

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 7 月 4 日 (04.07.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/127686 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 5/087 (2006.01) *B01D 15/08* (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01) *C07K 1/22* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/072780
- (22) 国际申请日: 2018 年 1 月 16 日 (16.01.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201711419375.1 2017 年 12 月 25 日 (25.12.2017) CN
- (71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 姚善泾(YAO, Shanjing); 中国浙江省杭
州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。

林东强(LIN, Dongqiang); 中国浙江省杭州市
西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。 张
其磊(ZHANG, Qilei); 中国浙江省杭州市西湖
区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。 邹徐
俊(ZOU, Xujun); 中国浙江省杭州市西湖区
浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。 卢慧丽
(LU, Huili); 中国浙江省杭州市西湖区浙大
路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。

(74) 代理人: 杭州天勤知识产权代理有
限公司(HANGZHOU TIANQIN INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国浙江省
杭州市西湖区竞舟路 1 号筑品金座 501
室, Zhejiang 310013 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: COMBINED LIGAND, AS WELL AS COMBINED BIOMIMETIC CHROMATOGRAPHY MEDIUM, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 组合型配基、组合型仿生层析介质及其制备方法和应用

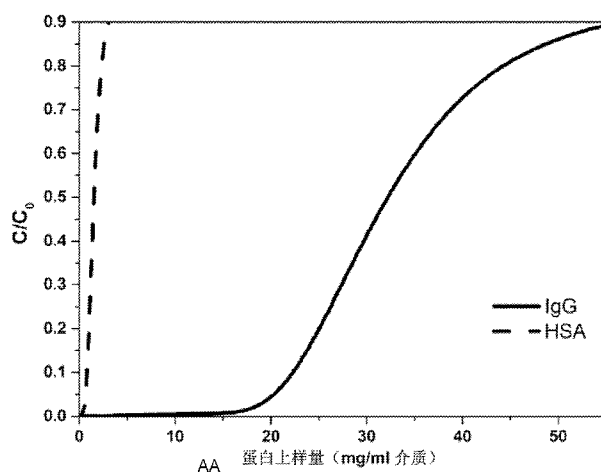


图 3

AA Protein loading amount (mg/ml medium)

(57) Abstract: The present invention relates to a combined ligand, as well as a combined biomimetic chromatography medium, a preparation method therefor, and application thereof. Regarding the combined biomimetic chromatography medium, a hydrophilic porous microsphere is taken as a chromatography medium, activation is performed using allyl bromide, bromination alcoholization is performed using N-bromosuccinimide, and then coupling is performed with the combined ligand. A sequence of the combined ligand is phenylalanine-tyrosine-glutamine-5-aminobenzimidazole. The combined biomimetic chromatography medium has two functional groups, i.e., phenylalanine-tyrosine-glutamine tripeptide and aminobenzimidazole, at the same time. In the retention of the high selectivity of a polypeptide ligand to an antibody, the introduction of a hydrophobic charge induction ligand makes an elution condition milder and enables efficient antibody isolation.

(57) 摘要: 本发明涉及一种组合型配基、组合型仿生层析介质及其制备方法和应用, 其中组合型仿生层析介质以亲水性多孔微球为层析基质, 采用烯丙基溴活化, N-溴代丁二酰亚胺溴代醇化, 然后偶联组合型配基。组合型配基的序列为苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑。该组合型仿生层析介质同时具有苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺三肽和氨基苯并咪唑两种功能基团, 在保留多肽配基对抗体选择性高的特点上, 引入疏水电荷诱导配基, 使得洗脱条件更加温和, 能实现有效地抗体分离。

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

组合型配基、组合型仿生层析介质及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及仿生层析领域，具体涉及一种组合型配基、组合型仿生层析介质及其制备方法和应用。

背景技术

抗体的靶向性强、生物相容性高，具有开发成治疗癌症等药物的极大潜力。随着抗体工程地不断发展，上游抗体表达和制备规模不断提高，开发高效的下游分离纯化技术是抗体产业发展的关键。

目前蛋白 A 亲和层析是最为常用的抗体捕获方法，具有很高的选择性，但是介质价格昂贵，洗脱条件苛刻，且存在配基脱落的风险。因此，开发替代技术成为当前的热点，短肽仿生层析和疏水电荷诱导层析（Hydrophobic charge induction chromatography, HCIC）是其中重要的两种。

短肽仿生层析是以短肽化合物作为配基的一种新型仿生亲和层析方法，短肽配基基于目标蛋白而设计，具有较高的选择性、稳定性和生物相容性好。美国专利(US 7408030 B2)公开了六肽配基 HWRGWV，用于血清、腹水、细胞培养液和牛奶等料液中分离抗体。但是，配基中带有电荷的精氨酸会对血清白蛋白产生吸附，降低配基的选择性，只有在较高盐浓度或者添加辛酸钠时才能得到纯度较高的 IgG（J. Chromatogr. A, 1218:1691-1700, 2011）。随着计算机分子模拟技术的引入，加速了多肽配基的筛选和优化设计。基于蛋白 A 亲和模型，中国发明专利(CN 103014880 A)公开了八肽配基 FYWHCLDE，体现出良好的 IgG 分离性能。不过，相关机理研究发现 IgG 结合主要依靠静电

相互作用，需要通过添加 NaCl 进行洗脱 (J. Chromatogr. A, 1359:100-111, 2014)。基于蛋白 A 的 Fc 片段结合位点的分子模拟，中国发明专利(CN 104645949 A)公开了四肽配基 YFRH，具有较高的 IgG 吸附容量和耐盐特性，洗脱条件温和。但是，该配基中也存在带电的精氨酸，在 pH 大于 4 的条件下对血清白蛋白的吸附量也较大，影响了介质对 IgG 的选择性 (Biochem. Eng. J., 114:191-201, 2016)。因此，多肽配基还需要进一步优化设计，既保持良好的 IgG 结合选择性，又需要具有温和的洗脱条件。

HCIC 由 Burton 和 Harding 提出 (J. Chromatogr. A, 71:81, 1998)，配基兼具疏水和离子化基团，中性 pH 条件下通过疏水作用结合蛋白，调节溶液 pH 使得蛋白和配基间产生静电排斥作用，从而实现洗脱。美国专利 (US 5652348 B2, US 7144743 B2) 描述了 HCIC 介质的制备方法，指出在低盐和高盐条件下均能实现蛋白的有效结合。已报道的 HCIC 配基包括吡啶化合物 (CN 101036877 A)、咪唑化合物 (CN 101185882 A)、咪唑和苯组成的化合物 (CN 101185881 A) 等，具有较强的耐盐吸附特性，洗脱条件也较温和。中国发明专利 (CN 104096544 A) 报道了一种用于抗体分离的 HCIC 介质，以氨基苯并咪唑为功能配基，具有较高的抗体结合能力和非盐依赖吸附性能。但是，HCIC 配基也存在一些缺陷，配基结构较单一，对抗体的选择性不高，对于不同来源的抗体，需要大量的过程优化，从复杂料液中分离得到高纯度的抗体较为困难。

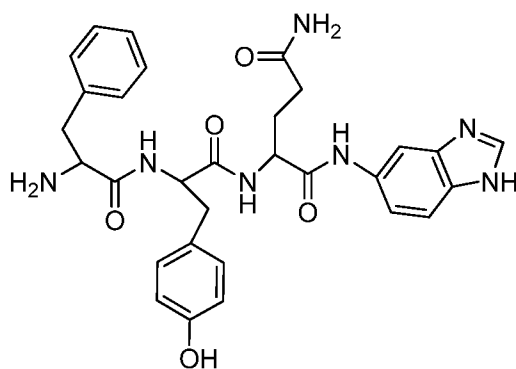
综上所述，短肽仿生层析和 HCIC 各有优缺点。中国发明专利 (CN 104117345 A) 提出了色氨酸和氨基苯并咪唑组成的双功能基团介质，在保留氨基苯并咪唑的 HCIC 特点的同时，引入色氨酸后，在一定程度上提高了对抗体的选择性，不过效果比较有限，血清白蛋白仍会部分吸附 (J. Chromatogr. A, 258:264, 2016)。

发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供一种组合型配基，同时具有苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺三肽和氨基苯并咪唑两种功能基团，在保留多肽配基对抗体选择性高的特点上，引入疏水电荷诱导配基，使得洗脱条件更加温和，能实现有效地抗体分离。

本发明所提供的技术方案为：

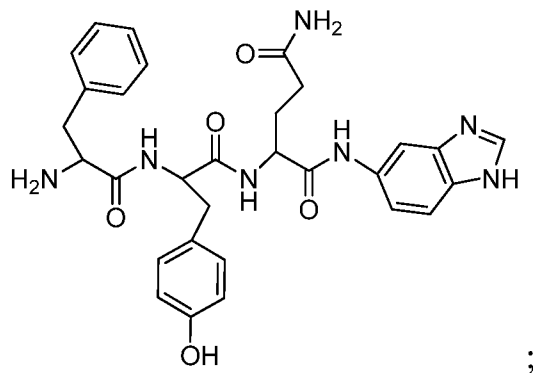
一种组合型配基，结构式如下：



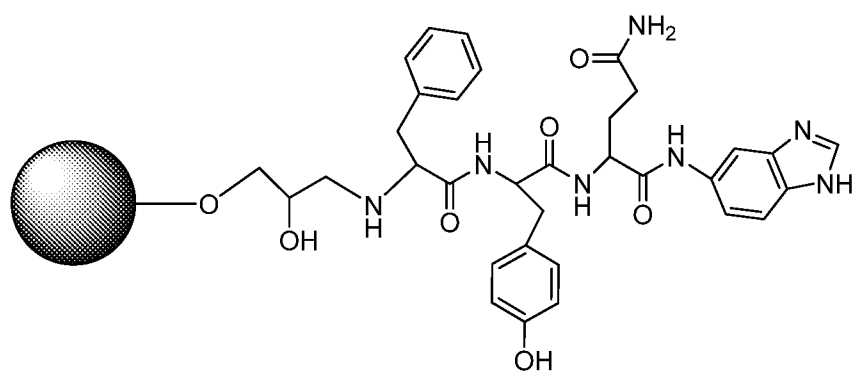
本发明中的组合型配基包括三肽和一个杂环小分子，借助计算机分子模拟的手段，对蛋白 A 和抗体 Fc 结合位点的关键残基进行分析评估，筛选和设计三肽-杂环小分子的组合型配基，可以采用现有技术中的化学合成方法合成三肽-杂环小分子，序列为苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑。

本发明还提供一种组合型仿生层析介质，包括层析基质和组合型配基，所述层析基质为带有羟基的亲水性多孔微球；所述组合型配基的序列为苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑；

所述组合型配基的结构式如下：

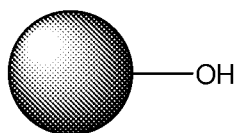


所述组合型仿生层析介质的结构式如下：



本发明中组合型仿生层析介质的结构式中仅给出一个组合型配基基团，仅仅是示例性说明，层析基质的表面和内部孔道表面具有大量的组合型配基基团。

本发明中层析基质为具有多孔结构和表面羟基的亲水性微球，结构式如下：



，结构式仅给出一个-OH，仅仅是示例性说明，其表面具有大量的-OH。

本发明通过将组合型配基偶联到层析基质上得到组合型仿生层析介质，其中组合型配基同时具有苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺三肽和氨基苯并咪唑两种功能基团，一方面通过分子模拟来模仿蛋白 A 配基与抗体 Fc 片段特异性结合的关键残基，优化设计苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺三肽，使配基具有较高的

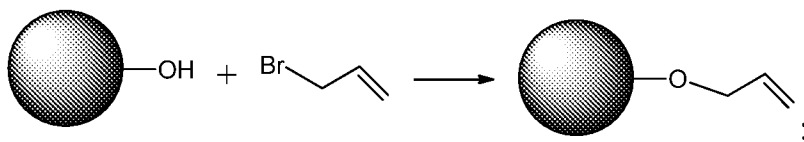
抗体选择性；另一方面引入疏水性电荷诱导配基-5-氨基苯并咪唑，强化疏水作用，且通过调节溶液 pH，利用静电排斥作用协助蛋白解离，降低洗脱难度，改善洗脱条件。

作为优选，所述层析基质为琼脂糖凝胶或纤维素微球。

本发明还提供一种如上述的组合型仿生层析介质的制备方法，包括如下步骤：

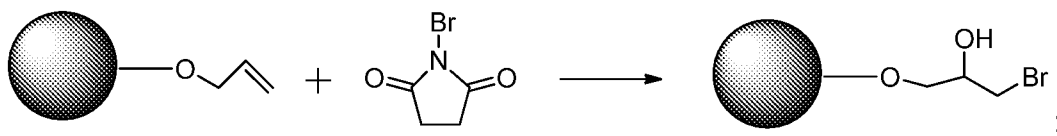
1) 层析基质采用烯丙基溴进行活化反应，得到活化层析基质；

步骤 1) 中反应过程如下：



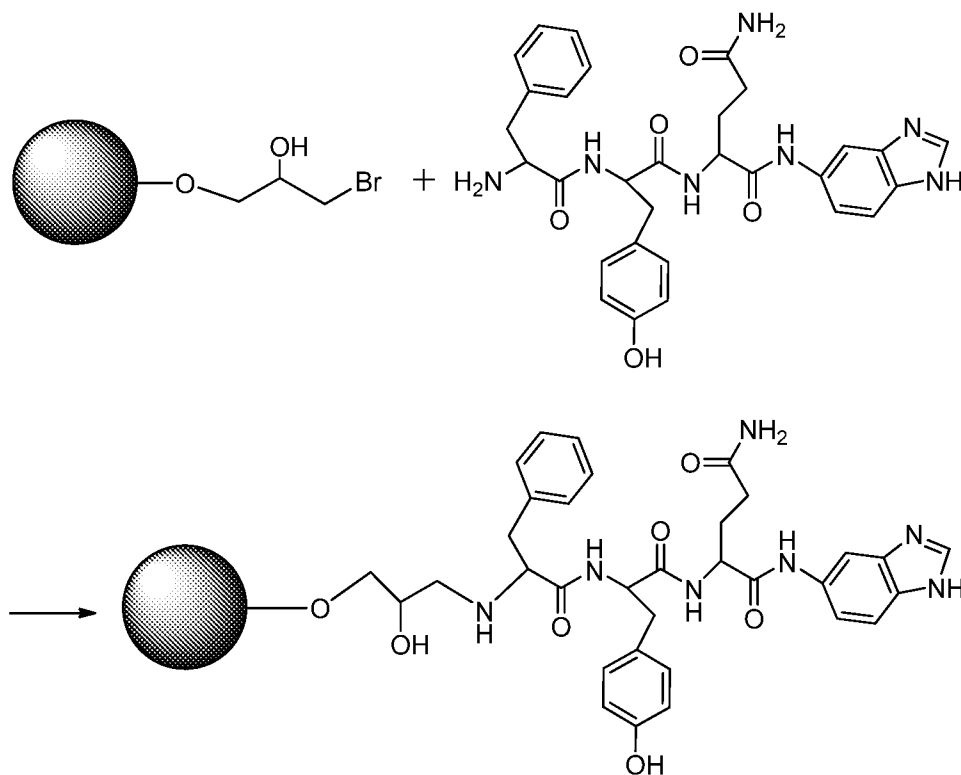
2) 活化层析基质采用 N-溴代丁二酰亚胺进行溴代醇化反应，得到溴代醇化的基质；

步骤 2) 中反应过程如下：



3) 将溴代醇化的基质与组合型配基进行偶联反应，得到组合型仿生层析介质；

步骤 3) 中反应过程如下：



作为优选，所述步骤1)中活化反应包括：将层析基质、二甲基亚砜溶液、烯丙基溴和氢氧化钠混合，在摇床中水浴反应，抽滤，洗涤得到活化层析基质。

进一步优选，所述步骤1)中活化反应包括：层析基质抽干后，加入0.5-1.5倍层析基质质量的18-22% (v/v) 二甲基亚砜溶液、0.1-1.0倍层析基质质量的烯丙基溴和0.1-0.5倍层析基质质量的氢氧化钠，28-32℃水浴，140-160rpm 转速摇床中反应24-48小时，抽滤，用去离子水洗涤，得到活化层析基质。

作为优选，所述步骤2)中溴代醇化反应包括：将活化层析基质、丙酮和N-溴代丁二酰亚胺混合，在摇床中水浴反应，抽滤，洗涤，得到溴代醇化的基质。

进一步优选，所述步骤2)中溴代醇化反应包括：取活化层析基质，加入1.0-3.0倍基质质量的45-55% (v/v) 丙酮和0.1-0.3倍基质质量的N-溴代丁二酰亚胺，28-32℃水浴，140-160rpm 转速摇床中反应1-3小时，抽滤，用去离

子水洗涤，得到溴代醇化的基质。

作为优选，所述步骤3)中偶联反应包括：将溴代醇化的基质与组合型配基溶解于二甲亚砜中，再加入碳酸钠缓冲液混合后，在摇床中水浴反应，抽滤，洗涤，得到组合型仿生层析介质；所述溴代醇化的基质与组合型配基的质量比为1:0.1-0.3。

进一步优选，所述步骤3)中偶联反应包括：取溴代醇化的基质于反应器中，称取0.1-0.3倍基质质量的苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑组合型配基，溶解于0.5-1.0倍基质质量的二甲亚砜中，再与1.0-3.0倍0.8-1.2M的碳酸钠缓冲液混合后加入反应器，28-32℃水浴，140-160rpm转速摇床中反应8-12h，抽滤，用离子水、0.08-0.12M HCl、0.08-0.12M NaOH反复抽滤冲洗，得到组合型仿生层析介质。

作为优选，所述步骤3)中组合型仿生层析介质继续采用乙醇胺水溶液进行封闭反应。

作为优选，所述封闭反应包括：将组合型仿生层析介质加入到乙醇胺水溶液中，控制pH8.0，在摇床中水浴反应。

进一步优选，所述封闭反应包括：将组合型仿生层析介质加入到含有1.0-5.0倍介质质量的0.8-1.2 M 乙醇胺水溶液(pH 8.0)中，20-30℃水浴，140-160rpm摇床中反应4-8小时，去离子水洗涤，并保存在18-22% (v/v) 乙醇溶液中。

本发明还提供一种如上述的组合型仿生层析介质在分离抗体中的应用。

同现有技术相比，本发明的有益效果体现在：

(1) 本发明中组合型配基的密度可控，通过调节溴代醇化的基质与组合型配基的质量比，可制备不同配基密度介质，最高可达到70μmol/g介质以上。

(2) 本发明的组合型仿生层析介质的抗体亲和力高，吸附容量大，静态

吸附容量达到 80mg/g 介质以上，动态载量达到 20mg/ml 介质以上。

(3) 本发明的组合型仿生层析介质的抗体选择性强，血清白蛋白的吸附量极低。

(4) 本发明的组合型仿生层析介质洗脱条件温和，调节溶液 pH 至 4.0-5.0，借助配基-蛋白间的静电排斥力，就可实现蛋白的高效洗脱，避免过酸对抗体结构和活性产生不良影响。

(5) 本发明的组合型仿生层析介质的性能稳定，清洗再生方便，可以重复使用 100 次以上。

附图说明

图 1 为实施例 1 中组合型配基的高效液相色谱图；

图 2 为实施例 1 中组合型配基的质谱图；

图 3 为应用例 1 中人 IgG 和人血清白蛋白 (HSA) 的穿透曲线比较图；

图 4 为应用例 2 中混和蛋白分离原料和洗脱组分的高效液相色谱图；

图 5 为应用例 3 中混和蛋白分离原料和洗脱组分的高效液相色谱图；

图 6 为应用例 4 中使用不同循环次数后的动态载量变化图。

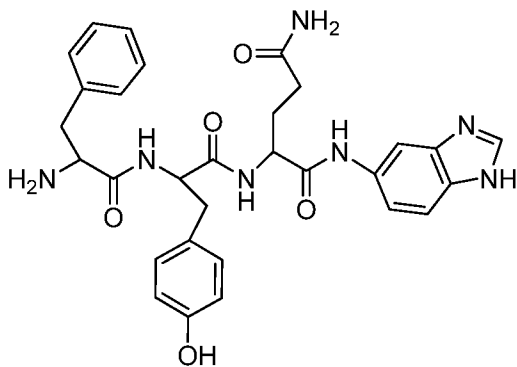
具体实施方式

下面结合具体的实施例对本发明作进一步说明。

实施例 1：组合型配基的制备

借助计算机分子模拟的手段，对蛋白 A 和抗体 Fc 结合位点的关键残基进行分析评估，筛选和设计三肽-杂环小分子的组合型配基，其序列为苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑。

组合型配基，结构式如下：



组合型配基可以采用现有技术中的化学合成方法合成，本实施例中的组合型配基委托中肽生化有限公司制备。

针对实施例 1 中的组合型配基进行高效液相色谱和质谱表征，分别如图 1 和 2 所示。

实施例 2：组合型仿生层析介质的制备

取抽干琼脂糖凝胶 3.0g，加入 3.0g 20% (v/v) 二甲基亚砜、1.5g 烯丙基溴和 0.6g 氢氧化钠，30℃下 150rpm 摇床活化 24 小时，抽滤，用去离子水洗涤得到活化的层析基质。

将活化的层析基质、6.0g 50% (v/v) 丙酮和 0.9g N-溴代丁二酰亚胺混合进行溴代醇化，30℃下 150rpm 摇床反应 3h，抽滤，用去离子水洗涤，得到溴代醇化的基质。

1.5g 二甲基亚砜和 3.0g 1M 碳酸钠缓冲液混合，加入 0.3g 苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑配基，充分溶解，再加入溴代醇化的层析基质，30℃下 150rpm 摇床反应 12 小时，用去离子水、0.1M HCl、0.1M NaOH 反复抽滤冲洗，得到配基偶联的介质。

最后将介质加入到 9.0g 1.0 M 乙醇胺水溶液 (pH 8.0) 中，25℃下 150rpm 摇床中反应 4 小时，去离子水洗涤，得到组合型仿生层析介质。

采用高效液相色谱分析反应后母液中的剩余配基含量 0.228g，说明有

0.072g 配基偶联到介质上。

通过物料平衡计算得到介质配基密度为 42 μ mol/g 介质，人免疫球蛋白的饱和吸附容量为 85mg/ml 介质。

实施例 3：组合型仿生层析介质的制备

取抽干琼脂糖凝胶 3.0g，加入 1.5g 20% (v/v) 二甲基亚砜、0.3g 烯丙基溴和 0.3g 氢氧化钠，30℃下 150rpm 摇床活化 24 小时，抽滤，用去离子水洗涤得到活化的层析基质。

将活化的层析基质、3.0g 50% (v/v) 丙酮和 0.3g N-溴代丁二酰亚胺混合进行溴代醇化，30℃下 150rpm 摇床反应 1h，抽滤，用去离子水洗涤，得到溴代醇化的基质。

1.5g 二甲基亚砜和 3.0g 1M 碳酸钠缓冲液混合，加入 0.3g 苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑配基，充分溶解，再加入溴代醇化的层析基质，30℃下 150rpm 摇床反应 8 小时，用去离子水、0.1M HCl、0.1M NaOH 反复抽滤冲洗，得到配基偶联的介质。

最后将介质加入到 3.0g 1.0 M 乙醇胺水溶液 (pH 8.0) 中，25℃下 150rpm 摇床中反应 4 小时，去离子水洗涤，得到组合型仿生层析介质。

采用高效液相色谱分析反应后母液中的剩余配基含量 0.259g，说明有 0.041g 配基偶联到介质上。

通过物料平衡计算得到介质配基密度为 24 μ mol/g 介质，人免疫球蛋白的饱和吸附容量为 65mg/ml 介质。

实施例 4：组合型仿生层析介质的制备

取抽干琼脂糖凝胶 3.0g，加入 4.5g 20% (v/v) 二甲基亚砜、3.0g 烯丙基

溴和 1.5g 氢氧化钠, 30℃下 150rpm 摇床活化 48 小时, 抽滤, 用去离子水洗涤得到活化的层析基质。

将活化的层析基质、9.0g 50% (v/v) 丙酮和 0.9g N-溴代丁二酰亚胺混合进行溴代醇化, 30℃下 150rpm 摇床反应 3h, 抽滤, 用去离子水洗涤, 得到溴代醇化的基质。

3.0g 二甲基亚砷和 6.0g 1M 碳酸钠缓冲液混合, 加入 0.9g 苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑配基, 充分溶解, 再加入溴代醇化的层析基质, 30℃下 150rpm 摇床反应 12 小时, 用去离子水、0.1M HCl、0.1M NaOH 反复抽滤冲洗, 得到配基偶联的介质。

最后将介质加入到 15.0g 1.0 M 乙醇胺水溶液 (pH 8.0) 中, 25℃下 150rpm 摇床中反应 8 小时, 去离子水洗涤, 得到组合型仿生层析介质。

采用高效液相色谱分析反应后母液中的剩余配基含量 0.775g, 说明有 0.125g 配基偶联到介质上。

通过物料平衡计算得到介质配基密度为 73 μ mol/g 介质, 人免疫球蛋白的饱和吸附容量为 92mg/ml 介质。

实施例 5: 组合型仿生层析介质的制备

取抽干琼脂糖凝胶 3.0g, 加入 3.0g 20% (v/v) 二甲基亚砷、1.5g 烯丙基溴和 0.9g 氢氧化钠, 30℃下 150rpm 摇床活化 36 小时, 抽滤, 用去离子水洗涤得到活化的层析基质。

将活化的层析基质、6.0g 50% (v/v) 丙酮和 0.6g N-溴代丁二酰亚胺混合进行溴代醇化, 30℃下 150rpm 摇床反应 2h, 抽滤, 用去离子水洗涤, 得到溴代醇化的基质。

2.0g 二甲基亚砷和 6.0g 1M 碳酸钠缓冲液混合, 加入 0.9g 苯丙氨酸-酪氨酸

酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑配基，充分溶解，再加入溴代醇化的层析基质，30℃下 150rpm 摇床反应 10 小时，用去离子水、0.1M HCl、0.1M NaOH 反复抽滤冲洗，得到配基偶联的介质。

最后将介质加入到 9.0g 1.0 M 乙醇胺水溶液 (pH 8.0) 中，25℃下 150rpm 摇床中反应 6 小时，去离子水洗涤，得到组合型仿生层析介质。

采用高效液相色谱分析反应后母液中的剩余配基含量 0.816g，说明有 0.084g 配基偶联到介质上。

通过物料平衡计算得到介质配基密度为 49 μ mol/g 介质，人免疫球蛋白的饱和吸附容量为 88mg/ml 介质。

实施例 6：组合型仿生层析介质的制备

取抽干琼脂糖凝胶 3.0g，加入 1.5g 20% (v/v) 二甲基亚砜、0.3g 烯丙基溴和 1.5g 氢氧化钠，30℃下 150rpm 摇床活化 24 小时，抽滤，用去离子水洗涤得到活化的层析基质。

将活化的层析基质、9.0g 50% (v/v) 丙酮和 0.9g N-溴代丁二酰亚胺混合进行溴代醇化，30℃下 150rpm 摇床反应 1h，抽滤，用去离子水洗涤，得到溴代醇化的基质。

1.5g 二甲基亚砜和 9.0g 1M 碳酸钠缓冲液混合，加入 0.3g 苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑配基，充分溶解，再加入溴代醇化的层析基质，30℃下 150rpm 摇床反应 12 小时，用去离子水、0.1M HCl、0.1M NaOH 反复抽滤冲洗，得到配基偶联的介质。

最后将介质加入到 9.0g 1.0 M 乙醇胺水溶液 (pH 8.0) 中，25℃下 150rpm 摇床中反应 4 小时，去离子水洗涤，得到组合型仿生层析介质。

采用高效液相色谱分析反应后母液中的剩余配基含量 0.254g，说明有

0.046g 配基偶联到介质上。

通过物料平衡计算得到介质配基密度为 $27\mu\text{mol/g}$ 介质，人免疫球蛋白的饱和吸附容量为 70mg/ml 介质。

实施例 7：组合型仿生层析介质的制备

取纤维素微球 3.0g，加入 3.0g 20% (v/v) 二甲基亚砜、1.5g 烯丙基溴和 0.6g 氢氧化钠， 30°C 下 150rpm 摇床活化 24 小时，抽滤，用去离子水洗涤得到活化的层析基质。

将活化的层析基质、6.0g 50% (v/v) 丙酮和 0.9g N-溴代丁二酰亚胺混合进行溴代醇化， 30°C 下 150rpm 摇床反应 3h，抽滤，用去离子水洗涤，得到溴代醇化的基质。

1.5g 二甲基亚砜和 3.0g 1M 碳酸钠缓冲液混合，加入 0.3g 苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑配基，充分溶解，再加入溴代醇化的层析基质， 30°C 下 150rpm 摇床反应 12 小时，用去离子水、0.1M HCl、0.1M NaOH 反复抽滤冲洗，得到配基偶联的介质。

最后将介质加入到 9.0g 1.0 M 乙醇胺水溶液 (pH 8.0) 中， 25°C 下 150rpm 摇床中反应 4 小时，去离子水洗涤，得到组合型仿生层析介质。

采用高效液相色谱分析反应后母液中的剩余配基含量 0.232g，说明有 0.068g 配基偶联到介质上。

通过物料平衡计算得到介质配基密度为 $40\mu\text{mol/g}$ 介质，人免疫球蛋白的饱和吸附容量为 80mg/ml 介质。

应用例 1

取实施例 2 得到的层析介质，装填 1ml 介质于 Tricorn 5/100 层析柱中，

采用 ÄKTA explorer 100 层析系统测定蛋白穿透曲线。

分别配制 2mg/ml 的人免疫球蛋白 IgG 和人血清白蛋白 (HSA) 溶液作为上样料液, 调节 pH 至 7.0。以 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 作为平衡缓冲液, 充分平衡床层后, 以 0.5ml/min 流速上样至蛋白 90% 穿透, 流出液的蛋白浓度用紫外检测器在 280nm 处检测, 结果见附图 3。依据蛋白 10% 穿透时的上样体积, 计算动态附载量, IgG 的动态载量为 22mg/ml, HSA 的动态载量仅为 0.8mg/ml。以 pH4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液洗脱 IgG, 收率达 90%。

应用例 2

取实施例 2 得到的层析介质, 装填 1ml 介质于 Tricorn 5/100 层析柱中, 采用 ÄKTA explorer 100 层析系统测定混合蛋白的分离能力。

配制含有 1mg/ml 的人免疫球蛋白 IgG 和 4mg/ml 人血清白蛋白 (HSA) 的混合蛋白溶液作为上样料液, 调节 pH 至 7.0。以 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 作为平衡缓冲液, 充分平衡床层后, 以 0.5ml/min 流速上样 5ml 混合蛋白溶液, 上样完成后用 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 冲洗至基线, 然后用 20mM 醋酸盐缓冲液 (pH 4.0) 进行洗脱, 流出液的蛋白浓度用紫外检测器在 280nm 处检测, 收集洗脱组分。对收集到的组分进行 HPLC 分析, 结果见附图 4。通过计算得到, IgG 的纯度为 99.0%, 收率为 91.5%。

应用例 3

取实施例 7 得到的层析介质, 装填 1ml 介质于 Tricorn 5/100 层析柱中, 采用 ÄKTA explorer 100 层析系统测定混合蛋白的分离能力。

配制含有 1mg/ml 的人免疫球蛋白 IgG 和 4mg/ml 人血清白蛋白 (HSA) 的混合蛋白溶液作为上样料液, 调节 pH 至 7.0。以 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH

7.0) 作为平衡缓冲液, 充分平衡床层后, 以 0.5ml/min 流速上样 5ml 混合蛋白溶液, 上样完成后用 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 冲洗至基线, 然后用 20mM 醋酸盐缓冲液 (pH 4.0) 进行洗脱, 流出液的蛋白浓度用紫外检测器在 280nm 处检测, 收集洗脱组分。对收集到的组分进行 HPLC 分析, 结果见附图 5。通过计算得到, IgG 的纯度为 89.1%, 收率为 92.8%。

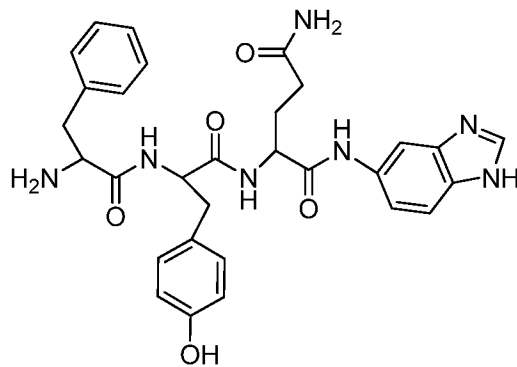
应用例 4

取实施例 2 得到的层析介质, 装填 1ml 介质于 Tricorn 5/100 层析柱中, 采用 ÄKTA explorer 100 层析系统测定蛋白穿透曲线。

配制 2mg/ml 的人免疫球蛋白 IgG 溶液作为上样料液, 调节 pH 至 7.0。以 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 作为平衡缓冲液, 充分平衡床层后, 以 0.5ml/min 流速上样至蛋白 90% 穿透, 流出液的蛋白浓度用紫外检测器在 280nm 处检测, 依据蛋白 10% 穿透时的上样体积, 计算 10% 穿透的动态附载量。介质经上样-冲洗-洗脱-再生循环使用 20 次, 50 次和 100 次后重复上述操作, 测定 IgG 的动态附载量。介质在 1、20、50 和 100 个循环时 IgG 的动态载量分别为 22.68mg/ml 介质、22.31mg/ml 介质、22.21mg/ml 介质和 21.89mg/ml 介质, 经 100 次循环使用后载量仅下降 3.5%, 具体变化曲线见附图 6。

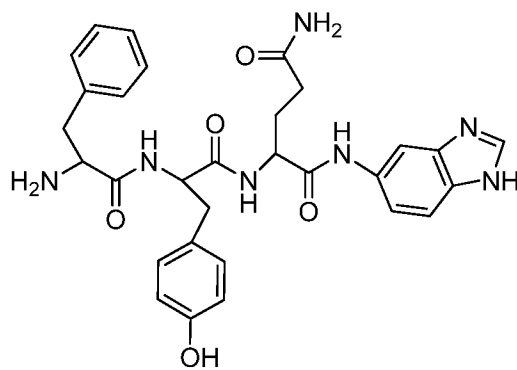
权 利 要 求 书

1、组合型配基，其特征在于，结构式如下：

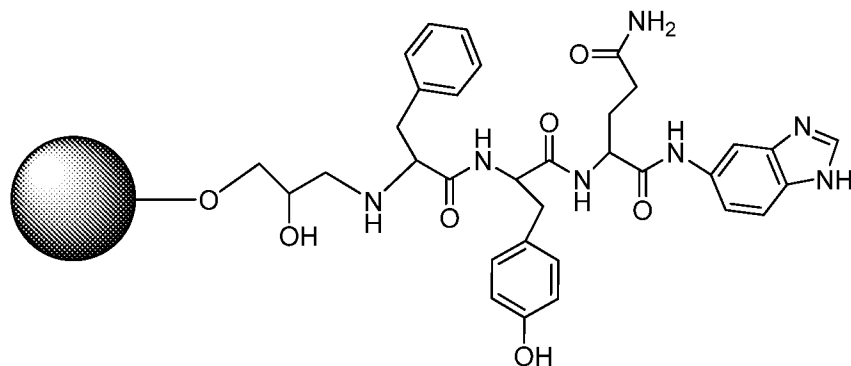


2、组合型仿生层析介质，其特征在于，包括层析基质和组合型配基，所述层析基质为带有羟基的亲水性多孔微球；所述组合型配基的序列为苯丙氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺-5-氨基苯并咪唑；

所述组合型配基的结构式如下：



所述组合型仿生层析介质的结构式如下：



3、根据权利要求2所述的组合型仿生层析介质，其特征在于，所述层析基质为琼脂糖凝胶或纤维素微球。

4、如权利要求2或3所述的组合型仿生层析介质的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

1) 层析基质采用烯丙基溴进行活化反应，得到活化层析基质；

2) 活化层析基质采用 N-溴代丁二酰亚胺进行溴代醇化反应，得到溴代醇化的基质；

3) 将溴代醇化的基质与组合型配基进行偶联反应，得到组合型仿生层析介质。

5、根据权利要求4所述的组合型仿生层析介质的制备方法，其特征在于，所述步骤1)中活化反应包括：将层析基质、二甲基亚砷溶液、烯丙基溴和氢氧化钠混合，在摇床中水浴反应，抽滤，洗涤得到活化层析基质。

6、根据权利要求4所述的组合型仿生层析介质的制备方法，其特征在于，所述步骤2)中溴代醇化反应包括：将活化层析基质、丙酮和 N-溴代丁二酰亚胺混合，在摇床中水浴反应，抽滤，洗涤，得到溴代醇化的基质。

7、根据权利要求4所述的组合型仿生层析介质的制备方法，其特征在于，所述步骤3)中偶联反应包括：将溴代醇化的基质与组合型配基溶解于二甲亚砷中，再加入碳酸钠缓冲液混合后，在摇床中水浴反应，抽滤，洗涤，得到组合型仿生层析介质；所述溴代醇化的基质与组合型配基的质量比为1:0.1-0.3。

8、根据权利要求4所述的组合型仿生层析介质的制备方法，其特征在于，所述步骤3)中组合型仿生层析介质继续采用乙醇胺水溶液进行封闭反应。

9、根据权利要求8所述的组合型仿生层析介质的制备方法，其特征在于，所述封闭反应包括：将组合型仿生层析介质加入到乙醇胺水溶液中，控制

pH8.0, 在摇床中水浴反应。

10、如权利要求 2 或 3 所述的组合型仿生层析介质在分离抗体中的应用。

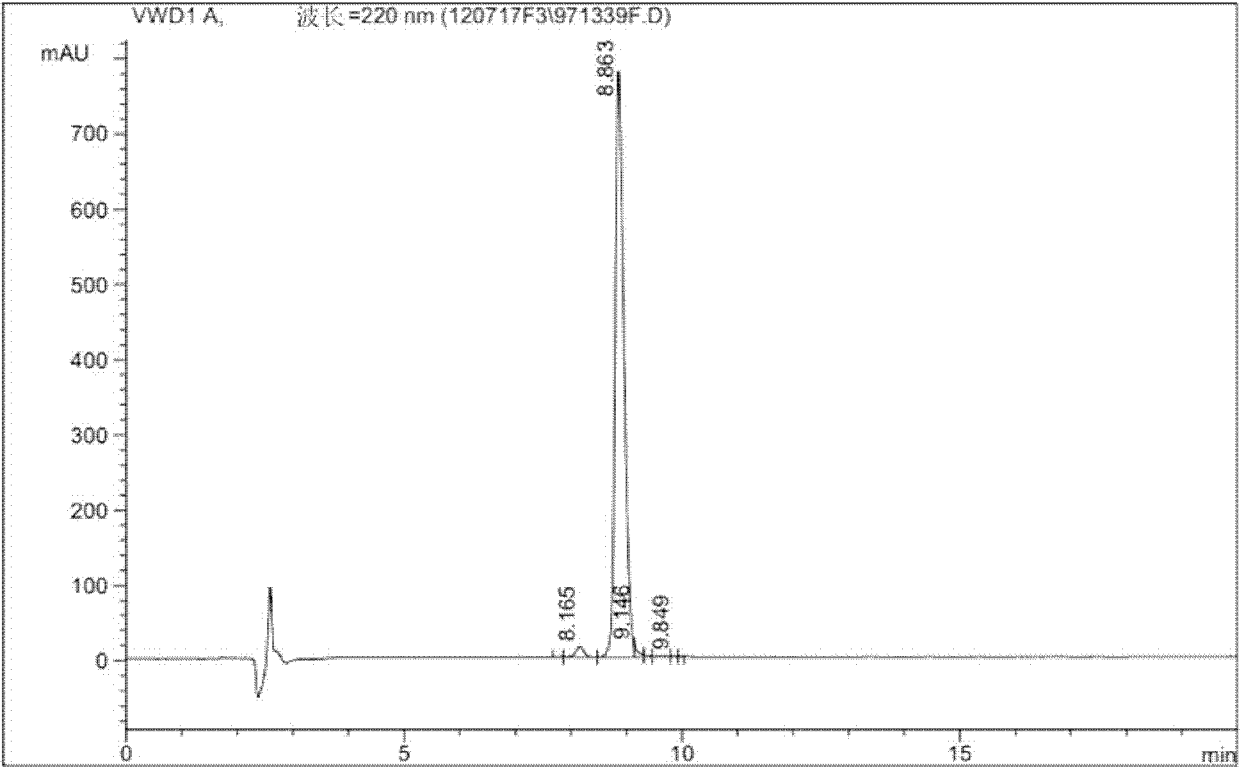


图 1

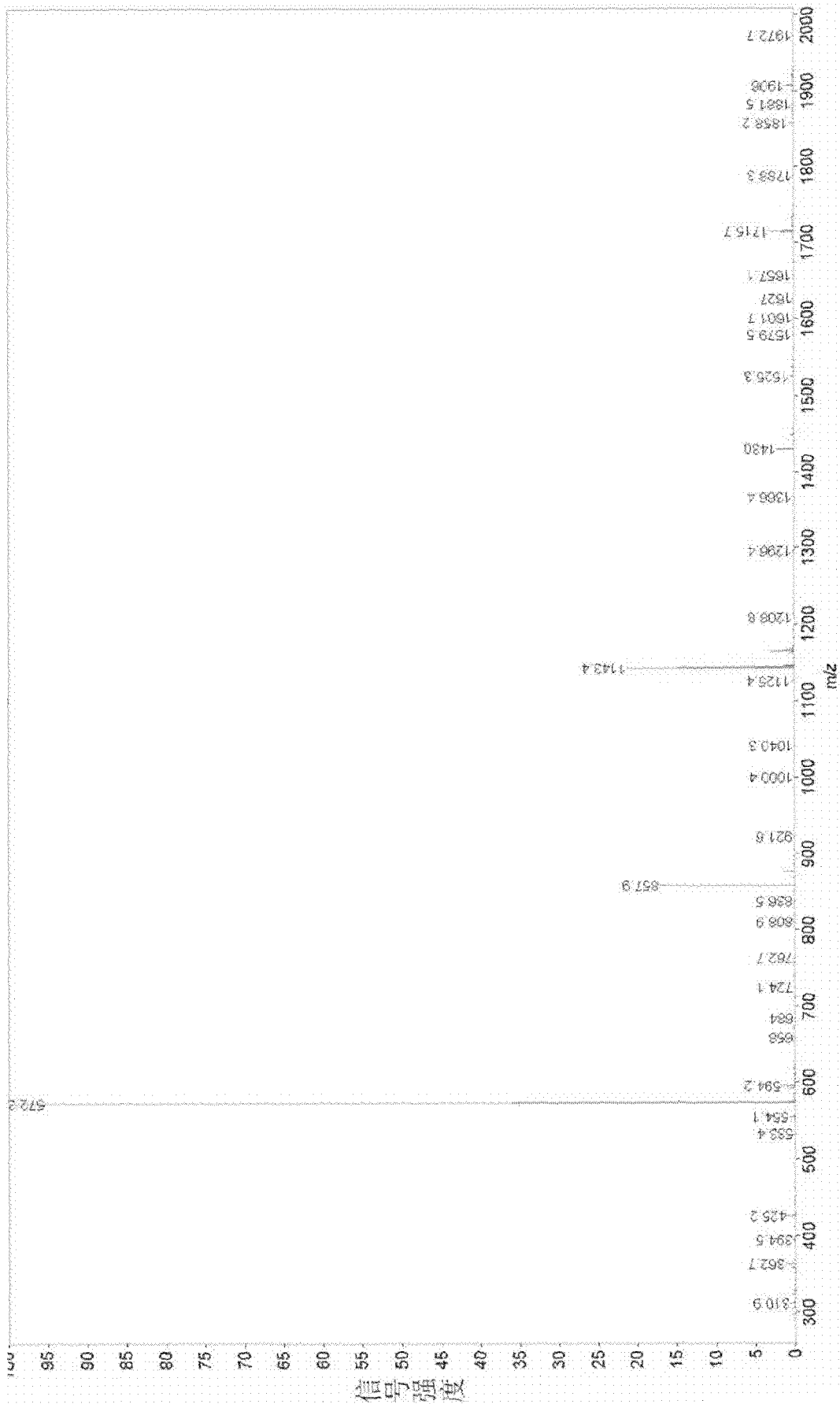


图 2

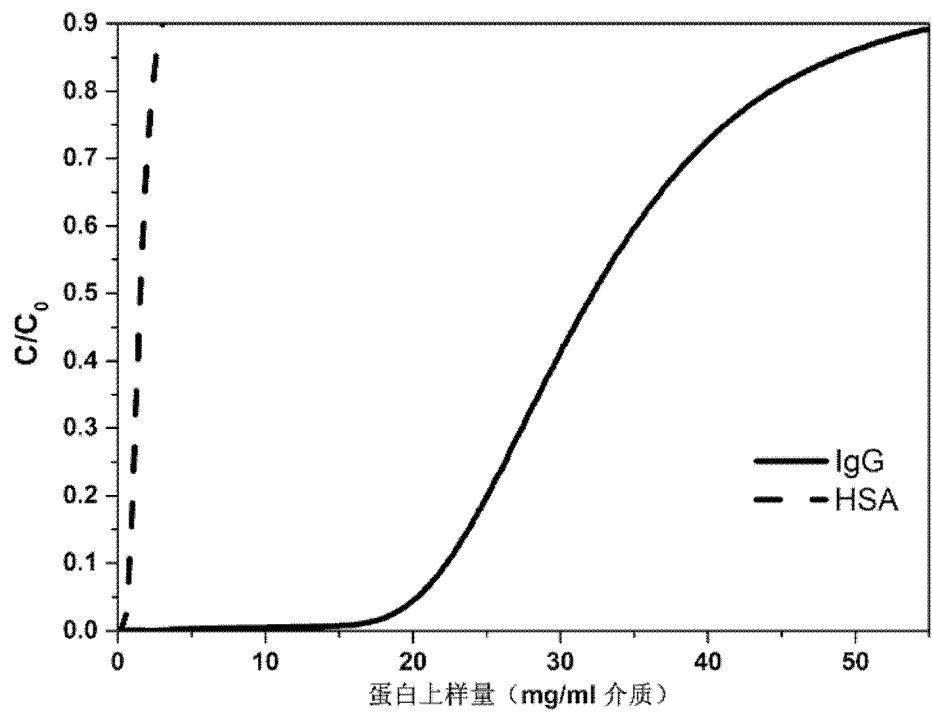


图 3

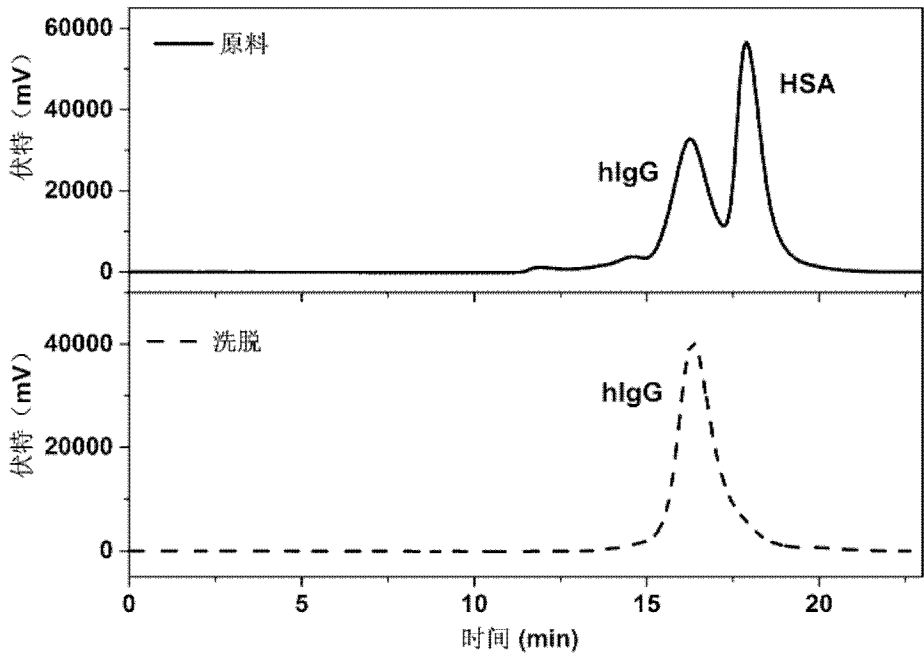


图 4

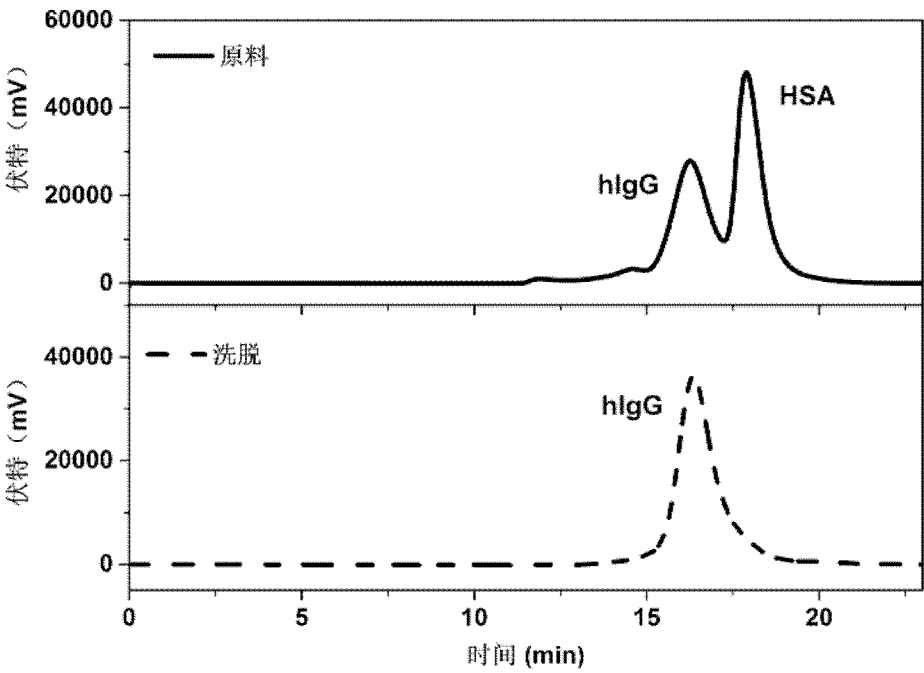


图 5

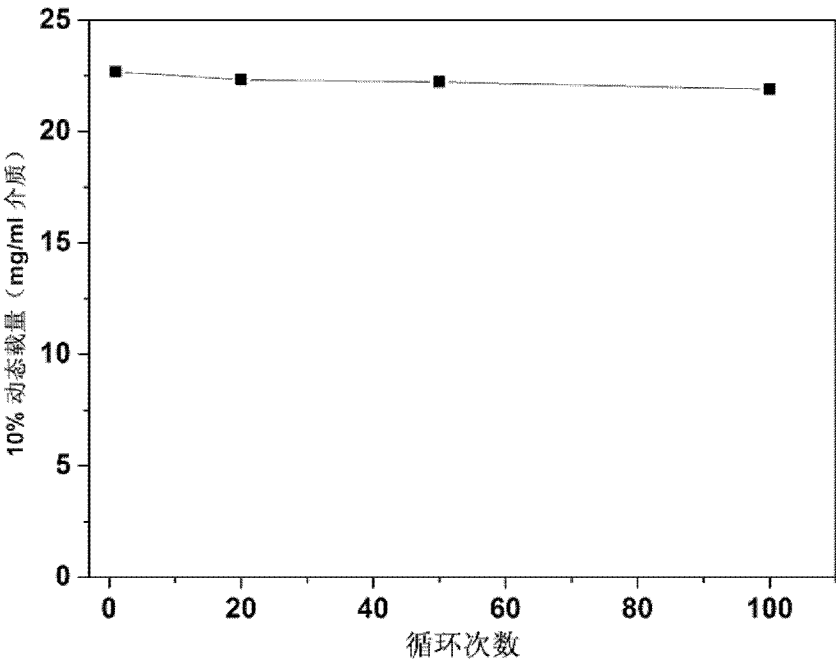


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/072780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 5/087(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; B01D 15/08(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K,B01D

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

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

DWPI, CNABS, CNKI, STN(REG, CAPLUS), 浙江大学, 姚善涇, 配基, 仿生层析, 抗体, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 谷氨酰胺, 苯并咪唑, combination type ligand, phenylalanine, tyrosine, glutamine, benzimidazole, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104096544 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 15 October 2014 (2014-10-15) claims 1-5, and embodiments 1-10	1-10
A	卢慧丽等 (LU, Huili et al.). "亲和仿生层析及在抗体纯化中的应用 (Affinity Biomimetic Chromatography and its Applications for Antibody Purification)" 化工学报 (CIESC Journal), Vol. 67, No. (9), 30 September 2016 (2016-09-30), pp. 3523-3535	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 September 2018

Date of mailing of the international search report

19 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/072780

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	104096544	A	15 October 2014	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/072780

A. 主题的分类

C07K 5/087(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; B01D 15/08(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K, B01D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, CNABS, CNKI, STN(REG, CAPLUS), 浙江大学, 姚善泾, 配基, 仿生层析, 抗体, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 谷氨酰胺, 苯并咪唑, combination type ligand, phenylalanine, tyrosine, glutamine, benzimidazole, antibody

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 104096544 A (浙江大学) 2014年 10月 15日 (2014 - 10 - 15) 权利要求1-5, 实施例1-10	1-10
A	卢慧丽等. "亲和和仿生层析及在抗体纯化中的应用" 化工学报, 第67卷, 第9期, 2016年 9月 30日 (2016 - 09 - 30), 第3523-3535页	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 9月 5日

国际检索报告邮寄日期

2018年 9月 19日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

王颖

传真号 (86-10) 62019451

电话号码 (86-10) 62086304

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/072780

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 104096544 A	2014年 10月 15日	无	