

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁴

B01D 15/08

B01J 20/32

(45) 공고일자 1989년08월05일

(11) 공고번호 89-0002847

(21) 출원번호

특 1986-0002501

(65) 공개번호

특 1986-0008190

(22) 출원일자

1986년04월02일

(43) 공개일자

1986년11월12일

(30) 우선권주장

725807 1985년04월22일 미국(US)

(71) 출원인

제이 티 베이커 인코오퍼레이티드 프랑크 피. 스미스

미합중국 뉴저어지 08865 필립스버어그 레드스쿨레인 222

(72) 발명자

휴우 이. 램스던

미합중국 뉴저어지 07076 스코치 플레인스우드 로우드 2080

미카엘 헨리

미합중국 펜실베니아 18042 이스턴 벌크 스트리아트 407

(74) 대리인

장용식

심사관 : 신진규 (책자공보 제1620호)**(54) 아실화 폴리에틸렌이민 결합 크로마토그래프 패킹 및 그 제조방법****요약**

내용 없음.

영세서

[발명의 명칭]

아실화 폴리에틸렌이민 결합 크로마토그래프 패킹 및 그 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 아실화 폴리에틸렌이민 결합 크로마토그래프 패킹 및 그 N-아실화 생성물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 약 3 내지 약 70미크론의 평균입자직경, 약 50 내지 약 1000옹스트롬 단위의 평균 기공크기를 지니는 실리카겔입자, 또는 약 37 내지 177미크론의 평균입자직경, 약 40 내지 약 1000 옹스트롬 단위의 평균기공크기를 지니는 제이 기공유리(CPG)입자와 약 400 내지 약 1800의 평균분자량을 지니는 폴리에틸렌 이미노-프로필 트리메톡시실란(PEI-Pr-triMe0-silane)와의 공유결합, 비가교결합된 폴리에틸렌이민 반응 생성물이 산활로렌화물 또는 산무수물로 N-아실화된 것이다. 여기서 아실작용기는 말단카르복실기를 지니지 않는다. 결과 생성된 아실화 PEI-PrSi-실리카겔과 PEI-PrSi-CPG 생성물은 각각 단백질의 정제 및 분리를 위한 액체 크로마토그래프에서 컬럼패킹에 적당한 고체상으로서 유용하다.

J.Chromatogr. 185, 375-392(1979)에 알퍼르트(Alpert)와 레그니에르(Regnier)은 폴리에틸렌이민(PEI)이 실리카표면에 흡수될 수 있어 중합체층으로 다작용 옥시란에 의해 가교결합되도록 인접하여 흡수된 PEI 분자에 충분한 일차 및 이차이미노기를 제공하게 된다는 것을 밝혔다. 최근에, 가교 결합된 폴리에틸렌이민으로 피복된 미립자 실리카의 컬럼을 지닌 고-성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하는 합성 올리고누클레오티드의 분리는 T.G.Lawson et al., Anal.Bio-chem. 133, 85-93(1983)의 문헌에 기록되어 있다. 이와는 달리, 본 발명은 비가교 결합 폴리에틸렌이미노프로필실란이 말단에 비-카르복실화아실기로 아실화되는 이미노와 아미노 작용기에 흡수되기 보다는 공유결합되는 다공성 실리카 또는 유리 지지물을 제공한다.

본 발명은 1983년 11월 25일 출원되고 폴리에틸렌이민결합 크로마토그래프 패킹이라 명칭이 주어진 심사중인 미국특허 출원번호 No.555, 368 및 1984년 11월 14일 출원되고 상기 미국출원과 동일한 명칭으로 상기 미국출원의 우선권 주장을 하여 심사중인 남아프리카 특허출원 번호 No.84/8886에 그 공동발명자중의 한사람인 Hugh Ramden에 의해 기술된 비가교결합된 공유결합 PEI-PrSi-실리카겔과 PEI-PrSi-CPG 생성물의 아실화 변성물을 제공한다.

상기 출원들의 내용은 참고로 본원에 통합된다. 램스던의 EPT-PrSi-실리카겔 생성물은 또 미국특허 No. 4,469,630호에도 기술된다.

램스던의 비가교 공유결합된 PEI-PrSi-실리카겔과 PEI-PrSi-CPG 생성물이 본 발명에 따라 아실화 되도록 기제를 구성하기 때문에 램스던의 상술된 출원으로부터 다음 관련 인용문은 여기에 재현된다.

램스던의 미국특허출원 No.355,368로부터 인용

본 발명의 비가교공유 결합된 PEI 실리카겔과 유리 생성물은 다음 단계에 따라서 편리하게

제조된다.

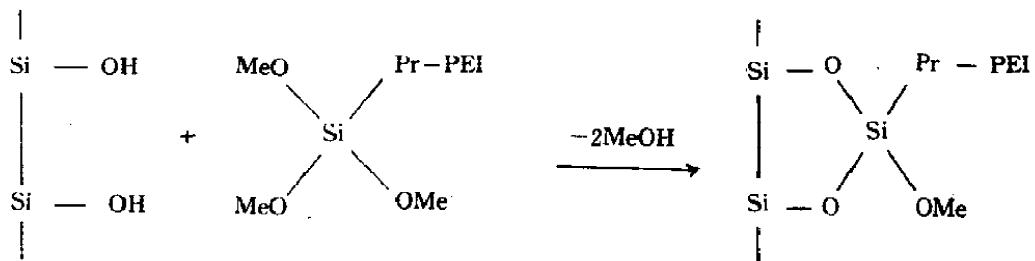
A. 약 3 내지 약 70미크론의 평균입자직경 및 약 50 내지 약 1000온스트롬 단위의 평균기공크기를 지니는 실리카겔 입자나 약 37 내지 177미크론의 평균입자직경 및 약 40 내지 약 1000온스트롬의 평균기공크기를 지니는 제어기공 유리입자중 하나를 약 400 내지 약 1800의 평균분자량을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필 트리메톡시 실란의 저급 알칸올용액을 지닌 불활성유기 용제 슬러리에서 반응시키고, 상기 반응은 약 2 내지 약 50시간동안 주위 환류온도에서 진행시킨다.

B. 반응혼합물로부터 결과 생성 고체부분을 회수하며

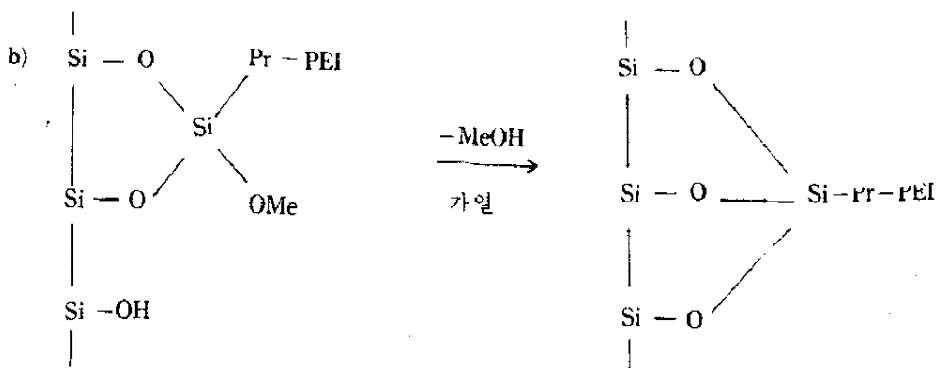
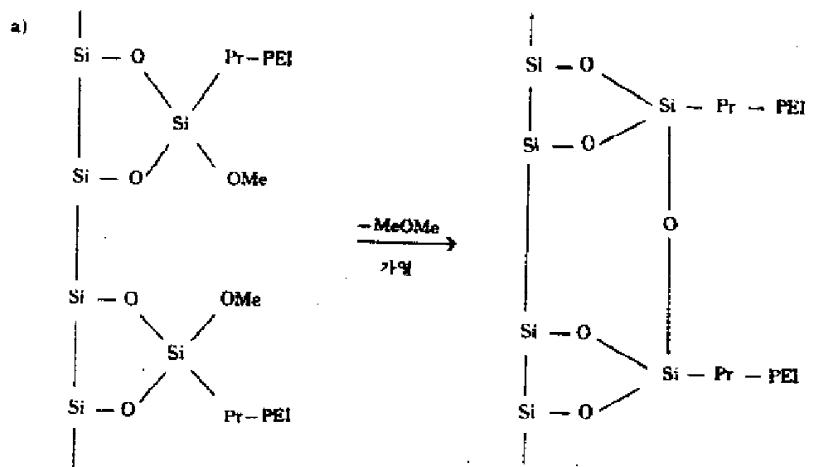
C. 각각의 실리카겔 또는 제어기공유리에 대해 실란을 완전히 결합시키고 건조시키기위한 충분한 온도와 시간동안 상기 고체부분을 가열시킨다.

여기서 사용된 바와같이 "공유결합"의 뜻은 PEI기가 프로필-실일(Pr-Si)에서 초래하는 화학적 상호작용을 위해서 실리카겔 또는 제어기공유리에 공유로 부착되는 것을 의미하며, "비가교결합"의 뜻은 인접하여 공유결합된 PEI 기상의 이이노 및 아미노기가 가교결합되거나 가교제와 반응하는 것이 아니라 중합체 층을 형성하는 것을 의미한다. 결합되지 않으므로써, 반응은 다음과 같이 두 단계에서 완결까지 진행한다는 것을 알았다.

단계 1 : 실리카 수산기와 실란의 메톡시기가 반응하여 미반응되어 남은 약간의 잔유메톡시기를 지닌 Si-O-Si 결합과 유리메탄올을 형성한다.



단계 2 : 잔류메톡시기와의 반응완결은 a) 및 b)에 의한 열경화 동안에 실행된다.



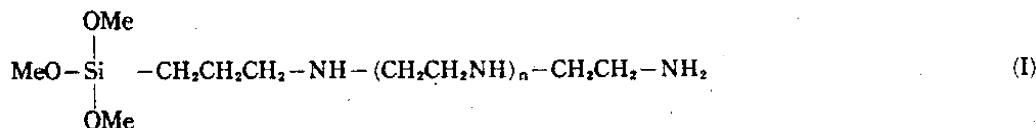
비결정 실리카로 이루어지는 실리카겔은 불규칙하고 구형상(바람직한)인 입자형태와 3 내지 325(ASTM)의 범위의 메시크기를 지닌 여러통상 등급으로 통상적으로 적용가능하다. 메시크기의 수적표시보다는 본 발명의 목적을 위한 보다 정확한 표시는 실리카겔입자의 평균직경 및 평균기공크기가 각각 약 3 내지 약 70미크론과 약 50 내지 약 1000, 되도록이면 250-500온스트롬단위이다. HPLC 크로마토그래프컬럼 패킹시에 결과 생성물 용도를 위해서는 약 3 내지 약 10미크론의 실리카겔 출발물

질이 바람직하며 저압 크로마토그래프 컬럼 패킹을 위해서는 약 40 내지 약 70미크론이 바람직하다.

액체 크로마토그래프에서 사용하는 실리카와 화학적으로 비슷한 지지물질을 포함하는 규산염인 제어 기공유리(CPG)은 37-177미크론의 평균입자직경 및 40-1000온스트롬, 바람직하게는 40-500온스트롬을 지닌 피어스화학 Co., 록포드, 일리노이로부터 생산된 것이 통상적으로 구입 가능하다.

실리카겔 또는 CPG 슬러리를 제조하는데 적당한 불활성 유기용제 가운데는 예를들면, 헥산, 헵탄 등과 같은 지방족 탄화수소 ; 벤젠, 툴루엔, 크실렌등의 방향족탄화수소 ; 에탄올, 이소프로판올, 부탄올 등과 같은 저급 알칸올 ; 염화 메틸렌, 클로로포름, 사염화탄소등과 같은 염소화메탄(주위 : 그러한 클로로 용제는 보다 높은 온도에서 반응될 수 있다) ; 과 테트라하이드로푸란, 글리메(glyme), 디글리메 등과 같은 또 다른 불활성 용제등이 있다. 일반적으로 실리카겔 또는 CPG 그램 대 용제 밀리리터의 1:5비율은 적당한 슬러리를 제공한다. 실리카겔과 CPG입자의 미세하고 불수용성 인 성질 때문에 순수한 용액보다는 슬러리가 얻어진다.

또 (N-트리메톡시실일 프로필)-폴리에틸렌이민으로써 알려진 폴리에틸렌아미노프로필 트리메톡시 실란은 폴리에틸렌이민과 아미노프로필트리메톡시실란의 반응 생성물이며 다음 화학식으로 나타낼 수 있다.



상기식에서, 본 발명을 위해서는 n은 약 4 내지 약 37의 정수이며 평균분자량으로 표시하면 약 400 내지 약 1800이다.

실란(I)은 실란을 가용시키기 위하여 충분한 알칸올을 사용하여 저급 C₁-C₆ 알칸올 용액의 형태로 실리카겔 또는 CPG와의 반응에서 사용된다. 50% W/W 이소프로판올 용액이 바람직하다. 일반적으로, 실란 약 25-100 그램 또는, 대신에 실란의 50% W/W 알칸올 용액 약 50-200ml가 실리카겔 또는 CPG 각 100gram과 반응하도록 사용된다. 반응은 반응용제 시스템의 혼류온도까지 상승된 온도가 반응속도를 증가시키기 위해서 사용될 수 있을 지라도 주위온도에서 진행될 수 있다.

반응은 2-50시간내에서 실질적인 완결(단계1)까지 용이하게 진행된다. 반응물의 혼합동안의 교반은 그후 반응이 더 이상의 교반없이 계속될 수 있을지라도 유익하게 적용된다. 무수조건은 결정적인 것이 아니며, 슬러리 용제 50ml당 약 0.1-1.0ml의 적은 양의 물의 존재가 불리하게 반응에 영향을 미치지 않는다는 것을 발견하였다.

생성된 그체부분은 통상 물리적수단, 예를들면 여과, 원심분리등에 의해 반응혼합물로부터 회수된다. 일반적으로 5미크론의 입자크기를 보유하는데 충분한 여과수단이 적당한 데 반하여 원심분리는 입자크기 3미크론에 적당하다.

회수된 고체부분은 그다음 실리카겔 또는 CPG에 실란을 공유로 완전하게 결합하여 건조하는데 충분한 시간동안 및 온도에서 가열 경화된다. 일반적으로 약 40-120°C 온도에서 약 1-4시간이 충분한 것으로 밝혀졌다. 따라서 얻어진 공유결합, 비가교결합된 최종 생성물은 약 0.5 내지 약 3.8%질소를 포함하는 것이 바람직하다.

인용물 끝

램스던의 상술된 비가교, 공유결합 PEI-PrSi-실리카겔과 PEI-PrSi-CPG 생성물의 이미노와 아미노 작용기는 화학식 R-CO-를 지니는 아실기를 부여하도록 아실화제로서 적당한 산 할로겐화물 또는 산무수물을 사용하여 N-아실화될 수 있다는 것을 알게되었다. 상기식에서, R은 C₁₋₈ 알킬, 페닐, 아랄킬 및 C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로 및 니트로로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 또는 20이상의 치환체 와로 치환된 페닐로 이루어지는 군으로부터 선택된 구성원이다. "할로"는 브로모, 클로로, 플루오로 및 요오드를 포함하며, "아랄킬"은 벤질, 1-펜에틸, 2-펜에틸, α -나프틸등을 포함한다.

통상 원소 분석으로 쉽게 측정될 수 있는 PEI-PrSi-실리카겔 또는 PEI-PrSi-CPG 기체에서 질소백분율은 PEI의 이미노와 아미노 작용기의 상대적 결합총량을 나타낸다. 충분한 아시로하제는 PEI상의 모든 이미노 및 아미노 작용기와 실제 반응하도록 사용된다. 즉, N-아실화 단계는 불활성 비양성자성 유기용제에서 아실화제의 동등량 또는 약산 초과량으로 용이하게 달성된다. 대표적인 아실화제에는 염화아세틸, 무수아세트산, 염화프로피온일, 무수 프로피온산, 염화부티릴, 염화 헥산노일, 염화 옥탄노일, 염화벤조일, 염화 p-니트로벤조일, 염화 3,5-디니트로벤조일, 염화 o-, m- 및 p-메톡시벤조일, 염화 2, 4, 6-트리클로로벤조일, 염화o-, m- 및 p-메틸벤조일, 염화페닐아세틸 등이 포함된다. 대표적인 비양성자성 용제에는 벤젠, 툴루엔, 크실렌등과 같은 방향족 탄화수소, 테트라하이드로푸란, 디옥산등과 같은 에테르, 헥산, 헵탄등과 같은 지방족 탄화수소 등이 포함된다. 예를들어 3급아민, 바람직하게는 3급알킬아민과 같은 산 스캐빈저의 동등량 또는 약간 초과량은 아실화 반응동안 방출된 산을 포착하는데 유용하게 적용된다.

따라서, 본 발명은 프로필실일(Pr-Si)결합을 위하여 실리카겔 또는 제어 기공유리에 대해 공유결합된 비가교 결합 폴리에틸렌이민(PEI)작용기를 제공하며, 여기서 대체로 PEI 기의 이미노 및 아미노 작용기의 모두, 예를들면 80%이상, 바람직하게는 95%이상이 이미 규정된 바와같이 화학식 R-CO-, 를 지니는 아실 작용기와 아실화된다.

보다 상세히 말하자면, 본 발명은 약 400 내지 약 1800의 평균분자량을 지니는 폴리에틸렌아미노프로필 트리메톡시 실란과 함께 약 3 내지 약 70미크론의 평균입자직경 및 약 50 내지 약 1000온스트롬 단위의 평균기공크기를 지니는 실리카겔, 입자, 또는 약 37 내지 약 177미크론의 평균입자직경 및 약 40 내지 1000온스트롬 단위의 평균기공크기를 지니는 제어기공유리입자의 N-아실화 공유결합

된, 비가교폴리에틸렌이민 반응생성물을 제공하며, 여기서 N-아실기는 화학식 R-CO-를 지니며, 이식에서 R은 C₁₋₈ 알킬, 페닐, 아랄킬 및 C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로 및 니트로로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 치환체와로 치환된 페닐로 이루어지는 군으로부터 선택된 구성원이다.

본 발명의 N-아실화된 PEI-PrSi-실리카겔 또는 PEI-PrSi-CPG 생성물을 컬럼 크로마토그라프에 의해 단백질의 정제 및 분리를 위해 신규하고 유용한 결합상을 구성하여 최신기구사용에 특히 적당하다. 패킹은 여러 메시크기, 예를들면, 약 50 내지 600메시일 수 있다.

바람직한 N-아실화된 PEI-PrSi-실리카겔 생성물은 평균입자직경 약 5 내지 약 40미크론, 평균기공크기 약 50 내지 330옹스트롬 단위를 지니는 실리카겔 입자와 평균분자량 약 400 내지 약 600을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필트리메톡시 실란의 반응생성물로 부터 얻어진 생성물이며, 평균입자직경 약 40 내지 약 62미크론, 평균기공크기 약 250 내지 약 500옹스트롬 단위를 지니는 실리카겔 입자와 평균분자량 약 1000을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필트리메톡시 실란으로 부터 얻어진 생성물이다.

본 발명의 N-아실화된 PEI-PrSi-실리카겔과 PEI-PrSi-CPG 생성물은 약한 소수성의 상호작용을 기초로 하여 단백질을 분리하는 것으로 생각된다. 본 발명 생성물로 단백질을 분리하는데에 있어서의 두드러진 이점들은 놀랍고도 색다른 것으로 생각되는데 그 이유는 이런 원리로 분리하는 현재 구입할 수 있는 크로마토그래프 매트릭스들이 일반적으로 광범위한 피아크를 제공하여 불량한 선택성과 정량적이지 못한 단백질 회수를 주기 때문이다. 이와 달리, 본 발명의 크로마토그래프 매트릭스는 예리한 잘 규정된 피아크를 제공하여 양호한 선택성과 단백질 질량의 정량적 회수를 주며 효소분리의 경우에 효소활성의 중대한 손실이 없다.

보통은 여기 기술된 크로마토그래프 매트릭스가 소수성 상호작용 크로마토그래피에 사용되는 수성의 고이온 강도 유동상에서, 이러한 고이온강도 수용액에서의 실리카의 고유용해도 특성으로 인해 가수분해에 불안정할 것으로 기대되기 때문에 본 발명은 더욱 더 놀랄만하다. 따라서 실리카 기제 매트릭스의 사용은 짧은 컬럼 수명을 떨어 초래하는 것으로 보통 기대할 것이다. 그러나 N-아실화된 PEI-PrSi-실리카겔 및 PEI-PrSi-CPG 생성물로는 그 반대가 사실이다. 실시예 17에 설명된 바와같이, 본 크로마토그래프 매트릭스로 충전된 HPLC 컬럼은 컬럼성능의 질에서 매우적은 변화를 지닌 이동성 완충상으로 1000시간에 걸쳐서 사용가능하다.

그러므로 본 발명에 따르면 평균분자량 약 400 내지 약 1800을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필 트리메톡시 실란과 함께 평균입자크기 약 3 내지 약 70미크론, 평균기공크기 약 50 내지 약 1000옹스트롬 단위를 지니는 실리카겔 입자, 또는 평균입자크기 약 37 내지 약 177미크론, 평균기공크기 약 40 내지 약 1000옹스트롬 단위를 지니는 제어기공 유리입자의 N-아실화된 공유결합, 비가교결합 폴리에틸렌이민 반응생성물로 충전된 액체크로마토그래프에 적당한 크로마토그래프 컬럼이 제공되며, 상기 N-아실기는 상술된 바와같은 화학식 R-CO-를 지닌다.

다음 실시예들은 본 발명을 설명하기 위해 제안되었을 분 한정하기 위한 것은 아니다.

[실시예 1]

A. 50ml 툴루엔에서 "실리카겔 #7024"로서 불규칙한 형태로 J.T. 베이커화학 Co., 필립스버그, N.J.로부터 통상 구입가능한 평균입자직경 40미크론, 평균기공크기 60옹스트롬을 지닌 실리카겔 10gram의 슬러리에 "(N-트리메톡시실릴프로필)-폴리에틸렌이민 PS076"으로서 페트래치 시스템 Inc., 브리스톨, PA로부터 통상 구입가능한 평균 분자량 400-600 (500으로 가정하다)을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필 트리메톡시 실란의 50% W/W 이소프로판을 용액 19.71gram을 교반하면서 첨가하였다. 혼합물을 약 1hr. 10min 동안 상온(약 25°C)에서 교반한 다음 교반없이 밤새(약 17시간)방치하였다. 다시 상온에서 5hr. 40min 동안 교반을 시작하였으며 또 혼합물을 밤새 방치하였다. 다음 혼합물을 중간프리유리필터로 여과시켰다. 여과액을 50ml 툴루엔으로 두번 그리고 50ml 메탄올로 두번 수세하여 모든 초과 실란반응물의 회수를 확실하게 한 다음 약 3hr. 30min 동안 80-85°C에서 오븐 건조하여 공유결합된 PEI-실리카겔 생성물 약 12gram을 수득하였다 ; 약 3.9% N

B. 1ml물이 실리카겔/실란 혼합물에 첨가된 것을 제외하고는 실시예 1-A의 절차를 반복하였다. PEI 결합된 실리카겔 생성물의 수득량은 약 13.3gram이었다 ; 약 5.5% N

[실시예 2]

100ml 툴루엔 및 2ml 물에서 상표면 "Vydac A"카타로그 No.101TPB5의 구형상 실리카로서 셉에이 라티온 그룹, 헤스페리아, (Sep A Ra Tions Group, Hesperia)CA로부터 통상 구입가능한 평균 입자직경 5.25미크론, 평균기공크기 330옹스트롬을 지닌 실리카겔 20gram의 슬러리를 제조하여 상온에서 10분 동안 교반하였다. 여기에 평균분자량 500을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필 트리메톡시 실란의 50% W/W/이소프로판을 용액 39.4gram을 교반하면서 첨가하였으며 혼합물을 5분동안 더 교반하였다. 그다음 혼합물을 상온에서 밤새 방치하였다. 다음 혼합물을 1.0미크론 필터 깔때기기를 사용하여 여과하였다. 여과액을 50ml 툴루엔으로 두번, 50ml 메탄올로 두번 수세한 다음 깔때기위에서 공기 건조시켰으며 최종적으로 약 3hr. 30min 동안 80-85°C에서 오븐 건조시켜 PEI 결합 실리카겔 생성물을 수득하였다 : 약 2.85% N

[실시예 3]

50ml 메탄올과 1ml물에서 "프랙토실 500"의 상품명으로 E.Merck Reagents, 독일로부터 통상 구입가능한 평균입자직경 40-63 미크론, 평균기공크기 420옹스트롬을 지니는 230-400메시 1ASTM)실리카겔 20gram의 슬러리를 제조하여 상온에서 5분동안 교반하였다. 100ml메탄올에서 평균분자량 1800을 지니는 폴리에틸렌 이미노프로필 트리메톡시 실란의 50% W/W이소프로판을 용액의 11.2 gram의 분리용액을 또 제조하였다. 그다음 실란용액을 교반하면서 5분에 걸쳐 실리카겔 슬러리에 첨가하였다. 첨가를 완료한 후 교반을 중지하고 혼합물을 50hr 동안 상온에서 방치하였다.

혼합물을 그다음 중간 크기의 식터드유리를 통하여 여과하였다. 여과액을 진공하에서 $3 \times 50\text{ml}$ 메탄올로 수세한 다음 약 4hr 동안 $80-85^\circ\text{C}$ 에서 오븐건조하여 PEI 결합 실리카겔 생성물을 수득하였다 : 약 1.1% N

[실시예 4]

다음 반응 혼합물을 앞서 실시예들의 방법에 따라 제조하였다.

성분	A	B	C
실리카겔 (5미크론, 330옹스트롬)	10g	10g	10g
이소프로판올	50ml	50ml	50ml
물	0.5ml	0.25ml	0.1ml
50% w/w i-PrOH 용액으로서 PEI-Pr-TriMeO-실란 (M.W=600)	9.9g	4.95g	2g

각 반응 혼합물을 상온에서 5분동안 교반한 다음 41hr.

30min 동안 교반없이 방치하였다. 각 혼합물을 여과하고 50ml 이소프로판올로 한번 50ml 메탄올로 두번 수세하였다. 각 여과액을 약 3hr. 12min 동안 $80-85^\circ\text{C}$ 에서 오븐 건조하여 각각의 PEI 결합 실리카겔 생성물을 수득하였다 : A : 1.2% N, B : 1.0% N, C : 0.9% N.

[실시예 5]

A. 50ml 헥산에서 평균입자직경 40미크론 및 평균기공크기 50옹스트롬을 지니는 실리카겔 10gram의 슬러리에 평균분자량 500을 지니는 PEI-Pr-triMeO-실란의 50% W/W i-PrOH 용액 19.71gram을 첨가하였다. 혼합물을 상온에서 5분동안 교반한 다음 약 2hr 동안 환류온도로 가열하였다. 혼합물을 상온으로 냉각시켜 여과하고 50ml 헥산으로 두번, 50ml 메탄올로 두번 수세하였다. 그 다음 여과액을 약 3hr 동안 $80-85^\circ\text{C}$ 에서 오븐 건조하여 PEI 결합 실리카겔 생성물을 수득하였다.

B. 등량의 제어기공유리(125미크론, 240옹스트롬)를 그에 사용된 실리카겔 대신 사용된 것을 제외하고는 실시예 5-A의 절차를 반복하여 대응하는 공유결합, 비가교된 PEI-PrSi-CPG 생성물을 수득하였다.

[실시예 6]

25ml 톨루엔에서 실시예 2의 PEI-PrSi-실리카겔 생성물(약 5미크론 약 330옹스트롬, 약 3% N) 5gram에 트리에틸아민 2ml에 이어서 무수아세트산 0.6ml를 첨가하였다. 혼합물을 흔들어 잘 섞어 균질화

$$17\frac{1}{2} \text{ hr}$$

한 다음 밤새 (약 17.5hr) 가끔 흔들면서 방치하였다. N-아세틸화 생성물을 여과하고 톨루엔 메탄올, 50/50 MeOH/HOH, 물로 연속적으로 수세하고 메탄올과는 3번 수세하였다. 그 다음 $80-85^\circ\text{C}$ 에서 오븐 건조하여 건조시켰다.

생성물 수득량 : 5gram

분석 : 8.52% C, 2.01% H, 2.81% N

[실시예 7]

동일량의 염화부티릴이 무수아세트산 대신 사용된 것을 제외하고는 실시예 6의 절차를 반복하였다. 대응 N-부탄오일 생성물의 수득량은 약 5.04gram이었다.

분석 : 9.12% C, 2.21% H, 2.62% N

[실시예 8]

염화헥산오일 0.8ml가 무수아세트산 대신 사용된 것을 제외하고는 실시예 6의 절차를 반복하였다. 대응 N-헥산오일 생성물의 수득량은 약 5.05gram이었다.

분석 : 9.59% C, 2.26% H, 2.58% N

[실시예 9]

PEI-PrSi-실리카겔 (약 15-20미크론, 약 300옹스트롬, 약 1.2% N)의 20gram을 결과 생성되는 N-부탄오일 생성물을 톨루엔과 한번, 메탄올과 함께 수세하는 것을 제외하고는 실시예 6의 절차에 따라 트리에틸아민 8ml와 염화부티릴 2.4ml로 처리하였다.

생성물 수득량 : 19.3gram

분석 : 5.96% C, 1.63% H, 1.17% N

[실시예 10]

실시예 5B의 동일량의 PEI-PrSi-CPG 생성물이 PEI-PrSi-실리카겔 생성물 대신 사용된 것을 제외하고

는 실시예 6의 절차를 반복하여 대응 N-아세틸화 PEI-PrSi-CPG 겔 생성물을 수득하였다.

[실시예 11]

PEI-PrSi-실리카겔 (약 5미크론, 약 300옹스트롬, 약 1.71% N)의 샘플 10gram을 실시예 9의 절차에 따라 염화부티릴 150%과량 및 트리에틸아민 동등량 (1.38ml BuOCl, 2.54ml Et₃N)으로 처리하였다.

수득량 : 10.2gram

분석 : 6.68% C, 1.26% H, 1.65% N

[실시예 12]

20m 툴루엔에서 PEI-PrSi-실리카겔(약 40미크론, 약 250옹스트롬, 약 3.5% N)의 20gram을 염화벤조일 10.5gram과 트리에틸아민 7.6gram으로 약 18hr 동안 처리하였다. 결과 생긴 벤조일화 PEI-PrSi-실리카겔 생성물을 여과한 다음 200ml 툴루엔, 200ml 메탄올, 200ml 물로 연속하여 수세하고 200ml 메탄올로 3번 수세하여 80-85°C에서 건조하였다.

수득량 : 22.2gram

분석 : 16.78% C, 1.94% H, 2.87% N

[실시예 13]

염화 3,5-디니트로벤조일 11.5gram이 트리에틸아민 7.0gram 존재에서 아실화제로서 사용된 것을 제외하고는 실시예 12의 절차를 반복하여 대응 3, 5-디니트로 벤조일화 PEI-PrSi-실리카겔 생성물을 수득하였다.

수득량 : 23.6gram

분석 : 13.33% C, 1.62% H, 3.37% N

[실시예 14]

염화 p-아니소일 10.5gram이 트리에틸아민 7.6gram 존재에서 아실화제로서 사용된 것을 제외하고는 실시예 12의 절차를 반복하여 대응 p-아니소일화 PEI-PrSi-실리카겔 생성물을 수득하였다.

수득량 : 22.8gram

[실시예 15]

염화 p-클로로벤조일 13.1gram이 동등량이 트리에틸아민 존재에서 아실화제로서 사용된 것을 제외하고는 실시예 12의 절차를 반복하여 대응 p-클로로벤조일화 PEI-PrSi-실리카겔 생성물을 수득하였다.

수득량 : 26.5gram

[실시예 16]

염화 p-톨루오일 11.6gram이 10.6ml(7.6g)트리에틸아민 존재에서 아실화제로서 사용된 것을 제외하고는 실시예 12의 절차를 반복하여 대응 p-톨루오일화 PEI-PrSi-실리카겔 생성물을 수득하였다.

수득량 : 22.0gram

[실시예 17]

표준 분석컬럼(4.6mm 내부직경 × 250mm 길이)를 결합상으로서 실시예 11에서 얻은 부티릴화 PEI-PrSi-실리카겔(약 5미크론, 약 300옹스트롬)으로 고압(7500psi)에서 슬러리 총전하였다. 슬러리는 25ml 메탄올에서 부티릴화 PEI-PrSi-실리카겔 3.69gram으로 이루어진다. 슬러리는 컬럼으로 주입한 후 추가 100ml 메탄올을 같은 압력에서 컬럼을 통하여 주입하였다. 컬럼을 고압 액체 크로마토그래프에 부착하였고 25mM KH₂PO₄, pH7의 용액을 안정된 바셀린이 280nm에서 관찰될 때까지 1200psi 유동속도에서 1ml/min으로 컬럼을 통하여 주입하였다. 2M(NH₄)₂SO₄ 와 25mM KH₂PO₄, pH7의 용액을 안정된 바셀린이 도달될 때까지 컬럼을 통하여 약 같은 유동속도에서 주입하였다. 2M(NH₄)₂SO₄ + 25mM KH₂PO₄로 제조된 고염 원총제 A에 용해된 단백질 혼합물의 용액(100마이크로리아이터)를 컬럼으로 주입하였고 단백질 성분을 1ml/min에서 30분에 걸쳐 25mM KH₂PO₄ (원총제 B)에 대해 염농도를 감소하므로 용리하였다. 단백질의 혼합물은 시토크롬 C 58microgram, 미오글로빈 377 microgram, 라이소자임 203 microgram, 오발부민 580 microgram 및 α 카이모트립시노겐 a 232microgram을 포함하였다. 각 단백질은 상호 서로 잘 분리된 진한 띠로서 용리하였다.

개개의 단백질을 위한 대표적인 질량 회수는 본래 양의 90%이상, 예를 들면, 시토크롬 C 90%, 미오글로빈 94% 및 라이소자임 92%이었다. 이 실시예의 컬럼은 단백질 분리를 위해 1000hr 이상의 크로마토그래프 사용후에도 크로마토그래프 성능은 어떠한 중대한 손실도 나타내지 않았다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

평균입자직경 약 3 내지 약 70미크론, 평균기공크기 약 50 내지 약 1000옹스트롬 단위를 지니는 실리카겔 입자, 또는 평균입자직경 약 37 내지 약 177미크론, 평균기공크기 약 40 내지 약 1000옹스트롬 단위를 지니는 제어기공유리 입자와 평균분자량 약 400 내지 약 1800을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필 트리메톡시 실란과의 N-아실화 공유결합, 비가교 결합된 폴리에틸렌이민 반응생성물. (여기

서 N-아실 작용기는 화학식 R-CO-를 지니며, 식에서 R은 C₁₋₈ 알킬, 페닐 그리고 C₁₋₄ 알콕시, 할로 및 니트로로 구성되는 군으로 부터 선택된 하나 또는 그 이상의 치환체로 페닐로 이루어지는 군으로 부터 선택된 구성원이다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 N-아실기가 부티릴인 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 실리카겔 입자가 평균입자직경 약 5 내지 약 40미크론, 평균기공크기 약 50 내지 330온스트롬 단위를 지니며 폴리에틸렌이미노 프로필 트리메톡시 실란이 평균분자량 약 400 내지 약 600을 지니는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 실리카겔 입자가 평균입자직경 약 40-62미크론, 평균기공크기 약 210 내지 약 520 온스트롬 단위를 지니며 폴리에틸렌 이미노프로필 트리메톡시 실란이 평균분자량 약 1000을 지니는 것을 특징으로 하는 생성물.

청구항 5

평균입자직경 약 3 내지 70미크론, 평균기공크기 약 50 내지 약 1000온스트롬 단위를 지니는 실리카겔입자, 또는 평균입자직경 약 37 내지 177미크론, 평균기공크기 약 40 내지 약 1000온스트롬 단위를 지니는 제어기공유리입자와 평균분자량 약 400 내지 약 1800을 지니는 폴리에틸렌이미노프로필 트리메톡시 실란과 함께 아실화제로서 산활로겐화물 또는 산무수물을 사용하여 N-아실화하는 공유결합, 비가교결합된 폴리에틸렌이민 반응생성물로 이루어지는 것을 특징으로 하는 특허청구의 범위 제1항의 N-아실화 생성물의 제조방법. (여기서 N-아실 작용기는 화학식, R-CO-를 지니며, 식에서 R은 C₁₋₈ 알킬, 페닐 그리고 C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로 및 니트로로 구성되는 군으로 부터 선택된 하나 또는 그 이상의 치환체로 치환된 페닐로 이루어지는 군으로 부터 선택된 구성원이다.)