



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102574102 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201080043200. 5
 (22) 申请日 2010. 07. 28
 (30) 优先权数据
 09009735. 3 2009. 07. 28 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2012. 03. 27
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2010/004628 2010. 07. 28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/012302 EN 2011. 02. 03
 (73) 专利权人 尹思琪爱克什有限公司
 地址 德国路德维希港
 (72) 发明人 克劳斯·戈特沙尔 马库斯·阿伦特
 安德列亚斯·基施费尔德
 克里斯蒂安·迈耶 马库斯·韦斯
 马丁·维尔特 洛塔尔·齐泽
 (74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
 务所(普通合伙) 11413
 代理人 王春伟 刘继富

(51) Int. Cl.
B01J 20/32(2006. 01)
C07K 1/22(2006. 01)
B01D 15/38(2006. 01)
 (56) 对比文件
 US 6071416 A , 2000. 06. 06,
 WO 2004/024318 A1 , 2004. 03. 25,
 WO 97/10887 A1 , 1997. 03. 27,

审查员 金婷

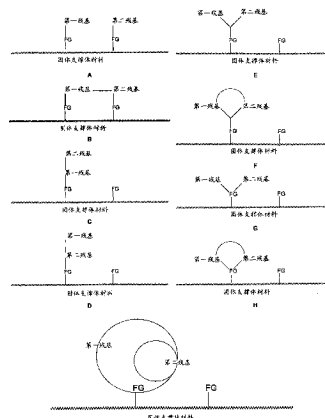
权利要求书2页 说明书62页 附图24页

(54) 发明名称

用于结合蛋白质和肽的特异性吸附剂及使用其的分离方法

(57) 摘要

含有固体支持体材料的吸附剂, 该固体支持体材料的表面包含第一残基和第二残基, 所述第一残基包含双核杂芳结构, 所述双核杂芳结构除碳原子以外还含有杂原子 N、O、S 中的至少一个, 所述第二残基包含单核杂芳结构, 所述单核杂芳结构除碳原子以外还含有杂原子 N、O、S 中的至少一个。



CN 102574102 B

1. 包含固体支持体材料的吸附剂,所述固体支持体材料的表面包含
 - 第一残基,所述第一残基包含双核杂芳结构,所述双核杂芳结构除碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个 ;和
 - 第二残基,所述第二残基包含单核杂芳结构,所述单核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个 ;其特征在于,所述第一残基和所述第二残基不是彼此直接连接,而是单独地连接至由它作为载体所支持的聚合物膜,
 - 其中所述的双核杂芳结构是苯并吡咯结构或苯并吡啶结构,所述苯并吡咯结构包括所有可能的氮杂-苯并吡咯结构、氧杂-苯并吡咯结构和硫代-苯并吡咯结构,所述苯并吡啶结构包括所有可能的氮杂-苯并吡啶结构、氧杂-苯并吡啶结构和硫代-苯并吡啶结构,以及
 - 其中所述的单核杂芳结构是吡咯结构,包括所有可能的氮杂-吡咯结构、氧杂-吡咯结构和硫代-吡咯结构。
2. 如权利要求 1 所述的吸附剂,其中所述的单核杂芳结构是 3- 氮杂吡咯结构。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的吸附剂,其中所述第一残基和 / 或所述第二残基含有长度为 1 至 20 个原子的共价的、构象柔性的连接体。
4. 如权利要求 1 或 2 所述的吸附剂,其中所述固体支持体材料的所述表面还包含第三残基和任选地第四残基。
5. 如权利要求 4 所述的吸附剂,其中所述的第三残基包含胺或酰胺结构或伯胺结构。
6. 如权利要求 5 所述的吸附剂,其中所述第一残基、所述第二残基和所述第三残基以 1:1:2 的摩尔比存在。
7. 如权利要求 1 或 2 所述的吸附剂,其中所述固体支持体材料的所述表面被聚合物膜覆盖,所述的聚合物膜包含第一官能团和第二官能团,所述第一官能团和所述第二官能团是相同的或是彼此不同的,所述第一官能团和所述第二官能团可携带所述第一残基和所述第二残基以及任选地第三残基和第四残基。
8. 如权利要求 7 所述的吸附剂,其中所述的聚合物包含单独链或由单独链组成,所述的单独链彼此共价交联,但不共价结合至所述载体的所述表面。
9. 如权利要求 7 所述的吸附剂,其中所述的聚合物是聚胺或聚乙烯基胺或包含聚胺的共聚物或聚合物共混物。
10. 如权利要求 7 所述的吸附剂,其中所述聚合物的膜的所述官能团的第一部分通过至少一种交联剂交联,并且其中所交联的聚合物的所述官能团的第二部分与所述第一残基和第二残基和任选其它残基结合。
11. 用于制备如权利要求 10 中所要求保护的吸附剂的方法,包括以下步骤:
 - (i) 提供具有第一官能团和第二官能团的聚合物 ;
 - (ii) 将所述聚合物的膜吸附至载体的表面 ;
 - (iii) 用至少一种交联剂将所吸附的聚合物的所述官能团的第一部分交联 ;
 - (iv) 将所交联的聚合物的所述官能团的第二部分与所述第一残基、第二残基和任选其它残基结合。
12. 从含有蛋白质或肽的混合物中分离所述蛋白质或肽或增加其浓度和 / 或纯度的方

法,包括以下步骤:

(i) 将溶解或悬浮在第一液体中的所述混合物与如权利要求 1 至 10 中任一项中所要求保护的吸附剂或与根据权利要求 11 制备的吸附剂接触足以使所述蛋白质或肽结合至所述吸附剂的时间;

(ii) 任选地用第二液体漂洗所述吸附剂;

(iii) 将带有所结合的蛋白质或肽的所述吸附剂与第三液体接触足以使所述蛋白质或肽从所述吸附剂中释放出来的时间;

(iv) 任选地用第四液体和 / 或第五液体洗涤和 / 或再生所述吸附剂。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述第一液体和任选地所述第二液体的 pH 接近于所述蛋白质或肽的等电点 pI。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的方法,其中所述第一液体的 pH 范围是 5.5 至 8.5,并且所述第三液体的 pH 范围是 3 至 6.5。

15. 如权利要求 12 或 13 所述的方法,其中所述蛋白质或肽的等电点 pI 为 5.5 至 8.5,分子量为 100 至 500000Da。

用于结合蛋白质和肽的特异性吸附剂及使用其的分离方法

技术领域

[0001] 本专利申请涉及生物分子分离技术领域,具体涉及生物色谱法。

[0002] 发明背景

[0003] 用于生物分子的色谱法介质一直以来都是根据与样品相互作用的下列可能的方式的一种或多种来分类:

[0004] - 疏水相互作用 (“反相”)

[0005] - 亲水相互作用 (“正相”)

[0006] - 阳离子交换

[0007] - 阴离子交换

[0008] - 尺寸排阻

[0009] - 金属离子螯合作用

[0010] 技术发酵过程效力的不断改善导致对简单、经济有效和高选择性的具有处理大蛋白质的能力而并不因此提高液体的需要量的下游提纯技术需求增加。针对给定的分离问题,上述色谱类型传统分步应用,不仅会相应地反映在产品纯度一步步稳定改善方面,而且还会反映在每个阶段产品损失方面,而这种损失会在最后严重地积累,更不用说操作时间和商品成本了。在早期将亲和色谱法引入下游过程可以满足这种要求,这是因为,可以多次显示一连串连续色谱步骤简化成了仅仅一步。尽管有时将亲和色谱法视为其自身的类型,但是从化学的观点,其基于与上述相同的相互作用方式,它通常又以两种或更多种方式的组合为基础。亲和色谱法的主要特征是它对预测定分析物的高特异性,这通常以具有生物学显著性的已知分子识别对(例如抗原-抗体、碳水化合物-外源凝集素、激素-受体或互补核苷酸链之间)为基础。因此,由终端用户根据他的具体分离任务才能定制最具亲和力的吸附剂。为得到完全功能化的吸附剂,通过选择少数几个标准生物共轭技术,将生物亲和残基与支持体材料(其本身可以是市售的)偶联(直接偶联,或通过允许残基在平移运动和旋转运动中有更大自由度的任选链进行偶联)。这类吸附剂的储存期通常很短,并且常常是临用现制。

[0011] 此外,人们已发现,合成亲和配体例如短直链或环状合成肽或肽模拟物(peptidomimetics)以及某些活性染料(主要是三嗪染料)与生物分子发生基团特异性地相互作用。后者是廉价的且易于制备的低分子量残基,该残基没有生物聚合物三级结构中的不稳定性和变异性的缺点。此外,由于它们的分子小且可调、化学活性强,因此即使在没有长链的情况下也可以将它们有效地以定向取向固定在固体支持体上,而在相同条件下生物聚合物却经常会在固定之后由于解折叠(defolding)、空间位阻或随机取向而缺乏活性。无论在哪种情况下,主动参与识别过程的吸附剂的组分通常仅仅存在于支持固体的表面(常常为结合表面的单层)上。

[0012] 除了均质固体支持体材料外,根据表面被交联聚合物薄膜覆盖的固体支持体材料的一般方案的由2-层横断面形态组成的吸附剂是现有技术熟知的。在过去主要使用例如高(辐射状)交联的聚丁二烯、聚苯乙烯、聚硅氧烷、聚(甲基)丙烯酸酯和聚酰胺的

聚合物。采用它们主要旨在创建一种致密的界面,该界面保护周围介质免于与固体支持体材料的下面部分(“载体”)发生不必要的相互作用。这种相互作用可能会导致生物分子非特异性的或甚至是不可逆的结合至吸附剂,同时另一方面,固体支持体材料的成分或其连接残基的化学键可能被样品或洗脱液的攻击性组分破坏。聚合物涂覆的吸附剂已知基本上应用于如上文所列的所有色谱类型,但是具体的是用于疏水相互作用和尺寸排阻。不是内部交联而是以直链或支链形式接枝至载体材料的聚合物涂层也是已知的,例如所谓的触须树脂(tentacle resins)。

[0013] 另一方面,亲和色谱法主要用本体凝胶相树脂实施。优良的形成凝胶材料有介质交联多糖、聚丙烯酰胺和聚(环氧乙烷)。由于这种水凝胶的柔软性(构象柔性、弹性系数)、大孔体系、高极性和高含水量以及没有反应性或变性的化学基团的原因,其确保了能够很好地安置活性残基和与其相互作用的生物分析物的生物相容界面。它们能够将蛋白质维持在它们的天然状态,即维持它们的恰当折叠、三维结构、缔合状态和功能完整性。这主要是因为:避免使用为了从强吸附的、疏水的(“硬的”)介质中洗脱出蛋白质或肽而经常需要的有机溶剂。因此,通过引入高特异性、完整的生物配体作为用于分离靶标的结合部分(其很好地安置在水凝胶内)来补偿所述支持体固有吸附力的缺乏。但是,这些介质的机械耐受性却比无机支持体材料的更弱,因为它们在施加的压力下是可压缩的并且不耐由振荡、柱填充或高液体流速造成的剪切应力。因此完全与可靠的HPLC工艺条件兼容的亲和吸附剂很少见。

[0014] 仅仅在最近,人们才意识到,固定相的机械耐受性是吸附剂支持体的主要性能,而仅仅是在固定相和流动相间界面的薄层才负责质量交换和与生物分析物相互作用。因此提出了将机械上很坚硬和尺寸稳定的多孔三维核心的功能与携带用于结合分析物的活性残基的生物相容的凝胶样界面层结合的概念,并且相关的合成问题已在技术上得到了解决。这种杂化材料在无机氧化物基底或低极性致密交联聚合物基底上采用了高极性松散交联聚合物。

[0015] 在方法上,可以通过将高极性聚合物涂覆在核心材料上,或通过核心材料和交联剂的存在下直接聚合极性单体、其前体或预聚物来制备它们。根据后一方法制备的大部分材料在文献中都描述为具有非孔渗透性(non-pore-penetrating)或孔填充性形态。非渗透性膜的可用于与分析物相互作用的表面积有限并且因此结合容量低(仅仅取决于聚合物膜的厚度),而孔填充性膜在与分析物相互作用中利用了核心材料的全部内孔体积,这通常会导致良好的结合容量,但是孔内扩散传质速率和与流动相的交换动力学是低的。覆盖但不完全填充核心材料的内表面的聚合物膜,将在这方面是有益的。这种全部种类的吸附剂最著名的代表是,由接枝至多孔二氧化硅支持体核心材料上的支化的和任选进一步交联的聚乙烯亚胺组成的体系。已显示,这类吸附剂可以被进一步衍生化,但是仅仅针对离子交换和仅需要小的标准残基的那些基团特异性亲和应用进行了商品化。

[0016] 生产合成亲和介质在概念上不同的方法就是所谓的“分子印迹”技术,该技术以靶基材和在聚合反应期间形成的聚合物空腔之间的形状和官能团互补性为基础,所述聚合反应在靶基材和随后必须被移除的致孔剂(porogen)存在下进行。印迹法已经被开发用于包括蛋白质和肽在内的大量基材,并且就靶标的暂时固定而言,可以划分为共价方法和非共价的方法。但是,它仅限于形成少数高度交联型的聚合物作为固体支持体材料,并且到目前

为止未见普遍接受曾经达到了生产规模,特别是不能用于在监察机构管理下的药物蛋白质或肽。

[0017] 用于提纯免疫球蛋白 G(IgG) 最普遍使用的亲和介质是支持体结合的蛋白 A 或 G(两者都天然产生在葡萄球菌 (*Staphylococci*) 的细胞壁上) 以及蛋白质 L,但是为了大规模应用,所有这些都需要相当高的资本投资,这基本上限制了它们用作一次性用品。已知蛋白质 A 结合在抗体恒定 Fc 部分的特定表位。因此它在重组抗体片段或缺乏该区域的融合产物的提纯中的使用受到限制。另一方面,对于苛刻的生产条件,蛋白质衍生吸附剂的反复使用与蛋白质二级 / 三级结构和 / 或化学键不稳定的缺点相关,特别是在色谱运行间强制强碱性清洁处理期间有可能引起失活或泄漏。除了因而降低寿命外,一直存在关于蛋白质 A 吸附剂应用于药物生产的争论,因为当待提纯的产物是供体内药用时,即使微小的泄漏蛋白质 A 都被怀疑导致人类的免疫障碍。因此,用于规定产品的登记审批和预期市售许可是决定技术提纯过程的其它重要因素,并且因此已成为行业标准的是:在蛋白质 A 色谱法后必须进行另外的色谱法步骤以移除浸出的毒物。

[0018] 除了意尝试制备具有改善的技术性能的这些蛋白质的工程化变体外,还因此制造了仅仅具有非常短的(反常的)肽表位或甚至具有全合成残基的少数吸附剂。市售的用作蛋白质 A/G/L 替代品的那些合成介质最近已综述于 2007 年 1 月出版的 *Journal of Chromatography B*, 848 卷。

背景技术

[0019] 在下文中为典型的吡啶和咪唑结构示例性显示的,作为生物色谱法吸附剂残基的双核和单核 C、N、O、S- 杂芳结构的有效性早已被认可,但是是独立地被认可,并没有要求保护它们组合使用的益处。但是,咪唑结构的实例比吡啶结构的更常见于科学文献和专利文献中。将咪唑结构引入吸附剂显而易见的方式是,在具有或不具有另外的连接部分的情况下通过与天然的氨基酸组氨酸、其受保护的形式偶联或与相关的组胺偶联的酰胺键。通过固相合成技术,组胺可以经它的氨基基团偶联至支持体,得到带有不另外带电或可解离基团的咪唑结构。对于组氨酸,两种选择是可行的:通过在氨基基团上形成酰胺偶联,得到仍然含有可脱质子的 (deprotonable) 羧基基团的咪唑结构,或者通过在羧基基团上形成酰胺偶联,得到仍然含有可质子化的 (protonable) 氨基基团的咪唑结构。所有这些不同的可能性已经在实验上实现。类似地,吡啶结构可以容易地作为色氨酸或色胺残基引入。

[0020] 组氨酸吸附剂的亲和色谱法广泛综述于 *Molecular Interactions in Bioseparations* (Ed. :TT.Ngo), Plenum Press, New York 1993, Chapter 18 (pp. 257-275) 以及 *Biochromatography* (Ed. :MA Vijayalakshmi), Taylor&Francis, London 2002, Chapter 9 (pp. 252-271)。在这些文献中给出了已被用于人血浆蛋白提纯的多种吸附剂的说明,连同详细的色谱参数和所提出的相互作用机制。组氨酸亲和色谱法的实用方面,通过同一作者在 *Molecular Biotechnology* 6(1996), 347-357 中概述。与免疫球蛋白提纯相关的某些实施例将在下文中强调:

[0021] 作为早期的实例,在 *Journal of Chromatography* 376(1986), 259-267 中,组氨酸通过表氯醇或 1,4- 丁二醇二缩水甘油醚键与琼脂糖偶联,以及与氧桥活化的二氧化硅偶联。研究了吸附剂的制备对若干蛋白质和肽分析物色谱结果的作用。该吸附剂最终用于人

胎盘 IgG 半中试规模的提纯。在 *Bioseparation* 3(1992), 47-53 中描述了在组氨酸-氨基己基-琼脂糖上通过施用的盐梯度从人血浆中提纯 IgG₁ 和 IgG₂ 亚类。在 *Journal of Chromatography B* 667(1995), 57-67, 以及在 *Journal of Chromatography B* 674(1995), 13-21 中, 将组氨酸固定在表氯醇-活化的或丁二醇二缩水甘油醚-活化的聚(乙烯乙二醇)的空纤维膜上, 该纤维膜用于从未处理的人血清中的 IgG 亚类-选择性一步分离。该吸附剂在不同缓冲液和温度条件下可重复用于色谱和简单平衡试验中, 这允许深入了解在抗体 Fab 部分的结合机制。在 *Journal of Chromatography B* 758(2001), 163-172 中随后研究了在不同缓冲体系中糖化 HSA 同工型在组氨酸-氨基己基琼脂糖上的分离机制。在根据 *Chromatographia* 65(2007), 639-648 从细菌提取物提纯模拟限制性酶中, 还对比了固定在琼脂糖凝胶上和固定在聚乙烯-乙醇上的组氨酸与结合至整体盘 (monolithic disc) 支持体的组氨酸-乙二胺的性能。该公开文本还报道了纯 IgG 在整体介质 (monolithic medium) 上的吸附, 并且报道了从细胞培养物上清液中分离单克隆抗体。

[0022] 接着, *Reactive Polymers* 13(1990), 177 的作者和其他人提出了用于生产具有咪唑残基吸附剂的概念上不同的方法。在固体载体上制备聚乙烯咪唑膜从而制备显示反相特征的吸附剂。

[0023] 在 *Analytical Biochemistry* 201(1992), 170-177 中, 将具有通过二乙烯基砜连接 N-结合咪唑残基的琼脂糖吸附剂用于人血清分级分离, 并且在多种流动相条件下与包含其它芳族残基或杂芳残基的吸附剂进行了比较。发现该结合取决于残基的密度, 但是该结合模式一直被认为包含有砜部分的特定贡献。

[0024] 在 *Bioseparation* 6(1996), 165-184 中, 制备了一系列吸附剂, 其中组氨酸通过 3 种不同的连接体与琼脂糖支持体偶联。给出了热力学数据、动力学数据和稳定性数据, 并测量鼠 IgG₁ 和 BSA 的人工混合物的分离以及从细胞培养滤液中分离鼠 IgG₁ 的选择性。在 *Journal of Membrane Science* 207(2002), 253-264 中报道的另一个方法中, 尼龙膜盘被右旋糖酐或聚乙烯醇层共价包覆, 并且在表溴醇活化下, 用己烷二胺连接体且最终用组氨酸衍生化。将该膜吸附剂在结合人 IgG 的能力上与其它亲和膜进行比较。

[0025] 根据 *Reactive&Functional Polymers* 34(1997), 103-111, 在用表氯醇或 1,4-丁二醇二缩水甘油醚活化支持体后, 由聚(丁二烯-羟基乙基甲基丙烯酸酯)支持体和组氨酸制备的吸附剂上还观察到 IgG 保留。

[0026] 在 *Applied Biochemistry and Biotechnology* 75(1998), 93-102 中, 将使用具有组氨酸残基吸附剂的色谱法与其它分离技术进行比较。现在关注抗体 (IgG、IgM) 提纯的应用, 将在具有固定组氨酸的琼脂糖、尼龙、尼龙-聚乙烯醇和二氧化硅平膜以及聚乙烯乙二醇中空纤维膜上得到的结果进行概述。发现, 直接将抗体从血清回收胜过在蛋白质 A 或蛋白质 G 介质上的传统捕获, 以至于达到了可以保持高度功能性的程度。该吸附剂被发现具有 IgG 亚类-选择性能。

[0027] 在 *Journal of Chromatography A* 814(1998), 71-81 中, 氨基丙基咪唑、组胺、氨基甲基苯并咪唑、巯基甲基咪唑和 2-巯基苯并咪唑与活化的琼脂糖或纤维素珠偶联。测定了在采用盐梯度或 pH 变化的洗脱条件下的若干模型蛋白质在这些吸附剂上的保留行为。在另一个例中, 以 *Journal of Biotechnology* 79(2000), 103-115 中所描述的方式, 将通过 2-羟基丙氧基连接体 2-巯基-1-甲基咪唑与琼脂糖偶联。测定了其在微生物培养建立期

间在接近于蛋白质的 pI 的 pH 条件下在细胞外酸性蛋白酶分离中的适应性。

[0028] 组氨酸的氨基基团还被直接地或通过己烷二胺连接体与丙烯酸酯共聚物整料 (monolith) 偶联, 然后将其用于从人血清中分离 IgG, 如在 *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002), 481-489 中报道的。该残基还显露出可用于与分析物的相互作用的羧酸基团。

[0029] *Separation Science and Technology* 37 (2002), 717-731, 以及 *Reactive&Functional Polymers* 61 (2004), 369-377, 描述了用 N- 结合组氨酸残基的聚(2- 羟基乙基甲基丙烯酸酯) 的部分衍生化, 及其在多种实验条件下反复用于从血浆中可逆吸附人 IgG。根据 *Macromolecular Bioscience* 2 (2002), 135-144, 通过 2- 羟乙基甲基丙烯酸酯与 2- 甲基丙烯酰基氨基组氨酸的共聚作用制备了类似的交联吸附剂, 并以相同方式使用。通过在磁粉上的悬浮聚合反应, 同样地制备另一种聚(乙二醇二甲基丙烯酸酯 -N- 甲基丙烯酰 - 组氨酸甲酯) 共聚物, 用于将 IgG 吸附至磁稳流化床柱上, 如在 *Biotechnology Progress* 20 (2004), 1169-1175 中所显示的。此外, 在 *Colloids and Surfaces A* 301 (2007), 490-497 中, 以类似的方式描述和测试了在作为固体支持体材料皂土上包含组氨酸的非共价复合材料。

[0030] 在其它残基中, 色氨酸 (tryptophanol) 和 2- 氨基苯并咪唑各自独立地与琼脂糖支持体偶联, 如 *Journal of Chromatography A* 1016 (2003), 21-33 中所描述。在不同吸附剂中测量和比较作为用于带负电荷生物分子模型系统的 BSA 漏出容量和回收率。

[0031] 在 *Journal of Chromatography B* 808 (2004), 25-33 中再次描述了与纤维素珠偶联的 2- 巯基 -5- 苯并咪唑磺酸。小鼠腹水液或大鼠杂交瘤细胞培养上清液中的 IgG₁ 单克隆抗体以及人血浆 Cohn 级分 II+III 中的 IgG 被捕获在吸附剂上。

[0032] 国际专利申请 WO 96/00735 (Massey University) 要求保护在树脂和与其结合的蛋白质或肽之间形成的复合物, 由此该树脂包含了共价连接至固体支持体材料的可离子化配体。该实验部分和阐明的吸附 / 解吸机制很大程度上与下列专利 (参见下文) 相同。作为另外的实例, 在缓冲低和高盐条件下, 监测了来自发酵液的枯草杆菌蛋白酶变体与 1-(3- 氨基丙基) 咪唑的结合, 该 1-(3- 氨基丙基) 咪唑通过形成酰胺连接至活化的氨基己酸纤维素上。相关的欧洲专利 EP 783366 (Massey University) 要求保护具有相对高密度的一种或多种可离子化残基和任选地另外不可离子化残基 (通过间隔臂结合至支持体) 的树脂。在疏水、低静电荷条件下分析物被吸附至该树脂上, 并且在较高静电荷的 pH 下解吸。将 1-(3- 氨基丙基) 咪唑残基 (任选地与氨基己酸间隔体 (spacer) 结合)、2-(氨基甲基) 苯并咪唑残基、组胺残基、巯基苯并咪唑残基、2- 巯基 -1- 甲基咪唑残基和色胺残基作为实例给出。在用表氯醇、烯丙基缩水甘油醚、烯丙基溴或羰基二咪唑活化琼脂糖或纤维素支持体之后, 使用它们。给出了不同吸附剂残基的酸滴定数据。

[0033] 国际专利申请 WO 2006/066598 (Versamatrix A/S) 要求保护具有共价固定残基的吸附剂, 各所述残基含有彼此间距给定距离范围的阳离子基团和疏水基团。将多种短肽或肽模拟物固定在合成树脂上, 并测试它们在单克隆抗体分离中的适应性以说明该发明。

[0034] 欧洲专利 EP 764048 (Biosepra Inc.) 要求保护含有任选取代的 5- 元杂环残基的吸附剂, 该残基通过硫醚桥连接至固体支持体材料。所给实例包括由 2- 氨基 - 和 2- 巯基咪唑和具有水凝胶填孔的环氧 - 活化的固体支持体制备的吸附剂。所述的 2- 巯基咪唑吸附

剂成功用于从牛初乳中提纯 IgG。国际专利申请 WO 2004/024318(Ciphergen Biosystems Inc.) 要求保护具有单环或多环杂芳残基的吸附剂,所述残基具有特定阴离子取代基,所述吸附剂通过巯基-、醚-或氨基-基团与固体支持体材料连接。作为实例,将 2-巯基苯并咪唑磺酸固定在纤维素珠、多孔氧化锆珠上,并作为二氧化硅上的右旋糖酐基涂层。通过色谱法,在改性纤维素材料上将抗体从牛血清和从乳清中分离。

[0035] 欧洲专利 EP 921855 (Upfront Chromatography A/S) 要求保护用吸附剂从溶液中分离 IgG 的方法,该吸附剂由在支持体材料上的、间隔体结合的、低分子量残基(选自苯并咪唑类,苯并噻唑类和苯并噁唑类)组成。测定了在表氯醇活化的琼脂糖支持体上的 2-巯基苯并咪唑的碱性稳定性,然后将其用于从人工培养上清液中分离单克隆抗体以及从多种动物血清和从蛋黄中分离多克隆抗体。还描述了含有 2-巯基-5-硝基苯并咪唑残基的吸附剂。

[0036] 国际专利申请 WO 01/38227 (Amersham Pharmacia Biotech AB) 示例性报道了显出色氨酸残基、2-氨基苯并咪唑残基或组氨酸残基的琼脂糖吸附剂,其通过短连接体与固体支持体材料结合,并且测量它们针对 4 种模型蛋白质的阴离子交换性能。要求保护用吸附剂从水性液体中结合带负电荷基材的方法,该吸附剂具有同时有阴离子交换性能和疏水性能的残基,各残基含有特定的、间隔体结合的芳基铵结构。在国际专利申请 WO 2005/082483 (Amersham Biosciences AB) 中,要求保护用于将液体中的抗体捕获到吸附剂上的方法,其中所述的吸附剂带有残基,所述的残基各含有至少两种不同结构:一种阳离子交换基团和一种 C、S、O-(杂)芳环体系。在非结合条件下的 2-氨基苯并咪唑并-琼脂糖吸附剂的色谱法在实施例 1 中用作预提纯得自 CHO 细胞培养物的人源 IgG₁ 的流通式精细纯化步骤(flow-through polishing step)。在国际专利申请 WO 2006/043895 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 中,要求保护用于从液体中分离抗体的方法,该方法使用了具有两种不同基团的吸附剂,第一是能够与分析物上的负电荷相互作用的基团,第二是能够进行各自非电荷相互作用的基团。所述的吸附剂在抗体经过时阻留了样品的杂质。作为实例,通过吸附剂的色谱法,将单克隆抗体从蛋白质 A 和宿主细胞蛋白质中分离,所述吸附剂含有活化琼脂糖支持体上的 2-氨基苯并咪唑残基。

[0037] US 6,071,416 涉及包含一个或多个 N-环芳烃配体的组合物,该配体的复合物包含至少 2 个,并优选 4 个或更多 N-环基团,所述 N-环基团通过适当亲水的间隔基团与固体支持体结合,并涉及这类组合物从溶液中移除或浓缩特定离子的用途。

[0038] WO 97/10887 涉及亲和配体,它们的制备和它们与基质的连接,所述基质可以由固体、半固体、微粒或胶体材料或可溶的聚合物组成,并且涉及其用于蛋白质材料提纯的用途。

[0039] 发明目的

[0040] 本发明的一个目的是提供新的用于蛋白质和肽的提纯方法和用于实施所述方法的吸附剂。

[0041] 发明概述

[0042] 本发明涉及包含固体支持体材料的吸附剂,所述固体支持体材料的表面包含至少两种不同的残基,所述至少两种不同的残基有包含双核杂芳结构的第一残基和包含单核杂芳结构的第二残基,所述双核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一

个,所述单核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个。任选地,所述至少两种残基由覆盖所述表面的交联聚合物膜携带。由于其完全合成性本质的原因,所述吸附剂的特征在于高的物理(具体地是热)和化学稳固性,但是仍然能够在温和的生理条件下,甚至从不适宜的样品基质中特异性分离生物分子。还提供了用于制备这类吸附剂的可选的方法。

[0043] 本发明还提供了用于从含有蛋白质或肽的混合物中分离所述的蛋白质或肽或增加其浓度和/或纯度的方法。所述的方法包括使所述混合物与根据本发明的吸附剂接触,所需的蛋白质或肽与所述吸附剂结合,随后将所述蛋白质或肽从吸附剂中洗脱,以及任选的中间漂洗步骤。

[0044] 还公开了多种分析上的应用和制备生物化学上的应用以及医疗上的应用,其中所述吸附剂和/或所述方法可以被有益地采用。用回收、纯度和生物学活性的百分率来表征根据所述方法提纯的抗体,其可与通过常规生物亲和分离技术得到的相当,而没有这些技术的缺点。

[0045] 根据一般方面,根据本发明所述的吸附剂包含固体支持体材料,该固体支持体材料的表面包含第一残基和第二残基,所述第一残基包含双核杂芳结构,该双核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个,所述第二残基包含单核杂芳结构,该单核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个。

[0046] 在一个实施方案中,所述的双核杂芳结构为苯并吡咯(吡咯)结构或苯并吡啶(喹啉或异喹啉)结构,所述苯并吡咯(吡咯)结构包括所有可能的氮杂-苯并吡咯结构、氧杂-苯并吡咯结构和硫代-苯并吡咯结构的,所述苯并吡啶(喹啉或异喹啉)结构包括所有可能的氮杂-苯并吡啶结构、氧杂-苯并吡啶结构和硫代-苯并吡啶结构的。

[0047] 在一个实施方案中,所述单核杂芳结构包含 5-元杂芳核心。

[0048] 在一个实施方案中所述的单核杂芳结构是吡咯结构,包括所有可能的氮杂-吡咯结构、氧杂-吡咯结构和硫代-吡咯结构,例如 3-氮杂吡咯(咪唑)。

[0049] 在一个实施方案中,所述单核杂芳结构不包含 6-元杂芳核心。

[0050] 在一个实施方案中,所述单核杂芳结构包含 6-元杂芳核心,条件是所述 6-元杂芳核心不是三嗪环或嘧啶环。

[0051] 在一个实施方案中,所述第一残基和/或第二残基包含连接体。

[0052] 在一个实施方案中,所述第一残基和/或第二残基含有长度为 1 至 20 个原子的共价、构象柔性连接体。

[0053] 在一个实施方案中,所述共价、构象柔性的连接体不含有硫。

[0054] 在一个实施方案中,所述连接体彼此独立地含有 1 至 300 个碳原子,例如 20 至 300 个碳原子。在所述实施方案中,所述连接体由聚乙二醇部分组成或包含聚乙二醇部分。

[0055] 在一个实施方案中,所述连接体不含有其它杂芳结构,具体地是没有三嗪环或嘧啶环。

[0056] 在一个实施方案中,其它取代基与分别包含杂原子 N、O、S 中至少一个的双核和/或单核杂芳结构结合。

[0057] 在一个实施方案中,所述其它取代基不包含阳离子交换(即,带负电荷的)基团,或所述双核和/或单核杂芳结构不包含阳离子交换(即,带负电荷的)基团。

[0058] 在一个实施方案中,所述其它取代基不包含含有硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐或膦酸盐基团的阳离子交换基团;或所述双核杂芳结构和/或单核杂芳结构不包含含有硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐或膦酸盐基团的阳离子交换基团。

[0059] 在另一个实施方案中,所述其它取代基不包含选自硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐或膦酸盐基团的阳离子交换基团;或所述双核杂芳结构和/或单核杂芳结构不包含选自硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐或膦酸盐基团的阳离子交换基团。

[0060] 在一个实施方案中,所述第一残基和第二残基以摩尔比 3 : 2 至 2 : 3 存在,优选地以比例为约 1 : 1 存在。

[0061] 在一个实施方案中,所述第一残基包含所述第二残基。

[0062] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料的表面还包含第三残基和任选地另外第四残基。

[0063] 在一个实施方案中,所述第三残基含有胺或酰胺结构,优选地是伯胺结构。

[0064] 在一个实施方案中,所述第一残基、第二残基和第三残基以摩尔比约 1 : 1 : 2 存在。

[0065] 在一个实施方案中,残基的总密度为 0.1mol dm^{-3} 至 1.0mol dm^{-3} , 优选地是至少约 0.3mol dm^{-3}

[0066] 在一个实施方案中,每种类型的残基均匀且随机地/统计学分布在所述的固体支持体材料表面。

[0067] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料由载体组成,所述载体表面被具有携带所述第一残基和第二残基以及任选地所述第三残基和第四残基的官能团的聚合物膜覆盖。

[0068] 在一个实施方案中,所述聚合物由彼此共价交联的单独链组成,但是所述单独链不共价接枝或结合至载体表面。

[0069] 在一个实施方案中,所述聚合物链彼此共价交联达到基于可用于交联的官能团数量为 2% 至 20% 的程度。

[0070] 在一个实施方案中,所述聚合物由共价接枝至载体表面但不彼此共价交联的单独链组成。

[0071] 在一个实施方案中,所述聚合物链通过它们的末端官能团共价接枝至载体表面。

[0072] 在一个实施方案中,所述聚合物膜占所述吸附剂总重量的 5% 至 30%, 优选 15% 至 20%。

[0073] 在一个实施方案中,所述聚合物在水性介质或水性-有机性混合的介质中是可溶胀的。

[0074] 在一个实施方案中,所述的聚合物是合成的聚电解质。

[0075] 在一个实施方案中,由酰胺、脲烷、脲或仲/叔胺键形成聚合物的交联或接枝联接和/或残基的连接。

[0076] 在一个实施方案中,所述聚合物是部分衍生化聚合物,其选自聚乙烯醇、聚乙烯胺、聚烯丙基胺、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸和聚甲基丙烯酸、或包括这些聚合物中至少一个的任何共聚物或聚合物的混合物。

[0077] 在一个实施方案中,所述聚合物是聚乙烯基胺。

[0078] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料或至少所述载体是多孔材料,该多孔材

料的具有 10nm 至 400nm 的孔径,或 $1\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 至 $1,000\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 的比表面积,或 30 体积%至 80 体积%的孔隙率。

[0079] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料是粒度为 $5\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 的颗粒材料。

[0080] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料是片状或纤维状的材料,例如膜。

[0081] 在一个实施方案中,制备所述载体的材料不同于制备所述聚合物膜的材料。

[0082] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料或至少是载体由选自下列的材料制备:普通或表面改性的聚苯乙烯、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、二氧化硅、玻璃、淀粉、纤维素、琼脂糖 (agarose), 琼脂糖凝胶 (sepharose) 以及右旋糖酐,或其复合物。

[0083] 在一个实施方案中,所述吸附剂还包括易于检测的标记物,例如光学吸收标记物、光学发射标记物、放射性标记物、磁性标记物、或质量 - 或射频 - 编码的标记物。

[0084] 本发明还涉及用于制备吸附剂的方法,其包括:

[0085] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0086] (ii) 将所述聚合物膜吸附至载体表面;

[0087] (iii) 用至少一种交联剂将所吸附的聚合物的所述官能团的限定部分交联;

[0088] (iv) 用包含双核杂芳结构的第一残基和包含单核杂芳结构的第二残基以及任选的其它残基将所述交联聚合物的所述官能团的其它限定部分衍生化,所述双核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个,所述单核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个。

[0089] 本发明还涉及用于制备吸附剂的方法,其包括:

[0090] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0091] (ii) 用包含双核杂芳结构的第一残基和包含单核杂芳结构的第二残基以及任选的其它残基将所述官能团的限定部分衍生化,所述双核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个,所述单核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个);

[0092] (iii) 将所衍生化的聚合物膜吸附至载体表面;

[0093] (iv) 用至少一种交联剂将吸附的聚合物的所述官能团的其它限定部分交联。

[0094] 本发明还涉及用于制备吸附剂的方法,其包括:

[0095] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0096] (ii) 将所述聚合物膜吸附至载体表面;

[0097] (iii) 将所吸附的聚合物的所述官能团的限定部分接枝至所述载体;

[0098] (iv) 用包含双核杂芳结构的第一残基和包含单核杂芳结构的第二残基以及任选的其它残基将所接枝聚合物的所述官能团的其它限定部分衍生化,所述双核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个,所述单核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个。

[0099] 本发明还涉及用于制备吸附剂的方法,其包括:

[0100] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0101] (ii) 用包含双核杂芳结构的第一残基和包含单核杂芳结构的第二残基以及任选的其它残基将所述官能团的限定部分衍生化,所述双核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂

原子 N、O、S 中的至少一个,所述单核杂芳结构除了碳原子以外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;

[0102] (iii) 将所衍生化的聚合物膜吸附至载体表面;

[0103] (iv) 将所吸附的聚合物的所述官能团的其它限定部分接枝至所述载体。

[0104] 在制备吸附剂方法的一个实施方案中,所述聚合物在水性介质或水性-有机性混合的介质中是可溶解的。

[0105] 在一个实施方案中,所述聚合物的所述官能团是 -NH-、-NH₂、-OH、-COOH 或 -COO- 基团。

[0106] 在一个实施方案中,所述聚合物的分子量为 5,000 道尔顿至 50,000 道尔顿之间。

[0107] 在一个实施方案中,所述至少一种交联剂选自二羧酸类、二胺类、二醇类和双-环氧化物。

[0108] 在一个实施方案中,所述至少一种交联剂是长度为 1 至 20 个原子的线性、构象柔性分子。

[0109] 在一个实施方案中,通过在所述官能团和所述残基之间形成酰胺键进行所述的衍生化步骤。

[0110] 在一个实施方案中,用各残基分步进行所述的衍生化步骤。

[0111] 本发明还涉及从含有蛋白质或肽的混合物中分离蛋白质或肽或增加其浓度和/或纯度的方法,其包括:

[0112] (i) 将溶解或悬浮在第一液体中的所述混合物与根据本发明的吸附剂或与根据本发明方法制备的吸附剂接触足以使所述蛋白质或肽与所述吸附剂结合的时间;

[0113] (ii) 任选地用第二液体漂洗所述吸附剂;

[0114] (iii) 将带有所述结合的蛋白质或肽的所述吸附剂与第三液体接触足以使所述蛋白质或肽从所述吸附剂中释放出来的时间;

[0115] (iv) 任选地用第四液体和/或第五液体洗涤和/或再生所述吸附剂。

[0116] 在分离蛋白质或肽或增加其浓度和/或纯度的方法的一个实施方案中,所述第一液体、所述第二液体和所述第三液体是不包含其它有机改性剂的缓冲的水性介质。

[0117] 在一个实施方案中,所述的第二液体与所述第一液体相同。

[0118] 在一个实施方案中,所述第一液体以及任选地所述第二液体的 pH 接近于靶蛋白质或肽的等电点 pI。

[0119] 在一个实施方案中,所述第三液体的 pH 是不同的,具体的是比所述第一液体以及任选地所述第二液体的 pH 低。

[0120] 在一个实施方案中,所述第一液体的 pH 范围是 5.5 至 8.5,并且所述第三液体的 pH 范围是 3 至 6.5。

[0121] 在一个实施方案中,所述第三液体的离子强度是不同的,具体的是比所述第一液体以及任选地所述第二液体的离子强度高。

[0122] 在一个实施方案中,以膜过滤技术、固相萃取技术或中至高压液相色谱法技术的方式来实施所述方法。

[0123] 在一个实施方案中,所述的方法还包括在步骤 (iii) 之后从第三液体中分离释放的蛋白质或肽。

[0124] 在一个实施方案中,步骤 (iii) 所释放的蛋白质或肽包含小于 10ppm 的从其中浸出的吸附剂或其它可浸出的材料。

[0125] 在一个实施方案中,所述方法结合了进一步分离过程,例如沉淀、离心、干燥、(微/超)滤、渗析、离子交换或病毒的减少处理。

[0126] 在一个实施方案中,含有所述蛋白质或肽的所述混合物是从微生物体或细胞培养中或从农作物提取物中得到的粗提纯或部分提纯的生物合成产物。

[0127] 在一个实施方案中,所述蛋白质或肽的等电点 pI 为 5.5 至 8.5,以及分子量为 100 至 500,000Da。

[0128] 在一个实施方案中,所述蛋白质或肽是抗体、其片段、其低聚物或包含抗体或抗体片段的融合蛋白。

[0129] 本发明还涉及用于液相色谱法或固相提取的柱,其包含在管状容器内的作为固定相的根据本发明的吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂以及任选其它部件,例如玻璃料 (frit)、滤板、流动分配器、密封、配件、螺钉、阀或其它流体处理元件或连接元件。

[0130] 在一个实施方案中,所述方法的特征还在于其对施加的高达 20 巴压力、对施加的高达 110°C 热以及对常见清洁卫生方案的物理和化学耐性,因此其能够反复使用多达 1,000 次,优选地多达 5,000 次。

[0131] 本发明还涉及,以微板或微芯片阵列或多毛细管或微流体装置形式,将多个根据本发明的相同或不同吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂或根据本发明的柱集成 (collection),该集成能够被平行处理。

[0132] 本发明还涉及诊断或实验提纯试剂盒,其在相同包装单元内包含根据本发明的吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂或根据本发明的柱或根据本发明吸附剂或柱的集成,以及对实行根据本发明的方法或与其不同的不同分析、诊断或实验方法所必需的其它化学或生物学试剂和 / 或可一次性用品。

[0133] 本发明还涉及根据本发明的吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂在制备药物或营养组合物中的用途,所述组合物包含具有诊断、治疗或营养价值的至少一种蛋白质或肽。

[0134] 本发明还涉及根据本发明的吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂在移除至少一种蛋白质或肽中的用途,以及在医疗上预防或治疗由存在所述的至少一种蛋白质或肽而引起的疾病中的用途。

[0135] 本发明还涉及根据本发明的吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂在识别、表征、定量或实验室提纯至少一种蛋白质或肽中的用途。

[0136] 本发明还涉及根据本发明的吸附剂或根据本发明方法制备的吸附剂用于至少一种蛋白质或肽可逆固定的用途,和对其它化学或生物学结构与所述蛋白质或肽结合进行任选测定的用途。

[0137] 根据第一个方面,本发明涉及包含固体支持体材料的吸附剂,其表面包含

[0138] - 包含双核杂芳结构的第一残基,所述双核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个 ;和

[0139] - 包含单核杂芳结构的第二残基,所述单核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个 ;

[0140] 其特征在于所述第一残基和所述第二残基彼此不直接连接,但是单独与本体固体支持体材料本身连接或与固体支持体材料作为载体所支持的聚合物膜连接。

[0141] 在一个实施方案中,所述双核杂芳结构是苯并吡咯(吡咯)结构或苯并吡啶(喹啉或异喹啉)结构,所述苯并吡咯(吡咯)结构包括所有可能的氮杂-苯并吡咯结构、氧杂-苯并吡咯结构和硫代-苯并吡咯结构,所述苯并吡啶(喹啉或异喹啉)结构包括所有可能的氮杂-苯并吡啶结构、氧杂-苯并吡啶和硫代-苯并吡啶结构。

[0142] 在一个实施方案中,所述单核杂芳结构是吡咯结构,包括所有可能的氮杂-吡咯结构、氧杂-吡咯结构和硫代-吡咯结构,例如 3-氮杂吡咯(咪唑)的。

[0143] 在一个实施方案中,所述第一残基和/或所述第二残基含有长度为 1 至 20 个原子的共价的、构象柔性的连接体。

[0144] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料的表面还包含第三残基和任选地第四残基。

[0145] 在一个实施方案中,所述的第三残基含有胺或酰胺结构或伯胺结构。

[0146] 在一个实施方案中,所述的第一残基、第二残基和第三残基以摩尔比约 1 : 1 : 2 存在。

[0147] 在一个实施方案中,所述固体支持体材料的表面被聚合物膜覆盖,所述的聚合物膜包含第一官能团和第二官能团,所述第一官能团与所述第二官能团可以是相同的或可以彼此不同的,其携带所述第一残基和第二残基,以及任选地第三残基和第四残基。

[0148] 在一个实施方案中,所述聚合物包含或由彼此共价交联的单独链组成,但是所述单独链并不共价结合或接枝至载体表面。

[0149] 在一个实施方案中,所述的聚合物是聚胺或聚乙烯基胺或包含聚胺的共聚物或聚合物共混物。

[0150] 在一个实施方案中,所吸附的聚合物的所述官能团的第一部分通过至少一种交联剂交联,并且其中该交联聚合物的所述官能团的第二部分与所述第一残基和第二残基以及任选其它残基结合。

[0151] 本发明还涉及用于制备根据本发明第一个方面的吸附剂的方法,其包括:

[0152] (i) 提供具有第一官能团和第二官能团的聚合物;

[0153] (ii) 将所述聚合物膜吸附至载体表面;

[0154] (iii) 通过至少一种交联剂将所吸附的聚合物所述官能团的第一部分交联;

[0155] (iv) 使所交联的聚合物的所述官能团的第二部分与所述第一残基、第二残基和任选的其它残基结合。

[0156] 本发明还涉及从含有蛋白质或肽的混合物中分离所述蛋白质或肽或增加其浓度和/或纯度的方法,其包括:

[0157] (i) 将溶解或悬浮在第一液体中的所述混合物与根据本发明第一个方面的吸附剂接触足以使所述蛋白质或肽与所述吸附剂结合的时间;

[0158] (ii) 任选地用第二液体漂洗所述吸附剂;

[0159] (iii) 将带有所述结合的蛋白质或肽的所述吸附剂与第三液体接触足以使所述蛋白质或肽从所述吸附剂中释放出来的时间;

[0160] (iv) 任选地用第四液体和/或第五液体洗涤和/或再生所述吸附剂。

[0161] 在一个实施方案中,所述第一液体和任选地所述第二液体的 pH 接近于靶蛋白质或肽的等电点 pI。

[0162] 在一个实施方案中,所述第一液体的 pH 范围是 5.5 至 8.5,所述第三液体的 pH 范围是 3 至 6.5。

[0163] 在一个实施方案中,所述蛋白质或肽的等电点 pI 为 5.5 至 8.5,以及分子量为 100 至 500,000Da。

[0164] 根据第二个方面,本发明涉及包含固体支持体材料的吸附剂,其表面包含

[0165] - 第一官能团和第二官能团,所述第一官能团与所述第二官能团可以相同或不同;

[0166] - 包含双核杂芳结构的第一残基,所述双核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;和

[0167] - 包含单核杂芳结构的第二残基,所述单核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;

[0168] 其特征在于,所述第一残基与所述第一官能团结合,所述第二残基与所述第二官能团结合。

[0169] 根据第三个方面,本发明涉及包含固体支持体材料的吸附剂,其表面包含

[0170] - 第一官能团和第二官能团,所述第一官能团与所述第二官能团可以相同或不同;

[0171] - 包含双核杂芳结构的第一残基,所述双核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;和

[0172] - 包含单核杂芳结构的第二残基,所述单核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;

[0173] 其特征在于,所述第一残基与所述第一官能团结合,所述第二残基与所述第二官能团结合;并且其中没有一个所述官能团与所述第一残基和所述第二残基都结合。

[0174] 根据第四个方面,本发明涉及包含固体支持体材料的吸附剂,其表面包含

[0175] - 第一官能团和第二官能团,所述第一官能团与所述第二官能团可以相同或不同;

[0176] - 包含双核杂芳结构的第一残基,所述双核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;和

[0177] - 包含单核杂芳结构的第二残基,所述单核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;

[0178] 其特征在于,所述第一残基与所述第一官能团结合,所述第二残基与所述第二官能团结合;条件是所述固体支持体材料不含有三嗪部分或嘧啶部分。

[0179] 根据第五个方面,本发明涉及包含固体支持体材料的吸附剂,其表面包含

[0180] - 第一官能团和第二官能团,所述第一官能团与所述第二官能团可以相同或不同;

[0181] - 包含双核杂芳结构的第一残基,所述双核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子 N、O、S 中的至少一个;和

[0182] - 包含单核杂芳结构的第二残基,所述单核杂芳结构除了碳原子外还包含杂原子

N、O、S 中的至少一个；

[0183] 其特征在于所述第一残基与所述第一官能团结合，所述第二残基与所述第二官能团结合；条件是所述固体支持体材料不含有三嗪部分或嘧啶部分；并且其中没有一个所述官能团与所述第一残基和所述第二残基都结合。

[0184] 在根据第二、第三、第四或第五个方面的一个实施方案中，所述双核杂芳结构是苯并吡咯（吲哚）结构或苯并吡啶（喹啉或异喹啉）结构，所述苯并吡咯（吲哚）结构包括所有可能的氮杂-苯并吡咯结构、氧杂-苯并吡咯结构和硫代-苯并吡咯结构，所述苯并吡啶（喹啉或异喹啉）结构包括所有可能的氮杂-苯并吡啶结构、氧杂-苯并吡啶结构和硫代-苯并吡啶结构。

[0185] 在一个实施方案中，所述单核杂芳结构是吡咯结构，包括所有可能的氮杂-吡咯结构、氧杂-吡咯结构和硫代-吡咯结构，例如 3-氮杂吡咯（咪唑）。

[0186] 在一个实施方案中，所述第一残基或所述第二残基或所述第一残基和所述第二残基与通过连接体所述第一官能团和所述第二官能团结合。

[0187] 在一个实施方案中，所述第一官能团和所述第二官能团中的 5 至 95% 或 15 至 85% 或 25 至 75% 或 35 至 65% 或 40 至 60% 与所述第一和所述第二残基结合，并且其中所述第一残基和第二残基以摩尔比为 3 : 2 至 2 : 3 存在。

[0188] 在一个实施方案中，所述固体支持体材料的表面还包含第三残基和任选地第四残基。

[0189] 在一个实施方案中，所述的第三残基含有胺或酰胺结构或伯胺结构。

[0190] 在一个实施方案中，所述的第一残基、第二残基和第三残基以摩尔比约 1 : 1 : 2 存在。

[0191] 在一个实施方案中，所述固体支持体材料的表面被聚合物膜覆盖，所述聚合物膜包含所述第一官能团和第二官能团，其携带所述第一残基和第二残基，以及任选地第三残基和第四残基。

[0192] 在一个实施方案中，所述聚合物包含或由彼此共价交联的单独链组成，但所述单独链不共价接枝至载体表面。

[0193] 在一个实施方案中，所述聚合物是部分衍生化的聚胺或聚乙烯基胺或包含聚胺的共聚物或聚合物共混物。

[0194] 在一个实施方案中，所述第一官能团和第二官能团的第一部分通过至少一种交联剂交联，并且其中所述第一官能团和第二官能团的第二部分与所述第一残基和第二残基以及任选其它残基结合。

[0195] 在一个实施方案中，本发明涉及制备根据第二个方面、第三个方面、第四个方面或第五个方面吸附剂的方法，其包括：

[0196] (i) 提供具有第一官能团和第二官能团的聚合物；

[0197] (ii) 将所述聚合物膜吸附至固体支持体材料表面；

[0198] (iii) 将所吸附的聚合物所述官能团的第一部分通过至少一种交联剂交联；

[0199] (iv) 使所交联的聚合物的所述官能团的第二部分与所述第一残基、第二残基和任选其它残基结合。

[0200] 在一个实施方案中，本发明涉及从含有蛋白质或肽的混合物中分离所述蛋白质或

肽或增加其浓度和 / 或纯度的方法,其包括:

[0201] (i) 将溶解或悬浮在第一液体中的所述混合物与根据本发明第二个方面、第三个方面、第四个方面或第五个方面的吸附剂接触足以使所述蛋白质或肽与所述吸附剂结合的时间;

[0202] (ii) 任选地用第二液体漂洗所述吸附剂;

[0203] (iii) 将带有所结合的蛋白质或肽的所述吸附剂与第三液体接触足以使所述蛋白质或肽从所述吸附剂中释放出来的时间;

[0204] (iv) 任选地用第四液体和 / 或第五液体洗涤和 / 或再生所述吸附剂。

[0205] 在一个实施方案中,所述第一液体和任选地所述第二液体的 pH 接近于所述蛋白质或肽的等电点 pI。

[0206] 在一个实施方案中,所述第一液体的 pH 范围是 5.5 至 8.5,所述第三液体的 pH 范围是 3 至 6.5。

[0207] 在一个实施方案中,所述蛋白质或肽的等电点 pI 为 5.5 至 8.5,以及分子量为 100 至 500,000Da。

[0208] 为了本发明公开内容的目的,针对根据本发明一般方面的吸附剂所列的所有实施方案都可以与根据本发明的第一个方面、第二个方面、第三个方面、第四个方面和第五个方面的吸附剂组合。

[0209] 优选实施方案的详述

[0210] 本发明要解决的技术问题可以表述为提供用于蛋白质和肽的新提纯方法,该方法无先前已知方法的如在前述部分中已概述的缺点。这意指,该方法应能够以高回收率从样品基质中一步分离出靶蛋白质和肽而不影响其功能完整性,同时极大地避免了使用昂贵材料,但是仍然在各方面能够符合设备在使用中的标准清洗和消毒方案,并且因此确保该方法被各自的监管部门接受,即能够以经济上可行的方式提供药物级 (pharmaceutical quality) 的靶蛋白质或肽。

[0211] 现在,可以通过提供将用于待提纯的蛋白质或肽的固液平衡分配过程的新型吸附剂来解决该技术问题,该吸附剂与现有技术所已知的吸附剂的区别主要在于它用残基进行特定的两次化学衍生化,所述衍生化解决了从靶蛋白质或肽的副产物中,具体地是从多种其它蛋白质或肽中,分离出靶蛋白质或肽的问题,并且选择性和灵敏性可以与常规亲和介质相当,但具有完全不含棘手生物材料的组成,所述生物材料可能制备成本高和 / 或在苛刻的条件降解。用于吸附剂生产的所有材料的高耐久性,也确保了使用所述吸附剂的任何分离方法长期的重现性,该重现性可能由于在分析结果中没有漂移效应而变得明显。

[0212] 辅助解决上述所给出技术问题的是包含至少两种不同的材料的吸附剂的层状组件,所述至少两种不同材料中之一是携带两种残基的合成或生物合成的聚合物膜,所述聚合物膜覆盖作为固体基底的第二材料。一方面,这种特定的组件的特征在于聚合物膜的相当高的重量含量和高的物理稳定性,但是链柔性程度仍然相当高,这也导致其高溶剂和样品吸收能力以及它们的快速扩散交换。因此所述膜保持在均质、生物相容、柔软和凝胶样的状态。这允许分析蛋白质或肽使它们部分或全部分子体积浸入到包含用于结合的吸附剂那些活性元件的层中,并迁移穿过它或沿它的表面迁移,同时防止它们变性。它因此确保了用于分析物的拟三维相互作用空间的创建,并且允许在分布于整个蛋白质或肽表面的表位与

残基修饰的凝胶相之间发生多点接触。由此,聚合物膜还有效地保护了品组分避免与固体支持体材料下面的成分发生不期望的相互作用。

[0213] 为了评价和更精确地提出本发明的整个范围,在下文中首先定义此后在本发明背景下使用的若干术语的含意。必须理解所有实施例仅为了说明的目的并无意作为实施方案的唯一清单而给出。本领域技术人员将会理解在不偏离本发明全部精神的前提下实行本发明另外和类似的方法。图6的图示还用符号表示了涉及所述吸附剂组合物的本文使用的诸多不同术语之间的相互关系。

[0214] 术语“吸附剂”意指在样品的固< >液平衡分配过程中用作固定相的任何合成或生物合成的材料,该材料显示了作为针对包含在所述样品中的至少一种给定的靶蛋白质或肽的接受体的选择性非共价结合性质,或者在包含于所述样品中不同构造的至少两种给定的靶肽或蛋白质之间,该材料能够在非共价结合性质方面进行区分(即,高绝对结合常数或高结合常数差)。因此它具体旨在,完成所给定的分析测定或制备测定、分离、固定、或(生物)化学转化任务,所述任务通常由至少一种靶蛋白质或肽和样品基质的独特组合组成,所述至少一种靶蛋白质或肽的构造可以是已知的、部分已知的或未知的,所述样品基质的组成可以同样是已知的、部分已知的或未知的。

[0215] 与类分相(generic phases)(其根据在全部分析物分子内取平均的累积性参数例如静电荷、偶极矩或亲脂性区分分析物)相反,这类吸附剂根据基团补充性概念至少部分地与在至少一种靶蛋白质或肽的三维分子表面上的至少一个域(表位)结合。这种新的概念也因此超出了所谓混合型吸附剂的范围,在传统含义中,所述混合型吸附剂根据两个经典的平均作用的组合进行分离。因此,本发明所述吸附剂在分子水平上设计为,仅仅与单以蛋白质或肽或一组结构上紧密相关的蛋白质或肽,并具有高亲和性,以及从可能含有广谱的不同副产物的环境中的高个体选择性的或组选择性。

[0216] 对于“固体支持体材料”,本领域的技术人员已知的所有非多孔或优选多孔、吸附性介质,例如各种无机矿物氧化物,诸如二氧化硅、氧化铝、氧化镁、二氧化钛、氧化锆、硅酸镁载体、磁铁矿、沸石、硅酸盐(硅藻土(celite)、硅藻土(kieselguhr))、云母、羟磷灰石、氟磷灰石,金属-有机框架,陶瓷和玻璃如可控孔度玻璃(CPG),金属,例如铝、硅、铁、钛、铜、银、金,以及石墨或无定形碳,纸,(生物)聚合物树脂,例如多糖、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯如Amberchrom™等,无论是球状或是不规则的形状,都可以用于构建所述吸附剂。共聚(苯乙烯-二乙烯基苯)(特别是在其用于强阳离子交换树脂中时被本体或表面磺化的共聚(苯乙烯-二乙烯基苯))、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、二氧化硅、玻璃、以及多糖类例如淀粉、纤维素、纤维素酯类、直链淀粉、琼脂糖、琼脂糖凝胶、甘露聚糖、黄原胶和右旋糖酐是优选的固体支持体材料。引入刚性和硬度的固体基底作为不溶性支持功能,为固定相与流动相间界面的扩大提供了基础,该界面是与蛋白质或肽相互作用的场所,作为所述相之间划分方法和特别是在流动和/或加压条件下增加机械强度和磨损性的分子基础。根据本发明的固体支持体材料可以具有均质或非均质的组成,因此还可以包括上面提及的一种或多种材料的复合物特别是多层复合物的材料。在上下文中,具体提及了磁性颗粒。

[0217] 在与其相关的重要实施方案中,所述固体支持体材料表面可以被聚合物膜覆盖。这种任选的膜被认为是固体支持体材料的一部分,因为此处开发和引入的依赖于单一本体固体支持体材料的直接表面上的官能团或残基的所有制备和分离方法通过这类聚合物覆

盖层的各自官能团或残基起作用。此外,该本体固体支持体材料固有的中或大孔的形态(topography)通常会在涂覆过程中保留。如果在这类所得杂化材料中,为了本发明,必须区分表面聚合物膜与下面的所有材料,则后者概指单独“载体”,或,换言之,该杂化固体支持体材料将包含载体和聚合物膜。但是在实践中,只要已知吸附剂的制备过程,这种区分就大多是可行的。作为提供吸附剂刚性框架部分的载体类似于固体的物理状态,并且可能由上文列举的任何那些材料组成,其可以根据本发明同样地用作在上面不具有表面聚合物膜的本体固体支持体材料,或用作这类表面聚合物膜载体。因此除了用于聚合物吸附的适应性外,所有特性、选择和限制(如已在上文阐明的)都等同应用于两条术语。因此本发明主要实施方案是吸附剂,其中所述的固体支持体材料由表面被具有官能团的聚合物膜覆盖的载体组成,所述的官能团携带第一残基和第二残基以及任选地第三残基和第四残基。

[0218] 如果,作为优选的,多孔材料用作载体,该聚合物膜通常将会均匀地覆盖其外表面和其大部分较大的内表面。因此“表面”表征了吸附剂在其制备和用作分离剂期间的整个固-液相界面,在该界面上发生残基识别和结合分析物,并且至少一种溶解的蛋白质或肽通过(任选地加压的)水压流、对流、灌流、扩散或电迁移,或任何这些组合可到达所述界面。由于包含柔软物质的载体和特别是表面聚合物膜可能在适当的液体中溶胀,因此所述界面并不是分明的分界面而是可以包含中间凝胶相层。吸附剂的表面性质可以与所用材料的本体性质不同。如果使用两种不同材料作为载体和聚合物膜,以及如果使用引起格外大的比表面积的制备方法,则尤其如此。

[0219] “覆盖”可以通过技术人员已知的各种涂覆方法在技术上实现,可以在自然驱动力下发生或手动实施,例如自发吸附、气相沉积、从液项、气相或等离子体相中聚合、旋转涂覆、表面凝聚、润湿、浸透、浸渍、涂刷、喷涂、冲压、蒸发、应用电场或电压,以及基于分子自组装的所有方法,例如,液晶、Langmuir-Blodgett-膜或层-层膜形成的。由此聚合物膜可以直接涂覆为多层或在彼此之上排列为阶梯式的单独的单层(stepwise sequence)。就大分子而言,单-或多-点-“吸附”,无论是否自发或人工加速,在任何情况下都被视为是与固体表面直接接触的聚合物溶液开始的任何涂覆过程的第一(不完全的)步。它需要在固体表面与各单独聚合物链间存在某些至少是弱的吸引物理(范德华)力或——在在载体和/或聚合物上存在互补功能化的情况下——相当特异性的、非共价的化学力,并且如果吸附多层,为了形成至少亚稳定的聚集体,还存在于其之内的聚合物与不同的垂直堆积层之间。在符号相反的电荷之间的静电力常用于该目的,由此载体的表面电荷通过其 ζ 电位给出。初始吸附可以以松散和无规律的方式发生,该方式可以随后转变为较大程度的二维或三维次序和/或密度。这可能归因于在表面上的聚合物链的某种残留流动性(residual mobility),导致单个表面处吸附和解吸过程间的稳态平衡,并且可能例如通过退火培育(fostered)。除了由物理缠结的链提供的基础立体(熵的(entropic))稳定外,通常必需通过在邻近的官能团之间接着引入共价键进一步增加吸附聚集体的稳定性。仍然为了增加稳定性,聚合物膜的链可以进一步共价接枝至下面的载体材料。

[0220] 由此所述固体支持体材料的外表面可以是平的(平板、薄板、箔、盘、片(slides)滤纸、膜、织物或无织物、纸)或弯曲的(凹的或凸的:球体、珠、颗粒、(中空)纤维、管、毛细管、小瓶、样品架中的孔)。固体支持体材料内表面的孔结构可以,特别是,由规则的、连续的毛细管道组成或由不规则(分形)几何形状的腔组成。微观上,根据制备方式它可以

是光滑的或粗糙的。孔体系可以在整个固体支持体材料中连续延伸或以腔为尽头（分支）。在流动相中蛋白质或肽在其溶剂化与其在固定相的表面上的保留之间的界面平衡比以及因此的恒流分离系统的功效很大程度上由通过固体支持体材料的孔经由扩散的质量传递决定，并因此由其颗粒和孔径的特征分布决定。孔径可以任选地显示为不对称的、多峰和/或空间上（例如横断面的）不均匀的分布。作为完全固体支持体材料或载体的适用于本发明的多孔固体的典型孔径范围为 10nm 至 400nm，并且可以因此分类为中或大孔；颗粒材料的典型粒径范围为 5 μm 至 500 μm 。适合的固体可取的孔隙率为 30 体积%至 80 体积%并且典型的比表面积为 $1\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 至 $1,000\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 。

[0221] 可替代的，最近介绍的固体支持体材料是所谓的整料色谱法介质，其被浇铸为所需（通常杆状）形状的单个体，这与由松散的微观粒子制备的经典的可压缩柱填充物相反。整料柱可以由二氧化硅或聚合材料例如聚甲基丙烯酸酯组成，并且它们的微结构可以含有纤维毛细管或烧结颗粒附聚物。

[0222] 术语“聚合物的膜”或“聚合物膜”意指至少一层二维或优选三维的合成或生物合成的聚合物网络，其通常在几个和几十个分子层之间。这类（衍生化或未衍生化的）聚合物网络自身可以根据本领域技术人员已知的方法制备。该聚合物膜可以具有化学均质的组成或它可以以不规则缠绕的或有序的方式（层-层）包括至少两种不同种类的互穿聚合物链（例如，聚丙烯酸和聚胺）。术语“链”通常意指聚合物最长的连续的主链并且也可能指分支，官能团沿该链连接。该术语用于表明在吸附剂制备期间所用的溶解、吸附或接枝的聚合物主链全长，和表明位于交联聚合物网眼结间的链段，因为在后者情况下单独链的全长难以鉴定。

[0223] 优选在其主链或侧链之内含有至少一种官能团的“聚合物”，因为其使得在均质或非均质介质中在这类官能团处容易与残基衍生化。此外，固体状态或溶解状态的聚合物的很多性质，以及其自发吸附和永久附着至所给定的固体载体上的趋势由其官能团决定。聚合电解质在此处具体提及。含有功能性和非功能性单元的共聚物，无论交替排列、无规排列或嵌段排列，在这方面也是可实现的。优选的官能团有伯氨基和仲氨基、羟基和羧酸或酯基团。根据周围介质的酸性/碱性，氨基基团可以以质子化的铵离子形式存在，羧基基团可以以去质子化的羧酸根形式存在。如果多孔或无孔本体聚合物也用作固体支持体材料的载体，那么说明涂覆在其上的聚合物膜（如所述）将具有不同的化学组成。这些区别由下文所列举的官能团的存在、种类或密度造成，由较低分子量造成，或由交联度较低造成。添加所有这些参数来增加亲水性、溶剂可溶胀性/扩散和生物相容性，以及降低在涂覆表面上的不期望的吸附。

[0224] 优选的聚合物膜包含至少一种含有氨基基团的聚合物。特别优选聚乙烯基胺。其它适合的聚胺可以包括聚乙烯亚胺、聚烯丙基胺等，以及除了含有氨基的那些聚合物之外的功能性聚合物，例如聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸，其前体聚合物，例如聚（马来酸酐）、聚酰胺，或多糖类（纤维素、右旋糖酐、芽霉菌糖等）。如果采用了共聚物，优选的共聚单体有简单烯烃单体或极性、惰性单体，如乙烯基吡咯烷酮。所用聚合物优选的分子量的范围是，但不限于，5,000 道尔顿至 50,000 道尔顿，对于聚乙烯基胺尤其如此。分子量接近上面所给定范围下限的聚合物已经显示渗透甚至载体的窄孔，从而具有大表面积和因此具有良好传质动力学、分离度和结合容量的固态材料可以用于本发明的吸附

剂。

[0225] 在用第一残基和第二残基衍生化之前或之后,所述聚合物将被吸附并且然后交联或接枝至适合的载体表面上作为薄的吸附层(adlayer)。基于吸附剂总重量,所得杂化材料的膜含量,包含其与残基的衍生物,可以在约5重量%至30重量%的范围,优选地在约15重量%至20重量%的范围。完全功能性吸附剂的聚合物含量的精确值还将取决于衍生化的程度、残基的分子量和所选载体的比重。这些值在较低的纳米范围内与膜厚对应。所述涂覆聚合物仍然可以保留其溶胀或收缩的能力,实际膜厚因此极大地取决于所用溶剂的类型。

[0226] 聚合物膜交联度可以分别是基于可用于交联的官能团数量的2%至20%。特别优选的是通过官能团缩合的交联,但是可以使用聚合物化学中所有其它已知的方法,包括自由基(radical)和光化学。但是,交联键也可以在不加入交联剂的情况下在聚合物官能团之间直接形成。如果使用提供至少两种具有对彼此的潜在反应性的不同官能团的共聚物或混合聚合物,则尤其可能,例如胺基团和羧酸基团,其在活化之后可以在彼此之间形成酰胺键。优选的交联涉及共价C-N键的形成,例如酰胺、脲烷、脲或仲/叔胺键,并且可以通过活化的羧酸或环氧化物与胺类反应形成。或者交联可以具有非共价性质,利用在相反荷电官能团之间的离子对,或借助于多荷电抗平衡离子等。

[0227] 如本文使用的,“交联度”以基于可用于交联的官能团总数在交联反应中形成交联的最大量的形式给出。如果,如优选的,将双功能试剂用于交联,那么交联度会因此反映出参与交联反应的交联剂量与可用于交联的聚合物官能团的数量(在这种情况下一个交联形成需要两个官能团)之间的摩尔比,由此假定该反应以在此尝试的比例上几乎定量地进行。大体而言,可能形成链间和链内交联以及非交联的末端封闭的侧链(由部分反应的交联剂)。

[0228] 相反地,术语“接枝”意指单个聚合物链共价锚接(anchorage)到固体载体表面上,优选通过其上的官能团成形。如果各聚合物链在沿着其链的至少一个任意位置被锚接,就足够了。通过多点接枝以使在表面形成伸出的聚合物环,可以实现膜更好的稳定性。但是,后一方法降低了聚合物链的三维柔性。优选通过链末端实现单点连接,以使完全伸长长度的链可以从表面向外指,沿着该链可以连接优选的多个官能团/残基或仅在相对的末端连接一个。尽管接枝聚合物的实际构象可以是无规则线团,但使用表面高接枝密度和适当的溶剂可以引起溶胀和通过色散相互作用在相邻链之间引起定向自组装现象,例如在可以通过交联进一步稳定的聚合物刷的形成中。优选地,通过类似于交联反应的温和的缩合反应实现接枝,但是也可以应用涉及产生自由基、离子或自由基离子的方法例如氧化或辐射诱导方法。所选方法将取决于载体功能化的简便性、类型和程度。大体上可以通过两种不同技术实现接枝:第一种技术使用表面结合的单体或引发剂以通过原位-聚合反应自表面构建平行聚合物链,而在第二种技术中首先在均质介质中合成整条聚合物链,即不存在表面,仅随后将它在另外的步骤中接枝至表面。如果本发明的吸附剂通过接枝程序制备并且构成本发明方法的实施方案,那么优选后者技术。

[0229] 在本发明优选的实施方案中,聚合物膜如果通过共价键内部交联,则不是接枝,即共价连接至下面的载体材料,即它仅仅通过物理和/或化学吸附结合之上。因此,术语“结合”涵盖物理和/或化学吸附。复合材料的化学和机械稳定性随后由通过交联聚合物膜载

体的整个物理缠结引起。聚合物膜的厚度和密度仍然足以非常好地保护在支持载体的表面上的极性基团或反应基团,例如在固体聚苯乙烯磺酸盐的情况下的苯基或磺酸盐基团,免受接近,否则这些基团被怀疑会被试剂裂解或发生与靶蛋白质或肽或待分离混合物中的共存杂质发生不明确、不可重现或不可逆的相互作用。

[0230] 在又一实施方案中,将聚合物膜接枝至载体上,而本身不是交联的。作为第三种选择,可以将聚合物膜本身交联并接枝至载体上。聚合物膜的所有 3 种不同所得网络形态简要描述于图 2 中。图 2 的情况 A 表示优选的吸附剂,其中单独的聚合物链彼此共价交联,但不共价接枝至载体表面。情况 B 表示单独的聚合物链共价接枝至载体表面但不彼此共价交联的吸附剂。情况 C 表示单独的聚合物链共价接枝至载体表面并且彼此共价交联的吸附剂,作为两种固定技术(可以按任何次序进行)组合的结果。

[0231] 术语“官能团”意指任何简单、不同的化学部分,该化学部分属于(未衍生化的)固体支持体材料或被限制在其表面上的任选聚合物膜上或在所述表面制备期间通过膜吸附被限制在聚合物上,所述官能团可以用作化学连接点或锚,并且因此,至少在固体支持体材料或覆盖它的聚合物膜的溶胀状态下,适用于通过化学加成反应或取代反应的液相或固相衍生化和任选地还适用于交联。因此官能团典型地将含有至少一个弱键和/或一个杂原子,优选亲核或亲电基团。较低活性的官能团在衍生化之前可能需要活化。因此它们可以在吸附剂的聚合物链和残基之间形成结构连接以及形成交联网络的结。与残基相反,官能团主要不是旨在与分析物相互作用(尽管实际上无法严格排除它们会相互作用或通过排斥的旁边的成分而有助于分离过程)而是旨在提供覆盖特定化学反应性的分子尺度的点的表面,所述点可以转化为实际相互作用的残基(衍生化)或可以用于形成共价联接(聚合物交联和接枝)。如本文使用的术语“联接”或“连接”应该包括直接形成的共价键,以及通过涉及多个原子的序列排成一行的一长列共价键。可以在吸附剂或分析物上存在并且不履行这些已知的和指定的功能的其它化学部分下至简单二价分子片段,都简称“基团”。

[0232] 一组官能团可以以多个分离的但相同的单元的形式来处理,并且它们的化学行为主要仅由可预测和可重现的基团性质决定,并且在极低的程度上由它们连接的材料或它们在这些材料上的精确位置决定。这类官能团举不胜举,其中有氨基基团、羟基基团、硫醇基团、羧酸基团或羧酸酯基团。官能团体现固体支持体材料的整体部分并因此而均匀分布于其表面的大面积上。适合的官能团常显示弱酸性或弱碱性,并因此赋予了成膜性聚合物两性电解质的特性。聚合物中的官能团可以在聚合反应期间由相应的单体引入或在吸附至载体之前或之后通过随后的官能团转化(类似聚合物的反应)引入。如果将不同单体共聚,如果官能团转化在完成之前停止,或如果将不同聚合物彼此层叠或作为互穿网络,则聚合物膜也可以含有两种或更多种不同官能团。优选的官能团有伯氨基基团和仲氨基基团。特别优选是伯氨基基团。

[0233] 术语“衍生化”意指在吸附剂制备期间能够将特定残基引入固体支持体材料表面上或引入用于覆盖所述表面的聚合物中从而制备中间或完全功能的吸附剂的任何化学反应,具体地是通过用含有所述残基或其前体的适合的衍生化试剂加成或取代其官能团。该术语也应该涵盖官能团互变为不同但是仍然反应性的官能团。残基的“前体”可以加上掩蔽或保护化学部分,该化学部分可以在衍生步骤中在与表面或聚合物形成连接之后,或同时去保护或另外转化为最终残基。例如,如果聚合物包含伯或仲氨基官能团并且通过与这

些官能团形成酰胺键进行衍生化,那么包含在残基中的另外的伯或仲胺部分最初应当被保护,例如在衍生化试剂中的Boc-或Fmoc-衍生物。另外,如果在在表面或聚合物官能团与在衍生化试剂上的反应中心之间的衍生化反应期间,待形成的键引起新的化学部分的形成,该化学部分在靶蛋白质或肽的识别中起作用,那么在衍生之后各自残基显然只是被完全开发,并且仅仅它的一部分或功能修饰部分作为前体包含在衍生化试剂中。在这种情况下,部分前体部分(离去基团)也可以在衍生化反应期间分离(例如在缩合反应期间的水分子)。

[0234] 在至少一个或任选地多个步骤的每步中的衍生化总是在官能团的“限定部分”上进行。就不同官能团和试剂的反应性而言,这意指存在于未衍生化的聚合物或固体支持体材料中目标设定百分比的各给定种类的官能团总是被转化为用各自所选残基衍生化的官能团。为了得到均匀的和可重复衍生化的吸附剂,然后使计算的适当量的衍生化试剂与聚合物反应。也可以尝试完全衍生化(衍生化程度=100%),由此衍生化试剂经常过量使用,但是这并不是必需的。

[0235] 因为像这类吸附剂的残基材料不应该在衍生步骤期间破坏,它常适合在温和条件下进行衍生。因此,为了在这类条件下保持足够的反应性,在实际键形成步骤之前或随该步骤同时活化官能团或衍生化试剂可能是必要的。优选地,将所述衍生化试剂活化。优选的衍生化反应涉及含有富电子氮官能团例如氨基基团的亲核聚合物和含有与缺电子的碳连接的离去基团(例如羰基或羧基衍生物)的亲电试剂,或反之亦然。因此可以通过固相或液相肽合成的标准技术实现活化,例如通过活化酯类。优选的衍生化反应涉及与官能团形成酰胺、脲烷、脲或仲/叔胺连接。由于酰胺和脲烷连接相对于羰基碳具有不对称性,因此它们可以分别从氨基或羧基聚合物方向和从氨基或羟基聚合物方向形成。

[0236] 吸附剂的亲和性和选择性很大程度上取决于两种或更多种不同残基的组合。术语“残基”意指任何不同的化学部分或相同或不同种类的化学部分的明显可识别的、重复存在的排列,只要亲和力强于与在吸附剂表面上的晶格或聚合物链的CH或CH₂重复单元的范德华接触,该化学部分能够在纳米尺度组装(通过其自身或其自身的一部分或在相同或不同种类的残基簇内)到对至少一种蛋白质或肽的至少一种互补结构或表面区域具有高和/或选择性亲和力的复合物或位置中。在固/液界面的这种位置在涉及生物大分子特异性相互作用的类似描述中被称作“结合位点”。由此残基可以是全合成物或天然产物或其片段或组合,但是应适用于化学合成和/或衍生化。它可以含有多于一种不同的化学部分(包括化学惰性部分例如,烷基或亚烷基单位,其仍然能够参与疏水或色散相互作用)。

[0237] 因为以可变的比率将两种或更多种不同残基引入吸附剂,所以结合位点将含有两种或更多种相同和不同残基。涉及形成特定结合位点的全体残基,彼此二维或三维空间相当靠近,并且可以,但不是必须,包括相邻表面官能团或聚合物膜相邻的重复元上的残基。常见结合位点的单独残基也可以属于表面交联或接枝聚合物的不同链(该原则还适用于暴露在各蛋白质或肽表面上的结合相对部分)。另一方面,两个或更多个邻近的或重叠的结合位点可以共用一个特定的残基。由于在表面上或在聚合物膜之内的官能团上的交联和残基分布随机(统计学的)性,所以可以形成类似但结构上和能量上都不相同的结合位点的所得分布。因此,这些结合位点的尺寸和对靶蛋白质或肽的亲和性可能在相当大程度上不同,但是这在实践中并未被证明是缺点。

[0238] 在吸附剂结合位点与靶蛋白质或肽之间的“结合”应该是可逆的,并且因此应当

通过在吸附剂互补化学部分之间的任何形式的非共价相互作用进行。一般非共价方式结合有离子相互作用、氢键合相互作用、供体-受体电荷转移相互作用、 $\pi-\pi$ 相互作用、阳离子- π 相互作用、偶极相互作用、配位相互作用、色散相互作用和疏水相互作用,但是经常会遇到不能够指明单独结合方式贡献的混合形式和非计量形式。因此,单、双或多同时接触可能会发生在可能包括相同的或不同残基的结合对(binding partners)之间。影响分析物在粗糙表面上和在微孔中的流动性的物理力和熵力(entropic forces)以及溶剂-介导的相互作用可以增加导致结合的因素。在某些情况中,包含吸附剂和至少一种结合蛋白质或肽的所得复合物可以是可检测的或甚至是可分离的,但是更多时候它仅仅具有不稳定的性质。没有适用于结合力的下限,因为这类值不仅是给定吸附剂-分析物对的固有性质而且溶剂依赖性也很强。此外,即使 1kcal mole^{-1} 的 Gibbs 焓差仍然可以通过色谱方法解决,这是由于柱多串联平衡(multiple serial equilibrations)的原因,所述柱的理论塔板数可以采用约 10^3 至 10^4 /米色谱床长度的值。在色谱应用中,结合也应不太强,因为否则在周围环境或生物相容的条件下难以实现可逆性。

[0239] 就本发明的吸附剂而言,可以将残基与在固体支持体材料表面上的官能团连接,所述支持体材料包括覆盖所述表面的任选聚合物膜,并且,如果这样,那么吸附剂就包括从官能团连接点的表面伸出的整个局部结构,或至少是在不同官能团上以相同方式存在的整个局部结构的一部分。不需要全部残基直接参与靶蛋白质或肽的结合。残基也可以含有仅为了使实际结合结构彼此分离或联接或为了提供用于结合位点的几何学上适合的框架从而将结合结构呈现给标靶的原子或部分。因此在固体支持体材料上特别是在其表面任选聚合物膜上的官能团与实际结合结构之间在形式上将任意的间隔单元、分支单元或其它连接单元分配给各残基的部分,它们与所述残基进行至少一种联接。所述联接通常可以通过,在任选聚合物膜以均质或非均质的方式应用于载体介质上之前或之后,以随机(普遍)或选择性方式的官能团的至少一种特定的衍生化过程来实现。因此,聚合物溶液或薄膜可以与已含有残基或其前体的预合成衍生化试剂反应。

[0240] 但是,如果官能团或它们的结构部分通过用残基或其前体衍生化转化为不同种类的部分,或随后与所述残基另外的原子形成完整的化学单位(例如,在 $-\text{NH}_2$ 官能团转化为 $-\text{NHCO-R}$ 残基中的氮原子),则也可以认为它们基本上丧失了它们作为官能团的特征,从而被认为是属于所述残基的结构部分。

[0241] 如果相同或不同种类的残基直接地或通过共价、构象柔性连接体与固体支持体材料官能团单独连接,则假定它们独立地适应它们在靶蛋白质或肽表面上的互补对,驱动力为最低总吉布斯焓。因此对于本发明的目的而言,并不需要以针对给定蛋白质或肽表位(以天然抗体为例)的最佳结合的正确三维空间取向来组织结合位点的残基;它们仅仅需要通过它们构象位置的探测(底物诱导契合)就能呈现这种取向。很多情况下,特别是如果需要不同的结合,那么靶蛋白质或肽的两种或更多种不同的或重叠的表位可以通过相同的吸附剂识别。

[0242] 尽管术语“残基”是被功能性限定的,其是指从吸附剂表面伸出并在上面相同或相似地重复很多次用于参与分析物结合的整体单元,但是这种残基可以在分子结构水平上由一个或多个可识别的但其自身为连续的亚单元,即所谓的“结构”,组成,所述残基仅在形式上可以被分割成这种亚单元。该术语在本发明中以其最广泛的可能性含义使用。尽管有

些随意,但将残基分割为不同结构应遵循化学相似性和直观的原则,由此分子部分或片段应该根据共同的结构性和/或物理性有意地归纳到一起。因此与属于相同残基的不同结构相关的功能也可以是不同的:某些结构(特别是C、N、O、S-杂芳结构)可能与分析物的结合有关,而其它的结构不是。鉴于根据本发明实现的吸附剂由于残基的微小结构变化而具有无数种可能性,在这种基础上,可以将残基的必需部分与非必需部分分离。对于不主要参与分析物结合的那些任选结构,“连接体”是附属物,其是短分子(常为简单烃)链,任选地在一端或两端包括用于进行必需联接的功能性或不饱和化合价,并在实际结合结构与邻近的结构和/或吸附剂表面之间形成结。因此例如有可能在本发明吸附剂中使用若干不同残基,这些残基都含有双核C、N、O、S-杂芳的结构,但是却有不同种类、不同长度或不同联接性和任选或缺少其它结构的连接体。那么这样一组残基可以在分子水平上有所不同,但是它们功能上完全称得上在本发明含意内的“第一残基”。连接体的用途将在下文更详细地进一步讨论。

[0243] 用于靶识别的残基结构包括“杂芳结构”,其在狭义上是与蛋白质或肽分析物接触发生相互作用的残基的那些主要结构部分。在上下文中的表述“杂芳的”意指显示持续离域、闭合环 π -电子体系的芳族特性(如例如在NMR光谱中通过非均质磁屏蔽所表明)和仅仅由碳和至少一种选自包括氮、氧和硫的环内杂原子(endocyclic heteroatom)组成的环或稠合环体系。只要产生不超出杂原子常见化合价的稳定的结构,在相同或不同环内可以组合相同或不同种类的杂原子。

[0244] 根据通用命名法,“双核”表示由任何尺寸的两种芳环组成的稠合的双环状体系,两个环共用两个相邻的环原子(在几乎所有情况下都为碳)、它们之间的共价键(即,[n. m. 0]零原子长度的桥)和共同的共轭 π -电子体系,而“单核”表示任何尺寸的分立的单环。然而其它芳族的、杂芳的、脂族的或杂脂肪族的环或环体系可以通过与至少一个环原子直接单键连接,任选地通过间隔单元,与杂芳的结构连接作取代基。但是,延长的环稠合(双点取代基连接)仅仅可以使用脂族的或杂脂肪族的环,以致杂芳的 π -电子体系并未延伸至另外环的全长,并且避免产生更高核性的环体系。杂原子的数量、组合和分布以及它们形成的 π -键级(其可以是分数的)由此与杂芳的分类无关;唯一的必要条件是至少一个杂原子位于环内并且共用共同的共轭环体系的至少一个 π 电子。由于存在将残基分割为结构的多种单独的可能性,因此如果至少一种可行的第一残基片段和第二残基片段分别导致双核和单核C、N、O、S-杂芳的结构,那么在上下文中它应当是充分的。优选的杂芳结构含有至少一个,更优选地精确的是一个5元环。

[0245] 如本文使用的术语“C、N、O、S-杂芳结构”意指除了碳原子以外还包含杂原子N、O、S中的至少一个的双核杂芳的结构、单核杂芳的结构。

[0246] 在一个实施方案中,杂芳的结构包含至少一个N原子和至少一种另外的杂原子N、O或S。在一个这类实施方案中,所述杂芳结构包含两个N原子,这种杂芳结构例如有咪唑。

[0247] “取代基”是被视为杂芳结构任选部分的有机自由基(除了氢),并且因此被认为也参与分析物结合。它们类似于这些杂芳结构的环外部分,它们通过至少一个共价键与所述杂芳结构的核心共价结合而不包含形成所述环的原子,所述核心即形成双核或单核杂芳的环的原子。除了若干杂芳结构通过直接共价键彼此连接的情况之外,这类取代基通过其自身通常仅仅显示与靶蛋白质或肽的弱的和非选择性相互作用,并且可以用于调节残基的

疏水 / 亲水性。如果它们在没有任何 C、N、O、S- 杂芳的情况下与吸附剂表面结合, 它们并不能令人满意地达到本发明的目的。

[0248] 在现有技术中, 显示高亲和性和选择性的吸附剂主要已知来自固定有生物源的抗体或其它高分子量受体的固体支持体材料。这类抗体首先必须针对涉及活生物体的生物学过程中的靶抗原来汇集, 或者靶蛋白质或肽必须与抗原或仅少数先前已知的天然亲和对的一种成分可逆结合。本发明的吸附剂与这些吸附剂的区别在于它们的残基可以通过化学合成来获得, 在于低分子量以及在于高化学稳定性。但是, 它们也可以以固定相的形势在所有类型的亲和色谱法中实施。

[0249] 术语“蛋白质”和“肽”分别表示聚氨基酸和寡氨基酸, 作为化学、生物合成或生物分析明显可识别的实体, 其可以具有合成源或生物源 (与它们是否可能存在于自然界中无关), 具有直链或支链同聚或异聚序列, 并且对其没有最小或最大序列长度或分子量的限制。最低要求是它们应当包含通过至少一个酰胺键缩合的至少两个氨基酸, 其将, 例如, 相当于二肽。所有仍然能够形成肽键的非蛋白氨基酸或完全非天然氨基酸、 β -氨基酸、N-烷基氨基酸、另外的肽模拟物单元等的存在, 不应是有害的。常可以通过分步法或收敛 (convergent) 法合成地制备小的 (寡) 肽; 在这类情况中术语肽应该还包括通过罕见的连通性 (connectivities) 形成的能得到的结构例如, 缩肽或类肽。较大蛋白质通常具有限定三维结构, 该三维结构可以采用很多的不同形状, 例如球形 (白蛋白) 或丝状 / 纤维状 (肌动蛋白、胶原); 它们可以溶于胞液、膜结合的细胞外基质部分中, 或可以存在于细胞表面上。由于微量的蛋白质可以用现代分子生物学方法处理, 识别它们不需已知它们的主要的氨基酸序列; 有时甚至不知道它们是否以均匀组成存在。与 (胶体状的) 分散载体 (纳米) 颗粒例如病毒、量子点或乳胶球表面结合的蛋白质或肽通常首先需裂解从而暴露出与吸附剂相互作用的它们整个分子表面的其他防护部分, 然后它们可以用于本发明分离方法。

[0250] 上述术语一方面包括非共价肽聚集物以及同和异源多聚体蛋白质, 但另一方面也包括全蛋白质的功能性或非功能性亚单元, 例如酶切或双硫键还原的产物, 以及新设计的微蛋白质, 例如“affibodiesTM”、“anticalinsTM”、“nanobodiesTM”, 或其它人工重构的活性部位。在蛋白质中可以包含金属离子或复合物, 通常在它们的活性部位。可以通过体内翻译后的修饰, 例如磷酸化、硫酸化 (sulphatisation), 糖基化、葡萄糖苷酸化或泛素化, 来修饰分析物蛋白质。与糖苷类和脂质的结合分别生成由不仅是氨基酸的其他结构单元形成的糖蛋白和脂蛋白。蛋白质修饰的向上调节或向下调节可以作为产生它们的生物体的某些病理状态的标志, 由此蛋白质修饰通常是极为重要的。同样地, 表面以及蛋白质的活性位点或别构位点的体外生物化学修饰包括与底物激动剂或拮抗剂以及各种保护性化学基团 (氨基、羧基、侧链官能团) 形成可逆或不可逆的复合物。蛋白质或肽可以进一步用化学或生化的方法标记 (例如用寡组氨酸序列标记, 结合染料或放射性标记物) 或与另一个 (载体) 蛋白质融合从而增强蛋白质或肽的表达、溶解度、排泄、测定或分离, 由此结合点可以是可裂解的, 但是它们也可以缺少它们自然序列的部分, 例如, 膜锚尾 (membrane anchoring tail)。

[0251] 如果使用术语“靶蛋白质”、“靶肽”或仅是“靶”之一, 那么特定的蛋白质或肽, 或多个蛋白质或肽 (通常与结构、分类、合成或起源相关), 意指为其设计了具有特异性残基的吸附剂。这通常是对吸附剂显示出最高亲和力分析物或所提供混合物的组分。靶蛋白质或肽与其潜在的蛋白质副产物的区别可以不仅在于其氨基酸序列 (归结为单点序列突变

或缺失并包括在基因转录期间由选择性剪接或 SNP 变体所产生的那些) 而且还在于其完全二级和三级结构元素, 这些元素包括不同折叠(自然、未折叠或错误折叠的) 状态的存在。该靶蛋白质或肽常是, 但并非必须是所提供混合物的主要组分(按重量或摩尔浓度计), 甚至也并不一定是主要肽的组分。不管该靶标在混合物内的丰度如何, 该靶标都常是, 但不是必须是有价值的混合物组分或需要提纯的特定物质, 后者可以包含在通过的级分中。因为很多蛋白质或肽具有明显的毒性, 在保健或环保应用中该靶标也可以是来自必须废弃的混合物中的这种有毒的或显示其他不期望性质的蛋白质或肽。还有可能就是该靶标并不是制备过程的主要产物而是次要副产物, 需要从混合物剩余物中分离或移除所述副产物从而提高另一混合物组分的浓度或纯度, 所述另一混合物组分通常是主产物, 其可以是或可以不是蛋白质或肽。对于多步血浆分级过程, 很多连续分级可能是必需的, 从而精制同时存在于所提供的混合物中的整批的不同蛋白质或肽, 由此可以在下一个阶段吸附在分级特定阶段通过的级分, 反之亦然。

[0252] 在待分离的混合物内能够在适合条件下与本发明吸附剂至少发生弱相互作用的所有溶质的全体(包括靶标) 称之为“分析物”。大部分分析物是蛋白质或肽, 因为吸附剂是为蛋白质或肽是分析物而设计的, 但是在某些情况下, 小的非肽分子可以属于这类。紧密相关的分析物可以共同形成合成或生物合成库, 例如一种源于胰蛋白酶切、噬菌体呈现文库或在体内或体外已适当转录的随机 cDNA 文库的表达产物的文库。但是, 吸附剂针对具有从靶标组脱离的结构分析物的亲和力通常会快速下降, 并且如果它们在结构上与靶标无关, 则亲合力接近 0。

[0253] 优选的蛋白质或肽的等电点 pI 为 5.5 至 8.5 并且它们的分子量可以为 100 至 500,000Da。这些 pI 值与包括在至少一个第一残基和第二残基中的至少一个杂芳结构的酸度 pKa 近似地匹配。本发明吸附剂的具体优选的靶蛋白质是“抗体”或其混合物, 术语还应该包括抗体的片段(轻链和重链、Fab 和 Fc 域、Sc 可变域等)、由这类片段形成的人造分子构建体(双抗体、三抗体)、抗体的低聚物、以及包含抗体或抗体片段的融合蛋白, 或例如含有可测标记如谷胱甘肽或 GFP 的其它类型的缀合物, 其也可以彼此化学连接。它可以是多克隆抗体或单克隆抗体。通常免疫球蛋白(Ig、 γ -球蛋白) 中, 抗体可以属于任何同型 IgA、IgD、IgE、IgG、或 IgM, 各同型可以被分成若干亚类。抗体可以是人源或其它哺乳动物源(通常是: 鼠类或啮齿类(小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠)、山羊、绵羊、狗、猪、牛、马)。优选的抗体是人抗体或人源化(嵌合的) 抗体。它们的个体基因型可以直接针对所有类型的抗原(其它抗体或生物学物质、小分子)。

[0254] “含有蛋白质或肽的混合物”意指可以是多种源的混合物。本发明没有关于混合物得到来源的严格限制。仅仅需要的是它包含至少一种称得上分析物的蛋白质或肽, 本发明吸附剂对其至少显示了弱的受体性质。该混合物可能由此含有两种或更多种不同蛋白质或肽, 所述的蛋白质或肽为想要从混合物的剩余物中被全体分离的(即, 它们全部都是分离靶标) 或将其彼此分离的(即, 它们中的仅仅一种或少数是分离靶标)。在混合物内至少两种蛋白质或肽的由吸附剂残基识别的结构基序(表位) 可以是相同的、类似的或部分相同的, 或不同的。假定后一种情况会在很多情况中导致与吸附剂发生不同类型的相互作用, 并且因此导致结合上有更大差异, 条件是至少两种蛋白质或肽的分子量相当并且含有大约相同的数量的可识别的表位。

[0255] 如果蛋白质或肽是天然存在的或重组制备的物质,那么它可以得自例如动物、植物、微生物或病毒(包括过渡制备产物的培育物种或转基因物种)的液体或固体生物学原料的新鲜或干燥的提取物、来自细胞培养物或细胞培养基的提取物、微生物(细菌的或真菌)或酶的发酵液、商品化原料或其任何组合。或者,含有蛋白质或肽的混合物可以是化学合成或化学部分合成的粗产物。这特别包括手动地或以自动化方式实施的标准溶液合成方法和固相肽合成方法。

[0256] 通常对于任何提纯技术特别是任何色谱技术,待使用的精确条件不仅取决于靶蛋白质或肽的构造还取决于样品基质的构造。“基质”是用于混合物的所有活性和非活性组分全体的术语,不包括靶标但是包括它们分散于其中的介质。这是因为,通常在分离过程中不是利用了靶蛋白质或肽的绝对物理或化学性质,而是利用了靶蛋白质或肽和所有或一些特定基质成分之间所述性质的差别。通常,基质的组成至多是仅仅(定性和定量上)部分已知,因为一种单一的分析方法常不能测定所有组分,至少不具备相等的灵敏度。在化学或生物学物质下游分离和提纯期间的不同过程阶段得到的中间产物表示在用于本发明上下文的含意之内的不同基质。在分析的上下文中,对吸附剂的吸附行为进行测定的整个混合物(靶标和基质组合的)也常称作“样品”。

[0257] 在用本发明吸附剂处理之前,可以通过其它无破坏性的单元操作的任何组合的其他预处理来部分提纯未加工的化学或生物学材料,所述其它无破坏性的单元操作具体的是传统分离工艺,其可以包含过滤(包括微滤或超滤)、渗析和电渗析、洗涤、沉淀、离心、离子交换、凝胶过滤、溶解、蒸发、结晶、干燥、研磨、任何方式的病毒减少处理以及常规色谱法(基于低特异性吸附剂的色谱法或生物学残基的常规亲和色谱法),从而尽可能多地从化学或生物学物质中移除废料(例如,不溶解的物质和大部分的蛋白质、核苷酸、碳水化合物、脂质和生物学材料中的无机物,仅仅留下有价值的物质)、有害的物质或使质量变坏的(aggressive)物质或怀疑可能会使吸附剂变质或降低它分离的能力的物质,由此,在靶标和吸附剂接触之前增加靶标的浓度。在上下文中,提及 LC/LC-偶联技术。在用该吸附剂处理干燥混合物例如冷冻干燥的(freeze-dried)或冻干的(lyophilised)物质之前,需要将它们置于适合的所提供的溶剂中。期望的是,溶解的混合物是均质的并且没有悬浮颗粒或胶体颗粒。同样地,本发明的分离方法也可以随后与上述所给定方式的一步或多步组合。

[0258] 很多蛋白质或肽已经在工业规模上进行制备,并且已经发现其在药物、营养(例如营养保健品)、化妆品或农业中的应用。直到现在,它们中大部分的大规模生产,在经济上和合理的时限之内,仅仅可以通过生物质提取来实现,即由例如药用植物、使用原核微生物或真核微生物的微生物发酵物,或直到昆虫或哺乳动物细胞的更高级的生物体细胞培养物中得到的生物物质(例如常使用的 CHO、NSO、BHK 或永生的 HeLa 细胞)。综上所述,因此根据本发明的混合物的常见来源是生物合成的产物,例如从微生物或细胞培养物中,或从农作物提取物中得到的那些。

[0259] 微生物发酵物包括细菌菌株或真菌菌株(例如酵母菌)在水下的培养物或漂浮的培养物。可以从整个生物体收获物中或从分离部分例如菌丝和/或相应的培养基上清液(该产物可以被分泌其中)中提取产物。半合成程序包括天然产物或中间体的下游化学修饰和合成原料的生物转化。在所有情况中,副产物经常包括蛋白质亚型、截短型和累积的中间体或沿生成靶蛋白质或肽的生物合成路径的后续产物。此外,这些副产物可能带有分泌

的抗生素、内毒素、真菌毒素、热原、细胞增殖的激活子或抑制剂、蛋白酶抑制剂、消泡剂、不完全消化营养物的残留物、部分降解的产物,以及高分子量成分和部分不溶解的成分(例如细胞碎片),因为它们可能得自产生生物体的终末期细胞溶解。由于另外的物质种类如核苷酸和大量所谓的宿主细胞蛋白释放入可提取的介质中,因此细胞溶解常进一步增加了混合物的复杂性。

[0260] 与本发明分离方法相关的术语“分离”包括使混合物成为部分的各种分开或分离,具体地是分为一种或多种结构上不同的组分,所述不同的组分在分子层面上溶于液体并将它们分摊至不同的液体级分中。混合物的一种重要成分总是至少一种其它混合物成分中分离出的靶蛋白质或肽。由此,是否该靶标以一种级分分离并且副产物全体以另一种(共同)级分分离,或是否各单独的混合物成分以其自己的级分从任何其它成分中分离,或是否方法导致了在这些极端情况之间的任何事,都无关紧要。如果在实施该方法之后得到的至少一种液体级分中观察到已经存在于原始(所提供的)混合物中的至少一种溶解的蛋白质或肽的富集就足够了。分离的副产物并不一定需要作为单独的液体级分回收;例如它们也可以保持与吸附剂结合,从而这样被丢弃。通常,如果分离过程残存有不完备的地方,就会在包含有价值的所需产物的级分中造成收率损失。避免洗脱带重叠的急剧分级将会提高分离质量(即纯度)而代价是更多的收率损失。

[0261] 术语“浓度”和“纯度”涉及各物质在混合物中给定的或可得到的分数含量,由此术语浓度意指溶液同时包括在混合物的整个参照量中的溶剂量,而术语纯度意指(有时是假定)不考虑溶剂(包括残留的水)的干燥混合物。它们最经常被表述为重量分数或摩尔分数(重量/重量、重量/体积、摩尔/摩尔、摩尔/体积)。根据在特定系统中将会实现的更重要的目标,可以因此获得更高纯度,而代价是更高的稀释度(即较低的浓度)反之亦然。用于测定如本文使用的这些指标的实际值的量度是通过 HPLC 峰面积,由此必须注意的是,除了重量以外的每种定量方法都会对好检测的混合物成分和不好检测的混合物成分显示出某些偏移,并且也可能会得到非线性校正曲线。例如,不溶解的物质用 HPLC 就不可定量。根据其来源、其分离和预处理方法,该混合物可以典型地含有(组合的)纯度是 1% 至 99%,优选地是至少 10%,更优选地是至少 50% 的靶蛋白质或肽,剩余物是结构上和功能上与靶标不相关的副产物或化合物,例如残留溶剂、残留试剂等。根据实际提纯任务,因此本发明的分离方法可以用作非常稀的混合物或粗制的混合物的初始捕获或分离步骤,或用作含有几乎纯的靶蛋白质或肽的已预提纯的混合物的最终精细纯化(polishing)步骤。该混合物的副产物和其它组分的数量可以从一个(例如单点序列突变或缺失)至基本上无穷大的数(例如未处理的生理学样品)。副产物的种类同样取决于原料来源和之前的处理。

[0262] 术语“接触”意指,通过在两相之间建立现象上(湿润)以及分子(表面扩散或孔隙扩散)尺度上的直接接触,用作为固体(固定)相的吸附剂对液体(流动)相中的初始(提供的)混合物做出的任何适当处理。形成的接触应是足够强足以使所有分子状分散的混合物成分(至少除了靶蛋白质或肽以外)都可以到达残基所在的吸附剂所有外表面和任选内表面,然后使它们相互作用。接触形成可以在静止状态或(柱塞(plug)、层流、紊流等)流动状态下发生,例如在吸附剂颗粒的固定床或流化(膨胀)床上。因为该混合物将溶于第一液体(给料液体或吸附液体)中,所以这将是非均相过程并且通过搅拌或振荡所得悬浮液可以宏观上加速接触形成,尽管对结束这种操作步骤并没有时间限制,除非达到靶蛋

白质或肽和任选地副产物与吸附剂的稳态结合平衡的建立。

[0263] 如本文使用的,术语“液体”意指任何溶剂(包括作为最重要的一种——水)或对待分离混合物的一种或多种成分具有至少弱的溶解性的溶剂的混合物。不同组成的液体可以用于在所述方法不同步骤中处理吸附剂,因为在各步骤中,其中所用的各液体必须完成它应该完成的特定任务,例如靶标吸附(结合)、靶标解吸(释放)或吸附剂清洗。在色谱环境之内,能够使混合物的一种或多种成分与吸附剂动态平衡交换的液体常也被称作流动相。因为基于本发明的吸附剂的色谱分离主要取决于强极性和疏水相互作用,所以可以使用对单独混合物成分具有不同溶解能力的各种各样的液体组成,就取决于哪个类型的相互作用受到青睐。为了在该分离方法任何给定步骤的时程内进一步调节任何或所有这些相互作用的强度,逐渐变化在所述步骤之内使用的液体的组成,例如通过梯度混合,有时也可能是建议的。因此,用于完成特定任务液体的组成,在使用它的过程的全部时间内,并不需要是恒定的。当选择适合的吸附液和洗脱液时,也必须考虑靶蛋白质或肽的特性溶解度。除了膜结合的那些之外的蛋白质,如果它们必须以它们的天然状态保存并且避免聚集,那么通常需要使用高含水量液体。很多蛋白质或肽也能耐受低至中百分比的二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、乙腈或低级醇类和低级二醇类。因为本发明的吸附剂对几乎所有质子有机溶剂和非质子有机溶剂是化学抵抗的,特别是在包含在载体中的本体固体支持体材料受到表面聚合物膜保护的情况下(所述聚合物膜是唯一直接与液体接触的材料),优选便于吸附剂溶胀或至少便于位于其上所述任选聚合物膜溶胀的那些主要极性液体。由此,兼容的液体混合物精确的极性可以通过其组成容易地微调。

[0264] 此外,可以优选向这类液体或液体混合物中加入少量的辅助物质例如——优选挥发性的——酸、碱或缓冲液,因此通过调节应用液体的pH(或,在部分有机洗脱液中,调节表面pH)以及由此调节选择的或所有分析物的质子化和/或去质子化的程度,和/或选择的或所有吸附剂的残基的质子化和/或去质子化的程度,能够使它们在不同溶剂化容量之间转换。在这方面,适用的材料有,例如,甲酸、乙酸、三氟乙酸和它们的盐。加入高浓度的惰性有机盐或无机盐也可以适用于改变液体的离子强度,并因此适用于通过竞争相互作用选择性断裂在分析物和吸附剂之间的离子对。但是,在制备应用中,如果意欲通过结晶进一步提纯靶蛋白质或肽,那么这类不挥发的盐添加剂稍后将难以从回收的洗脱物中移除。

[0265] 在某些情况下可能有利的是,将其它有机改性剂连同吸附剂一起用于蛋白质或肽混合物的分离,它们通过机制产生作用超出了液体pH或离子强度的单纯调节。作为“改性剂”,概括了小分子或大分子或其混合物,其本身不是具有溶剂化性质的液体,但是可以少量溶解或悬浮在用于本发明分离方法的多种液体的一种或多种中,在该方法特定步骤期间以帮助或预防待分离的混合物某些成分溶解/洗脱,或因为诸多第二(技术的)原因,例如,溶剂的长期稳定和保存、吸附剂生物淤积的预防、保护分析物免于化学或生物学降解或免于凝固、增强溶剂可混性、吸附剂溶胀、改善分析物测定、除去水结构、控制蛋白质解折叠或重折叠等,取决于单独的分选问题。有机改性剂特定实例是离子对试剂、表面活性剂(洗涤剂)和离液剂。

[0266] “漂洗”、“洗涤”和“再生”是用于更好地区分用不同种类液体的分步处理相同吸附剂的不同表达。由此该液体的区别在于它们实施的任务,而不是在于它们的组成。处理的实际程序可以由此是非常类似的,并且有时仅有的不同之处在于:处理之后基于溶解于液

体中的物质做出是否液体必须进一步精制、分馏、回收或清除的决定。漂洗指用理想地从吸附剂中溶解和释放可能不确定地被吸附剂结合的除了靶标以外的任何混合物组分的液体处理。洗涤指意欲从吸附剂中溶解和释放所有残留结合的混合物成分,甚至是那些可能比靶标结合更强的混合物成分的处理。再生指使用能够移除痕量洗涤液的液体并且所述液体能够使洁净的吸附剂恢复理想的物理和化学性质用于下一轮方法开始时的吸附步骤。

[0267] “固定”意指消除或基本上阻滞在吸附剂表面上的蛋白质或肽大范围横向流动和/或纵向流动的过程,这些流动可能另外由统计学的、扩散移动(布朗运动)或直接的物理力或化学力(例如渗透压、剪切流)引起。在表面吸附部分上的固定蛋白质或肽的宏观二维或三维方位可以因此被视为在短时间固定。在固定中心周围按纳米顺序的不可避免的小波动(例如构象变化、分子转动或振动、在邻近的结合位点之间跳跃,或在蛋白质或肽自身和结合于其上的残基以及(任选地聚合的)用于固定的各结合位点残基至表面固定的链的组合半径之内的任何平移运动,仍然保持未受影响。结合的蛋白质或肽通过横越结合表面层长时间的缓慢释放也可以是所需的性质。

[0268] 在限定了物质组成的主要实施方案中,本发明涉及一种新的吸附剂的靶标-特异性设计。具有官能团的固体支持体材料已用于接下来的表面衍生化,产生适于和本文所包括的靶蛋白质或肽发生多价和/或多功能的空间相互作用的多个残基的二维或三维排列。在测定多种残基之后,具体地发现是,如果包含所述杂芳残基的吸附剂用作固定相,那么用双核和单核杂芳残基对固体支持体材料的官能团部分的两次衍生化,在接下来的将蛋白质或肽彼此分离或从它们的副产物中分离的色谱分离中有优越的性能。

[0269] 本发明的一般方面因此可以用包含固体支持体材料的吸附剂描述,该固体载体材料的表面包含含有双核杂芳结构的第一残基以及包含单核杂芳结构的第二残基,所述双核杂芳结构除碳原子以外还含有杂原子 N、O、S 中的至少一个,所述单核杂芳结构除碳原子以外还含有杂原子 N、O、S 中的至少一个。

[0270] 本发明更具体的方面可以用根据如在“发明概述”部分所列举的第一方面、第二方面、第三方面、第四方面和第五方面的吸附剂描述。

[0271] 用于描述根据第三方面和第五方面的吸附剂的术语“其中没有一种所述官能团包含所述第一残基和所述第二残基二者”意指载体表面可利用的官能团少于 5%,优选地少于 1%,更优选的少于 0.1%,仍然更优选的没有一种官能团,携带第一残基和第二残基二者。

[0272] 在具体实施方案中,通过常见分析方法例如光谱法检测不到官能团携带第一残基和第二残基。

[0273] 吸附剂的所述固体支持体材料可以选自聚苯乙烯、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、二氧化硅、玻璃、淀粉、纤维素、琼脂糖、琼脂糖凝胶和右旋糖酐,或其任何复合物。固体支持体材料可以属于一般本体材料或其它表面-修饰例如引入表面官能团或增加水性可湿性的材料的类型。

[0274] 在特定实施方案中,所述吸附剂还可以包括易于检测的标记物,例如光学吸收标记物、光学发射标记物、放射性标记物、或质量-或射频-编码的标记物。所述的标记物可以用于识别甚至在吸附剂混合物中的具有其残基单独组合的特定吸附剂,或便于蛋白质或肽结合的测定。所述标记物可以并入固体支持体材料的核心,或者连同残基一起并入其表面上。

[0275] 对于如上述所提及的 C、N、O、S- 杂芳结构,特别是属于一些常存在于小有机分子化学结构中的 C、N、O、S- 杂芳结构,例如图 3 和 4 中所描述的清单的那些。在两种残基类型中都优选在至少一个环内含有至少一种氮原子的杂芳结构。通常杂芳结构的环核心除了 C-C 或 C = C 部分之外还主要由 -NH-、C = N、-O- 或 -S- 类型的一个或多个部分组装。特别优选 5- 元和 6 元环核心。通过仔细选择各自的杂环核心和取代基、第一残基与第二残基的摩尔比率和引入任选其它残基得来实现给定的特定蛋白质或肽的吸附剂的特异性亲和力的微调。因此很显然,不可能彻底地处理完全变化;相反,根据现存要求用于构建吸附剂的概念框架将给出。

[0276] 为简单起见,在图 3 和图 4 中针对各结构仅仅显示一种内消旋形式。此外,如果存在这类结构杂芳特征的至少一种合理的内消旋形式或互变异构形式,即便有另外的非杂芳形式的可能,为了本发明的目的,在术语“杂芳的”含意之内都是足够的。可以通过任何环原子,包括作为连接点的杂原子上的自由价,形成在环体系和残基剩余部分之间的联接,和因此最终联接固体支持体材料。

[0277] 所显示的一些杂芳结构,特别是那些包含一个或多个弱碱性氮环的杂芳结构,是离子化的,意指电中性原子或包含它的任何基团,在待实施的分离条件下(即,通常是不影响吸附剂或分析物结构完整性的温和条件或环境条件),可以可逆地转化(例如通过质子化或去质子化)为阳离子或阴离子,该阳离子或阴离子在环境条件下是稳定的或与不荷电的形式处于平衡状态。更具体地,吸附剂的 C、N、O、S- 杂芳残基将至少部分地适用于质子化,并且因此至少部分地以它们质子化的形式存在。尽管带电形式并没有在图中明确显示,但在所给定的条件下,实际上几乎完全可以在任意一边保持平衡,并且在带电和不带电形式之间仍然可以有可测量相互互变。质子化取决于环境 pH,但是在大多数疏质子的有机溶剂中也很普遍,并且使得难以区分是否两种形式或仅它们之一是吸附剂所显示的亲和力的原因。各残基质子化的实际程度,将取决于各残基碱性、酸的浓度和种类,使用的流动相和吸附剂预处理的方式。

[0278] 根据特定的分离任务,可能因此有利的是,用显示残基的吸附剂处理待分离的混合物,其中所述的残基主要处于不带电状态或主要处于带电状态,或其甚至可能在分离期间一次或多次变化带电状态(例如通过如从弱离子交换剂所知的缓冲剂交换)。可想而知,如果在 pH 接近各自杂芳结构 pK 值的环境中实施分离,借助于将吸附剂离子化的杂芳结构部分离子化的条件也是可能的。在不带电状态下制备或储存吸附剂而在带电状态中实施分离可能也是必要的,反之亦然。

[0279] 优选涉及约中性 pH 水性缓冲系统的吸附剂预处理,特别是如果存在包含胺结构(参见下文)的其它(第三)残基。这种处理将建立属于各种铵结构或其它离子化残基的反离子的均匀分布。残基对分析物所显示的氢键强度还会受到反离子性质、它们的碱性和/或它们“硬”对“软”的极化(polarisability)行为影响,所述的反离子期望留在周围溶剂化层内,并且期望与质子化残基形成离子对。

[0280] 其它取代基可以分别与双核和/或单核 C、N、O、S- 杂芳结构结合,并且可以针对两种结构独立进行选择。如示例性结构的图 5 中所示,其中取代基 R^1, \dots, R^n 独立地表示电子对、氢(H)、有机基,或表面连接体。在不期望限于特定环的几何形状或取代形式的情况下,C、N、O、S- 杂芳结构的适合的取代基可以特别包括由下列简单有机基的一种或多种

组成的取代基： C_1-C_{20} 直链或支链烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、烷氧基、烯氧基、炔基氧基、环烷基氧基、芳氧基、芳基烷基氧基、烷基硫基、烯基硫基、炔基硫基、环烷基硫基、芳基硫基、芳基烷基硫基、卤素烷基、卤素烯基、卤素炔基、卤素环烷基、卤素芳基、卤素芳基烷基、卤素烷基氧基、卤素芳基氧基、卤素芳基烷基氧基、卤素烷基硫基、卤素芳基硫基，或卤素芳基烷基硫基。特别是，取代基可以含有至少一种其它双核或单核 C、N、O、S-杂芳结构或以任何其它方式结合杂原子，并且特别是取自图 3 和图 4 所描述清单的一种。另外，取代基 R_1, \dots, R_n 的两种或更多种可以通过任何种类和长度的脂键，但是特别是通过任何前面提及的有机基或其组合，彼此联接，从而形成多环的状环结构。但是，不包括缩合成多核 C、N、O、S-杂芳的结构（稠合芳环的数量 > 3 ），因为它是包含固定阳离子交换基团的取代基。

[0281] 优选的双核结构有苯并吡咯（吡咯）结构或，所述苯并吡咯（吡咯）结构包括所有可能的氮杂-苯并吡咯结构、氧杂-苯并吡咯结构和硫代-苯并吡咯结构，所述苯并吡啶（喹啉或异喹啉）结构包括所有可能的氮杂-苯并吡啶结构。优选的单核结构是吡咯结构，包括所有可能的氮杂-吡咯结构、氧杂-吡咯结构和硫代-吡咯结构。此时，特别优选 3-氮杂吡咯（咪唑）结构。

[0282] 必须进一步区分本发明的全合成吸附剂和常规亲和介质，在常规亲和介质中，表面结合的残基本身常是蛋白质或肽或其部分，常规亲和介质近似地模拟了已知生物学配体受体相互作用。通常，这类介质具有前文提到的缺点。因为天然氨基酸色氨酸和组氨酸在它们的侧链中也分别含有双核或单核 C、N-杂芳结构，所以可以很容易地通过连续固相合成技术构建的任何多肽残基或其基团保护变体，在理论上也可以用作根据本发明的残基。因此必须解释的是，色氨酸或组氨酸、它们的酯或氨基甲酸盐或任何包括二者之一作为残基的肽都不在本发明范围内。但是，对于可以含有色氨酸-或组氨酸-相关的构件任何合成的和主要非肽结构而言并非如此。

[0283] 优选各残基的衍生化程度大致相等，即第一残基和第二残基以摩尔比为约 1 : 1 存在，更广义上为至少 3 : 2 至 2 : 3。第一残基和第二残基结合的总衍生度优选地保持在接近至少 50%（基于可用于衍生的官能团数量），以便在用于靶蛋白质或肽的吸附剂的结合容量仍然保持在高位时，促进混合的组合物多价相互作用位点形成。然后第一残基和第二残基都可以以例如接近 25% 的衍生度存在。优选的第三残基（参见下文）含有胺或酰胺，更优选地是伯胺结构。在这种情况下，所述的第一残基、第二残基和第三残基分别以摩尔比约 1 : 1 : 2 存在。允许这些值的相对偏差为约 10%。

[0284] 在一个实施方案中，5 至 95% 的官能团与所述双核和单核杂芳结构连接，优选地是 15 至 85%，更优选的是 25 至 75%，仍然更优选的是 35 至 65%，进一步优选的是 40 至 60%。因为第一残基与第二残基之比可以自由选择，所以为了特定分离问题，例如从包含所述肽或蛋白质的混合物中分离蛋白质或肽，可以在所述给定范围之内最佳地调整吸附剂，或调整吸附剂至在包含所述肽或蛋白质的混合物中肽或蛋白质的浓度和 / 或纯度的最佳增加。对所提及的分离或增加和 / 或纯度问题，这种变化提出了具体适用的吸附剂或根据本发明的吸附剂。

[0285] 因此，在一个实施方案中，5 至 95% 的官能团与所述双核和单核杂芳结构连接，优选地是 15 至 85%，更优选的是 25 至 75%，仍然更优选的是 35 至 65%，进一步优选的是 40

至 60% ;其中第一残基和第二残基以摩尔比为 3 : 2 至 2 : 3 存在。

[0286] 残基连接的类型可以是共价键的任何变体 (同原子或杂原子的可变的键级), 并且可以与固体支持体材料表面上的官能团或在覆盖所述表面的任选聚合物膜上的官能团直接形成, 无论是否连接至其主链或连接至其下垂直链或分支侧链, 或通过双连接体末端任选地偶联。除了杂芳结构之外, 其是第一残基和第二残基与靶蛋白质或肽选择性相互作用的特定部分, 这些残基也可以因此含有共价连接体。因为这种双功能的连接体在长度和化学组成上有很多变化可能性, 所以有意不将它们显示在图中, 但是却可以从标准固相合成或生物共轭方法 (例如琥珀酰) 中获知它们 ; 最简单的双功能连接体是预定 1 至约 20 个原子数的亚烷基链。最适合的连接体是构象柔性的连接体。将整个残基与聚合物膜联接的优选共价连接, 将同样的由酰胺、脲烷、脲、或仲 / 叔胺键形成。

[0287] 在上下文内, 必须提及的是, 在杂芳化合物原发作用叠加或放大中, 特别是用作连接体的长亚烷基链或聚乙二醇部分可以施加另外的、高度非特异的疏水力于所述蛋白质或肽上。先前描述的含有硫的连接体, 虽然它很容易合成和连接至活化表面, 但并不在本发明焦点之内, 因为, 熟知的是硫原子或包含硫的基团在分析物的分子表面上与相同种类的相应基团很好地相互作用, 但是事实上, 却可能会在其自身引入特定选择性, 该选择性可能会干扰吸附剂此处所示的结合机制。

[0288] 因此, 不可排除的是, 在这类任选连接体和固体支持体材料和 / 或杂芳结构的官能团之间形成的可能的另外的化学结构, 通过它们连接的方式也易于接近多种分析物, 并且可能因此有助于靶蛋白质或肽的选择性保留。关于位于作为各自残基部分的杂芳结构和固体支持体材料表面之间的另外结构实体的化学组成仅受到在吸附剂的制备、保存和使用期间对化学稳定性和与应用条件兼容性的需要的限制。因此, 也有可能的是, 通过特定连接点, 将各自残基作为亚结构并入复杂性更高的支架 (包括聚合物) 中, 所述支架可能含有相同和 / 或不同种类的另外的残基。

[0289] 残基可以直接偶联至本体固体支持体材料表面, 特别是通过与所述表面上的官能团形成共价键。例如, 在氯硅烷封端连接体或烷氧硅烷封端连接体的帮助下, 实施残基偶联至二氧化硅的表面硅烷醇基团的所选的方法, 而通过多种方法例如经典的溴化氰活化可以实现将残基偶联至碳水化合物支持体的羟基基团。这些方法本领域的技术人员完全已知。

[0290] 但是, 在优选的实施方案中, 本体固体支持体材料仅仅表示载体, 该载体直接的表面被具有官能团的聚合物膜所覆盖, 所述聚合物携带第一残基和第二残基和任选地其它残基。因此形成了薄的夹层, 它移动宏观上限定的形状并且吸附剂与分析物相互作用的部分彼此远离, 但没有显著改变整个下表面拓扑结构, 并且因此被认为是表面的一部分。可以将该残基连接至所述聚合物的官能团, 它将会使所用的基底聚合物转变成至少部分衍生的共聚物。具有官能团的适合的聚合物有, 例如聚乙烯醇、聚乙烯基胺、聚烯丙基胺、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸, 和包含这些聚合物中至少一个的任何共聚物或聚合物共混物。特别是如果固体支持体材料由作为载体的本体聚合物材料组成, 其表面还被聚合物膜覆盖, 并且如果使用非聚合物载体, 制备载体的材料可以不同于制备聚合物膜的材料。这种差别自身可以在例如, 不同单体组合物、聚合反应区 - 或立体化学、立体规整性 (立体规整度)、分子量分布、交联度, 或其组合中显现。

[0291] 聚合物膜的实际厚度和吸附剂的离动力学以及容量由此取决于聚合物溶胀状态,

该溶胀状态自身一直是流动相组分的功能,并且可以因此在不同外部条件下改变。对于在水性或混合水性-有机介质中进行的蛋白质和肽的分离,优选的是,在这类介质中聚合物是可溶胀的。如果聚合物是合成聚电解质,这最容易实现。如上述所解释的,任何可能的离子化残基的电荷特征还影响聚合物膜的可溶胀性达到某种程度,这种程度也是溶剂-依赖性的。本文使用术语“水性”以描述含有按体积计的水多于 50% 的液体,剩余物是其它水可混溶的溶剂或添加剂例如无机缓冲剂或有机缓冲剂、盐等。

[0292] 这类形态学旨在在流动相和固定相之间通过孔隙扩散保持非常高的传质速率。直链或支链聚合物自身必须被持久固定至坚硬且牢固的载体表面,以使聚合物膜经受住分离过程的条件,为此它在整个工艺中被制备并且留在原位。所述固定可以通过单独的聚合物链内部交联导致形成连续的聚合物网络实施,或通过单独的聚合物链在一个或多个位点沿链接枝至固体载体实施。在聚合物的相同或不同官能团之间,或在聚合物中任何地方出现的官能团和无涂覆载体的表面上出现的官能团之间,分别可以容易地实现交联以及接枝。优选的聚合物交联联接或接枝联接由酰胺、脲烷、脲、或仲/叔胺键形成。单独聚合物链的末端官能团最好用于接枝,这将导致端点构型产生最高的链柔性。

[0293] 虽然组合两种技术一定会是可行的,但通常它们之一就足够了。固定优选的方式是交联(而不是接枝)。因此,所述的聚合物链彼此共价交联达到基于可用于交联的官能团数量为 1% 至 20% 的程度。

[0294] 如果交联剂含有适合与一个或多个分析物相互作用的化学结构,另外的补充残基因此大体上可能由交联引入聚合物膜造成。因为聚合物的交联度优选地保持在比较低的百分比,它们的贡献被认为可忽略不计。认为相同的是另外的酰胺(例如甲酰胺)或脲烷基的贡献,它们可以保持在可变量,但通常是小于 1%,因此通过不完全水解反应合成含有氨基官能团的聚合物膜,生成统计学的胺/酰胺或胺/脲烷共聚物。

[0295] 然而有可能,用两个或更多个不同的第一残基和/或两个或更多个不同的第二残基(根据它们各自部分结构的定义)衍生化固体支持体材料。然后这些可以在它们的杂芳结构上,或在它们将这些结构连接至固体支持体材料表面的方法上,或在该两者上,彼此区分。在优选的实施方案中,第一残基的总数量和第二残基的总数量(或它们各自的衍生度当量)将大约相等,以便在随机(统计学的)空间残基分布的规定下,实现包含所有不同第一残基和第二残基的混合组合物结合位点的最大数量。

[0296] 通常且在优选的实施方案中,第一残基和第二残基不是彼此直接连接,而是单独地连接至本体固体支持体材料自身,或单独地连接至由它作为载体所支持的聚合物膜。双核和单核 C、N、O、S-杂芳结构是两种可区别的实体,各具有其自己的连接体连接本体固体支持体材料或聚合物表面,在该实施方案之内所述连接体应该在它们之间构成最短的联接路径。这种形式使第二残基很容易地通过结构与第一残基分离。因此,双核杂芳结构和单核杂芳结构并不是通过一种官能团和相同官能团连接至支持体材料的表面。

[0297] 另一方面,相同或不同种类的两种或更多种残基也可以通过不涉及聚合物膜主链的共价键彼此直接连接,或以任何其它方式直接与固体支持体材料表面连接。在这种情况下,在单独的残基之间的界限开始模糊和变得随意,因为仅当已知吸附剂的衍生史(即,衍生步骤的顺序和种类)时,将它们留下才可能有意义。如图 1 的图示 A-H 中示例性地显示,在固体支持体材料表面上的两种侧基官能团可以用两种不同残基以很多不同方法衍生

(此处长的水平波浪线表示表面的一部分,在这上可以含有其它残基)。

[0298] 除了上述所提及的平均分布的情况外,其中各单独的官能团携带一个残基(在式 A 或 B 中),它们也可以,例如,顺序地排成一直线连接(在式 C、D 中)或平行排列(在式 E、G 中)至相同的官能团上。这类构型可以在实验上实现为,尤其是,残基本身包含与聚合物或表面官能团相同或与其不同的官能团,并且在聚合物或表面官能团与所述第一残基衍生之后,可以用第二残基将该官能团本身(任选地脱保护和/或活化之后)衍生化(情况 C),或将一种官能团至少两次衍生(以一步或以诸多连续步骤衍生,以至于两种残基共用共同的官能团(情况 G)或具有分支结构的连接体(情况 E)(适当的实例将是伯氨基基团的两次或三次烷化,以得到叔氨基部分或季铵部分)。但是,所得构型 C、D、E、F 也可以通过替代的途径实现,在该替代途径中,衍生化试剂已经携带了正确相互排列的第一残基和第二残基,用该单一衍生化试剂衍生具有官能团的表面或聚合物。两个残基更复杂的相互排列,例如大环体系或多环状环体系(情况 F 和 H),当然也是可能的。在所有情况中除了 A 以外,用第一残基衍生的官能团的第一部分总是与用第二残基衍生的官能团的第二部分等同。

[0299] 上文所述的所有状况在统一的视图下也可以视为更一般状况的临界情况(borderline cases),其中单独的残基按层次排列。根据该说明和如本发明具体实施方案,第一(较大)残基除了其双核 C、N、O、S-杂芳结构外还包含第二(较小)残基(反之亦然),由此选择较大残基以使它直接衍生固体支持体材料的官能团,如图 1 一般图示 I 中所示。在这种情况下,第二残基的所有原子和化学部分也被包含在第一残基中。这意指,仅存在一种或两种不同的、可区别的残基,各包含所有共价联接的结构元素,该元素包括双核和单核 C、N、O、S-杂芳结构。在这种给定的层次之内,基本上任何类型的联接和几何形状(线性的、分支的、环状的,等)都可以实现,从而将第二残基的原子和结构实体连接至第一残基剩余部分上的原子和结构实体,所述的第一残基与第二残基并不重叠。在这类情况下,但是,结构层次划分为两种不同残基,仅是形式的问题;边界的化学性质对于作为整体的(integral)化学单位的整个结构而言将是独特的。由此,关于两种残基结构亚基的相互定向,除了第一残基和第二残基不应共用共同的、单一的杂芳环体系外,多样排列是可能的。

[0300] 如果鉴于该一般图示复查给定的实例之一,这类构型尤其可以实现为两种不同杂芳结构共用共同的连接体或其部分,通过该部分它们连结至固体支持体材料自身表面。由此,如果连接体具有分支结构,那么两种杂芳结构可以在相同分支上或在不同分支上直线排列。然后整个残基,即可能是最大的,均匀结构单位(包括终结于表面官能团的可能的连接体和与其连接的所有其它亚结构)将——仅形式上——归于第一残基,而第二残基——又在形式上——在这类构型中将仅仅含有各自的单核杂芳结构和可能与整个(第一)残基的剩余部分中间联接的单元。

[0301] 现在出乎意料地发现,具有上文所述的两种结构特征组合的任何吸附剂,能够容易地在从仅仅部分提纯的混合物开始的单一步骤中回收诸多蛋白质或肽,在某些情况中其纯度高于 98%,或各杂质终浓度低于 1%。因此在没有费劲或麻烦程序的前提下就可以得到药物级。在原材料例如直接按工业规模制备而得的那些中,蛋白质或肽的浓度也可以一步浓缩至高的水平。在混合物中适用的滴定率可能为约 1%至约 90%。由此,所述步骤的回收率是至少与常规提纯方法的回收率一样高,并且可以接近 95%的值。用于本发明给定目的包含两种不同杂芳结构两种类型的残基的吸附剂的显著良好的性能,甚至是更出乎意

料的,因为可以表明的是,包含与结构或的两种杂芳结构中仅仅一种紧密相关的残基的吸附剂至多必需显示仅仅中度分离效率。

[0302] 无意结合理论,相比用单一、未衍生聚合胺的膜涂覆的吸附剂,该特定吸附剂的高性能可以归因于存在另外的和结构上新的多价结合位点。用于创建这类新的结合位点的结构主要可以归因子聚合物的部分统计学修饰。在那些结构中特别注意的是,在所述结合位点之内可能会出现弱碱性的扩大的、富电子或缺电子 π -体系和/或共轭体系。潜在的相互作用方式被认为涉及属于极性/偶极群组的相互作用,如静电力、电荷转移和氢键合,以及那些属于非极性群组的相互作用,如疏水相互作用和 π -堆积。期望 π 体系的杂原子是偶极力和氢键合的潜在位点,无论是否通过其自身的电子 π 体系或通过外孤电子对 (extra electron lone pair)。但是,没有对给定分离中的实际操作机制和各残基对整个结合力的部分贡献的精确种类实施调查,不能预先对任何这类结构下确切的结论,部分原因是因为氢键合与溶剂分子形成竞争也可能使该情况复杂化。位阻因素也可以有助于所设计吸附剂的选择性。至少,第一残基或第二残基纯离子的贡献不太可能,或甚至可以排除在外。

[0303] 此外,在测定大量不同衍生的吸附剂之后,出乎意料地发现,鉴于本发明给定的分离目的,除了用第一残基和第二残基将固体支持体材料表面上官能团的第一和第二部分衍生化之外,第三残基的存在甚至产生了更好的结果。因此,固体支持体材料可以用补充的第三、第四和第五残基等进一步衍生。因此是本发明另一个的实施方案是含有固体支持体材料的吸附剂,该固体支持表面除了如上所述的第一残基和第二残基外,还包含第三残基。排除了双核或单核 C、N、O、S- 杂芳结构作为第三和其他各残基的结构构件的情况。除了该排除,如针对第一残基和第二残基在图 1 中示例性地举出的关于在两种残基之间可能存在的结构关系的所有选择项,也类似地用于第三残基和第一残基之间、第三残基和第二残基之间,以及在任何另外的残基之间的相互关系。不同种类的各另外残基提高了吸附剂产生对于给定蛋白质或肽的非常特异性结合位点的潜能,并以此将它与紧密相关的副产物区分。但是,残基的各类型应以衍生度至少约 20% 存在,因为显著低的衍生度在大部分情况下出于统计学的原因是可忽略不计的。因此对于大部分的应用,在大约相等的衍生度下维持残基类型的数量 ≤ 5 就足够了。无论不同残基的数量和相互比率如何,残基的各类型都仍然应均匀和随机地(统计地)分布在固体支持体材料的表面上。

[0304] 然而官能团的所述第一部分可以由此含有官能团的所述第二部分,或可以与其不同,用第一残基和第二残基的部分不完全衍生固体支持体材料的表面官能团,也可以产生第三残基。根据使用的试剂和合成条件,衍生化反应经常保持不完全。因此,可以有意地或出于技术原因使某一数量的未衍生官能团幸存,所述的未衍生官能团属于固体支持体材料表面,该表面包含待衍生的覆盖它的任选基底聚合物(即,并入至少一个其相应的单体或重复单位的那些)。这些官能团仍然可以易于接近多种分析物,可以充当结合位点的补充部分,有助于结合靶蛋白质或肽,并且因此提高吸附剂的分离能力。这意指,所述官能团其自身的第三(剩余的)部分可以代表一种所述的第三残基。在本发明中,优选的是应用被聚胺膜特别是聚乙烯胺膜所覆盖的固体支持体材料。因此,优选的官能团是伯氨基和任选地仲氨基结构,其因此可以视为补充的第三残基。还显示,衍生官能团的明显过高的分数导致对所给分离目标的选择性降低。这个事实可以认为是在包含第一残基和第二残基和未衍生的官能团的吸附剂之内在近似封闭的空间中由此产生新的多功能结合位点的指标。

[0305] 通过这类设计的第三次衍生或不完全一次衍生第二次衍生的方式,可以在很多情况下进一步提高对给定蛋白质或肽的选择性,并且,作为随之而来的实际益处,根据所涉及的第一残基和第二残基和官能团的相对极性,会经常观察到覆盖固体支持体材料表面的任选聚合物膜获得了另外的化学稳定性和较好的溶剂兼容性或溶胀性。然而,可以阐明的是,因为完全未衍生的聚合物如交联聚乙烯胺膜并未满意地达到本发明的分离目的,其对分析物仅仅显示主链伯氨基官能团,所以在特异性方面,第一残基和第二残基是用于实现潜在分离目的的最主要的残基。理想地,残基(包括充当补充残基的未衍生的官能团)的总密度总计为 0.1mol dm^{-3} 至 1.0mol dm^{-3} ,但优选地为至少约 0.3mol dm^{-3} 。

[0306] 另一方面,固体支持体材料的或其上任选聚合物膜的未衍生化反应性官能团,更具体地是氨基基团,可能仍然对靶标或待分离的混合物的可能反应性的副产物显示相当大的可逆或不可逆的反应性,这可能引起那些物质牢固捕获——即使它们仅仅以低浓度存在——并且,在反复使用之后,引起吸附剂缓慢劣化并丧失结合容量。为了避免这类不期望的相互作用,色谱的固定相的制备中常见的做法是,通过所述基团的最终“封端”提供这类无活性的残留官能团。因此,此时,至少通过将最初自由的官能团部分转化为结构上不同的封端官能团,可以产生另外的(第三或第四)残基。以这种方式,封端可以被视为衍生化反应的特例,该衍生化反应改善了固体/液体界面的兼容性,符合各自分析物、基质和流动相要求,但是几乎不产生另外的结合力,因此没有另外的选择性。尽管在固定相制备中付出了额外努力,但是就长期过程稳定性而言,残留官能团的部分或完全封端可能最终结果是有利的。

[0307] 优选地,通过降低官能团亲核性的反应实现例如氨基基团的亲核官能团的封端。封端基团被设计为具有简单分子结构,从而不显示与广泛的分析物的相互作用,或仅仅显示至少低强度的非共价相互作用和非特异性相互作用,以及不显著地改变固定相的整个极性。但是,可能的是,它们可能有助于高度衍生的第一残基和第二残基与基材的多重相互作用(multivalent interaction)。尽管由于不完全或混合的封端,在吸附剂上有可能引起多于两次混合的第三次衍生,但是,结果证明,优选的是整个吸附剂都统一封端(即达到 >95% 的程度),或完全不封端。在正式处理时,根据封端基团的结构,它们因此可能起到,也可能起不了第三残基的作用。

[0308] 在第一方法的实施方案中,本发明涉及用于制备本发明具有如上述所示特性的吸附剂的方法。它们将产生特定类型的吸附剂,其中固体支持体材料由载体组成,该载体的表面被具有官能团的聚合物膜覆盖,所述的官能团携带残基。上文还广泛地概括了这种优选类型吸附剂的特性。现在,所述制备方法包括至少如下步骤:

[0309] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0310] (a) 将所述聚合物的膜吸附至载体表面(“吸附步骤”);

[0311] (b-I) 用至少一种交联剂将吸附的聚合物的官能团的限定部分交联(“交联步骤”);

[0312] 或者

[0313] (b-II) 将吸附的聚合物的官能团的限定部分接枝至载体(“接枝步骤”);

[0314] (c) 用包含双核 C、N、O、S- 杂芳结构的第一残基,以及用包含单核 C、N、O、S- 杂芳结构的第二残基,以及用任选其它残基,将所述聚合物的官能团的限定部分衍生化(“衍生

化步骤”)。

[0315] 涉及上述制备方法详细路线的若干变化都是想得到的。首先,步骤(b-I)和(b-II),分别是交联和接枝,认为是等效的供选方案,并且这些步骤之一就足以实行该方法,以构建显示上面深入描述特性的根据本发明的吸附剂。两种供选方案都充当了完成如下任务的手段:在进一步处理条件下将吸附的聚合物持久固定至载体上,即使用强溶解性溶剂处理也能使用吸附剂。通过在所有聚合物链之间形成另外的共价键的连续网状结构并因此直接缠绕载体(交联),或通过在各单一聚合物链和载体之间形成共价键(接枝),实现该步骤。当然,用于固定的两种可选过程也可以在该方法之内结合为同时发生的单一步骤,或作为先后发生的两种可区分的从属步骤,而不会使吸附剂的稳定性受损。

[0316] 其次,其它变化可能涉及衍生步骤(c)与吸附步骤(a)的相对实时次序。因此可以想得到的是,首先在均质溶液中用残基衍生聚合物,然后将已经含有残基的聚合物膜吸附至适合的载体上。这种程序将需要考察和优化用于各不同衍生聚合物的涂覆步骤的实验条件。因此,优选的变化当然是,首先将未衍生的聚合物吸附至载体上,如在平行或先于衍生步骤(c)的吸附步骤(a)之内所进行的,以得到薄的均质层。

[0317] 无论如何得分别使交联步骤(b-I)或接枝步骤(b-II)直接接着吸附步骤(a)后,因为,一旦交联,聚合物将难以作为膜而被吸附。另一个边界条件是,步骤(i)将总是该顺序的第一个步骤。总的来说,所述两种独立的步骤变化(与步骤(a)和(c)的相对次序组合的步骤b-I或b-II的选择)的下列4种组合是可能的:

[0318] 第一方法:用于制备根据本发明的吸附剂的方法,包括,以下列次序:

[0319] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0320] (ii) 吸附步骤(a);

[0321] (iii) 交联步骤(b-I);

[0322] (iv) 衍生步骤(c)。

[0323] 第二方法:用于制备根据本发明的吸附剂的方法,包括,以下列次序:

[0324] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0325] (ii) 衍生步骤(c);

[0326] (iii) 吸附步骤(a);

[0327] (iv) 交联步骤(b-I)。

[0328] 第三方法:用于制备根据本发明的吸附剂的方法,包括,以下列次序:

[0329] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0330] (ii) 吸附步骤(a);

[0331] (iii) 接枝步骤(b-II);

[0332] (iv) 衍生步骤(c)。

[0333] 第四方法:用于制备根据本发明的吸附剂的方法,包括,以下列次序:

[0334] (i) 提供具有官能团的聚合物;

[0335] (ii) 衍生步骤(c);

[0336] (iii) 吸附步骤(a);

[0337] (iv) 接枝步骤(b-II)。

[0338] 进行该顺序的各步骤意味着,需要用处于之前步骤完成时状态的聚合物,即在交

联或接枝步骤之后的衍生步骤将用已经交联或接枝的聚合物进行,而吸附步骤之前的衍生步骤将用自由、未吸附的聚合物进行。如果在特定的步骤中,聚合物官能团的限定部分发生反应,并且在之前的步骤中类似部分已经发生过反应,那么意指在特定步骤中的所述的限定部分将取自之前步骤剩余的官能团和之前并未反应的官能团的总和(除了二价官能团或多价官能团以外)。尽管所有4种方法将得到大体上可比的结果,但第一方法由于其实际的简单性而被优选。

[0339] 在到目前为止没有明确提及的另一种变化中,可以将聚合物官能团的第一部分在溶液中衍生,然后将部分衍生的聚合物吸附,和用与之前相同或不同残基将在因此吸附的聚合物上的相同或不同官能团的第二部分衍生。或通过溶液衍生,可以将聚合物的官能团首先转化为不同官能团或残基前体,在吸附之后,然后将其转化为最终残基。在最合理的顺序中,通过制备步骤的这种混合组合引入单独的残基,由此该最合理的次序将极大地取决于载体材料的特定种类,以及在载体上吸附特定的、部分衍生聚合物的简便性。

[0340] 层的分子内和分子间交联将形成稳定的二维聚合物网或优选地是三维聚合物网,并且防止其从“包裹的”载体介质中解吸。尽管根据技术水平所知的所有程序,再加上基于在聚合物链上任何地方生成自由基(radical species)的非选择性方法(例如电化学方法、光诱发方法或(电离)辐射诱发方法)可以实现交联,但是该交联步骤优选仅仅在聚合物官能团之间使用交联剂进行,该交联剂例如意欲与所述官能团进行缩合反应。优选长度在1和20原子之间的线性、构象柔性分子,例如 α, ω -双功能缩合试剂,用于交联。并且,可以使用不同长度和/或不同反应性和/或不同链刚性的两种或更多种交联剂,优选地是在连续步骤中。交联并不会以彻底的方式(其将导致生成刚性材料)进行,而总是进行到预定的程度,即仅仅与聚合物官能团的限定部分交联,通过所加交联剂(与可利用的聚合物官能团相关)的化学计量部分该限定部分是容易操控的。在这方面,适合的交联剂包括二羧酸、二胺、二醇,和例如1,10-癸烷羧酸或亚乙基乙二醇二缩水甘油基醚(EGDGE)的双环氧化物。4,4'-二苯基二羧酸用作刚性交联剂。

[0341] 交联剂优先选择与聚合物的官能团进行特异性反应,而不是与模板(template)也不是与下面的载体材料反应,从而仅仅在聚合物膜之内,而不是在聚合物膜和载体表面之间实现稳定的交联。无论如何,以中等数量另外建立的后者类型的交联当然不会显著改变吸附剂的性质。

[0342] 如果另外的封端基团是所需的,则如果之前的衍生是不完全的,它们通常在过程的最后引入(在用特异性残基最后衍生之后)。进行封端大体上可以类似于上文所述的特异性衍生步骤。但是,生成高反应性试剂的活化法通常在封端反应中进行,因为高反应性试剂需要与那些已证明是最小反应性的官能团在衍生前的步骤中反应。优选的是酰基酸酐和酰基氯,具体地是乙酸酐或乙酰氯,或异氰酸盐和异硫氰酸盐,或环氧化物。并且,可以采用两种或更多种不同的封端试剂,或包含两种或多种不同封端基团(例如,混合的酸酐)的试剂。可想而知,还可以使用具有例如甲基碘、二甲基硫酸,或重氮甲烷的易离去基团的其它通常烷化反应试剂。可以类似地使用由现有技术已知的用于聚合固定相和非聚合固定相的其它适合的封端方法。通常,尽管在需要时,可以设法使该过程停止在基本任意的封端程度,但尽可能多的残留官能团的彻底封端是需要的。

[0343] 也有可能,用保护基团将聚合物膜的官能团或残基的取代基暂时衍生。因此可

以在从与各自的衍生化试剂有时不期望的反应引入一组或多组残基期间保护所述官能团或取代基,这些残基可能另外导致残基无法控制的积聚或例如分支更高阶的取代形式。一旦另外的一组残基已经放到合适的位置,保护基通常会被再次移除。

[0344] 将作为膜吸附至载体表面的聚合物的优选官能团,有伯氨基基团或仲氨基基团、羟基基团,以及羧酸基团或羧酸酯基团。这些基团是易于衍生的、生物相容的,并且增加了聚合物的水溶性。该方法中的聚合物在水性介质或水-有机混合的介质中是溶解的,因为吸附步骤优选地是从这类介质中向悬浮于其中的载体材料上进行,因此也优选使用所述的聚合物。尽管吸附步骤自身大体上可以在各步骤中使用不同聚合物分步进行,但是优选仅仅用单一类型的聚合物(即,具有相同类型官能团或相同前缀官能团的聚合物)进行。特别优选的是分子量在 5,000 道尔顿和 50,000 道尔顿之间的聚合物。

[0345] 通常,就本发明吸附剂的组成和性质而言,如上述所列的所有其它优选实施方案还以类似的方式用于其制备方法和在所述方法中的待采用材料,因此并不需要在上下文内重复。

[0346] 主要根据结构需要、功能需要或合成需要,锚定基团,即在衍生步骤中使用的衍生化试剂的活化位点,可以接近待形成的结合位点或离它或短或长的距离,即,它可以在形成结合位点的结构和活化位点之间并入间隔体基团。这种间隔体可以是刚性的或柔性的以及长度可变的,为了采用适合的几何形状,因此更长的间隔体基团常会转变成构象柔性的增加,在吸附剂和靶蛋白质或肽的结合位点之间的复合物,有时可能需要这种增加的构象柔性。可以将间隔体首先与在单独(可能是均质的)反应中的相应杂芳结构和形成的轭合物(类似于完全残基)偶联,然后在任选脱保护之后,再与聚合物偶联,或可以将间隔体首先偶联至聚合物和形成的轭合物,然后在任选脱保护之后,再与相应的杂芳结构偶联形成完全残基。由此两种偶联反应可能是相同的种类或不同的种类。通常,如果含有伯氨基官能团的聚合物被用作形成膜的聚合物,那么可以将氨基官能团的氮原子直接并入残基中。

[0347] 优选的衍生化试剂包括胺、环氧化物、羧酸或酯,以及异(硫代)氰酸盐,其导致与优选的聚合物官能团形成酰胺键、脲烷键或脲键。出于结构稳定性和方便的原因,最优选的是,通过在官能团和残基之间即在包含氨基的聚合物和羧基结尾的衍生化试剂之间,或在包含羧基的聚合物和氨基结尾的衍生化试剂之间,形成酰胺键而进行衍生步骤。在与氨基聚合物偶联中,特别优选的衍生化试剂是活化的羧酸衍生物。

[0348] 如果在衍生之前化学活化是必需的,则它可以在衍生步骤上游额外的步骤中或与衍生步骤同时进行。它可以活化聚合物官能团,或优选地活化衍生化试剂。例如通过固相肽合成的标准技术,例如经由活化的酯类(例如 OBt(苯并三唑基氧基)或 ONB(norbornendicarboximidyl) 酯类)可以实现羧基基团的活化。可以类似地处理羟基基团。在实用且因此具体优选的实施方案中,在衍生步骤期间,在由肽化学还已知方法的帮助下,在原位实施活化,即作为一锅反应,其中产生了稳态浓度的活化种类,但是未分离。

[0349] 可以在单一的衍生步骤中将两种残基引入聚合物。任选地,这里使用单一的衍生化试剂,该衍生化试剂已经包含两个残基(或其各自的前体),或包含含有第二残基的第一残基(或反之亦然)。或至少两种不同的衍生化试剂作为混合物使用,各衍生化试剂包含至少一种但是是不同的残基。或者可以用各残基分步进行衍生步骤。然后在第一个衍生步骤中采用的衍生化试剂包含第一残基,并且在第二个衍生步骤中采用的衍生化试剂包含第二

残基,或反之亦然。

[0350] 在制备方法的一个变体中,步骤 (iii) 和 (iv) 可以作为单一步骤实施。该实施方案还顾及到,在聚合物官能团的衍生化反应中,可以同时容易地引入第一残基和第二残基。该实施方案也可以实现所使用的至少两种衍生化试剂的混合物,其中第一衍生化试剂包含第一残基,并且第二衍生化试剂包含第二残基。尽管随后将产生所述两种残基沿聚合物主链随机、不规则分布,但是衍生的聚合物可以表征为第一残基和第二残基的统计比例,该比例基本上由至少两种衍生化试剂的相对量和反应性来确定。或者,如果该衍生化试剂已经包含第一残基和第二残基(或如果第一残基包含第二残基,或反之亦然),那么仅仅使用一种衍生化试剂是可行的。自然地,然后两种残基将以 1 : 1 的比例和以预限定的相互区域选择性化学和立体化学的方式存在于所得的衍生的聚合物中。不是两种完全开发的残基,而有可能是至少一种残基作为前体存在于衍生化试剂中。

[0351] 在本发明制备方法相同变体的范围内,可以实现这样的配置,在这一配置中使用了衍生化试剂的混合物,各衍生化试剂含有第一残基和第二残基。具体的是,在这类混合物中,第一残基(或其前体)的部分结构可以在衍生化试剂之间改变,然而第二残基(或其前体)可能保持相同,或反之亦然。非常具体地,衍生化试剂可以彼此组合以迎合制备方法,限定量的该衍生化试剂包含第一残基和第二残基,然而另外的限定量可能仅仅包含第一残基或仅仅包含第二残基。如果另外比较试剂的量和反应性,那么所得产物将会随后显示一种残基超过其它残基。尤其以特制这类方式,但是依然可以实现在聚合物官能团之中第一残基和第二残基均匀和随机的(统计的)分布。

[0352] 如果将另外的第三残基、第四残基.....等残基都引入聚合物,采用包含相应所需的结构基序的其它残基,该衍生步骤可能会任选地分步重复多次。经济上可行的是至多约 4 个重复步骤。优选地,各衍生步骤是总是进行至大致相同的衍生度,因此各残基的衍生度约 25%。

[0353] 本发明的吸附剂主要可以应用于含有蛋白质或肽的混合物的提纯。在第二方法的实施方案中,本发明因此涉及:使用如上所述靶特异性设计的吸附剂,从含有一种或多种蛋白质或肽和任选的副产物的混合物中分离所述蛋白质或肽或增加其浓度和/或纯度的方法。该方法包括至少以下步骤:

[0354] (i) 将溶解或悬浮在第一液体中的所述混合物与本发明的吸附剂接触足以使所述蛋白质或肽与所述吸附剂结合的时间;

[0355] (iii) 将带有所述结合的蛋白质或肽的所述吸附剂与第三液体接触足以使所述蛋白质或肽从所述吸附剂中释放出来的时间;

[0356] 在上述方法的第一变体中,在步骤 (i) 和步骤 (iii) 之间可以加入用第二(洗涤)液体的单独漂洗步骤,所述第二液体理想地是不显著破坏在吸附剂残基和待提纯的蛋白质或肽之间的非共价键,或另外用于释放所述吸附剂结合的蛋白质或肽。根据在混合物中包含的副产物和其它成分的种类和数量,在分离过程期间液体的这类变化有时可以提高分离效率。第二液体主要洗脱强度低,并且将会不特异地洗脱。那么所述方法包括任选的中间步骤:

[0357] (ii) 用第二液体漂洗所述吸附剂;

[0358] 在用步骤 (i) 中的吸附剂接触靶蛋白质或肽和副产物的混合物之后,在用步骤

(ii) 中的第二液体随后漂洗之前,具有被吸附至其上的蛋白质或肽的吸附剂也可以再次从包含在第一液体中的剩余混合物中分离。如果剩余混合物含有有价值的副产物,那么可以将其自身回收。后者变体也可以用作对非常稀释原料的捕获方法,并且在快速分批过程中也是移除可能的副产物的可行方式,该可能的副产物被怀疑会干扰接下来的,全部的和更复杂的色谱分离。其中这类可能的副产物是通过不可逆物理和化学吸附可能导致吸附剂缓慢劣化,并且因此导致缩短柱的耐久性的那些。

[0359] 在特定但是实际上又重要的情况下,可以选择与第一(给料,吸附)液体相同的第二液体。这意味着,当它在步骤(i)中作为混合物应用于吸附剂时,在步骤(ii)中就应该用与靶蛋白或肽从中被吸附的液体相同的液体漂洗吸附剂。这通常是可能的,因为通常选择第一液体以使它对靶蛋白质或肽仅仅具有中等至弱的溶解性质,因为仅仅是当靶蛋白质或肽和液体之间的相互作用焓比靶蛋白质或肽和吸附剂之间的相互作用焓更小时,高效的吸附才是有可能的。另一方面,如果该液体对应该在步骤(ii)中从吸附剂中被洗脱出来的副产物具有良好的溶解性,那么它也可以应用于漂洗吸附剂,尽管靶蛋白质或肽将仍然附着吸附剂并没有被同时释放。

[0360] 同样地,可以选择与第三(解吸,洗脱)液体相同的第二液体。如果第三液体对靶蛋白质或肽和副产物的溶解性不同到了足够大的程度,即便它们在吸附剂上的吸附焓是可比较的,也可以将相同的液体用于漂洗吸附剂。这实质上意味着,在这些情况下,该方法的步骤(ii)和步骤(iii)可以合并为一个步骤。在恒流系统中,随后首先漂洗掉更好溶解的副产物,接着漂洗在该液体随后的洗脱级分中所释放的靶蛋白质或肽。当然,该序列可能还接着另外第三液体级分,该级分含有另外的、较少溶解的且因此较慢洗脱的副产物。

[0361] 甚至所有的3种液体都可以是相同的。但是,即使2种或3种液体的选择相同,它们仍然可能在方法的不同步骤中以不同的流速应用于吸附剂。色谱法中体积流速通常是施压状态、柱维度和液体粘度的函数。在HPLC中流动相应的一维速率典型地按约 $1-5\text{mm s}^{-1}$ 的次序。因此编号第一、第二、第三……液体,适用于定义完成不同任务的应用液体的相对顺序,而非意在定义各液体必要的具体组成。不采用分开地或分步地交换液体的种类或其应用的流速(即,作为不连续梯度),而是可以使用以其它连续梯度形状特别是线性梯度在不同液体和/或流速之间缓慢转换。这需要安装机械装置,以逐渐向先前的液体中混合增加随后的液体级分。

[0362] 在本发明的一个实施方案中,第三液体在它的pH上与第一液体也和任选地第二液体不同。在具体实施方案中,第三液体的pH比第一液体和任选第二液体的pH低。仍然更优选的,第一液体和任选地第二液体的pH接近于(即:在大约 ± 1 个单位之内匹配)靶蛋白质或肽的等电位点 pI ,而第三液体的pH却与其极大地不同,至少约2个pH单位,并且具体的是更低。第一液体的pH范围可能有利地是5.5至8.5,而所得的第三液体的pH范围是3至6.5。该实施方案涉及下述情况:在吸附剂和靶蛋白质或肽之间的结合焓大部分由涉及在任一结合配偶体上的一个或多个可离子化的残基(例如氨基基团或包含氮的杂芳族化合物)的静电相互作用或其它极性相互作用(偶极子力、氢键)控制。具体的是,当pH范围接近任一极端(例如,低的pH下在质子化的氮之间)时,疏水相互作用和极性相互作用期望被控制接近于中性pH,然而离子斥力则期望部分替代相同的、迄今不荷电的残基的极性引力(attracting polar forces)。该作用可以相当大地减弱结合焓,并且因此从吸附

剂中将结合的蛋白质或肽释放出来。相反的是,一旦由于 pH 移位而丧失任一结合配偶体点电荷,吸引离子的相互作用也可以减弱。在这方面,特别重要的是在作为吸附剂上残基的含氮杂芳族化合物,因为这些化合物都能够显示疏水相互作用以及极性 / 离子相互作用。用于本发明分离方法的这类杂芳族残基的吸引力由下述事实引起:它们的结合行为在极为类似生理条件的 pH 值下可以转换,由此,转换的实际 pH 范围取决于特定残基的等电点,并且可能因此通过其结构和吸附剂(其至少包含这样类型的至少两种不同的残基)的相关组成进行微调。另一方面,关于在吸附剂和待分离的至少一个副产物之间的相互作用,结合焓的 pH 依赖性应是不显著的。例如这可以由于靶和副产物不同的等电位点,或由于疏水 / 极性相互作用相对静电相互作用的数量上不同的相对贡献。

[0363] 在本发明的另一个实施方案中,第三液体在它的离子强度上与第一液体也和任选地第二液体不同。在一个具体实施方案中,第三液体的离子强度比第一液体和任选第二液体的离子强度高。该实施方案涉及下述情况:在一个或多个离子或可离子化残基的参与下,在吸附剂和靶蛋白质或肽之间的结合焓大部分由静电相互作用控制,然而,在吸附剂和待分离的至少一个副产物之间的静电相互作用中,这样的参与是不同的,具体的是不显著的。另一方面,如果所有其它的参数保持恒定,一旦离子强度增加,对结合焓的疏水贡献就会增强。优选地,在低盐条件(0-0.2M 氯化钠)下在第一液体中实施分离方法的吸附步骤(i),而可以在最多 1M 氯化钠条件下在第三液体中实施释放步骤(iii)。尽管本发明的吸附剂非常好地耐受了高盐条件,但是为了解析吸附剂结合的蛋白质或肽,在大多数情况下既不必需的也不建议将高盐浓聚物加入到步骤(iii)的第三液体中。相反,随着盐浓度的变化,吸附剂对很多蛋白质或肽的亲合力大多数可以是不变的。因此,仅仅通过盐梯度自身去释放吸附的蛋白质或肽可能并不是有效的,但是与辅助 pH 梯度组合它们就可以是有效的。

[0364] 可以通过相对于第一和第二液体,增加第三液体对靶标的溶剂化强度,实现靶蛋白或肽从吸附剂的释放。或者,可以通过用溶于第三液体中的置换试剂,从吸附剂的结合位点处,置换靶蛋白质或肽实现该释放。如果置换试剂以摩尔量超过靶蛋白或肽存在,或如果置换试剂对吸附剂的结合强度甚至高于对靶蛋白质或肽的结合强度,那么置换作用(优选通过吸附剂结合置换试剂,而不是结合竞争靶标)可以实现。置换试剂本身可以是具有与靶标类似性质的蛋白质或肽或其片段,而且也可以是对 C、N、O、S- 杂芳残基有高亲和性的小合成分子。它自身也可以是双核或单核 C、N、O、S- 杂芳分子;由于用优选可溶杂芳族化合物(而不是吸附剂的残基)使靶蛋白质或肽的吸附剂-相互作用基团饱和,随后会引起置换发生。但是,为了以纯形式分离靶蛋白质或肽,必须随后将过量的置换试剂从洗脱液中移除。

[0365] 在靶蛋白质或肽已经从吸附剂中完全释放后,另外的洗脱液变化在经济上可以同样是有用的,从而以牺牲色谱分离度为代价而加速色谱运行,或其它有价值的产物在后面被洗脱。

[0366] 在第二变体中,通过以下任选的最终步骤扩展了该方法:

[0367] (iv) 用第四液体和 / 或第五液体洗涤和 / 或再生所述吸附剂;其在步骤(iii)后引入。

[0368] 此时,对于第四(洗涤)液体,使用主要具有非常高的洗脱强度的液体,其可以含有上述提及种类的添加剂,并且不特异地洗脱。如果以色谱柱的形式使用吸附剂,为了预防

柱的逐渐积垢、堵塞或容量缩小,可以在高体积流率下以正向或反向应用第四液体,因为其任务是清洗吸附剂,并且永久移除残留的杂质、强吸附的杂质或其它干扰的化学杂质或生物学杂质,特别是粒性物质的任何积聚。对医疗卫生和安全来说,为消除微生物污染的通常的清洁方案或消毒方案(例如,碱(1.0M 氢氧化钠)处理、酸(0.4M 乙酸)处理、氧化(次氯酸盐)处理和/或热处理),在这里也可以应用于所述吸附剂。

[0369] 在先前用攻击性的或强的溶剂化液体处理之后,将第五(再处理)液体用于调节吸附剂的溶胀度,以及其连接的残基的溶剂化作用,以便恢复吸附剂的初始状态,并且在各分离运行开始时载入恒定的、平衡的条件。为了保持吸附剂恒定的酸/碱性质,除了移除痕量洗脱液体或清洗液体之外,离子残基的反离子,如果存在,由此也将被恢复其初始均匀分布。第五液体可以与第一液体或第二液体相同,并且通常将在相同的流速下应用。也有可能,从各运行之后快速的和简单的洗涤/再生程序,转换为在每个第五次、第十次等等运行后更复杂的程序,取决于例如对达到受试产物的质量规范是至关重要的那些污染物实际的荷载。

[0370] 实施该分离方法的优选方式是中至高压液相色谱技术。由于其操作简单,并且通过上述引用的多种变化的任意一个,该方法也可以以分批提纯的方式不连续地使用,如亲和(膜-)过滤或固相萃取技术,或连续地使用,如模拟移动床(SMB)技术。所有变化也可能互相结合。

[0371] 吸附剂强的化学稳定性以及静态和动态结合能力(提供的荷载达约0.31或每升吸附剂大约20g蛋白质或肽,分别是可能的)在该方法的所有5种液体独立变异性中提供了大的自由度。与常规亲和色谱法不兼容的强溶剂化洗脱体系现在也是可得到的,从而有很多的空间优化液体的性质,例如溶解能力、低成本、低毒性和低废弃物产生。与本方法的仪器兼容的液体体系基本上包括了任何液体或液体混合物,该液体或液体混合物对本分离方法的底物(即具体的是蛋白质或肽)和优选地也对副产物(后者对第二液体特别重要)具有至少弱的溶解性质。因为基于本发明吸附剂的色谱分离通常在生物相容性限制下进行,缓冲的水性介质经常用作第一液体、第二液体和第三液体。可以将除了缓冲剂或金属盐(其基本保护蛋白质功能)外的有机改性剂(例如洗涤剂、离液序列高的添加剂、抗氧化剂、消泡剂)也加入到液体中,但是为了保持待提纯的蛋白质或肽可能存在的生物学活性最高,最好完全避免这些液体。为了增强某些分析物的可检测性,在实际分离的过程之前或之后,也可以加入少量的挥发性有机酸。

[0372] 然而,如果使用了其它的添加剂,通常稍后必须将它们移除,即,在该方法完成之后,从含有步骤(iii)中得到的靶蛋白质或肽的液体中移除,特别是当需要得到以结晶形式的所述蛋白质或肽时。为了达到该目的,各种各样的这类可能附加的步骤为本领域技术人员所熟知。为了移除添加剂,本发明的方法因此也可能随后与常见分离过程的任何其它类型结合。

[0373] 尽管将几乎任何有机的或水性的液体或液体混合物(包括超临界流体)应用于本发明的吸附剂都是可行的,但优选的是,当存在于固体支持体材料表面上时,促进聚合物膜溶胀的那些极性液体。液体混合物实际极性可以通过其组成容易地微调。

[0374] 因为在本方法的步骤(iii)中,吸附的靶蛋白质或肽(也和副产物)常常不是即时(如开关状态)释放,而是缓慢和逐渐释放,因此步骤(iii)其自身可以有利地分步进

行,即,如为了增加全部分离过程的分离度的分级。在该吸附剂与第三液体接触一段足够的时间后,然后手动或自动收集第三液体的相同或不同容量的两个或更多个体积固定的级分。然后重复步骤 (iii),并且将吸附剂再次与第三液体(的改良成分,如必需)接触,直到所有结合的靶蛋白质或肽已释放。在级分的收集期间,连续提供第三液体也是可实现的。随后测定在各级分中释放的靶蛋白质或肽的纯度和回收率,仅仅那些在质量和 / 或经济方面满足预设验收规范的级分才做进一步处理,同时所有其它的级分可能被清除或再循环进入原料。

[0375] 可以采用前沿以及区带洗脱技术。随梯度洗脱常会实现最好的性能和生产率,特别是,随第二和 / 或第三液体中增加的极性有机溶剂(低级醇类、乙腈、丙酮)含量。但是,如果在工业色谱(process chromatography)中或在通常的制备环境内使用,为了操作的简单性和技术的稳固性,可能优选等度洗脱或简单梯度洗脱(例如,不连续梯度)。PH 梯度和盐梯度也可以顺利地应用。就吸附剂的化学稳定性而言,根据吸附剂具体的残基,有可能的是,pH 值短期在 1 至 14 的范围内,然后连续运转在 2 至 13 之间。各自最佳的液体成分也将取决于吸附剂实际衍生度,并且必须逐个在实验上确定。

[0376] 使该方法明显地区别于常规离子交换吸附的就是,该方法也并且尤其能,应用于蛋白质或肽并不包含任何纯粹离子电荷的分离任务,即,在溶解介质的 pH 极为接近蛋白质或肽的等电点时。尽管由于吸附剂可能含有含可质子化氮的残基导致阴离子电荷可以增加本发明吸附剂的结合强度,但为了顺利完成该方法,它们无须存在。这也同样适用于副产物和混合物的其它成分。通过周围介质的偶极性和盐浓度,还确定了达到荷电相互作用能够影响化合物在吸附剂上吸附或分离的程度。对分析物和吸附剂的相反电荷上述所做的解释,也适用于相同前缀的电荷,该电荷在某些情况下可能导致被吸附剂抵抗和排斥而不是另外的吸附。

[0377] 此外,继步骤 (iii) 之后,本方法可能还另外包括从第三液体(蛋白质或肽已被释放在其中)的至少一个级分中分离蛋白质或肽。在制备的应用中,为了鉴定和 / 或后续处理的目的,有可能以浓缩的或甚至纯的形式从第三液体的溶液中分离蛋白质或肽。以最容易的方式,通过溶剂蒸发的温和方法(包括冷冻干燥、冻干),可以将所述蛋白质或肽从步骤 (iii) 的液体中回收。但是,溶剂蒸发也会浓缩源自第三液体的、低蒸汽压可能包含的物质。这种物质可能含有例如缓冲盐或稳定剂的添加剂,或例如较高沸溶剂同系物的污染物和 / 或降解产物,所述降解产物通常以痕量包含在市售质量的溶剂中。由于吸附剂高的物理和化学稳定性,但是,在步骤 (ii)-(iv) 期间实际上并未发生从固定相中浸出,以使步骤 (iii) 所释放的蛋白质或肽典型地包含少于 10ppm 的浸出吸附剂或其它从其中可浸出的物质(即,吸附剂组分(聚合物、残基),或分解产物)。

[0378] 在再溶解之后,如果必需,分离的优选方法包括,含有提纯的蛋白质或肽或所述的蒸发残基的第三液体的结晶步骤。在这样的结晶步骤期间,结晶可能由例如改变温度和 / 或液体成分诱发,甚至可以实现更高的提纯程度,因为低蒸汽压的污染物通常保留在溶液中,并且因此易于从靶产物结晶中分离。在干燥之后,结晶常准备用于配制和制剂过程。如果干燥保存是不期望或不可能的,那么,或者可能必需实施将提纯的产物转化为不同组成的溶液,即,通过如透析、离子交换等标准操作,将第三液体和储备液进行交换。

[0379] 通常在色谱法中,该方法和色谱法在其上运行的联合装置,也可以有利地辅之以

适合的测定技术,该测定技术顾及了,在急剧分馏和细致分馏的洗脱液中,靶蛋白质或肽和/或副产物或混合物的其他成分的浓度的定性测定、半定量测定或定量测定。优选的测定方法涉及物理性质或光谱性质的在线流动池检测器,例如折射计、偏光计、电导仪、紫外/可见吸收光谱仪或荧光光谱仪、红外光谱仪、质谱仪和核磁共振光谱仪。为了将待分离的混合物所有或特定的成份或特异性的成分,转化成具有改善可检测性的衍生物或片段,或为了加速或延迟它们的洗脱,也可能把在线柱前或柱后衍生部件或降解部件加入到系统中。用于蛋白质或肽的通用无损测定方法是在 280nm 波长下的 UV 吸收。

[0380] 就大的范围而言,如果人用或兽用药物或营养组合物,包含了可以通过吸附剂结合的至少一种诊断、治疗或营养价值的蛋白质或肽,那么本发明的吸附剂和因此采用该吸附剂的本发明的分离方法,也可以有益地用于所述的组合物(例如抗血清或疫苗)的制备。本发明的益处主要源自下述事实:这类应用常需要有价值的活性成分纯度 > 99% 或甚至 > 99.9%,该纯度仅仅在冗长和代价高昂的程序下通过常规方法才是可实现的,但是从经济的观点该纯度甚至可能提出了某些限制性的应用。

[0381] 就小的范围而言,它们或者可以用于至少一种蛋白质或肽的识别、表征、定量或实验室提纯。为了该目的,该应用涉及定性和定量分析,该分离方法有可能,辅之以特异性生物学测定,或辅之以光谱学方法,例如使用联用技术(hyphenated techniques),而且也可以通过与纯的真实样品或肽标准品对比保留体积而实现。它们可能有兴趣以微量形式用于蛋白质组学的应用,即在细胞或生物体中多个不同蛋白质表达水平和修饰的同时识别或定量。

[0382] 作为医疗装置的一部分,它们也可以用于从生物流体中移除至少一种蛋白质或肽,其包括医疗上预防或治疗由所述的生物流体中存在所述的至少一种蛋白质或肽而引起的疾病。该装置可以作为一种解毒部件或净化部件应用于所有的情况,在该情况中,患者已经早已吸收或即将吸收有害的或传染性的蛋白质或肽,例如它们通过病原体分泌,以及在患者自身的身体已经产生了这类有害的或传染性蛋白质的那些情况中,如自身免疫疾病中的情况。摄取的可能来源包括食物、水、空气、与感染病人的接触、输血等等。在一个具体应用中,医疗装置可以构造成血浆分离置换部件或血浆去除部件。这类装置主要将离体操作或体外操作,但是如小型化、可植入装置的构造似乎还在想象中。患者的生物流体可以(或持续地或分批地)取自患者身体,通过用吸附剂处理废弃污染物,然后再送回患者身体。外源(其它人类、动物)的生物流体也可以用吸附剂处理,在将所述的流体或其的部分或从其制备的组合物施用于需要其的患者之前,以降低传染性疾病传播的风险。在这种情况下,将使用本发明的分离方法,以降低靶蛋白质或肽在“有价值的”级分中的浓度/纯度(由此增加其中有价值的蛋白质或肽的纯度),而使它在“废弃”级分中浓缩。

[0383] 最终,它们可以用于固定至少一种蛋白质或肽至吸附剂上。由于在吸附剂和靶蛋白质或肽之间相互作用的非共价性,这种固定将是可逆的。在应用(例如,可过滤试剂或催化剂、细胞表面结合培养物的制备)中、在药物递送装置(例如药物洗脱或愈合支架)中,或在药物发现筛选中,这可能是一个潜在的优势。在后者情况中,本发明的分离方法可以辅之以,对其它化学或生物学结构结合至固定的蛋白质或肽进行试验的方法。这种第二次结合的测定可以随后作为任一结合配偶体可能的生理作用的第一指征。如果使用聚合物图层,则固定的蛋白质或肽可以被周围的形成凝胶介质物理地缠结,并且因而又将进入高生

物相容性的环境中。不同表达的,在如本文所描述的吸附剂和至少一种蛋白质或肽之间形成的非共价、可分离的复合物也因此呈现在本发明之内。可能将含有作为本发明优选蛋白质抗体的这类复合物用于免疫吸附技术。

[0384] 可以从上述给定的解释立即得到的本发明另一个目的是在管状容器之内包含本发明的吸附剂的预填充柱。在液相色谱法或固相萃取应用中,可以将这类柱用作固定的、所需尺寸(长度×直径)的固定相。除了管状容器之外,这类柱可以任选地含有现有技术已知的其它组分,例如玻璃料、滤板、流动分配器、密封、配件、螺钉、阀,或其它流体处理或连接元件。所述的吸附剂,可以在重力或离心力下作为浆液填充入柱中,或在另外的轴向挤压下通过活塞填充入柱中,并且以这种预填充的形式制备成可市售的。为了增加使用者的便利,应该因此确保更可重现的填充,以及如果固定相未在使用,那么应易于储存,并且固定相在色谱系统内应可以快速地交换。形成容器的材料(化学和生物学惰性材料,例如不锈钢、硅硼玻璃、类 PEEK 塑料等)被典型地选择,以使吸附剂不丧失自身的高稳定性,其意指整个柱理想情况下其特征应在于对高达 20 巴施压、高达 110℃ 施热以及对包括高压灭菌法 (autoclavability) 的常见清洁卫生方案的物理和化学耐性。在有利的情况下,能够重复使用该柱达 1,000 次,优选地达 5,000 次,并且增加了全部过程的经济性。但是,它也可以是可一次性使用的或可焚烧 (incinerable) 的部件。另一个任选是,仅仅设计吸附剂便宜的可并一次性使用的即时管壳 (immediate tubular housing), 并且将其放置在第二个管壳内,外壳由耐久和耐用的材料形成,其也包括所有可重复使用的、补充组件(套筒设计)。

[0385] 柱可以是全色谱系统的一部分。除了上文所述的测定系统以外,色谱系统的其它相关的组件包括:泵、流量调节剂、贮液器、脱气装置、注射口,柱转换阀、压力和流量计、温度控制室、出口收集盘(圆盘传送带)和自动分馏器。

[0386] 本发明的另一个目的是,如松散材料(颗粒状或块状(整体的)设计)或如预填充柱、筒(参见上述)或膜的本发明的多个相同或不同吸附剂的集成(或“库”),由此单独的吸附剂可以是相同或不同的。不同吸附剂的集成可以用于,例如初始筛选,寻找计划用于之后更复杂制备色谱方案的适合吸附剂,而相同的吸附剂的集成可以用于,例如具有类似基质的大量样品的多项医疗诊断试验,或用于半连续过程监测。这种集成的优势是其以手动或自动方式平行处理的能力。这种平行处理除了节约时间——由于样品处理量比串行处理更高——以外,还允许在标准化条件或至少相同(可复现的)的条件下,比较不同吸附剂或其它过程参数。如果集成的独立构件以标准化的或位置上可设的形式排列,优选地是与自动工作站兼容的二维矩阵,例如微板块阵列或微嵌片阵列,或例如多毛细管或微流体装置,那么该优势可以被特别开发。就小型化形式的示值读数而言,再次为蛋白组学技术制定了参照。

[0387] 从上文所述制备方法的交联/接枝步骤开始制备的所有中间产物,都是稳定的,足以储存供将来使用。然后将这种产物分成若干亚单元,根据所述亚单元用单独的衍生化试剂实施衍生步骤。以这样的方式,可以按需要形成不同吸附剂(即,用不同残基或其组合或以不同残基比例或不同衍生度,衍生的吸附剂)的库。如果根据全部亚单元平行实施衍生步骤,那么在非常短的时间内形成这类库是可行的,从而实施初始筛选寻找针对给定应用最好的吸附剂,该吸附剂应能够对改变的分离目标快速地响应。除了不同的衍生物外,还有可能包括不同聚合物膜、载体和/或活化化合物 (chemistries) 的不同固体支持体材

料也可以应用于吸附剂库的形成。

[0388] 随机或定向的库筛选是有可能完善或甚至替代合理的吸附剂设计一种手段。该筛选特别被用在以下情况中：如果缺乏结构信息，或如果应用了额外的严格的限制（例如关于兼容的液相的选择），在吸附剂上的不同残基和 / 或在靶蛋白质或肽上它们的相似物的贡献的相对重要性是不明显的。对于给定分离目的，这类库的筛选可以以这样的一种方式实施：用全库或其一个或多个亚单元，连续地或平行地测量表征具体吸附剂性能的一个或多个参数（亲和性、选择性、容量、回收率稳定性等）。关于在吸附剂和蛋白质或肽靶点之间形成的复合物，最显著的特性是亲和性和选择性相关的热力学参数和动力学参数。适合并入库的吸附剂的预选可以用计算的方法实施。

[0389] 可行的筛选方法将包括，例如在适合的批量条件下，用本发明的各吸附剂处理含有至少一种蛋白质或肽以及副产物和 / 或其它组分的混合物，并且测量在吸附剂和靶蛋白质或肽之间形成的复合物的单独平衡 Gibbs 焓。可替代的方法将包括，测量在一方面吸附剂与靶蛋白质或肽形成复合物和另一方面吸附剂与适当选择的副产物形成复合物之间的微分 Gibbs 焓。可以在本领域技术人员已知的所有热力学方法和 / 或动力学方法（例如量热法）的帮助下直接地进行测量。在这类复合体过渡态预期应用的类似过程条件下，在色谱运行的帮助下，也可以间接地进行测量，由此得到的结果可能需要校正洗脱液的贡献。在色谱环境中， k' 和 α 值可以以第一近似值分别作为 Gibbs 焓或微分 Gibbs 焓的指标。

[0390] 本发明另一个目的是，诊断或实验室提纯试剂盒。除了本发明的吸附剂（或吸附剂的集成，或包含吸附剂的柱）外，在同样的包装单位之内，该试剂盒还包含，实施本发明分离方法所必需的一组其它（或甚至所有的）的化学或生物试剂和 / 或可一次性使用的用品，或不同的分析、诊断或实验室方法，在所述方法中可以采用所述吸附剂。如果实施分离方法的同时必须遵照标准化的实验方案，并且特别是当吸附剂或柱用作可一次性使用的装置时，材料正确的数、量或浓度的这类预填充集成意欲增加使用者的便利。所述方案可以连同安全数据单等一起并入使用说明中，该说明可以任选地附在试剂盒中。

附图说明

[0391] 图 1: 用一个第一残基和一个第二残基将两个临近的表面官能团 (FG) 衍生化而得到的不同的单独构型 A-H 和一个一般图示 I。

[0392] 图 2: 由表面被聚合物膜覆盖的载体组成的固体支持体材料的不同示意图 A-C, (这里示例了描绘为灰色球体的无孔微粒载体; 未按比例绘制)。

[0393] 图 3: 可能的第一残基的选择, 该残基包含由稠合 5 元环和 6 元环和包含在其中一个或两个杂原子组成的双核 C、N、O、S- 杂芳结构。

[0394] 图 4: 可能的第二残基的选择, 该残基包含由稠合 5 元环或 6 元环和包含在其中一个或两个杂原子组成的单核 C、N、O、S- 杂芳结构。

[0395] 图 5: 由 5 元环和 6 元环组成的示例性的第一残基和第二残基的一般的图示。 $R^1 \dots R^8 =$ 电子对、H、有机基或表面连接体; $X^1 \dots X^6 =$ C 或 N; $Y^1 \dots Y^2 =$ N、O、S。

[0396] 图 6: 用于表征吸附剂的分析物相互作用表面的术语符号图示 (未按比例绘制)。不是所有描绘的术语对于实施本发明都是必需的。

[0397] 图 7: 用于本研究的第一残基和第二残基的结构 (由表面聚合物膜提供的官能团

以粗体印刷)。

[0398] 图 8:针对测定实施例 4 的荷载容量的从第 ND 10003 号吸附剂中分步 pH- 洗脱免疫球蛋白 G。

[0399] 图 9:含有过氧化氢酶的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 5 的第 ND 08037 号吸附剂上的分析色谱图。

[0400] 图 10:含有过氧化氢酶的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 5 的第 ND070002 号吸附剂上的分析色谱图。

[0401] 图 11:含有过氧化氢酶的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 5 的第 ND 06380 号吸附剂上的分析色谱图。

[0402] 图 12:在高盐浓度的影响下含有伴清蛋白的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 6 的第 ND 08236 号吸附剂上的分析色谱图。

[0403] 图 13:在高盐浓度的影响下含有伴清蛋白的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 6 的第 ND 07200 号吸附剂上的分析色谱图。

[0404] 图 14:在高盐浓度的影响下含有伴清蛋白的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 6 的第 ND 07122 号吸附剂上的分析色谱图。

[0405] 图 15:在高盐浓度的影响下含有伴清蛋白的蛋白质试验混合物和其单独成分在实施例 6 的第 ND 06386 号吸附剂上的分析色谱图。

[0406] 图 16:在根据实施例 7 的第 ND 07200(a) 和 PRC 10014(b) 号吸附剂上,伴清蛋白从其它蛋白质的混合物中半制备分离的 UV- 色谱图(虚线表示所用 pH 梯度的过程;截面 I-VII :所收集级分的时间窗)。

实施例

[0407] 一般

[0408] 购自 Dionex(前身是 Gynkotek)的 HPLC 系统由 4 通道低压梯度泵(LPG 580、LPG6 680 或 LPG 3400)、自动采样器(Gin50、ASI-100 或 WPS-300)、6 通道柱转换阀(Besta)、柱加热炉和二极阵列 UV 检测器(UVD 170U、UVD 340S 或 VWD 3400)组成。

[0409] 所有采用的吸附剂均以被交联聚乙烯基胺膜覆盖的磺化聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物(平均粒径 35 μm ,平均孔径 **1000 Å**)的相同多孔球形载体为基础,该交联聚乙烯基胺以随机地分布方式用如在各自实验描述中给定的残基衍生化。用作第一残基和第二残基的双核杂芳结构和单核的杂芳结构显示在图 7 式中。包含一个或两个氮原子的 5 元杂环和 6 元杂环都表示在其中。对于所有色谱实验来说,如果不另外阐明,那么吸附剂都用于实际床层尺寸 (bed size) 为 33.5×4mm 的标准不锈钢 HPLC 柱。在 20 巴压力下,通过水-甲醇(1 : 1)悬浮液的流动沉降填充该柱。

[0410] 下列表 1 列出了用于多种实验的蛋白质。给定的选项是多种多样的,从中等大小的肽到大的多聚体蛋白质复合物,都具有所示的例如催化、转运、免疫反应和发送信号 / 调节的不同功能。等电点数据取自文献,并且通过等电位聚焦法重现。通过凝胶渗透色谱法另行检验蛋白质纯度。使用的所有其它试剂都是标准实验级质量。

[0411]

蛋白质	来源	经销商	CAS 号	分子量	等电点
醇脱氢酶	面包酵母	Sigma	9031-72-5	141 kDa	5.4 - 5.8
过氧化氢酶	牛肝脏	Sigma	9001-05-2	250 kDa	5.4
过氧化氢酶	鼠肝脏	Sigma	9001-05-2	250 kDa	6.7
α -胰凝乳蛋白酶原 A	牛胰脏	Sigma	9035-75-0	26 kDa	9.5
伴清蛋白	鸡蛋白	Sigma	1391-06-6	77 kDa	6.7
细胞色素 C	牛心脏	Sigma	9007-43-6	12 kDa	10.5
血红蛋白	人	Sigma	9008-02-0	64 kDa	7.4
己糖激酶	面包酵母	Sigma	9001-51-8	54 kDa	4.5 - 5.0
免疫球蛋白 G (Gammanorm®)	人血浆	Octapharma	89957-37-9	144 kDa	6.4
胰岛素	重组人	Bioton	9004-10-8	6 kDa	5.3
溶菌酶	鸡蛋白	Fluka	12650-88-3	14 kDa	8.9
胃蛋白酶	猪胃粘膜	Sigma	9001-75-6	36 kDa	2.9
蛋白酶	白色念球菌	Sigma	39450-01-6	29 kDa	8.9
丙酮酸激酶	兔肌肉	Sigma	9001-59-6	237 kDa	7.6

[0412] 表 1:用于本研究的蛋白质的清单

[0413] 实施例 1 :具有不同比例的包含吡啶和咪唑的残基的特异性吸附剂的合成

[0414] 首先将商品聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物的球形树脂珠 (Rohm&Haas Company : Amberchrom™) 在浓缩硫酸中过磺化,然后将商品聚乙烯基胺-聚乙烯基甲酰胺共聚物溶液 (BASF :Lupamin®) 吸附在多孔珠上并且用双环氧化物轻度化学交联。对于该未衍生化的中间体,其包含大约 0.35-0.45mmol/ml 的游离氨基基团并且在二甲基甲酰胺中预溶胀,通过标准固相酰胺偶联方案以稍微超过相应于衍生的靶定程度的预定量的量将原位活化的 3-吡啶基丙酸和 4-咪唑基丙烯酸相继地和独立地偶联至氨基基团。将吸附剂洗涤为不含有过量的试剂,并且干燥直到恒重。在各衍生步骤之后通过固相滴定用含水甲苯磺酸测定衍生度作为残留氨基基团的质子结合容量的差异。根据该一般程序,制备了表 2 中所列的吸附剂。

[0415]

3-吡啶丙酰基 [% 衍生]	4-咪唑丙烯酰基 [% 衍生]	第三残基 (任选)
12	21	-
14	9	乙酰基
14	31	乙酰基、琥珀酰胺 (12 %), N-咪唑啉酮-乙氧羰基 (15 %)
18	32	-
20	6	乙酰基
20	24	乙酰基、琥珀酰胺 (26 %), 琥珀酰胺 (26 %) + 乙酰基、琥珀酰胺 (26 %) + 琥珀酸
21	17	乙酰基
22	13	乙酰基
22	30	-
23	37	-
24	25	乙酰基、琥珀酸 (6 %, 23 %)
25	30	-
26	19	乙酰基、琥珀酰胺 (21 %), N-咪唑啉酮-乙氧羰基 (10 %, 19 %), 2-羟基乙酰基 (8 %, 12 %)
27	14	乙酰基
28	27	乙酰基
28	37	-
29	33	乙酰基
38	24	乙酰基
38	60	乙酰基
43	24	-
43	27	乙酰基
43	32	乙酰基
47	11	-
55	19	乙酰基

[0416] 表 2: 制备的所选示例性吸附剂的组成 (精确度大约 $\pm 2\%$; 如果乙酰基作为第三残基存在, 那么取代的结合程度和 100% 之间的差异通常等于乙酰基基团的含量 ; 如果不存在第三配体, 那么取代的结合程度和 100% 之间的差异就等于氨基基团的含量)

[0417] 实施例 2 : 本发明吸附剂的集成针对不同蛋白质的结合性质的筛选

[0418] 实验 : 以大约 15-18mg/ml 的浓度 (丙酮酸盐激酶 : 5mg/ml) 制备纯蛋白质伴清蛋白、血红蛋白、过氧化氢酶 (来自鼠肝脏) 和丙酮酸盐激酶在 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中

的溶液（全部的等电点为 6 至 8）。将这些溶液 30 μ l（血红蛋白 :125 μ l）的分析量分别注射到含有吸附剂的不同 HPLC 柱上，所述吸附剂已经用包含杂芳结构的一种或多种残基以如下表中所列的各自的程度衍生。采用不连续梯度，从 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液的结合步骤开始以 0.25ml/分钟持续 40 分钟，接着是 50mM pH 3.5 的乙酸盐缓冲液洗脱步骤以 0.5ml/分钟持续 20 分钟，并且最终以相同的流速用 1M 含水乙酸（pH2.25）酸性冲洗 20 分钟。为了后续的运行，以 1ml/分钟的流速，用结合缓冲液再处理 20 分钟恢复吸附剂的最初状态。通过在 230nm、280nm 或 500nm 波长下的 UV 吸收信号积分，为各洗脱步骤独立测定洗脱蛋白质的收率。通过与另外的旁路运行（bypass runs）（不进入柱）定量比较而测定总蛋白质回收率。

[0419] 结果：筛选结果列于表 3-6（由此所有 3 个洗脱步骤的绝对收率的和等于总回收率）中，该结果提供了不同的第一残基和第二残基的直接比较，以及任一缺失残基的作用。尽管仅仅用第二残基衍生通常会导致降低吸附剂的结合容量（更高的漏出），但是，仅仅用第一残基衍生却导致通常被证实为就实用的（色谱的）目的而言过强的结合。在适度酸性缓冲的洗脱步骤（此时：pH 3.5）期间，如果回收靶蛋白质，可以确保可逆结合和可重现的结合。另一方面，如果该靶蛋白质仅可以在强酸冲洗步骤中从吸附剂中释放，那么该蛋白质可能会变性，因此就制备的目的而言，使吸附剂无用。有时还通过低的总回收率表明不可逆结合，其可能意味着，甚至用于冲洗步骤的含水酸也没有足够的洗脱强度以从吸附剂中释放全部量的蛋白质。作为一般趋势，仅当两种配体都在吸附剂上存在时，由此实现了最大的总性能。但是，吸附剂的最佳组成也在一定程度上取决于靶蛋白质。根据单独的合成能力，用第一残基和第二残基的衍生度可以在大范围内变化。此外，如果残基的种类保持不变，即使当衍生度的较小变化时也能观察到可测量的性能响应。在本研究中所包括的参照吸附剂（既不含有第一残基也不含有第二残基）上未观察到可逆保留。用乙酰基基团或琥珀酸基团作为第三配体的衍生化带来了恰恰相反的性质。在与此时所应用的条件相同的条件下，例如蛋白酶 K、细胞色素 C 或溶菌酶的碱性蛋白质，以及例如胃蛋白酶或胰岛素的酸性蛋白质，都显示在大部分的固定相上在 pH 7.4 下以高的百分比漏出，或显示在 pH 3.5 下（部分地）洗脱。在包括酸冲洗步骤的所有三个级分中发现的蛋白质己糖激酶给出了一个例外。这些蛋白质（数据未显示）的总回收率常是不能接受地低。在向结合缓冲液和洗脱缓冲液中加入 150mM 氯化钠的条件下用血红蛋白实施的平行试验并没有显著改变原始数据。在降低洗脱剂的 pH 之前，在结合剂 pH 7.4 下，另外的高盐洗脱步骤（1M NaCl）导致了仅仅从 30% 残基衍生的吸附剂中进一步洗脱（12%），该残基包含吡啶结构（即，缺乏第二残基）。

[0420]

第一 残基结构	第二 残基结构	第三 残基结构	漏出收率 pH 7.4	洗脱收率 pH 3.5	冲洗收率 pH 2.25	总回收率
苯并咪唑 (13 %)	咪唑 (10 %)	-	0 %	100 %	0 %	63 %
吡啶 (约 15 %)	咪唑 (约 25 %)	-	< 1 %	94 %	6 %	98 %
吡啶 (25 %)	咪唑 (20 %)	-	0 %	86 %	14 %	84 %
吡啶 (26 %)	咪唑 (26 %)	-	0 %	64 %	36 %	91 %
喹啉 (约 40 %)	咪唑 (约 30 %)	-	2 %	84 %	14 %	97 %
苯并咪唑 (约 50 %)	咪唑 (约 30 %)	-	0 %	100 %	0 %	59 %
吡啶 (25 %)	咪唑 (21 %)	乙酰基 (54 %)	52 %	43 %	5 %	88 %

[0421]

吡啶 (26 %)	咪唑 (24 %)	琥珀酸 (约 50 %)	87 %	0 %	13 %	81 %
吡啶 (约 25 %)	-	-	0 %	100 %	0 %	81 %
吡啶 (30 %)	-	-	0 %	17 %	83 %	86 %
喹啉 (约 40 %)	-	-	0 %	100 %	0 %	83 %
吡啶 (约 50 %)	-	-	1 %	13 %	86 %	69 %
苯并咪唑 (约 50 %)	-	-	0 %	100 %	0 %	72 %
苯并咪唑 (约 50 %)	-	-	< 1 %	92 %	8 %	97 %
-	吡啶 (24 %)	-	58 %	42 %	0 %	61 %
-	咪唑 (30 %)	-	29 %	71 %	0 %	89 %
-	咪唑 (62 %)	-	0 %	100 %	0 %	59 %

[0422]

-	吡啶 (约 20 %) + 咪唑 (约 30 %)	乙酰基 (约 50 %)	91 %	9 %	0 %	103 %
-	-	-	42 %	5 %	53 %	75 %
-	-	-	36 %	0 %	64 %	91 %
-	-	乙酰基 (约 100 %)	100 %	0 %	0 %	100 %
-	-	琥珀酸 (约 100 %)	100 %	0 %	0 %	95 %

[0423] 表 3:用靶蛋白质伴清蛋白进行相筛洗

[0424]

第一 残基结构	第二 残基结构	第三 残基结构	漏出收率 pH 7.4	洗脱收率 pH 3.5	冲洗收率 pH 2.25	总回收率
苯并咪唑 (13 %)	咪唑 (10 %)	-	0 %	100 %	0 %	105 %
吲哚 (约 15 %)	咪唑 (约 25 %)	-	4 %	95 %	1 %	88 %
喹啉 (19 %)	咪唑 (30 %)	-	57 %	43 %	0 %	92 %
吲哚 (25 %)	咪唑 (20 %)	-	3 %	97 %	2 %	89 %
吲哚 (26 %)	咪唑 (26 %)	-	9 %	89 %	0 %	59 %
苯并咪唑 (约 50 %)	咪唑 (约 30 %)	-	0 %	100 %	< 1 %	91 %
吲哚 (25 %)	咪唑 (21 %)	乙酰基 (54 %)	75 %	< 1 %	25 %	93 %
吲哚 (26 %)	咪唑 (24 %)	琥珀酸 (约 50 %)	60 %	40 %	0 %	77 %
吲哚 (约 25 %)	-	-	0 %	96 %	4 %	66 %
吲哚 (30 %)	-	-	0 %	96 %	4 %	73 %
喹啉 (约 40 %)	-	-	58 %	41 %	1 %	67 %
吲哚 (约 50 %)	-	-	3 %	90 %	7 %	56 %
苯并咪唑 (约 50 %)	-	-	< 1 %	99 %	1 %	88 %
苯并咪唑 (约 50 %)	-	-	70 %	30 %	0 %	74 %
喹啉 (约 40 %)	-	乙酰基 (约 60 %)	100 %	0 %	0 %	82 %
-	咪唑 (30 %)	-	84 %	16 %	0 %	83 %
-	咪唑 (62 %)	-	81 %	19 %	0 %	79 %
-	-	-	89 %	10 %	2 %	91 %
-	-	-	85 %	2 %	13 %	78 %
-	-	乙酰基 (约 100 %)	100 %	0 %	0 %	91 %

[0425] 表 4 :用靶蛋白质伴清蛋白的相筛选

[0426]

第一 残基结构	第二 残基结构	第三 残基结构	漏出收率 pH 7.4	洗脱收率 pH 3.5	清洗收率 pH 2.25	总回收率
苯并咪唑 (13 %)	咪唑 (10 %)	-	2 %	98 %	n.d.	86 %
喹啉 (19 %)	咪唑 (30 %)	-	3 %	97 %	n.d.	85 %
吲哚 (25 %)	咪唑 (20 %)	-	4 %	96 %	n.d.	45 %
吲哚 (26 %)	咪唑 (26 %)	-	4 %	75 %	n.d.	45 %
苯并咪唑 (约 50 %)	咪唑 (约 30 %)	-	2 %	98 %	n.d.	82 %
吲哚 (25 %)	咪唑 (21 %)	乙酰基 (54 %)	6 %	94 %	n.d.	90 %
吲哚 (26 %)	咪唑 (24 %)	琥珀酸 (约 50 %)	72 %	28 %	n.d.	86 %
吲哚 (约 25 %)	-	-	29 %	71 %	n.d.	25 %
吲哚 (30 %)	-	-	27 %	73 %	n.d.	27 %
-	-	-	63 %	37 %	n.d.	49 %
-	-	乙酰基 (约 100 %)	100 %	0 %	n.d.	84 %

[0427] 表 5:用来自鼠肝脏的靶蛋白质过氧化氢酶的相筛选 (n. d. = 未测得)

[0428]

第一 残基结构	第二 残基结构	第三 残基结构	漏出收率 pH 7.4	洗脱收率 pH 3.5	清洗收率 pH 2.25	总回收率
苯并咪唑 (13 %)	咪唑 (10 %)	-	< 1 %	100 %	n.d.	55 %
吡啶 (约 15 %)	咪唑 (约 25 %)	-	0 %	100 %	0 %	61 %
喹啉 (19 %)	咪唑 (30 %)	-	0 %	100 %	n.d.	55 %
吡啶 (25 %)	咪唑 (20 %)	-	0 %	100 %	n.d.	31 %
吡啶 (约 25 %)	咪唑 (约 25 %)	-	53 %	47 %	0 %	13 %
吡啶 (26 %)	咪唑 (26 %)	-	0 %	0 %	n.d.	0 %
苯并咪唑 (约 50 %)	咪唑 (约 30 %)	-	0 %	100 %	n.d.	44 %
吡啶 (25 %)	咪唑 (21 %)	乙酰基 (54 %)	31 %	69 %	n.d.	87 %
吡啶 (26 %)	咪唑 (24 %)	琥珀酸 (约 50 %)	100 %	0 %	n.d.	58 %
吡啶 (约 25 %)	-	-	0 %	0 %	0 %	0 %
吡啶 (30 %)	-	-	0 %	0 %	n.d.	0 %
喹啉 (约 40 %)	-	-	0 %	100 %	0 %	56 %
苯并咪唑 (约 50 %)	-	-	0 %	0 %	0 %	0 %
苯并咪唑 (约 50 %)	-	-	0 %	100 %	0 %	45 %
喹啉 (约 40 %)	-	乙酰基 (约 60 %)	100 %	0 %	0 %	93 %
-	-	-	100 %	0 %	n.d.	36 %
-	-	乙酰基 (约 100 %)	100 %	0 %	n.d.	71 %

[0429] 表 6:用靶蛋白质丙酮酸激酶的相筛选 (n. d. = 未测得)

[0430] 实施例 3:包含用于中性和弱酸性蛋白质残基具有吡啶和咪唑的吸附剂的荷载容量的测定

[0431] 实验:将血红蛋白、伴清蛋白和过氧化氢酶(来自牛肝脏)这 3 种蛋白质以 32mg/ml 的浓度分别溶于 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中。将分别对应于蛋白质绝对量

0.5...8mg 或每 ml 固定相的蛋白质荷载 1.2...19.0mg (等于 0.2...3.6% 重量 / 重量) 的渐增体积 (15...250 μ l) 的这些储备液逐步注射到含有吸附剂的 HPLC 柱上, 该吸附剂用如下所示的 3- 吡啶基丙酰基和 4- 咪唑基丙烯酰基残基衍生至不同的程度。

[0432] ND 08240 :25% 3- 吡啶基丙酰基 +20% 4- 咪唑基丙烯酰基残基

[0433] ND 08236 :14% 3- 吡啶基丙酰基 +29% 4- 咪唑基丙烯酰基残基

[0434] ND 08037 :26% 3- 吡啶基丙酰基 +26% 4- 咪唑基丙烯酰基残基

[0435] 采用不连续梯度, 从 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液的结合步骤开始以 0.25ml/ 分钟持续 40 分钟, 接着是 50mM pH 3.5 的乙酸盐缓冲液洗脱步骤以 0.5ml/ 分钟持续 20 分钟, 并且最终在相同的流速下用 1M 含水乙酸 (pH 2.25) 酸性冲洗 20 分钟。通过在 280nm 或 450nm 波长下的 UV 吸收信号积分, 为各步骤独立测定洗脱蛋白质的收率。通过与另外的旁路运行 (不进入柱) 的定量比较测定总蛋白质回收率。

[0436] 结果: 在不同吸附剂上, 在增加的荷载下 3 种蛋白质的洗脱行为概述于表 7 中。ND08240 :在所测的 4.8-19.0mg/ml 荷载范围内, 中性蛋白质血红蛋白在 pH 7.4 下的漏出范围为 4.3% 至 52%。测定最大荷载容量为 4.8mg/ml。更高的荷载导致漏出部分的快速升高。在荷载的整个范围内以 pH 3.5 洗脱蛋白质的剩余部分。ND 08236 :在所测的 1.2-19.0mg/ml 荷载范围内, 中性蛋白质伴清蛋白在 pH 7.4 下的漏出范围为 0.32% 至 47%。测定最大荷载容量为 7.13mg/ml。更高的荷载导致漏出部分的快速升高。在荷载的整个范围内以 pH 3.5 洗脱蛋白质的剩余部分。ND 08037 :在所测的 1.2-19mg/ml 荷载范围内, 弱酸性蛋白质过氧化氢酶在 pH 7.4 下的漏出范围为 2.1% 至 10.4%。测定最大荷载容量为 11.88mg/ml。更高的荷载仅导致漏出部分的缓慢升高; 但是蛋白质的剩余部分分配于两个酸性洗脱步骤中, 在 pH 2.25 时, 该部分从在 1.19mg/ml 荷载时的 56% 下降至在 19.0mg/ml 荷载时的 16%。

[0437]

吸附剂号	蛋白质	最大荷载 [mg/ml]	漏出收率 pH 7.4	洗脱收率 pH 3.5	冲洗收率 pH 2.25
ND 08240	血红蛋白	4.75	4 %	92 %	2 %
ND 08236	伴清蛋白	7.13	3 %	95 %	2 %
ND 08037	过氧化氢酶	11.88	5 %	82 %	13 %

[0438] 表 7: 对于 3 种吸附剂 - 蛋白质组合物在它们各自的最大荷载容量下吸附和逐步解吸后的收率

[0439] 实施例 4 : 在具有包含吡啶和咪唑残基的吸附剂上的免疫球蛋白 G 荷载容量的测定实验 : 通过用 100mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液将 303 μ l 商品 **Gammanorm**® 药品稀释于 5ml 容量瓶中制备了 10mg/ml 免疫球蛋白 G (IgG) 的溶液。将对应于 IgG 绝对量 8.58mg 或每 ml 固定相的 IgG 荷载 20.4mg 的 842 μ l 该储备液注射到含有第 ND 10003 号吸附剂的 HPLC 柱上, 该柱已经用大约 70 柱体积的 100mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液预先平衡。该吸附剂已经用 22% 3- 吡啶基丙酰基和 30% 4- 咪唑基丙烯酰基残基衍生化。在注射期间, 在 0.1ml/ 分钟的流速下应用 100mM pH 7.4 的磷酸盐结合缓冲液持续 90 分钟, 接着在 0.5ml/ 分钟流速下, 20 分钟内逐步变化为 100mM pH 4.3 的乙酸盐缓冲液 +50mM 氯化钠洗脱缓冲液, 在相

同的流速下用 0.5M 含水乙酸在另外 20 分钟内进行 pH 2.6 下酸性冲洗,在 1ml/分钟流速下用 100mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中间稀释 10 分钟,并且在相同的流速下用 1M 含水氢氧化钠溶液最终清洗 12 分钟。相应的色谱图示于图 8 中。收集类似不同 pH(pH 7.4、pH 4.3、pH 2.6) 洗脱液的 3 种级分,并在 280nm 下离线光度测定地分析它们的 IgG 含量。为了评估 100% 的参考值,仅仅在其它相同的条件下,以一段空管替代柱实施旁路运行。

[0440] 结果:可以在所有的级分中发现 IgG,其大部分在 pH 7.4 下可逆结合,并且在 pH 4.3 下解吸。3 种可分析的级分中 IgG 的收率被测定为 9% (pH 7.4 下漏出)、81% (pH 4.3 下洗脱) 和 12% (pH 2.6 下冲洗)。因此,所有 3 种级分的总蛋白质回收率总计为约 102%。因此,第 ND 10003 号吸附剂的可逆荷载容量 (pH 4.3 的级分) 可以测定为每 ml 固定相 16.5mg IgG,总荷载容量 (注射量小于 pH 7.4 的漏出量) 为每 ml 固定相 18.5mg IgG。因为在相同的实验方案中吸附剂被重复使用,所以吸附剂对 1M NaOH 清洗 / 清洁卫生处理的稳定性也是值得注意的。

[0441] 实施例 5:对本发明不同吸附剂上的过氧化氢酶的分析分离

[0442] 实验:将过氧化氢酶 (来自牛肝脏)、己糖激酶、胃蛋白酶、细胞色素 C 和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 这 5 种蛋白质的混合物 (各以 0.48mg 的量溶于 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中) 注射到含有吸附剂的不同 HPLC 柱上,该吸附剂已经用如下所列的第一残基和 / 或第二残基衍生化。

[0443] ND 08037 :26% 3- 吡啶基丙酰基 +26% 4- 咪唑基丙烯酰基残基

[0444] ND 070002 :50% 苯并咪唑 -5- 羰基 +30% 4- 咪唑基丙烯酰基残基

[0445] ND 06386 :32% 苯并咪唑 -5- 羰基残基

[0446] 洗脱液随梯度应用,该梯度是从 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液在 0.25ml/分钟的流速下持续 10 分钟开始,接着以 0.5ml/分钟的流速在 50 分钟内第一次 pH 线性变化成 0.1M 含水乙酸 (pH 2.86),并且在相同的流速下在另外的 50 分钟内第二次 pH 线性变化成 1M 含水乙酸 (pH 2.25),该梯度水平最终保持 20 分钟。在 225nm、280nm 和 290nm 的吸收波长处监测洗脱液组成。还注射作为纯溶液的各单一蛋白质用于对照。图 9-11 中描绘了在不同吸附剂上运行的色谱图。

[0447] 结果:混合物的色谱图与单个蛋白质运行的叠加匹配。全部注射量的该靶蛋白质过氧化氢酶的洗脱在所有 3 种吸附剂上都受阻。正如预期的,酸性蛋白质己糖激酶和胃蛋白酶也是静电结合到吸附剂上,但是容量低 (对于己糖激酶漏出为 5-25%;对于胃蛋白酶漏出为 35-50%)。胃蛋白酶一致低的总回收率表明:即使在所应用的最小 pH 值下,该蛋白质的结合级分也不能从吸附剂中再次释放。在碱性蛋白质中,细胞色素 C 被发现完全在漏出级分中,然而在该级分中 α -糜蛋白酶漏出约 25-35% 而且剩余部分被保留。在所有情况中都发现了沿 pH- 梯度洗脱的相对次序为 (1) α -胰凝乳蛋白酶原 A-(2) 过氧化氢酶-(3) 己糖激酶,峰间偏差在 3 分钟和 9 分钟之间。尽管洗脱峰总是重叠的,然而出于定性分析的目的,在应用梯度期间过氧化氢酶应从两种蛋白质中充分的溶出,而它从细胞色素 C 和胃蛋白酶中分离实际上是完全的。在本发明吸附剂的帮助下,可以因此在酸性蛋白质和碱性蛋白质同时存在的情况下测定过氧化氢酶。当比较吸附剂 ND 070002 与 ND 06380 时,也很显然,存在于 ND 070002 中另外的单核杂环取代基产生了在保留上的普遍延长以及减少过氧化氢酶和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 峰重叠的作用。

[0448]

吸附剂号	α -胰凝乳蛋白酶原 A	过氧化氢酶	己糖激酶
ND 08037	25.8	29.2	38.3
ND 070002	28.9	33.9	41.8
ND 06380	24.4	27.0	32.3

[0449] 表 8:在实施例 5 的洗脱梯度中在 3 种吸附剂上的 3 种蛋白质的保留时间 [分钟]

[0450] 实施例 6 :加入盐对在本发明的不同吸附剂上蛋白质保留的影响

[0451] 实验 :将伴清蛋白、己糖激酶、胃蛋白酶、细胞色素 C 和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 这 5 种蛋白质的混合物 (各以 0.48mg 的量溶于 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中) 注射到含有吸附剂的不同 HPLC 柱上,该吸附剂已经用如下相应的表中指明的残基衍生化。洗脱液随梯度应用,该梯度是从 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液开始以 0.25ml/ 分钟的流速持续 10 分钟,接着在恒定 pH 下,50 分钟内以 0.5ml/ 分钟流速,从 0 线性增加盐至 1M 氯化钠,然后在恒定的流速下保持该梯度水平 20 分钟。用 1M 含水乙酸在 0.5ml/ 分钟下持续 10 分钟的最终冲洗步骤结束洗脱程序。在 225nm、280nm 和 290nm 的吸收波长处监测洗脱液组成。给出的收率以积分后的这些信号为基础。此时通过总结各洗脱步骤的收率计算蛋白质回收率。还注射作为纯溶液的各单一蛋白质用于对照 (参见图 12-15)。

[0452] 结果 :所有 5 种蛋白质的保留数据列于表 9-12 中。吸附剂第 ND 08236 和 ND 06386 号既没有显示出对靶伴清蛋白的结合强度也没有显示出对酸性更大的蛋白质己糖激酶和胃蛋白酶的结合强度有任何显著的影响。根据预期的方案,仅仅在用酸性洗脱液 pH 陡降之后,可以从吸附剂中洗脱出这些蛋白质。在增加的盐浓度下,仅有很小百分比的碱性蛋白质 α -胰凝乳蛋白酶原 A (其本不应该静电结合) 被洗脱。另一方面,含有喹啉基 -4- 羰基的第 ND 07200 和 ND 07122 号吸附剂对伴清蛋白和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 的保留都显示了适当的盐作用。在据盐应用期间的收率损失方面,该作用在 ND 07122 中比在 ND 07200 中更显著,由此证实了,附加的单核杂芳配体对 ND 07200 中的结合强度具有有利作用。这些组合的发现可视为表明 :吸附剂的结合机制与简单的离子交换不同。因此,也可能从包含高浓度 pH 中性盐的所给料 (不澄清的) 溶液中将蛋白质捕获到吸附剂上。相反,洗脱液的盐浓度可以用作附加的参数,以调节在更复杂混合物的分离中的蛋白质选择性。

[0453]

蛋白质	盐洗脱保留时间[分钟]	漏出收率	盐洗脱收率	酸冲洗收率	总回收率
伴清蛋白	-	-	-	68 %	68 %
α -胰凝乳蛋白酶原 A	-	53 %	-	43 %	96 %
细胞色素 C	-	88 %	-	-	88 %
己糖激酶	-	9 %	-	47 %	56 %
胃蛋白酶	-	31 %	-	-	31 %

[0454] 表9:在第 ND 08236 号 (14% 3-吡啶基丙酰基 +29% 4-咪唑基丙烯酰基残基) 吸附剂上所加入盐的保留数据

[0455]

蛋白质	盐洗脱保留时间[分钟]	漏出收率	盐洗脱收率	酸冲洗收率	总回收率
伴清蛋白	25.1	-	26 %	26 %	52 %
α -胰凝乳蛋白酶原 A	21.3	48 %	18 %	3 %	69 %
细胞色素 C	-	88 %	-	-	88 %
己糖激酶	-	17 %	-	21 %	37 %
胃蛋白酶	-	32 %	-	-	32 %

[0456] 表10:在第 ND 07200 号 (19% 喹啉 -4- 羰基 +30% 4-咪唑基丙烯酰基残基) 吸附剂上所加入盐的保留数据

[0457]

蛋白质	盐洗脱保留时间[分钟]	漏出收率	盐洗脱收率	酸冲洗收率	总回收率
伴清蛋白	30.6	-	56 %	32 %	88 %
α -胰凝乳蛋白酶原 A	19.9	45 %	42 %	3 %	91 %
细胞色素 C	-	83 %	-	-	83 %
己糖激酶	-	14 %	-	32 %	46 %
胃蛋白酶	-	33 %	-	-	33 %

[0458] 表11:在第 ND 07122 号 (19% 喹啉 -4- 羰基残基) 吸附剂上所加入盐的保留数据

[0459]

蛋白质	盐洗脱保留时间[分钟]	漏出收率	盐洗脱收率	酸冲洗收率	总回收率
伴清蛋白	-	-	-	78 %	78 %
α -胰凝乳蛋白酶原 A	10.5	61 %	11 %	28 %	100 %
细胞色素 C	-	78 %	-	-	78 %
己糖激酶	-	10 %	-	38 %	48 %
胃蛋白酶	-	28 %	-	-	28 %

[0460] 表 12: 在第 ND 06386 号 (13% 苯并咪唑基 -2- 硫代乙酰基残基) 吸附剂上所加入盐的保留数据

[0461] 实施例 7: 伴清蛋白从具有含有咪唑和吡啶或喹啉的残基的吸附剂上的蛋白质混合物中的半制备分离

[0462] 实验: 将伴清蛋白、己糖激酶、胃蛋白酶、细胞色素 C 和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 这 5 种蛋白质的混合物 (各以 0.48mg 的量溶于 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中) 注射到含有第 ND 07200 号 (33.5×4mm) 或 PRC 10014 (250×4mm; 荷载 0.96mg) 吸附剂的两种不同 HPLC 柱上。该吸附剂已经用 19% 喹啉 -4- 羰基和 30% 4-咪唑基丙烯酰基残基 (ND07200) 或用 22% 3-吡啶基丙烯酰基和 28% 4-咪唑基丙烯酰基残基 (PRC 10014) 衍生化。洗脱液随梯度应用, 该梯度是从 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液开始以 0.25ml/ 分钟的流速持续 10 分钟 (PRC 10014:40 分钟), 接着在 0.5ml/ 分钟流速下 50 分钟内缓冲液线性变成 50mM pH 3.5 的乙酸盐缓冲液, 最后在恒定的流速下保持该梯度水平 20 分钟 (PRC10014:50 分钟)。在 225nm 的吸收波长下 (图 16a/b) 监测洗脱液组成, 并且将其收集成 7 个级分。再通过离心膜过滤浓缩至 0.2ml 的体积之后, 通过 SDS-PAGE 定性分析各级分的蛋白质含量 (对应于在 ND 07200 上的级分示例性地显示在图 17 中)。为了比较的目的, 在图 18 中描绘了所有 5 种单独的蛋白质在第 ND 07200 号吸附剂上的分析运行。

[0463] 结果: ND 07200: 级分 IV (31:30-40:00min; 4.25ml) 包含大部分的伴清蛋白连同一些残留的 α -胰凝乳蛋白酶原 A, 除了被任何其它蛋白质污染的以外。在级分 I 中发现了细胞色素 C, 在级分 II 和 III 中发现了 α -胰凝乳蛋白酶原 A, 并且在级分 V 和 VI 中发现了己糖激酶。在级分 II、III 和 V 中也检测到少量的伴清蛋白。尽管仍然是不完全的, 但当考虑短柱维度和粗粒级时, 选择的固定和流动相组合的提纯能力还是可接受的。PRC10014: 级分 V (98:00-109:00min; 5.50ml) 包含大部分的伴清蛋白连同残留的 α -胰凝乳蛋白酶原 A 和己糖激酶 (它已经被部分地从该级分中分离)。在级分 I 中发现了细胞色素 C, 在级分 IV 和 VI 中发现了 α -胰凝乳蛋白酶原 A, 并且在级分 V-VII 中发现了己糖激酶。在级分 IV 和 VI 中也检测到少量的伴清蛋白。

[0464] 实施例 8: 血红蛋白从具有含有苯并咪唑和咪唑的残基的吸附剂上的蛋白质混合物中的分析和半制备分离

[0465] 实验:将血红蛋白、己糖激酶、胃蛋白酶、细胞色素 C 和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 这 5 种蛋白质的混合物(各以 0.48mg 的量溶于 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中)注射到含有第 ND 07003 号吸附剂的 HPLC 柱上,吸附剂已经用 13% 苯并咪唑基-2-硫代乙酰基和 10% 4-咪唑基丙烯酰基残基衍生化。洗脱液随梯度应用,该梯度是从 25mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲液开始以 0.25ml/分钟的流速持续 10 分钟,接着以 0.5ml 分钟流速 50 分钟之内缓冲液线性变成 50mM pH 3.5 的乙酸盐缓冲液,最终在恒定的流速下保持该梯度水平 20 分钟。在 225nm(图 19)、280nm、290nm 和 500nm 的吸收波长下监测洗脱液成分,并且将其收集成 7 个级分。在通过离心膜过滤浓缩到 0.2ml 的体积之后,通过 SDS-PAGE 定性分析各级分的蛋白质含量(图 20)。为了比较的目的,将在第 ND 07003 号吸附剂上所有 5 种单独的蛋白质(血红蛋白:1.92mg 注射量)的平行分析运行,连同在柱末端收集的洗脱液的所测 pH 值都标绘在图 21 中。将在类似参照吸附剂第 ND 06386 号(其没有咪唑基丙烯酰基残基)上的分析运行加入到图 22 中。

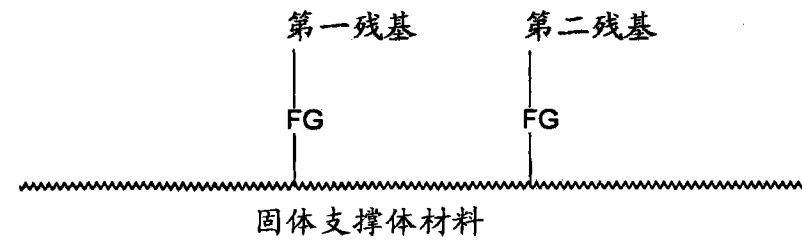
[0466] 结果:本实验的某些关键数据概述于表 13 中。采用第 ND 07003 号吸附剂得到的分析色谱图的叠加显示了相当好的固相分离效率。因此,血红蛋白可以在酸性蛋白质和碱性蛋白质同时存在的情况下测定,最小保留时间之差为 7.5 分钟,并且回收率 100%(参照吸附剂 ND 06386:86%)。此外,混合物的色谱图与单个蛋白质运行的叠加匹配。正如预期的,酸性蛋白质己糖激酶和胃蛋白酶也与吸附剂静电结合,但是具有低容量(即,部分漏出)。要解决的最困难的问题结果是血红蛋白从己糖激酶中的分离,这因于后者的洗脱行为宽。胃蛋白酶一致低的总回收率表明:即使在所应用的最小 pH 值下,该蛋白质的结合部分也不能从吸附剂中再次释放。相反,如果使用相同的梯度, α -胰凝乳蛋白酶原 A 和血红蛋白不能在第 ND 06386 号吸附剂上分离(保留时间为 35.1 和 35.7 分钟)。

[0467] 根据分析运行,半制备运行(31:30-40:00 分钟;4.25ml)的级分 IV 包含大部分的血红蛋白连同某些残留的 α -胰凝乳蛋白酶原 A,除了被任何其它蛋白质污染的以外。在级分 I(细胞色素 C)和级分 V 和 VI(己糖激酶、 α -胰凝乳蛋白酶原 A)中发现了初始混合物的其它的蛋白质。血红蛋白的痕迹也被带入到了后面的两个级分中。

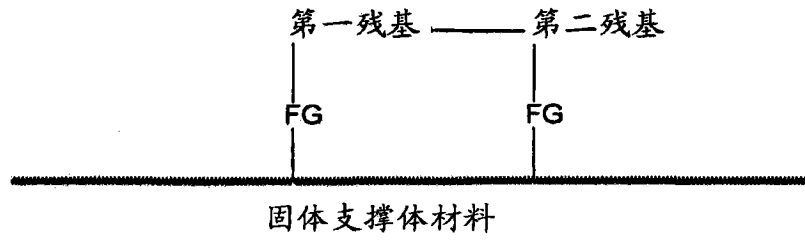
[0468]

蛋白质	缓冲洗脱保留时间[分钟]	近似的洗脱 pH	漏出收率	缓冲洗脱收率	总回收率
血红蛋白	25.5	6.8	4 %	96 %	100 %
α -胰凝乳蛋白酶原 A	33.0	5.6	36 %	13 %	49 %
细胞色素 C	-	-	99 %	-	99 %
己糖激酶	49.2	4.5	12 %	48 %	61 %
胃蛋白酶	-	-	34 %	-	34 %

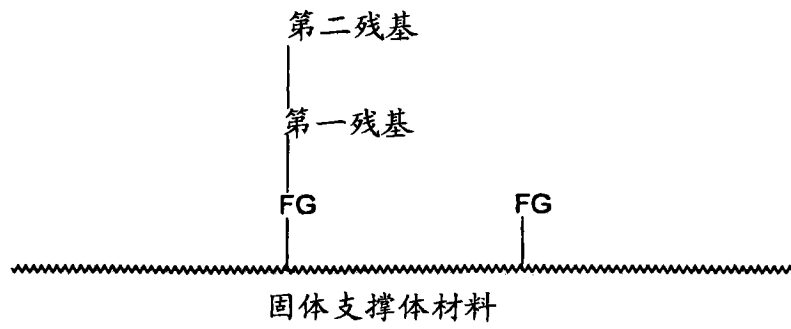
[0469] 表 13:在第 07003 号吸附剂上实施例 8 的试验混合物的保留数据。



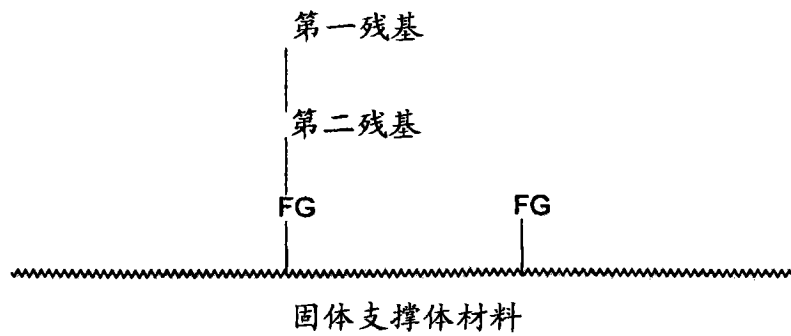
A



B



C



D

图 1 :构造 A-D

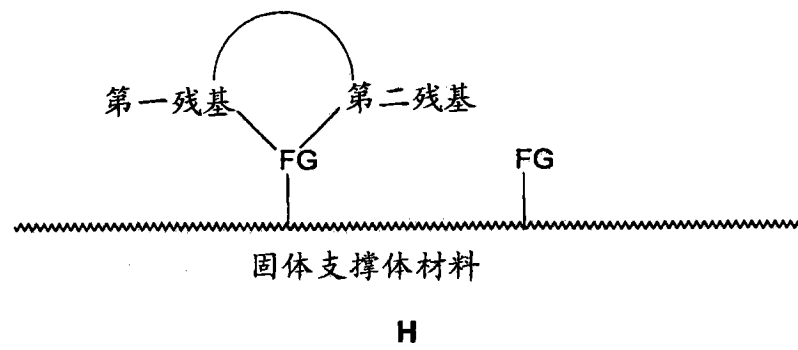
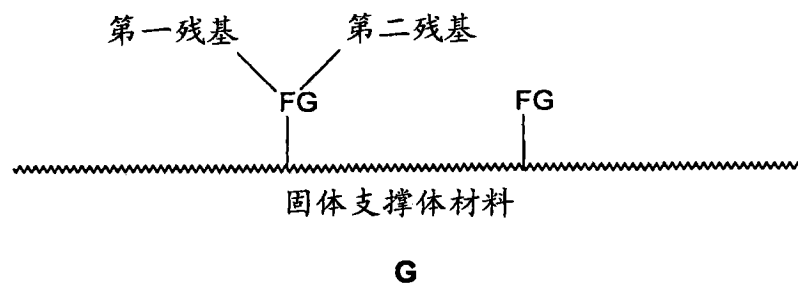
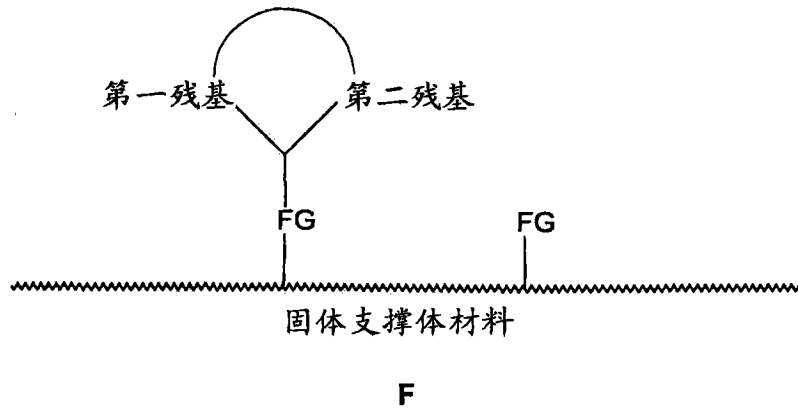
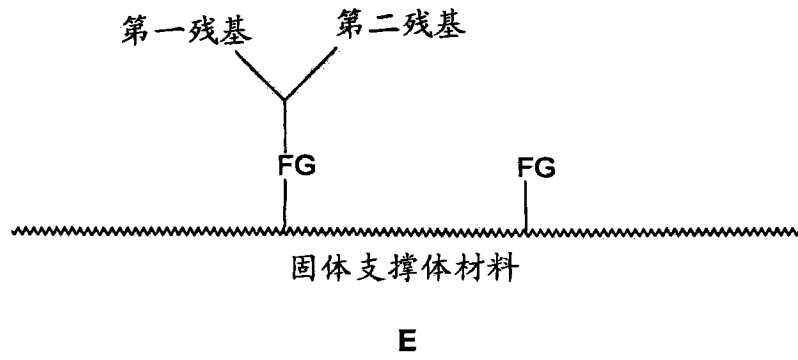


图1(续):构造 E-H

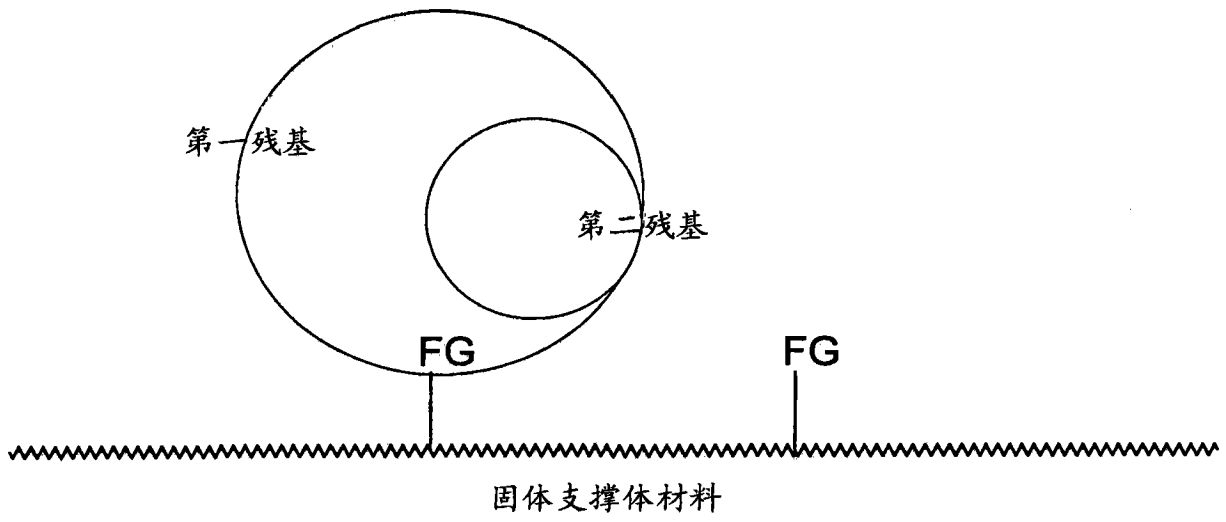
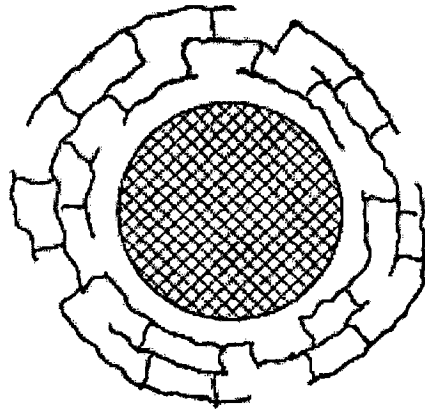
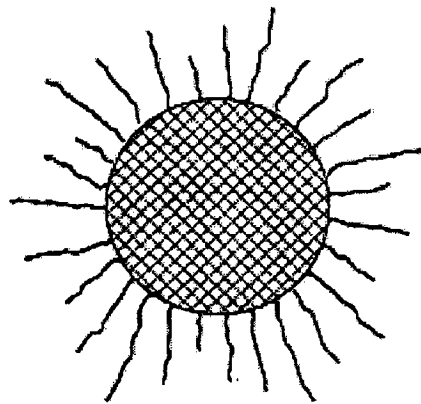


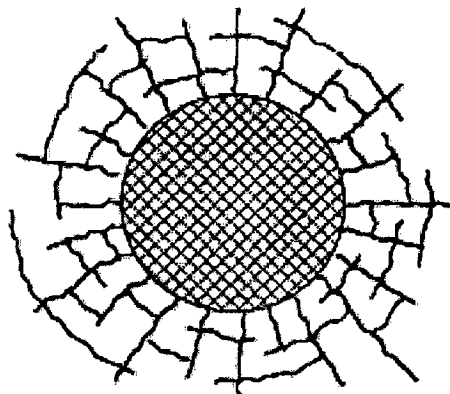
图 1(续):一般图示 I



A



B



C

图 2

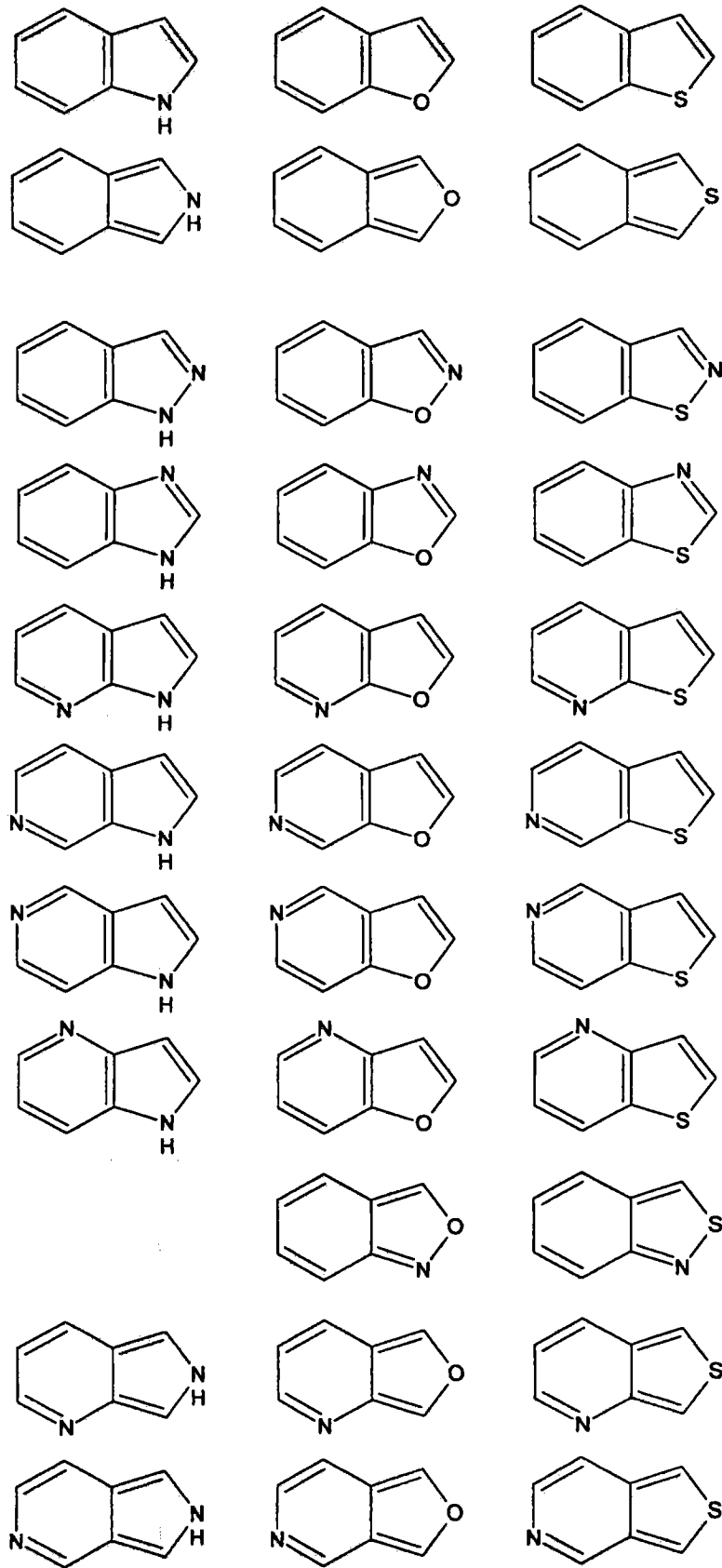


图 3

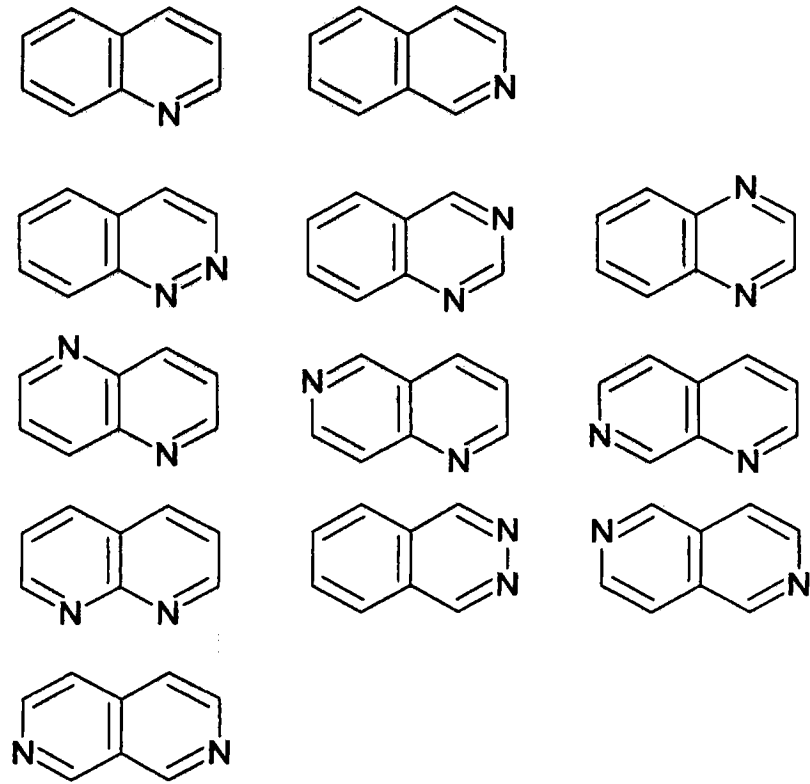


图3:(续)

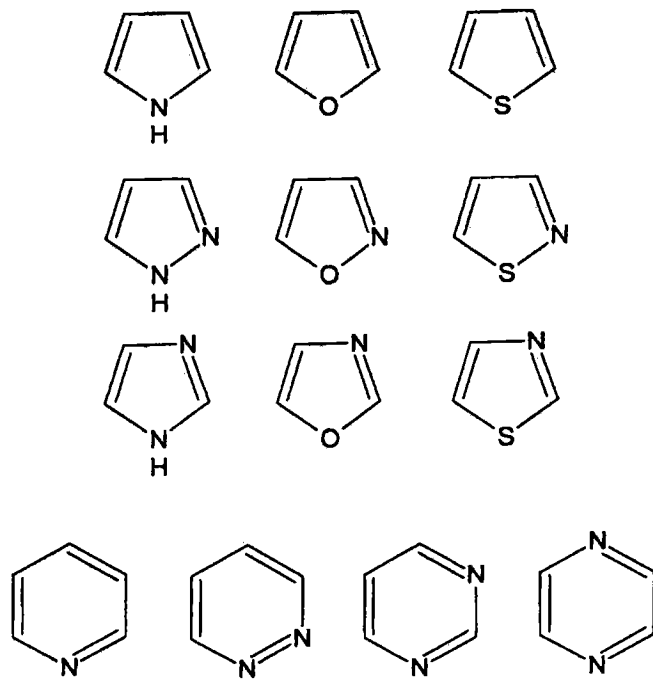


图4

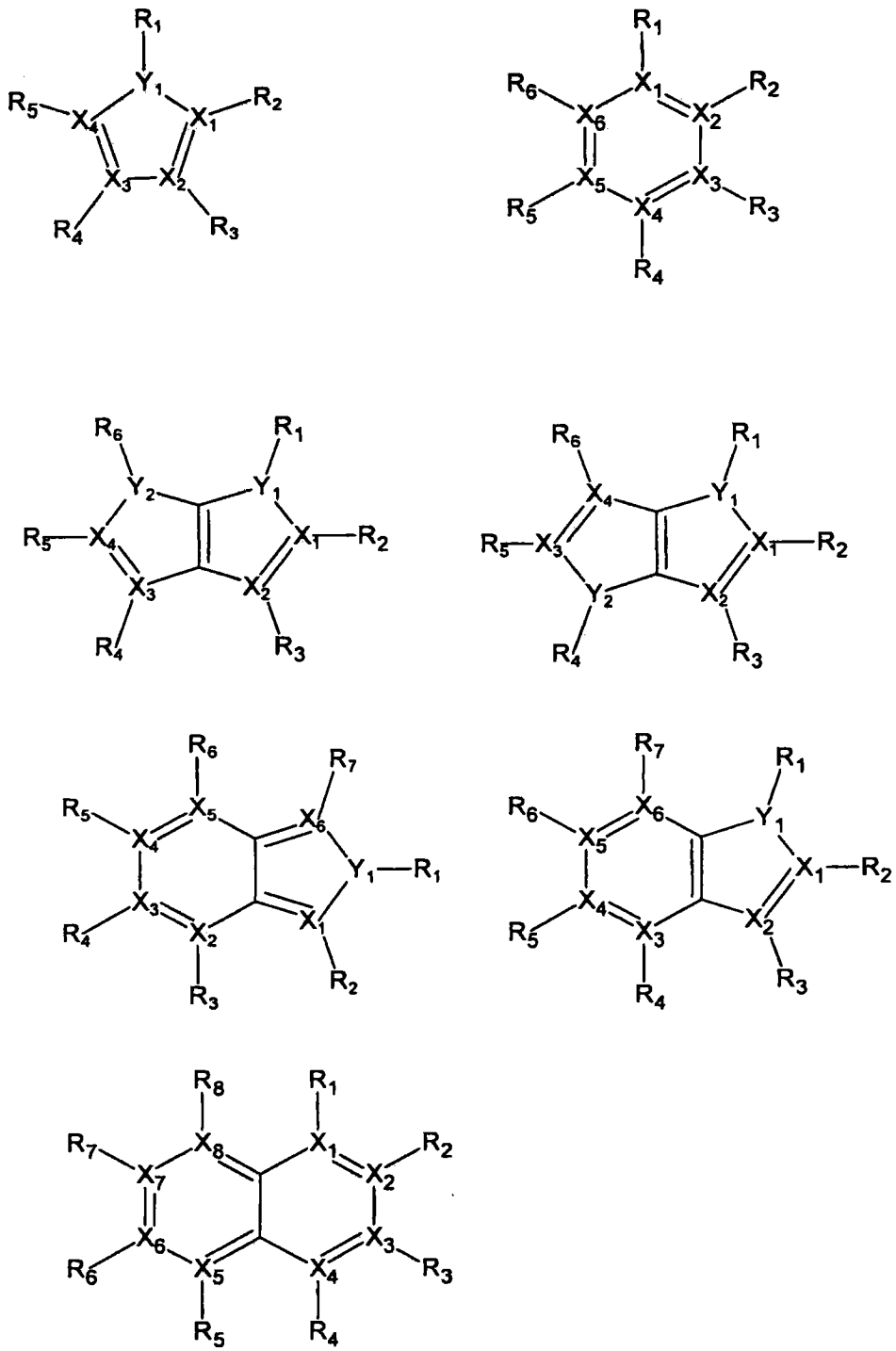


图 5

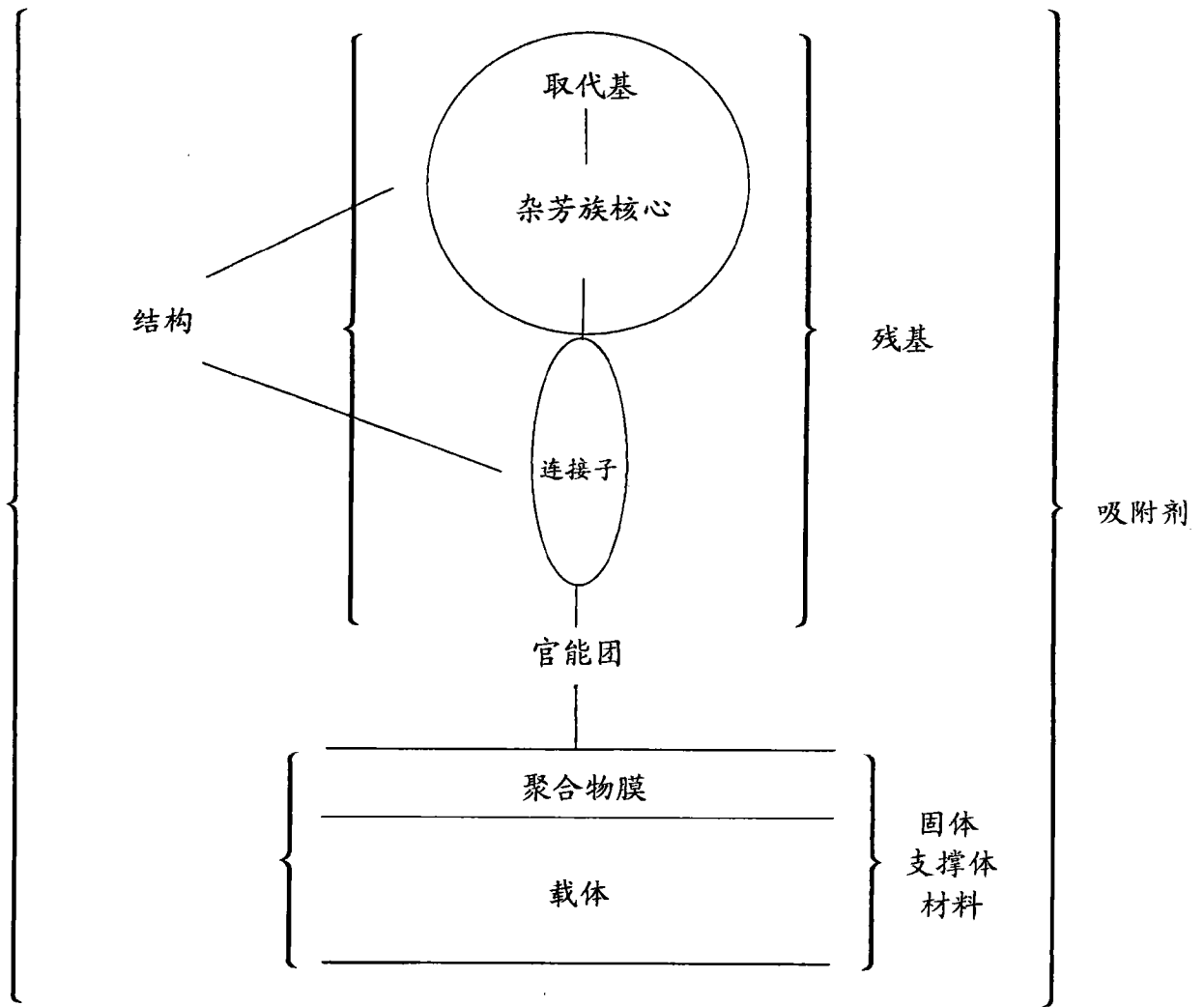


图 6

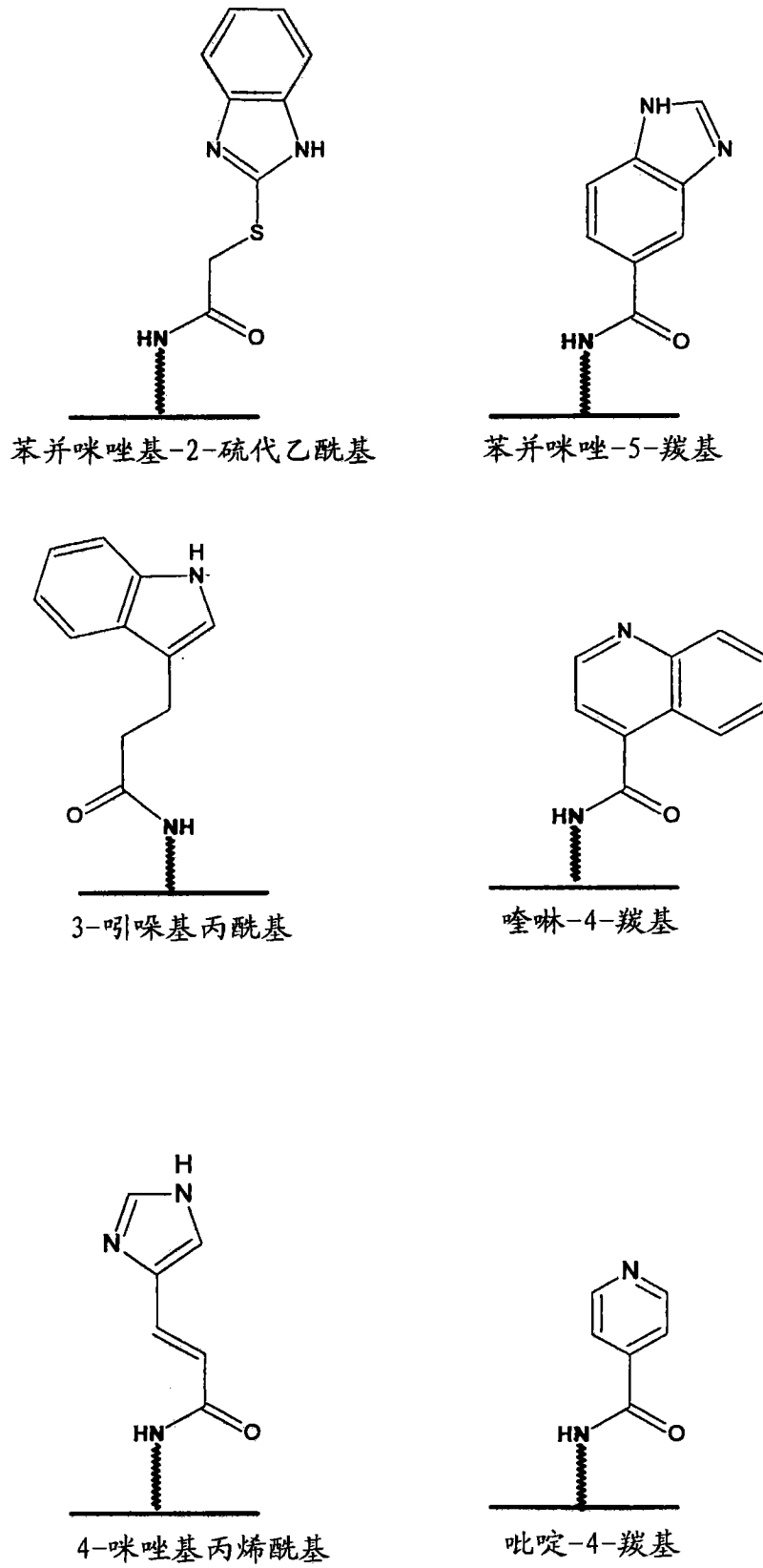


图 7

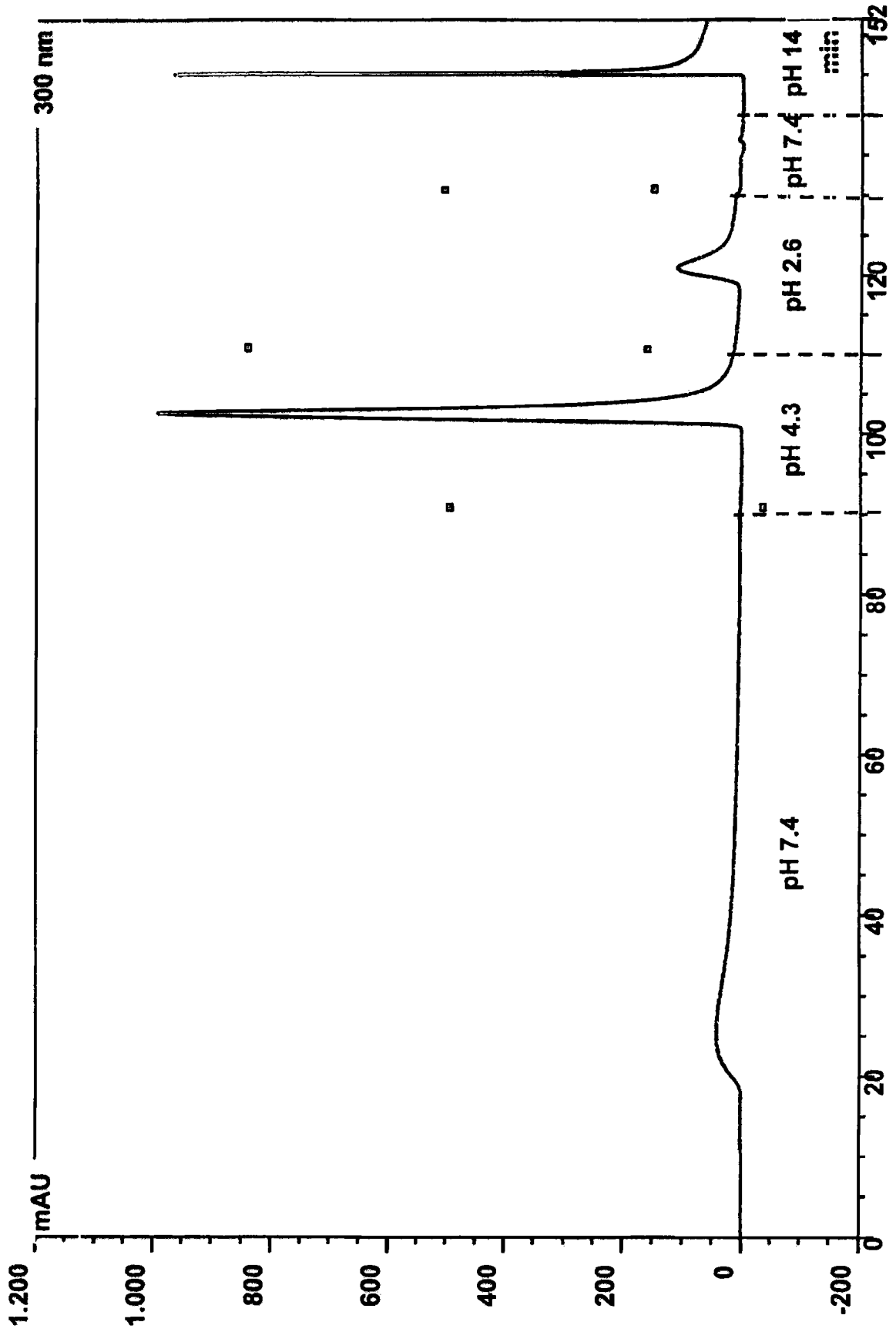


图 8

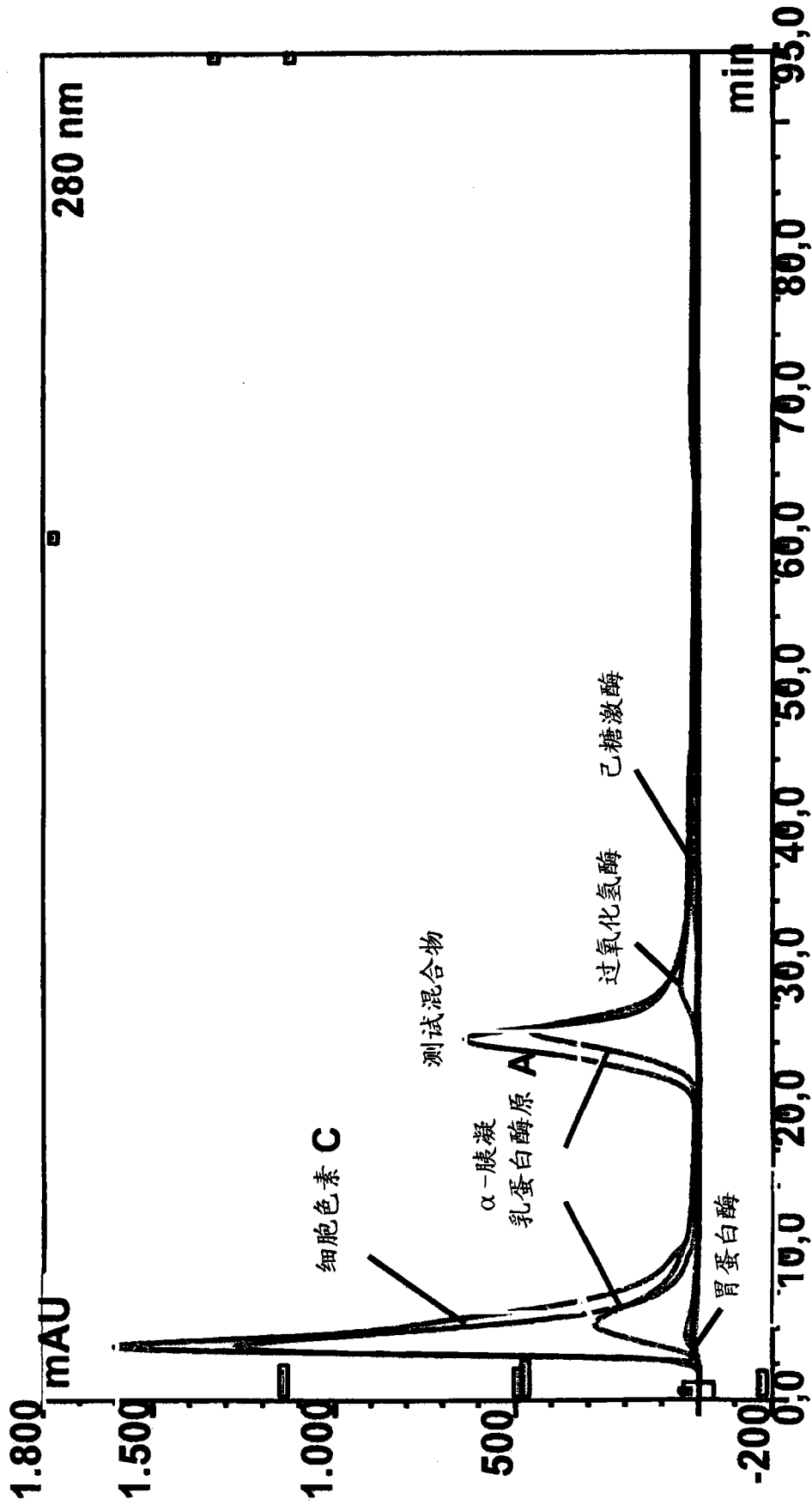


图 9

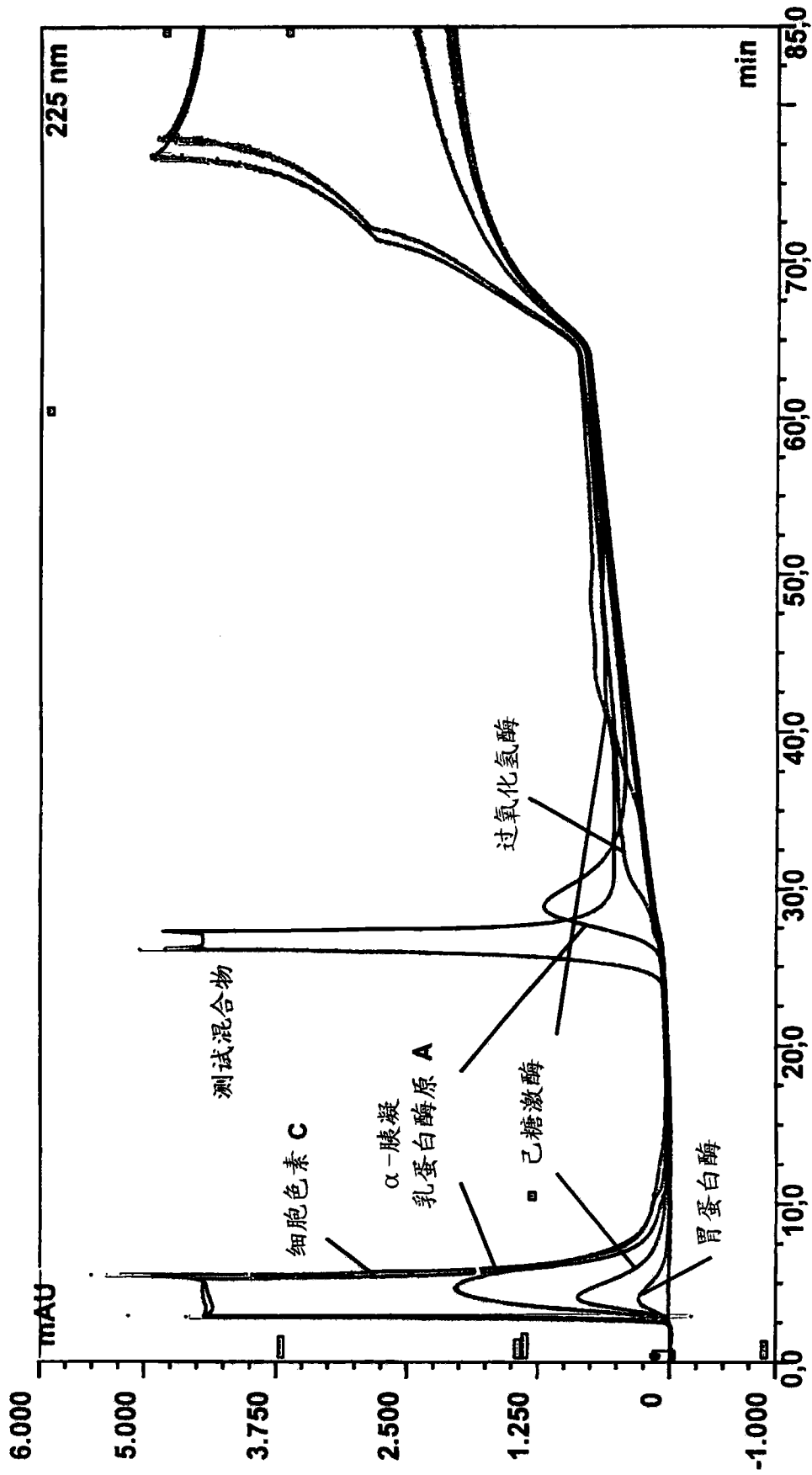


图 10

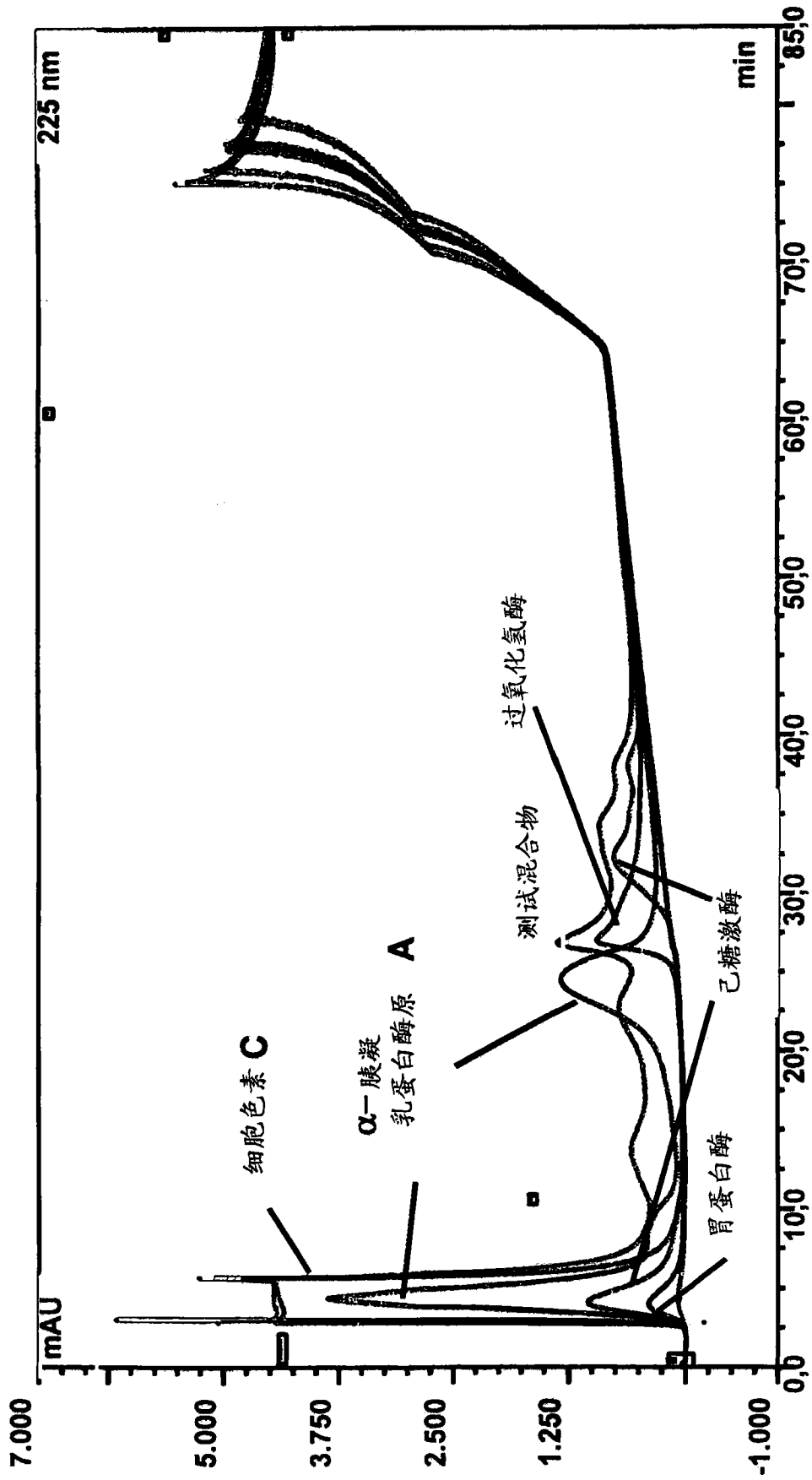


图 11

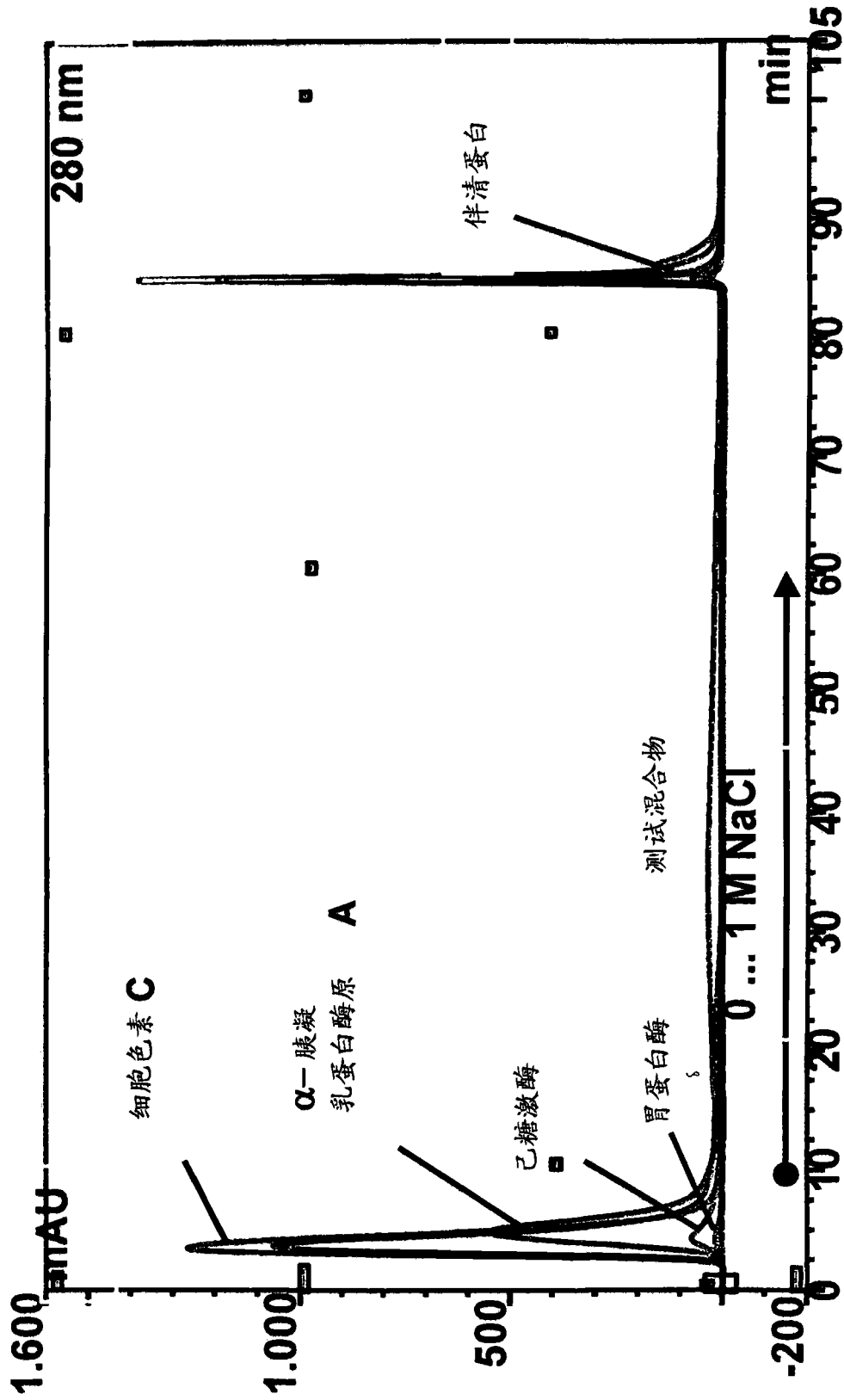


图 12

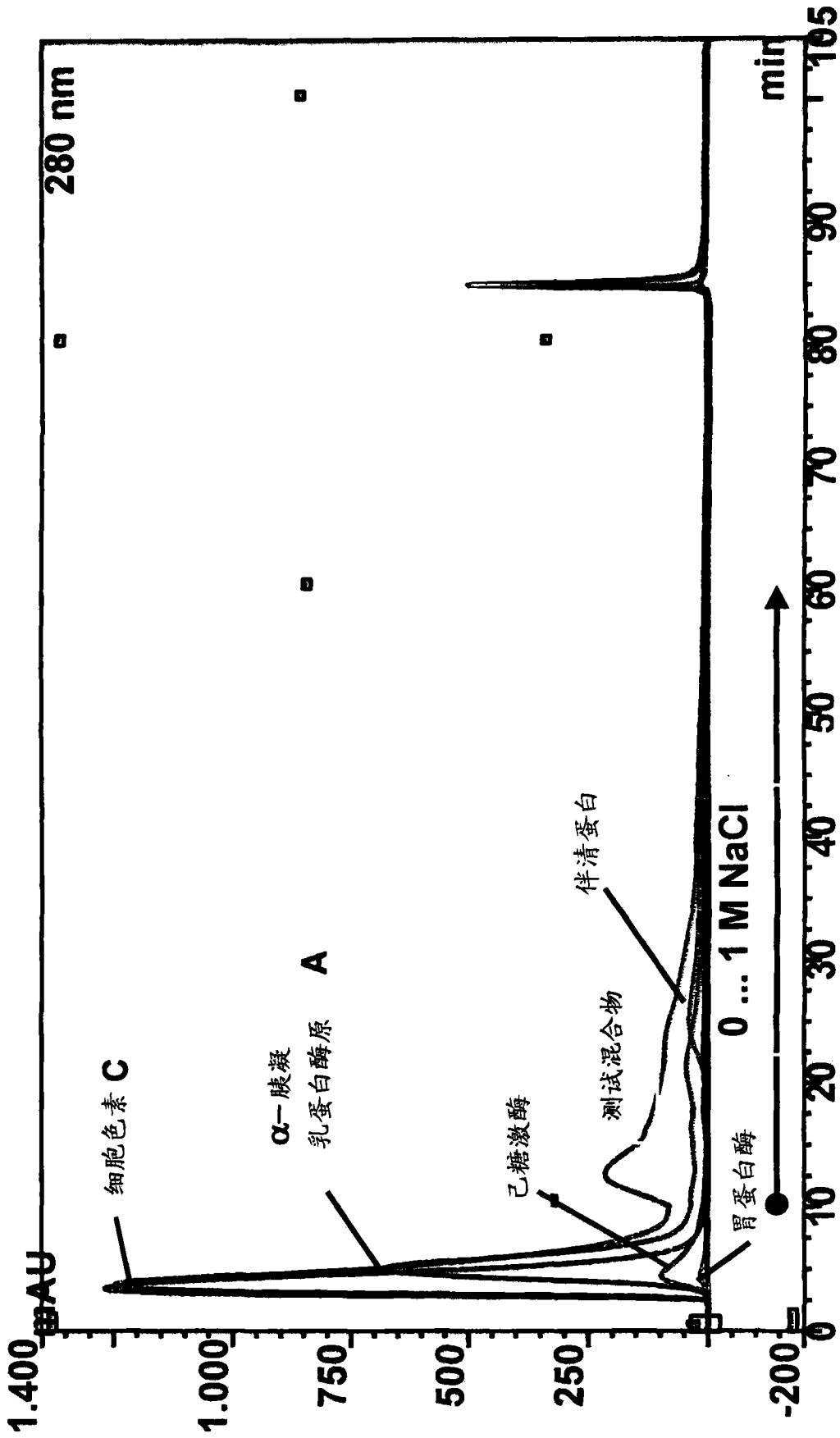


图 13

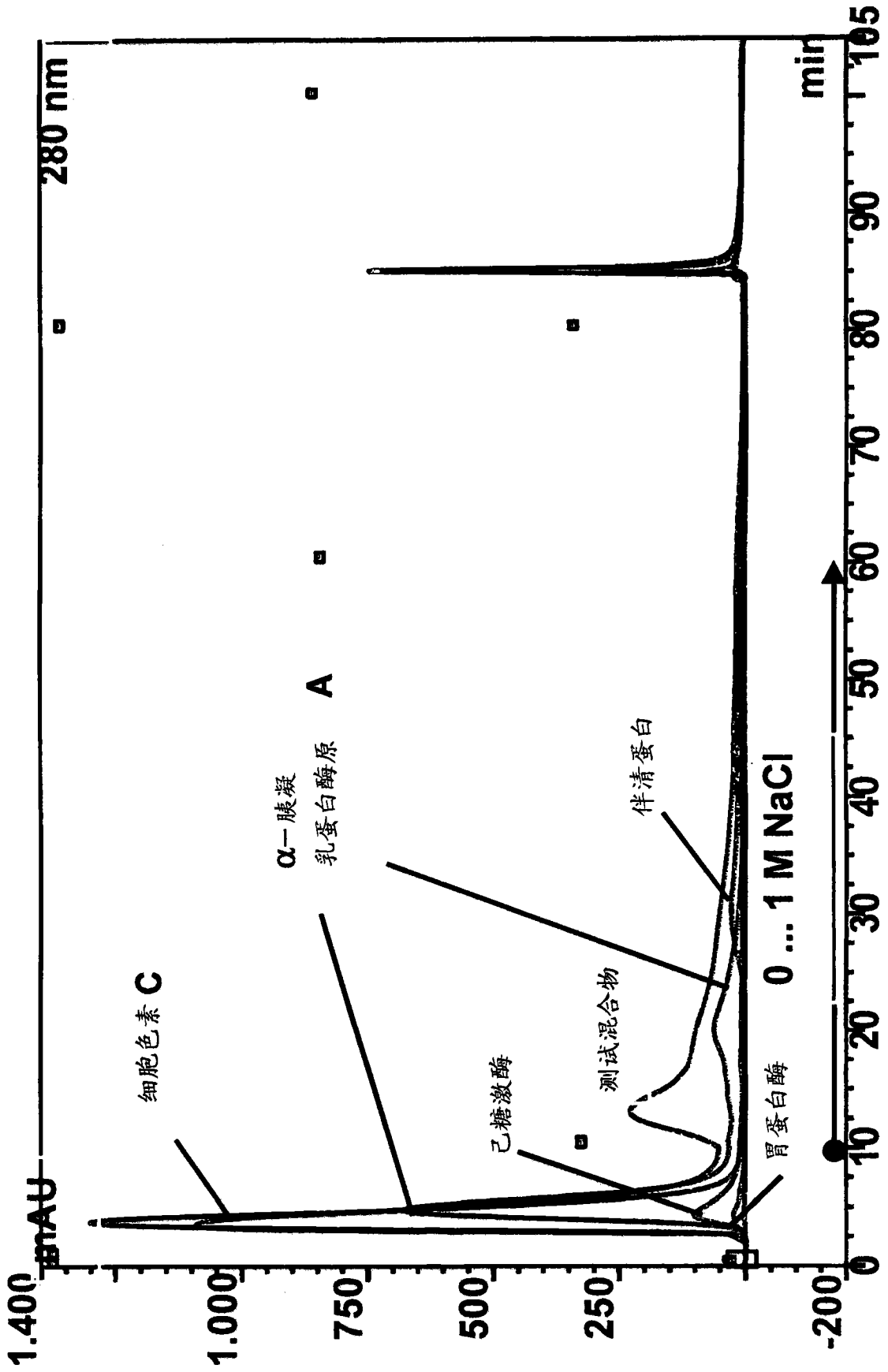


图 14

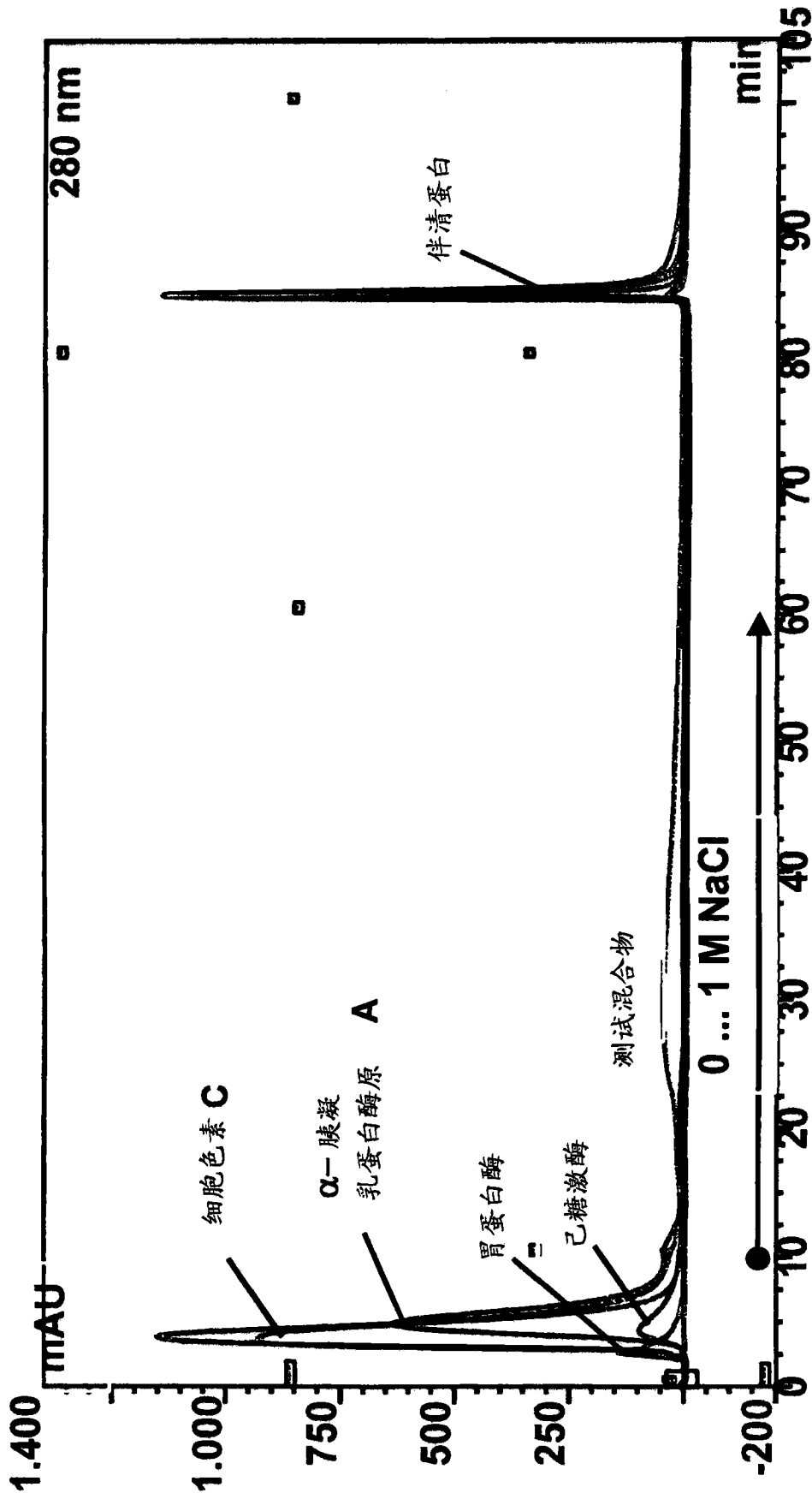


图 15

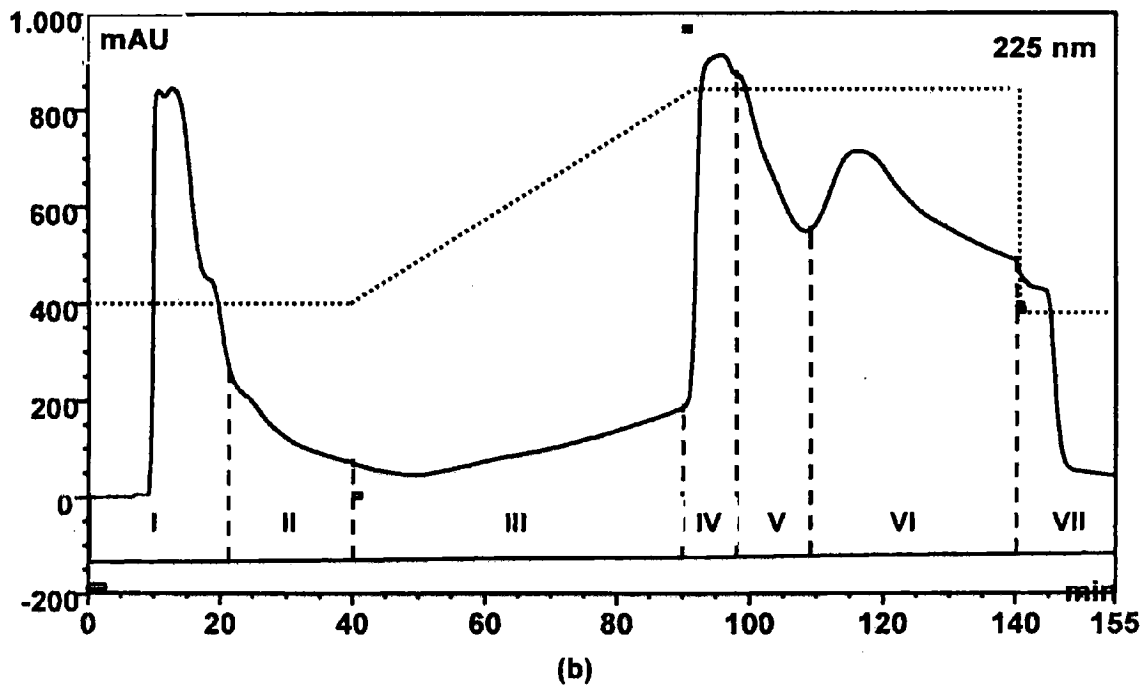
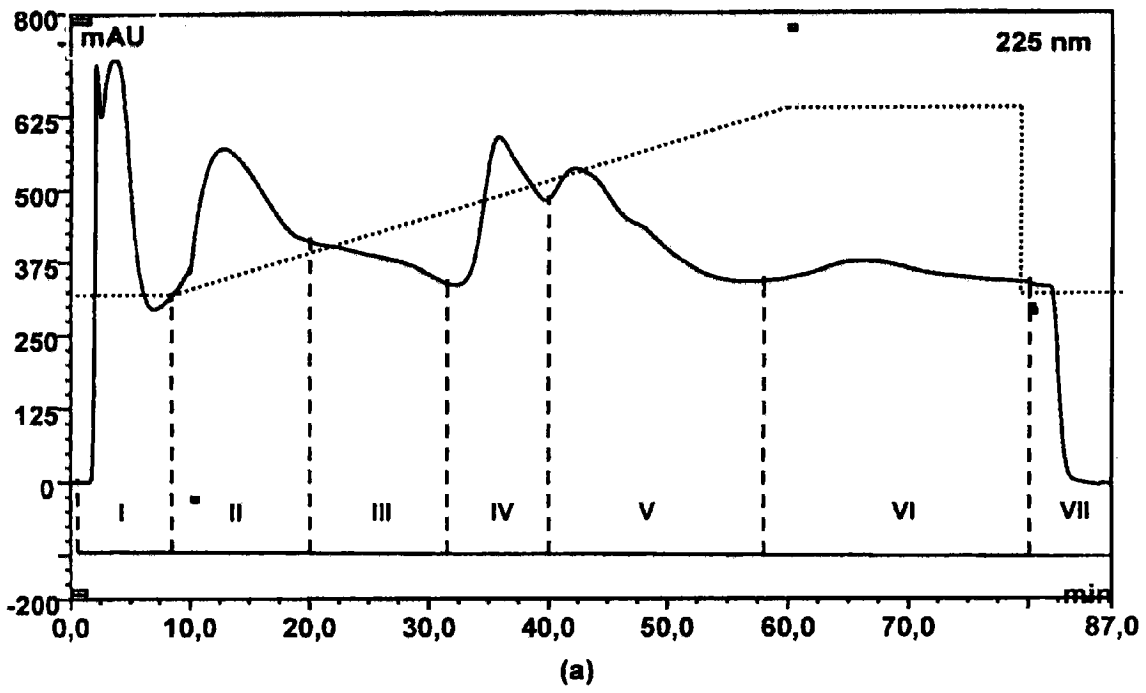


图 16

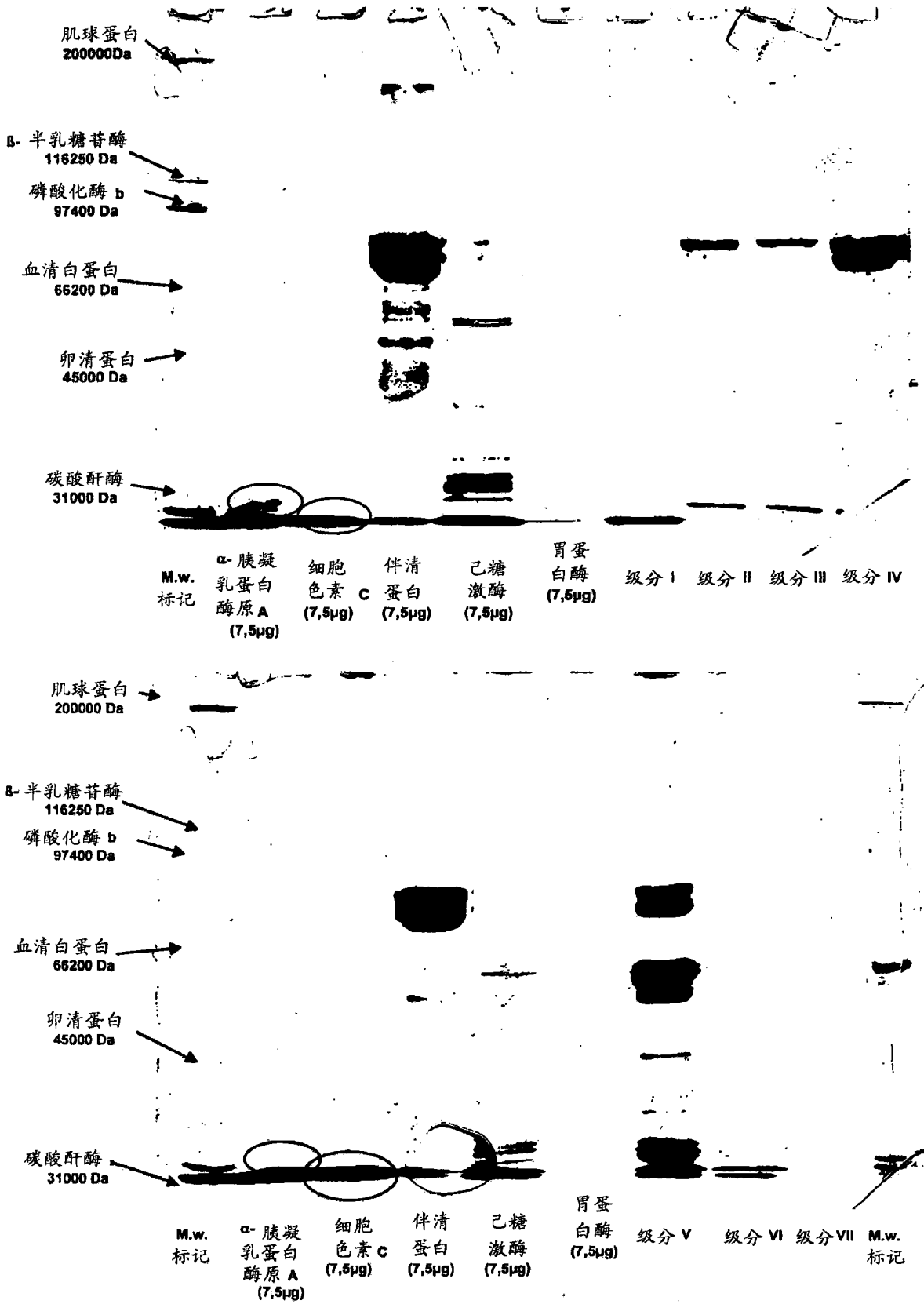


图 17

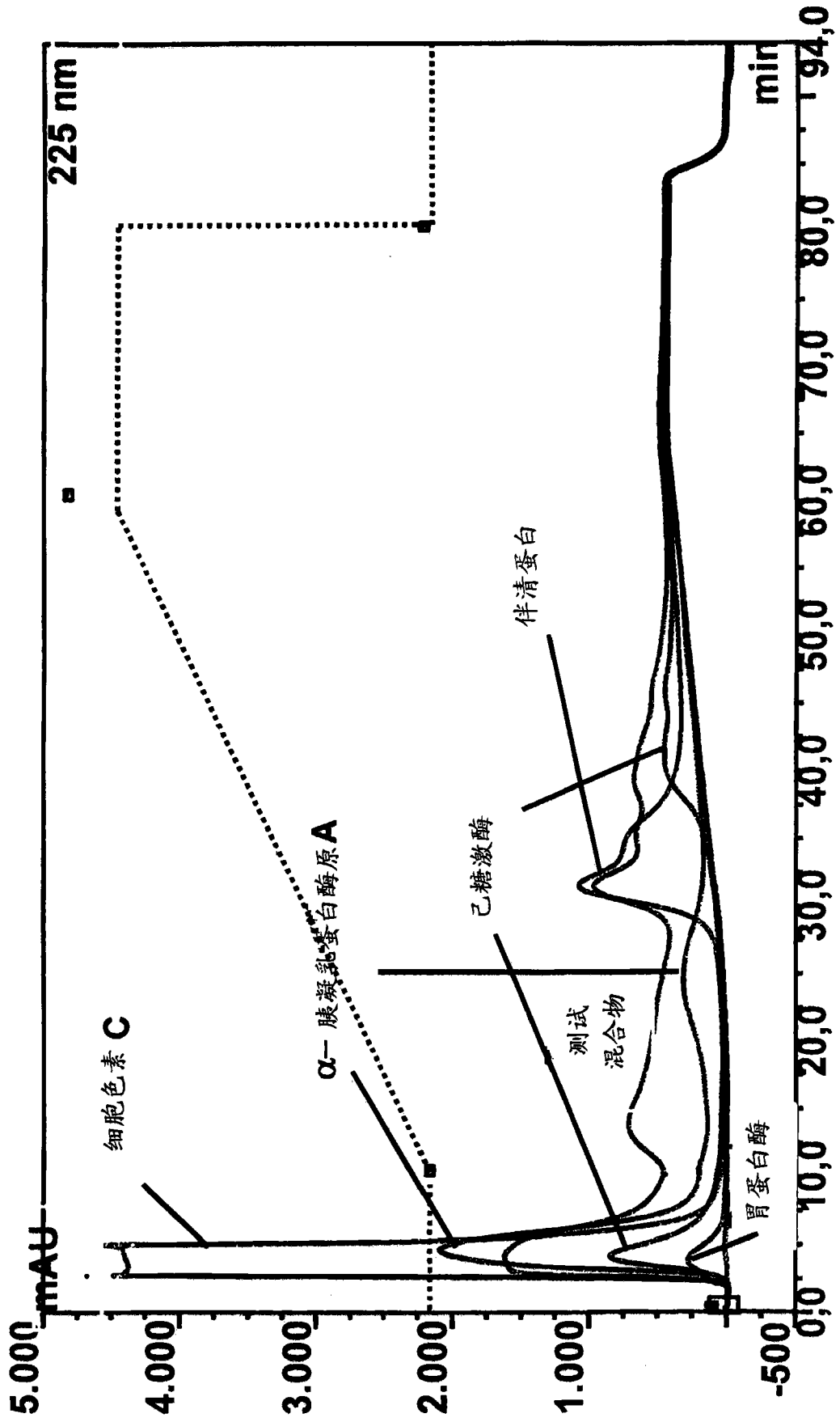


图 18

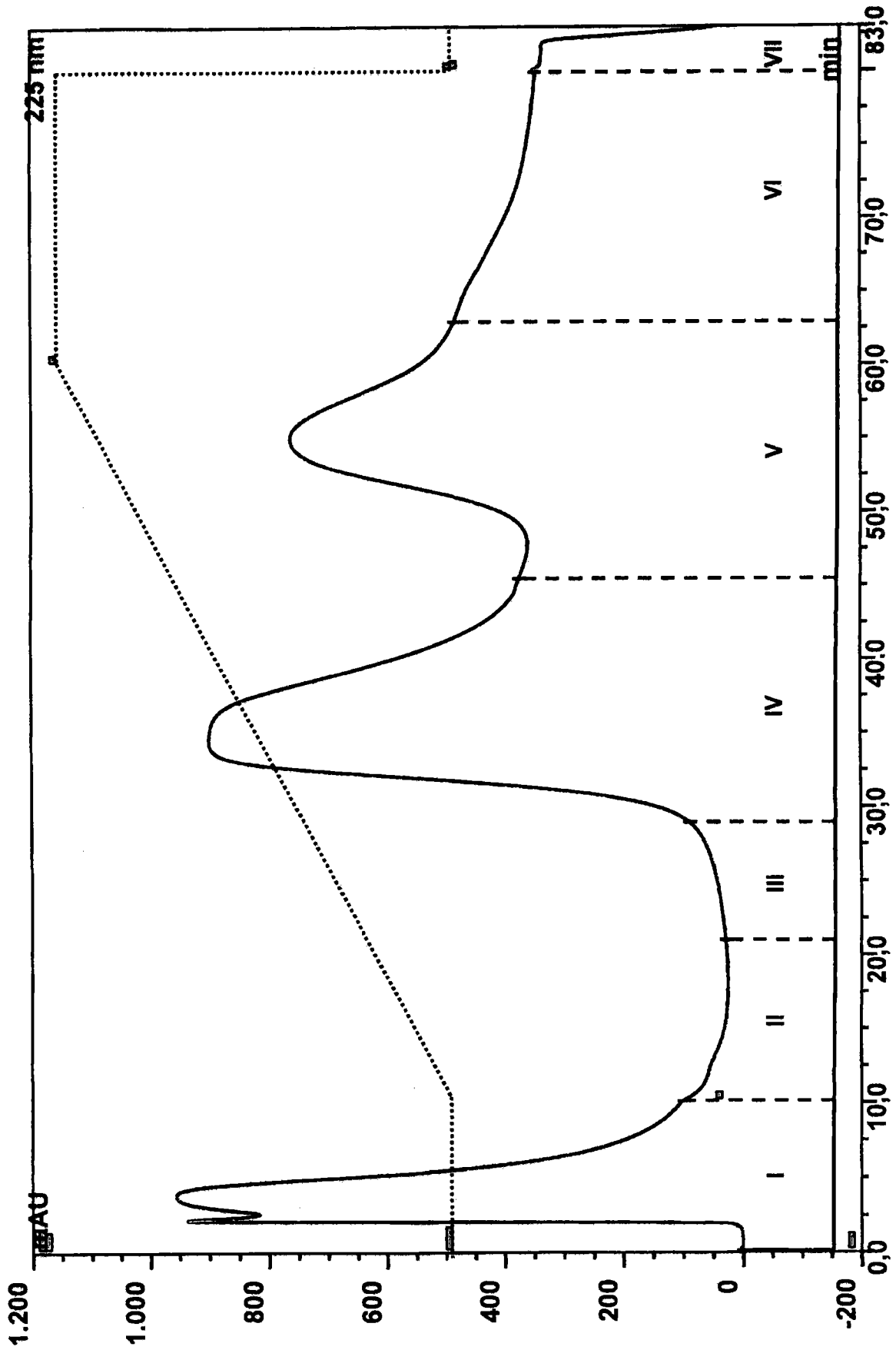


图 19

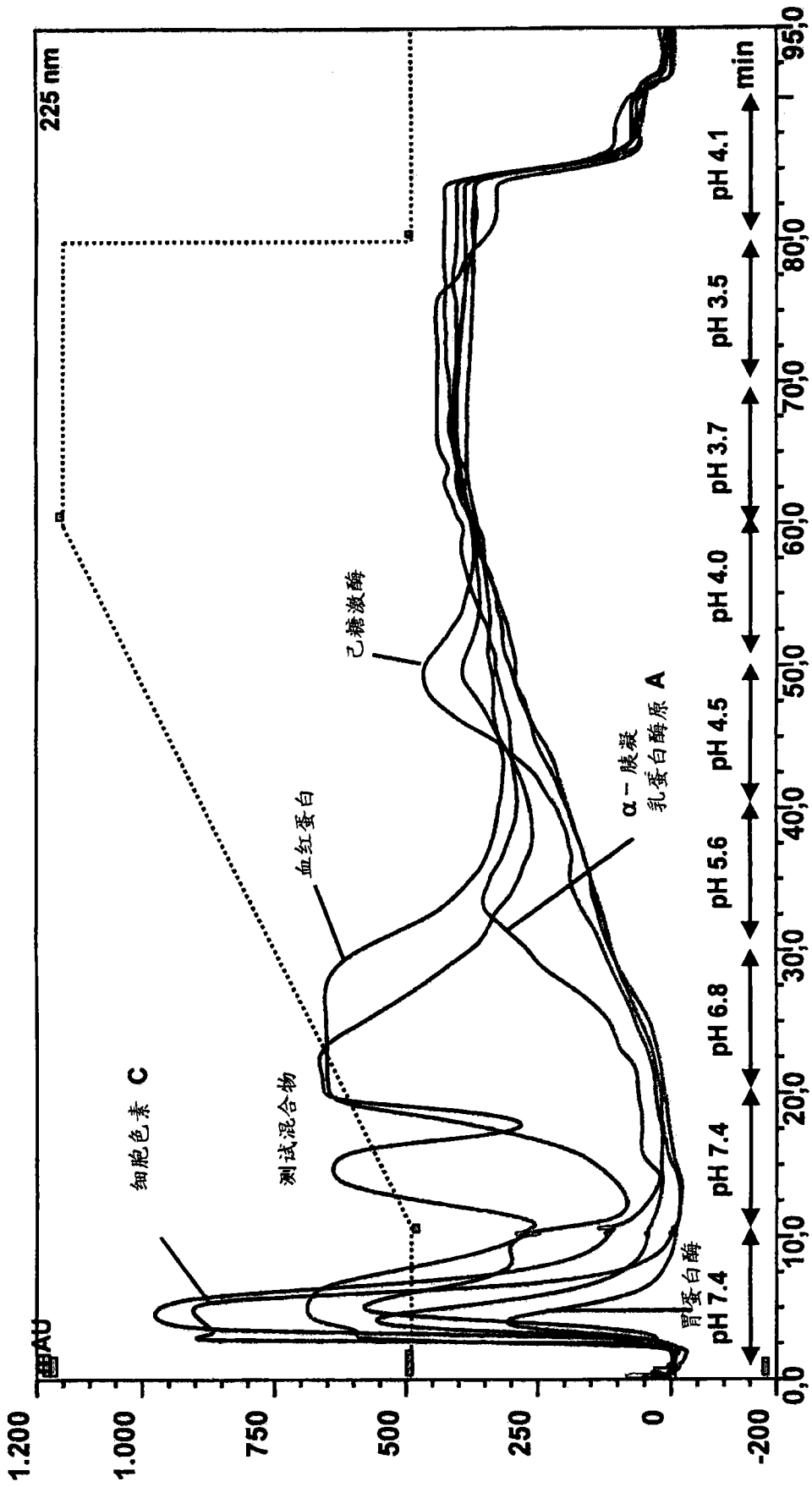


图 21

