

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95112100

B01D15/00

※申請日期：95.4.6

※IPC 分類：C09B62/06

B01J29/22

一、發明名稱：(中文/英文)

用於生物材料分離之含有蒽醌染料-配位體的吸附劑

Adsorbents comprising anthraquinone dye-ligands for the separation of
biological materials

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

汽巴特用化學品控股公司

CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC.

代表人：(中文/英文)

1. 漢斯-培特.威特林 / WITTLIN, HANS-PETER

2. 沛卓 庫菲爾 / QUERFELD, PETRA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士，4057 巴賽爾城，克律貝街 141 號

Klybeckstrasse 141, 4057 Basel, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 / Switzerland

三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 韋迪拉 舒巴納 伊庫迪 / EKKUNDI, VADIRAJ SUBBANNA

2. 納倫延 S. 普尼克 / PUNEKAR, NARAYAN S.

3. 坎馬雷許 培 芳迪卡 / FONDEKAR, KAMALESH PAI

4. 裴格 盧恩根 / ROENTGEN, GEORG

5. 許帕 S. 寇德 / KORDE, SHILPA S.

6. 亞吉特 B. 辛德 / SHINDE, AJIT B.

7. 馬薩納 摩西 / MOORTHY, MASANA

國 籍：(中文/英文)

1.2.3.5.6.7. 印度 / India

4. 德國 / Germany

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

歐洲專利；2005.04.08；05102776.1

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

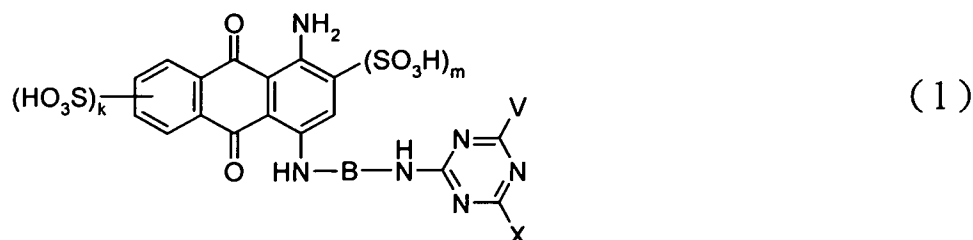
國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

一種用於生物材料分離的方法，其中使用一吸附劑，其包含式(1)化合物與基質的反應產物，該基質具有可與該式(1)化合物中的反應性基團反應而形成共價鍵之基團，

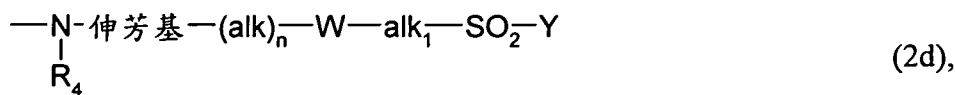


其中

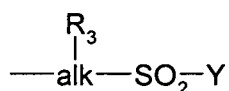
B 係為 C_2-C_{12} 伸烷基且可被 1、2 或 3 個選自由 $-NR_1-$ 或 $-O-$ 所組成群組之基團所中斷，且係未取代或被羥基、磺基、硫酸基、氰基或羧基所取代， R_1 係為氫或 C_1-C_4 烷基，或者 B 係為 C_5-C_9 伸環烷基、 C_1-C_4 -伸烷基- C_5-C_9 -伸環烷基或 C_1-C_4 -伸烷基- C_5-C_9 -伸環烷基- C_1-C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、磺基、鹵素或羧基所取代，或一伸苯基、 C_1-C_4 -伸烷基-伸苯基或 C_1-C_4 -伸烷基-伸苯基- C_1-C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、 C_2-C_4 烷醯胺基、磺基、鹵素或羧基所取代，

V 係為一非纖維反應性(non-fibre-reactive)的取代基或為一如下式的纖維反應性(fibre-reactive)的取代基，





其中 R_2 係為氫，或未取代或經取代的 C_1 - C_4 烷基或一基



R_3 係為氫、羥基、磺基、硫酸基、羧基、氰基、鹵素、 C_1 - C_4 烷氧羰基、 C_1 - C_4 烷酯氧基、胺甲酯基或一 $-\text{SO}_2\text{—Y}$ 的基團， R_4 係為氫或 C_1 - C_4 烷基，

alk 及 alk_1 係個別獨立於另一之直鏈或分支的 C_1 - C_6 伸烷基，伸芳基係為伸苯基或伸萘基，其係未取代或被磺基、羧基、羥基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基或鹵素所取代，

Y 係為乙烯基或一 $-\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—U}$ 的基且 U 為一離去基， Y_1 係為一 $-\text{CH}(\text{Hal})\text{—CH}_2(\text{Hal})$ 或 $-\text{C}(\text{Hal})=\text{CH}_2$ 的基團，其中 Hal 係為氯或溴，

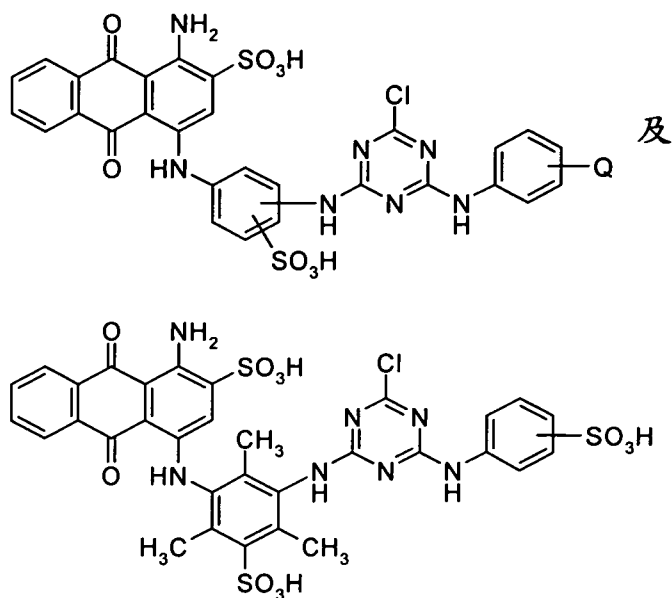
W 係為一 $-\text{SO}_2\text{—NR}_4\text{—}$ 、 $-\text{CONR}_4\text{—}$ 或 $-\text{NR}_4\text{CO—}$ 的基團，其中 R_4 係如上所定義，

Q 係為一 $-\text{O—}$ 或 $-\text{NR}_4\text{—}$ 之基，其中 R_4 係如上所定義，且 n 係為數字 0 或 1，

X 係為鹵素，且

k 及 m 係個別獨立於另一為數字 0 或 1，且 k+m 之總和為 1 或 2，

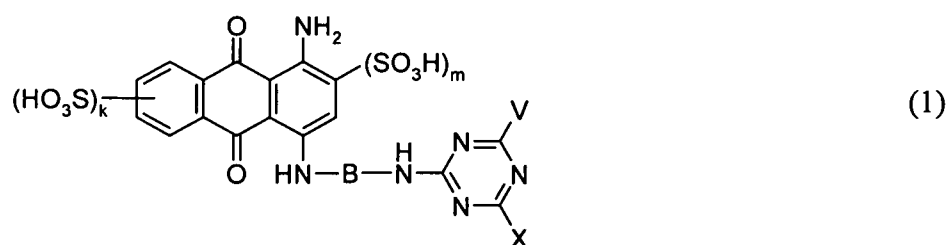
含有下式化合物之吸附劑除外



其中 Q 係為磺基或羧基，該方法提供各樣用於染料-配位體親和性管柱層析篩選中的染料-配位體之結構。

六、英文發明摘要：

A process for the separation of biological materials, wherein an adsorbent is used, which comprises a reaction product of a compound of formula



and a substrate having a group capable of reaction with a

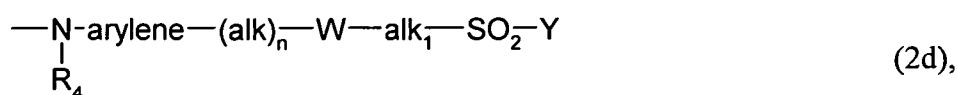
reactive group in said compound of formula (1) to form a covalent bond, in which B is C₂-C₁₂ alkylene radical, which can be interrupted by 1,2 or 3 members from the group consisting of -NR₁- or -O- and is unsubstituted or substituted by hydroxyl, sulfo, sulfato, cyano or carboxyl,

R₁ is hydrogen or C₁-C₄alkyl, or

B is a C₅-C₉cycloalkylene radical, C₁-C₄alkylene-C₅-C₉cycloalkylene radical or C₁-C₄alkylene-C₅-C₉cycloalkylene-C₁-C₄alkylene radical, which are unsubstituted or substituted by C₁-C₄alkyl, C₁-C₄alkoxy, sulfo, halogen or carboxyl, or a phenylene radical, C₁-C₄alkylene-phenylene radical or C₁-C₄alkylene-phenylene-C₁-C₄alkylene radical, which are unsubstituted or substituted by C₁-C₄alkyl, C₁-C₄alkoxy, C₂-C₄alkanoylamino, sulfo, halogen or carboxyl,

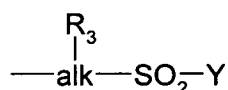
V is a non-fibre-reactive substituent or is a fibre-reactive substituent of the formula





wherein

R₂ is hydrogen or unsubstituted or substituted C₁-C₄alkyl or a radical



R₃ is hydrogen, hydroxyl, sulfo, sulfato, carboxy, cyano, halogen, C₁-C₄alkoxycarbonyl, C₁-C₄alkanoyloxy, carbamoyl or a group -SO₂-Y,

R₄ is hydrogen or C₁-C₄alkyl,

alk and alk₁ are each independently of the other linear or branched C₁-C₆alkylene,

arylene is a phenylene or naphthylene radical which is unsubstituted or substituted by sulfo, carboxy, hydroxyl, C₁-C₄alkyl, C₁-C₄alkoxy or by a halogen,

Y is vinyl or a radical -CH₂-CH₂-U and U is a leaving group,

Y₁ is a group -CH(Hal)-CH₂(Hal) or -C(Hal)=CH₂ wherein Hal is chlorine or bromine,

W is a group -SO₂-NR₄-, -CONR₄- or -NR₄CO- wherein R₄ is as defined above,

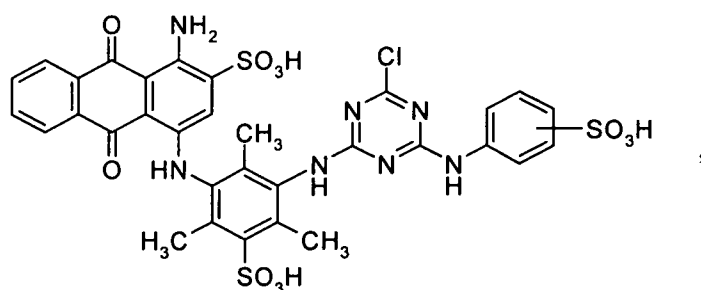
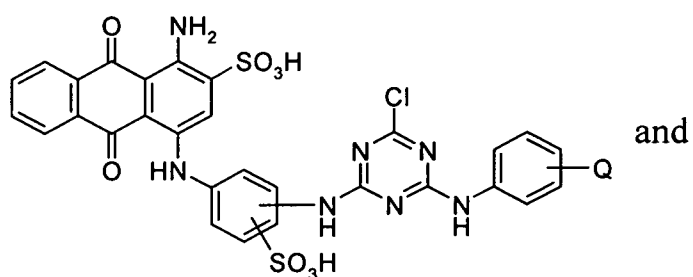
Q is a radical -O- or -NR₄- wherein R₄ is as defined above,

and

n is a number 0 or 1,

X is halogen, and

k and m are each independently of the other a number of 0 or 1 and the sum $k+m$ is 1 or 2, with the exception of an adsorbent, comprising a compound of formula



wherein

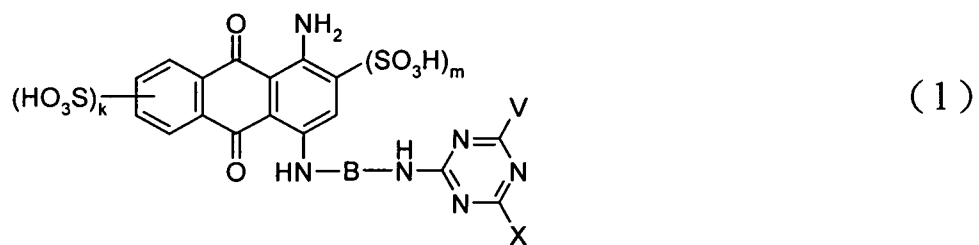
Q is sulfo or carboxy, provides various dye-ligand structures available for screening in dye-ligand affinity chromatography.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種使用吸附劑來分離或純化生物材料的方法，包含蔥醌染料配位體、一種用來製備吸附劑的方法以及吸附劑。

【先前技術】

反應性染料係為已良好建立的產品，且被廣泛使用在紡織工業中，用於纖維素的紡織原料之著色，例如棉花或黏膠。這類反應性染料的分子可被視為由兩個交聯的單元所製成，且各有不同的功用。一個單元係為發色基，其功用係在給予紡織原料想要的顏色以及其它色澤的性質。另一個單元係為對纖維質料有反應性的基團，可在良好建立的應用環境下，化學性地與纖維素反應而共價性地鍵結染料分子到紡織原料之上，由此產出一高度抵抗清洗過程之染色後的材料。

儘管反應性染料起初係被發展來解決在染色及印刷纖維性紡織材料中所遇到的一些問題，多年來它們被發現具有一些性質，使它們具有在紡織材料染色領域之外的用途。

例如從美國專利號 4,016,149 及 4,546,161 之中，咸知這些染料可藉類似的技術被連接於碳水化合物基質之上，例如由瓊脂糖、右旋葡萄糖、聚葡萄糖等所衍生的聚合物或共聚物。這些碳水化合物基質的反應產物以及某些商業上可得的反應性染料曾被用於親和性管柱層析中作為吸附

劑，用來管柱層析分離或純化某些蛋白質材料。在這些商業上可得，且曾被用於蛋白質或酵素的分離中作為配位體的紡織染料中，某些藍色的蒽醌染料包含一單氯三氮雜苯部分，例如 C.I. Reactive Blue 2 (Cibacron Blue 3GA)、C.I. Reactive Blue 5，及 C.I. Reactive Blue 49。

親和性管柱層析係基於蛋白質或酵素對靜相吸附劑上的配位體之差異性的親和性，且逐漸地被證明在例如 WO 2004052870 所述的生化藥劑及診斷法之高端應用領域係非常重要的。交互作用的本質可能為氫鍵 (hydrogen-bonding)、靜電力 (electrostatic forces)、因適合的幾何結果造成的堆疊，或任何其它可促進該配位體-標的物 (ligand-target) 關係的因素。配位體-標的物的交互作用應足夠強到可在保留配位體-標的物錯合物完整無缺的同時，允許其它的污染分子自一混合物中移除，換言之，一具有對配位體之親和性的蛋白質鍵結於母體之上，而其它不具親和性的則被洗出。被鍵結的蛋白質，可如所述選擇性地在不同的 pH、離子強度及緩衝液條件下被沖提，例如在 P.D.G. Dean、W.S. Johnson 及 F.A. Middle(Ed) 於 1982 年所著的 Affinity Chromatography: A Practical Approach。該蛋白質混合物可藉震盪或流經一具有吸附劑的管柱而分離。

已發現親和性管柱層析在血液分化上係為有利的，用於來自血漿部分中之蛋白質精細且快速的取得。親和性管柱層析被採用於藉傳統乙醇分化及/或藉離子交換管柱層析

而預純化的血漿部分之上。親和性管柱層析正被使用於不同血漿產物的工業生產，例如由 T. Burnouf 及 M. Radosevich 之 *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, 49, 575 所知的因子 VIII、因子 IX、von Willebrand 因子、蛋白質 C 以及抗凝血酶 III (Antithrombin III) 之濃縮物。

Cibacron Blue 3GA 與各種蛋白質及酵素之交互作用已被廣泛研究。該染料已被觀察到模擬了 NAD^+ 的部分，因此與可辨認此位置的蛋白質及酵素交互作用，例如描述於 S. Subramanian 之 *CRC. Critical Rev. Biochem.*, 1984, 16, 169 者。血漿蛋白已例如由 M. Allary、J. Saint-Blancard、E. Boschetti 及 P. Girot 之 *Bioseperation*, 1991, 2, 167 所知般藉使用固著的 Cibacron Blue 3GA 以大規模被成功地純化。二十七種血漿蛋白之分化，隨著使用固著 Cibacron 3GA、交聯的瓊脂糖小球之親和性管柱層析之幫助，藉一如所述的 pH 梯度而被呈現出來，例如，於 E. Gianazza 及 P. Arnaud 之 *Biochem. J.*, 1982, 201, 129。Blue Sepharose (Cibacron Blue 3GA 固著於瓊脂糖上) 上的絲胺酸蛋白酶之純化亦已被報導。例如從 C. Koch、L. Borg、K. Skjodt 及 G. Hoven 之 *J. Chromatogr. B.*, 1998, 718, 41 已知的是，絲胺酸蛋白酶與 Blue Sepharose 的交互作用涉及該酵素的活性位置。

生化科技的進步，例如噬菌體技術及電腦輔助的人工配位體設計，已引導用於蛋白質純化之親和性管柱層析的應用到進一步的發展，例如描述於 C. R. Lowe、A. R. Lowe

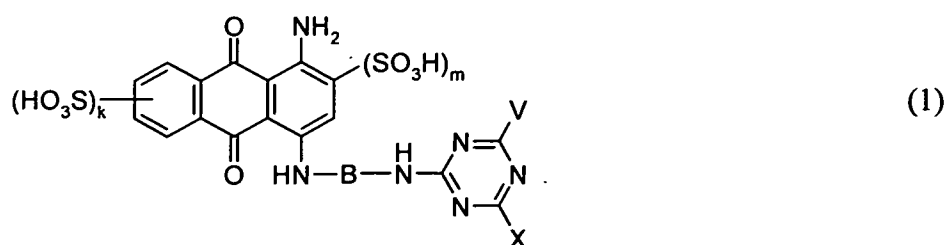
及 G. Gupta 之 *J. Bioche., Biophys. Methods*, 2001, 49, 561 者。除了傳統使用的生化配位體例如肝素(heparin)、白明膠(gelatin)、蛋白質 A 及蛋白質 C 之外，各種定製的合成配位體已提供改善的血漿蛋白產量。

用於工業上的蛋白質純化之人工配位體技術的應用，曾不被鼓勵到一較巨大的程度，且曾主要被限制在 Cibacron Blue 3GA 的使用。既然親和性管柱層析的原理係基於分子辨認的現象，配位體結構上的差異在穩定或去穩定蛋白質-染料間的交互作用中，扮演了一個實質上的角色。參照例如 N. Lindner、R. Jeffcoat 及 C. Lowe 之 *J. Chromatogr.*, 1989, 473, 227 及 Y.D.Clonis、N.E.Labrou、V. Kotsira、C. Mazitsos、S. Mellissis 及 G.Gogolas 之 *J. Chromatogr. A*, 2000, 891, 33。一三元錯合物中的次要交互作用，在展現對一特定蛋白質的親和性上，亦可具有深刻的效果，例如描述於 N. E. Labrou、E. Eliopoulos、Y. D. Clonis 之 *Biochem J.*, 1996, 315, 695 者。

因此，其有一需求係提供可很快合成的染料-配位體吸附劑來負責各種分離或純化的問題，並增進用於蛋白質純化、可信賴的方法之範圍。

【發明內容】

本發明係關於一種用於生物材料分離的方法，其中使用一吸附劑，其包含式(1)化合物與基質的反應產物，該基質具有可與上述式(1)化合物中的反應性基團反應而形成共價鍵之基團，

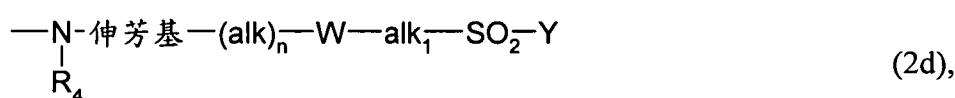


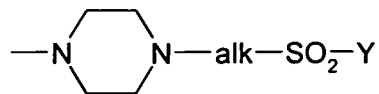
其中 B 係為 C₂-C₁₂ 伸烷基且可被 1、2 或 3 個選自由 -NR₁- 或 -O- 所組成的群組之基團所中斷，且係未取代或被羥基、磺基、硫酸基、氰基或羧基所取代，

R₁ 係為氫或 C₁-C₄ 烷基，或者

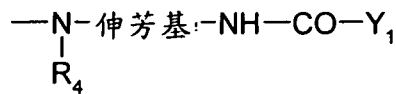
B 係為 C₅-C₉ 伸環烷基、C₁-C₄-伸烷基-C₅-C₉-伸環烷基或 C₁-C₄-伸烷基-C₅-C₉-伸環烷基-C₁-C₄-伸烷基，且係未取代或被 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、磺基、鹵素或羧基所取代，或一伸苯基、C₁-C₄-伸烷基-伸苯基或 C₁-C₄-伸烷基-伸苯基-C₁-C₄-伸烷基，其係未取代或被 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、C₂-C₄ 烷醯胺基、磺基、鹵素或羧基所取代，

V 係為一非纖維反應性的取代基或為一如下式之纖維反應性的取代基，



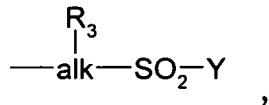


(2e) 或



(2f),

其中 R_2 係為氫，或未取代或經取代的 $\text{C}_1\text{—C}_4$ 烷基或一基



R_3 係為氫、羥基、磺基、硫酸基、羧基、氰基、鹵素、 $\text{C}_1\text{—C}_4$ 烷氧羰基、 $\text{C}_1\text{—C}_4$ 烷鹽氧基、胺甲鹽基或一 $\text{—SO}_2\text{—Y}$ 的基團，

R_4 係為氫或 $\text{C}_1\text{—C}_4$ 烷基，

alk 及 alk_1 係個別獨立於另一之直鏈或分支的 $\text{C}_1\text{—C}_6$ 伸烷基，

伸芳基係為伸苯基或伸萘基且為未取代或被磺基、羧基、羥基、 $\text{C}_1\text{—C}_4$ 烷基、 $\text{C}_1\text{—C}_4$ 烷氧基或鹵素所取代，

Y 係為乙烯基或一 $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—U}$ 的基且 U 為一離去基， Y_1 係為一 $\text{—CH(Hal)—CH}_2\text{(Hal)}$ 或 —C(Hal)=CH_2 的基團，其中 Hal 係為氯或溴，

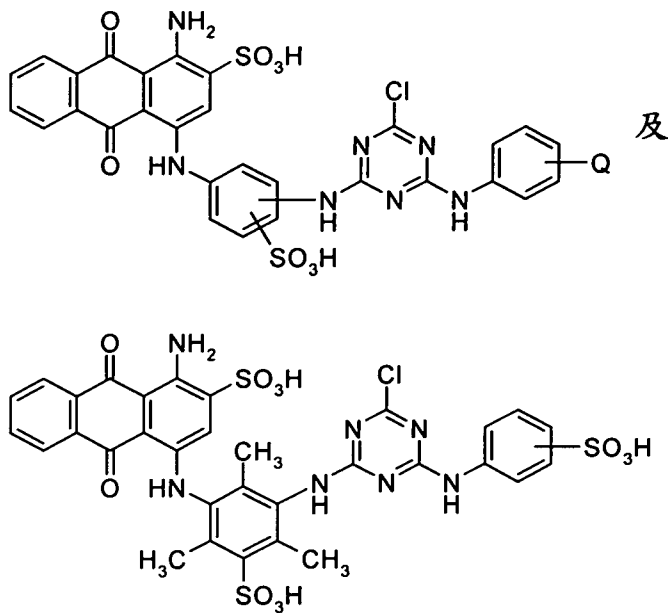
W 係為一 $\text{—SO}_2\text{—NR}_4\text{—}$ 、 $\text{—CONR}_4\text{—}$ 或 $\text{—NR}_4\text{CO—}$ 的基團，其中 R_4 係如上所定義，

Q 係為一 —O— 或 $\text{—NR}_4\text{—}$ 之基，其中 R_4 係如上所定義，且 n 係為數字 0 或 1，

X 係為鹵素，且

k 及 m 係個別獨立於另一為數字 0 或 1，且 $k+m$ 之總和為 1 或 2，

含有下式化合物之吸附劑除外



其中 Q 係為磺基或羧基。

作為 B 基中的 C_1 - C_4 烷基，可考慮例如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基或異丁基，較佳為甲基或乙基，尤其是甲基。

作為 B 基中的 C_1 - C_4 烷氧基，可考慮例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基及異丁氧基，較佳為甲氧基或乙氧基，尤其是甲氧基。

作為 B 基中的鹵素，可考慮例如氟、氯及溴，較佳為氯及溴，尤其是氯。

作為 B 基中的 C_2 - C_4 烷醯胺基，可考慮例如乙醯胺基或丙醯胺基，較佳為乙醯胺基。

較佳 R_1 係為氫或甲基。

一伸烷基 B 較佳為一 C_2 - C_6 伸烷基，其可被 1、2 或 3 個 -O- 所中斷，且係未取代或被羥基或硫酸基所取代。未取

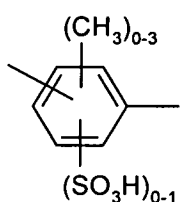
代的基係為較佳，特別是如式 $-\text{CH}_2-\overset{\text{H, CH}_3}{\underset{\text{H, CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_2-$ 的基。具有式

$-(\text{CH}_2)_3-$ 及

$-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$ 的基係特別偏好。

較佳之含伸環烷基的 B 基，係為對應之含有伸環己基 (cyclohexylene-containing) 且特別為未取代或以 C_1-C_4 烷基取代的基。一未取代或被 C_1-C_4 烷基取代的環己伸烷基或亞甲基-伸環己基，特別是一未取代或以 C_1-C_4 烷基取代的亞甲基-伸環己基，在此係特別為較佳。

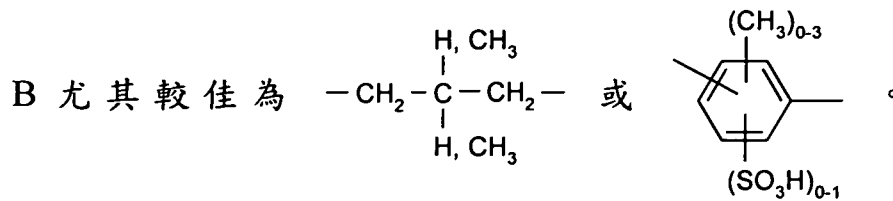
較佳之含伸苯基的 B 基係為對應之未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、鹵素或磺基取代的基。未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、鹵素或磺基取代的伸苯基或亞甲基-伸苯基-亞甲基係特別為較佳。尤其較佳的基係為那

些具有式  者。

B 係較佳為一 C_2-C_6 伸烷基，其可被 1、2 或 3 個 -O- 所中斷，且係未取代或被羥基或硫酸基所取代，或者一未取代或被 C_1-C_4 烷基取代的伸環己基或亞甲基-伸環己基，或者一未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、鹵素或磺基取代的伸苯基或亞甲基-伸苯基-亞甲基。

B 係特別較佳為一 C_2-C_6 伸烷基、一未取代或被 C_1-C_4 烷基取代的亞甲基-伸環己基，或一未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、鹵素或磺基取代的伸苯基或亞甲基-伸苯基-

亞甲基。



作為各獨立於另一之 R_2 及 R_4 的 C_1 - C_4 烷基，可考慮例如甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基及異丁基，較佳甲基或乙基，尤其是甲基。提到的基 R_2 係為未取代或被例如鹵素、羥基、氰基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 烷氧羰基、羧基、胺磺鹽基、磺基或硫酸基所取代，較佳被羥基、磺基、硫酸基、羧基或氰基所取代。未取代的基係為較佳。

當 Y 為一基 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{U}$ 時，離去基 U 可為例如 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OCO}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{OSO}_2-\text{C}_1-\text{C}_4$ 烷基或 $-\text{OSO}_2-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_4 \text{ 烷基})_2$ 。U 係較佳為一具有式 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OCO}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_5$ 或 $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 的基團，尤其是 $-\text{Cl}$ 或 $-\text{OSO}_3\text{H}$ ，更特別是 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 。

Y 係較佳為乙烯基、 β -氯乙基、 β -硫酸乙基、 β -硫代硫酸乙基、 β -乙醯乙基、 β -苯氧乙基或 β -磷酸乙基，尤其是 β -氯乙基、 β -硫酸乙基或乙烯基，更特別是 β -硫酸乙基或乙烯基，極特別是乙烯基。

Hal 係較佳為溴。

alk 及 alk_1 各獨立於另一為例如亞甲基、1,2-伸乙基、1,3-伸丙基、1,4-伸丁基、1,5-伸戊基、1,6-伸己基或上述

之支鏈異構物。alk 及 alk_1 各獨立於另一係較佳為一 C_1 - C_4 伸烷基，尤其是一伸乙基或伸丙基。

較佳的芳基之意義係為一未取代或被磺基、甲基或甲氧基所取代的 1,3-或 1,4-伸苯基，尤其是一未取代的 1,3-或 1,4-伸苯基。

R_2 係較佳為氫、 C_1 - C_4 烷基或一如式 $\begin{array}{c} \text{R}_3 \\ | \\ \text{---alk-SO}_2\text{---Y} \end{array}$ 的

基，其中在每一情況中 R_3 、Y 及 alk 係如上述所定義，且具有上述賦予的較佳意義。 R_2 係尤其為氫、甲基或乙基，且極特別為氫。

R_3 較佳係為氫。

R_4 係較佳為氫、甲基或乙基，尤其為氫。

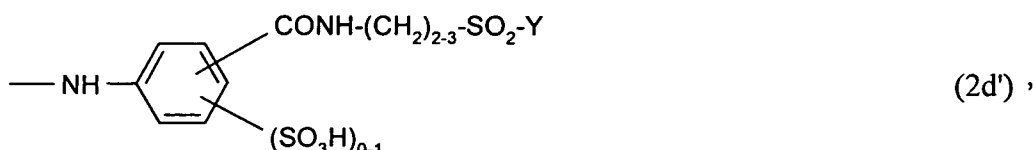
可變的 Q 係較佳為 -NH-或 -O-，尤其為 -O-。

W 係較佳為一具有式 -CONH-或 -NHCO-的基團，特別為具有式 -CONH-的基團。

可變的 n 係較佳為數字 0。

具有式 (2a) 到 (2f) 之較佳對纖維有活性的 (fibre-reactive) 取代基 V 係為某些基團，其中 R_2 及 R_3 各為氫； R_4 為氫、甲基或乙基；Q 為一 -NH-或 -O-的基；W 為一 -CONH-基團；alk 及 alk_1 各獨立於另一為伸乙基或伸丙基；伸芳基為未取代或被甲基、甲氧基或磺基所取代的伸苯基；Y 為乙烯基、 β -氯乙基或 β -硫酸乙基，尤其是乙烯基或 β -硫酸乙基，極特別是乙烯基； Y_1 為 -CHBr- CH_2 Br 或 -CBr= CH_2 且 n 為數字 0。在那些取代基之中，具有式 (2c) 及 (2d) 的基被賦予特別的偏好。

當 V 具有一對纖維有活性的(fibre-reactive)取代基之意義時，身為一如下式的基團 V 被賦予極特別的偏好，



尤其是(2c')，其中 Y 係如上所定義，且具有如上賦予的較佳意義。

在式(2c')的基中，該氮原子可被代替氮的甲基或乙基所取代。

當 V 為一對纖維無活性的取代基時，其可為例如羥基；C₁-C₄ 烷氧基；未取代或被羥基、羧基或磺基取代的 C₁-C₄ 烷磺基；胺基；被 C₁-C₈ 烷基單或雙取代的胺基，其中該烷基係為未取代或進一步被例如磺基、硫酸基、羥基、羧基或苯基所取代，尤其是被磺基或羥基，且係未中斷的或被一-O-基所中斷；未取代或被 C₁-C₄ 烷基取代的環己基胺基；嗎啉基；N- C₁-C₄ 烷基-N-苯基胺基或苯基胺基或萘基胺基，且該苯基或萘基係為未取代或以被例如 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、羧基、磺基或鹵素所取代。

適合之對纖維無活性的取代基 V 的實例為胺基、甲基胺基、乙基胺基、β-羥基乙基胺基、2-(β-羥基乙氧基)乙基胺基、N,N-二-β-羥基乙基胺基、β-磺基乙基胺基、環己基胺基、嗎啉基、鄰-、間-、或對-氯苯基胺基、鄰-、間-、

或對-甲基苯基胺基、鄰-、間-、或對-甲氧基苯基胺基、鄰-、間-、或對-磺基苯基胺基、二磺基苯基胺基、鄰-羧基苯基胺基、1-或 2-萘基胺基、1-硫-2-萘基胺基、4,8-二硫-2-萘基胺基、*N*-乙基-*N*-苯基胺基、*N*-甲基-*N*-苯基胺基、甲氧基、乙氧基、正或異丙氧基及羥基。

作為一對纖維無活性的基，*V* 被賦予偏好之含義為羥基； C_1 - C_4 烷氧基；未取代或以羥基、羧基或磺基取代的 C_1 - C_4 烷磺基；胺基；未取代或在烷基部分中被羥基、硫酸基或磺基取代，且係未被中斷或被一-O-基中斷的 *N*-單-或 *N,N*-雙- C_1 - C_4 烷基胺基；嗎啉基；苯基胺基或 *N*- C_1 - C_4 烷基-*N*-苯基胺基，其中各苯基環係未取代或被磺基、羧基、氯、乙醯胺基、甲基或甲氧基所取代，且其中該烷基係未取代或被羥基、磺基或硫酸基所取代；或者未取代或被 1-3 個磺基所取代的萘基胺基。

尤其較佳之作為一對纖維無活性的基 *V* 相當於胺基、未取代或在烷基部分中被羥基、硫酸基或磺基取代，且係未被中斷或被一-O-基中斷的 *N*-單-或 *N,N*-二- C_1 - C_4 烷基胺基；嗎啉基；未取代或在苯環中被磺基、羧基、氯、乙醯胺基、甲基或甲氧基所取代的苯基胺基或 *N*- C_1 - C_4 烷基-*N*-苯基胺基；或者未取代或被 1-3 個磺基所取代的萘基胺基。

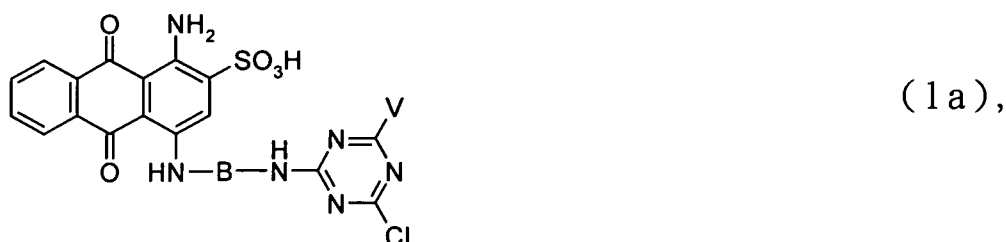
尤其重要之對纖維無活性的基 *V* 係為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基、*N,N*-二- β -羥基乙基胺基、 β -磺基乙基胺基、嗎啉基、2-、3-或 4-磺基苯基胺基、1-磺基萘-2-基胺基或 3,7-二磺基萘-2-基胺基。

k 較佳為數字 0。

m 較佳為數字 1。

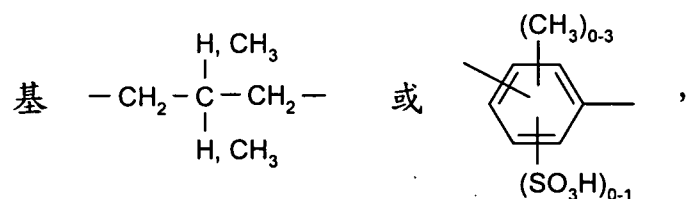
X 係例如為氟、氯或溴，較佳為氟或氯，特別為氯。

在本發明一較佳具體態樣中，具有式(1)的化合物相當於下式之化合物：



其中 B 係為一 C_2-C_6 伸烷基、未取代或被 C_1-C_4 烷基取代的亞甲基-伸環己基，或者一未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、鹵素或磺基取代的伸苯基或亞甲基-伸苯基-亞甲基；V 係為胺基、未取代或在烷基部分中被羥基、硫酸基或磺基所取代，且係未被中斷或被一 -O- 基中斷的 *N*-單-或 *N,N*-二- C_1-C_4 烷基胺基、嗎啉基、未取代或在苯環中被磺基、羧基、氯、乙醯胺基、甲基或甲氧基所取代的伸苯基胺基或 *N*- C_1-C_4 烷基-*N*-伸苯基胺基，或未取代或被 1-3 個磺基所取代的伸萘基胺基，或者 V 係為一具有如上所定義的式(2c')或(2d')之基團。

在本發明一尤其較佳的具體態樣中，具有式(1)的化合物相當於一如上賦予具有式(1a)之化合物，其中 B 係為一



V 相應為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基、*N,N*-

二- β -羥基乙基胺基、 β -磺基乙基胺基、嗎啉基、2-、3-或4-磺基苯基胺基、1-磺基萘-2-基胺基或3,7-二磺基萘-2-基胺基，或者V係為一具有如上所定義的式(2c')或(2d')之基團。

一具有式(1)之化合物的結構變化，可說明特定的分離或純化問題。

用於製備依照本發明所採用的吸附劑之基質或母體可實質上為不溶於水的。作為該基質之實例可提到丙烯酸系聚合物，例如聚丙烯醯胺或羥基烷基甲基丙烯酸酯(hydroxyalkylmethacrylate)以及這些材料的共聚物；金屬氧化物，例如氧化鋯、氧化鈦、氧化鋁、氧化矽，或者多孔玻璃，但較佳的水不溶性固態支撐物係為一聚合物的受質，具有複數個羥基可使式(1)的化合物經由反應性基團而被連接於其上。尤其適合的基質係為碳水化合物及修飾後的碳水化合物。適合的碳水化合物之實例係為瓊脂糖、交聯的瓊脂糖、右旋葡萄糖、聚葡萄糖，以及其修飾後的版本，例如以“Sapharose”及“Sephadex”凝膠(“Sephadex”及“Sephadex”係為GE Healthcare的商標)而可得，且被描述於GB 1,540,165之中。其它聚合物的基質係為聚醯胺。尤其較佳的基質為瓊脂糖及交聯的瓊脂糖。

依照本發明所採用的吸附劑可藉標準方法而製備，例如藉使式(1)的化合物與一具有可與該式(1)化合物中的反應性基團反應的基團之基質反應，而形成一共價鍵，例如一碳水化合物基質在一例如鹼金屬氫氧化物或碳酸根(例如氫

氧化鈉或碳酸鈉)的酸鍵結試劑存在的情況下，其中該可變因素係被定義且偏好如上。

用於製備這類吸附劑的方法及包含它們的層析管柱係被良好地文件化，例如在美國專利號 4,016,149 及 4,546,161 中。在此，這些文件將以引用方式納入本文中。

正如早已指出的，例如瓊脂糖、交聯的瓊脂糖、右旋葡萄糖、聚葡萄糖的基質或母體可藉不同長度的分隔基之導入而進一步地被修飾，有利地，於共價性鍵結式(1)化合物到該分隔基之前。因染料-配位體被改善的易接近性，分隔基可允許染料-配位體與欲純化的蛋白質相關材料之增強的交互作用，因而改善該吸附劑的選擇性及效率。

分隔基的導入係藉例如將受質在一例如鹼金屬氫氧化物或碳酸根(例如氫氧化鈉或碳酸鈉)的酸鍵結試劑存在的情況下以表氯醇處理，以及接著在適合的溫度下(例如 20-80°C，較佳 20-50°C)以多元胺處理而被實施。

適合用於分隔基導入的多元胺化合物可選自一由芳香族多元胺、脂肪族多元胺及脂環族多元胺組成的群組。典型的實例包括聚乙烯胺、聚乙烯亞胺、1,2-乙二胺、聯胺、聯胺-2-二-(3-胺基丙基)-胺、1,4-二胺基環己烷、3-胺基-1-甲基胺基丙烷、*N*-羥基乙基乙二胺、*N*-甲基-二-(3-胺基丙基)-胺、四次乙基二胺(tetraethylenediamine)、1,4-丁二胺(1,4-丁二胺)、1,6-六次甲基二胺(1,6-hexamethylenediamine)、1,8-辛二胺(1,8-辛二胺)、1-胺基乙基-1,2-乙二胺、二次乙基三胺、四次乙基五胺、五次乙

基六胺、苯二胺、甲苯二胺、2,4,6-三胺基甲苯-三氯化氫、1,3,6-三胺基苯、異佛爾酮二胺(isophoronediamine)、二甲苯二胺、氫化的二甲苯二胺、4,4'-二-二胺基伸苯基甲烷、氫化的 4,4'-二-二胺基伸苯基甲烷，以及這些多元胺單體的衍生物。

脂肪族及/或脂環族多元胺係為較佳。尤其較佳的係為脂肪族及/或脂環族二胺。可提到的特別為 1,4-丁二胺、1,6-六次甲基二胺及 1,8-辛二胺。多元胺可單獨地或以至少兩種多元胺的混合物之方式被使用。

生化材料可為任何可特定地鍵結到用於本發明之方法的式(1)化合物之上的材料，例如肽、多肽、蛋白質、核苷酸、多核苷酸、核酸、膽固醇、脂質、賀爾蒙。然而通常該生化材料或相關的物質將為一酵素、蛋白質或多肽，例如血清蛋白；肽酶；磷酸酶；激酶(kinase)，例如甘油激酶、己糖激酶(hexokinase)或尿激酶(urokinase)；核酸酶，例如核酸限制內切酶(restriction endonucleases)或核糖核酸酶(ribonuclease)；去氫酶，例如甘油醛-3-磷酸去氫酶、乳酸去氫酶、肝醇去氫酶(liver alcohol dehydrogenase)或葡萄糖-6-磷酸去氫酶；酯酶；合成酶；DNA 或 RNA 鍵結蛋白質及受體。

包含鍵結於一固態支撐物上的式(1)化合物之吸附劑可為一用於管柱分離目的的管柱型式，或者一薄膜型式而允許分離以一薄膜分離型式被實施。

根據本發明之分離或純化方法亦可藉在包含式(1)化合

物的吸附劑存在的情況下，於一具有適合的 pH 及離子強度的水性環境中處理(例如震盪)該生化材料、分離該吸附劑(例如藉由過濾)，以及藉適當的 pH 及離子強度變化從該吸附劑上沖提鍵結的蛋白質而被實施。

根據本發明之分離或純化方法係藉親和性層析而有利地被實施，包含：

- (a) 接觸相，其中一含有生化材料的混合物與吸附劑接觸，其包含一保留在層析管柱上的式(1)化合物。
- (b) 清洗相，其中未鍵結的物種藉通過一清洗溶液而從包含式(1)化合物的該吸附劑中移除，以及
- (c) 沖提相，其中一沖提溶液流經包含式(1)化合物的該吸附劑，而從管柱中回收被留住的需求生物材料。

藉由鍵結材料、清洗溶液及沖提溶液的謹慎選擇，生物材料複雜混合物的一步純化可被達成。

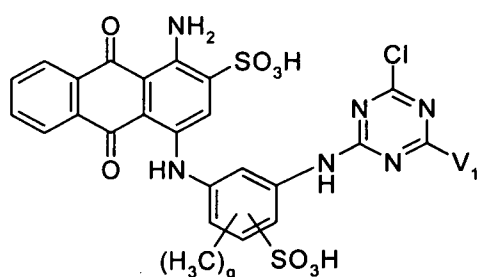
根據本發明的另一觀點，提供一吸附劑，包含一如上定義的式(1)化合物與一基質的加成物，其中該基質具有一基團，可與該式(1)化合物中的一反應性基團反應而形成一共價鍵，其中可變因素係被定義及偏好如上。

根據本發明之吸附劑係為極高純度的材料、沒有任何染料溶濾作用，且包含多種染料-配位體濃度於母體之上。此外，根據本發明之吸附劑係為化學及熱穩定的、極高選擇性的，且提供了多種染料-配位體結構，可用於染料-配位體親和性層析中的篩選。

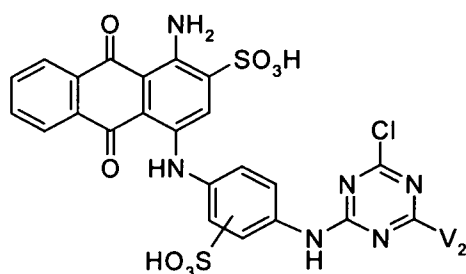
用於篩選的可用染料結構之範圍，在染料-配位體親和

性層析中係為一顯著的進步。進一步地，與這些結構變化物的交互作用可涉及一蛋白質的活化位置(T. Burnouf、H. Goubran 及 M. Radosevich, *J. Chromatogr. B*, **1998**, 715, 65)，或者該交互作用可位於蛋白質的其它位置上(B.M. Haydon 及 P.C. Engel, *J. Biochem.*, **2001**, 268, 1173)。藉這套吸附劑而來的這兩種鍵結模式之潛力，使其在發展蛋白質純化草案上，成為一有用的對策，而用於幾乎任何感興趣的蛋白質。

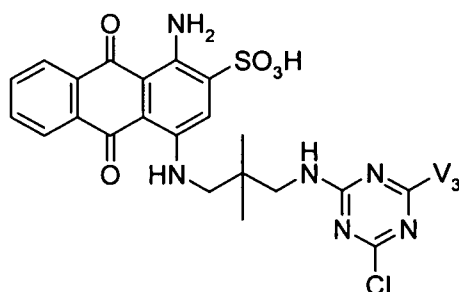
一些根據本發明被使用的染料-配位體係為新發現的。相應地，本發明亦相關於具有下式的化合物



(3),



(4) 及

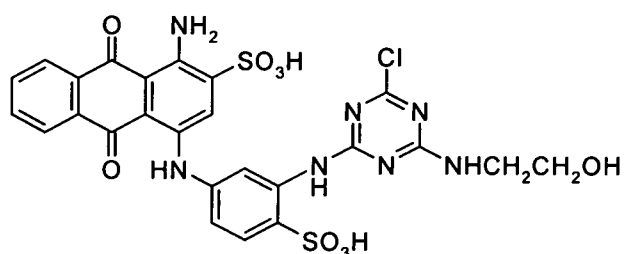


(5),

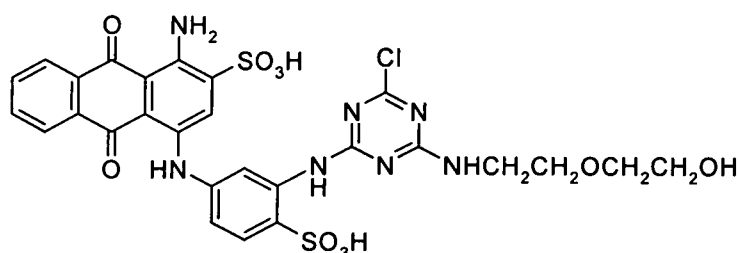
其中

V_1 係為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基或嗎啉基， V_2 及 V_3 各獨立於另一為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基、 N,N -二- β -羥基乙基胺基或嗎啉基，且 q 係為數字 0、1、2 或 3，較佳為 0 或 3。

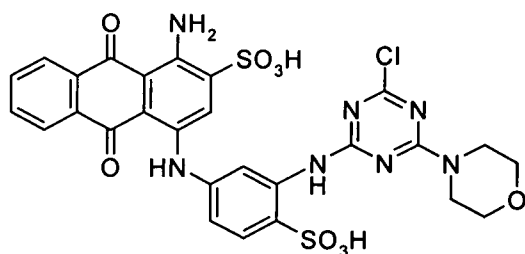
較佳為具有下式之化合物



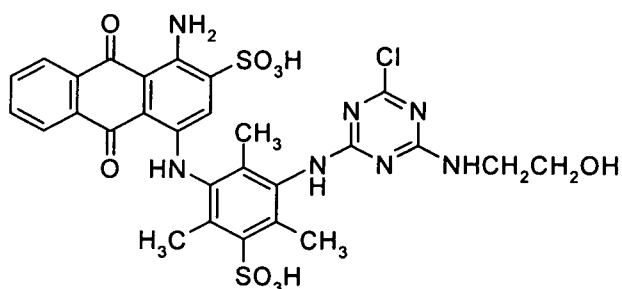
(3a),



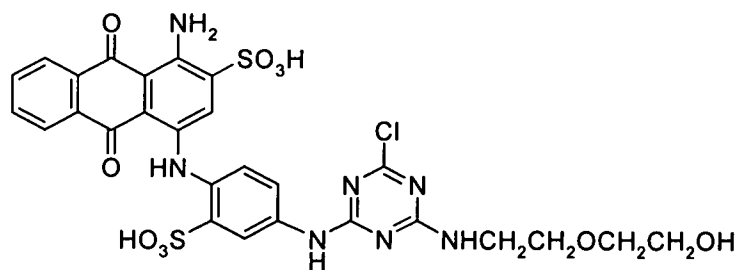
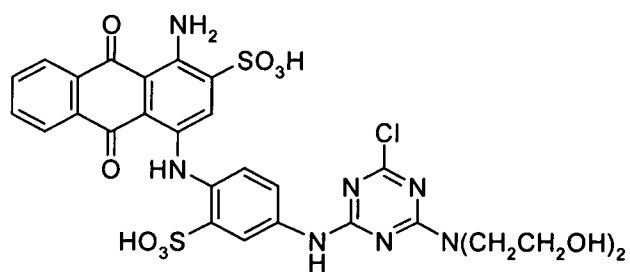
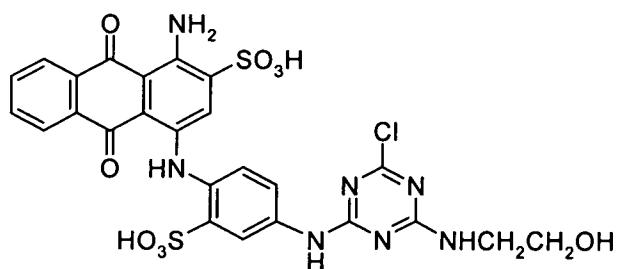
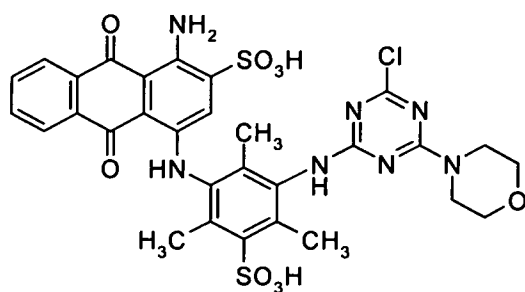
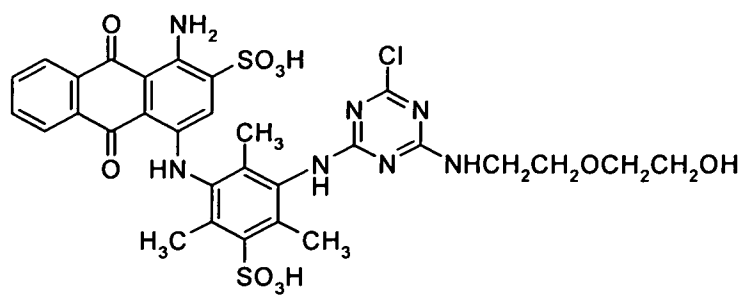
(3b),

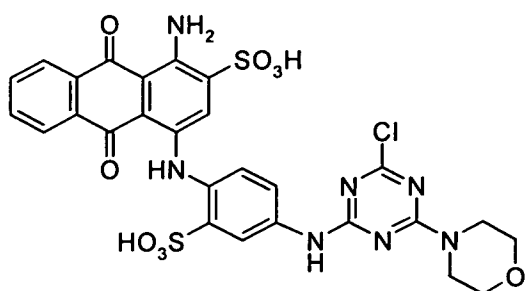


(3c),

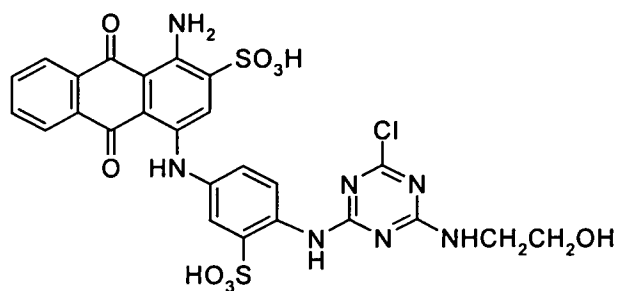


(3d),

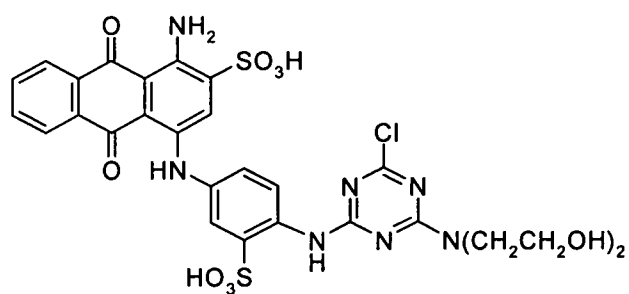




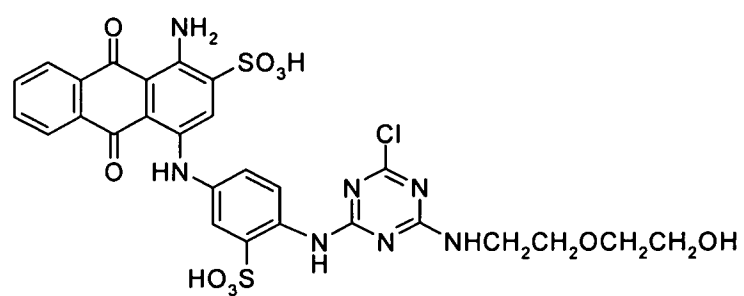
(4d),



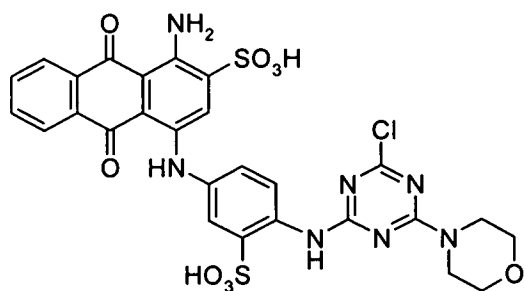
(4e),



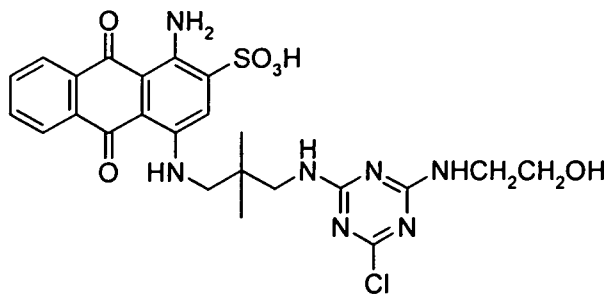
(4f),



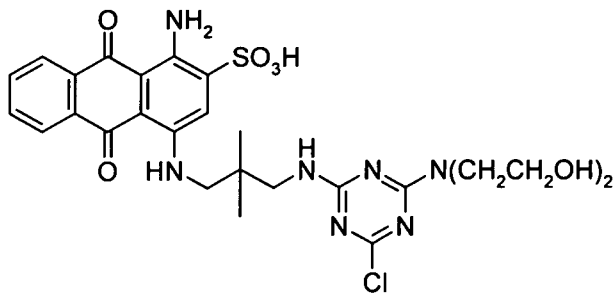
(4g),



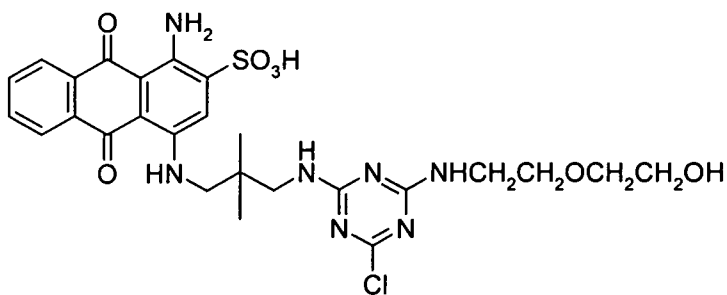
(4h),



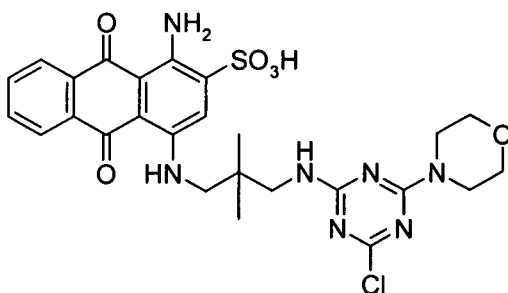
(5a),



(5b),



(5c) 及



(5d)

該染料-配位體可以類似於習知技藝之步驟製備。

【實施方式】

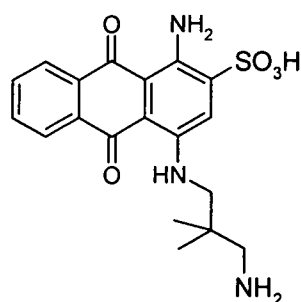
接下來的實施例係為了說明本發明。溫度係以攝氏度數被賦予。除非另有指示，”份”係為重量份且”百分率”係指重量百分率。重量份以”公斤對升”的比例而相關於體積份。

染料-配位體之製備

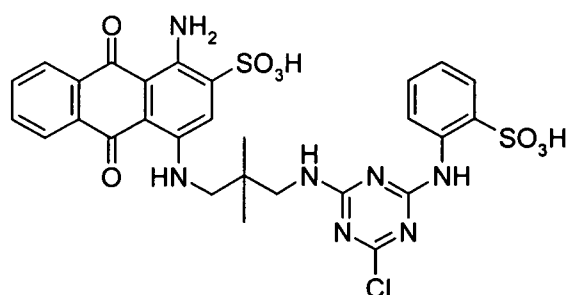
實施例 1：

(a) 20.17 份三聚氯化氰被分散於 100 份水及 100 份冰之中。19.26 份 2-胺基苯磺酸與氫氧化鈉一起被中和地溶解於 70 份水中。由此得到的中性溶液被一次性加入上述三聚氯化氰的分散液中，且以一氫氧化鈉水溶液(30 %) 將 pH 值維持在 3 一小時。接著，pH 值被一步步地增加到 6，且藉由逐滴添加氫氧化鈉水溶液(30 %)而維持兩小時。溫度被維持在 0-5°C 數小時。

(b) 40.35 份之符合下式的自由酸型式化合物被溶解於 200 份水中，且一次性地被加入根據步驟(a)所得的溶液中。



pH 值藉由氫氧化鈉水溶液(30 %)的添加被立即地提高到 8.4-8.6，且溫度被允許增加到 20°C。這些條件被維持幾小時。反應混合物被中和、藉透析免除無機鹽，並藉蒸發而濃縮。產物被乾燥且 94.3 克的一化合物被收集到，其在自由酸型式係符合下式：

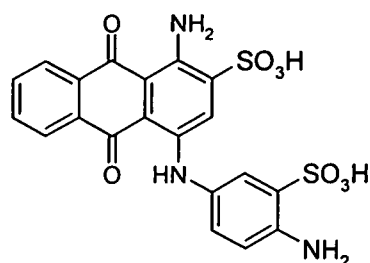


(101)。

實施例 2：

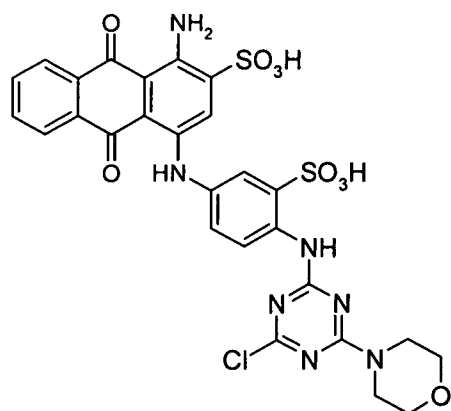
(a) 19.36 份三聚氯化氰被分散於 50 份水及 60 份冰之

中。48.95 份之符合下式的自由酸型式化合物與氫氧化鈉一起被中性地溶解於 350 份水中。



由此得到的中性溶液，在 20 分鐘內被加入上述三聚氯化氮的分散液中，同時藉氫氧化鈉水溶液(30 %)的逐滴添加而維持 pH 值在 5。反應混合物被保持在 pH 6，且溫度被維持在 0-2°C 數小時。

(b)9.58 份嗎啉被加入根據步驟(a)所得的溶液中。pH 值藉由氫氧化鈉水溶液(30 %)的添加被立即地提高到 9，且溫度被增加到 60°C。這些條件被維持數小時。反應混合物被中和、藉透析免除無機鹽，並藉蒸發而濃縮。產物被乾燥且收集到 93.1 克的一化合物，其在自由酸型式係符合下式：

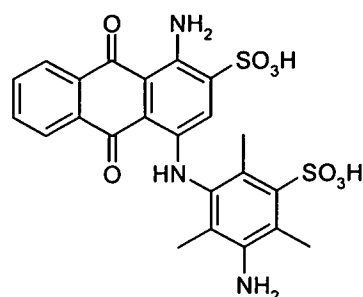


(102)。

($\lambda_{\max}$: 624 nm)

實施例 3：

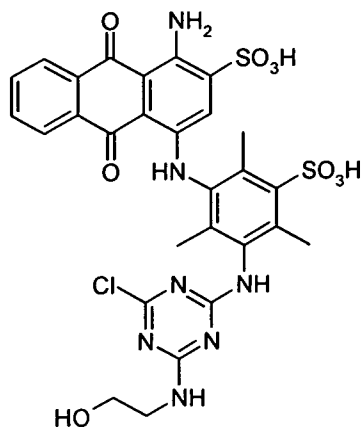
(a) 12.9 份三聚氯化氮被分散於 50 份水及 50 份冰之中。38.42 份之符合下式的自由酸型式化合物與氫氧化鈉一起被中和地溶解於 365 份水中。



由此得到的中性溶液在 10 分鐘內被加入上述三聚氯化氮的分散液中，同時藉氫氧化鈉水溶液(30 %)的逐滴添加而維持 pH 值在 5。反應混合物被保持在 pH 5，且溫度被維持在 0°C 數小時。

(b) 4.70 份乙醇胺被加入根據步驟(a)所得的溶液中。pH 值藉由蘇打水溶液(20 %)的添加被立即地提高到 9，且溫度被增加到 50°C。這些條件被維持數小時。

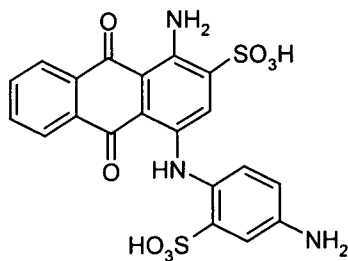
(c) 35 份氯化鈉被加入 1750 份的反應混合物中。30 分鐘後，懸浮液被過濾及乾燥。收集到 44 份的一化合物，其在自由酸型式係符合下式：



(103)。

 $(\lambda_{\max}: 586 \text{ nm})$ 實施例 4：

(a) 19.36 份三聚氯化氰被分散於 50 份水及 60 份冰之中。48.95 份之符合下式的自由酸型式化合物與氫氧化鈉一起被中和地溶解於 500 份水中。

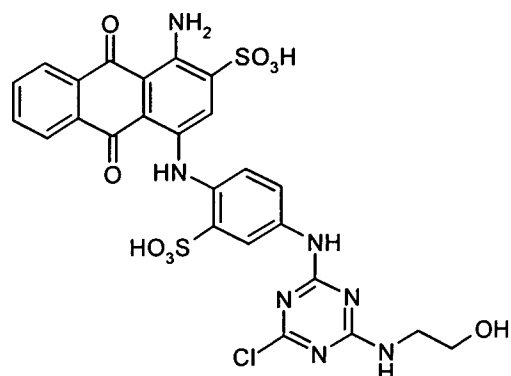


由此得到的中性溶液，在 45 分鐘內被加入上述三聚氯化氰的分散液中，同時藉氫氧化鈉水溶液(30 %)的逐滴添加而維持 pH 值在 5。反應混合物被保持在 pH 5，且溫度被維持在 0°C 數小時。

(b) 6.72 份乙醇胺被加入根據步驟(a)所得的溶液中。pH 值藉由蘇打水溶液(20 %)的添加被立即地提高到 8.5，且溫度被增加到 40°C。這些條件被維持數小時。

(c) 150 份氯化鈉被加入 2000 份的反應混合物。30 分

鐘後，懸浮液被過濾及乾燥。收集到 88 份的一化合物，其在自由酸型式係符合下式：

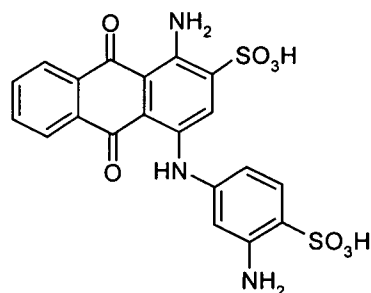


(104)。

($\lambda_{\max}$: 622 nm)

實施例 5：

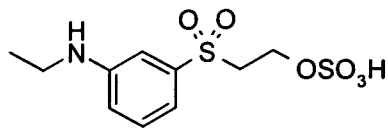
(a) 7.75 份三聚氯化氰被分散於 30 份水及 40 份冰之中。19.58 份之符合下式的自由酸型式化合物與氫氧化鈉一起被中和地溶解於 200 份水中。



由此得到的中性溶液，在 45 分鐘內被加入上述三聚氯化氰的分散液中，同時藉氫氧化鈉水溶液 (30 %) 的逐滴添加而維持 pH 值在 5。反應混合物被保持在 pH 5，且溫度被維持在 0°C 數小時。

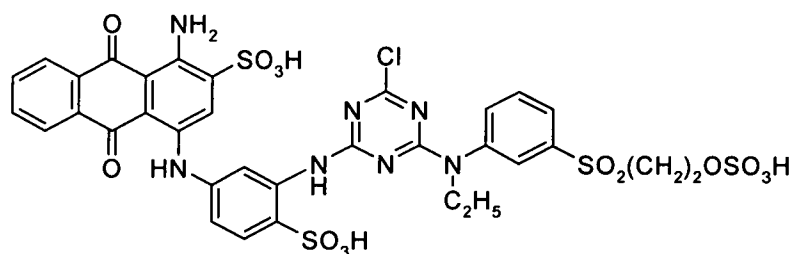
(b) 13.61 份的一化合物被加入根據步驟 (a) 所得的溶液

中，其中該化合物在自由酸型式符合下式且係先以一 pH 5 的蘇打水溶液(20 %)溶解。



pH 值藉由蘇打水溶液(20 %)的添加被立即地提高到 7，且溫度被允許增加到 20°C。這些條件被維持一整夜。產物被乾燥。

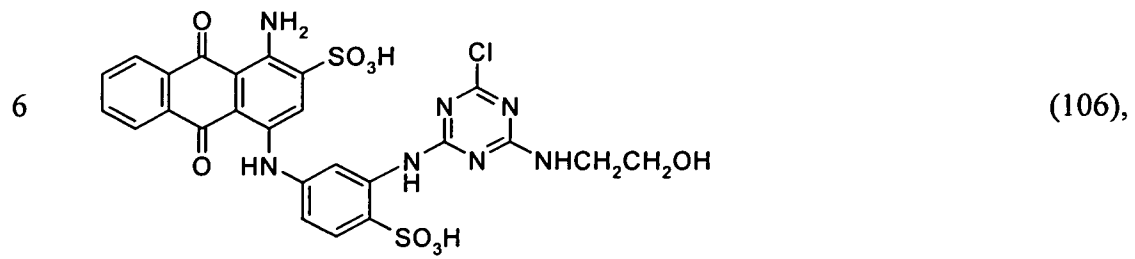
(c)96.8 份根據(b)得到的乾燥後產物與一氯化鈉水溶液(5 %)350 份一起被混成漿狀。接著，添加兩部分的 17 份氯化鈉及兩部分的 100 份丙酮。懸浮液被攪拌 30 分鐘、過濾並乾燥。收集到 76.56 份的一化合物，其在自由酸型式係符合下式：



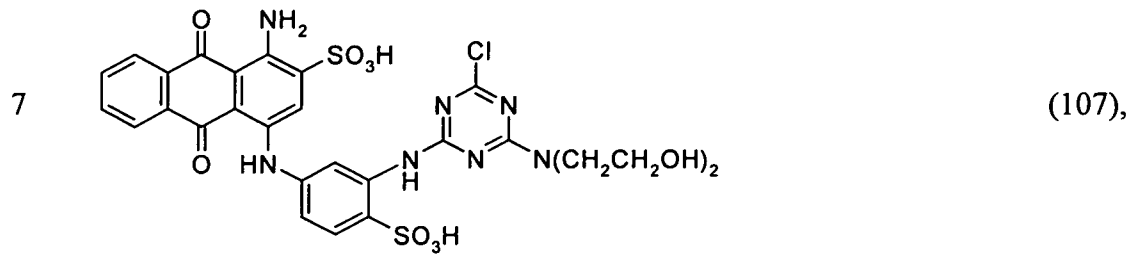
(105)。

實施例 6 到 25：

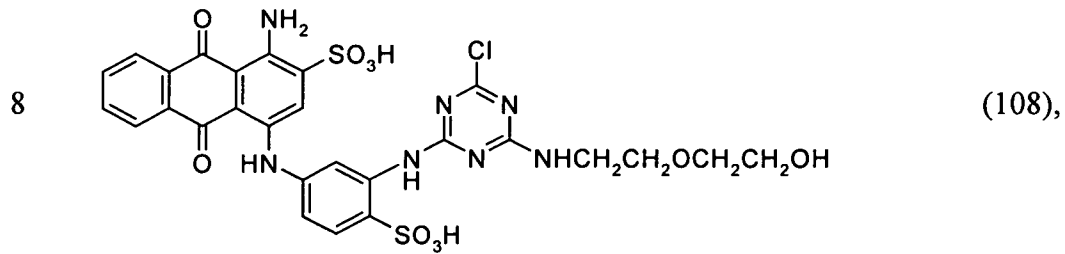
以一類似於實施例 1 到 5 中描述的方式，而得到具有下式的染料-配位體系為可能的：



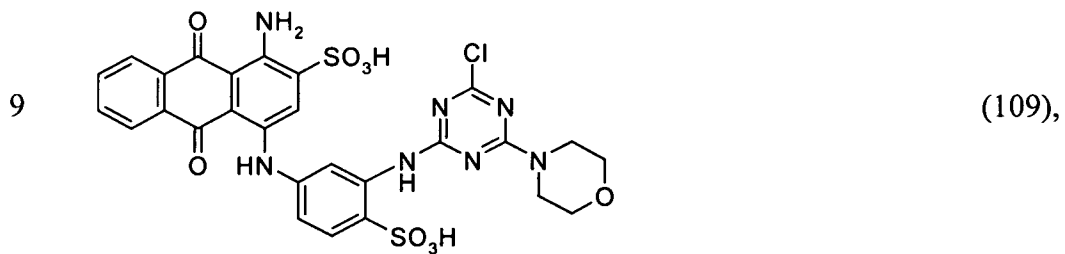
($\lambda_{\max}$: 600 nm)



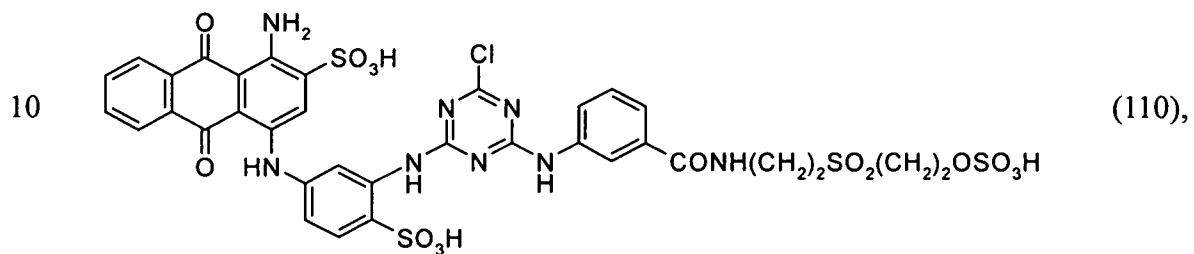
($\lambda_{\max}$: 598 nm)



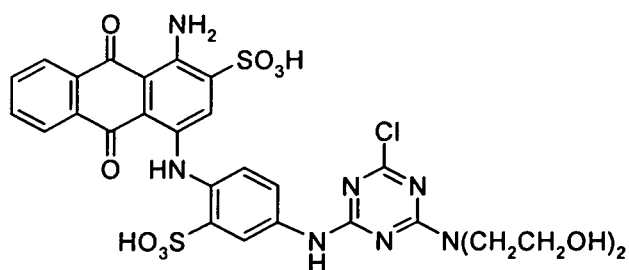
($\lambda_{\max}$: 600 nm)



($\lambda_{\max}$: 600 nm)



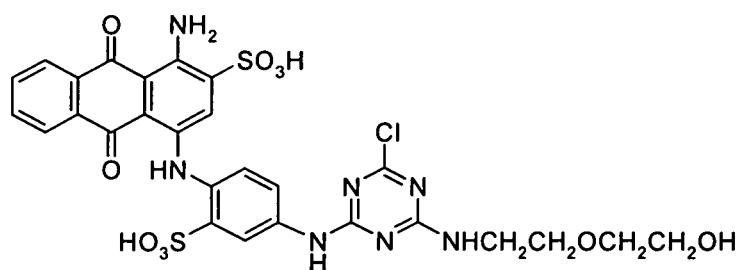
11



(111),

 $(\lambda_{\max}: 620 \text{ nm})$

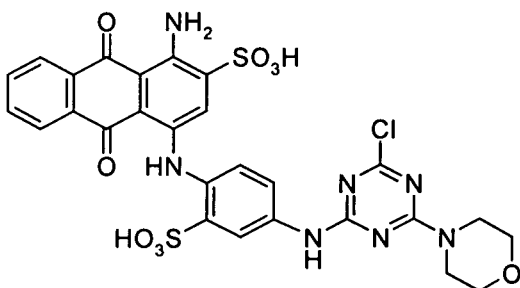
12



(112),

 $(\lambda_{\max}: 620 \text{ nm})$

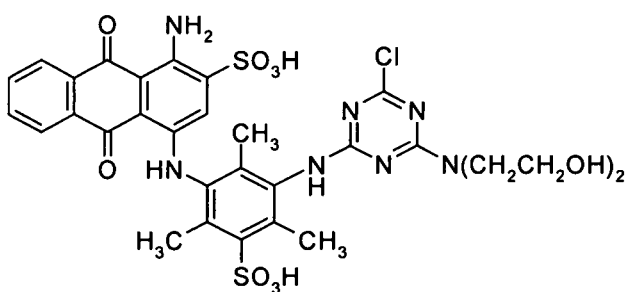
13



(113),

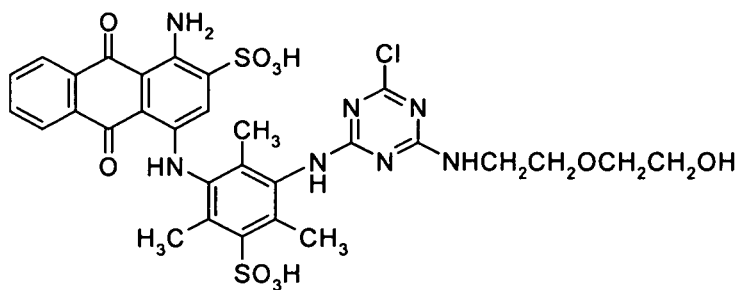
 $(\lambda_{\max}: 624 \text{ nm})$

14



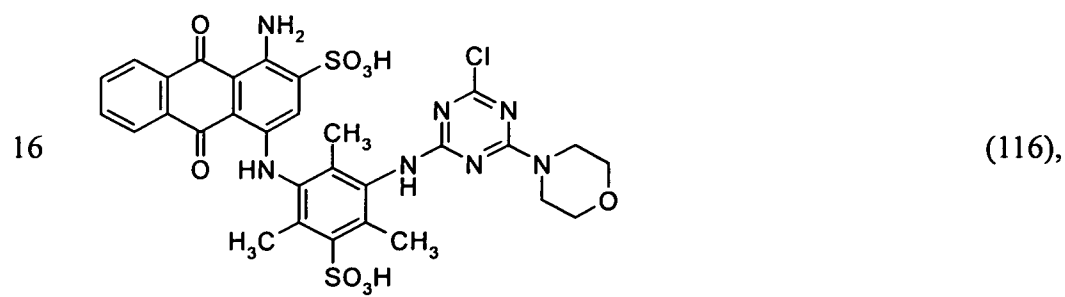
(114),

15

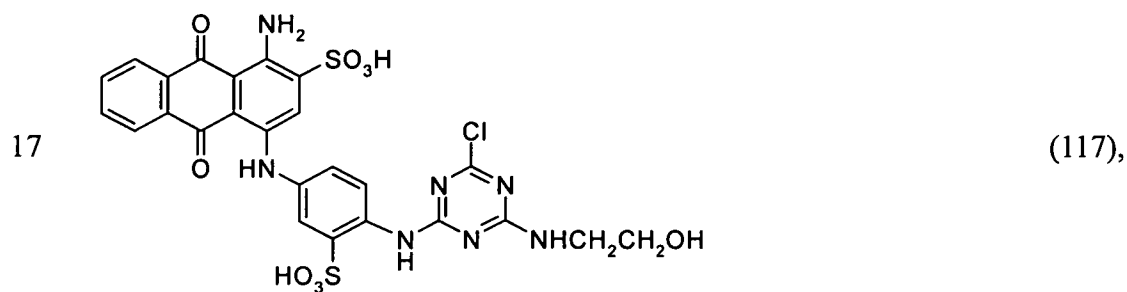


(115),

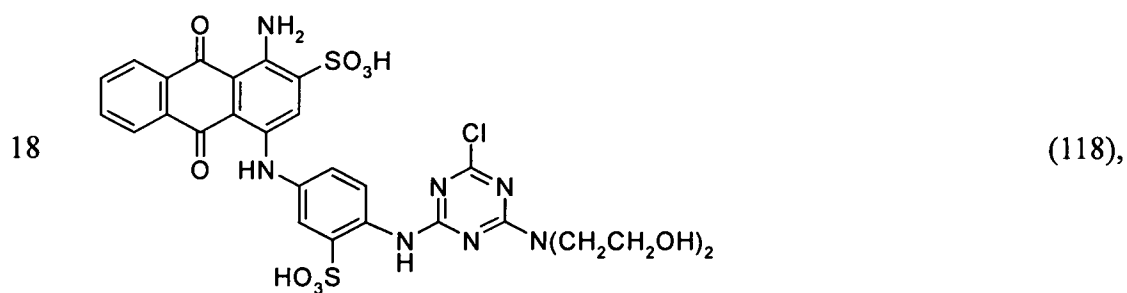
 $(\lambda_{\max}: 586 \text{ nm})$



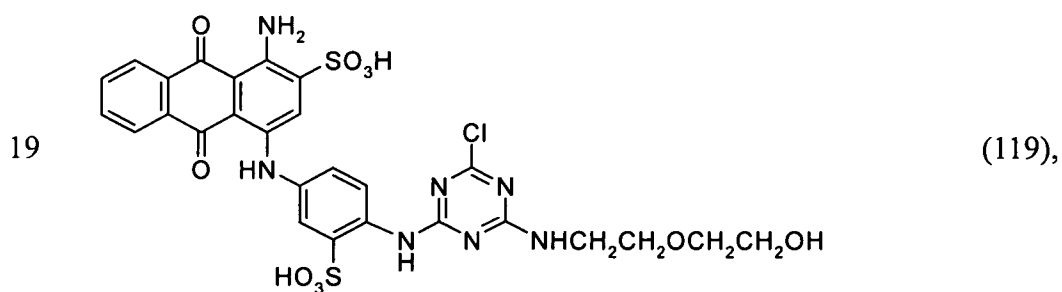
($\lambda_{\max}$: 588 nm)



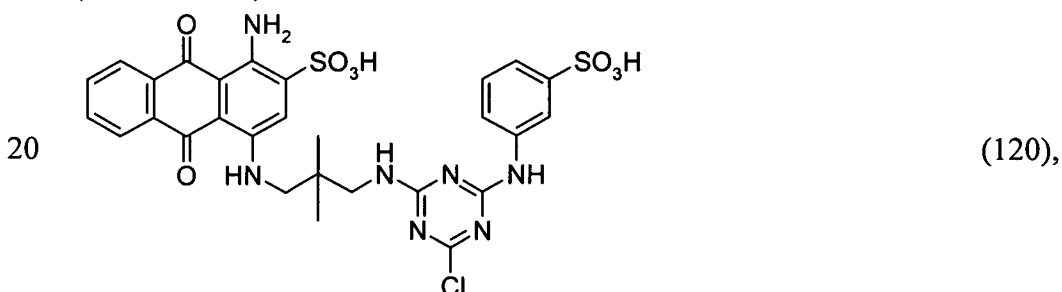
($\lambda_{\max}$: 622 nm)

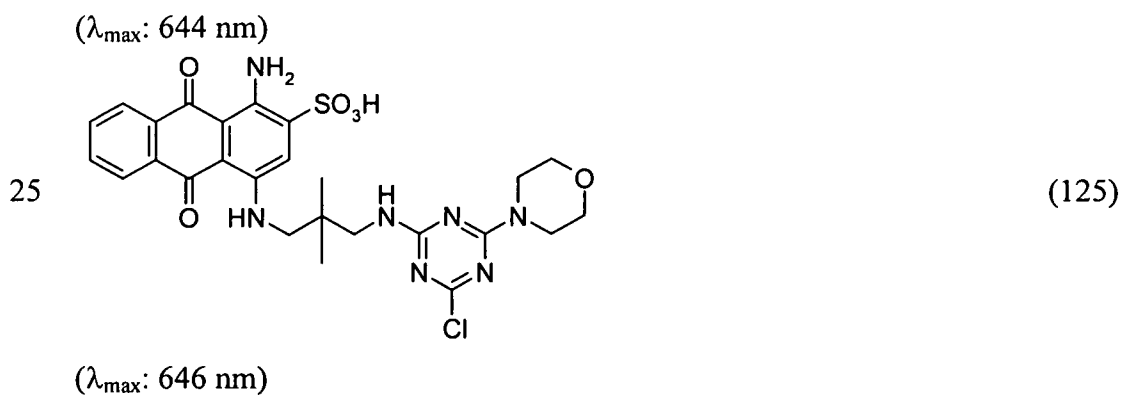
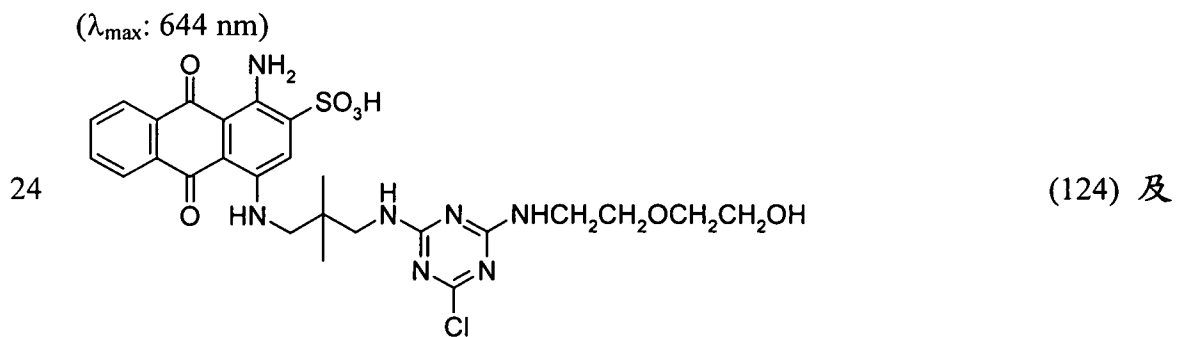
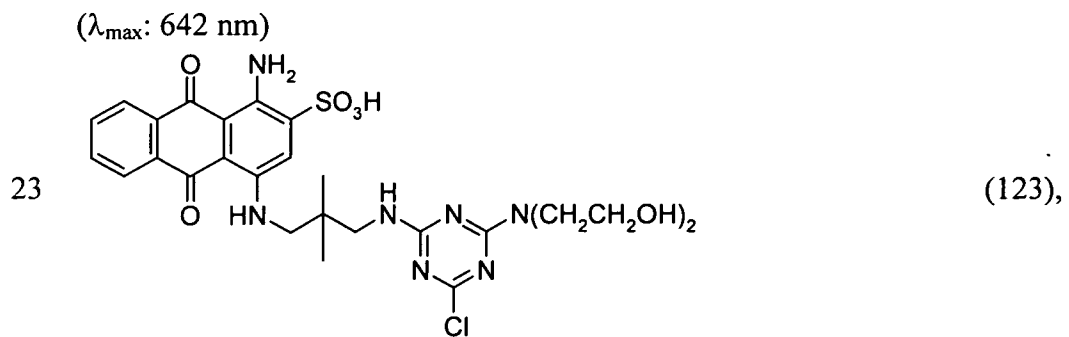
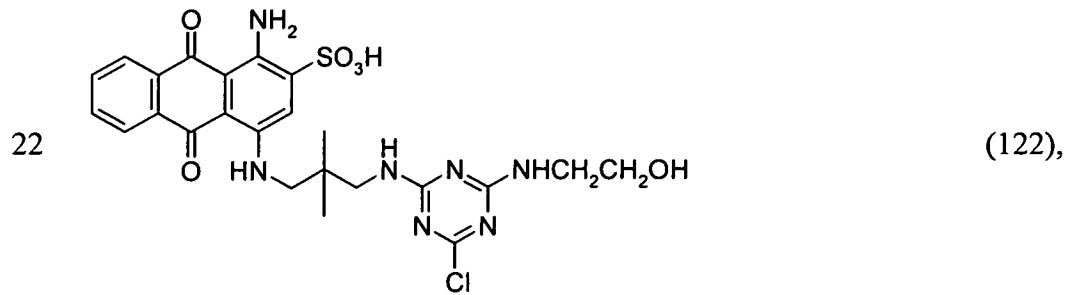
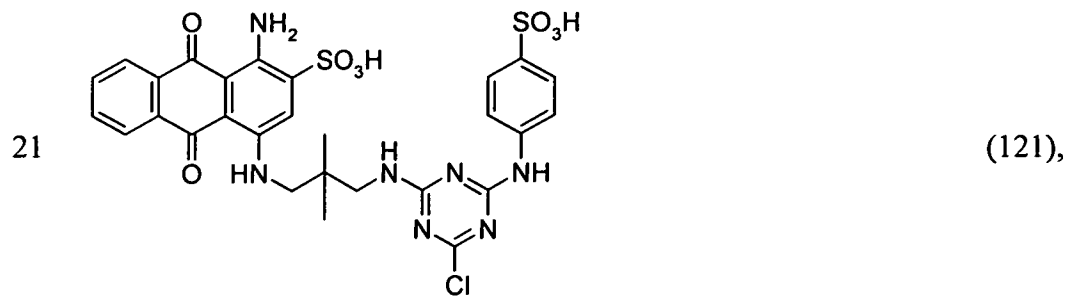


($\lambda_{\max}$: 624 nm)



($\lambda_{\max}$: 622 nm)





吸附劑的製備

實施例 26(用於經直接固著的吸附劑合成之一般草案)

將瓊脂糖凝膠(6 %交聯[CL], 3 克)以水(70 毫升)清洗, 然後加至一染料-配位體(30-60 微莫耳)水溶液(3-9 毫升)中。混合物被震盪 5 分鐘, 然後添加 220 克/升的氯化鈉溶液(0.6 毫升)。經另外 30 分鐘的震盪後, 碳酸鈉(1.5 克)被緩慢地加入上述懸浮液, 且在 60°C 下以 180 rpm 被溫和地震盪 2-16 小時。混合物被允許冷卻、過濾, 且固態物被依次地以水(300 毫升)、1 莫耳濃度(M)氯化鈉水溶液(150 毫升)、體積比 1:1 的 DMSO-水(30 毫升)、1 莫耳濃度氯化鈉水溶液(150 毫升)、各為 pH 3 及 pH 9 的緩衝液(90 毫升)及水(300 毫升)清洗。曬乾的吸附劑在 4°C 下被儲存於體積比 20 %的甲醇之中。

藉使用差異分析(在濾過物中未反應的染料)或根據以下步驟的凝膠分析計算染料-配位體的密度。

吸附劑(0.1 克, 過濾後的潮濕重)在 40°C 下於 6 莫耳濃度鹽酸(25 毫升)中被消化 1 小時, 然後吸附劑的配位體密度, 係藉一具有已知量染料-配位體的標準溶液之方式, 從鹽酸消化物的吸收值(在最大吸收波長 $\lambda_{\max}$)中而被估算。

在一些實例中氫氧化鈉被用為取代碳酸鈉的鹼, 且時間亦被改變。

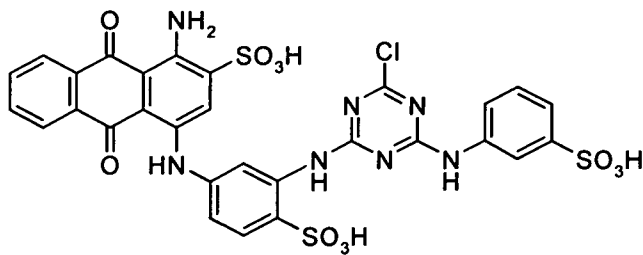
結果顯示於表 1。

表一：直接固著

樣品	瓊脂糖	染料化學式	鹼	處理時間	染料-配位體密度 [$\mu\text{mol/g}$]
BS -101	6 % CL	(105)	Na_2CO_3	2 h	7.9
BS -102	4 % CL	(105)	Na_2CO_3	2 h	8.9
BS -103	6 % CL	(108)	Na_2CO_3	2 h	4.3
BS -104	6 % CL	(201)	Na_2CO_3	2 h	8.0
BS -105	4 % CL	(201)	Na_2CO_3	2 h	12.7
BS -106	6 % CL	(110)	Na_2CO_3	2 h	5.3
BS -107	6 % CL	(109)	Na_2CO_3	2 h	7.6
BS -201	6 % CL	(104)	Na_2CO_3	4 h	2.4
BS -301	6 % CL	(103)	Na_2CO_3	16 h	8.1
BS -302	6 % CL	(115)	Na_2CO_3	2 h	6.0
BS -109	6 % CL	(106)	NaOH	4 h	8.9
BS -305	6 % CL	(114)	NaOH	4 h	1.7
BS -306	6 % CL	(116)	NaOH	16 h	5.5
BS -401	6 % CL	(117)	Na_2CO_3	2 h	5.7
BS -402	6 % CL	(119)	Na_2CO_3	2 h	7.5
BS -404	6 % CL	(120)	Na_2CO_3	16 h	5.0
BS -203	6 % CL	(111)	Na_2CO_3	4 h	5.5
BS -204	6 % CL	(112)	Na_2CO_3	4 h	6.2
BS -205	6 % CL	(113)	Na_2CO_3	16 h	6.8
BS -113	6 % CL	(107)	Na_2CO_3	2 h	4.5
BS -501	6 % CL	(101)	Na_2CO_3	4 h	6.0
BS -502	6 % CL	(125)	NaOH	4 h	7.1
BS -503	6 % CL	(121)	Na_2CO_3	4 h	4.9
BS -504	6 % CL	(122)	Na_2CO_3	4 h	3.7
BS -408	6 % CL	(118)	Na_2CO_3	16 h	6.2

實施例 27(用於經直接固著的吸附劑合成之一般草案)

將瓊脂糖凝膠(6 %交聯，3 克)以水(70 毫升)清洗，然後加至一具有下式的染料-配位體(0.0465 克，60 微莫耳)水溶液(3 毫升)中。



(201)

混合物被震盪 5 分鐘，然後添加 220 克/升的氯化鈉溶液(0.6 毫升)。經另外 30 分鐘的震盪後，碳酸鈉(1.5 克)被緩慢地加入上述懸浮液，且在 60°C 下以 180 rpm 被溫和地震盪 2 小時。混合物被允許冷卻、過濾，且固態物被依次地以水(300 毫升)、1 莫耳濃度氯化鈉水溶液(150 毫升)、體積比 1:1 的 DMSO-水(30 毫升)、1 莫耳濃度氯化鈉水溶液(150 毫升)、各為 pH 3 及 pH 9 的緩衝液(90 毫升)及水(300 毫升)清洗。曬乾的吸附劑在 4°C 下被儲存於體積比 20 % 的甲醇之中。

吸附劑(0.1 克，過濾後的潮濕重)在 40°C 下於 6 莫耳濃度鹽酸(25 毫升)中被消化 1 小時，然後吸附劑之配位體密度，從鹽酸消化物的吸收值中(在最大吸收波長 $\lambda_{\max}$)被估計為 8.0 微莫耳/克曬乾的凝膠。

實施例 27 係為了說明的目的。具有式(201)的染料-配位體係被排除於根據本發明之通式(1)的範圍之外。

實施例 28(用於經分隔基的吸附劑合成之一般草案)

將瓊脂糖凝膠(6 %交聯，14 克)以水(300 毫升)清洗，然後立即地懸浮於適當的圓底瓶或錐形瓶內的水中。添加

環氧氯丙烷(6.72 到 25.2 毫莫耳)，接著是等量的氫氧化鈉(6.72 到 25.2 毫莫耳)，然後反應堆在 27°C 下以 150rpm 被震盪 3 小時。懸浮液接著被過濾、以水(850 毫升)徹底地清洗，然後被曬乾而得到環氧基活化的(epoxy-activated)瓊脂糖。

將環氧基活化的瓊脂糖(13 克)加至一 1,6-二胺基烷(6.24 到 9.36 毫莫耳)的水溶液(52 毫升)中。反應混合物在 27°C 或 45°C 被震盪 4 小時然後過濾。產生的胺基官能化(amino functionalized)凝膠被徹底地以水(750 毫升)清洗並曬乾。

胺基官能化的瓊脂糖(4 克)被懸浮於一染料-配位體(80 毫莫耳)的水溶液(16 毫升)中，接著混合物在 27 攝氏下以 150rpm 被震盪 16 小時。懸浮液被過濾，然後過量的染料-配位體被水(250 毫升)、1 莫耳濃度的氯化鈉(100 到 200 毫升)、體積比 1:1 的 DMSO-水(60 到 80 毫升)、1 莫耳濃度的氯化鈉(100 到 200 毫升)及最後的水(300 毫升)所洗去。曬乾的吸附劑在攝氏 4 度下被儲存於體積比 20 % 的甲醇之中。

藉使用差異分析(在濾過物中未反應的染料)或根據以下步驟的凝膠分析計算染料-配位體的密度。

吸附劑(0.1 克，過濾後的潮濕重)在 40°C 下於 6 莫耳濃度鹽酸(25 毫升)中被消化 1 小時，然後吸附劑之配位體密度係藉一具有已知量染料-配位體的標準溶液之方式，從鹽酸消化物的吸收值(在最大吸收波長 $\lambda_{\max}$)中而被估算。

結果顯示於表 2 及 3。

表 2：經分隔基的間接固著

樣品	染料化學式	表氯醇 [mol/g]	己二胺 [mol/g]	染料-配位體密度 [mol/g]
BS-111	(201)	480	480	2.6
BS-112	(110)	480	480	7.7
BS-114	(106)	480	480	3.0
BS-115	(107)	480	480	2.4
BS-116	(108)	480	480	4.1
BS-118	(109)	480	480	6.7
BS-308	(114)	480	480	3.9
BS-309	(115)	480	480	4.7
BS-310	(116)	480	480	3.6
BS-409	(117)	480	480	4.5
BS-410	(118)	480	480	4.3
BS-411	(119)	480	480	4.3
BS-412	(120)	480	480	4.5
BS-505	(101)	480	480	3.6
BS-506	(121)	480	480	3.9
BS-507	(122)	480	480	2.9
BS-211	(104)	720	720	4.5
BS-212	(111)	720	720	3.4
BS-213	(112)	720	720	5.1
BS-214	(113)	720	720	5.1
BS-314	(103)	720	720	10.0
BS-508	(125)	720	720	5.5
BS-124	(105)	1800	480	15.3
BS-125	(106)	1800	480	16.2
BS-126	(107)	1800	480	13.3
BS-219	(104)	1800	480	8.6
BS-220	(111)	1800	480	7.1
BS-221	(112)	1800	480	8.8

6 %交聯(CL)的瓊脂糖被用為所有吸附劑的支撐物

表 3：經分隔基的間接固著

樣品	染料化學式	二胺基烷	染料-配位體密度 [mol/g]
BS-151	(106)	乙二胺	4.4
BS-152	(107)	乙二胺	3.7
BS-153	(109)	乙二胺	5.2
BS-335	(116)	乙二胺	5.1

BS-433	(118)	乙二胺	3.4
BS-434	(120)	乙二胺	1.7
BS-522	(122)	乙二胺	2.9
BS-245	(111)	乙二胺	1.7
BS-246	(112)	乙二胺	2.7
BS-334	(103)	乙二胺	6.3
BS-521	(125)	乙二胺	6.1
BS-148	(106)	丁二胺	7.7
BS-149	(107)	丁二胺	6.5
BS-150	(109)	丁二胺	9.6
BS-333	(116)	丁二胺	9.5
BS-431	(118)	丁二胺	8.4
BS-432	(120)	丁二胺	10.0
BS-520	(122)	丁二胺	6.5
BS-242	(111)	丁二胺	2.8
BS-243	(112)	丁二胺	4.4
BS-332	(103)	丁二胺	10.3
BS-519	(125)	丁二胺	4.5
BS-145	(106)	辛二胺	11.3
BS-146	(107)	辛二胺	10.1
BS-147	(109)	辛二胺	14.8
BS-331	(116)	辛二胺	14.3
BS-429	(118)	辛二胺	12.5
BS-430	(120)	辛二胺	16.0
BS-518	(122)	辛二胺	11.6
BS-239	(111)	辛二胺	5.5
BS-240	(112)	辛二胺	8.4
BS-330	(103)	辛二胺	12.5
BS-517	(125)	辛二胺	11.6

實施例 29(用於經分隔基的吸附劑合成之一般草案)

將瓊脂糖凝膠(6 %交聯，14 克)以水(300 毫升)清洗，然後立即地懸浮於一 100 毫升圓底瓶內的水中。添加環氧氯丙烷(0.6216 克，6.72 毫莫耳)添加，接著是氫氧化鈉(0.268 克，6.72 毫莫耳)，然後反應混合物在 27°C 下以 150rpm 被震盪 3 小時。懸浮液接著被過濾、以水(850 毫升)徹底地清洗，然後被曬乾而得到環氧基活化的瓊脂糖。

環氧基活化的瓊脂糖(13 克)被加入一 1,6-二氨基己烷(0.7612 克, 6.56 毫莫耳)的水溶液(52 毫升)中。反應混合物在 27°C 被震盪 4 小時然後過濾。產生的胺基官能化的凝膠被徹底地以水(750 毫升)清洗並曬乾。

胺基官能化的瓊脂糖(4 克)被懸浮於一具有式(106)的染料-配位體(0.0537 克, 81.1 微莫耳)水溶液(16 毫升)中, 接著反應混合物在 27°C 下以 150rpm 被震盪 16 小時。反應混合物被過濾, 然後過量的染料-配位體被水(250 毫升)、1 莫耳濃度的氯化鈉(100 毫升)、體積比 1:1 的 DMSO-水(60 毫升)、1 莫耳濃度的氯化鈉(100 毫升)及最後的水(250 毫升)所洗去。曬乾的吸附劑在攝氏 4 度下被儲存於體積比 20 %的甲醇之中。

吸附劑(0.1 克, 過濾後的潮濕重)在 40°C 下於 6 莫耳濃度鹽酸(25 毫升)中被消化 1 小時, 然後吸附劑之配位體密度, 從鹽酸消化物的吸收值中(在最大吸收波長 $\lambda_{\max}$)被估計為 3.0 微莫耳/克曬乾的凝膠。

生化材料的純化

用來決定其在蛋白質純化的有效性之吸附劑測試, 主要係以兩種類型的酵素被完成。代表性的氧化還原酶及水解酶類型之酵素係被用來評估吸附劑的效力。這些蛋白質實例包括氧化酵素(laccase)、NADP-麩胺酸去氫酶(NADP-GDH)(S. Noor 及 N. S. Punekar, *Microbiology*, 2005, 151, 1409)、精胺酸酶及胰蛋白酶。要不是胰蛋白酶, 所有其它

的酵素係源於真菌。

所有吸附劑的篩選，係在一批次鍵結(batch-binding)及沖提的模式中被完成。帶有其結構差異的吸附劑係為選擇性的，且顯然區別於被測試的不同蛋白質之間。例如，在一組平衡條件下，NADP-GDH 被選擇性地鍵結至 BS-212 及 BS-213。這其中之一可被用於按比例增大的純化中。然而此 NADP-GDH 並不會鍵結被廣泛使用的三氮雜苯染料 Cibacron Blue 3GA(S. Subramanian, *CRC Critical Rev. Biochem.*, 1984, 16, 169)。

表 4：直接固著：選定的吸附劑之測試結果

樣品	經鍵結/沖提的酵素活性 (載荷百分比)	
	氧化酵素	NADP-GDH
BS-101	33	27
BS-103	42	07
BS-104	00	11
BS-106	42	05
BS-107	17	29
BS-113	09	21
BS-201	18	06
BS-203	09	00
BS-204	18	00
BS-205	00	26
BS-301	08	08
BS-302	24	06
BS-305	31	00
BS-306	00	04
BS-401	16	00
BS-402	24	00
BS-403	16	11
BS-404	31	00
BS-408	42	00
BS-501	37	09
BS-502	00	00
BS-503	23	06
BS-504	44	00

表 5：間接固著(ECH-DAH 分隔基)：選定的吸附劑之

測試結果

樣品	經鍵結/沖提的酵素活性 (載荷百分比)	
	氧化酵素	NADP-GDH
BS-111	50	21
BS-112	25	20
BS-114	59	23
BS-115	75	17
BS-116	76	19
BS-118	85	05
BS-211	82	70
BS-212	90	77
BS-213	96	57
BS-214	96	59
BS-308	78	10
BS-309	80	07
BS-310	83	07
BS-314	92	14
BS-409	69	12
BS-410	81	14
BS-411	83	00
BS-412	69	25
BS-505	82	00
BS-506	83	00
BS-507	85	00
BS-508	78	57

表 6：間接固著(ECH-DAE、ECH-DAB、ECH-DAO 分

隔基)：測試結果

樣品	經鍵結/沖提的酵素活性 (載荷百分比)	
	氧化酵素	精胺酸酶
BS-151	34	47
BS-152	36	46
BS-153	21	37
BS-335	30	64
BS-433	30	72
BS-434	25	71
BS-522	36	55
BS-245	23	44
BS-246	13	72

BS-334	23	65
BS-521	36	42
BS-148	74	40
BS-149	83	42
BS-150	71	38
BS-333	41	55
BS-431	39	64
BS-432	42	67
BS-520	57	51
BS-242	56	54
BS-243	42	62
BS-332	48	56
BS-519	51	44
BS-145	77	35
BS-146	94	43
BS-147	69	32
BS-331	42	56
BS-429	53	63
BS-430	45	69
BS-518	54	50
BS-239	60	48
BS-240	64	64
BS-330	40	55
BS-517	52	39

實施例 30：一般步驟 (*Aspergillus terreus* NADP-麩胺酸去氫酶)

真菌被培養於基本培養基之上(使用硝酸根作為氮的來源)直到中對數期，然後藉過濾收集菌絲體。來自這些細胞未加工的 NADP-GDH 萃取物，被調配於 pH 7.5 的萃取緩衝液之中(100 毫莫耳濃度磷酸根、1 毫莫耳濃度 PMSF、1 毫莫耳濃度 EDTA、4 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇)。其 30-70 % 的硫酸銨部份在 G-25 母體上被除去鹽分，且被用於檢驗。活性係藉連續的 NADPH 氧化反應而在 340 奈米被監控。一活性單位(U)係被定義為在 1 毫升的標準檢體中，每分鐘被氧化 1 微莫耳的 NADPH。在所有的鍵結研究中，大約 100

毫活性單位(mU)的 NADP-GDH 試樣被採用於親和性樹脂之上。

微量離心管批次模式(Microfuge tube batch-mode)：吸附劑(0.3 毫升，填裝後體積)與 pH 7.5 的層析緩衝液(20 毫莫耳濃度磷酸根、1 毫莫耳濃度 EDTA、4 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇)，於一 1.5 毫升的 Eppendorf 管中一起被平衡。未加工的 NADP-GDH 試樣(~100 毫活性單位於約 100 微升之中)被塗在此母體之上，然後被培養於冰上 15 分鐘。未鍵結的部份藉離心(1000 rpm，2 分鐘)而被收集為上清液。母體被 0.5 毫升同樣的緩衝液清洗兩次。鍵結的蛋白質在同樣的緩衝液中，藉著離心而被沖提(先使用 0.3 毫莫耳濃度 KCl，接著使用 0.5 毫莫耳濃度 KCl)兩次(每次 0.4 毫升)。所有的培養係以 10 分鐘的培養時間而被呈現，且所有的操作係在一冷卻的微量離心機之中。

關於被測試的三種酵素活性，該吸附劑顯現不同的鍵結/沖提模式。它們的確提供了一活性範圍，能夠藉著差異性的鍵結而區別不同的蛋白質。

實施例 31：一般步驟：(*Aspergillus niger* 氧化酵素)

未加工的氧化酵素蛋白質，係分離自在 20 毫莫耳濃度的磷酸緩衝液中分生孢子的 *A. niger* 菌絲。其 30-80 % 的硫酸銨部份在 G-25 母體上被除去鹽分，且被用於檢驗。活性藉著連續性的 ABTS 氧化反應而在 436 奈米被監控。一活性單位(U)係被定義為在 1 毫升的標準檢體中，每分鐘

被氧化 1 微莫耳的 ABTS。在所有的鍵結研究中，大約 5 毫活性單位 (mU) 的氧化酵素試樣被採用於親和性樹脂之上。

- (a) 微旋管柱模式 (Micro-spin column mode)：親和性樹脂 (0.25 毫升，填裝後體積) 與 20 毫莫耳濃度的磷酸緩衝液 (pH 7.0) 於一微旋管柱中一起被平衡。未加工的氧化酵素試樣 (~5 毫活性單位於約 100 微升之中) 被塗在此母體之上，然後被培養於冰上 15 分鐘。未鍵結的部份藉離心 (1000 rpm，2 分鐘) 而被收集。母體進一步被 0.3 毫升磷酸緩衝液清洗。鍵結的蛋白質在同樣的緩衝液中，藉著離心而被沖提 (使用 0.6 莫耳濃度 KCl) 兩次 (每次 0.3 毫升)。
- (b) 微量離心管批次模式 (Microfuge tube batch-mode)：吸附劑 (0.3 毫升，填裝後體積) 與 20 毫莫耳濃度磷酸緩衝液 (pH 7.0) 於一 1.5 毫升的 Eppendorf 管中一起被平衡。未加工的氧化酵素試樣 (~5 毫活性單位於約 100 微升之中) 被塗在此母體之上，然後被培養於冰上 15 分鐘。未鍵結的部分藉離心 (1000 rpm，2 分鐘) 而被收集為上清液。母體被 0.5 毫升同樣的磷酸緩衝液清洗兩次。鍵結的蛋白質在同樣的緩衝液中，藉著離心而被沖提 (使用 0.6 莫耳濃度 KCl) 兩次 (每次 0.4 毫升)。所有的培養係以 10 分鐘的培養時間而被呈現，且所有的操作係在一冷卻的微量離心機之中。

實施例 32：一般步驟：(*Aspergillus niger* 精胺酸酶)

真菌被培養於基本培養基之上(使用精胺酸作為氮的來源)直到中對數期，然後藉過濾收集菌絲體。來自這些細胞未加工的精胺酸酶萃取物，被調配於 pH 7.5 的萃取緩衝液之中(200 毫莫耳濃度咪唑的鹽酸鹽、1 毫莫耳濃度 PMSF、12 毫莫耳濃度硫酸錳(II)、2 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇)。酵素被增殖於一 DEAE 管柱之上，且其活性部份被混合、帶至 70 %的硫酸銨而沈澱其酵素活性。此酵素粒被溶解於一 pH 7.5 的緩衝液(25 毫莫耳濃度 Hepes-NaOH、1.2 毫莫耳濃度硫酸錳、2 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇、20 %甘油)之中。此試樣被稀釋於一 pH 7.5 的緩衝液 (25 毫莫耳濃度咪唑的鹽酸鹽、1.2 毫莫耳濃度硫酸錳、2 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇) 之中且被用於檢驗。活性藉著用來估計尿素(在 478 奈米)的 Archibald 法而被監控。一活性單位(U)係被定義為在一標準檢體中，每分鐘產生 1 微莫耳的尿素。在所有的鍵結研究中，大約 300 毫活性單位(mU)的精胺酸酶試樣被採用於親和性樹脂之上。

微量離心管批次模式(Microfuge tube batch-mode)：吸附劑(0.3 毫升，填裝後體積)與 pH 7.5 的層析緩衝液(25 毫莫耳濃度咪唑的鹽酸鹽、1.2 毫莫耳濃度硫酸錳、2 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇)，於一 1.5 毫升的 Eppendorf 管中一起被平衡。未加工的精胺酸酶試樣(~300 毫活性單位於約 100 微升之中)被塗在此母體之上，然後被培養於冰上 15 分鐘。未鍵結的部分藉離心(1000 rpm，2 分鐘)而被收集為上清

液。母體被 0.5 毫升同樣的緩衝液清洗兩次。鍵結的蛋白質在同樣的緩衝液中，藉著離心而被沖提(使用 0.5 莫耳濃度 KCl)兩次(每次 0.4 毫升)。所有的培養係以 10 分鐘的培養時間而被呈現，且所有的操作係在一冷卻的微量離心機之中。

實施例 33：

使用 BS-212 吸附劑之 NADP-GDH(*A. terreus*)純化

真菌被培養於基本培養基之上(使用硝酸根作為氮的來源)直到中對數期，然後藉過濾收集菌絲體。來自這些細胞未加工的 NADP-GDH 萃取物，被調配於 pH 7.5 的萃取緩衝液 A 之中(100 毫莫耳濃度磷酸根、1 毫莫耳濃度 PMSF、1 毫莫耳濃度 EDTA，及 4 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇)。其 30-70% 的硫酸銨部份在 G-25 母體上(柱床體積 20 毫升)被除去鹽分，其中該母體係與帶有 1 毫莫耳濃度 EDTA 及 4 毫莫耳濃度 2-硫醇乙醇之 pH 7.5 的 20 毫莫耳濃度磷酸緩衝液(緩衝液 B)一起被平衡。此去鹽的蛋白質在一低的流速 10 毫升/小時下，被填充於一 20 毫升的 BS-212 管柱之上。該管柱在流速 12 毫升/小時下，被 100 毫升的緩衝液 B 清洗。

鍵結的蛋白質在緩衝液 B 中使用一線性梯度而被沖提(0-0.3 莫耳濃度 KCl，20 毫升+20 毫升)。用於沖提，一流速 18 毫升/小時被維持，且各部份(每份 1.5 毫升)被收集。NADP-GDH 的活性，如前所述藉追蹤在 340 奈米的吸收度變化而被測量。還原胺化檢驗完成於一 1.0 毫升反應容積

中，其含有 pH 8.0 的 100 毫莫耳濃度 Tris-HCl、10 毫莫耳濃度氯化銨、10 毫莫耳濃度 2-氧戊二酸鹽，及 0.1 毫莫耳濃度 NADPH。

結果：填充的十單位 NADP-GDH 活性中，在未鍵結或洗出的部份中無一被回收。大多數的活性被鍵結且可使用上述 KCl 梯度而被沖提(9.5 單位)。此沖提的數據曲線顯示於第 1 圖。藉使用吸附劑的單一步驟而達成的純化，係藉被填充之試樣的不連續膠體電泳(native-PAGE)及洗脫峰(peak fraction)而被監控。第 2 圖為此凝膠的圖片。顯然地 BS-212 吸附劑可實質地增殖 *Aspergillus* NADP-GDH 蛋白質。(第 2 圖中的箭號所示)

【圖式簡單說明】

第 1 圖：使用 KCl 梯度，來自 BS-212 管柱上的 *A. terreus* NADP-GDH 沖提數據曲線圖

第 2 圖：*A. terreus* NADP-GDH 的不連續膠體電泳(7.5 %)

第一行-一去鹽的硫酸銨(30-70 %)部份；

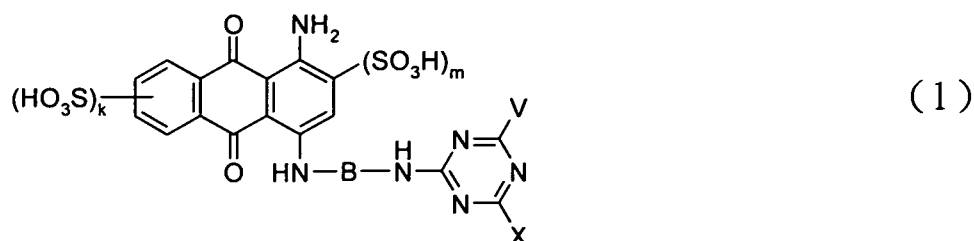
第二行-來自 BS-212 管柱(箭號指示了 NADP-GDH 蛋白質的位置)的洗脫峰蛋白質(第一圖)

【主要元件符號說明】

無

十、申請專利範圍：

1. 一種用於生物材料分離的方法，其中使用一吸附劑，其包含式(1)化合物與基質的反應產物，該基質具有可與該式(1)化合物中的反應性基團反應而形成共價鍵之基團，



其中

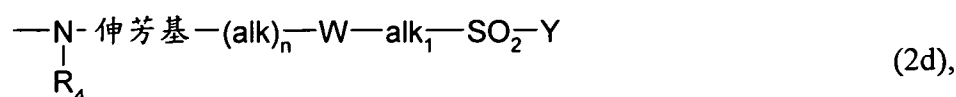
B 係為 C_2 - C_{12} 伸烷基，其可被 1、2 或 3 個選自由 - NR_1 - 或 -O- 所組成群組之基團所中斷，且係未取代或被羥基、磺基、硫酸基、氰基或羧基所取代，

R_1 係為氫或 C_1 - C_4 烷基，或者

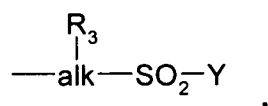
B 係為 C_5 - C_9 伸環烷基、 C_1 - C_4 -伸烷基- C_5 - C_9 -伸環烷基或 C_1 - C_4 -伸烷基- C_5 - C_9 -伸環烷基- C_1 - C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、磺基、鹵素或羧基所取代，或一伸苯基、 C_1 - C_4 -伸烷基-伸苯基或 C_1 - C_4 -伸烷基-伸苯基- C_1 - C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_2 - C_4 烷鹽胺基、磺基、鹵素或羧基所取代，

V 係為一非纖維反應性(non-fibre-reactive)的取代基或為一如下式的纖維反應性(fibre-reactive)的取代基，





其中 R_2 係為氫，或未取代或經取代的 C_1 - C_4 烷基或一基



R_3 係為氫、羥基、磺基、硫酸基、羧基、氰基、鹵素、 C_1 - C_4 烷氧羰基、 C_1 - C_4 烷醯氧基、胺甲醯基或一 $\text{—SO}_2\text{—Y}$ 的基團，

R_4 係為氫或 C_1 - C_4 烷基，

alk 及 alk_1 係個別獨立於另一之直鏈或分支的 C_1 - C_6 伸烷基，伸芳基係為伸苯基或伸萘基，其係未取代或被磺基、羧基、羥基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基或鹵素所取代，

Y 係為乙烯基或一 $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—U}$ 的基且 U 為一離去基， Y_1 係為一 $\text{—CH(Hal)—CH}_2\text{(Hal)}$ 或 —C(Hal)=CH_2 的基團，其中 Hal 係為氯或溴，

W 係為一 $\text{—SO}_2\text{—NR}_4\text{—}$ 、 $\text{—CONR}_4\text{—}$ 或 $\text{—NR}_4\text{CO—}$ 的基團，其中 R_4 係如上所定義，

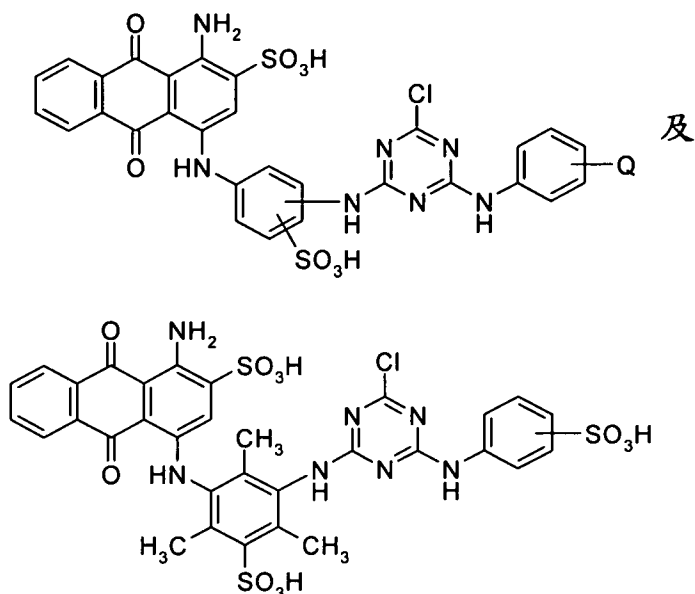
Q 係為一 —O— 或 $\text{—NR}_4\text{—}$ 之基，其中 R_4 係如上所定義，且 n 係

為數字 0 或 1，

X 係為鹵素，且

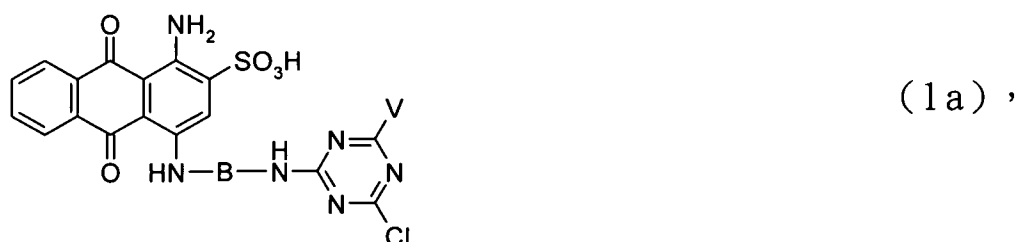
k 及 m 係個別獨立於另一為數字 0 或 1，且 k+m 之總和為 1 或 2，

含有下式化合物之吸附劑除外



其中 Q 係為磺基或羧基。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該式(1)化合物符合具有下式的化合物，

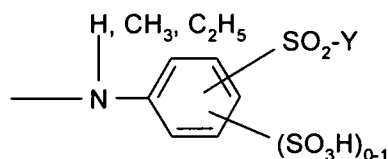


其中

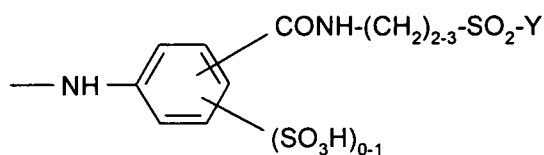
B 係為一 C_2 - C_6 伸烷基、未取代或被 C_1 - C_4 烷基取代的亞甲基-伸環己基，或者一未取代或被 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、鹵素或磺基取代的伸苯基或亞甲基-伸苯基-亞甲基；

V 係為胺基、未取代或在烷基部分中被羥基、硫酸基或磺基所取代，且係未被中斷或被一 -O- 基所中斷的 *N*-單-或 *N,N*-二- C_1 - C_4 烷基胺基、嗎啉基、未取代或在苯環中被磺基、羧基、氯、乙醯胺基、甲基或甲氧基所取代的苯基胺基或 *N*- C_1 - C_4 烷基-*N*-苯基胺基，或未取代或被 1-3 個磺基所取代的萘基胺基，或者

V 係為一具有下式的基團

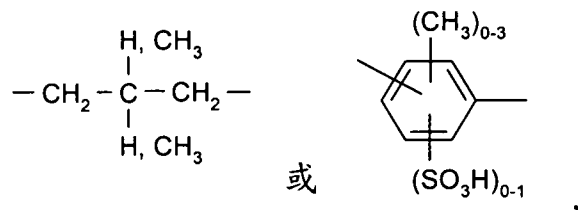


(2c') 或



(2d')。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中 B 係為一基



V 相應為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基、*N,N*-二- β -羥基乙基胺基、 β -磺基乙基胺基、嗎啉基、2-、3-或 4-磺基苯基胺基、1-磺基萘-2-基胺基或 3,7-二磺基萘-2-基胺基，或者

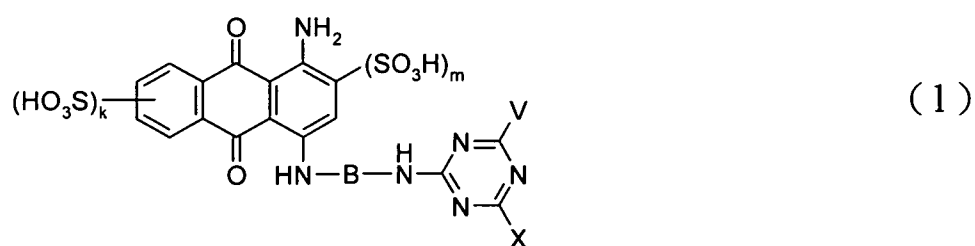
V 係為一如申請專利範圍第 2 項所定義的式 (2c') 或 (2d') 之基團。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項任一項之方法，其中該基

質為一碳水化合物或修飾後的碳水化合物。

5.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該基質為瓊脂糖、交聯的瓊脂糖、右旋葡萄糖、聚葡萄糖，或其修飾後的變體。

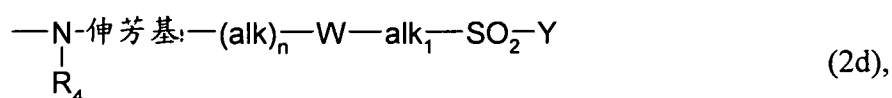
6.一種用於生物材料分離的吸附劑，其包含式(1)化合物與基質的反應產物，該基質具有可與該式(1)化合物中的反應性基團反應而形成共價鍵之基團，



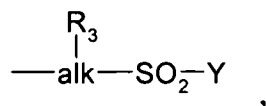
其中

B 係為 C_2 - C_{12} 伸烷基且可被 1、2 或 3 個選自由 - NR_1 -或 -O- 所組成群組之基團所中斷，且係未取代或被羥基、磺基、硫酸基、氰基或羧基所取代， R_1 係為氫或 C_1 - C_4 烷基，或者 B 係為 C_5 - C_9 伸環烷基、 C_1 - C_4 -伸烷基- C_5 - C_9 -伸環烷基或 C_1 - C_4 -伸烷基- C_5 - C_9 -伸環烷基- C_1 - C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、磺基、鹵素或羧基所取代，或一伸苯基、 C_1 - C_4 -伸烷基-伸苯基或 C_1 - C_4 -伸烷基-伸苯基- C_1 - C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_2 - C_4 烷醯胺基、磺基、鹵素或羧基所取代，

V 係為一非纖維反應性(non-fibre-reactive)的取代基或為一如下式的纖維反應性(fibre-reactive)的取代基，



其中 R_2 係為氫，或未取代或經取代的 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基或一基



R_3 係為氫、羥基、磺基、硫酸基、羧基、氰基、鹵素、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷氧羰基、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷鹽氧基、胺甲鹽基或一 $\text{-SO}_2\text{-Y}$ 的基團，

R_4 係為氫或 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基，

alk 及 alk_1 係個別獨立於另一之直鏈或分支的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 伸烷基，伸芳基係為伸苯基或伸萘基，其係未取代或被磺基、羧基、羥基、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷氧基或鹵素所取代，

Y 係為乙烯基或一 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-U}$ 的基且 U 為一離去基， Y_1 係為一 $\text{-CH(Hal)-CH}_2\text{(Hal)}$ 或 -C(Hal)=CH_2 的基團，其中 Hal 係

為氯或溴，

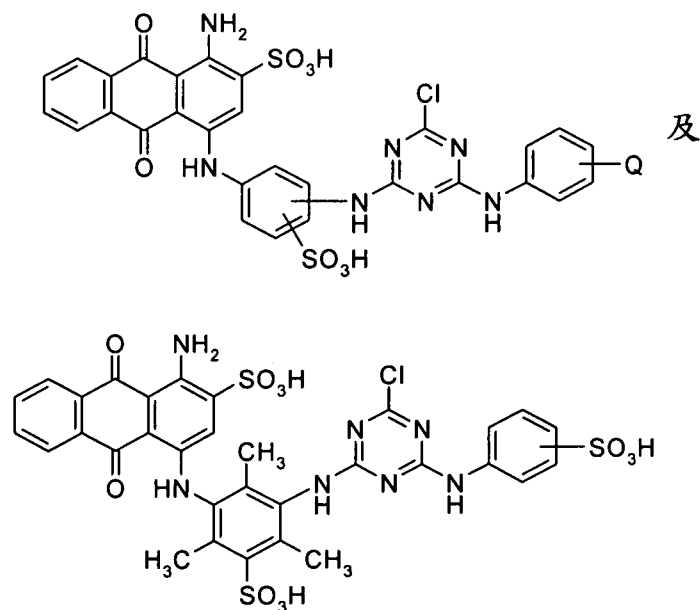
W 係為一 $-\text{SO}_2-\text{NR}_4-$ 、 $-\text{CONR}_4-$ 或 $-\text{NR}_4\text{CO}-$ 的基團，其中 R_4 係如上所定義，

Q 係為一 $-\text{O}-$ 或 $-\text{NR}_4-$ 之基，其中 R_4 係如上所定義，且 n 係為數字 0 或 1，

X 係為鹵素，且

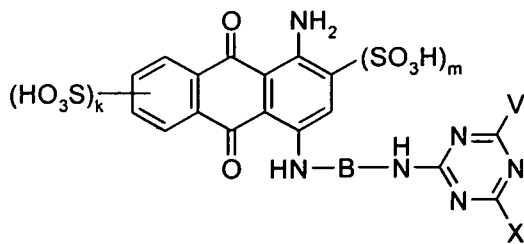
k 及 m 係個別獨立於另一為數字 0 或 1，且 $k+m$ 之總和為 1 或 2，

含有下式化合物之吸附劑除外



其中 Q 係為磺基或羧基。

7. 一種製備如申請專利範圍第 6 項之吸附劑的方法，其包含在一酸鍵結試劑存在的情況下，使一具有下式(1)的化合物與一具有可與該式(1)化合物中的反應性基團反應而形成共價鍵之基團的基質反應，

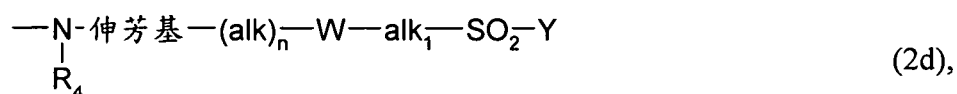


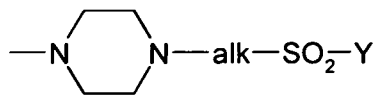
(1),

其中

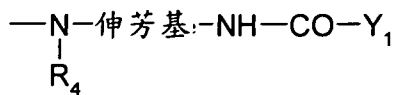
B 係為 C_2-C_{12} 伸烷基且可被 1、2 或 3 個選自由 $-NR_1-$ 或 $-O-$ 所組成群組之基團所中斷，且係未取代或被羥基、磺基、硫酸基、氰基或羧基所取代， R_1 係為氫或 C_1-C_4 烷基，或者 B 係為 C_5-C_9 伸環烷基、 C_1-C_4 -伸烷基- C_5-C_9 -伸環烷基或 C_1-C_4 -伸烷基- C_5-C_9 -伸環烷基- C_1-C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、磺基、鹵素或羧基所取代，或一伸苯基、 C_1-C_4 -伸烷基-伸苯基或 C_1-C_4 -伸烷基-伸苯基- C_1-C_4 -伸烷基，其係未取代或被 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、 C_2-C_4 烷鹽胺基、磺基、鹵素或羧基所取代，

V 係為一非纖維反應性(non-fibre-reactive)的取代基或為一如下式的纖維反應性(fibre-reactive)的取代基，



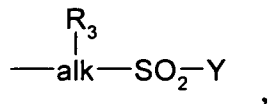


(2e) 或



(2f),

其中 R_2 係為氫，或未取代或經取代的 C_1 - C_4 烷基或一基



R_3 係為氫、羥基、磺基、硫酸基、羧基、氰基、鹵素、 C_1 - C_4 烷氧羰基、 C_1 - C_4 烷醯氧基、胺甲醯基或一 $-\text{SO}_2 - \text{Y}$ 的基團，

R_4 係為氫或 C_1 - C_4 烷基，

alk 及 alk_1 係個別獨立於另一之直鏈或分支的 C_1 - C_6 伸烷基，伸芳基係為伸苯基或伸萘基，其係未取代或被磺基、羧基、羥基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基或鹵素所取代， Y 係為乙烯基或一 $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{U}$ 的基且 U 為一離去基， Y_1 係為一 $-\text{CH}(\text{Hal}) - \text{CH}_2(\text{Hal})$ 或 $-\text{C}(\text{Hal}) = \text{CH}_2$ 的基團，其中 Hal 係為氯或溴，

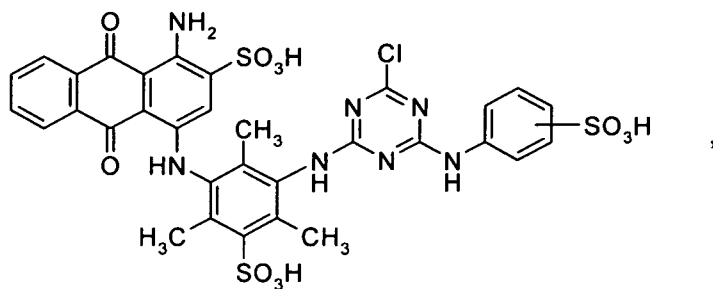
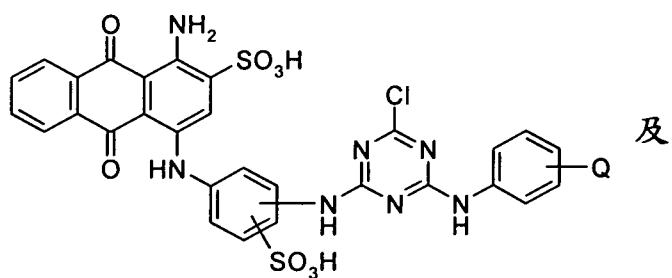
W 係為一 $-\text{SO}_2 - \text{NR}_4 -$ 、 $-\text{CONR}_4 -$ 或 $-\text{NR}_4 \text{CO} -$ 的基團，其中 R_4 係如上所定義，

Q 係為一 $-\text{O} -$ 或 $-\text{NR}_4 -$ 之基，其中 R_4 係如上所定義，且 n 係為數字 0 或 1，

X 係為鹵素，且

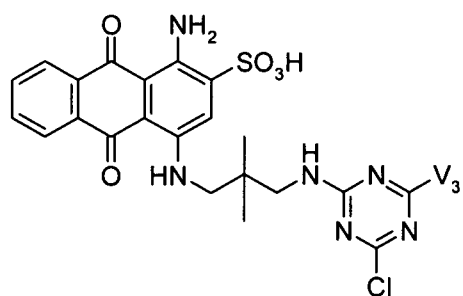
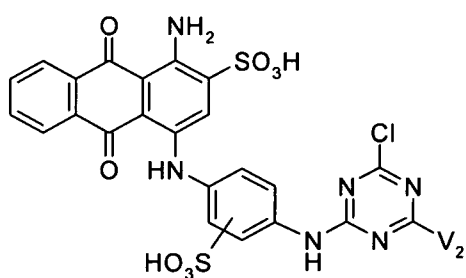
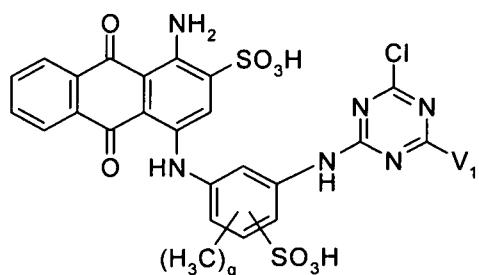
k 及 m 係個別獨立於另一為數字 0 或 1，且 $k+m$ 之總和為 1 或 2，

含有下式化合物之吸附劑除外



其中 Q 係為磺基或羧基。

8. 一種具有下式的化合物，



其中

V_1 係為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基或嗎啉基，

V_2 及 V_3 各獨立於另一為 β -羥基乙基胺基、2-(β -羥基乙氧基)乙基胺基、 N,N -二- β -羥基乙基胺基或嗎啉基，且

q 為數字 0、1、2 或 3，

限制條件為當 q 為 3 時， V_1 不為 β -羥基乙基胺基。

十一、圖式：

如次頁

圖 1

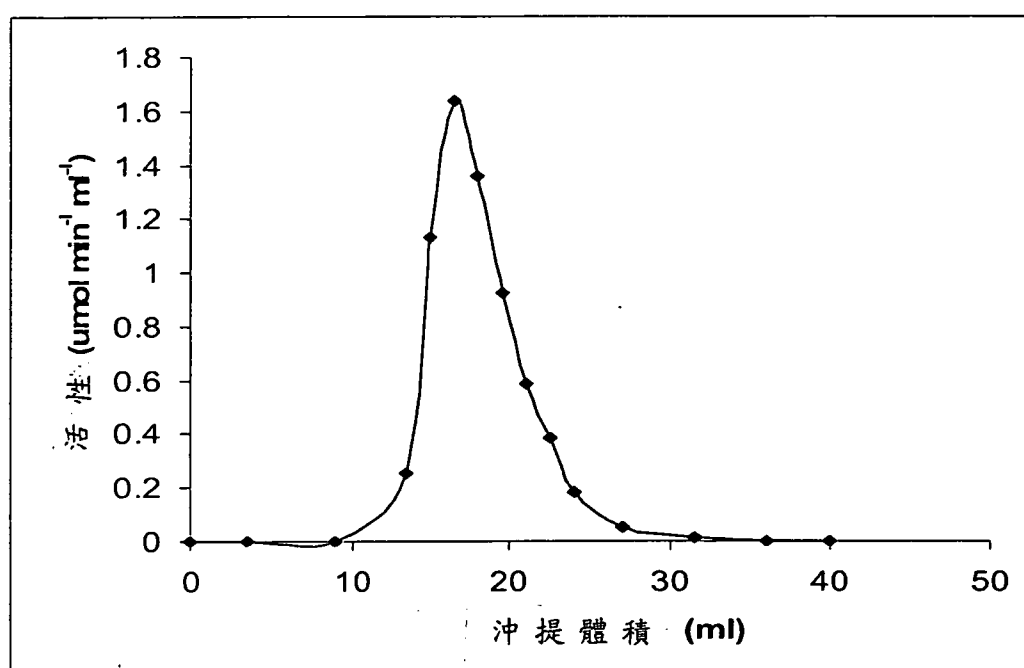


圖 2

