



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102639581 A

(43) 申请公布日 2012.08.15

(21) 申请号 201080054305.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.12.01

C08F 293/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/544 (2006.01)

0921025.3 2009.12.01 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.05.31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2010/002213 2010.12.01

(87) PCT申请的公布数据

W02011/067563 EN 2011.06.09

(71) 申请人 克兰菲尔德大学

地址 英国贝德福德郡

(72) 发明人 S·A·皮尔勒提斯基

A·R·L·古尔雷洛

M·J·维特科姆比

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

分子印迹聚合物的制备

(57) 摘要

在模板物质的存在下进行聚合方法,优选活性自由基聚合方法,以生产分子印迹聚合物(“MIPs”)。该聚合方法受到控制,使得产物非常小(500-106 道尔顿),因而它们是可溶的或者形成胶态悬浮体。模板物质是固定的模板,其可以重复使用。固定的模板对于通过亲和色谱法提纯 MIP 溶液/悬浮体也是有用的。

1. 用于制备呈 MIP 颗粒的溶液或者胶态悬浮体形式的分子印迹聚合物(“MIP”)的方法,包括以下步骤:

(a) 提供载体物质,该载体物质具有固定在其上以使得被暴露在表面的所述模板材料;

(b) 提供与所述表面接触的可聚合组合物;

(c) 实施与所述表面接触的所述可聚合组合物的受控聚合,当能够形成溶液或者胶态悬浮体的 MIP 颗粒已经形成时,终止所述聚合;以及

(d) 从所述表面分离所述 MIP 颗粒。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中在从所述表面分离所述 MIP 颗粒的所述步骤之后,在步骤(b)、(c) 和(d) 中重复使用所述具有固定在其上的所述模板材料的载体物质。

3. 根据权利要求 1 或者权利要求 2 的方法,其中所述载体物质是聚合物树脂、多糖、玻璃或者金属表面。

4. 根据权利要求 1、2 或者 3 的方法,其中所述载体物质呈珠粒、波导管的表面、纤维、包括光学纤维、膜或者毛细管的形式。

5. 根据权利要求 1-4 的任一项的方法,在从所述表面分离所述 MIP 颗粒的所述步骤之后,进一步包括纯化步骤(e),其中(i) 使含有所述分离的 MIP 颗粒的溶液或者悬浮体与载体物质接触,该载体物质具有固定在其上以使得被暴露在表面的所述模板材料,从而使所述 MIP 颗粒结合到所述固定的模板材料,(ii) 从所述载体物质分离未结合的材料;和随后(iii) 从固定的模板材料回收 MIP 颗粒以形成纯化的溶液或者胶态悬浮体。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中在步骤(e) 中使用的所述载体物质如权利要求 3 或者权利要求 4 中所定义,并且与步骤(c) 中使用的载体物质相同或者不同。

7. 根据权利要求 1-6 任一项的方法,其中所述受控聚合是自由基聚合。

8. 根据权利要求 1-6 任一项的方法,其中所述受控聚合选自任选地受控活性自由基聚合(LRP)、活性阴离子聚合、活性阳离子聚合和受控缩聚。

9. 根据权利要求 7 或者 8 的方法,其中所述受控聚合选自引发-转移-终止剂调控聚合、氮氧自由基调控聚合(NMP)、原子转移自由基聚合(ATRP)和可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的方法,其中在步骤(c) 中,终止聚合以产生分子量在 500-1,000,000 道尔顿范围内的可溶性 MIP 颗粒。

11. 根据权利要求 1-9 任一项的方法,其中在步骤(c) 中,终止聚合以产生颗粒尺寸 < 1 微米且在溶液中稳定的胶体颗粒。

12. 根据权利要求 1-11 任一项的方法,其中所述可聚合组合物含有一种或多种选自乙烯基单体、烯丙基单体、炔烃、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、氯丙烯酸酯、衣康酸酯、丙烯酸三氟甲基酯、氨基酸衍生物、核苷、核苷酸和碳水化合物的单体。

13. 根据权利要求 12 的方法,其中所述可聚合组合物还含有至少一种交联剂。

14. 根据权利要求 13 的方法,其中所述至少一种交联剂选自乙二醇二甲基丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、二乙烯基苯、亚甲基双丙烯酰胺、亚乙基双丙烯酰胺和 N, N' - 双丙烯酰基哌嗪。

15. 根据权利要求 1-14 任一项的方法,其中从所述表面分离所述 MIP 颗粒的所述步

骤(d)如下实现:通过加热、改变溶液 pH、改变离子强度的方式,或者通过加入脲、胍或者比 MIP 更强地与模板相互作用的物质。

16. 根据权利要求 1-15 任一项的方法,其中实施受控聚合的所述步骤(c)使用序列聚合,其中在步骤(b)中提供的所述聚合组合物用于第一聚合步骤,之后提供不同的可聚合组合物,并且进行进一步的聚合步骤以产生仍然能够形成溶液或者胶态悬浮体的改性的 MIP 颗粒。

17. 根据权利要求 1-16 任一项的方法,其中在步骤(c)之后,通过洗涤从所述固定的模板材料除去结合差的以及低亲和性的材料,随后在步骤(d)中,将更强的洗脱条件用于洗脱和收集高亲和性颗粒。

18. 根据权利要求 1-17 任一项的方法,其中步骤(c)使用有利于形成可溶性和细胶体颗粒的聚合条件,包括一个或多个如下步骤:稀释单体混合物,在低温进行聚合,加入链终止剂或者加入抑制剂。

19. 根据权利要求 1-18 任一项的方法,其中在步骤(c)中,通过加热、UV 或者可见光辐射、微波照射、电引发聚合、氧化或者加入催化剂引发聚合。

分子印迹聚合物的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及有机合成和高分子化学领域,特别涉及与通过模板定向合成和模板聚合制备有机分子的方法论相关的范围。

背景技术

[0002] 术语“模板定向合成”包括通过基材的化学改性或者通过在模板的存在下偶联两个或者多个分子而形成新物质,其中模板作为新的结构形成的模型。这种方法最有名的例子是基因转录。模板定向合成的一个特别的例子是模板聚合,其中聚合物受体(复制品)的形成在另一种聚合物或者小分子量有机物质(模板)的存在下进行。在引发聚合之前以及在聚合期间,根据模板的尺寸、极性和官能团,单体环绕模板分子自行空间分布(自组装过程)。单体要么聚合成直链要么聚合成刚性三维网络。模板聚合的一个具体例子是分子印迹,基于乙烯基或者丙烯酸单体在模板存在下的聚合(参见参考文献1、2)。传统的方法涉及高度交联的印迹聚合物的生产,该高度交联的印迹聚合物不溶于水性和有机溶剂中。由于它们固有的不溶解性,分子印迹聚合物(MIPs)在药物学和医学中使用的可能性受到限制。

[0003] 最近,已经多次尝试研究用于制备具有相对低分子量的印迹聚合物的方案,该具有相对低分子量的印迹聚合物能够以可溶的或者至少胶状的形式存在。这种形式将允许聚合物作为药物学和医学中的生物活性分子(药物、效应器、调节剂、抑制剂)使用,作为“可塑性抗体”,以代替传感器和亲和性分离中的生物分子以及作为具有酶样性质的催化剂。

[0004] 在一个此类例子中,通过环绕生物受体、酶、核酸、细胞、病毒、微生物体、组织样本或者药物的氨基酸和核苷酸的缩聚来合成 MIP 分子(参见 US 专利 6852818)。在另一个例子中,使用不同的方法来生产低聚和聚合 MIPs (参见 US 专利 6127154)。大部分现有技术中的例子描述高分子量交联聚合物的制备,这需要水解以递送在溶液中稳定的可溶或者胶状颗粒。在一个该类例子中(参见 US 专利 6127154),研究人员使用专门设计的化合物,该化合物含有能够在光照下偶联的光活性全氟苯基叠氮基。在这种情况下,亲和性配体可以作为可溶性颗粒合成。在所有这些情况下,合成的化合物包含许多具有不充分控制的尺寸和性质的级分。其它用于合成具有生物活性的分子的方法描述于 WO 96/40822 和 US 专利 5630978 中,其中在模板印迹聚合物的存在下制备化学化合物,该模板印迹聚合物是在另一种模板的存在下制备的,通常是药物例如肝素。得到的复制品是具有对模板没有亲和性而相反地类似于最初的药物分子本身的结构配体分子。

[0005] 一种生产纳米颗粒的方式是通过使用受控缩合或者添加剂自由基“活性”聚合。活性自由基聚合工艺,例如引发-转移-终止剂聚合、氮氧(nitroxide)自由基调控聚合、原子转移自由基聚合(ATRP)和可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT),为具有相对受控低分子量聚合物的合成打开了新的路线(参见参考文献3-9)。受控/活性聚合技术是基于休眠和活性物质之间的精细平衡,有效地降低了体系中增长的实体的浓度并且将终止的程度最小化。活性聚合可以没有副反应例如终止和链转移,因而可以产生具有良好定义的分子量分布和结构的聚合物。可以将相同的方法应用于共聚物的形成,由此可能通过自由基聚合按

照单体加入的适当顺序生产嵌段共聚物。之前已经将活性聚合用于生产本体接枝 MIPs(参见参考文献 10、11)。通过活性聚合也可以生产可溶性聚合物,而后将其用于 MIP 生产中(参见参考文献 12)。最近受控活性聚合被用于制备 MIP 纳米颗粒(13)。

[0006] 在 MIP 合成中的一个并发问题是需要频繁使用昂贵的和 / 或难于获得的模板,例如蛋白质、一些毒素等,它们在聚合后难以回收并且限制了可以得到的 MIP 的量。理想地应当能够再利用模板以克服这些限制。实现这点的最佳方式是使用以固定的形式的模板。之前已经使用过固定的模板(参见 US 专利 7393909)。这里,模板被固定到二氧化硅表面上,并且在环绕它的孔隙中形成聚合物。通过溶解二氧化硅载体并除去模板,得到各种形态的 MIPs。在 US 7393909 中公开的所有实施例中,承载固定模板的表面在溶解期间消失而不能循环利用。在其它例子中,使用固定的模板生产印迹表面(US 6127154 ;US6458599 ;US 7288415)。公开于这些报导中的承载模板的表面可能可以再生并且再使用若干次。这些方法可以用于生产传感器或者阵列,但是难以适于生产纳米颗粒或者小的可溶性分子。

[0007] 与 MIPs 相关的又一个主要问题是产生的结合位点的不均匀性,这通常是形成高含量的非特异性结合(non-specific binding)的原因。该问题已经通过分别地在带有固定的模板的柱上生产的 MIP 纳米颗粒的亲水性分离而得以纠正(13)。显然为了亲水性分离成为可能,MIPs 应当呈合适的形式,优选呈纳米颗粒的形式。

[0008] 本发明通过提出两种工艺的结合解决了所有这些与高性能交联 MIP 纳米颗粒的发展相关的问题:(i) 在承载固定的模板的表面的存在下进行受控聚合,任性地受控自由基聚合,以形成印迹纳米颗粒,以及(ii) 通过与固定的模板的亲水性相互作用保留纳米颗粒,用于选择和提纯目的。

[0009] 在以下参考文献中可以找到背景材料:

[0010] 1. Wulff, G. Makromol. Chem. Macromol. Symp., 1993, 70/71, 285。

[0011] 2. Vlatakis, G. ;et al. Nature, 1993, 361, 645。

[0012] 3. Moad, G. ;Rizzardo E. ;Solomon, D. H. Macromolecules 1982, 15, 909;

[0013] 4. Matyjaszewski, K. ;Xia, J. Chem. Rev. 2001, 101, 2921。

[0014] 5. Kamigaito, M. ;Ando, T. ;Sawamoto, M. Chem. Rev. 2001, 101, 3689。

[0015] 6. Hawker, C. J. ;Bosman, A. W. ;Harth, E. Chem. Rev. 2001, 101, 3661。

[0016] 7. Fischer, H. Chem. Rev. 2001, 101, 3581。

[0017] 8. Otsu, T. ;Matsumoto, A. Adv. Polym. Sci. 1998, 136, 75-137。

[0018] 9. Moad, G. ;et al. Polym. Int. 2000, 49, 993-1001。

[0019] 10. Ruckert, B. ;Hall, A. J. ;Selligren B. J. Mater. Sci. 2002, 12, 2275。

[0020] 11. Hattori, K. ;et al. J. Membr. Sci. 2004, 233, 169。

[0021] 12. Li, Z. ;Day, M. ;Ding, J. F. ;Faid, K. Macromolecules. 2005, 38, 2620。

[0022] 13. Guerreiro A. R. , Chianella I. , Piletska E. , Whitcombe M. J. , Piletsky S. A. (2009). Biosens. Bioelectron. , 24, 2740-2743。

[0023] 14. Jagur-Grodzinski, J. Reactive & Functional Polymers. 2001, 1, 1。

[0024] 15. Shim, S. E. et al. Macromolecules. 2003, 36, 7994-8000。

[0025] 16. Yu, Q. ;Zeng, F. ;Zhu S. Macromolecules. 2005, 34, 1612。

[0026] 17. US Patent 7019072-Method of preparing latex for coating paper, 2006。

[0027] 引用的专利

[0028]

| 专利号 | 地区 | 公告日期 | 名称 |
|-------------|-----|------------|-------------------------------|
| US6,852,818 | US | 08-02-2005 | 通过模板聚合生产的分子印迹聚合物 |
| US6,127,154 | US | 03-10-2000 | 具有与要求的分子实体互补结构的化合物的直接合成方法及其用途 |
| WO96/40822 | PCT | 19-12-1996 | 通过分子印迹制备生物学活性分子 |
| US5,630,978 | US | 20-05-1997 | 通过分子印迹制备生物学活性分子 |
| US7,393,909 | US | 01-07-2008 | 多孔分子印迹聚合物及其制备方法 |
| US6,458,599 | US | 01-10-2002 | 组合物和用于捕获、分离、检测、分析和定量大分子的方法 |
| US7,288,415 | US | 30-10-2007 | 组合物和用于捕获、分离、检测、分析和定量大分子的方法 |

发明内容

[0029] 根据本发明,提供了一种用于制备呈 MIP 颗粒的溶液或者胶态悬浮体形式的分子印迹聚合物(“MIP”)的方法,包括以下步骤:(a)提供载体物质,该载体物质具有固定在其上以使得被暴露在表面的所述模板材料;(b)提供与所述表面接触的可聚合组合物;(c)实施与所述表面接触的所述可聚合组合物的受控聚合,当能够形成溶液或者胶态悬浮体的 MIP 颗粒已经形成时,终止所述聚合;以及(d)从所述表面分离所述 MIP 颗粒。胶态悬浮体期望地是稳定的。它期望地由小于 1 微米的精细颗粒组成。

[0030] 本发明涉及应用受控聚合,任选地受控自由基聚合,其在用于生产可溶性或者胶态交联的 MIP 颗粒的固定的(凸面的)模板存在下进行。

[0031] 本发明优选的实施方式可以提供一种或者多种以下优点:

[0032] 1. MIP 纳米颗粒可以使用自动方案(通过机器)合成。

[0033] 2. 合成的 MIPs 不含模板,模板仍然结合到固体表面。

[0034] 3. 在 MIP 制备期间可以使用任何溶剂。

[0035] 4. MIP 合成、分离和纯化过程非常快(分钟到几小时)。

[0036] 5. 模板没有浪费,并且 MIP 合成方法可以重复若干次(这降低了 MIP 制备中用于昂贵模板的费用)。

[0037] 6. 当进一步官能化仍然在固定的模板上的合成的颗粒时,可以加入额外的步骤,例如通过加入荧光标记或者非粘合剂涂层。

[0038] 7. 有可能控制合成的颗粒的尺寸。

[0039] 8. 有可能分级合成的纳米颗粒并收集具有不同亲和性的级分。

[0040] 在这里描述的方法中, MIPs 是在固定的模板的存在下使用受控聚合,任选地受控自由基聚合技术而生产。用于通过受控聚合生产纳米颗粒的各种工艺,对于熟悉该领域的专家来说是已知的。聚合反应在合成分子的尺寸相对小的阶段终止。此类方法的产品可以以可溶的或者稳定的胶态形式存在于溶液中或者悬浮体中。根据本发明的 MIPs 的胶态悬浮体或者溶液可以是水性的或者有机液体。

[0041] 合成的分子具有与最初的模板互补的结构,并且能够以适度高亲和性与它结合。为了解释,本发明中“高亲和性”和“高性能”MIPs 定义为亲和性超过通常相应的空白聚合物亲和性至少 3 倍、优选至少 5 倍的这些聚合物,名称“空白”聚合物指的是在没有模板存在下进行的用于形成 MIP 的聚合方法的产物。这些合成分子(聚合物和低聚物)具有预定的亲和性和特征、比随机合成的聚合物高的活性并且比专门设计的分散有机结构更加容易制备。如这里描述的,形成 MIPs 的聚合方法可能是不完美的并且导致高和低亲和性颗粒的形成(例如形成于模板不存在的溶液中)。高亲和性颗粒可以选择性地结合(并且稍后回收)至带有固定的模板的表面,这使得它们与低亲和性颗粒分离。带有固定的模板的表面可以是与在 MIPs 的形成中使用的相同的表面,或者它们可以是分开的带有固定模板的表面(例如在分开的柱内部含有的)。这里提及的表面可以是亲和柱、传感器设备、微流体器件、微芯片、电抗器、珠粒、纤维、套管或井(wells)、微孔板、膜、过滤器、纹孔、纳米结构、囊泡、胶囊等等的表面。表面可以是固体、半固体、液体或者流体(如在胶束或者界面的情况下)。任选地可以进一步使用附加的(一个或多个)柱筛选颗粒,以选择出颗粒的亚级分,所述颗粒对潜在的干扰物化合物的不具有亲和性。可以使用相似的方法选择颗粒的亚级分,所述颗粒另外对模板的一种或者多种同系物具有亲和性,以生产“分类(class-selective)”粘结剂。

[0042] 如在本发明中描述的合成的分子(二聚物、低聚物、聚合物或者其混合物),可以用作药物学和医学中的药物,作为分析化学(传感器、检测)中的受体特异性配体,在生物工艺学、药物学和食品工业中用于分离,在合成中作为催化剂,或者在检测、传感器中作为酶的替代品,以及其它用途例如洗液粉末。之前在药物设计方面的努力典型地基于大量化学结构的结构活性相互关系的繁重研究。本发明描述了更简单和更直接的方法——受控聚合,任选地受控自由基聚合,用于在固定的模板的存在下形成交联的 MIP 纳米颗粒,以设计生物学上的活性物质,这将具有重要益处(与传统的药物设计和发现方法相比),以及对于亲和性分离、传感器和催化作用有用的配体。

[0043] 本发明的重要方面包括:(1). 在固定的模板存在下,通过受控聚合、任选地受控自由基聚合合成交联的 MIP 纳米颗粒,其中模板可以是生物受体、核酸、细胞、孢子、病毒、微生物、组织样品、碳水化合物、低聚糖、多糖、肽、核蛋白、粘蛋白、脂蛋白、合成蛋白、糖蛋白、葡糖胺聚糖、甾类、免疫抑制剂、激素、肝素、抗生素、维生素、病理或疾病状态的生物标记、毒素、杀虫剂、除草剂、炸药、神经毒剂、污染物、内分泌干扰化合物、核苷酸、核苷、低聚核苷酸、代谢物、次级代谢产物、药物代谢物、药物中间体或药物。这一清单不是意在限制而是一些潜在种类的模板的代表,本领域技术人员将理解其充分程度。

[0044] (2). 优化反应条件以产生具有相对小尺寸的颗粒。

[0045] (3). 由官能单体合成分子包括生物学上活性的分子,其中官能单体包括一种或者多种:乙烯基单体、烯丙基单体、炔烃、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、氯代丙烯酸酯、衣康酸酯、丙烯酸三氟甲基酯、氨基酸的衍生物、核苷、核苷酸以及碳水化合物。

[0046] (4). 通过发生在用于制备 MIP 的带有固定的模板的相同表面上或者不同的也含有固定的模板或者模板类似物的表面上的亲和相互作用,保留合成的高亲和性颗粒。

[0047] (5). 序列聚合,当用其它类型的分子改性保留在带有固定的模板的表面上的印迹聚合物颗粒以改变合成的分子的性质或者功能时。

[0048] (6). 合成的分子的应用,作为药物和医学中的药物,作为分析化学(传感器、检测)中的受体特异性配体,在生物工艺学、药物学和食品工业中用于分离,或者作为催化剂。

[0049] 附图简述

[0050] 图 1 描绘注入 HPLC 柱的空白(对照)颗粒的色谱图,该 HPLC 柱充满涂覆有固定模板的颗粒。

[0051] 图 2 描绘注入 HPLC 柱的 MIP 颗粒的色谱图,该 HPLC 柱充满涂覆有固定模板的颗粒。

[0052] 图 3 描绘用三聚氰胺印迹的 MIP 纳米颗粒的尺寸分布。

[0053] 发明详述

[0054] 如本发明描述制备的聚合物类似于模板的效应物(活化剂、抑制剂或者基材),并且本身可以具有生物活性,如果模板涉及生理过程或者此类分子或结构的有效同系物。此类聚合物可以用作例如药物学和医学中的药物。来自该方法的优点有很多,包括可能再利用用于 MIP 合成的固定的模板,可能将高亲和性的 MIPs 与低亲和性颗粒和未反应的单体分级,易于从模板移去合成的 MIPs,能够后功能化附着于固定的模板的 MIPs,能够完全或者部分自动化制造工艺等。本发明的其它优点对本领域技术人员来说是明显的。

[0055] 特别地,一方面本发明涉及交联的 MIPs 的合成,在固定的模板存在下通过受控聚合,任选地受控活性自由基聚合(LRP),或者活性阴离子聚合、活性阳离子聚合和受控缩聚,其中固定的模板可以是生物受体、核酸、细胞、孢子、病毒、微生物、组织样品、碳水化合物、低聚糖、多糖、肽、核蛋白、粘蛋白、脂蛋白、合成蛋白、糖蛋白、葡糖胺聚糖、甾类、激素、免疫抑制剂、肝素、抗生素、维生素、病理或疾病状态的生物标记、毒素、杀虫剂、除草剂、炸药、神经毒剂、污染物、内分泌干扰化合物、核苷酸、核苷、低聚核苷酸、代谢物、次级代谢产物、药物代谢物、药物中间体或药物,或者本领域技术人员已知的其它类模板。模板可以固定到聚合物、多糖或者玻璃表面上,例如呈珠粒、波导管、纤维、膜、毛细管形式的表面或者其它任何适合于预定用途的表面,如本领域技术人员已知的。

[0056] 聚合可以引发,例如通过加热,施加电流(电引发聚合),加入氧化还原催化剂、过硫酸盐或者过氧化物,通过辐射,包括 γ 辐射、或通过微波辐射或者优选通过采用 UV 或可见光的辐射而引发,并且聚合根据物质的反应性通常需要(数)分钟或者(数)小时。

[0057] 本发明涵盖了几种不同形式的受控聚合。它们都是基于能够将加成或者缩合反应控制到一定的水平,这样主要形成可溶性纳米颗粒而非序列聚合物层或者网络。在活性自由基聚合的例子中,通过热、化学或光化学刺激引发剂分子进行可逆转换,可逆地使休眠物质(dormant species)转换为作为链增长剂(chain propagator)的活性自由基或者离子。对此,应用反应的平衡常数的条件应当有利于休眠物质的形成并且应当允许休眠和增长物质之间的快速互换。因此,增长物质的浓度将非常低且它们的停留时间非常短,这减少了导致生长聚合物链终止的副反应的可能性。一些活性聚合的例子包括但不限于:氮氧自由基调控聚合(NMP)、原子转移自由基聚合(ATRP)和可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)。RAFT 聚合是基于可逆加成-断裂链转移平衡,其中在活性物质和休眠物质之间存在转化。在引发步骤产生的自由基将通过单体的加成而增长,直到遇到能够作为链转移剂的分子,并且自由基可能以可逆地方式加入分子。通常活性聚合方法允许使用引发-转移-终止剂(引发剂转移剂终止剂),其任选地可以与常规的引发剂结合从而为聚合赋予活性性质。引发-转

移-终止剂可以是具有二硫代氨基甲酰基基团的光-引发-转移-终止剂,或者带有碳-碳或者偶氮基团的热-引发-转移-终止剂(参见例如参考文献 14),或者其它种类的本领域技术人员已知的化合物。优选种类的引发-转移-终止剂是产生不同自由基的那些,一种反应活性的碳自由基以及另一种反应活性较低的基团,例如二硫代氨基甲酰基自由基。碳自由基,典型地是苯甲基自由基,可以与不饱和单体反应以引发聚合。活性较低的自由基例如二硫代氨基甲酰基自由基,可以通过与生长聚合物链再结合而终止聚合,然而响应连续的应用刺激例如紫外线照射,终止的产物可以进一步解离成为新的增长自由基和终止剂(参见例如参考文献 15)。

[0058] 本发明范围涵盖的其它可以用作不同类型的活性聚合(原子转移、阴离子、阳离子等)的引发剂化合物,包括但不限于:与 N, N, N', N'', N'''-五甲基二亚乙基三胺配合的 Cu(I)Br 和 2-溴丙腈、聚苯乙烯溴大分子引发剂和 Cu(I)Cl/PMDETA;乙基 2-溴异丁酸酯与 CuCl/联吡啶;1,4-双(2,6-二异丙基苯基)萘二亚胺镍(II)二溴化物(1,4-bis(2,6-diisopropylphenyl)acenaphatenediiminickel(II)dibromide);与二硫化四乙基秋兰姆组合的 2,2-二甲氧基-2-苯基乙酰苯(acephenone);四苯基二膦;叔过氧化物比如二-叔丁基过氧化物;SmMe(C₅Me₅)₂(THF);与 TiCl₄ 结合的苯乙烯基环氧化物;甲基苯乙烯四聚物二钠;MoOCl₄-n-BuSn-EtOH;HCl/ZnCl₂;甲基对-甲苯磺酸酯;2,10,15,20-四苯基卟啉甲基铝;3-甲基-1,1-二苯基戊基锂;在 THF 中的丁基锂;钼亚烷基化合物;双官能有机镧系元素(III)化合物;Mo(CH-t-Bu)(NAr)(OCMe₃)₂ 以及 Mo(CHCPhMe₂)(NAr)(OCMe(CF₃)₂)₂;HI/I₂;Zr、Ti 和 Hf 配合物与甲基铝氧烷或苯基硼酸盐(酯)结合;Pd、Ni、Fe 或 Co 的二酰亚胺配合物;均质的 Ta、Ti、Mo、W 卡宾配合物;由金属茂类型或者非-金属茂类型配合物组成的稀土金属配合物;阳离子单环戊二烯基锆乙脒盐(acetamidinate)配合物;具有一个或两个羟基的酯化的氟化调聚物,作为铜调控活性聚合的引发剂;Yb[C(SiMe₃)₃]₂。

[0059] 与传统的自由基聚合相反,活性聚合的一个优点是它以低速率进行并且没有可观察到的自动加速,而传统的自由基聚合进行时经常带有强烈的自动加速(参见例如参考文献 16)。本发明利用这点,通过在有利于形成具有相对低分子量的聚合物的条件下进行活性聚合。典型地反应在早期停止,以产生具有介于 500 和 1,000,000Da 之间分子量的聚合物。

[0060] 可以利用反应的优化条件以产生具有相对小尺寸的颗粒。该方法的一个重要部分是选择合适的活性引发剂和优化聚合反应的条件。另外,自由基的形成和增长速率可以通过加入反应抑制剂或者链转移剂例如巯基衍生物来控制(17)。

[0061] 可以由分散的有机分子或者由大分子制备活性自由基聚合的引发剂。大多数含有羟基、羧基或者氨基的化合物可以转化为引发剂,并因此易于引入聚合物中。在单官能引发剂的情况下,这可以在聚合物的末端,或者在多官能引发剂的情况下在聚合物的中间。

[0062] 有利于形成相对低分子量聚合物的反应条件包括但不限于:(i)在引发剂和单体之间使用化学计量比;(ii)冷却反应或者移去 UV 或者其它辐射源,这将在反应早期终止新的增长物质的形成;(iii)使单体与生长聚合物链脱离接触,例如通过过滤或者色谱法;(iv)向反应中加入抑制剂;(v)在非常稀的溶液中进行聚合反应;(vi)加入链转移剂。优选的选项是移去辐射源或者它的中断。另外,可以通过洗脱从附着于固定的模板的生长的 MIP 中移去单体和其它试剂。作为受控活性聚合的结果,可以形成尺寸在 500-1,000,000Da 范

围内的 MIP 颗粒,其可以溶解的形式存在,或者作为较大的颗粒(但低于 1 微米)以细胶体的形式存在,该胶体在溶液中稳定并且与亲和色谱法条件相容。

[0063] 可以用于 MIP 制备的单体包括:乙烯基单体、烯丙基单体、炔烃、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、氯丙烯酸酯、衣康酸酯、丙烯酸三氟甲基酯、氨基酸衍生物(例如酯或者酰胺)、核苷、核苷酸和碳水化合物的单体。在提出的发明的其它方面,聚合在含有双键的颗粒存在下进行,或者在含有双键的颗粒表面上进行。使用交联单体来固定或者稳定得到的复制品分子的结构,这样它仍然与模板的结构互补。典型的适合于 MIPs 的交联剂的例子包括但不限于:乙二醇二甲基丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、二乙烯基苯、亚甲基双丙烯酰胺、亚乙基双丙烯酰胺和 N, N' - 双丙烯酰基哌嗪。交联剂可以通过含有双键的颗粒或者前体聚合物起作用,或者通过带有可以结合到官能单体上的多个附带的官能团的颗粒或者聚合物起作用。本领域技术人员可以选择适合于特定体系的单体和交联剂。另外,各种组合和计算方法可以用于协助该选择。

[0064] 与单体、非特异性低聚物(non-specific oligomers)和低亲和性聚合物(例如在没有模板存在下在整体体积(bulk volume)中形成的那些)相比,合成的纳米颗粒对固定的模板具有更高的亲和性。因此在提议的发明的一个方面,通过洗涤从附着于固定的模板的纳米颗粒中除去结合差的材料。通过加热、改变溶液 pH、改变离子强度或者通过加入脲、胍或者比 MIP 更强地与模板相互作用的物质,破坏络合形成,从而从固定的模板分离高亲和性纳米颗粒。

[0065] 另外可以通过色谱法、过滤和 / 或电泳来提纯合成的亲和性 MIP 纳米颗粒。当使用相同或者相似的固定的模板来提纯对模板具有最高亲和性的聚合物级分时,合成的聚合物的分离可以通过亲和色谱法、或者选择性洗脱,和 / 或通过将具有不同尺寸的聚合物级分分离的凝胶渗透色谱法而实现。可以使用具有不同 pH、离子强度的缓冲剂、或者通过加入脲、胍、或者比聚合物与模板具有更强的相互作用的物质来实现分级、分离和提纯。另外,可以通过过滤、电泳、色谱分离、洗涤、离心或者透析来实现具有高亲和性的颗粒的分级。亲和色谱法是特别有效的方法,是特别优选的,因为它允许对模板具有窄亲和性分布的 MIPs 的制备。

[0066] 可以用另一种聚合物或者官能团来改性生长的聚合物链,意在向 MIPs 引入特定的性能,这将促进它的萃取或者其它形式的分离。这类例子还可以是具有疏水性尾状物的聚合物,其将允许例如通过有机溶剂从水溶液中萃取聚合物。可能引入特定的结合基团,例如生物素,这将允许通过亲和性吸附剂选择性地除去聚合物。本领域技术人员熟悉允许该将要进行的改性和相应的分离的实验方案的价值。改性可以直接在表面上实现,当聚合物结合在固定的模板上时或者分开时。

[0067] 因此,当用其它类型的分子改性印迹聚合物以改变合成的分子的性质或者功能时,本发明可以采用序列聚合。已经提到可以用另一种聚合物或者官能团改性生长的聚合物链以促进它的分离。活性聚合的一个重要性质是能够通过简单地停止例如对反应混合物的紫外线照射从而停止反应以及稍后继续。生长的聚合物链的末端含有引发剂,该引发剂可以被再次活化而引发新一轮的聚合。因此,可以将生长的聚合物链暴露于另一种单体并且继续聚合,引起嵌段共聚物的形成。新的单体可以向聚合物中引入新的官能团。因此,除了由第一 MIP 提供的对第一模板的亲和性,可以产生对引入体系中的第二模板具有亲和

性的延伸的聚合物。延伸的嵌段共聚物可以具有连接到端基的在诊断学中有用的荧光标记。其它类型的改性也是可能的,以引入其它功能或官能团,例如能够产生具有杀菌性能的活性物质、催化作用的基团、同位素标记、对固定有用的基团、传感和成像(例如造影剂)等。也可以通过使用相应官能化引发剂向聚合物中引入这些官能团。改性可以直接在表面上实现,当颗粒结合在固定模板上时或者分开时。

[0068] 一方面,本发明涉及合成的分子的用途,其用作药物学和医学中的药物,作为分析化学(传感器、检测)中的受体特异性(receptor-specific)的配体,用于生物工艺学、药物学和食品工业中的分离和作为催化剂。合成的聚合物的可溶性质使得它们是作为药物的理想候选。对酶、受体或者其它生物分子的选择性结合可用于影响这些分子的生物机能。因此,通过活性聚合合成的 MIPs 可被用在体内调节生物过程。当与同位素或者荧光标记结合时,MIPs 可被用作选择性的造影剂或者在其它形式的诊断学中。与在某些条件下能够产生例如单线态分子氧的配体结合的 MIPs,可以被用作选择性杀菌剂。本领域技术人员可以提出各种其它改性以向通过活性聚合制备的 MIPs 中引入抗菌性。

[0069] 合成的 MIPs 可以被用作在不同形式的分析和传感器中的天然抗体或者受体的代替。若干特征使得通过活性聚合制备的 MIPs 对于在传感器中的应用成为特别有吸引力的物质。如此合成的 MIPs 分子仍然含有引发剂,该引发剂可用于以共价键的方式将聚合物结合到固体表面。因此简单的 UV 照射可能足以将 MIPs 结合到覆盖有双键的表面。

[0070] 能够使用亲和色谱法将 MIP 配体分成具有不同亲和性的几个级分,这对于具有变化的探测范围的传感器/分析的制备是有利的。对于一些应用,也可以使用在没有模板存在下通过活性聚合制备的空白聚合物。然而,必须使用具有某些亲和性或者对于该特别的应用必需的其它性能的单体来制备此类聚合物。本领域技术人员知道如何通过使用例如计算或者组合方法来选择此类单体。有必要澄清,本发明的范围涵盖了使用以在相应实施方式中描述的方式制备的 MIPs 和空白聚合物。

[0071] 现在特别是参考以下非限定性实施例来进一步描述本发明。

实施例

[0072] 实施例 1. 对三聚氰胺具有亲和性的 MIP 颗粒的合成

[0073] 向 1.17g 乙腈、0.32g 甲基丙烯酸、0.36g 三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)、0.36g 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)、0.087g 二乙基二硫代氨基甲酸苄基酯(活性引发剂)和 0.02g 季戊四醇四(3-巯基丙酸酯)(链转移剂)的混合物中吹入氮气,并在充满用三聚氰胺衍生化的玻璃珠(9-13 μm 直径)的玻璃柱(70 \times 4mm)内部在 UV 辐射(UVAPRINT 100 CVI UV 源,0.163W/cm² 强度,Dr. **Hönle**)下聚合 3 分钟。除了柱中充满相同尺寸的裸露的玻璃珠外,用同样方法合成空白(对照)颗粒。聚合后,用 1ml 乙腈洗柱以洗脱纳米颗粒和未反应的单体。

[0074] 形成的可溶性印迹纳米颗粒具有通过在 Nanosizer (Malvern Instruments)上的动态光散射计算的 60nm 的平均直径。3 次不同的运行的尺寸分布显示于图 3 中。

[0075] 实施例 2. 合成的聚合物的亲和性分离。

[0076] a) 制备亲和吸附剂-模板的固定

[0077] 通过在 4M NaOH 中沸腾 10 分钟活化玻璃珠粒,用去离子水和丙酮洗然后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 干

干燥 2 小时。然后将珠粒在含 2%v/v 的 (3-氨基丙基)三甲氧基硅烷的甲苯中孵育 3 小时,用丙酮洗并将其置于 pH 为 7.2 且含 7%v/v 戊二醛的 PBS 中 30 分钟,然后用水洗。然后通过 4 小时期间在 pH 为 7.2 的 N-甲基-2-吡咯烷酮(10%v/v)和 0.1g/ml 的三聚氰胺的 PBS 溶液中孵育,将模板(三聚氰胺)固定到珠粒的表面。

[0078] 将三聚氰胺包覆的颗粒用于合成印迹纳米颗粒并用于亲和色谱法。

[0079] b) 亲和色谱法

[0080] 用具有 0.22 μm 孔隙大小的 PTFE 注射器式过滤器过滤在实施例 1 中从玻璃柱洗脱的样品,以除去任何大的聚合物聚集物。为了除去未反应的单体,然后将滤液置于离心机过滤筒(cartridge)上,其具有 10 000Da 的截止,并在 3000g 离心 4 小时。然后将颗粒再悬浮在乙腈中并在具有充满如上(实施例 2a)所述制备的亲水性吸附剂的柱(100 \times 4.6mm)的 HPLC 上试验,使用 Agilent 1100 系列 HPLC。注射体积为 40 μl ,使用的移动相是以 1ml/min 的乙腈,在 210nm 进行检测。为了避免使用酸辅助洗脱,分析在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。以相同方式制备 MIP 和对照聚合物。在亲和相中的空白和印迹颗粒的色谱图描绘于以下图 1 和 2 中。

[0081] 实施例 3- 用于三聚氰胺的纳米颗粒的制备

[0082] 通过在 4M NaOH 中沸腾 10 分钟活化玻璃珠粒(75 μm 直径),然后用双-蒸馏水和丙酮彻底清洗并且在 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 小时。然后将珠粒在 2%v/v 的 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMS)的甲苯溶液中孵育过夜,用丙酮洗涤并在 25ml 的 5%v/v 戊二醛(GA)的 pH 为 7.2 的 PBS 缓冲溶液中的溶液中孵育 1 小时,并且用双-蒸馏水漂洗。将模板固定,通过将珠粒在 0.01g/ml 的三聚氰胺和 N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)(10%v/v)的 pH 为 7.2 的 PBS 溶液中孵育 4 小时。通过用双-蒸馏水和甲醇洗涤除去过量的物理吸附的三聚氰胺。在真空下干燥衍生化的玻璃珠粒,并装入石英柱中(6.4mm o. d., 1.5mm 壁, 150mm 长度)。将 0.32g 甲基丙烯酸(MAA)、0.36g 三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)、0.36g 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)、0.087g N, N'-二乙基二硫代氨基甲酸苄基酯和 0.02g 季戊四醇四(3-巯基丙酸酯)(CTA)于 1.17g 乙腈(ACN)中混合,并吹 2 分钟 N_2 。然后将 500 μl 注入充满亲水性介质的柱中,并在 366nm 的 UV 辐射(HB 171/A 灯, 4 \times 15W 功率, PHILIPS)下聚合 2 分钟。聚合后,将柱连接到 HPLC 体系(Agilent 1100 系列 HPLC)。在流速 1ml/min 进行洗脱,在 220nm UV 检测。第一个 90 分钟,使用 ACN 作为移动相,而将柱保持在 0 $^{\circ}\text{C}$ 的冰浴中。然后的 45 分钟,将移动相换成 ACN 与甲酸(10mM)并将温度升至 25 $^{\circ}\text{C}$ 。最后,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱纳米颗粒的高亲和性级分 35 分钟。除了使用非-衍生化的玻璃珠粒外,按照如上描述制备空白纳米颗粒。不同级分的合成的纳米颗粒的尺寸从 120 至 460nm 变化,如通过在 Nanosizer (Malvern Instruments)上的动态光散射所计算。

[0083] 实施例 4- 用于肽的纳米颗粒的制备

[0084] 使玻璃珠粒(75 μm 直径)在 4M NaOH 中沸腾 10 分钟,用双-蒸馏水和丙酮洗涤并且在 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 小时。然后将珠粒在 2%v/v 的 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMS)的甲苯溶液中孵育过夜,然后用丙酮洗并在 25ml 的 7%v/v 戊二醛(GA)的 pH 为 7.2 的 PBS 溶液中孵育 1 小时,并且用双-蒸馏水漂洗,在 0.05mg/ml 的肽(TATTSVLG-NH₂)的 pH 为 7.2 的 PBS 溶液中孵育 4 小时。用双-蒸馏水洗涤衍生化的珠粒,并将其用于制备 MIP 纳米颗粒。将 19.5mg 的 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)、1mg 的 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)、16.5mg 的 N-叔丁基丙烯酰胺(TBAm)和 1.11 μl 丙烯酸(AAc)溶解于 50ml 的含有 10mg 十二烷基硫

酸钠(SDS)的水中。将溶液超声处理 10 分钟并吹 30 分钟 N_2 。将 10ml 该溶液放入 20ml 的含有 4g 衍生化的玻璃珠粒的螺口瓶中。通过加入 100 μ l 的 60mg/ml 的过硫酸铵(APS)和 3 μ l 的 N, N, N' N' - 四甲基乙二胺(TEMED)引发聚合,并在室温进行 22 小时。将含有 MIP 产品和亲和性介质的瓶子在 0°C 冰浴中保持 10 分钟,然后倒入 SPE 滤筒(cartridge)中以将附着有纳米颗粒的玻璃珠粒与其它组分分离。进行五个清洗步骤以除去具有低或者没有亲和性的材料,每个清洗步骤用 10ml 的冷双-蒸馏水。用 pH 为 7.2 的 PBS 在 60°C 进行纳米颗粒的高亲和性级分的洗脱。除了使用非-衍生化的玻璃珠粒外,按照如上描述制备空白纳米颗粒。不同级分的合成的纳米颗粒的尺寸从 30 至 130nm 变化,如通过在 Nanosizer (Malvern Instruments)上的动态光散射所计算。

[0085] 合成的纳米颗粒的亲性和性分析

[0086] 通过将 Au-涂覆(SIA Kit Au)的芯片浸入 Piranha 溶液(H_2SO_4/H_2O_2 , 3:1v/v)中 5 分钟进行清洗。然后,用双-蒸馏水和乙醇彻底漂洗它们。肽模板的硫醇化衍生物与甘氨酸间隔体(spacer)(CGGGGTATTSVLG-NH₂)和硫醇化参比肽(CQLPELKQKSS-NH₂)的固定,使用 Biacore 3000 SPR 通过注入 100 μ l 的在 pH 为 7.4 的 PBS 中的 0.1mg/ml 肽溶液进行,在干净的金芯片上且在 25°C 流速为 15 μ l/min,并即时记录。注入 100 μ l 的以 1:10、1:20、1:40、1:60、1:80 和 1:100 稀释的在 pH 为 7.4 的 PBS 中的纳米颗粒(流速:15 μ l/min),使用 Biacore 软件分析传感器的响应 2 分钟。得到了 MIP 纳米颗粒和模板肽(CGGGGTATTSVLG-NH₂)之间的相互作用的表观解离常数 $K_D=2.5$ pM。记录的参比肽(CQLPELKQKSS-NH₂)的表观解离常数为 $K_D=3.3$ nM,表明 MIP 纳米颗粒对于模板肽的特异性高大约 1000 倍。

[0087] 实施例 5-用于万古霉素的纳米颗粒的制备

[0088] 使玻璃珠粒(75 μ m 直径)在 4M NaOH 中沸腾 10 分钟,用双-蒸馏水和丙酮洗涤并且在 80°C 干燥 2 小时。然后将珠粒在 2%v/v 的(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷溶液中孵育过夜,用丙酮清洗,并将其置于 7%v/v 戊二醛的 pH 为 7.2 的 PBS 缓冲液中 1 小时,用双-蒸馏水漂洗,并用 0.5mg/ml 的万古霉素 HCl 的 pH 为 7.2 的 PBS 中孵育 4 小时。用双-蒸馏水洗涤衍生化的珠粒,并将其用于制备 MIP 纳米颗粒。将 19.5mg 的 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm)、1mg 的 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺(BIS)、16.5mg 的 N-叔丁基丙烯酰胺(TBAm)和 1.11 μ l 丙烯酸(AAc)溶解于 50ml 的含有 10mg 十二烷基硫酸钠(SDS)的水中。将溶液超声处理 10 分钟并吹 30 分钟 N_2 。将 50ml 该溶液放入 100ml 的含有 20g 衍生化的玻璃珠粒的螺口瓶中。通过加入 500 μ l 的 60mg/ml 的过硫酸铵(APS)和 3 μ l 的 N, N, N' N' - 四甲基乙二胺(TEMED)引发聚合,并在室温进行 22 小时。将含有 MIP 产品和亲和性介质的瓶子在 0°C 冰浴中保持 10 分钟,然后倒入 SPE 滤筒中以将附着有纳米颗粒的玻璃珠粒与其它组分分离。进行五个清洗步骤以除去具有低或者没有亲和性的材料,每个清洗步骤用 20ml 的冷双-蒸馏水。然后在 60°C 通过 5 级分 20ml 的 pH 为 7.2 的 PBS 将高亲和性纳米颗粒与亲和性介质分开。除了使用三甲氧基硅烷衍生化的玻璃珠粒外,以相同的方式制备非-印迹纳米颗粒。得到的可溶性印迹纳米颗粒具有 228nm 的平均直径,如使用来自 Malvern Instruments Ltd(Malvern, UK)的 Zetasizer Nano(Nano-S)通过动态光散射(DLS)所计算。

[0089] 合成的纳米颗粒的亲性和性分析

[0090] 通过将购自 Biacore 的 Au-涂覆(SIA Kit Au)的芯片浸入 Piranha 溶液($H_2SO_4/$

H₂O₂, 3:1v/v)中5分钟进行清洗。然后用双-蒸馏水和乙醇彻底漂洗,并在0.2mg/ml的4-氨基苯硫酚的乙醇溶液中在4℃孵育24小时。之后将芯片用双-蒸馏水漂洗,并在2.5ml的7%v/v的GA在pH为7.2的PBS溶液中室温孵育1小时。进一步用双-蒸馏水漂洗芯片,并在1.2mg/ml的万古霉素在pH为7.2的PBS溶液中室温孵育24小时,并倒入Biacore 3000中。将100 μl的纳米颗粒和以1:10、1:100、1:1000、1:10000稀释的在pH为7.4的PBS中的纳米颗粒在30℃注入(流速15 μl/min)。使用Biacore软件分析传感器的响应。万古霉素对于MIP纳米颗粒的表观解离常数K_D为0.9nM。

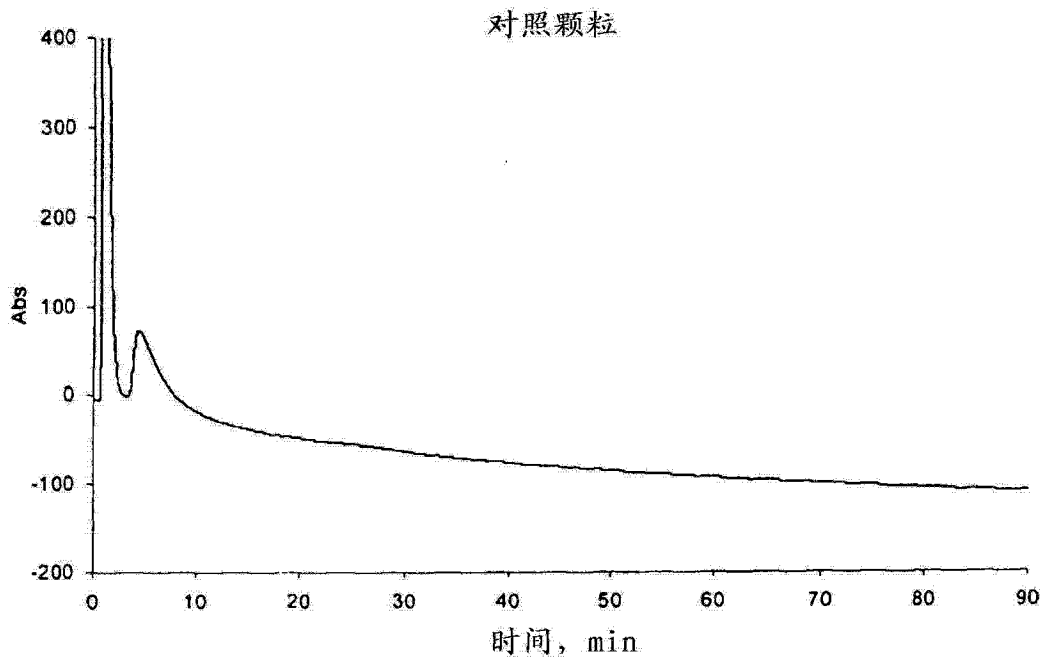


图 1

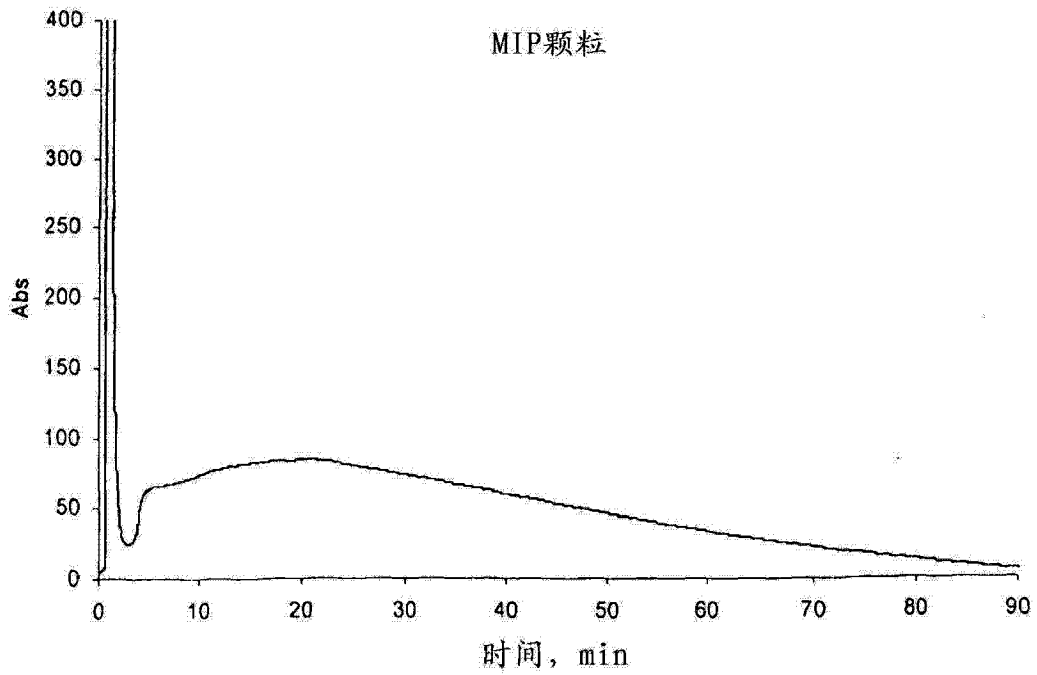


图 2

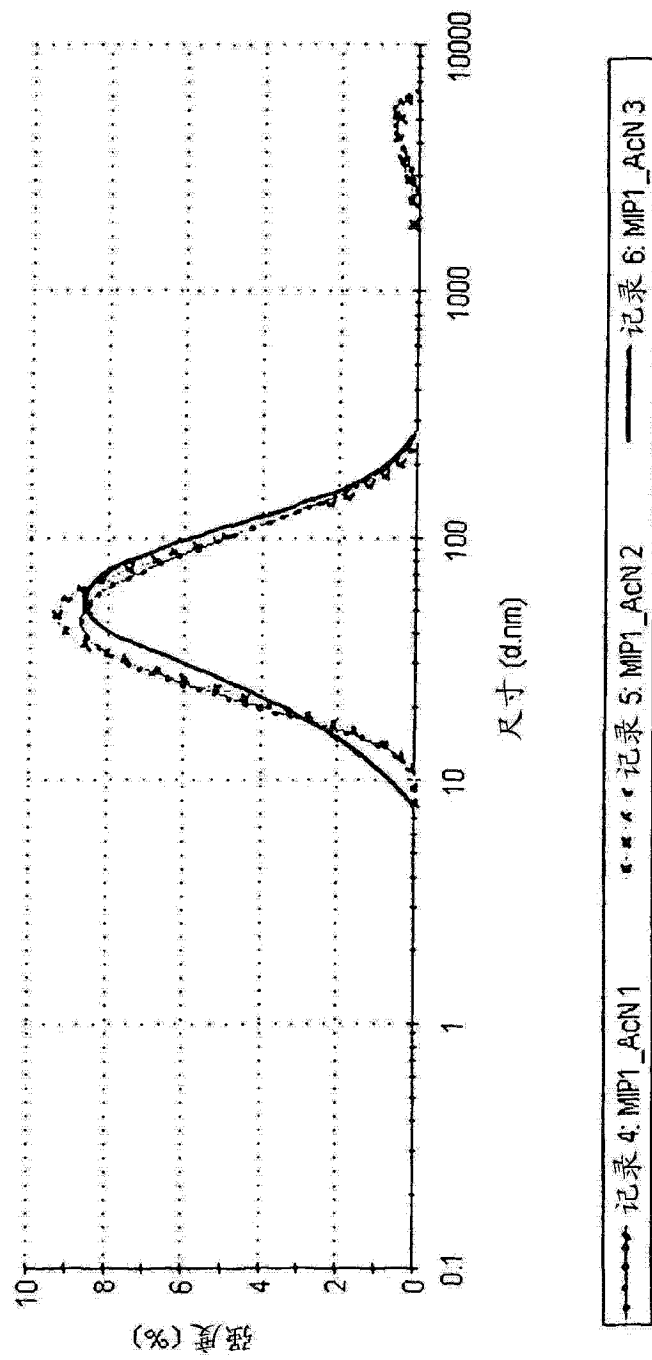


图 3