa～約1,500kDa；約100kDa～約1,250kDa；約100kDa～約1,000kDa；約100kDa～約750kDa；約100kDa～約500kDa；約200kDa～約4,000kDa；約200kDa～約3,500kDa；約200kDa～約3,000kDa；約200kDa～約2,500kDa；約200kDa～約2,250kDa；約200kDa～約2,000kDa；約200kDa～約1,750kDa；約200kDa～約1,500kDa；約200kDa～約1,250kDa；約200kDa～約1,000kDa；約200kDa～約750kDa；または約200kDa～約500kDaの分子量にサイジングされる、段落359～451のいずれか1つに記載の方法。さらなるそのような実施形態では、精製された多糖は、約250kDa～約3,500kDa；約250kDa～約3,000kDa；約250kDa～約2,500kDa；約250kDa～約2,000kDa；約250kDa～約1,750kDa；約250kDa～約1,500kDa；約250kDa～約1,250kDa；約250kDa～約1,000kDa；約250kDa～約750kDa；約250kDa～約500kDa；約300kDa～約4,000kDa；約300kDa～約3,500kDa；約300kDaおよび約3,000kDa；約300kDaおよび約2,500kDa；約300kDaおよび約2,250kDa；約300kDa～約2,000kDa；約300kDa～約1,750kDa；約300kDa～約1,500kDa；約300kDa～約1,250kDa；約300kDa～約1,000kDa；約300kDa～約750kDa；約300kDa～約500kDa；約500kDa～約4,000kDa；約500kDa～約3,500kDa；約500kDa～約3,000kDa；約500kDa～約2,500kDa；約500kDa～約2,250kDa；約500kDa～約2,000kDa；約500kDa～約1,750kDa；約500kDa～約1,500kDa；約500kDa～約1,250kDa；約500kDa～約1,000kDa；約500kDa～約750kDa；または約500kDa～約600kDaの分子量にサイジングされる。

【0928】

456. 前記精製された多糖の溶液が、約5kDa、約10kDa、約15kDa、約20kDa、約25kDa、約30kDa、約35kDa、約40kDa、約45kDa、約50kDa、約75kDa、約90kDa、約100kDa、約150kDa、約200kDa、約250kDa、約300kDa、約350kDa、約400kDa、約450kDa、約500kDa、約550kDa、約600kDa、約650kDa、約700kDa、約750kDa、約800kDa、約850kDa、約900kDa、約950kDa、約1000kDa、約1250kDa、約1500kDa、約1750kDa、約2000kDa、約2250kDa、約2500kDa、約2750kDa、約3000kDa、約3250kDa、約3500kDa、約3750kDaまたは約4,000kDaの分子量にサイジングされる、段落359～451のいずれか1つに記載の方法。

【0929】

457. 前記精製された多糖の溶液が、滅菌濾過される、段落1～456のいずれか1

10

20

30

40

50

つに記載の方法。

【0930】

458．前記滅菌濾過が、デッドエンド濾過である、段落457に記載の方法。

【0931】

459．前記滅菌濾過が、接線流濾過である、段落457に記載の方法。

【0932】

460．フィルターが、約0.01～0.2ミクロン、約0.05～0.2ミクロン、約0.1～0.2ミクロンまたは0.15～0.2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落457～459のいずれか1つに記載の方法。

【0933】

461．フィルターが、約0.05、約0.1、約0.15または約0.2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落457～459のいずれか1つに記載の方法。

【0934】

462．フィルターが、約0.2ミクロンの名目保持範囲を有する、段落457～459のいずれか1つに記載の方法。

【0935】

463．フィルターが、約25～1500 L/m²、50～1500 L/m²、75～1500 L/m²、100～1500 L/m²、150～1500 L/m²、200～1500 L/m²、250～1500 L/m²、300～1500 L/m²、350～1500 L/m²、400～1500 L/m²、500～1500 L/m²、750～1500 L/m²、1000～1500 L/m²または1250～1500 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0936】

464．フィルターが、25～1000 L/m²、50～1000 L/m²、75～1000 L/m²、100～1000 L/m²、150～1000 L/m²、200～1000 L/m²、250～1000 L/m²、300～1000 L/m²、350～1000 L/m²、400～1000 L/m²、500～1000 L/m²または750～1000 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0937】

465．フィルターが、25～500 L/m²、50～500 L/m²、75～500 L/m²、100～500 L/m²、150～500 L/m²、200～500 L/m²、250～500 L/m²、300～500 L/m²、350～500 L/m²または400～500 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0938】

466．フィルターが、25～300 L/m²、50～300 L/m²、75～300 L/m²、100～300 L/m²、150～300 L/m²、200～300 L/m²または250～300 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0939】

467．フィルターが、25～250 L/m²、50～250 L/m²、75～250 L/m²、100～250 L/m²または150～250 L/m²、200～250 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0940】

468．フィルターが、25～100 L/m²、50～100 L/m²または75～100 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0941】

469．フィルターが、約25、約50、約75、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約500、約600、約700、約800、約

10

20

30

40

50

900、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400または約1500 L/m²のフィルター能力を有する、段落457～462のいずれか1つに記載の方法。

【0942】

470．得られた精製された多糖が、液体溶液である、段落1～469のいずれか1つに記載の方法。

【0943】

471．得られた精製された多糖が、乾燥粉末である、段落1～469のいずれか1つに記載の方法。

【0944】

472．得られた精製された多糖溶液が、凍結乾燥される、段落1～469のいずれか1つに記載の方法。

10

【0945】

473．得られた精製された多糖溶液が、凍結乾燥ケーキである、段落1～469または472のいずれか1つに記載の方法。

【0946】

474．前記細菌多糖が、莢膜多糖、莢膜下多糖、またはリポ多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

【0947】

475．前記細菌多糖が、莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

20

【0948】

476．前記細菌多糖が、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

【0949】

477．前記細菌多糖が、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 5型に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

【0950】

478．前記細菌多糖が、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 8型に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

【0951】

479．前記細菌多糖が、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

30

【0952】

480．前記細菌多糖が、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b型に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

【0953】

481．前記細菌多糖が、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

40

【0954】

482．前記細菌多糖が、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群A (MenA)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群W135 (MenW135)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群Y (MenY)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群X (MenX) または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 血清群C (MenC) に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

【0955】

483．前記細菌多糖が、大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来する莢膜多糖である、段落1～473のいずれか1つに記載の方法。

50

【0956】

484. 前記細菌多糖が、溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌 (GBS)) に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0957】

485. 前記細菌多糖が、GBS Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VIIおよびVII型に由来する莢膜多糖からなる群から選択される莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0958】

486. 前記細菌多糖が、腸毒性大腸菌 (*Escherichia coli*) 群 (E EC群) の大腸菌 (*Escherichia coli*) 株部分に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

10

【0959】

487. 前記細菌多糖が、腸管毒素産生性大腸菌 (*Escherichia coli*) (ETEC)、病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EPEC)、腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) - O157:H7 (EHEC)、または腸管細胞侵入性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EIEC) などの腸毒性大腸菌 (*Escherichia coli*) 群 (EEC群) の大腸菌 (*Escherichia coli*) 株部分に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。ある実施形態では、細菌莢膜多糖の供給源は、尿路病原性大腸菌 (*Escherichia coli*) (UPEC) である。

20

【0960】

488. 前記細菌多糖が、血清型O157:H7、O26:H11、O111:H- およびO103:H2 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0961】

489. 前記細菌多糖が、血清型O6:K2:H1 およびO18:K1:H7 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0962】

490. 前記細菌多糖が、血清型O45:K1、O17:K52:H18、O19:H34 およびO7:K1 からなる群から選択される大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

30

【0963】

491. 前記細菌多糖が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O104:H4 に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0964】

492. 前記細菌多糖が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O1:K12:H7 に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0965】

493. 前記細菌多糖が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O127:H6 に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

40

【0966】

494. 前記細菌多糖が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O139:H28 に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0967】

495. 前記細菌多糖が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 血清型O128:H2 に由来する莢膜多糖である、段落1~473のいずれか1つに記載の方法。

【0968】

496. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumo*

50

niae) に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0969】

497. 前記細菌多糖が、血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、6C、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24B、24F、29、31、33F、34、35B、35F、38、72 および 73 からなる群から選択される肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0970】

498. 前記細菌多糖が、血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、9N、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、22F、23A、23B、23F、24F、29、31、33F、35B、35F、38、72 および 73 からなる群から選択される肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0971】

499. 前記細菌多糖が、血清型 8、10A、11A、12F、15B、22F および 33F からなる群から選択される肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0972】

500. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 1 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0973】

501. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 2 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0974】

502. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 3 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0975】

503. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 4 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0976】

504. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 5 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0977】

505. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0978】

506. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 6B に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0979】

507. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumo*

50

n i a e) 血清型 6 C に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 0 】

5 0 8 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 7 F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 1 】

5 0 9 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 8 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 2 】

5 1 0 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 9 V に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 3 】

5 1 1 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 9 N に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 4 】

5 1 2 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 0 A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 5 】

5 1 3 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 1 A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 6 】

5 1 4 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 2 F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 7 】

5 1 5 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 4 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 8 】

5 1 6 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 5 A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 8 9 】

5 1 7 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 5 B に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 9 0 】

5 1 8 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 5 C に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 9 9 1 】

5 1 9 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 1 6 F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0992】

520. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 17F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0993】

521. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 18C に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0994】

522. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 19A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0995】

523. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 19F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0996】

524. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 20 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0997】

525. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 20A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0998】

526. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 20B に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0999】

527. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 22F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【1000】

528. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 23A に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【1001】

529. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 23B に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【1002】

530. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 23F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【1003】

531. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 24B に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【1004】

532. 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)

50

n i a e) 血清型 2 4 F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 0 5 】

5 3 3 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 2 9 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 0 6 】

5 3 4 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 3 1 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 0 7 】

5 3 5 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 3 3 F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 0 8 】

5 3 6 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 3 4 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 0 9 】

5 3 7 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 3 5 B に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 1 0 】

5 3 8 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 3 5 F に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 1 1 】

5 3 9 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 3 8 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 1 2 】

5 4 0 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 7 2 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 1 3 】

5 4 1 . 前記細菌多糖が、肺炎連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 血清型 7 3 に由来する莢膜多糖である、段落 1 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 1 0 1 4 】

5 4 2 . 段落 1 ~ 5 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法によって得られた精製された細菌多糖。

【 1 0 1 5 】

5 4 3 . 段落 1 ~ 5 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法によって得られる精製された細菌多糖。

【 1 0 1 6 】

5 4 4 . 抗原としての使用のための段落 1 ~ 5 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法によって得られた精製された細菌多糖。

【 1 0 1 7 】

5 4 5 . 担体タンパク質にコンジュゲートされた、段落 1 ~ 5 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法によって得られた精製された細菌多糖。

10

20

30

40

50

【1018】

546. 担体タンパク質にさらにコンジュゲートされた、段落1～541のいずれか1つに記載の方法によって得られた精製された細菌多糖。

【1019】

547. 段落1～541のいずれか1つに記載の方法によって得られた精製された細菌多糖の糖コンジュゲート。

【1020】

548. 段落542～543のいずれか1つに記載の精製された多糖のいずれかを含む免疫原性組成物。

【1021】

549. 段落546～547のいずれか1つに記載の糖コンジュゲートを含む免疫原性組成物。

【1022】

550. 本明細書に開示される糖コンジュゲートのいずれかを含む免疫原性組成物。

【1023】

551. 本明細書に開示される糖コンジュゲートの組合せのいずれかを含む免疫原性組成物。

【1024】

本明細書で使用される場合、用語「約」は、記述された濃度範囲、時間枠、分子量、温度またはpHなどの、統計的に意味のある値の範囲内にあることを意味する。そのような範囲は、所与の値または範囲の1桁分以内、典型的には、20%以内、より典型的には、10%以内、さらにより典型的には、5%以内または1%以内であってもよい。時には、そのような範囲は、所与の値または範囲の測定および/または決定のために使用される標準的な方法に典型的な実験誤差以内であってもよい。用語「約」によって包含される許容可能な変動は、試験下の特定の系に依存し、当業者であれば容易に理解できる。本出願内である範囲が記載される場合はいつでも、その範囲内の全ての数も、本開示の実施形態として企図される。

【1025】

本明細書における用語「含む (comprising)」、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」および「含む (comprises)」は、全ての例において、それぞれ、用語「本質的にかつらなる (Consisting essentially of)」、「本質的にかつらなる (consist essentially of)」、「本質的にかつらなる (consists essentially of)」、「からなる (consisting of)」、「からなる (consist of)」および「からなる (consists of)」と置換可能であってもよいことが本発明者らによって意図される。

【1026】

本明細書でそれぞれ互換的に使用される、「免疫原性量」、「免疫学的有効量」、「治療有効量」、「予防有効量」、または「用量」は、一般的には、当業者には公知の標準的なアッセイによって測定した場合、細胞性 (T細胞) または体液性 (B細胞もしくは抗体) 応答のいずれかである免疫応答を惹起するのに十分な抗原または免疫原性組成物の量を指す。

【1027】

本文献の範囲のいずれかの中の任意の全数が、本開示の実施形態として企図される。

【1028】

本特許明細書内で引用される全ての参考文献または特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1029】

本発明は、添付の実施例に例示される。以下の実施例は、そうでなければ詳細に説明される場合を除いて、当業者には周知であり、日常的である標準的な技術を使用して実行される。実施例は、例示的であるが、本発明を限定するものではない。

10

20

30

40

50

【実施例】

【1030】

(実施例1)

肺炎球菌多糖血清型8の精製

精製のためのプロセスの流れ図を、図1に示す。プロセスは、NLS不活化発酵ブロス (EP2129693を参照されたい) から始まり、回収ユニット操作 (凝集、遠心分離および深層濾過)、次いで、精製ユニット操作 (限外濾過、および炭素濾過) を含む。

【1031】

1. 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型8のNLS不活化発酵ブロスから始まる。培養物を、Hy-Soy培地中で増殖させた。増殖の終わりに (光密度のさらなる増加がないことによって示される)、培養物を、NLSで不活化した (EP2129693を参照されたい)。

10

【1032】

2. 凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。NLSの添加によって溶解された発酵ブロスを使用して、凝集を実施した。

【1033】

2.1 pHおよびミョウバンの効果

実験を行って、pH、ミョウバンのパーセント、および保持時間の効果を検査した。

20

【1034】

予め設定された量の発酵ブロスを、異なる容器中にアリコートし、10% (w/w) ストックミョウバン溶液 (硫酸カリウムアルミニウム十二水和物および脱イオン水を使用して調製される) を、2% (w/v) の最終濃度となるように添加した。

【1035】

次いで、pHを所望のレベルに調整した。次いで、様々な保持時点の後、容器を12,000gで15分間、遠心分離した。上清を、タンパク質、多糖および透明度についてアッセイした。1、4および24時間の保持時間での2%ミョウバンの存在下でのタンパク質除去および透明度に対するpHの効果は、図2に示す。このデータは、pH2.5~4.0および2%ミョウバンでのタンパク質除去が非常に有効であったことを示す。80%を超えるタンパク質不純物が、この単一のステップにおいて除去された。分離液 (centrate) の透明度は、pHと保持時間の両方によって影響された。図2は、3.5のpHが最も高い分離液の透明度を与えたことを示す。

30

【1036】

pH3.5でのタンパク質除去および分離液透明度に対するミョウバン濃度および保持時間の効果を、図3に示す。保持時間試験を、周囲温度 (20 ± 2) で行った。その結果は、タンパク質除去または分離液の清澄化において、1.0%のミョウバンでは十分ではなかったことを示す。2%と3%ミョウバンの差異は、有意ではなかった。

【1037】

2.2 温度の効果

凝集したブロス (pH3.5および2%ミョウバン) を、50 に加熱し、30および60分間保持した。周囲温度に冷却した後、試料を12,000gで遠心分離した。分離液の透明度を、周囲温度で実施した凝集に由来する分離液と比較して測定した。周囲温度の凝集に由来する分離液のOD600は、0.99であった。50 で30分後、OD600は0.13に減少し、50 で60分後、OD600は0.04にさらに低下した。これは、より高い温度で凝集を実施することによって、分離液の透明度を有意に改善することができることを明確に示している。

40

【1038】

2.3 凝集に影響する変数の効果

50

血清型 8 の凝集プロセスに対して影響する変数の効果をより良好に定義するために、試験を行った。本発明者らは、多糖の回収、透明度および不純物除去に関するミョウバン濃度、pH、温度、および保持時間の因子を検査した。

【 1 0 3 9 】

特定量のミョウバンを、室温でブロスに添加した後、5 N H_2SO_4 または 5 N $NaOH$ を用いて pH を調整した。試料を、所望の温度に設定した水浴中に入れ、それぞれの時点で、試料を分析のために採取した後、12,000 x g で遠心分離した。上清を、多糖濃度、タンパク質および濁度 (OD 600) について分析した。

【 1 0 4 0 】

【表 1】

試料	ミョウバン (%)	pH	温度 (°C)	保持時間 (hr)	多糖(回収率%)	タンパク質 (除去率%)
1	2	3	40	2	88	94
2	2	2	40	2	82	95
3	2	3	40	3	84	95
4	4	2	60	1	81	95
5	2	3	40	2	86	94
6	4	4	60	3	73	94
7	0	4	60	3	71	79
8	4	4	20	1	61	93
9	0	2	20	3	50	93
10	4	2	20	3	69	91
11	0	2	60	1	71	95
12	0	3	40	2	41	94
13	4	2	20	1	56	92
14	2	4	40	2	87	95
15	0	4	20	1	94	81
16	4	4	60	1	83	94
17	4	4	20	3	53	93
18	4	2	60	3	92	94
19	2	3	20	2	59	95
20	0	2	20	1	79	73
21	0	4	20	3	79	76
22	2	3	40	1	74	95
23	2	3	60	2	88	94
24	2	3	40	2	89	94
25	4	3	40	2	84	94
26	0	4	60	1	83	65
27	0	2	60	3	100	93

10

20

30

40

50

【1041】

結果の分析により、凝集ユニット操作のための望ましいpH、ミョウバンのパーセントおよび保持時間が、かなり広く、pH: 2.75 ~ 3.75; ミョウバン: 1.5 ~ 3.0% w/v; および保持時間: 1.5 ~ 3時間であることが示された。望ましい温度範囲は、約45 ~ 60であった。

【1042】

3. 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、12,000 x gに設定した。

【1043】

4. 深層濾過

遠心分離は主要な固体/液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【1044】

初期試験を、0.25 ~ 1.0ミクロンの名目保持範囲を有するフィルターを使用して行った。分離液の透明度は、フィルター能力に影響した。

【1045】

特に、凝集を約20で実施した場合、分離液の透明度はそれほど良好ではなく、OD600は0.8 ~ 1.4の範囲であり、フィルター能力は影響を受けた。より高温の凝集条件を使用した場合、深層濾過プロセスは、よりロバストで一貫した能力を示し、フィルター能力は400 L/m²より高く、さらに分離液のOD600は0.04 ~ 0.2の範囲であった。

【1046】

5. 任意選択の0.45ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に0.45ミクロンのフィルターを使用した。

【1047】

6. 限外濾過/透析濾過 - (UFD F - 1)

精製は、深層濾液から始まる(上記のステップ4または5に由来する)。

【1048】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤(アルミニウム)のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【1049】

1回目のUFD Fの前に、深層濾液を、5N水酸化ナトリウムを使用して7.0に調整した。あるいは、透析濾過緩衝剤としてクエン酸ナトリウム/リン酸ナトリウム、pH7.0(例えば、10mMリン酸塩/25mMクエン酸塩、pH7.0)に対してUFD F透析濾過を行う前に、pHを調整しない。

【1050】

7. 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである(WO2008118752を参照されたい)。

【1051】

炭素フィルターによりタンパク質不純物を除去する有効性を試験した。3つの7'直径のR32SP炭素フィルターを、連続して使用した。UFD F - 1に由来する保持液を、40LMHの流量で濾過し、炭素濾液のUV280を記録した。

【1052】

保持液に関するUV280シグナルは、炭素濾過前に460 - mA uに過ぎず、水洗浄のベースラインと比較してかなり低かった(380 - mA u)。これは、多くのタンパク質関連不純物が以前のユニット操作によって既に除去されていることを示唆していた。し

10

20

30

40

50

かしながら、炭素フィルターは、残存する残留不純物を非常に効率的に依然として除去した。これは、フィルターを一系列に置いた後のUV280シグナルの低下において示され、そこで、UVシグナルはベースラインまで低下した。このデータは、タンパク質関連不純物が、炭素フィルターを通す1回の通過によって除去されることを示していた。

【1053】

8. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFDF - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、25 mMクエン酸ナトリウム、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、30 kDaの分子量カットオフフィルターを使用して実施される。

10

【1054】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。透析濾過緩衝剤として、様々な溶液を使用した：50 mM NaClと水、または透析濾過緩衝剤としての25 mMリン酸カリウム pH 6.0との組合せ。

【1055】

クエン酸塩除去に対する25 mMリン酸カリウム pH 6.0の効果を評価した。この実験において、炭素濾液を、2.6倍に濃縮した後、25 mMリン酸カリウム pH 6.0に対して透析濾過した。試料を除去し、透析濾過の様々な点で残留クエン酸塩について分析した。

【1056】

0.13の拒絶係数が得られた。6-logの低下に達するためには、7倍透析容量未満の25 mMリン酸カリウム pH 6.0が必要である。

20

【1057】

9. 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するために、3つの稠度バッチを製造した。発酵バッチ全体を、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【1058】

3つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を表2に示す。全てのステップの収率は、約77~99%であり、非常に再現性が高く、ロバストである。

30

【1059】

40

50

【表 2】

表 2: 血清型 8 の稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

血清型 8	VRU 稠度バッチ		
	001	002	003
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	77	90	88
UFDF1 保持液	102	102	100
炭素濾液	95	93	92
UFDF2 保持液	97	97	96
最終濾過	99	99	99
全体の収率	72	84	78

10

20

【1060】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表3に示す。3つの稠度バッチは、予め定義された許容基準の全てを満たした。

【1061】

【表 3】

表 3: 血清型 8 の稠度バッチに関する分析結果

血清型 8	稠度		
	001	002	003
アッセイ			
残留 NLS	< LOQ	<LOQ	<LOQ
残留核酸	< 0.16%	<0.15%	<0.14%
残留タンパク質	0.3%	0.3%	0.3%
残留 C ポリ	2.5 wt%	2.8 wt%	2.4wt%

30

40

【1062】

(実施例 2)

肺炎球菌多糖血清型 33F の精製

50

肺炎球菌多糖 33F の精製のためのプロセスの流れ図を、図 1 に示す。プロセスは、NLS 処理された発酵ブロスから始まり、回収ユニット操作（凝集、遠心分離および深層濾過）、次いで、精製ユニット操作（限外濾過、および炭素濾過）を含む。

【1063】

1. 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）血清型 33F の NLS 不活化発酵ブロスから始まる。培養物を、Hy-Soy 培地中で増殖させた。増殖の終わりに（光密度のさらなる増加がないことによって示される）、培養物を、NLS で処理した（EP 2129693 を参照されたい）。

【1064】

2. 凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。NLS の添加によって溶解された発酵ブロスを使用して、凝集を実施した。

【1065】

2.1 pH の効果

実験を行って、pH の効果を検査した。

【1066】

血清型 33F の凝集のための最適 pH を決定するために、不活化 33F 発酵ブロス上で酸滴定試験を実施した。その試験の結果を、図 4 に示す。不純物除去対 pH のグラフは、最大不純物除去が pH 3.5 で / pH 3.5 より下で達成されることを示している。

【1067】

以前の実験で同定された pH を使用して、ミョウバン凝集試験を行った。その試験の結果を、図 5 に示す。OD 600 によって測定された沈降速度は、1.0% より高いミョウバン濃度で大きく不変である。最も高い不純物除去は、1.5% ミョウバンであるが、1~3% ミョウバンでは有意差は認められない。滴定範囲にわたって多糖濃度に有意な変化はなかった。

【1068】

2.2 他のパラメータの効果

ミョウバン添加の速度の効果を決定するために、発酵バッチを 2 つに分割し、ストックミョウバン溶液を 3 分または 60 分かけて添加した。遠心分離後の透明度または深層濾過能力に対する有意な効果はなかった。これは、ミョウバン添加速度が有意なプロセスパラメータではないことを示している。

【1069】

凝集条件をさらに改良するために、多糖回収率、透明度およびタンパク質除去に対するミョウバン濃度、pH、温度、および保持時間の効果を検査する実験設計（DOE）を設定した。検査した因子を、表 4 に示す。

【1070】

【表 4】

表 4: 33F 凝集試験において検査した DOE 因子

因子	範囲
ミョウバン濃度 (% w/v)	0-4
pH	2-5
温度 (°C)	20-60
保持時間(分)	30-90

10

20

30

40

50

【1071】

全ての条件が95%より高い回収率を与えたため、多糖回収率は、試験したいずれの条件下でも有意に影響されなかった。同様に、タンパク質除去は、試験した全ての条件について90%より高かった。ミョウバンの濃度は、OD600によって測定した場合、透明度に対して最も大きな影響を有する。低いミョウバン濃度では、OD600は増大した。また、温度が低下し、pHが増大するにつれて、透明度がわずかに増加した。

【1072】

凝集条件が清澄化ユニット操作に対して有する効果を決定するために、50 で凝集させた発酵ブロス上で連続遠心分離試験を行った。

【1073】

20 で凝集したブロスについて観察されるように、50 で凝集したブロスについて、400~1200 mL / 分の供給速度では分離液の透明度の有意な増加はなかった。しかしながら、分離液の透明度と、深層フィルター能力は両方とも、20 での凝集と比較して有意に増加した。新しい凝集条件を使用した場合、深層フィルター能力は、400 L / m² より高い。

【1074】

凝集温度の20 から50 への上昇が、分離液の透明度およびかくして、深層フィルターの能力を改善したことを確認すること(以下を参照されたい)。分離液の透明度および深層濾液を測定した(表5を参照されたい)。

【1075】

【表5】

表5: 分離液および深層濾液の透明度に対する凝集温度の効果

凝集温度	分離液の OD600	深層濾液の OD600
20°C	0.060	0.025
50°C	0.031	0.016

【1076】

3. 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、12,000 x g に設定した。

【1077】

4. 深層濾過

遠心分離は主要な固体/液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【1078】

5. 任意選択の0.45ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に0.45ミクロンのフィルターを使用した。

【1079】

6. 限外濾過/透析濾過 - (UFDF - 1)

精製は、深層濾液から始まる(上記のステップ4または5に由来する)。

【1080】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤(アルミニウム)のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【1081】

初期実験において、深層濾液のpHを、5N水酸化ナトリウムを使用して3.5から7.0に調整した。これは多糖の分子量に影響しなかったが、33F上のO-アセチル基の部分的な脱アセチル化をもたらした。

10

20

30

40

50

【1082】

脱アセチル化は、5 N水酸化ナトリウムを用いた中和の間にもたらされた高い局部 pH に起因するものであると提唱された。したがって、深層濾液を管理可能な容量に濃縮した後、透析濾過の間に 33 F 溶液の pH を調整することが決定された。

【1083】

クエン酸ナトリウム/リン酸ナトリウム、pH 7.0 (例えば、10 mMリン酸塩/25 mMクエン酸塩 pH 7.0) に対して、透析濾過を実施した。

【1084】

あるいは、25 mM EDTA を、クエン酸塩の代わりに使用することもできた。

【1085】

7. 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである (WO 2008 118752 を参照されたい)。

【1086】

炭素濾過ステップを、1 回通過モードまたは再循環モードで実施することができる。血清型 33 F について、どの操作モードが最も良く機能するかを決定するために、再循環炭素濾過試験を実施した。この実験では、UFDF - 1 に由来する保持液を、170 LMH で、47 mm の Cuno R32SP ディスクを順次 2 回通して濾過し (合計面積 35 cm²)、不純物レベルを各サイクルの後に決定した (合計 5 サイクル)。不純物除去は、約 30 L/m² の最も低い供給負荷で最良であった。1 より多いサイクルでのさらなる不純物除去は有意でなく、再循環モードを使用するのはほとんど、または全く有益ではないことを示していた。

【1087】

8. 任意選択の 0.2 ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、炭素濾過後に 0.2 ミクロンのフィルターを使用した。

【1088】

9. 限外濾過/透析濾過 - (UFDF - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、25 mMクエン酸ナトリウム、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0 を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、30 kDa の分子量カットオフフィルターを使用して実施される。

【1089】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。クエン酸塩のレベルを高度に低下させるために、様々な緩衝剤を使用して透析濾過実験を実施した。

【1090】

これらの実験において、炭素濾液を、4 倍に濃縮した後、様々な緩衝剤に対して透析濾過した。試料を除去し、残留クエン酸塩について分析した。

【1091】

水は 50% の最も高い拒絶係数を有し、標的低下を達成するには約 22 倍透析容量を必要としたであろう。

【1092】

10 mMリン酸ナトリウム pH 7.0 と、10 mMリン酸カリウム pH 6.5 は両方も、約 20% の類似する拒絶係数を有し、6 - log の標的低下を達成するには、10 倍透析容量を必要としたであろう。

【1093】

25 mM の塩化ナトリウムは、8% の最も低い拒絶係数を有し、7 倍透析容量で標的低下に達したであろう。塩化ナトリウム濃度を 10 mM に低下させることにより、拒絶係数は 28% に増大した。

【1094】

10

20

30

40

50

残留クエン酸塩レベルが達成されたことを確保するために、塩化ナトリウムの濃度を、50 mMに増加させた。50 mM塩化ナトリウムの6倍透析容量後、保持液を、さらに6倍透析容量の水に対して透析濾過した。

【1095】

10. 滅菌濾過

保存ボトルへの充填前の最終ユニット操作は、滅菌濾過（0.2ミクロン濾過）である。

【1096】

11. 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するために、3つの稠度バッチを製造した。発酵バッチを、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【1097】

3つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を表6に示す。全てのステップの収率が、約90%またはそれより高く、非常に再現性が高い。全体の収率の平均は、73%である。

【1098】

【表6】

表6: 血清型33Fの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

血清型33F	稠度バッチ		
	001	002	003
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	90	90	91
UFDF1 保持液	101	102	99
炭素濾液	87	86	87
UFDF2 保持液	92	95	93
最終濾過	99	99	99
全体の収率	72	74	72

【1099】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表3に示す。3つの稠度バッチは、予め定義された許容基準の全てを満たした。

【1100】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表7に示す。

【1101】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7: 33F 稠度バッチに関する分析結果(20°Cでの凝集)

アッセイ	001	002	003
O-アセチル化	0.87	0.85	0.90
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	<LOQ	<LOQ
残留核酸	< 0.02%	<0.02%	<0.04%
残留タンパク質	0.2%	0.2%	0.3%
残留 C ポリ	4.4 wt%	4.2 wt%	4.7 wt%
残留 Al	<1 ppm	<1 ppm	<1 ppm

10

【 1 1 0 2 】

凝集を、20 の代わりに50 で実施した以外は、同じ手順を使用して、さらに2つのバッチを製造した。稠度バッチに由来する平均の結果と共に、これらのバッチに由来する分析結果を、表 8 に示す。これらの結果は、凝集温度の上昇が、生成物の品質に及ぼす影響も有しなかったことを明確に示している。

20

【 1 1 0 3 】

【表 8】

表 8: 50°Cでの 33F 凝集に関する分析結果

アッセイ	50°C -1	50°C -2
O-アセチル化	1.03	1.04
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	< LOQ
残留核酸	0.02%	0.02%
残留タンパク質	0.2%	0.2%
残留 C ポリ	4.1	3.2
全体の収率	68%	57%

30

40

50

【 1 1 0 4 】

(実施例 3)

肺炎球菌多糖血清型 1 5 B の精製

肺炎球菌多糖 1 5 B の精製のためのプロセスの流れ図を、図 1 に示す。プロセスは、N L S 処理された発酵ブロスから始まり、回収ユニット操作（凝集、遠心分離および深層濾過）、次いで、精製ユニット操作（限外濾過、および炭素濾過）を含む。

【 1 1 0 5 】

1 . 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌 (S . p n e u m o n i a) 血清型 1 5 B の N L S 不活化発酵ブロスから始まる。培養物を、H y - S o y 培地中で増殖させた。増殖の終わりに（光密度のさらなる増加がないことによって示される）、培養物を、N L S で不活化した（E P 2 1 2 9 6 9 3 を参照されたい）。

10

【 1 1 0 6 】

2 . 凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。N L S の添加によって溶解された発酵ブロスを使用して、凝集を実施した。

【 1 1 0 7 】

実施例 1 および 2 と同様に、実験を行って、凝集に対する様々なパラメータの効果を検査した。

20

【 1 1 0 8 】

変数の効果は、p H、ミョウバンのパーセントおよび保持時間であった。

【 1 1 0 9 】

このデータは、p H 2 . 5 ~ 4 . 0 および 1 ~ 3 % のミョウバンでのタンパク質除去が非常に有効であり、この単一ステップで 9 0 % を超えるタンパク質不純物が除去されたことを示していた。不純物除去のこの効率は、保持時間（1、4 または 2 4 時間）によって影響されなかった。

【 1 1 1 0 】

1 5 B について開発された凝集条件を確認するために、D O E 試験を実施して、多糖回収率、透明度および不純物除去に対するミョウバン濃度、p H および保持時間の効果を検査した。p H、ミョウバンのパーセントおよび保持時間に関する因子の範囲は、それぞれ、2 ~ 4、0 ~ 4 % w / v、および 1 ~ 4 時間である。

30

【 1 1 1 1 】

この D O E に関する実験データを、表 9 に示す。合計 2 0 回の実験を、設計空間の範囲内で実施した。

【 1 1 1 2 】

40

50

【表 9】

表 9

試料	ミョウバン (%)	pH	保持時間 (hr)	多糖(回収率%)	タンパク質 (除去率%)
1	2	3	2	93	93
2	2	4	2	97	91
3	4	2	3	92	92
4	4	4	3	92	89
5	2	3	3	92	93
6	2	3	2	93	93
7	0	3	2	89	94
8	2	3	1	89	93
9	4	3	2	90	92
10	2	3	2	93	93
11	2	3	2	93	93
12	0	4	1	97	90
13	0	2	1	92	94
14	2	3	2	93	93
15	4	4	1	89	88
16	2	3	2	93	93
17	0	2	3	92	94
18	2	2	2	92	92
19	0	4	3	96	91
20	4	2	1	90	92

【1113】

結果は、設計空間内で、凝集ユニット操作のための望ましい pH、ミョウバンのパーセントおよび保持時間が、かなり広く、pH：2.7～3.8；ミョウバン：1～2.5% (w/v)；および保持時間：1.5～3時間であることを示唆していた。同様の結果が、他の血清型の DOE 試験において観察された。

【1114】

上記実験は、20で行った。

【1115】

凝集条件が清澄化ユニット操作に対して有する効果をさらに決定するために、50で凝集させた発酵ブロス上で連続遠心分離試験を行った。

【1116】

20で凝集したブロスについて観察されるように、50で凝集したブロスについて、400～800 mL / 分の供給速度では分離液の透明度の有意な増加はなかった。

【1117】

3. 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、 $12,000 \times g$ に設定した。

【1118】

4. 深層濾過

遠心分離は主要な固体/液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【1119】

5. 任意選択の0.45ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に0.45ミクロンのフィルターを使用した。

【1120】

6. 限外濾過/透析濾過 - (UFD F - 1)

精製は、深層濾液から始まる(上記のステップ4または5に由来する)。

【1121】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤(アルミニウム)のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【1122】

初期実験において、深層濾液のpHを、5N水酸化ナトリウムを使用して3.5から7.0に調整した。しかしながら、これは、15B上のO-アセチル基の部分的な脱アセチル化をもたらし得る。

【1123】

したがって、深層濾液を管理可能な容量に濃縮した後、透析濾過の間に15B溶液のpHを調整することが決定された。

【1124】

15Bに関する緩衝剤選択試験において、10~50mMのクエン酸塩濃度を、様々な濃度のリン酸ナトリウムと共に試験した。

【1125】

クエン酸ナトリウム/リン酸ナトリウム、pH7.0(例えば、10mMリン酸塩/25mMクエン酸塩pH7.0)に対して、透析濾過を実施した。

【1126】

7. 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである(WO2008118752を参照されたい)。

【1127】

3つの7' '直径のCuno R32SP炭素フィルターを、連続して使用した。UFD F - 1に由来する保持液を、最初にフィルターを通過させて、280nmでのUVシグナルを、出発溶液について記録した。その後、保持液を32LMHの流量で濾過し、炭素濾液に関するUV280を記録し、保持液のものと比較した。UV280シグナルの約95%の減少は、タンパク質関連不純物が、炭素フィルターの1回通過によって除去されることを示していた。

【1128】

炭素濾過ステップを、1回通過モードまたは複数回通過モードまたは再循環モードで実施することができる。炭素を通す付加が血清型15Bに関する利益を追加するかどうかを決定するために、UFD F - 1に由来する保持液を、64LMHで連続して3つの7インチのCuno R32SPディスクを通して濾過する実験を行った。不純物レベル、UV280レベルおよびタンパク質に関するハウ酸ローリーアッセイを、それぞれの通過後に決定した。結果は、多くの不純物を除去するには、1回通過で十分であることを示していた。1回通過濾液および第2の通過濾液に関するタンパク質濃度は、それぞれ、25.2

10

20

30

40

50

および $20.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。フィルターの洗浄に起因する希釈をファクタリングする場合、第1の通過濾液および第2の通過濾液中のタンパク質の量は、ほぼ同じであった。

【1129】

8. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFD F - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、 25 mM クエン酸ナトリウム、 10 mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.0$ を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、 30 kDa の分子量カットオフフィルターを使用し実施される。

【1130】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。クエン酸塩のレベルを高度に低下させるために、様々な緩衝剤を使用して透析濾過実験を実施した（実施例1および2を参照されたい）。

【1131】

9. ホモジナイゼーション

精製された 15 B 多糖類を、ホモジナイズ、例えば、機械的にサイジングすることができる（例えば、 $\text{WO} 2015110942$ を参照されたい）。

【1132】

10. 滅菌濾過

保存ボトルへの充填前の最終ユニット操作は、滅菌濾過（ $0.2 \mu\text{m}$ フィルター）である。

【1133】

11. 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するために、3つの稠度バッチを製造した。発酵バッチを、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【1134】

3つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を表10に示す。全てのステップの収率は、約 $75 \sim 98\%$ であり、非常に再現性が高く、ロバストである。全体の収率の平均は、 60% である。

【1135】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10: 血清型 15B の稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

血清型 15B	稠度バッチ		
	001	002	003
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	98	88	83
UFDF1 保持液	75	86	85
炭素濾液	90	88	88
UFDF2 保持液	93	96	97
ホモジナイゼーション	90	92	95
全体の収率	55	66	57

10

20

【1136】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表 11 に示す。3つの稠度バッチは、予め定義された許容基準の全てを満たした。

【1137】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表 11 に示す。

【1138】

【表 11】

表 11: 血清型 15B の稠度バッチに関する分析結果

30

試験	15B-001	15B-002	15B-003
O-アセチル化	0.94	0.88	0.87
グリセロール	0.97	0.92	0.93
残留クエン酸塩	< LOQ	< LOQ	< LOQ
残留 NLS	< LOQ	< LOQ	< LOQ
残留核酸	<0.12	<0.13	<0.13
残留タンパク質	0.2%	0.2%	0.2%
残留 C ポリ	1.5%	1.8%	1.8%
残留 Al	<0.05 ppm	<0.05 ppm	<0.05 ppm

40

【1139】

凝集を、20 の代わりに 50 で実施した以外は、同じ手順を使用して、さらに 2つのバッチを製造した。稠度バッチに由来する平均の結果と共に、これらのバッチに由来する分析結果を、表 8 に示す。これらの結果は、凝集温度の上昇が、生成物の品質に及ぼす影響も有しなかったことを明確に示している。

50

【 1 1 4 0 】

【表 1 2】

表 12: 50°Cのバッチの比較

アッセイ	50°C -1	50°C -2
O-アセチル化	0.94	0.94
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	< LOQ
残留核酸	<0.02	N/A
残留タンパク質	N/A	N/A
残留 C ポリ	1.0%	0.9%
全体の収率	43%	N/A

10

20

【 1 1 4 1 】

(実施例 4)

肺炎球菌多糖血清型 2 2 F の精製

肺炎球菌多糖 2 2 F の精製のためのプロセスの流れ図を、図 1 に示す。プロセスは、NLS 不活化発酵ブロスから始まり、回収ユニット操作（凝集、遠心分離および深層濾過）、次いで、精製ユニット操作（限外濾過、および炭素濾過）を含む。

30

【 1 1 4 2 】

1. 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 2 2 F の NLS 不活化発酵ブロスから始まる。培養物を、Hy-Soy 培地中で増殖させた。増殖の終わりに（光密度のさらなる増加がないことによって示される）、培養物を、NLS で処理した（EP 2 1 2 9 6 9 3 を参照されたい）。

【 1 1 4 3 】

2. 凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。NLS の添加によって溶解された発酵ブロスを使用して、凝集を実施した。

40

【 1 1 4 4 】

2. 1 pH およびミョウバンの効果

実施例 1 および 2 と同様に、実験を行って、凝集に対する様々なパラメータの効果を検査した。

【 1 1 4 5 】

このデータは、pH 2.5 ~ 4.0 および 1.5 ~ 3% のミョウバンでのタンパク質除去が非常に有効であり、この単一ステップで 90% を超えるタンパク質不純物が除去されたことを示していた。

【 1 1 4 6 】

50

22Fについて開発された凝集条件を確認するために、DOE試験を実施して、多糖回収率、透明度および不純物除去に対するミョウバン濃度、pHの効果を検査した。

【1147】

タンパク質除去効率は、低いpHで非常に高かった。ミョウバンとpHとの組合せが有効であった。

【1148】

2.2 温度の効果

試験を行って、凝集したブロスの粒径に対する温度の効果を検査した。20での凝集(2%w/vミョウバン、pH3.5)後、凝集したブロスを所望の温度に加熱し、1時間保持した。周囲温度(15~25)に冷却した後、凝集したブロスを12,000xgで遠心分離し、透明度(OD600)を決定した。

10

【1149】

結果を、表13に示す。

【1150】

【表13】

表 13: 様々な温度での凝集した粒径および分離液の OD の結果

凝集後 1h の保持温度 (°C)	凝集したブロスの粒径(μm)	分離液の OD600
ブロス	10.3	NA
20°C	178	0.066
30°C	206	0.033
40°C	210	0.028
50°C	203	0.027

20

【1151】

高い温度で、分離液のOD600は有意に減少した。

【1152】

以前の実験において、凝集したブロスの粒径がより高い温度でより大きいことが観察された。凝集温度と共に粒径の変化を示す視覚的比較を、図6に示す。1回目の実験のために、凝集温度を室温(RT)で保持し、2回目の実験のために、それを1hにわたって45に上昇させた。

30

【1153】

図6において、室温で保持し、45に加熱した1h後の凝集したブロスの平均粒径は、それぞれ、9.8μmおよび65μmであった。45に加熱した凝集したブロスの粒径は有意に増大した。粒径がより大きいことに加えて、微細な粒子(1μm未満)の量も減少している。大きい粒子の形成および微細な粒子の減少は、さらなるステップ(例えば、遠心分離および深層濾過)に役立ち、より透明な分離液をもたらす。

【1154】

40

唯一の変化が凝集温度(20または50)である、2つのさらなる22Fバッチを製造した。これらのバッチに由来する分離液(遠心分離後)および深層濾過後(以下を参照されたい)の透明度を、表14に示す。

【1155】

50

【表 1 4】

表 14: 分離液および深層濾液の透明度に対する凝集温度の効果

バッチ	分離液の OD600	深層濾液の OD600
1 (20°C)	0.09	0.024
2 (50°C)	0.04	0.016

【 1 1 5 6 】

3. 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、12,000 × g に設定した。

【 1 1 5 7 】

4. 深層濾過

遠心分離は主要な固体 / 液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1 回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【 1 1 5 8 】

5. 任意選択の 0.45 ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に 0.45 ミクロンのフィルターを使用した。

【 1 1 5 9 】

6. 限外濾過 / 透析濾過 - (U F D F - 1)

精製は、深層濾液から始まる (上記のステップ 4 または 5 に由来する) 。

【 1 1 6 0 】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤 (アルミニウム) のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【 1 1 6 1 】

炭素濾過を実施する前に、22F 多糖の pH を、7.0 ± 0.5 に調整した。上記に示されたように、pH を調整するための NaOH の使用は、O - アセチル基の部分的な脱アセチル化をもたらし得る。22F 多糖も O - アセチル基を含有するため、深層濾液を管理可能な容量に濃縮した後、透析濾過の間に 22F 溶液の pH を調整することが決定された。

【 1 1 6 2 】

血清型 22F に関する緩衝剤選択試験において、0 ~ 40 mM のクエン酸塩濃度を、様々な濃度のリン酸ナトリウムと共に試験した。

【 1 1 6 3 】

最も高い透析濾過流動は、20 mM を超えるクエン酸塩濃度および 10 mM またはそれ未満のリン酸塩濃度の場合に得られる。

【 1 1 6 4 】

7. 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである (W O 2 0 0 8 1 1 8 7 5 2 を参照されたい) 。

【 1 1 6 5 】

U F D F 1 保持液を、連続して積み重ねられた 3 つまたは 4 つの 7 ' ' 直径の R 3 2 S P 炭素フィルターを通して濾過した。一連の実験を実施して、U F D F 1 保持液から残留する UV および R I 不純物を除去する際の R 3 2 S P 炭素フィルターの有効性を測定した。UV 260 / 280 nm での吸光度の少なくとも 95 % の低下があった。これは、U F D F 1 保持液からのタンパク質および核酸に関連する不純物の有意な除去を示している。結果は、炭素がタンパク質関連不純物除去のための優れた能力を有することを示す。

【 1 1 6 6 】

10

20

30

40

50

8. 限外濾過 / 透析濾過 - (U F D F - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、25 mMクエン酸ナトリウム、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、30 kDaの分子量カットオフフィルターを使用して実施される。

【1167】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。クエン酸塩のレベルを高度に低下させるために、様々な緩衝剤を使用して透析濾過実験を実施した（実施例1および2を参照されたい）。

【1168】

9. ホモジナイゼーション

精製された22F多糖類を、ホモジナイズ、例えば、機械的にサイジングすることができる（例えば、WO2015110942を参照されたい）。

【1169】

10. 滅菌濾過

保存ボトルへの充填前の最終ユニット操作は、滅菌濾過（0.2ミクロン濾過）である。

【1170】

11. 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するために、3つの稠度バッチを製造した（凝集温度20）。発酵バッチを、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【1171】

3つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を、表14に示す。全てのステップの収率が、約90%またはそれより高く、非常に再現性が高い。全体の収率の平均は、58%である。

【1172】

【表15】

表 14: 血清型 22F 多糖の稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

ユニット操作	01	02	03
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	73	80	81
UFDF1 保持液	98	93	85
炭素濾液	86	87	82
UFDF2 保持液	96	92	99
ホモジナイゼーション	NA ¹	92	NA ¹
全体の収率	59	55	56

¹01 および 03 はホモジナイズしなかった

【1173】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表15に示す。

【1174】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 15: 血清型 22F の稠度バッチに関する分析結果

アッセイ	001	002	003
O-アセチル化 天然/サイジングされた	0.91/ 0.94	1.04/ 0.94	1.09/ 0.89
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	<LOQ	<LOQ
残留核酸	< 0.02%	<0.02%	<0.02%
残留タンパク質	0.2%	0.2%	0.2%
残留 C ポリ	2.3 wt%	2.8 wt%	1.9 wt%
残留 AI	<1 ppm	<1 ppm	<1 ppm

10

【 1 1 7 5】

凝集を、20 の代わりに 50 で実施した以外は、同じ手順を使用して、さらに 2 つのバッチを製造した。稠度バッチに由来する平均の結果と共に、これらのバッチに由来する分析結果を、表 1 6 に示す。これらの結果は、凝集温度の上昇が、生成物の品質にいかなる影響も有しなかったことを明確に示している。

20

【 1 1 7 6】

【表 1 7】

表 16: 50°Cでのデモおよび稠度バッチの比較

アッセイ	22F 稠度 バッチ(平均)	50°C -1	50°C -2
O-アセチル化	1.01	1.08	1.07
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	<LOQ	NA ¹	NA ¹
残留核酸	<0.02%	0.01%	0.01%
残留タンパク質	0.2%	0.2%	0.2%
残留 C ポリ	2.3	2.5	1.8
全体の収率	58%	70.6%	71.2

30

¹バッチを、残留 NLS について分析しなかった

40

【 1 1 7 7】

(実施例 5)

肺炎球菌多糖血清型 10A の精製

肺炎球菌多糖 10A の精製のためのプロセスの流れ図を、図 1 に示す。プロセスは、NLS 不活化発酵プロセスから始まり、回収ユニット操作（凝集、遠心分離および深層濾過）、次いで、精製ユニット操作（限外濾過、および炭素濾過）を含む。

【 1 1 7 8】

1. 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌 (S. pneumonia) 血清型 10A の NLS 不活化発酵プロセスから始まる。培養物を、Hy - Soy 培地中で増殖させた。増殖の終わりに (光

50

密度のさらなる増加がないことによって示される)、培養物を、NLSで不活化した(E P 2 1 2 9 6 9 3を参照されたい)。

【1179】

2. 凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。NLSの添加によって溶解された発酵ブロスを使用して、凝集を実施した。

【1180】

血清型10Aの凝集のための最適pHを、DOEによって決定した(例えば、実施例1および3を参照されたい)。

【1181】

Prediction Profilerに基づく、望ましさは、pH 3.5および2%ミョウバンでほぼ最適である。それはまた、3.5よりわずかに低いpHは、多糖収率のわずかな減少と共に、タンパク質除去および分離液の透明度の少しの改善に役立つが、同時に、ピーク純度はわずかにより高い場合があることを示す。

【1182】

他の血清型に関する開発研究は、凝集の間の温度上昇が、より高い深層濾過能力をもたらすことを示した。しかしながら、ブロスの加熱は、多糖分子量に対する効果を有し得る。10Aに対して実験を行って、温度の上昇が分子量の減少をもたらすかどうかを決定した。第1の実験においては、凝集したブロスを、20、50、60および70の温度ならびに1、4および22時間の保持時間でインキュベートした。それぞれの温度で4時間の保持時間に由来する試料のみを精製した。全ての試料が、同じ¹H-NMRスペクトルを示したが、60および70の試料は、分子量の有意な低下を示した。第2の実験においては、凝集したブロスを、20、35、45および55の温度ならびに1、2および4時間の保持時間でインキュベートし、全ての試料を精製した。この試験により、45で最大4時間にわたって分子量の非常に小さな変化が示された。55で最初の1時間の曝露において分子量のわずかな減少が観察されたが、その差異はアッセイの誤差の範囲内であった。

【1183】

3. 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、12,000 × gに設定した。

【1184】

4. 深層濾過

遠心分離は主要な固体/液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【1185】

5. 任意選択の0.45ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に0.45ミクロンのフィルターを使用した。

【1186】

6. 限外濾過/透析濾過 - (UFDF - 1)

精製は、深層濾液から始まる(上記のステップ4または5に由来する)。

【1187】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤(アルミニウム)のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【1188】

炭素濾過を実施する前に、22F多糖のpHを、7.0 ± 0.5に調整した。

【1189】

10

20

30

40

50

最初に、透析濾過を、10 mMリン酸ナトリウム pH 7.0 に対して実施した。これは、pHを所望の値に調整するのに成功した。しかしながら、リン酸ナトリウムだけを使用する透析濾過の間に、白色の沈降物が形成された。白色の固体が単離され、リン酸アルミニウムを含有することが決定された。リン酸アルミニウムは、中性pHで水に不溶性であり、凝集ステップ後に存在する残留アルミニウムに起因して形成される。リン酸アルミニウムの形成を防止するために、透析濾過緩衝剤にキレート剤を添加することが決定された。他の血清型に関する研究に基づいて、クエン酸ナトリウムを選択した。10 mMより高いクエン酸塩濃度が、時間と共にかすみ形成されるのを防止するのに有効であった。25 mMのクエン酸塩濃度は、残留アルミニウムを1 ppm未満まで除去することが示された。

10

【1190】

7. 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである（WO 2008 118 752を参照されたい）。

【1191】

UFDF 1保持液を、R32SPディスク炭素フィルターを通して濾過した。結果は、炭素がタンパク質関連不純物除去のための優れた能力を有することを示す。

【1192】

8. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFDF - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、25 mMクエン酸ナトリウム、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、30 kDaの分子量カットオフフィルターを使用して実施される。

20

【1193】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。クエン酸塩のレベルを高度に低下させるために、様々な緩衝剤を使用して透析濾過実験を実施した（実施例1および2を参照されたい）。

【1194】

9. 滅菌濾過

保存ボトルへの充填前の最終ユニット操作は、滅菌濾過（0.2ミクロン濾過）である。

30

【1195】

10. 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するために、3つの稠度バッチを製造した（凝集温度45）。発酵バッチを、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【1196】

3つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を、表17に示す。全てのステップの収率が、72%より高く、非常に再現性が高い。全体の収率の平均は、68%である。

【1197】

40

50

【表 1 8】

表 17: 血清型 10A の稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

ユニット操作	10A-001	10A-002	10A-003
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	100	100	99
UFDF1 保持液	91	93	97
炭素濾液	80	76	72
UFDF2 保持液	98	89	99
最終濾過	99	99	99
全体の収率	71	63	69

10

20

【 1 1 9 8 】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表 1 8 に示す。

【 1 1 9 9 】

【表 1 9】

表 18: 血清型 10A の稠度バッチに関する分析結果

アッセイ	10A-001	10A-002	10A-003
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	<LOQ	<LOQ
残留核酸	< 0.15%	<0.11%	<0.21%
残留タンパク質	0.5%	0.4%	0.4%
残留 C ポリ	5.0 wt%	4.9 wt%	4.4 wt%
残留 Al	<0.05 ppm	<0.05 ppm	<0.05 ppm

30

40

【 1 2 0 0 】

(実施例 6)

肺炎球菌多糖血清型 1 1 A の精製

肺炎球菌多糖 1 1 A の精製のためのプロセスの流れ図を、図 1 に示す。プロセスは、NLS 不活化発酵ブロスから始まり、回収ユニット操作（凝集、遠心分離および深層濾過）、次いで、精製ユニット操作（限外濾過、および炭素濾過）を含む。

【 1 2 0 1 】

1. 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) 血清型 1 1 A の NLS 不活化発酵ブロスから始まる。培養物を、Hy - Soy 培地中で増殖させた。増殖の終わりに（光

50

密度のさらなる増加がないことによって示される)、培養物を、NLSで不活化した(E P 2 1 2 9 6 9 3を参照されたい)。

【1202】

2.凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。NLSの添加によって溶解された発酵ブロスを使用して、凝集を実施した。

【1203】

他の血清型のための精製プロセスに関する以前の研究は、清澄化ユニット操作が、溶液のpHおよび添加されるミョウバンの濃度によって影響されることを示した。血清型11Aの凝集に対するこれらの因子の影響を理解するために、DOE試験を行ったが、これは、別の因子である、凝集プロセスに対する影響を有し得る凝集時間も含む。

10

【1204】

それぞれのパラメータの範囲を、表19に列挙する。

【1205】

【表20】

表 19: 血清型 11A 凝集 DOE 試験に関するパラメータ範囲

範囲	低い	高い
pH	2	5
ミョウバン濃度	0%	4%
時間	15分	105分

20

【1206】

これらの3つのパラメータを変化させる一連の20回の実験を行った。

【1207】

凝集プロセスの間のそれぞれの変数(ミョウバン濃度、pHおよび凝集時間)と、応答(PS回収、OD600およびタンパク質除去)との関係を、Prediction Profilerによって分析した。重要性が最も低い変数は、ミョウバン濃度およびpHをその中央点に設定した場合に、タンパク質除去または透明度に対する影響がほぼなく、多糖回収に対する影響が非常に小さい凝集時間である。ミョウバン濃度は、主に透明度に影響する。最適ミョウバン濃度は、約2.5%であり、最良の透明度をもたらした。しかし、ミョウバン濃度が1.5%~3%である場合、OD600の差異は小さい。他方、凝集pHは、主にタンパク質除去に影響し、pHが低いほど、タンパク質除去は高い。pH3.5およびそれより下で、最大不純物除去が達成される。

30

【1208】

さらなる実験を設計して、凝集温度の上昇が、下流の操作をさらに改善するかどうかを決定した。

【1209】

血清型11Aの凝集に対する温度の効果を決定するために、3つの異なる温度で実験を行った。温度に加えて、凝集中の2つの異なる攪拌速度を検査した。11Aの発酵ブロスを、様々な温度で1時間、2%ミョウバン、pH3.5を使用して凝集させた。凝集後、ブロスを遠心分離し、分離液の透明度を測定した。次いで、分離液を、深層フィルターを通して濾過し、フィルター能力を決定した。実験条件および結果を、表20に示す。深層フィルター濾液を、Vmaxモデルを使用して0.45ミクロンのデッドエンドフィルターを通してさらに濾過した。

40

【1210】

全て400L/m²より高かったため、4つ全ての条件について深層フィルター能力に差異はなかった。しかしながら、0.45ミクロンのVmaxの結果には有意差があった

50

。50 での凝集は、約 1300 L/m² の Vmax を有し、これは他の条件よりも約 8 倍高かった。同様に、10 での凝集は、最も低い Vmax を有していた。

【1211】

【表21】

表 20: 異なる温度および攪拌速度での血清型 11A の凝集

	実験 1	実験 2	実験 3	実験 4
温度	20°C	50°C	10°C	20°C
攪拌速度	214 rpm	214 rpm	214 rpm	321 rpm
OD600	0.064	0.055	0.062	0.056
深層フィルター能力	>400 L/m ²	>400 L/m ²	>400 L/m ²	>400 L/m ²
0.45 ミクロンの Vmax	177 L/m ²	1367 L/m ²	146 L/m ²	171 L/m ²

10

20

【1212】

上昇した温度での凝集に関する潜在的な関心は、11A の分子構造および分子量に対する温度上昇の影響である。血清型 11A は、3 個の O - アセチル基、およびリン酸を介して多糖反復単位に接続された 1 個のグリセロール基を有する。これらの基は全て、低い pH および上昇した温度で凝集中に潜在的に切断除去され得る。分子に対する上昇した温度の他の影響は、分子量に対するものである。この条件 (pH 3 . 5) での凝集中に、より長い鎖の多糖類は、より短い鎖に分解し、より低い分子量をもたらす得る。本発明者らの実験は、生成物が室温での凝集後に精製された元の 11A と同一であることを示す (表 24 を参照されたい) 。

30

【1213】

3 . 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、12,000 x g に設定した。

【1214】

4 . 深層濾過

遠心分離は主要な固体 / 液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1 回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【1215】

深層フィルター能力に対するブロスの保持時間の効果を決定するために、2% ミヨウバンおよび pH 3 . 5 を使用する 20 での凝集に由来する分離液を、2 ~ 8 で最大 3 日間保持した。次いで、分離液を、深層フィルターを使用して濾過し、フィルター能力を決定した。2 日間の保持にわたって深層フィルター能力に有意差はなかった (表 21) 。

40

【1216】

50

【表 2 2】

表 21: フィルター能力に対するブロスの保持時間の影響

時間	0 日目	1 日目	2 日目
フィルター能力 (L/m ²)	193	185	243

【1 2 1 7】

5. 任意選択の 0.45 ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に 0.45 ミクロンのフィルターを使用した。 10

【1 2 1 8】

6. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFD F - 1)

精製は、深層濾液から始まる (上記のステップ 4 または 5 に由来する)。

【1 2 1 9】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤 (アルミニウム) のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【1 2 2 0】

他の血清型に関する開発研究において (上記を参照されたい)、10 mM リン酸ナトリウム、25 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0 が、UF / DF プロセスにおける使用にとって良好な緩衝剤であることが見出された。リン酸塩緩衝剤は、pH を中性に調整するために使用される。クエン酸塩緩衝剤は、アルミニウムを除去するためのキレート剤として使用される。 20

【1 2 2 1】

7. 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである (WO 2 0 0 8 1 1 8 7 5 2 を参照されたい)。

【1 2 2 2】

UFD F 1 保持液を、R 3 2 S P ディスク炭素フィルターを通して濾過した。結果は、炭素がタンパク質関連不純物除去のための優れた能力を有することを示す。 30

【1 2 2 3】

8. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFD F - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、25 mM クエン酸ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、30 kDa の分子量カットオフフィルターを使用して実施される。

【1 2 2 4】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。クエン酸塩のレベルを高度に低下させるために、様々な緩衝剤を使用して透析濾過実験を実施した (実施例 1 および 2 を参照されたい)。 40

【1 2 2 5】

9. ホモジナイゼーション

精製された 1 1 A 多糖類を、ホモジナイズ、例えば、機械的にサイジングすることができる (例えば、WO 2 0 1 5 1 1 0 9 4 2 を参照されたい)。

【1 2 2 6】

10. 滅菌濾過

保存ボトルへの充填前の最終ユニット操作は、滅菌濾過 (0.2 ミクロン濾過) である。

【1 2 2 7】

11. 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するため 50

に、3つの稠度バッチを製造した。発酵バッチを、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【1228】

3つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を、表17に示す。

【1229】

【表23】

表 22: 血清型 11A の稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

ユニット操作	11A-001	11A-002	11A-003
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	89	89	92
UFDF1 保持液	99	98	98
炭素濾液	91	89	94
UFDF2 保持液	95	98	56 ¹
ホモジナイゼーション	99.9	96.7	91.6
全体の収率	78	77	48

¹ 開口バルブに起因する生成物損失

【1230】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表23に示す。

【1231】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 23: 血清型 11A の稠度バッチに関する分析結果

アッセイ	11A-001	11A-002	11A-003
O-アセチル化 天然/サイジングされた	2.8/3.05	2.8/3.23	3.0/3.25
グリセロール 天然/サイジングされた	0.91/0.9	0.90/1.05	1.0/1.02
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	<LOQ	<LOQ
残留核酸 (w :w)	< 0.02%	<0.03%	<0.03%
残留タンパク質(w :w)	0.2%	0.2%	0.3%
残留 C ポリ 天然/サイジングされた	1.5%/1.6%	1.5%/1.6%	2.1%/2.2%
残留 AI	<1 ppm	<1 ppm	<1 ppm

10

20

【 1 2 3 2】

様々な温度での凝集を行った。1つの凝集を、50 で実施し、この材料の一部を、上記のプロセスを使用して精製した。稠度バッチに由来する平均の結果と共に、この精製に由来する分析結果を、表 2 4 に示す。これらの結果は、凝集温度の上昇が、生成物の品質にいかなる影響も有しなかったことを明確に示している。

【 1 2 3 3】

【表 2 5】

表 24: 50°Cでのデモおよび稠度バッチの比較

アッセイ	11A の稠度平均(室温)	50°C バッチ
O-アセチル化	2.9	3.09
残留クエン酸塩	<LOQ	9.6 µg/ml
残留 NLS	< LOQ	N/A
残留核酸	0.03%	0.03%
残留タンパク質	0.2%	0.0%
残留 C ポリ	1.7 wt%	1.0 wt%
グリセロール	0.94	0.96
全体の収率	77%	69%

30

40

50

【 1 2 3 4 】

(実施例 7)

肺炎球菌多糖血清型 1 2 F の精製

肺炎球菌多糖 1 2 F の精製のためのプロセスの流れ図を、図 1 に示す。プロセスは、N L S 不活化発酵プロセスから始まり、回収ユニット操作（凝集、遠心分離および深層濾過）、次いで、精製ユニット操作（限外濾過、および炭素濾過）を含む。

【 1 2 3 5 】

ホモジナイゼーションステップは、任意選択である。

【 1 2 3 6 】

1 . 出発材料

プロセスは、肺炎連鎖球菌 (S . p n e u m o n i a) 血清型 1 2 F の N L S 不活化発酵プロセスから始まる。培養物を、H y - S o y 培地中で増殖させた。増殖の終わりに（光密度のさらなる増加がないことによって示される）、培養物を、N L S で処理した（E P 2 1 2 9 6 9 3 を参照されたい）。

【 1 2 3 7 】

2 . 凝集

このステップの主な目的は、細胞破片、宿主細胞のタンパク質および核酸を沈降させることである。それはまた、下流の清澄化ユニット操作にも役立つ。N L S の添加によって溶解された発酵プロセスを使用して、凝集を実施した。

【 1 2 3 8 】

他の血清型のための精製プロセスに関する以前の研究は、清澄化ユニット操作が、溶液の pH およびミョウバンの濃度によって影響されるが、凝集攪拌時間からは影響されないことを示した。血清型 1 2 F の凝集に対するこれらの因子の影響を理解するために、D O E 試験を行った。

【 1 2 3 9 】

それぞれのパラメータの範囲を、表 2 5 に列挙する。

【 1 2 4 0 】

【表 2 6 】

表 25: 血清型 12F 凝集 DOE 試験に関するパラメータ範囲

範囲	低い	高い
pH	2	5
ミョウバン濃度	0%	4%
時間	30 分	90 分

【 1 2 4 1 】

これらの 3 つのパラメータを変化させる一連の 1 6 回の試験を行った（室温で）。

【 1 2 4 2 】

凝集プロセスの間のそれぞれの変数（ミョウバン濃度、pH および凝集時間）と、応答（P S 回収、O D 6 0 0 およびタンパク質除去）との関係を、P r e d i c t i o n P r o f i l e r によって分析した。重要性が最も低い変数は、ミョウバン濃度および pH をその中央点に設定した場合に、タンパク質除去または多糖回収に対する影響がほぼなく、透明度に対する影響が非常に小さい凝集時間である。

【 1 2 4 3 】

ミョウバン濃度は、主に透明度に影響する。最適ミョウバン濃度は、約 2 . 7 % であり、最良の透明度をもたらした。しかし、ミョウバン濃度が 1 . 5 % ~ 3 . 5 % である場合、O D 6 0 0 の差異は小さい。ミョウバン濃度は、多糖回収に対するいくつかの影響を有する。それが約 4 % に増加する場合、多糖回収はわずかにより低い。他方、凝集 pH は、主にタンパク質除去に影響し、pH が低いほど、タンパク質除去は高い。pH 3 . 5 およ

10

20

30

40

50

びそれより下で、最大不純物除去が達成される。

【 1 2 4 4 】

他の血清型に関する研究は、凝集の間の温度上昇が、より高い深層濾過能力をもたらすことを示した。凝集温度を 5 0 に上昇させた場合、分離液の透明度は劇的に増大し (O D 6 0 0 が 0 . 3 3 8 (2 0 で) から 0 . 0 7 3 (5 0 で) に減少した)、フィルター能力は 8 倍より大きく増加した。凝集のためにより高い温度を使用した場合、粒径は大きい粒径範囲に劇的にシフトし、次いで、遠心分離をより容易にした。

【 1 2 4 5 】

凝集プロセスに対する凝集温度の影響を理解するために、その他の実験も実施した。血清型 1 2 F の発酵プロセスを、2 つの異なる温度で 1 時間、2 % ミヨウバン、p H 3 . 5 を使用して凝集させた。凝集後、プロセスを遠心分離し、分離液の透明度を測定した (O D 6 0 0)。次いで、分離液を、深層フィルターを通して濾過し、フィルター能力を決定した。深層フィルター濾液を、V m a x モデルを使用して 0 . 4 5 ミクロンのデッドエンドフィルターを通してさらに濾過した。これらの実験の結果を、図 2 6 に示す。

【 1 2 4 6 】

【表 2 7】

表 26: 異なる温度での血清型 12F の凝集

	実験 1		実験 2		
温度	20°C		50°C		
攪拌速度	214 rpm		214 rpm		
OD600	0.076		0.030		
フィルター	1	2	1	2	3
濾過後の OD	0.022	0.014	0.019	0.014	0.020
深層フィルター能力	>400 L/m ²	>90 L/m ²	>400 L/m ²	>80 L/m ²	>400 L/m ²
0.45 ミクロンの Vmax	503 L/m ²	≥1866 L/m ²	1490 L/m ²	≥1934 L/m ²	≥1985 L/m ²
Vmax 初期流動	8503 LMH	10129 LMH	8555 LMH	11085 LMH	8495 LMH

【 1 2 4 7 】

凝集温度として 5 0 を使用した場合、O D 6 0 0 がより低いことが表 2 6 から見られる。全ての条件についてフィルターの能力に達しなかったため、全ての条件について深層フィルター能力に差異はなかった。しかしながら、0 . 4 5 ミクロンの V m a x データは、より高い温度での凝集がはるかにより良好であることを依然として示している。

【 1 2 4 8 】

3 . 遠心分離

遠心分離を行って、分離液を合理的な能力で濾過することができるように、それを清澄化した。遠心分離速度を、1 2 , 0 0 0 × g に設定した。

【 1 2 4 9 】

4 . 深層濾過

遠心分離は主要な固体 / 液体分離ユニット操作であるが、それは供給流から全ての粒子を除去するわけではなく、深層濾過ユニット操作を、遠心分離ユニット操作と、1 回目の限外濾過ユニット操作との間に組み込んだ。

【 1 2 5 0 】

5 . 任意選択の 0 . 4 5 ミクロンでの濾過

任意選択であるが、一部の試料中で、深層濾過後に 0 . 4 5 ミクロンのフィルターを使用した。

【 1 2 5 1 】

6 . 限外濾過 / 透析濾過 - (U F D F - 1)

精製は、深層濾液から始まる (上記のステップ 4 または 5 に由来する) 。

10

【 1 2 5 2 】

この操作は、低分子量の宿主細胞不純物および残留凝集剤 (アルミニウム) のレベルを低下させながら、消費した発酵媒体を、緩衝剤で置き換えるものである。

【 1 2 5 3 】

他の血清型に関する開発研究において (上記を参照されたい) 、 1 0 m M リン酸ナトリウム、 2 5 m M クエン酸ナトリウム、 p H 7 . 0 が、 U F / D F プロセスにおける使用にとって良好な緩衝剤であることが見出された。リン酸塩緩衝剤は、 p H を中性に調整するために使用される。クエン酸塩緩衝剤は、アルミニウムを除去するためのキレート剤として使用される。

【 1 2 5 4 】

7 . 炭素濾過

このユニット操作は、タンパク質および核酸などの宿主細胞不純物ならびに着色不純物のレベルを低下させるものである (W O 2 0 0 8 1 1 8 7 5 2 を参照されたい) 。

20

【 1 2 5 5 】

U F D F 1 保持液を、 R 3 2 S P ディスク炭素フィルターを通して濾過した。結果は、炭素がタンパク質関連不純物除去のための優れた能力を有し、炭素濾過からの生成物回収が非常に良好であることを示す。

【 1 2 5 6 】

一部の試料については、炭素濾過後の 0 . 2 μ m での濾過を実施した (任意選択) 。

【 1 2 5 7 】

8 . 限外濾過 / 透析濾過 - (U F D F - 2)

このユニット操作は、生成物を所望の濃度に濃縮し、 2 5 m M クエン酸ナトリウム、 1 0 m M リン酸ナトリウム、 p H 7 . 0 を、コンジュゲーションのための補正緩衝剤で置き換えるものである。このステップは、 3 0 k D a の分子量カットオフフィルターを使用して実施される。

30

【 1 2 5 8 】

残留クエン酸塩の存在は、コンジュゲーション化学反応を妨げ得る。クエン酸塩のレベルを高度に低下させるために、様々な緩衝剤を使用して透析濾過実験を実施した (実施例 1 および 2 を参照されたい) 。

【 1 2 5 9 】

9 . 滅菌濾過

保存ボトルへの充填前の最終ユニット操作は、滅菌濾過 (0 . 2 ミクロン濾過) である。

40

【 1 2 6 0 】

1 0 . 稠度

上記の回収および精製プロセスが、再現可能な結果をもたらすことを証明するために、 3 つの稠度バッチを製造した。発酵バッチを、上記のプロセスを使用して凝集させ、遠心分離した。

【 1 2 6 1 】

3 つの稠度バッチに関するステップおよび全体の収率を、表 2 7 に示す。

【 1 2 6 2 】

50

【表 2 8】

表 27: 血清型 12F の稠度バッチに関するステップおよび全体の収率

ユニット操作	12F-001	12F-002	12F-003
発酵ブロス	NA	NA	NA
分離液	100	100	100
深層濾液	89	88	91
UFDF1 保持液	97	97	96
炭素濾液	83	86	82
UFDF2 保持液	93	94	94
最終濾過	94	99	96
全体の収率	63	67	65

10

20

【1 2 6 3】

3つの稠度バッチに関する分析結果を、表 2 8 に示す。

【1 2 6 4】

【表 2 9】

表 28: 血清型 12F の稠度バッチに関する分析結果

アッセイ	11A-001	11A-002	11A-003
残留クエン酸塩	<LOQ	<LOQ	<LOQ
残留 NLS	< LOQ	<LOQ	<LOQ
残留核酸 (w :w)	< 0.03%	<0.03%	<0.03%
残留タンパク質 (w :w)	0.5%	0.5%	0.5%
残留 C ポリ	0.6wt%	0.5wt%	0.6wt%
残留 AI	5 ppm	6 ppm	6 ppm

30

40

【1 2 6 5】

(実施例 8)

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) Cp5 および Cp8 多糖類の精製

本実施例は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に由来する莢膜多糖類 5 型 (Cp5) および 8 型 (Cp8) の単離のための精製プロセスを記載する。

【1 2 6 6】

1. 出発材料

精製プロセスのための出発材料は、全細胞 (非溶解) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureu*

50

s) 発酵収集物であった。

【1267】

2. 酸加水分解

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 発酵物の収集後、強酸 (例えば、硫酸) の添加によって全細胞ブrossを酸性 pH に調整し、加熱した後、一定期間にわたってインキュベートした (WO2011041003 を参照されたい)。加水分解後、ブrossを冷却した後、水酸化ナトリウム溶液の添加によって中和した。

【1268】

3. 凝集

攪拌しながら、10% (w/v) 水性ミョウバン (リン酸アルミニウムナトリウム) 溶液を、冷却した (20 ~ 30) 中和ブross (上記のステップ2のもの) に添加することによって凝集を実施して、ブross中の最終2% (w/v) ミョウバン溶液を生成した。水酸化ナトリウム溶液 (1 ~ 10 N) の添加によって、ブrossを中和した (pH 6.9 ~ 7.1)。中和後、凝集したブrossを、室温で少なくとも10分間インキュベートした後、精密濾過によって清澄化した。

10

【1269】

4. ブrossの清澄化 (精密濾過または遠心分離)

0.2 μm 孔径の中空繊維膜を使用する接線流精密濾過によって、凝集したブrossを清澄化した。この清澄化の所望の生成物は、濃縮段階と透析濾過段階の両方に由来する浸透液であった；保持液は、最終的に廃棄される。4000 ~ 8000 s⁻¹ の切断速度での一定の流動条件下で、凝集したブrossを約4倍に濃縮した。濃縮後、一定容量透析濾過 (5倍透析容量) を、脱イオン水に対して実施した。一定の流動条件下でも透析濾過を実施する。

20

【1270】

透析濾過後、濃縮段階と透析濾過段階の両方に由来する合わせた浸透液は、次の操作のための供給原料として役立つ。

【1271】

5. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFDF - 1)

精密濾過浸透液を、中空繊維接線流限外濾過膜を使用して濃縮および透析濾過した。保持液を生成物として収集した；浸透液を廃棄物として廃棄した。供給原料 (精密濾過浸透液) を、約8 ~ 15倍に濃縮した。濃縮後、保持液を、少なくとも10倍透析容量の125 mMリン酸ナトリウム、pH 7.5 に対して透析濾過した (一定容量)。

30

【1272】

透析濾過後、保持液を、フィルター装置から排水することによって回収した。

【1273】

あるいは、凝集したブross中の沈降した細胞破片を液体から分離するための清澄化方法として、遠心分離を使用することもできる。次いで、その後の炭素濾過ステップによって、上清をプロセッシングすることができる。

【1274】

6. 炭素濾過

次に、限外濾過 / 透析濾過保持液を、炭素濾過を使用して濾過した。Cp5精製とCp8精製の両方のために、Cuno R32SP等級の炭素フィルターを使用した。保持液を、典型的には、1回通過操作において炭素フィルターを通して供給した。炭素濾液を、生成物として収集した。生成物濾過の後、炭素を125 mMリン酸ナトリウム (pH 7.5) 緩衝剤で洗浄した。この洗浄液を、生成物濾液と合わせ、過ヨウ素酸塩酸化を開始する。

40

【1275】

7. 過ヨウ素酸塩酸化

次に、合わせた炭素濾液とフィルター洗浄液とを、過ヨウ素酸塩を用いる酸化反応にかける。室温で、過ヨウ素酸の1.0 M溶液を、以前の精製ステップに由来する炭素濾液 /

50

洗浄液に添加する（50 mMの最終濃度の過ヨウ素酸塩を生成する）。この反応混合物を、室温で30分間インキュベートした。次いで、モル過剰のプロピレングリコールを、反応混合物に添加して、反応をクエンチした。クエンチ後、反応生成物を、水酸化ナトリウムの添加によって中和した（pH 6.9 ~ 7.1）。次いで、反応生成物の溶液に、最後の限外濾過 / 透析濾過操作を開始する。

【1276】

8. 限外濾過 / 透析濾過 - (UFD F - 2)

過ヨウ素酸塩酸化生成物の混合物を、中空繊維接線流限外濾過膜を使用して濃縮および透析濾過した。一定のTMP条件下および一定の剪断速度で、材料を2 ~ 4倍濃縮した（約4 ~ 8 g / LのCp5 / Cp8に）。次に、保持液を、少なくとも10倍透析容量のDI水に対して透析濾過した（一定容量）。

10

【1277】

透析濾過後、保持液を回収した後、フィルターを、最小容量のDI水を使用して洗浄した。洗浄液を排水し、保持液と共に収集した；次いで、合わせた材料を滅菌濾過した。

【1278】

9. 滅菌濾過

合わせた保持液および洗浄液を、適切にサイジングされたデッドエンド滅菌等級フィルター（0.2 μm孔径）を通して、滅菌容器中に濾過した。次いで、この濾液を4で保存した。

【1279】

本明細書に記載された全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する当業者のレベルを示す。全ての刊行物および特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物または特許出願が、参照により組み込まれると具体的かつ個別的に示されたのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【1280】

前記発明を明確に理解するために図表および例によっていくらか詳細に記載してきたが、ある特定の変化および改変を、添付の特許請求の範囲内で実施することができる。

30

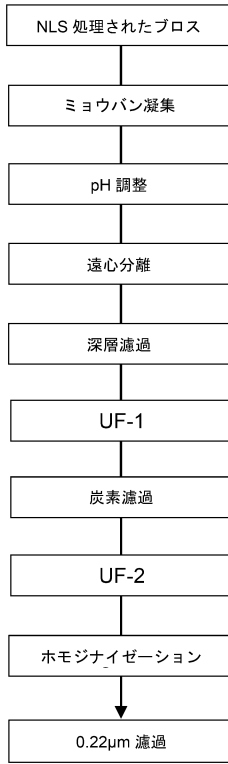
40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2A

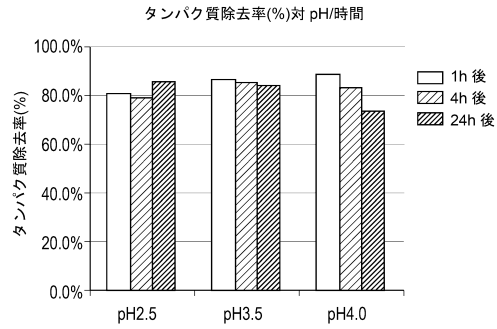
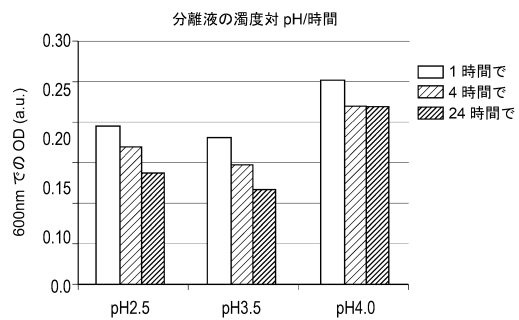


図 2B



10

20

【 図 3 】

図 3A

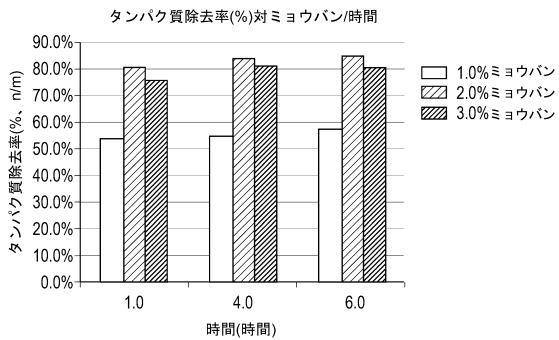
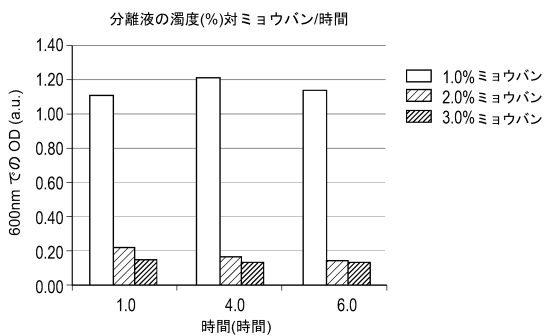
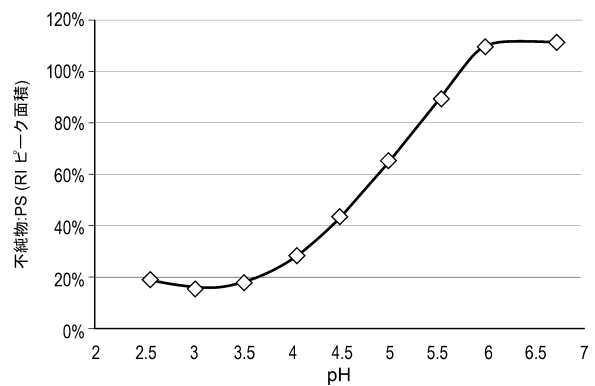


図 3B



【 図 4 】

図 4

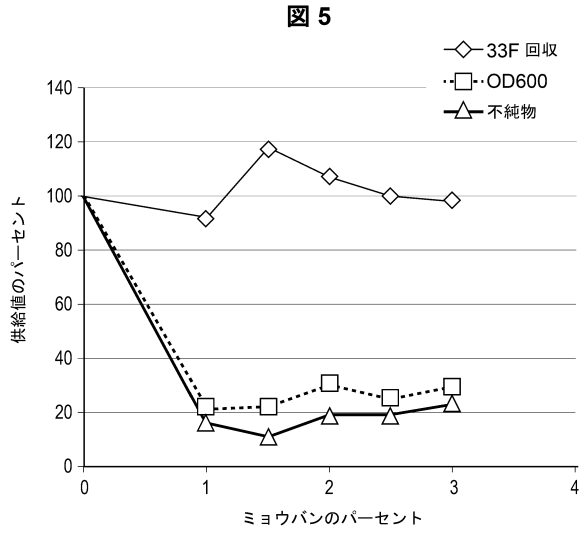


30

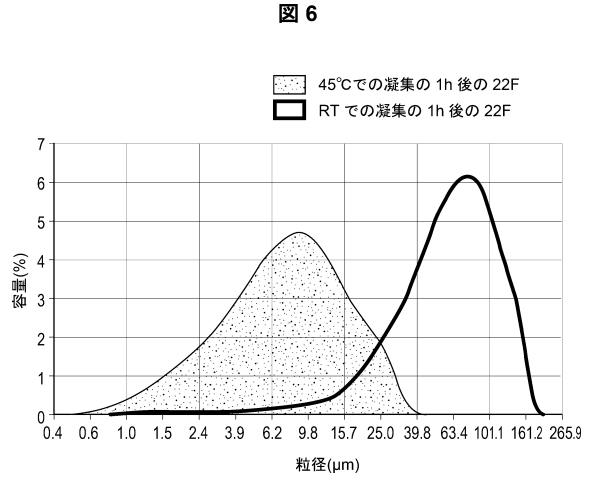
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- アメリカ合衆国 08859 ニュージャージー州 パーリン市 シンガー・コート 12
(72)発明者 ジャスティン キースモラン
アメリカ合衆国 10994 ニューヨーク州 ウェスト・ナイヤック市 ウィラー・プレイス・ウ
エスト 26
審査官 中野 あい
- (56)参考文献 特表2016-504918(JP,A)
特表2015-527079(JP,A)
特表2010-521972(JP,A)
特表2008-535490(JP,A)
特表2012-530786(JP,A)
特表2013-509397(JP,A)
特表2008-528052(JP,A)
中国特許出願公開第101081296(CN,A)
特開昭59-085297(JP,A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12P 1/04-41/00
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)