(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105051055 A
(43)申请公布日 2015.11.11

(21)申请号 201480007315.7
(22)申请日 2014.02.05
(30)优先权数据
61/761,646 2013.02.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2014/000048 2014.02.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/123486 EN 2014.08.14
(71)申请人 新加坡科技研究局
地址 新加坡新加坡
(72)发明人 彼得·斯坦利·加尼翁
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 武晨燕 迟姗
(51)Int.Cl.
*C07K 1/22*(2006.01)
*B01D 15/16*(2006.01)
*C07K 16/00*(2006.01)
*C07D 279/18*(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

通过使用硫代杂环阳离子处理来降低蛋白质制剂中的聚集物水平的方法

(57)摘要

本发明提供了一种降低具有目标蛋白质的蛋白质制剂中聚集物含量的方法，所述方法包括使所述蛋白质制剂与硫代杂环阳离子接触以形成混合物，使所述混合物与至少一种官能化固体接触以去除过量的硫代杂环阳离子；以及任选地使所述混合物同时或相继与至少一种另外的官能化固体接触以进一步降低所述蛋白质制剂的聚集物含量。

CN 105051055 A

1.一种降低包含目标蛋白质的蛋白质制剂中的聚集物含量的方法,所述方法包括：

使所述蛋白质制剂与硫代杂环阳离子接触以形成混合物；

使所述混合物与至少一种官能化固体接触以去除过量的硫代杂环阳离子；以及

任选地使所述混合物同时或相继与至少一种另外的官能化固体接触以进一步降低所述蛋白质制剂的聚集物含量。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述硫代杂环阳离子是亚甲蓝。

3.如权利要求1或2中任一项所述的方法,其中所述硫代杂环阳离子以选自由以下各项组成的组的浓度范围存在：(a)约0.001%至约1%；(b)约0.01%至约1%；以及(c)约0.02%至约0.03%。

4.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中尿囊素以选自由以下各项组成的组的浓度范围存在：(a)约0.6%至约50%；(b)约1%至约10%；以及(c)约1%至约2%。

5.如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中操作电导率选自由以下各项组成的组的范围：(a)约0.1mS/cm至约50mS/cm；(b)约1mS/cm至约30mS/cm；以及(c)约5mS/cm至约15mS/cm。

6.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中操作pH值选自由以下各项组成的组的范围：(a)约4至约10；(b)约5至约9；(c)约6至约8；以及(d)约6.5至约7.5。

7.如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述混合物进一步包含除所述硫代杂环阳离子以外的抗病毒剂,所述抗病毒剂选自由以下各项组成的组：氯己定、苯扎氯铵、依沙吖啶、以及磷酸三(正丁基)酯。

8.如权利要求1所述的方法,其中所述混合物进一步包含尿囊素,所述尿囊素的浓度选自由以下各项组成的组中的一项的范围：(a)约0.6%至约50%；(b)约0.7%至约25%；(c)约0.8%至约10%；(d)约0.9%至约5%；以及(e)约1%至约2%。

9.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述至少一种官能化固体的表面提供了选自由以下各项组成的组的化学相互作用：静电相互作用、疏水性相互作用、氢键键合、以及金属亲和力。

10.如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述至少一种官能化固体是颗粒状的。

11.如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述目标蛋白质包括选自由以下各项组成的组的蛋白质：重组蛋白、抗体、生长激素以及凝血因子。

12.如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述蛋白质制剂是选自由以下各项组成的组的一项：含有细胞的细胞培养收获物、基本上无细胞的细胞培养收获物、以及部分纯化的蛋白质。

13.一种试剂盒,所述试剂盒被提供用于便于实施如权利要求1至12中任一项所述的方法。

# 通过使用硫代杂环阳离子处理来降低蛋白质制剂中的聚集物水平的方法

[0001] 相关申请的声明

[0002] 本申请要求 2013 年 2 月 6 日提交的 U.S.61/761,646 的优先权，该专利的整体以引用的方式并入本文。

[0003] 背景技术领域

[0004] 本文公开的实施方案涉及用于改善包括抗体在内的蛋白质的纯化的方法。具体来说，实施方案涉及用于降低聚集物的水平的方法。这些方法可以（相继或同时）结合细胞培养收获物的澄清一起进行。本文公开的实施方案进一步涉及这些能力与其它纯化方法的整合以实现所需水平的最终蛋白质纯度。

## 背景技术

[0005] 在蛋白质纯化中聚集物去除具有公认的价值。已经证实，低浓度的黄色荧光杂环染料依沙吖啶 (ethacridine) 降低抗体制剂的聚集物含量 (Gan 等，J.Chromatography A 1291(2013)33-40)。在蛋白质纯化的领域中依沙吖啶被用作沉淀剂。

[0006] 硫代杂环阳离子亚甲蓝被用于使通过使血浆分级分离所产生的治疗性蛋白质制剂的病毒灭活。它还被用作抗疟疾药物并且用于治疗高铁血红蛋白血症和某些癌症。

## 发明内容

[0007] 在一些方面，本文公开的实施方案提供了降低包含目标蛋白质的蛋白质制剂中的聚集物含量的方法，所述方法包括使所述蛋白质制剂与硫代杂环阳离子接触以形成混合物，使所述混合物与至少一种官能化固体接触以去除过量的硫代杂环阳离子，以及任选地使所述混合物同时或相继地与至少一种另外的官能化固体接触以进一步降低所述蛋白质制剂的聚集物含量。

## 具体实施方式

[0008] 提供了用于纯化蛋白质的方法和试剂盒。在某些实施方案中，所公开的方法经由使抗体或其它蛋白质与一种或多种硫代杂环阳离子接触使得这些所需的蛋白质的制剂中的聚集物减少。在某些实施方案中，所公开的方法可以在所谓的生理条件（约 12mS/cm 至约 16mS/cm) 至为这些条件的高达三倍或更多倍的电导率值的电导率水平范围实施。这些升高的电导率水平可以容许所述方法被应用于酸性蛋白质而不会有在处理期间导致它们沉淀的风险，并且从而增加了所公开的方法可以应用的所需蛋白质种类的多样性。在某些实施方案中，所公开的方法可以使用超低浓度的硫代杂环阳离子来实施；如约 0.01％至约 0.05％。所公开的方法包括使经过处理的蛋白质制剂与提高总处理能力的固体物质接触以降低聚集物含量，这通常与减少宿主蛋白污染并行进行，并且所公开的方法提供了去除过量的硫代杂环阳离子的额外优势。在某些实施方案中，所述硫代杂环阳离子是亚甲蓝。

[0009] 在某些实施方案中，所公开的方法使与所需蛋白质相比具有高分子量的聚集物的

水平降低，所述聚集物诸如同型聚集物 (homo-aggregate)，由多个所需蛋白质或多个另外的单一物质组成；以及异型聚集物 (hetero-aggregate)，由一个或多个所需蛋白质连同不含所需蛋白质的至少一种其它物质或物质的组合组成。在某些实施方案中，聚集物包括所需蛋白质和污染物的异型聚集物，并且在某些这样的实施方案中，污染物是核酸、核苷酸、内毒素、金属离子、蛋白质、脂质、或细胞培养基组分。在某些实施方案中，基本上消除了所需蛋白质的同型聚集物的存在。在某些实施方案中，基本上消除了所需蛋白质和污染物的异型聚集物的存在。在某些实施方案中，基本上消除了不包括所需蛋白质的同型聚集物和异型聚集物的存在。

[0010] 在某些实施方案中，所公开的方法另外使得在减少聚集物的同时减少诸如 DNA、内毒素以及病毒水平之类的污染物。在某些实施方案中，所公开的方法是通过另外包括除硫代杂环阳离子本身以外的抗病毒剂来实施的。

[0011] 在某些实施方案中，所关注的蛋白质种类（例如待纯化的所需蛋白质）具有重组起源，并且蛋白质制剂可以包括含有细胞的细胞培养收获物、细胞培养上清液、澄清了的细胞培养上清液、来自色谱柱的洗脱物、或由先前的纯化阶段获得的含有蛋白质的溶液。在某些实施方案中，所述蛋白质制剂含有抗体，并且在某些这样的实施方案中，所述抗体是 IgG、IgM 或其片段形式、或抗体或抗体片段的融合蛋白，如 Fc 融合蛋白。在某些实施方案中，所需蛋白质可以是凝血蛋白，如因子 VIII。在某些实施方案中，所需蛋白质可以是肽激素，如人生长激素。

[0012] 在某些实施方案中，所公开的方法可以被实施以使得样品的电导率处在足够高的水平以基本上避免所需蛋白质从样品中沉淀出。可以根据本领域已知的方法，通过添加盐或稀释剂来调节电导率。在某些实施方案中，电导率比所确定的为避免所需蛋白质的大量沉淀所需的水平大了约 5mS/cm、约 10mS/cm、约 15mS/cm 或约 20mS/cm。在某些实施方案中，电导率大于约 20mS/cm、约 25mS/cm、约 30mS/cm、约 35mS/cm、约 40mS/cm、约 45mS/cm，或大于约 45mS/cm。所述方法在升高的电导率下去除某些子集的污染物的能力代表了所公开的方法的惊人特征之一，这是因为已知在这些系统中电荷的相互作用会在升高的电导率下减少。在例如约 25mS/cm 以及更高的电导率下，已知只有少数的带负电荷的蛋白质与正电性表面结合。除了本发明的方法之外，许多正电性试剂向 IgG 抗体的制剂的施用是在小于约 5mS/cm 的电导率下进行的，并且通常有碱性 pH 值的额外操作要求。这种操作 pH 值不是本发明方法的要求。对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的是，升高的电导率可能有削弱聚集物内的内部静电缔合的作用并且从而提高了所述方法实现聚集物的解离和 / 或与所需蛋白质缔合的污染物的去除的能力。

[0013] 在某些实施方案中，硫代杂环阳离子是亚甲蓝 (IUPAC 命名：[7-（二甲基氨基）吩噻嗪 -3- 亚基 ]- 二甲基铵）、其类似物或盐。亚甲蓝的类似物也可以用作硫代杂环阳离子，这些类似物描述于美国专利号 7,176,308 中，该专利的整个公开内容以引用的方式整体并入本文。亚甲蓝也被称为碱性蓝 9。其它硫代杂环阳离子源包括亚甲绿（即碱性绿 5)、劳氏紫 (Lauth's violet)（即硫堇）。也可以使用亚甲蓝的氧化形式，如噻嗪类，亚甲天蓝 A、亚甲天蓝 B、以及亚甲天蓝 C。在一些实施方案中，硫代杂环阳离子可以是具有任何抗衡阴离子的吩噻嗪 -3- 亚基 - 二甲基铵结构类别的任何成员。

[0014] 在某些实施方案中，可以足以促进所需程度的聚集物减少的基本上最低的浓度提

供硫代杂环阳离子。在某些实施方案中,硫代杂环阳离子的浓度可以小于(以每单位体积的重量计)1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05%、0.04%、0.025%、或0.001%。在某些实施方案中,以0.01% -0.04%或0.02% -0.025%的浓度提供正电性有机添加剂。

[0015] 在某些实施方案中,所公开的方法可以在经过选择以避免或限制所需蛋白质沉淀,同时减少样品中聚集物的量的pH值水平实施。pH值水平可以通过常规手段调节并且可以结合电导率的选择来选择。在某些实施方案中,样品的pH值是约4至约9、约5至约8、或约6至约7.5。

[0016] 在某些实施方案中,使样品另外与除硫代杂环阳离子本身以外的抗病毒剂接触。在某些这样的实施方案中,所述抗病毒剂可以是非多价有机阳离子,如苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、氯己定(chlorhexidine)、依沙吖啶、或磷酸三(正丁基)酯。这些抗病毒剂可以小于约1%(w/v)、小于约0.1%(w/v)、或小于约0.01%(w/v)或小于约0.001%的量存在。

[0017] 在某些实施方案中,所述方法另外包括使样品与酰脲接触的步骤,所述酰脲的量足以使得所述酰脲在样品中是未被溶解的。然后可以从包括沉淀的污染物的样品的平衡中分离含有所需蛋白质的上清液。在某些这样的实施方案中,在使样品与正电性有机添加剂接触的步骤之前供给酰脲,在其它实施方案中,在与使样品与正电性有机添加剂接触的步骤基本上同时供给酰脲,并且在另外的其它实施方案中,在使样品与正电性有机添加剂接触的步骤之后供给酰脲。在某些这样的实施方案中,酰脲可以是以下各项中的任一种:尿酸、乙内酰脲(咪唑烷-2,4-二酮)、尿囊素(2,5-二氧代-4-咪唑烷基脲、铝克洛沙(alcloxa)、尿囊素铝(aldioxa)、赫默坎尼(hemocane)、脲基乙内酰脲、5-脲基乙内酰脲)、乙醛酰脲、乙醛酸二酰脲、2,5-二氧代-4-咪唑烷基脲(尿囊素)、咪唑烷基脲、二咪唑烷基脲、以及嘌呤。在某些实施方案中,酰脲是尿囊素并且在一些这样的情况下,尿囊素以大于0.56%(w/v)、1%、1.5%、2%、或更大的浓度存在。在某些实施方案中,酰脲是尿酸并且在一些这样的情况下,尿酸以大于0.0025%(w/v)、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、1%或更大的浓度存在。

[0018] 在某些实施方案中,方法可以另外包括使样品与一定量的酰脲接触的步骤,其中所述酰脲完全溶解。在某些这样的实施方案中,可溶性酰脲可以是脲、咪唑烷基脲、或另一种酰脲。在某些实施方案中,酰脲是脲,并且在一些这样的情况下,脲以大于0.5M、或大于1M、或大于2M、或大于4M、或大于6M、或大于8M的浓度存在。进行本文中的包括亚甲蓝在内的硫代杂环阳离子与酰脲组合的方法的能力是惊人的,其中避免沉淀是所述方法的特定目标。这一结果与已知的依沙吖啶沉淀法形成对比。诸如脲的高可溶性酰脲具有提高许多化合物的溶解度的一般作用,也就是说,它们的存在阻止了沉淀物的形成。

[0019] 在某些实施方案中,所公开的方法的效用可以通过加速细胞培养收获物中细胞碎片的沉降以及大幅降低DNA、内毒素以及病毒的水平(当DNA、内毒素以及病毒存在时)来提高。实验数据表明一些酰脲优先地与聚集物、内毒素以及病毒相互作用的能力促成了这些结果,并且与在不存在酰脲的情况下使用多价阳离子进行处理相比,低水平的溶解的酰脲可以有助于更高的抗体回收。在处理后,可以通过沉降或过滤来去除固体物质,在上清液中留下基本上无聚集物的蛋白质。

[0020] 在某些实施方案中,所公开的方法可以通过以下另外的步骤来实施:使样品与可

溶性有机调节剂接触，所述调节剂如非离子有机聚合物、有机溶剂、表面活性剂或酰脲。在某些这样的实施方案中，在使样品与正电性有机添加剂接触的步骤之前，进行使样品与有机调节剂接触的步骤。在其它实施方案中，使样品与有机调节剂接触的步骤与使样品与正电性有机添加剂接触的步骤基本上同时进行。在另外的其它实施方案中，在使样品与正电性有机添加剂接触的步骤之后，进行使样品与有机调节剂接触的步骤。在某些实施方案中，所述有机调节剂是非离子有机聚合物，如聚乙二醇、聚丙二醇以及聚丁二醇，并且在某些这样的实施方案中，非离子有机聚合物具有约1000D或更小、500D或更小、250D或更小、或100D或更小的平均分子量。在某些实施方案中，所述有机调节剂是有机溶剂，如乙二醇、丙二醇、丁二醇、二甲亚砜、乙醇、或苯氧乙醇。在某些实施方案中，以约1%（w/v）或更大的浓度提供有机调节剂。在某些实施方案中，有机调节剂是表面活性剂，如吐温（Tween）、曲通（triton）、CHAPS、CHAPSO或辛基葡糖苷，并且在某些这样的实施方案中，以约1%（w/v）或更小、约0.1%或更小、或约0.02%（w/v）或更小的浓度提供表面活性剂。在某些实施方案中，有机调节剂是以亚饱和量提供的酰脲，并且在某些这样的实施方案中，酰脲是脲、乙内酰脲或尿囊素。

[0021] 在某些实施方案中，所公开的方法可以借助于被设计成执行所公开的方法的试剂盒来实施。这种试剂盒可以提供可用于实施所公开的方法的说明书和试剂，如多价有机阳离子、酰脲、有机调节剂、抗病毒剂、以及用于调节电导率的试剂中的一种或多种。所述试剂盒可以提供被适配成实施所公开的方法以用于纯化蛋白质的量和浓度的物质。这些试剂盒可以被适配用于与诸如IgG或IgM抗体之类的某些蛋白质一起使用，并且可以被适配成适合于一定规模的蛋白质制备和纯化的量。

[0022] 在某些实施方案中，在所公开的方法之后，可以使样品与固体物质接触，意图是所述固体具有在另外的处理之前从样品中选择性地去除过量的硫代杂环阳离子或其它样品组分的作用。在一个这样的实施例中，可能包括诸如用于进行阳离子交换色谱技术的带负电荷的固体以清除过量的硫代杂环阳离子。在另一个这样的实施例中，可能利用诸如用于进行疏水性相互作用色谱技术的疏水固体。在另一个这样的实施例中，可能利用带负电荷的疏水的色谱固体。在另一类型的实施例中，可能使用带有正电荷的固体来从样品中清除DNA、或pH指示剂染料、或磷脂、或其它组分。

[0023] 在某些实施方案中，所公开的方法可以与常规的蛋白质纯化方法组合以实现更高水平的纯化或去除其它污染物。举例来说，所公开的方法可以被实施，用于常规的纯化方法的准备中，所述常规的纯化方法涉及沉淀法、色谱法、以及液-液萃取法。为这些方法研发适当的条件以及使它们与本文所述的所公开的方法整合以实现对产品的所需纯化是在本领域普通技术人员的能力范围内的。

[0024] 在某些实施方案中，可针对pH值和/或通过螯合剂、有机聚合物或有机溶剂、表面活性剂、离液剂、以及不同种类的盐的存在改变操作条件以调节使聚集物减少并且使所需蛋白质保留在溶液中的程度。

[0025] 在一些实施方案中，提供了降低包含目标蛋白质的蛋白质制剂中聚集物含量的方法，所述方法包括：使所述蛋白质制剂与硫代杂环阳离子接触以形成混合物，使所述混合物与至少一种官能化固体接触以去除过量的硫代杂环阳离子，以及任选地使所述混合物同时或相继与至少一种另外的官能化固体接触以进一步降低所述蛋白质制剂的聚集物含量。在

一个这样的实施方案中，可以包括经过官能化以提供升高的疏水性和负电荷的固体颗粒以清除过量的硫代杂环阳离子，同时可以包括经过官能化以提供正电荷的固体颗粒以结合含有螯合的 DNA 组分的聚集物。在一个这样的实施方案中，经过官能化以提供正电性的固体可以进一步包括其它化学官能性，如氢键键合、疏水性和 / 或金属亲和力。

[0026]　在一些实施方案中，所述硫代杂环阳离子是亚甲蓝。

[0027]　在一个或多个前述实施方案中，硫代杂环阳离子以选自由以下各项组成的组的浓度范围存在 :(a) 约 0.001％至约 1％ ;(b) 约 0.01％至约 1％ ;以及 (c) 约 0.02％至约 0.03％，包括任何中间值或值的范围。

[0028]　在一个或多个前述实施方案中，尿囊素以选自由以下各项组成的组的浓度范围存在 :(a) 约 0.6％至约 50％ ;(b) 约 1％至约 10％ ;以及 (c) 约 1％至约 2％，包括任何中间值或值的范围。

[0029]　在一个或多个前述实施方案中，操作电导率选自由以下各项组成的组的范围 :(a) 约 0.1mS/cm 至约 50mS/cm ;(b) 约 1mS/cm 至约 30mS/cm ;以及 (c) 约 5mS/cm 至约 15mS/cm，包括任何中间值或值的范围。

[0030]　在一个或多个前述实施方案中，操作 pH 值选自由以下各项组成的组的范围 :(a) 约 4 至约 10 ;(b) 约 5 至约 9 ;约 6 至约 8、以及约 6.5 至 7.5，包括任何中间值或值的范围。

[0031]　在一个或多个前述实施方案中，所述混合物进一步包含除硫代杂环阳离子以外的抗病毒剂，所述抗病毒剂选自由以下各项组成的组 :氯己定、苯扎氯铵、依沙吖啶、以及磷酸三 ( 正丁基 ) 酯。

[0032]　在一些实施方案中，硫代杂环阳离子可以与尿囊素组合使用。尿囊素可以提高亚甲蓝实现聚集物减少的能力。

[0033]　在一个或多个前述实施方案中，所述混合物进一步包含尿囊素，所述尿囊素的浓度选自由以下各项组成的组中的一个范围 :(a) 约 0.6％至约 50％;(b) 约 0.7％至约 25％;(c) 约 0.8％至约 10％;(d) 约 0.9％至约 5％;以及 (e) 约 1％至约 2％，包括任何中间值或值的范围。

[0034]　在一个或多个前述实施方案中，至少一种官能化固体的表面提供了选自由以下各项组成的组的化学相互作用 :静电相互作用、疏水性相互作用、氢键键合、以及金属亲和力。

[0035]　在一个或多个前述实施方案中，所述至少一种官能化固体是颗粒状的。

[0036]　在一个或多个前述实施方案中，所述目标蛋白质包括选自由以下各项组成的组的一项 :重组蛋白、抗体、生长激素、以及凝血因子。

[0037]　在一个或多个前述实施方案中，所述蛋白质制剂是选自由以下各项组成的组的一项 :含有细胞的细胞培养收获物、基本上无细胞的细胞培养收获物、以及部分纯化的蛋白质。

[0038]　在一些实施方案中，提供了用于便于实施本文所公开的方法的试剂盒。这些试剂盒可以包括说明书、试剂、以及任选的任何预包装的设备，所述设备呈预包装的色谱装置或简单容器的形式。

[0039]　在下文对术语进行定义以使得可以更容易地理解所公开的方法。另外的定义阐述于整个具体实施方式中。

[0040]　“聚集物”指的是两个或更多个分子的缔合，这种缔合在生理条件下是稳定的并且

可以在广泛的pH值和电导率条件的范围内保持稳定。聚集物经常包含至少一种生物分子，如蛋白质、核酸或脂质；以及另一种分子或金属离子。这种缔合可以经由任何类型的化学相互作用或化学相互作用的任何组合来发生。抗体的聚集物可以分为以下两个类别："同型聚集物"指的是两个或更多个具有相同组成的蛋白质的稳定缔合；"异型聚集物"指的是一个或多个具有相同或不同组成的蛋白质的稳定缔合，其任选地与一个或多个非蛋白质分子缔合。非蛋白质组分可以由来自由以下各项组成的组的一种另外的实体组成：核苷酸、内毒素、金属离子、脂质、或细胞培养基组分。

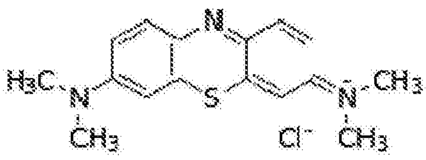
[0041] "抗体"指的是免疫球蛋白、其复合形式或片段形式。所述术语可以包括但不限于源自于人类或其它哺乳动物细胞系的IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM类别的多克隆抗体或单克隆抗体，包括天然形式或遗传修饰的形式，如人源化抗体、人类抗体、单链抗体、嵌合抗体、合成抗体、重组抗体、杂合抗体、突变抗体、移植抗体、以及体外产生的抗体。"抗体"还可以包括复合形式，包括但不限于含有免疫球蛋白部分的融合蛋白。"抗体"还可以包括抗体片段，如Fab、$F(ab')_2$、Fv、scFv、Fd、dAb、Fc以及其它组合物，无论它们是否保留抗原结合功能。

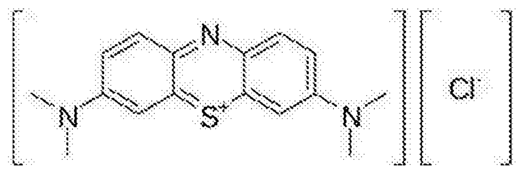
[0042] "内毒素"指的是在革兰氏阴性细菌的外膜中存在的、在裂解时从细胞中释放的一种毒性热稳定性脂多糖物质。

[0043] "非离子有机聚合物"指由连接的、缺少带电荷的基团的重复有机子单元构成的天然存在的烃或合成烃。它可以是线性的、主要是线性的而具有一定支化的、或主要是支化的。适合于实施所公开的方法的实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、以及聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。PEG具有结构式$HO-(CH_2-CH_2-O)_n-H$。实例包括但不限于具有在小于100道尔顿至大于1000道尔顿的范围的平均聚合物分子量的组合物。

[0044] "硫代杂环阳离子"指的是如下的有机阳离子，所述有机阳离子包含呈共面排列的3个环、带有至少一个硫醇基和至少一个氨基，带有至少一个正电荷，其中所述正电荷可以存在于硫醇基或氨基。一个实例是亚甲蓝。

[0045]




[0046] "有机溶剂"指的是以液态存在的天然存在的有机化合物或合成有机化合物。适合于实施所公开的方法的实例包括但不限于乙二醇、丙二醇、二甲亚砜、乙醇、以及苯氧乙醇。

[0047] "有机聚合物"指的是有机单体的天然存在的聚合物或合成聚合物。实例包括但不限于聚乙二醇、聚丙二醇、葡聚糖、或纤维素等等。

[0048] "多核苷酸"指的是由在链中共价键合的多个核苷酸单体构成的生物聚合物。DNA(脱氧核糖核酸)和RNA(核糖核酸)是多核苷酸的实例。

[0049] "蛋白质"指的是一组复杂的含有碳、氢、氧、氮、以及通常硫并且主要由通过肽键连接的氨基酸的一条或多条链构成的有机大分子中的任一种。蛋白质可以具有天然起源或重组起源。蛋白质可以用非氨基酸部分来修饰，诸如经由糖基化、聚乙二醇化、或与其它化学部分缀合。蛋白质的实例包括但不限于抗体、凝血因子、酶、以及肽激素。

[0050] “未溶解的酰脲”指的是含有一定量的酰脲的溶液，该量超过了酰脲在具体的蛋白质制剂中通常存在的条件下的最大溶解度。在某些实施方案中，所公开的方法提供了具有酰脲的样品，所述酰脲以大于这种酰脲在这种样品的所述条件下在这种样品中的溶解度的量存在，以使得所述酰脲中有一部分以未溶解的形式存在于样品中。

[0051] “表面活性剂(surfactant)”包括“表面活性剂(surface active agent)”，如一类有机分子，这类有机分子一般包含疏水部分和亲水部分，从而使得它们被称为两亲性。在水溶液中足够的浓度下，表面活性剂可以自缔合成簇，其中疏水部分集中在中心处以使得与水的接触减到最低程度，并且亲水部分向外辐射以使得与水的接触达到最大程度。在生物制剂、特别是含有具有疏水特征或具有具疏水特征的区域的物质的那些生物制剂存在下，表面活性剂的疏水部分倾向于与所述疏水物质的一些部分自发地缔合并且经由表面活性剂的亲水部分的影响提高它们的溶解度。它们还可以用于调节在均被溶解在水性溶剂中的不同的疏水物质之间存在的疏水性相互作用。适合于实施所公开的方法的某些实施方案的表面活性剂的实例包括但不限于非离子表面活性剂，如聚山梨醇酯表面活性剂(例如吐温20、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯、以及吐温80、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)以及曲通(例如聚乙二醇对-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯基醚)；以及两性离子表面活性剂，如CHAPS(3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸内盐)、CHAPSO(3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]-2-羟基-1-丙磺酸内盐)、以及辛基葡糖苷(例如(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(羟甲基)-6-辛氧基噁烷-3,4,5-三醇)。

[0052] “病毒”或“病毒粒子”指的是仅在活的宿主，主要是细菌、植物以及动物的细胞内复制的超微结构(具有约20nm至300nm的直径)、代谢惰性感染因子：由RNA或DNA核心、蛋白质外壳，以及在更复杂的类型中，周围的包膜构成。

[0053] 在为使用根据某些实施方案的所公开的方法的准备中，将需要选择硫代杂环阳离子。实验数据揭示亚甲蓝由于它除了能够使病毒灭活之外还有效减少聚集物而是理想的。它用作抗疟疾药物和用于治疗高铁血红蛋白血症的治疗剂的用途突出了它与人体内使用的相容性，并且它被列于美国药典(U.S.Pharmacopeia)中。

[0054] 在针对在某些实施方案中的使用对硫代杂环阳离子进行评价的过程中，可以如下研究用于施用的条件。硫代杂环阳离子的使用潜在地对在某些实施方案中可以用于实施方法的条件构成一些限制。举例来说，可能期望利用基本上防止硫代杂环阳离子与所关注的蛋白质之间的强相互作用的条件。获得这些条件的近似值的简单方法是将所关注的蛋白质施用于阴离子交换剂并且将它在盐梯度中洗脱。刚好高于将蛋白质洗脱的阈值的盐浓度大致鉴定出所述方法可以被有效实施的最小电导率。这一浓度将受pH值的影响，这可以通过相同的手段来建模。假定将所述方法应用于细胞培养上清液，IgG抗体可能不需要添加盐或调节pH值来避免显著的损失。IgM抗体可能需要添加盐，甚至达到接近30mS/cm的电导率值(是生理电导率值的约2倍)。在涉及使用未溶解的酰脲和正电性有机添加剂的某些实施方案中，IgG应用可以在低于生理电导率下进行，潜在地包括1mS/cm或更小的值，在这种情况下，大量的宿主蛋白可以联同解离的聚集物一起被去除。这些应用可能需要增加硫代杂环阳离子的浓度以弥补经由与宿主蛋白结合而损失的量。在这些情况下，更低的操作电导率还可以提高DNA、内毒素以及病毒的去除。在某些实施方案中，所公开的方法一般将支持大于95%，并且通常98%-99%的抗体回收率。通常应当在添加酰脲或硫代杂环阳离

子之前建立样品的电导率和 pH 值条件。

[0055] 在某些实施方案中，评价用于澄清了的含有 IgG 单克隆抗体的细胞培养上清液的条件的一种有效手段涵盖了 0.01％至 0.1％的范围的硫代杂环阳离子以及从生理电导率的一半至生理电导率的 2 倍范围的电导率。这些范围可以被进一步扩大，如果结果表明这样做可能是有帮助的话，或者被缩小以及以更小增量进行评价。

[0056] 在某些实施方案中，研发用于澄清了的细胞培养上清液的根据所公开的方法的纯化程序的适当起点是使用 0.025％的亚甲蓝。

[0057] 在某些实施方案中，可能有利的是，在添加正电性有机添加剂之前首先使有机调节剂在蛋白质制剂中分散，这是因为这种做法可以提高抗体回收率。在添加正电性有机添加剂之前长时间的孵育似乎是不必要的 ;15 分钟或更短时间足矣，尽管更长时间的孵育也似乎没有坏处。实验数据一般表明以约 1％的过饱和量添加尿囊素提高了 IgG 的回收率。

[0058] 在某些实施方案中，建议在将硫代杂环阳离子添加到样品中之前将它溶解在例如水或缓冲液中，以有助于它们在整个蛋白质制剂中快速分布。应当注意例如通过将溶解的硫代杂环阳离子逐步地输注到充分混合的悬浮液中来避免持续的局部过量。孵育时间应当是至少 15 分钟、或约 30 分钟，但不需要大于约 60 分钟。

[0059] 所述方法一般可以在环境温度实施，但也可以在更高或更低的温度，例如 4℃至 37℃的范围的温度进行。实验数据表明温度基本上不改变所获得的结果，这将使得蛋白质本身的稳定性要求成为操作温度的选择中的决定因素。

[0060] 在某些实施方案中，在将硫代杂环阳离子添加到样品中之前，将它溶解或分散在例如水或缓冲液中，并且调节 pH 值。这是因为硫代杂环阳离子的某些制剂，如游离碱形式，是碱性的，并且有可能会以非预期的方式大幅改变实验条件。

[0061] 在涉及使用过饱和的酰脲和硫代杂环阳离子这两者的某些实施方案中，可能一般有利的是，在添加硫代杂环阳离子之前首先将酰脲分散在蛋白质制剂中，这是因为使用酰脲尿囊素进行的实验表明这种做法可以提高抗体回收率。在添加正电性有机添加剂之前长时间的孵育似乎是不必要的 ;15 分钟或更短时间足矣，尽管更长时间的孵育也似乎没有坏处。

[0062] 对于监测通过所述方法所实现的聚集物解离或去除来说，存在多种选择，无论是在方法研发期间还是制造期间。最简单的是在具有合适的选择性的柱上进行分析型尺寸排阻色谱并且在 280nm 的 UV 波长监测。这可以揭示 HMW（高分子量）聚集物，这是因为它们通常包括合理地符合未聚集的产品的多倍尺寸的流体动力学尺寸。异型聚集物通常被这种方法所忽略，这是因为它们的流体动力学尺寸可能仅略大于未聚集的产品的尺寸。在这些情况下，聚集物的异型组合物可以通过计算在 254nm 的 UV 吸光度与在 280nm 的 UV 吸光度的比率，然后将该值与被认为完全不含相关污染物的纯化的蛋白质的吸光度比率进行比较来揭示。含有 DNA 的异型聚集物例如将通过 254/280 的比率升高来揭示。可以同时在 655nm 监测亚甲蓝含量，如果色谱仪提供了这种能力的话。这可能有助于证实亚甲蓝被后续的纯化过程所去除。还可以结合其它色谱法一起使用多波长监测。或者可以通过反相高效液相色谱来监测亚甲蓝。

[0063] 在某些实施方案中，所公开的方法可以与在后续的纯化之前去除硫代杂环阳离子以及样品潜在的其它组分的处理整合。这些处理可以包括使样品暴露于带有化学部分的固

体，这些化学部分的性质与硫代杂环阳离子的特征是互补的，目的在于使它们螯合样品的剩余硫代杂环阳离子。由于硫代杂环阳离子被理解成带正电荷的并且具有疏水性，由此可见包括疏水的带负电荷的表面在内的带负电荷的表面应当特别适用于螯合过量的硫代杂环阳离子。可以包括具有其它表面组成的固体以螯合样品的其它组分。

[0064] 在某些实施方案中，所公开的方法可以与一种或多种纯化方法整合，包括但不限于蛋白质A和其它形式的生物学亲和色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、疏水性相互作用色谱、固定金属亲和色谱、羟基磷灰石或其它混合模式的色谱、和/或非色谱法，如沉淀和液-液萃取。为各种方法研发适当的条件以及使它们与本文所公开的方法整合以实现对具体抗体的所需纯化是在本领域普通技术人员的权限范围内的。

[0065] 实施例

[0066] 实施例1：亚甲蓝的独立作用相比于依沙吖啶的独立作用。通过离心和微滤使含有约2g/L浓度的IgG1单克隆抗体的细胞培养收获物澄清。聚集物含量是21％并且宿主蛋白含量是IgG的371,459ppm（百万分率）。在一系列对照实验中，将澄清了的收获物的不同的等分部分与0.01％、0.02％、或0.04％的依沙吖啶混合并且在搅拌同时孵育2小时。在另一系列实验中，将亚甲蓝以相同的浓度添加到单独的等分部分中。添加由带有疏水性丁基的带负电荷的聚合物合成的固体颗粒(MacroPrep tbutyl，伯乐实验室公司(Bio-Rad Laboratories))以达到5％体积/体积的水平，并且在混合同时孵育16小时。通过离心去除固体。在这两个系列中聚集物含量和宿主蛋白含量均降低，但亚甲蓝使它们降低得更多。对于依沙吖啶，聚集物减少到17％，相比之下，亚甲蓝使聚集物减少到16％，就依沙吖啶或亚甲蓝的浓度而言，存在非常小的差异。对于依沙吖啶，在整个0.01％至0.04％的范围内，宿主蛋白减少到327,621ppm、315,180ppm、以及307,014ppm。对于亚甲蓝，对应值是259,357ppm、240,059ppm、221,810ppm，这证实亚甲蓝的性能要平均高出24％。在这两组中，IgG回收率是91％。在经过依沙吖啶处理的收获物与经过亚甲蓝处理的收获物之间观测到另一个区别在于：在经过依沙吖啶处理的样品中，一部分的游离抗体轻链似乎自发地二聚化。这在亚甲蓝的情况下没有被观测到，并且没有进一步研究这一现象，然而，亚甲蓝上硫原子的存在已经被假定为发挥了潜在的作用。

[0067] 实施例2：与尿囊素混合的亚甲蓝。通过离心和微滤使含有约2g/L浓度的IgG1单克隆抗体的细胞培养收获物澄清。聚集物含量是6.8％并且宿主蛋白含量是IgG的406,239ppm。添加1％ w/v的量的尿囊素。添加0.02％的量的亚甲蓝并且将混合物孵育2小时。添加2.5％ v/v的量的带正电荷的颗粒(Bio-Works TREN high)，并且按相同的比例添加带负电荷的颗粒(Bio-Rad Macroprep high S)并且在混合同时孵育16小时。通过离心和微滤去除固体。聚集物减少到3.3％并且宿主蛋白减少到143,362ppm，IgG回收率是91％。使混合物通过一对深度过滤器(PB1和PC1，赛多利斯公司(Sartorius))。聚集物减少到2.1％。宿主蛋白减少到43,360ppm，IgG回收率是86％。

[0068] 实施例3：含有IgG的细胞培养收获物的聚集物减少。通过将pH值滴定到8.0，添加尿囊素达到1％ w/v的最终浓度，继而添加0.025％的量的亚甲蓝来对含有约21％的聚集物的IgG细胞培养收获物进行处理。在室温下将混合物在搅拌同时孵育1小时。使Bio-Works TREN-high颗粒与Macroprep t-Butyl颗粒的4:1混合物对50mM tris、100mM NaCl(pH 8.0)平衡，使颗粒沉降并且将总计IgG制剂的体积的5％的体积的混合颗粒添加

到制剂中。将混合物在搅拌同时孵育4小时并且通过离心去除固体。所取出的用于分析的样品揭示聚集物从初始的21％减少到2.1％。DNA减少了超过99％(AccuBlue，伯亭公司(Biotium))并且宿主蛋白减少了81％(宿主蛋白ELISA，斯格勒斯公司(Cygnus))。使混合物通过一对深度过滤器(PB1和PC1，赛多利斯公司)。聚集物进一步减少到少于0.5％，并且与初始的收获物相比，宿主蛋白减少了总共91％。

[0069] 实施例4：含有IgM的细胞培养收获物的聚集物减少。通过添加一定量的NaCl以产生20mS/cm的最终电导率，继而按1％的最终比例添加尿囊素，继而添加0.025％的量的亚甲蓝来对含有约23％的聚集物的IgG细胞培养收获物进行处理。在室温下将混合物在搅拌同时孵育2小时。使Macroprep High S、Macroprep High Q、Macroprep t-Butyl以及Chelex 100(伯乐公司)的1:1:1:1混合物对50mM磷酸钠、200mM NaCl(pH 7.2)平衡，使颗粒沉降并且将总计IgM制剂的体积的5％的体积的混合颗粒添加到制剂中。将制剂在搅拌同时孵育4小时，并且通过离心，继而通过经由0.22微米的膜进行膜过滤来去除固体。聚集物含量从初始的23％降低到少于1％。DNA减少了超过99％，并且宿主细胞蛋白质污染物减少了47％。

[0070] 本领域普通技术人员将了解如何将来自实验，如上述实施例中所述的实验的结果按比例扩大或按比例缩小到满足他们的具体要求所需的任何体积。

[0071] 本文所引用的所有参考文献均出于所有目的以引用的方式整体并入本文，该引用的程度就如同每一件单独的公开或专利或专利申请均被明确地并且单独地表明出于所有目的以引用的方式整体并入本文一样。如果以引用的方式并入本文的公开和专利或专利申请与本说明书中所含的公开内容矛盾，那么本说明书意图取代和/或优先于任何这样的矛盾内容。

[0072] 在本说明书和权利要求书中所使用的表示成分的量、色谱条件等的所有数字均将被理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此，除非有相反的指示，否则在本说明书和所附权利要求书中所阐述的数值参数是近似值，所述近似值可以根据由本发明所公开的方法所试图获得的所需性能而变化。

[0073] 可以对所公开的方法进行许多修改和变化而不脱离它的精神和范围，如将对于本领域技术人员来说所显而易见的。本文所述的具体实施方案仅通过举例的方式提供而不意味着以任何方式具有限制性。本说明书和实施例仅意图被认为是示例性的，所公开的方法的真正范围和精神由以下权利要求书表明。