

纯化重组蛋白的方法

技术领域

5 本发明涉及重组蛋白的纯化方法。更具体而言，本发明涉及从含有重组蛋白，特别是重组人白蛋白的样品中高效纯化重组蛋白的方法。

背景技术

10 人白蛋白的结构是一个心型结构的单链非糖基化蛋白，有 585 个氨基酸，17 对二硫键，一个自由巯基，分子量为 66438 道尔顿。人白蛋白在人体中的半衰期为 19-21 天。人白蛋白的心形结构由三个主要结构域和六个被 17 个二硫键包裹的亚结构域组成，它们通过范德华力松散地结合在一起。从其晶体结构可以看出，二硫化物桥赋予螺旋状的球状结构刚度，但提供足够的灵活性，使蛋白质能够根据周围介质的变化进行构象变化。

15 人白蛋白常规的生产方法是从人血清中提取分离纯化出来，统称为人血清白蛋白。人血来源的人白蛋白受到血浆来源的数量限制和血浆供者的病毒污染以及个体抗体和蛋白差异的影响，其在临床使用中存在较大的风险。因此，在很多国家的人血白蛋白使用说明书中都有病毒安全性声明，例如：“为预防因使用人血或血浆制品导致的感染所采取的标准措施包括供血者选择、单次供血的筛选或血浆池特殊感染标记的筛选及灭活/去除病毒的有效生产步骤的采用。即便如此，当选用由血液或血浆制备的医药产品时，被传染性致病因子感染的可能性不能排除。这包括了未知的或新出现的病毒和其它病原体”。因此，采用基因重组方法是有效获取无病毒污染的白蛋白的最好途径。

25 目前，最常用的可实现规模化生产的基因重组微生物表达人白

蛋白的方式，主要是酵母表达系统，其中以酿酒酵母和毕赤酵母最为成熟。然而，由于人白蛋白属于大容量注射剂，每次注射的剂量可达到 5-30g。所以，必须要求每次注射剂量的总宿主蛋白残留和生产过程的污染物 ELISA 测试结果不得大于 1ng/ml(200mg/ml-rHA)。

5 不管采用何种方式进行重组人白蛋白的生产，其免疫原性还包含蛋白质的翻译后修饰，例如糖基化、氧化、多聚和聚集等等。因此，高效特异性纯化是获得高纯度重组人白蛋白的工艺关键要素。

以往的纯化工艺是采用现有的纯化介质，其工艺复杂，通常不能获得超高纯度重组人白蛋白。中国专利申请 CN1127299 公开了发
10 酵液与菌体共同加热灭活酵母活性的蛋白酶，采用其 Sepharose-Streamline-SP 第一步的富集纯化中出现约 20-30%以上的二聚体，需要加热还原解聚，然后用 HIC 疏水层析去除 45KDa 的白蛋白碎片，再用 Sepharose-DEAE 层析法去除色素。在该申请中，发酵液与菌体在大于 58-65℃以上加热灭活蛋白酶，导致酵母菌出现热激蛋白和重
15 组人白蛋白以及宿主蛋白交联，为其后的层析纯化带来难度。同时，菌体与发酵液共同流穿流化床的 Sepharose-Streamline-SP 层析的分离纯化和运行效率都很低。

中国专利申请 CN101768206 和 CN1854155 以及 CN1496993 中公开了采用 Sepharose HSL 型高耐盐的阳离子介质富集捕获发酵液中的
20 重组人白蛋白，然后采用 Sepharose phenyl 的 HIC 介质去除白蛋白碎片，再用 Sepharose aminobutyl 阴离子交换层析介质替代 Sepharose DEAE 以提高收率。

中国专利申请 CN1810834 和 CN1550504 以及 CN1880334 中公开了采用 Sepharose SP FF 捕获富集重组人白蛋白，然后采用 Delta
25 蓝柱亲和层析吸附白蛋白以去除 45KDa 的白蛋白碎片和酵母的宿主蛋白，蓝柱的缺点是蓝色染料的配基脱落和安全性，且以亲和层析分离重组人白蛋白的工艺设计导致纯化的效率降低。其后采用的 S-200HR 的分子筛也是纯化效率低的步骤。

以上三个系列公开的专利可以有效的得到纯度较高的重组人白蛋白，但纯化前期的捕获富集过程中聚合体的产生量较大，需要重新解聚，该解聚工艺有可能出现错配等含免疫原性的重组人白蛋白。

- 5 因此，本领域对于高效纯化重组蛋白，特别是重组人白蛋白的方法存在持续需求，使其减少聚合体的产生并抑制宿主蛋白、色素和糖类物质与重组蛋白的相互作用。

发明内容

- 10 在本发明的一个实施方案中，提供了一种纯化重组蛋白，特别是重组人白蛋白的方法，包括：

(a)将氨基胍和中长链脂肪酸加入含有重组蛋白的样品中；和

(b)对所得样品进行层析，所述层析任选用含有氨基胍的层析缓冲液进行。

- 15 在本发明的一个实施方案中，所述含有重组蛋白的样品为发酵上清液。优选地，通过离心、固液分离、加热灭活、中空纤维超滤或/和深层过滤澄清分离常规技术，从发酵液获得澄清上清液。

- 20 在本发明的一个实施方案中，采用离心机进行固液分离，可以迅速将发酵菌体与上清液分离，以保持发酵液的一致性；将发酵液固液分离后，可在辛酸钠等热稳定剂的条件下，对发酵上清液进行55°C~68°C之间的加热，再次进行固液分离；然后采用300~500KDa的膜包或中空纤维膜或0.1~2 μm之间膜孔径的中空纤维进行澄清处理。澄清处理可在加热灭活的前后分别处理一次。

- 25 在本发明的另一个实施方案中，上述步骤(a)中所述氨基胍的浓度为2-100mmol/g(重组蛋白)，优选氨基胍浓度为3-80mmol/g(重组蛋白)。

 在本发明的一个实施方案中，所述中长链脂肪酸选自辛酸、癸酸、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)、花生四烯酸(C20:4)中的

一种或多种及其盐。在一个实施方案中，所述中长链脂肪酸的浓度为 2-300mmol/g(重组蛋白)。优选地，所述中长链脂肪酸的浓度为 6-150 mmol/g (重组蛋白)。

5 在本发明的一个实施方案中，所述层析包括阳离子交换层析和疏水层析。

在其它实施方案中，所述重组蛋白也可以为 G-CSF、GLP-1、干扰素、生长激素、白介素及其类似物，以及上述蛋白与白蛋白的融合蛋白。

与现有技术不同，本申请发明人意想不到地发现，向含有重组人白蛋白的样品中加入氨基胍和 10 中长链脂肪酸，然后进行阳离子层析和疏水层析(任选用含有氨基胍的层析缓冲液进行)，可以产生若干意外效果。第一，氨基胍可以阻止和减少以往阳离子交换介质容易产生二聚体、多聚体和杂聚体的现象；中长链脂肪酸作为主动强配体抑制了大部分的宿主蛋白、色素和糖类物质与白蛋白的相互作用。因此，本发明的实施方案使得阳离子交换层析中普遍存在的聚15 合体、杂聚体、色素和宿主蛋白大大降低。第二，氨基胍和 20 中长链脂肪酸的存在抑制了 45KDa 分子量重组白蛋白碎片之间的相互二硫键聚合，以便于暴露更多的不能折叠的蛋白碎片疏水区域，使疏水层析更加彻底地去除重组人白蛋白的小分子碎片和大量的疏水杂质，以及脱去带有强疏水结构的酵母色素。

在本发明的一个实施方案中，所述阳离子交换层析的层析平衡液、洗涤液或洗脱缓冲液中氨基胍的浓度为 1-200mmol/L，优选层析平衡液、洗涤液或洗脱缓冲液中氨基胍的浓度为 1-150mmol/L。

25 在本发明的一个实施方案中，所述阳离子交换层析的层析平衡液和洗涤液的 pH 在 4.0-6.0 之间，优选 pH 在 4.0-5.5 之间；洗脱液的 pH 在 7.0-9.5 之间，优选 pH 在 7.0-8.5 之间。

在本发明的一个实施方案中，阳离子交换层析的层析平衡液和洗涤液的电导率不高于 15ms/cm，优选不高于 10 ms/cm；洗脱液的

电导率不高于 30ms/cm，优选不高于 25 ms/cm。

在本发明的一个实施方案中，所述阳离子交换层析的层析平衡液和洗涤液为磷酸或醋酸或 Tris 缓冲溶液，优选磷酸或醋酸缓冲液。

5 在本发明的一个实施方案中，所述阳离子交换层析的介质基材是聚丙烯酸酯基材、聚苯乙烯-二乙烯基苯基材、琼脂糖基材、改性纤维素基材。

 在本发明的一个实施方案中，所述阳离子交换层析的介质偶联有疏水性阳离子配基，所述疏水性阳离子配基包括高耐盐的
10 Sephacrose Capto MMC。

 在本发明的一个实施方案中，所述阳离子交换层析的介质选自 Uni-SP 系列、UniGel-SP 系列、NanoGel-SP 系列、MonoMix-HC SP 系列、MonoMix-MC SP 系列、琼脂糖的 Sepharose 系列或 Bestarose 系列。

15 在本发明的一个实施方案中，所述疏水层析的介质为经亲水改造的琼脂糖、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯-二乙烯基苯基材微球，其偶联有 Phenyl 或 Butyl 系列的疏水配基；或者疏水层析的介质为亲水性聚甲基丙烯酸酯基质，其偶联有 Phenyl 或 Butyl 系列的疏水配基。

 在本发明的一个实施方案中，所述疏水层析的介质选自 UniHR
20 Phenyl 系列、NanoHR Phenyl 系列、UniHR Butyl 系列、NanoHR Butyl 系列、MonoMix-MC Butyl 系列、MonoMix-MC Phenyl 系列、琼脂糖的 Sepharose 系列或 Bestarose 系列。

 对于阳离子交换层析和疏水层析，优选亲水性表面改性的聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯或聚甲基丙烯酸酯基材微球偶联的阳
25 离子配基或疏水配基分离介质。

 本发明采用的聚丙烯酸酯聚合物微球亲水改造的基材分离介质还例如是默克密理博公司生产的聚甲基丙烯酸酯的 Fractogel® 型亲水改进的离子交换、疏水作用和亲和层析填料产品的基材，包括但不

限制于如下系列，阳离子交换介质 Fractogel[®] EMD SO₃⁻(S) Resin 或 Fractogel[®] SO₃⁻(strong CEX)或 Fractogel[®] SE Hicap (strong CEX)或 Eshmuno[®] S (strong CEX)等。

5 本发明包括但不限于限制于相同基材介质所合成后亲水改性的阳离子和疏水分离介质。

本发明优选如上所述的默克密理博公司生产的聚甲基丙烯酸酯的 Fractogel[®]型亲水改性基材的分离介质和苏州纳微科技股份有限公司或赛分科技有限公司(Sepax Technologies, Inc)生产的上述聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯基材微球经亲水改造的偶联分离介质；最
10 优选苏州纳微科技股份有限公司和赛分科技有限公司(Sepax Technologies, Inc)生产的上述聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯基材微球经亲水改造的偶联分离介质。

本发明的各个层析步骤之间的置换缓冲液和浓缩过程，可以采用分离孔径在分子量 1KDa 到 30KDa 之间的中空纤维膜和平板膜包
15 等装置与设备实施，包括但不限于限制于使用顺序和交叉使用。

本发明的层析步骤之间的置换缓冲液，也可以采用 Sephadex G25 或 Superdex G75 进行换液处理。

另外，本申请发明人还意想不到地发现，在上述层析中，优选采用直径为 10 μm~150 μm 的聚丙烯酸酯或聚甲基丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯微球，在经亲水包覆改性后，接枝阳离子、疏水配基，例如阳离子交换介质的 Uni-SP 系列、UniGel-SP 或 NanoGel-SP 系列、MonoMix-HC SP 或 MonoMix-MC SP 系列；疏水层析的 UniHR Phenyl 系列、NanoHR Phenyl 系列、UniHR Butyl 系列以及 NanoHR Butyl 系列，MonoMix-MC Butyl 系列或 MonoMix-MC
20 Phenyl 系列，该类分离纯化介质保留了聚丙烯酸酯或聚甲基丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯自身或涂层的一定量的疏水性，使其在配合含有氨基胍和中长链脂肪酸的重组人白蛋白的层析中更加容易除去色素和宿主蛋白。

在本发明的一个实施方案中，所述疏水层析的 pH 在 6.0-8.5 之间，优选 pH 在 6.5-8.0 之间。

在本发明的一个实施方案中，所述疏水层析的电导率不高于 30ms/cm，优选不高于 25 ms/cm。

5 在本发明的一个实施方案中，所述疏水层析的上样溶液中氨基胍的浓度为 1-100mmol/g 重组蛋白。

在本发明的一个实施方案中，所述氨基胍为其盐形式，优选其盐酸盐。

10 本发明所述的方法主要应用在酵母表达发酵上清液纯化工艺的前期，有利于在富集发酵液的过程中，提高纯化精度，以便于在后期的精制纯化中提高效率，增加收率，减少成本。

本发明所述的方法也可以应用在重组人白蛋白的其他工艺当中，包括但不限于采用应用在精制工艺，中间纯化工艺。

15 本发明的一些具体实施方案采用的聚丙烯酸酯或聚甲基丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合亲水改性微球，其孔径在 300Å~3000Å 之间，微球直径在 10 μm~150 μm 之间。

本发明的一些具体实施方案采用的聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物组成的 10 μm~150 μm 之间的微球属于高强度聚合物材料柱床装填在 100mm~800mm 之间。优选 250mm~600mm 之间。

20 本发明的一些具体实施方案采用的聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物微球直径分布均匀，反压相对较低，进行连续流层析的分离纯化方式。

本发明所述的层析条件可按照通用的指导手册进行一定的调节和变更。

25 本发明所述的层析之间可以采用其他一些常规的方法进行透析、超滤和巴氏灭活等步骤，不影响本发明的实施效果。

对于重组人白蛋白的纯化，任选地，在上述层析最终完成后，可采用 100KDa 和/或 30KDa 和/或 10KDa 的膜包进行截留大分子聚

集体和去除小分子物质，进行继续纯化，置换缓冲液并浓缩为浓度大于 20% 的重组人白蛋白原液。另外，表达重组人蛋白的宿主细胞包括但不限于酵母、含糖酵母属系的酿酒酵母、克鲁维酵母属系、汉逊酵母属系和毕赤酵母属系。

5 除非另外定义，本文所用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常理解的相同含义。在冲突的情况下，以本申请说明书为准。下面描述优选的方法和材料，但是与本文所述那些类似或等同的方法和材料可用于实施或测试本发明。本文公开的材料、方法和实例仅是说明性的，而非旨在限制。

10 在本说明书中，术语“重组人白蛋白”也可以称为“重组人血清白蛋白”和/或“重组人血白蛋白”和/或“rHA”和/或“rHSA”。术语“人血清白蛋白”是指从人血清中提取出来的人白蛋白，也可以称为“人血白蛋白”和/或“HSA”和/或“HA”和/或“pdHSA”。

15 附图说明

图 1 示出了采用不含有氨基胍的纯化工艺，进行第一步的富集纯化时的聚体产生情况。

图 2 示出了根据本发明的一个实施方案的方法，添加氨基胍可以阻止和减少二聚体、多聚体和杂聚体的产生。

20 图 3 示出了无中长链脂肪酸添加情况下的疏水层析收集液 HPLC-C4 检测图谱；

图 4 示出了含有中长链脂肪酸情况下的疏水层析收集液 HPLC-C4 检测图谱，表明中长链脂肪酸作为主动强配体抑制了大部分的宿主蛋白、色素和糖类物质与白蛋白的相互作用。

25 图 5 和图 6 分别示出了根据实施例 4 的方法，用不含有和含有氨基胍以及中长链脂肪酸的两种纯化工艺进行纯化的抗 HCP-Western Blotting 还原图谱和非还原图谱。泳道 1-6 分别为阳离子交换收集溶液-1、阳离子交换收集溶液-3、阳离子交换收集溶液-4、阳离子交换

收集溶液-5、阳离子交换收集溶液-6 和阳离子交换收集溶液-7 (上样体积均为 0.14ul)，其中数字标号为纯化过程亚批编号，-2 批实验过程中留样进行其他实验；-1/-3/-4 为不含氨基胍生产工艺生产的样品，-4/-5/-6 按照本发明添加氨基胍及中长链脂肪酸生产工艺的样品。

图 7 示出了根据实施例 4 的方法，采用相同的阳离子交换层析收集液，进行两种纯化工艺的对比检测而获得的非还原电泳 SDS-PAGE 图谱。本实验取同一批次阳离子交换层析收集液，分别采用不含有氨基胍和中长链脂肪酸和含有氨基胍和中长链脂肪酸两种纯化工艺对蛋白进行相应纯化，聚体产生情况对比；-1 标识为不加氨基胍和中长链脂肪酸的纯化生产工艺纯化的样品，2 按照本发明添加氨基胍及中长链脂肪酸生产工艺纯化的样品。泳道 1-10 的上样情况如下：

	1	阳离子交换层析收集液	0.2ul
15	2	疏水层析上样流穿-1	5ul
	3	疏水层析目标收集溶液-1	0.2ul
	4	疏水层析洗涤液-1	1ul
	5	疏水层析清洗液-1	5ul
	6	疏水层析上样流穿 1#样-2	5ul
20	7	疏水层析上样流穿 2#样-2	0.5ul
	8	疏水层析目标收集溶液-2	0.2ul
	9	疏水层析洗涤液-2	2ul
	10	疏水层析清洗液-2	2ul

具体实施方式

本发明的发酵规模在 10L、20L、3,000L 和 10,0000L 设备上进行的实施，纯化规模分别在柱直径 10cm、45cm、120cm 的规模实施，其线性放大良好。本实施例包括但不限于以上规模。以下实施例结合附图可进一步理解本发明的特点和优势，不以任何方式限

制本发明解释的其余内容。

实施例 1 发酵与固液分离

按照专利 CN102190722 的方法构建毕赤酵母菌种和优化的培养基与培养参数发酵，经 300 小时发酵，得到 12g/L 重组人白蛋白的发酵液。将发酵液离心分离菌体，收获上清液，加入加热稳定剂（辛酸钠至终浓度为 20mM），氨基胍至终浓度为 30mM，半胱氨酸至终浓度为 10mM 和 N-乙酰色氨酸至终浓度为 5mM，64℃加热 60 分钟灭活蛋白酶。经 0.22 μm 中空纤维膜过滤澄清和注射水洗涤后，用醋酸调 pH 到 4.0~4.5 之间。

将 UniGel SP 装柱，柱床高度 400mm，采用 50mM HAc+50mM NaCl+10 mM 氨基胍 pH4.1 平衡液平衡层析柱，将澄清分离的发酵液(含辛酸钠 30mmol/g 白蛋白)上样；用平衡液洗涤层析柱；再采用 50mM PB +170mM NaCl+10mM 氨基胍 pH 8.3 的洗脱液洗脱目的蛋白；洗脱完成后用 1 M NaCl+0.5M NaOH 溶液和水对介质进行彻底清洁再生。

实施例 2 疏水层析

将实施例 1 中收集的洗脱液直接上样至已平衡的疏水层析柱 (UniHR Phenyl-80L，柱床高度 400mm)，平衡液为：50mM PB +160mM NaCl pH 7.8+10 mM 氨基胍，采用平衡液洗涤层析柱，收集重组人白蛋白组分样品，采用 0.01M 的 NaOH 和水对介质进行彻底清洁再生。

实施例 3 超滤脱去氨基胍

将实施例 2 收集的蛋白液采用 30KDa 和/或 10KDa 的膜包进行溶液置换，脱去氨基胍等稳定剂，继续纯化；置换并浓缩为浓度大于 20%的重组人白蛋白原液。

实施例 4 本发明的纯化工艺和不含氨基胍、中长链脂肪酸的纯化工艺对比

采用相同的发酵工艺生产所得发酵液，在不加入氨基胍以及中

长链脂肪酸的纯化条件下进行纯化；按照本发明的实施例 1 和实施例 2 的方法添加氨基胍和油酸钠的条件下进行纯化，通过纯化效果的对比，液相检测对比（图 1、图 2、图 3、图 4），电泳检测对比（图 5、图 6、图 7），糖检测结果(表 1)对比，差距明显。

5

不含氨基胍和中长链脂肪酸的工艺流程			本发明中工艺流程检测		
检测(糖蛋白 ug/mg 蛋白)			(糖蛋白 ug/mg 蛋白)		
上样	阳离子交换层析	疏水层析收	上样原	阳离子交换层析	疏水层析收
原液	收集总溶液	集总溶液	液	收集总溶液	集总溶液
341.09	5	1.04	358.96	0.4	0.17
224.02	5.19	1.06	未检测	0.29	0.21
343.11	5.37	1.11	317.24	0.42	未检出

表 1

实施例 5 蛋白纯化过程中质量控制项检测方法

- 10
- 15
- 20
- 1、HPLC 检测法：层析 1 的主要检测方法为 HPLC-SEC 检测法/HPLC-C4 检测法：
检测方法：参照《中国药典》2015 年版三部通则 3121 人血白蛋白多聚体测定法，建立相应检测方法测得重组人白蛋白溶液中聚体(含多聚体和二聚体)；
检测方法：参照《中国药典》2015 年版三部通则 0512 高效液相色谱法，建立相应检测方法测得重组人白蛋白溶液中结合色素的蛋白以及部分糖结合蛋白；
2、电泳检测法：疏水层析的主要检测方法为 SDS-PAGE 电泳：
检测方法：参照《中国药典》2015 年版四部(通则 0541 第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法)，进行样品检测；
参照《中国药典》2015 年版第四部(通则 3401 免疫印迹法)，进

行相关样品检测。

3、PAS 法糖含量的检测：

5 取供试品溶液加入盐酸溶液，使溶液 pH 为酸性，加入高碘酸钠充分混合，在室温条件下，使供试品中多糖中顺式乙二醇基氧化成醛，通过冰浴终止反应，加入冰硫酸锌和氢氧化钠使蛋白质沉淀，经离心机 8000 转离心 15 分钟后吸取上清液置 96 孔板中，再加入新鲜配制的乙酰丙酮乙酸铵混合液，置 37℃ 条件下孵育 1 小时。在全自动酶标仪 405nm 波长下进行比色计算出糖含量。

10

虽然本发明某些特征已经在本文中阐释和描述，但本领域技术人员将想到许多修改、替代、变更和等同。因此，应理解的是，所附权利要求书意在涵盖落入本发明真实精神范围之内内的所有此类修改和变更。

15

权 利 要 求 书

1. 一种纯化重组蛋白的方法，包括：
 - (a)将氨基胍和中长链脂肪酸加入含有重组蛋白的样品中；和
 - 5 (b)对所得样品进行层析，所述层析任选用含有氨基胍的层析缓冲液进行。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中步骤(a)中所述氨基胍的浓度为 2-100mmol/g (重组蛋白)。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述中长链脂肪酸选自辛酸、癸酸、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸
10 (C18:1)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)、花生四烯酸(C20:4)中的一种或多种及其盐。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述中长链脂肪酸的浓度为 2-300mmol/g(重组蛋白)，优选 6-150 mmol/g (重组蛋白)。
- 15 5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述层析包括阳离子交换层析和疏水层析。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的层析平衡液、洗涤液或洗脱缓冲液中氨基胍的浓度为 1-200mmol/L。
7. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的层析平衡液和洗涤液的 pH 在 4.0-6.0 之间，优选 pH 在 4.0-5.5 之间；洗脱
20 液的 pH 在 7.0-9.5 之间，优选 pH 在 7.0-8.5 之间。
8. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的层析平衡液和洗涤液的电导率不高于 15ms/cm，优选不高于 10 ms/cm；洗脱液的电导率不高于 30ms/cm，优选不高于 25 ms/cm。
- 25 9. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的层析平衡液和洗涤液为磷酸或醋酸或 Tris 缓冲溶液，优选磷酸或醋酸缓冲液。
10. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的介质基

材选自聚丙烯酸酯基材、聚苯乙烯-二乙烯基苯基材、琼脂糖基材、改性纤维素基材；优选聚丙烯酸酯或聚苯乙烯-二乙烯基苯亲水改性基材。

5 11. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的介质偶联有疏水性阳离子配基，所述疏水性阳离子配基包括高耐盐的 Sepharose Capto MMC。

12. 根据权利要求 5 所述的方法，其中阳离子交换层析的介质选自 Uni-SP 系列、UniGel-SP 系列、NanoGel-SP 系列、MonoMix-HC SP 系列、MonoMix-MC SP 系列、琼脂糖的 Sepharose 系列或
10 Bestarose 系列。

13. 根据权利要求 5 所述的方法，其中疏水层析的介质为经亲水改造的琼脂糖、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯-二乙烯基苯基材微球，其偶联有 Phenyl 或 Butyl 系列的疏水配基；或者疏水层析的介质为亲水性聚甲基丙烯酸酯基质，其偶联有 Phenyl 或 Butyl 系列的疏水配基。
15

14. 根据权利要求 5 所述的方法，其中疏水层析的介质选自 UniHR Phenyl 系列、NanoHR Phenyl 系列、UniHR Butyl 系列、NanoHR Butyl 系列、MonoMix-MC Butyl 系列或 MonoMix-MC Phenyl 系列，琼脂糖的 Sepharose 系列或 Bestarose 系列。

20 15. 根据权利要求 5 所述的方法，其中疏水层析的 pH 在 6.0-8.5 之间，优选 pH 在 6.5-8.0 之间。

16. 根据权利要求 5 所述的方法，其中疏水层析的电导率不高于 30ms/cm，优选不高于 25 ms/cm。

17. 根据权利要求 5 所述的方法，其中疏水层析的上样溶液中氨基胍的浓度为 1-100mmol/g 重组蛋白。
25

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述氨基胍为其盐形式，优选其盐酸盐。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述重组蛋白

为重组人白蛋白。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述重组蛋白为 G-CSF、GLP-1、干扰素、生长激素、白介素及其类似物，以及上述蛋白与白蛋白的融合蛋白。

- 5 21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述含有重组蛋白的样品为发酵上清液。