

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 4 月 25 日 (25.04.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/075892 A1

- (51) 国际专利分类号:
C08B 37/08 (2006.01) *B01D 15/22* (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/116624
- (22) 国际申请日: 2017 年 12 月 15 日 (15.12.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201710966913.2 2017 年 10 月 17 日 (17.10.2017) CN
- (71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市

南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

- (72) 发明人: 张居作(ZHANG, Juzuo); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 范秀军(FAN, Xiujun); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 张键(ZHANG, Jian); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 程国钢(CHENG, Guogang); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 陈指龙(CHEN, Zhilong); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 张保珍(ZHANG, Baozhen); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 肖仲琳(XIAO,

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING PLACENTA-LIKE CHONDROITIN SULFATE A OR DERIVATIVE THEREOF BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

(54) 发明名称: 一种胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物的亲和层析纯化方法

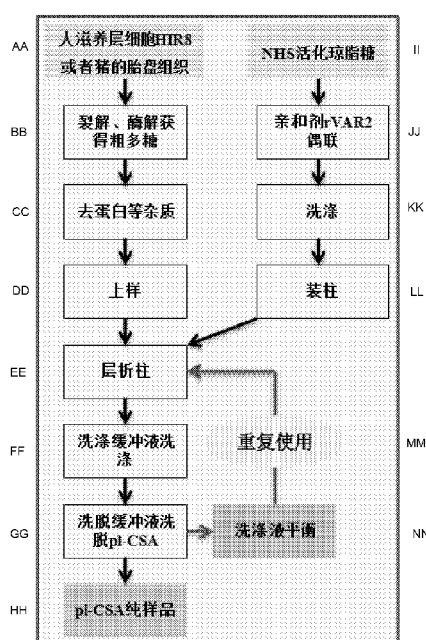


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for purifying a placenta-like chondroitin sulfate A or a derivative thereof. The purification method performs the chromatographic purification of the placenta-like chondroitin sulfate A or derivative thereof by affinity chromatography, wherein the material of the affinity chromatographic column is a conjugate of a recombinant plasmodium-infected erythrocyte surface antigen protein with an affinity chromatographic matrix. The chromatographic purification method comprises loading crude placenta-like chondroitin sulfate A or derivative thereof onto the affinity chromatographic column, washing with a washing liquid until no

Zhonglin); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 韩金雨(HAN, Jinyu); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝北北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

impurities flow out, and then eluting with the eluent and collecting the purified placenta-like chondroitin sulfate A or derivative thereof. The purification method can overcome the difficulty in polysaccharide purification, making other polysaccharides with a similar molecular size and structure not be adsorbed by rVAR2 and easily removed by washing so as to obtain the highly purified pl-CSA; and making the washing condition pl-CSA firmly bonded by the rVAR2 ligand and the eluent condition easily released to obtain a higher recovery rate.

(57) 摘要: 一种胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物的纯化方法, 所述纯化方法为以亲和层析的方法对胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物进行层析纯化, 其中亲和层析柱材为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物, 所述层析纯化的方法为将胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物粗品上样于亲和层析柱上, 并以洗涤液进行洗涤至没有杂质流出, 再以洗脱液进行洗脱并收集胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物纯品。所述纯化方法能够克服多糖纯化的困难, 分子大小和结构相近的其他多糖不被rVAR2吸附, 容易被洗涤去除, 获得高纯度的pl-CSA; 而洗涤液条件pl-CSA被rVAR2配基牢固结合, 洗脱液条件容易释放, 获得了较高的回收率。

一种胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的亲和层析纯化方法

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的亲和层析纯化方法。

背景技术

亲和层析的原理是利用生物分子间亲和力的特异性和可逆性，偶联亲和配基于固定相吸附介质，流动相中的目标物通过固定相时被亲和吸附，而流动相中的杂质被洗出，最后通过改变流动相条件，如 pH 值或者离子浓度和种类，解离配基与目标物之间的亲和吸附，使目标物释放进入流动相，从而获得高纯度目标物，自亲和层析技术出现至今，这一项技术发展非常迅速，在生物技术领域取得了瞩目的成绩，现已经被广泛用于蛋白质、肽类、酶制剂、抗原抗体、激素、核酸等。亲和层析柱中被固定的配基选择是亲和纯化的关键因素，根据配基与生物大分子之间相互作用体系的不同，可分为四种不同的类型，包括：1. 生物亲和层析，这种方法是利用特异性相互作用的配对物质来纯化其中的一种物质，典型的配对物质包括酶-底物、酶-抑制剂、激素-受体等；2. 免疫亲和层析，这种方法是利用抗原抗体的特异性结合特性，以其中一方为配基吸附另一方，这种方法能获得高纯化倍数的物质，且能保持高的天然活性；3. 金属离子亲和层析，这种方法是利用金属离子能与某种蛋白形成螯合物，以固定化的金属离子为配基，如利用组氨酸咪唑基团能与镍离子特异性结合来纯化具有组氨酸标签的融合蛋白；4. 拟生物素亲和层析，这种方法是利用部分分子间或者分子内部的相互作用力，以人工合成固化的一种分子或者分子的一部分为配基，来纯化目的蛋白。但是目前还鲜有多糖亲和纯化方法的建立和应用，关键的难点在于发现能够与多糖特异性亲和结合的配体。

多糖的提取方案通常采用醇提取、水提取、或者有机溶剂提取等方法分离总的多糖或者其中某一类性质的多糖，如利用 Sevag 液（ $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$ ）加入含多糖的样品中，剧烈振摇 5 min 后 4000 rpm 离心 10 min，利用蛋白质与氯仿和正丁醇相互作用形成凝胶不溶物，而多糖溶解在水相，多次反复操作，以达到去除蛋白等杂质，但此种方法所获得的多糖为粗品，含有多种多糖组分，后续的研究

究、开发和应用等方面的质量不可控，多糖种类不可控，很难区分不同多糖间的性质、作用类型和作用方式，如肝素中的其他多糖的残存严重阻碍了其临床应用。为了从粗多糖中纯化出某一种单体，比较成熟的方法是利用分子筛层析柱，如 DEAE-纤维素-52 层析柱、Sephadex G-100 层析柱和 AB 树脂等，这种方法已经广发应用多糖的纯化，如板蓝根多糖纯化、肝素纯化、螺旋藻多糖纯化等，这种方法在没有更好的方法出现之前具有广泛的优越性，但其缺陷在于纯度还是较低，回收率低，为了提高纯度，往往要牺牲超过 50% 的回收率，而对于分子大小和结构相近的物质更是无计可施。

发明内容

本发明利用细胞表面多糖被配基特异性识别的原理，既滋养层细胞表面的胎盘样硫酸软骨素 A (pl-CSA) 能被疟原虫感染红细胞表面抗原 VAR2CSA 特异性的识别结合，以重组合成的 VAR2CSA (rVAR2)，既 pl-CSA 最小结合部分为配基，通过与 NHS 活化的琼脂糖偶联制备亲和层析柱材，建立 pl-CSA 亲和层析纯化方法，这一方法能够克服多糖纯化的困难（回收率低、纯度低），包括分子大小和结构相近的其他多糖不被 rVAR2 吸附，很容易被洗涤去除，获得高纯度的 pl-CSA；而在洗涤液条件，pl-CSA 被 rVAR2 配基牢固结合，洗脱液条件容易释放，从而获得了较高的回收率。

本发明一个方面提供了一种胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的纯化方法，所述纯化方法为以亲和层析的方法对胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物进行层析纯化，其中亲和层析柱材为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物。

在本发明的实施方案中，层析纯化的方法为将胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的粗品上样于亲和层析柱上，并以洗涤液进行洗涤至没有杂质流出，再以洗脱液进行洗脱并收集胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的纯品。

在本发明的实施方案中，胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的粗品上样与层析柱材体积比为 1: 0.5-2，优选为 1: 0.8-1.2，更优选为 1: 1。

在本发明的实施方案中，洗涤液的洗脱体积为 3 倍以上柱体积，更优选为 5 倍以上柱体积，更优选为 5-10 倍柱体积。

在本发明的实施方案中，洗脱液的洗脱体积为 5 倍以上柱体积，更优选为 8

倍以上柱体积，更优选为 10 倍柱体积。

在本发明的实施方案中，亲和层析所用的洗涤剂 pH 值 7-9，更优选择 pH 值 7-8，更优选择 pH 值 7.2，洗脱剂 pH 值为 2-4，更优选择 pH 值 2.2-3.6，更优选择 pH 值 3.0。

在本发明一个具体的实施方案中，所述洗脱剂中包含保护剂，优选地，所述保护剂为甘氨酸、维生素 C、维生素 E、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、甲硫氨酸、硫脲、乙二胺四醋酸二钠、枸橼酸中的一种或几种的组合物。

在本发明一个具体的实施方案中，所述洗涤剂中包含盐溶液。

在本发明的一个具体的实施方案中，所述洗涤剂为 0.1 M NaCl，0.02 M Na₂HPO₄，选择 pH 值为 7.2。

在本发明的一个具体的实施方案中，所述洗脱剂为 0.1 M 甘氨酸，pH 值为 3。

在本发明的实施方案中，当以洗脱液进行洗脱后，检测流出物的 pH 值，当 pH 值为 6.8 时开始收集胎盘样硫酸软骨素 A 纯品，以紫外监测仪确定收集峰值。

在本发明中，重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物中所述重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白的基因信息为 ID: GU249598，编码包含 ID1-ID2 在内的一段富含半胱氨酸的区域（1273-3897），所述亲和层析载体选自琼脂糖、纤维素、交联葡聚糖、聚丙烯酰胺、多孔玻璃珠中的一种或多种；重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物中，所述的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白为疟原虫感染红细胞表面抗原 VAR2CSA 与 pl-CSA 最小结合部分重组合成的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白，重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质通过化学键进行偶联。所述重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白的序列如 SEQ ID No.2 所示。

SEQ ID No.1 如下所示

```
GGATCCCTGGAAACTACATCAAGGGCGACCCCTATTTTCGCTGAGTAC
GCTACAAACTGAGCTTCATCCTGAACCCCAGCGACGCCAACAACCCAG
CGGCGAGACAGCCAACCACAACGACGAGGCCTGCAACTGCAACGAGAGC
GGCATCAGCAGCGTGGGCCAGGCTCAGACATCCGGCCCTAGCAGCAACAA
GACCTGTATCACCCACAGCTCCATCAAGACCAACAAGAAAAAAGAATGCA
```

AGGACGTGAAGCTGGGCGTGCGGGAGAACGACAAGGATCTGAAGATCTG
CGTGATCGAGGACACCAGCCTGAGCGGCGTGGACAACTGCTGCTGCCAGG
ATCTGCTGGGCATCCTGCAGGAAAAGTGCAGCGACAACAAGCGGGGCAGC
AGCTCCAACGACAGCTGCGACAATAAGAACCAGGACGAGTGCCAGAAAA
AGCTGGAAAAGGTGTTTCGCCAGCCTGACCAACGGCTACAAGTGCGATAAG
TGCAAGAGCGGCACCTCCCGGTCCAAGAAGAAGTGGATCTGGAAGAAGTC
CAGCGGCAACGAGGAAGGCCTGCAGGAAGAGTACGCCAACACCATCGGC
CTGCCCCCAGGACCCAGAGCCTGTACCTGGGCAATCTGCCCAAAGTGA
AAACGTGTGCGAGGATGTGAAGGACATCAACTTCGACACCAAAGAGAAGT
TTCTGGCCGGCTGCCTGATCGTGTCTTCCACGAGGGCAAGAATCTGAAGA
AGCGCTACCCCCAGAATAAGAACAGCGGCAACAAAGAAAACCTGTGCAA
GGCTCTGGAATACAGCTTCGCCGACTACGGCGACCTGATCAAGGGCACCTC
CATCTGGGACAACGAGTACACAAAGGACCTGGAAGTGAATCTGCAGAACAA
ACTTCGGCAAGCTGTTTCGGCAAGTACATCAAGAAGAACAATACCGCCGAG
CAGGACACCTCCTACAGCTCCCTGGACGAGCTGCGCGAGTCTTGGTGAAT
ACCAATAAGAAGTACATCTGGACCGCCATGAAGCACGGCGCCGAGATGAA
CATCACCACCTGTAACGCCGACGGCTCCGTGACCGGCAGCGGCTCCAGCT
GCGACGACATCCCCACCATCGACCTGATCCCCAGTACCTGAGATTTCTGC
AGGAATGGGTTCGAGAACTTCTGCGAGCAGCGGCAGGCCAAAGTGAAGGA
CGTGATCACCAACTGCAAGAGCTGCAAAGAATCCGGCAACAAATGCAAGA
CCGAGTGCAAAACCAAGTGCAAGGATGAGTGCGAGAAGTACAAGAAGTT
CATCGAGGCCTGCGGCACAGCCGGCGGAGGCATCGGAACAGCCGGCAGCC
CCTGGTCCAAGAGATGGGACCAGATCTACAAGCGGTACAGCAAGCACATC
GAGGACGCCAAGCGGAACCGGAAGGCCGGCACCAAGAAGTGCGGCACCA
GCTCCACCACCAACGCCGCTGCCAGCACCGACGAGAATAAGTGCGTGCAG
AGCGACATCGACAGCTTTTTCAAGCACCTGATCGATATCGGCCTGACCACC
CCCAGCAGCTACCTGAGCAACGTGCTGGACGACAACATCTGTGGCGCCGA
CAAGGCCCCCTGGACAACCTATACAACATACTACAACCGAGAAGTGCA
ACAAAGAGCGGGACAAGAGCAAGAGCCAGAGCAGCGACACCCTGGTGGT
GGTGAACGTGCCCAGCCCCCTGGGCAACACACCCTACCGGTACAAGTACG
CCTGCCAGTGCAAGATCCCCACCAACGAGGAAACATGCGACGACCGGAAA
GAATACATGAACCAGTGGTCCTGCGGGAGCGCTCGGACCATGAAGAGAGG
GTATAAGAACGATAACTACGAACTGTGCAAGTACAACGGCGTGGATGTGAA
GCCCACCACCGTGCGGAGCAACTCCAGCAAGCTGGACGGCAACGACGTG

ACCTTCTTCAACCTGTTCGAGCAGTGGAACAAAGAAATCCAGTACCAGATC
GAGCAGTACATGACCAACGCCAACATCAGCTGCATCGATGAGAAAGAAGT
GCTGGACAGCGTCTCCGACGAGGGCACCCCCAAAGTGCGGGGAGGCTACG
AGGACGGCCGGAACAACAACACAGATCAGGGCACAAATTGCAAAGAAAA
GTGCAAGTGCTACAAGCTGTGGATCGAGAAGATCAACGATCAGTGGGGCA
AGCAGAAGGACAACCTACAACAAGTTCCGGTCCAAGCAGATCTACGACGCC
AATAAGGGCAGCCAGAACAAAAAGGTGGTGTCCCTGAGCAACTTCCTGTT
CTTCAGCTGCTGGGAGGAATACATCCAGAAGTACTTCAACGGCGATTGGAG
CAAGATCAAGAACATCGGCTCCGACACCTTCGAGTTTCTGATCAAGAAGTG
CGGCAACAACAGCGCCACGGCGAGGAAATCTTCAGCGAGAAGCTGAAG
AACGCCGAGAAGAAGTGCAAAGAGAACGAGAGCACCGACACCAATATCA
ACAAGAGCGAGACATCCTGCGACCTGAACGCCACCAACTACATCCGGGGC
TGCCAGAGCAAGACCTACGACGGCAAGATCTTCCCCGGCAAGGGCGGGCGA
GAAGCAGTGGATTTGCAAGGACACCATCATCCACGGCGACACCAACGGCG
CCTGCATCCCCCTCGCACCCAGAACCTGTGCGTGGGCGAGCTGTGGGAC
AAGTCCTACGGCGGCAGATCCAACATCAAGAACGATACCAAAGAACTGCT
GAAAGAGAAGGTCGAC

SEQ ID No.2 如下所示:

LENYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDEACNCNESGISS
VGQAQTS GPSSNKT CITHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSL
SGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSSSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLT
NGYKCDKCKSGTSRSKWKWIWKKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGN
LPKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKEN
LCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLF GK YIKKNNTA
EQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSS
CDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTEC
KTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKR
NRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVL
DDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNT
YRYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKY
NGVDVKPTTVRSNSSKLDGNDVTFFNLFEQWNKEIQYQIEQYMTNANISCIDE
KEVLDSVSDEGTPKVRGGYEDGRNNNTDQGTNCKEKCKCYKLWIEKINDQW
GKQKDNYNKFRRSKQIYDANKGSQNKKVVSLSNFLFFSCWEEYIQKYFNGDW

SKIKNIGSDTFEFLIKKCGNNSAHGEEIFNEKLKNAEKKCKENESTDTNINKSE
TSCDLNATNYIRGCQSKTYDGKIFPGKGGEKQWICKDTIIHGDNTGACIPRTQ
NLCVGELWDKSYGGRSNIKNDTKELLKEK

在本发明中，重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物的制备方法为将重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质通过缩合交联剂进行偶和，所述的交联剂选自 DCC、DIC、EDC、NHS、Hobt 中的一种或多种偶联。

本发明另一个方面提供了一种胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的制备方法，其包括如下步骤：

- 1) 制备胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的粗品；
- 2) 纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的粗品，得到胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的纯品。

其中步骤 2) 中的纯化方法采用本发明上述的胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的粗品纯化方法。

在本发明的技术方案中，制备胎盘样硫酸软骨素 A 粗品的方法为：

- 1-1) 将猪胎盘破碎或者将连续培养的滋养层细胞半机械分离，得到组织细胞浆液；
- 1-2) 将组织细胞浆液以裂解液进行裂解，得到裂解的组织细胞浆液；
- 1-3) 将裂解的组织细胞浆液灭酶后除去蛋白，得到胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的粗品。

在本发明中，所述重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白的制备方法为：

- 1) 基因合成配基编码基因片段，既通过基因合成手段合成 2760 bp 的基因片段，以 ID: GU249598 为参照，编码包含 ID1-ID2 在内的一段富含半胱氨酸的区域（1273-3897，即 SEQ ID No.2）的核苷酸序列即 SEQ ID No.1，并在其末端设置 6×His 标签的编码序列；

- 2) 配基 rVAR2 的重组表达，既将基因片段通过 5 端 BamH I、3 端 Sal I 双酶切位点连接 pET28a(+) 载体，转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞，通过 PCR 和测序验证阳性克隆；将阳性克隆接种卡那霉素 LB 液体培养基，37℃ 摇床 220rpm 培养 16 个小时后，加入 0.5 mM 的 IPTG 进行诱导，4~6 小时后收集菌体，超声波破碎收集重组蛋白混合液；

3) 配基 rVAR2 的分离纯化, 既通过 Ni^{2+} 亲和层析纯化方法, 获得 rVAR2 纯品。

本发明另一个方面提供了一种用于纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的材料, 其为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白。

本发明另一个方面提供了一种用于纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的层析柱材, 其为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析载体的偶联物。

本发明另一个方面提供了重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白在制备纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的层析柱材中的用途。

在本发明中, 所述胎盘样硫酸软骨素 A 衍生物选自具有硫酸软骨素 A 的蛋白、硫酸软骨素 A 蛋白聚糖、被硫酸软骨素 A 修饰的胎盘源分泌体中一种或多种。由于其衍生物中具有胎盘样硫酸软骨素 A 结构, 因此可以采用本发明的特异性亲和层析柱材对其进行纯化。

本发明另一个方面提供了重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白在纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物中的用途。

本发明再一个方面提供了一种用于胎盘样硫酸软骨素 A 的亲和层析纯化系统, 其从上游至下游依次包括进样装置、电极三通、进样恒流泵、亲和层析柱、排液恒流泵、电极二通、收集装置和紫外检测装置。

在本发明的亲和层析纯化系统中, 进样装置包含 3 个进样容器, 其通过三条通道分别与电极三通相连, 电极三通为液位感应三通。3 个进样容器分别用于乘放 pl-CSA 粗品、洗涤液和洗脱液。

在本发明的亲和层析纯化系统中, 进样恒流泵与排液恒流泵的流速一致。

在本发明的亲和层析纯化系统中, 亲和层析柱中设置有本发明所述的用于纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的层析柱材。

在本发明的亲和层析纯化系统中, 电极二通为酸碱度感应二通, 收集装置包含 2 个收集容, 其通过两条通道分别与电极二通相连, 2 个收集容器分别用于乘放废液和产物。

在本发明亲和层析纯化系统中, 用于检测流出物的紫外检测装置与电极三通和电极二通分别连接, 紫外监控仪通过检测流动相的光吸收值的改变和 pH 值的改变控制电极三通和电极二通, 从而开启或关闭进样阀门和收集器阀门。

有益效果

本发明利用细胞表面多糖被配体特异性识别的原理,既滋养层细胞表面的胎盘样硫酸软骨素 A (pl-CSA) 能被疟原虫感染红细胞表面抗原 VAR2CSA 特异性的识别结合,以重组合成的 VAR2CSA 与 pl-CSA 最小结合部分 (rVAR2) 为配基,通过与 NHS 活化的琼脂糖偶联制备亲和层析柱材,建立 pl-CSA 亲和层析纯化方法,这一方法能够克服多糖纯化的困难 (回收率低、纯度低),包括分子大小和结构相近的其他多糖不被 rVAR2 吸附,很容易被洗涤去除,获得高纯度的 pl-CSA;而洗涤液条件 pl-CSA 被 rVAR2 配基牢固结合,洗脱液条件容易释放,获得了较高的回收率。

附图说明

图 1. 本发明的技术路线图。

图 2. 本发明的工艺流程图。

图 3. pET28a (+) -rVAR2 原核表达。

A: 原核表达质粒; B: 原核表达质粒双酶切鉴定 (1: BamHI 单酶切; 2: Sall 单酶切; 3: BamHI、Sall 双酶切; M: DNA marker DL15000); C: 原核表达菌 PCR 鉴定 (1-16: 不同菌液 PCR 鉴定; M: DNA marker DL2000)。

图 4. rVAR2 的制备和纯化。

A: rVAR2 蛋白在不同感受态中表达 (1: TransBL21; 2: BL21(DE3); 3: BL21; BL21(DE3)阴性菌); B: 重组菌抗 6×His 抗体 WB 验证 (1: TransBL21; 2: BL21(DE3); 3: BL21; BL21(DE3)阴性菌); C: 纯化过程中各组分 (1: rVAR2 粗样品; 2: 8M 尿素裂解过滤后的样品; 3: 洗涤液样品; 4: 纯化后的 rVAR2; 5: BL21(DE3)阴性菌液; M: protein plus 250 kD) D: 纯化过程中各组分抗 6×His 抗体 WB 验证 (1: rVAR2 粗样品; 2: 8M 尿素裂解过滤后的样品; 3: 洗涤液样品; 4: 纯化后的 rVAR2; 5: BL21(DE3)阴性菌液; M: protein plus 250 kD)。

图 5. PI-CSA 得纯化过程产物。

A: 从猪胎盘中分离纯化 pl-CSA 的过程产物 (1 和 2: 裂解、酶解产物; 3 和 4: 去蛋白、0.45 μm 滤膜过滤后的产物; 5. 过层析系统后的纯 pl-CSA); B: 从细胞中分离纯化 pl-CSA 的过程产物 (1: 酶解、去蛋白、0.45 μm 滤膜过滤后的产物; 2: 过层析系统后的纯 pl-CSA)。

具体实施方式

实施例1 制备并纯化胎盘样硫酸软骨素A

包括如下实验步骤：

(1) 猪胎盘破碎 (4 °C 破碎仪 4 M 破碎 60 sec) 或者连续培养的滋养层细胞系半机械分离 (0.05% 的胰酶加离心力甩：胰酶室温作用 3 min，离心力 560 g 作用 3 min)，得到组织细胞浆液；

(2) 将步骤 (1) 获得的组织细胞浆液与裂解液混合 ($V_{\text{细胞浆液}} : V_{\text{裂解液}} = 1:10$)，裂解液中含 RNase、DNase I、胰酶和 protease K (各酶液终浓度为 1 U/ml 或 1 $\mu\text{g/ml}$)，pH 值 7.0~9.0，优选条件是 pH 值 8.0，超声波破碎仪 50% 的功率冰浴条件超声 2 sec、间隔 2 sec、时长 30 sec/ml，得到裂解的组织细胞浆液；

(3) 将步骤 (2) 获得的裂解的组织细胞浆液 4 °C 放置 12~16 h，然后 85 °C 水浴 2 min 灭活裂解液中的酶；加入 1/4 体积的 Sevag 液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$)，剧烈振荡 5 min 后 4100 g 离心 10 min，取上清；0.45 μm 的滤膜过滤既得到 pl-CSA 粗品，苯酚硫酸法检测多糖含量，一周内置于 4 °C 保存，长期置于 -20 °C 或 -80 °C。

(4) 对疟原虫感染红细胞表面抗原 VAR2CSA 基因序列 (FCR3 虫株，GenBank accession no. GU249598) 进行分析，合成与 pl-CSA 亲和能力较强肽段的基因片段 SEQ ID No.1，以 ID: GU249598 为参照，长度 2760 bp，其中包含有 6 $\times$ His 标签的编码序列，编码包含 ID1-ID2 在内的一段富含半胱氨酸的区域 (1273-3897) 蛋白，其编码序列如 SEQ ID No.1 所示。

SEQ ID No.1 如下所示

```
GGATCCCTGGAAACTACATCAAGGGCGACCCCTATTTTCGCTGAGTA
CGCTACAAACTGAGCTTCATCCTGAACCCAGCGACGCCAACAACCCCA
GCGGCGAGACAGCCAACCACAACGACGAGGCCTGCAACTGCAACGAGAG
CGGCATCAGCAGCGTGGGCCAGGCTCAGACATCCGGCCCTAGCAGCAACA
AGACCTGTATCACCCACAGCTCCATCAAGACCAACAAGAAAAAGAATG
CAAGGACGTGAAGCTGGGCGTGCGGGAGAACGACAAGGATCTGAAGATC
TGCGTGATCGAGGACACCAGCCTGAGCGGCGTGACAACTGCTGCTGCCA
GGATCTGCTGGGCATCCTGCAGGAAACTGCAGCGACAACAAGCGGGGC
AGCAGCTCCAACGACAGCTGCGACAATAAGAACCAGGACGAGTGCCAGA
AAAAGCTGGAAAAGGTGTTCGCCAGCCTGACCAACGGCTACAAGTGCGAT
```

AAGTGCAAGAGCGGCACCTCCCGGTCCAAGAAGAAGTGGATCTGGAAGA
AGTCCAGCGGCAACGAGGAAGGCCTGCAGGAAGAGTACGCCAACACCAT
CGGCCTGCCCCCAGGACCCAGAGCCTGTACCTGGGCAATCTGCCCAAAC
TGGA AAAACGTGTGCGAGGATGTGAAGGACATCAACTTCGACACCAAAGA
GAAGTTTCTGGCCGGCTGCCTGATCGTGTCTTCCACGAGGGCAAGAATC
TGAAGAAGCGCTACCCCCAGAATAAGAACAGCGGCAACAAAGAAAACCT
GTGCAAGGCTCTGGAATACAGCTTCGCCGACTACGGCGACCTGATCAAGG
GCACCTCCATCTGGGACAACGAGTACACAAAGGACCTGGAAGTGAATCTG
CAGAACA ACTTCGGCAAGCTGTTCCGGCAAGTACATCAAGAAGAACAATAC
CGCCGAGCAGGACACCTCCTACAGCTCCCTGGACGAGCTGCGCGAGTCTT
GGTGGAATACCAATAAGAAGTACATCTGGACCGCCATGAAGCACGGCGC
CGAGATGAACATCACCACTGTAACGCCGACGGCTCCGTGACCGGCAGCG
GCTCCAGCTGCGACGACATCCCCACCATCGACCTGATCCCCCAGTACCTG
AGATTTCTGCAGGAATGGGTGCGAGAACTTCTGCGAGCAGCGGCAGGCCAA
AGTGAAGGACGTGATCACC AACTGCAAGAGCTGCAAAGAATCCGGCAAC
AAATGCAAGACCGAGTGCAAAAACCAAGTGCAAGGATGAGTGCGAGAAGT
ACAAGAAGTTCATCGAGGCCTGCGGCACAGCCGGCGGAGGCATCGGAAC
AGCCGGCAGCCCCTGGTCCAAGAGATGGGACCAGATCTACAAGCGGTAC
AGCAAGCACATCGAGGACGCCAAGCGGAACCGGAAGGCCGGCACCAAGA
ACTGCGGCACCAGCTCCACCACCAACGCCGCTGCCAGCACCGACGAGAAT
AAGTGCGTGCAGAGCGACATCGACAGCTTTTTCAAGCACCTGATCGATAT
CGGCCTGACCACCCCCAGCAGCTACCTGAGCAACGTGCTGGACGACAACA
TCTGTGGCGCCGACAAGGCCCCCTGGACAACCTATACAACATACTACTACA
ACCGAGAAGTGCAACAAAGAGCGGGACAAGAGCAAGAGCCAGAGCAGC
GACACCCTGGTGGTGGTGAACGTGCCCAGCCCCCTGGGCAACACACCCTA
CCGGTACAAGTACGCCTGCCAGTGCAAGATCCCCACCAACGAGGAAACAT
GCGACGACCGGAAAGAATACATGAACCAGTGGTCCTGCGGGAGCGCTCG
GACCATGAAGAGAGGGTATAAGAACGATAACTACGAACTGTGCAAGTAC
AACGGCGTGGATGTGAAGCCCACCAACCGTGCGGAGCAACTCCAGCAAGCT
GGACGGCAACGACGTGACCTTCTTCAACCTGTTTCGAGCAGTGGAACAAAG
AAATCCAGTACCAGATCGAGCAGTACATGACCAACGCCAACATCAGCTGC
ATCGATGAGAAAGAAGTGCTGGACAGCGTCTCCGACGAGGGCACCCCCA
AAGTGCGGGGAGGCTACGAGGACGGCCGGAACAACAACACAGATCAGGG
CACAAATTGCAAAGAAAAGTGCAAGTGCTACAAGCTGTGGATCGAGAAG

ATCAACGATCAGTGGGGCAAGCAGAAGGACAACACTACAACAAGTTCCGGT
CCAAGCAGATCTACGACGCCAATAAGGGCAGCCAGAACAAAAAGGTGGT
GTCCCTGAGCAACTTCCTGTTCTTCAGCTGCTGGGAGGAATACATCCAGA
AGTACTTCAACGGCGATTGGAGCAAGATCAAGAACATCGGCTCCGACACC
TTCGAGTTTCTGATCAAGAAGTGCGGCAACAACAGCGCCCACGGCGAGGA
AATCTTCAGCGAGAAGCTGAAGAACGCCGAGAAGAAGTGCAAAGAGAAC
GAGAGCACCGACACCAATATCAACAAGAGCGAGACATCCTGCGACCTGA
ACGCCACCAACTACATCCGGGGCTGCCAGAGCAAGACCTACGACGGCAA
GATCTTCCCCGGCAAGGGCGGGCAGAGAAGCAGTGGATTTGCAAGGACACC
ATCATCCACGGCGACACCAACGGCGCCTGCATCCCCCCTCGCACCCAGAA
CCTGTGCGTGGGCGAGCTGTGGGACAAGTCCTACGGCGGCAGATCCAACA
TCAAGAACGATACCAAAGAAGTCTGAAAGAGAAGGTTCGAC。

并在其5'端加入BamH I酶切位点，3'端加入Sal I酶切位点；将基因片段SEQ ID No.1与pET28a (+) 原核表达载体相连，转化大肠杆菌BL21感受态细胞，进行原核表达，利用rVAR2末端6×His标签进行Ni²⁺亲和层析，获得高纯度的rVAR2 (684.1 μg/mL)。

(5) 将步骤(4)中获得的高纯度的rVAR2与NHS活化琼脂糖(浓度4%)偶联：取琼脂糖溶于100 mM pH5.5的MES溶液中，加入EDC，轻轻混匀，再加入NHS，轻轻混匀后室温避光反应2 h；随后加入以1mg/g琼脂糖的用量加入rVAR2，轻轻充分混匀，室温避光反应24 h，装柱，用pH值7.2的PBS洗出反应液，收集流出液，并进行浓缩，以SDS-PAGE检测脱落的rVAR2，4 °C储存成功偶联的琼脂糖凝胶既为pl-CSA的rVAR2亲和层析柱；连接储液瓶、管道、电极三通、恒流泵、层析柱、管道、恒流泵、电极二通、样品或废液收集瓶，完成亲和层析纯化系统的组建。

(6) 将步骤(3)中获得的pl-CSA粗品以1 ml/(1 ml柱材)经电极三通过恒流泵进入层析柱，当pl-CSA粗品液面低于第一个柱材体积液面时电极三通关闭，静置30 min，使pl-CSA粗品与柱材上的亲和配基充分结合；电极三通开启洗涤液(0.1 M NaCl, 0.02 M Na₂HPO₄, pH值7.2)，以10倍柱材体积洗涤液去除杂质，液面低于第一个10倍柱材体积液面，电极三通关闭；电极三通开启洗脱液(0.1 M Glycine甘氨酸, pH值3.0)，以5倍柱材体积洗脱液洗脱pl-CSA，电极二通在pH值≥6.8时收集废液，在pH值<6.8时开始，并且有紫外检测仪显示有紫外吸收时，

收集pl-CSA纯样品，第一个纯化流程完成；进出口恒流泵流速一致，电极三通为液位感应三通，电极二通为酸碱度感应二通，紫外监控仪通过检测流动相的光吸收值的改变和pH值的改变控制电极三通和电极二通，从而开启或关闭进样阀门和收集器阀门；收集高纯度pl-CSA，以苯酚硫酸法检测pl-CSA浓度。10倍柱材体积的洗涤缓冲液清洗柱材，完成纯化后将柱材置于含0.01%叠氮钠的洗涤缓冲液中，4 °C储存。

1、一种胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的纯化方法，所述纯化方法为以亲和层析的方法对胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物进行层析纯化，其中亲和层析柱材为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物，所述层析纯化的方法为将胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物粗品上样于亲和层析柱上，并以洗涤液进行洗涤至没有杂质流出，再以洗脱液进行洗脱并收集胎盘样硫酸软骨素 A 纯品或其衍生物纯品。

2、根据权利要求 1 所述的纯化方法，重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物中，所述的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白为疟原虫感染红细胞表面抗原 VAR2CSA 与 pI-CSA 最小结合部分重组合成的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白，且重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白末端链接 His 标签，此重组蛋白与亲和层析基质通过化学键进行偶联；优选地，所述重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白的序列如 SEQ ID No.2 所示。

3、根据权利要求 1-2 任一项所述的纯化方法，胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物粗品上样与层析柱材体积比为 1: 0.5-2，优选为 1: 0.8-1.2，更优选为 1: 1；

亲和层析所用的洗涤剂 pH 值 7-9，更优选为 pH 值 7-8，更优选为 pH 值 7.2；洗脱剂 pH 值为 2-4，更优选为 pH 值 2.2-3.6，更优选为 pH 值 3.0。

4、根据权利要求 1-2 任一项所述的纯化方法，所述洗脱剂中包含保护剂，优选地，所述保护剂为甘氨酸、维生素 C、维生素 E、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、甲硫氨酸、硫脲、乙二胺四醋酸二钠、枸橼酸中的一种或几种的组合物。

5、根据权利要求 1-2 任一项所述的纯化方法，当以洗脱液进行洗脱后，检测流出物的 pH 值，当 $\text{pH} < 6.8$ 且紫外检测仪有紫外吸收时开始收集胎盘样硫酸软骨素 A 纯品或其衍生物纯品。

6、根据权利要求 1-2 任一项所述的纯化方法，洗涤液的洗脱体积为 3 倍以

上柱体积，洗脱液的洗脱体积为 5 倍以上柱体积；更优选洗涤液的洗脱体积为 5 倍以上柱体积，洗脱液的洗脱体积为 8 倍以上柱体积；最优选洗涤液的洗脱体积为 5-10 倍柱体积，洗脱液的洗脱体积为 10 倍柱体积。

7、一种纯化的胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物，纯化的胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物通过权利要求 1-6 任一项所示的纯化方法制备而得。

8、一种用于纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的层析柱材，其为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析载体的偶联物，所述的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白为疟原虫感染红细胞表面抗原 VAR2CSA 与 pI-CSA 最小结合部分重组合成的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白，且重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质通过化学键进行偶联；优选地，所述重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白的序列如 SEQ ID No.2 所示；更优选地，所述亲和层析载体选自琼脂糖、纤维素、交联葡聚糖、聚丙烯酰胺、多孔玻璃珠中的一种或多种。

9、如权利要求 8 所述的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析载体的偶联物作为亲和层析纯化柱材中的用途，优选地，作为用于纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的亲和层析纯化柱材中的用途，更优选地，所述胎盘样硫酸软骨素 A 衍生物选自具有硫酸软骨素 A 的蛋白、硫酸软骨素 A 蛋白聚糖、被硫酸软骨素 A 修饰的胎盘源外泌体中一种或多种。

10、一种用于胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的亲和层析纯化装置，其以权利要求 8 所述的重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析载体的偶联物作为纯化胎盘样硫酸软骨素 A 或其衍生物的层析柱材，优选地，该装置从上游至下游依次包括进样装置、电极三通、进样恒流泵、亲和层析柱、排液恒流泵、电极二通、收集装置和紫外检测装置，其中，进样装置包含 3 个进样容器，其通过三条通道分别与电极三通相连，电极三通为液位感应三通；电极二通为酸碱度感应二通，收集装置包含 2 个收集容，其通过两条通道分别与电极二通相连；用于检测流出物的紫外检测装置与电极三通和电极二通分别连接。

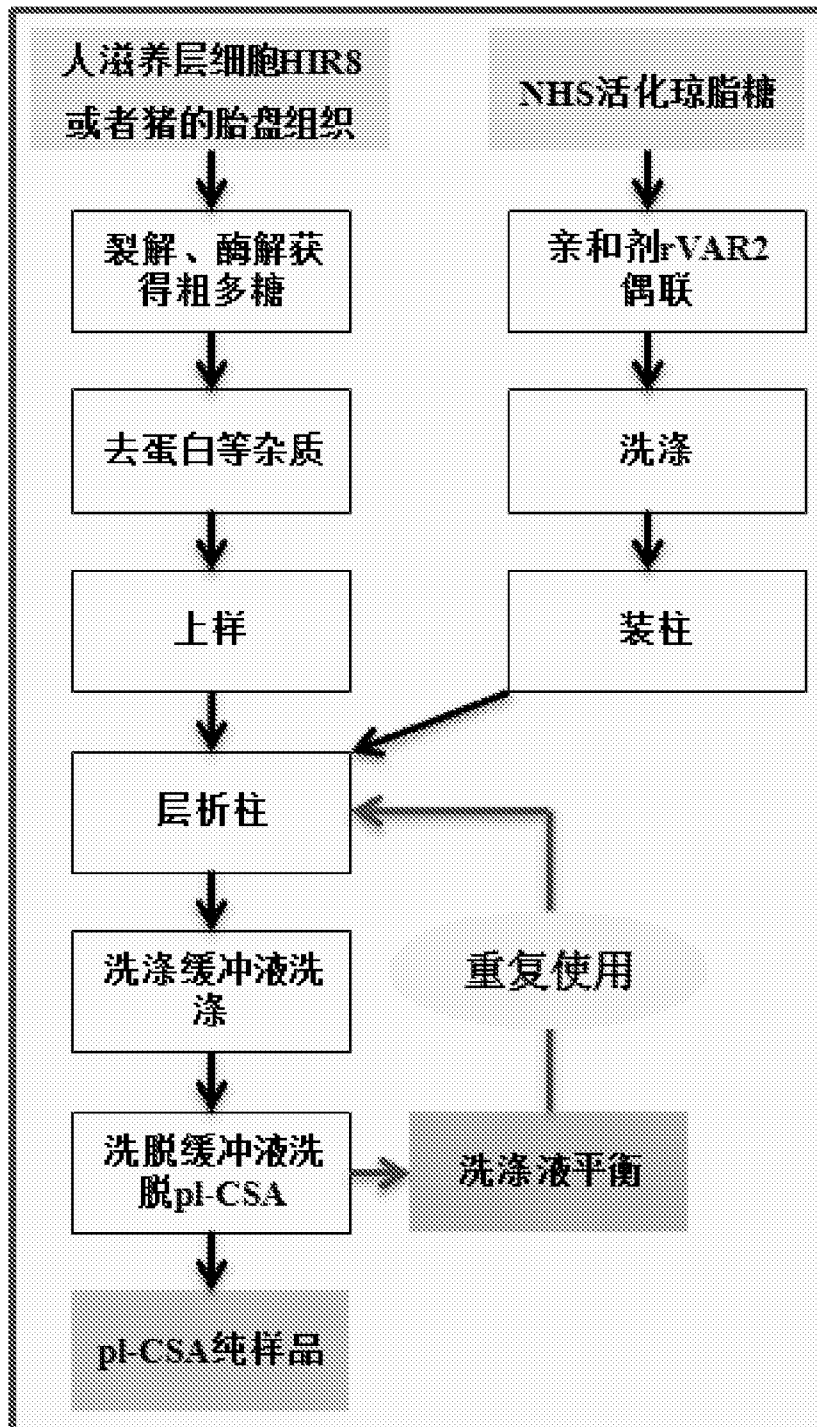


图 1

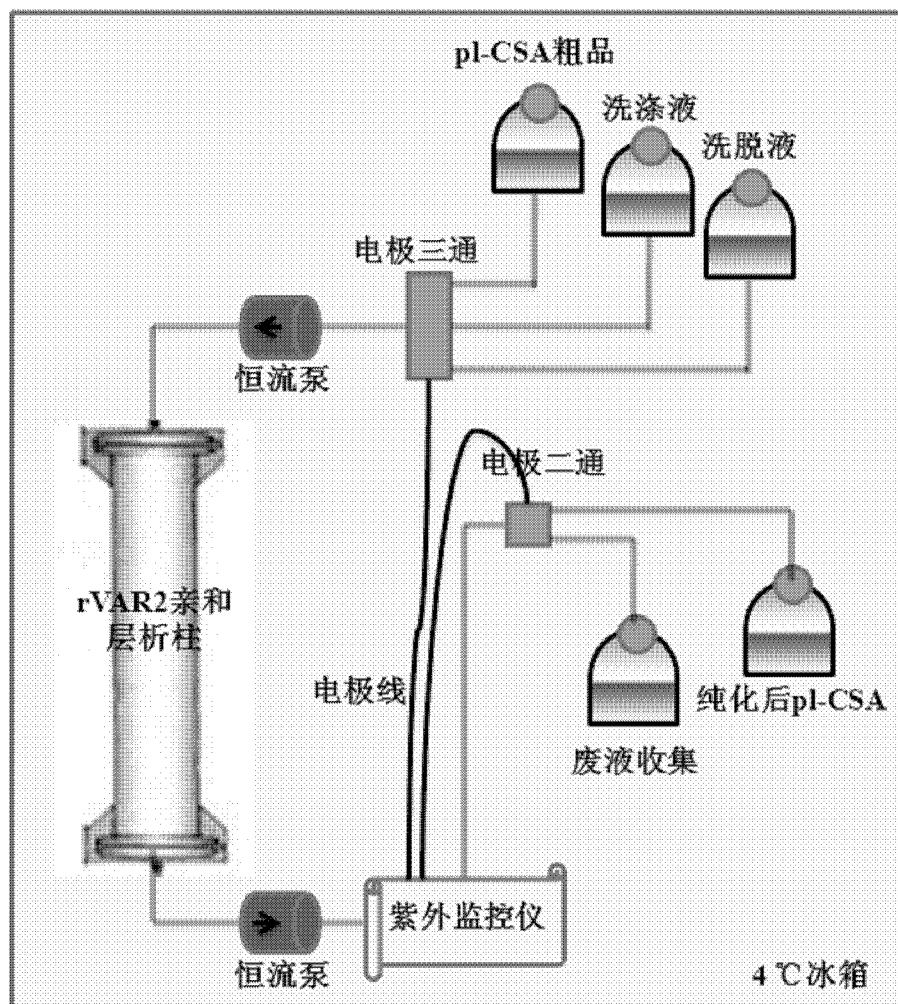


图 2



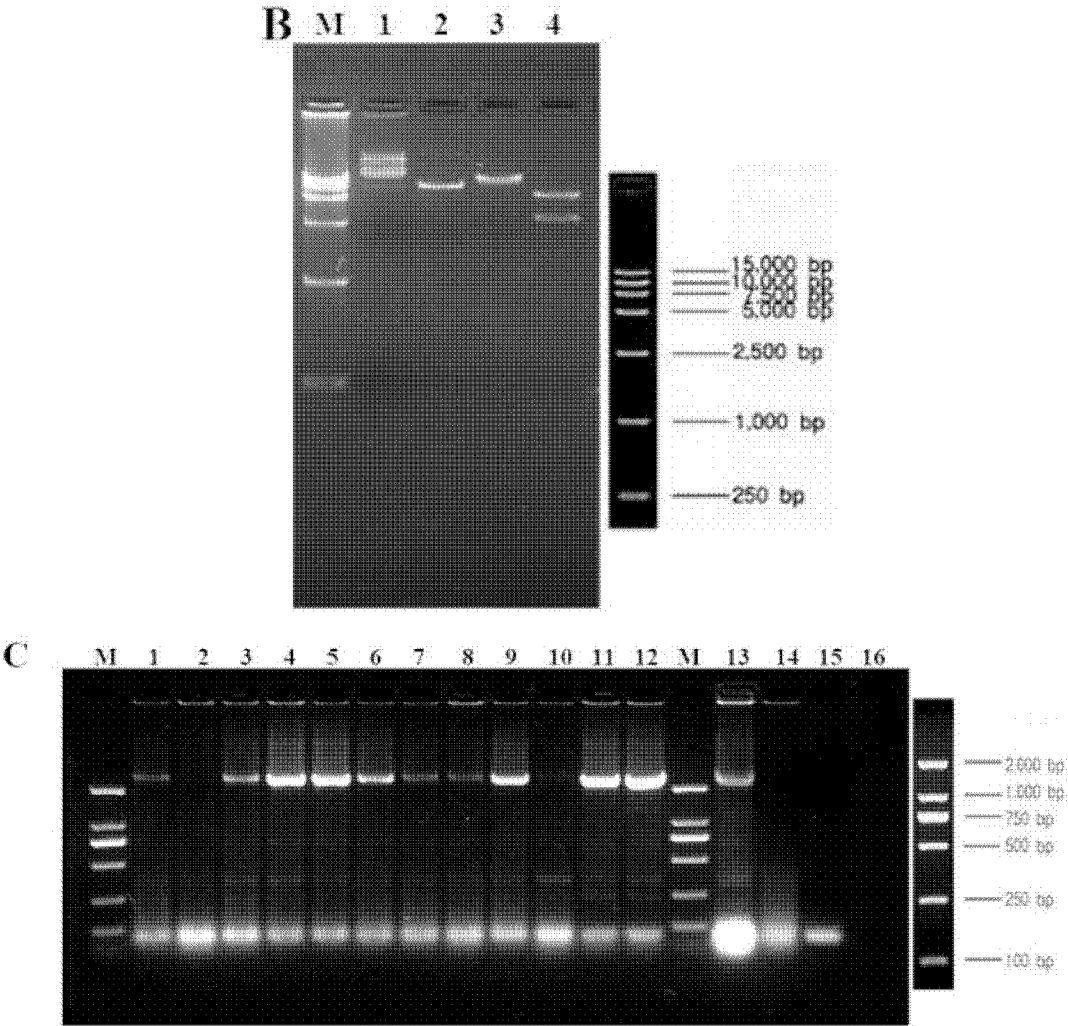


图 3

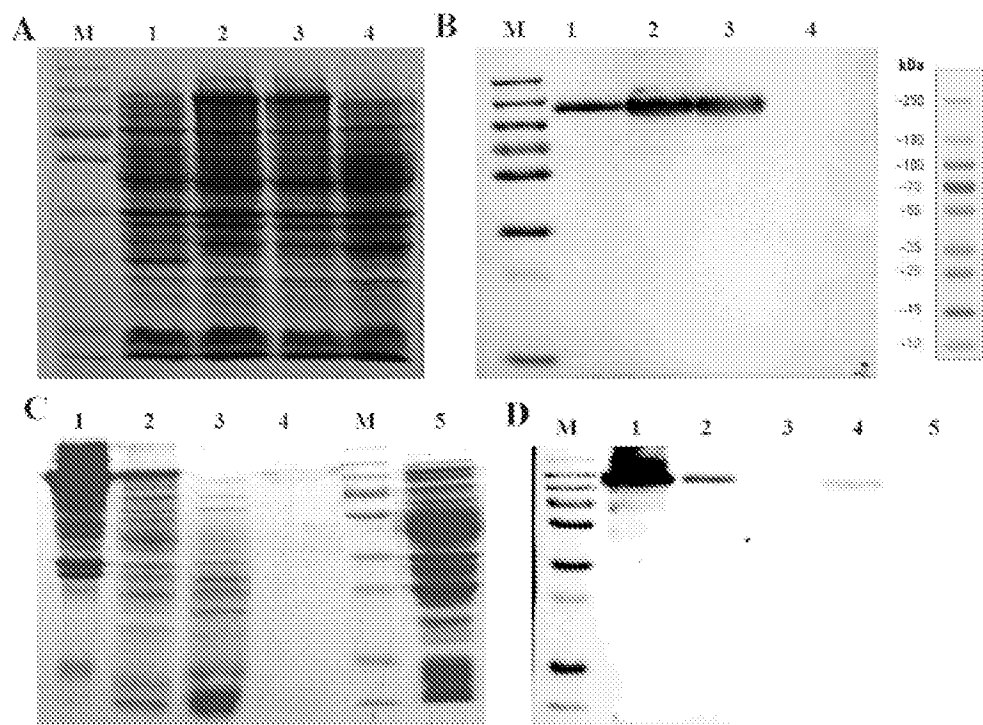


图 4

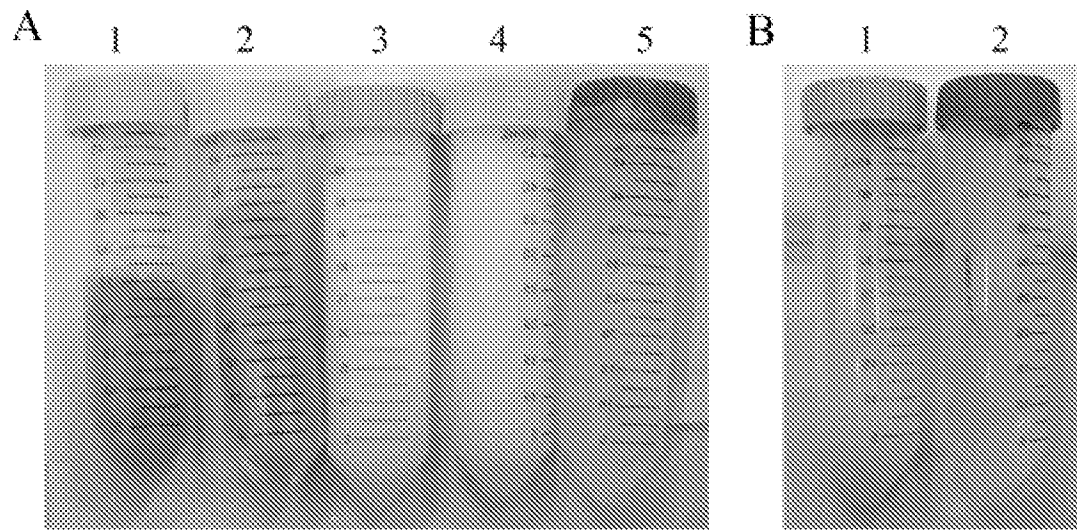


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/116624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B 37/08(2006.01)i; C12P 19/00(2006.01)i; B01D 15/22(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08B; C12P; B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; EBI-EMBL; Google; 申请人/发明人, 序列, 胎盘, 硫酸软骨素A, 亲和层析, 疟原虫感染红细胞表面抗原, 保护剂, 层析柱, 电极, 泵, 紫外检测, placenta, chondroitin sulfate A, affinity chromatography, VAR2CSA, rVAR2, protective agent, column, electrode, pump, UV detection

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106459162 A (ZYMEWORKS INC. ET AL.) 22 February 2017 (2017-02-22) description, table 1	7
Y	CN 104387499 A (JINAN SHENGYUELIN BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.) 04 March 2015 (2015-03-04) claims 1-7	1-6, 8-10
Y	CLAUSEN, T. M. et al. "Structural and Functional Insight into How the Plasmodium falciparum VAR2CSA Protein Mediates Binding to Chondroitin Sulfate A in Placental Malaria." <i>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i> , Vol. 287, No. 28, 06 July 2012 (2012-07-06), pp. 23332-23345	1-6, 8-10
Y	DAHLBÄCK, M. et al. "The Chondroitin Sulfate A-binding Site of the VAR2CSA Protein Involves Multiple N-terminal Domains." <i>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i> , Vol. 286, No. 18, 06 May 2011 (2011-05-06), pp. 15908-15917	1-6, 8-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 2018

Date of mailing of the international search report

10 July 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/116624**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104136041 A (VAR2 PHARMACEUTICALS APS) 05 November 2014 (2014-11-05) description, paragraph 4	1-6, 8-10
Y	SALANTI, A. et al. "Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria." <i>MOLECULAR MICROBIOLOGY</i> , Vol. 49, No. 1, 31 December 2003 (2003-12-31), pp. 179-191	1-6, 8-10
Y	WO 2016135291 A1 (VAR2 PHARMACEUTICALS APS) 01 September 2016 (2016-09-01) description, p. 2, paragraph 3	1-6, 8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/116624

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/116624

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106459162	A	22 February 2017	BR	112016015105	A8	24 April 2018
				JP	2017505335	A	16 February 2017
				WO	2015095952	A1	02 July 2015
				KR	20160125361	A	31 October 2016
				US	2017246310	A1	31 August 2017
				AU	2014373640	A1	07 July 2016
				CA	2935064	A1	02 July 2015
				EP	3087091	A1	02 November 2016
				US	2018117163	A9	03 May 2018
				SG	11201605260V	A	28 July 2016
				EP	3087091	A4	14 June 2017
				MX	2016008448	A	09 January 2017
				RU	2016130348	A	31 January 2018
CN	104387499	A	04 March 2015	CN	104387499	B	08 February 2017
CN	104136041	A	05 November 2014	EP	2812024	A1	17 December 2014
				US	2015004099	A1	01 January 2015
				JP	2015513524	A	14 May 2015
				WO	2013117705	A1	15 August 2013
				CA	2861051	A1	15 August 2013
				BR	112014018630	A2	04 July 2017
				US	2017016905	A1	19 January 2017
				AU	2013217986	A1	24 July 2014
				IL	233594	D0	31 August 2014
				US	9926350	B2	27 March 2018
				US	2017081373	A1	23 March 2017
				EP	2812024	B1	11 April 2018
				SG	10201606195U	A	29 September 2016
				EA	201491494	A1	30 January 2015
				US	9932375	B2	03 April 2018
				SG	11201403988W	A	30 October 2014
				JP	2018076333	A	17 May 2018
				AU	2013217986	B2	27 April 2017
WO	2016135291	A1	01 September 2016	AU	2016223379	A1	07 September 2017
				CN	107438625	A	05 December 2017
				EP	3262063	A1	03 January 2018
				CA	2977434	A1	01 September 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/116624

A. 主题的分类 C08B 37/08(2006.01)i; C12P 19/00(2006.01)i; B01D 15/22(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C08B; C12P; B01D 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; EBI-EMBL; Google; 申请人/发明人, 序列, 胎盘, 硫酸软骨素A, 亲和层析, 疟原虫感染红细胞表面抗原, 保护剂, 层析柱, 电极, 泵, 紫外检测, placenta, chondroitin sulfate A, affinity chromatography, VAR2CSA, rVAR2, protective agent, column, electrode, pump, UV detection		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 106459162 A (醇活有限公司 等) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书表1	7
Y	CN 104387499 A (济南盛岳林生物工程有限公司) 2015年 3月 4日 (2015 - 03 - 04) 权利要求1-7	1-6, 8-10
Y	CLAUSEN, T. M. 等. "Structural and Functional Insight into How the Plasmodium falciparum VAR2CSA Protein Mediates Binding to Chondroitin Sulfate A in Placental Malaria." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., 第287卷, 第28期, 2012年 7月 6日 (2012 - 07 - 06), 第23332-23345页	1-6, 8-10
Y	DAHLBÄCK, M. 等. "The Chondroitin Sulfate A-binding Site of the VAR2CSA Protein Involves Multiple N-terminal Domains." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., 第286卷, 第18期, 2011年 5月 6日 (2011 - 05 - 06), 第15908-15917页	1-6, 8-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2018年 6月 29日		2018年 7月 10日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		郭婷婷 电话号码 86-(10)-53961925

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 104136041 A (VAR2制药有限公司) 2014年 11月 5日 (2014 - 11 - 05) 说明书第4段	1-6, 8-10
Y	SALANTI, A. 等. "Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria." MOLECULAR MICROBIOLOGY., 第49卷, 第1期, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第179-191页	1-6, 8-10
Y	WO 2016135291 A1 (VAR2 PHARMACEUTICALS APS) 2016年 9月 1日 (2016 - 09 - 01) 说明书第2页第3段	1-6, 8-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/116624

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106459162	A	2017年 2月 22日	BR	112016015105	A8	2018年 4月 24日
				JP	2017505335	A	2017年 2月 16日
				WO	2015095952	A1	2015年 7月 2日
				KR	20160125361	A	2016年 10月 31日
				US	2017246310	A1	2017年 8月 31日
				AU	2014373640	A1	2016年 7月 7日
				CA	2935064	A1	2015年 7月 2日
				EP	3087091	A1	2016年 11月 2日
				US	2018117163	A9	2018年 5月 3日
				SG	11201605260V	A	2016年 7月 28日
				EP	3087091	A4	2017年 6月 14日
				MX	2016008448	A	2017年 1月 9日
				RU	2016130348	A	2018年 1月 31日
CN	104387499	A	2015年 3月 4日	CN	104387499	B	2017年 2月 8日
CN	104136041	A	2014年 11月 5日	EP	2812024	A1	2014年 12月 17日
				US	2015004099	A1	2015年 1月 1日
				JP	2015513524	A	2015年 5月 14日
				WO	2013117705	A1	2013年 8月 15日
				CA	2861051	A1	2013年 8月 15日
				BR	112014018630	A2	2017年 7月 4日
				US	2017016905	A1	2017年 1月 19日
				AU	2013217986	A1	2014年 7月 24日
				IL	233594	D0	2014年 8月 31日
				US	9926350	B2	2018年 3月 27日
				US	2017081373	A1	2017年 3月 23日
				EP	2812024	B1	2018年 4月 11日
				SG	10201606195U	A	2016年 9月 29日
				EA	201491494	A1	2015年 1月 30日
				US	9932375	B2	2018年 4月 3日
				SG	11201403988W	A	2014年 10月 30日
				JP	2018076333	A	2018年 5月 17日
				AU	2013217986	B2	2017年 4月 27日
WO	2016135291	A1	2016年 9月 1日	AU	2016223379	A1	2017年 9月 7日
				CN	107438625	A	2017年 12月 5日
				EP	3262063	A1	2018年 1月 3日
				CA	2977434	A1	2016年 9月 1日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)