



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107312062 A

(43)申请公布日 2017.11.03

(21)申请号 201710282087.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.05.16

C07K 1/30(2006.01)

(30)优先权数据

C07K 1/32(2006.01)

61/395,769 2010.05.17 US

C07K 16/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

C08F 8/00(2006.01)

201180024500.3 2011.05.16

C08F 8/02(2006.01)

(71)申请人 EMD密理博公司

B01J 41/13(2017.01)

地址 美国马萨诸塞州

B01J 41/14(2006.01)

B01J 41/12(2017.01)

(72)发明人 J·贾比尔 W·莫亚

J·哈姆日克 A·布迪夫 Y·张

N·索伊斯 J·查库迪恩

N·辛格

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 张海涛 于辉

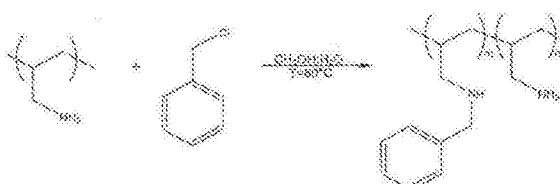
权利要求书1页 说明书45页 附图14页

(54)发明名称

用于纯化生物分子的刺激响应性聚合物

(57)摘要

本发明涉及用于纯化生物分子的刺激响应性聚合物，所述刺激响应性聚合物是可溶性刺激响应性聚合物，其选自由含烯丙基胺的聚合物和共聚物、及苄基改性的含烯丙基胺的聚合物和共聚物组成的组，其中该聚合物在加入刺激时能够结合和沉淀样品中所关注的生物分子。本发明还提供了使用该聚合物使样品中的目标分子与一种或多种杂质分开的方法，其包括以下步骤：(a)提供包含目标分子和一种或多种杂质的样品；(b)将该样品与权利要求1的可溶性刺激响应性聚合物接触，由此形成聚合物和一种或多种杂质的络合物；和(c)在该样品中加入刺激，由此从溶液中沉淀出该络合物，由此使目标分子与一种或多种杂质分开。



本发明涉及用于纯化生物分子的刺激响应性聚合物，其选自由含烯丙基胺的聚合物和共聚物、及苄基改性的含烯丙基胺的聚合物和共聚物组成的组，其中该聚合物在加入刺激时能够结合和沉淀样品中所关注的生物分子。本发明还提供了使用该聚合物使样品中的目标分子与一种或多种杂质分开的方法，其包括以下步骤：(a)提供包含目标分子和一种或多种杂质的样品；(b)将该样品与权利要求1的可溶性刺激响应性聚合物接触，由此形成聚合物和一种或多种杂质的络合物；和(c)在该样品中加入刺激，由此从溶液中沉淀出该络合物，由此使目标分子与一种或多种杂质分开。

1. 一种可溶性刺激响应性聚合物，其选自由含烯丙基胺的聚合物和共聚物、及苯基改性的含烯丙基胺的聚合物和共聚物组成的组，其中该聚合物在加入刺激时能够结合和沉淀样品中所关注的生物分子。
2. 权利要求1的刺激响应性聚合物，其中该所关注的生物分子是治疗性多肽。
3. 权利要求1的刺激响应性聚合物，其中该所关注的生物分子是与治疗性多肽一起存在于样品中的杂质。
4. 权利要求3的刺激响应性聚合物，其中该杂质选自宿主细胞蛋白质、内毒素、DNA、RNA、病毒、脂质、全细胞和细胞碎片。
5. 权利要求1的刺激响应性聚合物，其中该刺激是多价离子。
6. 权利要求5的刺激响应性聚合物，其中该多价离子是磷酸根或者柠檬酸根。
7. 权利要求3的刺激响应性聚合物，其中该治疗性多肽是抗体。
8. 权利要求7的刺激响应性聚合物，其中该抗体是单克隆抗体。
9. 一种使样品中的目标分子与一种或多种杂质分开的方法，其中该方法包括以下步骤：
 - (a) 提供包含目标分子和一种或多种杂质的样品；
 - (b) 将该样品与权利要求1的可溶性刺激响应性聚合物接触，由此形成聚合物和一种或多种杂质的络合物；和
 - (c) 在该样品中加入刺激，由此从溶液中沉淀出该络合物，
由此使目标分子与一种或多种杂质分开。
10. 权利要求9的方法，其中该方法进一步包含一个或多个过滤步骤。
11. 权利要求9的方法，其中该方法进一步包含一个或多个色谱法步骤。
12. 权利要求9的方法，其中该刺激是多价离子。
13. 权利要求12的方法，其中该多价离子是磷酸根或者柠檬酸根。

用于纯化生物分子的刺激响应性聚合物

[0001] 本申请是中国专利申请号为201180024500.3申请日为2011年5月16日的中国专利申请的分案申请。

[0002] 优先权数据

[0003] 本申请要求2010年5月17日申请的美国临时专利申请No.61/395769的优先权权益,其全部内容在此通过引用并入。

发明领域

[0004] 本发明涉及用于蛋白质纯化的聚合物。特别的,本发明至少部分地涉及刺激响应性聚合物,其用于从含有目标分子和一种或多种杂质的样品中纯化目标分子。

[0005] 发明背景

[0006] 有效的和经济的大规模纯化生物分子例如诸如治疗性蛋白质(包括抗体)是生物工艺学和医药工业上日益重要的方面。通常,该纯化方法是相当精细和昂贵的,并且包括许多不同的步骤。例如典型地在蛋白质的情况下,蛋白质是使用细胞培养物方法来生产的,例如使用哺乳动物的或者细菌的细胞系,其通过插入含有基因(其编码所述的蛋白质)的重组细胞质体来工程化,生产所关注的蛋白质。通常,在目标蛋白质表达之后,将它与一种或多种不期望的组分(包括例如宿主细胞蛋白质、培养基副产物和DNA)分开成为艰难的挑战。当该治疗性蛋白质打算用于人类中,并且必须经过美国食品药品管理局(FDA)批准时,这样的分离是特别重要的。

[0007] 通常,目前用于蛋白质的分离和/或纯化方法包括至少下面的步骤:通过溶胞作用来回收细胞内的蛋白质或者在分泌型蛋白质的情况下从培养基中回收蛋白质;使用差速离心法或者过滤法来除去细胞和细胞碎片,来获得含有所关注的蛋白质的纯化样品;和在多步方法中使用多种色谱介质来将样品中所关注的蛋白质与不同杂质分开。

[0008] 已经将不同类型的聚合物(包括聚电解质)用于一个或多个步骤中来纯化生物分子,特别是蛋白质。例如在絮凝化中使用聚电解质来纯化蛋白质是公知的(参见例如国际PCT专利申请No.WO2008/091740)。这可以用广泛的聚合物来完成,并且唯一所需的一般特性是该聚合物必须具有与所关注的物质(例如目标分子或者杂质)一定程度的相互作用。最普通的方法是使用含有离子物质的聚合物例如聚电解质。通常,将聚电解质加入到蛋白质混合物中,并且经由该混合物的一种或多种组分的选择性絮凝化来实现纯化。这种方案的一个关键的缺点是必须加入仔细控制量的聚电解质来避免残余聚合物污染(例如当聚合物的量过高时)或者避免无效的絮凝化(例如当聚合物的量过低时)。因为离子交换和其他的带电荷的色谱法介质通常用于蛋白质的纯化中,因此残余聚电解质会潜在地结合下游的纯化步骤中所用的介质,由此污染所述方法和使得所述方法变得复杂。

[0009] 最近,已经开发了这样的工艺,其克服了与使用聚合物来纯化生物分子有关的一些挑战(参见例如国际PCT公开No.WO2008/079302A2)。例如已经开发了刺激响应性或者“刺激性(Smart)”聚合物,其能够结合到可溶性(例如宿主细胞蛋白质、DNA、细胞培养物添加剂)以及不溶性(例如细胞和细胞碎片)组分二者上(参见例如美国公开No.20080255027和

20090036651)。虽然刺激响应性聚合物表现出通常更大的前景,但是面对广泛使用这样的聚合物的一个关键的挑战是存在着可以在从实验室规模到大生产规模的不同规模来实施的简单刺激。

发明内容

[0010] 本发明提供新的基于聚电解质的刺激响应性聚合物,其易于升级,并且在宽的pH和传导率范围内进行,由此使得它们能够用于纯化广泛的生物分子,包括例如治疗性蛋白质。

[0011] 在本发明的一些实施方案中,提供了一种刺激响应性聚合物,其包含聚电解质主链,该主链包含一个或多个疏水性基团,其中在加入刺激之后,该聚合物能够结合和沉淀样品中所关注的生物分子。

[0012] 在一些实施方案中,本发明聚合物的聚电解质主链包含至少两个单体单元或者至少三个单体单元。在一些实施方案中,至少50%的该单体单元包含电荷。在其他实施方案中,该聚电解质主链的每个单体单元包含电荷。

[0013] 在一些实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物包含聚胺主链。在一些实施方案中,一个或多个疏水性基团是苯基。

[0014] 本发明的刺激响应性聚合物能用于纯化期望的目标分子,并且通过将期望的目标分子与该期望的目标分子一起存在于样品中的一种或多种不期望的物质分开来进行这样的纯化。

[0015] 因此,在一些实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物结合和沉淀了所关注的生物分子,其本身是通过该刺激响应性聚合物结合和沉淀的所期望的目标分子。在其他实施方案中,刺激响应性聚合物结合和沉淀了所关注的生物分子,其是与所期望的目标分子一起存在于样品中的不期望的物质。

[0016] 在一些实施方案中,该所关注的生物分子是治疗性多肽(即,所期望的目标分子)。在一些实施方案中,该治疗性多肽是抗体(例如单克隆抗体)。

[0017] 在其他实施方案中,该所关注的生物分子选自宿主细胞蛋白质、DNA、RNA、脂质、病毒、内毒素、细胞培养物添加剂、全细胞和细胞碎片。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的聚合物对刺激是响应性的,该刺激是形成络合物的盐。

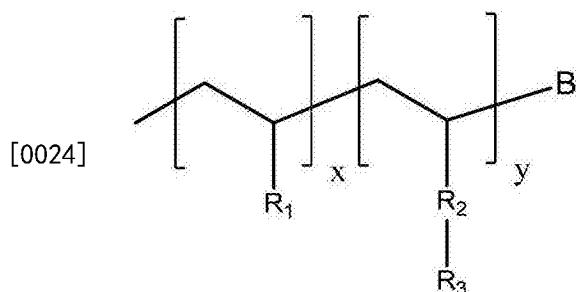
[0019] 本发明还包括使用此处所述的聚合物的方法。该刺激响应性聚合物相对于现有技术所述的聚合物是独特的和具有创造性的,表现在它们代替或者改进了纯化方法中的一个或多个步骤,由此明显提高了从一种或多种不期望的物质纯化或者分离的所期望的目标分子的整体纯度。

[0020] 因此,在一些实施方案中,提供了一种提高目标分子纯度的方法,其中该方法包含步骤:(a)提供包含目标分子和一种或多种杂质的样品;(b)将该样品与包含聚电解质主链(其包含一个或多个连接到主链上的疏水性基团)的刺激响应性聚合物在适于该聚合物结合溶液中的目标分子的第一组条件下接触,由此来形成聚合物和目标分子的络合物;和(c)在适于将络合物从溶液中沉淀出来的第二组条件下在该样品中加入刺激,其中该络合物的沉淀导致了目标分子与一种或多种杂质的分离,由此提高了目标分子的纯度。

[0021] 在本发明方法的一些实施方案中,该方法进一步包含从络合物中回收目标分子的步骤。

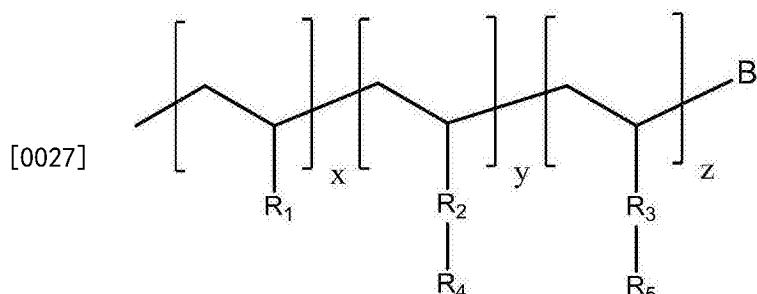
[0022] 在另外一种实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物结合和沉淀了一种或多种杂质,而非目标分子,其中该聚合物和一种或多种杂质的络合物的沉淀导致了目标分子与一种或多种杂质的分离,由此提高了该目标分子的纯度。因此,这样的方法包含步骤:(a)提供包含目标分子和一种或多种杂质的样品;(b)将该样品与包含聚电解质主链(其包含连接到主链上的一个或多个疏水性基团)的刺激响应性聚合物在适于将该聚合物结合到一种或多种杂质上的第一组条件下接触,由此来形成聚合物和一种或多种杂质的络合物;和(c)在适于沉淀该络合物的第二组条件下将刺激加入该样品,其中该络合物的沉淀导致了目标分子与一种或多种杂质的分离,由此提高了目标分子的纯度。

[0023] 在一些实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物包含下面的结构:



[0025] 其中x和y代表该聚合物的单体单元;R₁和R₂是带电荷基团,其形成了该聚电解质主链(B)的一部分;和R₃是连接到主链的带电荷基团上的疏水性基团。y单体单元(即,具有连接到主链上的疏水性基团)与单体单元总数(即,x和y单体单元总和)的比率代表了该聚合物的“疏水性改性百分率”。

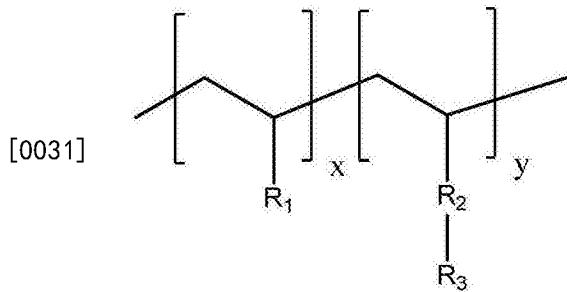
[0026] 在一些实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物包含下面的结构:



[0028] 其中x、y和z是该聚合物的单体单元;R₁、R₂和R₃是带电荷基团,其形成了该聚电解质主链(B)的一部分;R₄是连接到主链的带电荷基团上的疏水性基团;和R₅是连接到主链的带电荷基团上的官能团。y单体单元(即,具有连接到主链上的疏水性基团)与聚合物中单体单元的总数(即,x、y和z单体单元总和)的数目的比率代表了该聚合物的“疏水性改性百分率”。此外,z单体单元(即,具有连接到主链的带电荷基团上的官能团)与单体单元的总数(即,x、y和z单元总和)的数目的比率代表了该聚合物的“官能团改性百分率”。

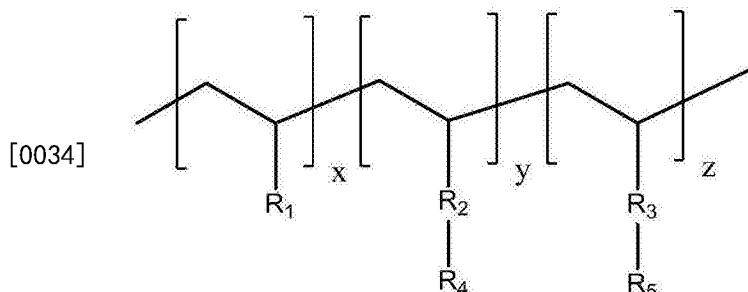
[0029] 通常,应当理解本发明所包括的聚合物可以具有“n”数目的这里所述的任意单体单元x、y或者z,这里n等于或者大于2。

[0030] 在仍然的其他实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物包含下面的结构:



[0032] 其中x和y代表单体单元;R₁、R₂是脂肪族胺基(例如伯胺或者仲胺和/或芳族胺),其形成了聚电解质的含碳主链的一部分;和R₃是连接到胺基R₂上的疏水性基团,并且包含4个或者更多个碳原子(例如烷基、烯基、芳烯基或者氟碳基团)。在一些实施方案中,y(即,具有连接到该聚电解质主链的带电荷基团上的疏水性基团的单体单元)与x(即,该聚电解质主链的未改性的带电荷基团)的比率是0.01–0.75或者0.05–0.75。因此,疏水性基团改性百分率将是总聚电解质单体单元(即,x+y)的1%–75%或者5%–75%。

[0033] 在仍然的其他实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物包含下面的结构:



[0035] 其中R₁、R₂和R₃是脂肪族胺基团,其形成了含碳聚电解质主链的一部分(例如伯胺或者仲胺和/或芳族胺);和R₄是含有4个或者更多个碳原子的疏水性基团,并且选自烯基、芳烷基和芳烯基;和R₅是含有4或者多于4个碳原子的疏水性基团,并且选自烷基或者氟碳基团。y单体单元与聚电解质单体单元的总数的比率是0.01–0.75。z单体单元与聚电解质单体单元总数的比率是0.05–0.5或者0.01–0.5。因此,疏水性基团改性百分率是1%–75%或者5%–75%,和官能团改性百分率是1%–50%或者5%–50%。

[0036] 使用本发明的刺激响应性聚合物的另外的方法包括这样的方法,其能够纯化目标分子或者所关注的产品(例如抗体),同时使残余聚合物在样品中的量最小。

[0037] 在一些实施方案中,提供了一种使用本发明的刺激响应性聚合物,将目标分子(例如抗体)与一种或多种杂质分开,同时使得聚合物的残余量最小的方法,其中该方法包含步骤:(a)提供包含目标分子和一种或多种杂质的样品;(b)将该样品与刺激响应性聚合物在适于将该聚合物结合到一种或多种杂质上的第一组条件下接触,由此来形成聚合物和一种或多种杂质的第一络合物;其中该第一组条件包含在加入该聚合物之前或者之后,调整样品的pH或者盐浓度;(c)在第二组条件下从样品中沉淀第一络合物;(d)将该样品与多价离子接触,由此来形成残余聚合物和多价离子的第二络合物;和(e)沉淀该第二络合物;和(f)从样品中回收目标分子;由此将样品中的目标分子与一种或多种杂质分开,同时降低残余聚合物在样品中的量。

[0038] 在一些实施方案中,该目标分子是抗体。在一种具体的实施方案中,该抗体是单克隆抗体。

[0039] 在一种具体的实施方案中,本发明不同的方法中回收目标分子的包含色谱法步骤。在另外一种实施方案中,回收目标分子包含过滤步骤。

[0040] 在一些实施方案中,本发明的方法可以包括使用本发明的刺激响应性聚合物的两个或者更多个步骤。例如可以使用刺激响应性聚合物来在纯化方法的一个步骤中沉淀一种或多种杂质,并且可以将相同的或者不同的聚合物用于在所述方法的不同步骤中沉淀目标分子或者期望的产品。

[0041] • 在一些实施方案中,该一种或多种杂质选自宿主细胞蛋白质、DNA、RNA、抗体聚集体、病毒、内毒素、全细胞、细胞碎片和细胞培养物添加剂。

附图说明

[0042] 图1是一个示意图,表示了聚烯丙基胺聚合物与苄基氯的反应。

[0043] 图2表示了己酸和叔丁基改性的聚烯丙基胺(HC-t-BuMPAA)的反应方案。

[0044] 图3是一个图,其表示了氯化钠对于多价离子刺激的作用和己酸和叔丁基改性的聚烯丙基胺(HC-t-BuMPAA)的pH响应性。X-轴表示pH,Y-轴表示离心机分离液(centrate)(即,离心机的输出物)的浊度。

[0045] 图4表示了实施例29所述的聚乙烯基胺的合成。

[0046] 图5表示了聚合后聚胺的脱保护反应(deprotection)。

[0047] 图6表示了聚乙烯基胺与苄基氯的反应。

[0048] 图7表示了用于形成多价离子刺激响应性共聚物的聚合和反应方案。

[0049] 图8表示了实施例35的改性的聚乙烯基胺(PVA)的NMR光谱。¹H NMR的积分显示苄基改性度是大约18%。

[0050] 图9表示了实施例36的改性的聚烯丙基胺的NMR光谱。¹H NMR的积分显示苄基改性度是大约33%。

[0051] 图10表示了一个图,其证实了非刺激响应性聚合物(例如壳聚糖)和刺激响应性聚合物(例如苄基改性的聚烯丙基胺)的聚合物剂量对于离心机分离液浊度的影响。X-轴是聚合物剂量(wt%),和Y-轴是离心机分离液浊度(NTU),如实施例37所述。

[0052] 图11表示了一个图,其证实了在存在和不存在用于苄基聚烯丙基胺刺激响应性聚合物的刺激时,聚合物剂量的影响。X-轴是聚合物剂量wt%,和Y-轴是离心机分离液浊度(NTU),如实施例38所述。

[0053] 图12表示了一种用于纯化生物分子的典型的方案。

[0054] 图13表示了一种纯化方案,其包括用于改进细胞培养物的纯化的刺激响应性聚合物。该刺激响应性聚合物除去了一种或多种杂质,但是,该聚合物不结合所期望的目标分子。

[0055] 图14表示了一种纯化方案,其包括用于改进细胞培养物的澄清过程的刺激响应性聚合物。该刺激响应性聚合物经由絮凝化来除去一种或多种杂质,但是,该聚合物不结合所期望的目标分子,并且通过在澄清后加入刺激来除去残余聚合物。

[0056] 图15表示了一种纯化方案,其包括用于改进细胞培养物的澄清过程的刺激响应性聚合物。该刺激响应性聚合物除去一种或多种杂质,但是,该聚合物不结合目标分子,并且在澄清后通过另外的吸附性过滤步骤,来除去残余聚合物。

具体实施方式

[0057] 本发明提供了至少一部分的新的和改进的刺激响应性聚合物，其包含用一个或多个疏水性基团改性的聚电解质主链，其中该聚合物的溶解度可以通过加入刺激来改变。

[0058] 此处所述的刺激响应性聚合物和使用其的方法比现有技术所述的这些更有效，其表现在它们提供了改进的pH范围，用于纯化期望的目标分子包括例如蛋白质，以及除去不期望的物质例如杂质，例如宿主细胞蛋白质、DNA、RNA、脂质、内毒素、细胞培养物添加剂、细胞和细胞碎片。在一些实施方案中，此处所述的聚合物对于低浓度的简单多价盐是响应性的，由此允许相对于现有的盐响应性聚合物来改进成规模性和降低传导率。在不同的实施方案中，本发明的聚合物能够有效地除去来自细胞培养基的全细胞、细胞碎片以及其他可溶性杂质。该聚合物也能够有效地除去含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的蛋白质混合物中的杂质。此外，此处所述的不同的聚合物能够有效地捕获样品中的目标分子和所关注的蛋白质/产物，由此将它们与样品中存在的一种或多种杂质分开，并且提高目标分子的纯度。

[0059] 本发明还包括使用广泛的条件，使用此处所述的聚合物来纯化目标分子例如治疗性蛋白质的方法。

[0060] 不希望受限于理论，可以预期的是此处所述的刺激响应性聚合物能够用于结合和沉淀期望的目标分子例如治疗性蛋白质、或者所期望的产物、或者不期望的物质例如一种或多种杂质，包括例如宿主细胞蛋白质、DNA、RNA、脂质、内毒素、细胞培养物添加剂、全细胞和细胞碎片。通常，被本发明的聚合物所结合的分子称作所关注的生物分子，而不管它是期望的目标分子还是不期望的物质。

[0061] 如此处所述，对于打算使用的具体的刺激响应性聚合物的选择是基于该聚合物打算结合什么来确定的。例如在所关注的生物分子的情况下（其在高于它的pI的pH时具有净负电荷（例如全细胞、细胞碎片、DNA、内毒素和蛋白质）），期望的是使用包含聚电解质主链的刺激响应性聚合物，其是阳离子的（即，带正电荷）。另一方面，在所关注的生物分子（其在低于它的pI的pH时具有净正电荷（例如蛋白质）的情况下，期望的是使用包含聚电解质主链的刺激响应性聚合物，其是阴离子的（即，带负电荷）。

[0062] 在纯化方法过程中所用的条件下正电荷是聚合物所固有的，或者正电荷能够用pH的改变来产生，所述的改变为该刺激响应性聚合物赋予了电荷。

[0063] 影响生物分子的整体回收率的一种重要的参数是该聚电解质主链中疏水性改性基团与其余未改性的带电荷基团的比率。例如，随着疏水性基团百分比的增加，通过非特异性相互作用所形成的生物分子的损失也增加。所以，对于给定的生物分子来说，可以使用带电荷基团与疏水性基团的特定比率来使得生物分子回收率最大。另外，高的疏水性基团百分比能够限制聚合物的溶解度和带电荷基团在该聚电解质主链上的效力。

[0064] 此外，该聚电解质聚烯丙基胺主链中的带电荷胺基用苄基氯的改性，产生了仲胺，其在广泛的pH系列条件下是带电荷的。但是，这样的苄基改性增加了对于胺基的空间体积，这会影响电荷-电荷的相互作用。另外，在聚电解质主链中用疏水性基团改性带电荷基团会导致带电荷基团数目的减少。例如，聚烯丙基胺的胺基用苄基氯的改性导致形成了酰胺连接，其不是带电荷基团，由此导致主链中带电荷基团数目的减少。因此，带电荷基团数目的

减少还会影响聚合物的溶解度以及聚合物通过电荷-电荷相互作用来结合的能力。

[0065] 当本发明的某些聚合物是阳离子的和其他是阴离子的时,还会合成杂化的聚合物,其包含聚电解质主链,该主链是阳离子的,并且用一种或多种疏水性以及阴离子基团进行了改性。在这样的杂化聚合物的情况下,阳离子聚电解质上未改性的基团对于形成络合物的盐是响应性的,而主链上的阴离子改性基团可以结合所关注的具有净正电荷的生物分子。因此,该聚电解质主链中的未改性的阳离子基团与阴离子和疏水性基团的比率对于确定该聚合物络合和捕获所关注的生物分子的必需的溶解度和刺激来说是重要的。例如,该聚电解质主链上过少的未改性的阳离子基团会导致对刺激有限的到没有的响应。而相反,过少的阴离子基团会限制捕获所关注的生物分子的能力。

[0066] 疏水性基团改性聚电解质主链所必需的量以及所用的刺激的类型和量可以基于使用聚合物纯化的所关注的生物分子以及所用的条件,和该聚合物主链固有的溶解度和分子量来确定。例如为了使得刺激例如多价盐的用量最小,令人期望的是具有连接到该聚电解质主链上更多的疏水性基团。可选择的,提高多价离子刺激的量降低了所需的疏水性改性度或者疏水性改性百分比。在一些情况下,例如如果该多价离子刺激处于非常高的浓度,可以完全消除对于疏水性改性的需要。可选择的,提高聚合物分子量降低了聚电解质主链的固有溶解度,并且会允许低的(5%或者更低的)聚电解质疏水性改性或者不进行聚电解质疏水性改性。但是,疏水性改性的取消能够提高在高的聚合物剂量时,对于低分子量或者更大溶解性聚合物主链的残余聚合物量。

[0067] 在不同的实施方案中,聚电解质主链上的疏水性改性度是1%-85%或者5%-50%。因此,取决于刺激响应性聚合物结合的所关注的生物分子,疏水性改性百分率是至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或者85%。

[0068] 在一些实施方案中,使用形成络合物的盐作为刺激。在不同的实施方案中,形成络合物的盐的浓度是2mM-500mM,或者25mM-100mM。示例性的形成络合物的盐包括但不限于多价离子例如诸如柠檬酸盐、磷酸盐、硫酸盐和EDTA,和离子相关性盐例如高氯酸盐、十二烷基硫酸钠盐、十二烷基苯硫酸盐、Fe(II)-4-氯-2-硝基酚阴离子、四苯基硼酸钠盐和六硝基二酚胺(参见例如ANALYTICAL SCIENCES,1987年12月,第3卷第479页)。通常,本领域技术人员熟悉众多的形成络合物的盐,其是现有技术中已知的,并且可以用作此处所述的聚合物的刺激。

[0069] 用于引起沉淀所需的形成络合物的盐的量取决于因素例如诸如pH、聚合物浓度和所关注的生物分子在样品中的浓度。例如,一些聚电解质例如聚烯丙基胺具有随着pH变化的电荷密度(胺质子化的程度)。随着pH的增加,电荷密度水平降低,这样引起沉淀所需的刺激程度将不同于在较低pH或者较高的电荷密度状态时的程度。

[0070] 通常,本发明的刺激响应性聚合物可以加入到含有目标分子的给料(feedstock)或者含有目标分子的样品中,其是固体形式或者液体形式。最终的聚合物浓度通常是0.01%-2%。在这里所述的一些方法中,产生聚合物和所关注的生物分子的混合物,随后加入刺激例如形成络合物的盐例如多价阴离子。刺激的量可以取决于聚合物浓度。例如2%的聚合物浓度将需要更高量的刺激来引起聚合物沉淀。重要的是将该刺激以恰当的或者稍过量的量来施用,目的是确保通过该刺激的响应来进行聚合物的完全沉淀。这与聚合物絮凝

化形成了对比，其中过高的给料量导致了有问题的残余聚合物。

[0071] 本发明可以用于多种纯化方案中。该刺激响应性聚合物可以在所述方法的任何步骤使用，虽然优选的使用是在纯化过程中或者捕获目标分子过程中，在所述方法开始时使用。单一的刺激响应性聚合物或者聚合物的混合物可以在一个或多个步骤中加入，随后使用一种或多种刺激来沉淀。该刺激可以在聚合物与该所关注的生物分子(即，一种或多种杂质或者期望的目标分子)结合之前、之中或者之后施用。同样，该刺激可以在除去沉淀物(其通常是固体形式)之前、之中或者之后施加。沉淀物随后可以使用现有技术已知的一种或多种技术和/或这里所述的这些例如过滤、沉降、离心分离或者任何其他的固/液分离方法或者同时的、平行的或者连续分离方案的方法的组合来除去。

[0072] 该刺激响应性聚合物的加入可以通过几种方式来完成。在加入刺激响应性聚合物之前，可以将细胞培养基调整到期望的条件，例如调整(例如降低)pH和/或传导率。该刺激响应性聚合物然后可以加入到细胞培养基中，并且混合。该刺激响应性聚合物可以以液体或者固体形式加入。含有聚合物的溶液本身可以正确的配制，以使得它将细胞培养基的pH调整为期望的条件。例如，该刺激响应性聚合物可以溶解在浓乙酸溶液中。这种乙酸溶液的浓度可以基于体积、发酵溶液条件和蛋白质浓度来改变，目的是通过加入该刺激响应性聚合物来提供所必需的pH调整，由此产生期望的聚合物浓度和溶液pH。该刺激响应性聚合物可以以发生自发絮凝化的浓度加入，典型的浓度是0.01-0.1%wt聚合物或者0.01-0.5%wt聚合物，这取决于类型和固体百分比，从而所述溶液变得雾浊并且开始形成沉淀物。可选择的，该刺激响应性聚合物可以以不发生自发絮凝化但是发生聚合物-生物分子的结合的浓度加入，例如典型的浓度是0.5%-2%wt聚合物，并且该溶液可以比初始时的溶液透明或者稍雾浊或者更混浊。同样，该刺激响应性聚合物可以以发生混合物的自发絮凝化和聚合物-生物分子的结合的浓度加入。

[0073] 虽然在纯化方案中使用刺激是更令人期望的，因为它缓解了与聚合物过量给料相关的一些问题例如在絮凝化方法中的问题，但是可以预期的是这里所述的聚合物也可以用作絮凝剂。

[0074] 在一种示例性的纯化方案中，在发酵完成之后将本发明的刺激响应性聚合物加入到细胞培养物中，并且将聚合物配制来结合不是期望的目标分子的所关注的生物分子。在这样的方法中，将刺激响应性聚合物在第一组条件下加入到细胞培养物中，该条件例如可以在结合所关注的生物分子的聚合物的加入之前、之中或者之后进行调整的条件。在该刺激响应性聚合物在第一组条件下加入之后，将刺激在第二组条件下加入，由此产生包含所关注的生物分子(例如一种或多种杂质例如细胞、细胞碎片、宿主细胞蛋白质、DNA、内毒素和病毒)的沉淀物。该固体沉淀物随后可以通过离心分离和/或过滤除去，由此产生澄清过的细胞培养液。所形成的澄清的细胞培养液随后可以通过使用色谱法介质的捕获步骤，来结合期望的目标分子。该目标分子随后可以从捕获步骤中洗脱。因此在一些情况下，通过使用能够在澄清步骤除去一种或多种杂质的本发明的刺激响应性聚合物，能够减少/消除或者改变另外的步骤的数量。

[0075] 在一些实施方案中，刺激响应性聚合物是在该聚合物结合并不是目标分子的所关注的生物分子的这样的条件下加入到细胞培养物中。在该刺激响应性聚合物在期望的溶液条件充分混合之后，形成包含所关注的生物分子的絮凝物。通过初级澄清除去含有所关注

的生物分子的固体。将所形成的细胞培养液收集，并且将刺激施用到沉淀的残余聚合物上。该沉淀的残余聚合物随后通过次级澄清除去。将所形成的澄清的细胞培养物溶液通过使用色谱法介质的捕获步骤来结合目标分子。可以在初级澄清之后的任何纯化步骤中通过刺激的添加来除去残余聚合物。同样，可以在任何步骤加入刺激来除去残余聚合物或者在整个方法中多次添加一种或多种刺激。

[0076] 在另外一种纯化方案中，在发酵完成后，将刺激响应性聚合物在适于聚合物结合一种或多种杂质的条件下加入到细胞培养液中，以使得该聚合物不结合目标分子。在该刺激响应性聚合物在期望的溶液条件下充分混合之后，加入刺激，其与一种或多种杂质形成固体沉淀物。该固体沉淀物通过离心分离和/或过滤除去。将所形成的澄清的细胞培养物溶液通过能够结合该刺激响应性聚合物的过滤器。本领域技术人员能够容易地选择/确定这样的能够结合该刺激响应性聚合物的过滤器。例如，可以提供这样的过滤器，其具有与其打算结合的所关注的生物分子类似的性能。可选择的，可以使用这样的过滤器，其具有与所关注的生物分子相同电荷的带电荷基团和与刺激响应性聚合物相反电荷的带电荷基团。

[0077] 膜、填料床或者过滤器也可以用于从溶液中除去聚合物。例如含有磺酸基团的阴离子膜可以用于除去聚胺刺激响应性聚合物。同样，可以使用具有与用于沉淀所述聚合物的刺激类似的结合性能的过滤器。如果该刺激是多价阴离子，则提供表面含有能够从溶液中除去该聚合物的多价阴离子的过滤器。例如，用聚乙烯基磷酸盐改性的膜能够以与能够络合聚胺的磷酸根离子非常相似的方式来结合聚胺，由此来引起沉淀。同样，可以使用用聚乙烯基磷酸盐改性的珠子（例如聚甲基丙烯酸酯）。在一些实施方案中，在使用能够除去该刺激响应性聚合物的过滤器对溶液进行过滤之后，将所形成的溶液通过使用色谱法介质的捕获步骤来结合目标生物分子。可以使用色谱法介质、深层过滤器或者其他多孔材料（其能够结合该刺激响应性聚合物）来除去聚合物。同样可以用吸附性装置在单个步骤或者大于一个或者多个步骤中除去该聚合物。此外，可以经由吸附性装置在该聚合物加入到混合物中之后的任何步骤中除去该聚合物。

[0078] 可以预期的是本发明能够用于此处所述的纯化方案的多种变化中。该刺激响应性聚合物可以用于取代或者增强澄清步骤和捕获步骤二者。例如，可以使用两种单独的刺激响应性聚合物；第一聚合物结合一种或多种杂质但是不结合目标分子，第二聚合物结合目标分子。这两种聚合物能够在分别的步骤或者单个步骤中使用。同样，可以使用单一聚合物，其具有能够结合目标分子的官能团和能够结合一种或多种杂质的聚电解质主链。该单一聚合物能够在单个步骤或者多个步骤中结合目标分子和一种或多种杂质。在若干个不同的沉淀/刺激添加或者清洗步骤之后，随后可以进行目标分子从该聚合物中的洗脱。该刺激响应性聚合物可以在捕获步骤之后加入并且用于澄清悬浮的固体和杂质（其是由病毒的灭活产生的），或者在捕获步骤之后的其他步骤之后加入。该刺激响应性聚合物还可以取代或者增强精制（polishing）步骤。

[0079] 在一些实施方案中，包括病毒灭活步骤（即，将溶液曝露于低pH、表面活性剂或者加热）。该溶液条件可以调整，并且将样品通过一系列的精制步骤（即，一种或多种的离子交换、疏水性相互作用、混合模式和其他）进行加工。该溶液然后可以经历一系列的过滤步骤，包括病毒过滤和超滤或者渗滤。

[0080] 为了更容易理解本发明，首先定义某些术语。另外的定义在整个详细的说明书中

阐述。

[0081] I. 定义

[0082] 作为此处互换使用的，术语“刺激”表示环境中的物理或者化学变化，其导致了本发明的刺激响应性聚合物的响应。因此，本发明提供新的聚合物，其对于刺激是响应性的，并且该刺激导致了该聚合物溶解度的变化。此处所述的一种或多种聚合物对其响应的刺激的例子包括但不限于例如温度变化、传导率变化和/或pH变化。在一些实施方案中，刺激包括将络合剂或者形成络合物的盐加入到样品中。在多种实施方案中，刺激通常是在聚合物加入到样品中之后加入的。虽然该刺激也可以在聚合物加入到样品之中或者之前加入。

[0083] 作为此处使用的术语“聚合物”指的是通过两个或者更多个单体单元共价连接所形成的分子。这些单体单元可以是合成的或者是自然存在的。通过重复单元所形成的该聚合物可以是直链的或者支化的。聚合物的例子包括但不限于聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯、聚烯丙基胺、聚乙烯醇、聚苯乙烯和共聚物（例如聚苯乙烯-共聚-聚吡啶，聚丙烯酸-共聚-甲基丙烯酸甲酯，普鲁诺尼克（pluronics）、PF68等）。在本发明的一些实施方案中，聚合物包含聚电解质主链。同样这里所述的是共聚物，其能够用于本发明的方法中，其中该共聚物是刺激响应性的。通常，应当理解在聚合物的情况下，单体单元是相同类型的，而共聚物通常具有不同类型的单体单元。

[0084] 作为此处使用的术语“刺激响应性聚合物”是聚合物或者共聚物，其在加入刺激之后表现出物理和/或化学变化的性能。典型的刺激响应是聚合物溶解度的变化。例如聚合物聚（N-异丙基丙烯酰胺）在温度低于35°C时是水溶性的，但是在大约35°C的温度时变成不溶于水的。在一种具体的实施方案中，刺激响应性聚合物是聚烯丙基胺或者聚乙烯基胺聚合物，其对于多价离子刺激（例如磷酸根刺激）是响应性的。

[0085] 作为此处使用的术语“聚电解质主链”指的是包含两个或者更多个单体单元的含碳聚合物，其中至少50%的单元、或者至少55%的单元、或者至少60%的单元、或者至少65%的单元、或者至少70%的单元、或者至少75%的单元、或者至少80%的单元、或者至少85%的单元、或者至少90%的单元、或者至少95%的单元，包含带电荷的官能性。换句话说，至少50%的单体单元包括带电荷基团，其形成了该单元的一部分。在一些实施方案中，这里所述的聚电解质主链包含至少两个或者更多个单体单元，其中每个单元包含带电荷的官能性。在聚合物的聚电解质主链的情况下，其中每个单体单元包含带电荷的官能性，这样的聚合物可以称作“连续聚电解质”。示例性聚电解质包括但不限于聚烯丙基胺、聚乙烯基胺、聚丙烯酸、聚乙烯亚胺、壳聚糖和聚乙烯基磷酸。还可以预期的是一种或多种物质（其不同于该单体单元）可以连接到聚电解质主链上。

[0086] 作为此处使用的术语“疏水性基团”指的是非极性物质或者化学基团，其对水的亲合性很低到没有。示例性的疏水性基团包括但不限于苯基、叔丁基、环烃、多环脂肪族烃、多环芳烃和短链烃例如己基和辛基。在一种具体的实施方案中，该疏水性基团是苯基。该疏水性基团也可以是非烃，并且包含杂原子例如氮、氧、硫、磷等。在本发明的各种实施方案中，提供了刺激响应性聚合物，其包含聚电解质主链，该主链具有连接到主链中的带电荷基团上的一个或多个疏水性基团。不希望受限于理论，应当理解连接到聚电解质主链上的疏水性基团的数目对于改变聚合物溶解度由此提高该聚合物的刺激响应性是重要的。但是，不期望的是具有许多疏水性基团，其在没有刺激时赋予了该聚合物水不溶性。

[0087] 带电荷基团在聚电解质主链(其是用疏水性基团改性的)中的百分率通常称作该聚合物的“疏水性改性百分率”。因此在各种实施方案中,疏水性改性百分率是重要的,并且是1%-85%或者5%-85%。因此疏水性改性百分率可以是至少1%、或者至少2%、或者至少3%、或者至少4%、或者至少5%、或者至少6%、或者至少7%、或者至少8%、或者至少9%、或者至少10%、或者至少15%、或者至少20%、或者至少25%、或者至少30%、或者至少35%、或者至少40%、或者至少45%、或者至少50%、或者至少55%、或者至少60%、或者至少65%、或者至少70%、或者至少75%、或者至少80%、或者至少85%。

[0088] 作为此处使用的术语“疏水性改性百分率”通常指的是未改性的聚电解质带电荷基团与疏水性基团改性的聚电解质带电荷基团的比率,作为总聚电解质单体单元在聚电解质聚合物主链中的百分率。

[0089] 在一些实施方案中,连接到聚电解质主链上的疏水性基团进一步具有连接到疏水性基团上的带电荷基团,其是明显不同于主链中的带电荷基团的物质。

[0090] 作为此处使用的术语“烷基”通常指的是直链或者支化的烃链。直链或者支化链烃链指的是任何取代的或者未取代的包含非成环碳的化合物,包括例如烷烃、烯烃和炔烃。烷基的例子包括低级烷基例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基或者异己基;高级烷基例如正庚基、正辛基、异辛基、壬基、癸基等;低级烯基例如乙烯基、丙烯基、丙炔基、丁烯基、丁二烯基、戊烯基、正己烯基或者异己烯基;和高级烯基例如正庚烯基、正辛烯基、异辛烯基、壬烯基、癸烯基等。本领域技术人员熟悉众多的直链(即,支化的)以及支化的烷基,其包括在本发明中。

[0091] 另外,这样的烷基还可以包含不同的取代基,其中一个或多个氢原子被官能团所替代。官能团的例子包括但不限于羧酸基、磺酸基、磷酸基等。作为此处使用的术语“烯基”指的是直链或者支化的烃链,其中至少一个碳-碳连接是碳-碳双键。

[0092] 作为此处使用的术语“芳烷基”指的是端部被至少一种芳基取代的烷基。

[0093] 作为此处使用的术语“芳基烯基”指的是端部被至少一种芳基取代的烯基。

[0094] 作为此处使用的术语“芳基”指的是带有共轭双键体系的烃环,经常包含至少六个n(pi)电子。芳基的例子包括但不限于苯基、萘基、甲氧苯基、甲苯甲酰基和二甲苯基。

[0095] 作为此处使用的术语“氟碳化合物”指的是直链或者支化的碳链,其中一个或多个氢原子被氟基团取代。直链或者支化链的氟碳化合物链通常指的是任何取代的或者未取代的含有非环碳的化合物,包括例如烷烃、烯烃和炔烃。烷基的例子包括低级烷基例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基或者异己基;高级烷基例如正庚基、正辛基、异辛基、壬基、癸基等;低级烯基例如乙烯基、丙烯基、丙炔基、丁烯基、丁二烯基、戊烯基、正己烯基或者异己烯基;和高级烯基例如正庚烯基、正辛烯基、异辛烯基、壬烯基、癸烯基等。通常应当理解本领域技术人员熟悉众多的直链(即,直链的)以及支化的烷基,其处于本发明的范围内。另外,这样的烷基还可以包含多种取代基,其中一个或多个氢或者一个或者多个氟原子被官能团所替代。官能团的例子包括但不限于羧酸基、磺酸基、磷酸基等。

[0096] 作为此处使用的术语“官能团”是为此处所述的聚合物赋予另外的官能性的基团。换句话说,官能团是这样的基团,其不同于疏水性基团,并且还连接到该聚电解质主链上例如连接到主链的带电荷基团上。例如在一些实施方案中,官能团可以是用于改变该聚合物的结合性能的配体,例如是羧酸、磺酸、硫酸盐、伯胺、季胺和二乙基氨基。该官能团还可以

改变聚合物的性能或者提供另外的期望的性能,例如诸如改变刺激响应性或者使得该聚合物响应第二刺激。用于改变刺激响应行为的示例性官能团包括但不限于羧酸基团(pH响应性)、吡啶基团(pH响应性)和N-异丙基丙烯酰胺基团(温度响应)。

[0097] 作为此处使用的术语“配体”通常指的是提供了与另外一种物质的特异性结合能力的物质。“配体”的例子包括但不限于离子交换基团、生物亲合性或者生物特异性基团、疏水性基团、嗜硫性相互作用基团、螯合物或者螯合基团、与目标化合物具有所谓的pi-pi相互作用的基团、氢键合基团和亲水性基团。

[0098] 作为此处使用的术语“絮凝化”指的是加入絮凝剂例如此处所述的聚合物到溶液中,来除去一种或多种悬浮的不溶性或者可溶性杂质。该聚合物必须以这样的浓度加入到该溶液中,即,该浓度允许自发形成不溶性聚集体,其可以经由典型的固-液分离方法从溶液中除去。

[0099] 作为此处使用的术语“组合物”、“溶液”或者“样品”指的是打算用此处所述的一种或多种刺激响应性聚合物进行纯化的目标分子或者期望的产物以及一种或多种不期望的物质或者杂质的混合物。在一些实施方案中,该样品包含其中分泌有目标分子或者期望的产物的给料或者细胞培养基。在一些实施方案中,该样品包含目标分子(例如治疗性蛋白质或者抗体)以及一种或多种杂质(例如宿主细胞蛋白质、DNA、RNA、脂质、细胞培养物添加剂、细胞和细胞碎片)。在一些实施方案中,该样品包含所关注的目标分子,其分泌在细胞培养基中。在一些实施方案中,打算用此处所述的一种或多种刺激响应性聚合物来从其中纯化目标分子的样品在该样品与刺激响应性聚合物接触之前是“部分纯化的”。部分纯化可以例如通过使得该样品进行一个或多个纯化步骤例如诸如一个或多个非亲合性色谱法步骤来完成。该目标分子可以从一种或多种不期望的物质或者杂质中通过沉淀该一种或多种杂质或者通过沉淀该目标分子来分离。

[0100] 在一些实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物在第一组条件下结合了所关注的生物分子,其本身是目标分子或者产物(例如目标蛋白质或者多肽),并且在第二组条件下沉淀该目标分子,例如通过加入刺激到该样品中来沉淀。在其他实施方案中,所关注的生物分子是非目标分子的分子。换句话说,通过此处所述的刺激响应性聚合物结合的所关注的生物分子可以是这样的分子,其不期望来与样品中的目标分子相结合。不希望受限于理论,可以预期在一些实施方案中,本发明的刺激响应性聚合物在加入刺激时结合和沉淀宿主细胞蛋白质、DNA、全细胞、细胞碎片、病毒、内毒素和/或细胞培养物添加剂中的一种或多种。因此目标分子(例如目标蛋白质或者多肽)能够使用此处所述的聚合物,通过沉淀期望的目标分子或者通过沉淀一种或多种不期望的物质(例如一种或多种杂质)来纯化,所述的杂质可以存在于含有期望的目标分子的样品中。

[0101] 作为此处使用的术语“沉淀”、“沉淀性”或者“沉淀”指的是结合的(例如与所关注的生物分子络合)或者未结合的聚合物从含水的和/或溶解状态变成不含水的和/或不溶性的状态。

[0102] 作为此处使用的术语“所关注的生物分子”指的是通过此处所述的刺激响应性聚合物来结合和沉淀的任何分子。例如,该所关注的生物分子可以是期望的目标分子例如诸如期望的产物或者多肽(例如抗体),或者它可以是不期望的物质,其需要从含有期望的目标分子的样品中除去。这样的不期望的物质包括但不限于例如选自宿主细胞蛋白质、DNA、

RNA、蛋白质聚集体、细胞培养物添加剂、病毒、内毒素、全细胞和细胞碎片中的一种或多种杂质。

[0103] 作为此处互换使用的，术语“目标分子”、“目标生物分子”、“期望的目标分子”和“期望的目标生物分子”通常指的是所关注的多肽或者产物，期望的是将其从一种或多种不期望的物质例如一种或多种杂质(其可以存在于含有所关注的多肽或者产物的样品中)中分离或纯化。作为此处互换使用的术语“所关注的蛋白质”、“目标多肽”、“所关注的多肽”和“目标蛋白质”通常指的是治疗性蛋白质或者多肽，包括但不限于打算用本发明的刺激响应性聚合物进行纯化的抗体。

[0104] 作为此处互换使用的术语“多肽”或者“蛋白质”通常指的是具有大于大约10个氨基酸的肽和蛋白质。在一些实施方案中，此处所述的刺激响应性聚合物被用于从与蛋白质或者多肽一起存在于样品中将一种或多种不期望的物质与该蛋白质或者多肽分开。在一些实施方案中，该一种或多种物质是一种或多种杂质，其能够与待纯化的蛋白质或者多肽一起存在于样品中。如上所述，在一些实施方案中，通过向样品添加刺激，此处所述的刺激响应性聚合物特异性结合和沉淀了所关注的蛋白质或者多肽。在其他实施方案中，通过加入刺激，此处所述的刺激响应性聚合物结合和沉淀了这样的物质，其不同于所关注的蛋白质或者多肽例如诸如宿主细胞蛋白质、DNA、病毒、全细胞、细胞碎片和细胞培养物添加剂。

[0105] 在一些实施方案中，打算用此处所述的刺激响应性聚合物来纯化的蛋白质或者多肽是哺乳动物蛋白质例如治疗性蛋白质或者能够用于治疗的蛋白质。示例性的蛋白质包括但不限于例如肾素；生长激素，包括人类生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；甲状腺激素；甲状腺刺激激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰岛素A-链；胰岛素B-链；胰岛素原；促卵泡激素；降血钙素；黄体化激素；胰高血糖素；凝血因子例如因子VIIIC、因子IX、组织因子、和von Willebrands因子；抗凝血因子例如蛋白质C；心钠素；肺表面活化剂；血浆酶原活化剂例如尿激酶或者人尿或者组织类型的血浆酶原活化剂(t-PA)；铃蟾肽；凝血酶；造血生长因子；瘤因子- α 和- β ；脑啡肽酶；RANTES(控制活化通常的T-细胞的表达和分泌)；人巨噬细胞发炎蛋白质(MIP-1- α)；血清蛋白例如人血清蛋白；Muellerian抑制性物质；松弛肽A-链；松弛肽B-链；prorelaxin；小鼠促性腺激素相关的肽；微生物蛋白质例如 β -内酰胺酶；脱氧核糖核酸酶；IgE；细胞毒素T-淋巴球相关的抗原(CTLA)，例如CTLA-4；抑制素；活化素；脉管内皮生长因子(VEGF)；激素或者生长因子的受体；蛋白质A或者D；类风湿因子；亲神经因子例如骨来源的亲神经因子(BDNF)，神经营养蛋白-3,-4,-5,或者-6(NT-3、NT-4、NT-5或者NT-6)，或者神经生长因子例如NGF- β ；血小板来源的生长因子(PDGF)；纤维原细胞生长因子例如 α -FGF和 β -FGF；表皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)例如TGF- α 和TGF- β ，包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF β 4或者TGF- β 5；胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)，胰岛素样生长因子结合蛋白质(IGFBP)；CD蛋白质例如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34和CD40；红细胞生成素；骨生长诱导因子；抗毒素；骨成形素蛋白质(BMP)；干扰素例如干扰素- α 、- β 和- γ ；菌群刺激因子(CSF)例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF；白细胞介素(IL)例如IL-1到IL-10；超氧化物歧化酶；T-细胞受体；表面膜蛋白质；衰变加速因子；病毒抗原(viral antigen)例如诸如一部分的AIDS包膜；转运蛋白；归巢受体；地址素；调节蛋白质；整联蛋白例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM；肿瘤相关的抗原例如HER2、HER3或者HER4受体；和任何上面所列出的多肽的碎片和/或变体。

[0106] 此外,在一些实施方案中,使用本发明的刺敏聚合物纯化的蛋白质或者多肽是抗体、其功能碎片或者变体。在一些实施方案中,所关注的蛋白质是重组细胞蛋白质,其含有免疫球蛋白的Fc区域。

[0107] 术语“免疫球蛋白”、“Ig”或者“抗体”(在此互换使用)指的是具有由两个重链和两个轻链组成的基本四个多肽链结构的蛋白质,所述的链是例如通过链间的二硫键来稳定的,其能够特异性结合抗原。术语“单链免疫球蛋白”或者“单链抗体”(在此互换使用)指的是具有由一个重链和一个轻链组成的两个多肽链结构的蛋白质,所述的链是例如通过链间的肽键来稳定的,其能够特异性结合抗原。术语“域”指的是含重链或者轻链多肽的球形区域,所述的多肽包含例如通过 β -折叠片和/或链间二硫键稳定的肽环(例如包含3-4个肽环)。域在此进一步称作“恒定的”或者“可变的”,其基于在“恒定”域的情况下在不同种类的成员的域中相对缺乏的顺序变化,或者在“可变”域的情况下在不同种类的成员的域中明显的变化。抗体或者多肽“域”经常在本领域中互换地称作抗体或者多肽“区域”。抗体轻链的“恒定”域被互换地称作“轻链恒定区域”、“轻链恒定域”、“CL”区域或者“CL”域。抗体重链的“恒定”域被互换地称作“重链恒定区域”、“重链恒定域”、“CH”区域或者“CH”域。抗体轻链的“可变”域被互换地称作“轻链可变区域”、“轻链可变域”、“VL”区域或者“VL”域。抗体重链的“可变”域被互换地称作“重链可变区域”、“重链可变域”、“VH”区域或者“VH”域。

[0108] 免疫球蛋白或者抗体可以是单克隆的或者多克隆的,并且可以以单体或者聚合物形式存在,例如以五聚体形式存在的IgM抗体和/或以单体、二聚体或者多聚体形式存在的IgA抗体。免疫球蛋白或者抗体还可以包括多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体碎片,只要它们保持或者改性来包含配体-特异性结合域就行。术语“碎片”指的是抗体或抗体链的一部分,其包含比完整的或者完全的抗体链更少的氨基酸。碎片可以经由完整的或者完全的抗体或抗体链的化学或者酶的处理来获得。碎片也可以通过重组细胞手段来获得。当重组细胞生产时,碎片可以单独表达或者作为称作融合蛋白质的更大的蛋白质的一部分来表达。示例性的碎片包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fc和/或Fv碎片。示例性的融合蛋白质包括Fc融合蛋白质。

[0109] 通常,免疫球蛋白或者抗体与所关注的“抗原”相关。优选,抗原是生物上重要的多肽,并且将抗体为遭受疾病或者紊乱的哺乳动物的给药会产生对于哺乳动物的治疗好处。但是,与非多肽抗原有关的抗体(例如肿瘤有关的糖脂质抗原;参见美国专利No.5091178)也是可以预期的。在抗原是多肽的情况下,它可以是跨膜分子(例如受体)或者配体例如生长因子。

[0110] 作为此处使用的术语“单克隆抗体”指的是获自基本同类抗体群的抗体,即,所述群中包含的单个抗体是相同的,除了少量可以存在的自然存在的变种。单克隆抗体是高度特异性的,涉及到单个抗原位置。此外,与常规的(多克隆)抗体制剂(其典型的包括涉及到不同的决定因子(抗原决定基)的不同的抗体)相反,每个单克隆抗体涉及到抗原上的单个决定因子。修饰词“单克隆”表示获自基本相同的抗体群的抗体的特性,并且不被解释为通过任何特别的方法所需的抗体的生产。例如,本发明所用的单克隆抗体可以通过Kohler等人,Nature 256:495 (1975)首先描述的杂种细胞来制造的,或者可以通过重组细胞DNA方法来制造(参见例如美国专利No.4816567)。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597 (1991)所述的技术来

从抗菌素抗体库中分离出来。

[0111] 单克隆抗体可以另外包括“嵌合型”抗体(免疫球蛋白),其中一部分的重和/或轻链是与来源于特定物质或者属于特定的抗体种类或者亚种的抗体中相应的序列相同的或者类似的,而其余的链是与来源于另外一种物质或者属于另外一种抗体种类或者亚种的抗体以及这样的抗体碎片中相应的序列相同的或者类似的,只要它们表现出期望的生物活性(美国专利No.4816567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0112] 当用于此处时,术语“高变区”指的是抗体的氨基酸残基,其是造成抗原结合的原因。该高变区包含氨基酸残基,其来自“互补决定区域”或者“CDR”(即,轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)和重链可变域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))和/或来自“高变环(hypervariable loop)”(即轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)和重链可变域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))的这些残基。“框架”或者“FR”残基是这些可变域残基,而非此处所定义的高变区残基。

[0113] “人类化”形式的非人类(例如鼠科)抗体是嵌合型抗体,其包含来自于非人类免疫球蛋白的最小序列。在极大地程度上,人类化抗体是人类免疫球蛋白(接受性抗体),其中受体的高变区残基被来自下面的具有期望的特异性、亲合性和能力的非人类物质(给体抗体)的高变区残基所代替:例如小鼠、大鼠、兔子或者非人类的灵长目动物。在某些情况中,人类免疫球蛋白的Fv框架区域(FR)残基被相应的非人类残基代替。此外,人类化抗体可以包含在受体抗体或者给体抗体中没有的残基。可以进行这些改性来进一步提高抗体性能。通常,该人类化抗体包含至少一种和典型的两种可变域中的基本上全部,其中全部的或者基本上全部的超变量环对应于非人类免疫球蛋白的这些,并且全部的或者基本上全部的FR区域是人类免疫球蛋白序列的这些。该人类化抗体任选地还将包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区域(Fc),典型的是人类免疫球蛋白。进一步的细节参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0114] 在一些实施方案中,使用本发明的刺激响应性聚合物进行分离或者纯化的抗体是治疗性抗体。示例性治疗性抗体包括例如赫赛汀(trastuzumab)(HERCEPTINTM,Genentech,Inc.,Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285-4289;美国专利No.5725856);抗-CD20抗体例如嵌合型抗-CD20“C2B8”(美国专利No.5736137);rituximab(RITUXANTM),ocrelizumab,一种2H7抗体的嵌合型或者人类化变体(美国专利No.5721108;W004/056312)或者tositumomab(BEXXAR.TM);抗-IL-8(St John等人(1993)Chest,103:932,和W095/23865);抗-VEGF抗体,包括人类化和/或亲合性成熟的抗-VEGF抗体例如人类化抗-VEGF抗体huA4.6.1bevacizumab(AVASTINTM,Genentech,Inc.,Kim等(1992)生长因子7:53-64,W096/30046,W098/45331);抗-PSCA抗体(W001/40309);抗-CD40抗体,包括S2C6及其人类化变体(W000/75348);抗-CD11a(美国专利No.5622700;W098/23761;Steppe等(1991)Transplant Intl.4:3-7;Hourmant等(1994)Transplantation 58:377-380);抗-IgE

(Presta等(1993)J. Immunol. 151: 2623-2632; WO95/19181); 抗-CD18(美国专利No. 5622700; WO97/26912); 抗-IgE, 包括E25、E26和E27(美国专利No. 5714338; 美国专利No. 5091313; WO93/04173; 美国No. 5714338); 抗-Apo-2受体抗体(WO98/51793); 抗-TNF- α 抗体, 包括cA2(REMICADETM), CDP571和MAK-195(美国专利No. 5672347; Lorenz等(1996)J. Immunol. 156 (4): 1646-1653; Dhainaut等(1995)Crit. Care Med. 23 (9): 1461-1469); 抗-Tissue Factor(TF)(EP0420937B1); 抗-人类 α 4 β 7整联蛋白(WO98/06248); 抗-EGFR, 嵌合的或者人类化225抗体(WO96/40210); 抗-CD3抗体例如OKT3(美国专利No. 4515893); 抗-CD25或者抗-tac抗体例如CHI-621SIMULECTTM和ZENAPAXTM(美国专利No. 5693762); 抗-CD4抗体例如cM-7412抗体(Choy等(1996)Arthritis Rheum 39 (1): 52-56); 抗-CD52抗体例如CAMPATH-1H(Riechmann等(1988)Nature 332: 323-337); 抗-Fc受体抗体例如M22抗体涉及到Fc γ RI如Graziano等(1995)J. Immunol. 155 (10): 4996-5002; 抗-癌胚抗原(CEA)抗体例如hMN-14(Sharkey等(1995)Cancer Res. 55 (23Suppl): 5935s-5945s; 涉及乳房表皮细胞的抗体, 包括huBrE-3, hu-Mc3和CHL6(Ceriani等(1995)Cancer Res. 55 (23): 5852s-5856s; 和Richman等(1995)Cancer Res. 55 (23Supp): 5916s-5920s); 结合到大肠癌细胞的抗体例如C242(Litton等(1996)Eur J. Immunol. 26 (1): 1-9); 抗-CD38抗体, 例如AT13/5(E11is等(1995)J. Immunol. 155 (2): 925-937); 抗-CD33抗体例如Hu M195(Jurcic等(1995)Cancer Res. 55 (23Suppl): 5908s-5910s和CMA-676或者CDP771; 抗-CD22抗体例如LL2或者LymphoCide(Juveid等(1995)Cancer Res. 55 (23Suppl): 5899s-5907s); 抗-EpCAM抗体例如17-1A(PANOREXTM); 抗-GpIIb/IIIa抗体例如abciximab或者c7E3Fab(REOPROTM); 抗-RSV抗体例如MEDI-493(SYNAGISTM); 抗-CMV抗体例如PROTOVIRTM); 抗-HIV抗体例如PRO542; 抗-肝炎抗体例如抗-Hep B抗体OSTAVIRTM; 抗-CA125抗体OvaRex; 抗-特应GD3抗原决定基抗体BEC2; 抗- α v β 3抗体VITAXINTM; 抗-人类肾脏细胞癌抗体例如ch-G250; ING-1; 抗-人类17-1A抗体(3622W94); 抗-人类结肠直肠肿瘤抗体(A33); 涉及到GD3神经节苷脂的抗-人类黑素瘤抗体R24; 抗-人类鳞片细胞癌(SF-25); 和抗-人类白细胞抗原(HLA)抗体例如Smart ID10和抗-HLA DR抗体Oncolym(Lym-1)。

[0115] 作为此处互换使用的术语“污染物”、“杂质”和“碎片”指的是任何外来的或者讨厌的材料, 包括生物大分子例如DNA、RNA、一种或多种宿主细胞蛋白质(HCP或者CHOP)、内毒素、病毒、脂质和一种或多种添加剂, 其可以存在于含有所关注的蛋白质或者多肽(例如抗体)的样品中, 所述蛋白质或者多肽打算用本发明的刺激响应性聚合物将其与一种或多种外来的或者讨厌的分子分离。在一些实施方案中, 此处所述的刺激响应性聚合物从含有所关注的蛋白质或者多肽和一种或多种杂质的样品中结合和沉淀了所关注的蛋白质或者多肽。在其他实施方案中, 此处所述的刺激响应性聚合物结合和沉淀了一种或多种杂质, 由此将所关注的多肽或者蛋白质与一种或多种杂质分开。

[0116] 作为此处互换使用的术语“中国鼠卵巢细胞蛋白质”和“CHOP”指的是来源于中国鼠卵巢(“CHO”)细胞培养物的宿主细胞蛋白质(“HCP”)的混合物。HCP或者CHOP通常作为杂质存在于细胞培养基或者溶胞产物中(例如含有所关注的蛋白质或者多肽(例如抗体或者在CHO细胞中表达的免疫粘附素)的收获的细胞培养液)。通常, CHOP在包含所关注的蛋白质的混合物中的存在量提供了对于所关注的蛋白质纯度的度量。典型地, CHOP在蛋白质混合物中的量是以相对于混合物中所关注的蛋白质量的每百万份的份数来表示的。

[0117] 应当理解这里宿主细胞是另外一种哺乳动物细胞类型,E.coli,酵母细胞,昆虫细胞或者植物细胞,HCP指的是在宿主细胞的溶胞产物中存在的非目标蛋白质的蛋白质。

[0118] 作为此处使用的术语“细胞培养物添加剂”指的是这样的分子(例如非蛋白质添加剂),其加入到细胞培养方法中来促进或者改进细胞培养或者发酵方法。在本发明的一些实施方案中,此处所述的刺激响应性聚合物结合和沉淀了一种或多种细胞培养物添加剂。示例性细胞培养物添加剂包括消泡剂、抗生素、染料和营养物。

[0119] 作为此处互换使用的术语“每百万份的份数”或者“ppm”指的是对于使用此处所述的刺激响应性聚合物进行了纯化的期望的目标分子(例如目标蛋白质或者抗体)纯度的量度。因此,这种量度可以用于测量在纯化方法之后所存在的目标分子的量或者用于测量不期望的物质的量。在一些实施方案中,单位“ppm”在此用于表示溶液中杂质,例如所关注的蛋白质(mg/ml)的HCP或者CHOP的量(单位是ng/ml)的(即,CHOP ppm=(CHOP ng/ml)/(所关注的蛋白质mg/ml))。当该蛋白质(例如通过冻干法)干燥时,ppm指的是(CHOP ng)/(所关注的蛋白质mg))。

[0120] 术语“分离”、“纯化”和“分离”在此互换用于使用此处所述的刺激响应性聚合物,从包含目标分子和一种或多种杂质的组合物或者样品中纯化目标分子(例如所关注的多肽或者蛋白质)的上下文中。在一些实施方案中,目标分子在样品中的纯度是通过使用此处所述的刺激响应性聚合物从样品中除去(完全或者部分)一种或多种杂质来提高的。在另外一种实施方案中,目标分子在样品中的纯度是通过将目标分子从样品的一种或多种杂质中沉淀出来而提高的。

[0121] 在一些实施方案中,纯化方法另外使用了一个或多个“色谱法步骤”。典型地,如果需要,这些步骤可以在使用本发明的刺激响应性聚合物将一种或多种不期望的物质与目标分子分开之后进行。

[0122] 在一些实施方案中,使用此处所述的刺激响应性聚合物来离析、分离或者纯化所关注的多肽或者蛋白质的“纯化步骤”可以是产生“均匀的”或者“纯净的”组合物或者样品的整个纯化方法的一个部分,此处所用的术语指的是组合物或者样品,其在包含所关注的蛋白质的组合物中包含小于100ppm的HCP,可选择的小于90ppm、小于80ppm、小于70ppm、小于60ppm、小于50ppm、小于40ppm、小于30ppm、小于20ppm、小于10ppm、小于5ppm、或者小于3ppm的HCP。

[0123] 作为此处使用的术语“澄清(clarification)步骤”通常指的是在生物分子纯化中的一个或多个初始步骤。该澄清步骤通常包含使用包括下面的单独的或者其不同组合的任何一个或多个步骤来除去细胞和/或细胞碎片,例如离心分离和深层过滤、沉淀、絮凝化和沉降。澄清步骤通常包括除去一种或多种不期望的物质,并且典型地是在包括捕获期望的目标分子的步骤之前进行的。澄清的另一关键的方面是除去样品中可溶性和不溶性组分(其会后来导致纯化方法中消毒过滤器的污染结果),由此使得整个纯化方法更经济。在一些实施方案中,本发明提供了对于通常用于各种纯化方案中的常规澄清步骤的改进,如通过这里所述的实施例的降低的浊度/杂质和下游过滤器更高的通过量所证明的。

[0124] 作为此处使用的术语“色谱法”指的是任何种类的将所关注的分析物(例如目标分子)与混合物中存在的其他分子分离的技术。通常,所关注的分析物是通过混合物的单个分子在流动相的作用下穿过固定介质的迁移速率的差异,或者在结合和洗脱方法中,与其他

分子分离的。

[0125] 术语“色谱法树脂”或者“色谱法介质”在此互换使用，并且指的是这样的任何种类的相(例如固体相)，其将所关注的分析物(例如目标分子)与混合物中存在的其他分子分离开来。通常，该所关注的分析物是通过混合物的单个分子在流动相的作用下穿过固定的固体相的迁移速率的差异，或者在结合和洗脱方法中，与其他分子分离开来。各种类型的色谱法介质的例子包括例如阳离子交换树脂、亲合性树脂、阴离子交换树脂、阴离子交换膜、疏水性相互作用树脂和离子交换单块(monolith)。

[0126] 作为此处使用的术语“捕获步骤”通常指的是这样的方法，其用于使用刺激响应性聚合物或者色谱法树脂来结合目标分子，其产生了含有目标分子和该聚合物或者树脂的沉淀物的固体相。典型地，该目标分子随后使用洗脱步骤回收，该洗脱步骤从固体相中除去目标分子，由此导致目标分子与一种或多种杂质的分离。在各种实施方案中，该捕获步骤可以使用色谱法介质例如树脂、膜或者单块材料、或者聚合物例如刺激响应性聚合物、聚电解质或者结合目标分子的聚合物来进行。

[0127] 作为此处使用的术语“盐”指的是通过酸和碱的相互作用形成的化合物。能够用于此处所述的方法中的各种缓冲液中的各种盐包括但不限于乙酸盐(例如乙酸钠)、柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)、氯化物(例如氯化钠)、硫酸盐(例如硫酸钠)、或者钾盐。

[0128] 作为此处互换使用的术语“多价盐”或者“多价离子”指的是这样的化合物，其包含了超过一个电荷或含有大于一个电荷的基团。在一些实施方案中，用作刺激的多价盐(其导致了聚合物因响应盐刺激而致的溶解度的变化)通常导致该聚合物从溶液中沉淀出来。能够使用的示例性多价盐包括例如磷酸盐和硫酸盐。本发明还包括能够使用的抗衡离子例如诸如柠檬酸盐。多价盐当用作此处所述的刺激时，可以作为独立的试剂加入到含有所关注的生物分子以及刺激响应性聚合物的样品中。可选择的，该盐可以连接到基底例如膜上。在一种具体的实施方案中，将膜用聚乙烯基磷酸盐改性，其是一种含有多价盐的聚合物涂层。相对于其他刺激例如温度和pH，用作此处所述的刺激的多价离子被认为对于蛋白质结构和稳定性具有较低的危害。

[0129] 在一些实施方案中，多价盐能够与一种或多种物质相互作用，由此来形成相结合的物质或者络合物。因此，这样的盐也可以称作“形成络合物的盐”。形成络合物的盐和它们所形成的络合物非限定性的例子是多价阳离子例如 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 和它们与乙二胺四乙酸酯中的羧酸基团的络合物；多价阴离子例如磷酸根(PO_4^{3-})和柠檬酸根和它们与聚烯丙基胺中的伯胺的络合物；和离子-结合性盐例如高氯酸盐、十二烷基硫酸盐和十二烷基苯磺酸盐和它们与聚烯丙基胺中的伯胺的络合物。

[0130] “离子-结合性盐”是单价(阳离子或者阴离子)、大体积和电荷-分散的盐。在一些实施方案中，离子-结合性盐被用作刺激，其导致了对盐刺激响应的聚合物溶解度的变化，由此导致该聚合物从溶液中沉淀出来。能够使用的示例性离子-结合性盐包括例如高氯酸盐、十二烷基硫酸盐、十二烷基苯磺酸盐、四苯基硼酸盐和六硝基二酚胺。

[0131] 作为此处使用的术语“溶剂”通常指的是能够溶解或者分散一种或多种其他物质来提供溶液的液体物质。溶剂包括水性溶剂和有机溶剂，其中有用的有机溶剂包括非极性溶剂、乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈、己二醇、丙二醇和2,2-硫二甘醇。

[0132] 作为此处互换使用的术语多肽的“pI”或者“等电点”指的是多肽的正电荷与它的

负电荷平衡时的pH_π可以由多肽的结合的碳水化合物的氨基酸残基或者唾液酸残基的净电荷来计算,或者可以通过等电位聚焦来测量。

[0133] 本发明进一步通过下面的实施例来说明,其不应当解释为限制性的。本申请整个中所引用的全部的参考文献、专利和公开专利申请的内容,以及附图,在此通过引用并入。

[0134] 实施例

[0135] 实施例1:制备未澄清的非表达性细胞培养液 (CCF)

[0136] 在一种代表性试验中,将来源于非表达性中国鼠卵巢 (CHO) 细胞系的细胞在10L生物反应器 (New Brunswick Scientific) 中生长到 10×10^6 细胞/mL的密度,并且在64%的存活率时收获。将IgG加入到浓度为1.3g/L。宿主细胞蛋白质 (HCP) 的含量使用ELISA (Cygnus# CM015) 测量是8300ng/mL。该未澄清的细胞培养物的pH是pH7.2。

[0137] 实施例2:合成包含用疏水性基团改性的聚电解质主链的刺激响应性聚合物

[0138] 在一种代表性试验中,合成了包含用疏水性基团改性的聚烯丙基胺 (BzMPAA) 主链的刺激响应性聚合物。一种包含用疏水性基团改性的阳离子聚电解质主链的聚合物是使用10.3g的40%wt线性聚烯丙基胺 (NITTOBO, 150kD)、2g氢氧化锂和20mL的50%水/甲醇的混合物来合成的,该混合物被搅拌直到充分混合。将2.1mL的苄基氯在15mL甲醇中的溶液加入到该聚合物溶液中。将所形成的混合物在60℃加热14小时。该苄基改性的聚烯丙基胺是在反应结束时,由于与溶剂的热力学不相容而沉淀的。将沉淀物用30mL丙酮清洗,并且重新溶解在400mL的1M乙酸中。将该聚合物通过使用pH7的50mM磷酸钠进行沉淀来进一步纯化。图1表示了聚烯丙基胺聚电解质聚合物与疏水性基团 (即,苄基氯) 的反应的示意图。

[0139] 实施例3:制备苄基改性的聚烯丙胺 (BzMPAA) 的溶液

[0140] 10%的BzMPAA溶液是通过在室温和连续搅拌16小时下,将10g实施例2的聚合物溶解在90g的1M乙酸来制备的。所形成的粘性溶液是轻微雾浊。

[0141] 实施例4:在非表达性细胞培养液 (CCF) 的澄清中使用不同浓度的苄基改性的聚烯丙胺 (BzMPAA)

[0142] 将实施例3的BzMPAA以0.2g、0.3g、0.4g和0.5g的量加入到实施例1的5mL未澄清的细胞培养液 (CCF) 样品中。将该样品在室温混合2分钟。因为聚合物的加入将pH降低到pH4.5-5.5的范围,因此使用2M Tris碱将该混合物的pH调整到pH为7。向所形成的溶液中加入0.043g的二碱式磷酸钾来沉淀聚合物-目标分子、细胞和细胞碎片络合物。将分散的固体悬浮液形式的沉淀物连续混合5分钟。将沉淀物然后经由离心分离 (4000rpm, 1分钟) 进行收集。将来自每个样品的上清液然后通过0.2um的Durapore®过滤器进行过滤。所得的纯化详细列于下表1中。

[0143] 实施例5:在用BzMPAA澄清非表达性的CCF中使用不同的pH值

[0144] 将实施例3的BzMPAA加入到含有实施例1的5mL的未澄清的细胞培养液的四个样品中 (每个0.4g)。将该样品在室温混合2分钟。因为聚合物的加入将pH降低到pH4.5-5.5的范围,因此使用2M Tris碱将该混合物的pH调整到pH分别为5.5、6.5、7.5和8.5。向所形成的溶液中加入0.043g的二碱式磷酸钾来沉淀聚合物-目标分子、细胞和细胞碎片络合物。将分散的固体悬浮液形式的沉淀物连续混合5分钟。将沉淀物然后经由离心分离 (4000rpm, 1分钟) 进行收集。将来自每个样品的上清液然后通过0.2um的Durapore®过滤器进行过滤。所得的纯化详细列于下表1中,其描述了加入有非表达性的CHO CCF的BzMPAA纯化。

[0145] 表1.

聚合物浓度 (wt%)	pH	IgG 回收率 (%)	HCP 除去率 (%)	DNA 除去率 (LRV)
0.4	7	97	63	2.7
0.6	7	92	82	2.8
0.8	7	86	83	2.7
1.0	7	82	85	2.7
0.8	5.5	95	83	3.0
0.8	6.5	86	91	2.9
0.8	7.5	90	86	2.8
0.8	8.5	95	62	2.9

[0147] 实施例6:检测在CCF澄清中使用BzMPAA所获得的纯度水平

[0148] 使用亲合性蛋白质A分析的HPLC鉴定来检测实施例4和实施例5的样品的IgG回收率。IgG在溶液中的含量可选择的使用分析型蛋白质A柱来测量。具体的,一种Poros A/20蛋白A柱(Applied Biosystems)是用PBS平衡,用0.1M赖氨酸(pH2)洗脱和用6M盐酸胍清洁。使用一系列变化的注射体积的多克隆IgG(Seracare)来产生IgG标准曲线。注射样品,并且从标准曲线上确定IgG浓度。

[0149] 使用市售的酶连接的免疫吸收剂检测(ELISA)套件(Cygnus Technologies Inc., Southport, N.C., Cygnus#CM015)检测实施例4和实施例5的样品的宿主细胞蛋白质(HCP)。还使用standard pico green检测以及鲱精DNA作为标准物来检测实施例4和实施例5的样品的DNA。

[0150] 实施例7:制备未澄清的细胞培养液(CCF)

[0151] 将来源于表达性中国鼠卵巢(CHO-DG44)细胞系的细胞在10L生物反应器(New Brunswick Scientific)中生长到 10×10^6 细胞/mL的密度,并且在30%的存活率时收获。单克隆抗体(MAb)浓度测定确定为0.8g/L。宿主细胞蛋白质(HCP)的含量使用ELISA(Cygnus#3G ELISA)测量是200000ng/mL。该未澄清的细胞培养物的pH是pH6.9。

[0152] 实施例8:合成20% 苯基改性的聚烯丙基胺(BzMPAA)

[0153] 将10g聚烯丙基胺(PAA)(Nittobo, 150kD; 40%wt/wt)置于100mL圆底烧瓶中,并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体)在25mL的H₂O中的溶液。然后立即加入苯基氯(1.38g, 1.25mL),在室温搅拌几分钟,然后加热到60℃过夜17小时。将反应物冷却到室温,除去溶剂,产生聚合物沉淀。将沉淀的聚合物用水清洗,随后在1M的AcOH水溶液(40mL)中搅拌,直到实现完全的溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为400mL(1%聚合物溶液),搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPo₄) (3.48g),将该溶液的pH调整为大约6.8来沉淀改性的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物,并且将其最终在真空烘箱中在50–60℃干燥过夜。

[0154] 实施例9:合成40% 苯基改性的聚烯丙基胺(BzMPAA)

[0155] 将10g聚烯丙基胺(PAA) (Nittobo, 150kD; 40%wt/wt) 置于100mL圆底烧瓶中, 并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体) 在25mL的H₂O中的溶液。然后加入苯基氯(2.30g, 2.09mL), 在室温搅拌几分钟, 然后加热到60℃过夜17小时。将反应物冷却到室温, 除去溶剂, 产生聚合物沉淀。将沉淀的聚合物用水清洗, 随后在1M的AcOH水溶液(40mL) 中搅拌, 直到实现完全的溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为400mL(1%聚合物溶液), 搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄) (3.48g), 将该溶液的pH调整为pH6.8来沉淀改性的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物, 并且将其最终在真空烘箱中在50–60℃干燥过夜。

[0156] 实施例10:合成60% 苯基改性的聚烯丙基胺(BzMPAA)

[0157] 将10g聚烯丙基胺(PAA) (NITTOBO, 150kD; 40%wt/wt) 置于100mL圆底烧瓶中, 并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体) 在25mL的H₂O中的溶液。然后加入苯基氯(3.23g, 2.94mL), 在室温搅拌几分钟, 然后加热到60℃过夜17小时。将反应物冷却到室温, 除去溶剂。将沉淀的聚合物用水清洗, 然后在1M的AcOH水溶液(40mL) 中搅拌, 直到实现完全的溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为400mL(1%聚合物溶液), 搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄) (3.48g), 将该溶液的pH调整为pH6.8来沉淀改性的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物, 并且将其最终在真空烘箱中在50–60℃干燥过夜。

[0158] 实施例11:合成二苯基改性的聚烯丙基胺(DPhMPAA)

[0159] 在一种示例性试验中, 聚电解质聚合物主链聚烯丙基胺是用二苯基改性的。简而言之, 将10g聚烯丙基胺(PAA) (Nittobo, 150kD; 40%wt/wt) 置于100mL圆底烧瓶中, 并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体) 在25mL的H₂O中的溶液。随后加入氯-二苯基甲烷(3.68g, 3.23mL), 在室温搅拌几分钟, 然后加热到60℃过夜17小时。将反应物随后冷却到室温, 除去溶剂。将沉淀的聚合物用水清洗, 然后在1M的AcOH水溶液(40mL) 中搅拌。将通过二苯基氯甲烷的水解所产生的剩余的白色固体滤出。随后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为400mL(1%聚合物溶液), 搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄) (3.48g), 将该溶液的pH调整为pH6.8来沉淀改性的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物, 并且将其最终在真空烘箱中在50–60℃干燥过夜。

[0160] 实施例12:合成6% 二氯苯基改性的聚烯丙基胺(DC1BzMPAA)

[0161] 在另一试验中, 将10g聚烯丙基胺(PAA) (NITTOBO, 150kD; 40%wt/wt) 置于100mL圆底烧瓶中, 并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体) 在25mL的H₂O中的溶液。随后加入3,4-二氯苯基氯(1.71g, 1.21mL), 将混合物在室温搅拌过夜17小时。将反应混合物随后用100mL的H₂O稀释, 其后用磷酸将pH调整为中性(pH7.0)。将沉淀的聚合物滤出, 用H₂O清洗, 并在60℃真空烘箱中干燥过夜。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物, 并且将其最终在真空烘箱中在50–60℃干燥过夜。

[0162] 实施例13:合成10% 二氯苯基改性的聚烯丙基胺(DC1BzMPAA)

[0163] 在另一代表性试验中, 如下来合成10% 二氯苯基改性的聚烯丙基胺。将5g聚烯丙基胺(PAA) (NITTOBO, 150kD; 40%wt/wt) 置于100mL圆底烧瓶中, 并且在室温和磁力搅拌下以少量加入1.68g氢氧化钠(1.2当量/单体) 在40mL 50/50H₂O/1,2二甲氧基乙烷(DME) 中的溶液。随后加入3,4-二氯苯基氯(0.57g, 0.40mL), 在室温搅拌几分钟, 然后加热到60℃过夜

21小时。将反应物随后冷却到室温，将DME在真空和60–70°C除去，然后除去其余的溶剂。将沉淀的聚合物用水清洗，然后在1M的AcOH水溶液(20mL)中搅拌，直到实现完全溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为200mL(1%聚合物溶液)，搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄)(1.74g)，将该溶液的pH调整为pH6.8来沉淀改性的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物，并且将其最终在真空烘箱中在50–60°C干燥过夜。

[0164] 实施例14:合成33%氯苄基改性的聚烯丙基胺(DC1BzMPAA)

[0165] 在另一种代表性试验中，如下来合成33%的氯苄基改性的聚烯丙基胺。将5g聚烯丙基胺(PAA)(NITTOBO, 150kD; 40%wt/wt)置于100mL圆底烧瓶中，并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体)在40mL 50/50H₂O/1,2二甲氧基乙烷(DME)中的溶液。随后加入4-氯苄基氯(1.48g)，在室温搅拌几分钟，然后加热到60°C过夜21小时。第二天，将DME在真空和60–70°C蒸发除去，将其余的溶剂与沉淀的聚合物分离。将后者用水清洗，然后在1M的AcOH水溶液(20mL)中搅拌，直到实现完全溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为200mL(1%聚合物溶液)，搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄)(1.74g)，将该溶液的pH调整为pH7来沉淀纯化的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物，并且将其最终在真空和50–60°C干燥过夜。

[0166] 实施例15:合成13%苯基-苄基改性的聚烯丙基胺(DC1BzMPAA)

[0167] 在另一试验中如下来合成13%的苯基-苄基改性的聚烯丙基胺。将4.7g聚烯丙基胺(PAA)(Nittobo, 150kD; 40%wt/wt)置于100mL圆底烧瓶中，并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体)在40mL 50/50H₂O/1,2二甲氧基乙烷(DME)中的溶液。随后加入4-苯基苄基氯(1g)，将该混合物在55°C加热过夜20小时。随后将反应物冷却到室温，将DME在真空和60–70°C除去，将其余的溶剂从沉淀的聚合物中除去。将后者用水清洗，然后在1M的AcOH水溶液(40mL)中搅拌过夜，直到实现完全溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为200mL(1%聚合物溶液)，搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄)(1.74g)，将该溶液的pH调整为pH7.0来沉淀纯化的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物，并且将其最终在真空和50–60°C干燥过夜。

[0168] 实施例16:合成27%苯基-苄基改性的聚烯丙基胺(DC1BzMPAA)

[0169] 在另一试验中，如下来合成27%苯基-苄基改性的聚烯丙基胺。将2.8g聚烯丙基胺(PAA)(Nittobo, 150kD; 40%wt/wt)置于100mL圆底烧瓶中，并且在室温和磁力搅拌下以少量加入3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体)在24mL 50/50H₂O/1,2二甲氧基乙烷(DME)中的溶液。随后加入4-苯基苄基氯(1g)，将该混合物在55°C加热过夜20小时。随后将反应物冷却到室温，将DME在真空和60–70°C除去，将其余的溶剂从沉淀的聚合物中除去。将后者用水清洗，然后在1M的AcOH水溶液(32mL)中搅拌过夜，直到实现完全溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为200mL(1%聚合物溶液)，搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄)(1.74g)，将该溶液的pH调整为pH7.0来沉淀纯化的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物，并且将其最终在真空和50–60°C干燥过夜。

[0170] 实施例17:用不同的聚合物浓度来澄清CCF

[0171] 在一种示例性试验中，评价了实施例8–16上述的刺激响应性聚合物对于CCF的澄清，其制备描述在上面的实施例7中。将实施例8–16的聚合物溶液以0.2g、0.3g、0.4g和0.5g的量加入到5mL的未澄清的细胞培养液样品中。将该样品在室温混合2分钟。因为聚合物的

加入将pH降低到pH4.5–5.5的范围,因此使用2M Tris碱将该混合物的pH调整到pH7。向所形成的溶液中加入0.043g的二碱式磷酸钾来沉淀聚合物-目标分子、细胞和细胞碎片络合物。将分散的固体悬浮液形式的沉淀物连续混合5分钟。将沉淀物然后经由离心分离(4000rpm,1分钟)进行收集。将来自每个样品的上清液然后通过0.2μm的Durapore®过滤器进行过滤。所得的纯化详细列于表2中。

[0172] 实施例18:在不同pH下用聚合物澄清CCF

[0173] 在另一试验中,将实施例8–16的聚合物溶液加入到含有5mL未澄清的细胞培养液(如实施例7所述)的四个样品(每个0.4g)中。将该样品在室温混合2分钟。因为聚合物的加入将pH降低到pH4.5–5.5的范围,因此使用2M Tris碱将该混合物的pH调整到pH分别为5.5、6.5、7.5和8.5。向所形成的溶液中加入0.043g的二碱式磷酸钾来沉淀聚合物-目标分子、细胞和细胞碎片络合物。将分散的固体悬浮液形式的沉淀物连续混合5分钟。将沉淀物然后经由离心分离(4000rpm,1分钟)进行收集。将来自每个样品的上清液然后通过0.2μm的Durapore®过滤器进行过滤。所得的纯化详细列于表2中。

[0174] 实施例19:使用对不同含量的多价离子刺激响应的聚合物来澄清CCF

[0175] 在另一试验中,使用不同量的多价离子刺激来评价实施例8–15所述的聚合物对于CCF的纯化。具体的,将实施例8–15的聚合物加入到含有5mL未澄清的细胞培养液(如实施例7所述)的四个样品(每个0.4g)中。将该样品在室温混合2分钟。因为聚合物的加入将pH降低到pH4.5–5.5的范围,因此使用2M Tris碱将该混合物的pH调整到pH分别为5.5、6.5、7.5和8.5。向所形成的溶液中加入0.031–0.043g(50–70mM最终磷酸盐浓度)的二碱式磷酸钾来沉淀聚合物-目标分子、细胞和细胞碎片络合物。将分散的固体悬浮液形式的沉淀物连续混合5分钟。将沉淀物然后经由离心分离(4000rpm,1分钟)进行收集。将来自每个样品的上清液然后通过0.2μm的Durapore®过滤器进行过滤。所得的纯化描述于表2中。

[0176] 实施例20:使用通常所用的絮凝剂来澄清CCF

[0177] 在另一试验中,使用通常所用的絮凝剂壳聚糖来澄清CCF,目的是产生对比数据。聚合物溶液(2wt%)是根据Riske,F.等人;Jounral of Biotechnology,128 (2007) 813–823中所述的方法来制造的。将该聚合物溶液以变化的量和变化的pH条件加入到实施例7的CCF中。没有对这种聚合物使用刺激。所得的纯化描述在表2中。

[0178] 实施例21:评价使用刺激响应性聚合物沉淀CCF之后的纯度水平

[0179] 在一种代表性试验中,使用亲合性蛋白质A分析的HPLC检测来检测实施例8–16所述的聚合物的IgG回收率。IgG在溶液中的含量可选择的使用分析型蛋白质A柱来测量。一种Poros A/20蛋白质A柱(Applied Biosystems)是用PBS平衡,用0.1M赖氨酸(pH2)洗脱和用6M盐酸胍清洁。使用一系列变化的注射体积的多克隆IgG(Seracare)来产生IgG标准曲线。注射样品,并且从标准曲线上确定IgG浓度。使用市售的酶连接的免疫吸收剂检测(ELISA)套件(Cygnus Technologies Inc.,Southport,N.C.,Cygnus#3G)检测实施例8–16的样品的宿主细胞蛋白质(HCP)。还使用standard pico green检测并且使用鲱精DNA作为标准物来检测实施例8–16的样品的DNA。为了评价细胞和细胞碎片的减少,在4000rpm离心分离1分钟后测量浊度。

[0180] 表2.实施例8–16和20的特征数据

[0181]

实施例	聚合物浓度 (wt%)	多价盐浓度 (mM)	pH	浊度 (NTU)	IgG 回收率 (%)	HCP 除 去率 (%)	DNA 除 去率 (%)
8	0.4	70	7.5	26.7	88	58	95
8	0.6	70	7.5	12.8	86	65	95
8	0.8	62	7.5	31.4	79	72	97
8	1.0	62	7.5	104	79	75	94
8	0.8	62	8.5	7.8	71	67	95
8	0.8	62	6.5	60.8	86	76	96
8	0.8	62	5.5	76.5	99	76	97
9	0.4	70	7.5	2.2	82	83	98
9	0.6	70	7.5	2.5	64	85	>99
9	0.8	62	7.5	2.8	61	87	>99
9	1.0	62	7.5	2.8	53	88	>99
9	0.8	62	8.5	7.1	79	80	>99
9	0.8	62	6.5	3.0	58	91	98
9	0.8	62	5.5	3.4	87	92	97
10	0.4	70	7.5	5.1	54	88	95
10	0.6	70	7.5	4.9	26	90	98
10	0.8	62	7.5	5.6	21	93	>99
10	1.0	62	7.5	1.9	18	93	>99
10	0.8	62	8.5	6.1	40	89	>99
10	0.8	62	6.5	5.0	14	96	>99
10	0.8	62	5.5	2.8	26	95	>99
11	0.4	70	7.5	124	97	42	98
11	0.6	70	7.5	210	61	52	98
11	0.8	62	7.5	478	92	56	99
11	1.0	62	7.5	474	84	55	98
11	0.8	62	8.5	94.2	54	65	98
11	0.8	62	6.5	380	88	60	97
11	0.8	62	5.5	212	99	58	97
12	0.6	70	7.5	3.4	50	74	>99
12	0.8	62	7.5	1.9	85	58	>99
12	1.0	62	7.5	1.3	70	66	>99
12	0.8	62	8.5	1.4	33	81	>99
12	0.8	62	6.5	1.0	37	93	>99
12	0.8	62	5.5	1.4	93	77	>99

[0182]

12	0.6	50	7.5	1.7	81	85	>99
12	0.6	50	6.5	3.1	87	80	>99
12	0.4	50	5.5	1.6	98	66	>99
13	0.4	70	7.5	2.3	86	71	98
13	0.6	70	7.5	1.9	71	73	98
13	0.8	62	7.5	2.4	81	77	>99
13	1.0	62	7.5	1.4	68	80	>99
13	0.8	62	8.5	1.5	60	69	>99
13	0.8	62	6.5	1.1	77	87	>99
13	0.8	62	5.5	1.3	98	90	>99
13	0.6	50	7.5	1.7	78	84	>99
13	0.6	50	6.5	3.1	39	84	>99
13	0.4	50	5.5	1.6	69	78	>99
14	0.4	70	7.5	5.4	69	91	>99
14	0.6	70	7.5	7.3	46	89	>99
14	0.8	62	7.5	5.1	57	94	>99
14	1.0	62	7.5	4.3	22	87	>99
14	0.8	62	8.5	2.8	41	92	>99
14	0.8	62	6.5	3.7	2	97	>99
14	0.8	62	5.5	8.5	7	94	>99
14	0.6	50	7.5	7.5	44	89	>99
14	0.6	50	6.5	6.5	57	96	>99
14	0.4	50	5.5	6.6	43	90	>99
15	0.4	70	7.5	3.0	93	75	>99
15	0.6	70	7.5	1.5	~100	86	>99
15	0.8	62	7.5	2.7	91	72	>99
15	1.0	62	7.5	2.4	67	91	>99
15	0.8	62	8.5	2.3	~100	77	>99
15	0.8	62	6.5	1.4	57	87	>99
15	0.8	62	5.5	2.0	89	90	>99
15	0.6	50	7.5	5.3	~100	88	>99
15	0.6	50	6.5	6.3	~100	70	>99
15	0.4	50	5.5	7.9	~100	83	>99
16	0.4	70	7.5	9.4	85	77	>99
16	0.6	70	7.5	9.9	54	93	>99
16	0.8	62	7.5	9.7	~100	85	>99
16	1.0	62	7.5	19.0	67	94	>99

[0183]

16	0.8	62	8.5	9.1	~100	84	>99
16	0.8	62	6.5	5.6	78	94	>99
16	0.8	62	5.5	4.2	54	88	>99
16	0.6	50	7.5	7.2	56	90	>99
16	0.6	50	6.5	4.1	89	92	>99
16	0.4	50	5.5	2.6	85	89	>99
20	1	0	7.5	27.0	~100	39	30
20	0.8	0	8.5	22.0	61	63	54
20	0.8	0	6.5	16.0	70	30	34
20	0.8	0	5.5	195.0	63	62	96

[0184] 实施例22:合成苄基改性的聚乙烯亚胺(BzMPEI)

[0185] 在另外一种试验中,如下来合成了苄基改性的聚乙烯亚胺刺激响应性聚合物。将10g PEI (Aldrich, 750kD; 50%wt/wt) 置于100mL圆底烧瓶中,并且在室温和磁力搅拌下以少量加入~3.34g氢氧化钠(1.2当量/单体)在25mL H₂O中的溶液。随后加入苄基氯(2.30g, 2.09mL),室温搅拌几分钟,然后在60℃加热过夜17小时。随后将反应物冷却到室温,除去溶剂。将沉淀的聚合物用水清洗,然后在1M的AcOH水溶液(40mL)中搅拌,直到实现完全溶解。然后将该溶液用H₂O稀释到最终体积为400mL(1%聚合物溶液),搅拌下加入二碱式磷酸钾(K₂HPO₄) (3.48g),将该溶液的pH调整为pH6.8来沉淀改性的聚合物。通过在烧结漏斗上过滤来收集该聚合物,并且将其最终在50–60℃的真空烘箱干燥过夜。

[0186] 实施例23:合成苄基改性的聚乙烯基胺(BzMPVA)

[0187] 在一种代表性实施例中,如下来合成了苄基改性的聚乙烯基胺。将32g的聚(乙烯基胺) (PVA) 氯化氢(MW83500,Air Products and Chemicals Inc.)称重到玻璃容器中。加入200mL的H₂O和加入26g的50%NaOH,并且搅拌直到充分混合。加入23.5g苄基氯,并且在70℃混合16h。随着反应的进行,从上清液中分离固体白色物质。使得固体沉降,通过倾析来丢弃掉上清液。将固体在350mL的3%乙酸中溶解过夜。加入360mL的H₂O,并且混合16h,直到溶液均匀。通过用去离子(DI) H₂O将总体积提高到3.2L的总体积,来稀释到1%w/v溶液。加入磷酸钠到50mM的浓度,来引起聚合物的沉淀。加入1M的NaOH达到pH6.8,这提供了另外的聚合物沉淀。过滤成干饼,丢弃上清液。将固体在70℃干燥过夜。溶解在3%乙酸中,直到产生均匀的溶液,来产生5%w/v溶液。

[0188] 实施例24:在存在刺激时,比较在澄清中的改性的和未改性的聚合物

[0189] 将聚烯丙胺(PAA,Nittobo,150kD;40%wt/wt) 和实施例10的聚合物(Bz-MPAA) 加入到水溶液中来产生最终分别为0.2%wt和0.4%的聚合物浓度。使用磷酸氢钾作为刺激,并且以不同的量加入到PAA和实施例10的聚合物溶液中,记录所形成的聚集体的浊度和性质。结果表示在下表3中。

[0190] 表3.

[0191]

聚合物	刺激 (磷酸氢钾, mM)	浊度 (NTU)	聚集体性质
PAA	2.4	2.1	透明(无聚集体)
PAA	4.7	3	透明(无聚集体)
PAA	9.35	17.9	透明(无聚集体)
PAA	18.7	41.2	混浊
PAA	37.5	152	混浊
PAA	75	764	乳状/不透明
PAA	150	760	乳状/不透明
实施例 10(BzMPAA)	2.4	1	透明(无聚集体)
实施例 10(BzMPAA)	4.7	2	透明(无聚集体)
实施例 10(BzMPAA)	9.35	4	透明(无聚集体)
实施例 10(BzMPAA)	18.7	9	透明(无聚集体)
实施例 10(BzMPAA)	37.5	28	透明(无聚集体)
实施例 10(BzMPAA)	75	230	大聚集体
实施例 10(BzMPAA)	150	231	大聚集体

[0192] 实施例25:在存在刺激时,比较在澄清中的改性的和未改性的聚合物

[0193] 将未改性的聚合物聚烯丙胺(PAA,Nittobo,150kD;40%wt/wt)、聚乙烯亚胺(PEI,Aldrich,750kD;50%wt/wt)、聚乙烯基胺(聚(乙烯基胺)(PVA)氯化氢,MW 83500,Air Products and Chemicals Inc.)和实施例10的改性的聚合物(Bz-MPAA)、实施例22的改性聚合物(BzMPEI)和实施例23的改性聚合物(BzMPVA)加入到水溶液中来产生最终分别为0.2重量%和0.4重量%的聚合物浓度。使用磷酸氢钾(150mM)作为刺激,并且加入到每个0.4%聚合物溶液中,记录所形成的聚集体的浊度和性质。结果表示在表4中。

[0194] 表4

[0195]

聚合物	刺激 (磷酸氢钾)	刺激前 的浊度 (NTU)	刺激后 的浊度 (NTU)	刺激后聚集体 的性质	离心分 离后的 浊 度 (NTU)
PAA	150mM	0.1	>1000	乳状	348
PEI	150mM	2.9	>1000	乳状	>1000
PVA	150mM	0.5	>1000	乳状	233
实施例 9(BzMPAA)	150mM	1.9	>1000	大聚集体	9.6
实施例 18(BzMPEI)	150mM	5.1	>1000	乳状大聚集体	385
实施例 19(BzMPVA)	150mM	3.2	>1000	大聚集体	12.7

[0196] 实施例26:合成己酸和叔丁基改性的聚烯丙基胺(HC-t-BuMPAA)

[0197] 将3.49g的6-溴己酸溶解在包含10ml的40wt%线性聚合物聚(烯丙基胺)(150kda, NITTOBO)和30ml氢氧化钠(1M)的溶液中。将该混合物在T=50℃反应18h,将产物作为水凝胶进行沉淀。将该沉淀物溶解在100mg/ml氢氧化锂溶液中,并且与含有2.5ml的叔丁基缩水甘油醚的10ml甲醇混合。将该混合物随后在T=50℃反应18h。使用3.5kda分子量截留物透析管,通过用去离子(DI)水的深入透析(3天)来纯化所述的聚合物溶液。该聚合物溶液的最终浓度是7.2wt%。该合成反应的示意图表示在下图2中。

[0198] 实施例27:当溶解在三羟甲基氨基甲烷缓冲液中时,氯化钠对于己酸和叔丁基改性的聚烯丙基胺(HC-t-BuMPAA)的多价刺激的作用

[0199] 将实施例26的600μl的HC-t-BuMPAA加入到含有0、0.15或者0.5M氯化钠的10ml的25mM磷酸钠中。该溶液最终的pH是11.6。将该溶液用3M乙酸滴定,并且在每个添加之后记录溶液的浊度。如图3所示,通过加入除了磷酸钠之外的氯化钠,观察发生相变时pH响应性的变化。

[0200] 实施例28:使用聚合物HC-t-BuMPAA在不同的聚合物浓度来澄清CCF

[0201] 在一种代表性试验中,使用本发明的聚合物如下来对未澄清的CCF进行澄清。将178、356或者534μl的实施例26的HC-t-BuMPAA加入到5ml的实施例1的未澄清的细胞培养液(其含有25mM的磷酸钠),并且使用25μl的3M乙酸调整到pH8.7。在加入所述聚合物后,使用3M乙酸将该溶液的最终pH滴定到7.2,由此沉淀该聚合物-细胞络合物。

[0202] 将分散的固体悬浮液形式的沉淀物连续混合另外5min。然后通过离心分离(4000rpm,1min)收集该沉淀物,将上清液通过0.2μm的Durapore®过滤器进行过滤。不管所用的聚合物浓度如何,该方法产生了100%的Mab回收率。

[0203] 实施例29:由单体合成聚乙烯基胺(PVA)刺激响应性聚合物

[0204] 由单体如下来合成一种刺激响应性聚合物,该聚合物包含含有伯胺的重复单元。将165g去离子水和22.5g的N-乙烯基甲酰胺(NVF)(SIGMA-ALDRICH,98%)置于250mL圆底烧瓶中。该烧瓶装备有磁力搅拌器和N₂测量尺。将该溶液搅拌和用N₂冲洗0.5小时,之后在另外0.5小时内加热到45℃,并且连续冲洗。引发剂溶液是通过将0.288g的2,2'-偶氮二异丁基

脒二盐酸盐(ABAP)(Aldrich)加入到10mL去离子水中并且溶解来制备的。向该250mL圆底烧瓶中在氮气氛下加入引发剂溶液。将该溶液在氮气下和强力搅拌的同时,在55°C加热1小时,随后在65°C加热2小时,其后在75°C加热1小时。获得了一种粘性的均匀溶液,并且冷却到室温。通过Brookfield粘度DV-II+Pro Viscometer来测量粘度(设置为100RPM,45%扭矩,转子#34)。所形成的溶液的粘度是278–350厘泊(cP)。将该溶液转移到500mL烧瓶中,并且用330mL的H₂O稀释,搅拌下加入40g的50%NaOH。将该溶液在85°C加热8小时。

[0205] 通过加入一滴2摩尔磷酸钠到水解的聚合物中,并且观察加入磷酸根离子时溶液中的白色固体沉淀物,来测试小样品对于磷酸盐刺激的敏感性。向该水解的聚合物溶液中逐滴加入25%的HCl,直到达到pH为大约2。将该溶液强力搅拌过夜,获得了一种均匀的黄色溶液。向该溶液中在搅拌下加入100mL的4摩尔NaOH以及500mL异丙醇。将该聚合物如下来分离:加入100mL的2摩尔磷酸钠,并且将固体真空过滤和用去离子水清洗。将该固体聚合物在65°C真空烘箱中干燥过夜。将部分干燥的聚合物用液氮冷冻,并且研磨成细粉,进一步在65°C的真空烘箱中干燥24小时。最后,回收了40.7g的干粉,并且溶解在1摩尔乙酸中到最终浓度为5%w/w。

[0206] 图4给出了聚乙烯基胺合成方法的总结。

[0207] 实施例30:合成一系列疏水性改性的聚乙烯基胺(PVA)刺激响应性聚合物

[0208] 使用实施例29合成的PVA,如下来生产了三种分别的疏水性改性的刺激响应性聚合物。将100mL的实施例29的5%PVA溶液置于三个500mL玻璃罐的每个中,并且标记为罐1、2和3。向三个罐的每个中在搅拌下加入100g的4摩尔NaOH。接着,向每个罐中加入50g的1-丙醇作为助溶剂,并且搅拌该溶液,随后分别加入0.74g、1.47g和2.94g的苄基氯到罐1、2和3中。将三个罐在60°C加热16小时。将所形成的聚合物每个如下从各个反应溶液中分离:用去离子水将反应溶液调整到500mL,用25%HCl调整pH为8,并且加入100g的2摩尔磷酸钠。通过加入磷酸根离子,经由真空过滤收集了固体沉淀物。将每个反应的固体单独用去离子水清洗,并且溶解到300mL的1摩尔乙酸中。将该聚合物如下来进一步纯化:调整单个溶液的pH为7.4,逐滴加入2摩尔磷酸钠来沉淀该聚合物,过滤所形成的固体,水洗该固体,随后用异丙醇清洗,并且在65°C的真空烘箱干燥2天。将每个干燥聚合物样品用液氮冷冻,并且研磨成细粉。罐1、2和3所回收的干燥聚合物的质量分别是1.44、2.12和2.47g。将单个聚合物每个溶解来产生在1摩尔乙酸中的2%溶液。

[0209] 实施例31:经由非常高分子量的聚(N-乙烯基乙酰胺)的水解来对胺脱保护,来生产聚乙烯基胺(PVA)刺激响应性聚合物

[0210] 在另外一种示例性试验中,如下来制备了非常高分子量的刺激响应性聚合物。非常高分子量聚合物通常指的是分子量等于或者大于1000kDa的聚合物。

[0211] 一种包含含伯胺重复单元的刺激响应性聚合物是如下来制备的。在2L玻璃罐中,在强力搅拌16小时下将平均分子量4060kDa的40g聚(N-乙烯基乙酰胺)-线性均聚物(POLYSCIENCES, INC.)溶解到0.8L去离子水中。向该溶液中加入140g浓HCl,同时连续搅拌1小时。将该罐轻轻盖上盖子,并且将该溶液在99°C加热5天,同时间歇的旋转来混合所述溶液。加热5天后,将该溶液冷却到室温,用去离子水将总体积调整到4L。用8摩尔NaOH在强力搅拌下将该溶液调整到pH7。将水解的产物通过逐滴加入2摩尔磷酸钠来沉淀,直到没有观察到另外的沉淀物为止。将白色沉淀物用去离子水清洗,并且压缩来除去多余的水。将回收

的聚合物在65°C真空烘箱中干燥2天。将干燥的聚合物用液氮冷冻，并且研磨成细粉。所回收的干质量是42.5g。2%的溶液是通过将该干粉溶解到1摩尔乙酸和0.08%HCl中来制造的。将所形成的溶液与2%的起始材料(聚(N-乙烯基乙酰胺)-线性均聚物)溶液比较其对于磷酸盐或者柠檬酸盐刺激的响应。这是通过逐滴加入2摩尔磷酸钠或者0.2摩尔柠檬酸钠到50mL的起始材料和所形成的水解的聚合物的样品二者中来进行的。

[0212] 所形成的水解的聚合物在加入磷酸根或者柠檬酸根离子时沉淀成白色物质，而起始材料的溶液在逐滴加入磷酸根或者柠檬酸根离子时没有发生沉淀，由此表明该起始材料对于刺激(例如多价阴离子例如磷酸根或者柠檬酸根)是非响应性的，而如这个实施例所述合成的非常高分子量聚合物对于刺激(例如多价阴离子例如磷酸根或者柠檬酸根)是响应性的。

[0213] 图5表示了聚胺聚合物的一种脱保护的方法，由此导致形成了刺激响应性聚乙烯基胺(PVA)。

[0214] 实施例32：基于脱保护的聚(N-乙烯基乙酰胺)合成疏水性改性的聚乙烯基胺(PVA)刺激响应性聚合物

[0215] 使用由实施例31的脱保护的4060kDa聚(N-乙烯基乙酰胺)-线性均聚物而获得的PVA，如下来制备非常高分子量疏水性改性的刺激响应性聚合物。

[0216] 将100g的2%的脱保护的4060kDa聚(N-乙烯基乙酰胺)溶液置于玻璃罐中。向该玻璃罐中加入100g的4摩尔NaOH调整pH至大约13。接着，向罐中加入20g的1-丙醇作为助溶剂。最后加入0.58g的苄基氯，并将该罐盖上盖子。将反应物在强力晃动下在60°C加热3小时。3小时后，将反应混合物冷却到室温，将产物用丙酮沉淀，随后收集。将所形成的固体用去离子水清洗，随后用异丙醇清洗，并且在65°C干燥炉干燥2天。将干燥固体研磨成细粉，并且所收集的最终的聚合物干质量是1.44g。2%溶液是通过将干燥的粉末溶解在1摩尔乙酸和0.08%HCl中来制造的。通过逐滴加入2摩尔磷酸钠或者0.2摩尔柠檬酸钠到5mL的0.5%聚合物溶液样品中，来测试所形成的溶液对于多价离子刺激的敏感性。通过加入磷酸根或者柠檬酸根离子，观察到白色沉淀物，由此表明该聚合物对于多价阴离子刺激是响应性的。

[0217] 图6提供了这个实施例所述合成方法的示意。

[0218] 实施例33：合成刺激响应性乙烯基胺/乙烯基丁基醚共聚物(VA-共聚-VBE)

[0219] 在另外一种试验中，制备了一种刺激响应性共聚物，其具有包括疏水性基团的单体单元之一。

[0220] 如下来由单体合成刺激响应性聚合物，其包含含有伯胺和丁醚的重复单元。将90g辛烷、2.5g的Span-85(SIGMA)、16g的N-乙烯基甲酰胺(NVF)(ALDRICH,98%)、5g的N-丁基乙烯基醚(SIGMA)和30g去离子水置于250mL圆底烧瓶中。该烧瓶装备有磁力搅拌器和N₂测量尺。随着温度升高到55°C，将该溶液搅拌和用N₂冲洗1小时。

[0221] 引发剂溶液是通过将0.10g的2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAP)(ALDRICH)加入到10mL去离子水中，并且溶解来制备的。将该引发剂溶液在氮气冲洗气氛下装入含有反应溶液的250mL圆底烧瓶中。将该溶液在强力搅拌和连续的氮气冲洗下，在55°C加热1小时，随后在60°C加热1小时，其后在70°C加热1小时和随后在80°C加热1小时。这产生了一种在底部具有粘性凝胶层的两相溶液。将顶层倾析和弃掉。向底层中加入200mL去离子水，并且在强力搅拌下加入20g的50%NaOH。将该溶液在80°C加热6小时。6小时后，停止加热该溶液，并

且将其冷却到室温。用去离子水将体积增加到2L。将产物通过逐滴加入2摩尔磷酸钠，产生大的白色沉淀物来进行分离。通过倾析上清液来收集沉淀物，并且将沉淀物用去离子水清洗。将分离的聚合物溶解在500mL去离子水、10g乙酸和2g浓HCl中。通过将2摩尔磷酸钠或者0.2摩尔柠檬酸钠逐滴加入到5mL的0.5%聚合物溶液样品中，来测试所形成的溶液对于多价离子刺激的敏感性。加入磷酸根或者柠檬酸根离子时观察到白色沉淀物，由此表明该聚合物对于多价阴离子刺激是响应性的。

[0222] 图7表示了这个实施例所述的反应的一个示意。这个实施例证实了含有与疏水性单体共聚的胺或者带电荷官能性的共聚物对于多价离子刺激是响应性的。

[0223] 实施例34：经由反乳液聚合方法由N VF单体来合成非常高的分子量聚乙烯基胺(PVA)刺激响应性聚合物

[0224] 如下由单体来合成刺激响应性聚合物，其包含含有伯胺的重复单元。将90g辛烷、2.5g的Span-85 (SIGMA)、16g的N-乙烯基甲酰胺 (N VF) (ALDRICH, 98%) 和30g去离子水置于250mL圆底烧瓶中。该烧瓶装备有磁力搅拌器和N₂测量尺。随着温度升高到55°C，将该溶液搅拌和用N₂冲洗1小时。引发剂溶液是通过将0.20g的2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(ABAP) (ALDRICH) 加入到20mL去离子水中并且溶解来制备的。将该引发剂溶液在氮气冲洗气氛下装入含有反应溶液的250mL圆底烧瓶中。将该溶液在强力搅拌和连续的氮气纯化下，加热至60°C 2小时，其后加热至75°C 1小时。这产生了一种在底部具有粘性凝胶层的两相溶液。将顶层倾析和弃掉。向底层中加入500mL去离子水，并且在强力搅拌下加入48g的50% NaOH。将该溶液在80°C加热16小时。16小时后，停止加热该溶液，并且将其冷却到室温。用去离子水将体积增加到1L。将产物通过逐滴加入2摩尔磷酸钠，产生大的白色沉淀物来进行分离。通过倾析上清液来收集沉淀物，并且将沉淀物用去离子水清洗，在异丙醇中浸泡2小时，最后再次用去离子水清洗。将所形成的固体物质在65°C真空烘箱中干燥3天。将干燥的聚合物用液氮冷冻，并且研磨成细粉，进一步干燥1天。所形成的干粉的质量是21.5g。2%溶液是通过将该干粉溶解在1摩尔乙酸和0.08%的HCl中来制造的。通过将2摩尔磷酸钠或者0.2摩尔柠檬酸钠逐滴加入到50mL的1%聚合物溶液样品中，来测试所形成的溶液对于多价离子刺激的敏感性。在加入磷酸根或者柠檬酸根离子时，观察到白色沉淀物。

[0225] 实施例35：合成高分子量疏水性改性的聚乙烯基胺(PVA)刺激响应性聚合物

[0226] 使用获自BASF的Lupamin9095溶液(线性聚乙烯基胺，平均MW=340kDa, 20%固体，pH7-9)，如下来生产疏水性改性的刺激响应性聚合物。将300g的Lupamin9095(大约60g的聚乙烯基胺)加入到2L玻璃罐中。接着，将40g的NaOH粒和500mL去离子水进行溶解，并且加入该罐中。之后加入500mL的1,2-二甲氧基乙烷 (SIGMA) 作为助溶剂，将该溶液强力搅拌直到均匀。接着，将17.66g苄基氯 (ACROS ORGANICS, 99%) 在搅拌下加入到该反应罐中。将该溶液在磁力搅拌下加热至60°C 16小时。随后将该溶液冷却到室温，并且转移到5L烧杯中。接着，在搅拌下加入1500mL去离子水。用冰醋酸将pH调整为5。将产物通过缓慢加入250mL的2摩尔磷酸钠来沉淀，并且收集固体，用去离子水清洗。

[0227] 该聚合物进一步通过下面的方法纯化。将该固体在搅拌下溶解在2L的1摩尔乙酸中。用去离子水将总体积增加到10L，并且逐滴加入50%的NaOH来将pH调整为7。将产物通过加入600g的2摩尔磷酸钠来沉淀。将固体经由真空过滤来分离，并且用去离子水清洗。将所形成的固体物质在65°C的真空烘箱干燥3天。将该干燥的聚合物用液氮冷冻，并且研磨成细

粉,进一步干燥1天。所形成的干粉的质量是46g。将小样品溶解在1摩尔的CD₃COOD/D₂O酸中,获得了¹H-NMR色谱,其表示在图8中。将¹H-NMR峰进行积分,并且测量苄基改性量是18%。

[0228] 实施例36:疏水性改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性聚合物的200g规模合成

[0229] 在此处所述的一种示例性试验中,它证实了这里所述的聚合物能够大规模制造。

[0230] 使用聚烯丙胺溶液(PAA,NITTOBO,150kD;40%wt/wt),如下来生产了疏水性改性的刺激响应性聚合物。将500g的聚烯丙胺(PAA,NITTOBO,150kD;40%wt/wt)(大约200g的聚烯丙胺)加入到4L玻璃罐中。接着,将80g的NaOH粒和1000mL的去离子水溶解,并且加入该罐中。之后加入1000mL的1,2-二甲氧基乙烷(SIGMA)作为助溶剂,将该溶液强力搅拌直到均匀。接着,将114g苄基氯(ACROS ORGANICS,99%)加入到该反应罐中。将该溶液在磁力搅拌下在60℃加热16小时。将该溶液冷却到室温,并且转移到10L烧杯中。

[0231] 接着,在搅拌下加入1000mL去离子水,从溶液中沉淀出粘性固体物质。将该产物通过缓慢加入200mL的2摩尔磷酸钠来进一步沉淀,收集固体,并且用去离子水清洗。将该聚合物通过下面的方法进一步纯化。将该固体搅拌溶解在3L的1摩尔乙酸中。用去离子水将总体积增加到10L,并且逐滴加入50%NaOH将pH调整为7。将该产物通过加入800g的2摩尔磷酸钠来沉淀,收集固体,并且用去离子水清洗。将该聚合物甚至进一步通过下面的方法来纯化。将该固体搅拌溶解在3L的1摩尔乙酸中。用去离子水将总体积增加到10L,并且通过逐滴加入50%NaOH来将pH调整为7。将该产物通过加入800g的2摩尔磷酸钠来沉淀,收集固体,并且用去离子水清洗。将所形成的固体物质在65℃真空烘箱中干燥3天。将该干燥的聚合物用液氮冷冻,并且研磨成细粉,进一步干燥1天。所形成的干粉的质量是250g。将小样品溶解在1摩尔CD₃COOD/D₂O酸中,获得¹H-NMR光谱,如图9所示。将¹H-NMR峰积分,测量苄基改性量是33%。

[0232] 实施例37:确定提高刺激响应性聚合物相比于阳离子聚电解质在CHO细胞培养物中的剂量时,它们的絮凝化性能和上清液品质

[0233] 在这里所述的一种示例性试验中,比较了本发明的刺激响应性聚合物与已知的聚合物(即,壳聚糖)某些令人期望的性能。

[0234] CHO细胞培养物是使用实施例1所述的方法来制备的。中等分子量壳聚糖(MMW壳聚糖)(Sigma-Aldrich)的2%w/w溶液是在1摩尔乙酸中制备的。疏水性改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性(33%-BnPAA)聚合物的2%w/w溶液是根据实施例#36来制备的。将10mL的CHO细胞培养物分散到15mL的圆锥管中。对于每个LMW壳聚糖和33%-BnPAA来说,向每个含有CHO细胞培养物的圆锥管中加入单个聚合物剂量0.0、0.1、0.2、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.14、0.18、0.22和0.4%w/v。对于仅仅含有33%-BnPAA的圆锥管来说,将pH调整为7.2,并且施加150mM磷酸钠刺激。全部的圆锥管在3000RPM离心分离2分钟,倾析上清液,并且测量浊度。

[0235] 下表5和图10汇总了代表性试验的结果,来证实非刺激响应性聚合物(例如壳聚糖)需要剂量优化来进行有效的絮凝化,而本发明的刺激响应性聚合物没有表现出需要剂量优化。换句话说,在非刺激响应性聚合物例如壳聚糖的情况下,一旦将最佳剂量的聚合物加入来有效进行絮凝化,则超过最佳剂量导致浊度升高,这是不期望的。而在例如这里所述的这些刺激响应性聚合物的情况下,不管剂量是否增加,该刺激响应性聚合物都产生了有效的絮凝剂/沉淀剂。

[0236] 表5

[0237]

聚合物絮凝剂剂量 (w/v)%	聚合物絮凝剂	刺激 (有/无)	上清液浊度 (NTU)
0	MMW 壳聚糖	无	266
0.01	MMW 壳聚糖	无	14
0.02	MMW 壳聚糖	无	13
0.03	MMW 壳聚糖	无	28
0.04	MMW 壳聚糖	无	200
0.05	MMW 壳聚糖	无	282
0.06	MMW 壳聚糖	无	311
0.07	MMW 壳聚糖	无	325
0.08	MMW 壳聚糖	无	353
0.09	MMW 壳聚糖	无	378
0.1	MMW 壳聚糖	无	379
0.14	MMW 壳聚糖	无	404
0.18	MMW 壳聚糖	无	409
0.22	MMW 壳聚糖	无	405
0.4	MMW 壳聚糖	无	400
0	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	237
0.01	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	399
0.02	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	486
0.03	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	433
0.04	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	293
0.05	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	42
0.06	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	19
0.07	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	14
0.08	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	16
0.09	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	21
0.1	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	20
0.14	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	17
0.18	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	17
0.22	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	12
0.4	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	有	14

[0238] 实施例38: 确定在多价阴离子刺激存在下, 相对于无刺激, 提高刺激响应性聚合物在CHO细胞培养物中的剂量时的絮凝化性能和上清液品质

[0239] CHO细胞培养物是使用实施例1所述的方法来制备的。疏水性改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性(33%-BnPAA)聚合物的2%w/w溶液是根据实施例#36来制备的。对于33%-BnPAA来说,向每个含有CHO细胞培养物的圆锥管中平行三份地(一份用于磷酸盐,一份用于柠檬酸盐,一份用于无刺激)加入剂量为0.0、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.14、0.18、0.22和0.4%w/v的各聚合物。将pH调节为7.2,并且施加150mM磷酸钠或者150mM柠檬酸钠刺激或者不施加刺激。全部的圆锥管在3000RPM离心分离2分钟,倾析上清液,并且测量离心分离液浊度。这个实施例所述的试验结果表示在表6和图11中。

[0240] 表6和图11汇总了代表性试验的结果,来证实刺激响应性聚合物(例如在实施例36中所述)可以作为非刺激响应性絮凝剂(类似于实施例37中的壳聚糖数据)来操作,这在不使用刺激时需要聚合物剂量的优化。但是,使用多价离子刺激例如磷酸根或者柠檬酸根,该刺激响应性聚合物不需要剂量优化,因为离心机分离液浊度不受到聚合物剂量增加的影响。

[0241] 表6

[0242]

聚合物絮凝剂剂量 (w/v)%	聚合物絮凝剂	刺激(磷酸盐 /柠檬酸盐/ 无)	上清液混浊 度(NTU)
0	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	237
0.05	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	42
0.06	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	19
0.07	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	14
0.08	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	16
0.09	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	21
0.1	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	20
0.14	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	17
0.18	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	17
0.22	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	12
0.4	33%苄基改性的聚烯丙基胺	磷酸盐	14
0.05	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	50
0.06	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	29
0.07	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	27
0.08	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	23
0.09	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	30
0.1	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	21
0.14	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	19
0.18	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	24
0.22	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	23
0.4	33%苄基改性的聚烯丙基胺	柠檬酸盐	20
0.05	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	64
0.06	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	33
0.07	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	23
0.08	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	46
0.09	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	51
0.1	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	55
0.14	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	199
0.18	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	492
0.22	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	454
0.4	33%苄基改性的聚烯丙基胺	无	455

[0243] 实施例39: 确定提高未改性的刺激响应性聚合物在CHO细胞培养物中的剂量时的絮凝化性能和上清液品质

[0244] 在另一试验中,测量了这里所述的未改性的刺激响应性聚合物在CHO细胞培养物中的絮凝化能力和上清液品质。

[0245] CHO细胞培养物是使用实施例1所述的方法来制备的。未改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性聚合物的2%w/w溶液是通过将聚烯丙胺(PAA, NITTOBO, 150kD; 40%wt/wt)溶解在1摩尔乙酸中来制备的。将10mL的CHO细胞培养物分散到15mL圆锥管中。向每个含CHO细胞培养物的圆锥管中加入剂量为0.0、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.14、0.18、0.22和0.4%w/w的各聚合物。将pH调节为7.2,并且施加150mM磷酸钠刺激。全部的圆锥管在3000RPM离心分离2分钟,倾析上清液,并且测量浊度。此处所述的实施例的试验的结果表示在表7中。

[0246] 表7

[0247]

聚合物絮凝剂的剂量 (w/v)%	聚合物絮凝剂	刺激(有/无)	上清液混浊度 (NTU)
0.05	未改性的150kD聚烯丙胺	无	171
0.06	未改性的150kD聚烯丙胺	无	426
0.07	未改性的150kD聚烯丙胺	无	673
0.08	未改性的150kD聚烯丙胺	无	959
0.09	未改性的150kD聚烯丙胺	无	947
0.1	未改性的150kD聚烯丙胺	无	>1000
0.14	未改性的150kD聚烯丙胺	无	>1000
0.18	未改性的150kD聚烯丙胺	无	>1000
0.22	未改性的150kD聚烯丙胺	无	>1000
0.4	未改性的150kD聚烯丙胺	无	>1000

[0248] 实施例40:确定刺激响应性聚合物在CHO细胞培养物中的絮凝化性能、沉降时间和上清液品质

[0249] CHO细胞培养物是使用实施例1所述的方法来制备的。疏水性改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性(33%-BnPAA)聚合物的10%w/w溶液类似于实施例#36来制备。将50mL的CHO细胞培养物平行两份地置于100mL玻璃量筒中。在一个量筒中,该刺激响应性聚合物加入到0.5%的剂量,逐滴加入2摩尔Tris碱将pH调整为7,加入2摩尔磷酸钠溶液将磷酸钠浓度调整为50mM,并将溶液搅拌2分钟。进行磷酸钠和pH调整来沉淀细胞、细胞碎片、杂质、残余聚合物的络合物和该刺激响应性聚合物;来絮凝化该固体;和来提高粒度。在磷酸钠加入和pH调整后,在该刺激响应性聚合物处理过的供料中观察到大的聚集体粒子。将另一量筒搅拌2分钟,不加入任何东西。将两个量筒静置1小时。在1小时结束时,吸出上清液,记录浊度。

[0250] 已经观察到具有刺敏聚合物的量筒中的固体相相对于未处理的量筒中的固体相

(其产生了不明确的Settling Front),沉降的更快以及具有明确的Settling Front(清晰的固体向液体相的转变)。

[0251] 一个这样的试验的结果汇总在表8中。Settling Front的测试对于未处理的量筒来说是一个粗略的估计,因为该Settling Front是非常分散和不明确的。

[0252] 表8

[0253]

时 间 (min)	聚合物	Settling Front (%固体)	最终的上清液 浊度(NTU)
10	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	100	
20	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	100	
30	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	62	
40	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	50	
50	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	47	
60	33% 苄基改性的聚烯丙基胺	42	18
10	无	100	
20	无	100	
30	无	95	
40	无	93	
50	无	88	
60	无	84	589

[0254] 实施例41:使用不同分子量的聚胺的澄清性能的比较

[0255] 获得了一系列不同分子量的聚合物,将其改性,并且用于絮凝、沉淀和纯化细胞培养物。通过下面的方法获得和/或改性了分子量为15kD、85kD、150kD、350kD、600–950kD和2000–4000kD的具有伯胺重复单元的聚合物。

[0256] 15kD聚烯丙基胺聚合物获自NITTOBO,并且使用类似于实施例36的方法进行了苄

基化(共价连接苄基并且纯化)。85kD苄基化的聚乙烯基胺聚合物是通过实施例23来制备的。150kD苄基化的聚烯丙基胺是根据实施例36来制备的。350kD苄基化的聚乙烯基胺聚合物是通过实施例35来制备的。950kD聚乙烯基胺聚合物主链是通过用2当量的碱在80℃水解Polymin VZ (BASF) 8小时来制备的。未改性的2000–4000kD PVA是根据实施例31制备的。苄基化的2000–4000kD聚合物是根据实施例32制备的。将该聚合物用于絮凝化、沉淀和纯化大约 12×10^6 细胞/mL的CHO DG44细胞培养物,收获细胞存活率<50%。该絮凝化是在0.2%和0.4%w/w的聚合物计量进行的。施加了50mM磷酸钠的溶液刺激和用2摩尔Tris碱将pH调整到7。

[0257] 记录所观察的絮凝物尺寸,并且表示为+是小絮凝物,++++是非常大的聚集体。小瓶标记的++++是比聚集体悬浮液更大的完全区域的分离。还要注意较大的聚集体/粒子沉降的更快,具有更清晰的固液界面。结果表示在表9中,其证实了使用不同分子量的聚胺的絮凝化结果。

[0258] 表9.

分子量 (kD)	聚合物剂量 (w/w)	聚集体/粒度
15	0.2	+
85	0.2	+
150	0.2	++
350	0.2	+++
600–900	0.2	+++
2000–4000	0.2	++++
15	0.4	+
85	0.4	+
150	0.4	+++
350	0.4	++++
600–900	0.4	++++
2000–4000	0.4	+++++

[0259] [0260] 实施例42: 使用不同的疏水性改性的聚胺的澄清性能的比较

[0261] CHO细胞培养物是使用实施例1所述的方法来制备的。将实施例31、32、33和35所述的聚合物样品加入到实施例38所述的细胞培养物中,不同之处如下:该聚合物剂量是0.1wt%–0.6wt%,如表10所示。初始细胞培养物浊度是~900NTU,没有聚合物处理的离心机分离液的浊度是212NTU。将pH调整为7.2,并且施加50mM磷酸钠刺激。全部的圆锥管在3000RPM离心分离2分钟,并且倾析上清液,测定离心机分离液浊度。这个实施例所述的试验的结果表示在表10中,其证实了在不同聚合物剂量时的不同的疏水性改性的性能。

[0262] 表10证实了通过改变疏水性基团的性质和/或聚合物分子量,能够改变对于刺激的响应和所形成的离心机分离液的浊度。

[0263] 表10.

聚合物	聚合物剂量 (w/w)	离心机分离液浊度 (NTU)	
未处理(无聚合物)	0	212	
实施例 31	0.2	12	
实施例 31	0.6	76	
实施例 32	0.2	92	
[0264]	实施例 32	0.6	26
	实施例 33	0.2	17
	实施例 33	0.6	61
	实施例 35	0.1	19
	实施例 35	0.2	12
	实施例 35	0.4	36
	实施例 35	0.6	32

[0265] 实施例43:用刺激响应性聚合物所获得的浊度的降低对于下游过滤的影响

[0266] 为了评价该刺激响应性聚合物对于后续的离心分离和深层过滤步骤的影响,进行了下面的过程。将DG44中国鼠卵巢(CHO)细胞系表达性PTG1抗体在10L生物反应器(NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)中生长到大约 15×10^6 细胞/mL的密度,并且在<50%存活率时收获。类似于实施例36来制备疏水性改性的基于聚丙烯丙基胺的刺激响应性(33%-BnPAA)聚合物的10%w/w溶液。

[0267] 将DG44CHO细胞培养物的一部分用0.2%的刺激响应性聚合物33%-BnPAA处理,而不对另一部分的DG44CHO细胞培养物进行处理。向该刺激响应性聚合物处理的细胞培养物中,通过逐滴加入2摩尔磷酸钠来将磷酸钠浓度调整到50mM,并且通过逐滴加入2摩尔Tris碱来将pH调整为7.2。进行磷酸钠和pH调整来沉淀细胞、细胞碎片、杂质、残余聚合物的络合物和该刺激响应性聚合物,以及来絮凝化所述固体和来提高粒度。在磷酸钠添加和pH调整之后,在刺激响应性聚合物处理的供料中观察到大的絮凝粒子。将两个部分在3000RPM离心分离5分钟,倾析上清液,测定浊度。所测量的33%-BnPAA聚合物处理的供料的离心机分离液浊度是10NTU,而未处理的供料的离心机分离液浊度测定为60NTU。

[0268] 每个供料的深层过滤器通过量是通过下面的方法确定的。将表面积为 23cm^2 的XOHCMillistak+®Pod一次性深层过滤器(MILLIPORE)用于每个供料。该深层过滤器装备有蠕动泵和在线压力传感器。将该过滤器按照说明书指示用去离子水冲洗,并且将供料以100LMH泵送通过,并将滤液合并。33%-BnPAA聚合物处理的供料滤液的合并浊度是6NTU,未

处理的供料的滤液的合并浊度是9NTU。33% -BnPAA聚合物处理的供料的过滤器通过量在10psi时是1304L/m²,在此时由于供料的限制而停止试验。未处理的供料的过滤器通过量在20psi时是206L/m²,在此时由于压力的限制停止试验。

[0269] 实施例44:用刺激响应性聚合物,随后用亲合性树脂捕获,来纯化模拟蛋白质流

[0270] 为了更好的评价刺激响应性聚合物对于后续的纯化步骤的影响,制备了模拟供料,并且进行下面的过程。CHO细胞培养物是使用类似于实施例1的方法来制备的。初始供料HCP水平是~210000ppm。类似于实施例36来制备疏水性改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性(33% -BnPAA)聚合物的10% w/w溶液。将一部分的CHO细胞培养物用0.1%的刺激响应性聚合物33% -BnPAA处理,而将另一部分的CHO细胞培养物用0.4%的刺激响应性聚合物33% -BnPAA处理,将第三部分的CHO细胞培养物不进行处理。向该刺激响应性聚合物处理的细胞培养物中,通过逐滴加入2摩尔磷酸钠来将磷酸钠浓度调整到50mM,并且通过逐滴加入2摩尔Tris碱来将pH调整为7.2。进行磷酸钠和pH调整来沉淀细胞、细胞碎片、杂质、残余聚合物的络合物和该刺激响应性聚合物,以及来絮凝化所述固体和提高粒度。在磷酸钠添加和pH调整之后,在刺激响应性聚合物处理的供料中观察到大的絮凝粒子。将每个部分的细胞培养物在实验室规模的离心桶中在3000RPM离心分离5分钟。记录每个离心机分离液的浊度,并且报告在表11中。将离心机分离液通过0.2μm Durapore®过滤器进行过滤。

[0271] 将滤液合并物通过三步基于色谱法的纯化进行纯化,该三步色谱法纯化是由蛋白质A亲合性色谱法(ProSep UltraPlus®)、结合和洗脱阴离子交换色谱法(ProResS®)以及流过模式的膜吸附剂阴离子交换色谱法(ChromaSorb®)组成。该纯化是在色谱法工作站上,根据表12中的方法来进行的。对于每个步骤的合并物,通过ELISA分析宿主细胞蛋白质(CHOP),通过ELISA分析沥滤的蛋白A(L ProA),通过PicoGreen®检测分析残余的DNA,通过尺寸排阻(size exclusion) HPLC分析浊度、聚集体蛋白质(AGG)百分比,和通过UV吸收分析蛋白质浓度。

[0272] 表11.

[0273]

供料 处理	离心机分离液 (NTU)	Mab 回收率 (%)	CHOP 除去率 (%)			DNA (ug/mL)
仅仅离 心分离	127	100	0			49
0.1% Bn25PAA	7.3	90	50			<LOQ
0.4% Bn25PAA	9.2	78	50			<LOQ

蛋白质 A 合并物

供料 处理	病毒灭活, 低 pH 保持合并物 (NTU)	步骤产率 (%)	[CHOP] (ppm)	AGG%	L ProA (ppm)	DNA (ug/mL)
仅仅离 心分离	45	99	2135	3	>25	0.84
0.1% Bn25PAA	2.4	99	507	2.9	12	<LOQ
0.4% Bn25PAA	2	100	267	3	>25	<LOQ
仅仅离 心分离	87	684	2.3	<LOQ	<LOQ	
0.1% Bn25PAA	91	282	2.4	<LOQ	<LOQ	
0.4% Bn25PAA	86	133	2.4	<LOQ	<LOQ	

ChromaSorb 合并物

供料 处理			步骤产率 (%)	[CHOP] (ppm)	L ProA	DNA (ug/mL)
仅仅离 心分离			93	1.0 或 者<LOQ	<LOQ	<LOQ
0.1% Bn25PAA			96	0.7 或 者<LOQ	<LOQ	<LOQ
0.4% Bn25PAA			95	0.7 或 者<LOQ	<LOQ	<LOQ

[0274] 表12.

[0275]

蛋白质A		
------	--	--

柱尺寸	0.66X14cm		
方法			
步骤	缓冲液	持续期(柱体积)	驻留时间
EQ	磷酸盐缓冲的盐水	5	3
负荷	0.9mg/mL澄清的给料	214mL	4
清洗	磷酸盐缓冲的盐水	9	3
洗脱	50mM乙酸, pH3.0	6	3
酸汽提(Acid Strip)	150mM磷酸	3	3
EQ	磷酸盐缓冲的盐水	5	3

[0276]

阳离子交换			
柱尺寸	0.66 X 14 cm		
方法			
步骤	缓冲液	持续期(柱体积)	驻留时间
EQ	50mM 乙酸, 25mM NaCl, pH5.0	3	3
负荷	用 50mM 乙酸调整到 pH5 的蛋白 质 A 洗脱合并物, 25mM NaCl, pH5.0	负 荷 密 度 =40mg/mL	4
清洗	50mM 乙酸, 25mM NaCl, pH5.0	3	3
洗脱	50mM 乙酸, 125mM NaCl, pH5.0	6	3
NaCl 汽提	50mM 乙酸, 500mM NaCl, pH5.0	3	3
NaOH 清洁	0.5M NaOH	3	3
EQ	50mM 乙酸, 25mM NaCl, pH5.0	15	3

[0277]

阴离子交换			
ChromaSorb 0.08mL			
方法			
步骤	缓冲液	持续期(柱体积)	流 速 (mL/min)
EQ	50mM Tris pH7.4	300	1
负荷	阳离子交换合并物, 用 50mM tris pH7.4 调整	负 荷 密 度 =2.5 kg/L	1

[0278] 实施例45: 用刺激响应性聚合物, 随后用阳离子交换树脂捕获来纯化模拟蛋白质流

[0279] 为了更好的评价刺激响应性聚合物对于随后的纯化步骤的影响, 进行下面的过程。将DG44中国鼠卵巢(CHO)细胞系表达性PTG1抗体在10L生物反应器(New Brunswick Scientific)中生长到大约 15×10^6 细胞/mL的密度, 并且在<50%存活率时收获, HCP水平是~142000ppm。

[0280] 类似于实施例#36来制备疏水性改性的基于聚烯丙基胺的刺激响应性(33%-

BnPAA) 聚合物的10% w/w溶液。将CHO细胞培养物的一部分用0.1%的刺激响应性聚合物33%-BnPAA处理,而将另一部分的CHO细胞培养物用0.4%的刺激响应性聚合物33%-BnPAA处理,将第三部分的CHO细胞培养物不进行处理。向该刺激响应性聚合物处理的细胞培养物中,通过逐滴加入2摩尔磷酸钠来将磷酸钠浓度调整到50mM,并且通过逐滴加入2摩尔Tris碱来将pH调整为7.2。进行磷酸钠和pH调整来沉淀细胞、细胞碎片、杂质、残余聚合物的络合物和该刺激响应性聚合物,以及来絮凝化所述固体和提高粒度。在磷酸钠添加和pH调整之后,在刺激响应性聚合物处理的供料中观察到大的聚集体粒子。将每个部分的细胞培养物在实验室规模的离心桶中在3000RPM离心分离5分钟。记录每个离心机分离液的浊度,并且报告在表13中。将离心机分离液通过0.2μmDurapore®过滤器进行过滤。

[0281] 将滤液合并物通过两步基于色谱法的纯化进行纯化,该两步色谱法纯化是由结合和洗脱阴离子交换色谱法(ProRes S®)以及流过模式的膜吸附剂阴离子交换色谱法(ChromaSorb®)组成。该纯化是在色谱法工作站上,根据表12中的方法来进行的。对于每个步骤的合并物,通过ELISA分析宿主细胞蛋白质(CHOP),通过ELISA分析沥滤的蛋白质A(L ProA),通过PicoGreen®检测分析残余的DNA,通过尺寸排阻HPLC分析浊度、聚集体蛋白质(AGG)百分比,和通过UV吸收分析蛋白质浓度。

[0282] 表13.

[0283]

供料处理	离心机分离液 (NTU)	Mab 回收率 (%)	CHOP 除去率 (%)	DNA(ug/mL)
未处理的	>1000	100	0	11.9
0.1%聚合物	2	92	56	<LOQ
0.4%聚合物	12	90	65	<LOQ

CEX 合并物				
供料处理	步骤产率(%)	[CHOP] (ppm)	Agg(%)	DNA(ug/mL)
0.1%聚合物	80	897	<0.1	<LOQ
0.4%聚合物	84	500	<0.1	<LOQ

ChromaSorb 合并物				
供料处理	步骤产率(%)	[CHOP] (ppm)		DNA(ug/mL)
0.1%聚合物	96	270		<LOQ
0.4%聚合物	97	225		<LOQ

[0284] 实施例46:用磷酸甲基丙烯酸2-羟乙酯(PAHEMA)改性的聚乙烯膜表面

[0285] 在另一试验中,将膜改性来加入多价离子刺激,其中该膜可以用于除去残余刺激响应性聚合物。

[0286] PAHEMA的16%含水混合物是根据下面的配方来制备的:16g的PAHEMA(Aldrich# 695890,75%的PAHEMA和25%的BisHEMPA)、0.2g的Irgacure 2959、93.8g水。将聚乙烯膜

(0.65um, UPDP MILLIPORE) 预先用甲醇润湿，并且在水中交换，用该PAHEMA配料处理。将该样品曝露于UV光，用甲醇和水清洗，并且干燥。通过这种表面改性添加到该膜中的重量是4.4%。该膜的红外光谱表现出强的甲基丙烯酸酯羰基吸收。用亚甲基蓝(带正电荷染料)着色该膜产生了深蓝色，并且青色光密度是1.43。

[0287] 实施例47：用磷酸甲基丙烯酸2-羟乙酯(PAHEMA)改性的亲水性聚乙烯膜表面

[0288] PAHEMA的16%含水混合物是根据下面的配方来制备的：16g的PAHEMA (Aldrich# 695890, 75%的PAHEMA和25%的BisHEMPA)、0.2g的Irgacure 2959、93.8g水。将亲水性膜(0.65um, MPLC MILLIPORE)直接与PAHEMA溶液接触。如上所述进行UV曝光和清洗，产生具有7.6%增量的膜。该膜的红外光谱表现出强的甲基丙烯酸酯羰基吸收。用亚甲基蓝(带正电荷染料)着色该膜产生了深蓝色，并且青色光密度是1.45。

[0289] 实施例48：用磷酸甲基丙烯酸2-羟乙基酯(PAHEMA)改性的亲水性聚甲基丙烯酸酯树脂

[0290] 在另一试验中，将树脂改性来包括刺激，其中该改性的树脂因此能够用于除去残余聚合物。

[0291] 制备具有下面组成的溶液：60ml烯丙基缩水甘油醚(AGE)、110g的4M的NaOH、12g硫酸钠。向该溶液中加入60ml的ToyoPearl65C介质，并将该混合物置于5°C的旋转混合器中16小时。将该介质分离，并且通过常规程序清洗。如下来制备PAHEMA接枝溶液：1.0g PAHEMA、0.06g过硫酸铵、9.0g水。向该溶液中加入5ml的AGE改性的ToyoPearl介质。将该混合物置于80C的混合器中16小时。通过常规程序分离和清洗，来产生PAHEMA改性的树脂。当用0.01%的亚甲基蓝(其是一种带正电荷的染料)的水溶液处理时，这个产物着色成了深蓝色。

[0292] 实施例49：刺激响应性聚合物与用磷酸甲基丙烯酸2-羟乙酯(PAHEMA)改性的亲水性聚乙烯膜表面的结合

[0293] 用下面的试验程序，使用PAHEMA改性的MPLC膜(实施例47)从分别含有100, 10, 和1ppm的PAA的3种溶液中来捕获聚烯丙基胺(PAA)聚合物。膜盘20mm加工直径在15cc细胞保持器中。PAA溶液在1.5cc/s加工。将该膜用100mL PBS缓冲液从细胞保持器中洗入和洗出。将加工的膜用Ponceau S着色。

[0294] Ponceau S是一种带负电的染料，其强吸附到带正电的表面上。当将PAA用PAHEMA改性的膜吸附时，所述表面从负电荷转化成正电荷。这种转化是通过用Ponceau S着色所述的加工溶液而容易观察的。对于用Ponceau S着色程度的一个良好的度量是用Macbeth密度计所测量的品红光密度。表14表示了在膜的上游和下游两个面上，不同的加工膜(即，负荷有PAA)的品红光密度值。

[0295] 可以看到对于1ppm的情况来说，全部的PAA被捕获到膜的上游一面。对于15mL的加工溶液来说，这对应于4.8微克的PAA/cm²的膜表面。

[0296] 表14。

[0297]

PAA负荷(加工的PAA)	上游(上侧) 品红光密度	下游(下侧) 品红光密度
未加工的	0	0
100ppm	0.77	0.77

10ppm	0.75	0.70
1ppm	0.60	0

[0298] 因此,基于这个实施例的结果,可以推出此处所述的改性的膜和树脂可以用于减少残余聚合物的含量或者完全除去残余聚合物。

[0299] 根据申请文件中所引用的参考文献(其在此引入作为参考)的教导,能够最透彻的理解本申请。申请文件中的实施方案提供了对本发明的实施方案的说明,并且不应当解释为对其范围的限制。本领域技术人员容易认识到本发明还包括许多其他实施方案。全部的公开文献和发明在此以它们全部引入作为参考。在所引入的材料与本申请相矛盾或者不一致时,本申请将替代这样的材料。此处任何参考文献的引用并非承认这样的参考文献是本发明的现有技术。

[0300] 除非另有指示,否则申请文件(包括权利要求)中所用的表示成分、细胞培养物、处理条件等的量的全部数字被理解为在全部情况下是用术语“大约”修正的。因此,除非另有相反的指示,否则数字参数是大约的,并且可以根据本发明所寻求获得的期望的性能来改变。除非另有指示,否则在一系列元素之前的术语“至少”被理解为指的是在这一系列中的每个元素。本领域技术人员认识到或者能够使用不超过常规的试验来确定,此处所述的本发明具体实施方案的许多等价物。这样的等价物目的是包括在下面的权利要求中。

[0301] 对本领域技术人员来说显而易见的,可以对本发明进行许多的改变和变化,而不脱离它的主旨和范围。此处所述的具体实施方案仅仅是由实施例来提供的,并非表示任何的限制。它的目的是将说明书和实施例仅仅是作为示例性的,本发明真正的范围和主旨是通过下面的权利要求来表示的。

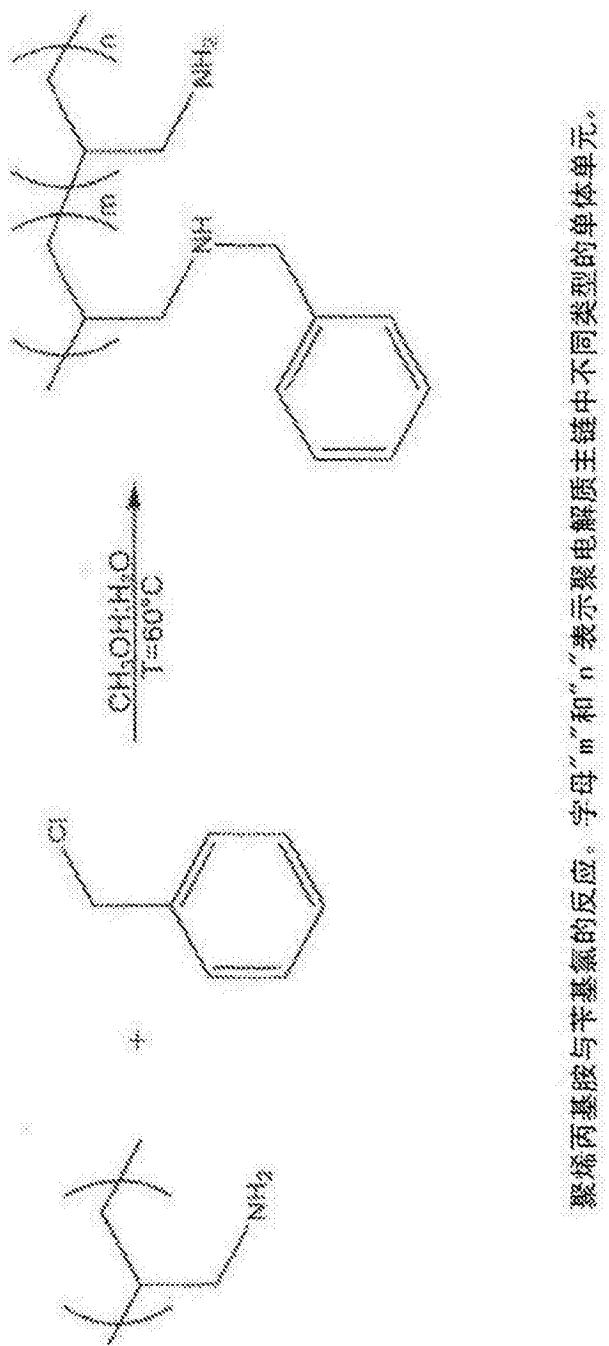
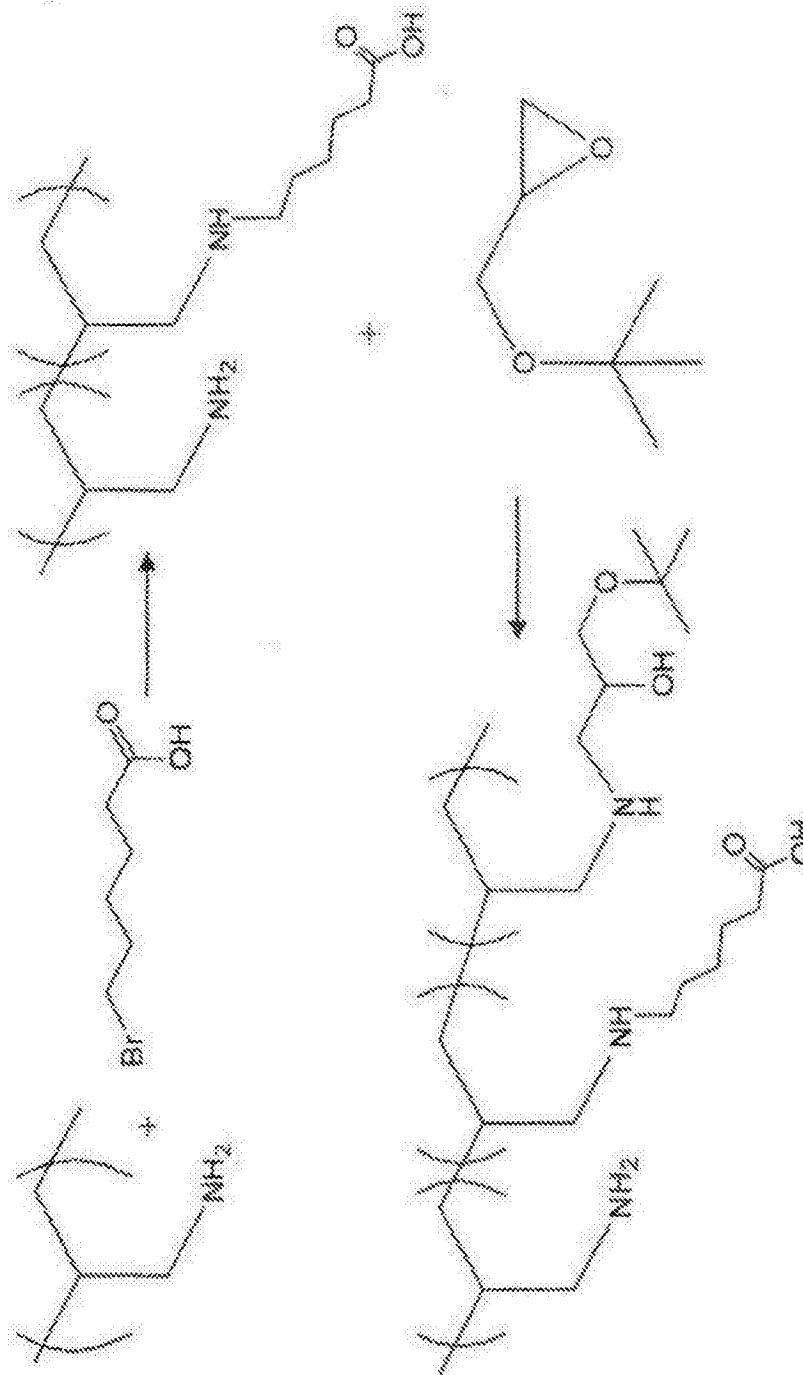


图1



己二酸和叔丁基丙烯酰胺改性的聚异丁烯(4-(t-BuMPAA)的反应方案。

图2

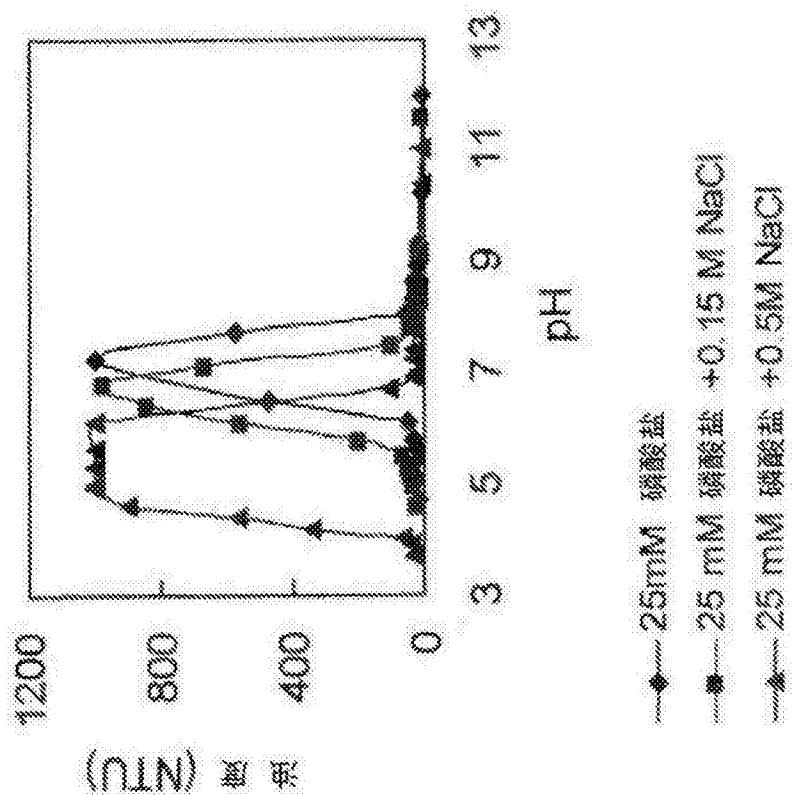


图3

氯化钠对于己酸和叔丁基羧酸的聚丙烯酸盐($\text{G}-\text{C}-\text{BuMPAA}$)的多价刺激的作用。

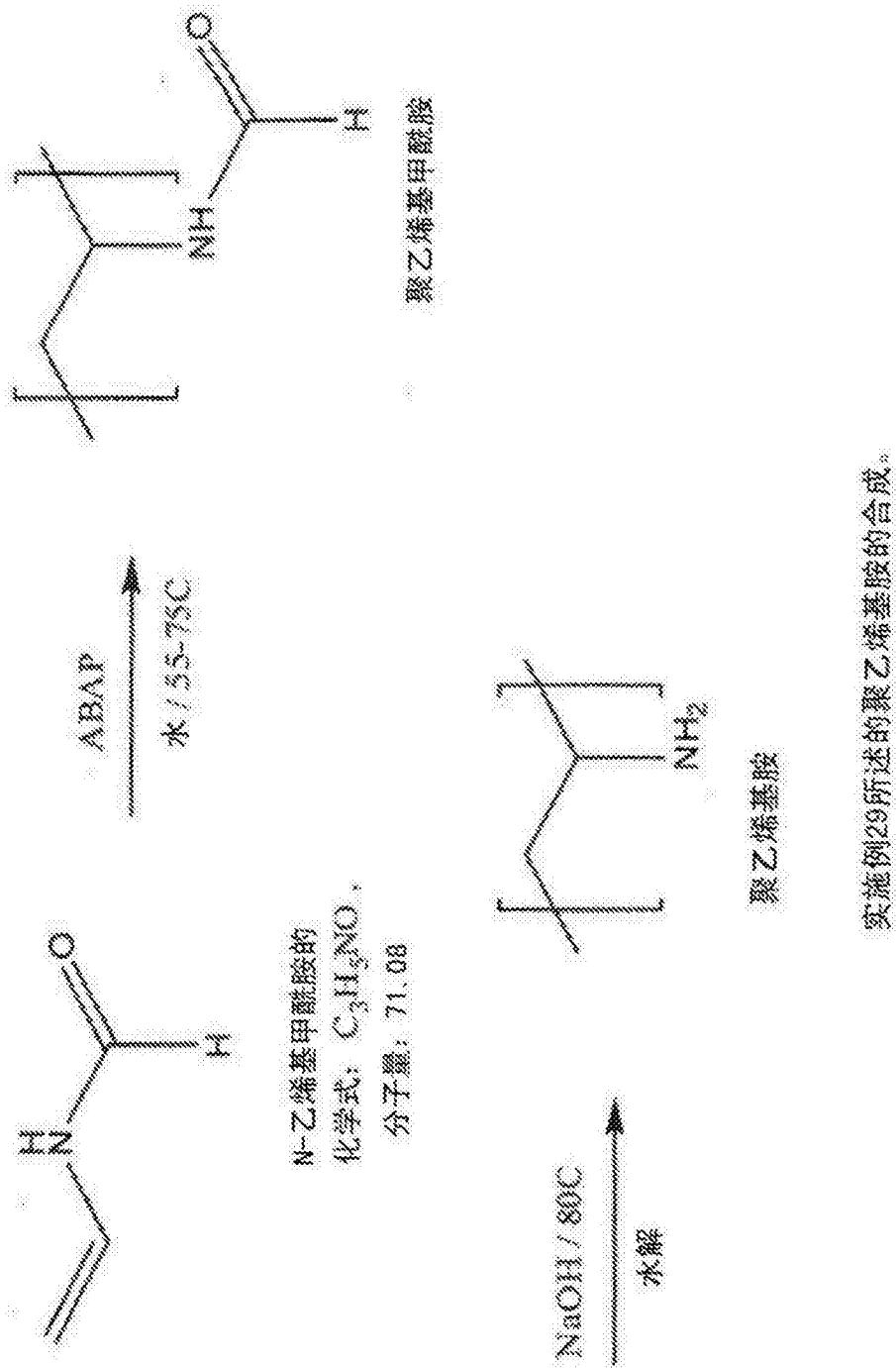


图4

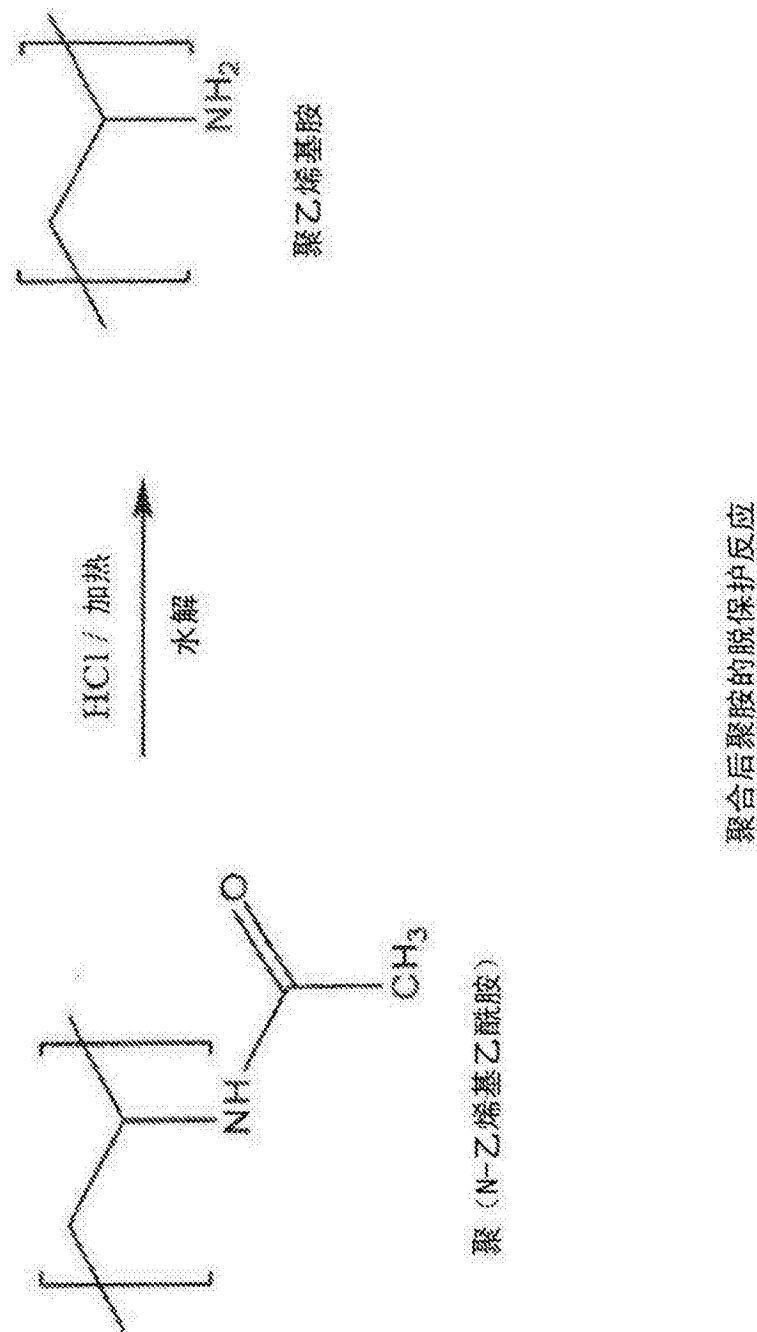


图5

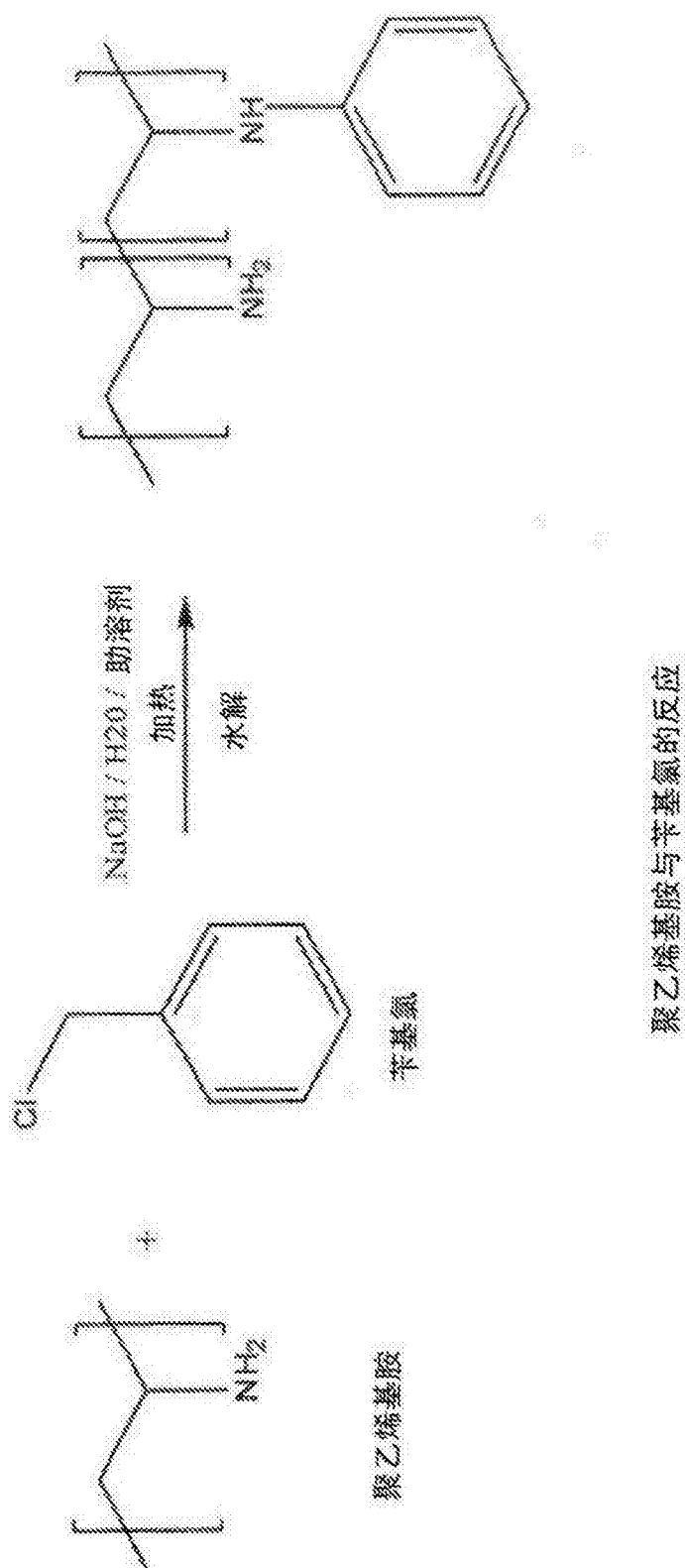


图6

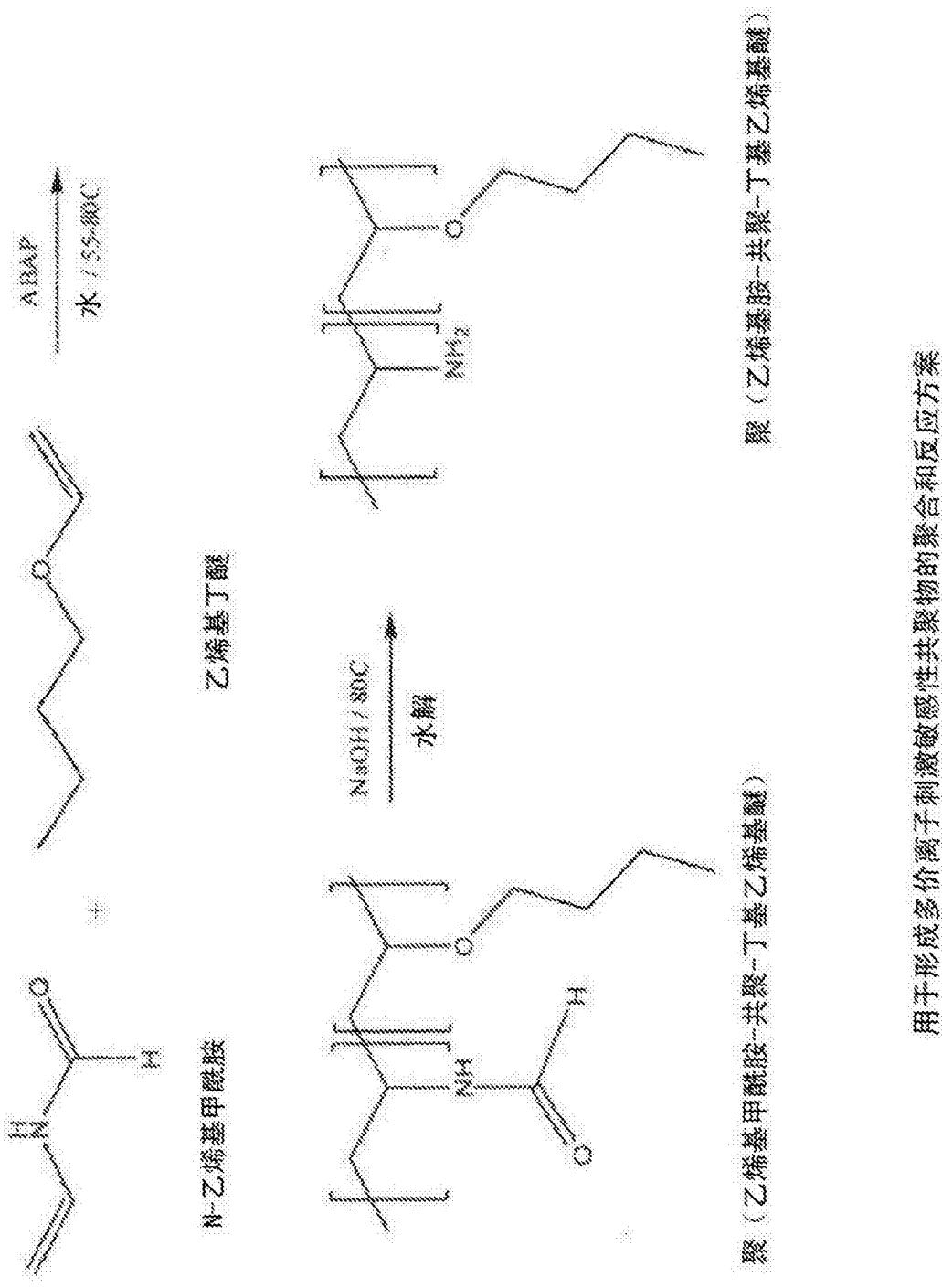
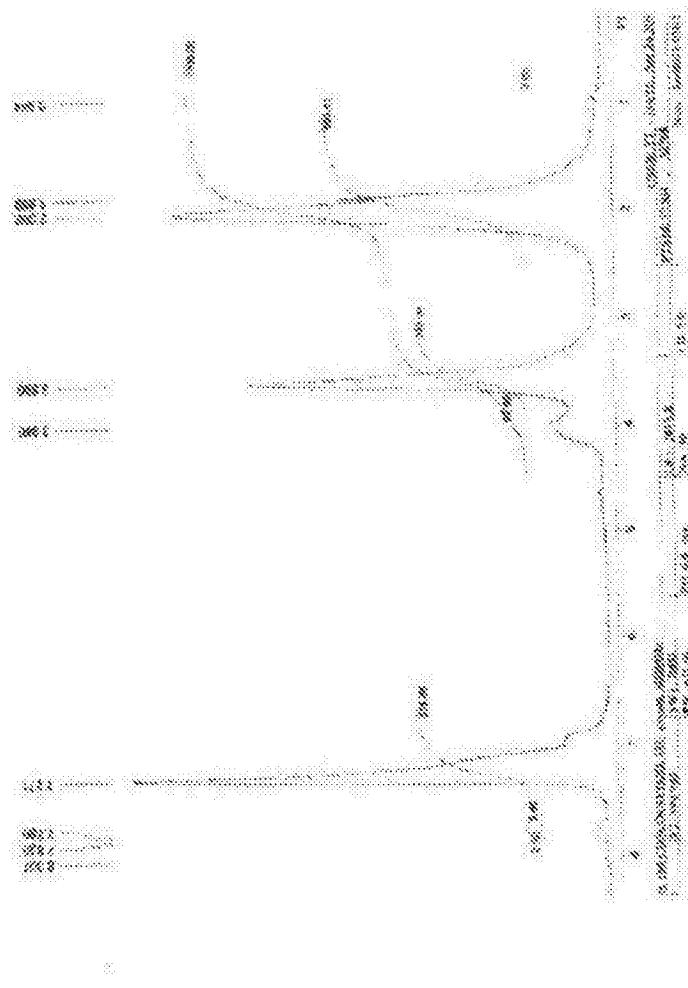


图7



表示了实施例35的改性的聚乙丙基胺的NMR光谱。¹H NMR的积分显示苯基改性度是大约18%。

图8

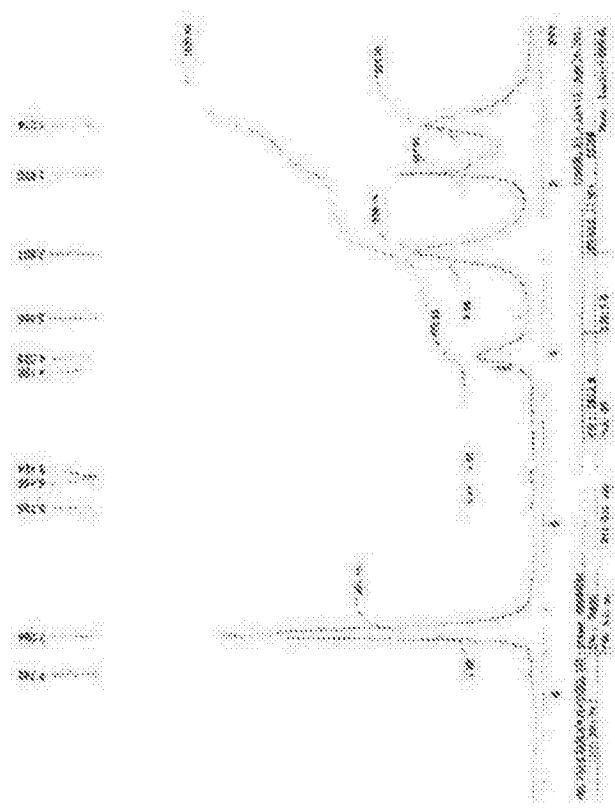


图9

表示了实施例3G的改性的聚烯丙基胺的NMR光谱。¹H 谱的积分部分显示苯基改性度是大约33%。

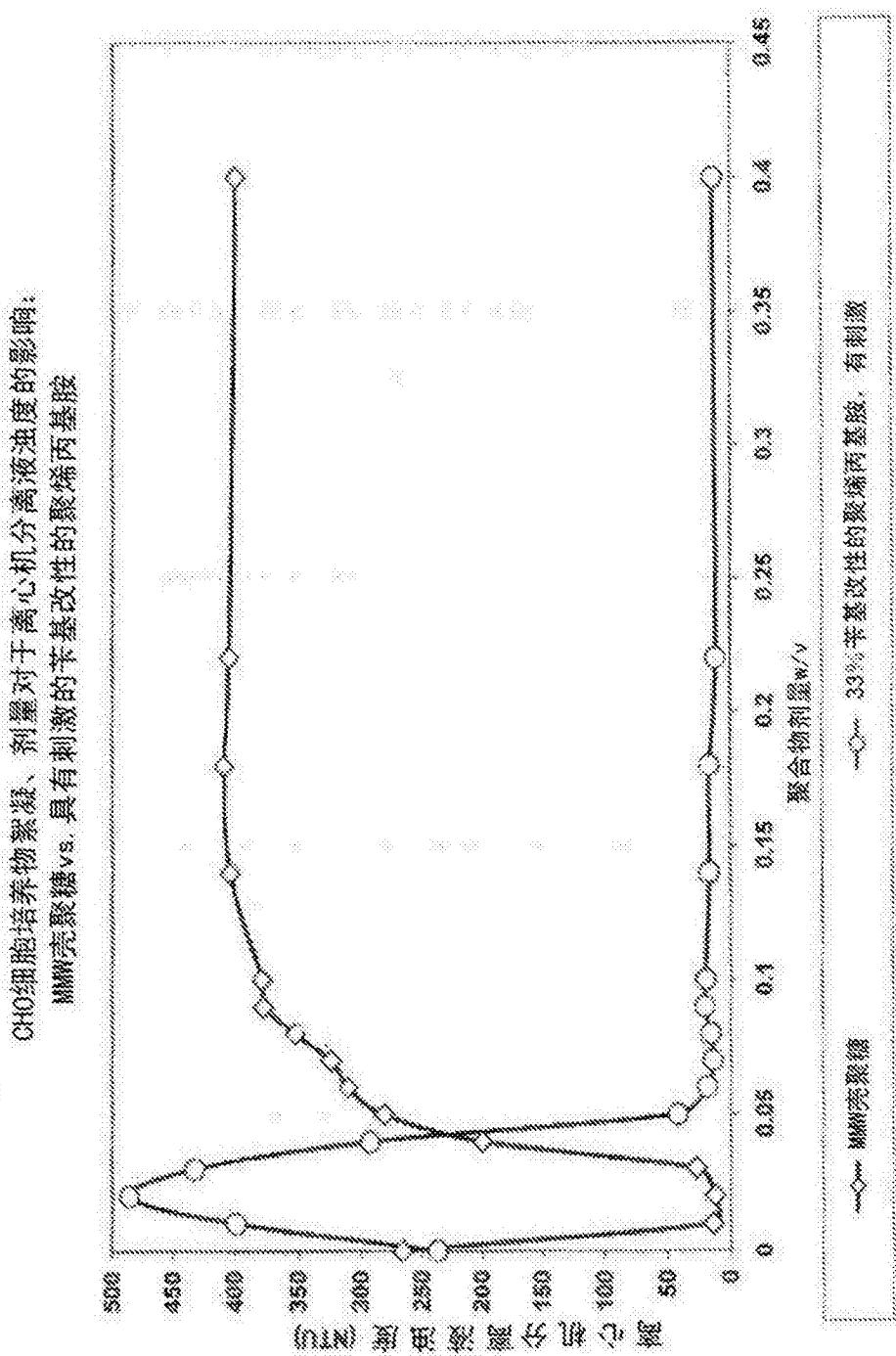


图10

C10细胞培养物聚丙、聚丙和刺激作用对于离心机分离液浓度的影响、含有硫酸盐刺激、含有柠檬酸盐刺激、以及无刺激的苯基改性的聚丙丙基羧酸纤维素比较

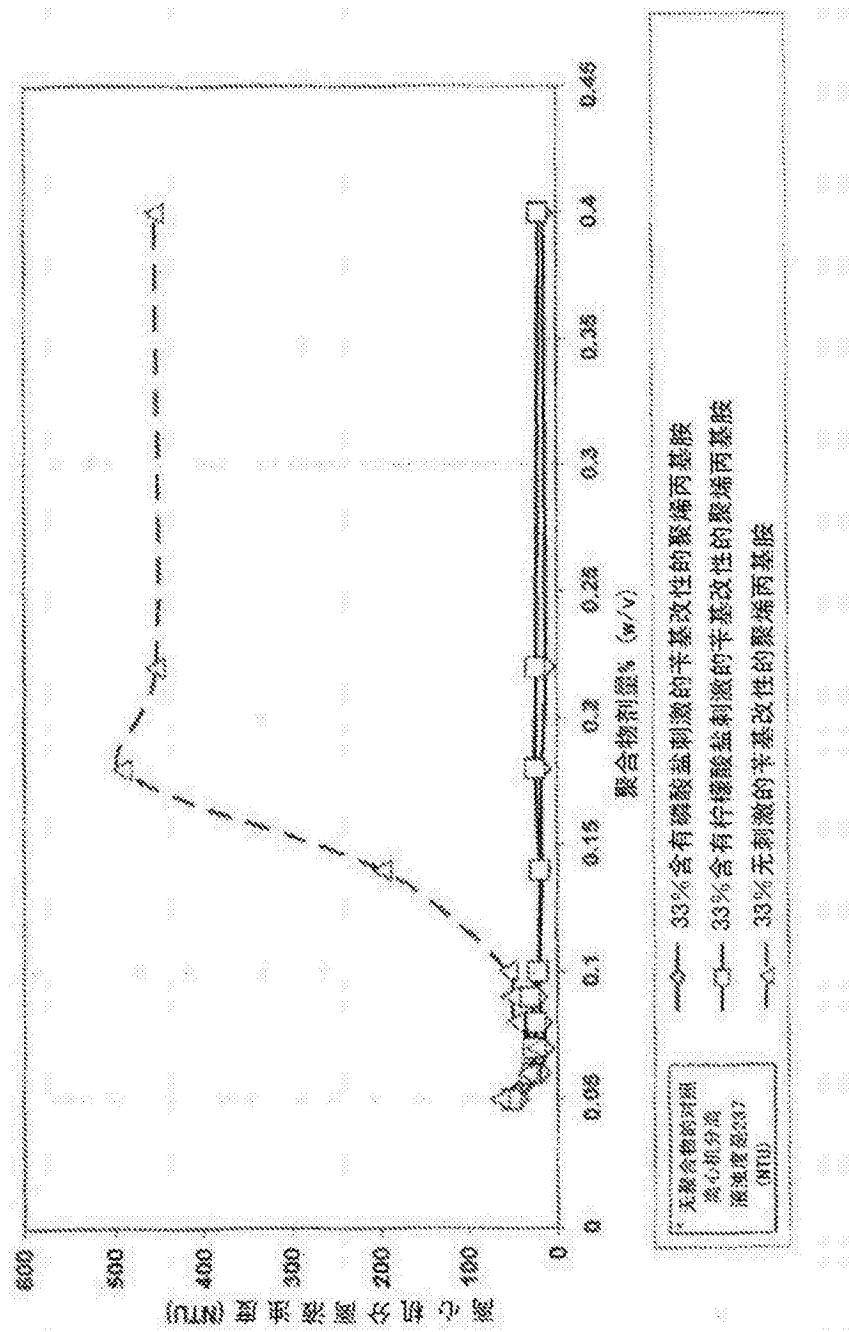


图11

实施例38所述的试验的离心机分离液浓度与聚合物剂量的关系

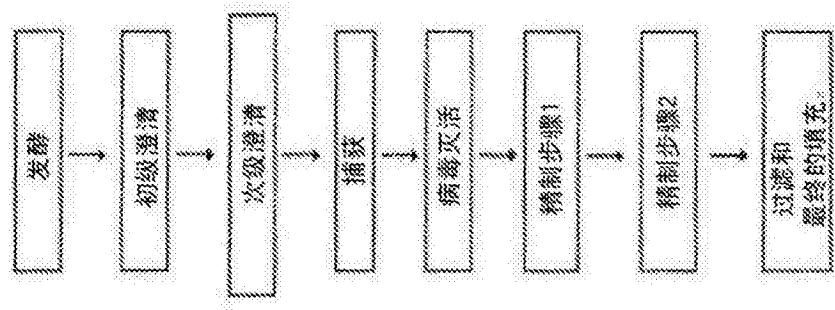


图12

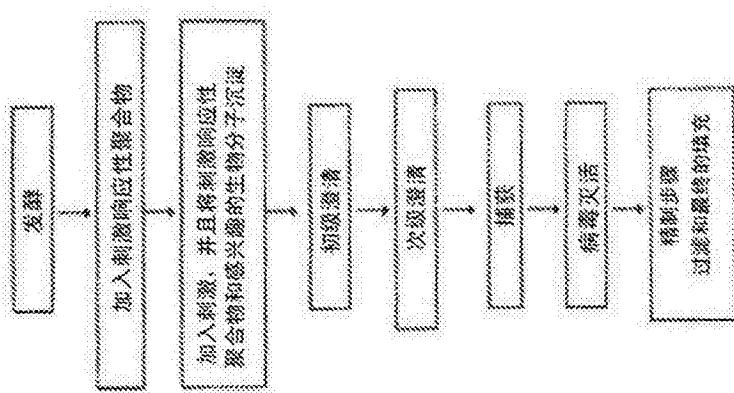


图13

一种净化方案，其包括用于改进细胞培养物的澄清过程的刺激响应性聚合物。
该刺激响应性聚合物除去一种或多种杂质，但是，该聚合物不结合所期望的目标分子。
用于净化生物分子的典型的方法。

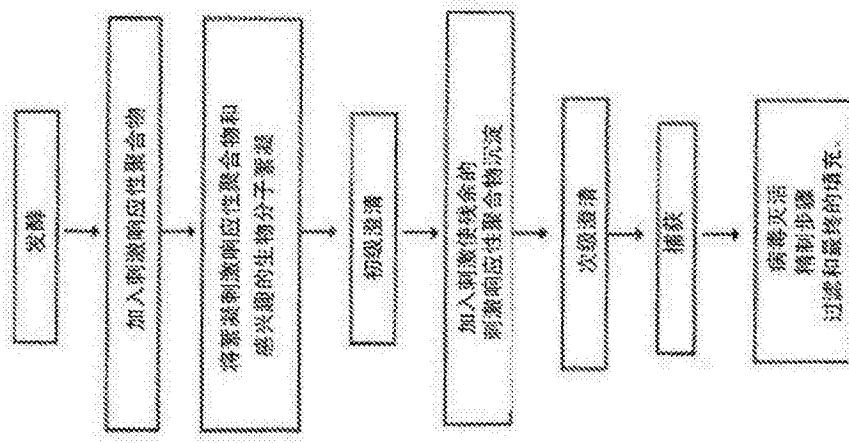


图14

一种净化方案，其包括用于改进细胞培养物的澄清过程的刺激响应性聚合物。

该刺激响应性聚合物经由聚接来除去了一种或多种杂质，但是，

该聚合物不结合所期望的目标分子，并且通过在初步澄清后加入刺激来除去残余聚合物。

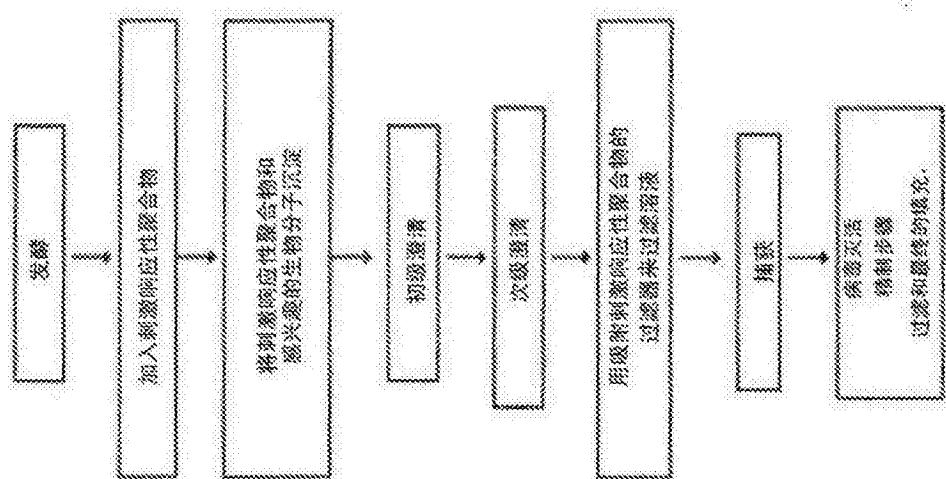


图15

一种净化方案，其包括用于改进细胞培养物的澄清过程的刺激响应性聚合物。
该刺激响应性聚合物除去一种或多种杂质，但是，该聚合物不结合目标分子，并且在澄清后通过另外的吸附性过滤步骤来除去残余聚合物。