

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 30/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200580011491.9

[45] 授权公告日 2008年9月10日

[11] 授权公告号 CN 100417941C

[22] 申请日 2005.2.10

[21] 申请号 200580011491.9

[30] 优先权

[32] 2004.2.16 [33] JP [31] 037589/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/002017 2005.2.10

[87] 国际公布 WO2005/078430 日 2005.8.25

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.16

[73] 专利权人 东京农工大学 TLO 株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 千叶一裕

[56] 参考文献

JP2001-96104A 2001.4.10

JP2002-249523A 2002.9.6

JP2002-273217A 2002.9.24

审查员 孙春梅

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 杨宏军

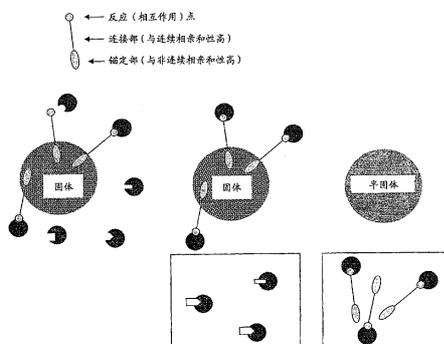
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 7 页

[54] 发明名称

化学物质的分离方法

[57] 摘要

本发明提供一种利用固相的物质分离方法，该方法不需实施化学处理、生物化学处理、给予光照射、电刺激等就能够容易地分离固定在固相上的物质。所述方法是分离第 1 物质和第 2 物质反应生成的反应物的方法，包括如下步骤：(a) 将第 1 物质和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，(b) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将第 1 物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，(c) 使固定在温度敏感性载体上的第 1 物质的反应部与第 2 物质反应得到反应物的步骤，(d) 将杂质从反应体系中除去的步骤，(e) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将反应物的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤。



1、一种分离方法，所述方法为分离第1物质和第2物质反应生成的反应物的方法，包括以下步骤，

(a) 将第1物质和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，

(b) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将第1物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，

(c) 使固定在温度敏感性载体上的第1物质的反应部与第2物质反应得到反应物的步骤，

(d) 将杂质从反应体系中除去的步骤，

(e) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将反应物的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，

此处，所述第1物质，具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质反应的反应部，

所述温度敏感性载体通过温度变化从固相状态可逆地变为液相状态，在固相状态下固定锚定部，液相状态下不固定锚定部。

2、一种分离方法，所述方法为分离第1物质和第2物质反应生成的反应物的方法，包括以下步骤，

(a) 使第1物质与第2物质反应得到反应物的步骤

(b) 将反应物和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，

(c) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将反应物的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，

(d) 将杂质从反应体系中除去的步骤，

(e) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将反应物的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，

此处，所述第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质反应的反应部，通过使第1物质与第2物质反应，将锚定部导入反应物中，

所述温度敏感性载体通过温度变化从固相状态可逆地变为液相

状态，固相状态下固定锚定部，液相状态下不固定锚定部。

3、一种分离方法，所述方法为分离利用第1物质和第2物质之间的相互作用生成的复合体的方法，包括以下步骤，

(a) 将第1物质和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，

(b) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将第1物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，

(c) 使固定在温度敏感性载体上的第1物质的相互作用部位与第2物质相互作用得到复合体的步骤，

(d) 从反应体系中除去杂质的步骤，

(e) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将复合体的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，

其中，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和能够与第2物质相互作用的相互作用部位，

温度敏感性载体通过温度变化而从固相状态可逆地变为液相状态，在固相状态下固定锚定部，在液相状态下不固定锚定部。

4、一种分离方法，所述方法为分离通过第1物质和第2物质的相互作用生成的复合体的方法，包括以下步骤，

(a) 使第1物质与第2物质相互作用得到复合体的步骤，

(b) 将复合体和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，

(c) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将复合体的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，

(d) 从反应体系中除去杂质的步骤，

(e) 通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将复合体的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，

其中，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质相互作用的相互作用部位，通过使第1物质与第2物质相互作用，将锚定部导入复合体中，

温度敏感性载体通过温度变化而从固相状态可逆地变为液相状态，在固相状态下固定锚定部，在液相状态下不固定锚定部。

化学物质的分离方法

技术领域

本发明涉及一种化学物质的分离方法。更详细而言，本发明涉及通过特定的温度敏感性载体和具有锚定（anchor）部的物质的相互作用，高效分离化学物质的方法。

背景技术

在化学过程、生物化学过程中物质的化学反应或相互作用，多数情况下在溶液中进行。在上述过程中，为了以尽可能高的纯度高效地得到目标物质，必须进行必要物质和不要物质的分离操作。以往，为进行物质分离，广泛应用了使用固体载体粒子的各种色谱法或固相合成法。例如，亲和色谱法使预先化学键合在固相载体表面的探针分子与亲和性高的配体分子特异性结合而与其他分子相区别，进行分离。在此方法中，与固相结合的物质和溶解在液相中物质的分离非常容易，为从固相中切断物质得到目标物质，必须进行一定的处理。即，在表面捕集到物质后，为使之再次释放，必须实施特定的化学处理、生物化学处理、给予光照射、电刺激等物理处理。（“Conn.Stamph 生化学”第3版，p133，东京化学同人）

发明内容

本发明的课题在于提供一种方法，所述方法为利用固相的物质分离方法，不需实施化学处理、生物化学处理、给予光照射、电刺激等就能够容易地分离固定在固相上的物质。

本发明利用含有锚定部的物质通过其锚定部与温度敏感性载体之间的相互作用，能够控制对特定物质的捕集或释放。

即，本发明的第1方案是第1物质和第2物质反应生成的反应物

的分离方法，其步骤包括，（a）混合第1物质和液相状态的温度敏感性载体的步骤，（b）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将第1物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，（c）使固定在温度敏感性载体上的第1物质的反应部与第2物质反应得到反应物的步骤，（d）从反应体系中除去杂质的步骤，（e）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将反应物锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤；此处，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质反应的反应部，温度敏感性载体通过使温度变化而从固相状态可逆地变为液相状态，固相状态时能够固定锚定部，液相状态时不能固定锚定部。

本发明的第2方案为第1物质和第2物质反应生成的反应物的分离方法，其步骤包括，（a）第1物质与第2物质反应得到反应物的步骤，（b）混合反应物和液相状态的温度敏感性载体的步骤，（c）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将反应物的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，（d）从反应体系中除去杂质的步骤，（e）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，反应物的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤；此处，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质反应的反应部，通过使第1物质与第2物质反应，将锚定部导入反应物中，温度敏感性载体通过温度变化而从固相状态可逆地变为液相状态，固相状态时能够固定锚定部，液相状态时不能固定锚定部。

本发明的第3方案是通过第1物质和第2物质之间的相互作用生成的复合体的分离方法，其步骤包括，（a）将第1物质和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，（b）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将第1物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，（c）使固定在温度敏感性载体上的第1物质的相互作用部位与第2物质相互作用得到复合体的步骤，（d）从反应体系中除去杂质的步骤，（e）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将复合体的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，此

处，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和能够与第2物质相互作用的相互作用部位，温度敏感性载体通过温度变化而从固相状态可逆地变为液相状态，固相状态时能够固定锚定部，液相状态时不能固定锚定部。

本发明的第4方案为通过第1物质和第2物质的相互作用生成的复合体的分离方法，其步骤包括，(a)使第1物质与第2物质相互作用得到复合体的步骤，(b)将复合体和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，(c)通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将复合体的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，(d)从反应体系中除去杂质的步骤，(e)通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将复合体的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，此处，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和能够与第2物质相互作用的相互作用部位，通过使第1物质与第2物质相互作用，将锚定部导入复合体中，温度敏感性载体通过温度变化而从固相状态可逆地变为液相状态，固相状态时能够固定锚定部，液相状态时不能固定锚定部。

附图说明

[图1]图1为温度敏感性载体因温度不同而变为固相状态、液相状态的示意图。

[图2]图2为吸附在固相载体表面的温度敏感性载体的示意图。

[图3]图3为胶束或乳胶状态的温度敏感性载体的示意图。

[图4]图4为通过相互作用得到的复合体的分离方法示意图。

[图5]图5为温度敏感性胶束载体示意图。

[图6]图6为肽合成示意图。

[图7]图7为肽合成示意图。

具体实施方式

本发明中使用的温度敏感性载体是一种通过温度变化而可逆地

从固相状态变为液相状态，具有固相状态时固定第1物质的锚定部，液相状态时不能固定锚定部的性质的物质。作为温度敏感性载体，只要是具有上述性质的物质即可，无特殊的限制，例如可以举出烃类。其中，优选碳原子数在10~30的烃类，更优选正十四烷、正十六烷、正十八烷、二十烷、环己烷。然后，通过改变上述烃类的碳链，能够按照要求改变从固相状态变为液相状态的温度。另外，也可以通过混合2种以上的烃类，改变从固相状态变为液相状态的温度。

上述烃类可以通过升高温度从固相状态变为液相状态，但相反，也可以使用通过升高温度从液相状态变为固相状态的物质。

在本发明中，所谓液相状态除包括液相之外，还包括温度敏感性载体的软化状态或半固体状态。另外，本发明中，所谓固相状态除包括固相之外，还包括温度敏感性载体的固化状态。然后，温度敏感性载体显示出在固化状态下固定锚定部，在软化状态或半固体状态下不能固定锚定部的性质。

作为本发明使用的温度敏感性载体的形态，除包括图1所示的温度敏感性载体整体可逆地从固相状态变为液相状态的形态外，也包括图2所示的温度敏感性载体被吸附或键合在其他固体载体表面上的形态。作为此时使用的固体载体，只要是能够吸附或键合温度敏感性载体的物质即可，无特殊的限制，例如可以举出，表面键合十八烷基的硅胶(ODS)或玻璃珠、铂粉末等。另外，将预先溶于环己烷等的熔点高于环己烷的链状烷烃类与环己烷的混合物的形式冷却、析出得到的物质也可作为载体。

另外，作为本发明中使用的温度敏感性载体的其他形态，也可以为图3所示的被表面活性剂包裹的胶束或乳胶的形态。作为此时使用的表面活性剂，只要是能够形成胶束或乳胶的物质即可，无特殊的限制，例如可以举出卵磷脂或溶血卵磷脂等磷脂类等。上述表面活性剂也可以2种以上适当地混合使用。

本发明中使用的第1物质是具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部、和与第2物质反应的反应部或与第2物质相互作用的相互作

用部位的物质。作为锚定部，只要是能够固定在温度敏感性载体上的部位即可，无特殊的限制，例如可以举出长链烷基、聚乙二醇（PEG）等聚醚链、聚苯乙烯或聚乙烯等聚合物类等。

另外，作为第1物质的反应部，只要是能够与第2物质反应的部位即可，无特殊的限制，例如可以举出氨基、羧基、醛基、磺酸基、羟基、硫醇基、卤代烷基、不饱和烃基、硝基、酸酐、卤化酰基、异氰酸酯基、异硫氰酸酯基等。

作为第1物质的相互作用部位，只要是能够与第2物质相互作用的部位即可，无特殊的限制，例如可以举出抗生素蛋白、生物素、抗原、抗体、生理活性物质、肽、低聚糖、糖肽、核酸、肽或蛋白质的表位等。

本发明使用的第1物质可以通过使上述锚定部和反应部或相互作用部位相结合而制备。另外，必要时，锚定部和反应部或相互作用部位之间可以设置连接部。连接部具有使锚定部和反应部或相互作用部位之间保持适当的距离、易于与第2物质反应或相互作用的作用。对连接部没有特殊的限制，例如可以举出长链烷基、聚乙二醇（PEG）等聚醚链、聚硫醚链等。

此外，上述第1物质的制备方法没有特殊的限制，能够利用通常的化学合成等制得。

作为本发明使用的第2物质，只要是能够与第1物质的反应部反应的物质即可，无特殊的限制，例如可以举出具有羧基、氨基、醛基、磺酸基、羟基、硫醇基、卤代烷基、不饱和烃基、硝基、酸酐、卤化酰基、异氰酸酯基、异硫氰酸酯基等的物质。或者，作为第2物质，只要是能够与第1物质的相互作用部位相互作用的物质即可，无特殊的限制，例如可以举出抗生素蛋白、生物素、抗原、抗体、生理活性物质、肽、低聚糖、糖肽、核酸、肽或蛋白质的表位等。

例如，在进行肽合成时，可以举出氨基作为第1物质的反应部，用 t-BOC 保护氨基、用二异丙基碳二亚胺（DIPCD）等活化羧基的氨基酸作为第2物质。

下面，对本发明的第1方案进行说明。

本发明第1方案是通过第1物质和第2物质反应生成的反应物的分离方法，其步骤包括，(a)将第1物质和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，(b)通过改变反应体系的温度使温度敏感性载体变为固相状态，将第1物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，(c)使固定在温度敏感性载体上的第1物质的反应部与第2物质反应得到反应物的步骤，(d)从反应体系中除去杂质的步骤，(e)通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将反应物锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，此处，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质反应的反应部，温度敏感性载体通过改变温度从固相状态可逆地变为液相状态，固相状态时能够固定锚定部，液相状态时不能固定锚定部。

上述(a)步骤中，第1物质和温度敏感性载体均匀地溶解或分散。此时，也可以适当使用水等溶剂使第1物质和温度敏感性载体溶解或分散。然后在(b)步骤中，通过改变温度使温度敏感性载体变为固相状态，此时第1物质的锚定部被固定在温度敏感性载体上。接下来在(c)步骤中第1物质的反应部和第2物质反应，得到固定有锚定部的反应物。此时，可以使用反应促进剂、反应活化剂等。进而在(d)步骤中，除去未反应的第2物质、反应促进剂、反应活化剂等杂质。作为除去的方法可以举出用溶剂清洗反应体系，过滤等。此时，因为反应物的锚定部固定在温度敏感性载体上，所以杂质和反应物能够很容易地分离。另外，温度敏感性固体的尺寸小时，为了分离溶剂或溶解在溶剂中的杂质，利用温度敏感性固体和溶剂的比重差通过离心分离进行分离，或在温度敏感性固体表面上预先键合或捕集对特定物质具有高亲和性的物质，利用与此亲和部分相互作用的其他固体表面，或与高分子的相互作用，可以将尺寸小的温度敏感性固体粒子固定在特定的固体表面。此时，溶液和温度敏感性固体粒子之间即使不存在比重差，也能很容易地分离。然后，在(e)步骤中，使温度敏感性载体变为液相状态，由此将反应物从温度敏感性载体中释放

出来。此时，不需进行化学反应等即可将反应物释放。通过回收此释放出的反应物，能够得到目标物质。

另外，例如，进行肽的合成时，在（d）步骤之后，通过进一步使用伸长（elongating）的氨基酸作为第2物质，反复进行（c）步骤和（d）步骤，能够合成所期望的氨基酸长度的肽。

以下，对本发明的第2方案进行说明。

本发明的第2方案是通过第1物质和第2物质反应生成的反应物的分离方法，其步骤包括，（a）使第1物质与第2物质反应得到反应物的步骤，（b）将反应物和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤，（c）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态，将反应物的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤，（d）从反应体系中除去杂质的步骤，（e）通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态，将反应物的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤，此处，第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质反应的反应部，通过使第1物质与第2物质反应，将锚定部导入反应物中，温度敏感性载体通过改变温度可逆地从固相状态变为液相状态，固相状态时能够固定锚定部，液相状态时不能固定锚定部。

上述（a）步骤中，使第1物质和第2物质反应得到反应物。此时，可以使用反应促进剂或反应活化剂等。此反应可在溶剂中的均一体系内进行，与以往的固相合成法相比，能够高效地反应。然后在（b）步骤中，使反应物和温度敏感性载体均匀地溶解或分散。之后，在（c）步骤中，通过改变温度使温度敏感性载体变为固相状态，此时反应物的锚定部被固定在温度敏感性载体上。进而在（d）步骤中，除去未反应的第2物质、反应促进剂、反应活化剂等杂质。作为除去的方法可以举出用溶剂清洗反应体系，过滤等。此时，因为反应物的锚定部被固定在温度敏感性载体上，所以杂质和反应物能够很容易地分离。然后，在（e）步骤中，将温度敏感性载体变为液相状态，由此使反应物从温度敏感性载体中释放出来。此时，不需进行化学反应等即可释放反应物。通过回收此释放出的反应物，能够得到目标物质。

此外,例如,进行肽的合成时,在(e)步骤之后,进一步使用伸长的氨基酸作为第2物质,反复进行(a)步骤~(e)步骤,能够合成所期望的氨基酸长度的肽。图7表示肽合成的概念图。图7(i)中,例如在0°C下将环己烷保持在分散于DMF中的固相(ODS)表面,使其固化。此时,与锚定分子键合的C末端氨基酸和固化在固相载体表面的环己烷一同被保持。之后,在图7(ii)中,例如通过升温至50°C,使固相表面的环己烷完全溶解于DMF中。与此同时,与锚定分子键合的C末端氨基酸也溶解于DMF相中。此时,在均匀溶液中与氨基酸伸长试剂反应。之后,在图7(iii)中,边搅拌边再次冷却到0°C,溶解于DMF中的锚定分子和环己烷由于环己烷的固化而坚固地保持在ODS表面。在此情况下,可以使用DMF清洗除去剩余的氨基酸伸长试剂。

以下,对本发明的第3方案进行说明。

本发明的第3方案是通过第1物质和第2物质间的相互作用生成的复合体的分离方法,其步骤包括,(a)将第1物质和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤,(b)通过改变反应体系的温度使温度敏感性载体变为固相状态,将第1物质的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤,(c)使固定在温度敏感性载体上的第1物质的相互作用部位与第2物质相互作用得到复合体的步骤,(d)从反应体系中除去杂质的步骤,(e)通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为液相状态,复合体的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤,此处,第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质相互作用的相互作用部位,温度敏感性载体通过温度变化从固相状态可逆地变为液相状态,固相状态时能够固定锚定部,液相状态时不能固定锚定部。

上述(a)步骤中,将第1物质和温度敏感性载体均匀地溶解或分散。此时,可以适当地使用水等溶剂使第1物质和温度敏感性载体溶解或分散。然后,在(b)步骤中,通过改变温度使温度敏感性载体变为固相状态,此时第1物质的锚定部被固定在温度敏感性载体上。

接下来在(c)步骤中第1物质的相互作用部位与第2物质相互作用,得到固定有锚定部的复合体。此时,未与第1物质发生相互作用的其余物质没有形成复合体,仍然溶解或分散在溶剂中。进而,在(d)步骤中,除去未与第1物质发生相互作用的其他物质等杂质。作为除去的方法可以举出用溶剂清洗反应体系,过滤等。此时,因为复合体的锚定部固定在温度敏感性载体上,所以杂质和复合体能够很容易地分离。然后,在(e)步骤中,温度敏感性载体变为液相状态,由此使复合体从温度敏感性载体中释放出来。此时,不需进行化学反应等即能够释放复合体。通过回收此释放出的复合体,能够得到目标物质(参见图4)。

以下,对本发明的第4方案进行说明。

本发明的第4方案是通过第1物质和第2物质间的相互作用生成的复合体的分离方法,其步骤包括,(a)使第1物质与第2物质相互作用得到复合体的步骤,(b)将复合体和液相状态的温度敏感性载体混合的步骤,(c)通过改变反应体系温度使温度敏感性载体变为固相状态,将复合体的锚定部固定在温度敏感性载体上的步骤,(d)从反应体系中除去杂质的步骤,(e)通过改变反应体系的温度使温度敏感性载体变为液相状态,将复合体的锚定部从温度敏感性载体中释放的步骤,此处,第1物质具有能够固定在温度敏感性载体上的锚定部和与第2物质相互作用的相互作用部位,通过使第1物质与第2物质相互作用,将锚定部导入复合体中,温度敏感性载体通过温度变化从固相状态可逆地变为液相状态,固相状态时能够固定锚定部,液相状态时不能固定锚定部。

上述(a)步骤中,使第1物质和第2物质相互作用得到复合体。此时,未与第1物质相互作用的其他物质不形成复合体。然后,在(b)步骤中,使复合体和温度敏感性载体均匀地溶解或分散。此时,适当地使用水等溶剂,可以使复合体和温度敏感性载体溶解或分散。之后,在(c)步骤中,通过改变温度,使温度敏感性载体变为固相状态,此时复合体的锚定部被固定在温度敏感性载体上。进而在(d)

步骤中，除去未与第1物质发生相互作用的其他物质等杂质。作为除去的方法可以举出用溶剂清洗反应体系，过滤等。此时，因为复合体的锚定部被固定在温度敏感性载体上，所以杂质和复合体能够很容易地分离。然后，在(e)步骤中，使温度敏感性载体变为液相状态，由此将复合体从温度敏感性载体中释放出来。此时，不需进行化学反应等即能够释放复合体。通过回收此释放出的复合体，能够得到目标物质。

实施例 1

〈带有配体的锚定分子的合成〉

将生物素(0.11g)、N, N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(0.12g)和三乙基胺(0.24g)溶解于15毫升DMF中，室温下搅拌6小时。然后，向此溶液中添加8-氨基-3,6-二氧辛烷胺胆甾醇氨基甲酸酯(0.26g)，将反应溶液搅拌16小时。用旋转式蒸发器减压蒸馏除去溶剂，通过硅胶柱色谱法分离·精制，得到作为带有配体的锚定分子的{3-[2-(2-{2-[5-(2-氧代-六氢-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)-戊酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙基}-氨基甲酸13-(1,5-二甲基-己基)-10-甲基-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基酯，收率为60%。

〈温度敏感性胶束载体的配制〉

将7.5毫克卵磷脂、5.0毫克溶血卵磷脂、35.0毫克作为带有配体的锚定分子的{3-[2-(2-{2-[5-(2-氧代-六氢-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)-戊酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙基}-氨基甲酸13-(1,5-二甲基-己基)-10-甲基-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基酯、30毫克正十六烷，溶解于2毫升水中后，在30℃的热水浴中，用双筒混合器(IKA(注册商标)-WERKE)以

20000rpm, 搅拌 3 分钟。之后在冰浴中冷却 10 分钟 (参见图 5)。

〈通过电泳检测抗生物素蛋白〉

将 20 微升 6 毫克/毫升的抗生物素蛋白 (ImmunoPure (注册商标) Avidin; PIERCE) 水溶液加入到 20 微升所得的胶束溶液中, 用均质混合器 (IKA (注册商标) - WERKE) 搅拌 1 分钟。之后边时常地冷却样品边加入缓冲液 (三盐酸缓冲液 + EDTA) 进行清洗, 用 Microcon YM-100 (Microcon (注册商标) 离心式过滤器, M.W.10 万; MILLIPORE) 浓缩, 反复操作 5 次。将反应液在 40°C 的热水浴中边搅拌边加热 1 小时。之后, 通过离心分离 (CHIBITAN - II 台式离心机; MILLIPORE), 除去胶束, 对下相的水溶液进行采样, 按下述条件进行电泳。

电泳槽: XY PANTERA SYSTEM ERICA

电泳用凝胶: XY PANTERA GEL

染色液: Bio - Safe™ Coomassie; Coomassie (注册商标) G250 Stain (BIO - RAD™)

缓冲液: 0.0625M Tris HCl (pH6.8)、5% 2 - 巯基乙醇、0.005% BPB、20%甘油、2% SDS

将 4 微升样品用 4 微升样品缓冲液稀释后, 在 90°C 下加热 15 分钟使之变性。用 Mili-Q 水清洗电泳用凝胶, 每条泳道 (lane) 中加入 6 微升样品, 通入 17 分钟电流 (200V)。结束后用 Mili-Q 水清洗凝胶 3 次, 在染色液中浸泡一小时。进而, 为使之浸泡在 Mili-Q 水中一夜, 进行脱色。通过本操作使其与配体锚定分子相互作用, 对被捕集在胶束表面的抗生物素蛋白分子进行分离、检测。

实施例 2

〈温度敏感性均一溶液反应 (相互作用) · 固相表面捕集系统的构建 (1)〉

将 2.0 克 ODS (表面键合有十八烷基的硅胶) 分散到由 1 毫升环

己烷和 9 毫升 DMF (二甲基甲酰胺) 于 25°C 下混合形成的溶液中。通过在相同温度下用涡旋混合器(Vortex Mixer)搅拌, 使其分离成两相, 作为上层主成分的环己烷被保持在 ODS 表面。然后, 将此溶液冷却至 0°C, ODS 表面的环己烷凝固, 在保持在表面的状态下固化。然后将此分散液升温至 50°C, 环己烷融解的同时, 与 DMF 均匀地溶解。此现象能够通过温度的变化可逆地反复。

〈使用环己烷·DMF·ODS 体系形成肽键〉

将采用 DMF 制成的上述温度敏感性均一溶液反应(相互作用)固相表面捕集系统升温至 50°C 后, 溶解 0.1 毫摩尔 2-氨基-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯。向其中加入 20 毫升含有 0.3 毫摩尔 Fmoc-Gly-OBt、0.5 毫摩尔二异丙基碳二亚胺(DIPCD)的 DMF 溶液, 搅拌 90 分钟。然后, 将本反应体系边搅拌边冷却至 0°C。冷却后, 通过抽滤法除去 DMF 溶液, 固体(环己烷·ODS)用 20 毫升冷却到 5°C 以下的 DMF 清洗 3 次。然后, 将固体(环己烷·ODS)升温至 40°C, 用真空泵减压蒸馏除去环己烷。最后用乙腈清洗 ODS。从乙腈溶液中能够得到 2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-乙酰基氨基]-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯, 收率为 97%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz) d: 7.77 (2H, d, $J=7.3\text{Hz}$), 7.59 (2H, d, $J=7.3\text{Hz}$), 7.40 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 7.31 (2H, dt, $J=0.7, 7.3\text{Hz}$), 6.52 (2H, s), 6.38 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 5.44-5.37 (1H, br), 5.10 (1H, d, $J=12.1\text{Hz}$), 5.02 (1H, d, $J=12.1\text{Hz}$), 4.62 (2H, dd, $J=8.4, 4.8\text{Hz}$), 4.42 (2H, d, $J=7.0\text{Hz}$), 4.24 (1H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 3.96-3.92 (8H, m), 2.21-2.16 (1H, m), 1.81-1.76 (4H, m), 1.75-1.70 (2H, m), 1.48-1.43 (6H, m), 1.37-1.21 (84H, br), 0.91 (3H, d, $J=7.0\text{Hz}$), 0.88 (9H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 0.86 (3H, d, $J=7.0\text{Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz) d: 171.5, 168.7, 156.5, 153.1, 143.6, 141.2, 138.3, 130.0, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0, 107.0,

73.4, 69.2, 67.5, 67.4, 57.1, 47.1, 32.0, 31.4, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 22.8, 19.0, 17.7, 14.2; MALDITOF-MS (pos) 计算值 $C_{83}H_{138}N_2O_8$ $[M + Na]^+1314$, 实测值 1314。

实施例 3

〈温度敏感性均一溶液反应(相互作用)·固相表面捕集系统的构建(2)〉

将 2.0 克 ODS (表面键合有十八烷基的硅胶) 分散到由 1 毫升环己烷、7 毫升 NMP (N-甲基-2-吡咯烷酮) 在 20°C 下混合形成的溶液中。在相同温度下通过涡旋混合器搅拌, 使其分离成两相, 作为上层主成分的环己烷保持在 ODS 表面。然后, 将此溶液冷却至 -10°C, ODS 表面的环己烷凝固, 在表面保持状态下固化。然后将此分散液升温至 20°C, 环己烷融解的同时, 与 NMP 均匀地溶解。此现象能够通过温度的变化可逆地反复。

〈使用环己烷·NMP·ODS 体系形成肽键〉

将采用 NMP 制成的上述温度敏感性均一溶液反应(相互作用)·固相表面捕集系统升温至 20°C 后, 溶解 0.1 毫摩尔 2-氨基-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯。向其中加入 10 毫升含有 0.3 毫摩尔 Fmoc-Gly-OBt、0.5 毫摩尔二异丙基碳二亚胺 (DIPCD) 的 NMP 溶液, 搅拌 90 分钟。然后, 将本反应体系边搅拌边冷却至 -10°C。冷却后, 通过抽滤法除去 NMP 溶液, 将固体物质(环己烷·ODS) 用 20 毫升冷却到 5°C 以下的 NMP 清洗 3 次。然后, 将固体(环己烷·ODS) 升温至 20°C, 用真空泵减压蒸馏除去环己烷。最后用乙腈清洗 ODS。从乙腈溶液中能够得到 2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-乙酰基氨基]-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯, 收率为 99% (参见图 6)。

实施例 4

〈采用环己烷·DMF·ODS 体系的肽键逐级连续形成反应〉

将采用 DMF 制成的上述温度敏感性均一溶液反应(相互作用)·固相表面捕集系统升温至 50℃后,溶解 0.1 毫摩尔 2-氨基-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯。向其中加入 20 毫升含有 0.3 毫摩尔 Fmoc-Gly-OBt、0.5 毫摩尔二异丙基碳二亚胺(DIPCD)的 DMF 溶液,搅拌 90 分钟。然后,将本反应体系边搅拌边冷却至 0℃。冷却后,通过抽滤法除去 DMF 溶液,固体(环己烷·ODS)用 20 毫升 DMF 清洗 3 次。然后,将固体(环己烷·ODS)升温至 20℃后,加入 10 毫升 10%DBU/DMF 溶液。在相同温度下搅拌 2 分钟后,边搅拌边使反应液冷却至 0℃。冷却固化结束后,再次过滤,用 DMF 清洗。通过 DBU 处理操作,使与 N 末端氨基键合的 Fmoc 基脱离,变为氨基。通过反复进行相同的操作,能够逐级形成肽键。

$^1\text{H-NMR}$ (600MHz) d: 7.74 (1H, d, J=9.2Hz), 6.53 (2H, s), 5.11 (1H, d, J=12.1Hz), 5.02 (1H, d, J=12.1Hz), 4.61 (1H, dd, J=9.2, 5.1Hz), 3.95 (4H, t, J=6.6Hz), 3.94 (2H, t, J=6.6Hz), 3.39 (2H, s), 2.24 - 2.18 (1H, m), 1.81 - 1.76 (4H, m), 1.75 - 1.71 (2H, m), 1.49 - 1.44 (6H, m), 1.37 - 1.20 (84H, br), 0.93 (3H, d, J=7.0Hz), 0.90 - 0.86 (12H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz) d: 172.6, 171.8, 153.1, 130.3, 125.5, 106.9, 73.4, 69.2, 67.2, 56.6, 44.8, 32.0, 31.3, 30.4, 30.3, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.2, 22.8, 19.1, 17.8, 14.2; MALDI TOF-MS (pos) 计算值 $\text{C}_{68}\text{H}_{128}\text{N}_2\text{O}_6$ [M + Na] $^+$ 1091, 实测值 1091.

实施例 5

〈使用环己烷·NMP·ODS 体系的肽键逐级连续形成反应〉

将采用 NMP 制成的上述温度敏感性均一溶液反应(相互作用)·固相表面捕集系统升温至 20℃后,溶解 0.1 毫摩尔 2-氨基-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯。加入 10 毫升含有 0.3 毫摩尔 Fmoc-Gly-OBt、0.5 毫摩尔二异丙基碳二亚胺(DIPCD)的 NMP 溶液

后，搅拌 90 分钟。然后，将本反应体系边搅拌边冷却至 -10°C 。冷却后，通过抽滤法除去 NMP 溶液，固体（环己烷·ODS）用 20 毫升冷却至 5°C 以下的 NMP 清洗 3 次。然后，将固体（环己烷·ODS）升温至 20°C 后，添加 10 毫升 10% DBU/NMP 溶液。在相同温度下搅拌 2 分钟后，边搅拌边使反应液冷却至 -10°C 。冷却固化结束后，再次过滤，用 NMP 清洗。通过 DBU 处理操作，使与 N 末端氨基键合的 Fmoc 基脱离，变为氨基。通过反复进行相同的操作，能够逐级形成肽键。

实施例 6

〈使用环己烷·DMF·二十烷(链状烷烃)的肽键逐级连续形成反应〉

将 0.1 毫摩尔 2-氨基-3-甲基-丁酸 3, 4, 5-三-十八烷氧基苄基酯、100 毫克二十烷溶解于 9 毫升 DMF、1 毫升环己烷中。在其中加入 5 毫升含有 0.3 毫摩尔 Fmoc-Gly-OBt、0.5 毫摩尔二异丙基碳二亚胺 (DIPCD) 的 DMF 溶液，在 25°C 下搅拌 90 分钟。然后，将本反应体系边搅拌边冷却至 -10°C 。此时，析出白色固体粒子。通过抽滤法除去 DMF 溶液，将固体（环己烷·二十烷）用 20 毫升冷却至 0°C 以下的 DMF 清洗 3 次。然后，将固体（环己烷·二十烷）升温至 20°C 后，加入 10 毫升 10% DBU/DMF 溶液。在相同温度下搅拌 2 分钟后，边搅拌边使反应液冷却至 -10°C 。冷却固化结束后，再次过滤，用冷却至 0°C 以下的 DMF 清洗。通过 DBU 处理操作，使与 N 末端氨基键合的 Fmoc 基脱离，变为氨基。通过反复进行相同的操作，能够逐级形成肽键。

实施例 7

〈从均一溶液体系中将含有氨基的物质除去的清除剂的应用方法（利用 ODS 粒子的情况）（1）〉

在 50°C 下，将 0.1 毫摩尔 3, 4, 5-三-十八烷氧基苯甲醛和 3 毫升环己烷溶于 10 毫升溶有 0.05 毫摩尔苯胺的 DMF 溶液中。搅拌

16 小时，加入 2.0 克 ODS 后，边搅拌边冷却至 -10°C 。冷却后，通过抽滤法分离 DMF 溶液和固体（环己烷·ODS）。固体部分冷却时用 10 毫升冷却至 0°C 以下的 DMF 清洗。通过本操作，使苯胺与醛反应，以 98% 的反应收率，捕集到固体中。

实施例 8

〈从均一溶液体系中将含有氨基的物质除去的清除剂的应用方法（不利用 ODS 粒子的情况）（2）〉

在 50°C 下，将 0.1 毫摩尔 3, 4, 5-三-十八烷氧基苯甲醛和 3 毫升环己烷溶解于 10 毫升溶解有 0.05 毫摩尔苯胺的 NMP 溶液中。搅拌 16 小时，边搅拌边冷却至 -10°C 。冷却后，通过抽滤法分离 NMP 溶液和固体（环己烷）。固体部分冷却时用 10 毫升 NMP 清洗。通过本操作使苯胺和醛反应，以 96% 的反应收率，捕集于固体中。

实施例 9

〈从均一溶液体系中将含有氨基的物质除去的清除剂的应用方法（不利用 ODS 粒子的情况）（3）〉

在 50°C 下将 0.1 毫摩尔 3, 4, 5-三-十八烷氧基苯甲醛、3 毫升环己烷、500 毫克二十烷溶于 10 毫升溶解有 0.05 毫摩尔苯胺的 DMF 溶液中。搅拌 16 小时，边搅拌边冷却至 0°C 。冷却后，通过抽滤法分离 DMF 溶液和固体（环己烷和二十烷的混合物）。固体部分冷却时用 10 毫升 DMF 清洗。通过本操作使苯胺与醛反应，以 98% 的反应收率，捕集于固体中。

参考例

〈温度敏感性固相载体的配制〉

将 35.0 毫克作为带有锚定部的探针分子的 {3-[2-(2-{2-[5-(2-氧代-六氢-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)-戊酰基氨基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙基}-氨基甲酸 13-(1,5-二甲

基-己基)-10-甲基-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基酯、300毫克正十六烷溶于2毫升水中后,在30℃的热水浴中用双筒混合器(IKA(注册商标)-WERKE)以20000rpm,搅拌3分钟。在此状态下边搅拌边迅速将容器冷却至0℃。由此使温度敏感性载体以带有锚定部的探针分子的探针部分朝向水相的形态分散于水中,固定化。

产业上的可利用性

通过本发明,不仅使化学物质、生化学物质的连续合成·精制·分离操作显著地高效率化,而且,利用生物体物质间的相互作用的物质分离生成法或特定物质的检验·分析法等可在极其广泛的技术领域中得到革新性的进展。

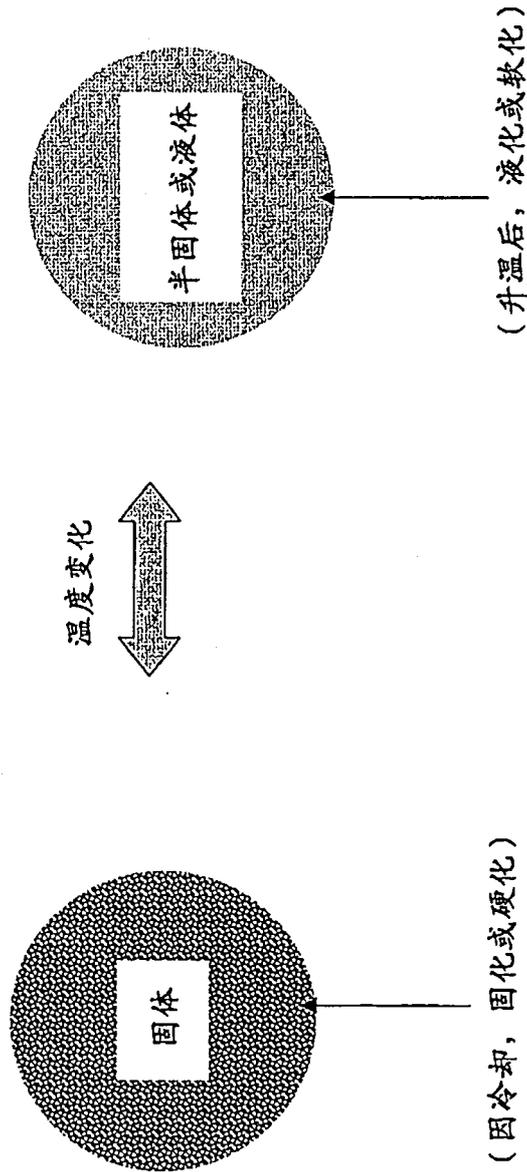


图1

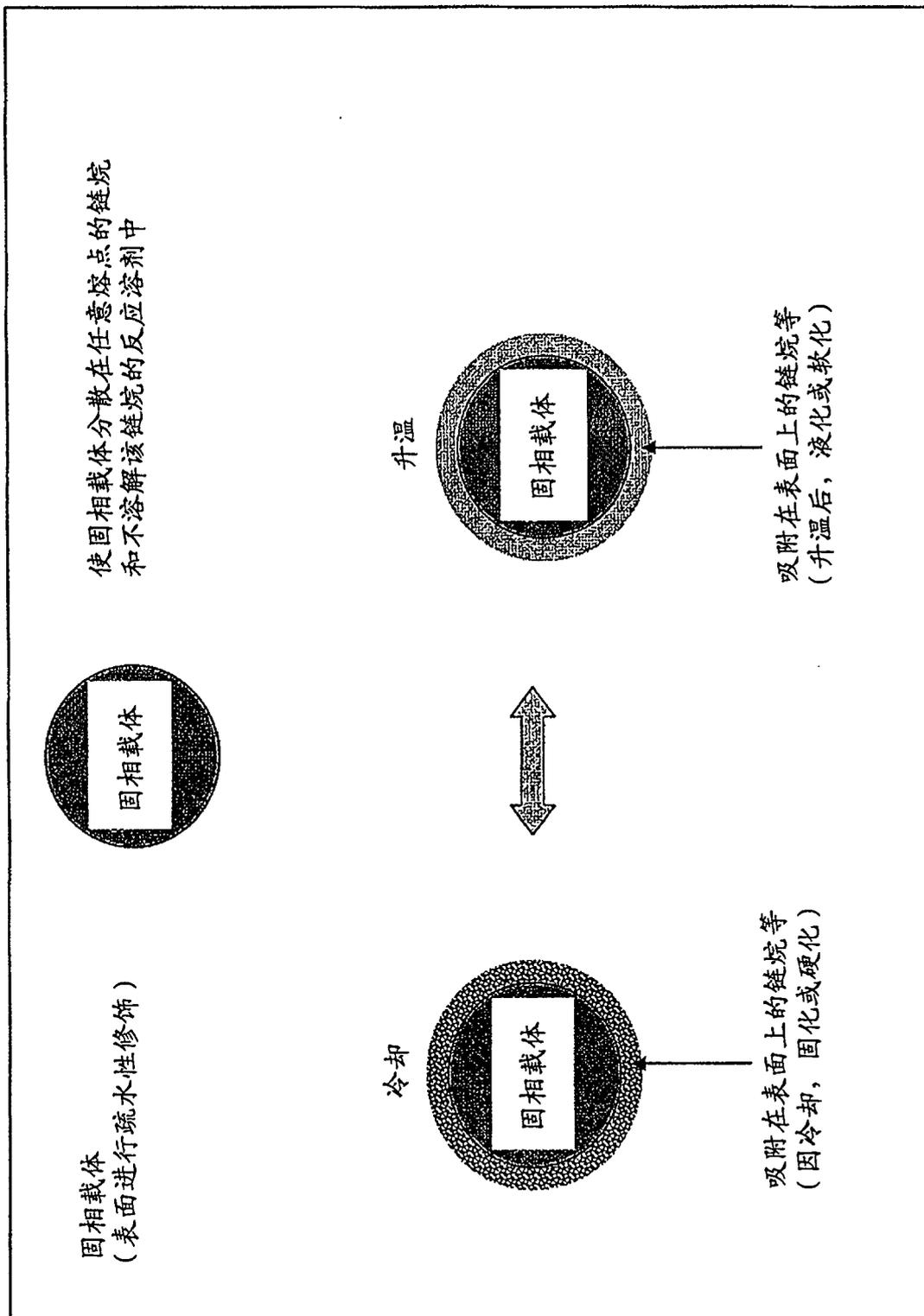


图 2

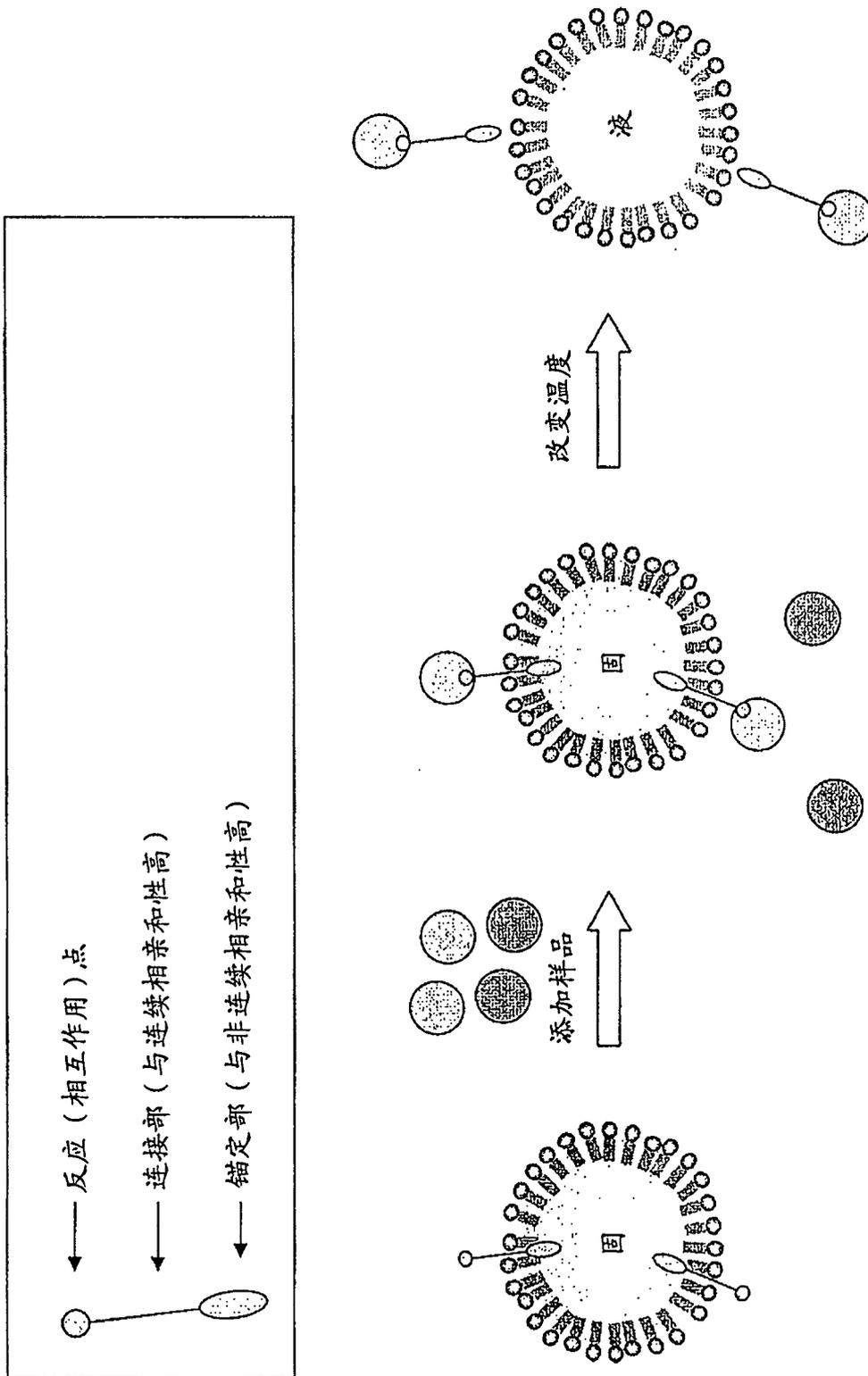


图 3

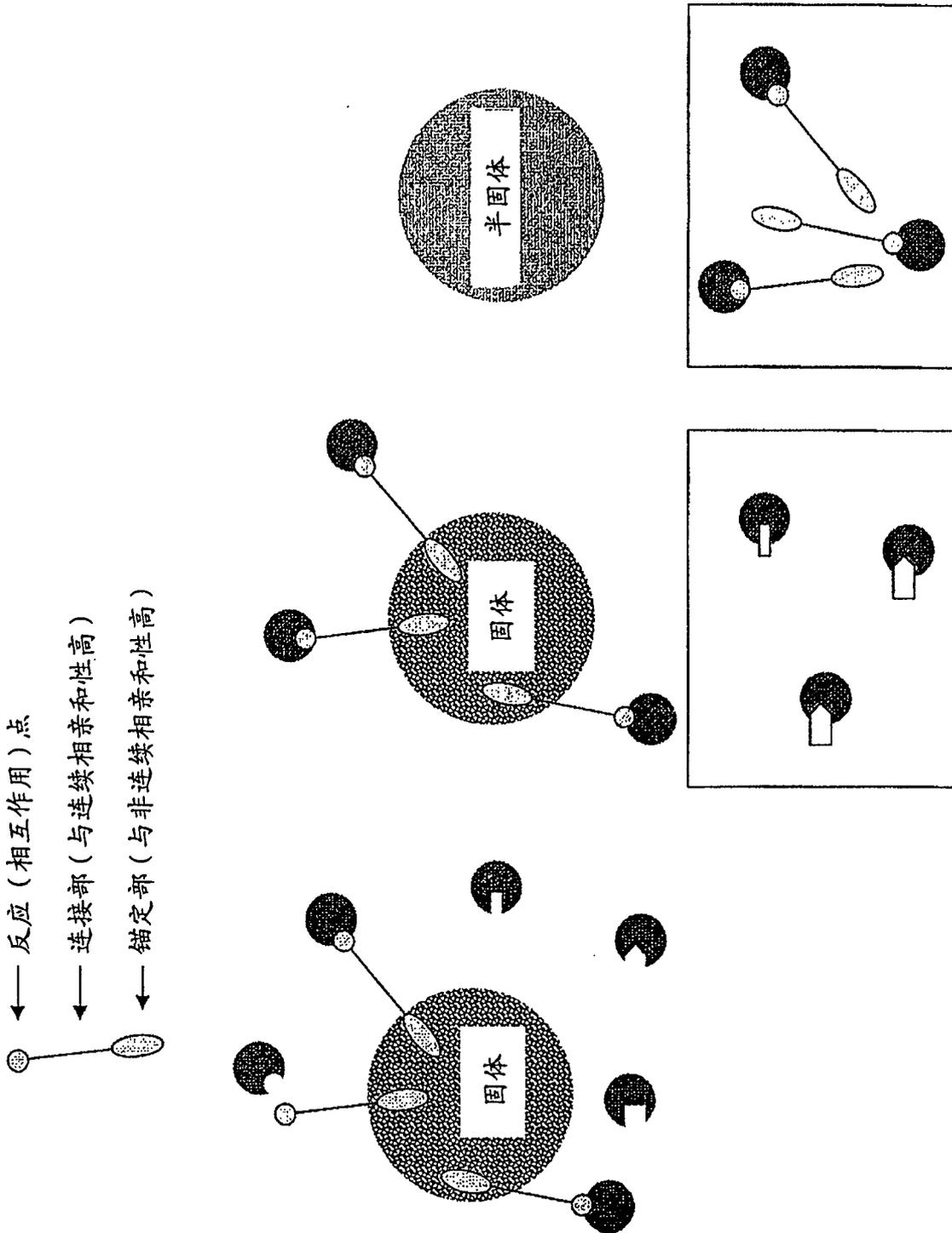


图 4

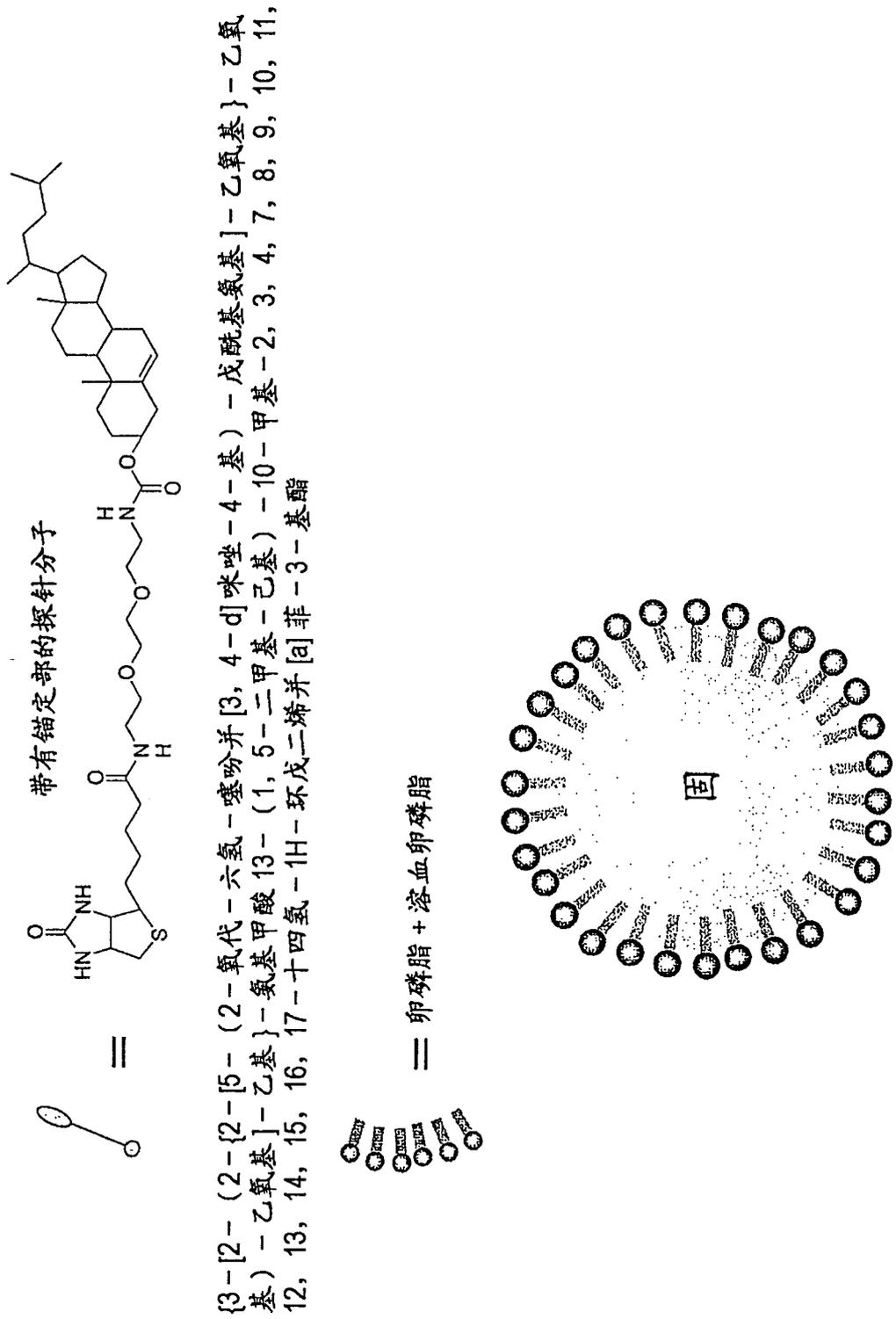
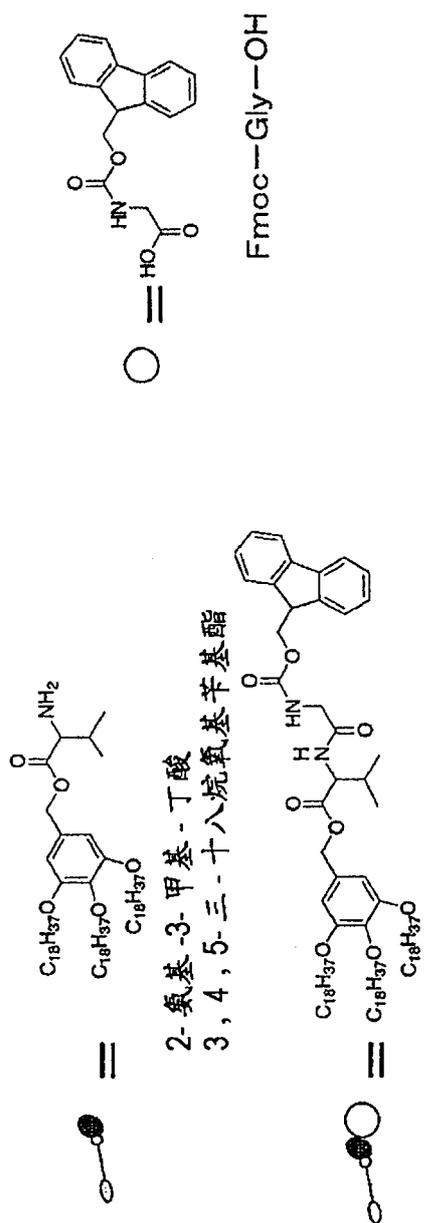


图 5



2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-乙酰基氨基]-3-甲基-丁酸 3,4,5-三-十八烷氧基苄基酯

环己烷吸附·固化的载体表面

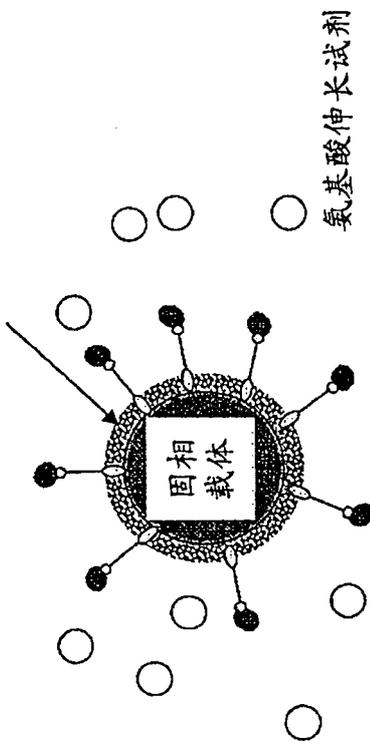


图 6

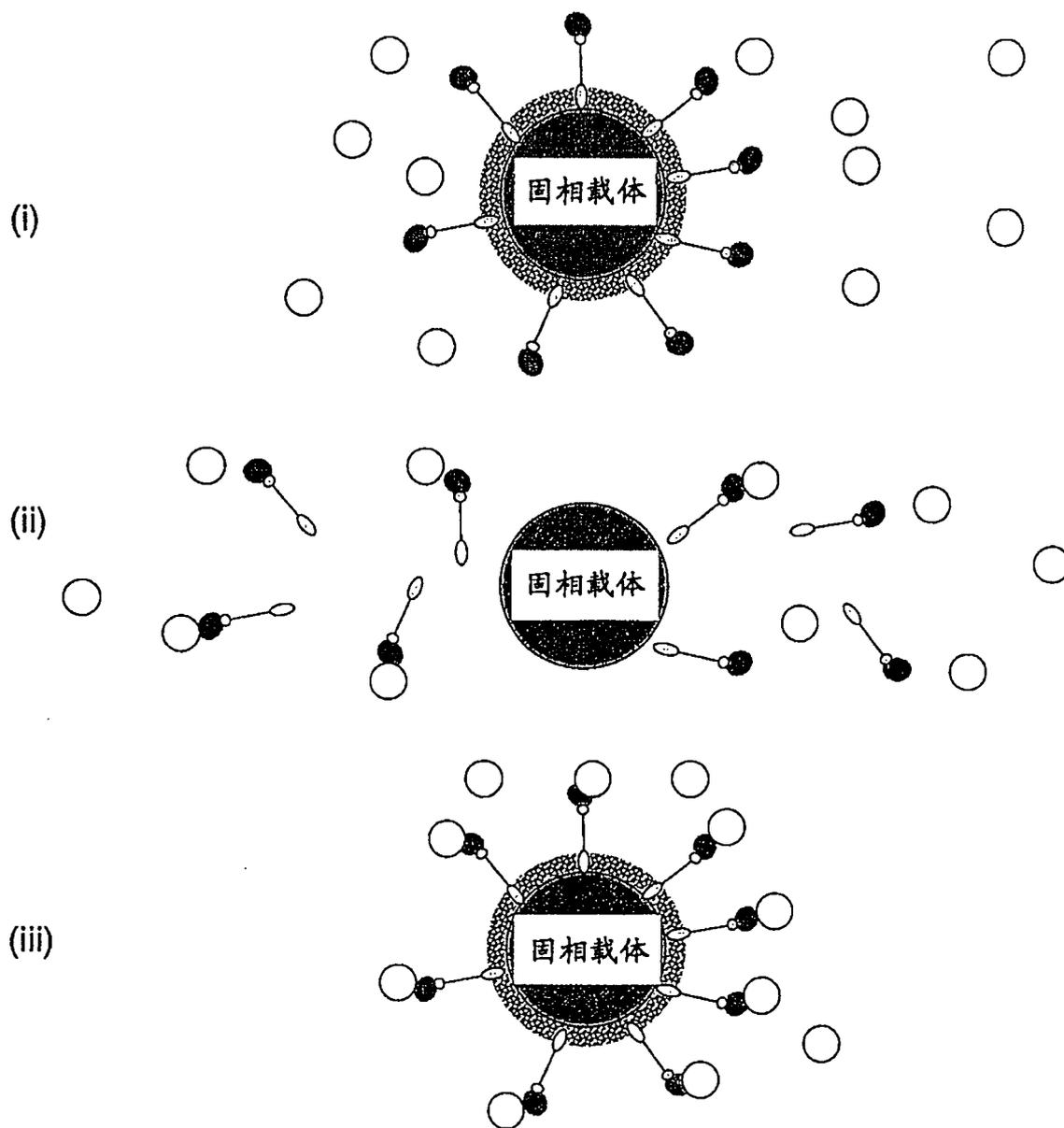


图 7