

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480008883.5

[51] Int. Cl.

B01J 31/00 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年8月19日

[11] 授权公告号 CN 100528357C

[22] 申请日 2004.2.3

[21] 申请号 200480008883.5

[30] 优先权

[32] 2003.2.3 [33] US [31] 10/357,115

[86] 国际申请 PCT/US2004/003006 2004.2.3

[87] 国际公布 WO2004/069406 英 2004.8.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.29

[73] 专利权人 格雷斯公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 R·沃姆斯贝彻

[56] 参考文献

US 5998183A 1999.12.7

US 4298500A 1981.11.3

US 4544485A 1985.10.1

GB 1283958A 1972.8.2

审查员 张麦红

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 段晓玲

权利要求书5页 说明书35页 附图25页

[54] 发明名称

载体上的催化剂系统

[57] 摘要

本发明涉及载体上的催化剂系统。本发明载体上的催化剂包含非酸性、亲水性含羟基有机 R_{10} 基团和至少一个能结合催化性物质如酶或有机金属分子的连接体连接至其至少一个表面的无机载体, R_{10} 基团在溶液中没有或基本没有表面电荷, 其中该连接体连接至催化性物质。优选 R_{10} 基团选自 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OH)_2$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH(OH)_2CH_3$ 、 $-CH_2CH(OH)_2$ 、 $-CH(OH)CH_2(OH)$ 及其混合物。载体表面上 R_{10} 基团的存在, 通过使疏水作用最小化并在有催化性物质与之连接的载体区域不或基本不提供表面电荷, 防止或降低了催化性物质和载体表面的非特异性结合。同时, 连接体以使催化性物质的催化活性自由使用的方式将催化性物质结合到载体的表面。也公开了用本发明载体上的催化剂系统催化反应的方法。

1. 一种载体上的催化剂系统，所述催化剂系统包含至少一种 R_{10} 基团、至少一个连接体和与该连接体相连接的至少一种催化性物质已连接至其至少一个表面的无机金属氧化物载体，其中所述 R_{10} 基团包含至少一个非酸性、亲水性含羟基有机基团，该有机基团含有 1 至 3 个碳原子，所述 R_{10} 基团存在的量足以防止非特异性结合至所述载体。

2. 权利要求 1 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{OH})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$ 及其混合物。

3. 权利要求 2 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 及其混合物。

4. 权利要求 3 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。

5. 权利要求 1 的载体上的催化剂系统，所述催化剂系统包含 R_{10} 基团的浓度为每 nm^2 无机载体 1 个至 10 个 R_{10} 基团。

6. 权利要求 1 的载体上的催化剂系统，其中所述无机金属氧化物载体在其表面具有至少一个羟基。

7. 权利要求 6 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团在所述载体表面以 50% 至 99% 的羟基浓度存在于该载体上。

8. 权利要求 7 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团在所述载体表面以 75% 至 90% 的表面羟基浓度存在于该载体上。

9. 权利要求 1、2 或 3 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团通过连接至所述载体表面的二价部分或原子反应物连接至该载体的表面。

10. 权利要求 1、2 或 3 的载体上的催化剂系统，其中所述 R_{10} 基团直接连接至所述载体的表面。

11. 权利要求 1 的载体上的催化剂系统, 其中所述无机金属氧化物为硅酸盐或硅铝酸盐。

12. 权利要求 1 的载体上的催化剂系统, 其中所述无机金属氧化物选自二氧化硅、氧化铝、二氧化硅-氧化铝、氧化锆、锆酸盐、二氧化钛、可控孔径玻璃及其混合物。

13. 权利要求 12 的载体上的催化剂系统, 其中所述无机金属氧化物为二氧化硅。

14. 权利要求 13 的载体上的催化剂系统, 其中所述二氧化硅为色谱级二氧化硅或硅胶。

15. 权利要求 1、2 或 3 的载体上的催化剂系统, 其中所述无机金属氧化物载体有磁性反应。

16. 权利要求 1、2 或 3 的载体上的催化剂系统, 其中所述连接体为任选取代的二价化学基团。

17. 权利要求 1、2 或 3 的载体上的催化剂系统, 其中所述连接体具有的浓度为每 nm^2 无机金属氧化物载体 0.1 个至 5.0 个连接体。

18. 权利要求 1 或 2 的载体上的催化剂系统, 其中所述载体包含催化性物质的浓度足以催化所需的反应。

19. 权利要求 18 的载体上的催化剂系统, 其中所述催化性物质为酶。

20. 权利要求 19 的载体上的催化剂系统, 其中所述载体每 nm^2 包含 0.04 至 4 的酶。

21. 权利要求 20 的载体上的催化剂系统, 其中所述无机金属氧化物载体为二氧化硅, 且所述 R_{10} 基团为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。

22. 权利要求 21 的载体上的催化剂系统, 其中所述二氧化硅为硅胶或色谱级二氧化硅。

23. 权利要求 18 的载体上的催化剂系统, 其中所述催化性物质为有机金属络合物。

24. 权利要求 18 的载体上的催化剂系统，其中所述催化性物质为有机分子、片段或络合物。

25. 一种降低与包含载体上的催化剂系统的无机金属氧化物载体非特异性结合的方法，所述载体具有至少一种能够非特异性结合的官能团，所述方法包括：

(a) 提供具有至少一种官能团的无机金属氧化物载体，该官能团能够与催化性物质、反应底物、反应产物或其它分子非选择性反应；

(b) 所述无机金属氧化物载体的至少一种官能团与能够于所述载体上形成 R_{10} 基团的反应物反应，以提供所述无机金属氧化物载体至少一个表面上至少一种 R_{10} 基团，其中所述 R_{10} 基团包含至少一个非酸性、亲水性含羟基有机基团，该有机基团含有 1 至 3 个碳原子；

(c) 所述无机金属氧化物载体与至少一个连接体反应以提供至少一个连接至该载体至少一个表面的连接体；和

(d) 所述连接体与催化性物质反应以将该催化性物质固定在所述载体上，

其中所述 R_{10} 基团以足以降低和/或防止非特异性结合的浓度存在于所述无机金属氧化物载体的表面上。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述 R_{10} 基团选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{OH})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$ 及其混合物。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述 R_{10} 基团选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 及其混合物。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述 R_{10} 基团为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。

29. 权利要求 25 的方法，其中所述 R_{10} 基团的浓度为每 nm^2 无机金属氧化物载体 1 个至 10 个 R_{10} 基团。

30. 权利要求 25 的方法，其中所述能够与所述催化性物质、反应底物或反应产物反应的官能团为所述载体表面上的羟基。

31.权利要求 30 的方法,其中所述 R_{10} 基团在所述载体表面以足以覆盖 50%至 90%的羟基浓度存在于该载体上。

32.权利要求 31 的方法,其中所述 R_{10} 基团在所述载体表面以足以覆盖 75%至 99%的表面羟基浓度存在于该载体上。

33.权利要求 25 的方法,其中所述 R_{10} 基团通过连接至所述载体表面的二价部分或原子反应物连接至该载体的表面。

34.权利要求 25 的方法,其中所述 R_{10} 基团直接连接至所述载体的表面。

35.权利要求 25 的方法,其中所述无机金属氧化物为硅酸盐或硅铝酸盐。

36.权利要求 25 的方法,其中所述无机金属氧化物选自二氧化硅、氧化铝、二氧化硅-氧化铝、氧化锆、锆酸盐、二氧化钛、可控孔径玻璃及其混合物。

37.权利要求 36 的方法,其中所述无机金属氧化物为二氧化硅。

38.权利要求 37 的方法,其中所述二氧化硅为色谱级二氧化硅或硅胶。

39.权利要求 25 的方法,其中所述无机金属氧化物载体有磁性反应。

40.权利要求 25 的方法,其中所述连接体为任选取代的二价化学基团。

41.权利要求 25 的方法,其中所述连接体的浓度为每 nm^2 载体 0.1 个至 5.0 个连接体。

42.权利要求 25 的方法,其中所述载体包含催化性物质的浓度足以催化所需的反应。

43.权利要求 42 的方法,其中所述催化性物质为酶。

44.权利要求 43 的方法,其中所述载体每 nm^2 包含 0.04 至 4 的酶。

45.权利要求 43 的方法,其中所述无机金属氧化物载体为二氧化硅,且所述 R_{10} 基团为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。

46. 权利要求 45 的方法，其中所述二氧化硅为硅胶或色谱级二氧化硅。

47. 权利要求 42 的方法，其中所述催化性物质为有机金属络合物。

48. 权利要求 42 的方法，其中所述催化性物质为有机分子、片段或络合物。

49. 一种催化反应的方法，所述方法包括：

(a) 提供包含反应物分子的反应混合物，所述反应物分子能反应生成所需产物；和

(b) 使该反应混合物与权利要求 1 的载体上的催化剂系统以足以催化所述反应混合物中反应物分子反应的量接触并接触一定时间，以提供所需产物。

50. 权利要求 49 的方法，所述方法还包括：

(c) 自所述反应混合物中除去所述载体上的催化剂系统。

51. 权利要求 49 的方法，其中步骤(b)中所述载体上的催化剂系统的 R_{10} 基团选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{OH})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$ 及其混合物。

52. 权利要求 49 的方法，其中所述无机金属氧化物选自二氧化硅、氧化铝、二氧化硅-氧化铝、氧化锆、锆酸盐、二氧化钛、可控孔径玻璃及其混合物。

53. 权利要求 49 的方法，其中步骤(b)中所述载体上的催化剂系统的无机金属氧化物载体包含催化性物质的浓度足以催化所述反应混合物中反应物分子的反应。

54. 权利要求 53 的方法，其中所述催化性物质为酶。

55. 权利要求 53 的方法，其中所述催化性物质为有机金属络合物。

56. 权利要求 53 的方法，其中所述催化性物质为有机分子、片段或络合物。

载体上的催化剂系统

相关申请

本申请为于2001年8月14日提交的美国申请序列第09/929,621号的部分继续神情，该申请的内容通过引用而结合至本文。

发明领域

本发明涉及新型的催化剂系统，以及其在催化中的用途。更具体地讲，本发明涉及使至少一种催化性物质如酶或有机金属络合物固定或连接至载体至少一个表面上的载体上的催化剂(supported catalyst)系统，该表面已改性以防止催化性物质对载体的非特异性结合。该催化剂系统表现出高催化活性且使催化性物质易于分离并回收再使用。

发明背景

精细化学品和药物的合成已经变得越来越复杂，常常需要涉及到复杂催化剂系统例如昂贵的酶和基于有机金属的催化剂系统的多步骤反应。结果，越来越强调开发新的和改进的催化剂系统，其具有高活性和选择性，易于自反应溶液中回收接着再使用，且在所需的反应条件下在相对较长的一段时间内将维持它们的催化活性。

一种在生物催化领域显示出较大工业潜力的这样的催化剂系统为例如基于酶的催化剂系统。酶为蛋白质催化物质，常常表现出于相对温和的条件下以较高化学特异性催化困难或复杂反应的优点。

酶通常可溶，使得酶的回收再使用即使可能，也变得困难。一些情况下，加工条件可能破坏酶。如酶没被破坏，也需要破坏它，如在一些食品情形中，连续活性将有不需要的结果。为了避免这些问题，开发了固定或固定化酶系统，这些系统中酶结合到无机载体或载体的

表面上。示例性固定化酶系统，以及它们的制备方法，于美国专利第 4,384,045; 4,258,133; 5,998,183; 和 5,405,766 号中公开。

其它目标催化剂包括有机金属络合物，其广泛应用于精细化学品和药物的合成。有机金属络合物催化许多重要反应，例如 Heck-型反应、Suzuki 偶联反应、芳族卤化物的胺化反应和 Grignard 反应。在大部分应用中，有机金属络合物催化以均相方式进行，这些应用中催化剂的分离和再使用是困难的。通常有机金属络合物非常昂贵，因此再使用和回收非常需要。相当多的研究针对“多相化”均相有机金属络合物催化剂，以便简化催化剂的回收。见，如 Cornils 等, *Applied Homogenous Catalysis with Organometallic Compounds* (卷 3) (Wiley-VHC, 2002); 和 D. E. DeVos 等, *Chiral Catalyst Immobilization and Recycling* (Wiley-VC, 2002)。

众所周知许多催化性物质如蛋白质，对某些载体物质特别是基于无机氧化物的物质结合非常强，且有时不可逆和非选择性。此外，无机氧化物载体含有官能团例如羟基、特别是酸性羟基时，载体可遭受甚至更高层次的催化性物质非选择性结合。也就是说，催化性物质如酶，可以以非选择性方式结合到载体表面从而降低催化活性。因而，当表面的催化性官能团对所需催化作用非常有选择性时，表面的未使用区域通常非选择性。净结果是降低了催化剂组合物的活性。

因此，对于改进的载体上的催化剂系统存在需求，其防止或使已知与载体上的催化剂系统相关的非特异性结合问题降到最低，使自反应溶液中回收催化剂系统比较容易，接着可再使用且在较长的一段时间内维持高催化活性。

发明简述

现在已经开发了新型载体上的催化剂系统，其防止或降低非特异性结合到包含催化剂系统的载体，特别是在它的至少一个表面具有酸性羟基的无机氧化物载体。本发明催化剂系统的开发基于以下发现，

即载体表面的修饰使表面疏水作用降到最低并在有催化性物质与之连接的载体区域提供零或低表面电荷，降低对载体的非特异性结合或使之最小化。

依照本发明，载体上的催化剂系统包含催化性物质，如酶或其它催化性物质，在其中载体表面已被修饰以提供许多 R_{10} 基团的区域，通过连接至载体至少一个表面的至少一个连接体(linker)固定或结合到载体的至少一个表面。优选， R_{10} 基团选自： $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$ 及其混合物。当连接体以允许催化性物质的催化活性自由使用的方式将催化性物质结合到载体表面时，载体表面 R_{10} 基团的存在防止或降低了所有或基本上所有表面相互作用，尤其是来自更高极性溶剂例如水的反应。

本发明载体上的催化剂系统在所需反应条件下、在较长一段时间内表现出高催化活性，并提供催化性物质易于自反应物中回收再使用。

不受任何特别理论的束缚，可相信，为了避免非选择性结合到载体表面，载体的表面电荷应为零或非常低。而且，表面电荷的避免可减少或防止强静电吸引力，这可使某些催化性物质例如酶或有机金属络合物变性，使得它们没有催化活性。除了避免表面电荷以外，表面疏水作用应降到最低或消除以减少非选择性结合。疏水作用通常比静电或偶极相互作用要弱，当蛋白质混合物例如含酶混合物的溶剂中盐浓度相对较高时，疏水作用可变成占优势的作用。盐离子与带电荷的载体表面相互作用，因而蛋白质通过双电层“屏蔽电荷”。结果高盐浓度使得疏水作用变得更占优势。应避免这样的疏水性载体表面以消除疏水作用或使之最小化。

偶极相互作用如氢键，也被认为在非选择性结合中起作用，因而也应加以考虑。例如，如果溶剂是水，那么由于熵的原因使溶剂间偶极相互作用多于载体表面。更具体地讲，将溶液中组分结合到载体表

面涉及由于表面上组分定位而引起熵的降低。即，如果蛋白质例如酶，对通过氢键结合到表面或保留在溶液中可以选择，后者因为其更高的熵态而更有利。

为完全从溶液发生吸附，吸附分子与表面的相互作用能、吸附焓必须超过溶液更高的熵。自溶液吸附或非选择性结合至表面总是表现熵的降低。由于存在这种降低，吸附焓必须足够高以克服熵的改变。即静电和疏水作用都应避免，亦即保持低的吸附焓。

因此，本发明的一个优点是提供改进的载体上的催化剂系统，其中载体对于非特异性结合至不需要的非催化物质具有减弱的能力。

本发明的另一个优点是提供载体上的催化剂系统，其中载体在吸附操作 pH 下没有或基本没有表面电荷且性质上是亲水的。

本发明还另一个优点是提供载体上的催化剂系统，其中载体对于疏水作用具有减弱的能力。

本发明另一个优点是提供载体上的催化剂系统，其中载体具有减弱的静电相互作用能力。

本发明另一个优点是提供载体上的催化剂系统，其中载体对静电和疏水作用均具有减弱的能力，从而维持低吸附焓(enthalpy)。

本发明另一个优点是提供无机氧化物载体上的催化剂系统，其抗非特异性结合。

本发明再另一个优点是提供改进的基于酶的载体上的催化剂系统，其表现出高酶活力，并使催化剂易于回收再使用。

本发明的也一个优点是提供改进的基于有机金属的载体上的催化剂系统，其表现出高催化活性并使催化剂易于回收再使用。

本发明的也一个优点是提供减少或防止非催化性物质对包含在载体上的催化剂系统的载体的不需要非特异性结合的方法。

本发明的这些和其它方面将于下面进一步详细描述。

附图简述

图1图示固定化酶系统，其中酶通过连接体连接至无机氧化物载体例如二氧化硅的表面，无本发明催化剂的表面修饰。

图2图示一个本发明载体上的催化剂系统实施方案，该系统包含无机载体、 R_{10} 基团、连接体和催化性物质即酶。

图3显示实施例1和2的pH 3-9等电聚焦凝胶电泳的结果，泳道2和7表示Pharmacia 3.6-9.3宽pI标准，泳道3和4表示实施例1的载体，泳道5和6表示实施例2的载体。该图举例说明未处理的常规无机氧化物载体的非特异性结合。

图4显示实施例3-5的pH 3-9等电聚焦凝胶电泳的结果，泳道1和8表示标准蛋白混合物，泳道2和3表示实施例3的载体，泳道4和5表示实施例4的载体，泳道6和7表示实施例5的载体。

图5显示实施例6-8的pH 3-9等电聚焦凝胶电泳的结果，泳道1和8表示标准蛋白混合物，泳道2表示实施例7(高盐)的载体，泳道3表示实施例8(高盐)的载体，泳道6表示实施例7(低盐)的载体，泳道7表示实施例8(低盐)的载体。

图6显示实施例8载体的漫反射红外光谱。

图7显示经载体修饰含有 R_{10} 前体的实施例7载体的漫反射红外光谱。

图8显示经载体修饰含有 R_{10} 基团的实施例8载体的MAS Si^{29} NMR波谱。

图9显示经载体修饰含有 R_{10} 基团的实施例8载体的X-射线光电子能谱(XPS)。

图10显示经载体修饰含有 R_{10} 前体的实施例7载体的XPS能谱。

图11显示当实施例9和实施例10载体上酶载量不同时，由 α -糜蛋白酶(CT)催化的四肽水解绝对速率的比较。

图12显示比活性(每mM酶)对实施例9和10载体的载量的图。

图13显示转化率对 α -糜蛋白酶(CT)固定在实施例9(141 mg CT/g)和实施例10(138 mg CT/g)载体上所用时间的图。

图 14 显示当实施例 9 和实施例 10 载体上酶载量不同时, 由 β -脂肪酶催化的甘油三丁酸酯水解绝对速率的比较。

图 15 显示当实施例 9 和实施例 10 载体上酶载量不同时, 由 β -脂肪酶催化的酯交换绝对速率的比较。

图 16 描述由图 17 中举例说明的反应制备产生 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 作为 R_{10} 的涂覆剂。

图 17 图示具有 R_{10} 的二氧化硅的制备, R_{10} 通过不是二氧化硅一部分的硅原子连接, 其中 R_{10} 为 $-\text{CH}_2\text{OH}$, 以便 $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{OH}$ 直接连接至表面(SiOH 表示表面上的甲硅烷醇基)。

图 18 描述由图 19 中举例说明的反应制备产生 $-\text{CH}(\text{OH})_2$ 作为 R_{10} 的涂覆剂。

图 19 显示具有 R_{10} 的二氧化硅的制备, R_{10} 通过不是二氧化硅一部分的硅原子间接连接, 其中 R_{10} 为 $-\text{CH}(\text{OH})_2$, 以便 $-\text{Si}-\text{CH}(\text{OH})_2$ 直接连接至表面(SiOH 表示表面上的甲硅烷醇基)。

图 20 显示由与图 17 和 19 中举例说明流程类似的反应流程制备产生羟乙基作为 R_{10} 的涂覆剂。

图 21 显示一种制备催化剂的方法, 该催化剂包含二氧化硅和连接至表面的 $-\text{Si}-\text{R}_{10}$ 基团, 其中 R_{10} 通过不是二氧化硅一部分的硅原子间接连接至表面。 R_{10} 为 1,2-二羟基乙基。

图 22 显示制备固体的另一种方法, 该固体包含二氧化硅和连接至表面的 $-\text{Si}-\text{R}_{10}$ 基团, 其中 R_{10} 通过不是二氧化硅一部分的硅原子间接连接至表面。 R_{10} 为 1,2-二羟基乙基。

图 23 显示本发明的一个实施方案, 其中 $-\text{Si}-\text{R}_{10}$ 基团当连接至二氧化硅表面时为交联。 R_{10} 为羟甲基(SiOH 表示表面上的甲硅烷醇基)。

图 24 显示涂覆剂的制备, 该涂覆剂产生在一点连接至二氧化硅表面的 $-\text{Si}-\text{R}_{10}$ 基团。 R_{10} 为羟甲基, 由图 25 中举例说明的反应获得。

图 25 显示本发明的一个实施方案, 其中 $-\text{Si}-\text{R}_{10}$ 基团于一点连接至二氧化硅表面。 R_{10} 为羟甲基(SiOH 表示表面上的甲硅烷醇基)。

发明详述

整个本申请应用以下定义：

本文使用的短语“催化性物质”表示能影响化学反应速率而自身没被消耗或经历化学改变的任何分子或分子片段。

本文使用的术语“底物”是指参与催化反应的反应物分子。

本文使用的术语“产物”是指在催化反应过程中由反应物分子反应生成的分子。

本文使用的术语“连接体”将包括至少一种连接体，本领域中也称为配体、间隔、间隔臂、侧链或链(leash)。使用各种连接体混合物也在本发明范围内。在使用多个具有不同结合亲合力的连接体情况中，使用超过一种类型的连接体是期望同时或分别结合超过一种类型的催化性物质。

短语“ R_{10} 基因” (也称为“ R_{10} 部分”)，更详细地如下定义，将保护至少一种 R_{10} 基因。本发明包括 R_{10} 基因混合物的使用。

术语“表面”是指载体的单个表面或多个表面。

短语“载体上的催化剂系统”是指具有 R_{10} 基因和连接体的改进载体与通过连接体连接至载体的催化性物质的总组合物。

本文使用的短语“非特异性结合”指底物、产物、催化性物质、或其它实体或分子不需要的表面吸附，其方式减少或降低催化活性。

本文使用的术语“亲水性”是指对水和极性分子具有亲合力的特性。

根据本发明，载体上的催化剂系统包含载体，优选基于无机物质的载体，通过在至少一个表面上结合至少一种 R_{10} 基因和至少一种连接体来修饰。优选 R_{10} 基因选自： $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$ 及其混合物。连接体将至少一种催化性物质如酶或其它催化性物质连接至载体表面。因此，载体表面被修饰成在同一区域内含有 R_{10} 基因和至少

一种连接体, R_{10} 基团完全防止催化性物质、底物或与载体表面非选择性相互作用的产物, 连接体选择性结合所需的催化性物质。以这种方式, 催化性物质通过连接体连接至载体表面, 因此提供固定化催化剂的已知优点, 且同时保持游离且不受拘束使活性损失非常小。所改进的载体可“按现状”(没有催化性物质与之连接)提供给载体上的催化剂系统使用者, 然后使用者可将所需要的催化性物质如酶、有机金属络合物或其它催化性物质和连接体进行反应。连接体可任选加帽(capped)或以前体形式提供, 其在与催化性物质反应前将需要进一步化学处理。

载体上的催化剂系统的组分

如上所讨论, 本发明载体上的催化剂系统包含载体, 优选无机物质为基础的载体, 最优选无机氧化物载体, 至少一个 R_{10} 基团(如下定义)和至少一个连接体位于载体至少一个表面, 其中连接体能连接或被连接至催化性物质例如酶。见, 如图 2。

无机载体

优选的载体物质为具有高表面面积从而提供高结合催化性物质能力的无机物质。也优选无机物质物理上坚固以处理高压负荷并能处理高流速和高压。

可具有高表面面积的无机物质包括但不限于硅胶、二氧化硅、氧化铝和氧化锆。硅胶情况中, 表面面积范围可自非常低如约 $1 \text{ m}^2/\text{g}$, 至非常高如超过约 $800 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔径类型自非常低如小于约 25 \AA , 至非常高如超过约 1500 \AA 。另外, 二氧化硅不仅具有高表面面积, 而且它们与聚合材料比较也有物理强度, 且因此可用于高压或高搅拌条件。

优选的无机物质为无机氧化物。合适的无机氧化物包括但不限于那些每 nm^2 具有约 1 至约 10 个羟基的无机氧化物。更优选无机氧化物为金属氧化物、硅酸盐或硅铝酸盐例如沸石。最优选的无机物质为无

机金属氧化物例如二氧化硅和钠二氧化硅(sodium silica), 其可以为例如色谱级二氧化硅或硅胶形式。另外优选的金属氧化物包括但不限于氧化铝、二氧化硅-氧化铝、氧化锆、锆酸盐、可控孔径玻璃和二氧化钛。有磁性反应的无机金属氧化物例如在美国专利第 6,447,911 号(公开内容通过引用而整体结合至本文)中公开的含硅氧化物涂覆的磁性颗粒也适合作为底物材料。也可以使用混合的无机金属氧化物, 如二氧化硅和氧化铝的共凝胶或共沉淀物。

载体可以为适合与反应器条件的形状和/或大小匹配的任何形式, 因此, 载体可以为任何物理形式例如颗粒、纤维或板, 使用本领域已知方法制备。(见 Sie, S.T., *The Chemical Engineering Journal*, Vol.3 (1993))。例如可制成球用于间歇式反应器且易于过滤和回收, 且可制成挤出物用于连续填充柱应用。二氧化硅可形成用于不同应用的许多不同形状。

R₁₀ 基团

R₁₀ 基团用于修饰载体以提供减少或防止催化性物质直接对载体表面非特异性结合的特殊性质, 包括非酸性有机基团或部分, 与载体上任何羟基比较, 含羟基基团基本上在溶液中没有电荷。适合作为 R₁₀ 基团的有机基团具有亲水性和非酸性或非常弱的酸性的共同特性, 即具有约 14 和更大的 pKa 值。优选有机基团含有约 1 至约 3 个碳原子。当具有能形成所需产物的反应物分子的反应混合物与载体接触, 且载体具有至少一个 R₁₀ 基团修饰的表面时, 电荷相互作用和疏水作用最小化且偶极相互作用增强。

在本发明一个优选的实施方案中, R₁₀ 基团为选自以下的实体:
-CH₂OH、-CH(OH)₂、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂OH、-C(OH)₂CH₃、-CH₂CH(OH)₂、-CH(OH)CH₂(OH)及其混合物, 且特别是-CH₂OH。更优选 R₁₀ 选自-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂OH 和-CH(OH)CH₂(OH)。

甚至更优选 R_{10} 选自: $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 。最优选 R_{10} 为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。

R_{10} 部分位于载体的至少一个表面。“位于”是指 R_{10} 可直接连接至载体物质的表面。

R_{10} 可位于无机载体周围存在的表面区域,或位于在孔中存在的表面区域,其穿透进入载体的内部。

R_{10} 也可以通过二价部分或原子($-\text{X}-$)连接至至少一个载体表面从而“位于”载体表面上,以形成具有式 $-\text{X}-\text{R}_{10}$ 的基团。二价部分或原子可来自用于生成 R_{10} 的反应物,如残余金属原子,例如来自硅烷反应物的硅、来自烷氧基铝的铝或来自烷氧基锆的锆。二价部分或原子可以直接连接至载体,优选通过载体表面的羟基。选择的载体物质可以决定 $-\text{X}-$ 及其相关反应物的选择。然而一般而言,任何含有 $-\text{X}-$ 的反应物将为可与载体上的活性官能团如羟基反应的反应物。在无机氧化物情况中,合适的反应物典型地包括能够与羟基反应的氧化物。例如包含位于至少一个表面的 R_{10} 基团的载体可用具有 R_{10} 基团的反应物例如烷氧基硅烷、二烷氧基硅烷或三烷氧基硅烷来制备。例如,乙酰氧基甲基可为 R_{10} 基团羟甲基的前体基团。使用涂覆剂或反应物将 R_{10} 基团连接至至少一个载体表面的方法包括以下步骤:首先使涂覆剂与载体表面反应,然后水解涂覆剂中前体基团以产生 R_{10} 基团连接体的载体。反应化合物如那些能通过与无机物质反应生成 R_{10} 基团的化合物的化学为本领域所熟知。见,如 Smith, *Organic Synthesis* (John Wiley & Sons, 1994); March, *Advanced Organic Chemistry* (第4版) (John Wiley & Sons, 1992); Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (第2版) (John Wiley & Sons, 1999); Greene 等, *Protective Groups in Organic Synthesis* (第3版) (John Wiley & Sons, 1999); Brook, *Silicon in Organic, Organometallic, and Polymer Chemistry* (John Wiley & Sons, 2000); Hermanson, G.T. 等, *Immobilized Affinity Ligand Techniques* (Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1992); Weetall, *Covalent Coupling Methods*

for *Inorganic Support Materials, Methods in Enzymology*, vol. XLIV, Mosbach, K. 编辑(1976); 美国专利第 4,298,500 号; 和美国专利第 5,371,262 号; 它们的公开内容通过引用而结合至本文。

将 R_{10} 基团通过残余金属如来自硅烷反应物的 Si 连接至载体至少一个表面也在本发明范围之内, 其中各所得 Si- R_{10} 基团通过三个共价键连接至载体。见, 例如图 17、19、21 和 22 反应流程中由具有三个甲硅烷醇基的涂覆剂反应产生的最终产物。

如图 23-25 所说明, 可以选择涂覆剂以使 R_{10} 基团可通过一个或两个共价键、或通过 Si 原子交联连接到载体物质。这样的交联可以是 Si-O-Si 连接体或另外的连接体例如 Si-O-C(O)-O-Si、Si-O-亚烷基-O-Si 或 Si-O-C(O)-亚烷基-O-Si。图 25 反应流程的最终产物即化合物(20)举例说明了本发明催化剂系统的一个实施方案, 其中 Si- R_{10} 基团具有连接至二氧化硅表面的一点。该实施方案由二氧化硅和单乙氧基硅烷反应制备。参见图 24 单乙氧基硅烷涂覆剂的制备。

连接体

连接体为结合至载体和催化性物质两者的低分子量分子且其用作将催化性物质结合至载体的固定化基团。因此, 合适连接体的选择将取决于载体物质和催化性物质。连接体可以是任选取代的二价化学基团。该任选取代的二价化学基团可包含 R_n 基团, n 为 R 基团的数目且为至少为 1 的整数, 优选不大于 30, 且更优选不大于 15。一般而言, 以自催化性物质至载体表面测量的长度计, 二价化学基团为约 1 个至约 30 个原子, 优选约 1 个至约 20 个原子, 且更优选约 5 个至约 15 个原子。

连接体可选自: $-C(R_1)H-$ 、 $-C(R_2)=C(R_3)-$ 和 $-C\equiv C-$, 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立为氢、烷基、取代烷基、环烷基、取代环烷基、烯基、取代烯基、环烯基、取代环烯基、炔基、取代炔基、环炔基、取代环炔基、芳基、取代芳基、芳烷基或取代芳烷基。上述 R 基团可任选被以下基

团替换：-O-、-S-、羰基、硫代羰基、-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-C(S)S-、-SC(S)-、-N(R₄)-、-N(R₄)C(O)-、-C(O)N(R₄)-、-C(R₅)=N-、-N=C(R₅)-、-C(R₅)=NO-、-ON=C(R₅)-、-P-、-P(OH)O-、亚芳基、取代亚芳基、亚环烷基、取代亚环烷基、亚环烯基、取代亚环烯基、二价杂环基或二价取代杂环基，其中 R₄ 和 R₅ 独立为氢、烷基、取代烷基、环烷基、取代环烷基、烯基、取代烯基、环烯基、取代环烯基、炔基、取代炔基、环炔基、取代环炔基、芳基、取代芳基、芳烷基或取代芳烷基。例证性连接体为包含 R_n 基团的烃基，其中 n 如上所描述，且至少一种 R 基团为 -CH₂-，和 (n-1)-R-基团任选被上述 R 基团如 -O-、-S- 等替换。

本文所用术语“取代”指不改变取代 R 基团主要化学性质的含侧链取代基，如烃基的碳氢化合物性质。

术语“烷基”是指饱和支链或非支链烃基，优选那些约 1 个至约 30 个碳原子的烃基，更优选那些有约 1 个至约 20 个碳原子的烃基，且甚至更优选那些有约 1 个至约 6 个碳原子的烃基。“烷基”实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、异戊基、新戊基、1,1-二甲基丙基、正己基、1-甲基戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、1,1-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、异己基和新己基。

术语“环烷基”是指饱和环状烃基，优选具有约 3 个至约 10 个碳原子，且更优选具有约 3 个至约 6 个碳原子。“环烷基”实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、二环庚基和萘烷基。

术语“烯基”是指具有至少一个 C=C 键的支链或非支链烃基，其中烃基优选约 2 个至约 30 个碳原子，更优选约 2 个至约 20 个碳原子，甚至更优选约 2 个至约 6 个碳原子。“烯基”实例包括但不限于乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、异丙烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、3-戊烯基和 2-己烯基。

术语“环烯基”是指具有至少一个 C=C 键的环状烃基，优选有约 3 个至约 10 个碳原子，更优选有约 3 个至约 6 个碳原子。

术语“炔基”是指具有至少一个 C≡C 键的支链或非支链烃基，优选具有约 2 个至约 30 个碳原子，更优选具有约 2 个至约 20 个碳原子，且甚至更优选具有约 2 个至约 6 个碳原子。“炔基”实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、2-丁炔基、3-丁炔基和 2-戊烯-4-炔基。

术语“环炔基”是指具有至少一个 C≡C 键的环状烃基，优选具有约 3 个至约 10 个碳原子，且更优选具有约 3 个至约 6 个碳原子。“环炔基”实例包括但不限于环戊炔基(pentynyl)和环己炔基(hexynyl)。

术语“芳基”是指芳族环状烃基，优选具有约 6 个至约 14 个碳原子。“芳基”实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基(anthracyl)和菲基，苯基为优选的芳基。

术语“芳烷基”是指被一个或多个芳基取代的烷基。“芳烷基”实例包括但不限于苄基、苯乙基、二苯甲基和三苯甲基，苄基为优选的芳烷基。

短语“二价杂环基”是指二价环状基团，典型地具有约 3 个至约 10 个环原子，优选约 3 个至约 7 个环原子，且更优选约 4 个至约 6 个环原子，其中约 1 个至约 4 个环原子为 O、S 或 N 原子，或 O、S 和/或 N 原子的混合物。二价杂环基实例包括但不限于以下二价基团：硫杂丙烯环、环氧乙烷、氮丙啶、1H-吡丙因、2H-吡丙因、2H-硫杂环丁二烯(thiete)、硫杂丁环、2H-氧杂环丁二烯(oxete)、氧杂丁环、氮杂环丁二烯、氮杂环丁烷、1,2-氧杂氮杂环丁烷、噻吩、呋喃、吡咯、咪唑、噁唑、异噁唑、噻唑、异噻唑、吡唑、1,3-二氧戊烷、1,2,3-噻二唑、1,3,4-噻二唑、1,2,4-噻二唑、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、1,3,4-噁二唑、1,2,5-噁二唑、1,2,3-三唑、1,2,4-三唑、四唑、噁二唑、吡啶、喹啉、异喹啉、喹啉、喹唑啉、蝶啶、卞唑、苯并噁唑、1,3-噁嗪、2H-1,3-噁嗪、吩嗪、吩噻嗪、哒嗪、嘧啶、吡嗪、苯并[b]呋喃、苯并[b]

噻吩、吡啶、异吡啶、吡唑、嘌呤、异苯并呋喃、四氢呋喃、1,4-二噁烷、吡咯烷、四氢吡喃、1,2-二氢吡啶、1,4-二氢吡啶、哌啶、哌嗪、吗啉、硫吗啉、苯并二氢吡喃、异苯并二氢吡喃、苯并吡喃、1H-氮杂草、3H-氮杂草、1,2-二氮杂草、1,3-二氮杂草、1,4-二氮杂草、三氮杂草和吡辛因。

术语“杂芳基”是指芳族杂环基团。

术语“亚烷基”、“亚烯基”、“亚炔基”、“亚环烷基”、“亚环烯基”和“亚芳基”分别为烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和芳基的二价等价物。

短语“取代烷基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的烷基：羟基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氮基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧基(优选乙酰氧基)、芳基羧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧基、芳氧基羧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代烯基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的烯基：羟基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氮基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧基(优选乙酰氧基)、芳基羧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧基、芳氧基羧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代炔基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的炔基：羟基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、

叠氮基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧氧基(优选乙酰氧基)、芳基羧氧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧氧基、芳氧基羧氧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代环烷基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的环烷基：烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氮基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧氧基(优选乙酰氧基)、芳基羧氧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧氧基、芳氧基羧氧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代环烯基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的环烯基：烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氮基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧氧基(优选乙酰氧基)、芳基羧氧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧氧基、芳氧基羧氧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代环炔基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的环炔基：烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氮基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷

基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧基(优选乙酰氧基)、芳基羧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧基、芳氧基羧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代芳基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的芳基：烷基、烯基、炔基、芳烷基、羟基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氨基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧基(优选乙酰氧基)、芳基羧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧基、芳氧基羧基、氨基甲酰基、苯乙烯基、环烷基、环烯基、芳基(优选苯基)和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代杂环基”是指被约1个至约5个、优选约1个至约3个选自以下的取代基取代的杂环基：烷基、烯基、炔基、芳烷基、羟基、巯基、烷氧基、烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、N,N-芳基烷基氨基、二芳基氨基、叠氨基、脒基、脲基、氟、氯、溴、碘、硝基、氰基、酰基(优选乙酰基和苯甲酰基)、硫代酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、烷基氨磺酰基、羧基、烷基羧基(优选乙酰氧基)、芳基羧基(优选苯甲酰氧基)、烷氧基羧基、芳氧基羧基、氨基甲酰基、芳基(优选苯基)、苯乙烯基、环烷基、环烯基和杂环基(优选杂芳基)。

短语“取代亚芳基”、“取代亚环烷基”、“取代亚环烯基”和“取代二价杂环基”分别是指取代芳基、取代环烷基、取代环烯基和取代杂环基的二价等价物。

将连接体连接至载体表面的键取决于使连接体和无机物质反应所采用的化学。该键可为醚、硫醚、酯、硫酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、磷酸酯(盐)、膦酸酯(盐)、磷酸酯、氨基磷酸酯、胺、酰胺、酰亚胺、

脲、硫脲、磺酰胺、亚砷、砷、二硫化物、胍、O-酰基胍、O-氨基甲酰基胍、O-酰氧基烷基胍、O-酰氧基烷氧基胍、O-胍基磷酸酯(盐)、O-胍基磷酸酯(盐)、O-胍基氨基磷酸酯或 C=C 键。连接体连接和催化性物质如酶的键也可以是上述键中的一种。

将连接体与载体表面反应的化学在文献中有详尽的描述。见，如 Hermanson, G. T.等, *Immobilized Affinity Ligand Techniques* (Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1992); Weetall, *Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials*, Methods in Enzymology, vol. XLIV, Mosbach, K.编辑(1976)。将连接体与载体表面反应的特殊化学显然取决于所使用的特别载体物质和连接体。同样，将连接体与催化性物质反应的化学取决于采用的特别连接体和催化性物质。合适连接体/催化性物质偶合化学的具体实例如表 1 所示。根据表 1，催化性物质可通过催化性物质上的氨基、巯基、羰基或羟基或活性氢原子偶合至连接体。

表 1-常规连接体/结合部分偶合化学实例

<u>由以下形成的连接体</u>	<u>催化部分偶合基团</u>
溴化氰(CNBr)	氨基
N-羟基琥珀酰亚胺酯	氨基
羰基二咪唑	氨基
还原胺化	氨基
FMP 活化*	氨基
EDC-介导的酰胺键形成**	氨基
有机磺酰氯: 甲苯磺酰氯和三氟乙磺酰(tresyl)氯	氨基
二乙烯基砷	氨基
吡内酯	氨基
氰尿酸氯(三氯-s-三嗪)	氨基
碘代乙酰基或溴代乙酰基活化方法	巯基
马来酰亚胺	巯基
吡啶基二硫化物	巯基

二乙烯基砷	巯基
环氧	巯基
TNB-硫醇 ^{***}	巯基
酰肼	羰基
还原胺化	羰基
环氧(双环氧乙烷)	羟基
二乙烯基砷	羟基
氰尿酸氯	羟基
重氮鎓化合物	活性氢
Mannich 缩合	活性氢

*FMP 指甲苯-4-磺酸 2-氟-1-甲基-吡啶鎓

**EDC 指 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺

***TNB-硫醇指 2-亚氨基硫代戊环(thiolane)5,5-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)

催化性物质

本发明催化剂系统还包含至少一种催化性物质，其连接至位于载体至少一个表面上的连接体。催化性物质为能影响化学反应速率而自身未被消耗或没有经历化学改变的任何分子或分子片段。催化性物质必须能连接至连接体。这样的催化性物质包括但不限于酶、有机金属络合物或其它适用于催化目标反应的有机物质。

在本发明一个优选的实施方案中，催化性物质为酶。合适的酶包括但不限于选自以下酶家族的酶：包括但不限于氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和连接酶。氧化还原酶家族的示例性酶包括但不限于 P450 酶、还原酶、过氧化物酶、氢化酶、脱氢酶和催化。转移酶家族的示例性酶包括但不限于糖基转移酶(glycosyltransferases)和甘露糖基转移酶。水解酶家族的示例性酶包括但不限于酯酶、葡萄糖淀粉酶、转氨甲酰酶、核酸酶、核糖核酸酶、ATP 酶、肽酶、蛋白酶和磷酸二酯酶。裂合酶家族的示例性酶包括但不限于多糖裂合酶。异构

酶家族的示例性酶包括但不限于拓扑异构酶。连接酶家族的示例性酶包括但不限于合成酶。另外的酶包括但不限于激酶、磷蛋白质和增变基因转座子。

起催化性物质作用的酶可为天然存在或合成和以非修饰或修饰形式。修饰包括但不限于天然存在的修饰和非天然存在的修饰，例如那些由 DNA 改组创建的修饰，如在美国专利第 5,605,793 号、5,811,238 号、5,830,721 号、6,117,679 号、6,132,970 号、6,165,793 号、6,180,406 号、6,238,884 号和 5,965,408 号中所描述。酶的纯度水平将取决于涉及到的特别催化。天然和合成以及修饰和非修饰的酶纯化方法均为本领域所熟知。

预计用于本发明的其它催化性物质包括有机金属络合物。有机金属络合物在精细化学品和药物合成中作为催化剂广泛使用。任何可修饰成与合适连接体反应并连接至载体的有机金属络合物，可以用于实现本发明益处。合适的有机金属络合物包括但不限于用于 Heck 芳基化的四(三苯基膦)合钯(0)、(-)-1,2-双((2R,5R)-2,5-二甲基-磷杂环戊烷-1-基(phospholano))苯、用于不对称氢化的[DUPHOS] Rh(COD)⁺、用于 Suzuki 偶合和由芳基卤化物合成芳胺的 2-(二-叔丁基膦基)二苯基合钯等。

还有，预计用于本发明的其它催化性物质包括基于有机的物质，如有机络合物或片断。例如有机酸在酸催化水解反应中用作催化剂。合适的基于有机的催化性物质包括但不限于甲酸、羧酸、基于硼的 Lewis 酸，和 Lewis 碱例如吡啶等。

组分浓度

决定 R₁₀ 基团和催化性物质浓度的因素包括但不限于 R₁₀ 基团和催化性物质的特性和活性部位即载体表面上连接体的浓度。

一般而言，R₁₀ 基团以足量存在于载体至少一个表面上，以便当表面与包含酶的组合物接触时，例如可减少或防止酶与载体的非特异性

结合。在本发明一个实施方案中， R_{10} 基团的浓度为足以保证载体表面低表面电荷如小于约 $0.16\text{C}/\text{m}^2$ 的量。优选 R_{10} 基团的浓度可为每平方纳米(nm^2)载体表面面积约 1 个至约 10 个基团。

催化性物质浓度主要取决于使用的具体催化性物质。例如具有约 5nm 流体动力半径的酶通常“遮蔽”约 100nm^2 表面面积。酶不总是以一比一的化学计量连接至单个连接体上，而可能通过几个连接基团连接，如当酶为大分子时。在采用比较小的酶的实施方案中，可使用少于化学计量量的酶且任何未反应的连接基团可“加帽”以避免催化过程的干扰并任选酶分离。

或者， R_{10} 基团和催化性物质的浓度可以在载体表面上有多少官能团反应或被 R_{10} 基团和催化性物质“覆盖”(优选通过连接体)来表述。例如，载体物质约 50%至约 99%的表面羟基可被 R_{10} 基团覆盖和约 1%至约 50%的表面羟基可被通过连接体连接至表面的催化性物质覆盖。本发明催化剂系统的某些实施方案中，载体物质上约 75%至约 99%的表面羟基被 R_{10} 基团覆盖和约 1%至约 25%的表面羟基被通过连接体连接至表面的催化性物质覆盖。

载体表面上连接基团的浓度可变。在本发明某些实施方案中，如上所述，如果催化性物质是大的部分，催化性物质如酶可“遮蔽”载体表面面积的大区域。结果，载体上连接体的浓度不需要相对高。没有被连接体涂覆的载体表面面积基本上用 R_{10} 基团涂覆以防止催化性物质结合至载体表面。在一个优选的实施方案中，大部分的载体表面由 R_{10} 基团覆盖，如载体表面上以每 nm^2 约 1 个至约 10 个基团的浓度，其余的由连接体覆盖。通常，连接体浓度将为足以提供足够的催化性物质以催化所需反应的量。典型地，在载体表面上连接体浓度为约 0.1 至约 5.0nm^2 连接体。

连接基团、 R_{10} 基团和催化性物质的浓度取决于具体的反应参数且可由熟练的技术人员容易地决定。

制备载体上的催化剂系统

通常，本发明载体上的催化剂系统通过以下方法制备：修饰载体至少一个表面以将至少一种 R_{10} 基团和连接体直接或间接连接至载体的至少一个表面，然后使连接体反应形成结合至连接体的催化性物质。将连接体加到载体表面和将 R_{10} 基团加到载体表面的顺序是可以变化的。在载体表面上 R_{10} 基团可于与连接体连接后创建或于与连接体连接前创建。或者，可创建 R_{10} 基团或连接体或二者的前体和/或首先连接和然后，反应以产生最终 R_{10} 基团和/或连接体。一旦连接体/ R_{10} 基团顺序确定，连接体使用合适的偶合技术化学连接至载体表面，接着用第二次偶合过程连接至催化性物质。

优选本发明载体上的催化剂系统通过以下方法制备：以足以将连接体至少一个末端连接至载体至少一个表面的方式，使无机载体物质与具有至少两个末端的连接体反应，然后使载体表面上至少一个官能团与 R_{10} 基团或能形成 R_{10} 基团的反应物反应，以在载体至少一个表面上创建至少一种 R_{10} 基团。然后将所需催化性物质与连接体反应，以使催化性物质连接至载体修饰过的表面，但同时如上所述为游离并不受拘束。

在本发明一个更优选的实施方案中，制备本发明载体上的催化剂系统的方法包括以下步骤：(1)以合适的表面浓度，使具有能非选择性结合的活性表面位点的无机载体接触连接体或连接体前体，以提供其部分活性表面位点连接至连接体或连接体前体的修饰的载体；(2)使修饰的载体接触足量的 R_{10} 基团前体以覆盖载体上剩余的活性表面位点；(3)将 R_{10} 基团前体转化为 R_{10} 基团；(4)任选将连接体前体转化为连接体；和(5)将催化性物质固定至连接体。使用这种方法，载体表面被修饰以便其具有结合催化性物质的连接体，而余下的表面用 R_{10} 基团覆盖以消除非选择性结合。上述步骤(1)和(2)用硅烷化剂最方便进行，其中在合适的溶剂例如甲苯中于回流条件下，合适的三乙氧基硅

烷与无机载体的表面羟基反应，例如二氧化硅载体的甲硅烷醇基团。硅烷化化学为本领域技术人员所熟知。

示例性连接体前体为氨基丙基三乙氧基硅烷，其可于硅烷与无机载体表面反应后与戊二醛反应形成连接体。如上讨论，氨基醛反应形成连接体为本领域技术人员所熟知。

示例性 R_{10} 前体为乙酰氧基甲基三乙氧基硅烷，其以后可通过乙酰氧基水解转化为 R_{10} 基团- CH_2OH ，见图 17。

一种制备具有 $-CH_2OH$ 作为 R_{10} 基团位于二氧化硅表面上的二氧化硅载体的具体方法如图 16 和 17 所示。图 16 描述了涂覆剂乙酰氧基甲基三乙氧基硅烷(化合物(2))的制备，其用于将羟甲基(R_{10} 基团)引入到二氧化硅表面的甲硅烷醇基。见图 17 所示反应，其中化合物(5)为羟甲基(R_{10} 基团)直接连接至表面的二氧化硅。

一种制备表面包含 R_{10} 基团- $CH(OH)_2$ 的二氧化硅的方法如图 18 和 19 所示。图 18 描述了涂覆剂二乙酰氧基甲基三乙氧基硅烷(化合物(7))的制备，用于将 $-CH(OH)_2$ 作为 R_{10} 基团引入到二氧化硅表面。见图 19 所示反应和化合物(9)。

图 23 所示为制备涂覆剂乙酰氧基乙基三乙氧基硅烷(化合物(11))的方法，该方法用于将 R_{10} 基团 2-羟乙基引入到二氧化硅表面。

两种制备包含二氧化硅和 1,2-二羟基乙基作为 R_{10} 基团的载体的方法如图 24 和 25 所示。

一旦载体表面被修饰成连接合适的连接体和 R_{10} 基团，足量选择的催化性物质可与连接体反应。如果催化性物质为酶，可以使用常规蛋白质固定化方法。见，例如 G.T. Hermanson 等, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, (Academic 出版社)。其它催化性物质例如有机金属络合物或有机络合物，可能需要不同的化学途经来固定化。例如有机金属络合物可以使其连接的侧基终接至 α 烯烃。该烯烃然后可通过硅氢化反应与氢化三乙氧基硅烷反应。所得有机金属-侧链-三乙氧基硅烷然后可与载体反应，从而将有机金属连接至载体。见，如 Cornils 等，

Applied Homogenous Catalysis with Organometallic Compounds (卷3)(Wiley-VHC, 2002); 和 DeVos, D.E.等, *Chiral Catalyst Immobilization and Recycling* (Wiley-VC, 2002)。

上述方法为通用方法。所采用具体方法的参数和步骤将取决于特定的载体物质、催化性物质、 R_{10} 基团、连接体和反应物分子。本文描述的一般步骤可通过本领域已知方法改变、重复或如果发现不需要可以删除。

本发明载体上的催化剂系统可用作催化剂来催化通常本领域已知的由相应游离催化性物质催化的反应。例如催化性物质为酶时，载体上的催化剂系统可用于催化各种反应，包括但不限于氧化/还原反应；原子团的转移，如氨基、乙酰基、磷酰基和糖基；键的水解分裂；例如 C-C、C-O 或 C-N 键的非水解分裂；异构化和转移反应；两个分子偶合的共价连接体以及 ATP 或类似三磷酸酯中高能键的水解；等。当催化性物质为有机金属络合物时，载体上的催化剂系统可用于催化的反应包括但不限于 Heck 芳基化；Suzuki 偶联反应；由芳基卤化物合成芳胺；等等。

本发明载体上的催化剂系统的主要优点是在混合物中反应物反应得到所需产物后，催化剂系统易于从反应混合物中回收。在反应中溶解的催化性物质例如酶或有机金属络合物典型地非常难分离和回收。然而，本发明载体上的催化剂系统很容易用常规固液分离技术例如过滤或离心分离，以便回收并再使用。

本发明载体上的催化剂系统可用于常规反应器例如固定(柱)或流化床反应器催化反应。催化剂可以连续或分批方式使用。

为了进一步说明本发明及其优点，给出以下具体实施例。这些实施例作为要求保护的本发明的具体例证而给出。然而，应理解本发明并不限于实施例中描述的具体内容。

实施例以及说明书剩余部分中所有份和百分比除非另外说明否则均按重量计。

此外，本说明书或权利要求书中引用的数字范围，例如代表性物质、测量单位、条件、物理状态或百分比的特殊集合，或者落在该类范围内的任何数字，包括所引用任何范围内数字的任何子集及其任何显而易见的改变，均将通过引用按字面表达结合至本文。

实施例

实施例 1 和 2-常规二氧化硅介质上的非特异性结合

这些实施例表明先有技术中未涂覆、带电荷的二氧化硅净表面主要基于等电点和二氧化硅表面面积强力吸附蛋白质。测试两种类型的二氧化硅：实施例 1 和 2。

实施例 1 为低表面面积的硅胶，于 150℃加热处理 4 小时后具有表面面积 = 161 m²/g (微孔 = 73 m²/g; 中孔 = 88 m²/g; 孔体积 = 0.373 cc/g; 平均孔直径 = 93 Å)。

实施例 2 为更高表面面积/孔体积的硅胶，于 150℃加热处理 4 小时后表面面积 = 253 m²/g (微孔 = 35 m²/g; 中孔 = 218 m²/g; 孔体积 = 2.445 cc/g; 平均孔直径 = 387 Å)。

以下实施例描述了方法，其中实施例 1 和 2 的净二氧化硅样品在水溶液中与蛋白质的络合物混合物接触。然后所得上清液用等电聚焦凝胶电泳来分析蛋白质的吸附。

将 Pharmacia 3.6-9.3 宽 pI 校准试剂盒(目录#17-0471-01)管形瓶(325 μg 蛋白质/瓶)在 eppendorf 管中溶于 200 μl DI H₂O。加入 0.005 g 实施例 1 的硅胶。在另一个 eppendorf 管中，将 Pharmacia 3.6-9.3 宽 pI 校准试剂盒(目录#17-0471-01)管形瓶(325 μg 蛋白质/瓶)溶于 200 μl DI H₂O 中，然后加入 0.005 g 实施例 2 的硅胶。两个样品滚动(end over end)搅拌 1 小时。这些样品在 Pharmacia 快速凝胶(PhastGel)装置上进行 3-9 等电聚焦凝胶电泳。结果如图 3 所示。

泳道

描述

2,7

Pharmacia 3.6-9.3 宽 pI 标准品

3,4 实施例 1 硅胶

5,6 实施例 2 硅胶

图 3 表明与实施例 1 和 2 硅胶载体接触的样品的带(蛋白质)消失, 这表示蛋白质被吸附到硅胶表面。高表面面积二氧化硅实施例 2 吸附所有等电点大于 5.9 的蛋白质, 而较低表面二氧化硅实施例 1 仅吸附更高 pI 的蛋白质。数据清晰表明未涂覆二氧化硅结合蛋白质主要通过强静电相互作用, 且表面在该 pH(假定约为 5.5)带负电荷。

实施例 3-5 - 疏水载体上非选择性结合

这些实施例表明当二氧化硅用疏水基团或甲基或辛基涂覆时存在强吸附, 尤其是在适度的溶剂离子强度时(约 0.1 M NaCl)。

实施例 3 的载体为来自 W.R. Grace & Co. 的未涂覆纯商品宽孔二氧化硅 XWP-凝胶 P 005, SA = 72 m²/g, 具有 50 nm 孔中值, 其于 150 °C 已活化 2 小时。

实施例 4 的载体为如下所述用甲基涂覆的实施例 3 二氧化硅。

实施例 5 载体为如下所述用辛基涂覆的实施例 3 二氧化硅。

实施例 4 的载体按如下方法制备: 在 250 ml 的圆底烧瓶中, 加入 50 ml 甲苯和 6.16 g 甲基三乙氧基硅烷。然后将 10.1 g 实施例 3 的二氧化硅加入到甲苯/甲基三乙氧基硅烷溶液中。通 5 分钟 N₂ 以除去空气并于整个反应过程中连续通气。将样品回流并于 110 °C 搅拌 4 小时。将样品过滤并用 50 ml 甲苯洗涤 3 次。将样品再打浆至 50 ml 甲苯中, 然后过滤并用 50 ml 甲苯洗涤 3 次。然后将样品再打浆至 50 ml 甲苯中, 过滤并用 50 ml 甲苯洗涤 3 次。将样品于 110 °C 干燥并于 150 °C 煅烧 4 小时。

实施例 5 的载体按如下方法制备: 以 0.53 g 辛基三乙氧基硅烷溶于 13.25 g 甲苯的溶液作为溶剂, 将 10.1 g 实施例 3 的二氧化硅浸渍到

初湿。然后将样品在通风橱中风干 2 小时，于 110℃干燥一小时并于 150℃煅烧 4 小时。

在 0.1 M NaCl 中的蛋白吸附测定如下：由于实施例 4 和 5 的载体的表面疏水，需要有润湿过程以确保与蛋白质溶液良好接触。因此，向 eppendorf 管中加入 0.014 g 实施例 3 的二氧化硅作为对照。然后，加入 1.0 ml 乙醇，搅拌并离心，将上清液除去。加入 0.5 ml 乙醇和 0.5 ml DI H₂O，搅拌并离心，将上清液除去。加入 0.25 ml 乙醇和 0.75 ml DI H₂O，搅拌并离心，将上清液除去。加入 1 ml DI H₂O，搅拌并离心，将上清液除去。再重复四次 DI H₂O 洗涤过程。加入 1.0 ml 0.1 M NaCl + 0.02 M PBS (pH 7.4)，搅拌并离心，将上清液除去。再重复四次用 0.1 M NaCl + 0.02 M PBS 洗涤的过程。将两管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 500 μl 0.1 M NaCl + 0.02 M PBS (pH 7.4) 中。将溶解的 IEF Mix 置于 eppendorf 管中。

向另一个 eppendorf 管中加入 0.014 g 实施例 4 的载体。实施例 4 进行与实施例 3 相同的润湿过程和蛋白质加入。

向第三个 eppendorf 管中加入 0.014 g 实施例 5 的载体。实施例 5 进行与实施例 3 相同的润湿过程和蛋白质加入。

将一管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 250 μl 0.1 M NaCl + 0.02 M PBS (pH 7.4)。这为标准的未处理蛋白混合物。

所有样品滚动搅拌 1 小时。将样品在 Pharmacia 快速凝胶装置上进行 3-9 等电聚焦凝胶电泳。结果如图 4 所示。

<u>泳道</u>	<u>描述</u>
1, 8	标准蛋白混合物
2, 3	实施例 3 二氧化硅
4, 5	实施例 4 载体
6, 7	实施例 5 载体

如图4中所见,当二氧化硅的表面电荷被溶解的盐、0.1 M NaCl“屏蔽”,且没有蛋白结合存在时,甲基、尤其是辛基的疏水作用非常强且许多带消失。数据清晰表明疏水表面组合物可导致非选择性结合。

实施例 6-8 - 使用 R_{10} 基团减少非选择性结合

实施例 6-8 显示采用本发明 R_{10} 基团减少蛋白质非选择性结合至二氧化硅表面的优点。

除二氧化硅于 200°C 活化 2 小时外,实施例 6 的载体与实施例 3 的二氧化硅相同。

实施例 7 的载体为中间体表面组合物,二氧化硅表面具有 Si-R 基团连接体,其中 R 为乙酰氧基甲基。

实施例 8 的载体为本发明表面组合物的实例,二氧化硅表面具有 Si- R_{10} 基团连接体,其中 R_{10} 基团为甲基羟基。也显示实施例 8 的载体表面与高和低离子强度溶剂的优点。

实施例 7 的载体按如下方法制备:在 250 ml 圆底烧瓶中,加入 50 ml 甲苯和 20.42 g 乙酰氧基甲基三乙氧基硅烷。将 15.05 g 实施例 6 的载体加入到甲苯/乙酰氧基甲基三乙氧基硅烷溶液中。通 5 分钟 N_2 以除去空气并于整个反应过程连续通气。将样品回流并于 110°C 搅拌 16 小时。然后,将样品过滤并用 50 ml 甲苯洗涤 3 次。将样品再打浆至 50 ml 甲苯中,过滤并用 50 ml 甲苯洗涤 5 次。然后将样品再打浆至 50 ml 甲苯中,过滤并用 50 ml 甲苯洗涤 5 次。将其于 110°C 干燥并于 150°C 煅烧 4 小时。

实施例 8 的载体按如下方法制备:在 250 ml 圆底烧瓶中,加入 10 g 实施例 7 的载体和 100 ml 0.01 M H_2SO_4 。通 5 分钟 N_2 以除去空气并于整个反应过程连续通气。将样品回流并于 100°C 搅拌 18 小时。然后,将样品过滤并用 100 ml (80°C) DI H_2O 洗涤 2 次。将样品再打浆至 100

ml (80°C) DI H₂O 中, 过滤并用 100 ml (80°C) DI H₂O 洗涤 2 次, 于 110°C 干燥并于 150°C 煅烧 4 小时。

向 eppendorf 管中加入 0.007 g 实施例 7 的载体。将一管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 250 μl 0.14 M NaCl + 0.02 M PBS (pH 7.2) 中, 然后加入到 eppendorf 管中。将样品标记为实施例 7 高盐。

向第二个 eppendorf 管中加入 0.007 g 实施例 8 的载体。将一管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 250 μl 0.14 M NaCl + 0.02 M PBS (pH 7.2) 中, 然后加入到 eppendorf 管中。将该样品标记为实施例 8 高盐。

向第三个 eppendorf 管中加入 0.007 g 实施例 7 的载体。将一管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 250 μl 0.02 M PBS (pH 7.4) 中, 然后加入到 eppendorf 管中。将样品标记为实施例 7 低盐。

向第四个 eppendorf 管中加入 0.007 g 实施例 8 的载体。将一管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 250 μl 0.02 M PBS (pH 7.4) 中, 然后加入到 eppendorf 管中。将样品标记为实施例 8 低盐。

在第五个 eppendorf 管中, 将一管形瓶 Sigma IEF Mix 3.6-9.3 等电聚焦标记(目录#I-3018)溶于 250 μl DI H₂O 中。该样品标记为蛋白混合物标准品。

所有样品滚动搅拌 1 小时。然后将所有样品在 Pharmacia 快速凝胶装置上进行 3-9 等电聚焦凝胶电泳。结果如图 5 所示。

<u>泳道</u>	<u>描述</u>
1, 8	蛋白混合物标准品
2	实施例 7 高盐
3	实施例 8 高盐
6	实施例 7 低盐

7 实施例 8 低盐

这个试验的结果清晰地表明实施例 8 的载体防止非特异性吸附到二氧化硅表面的能力，其中所有的蛋白带都存在。

实施例 8 的表征

实施例 8 的载体表面组合物通过下述分析来表征：

图 6 显示实施例 8 载体的 $1400-4000\text{ cm}^{-1}$ 漫反射红外光谱，其具有包含 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基团的表面组合物。红外数据是通过 Nicolet Magna 550 使用 Spectra-Tech 漫反射辅助设备获得。样品以 1:20 用 KBr 稀释，并于 4 cm^{-1} 分辨率累积 512 次扫描。 2937 cm^{-1} 和 2897 cm^{-1} 的峰清晰表明 $-\text{CH}_2$ 基团的存在。 $-\text{OH}$ 共振带掩埋在 3483 cm^{-1} 的宽峰中。为了比较，图 7 显示实施例 7 的载体的光谱，具有包含 $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ 基团的表面组合物。新的共振出现在 1726 、 1421 和 1374 cm^{-1} ，其为与乙酰氧基有关的特征共振。

图 8 显示实施例 8 的载体的 MAS Si^{29} NMR 波谱。单脉冲 ^{29}Si 核磁共振试验在 Chemagnetics CMX 200 上进行，以共振频率 39.76 MHz 操作。将样品装在 14 mm 的铅笔-类型转子中。利用对应于 22 度脉冲的 $4\text{ }\mu\text{s}$ 脉冲长度，以及 60 秒的驰豫延迟。于 -62 ppm 的明显共振被鉴别为 $\text{O}_3\text{Si}-\text{CH}_x$ (Vicic, D.等, *J. Am. Chem. Soc.* 105: 3767-3776 (1983))。

图 9 显示实施例 8 的载体的 X 射线光电子能谱。将样品装在有双面带的样品短管(stub)上并进行 2 小时的碳、氧和硅扫描。图谱拟合成两个峰，其被鉴别为污染物 C, 284.7 eV ，和醇 C 原子, 286.7 eV 。见，如 Moulder, J.F.等, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*, Perkin-Elmer Corp., Eden Prairie, MN (1992)。为了比较，实施例 7 的载体的 XPS 能谱于图 10 中显示。这种情况中，在 289 eV 也观察到与羧基碳有关的峰。这些研究表明实施例 8 载体的表面组合物包含甲基羟基，即 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。

实施例 8 载体上 R₁₀ 基团(-CH₂OH)的浓度为 2.01 个基团/nm², 且由二氧化硅载体的表面面积(72 m²/g)和最终产物的碳含量(1.907%)计算。表面面积使用常规 BET 表面面积方法测定, 碳含量(%重量)用型号 C-144 LECO 碳分析器测定。

实施例 9 和 10 - 未修饰的(实施例 9)和修饰的(实施例 10)载体表面

将 850 g 甲苯和 13.37 g 3-氨基丙基三乙氧基硅烷加入到 2000 ml 圆底烧瓶中。然后, 将 200 g 二氧化硅(Grace Davison 硅胶#2408, 于 100°C 老化 40 小时, 于 200°C 煅烧 2 小时)加入到圆底烧瓶, 接着加入 15 颗沸石(boiling chips)。将圆底烧瓶置于加热夹套中并装上冷凝器。将加热夹套连接至以 115 rpm 的速度运转的定轨摇床顶部。在整个反应过程中 N₂ 通过圆底烧瓶和冷凝器以除去空气。将样品回流 4 小时, 然后过滤并用 2×1000 ml 甲苯洗涤, 于 115°C 干燥并于 150°C 煅烧 2 小时。该样品标记为中间体 A2。

将 206 g 中间体 A2 和 500 ml 偶合缓冲液(0.1 M Na₂PO₄ + 0.15 M NaCl (pH 7.0))在 4000 ml 烧杯中混合并搅拌。在 1000 ml 烧杯中, 将 500 ml 偶合缓冲液、7.88 cc 50 wt. % 戊二醛和 30.96 g NaCNBH₃ 一起搅拌直至溶解。然后将含有戊二醛的混合物加入到二氧化硅浆状物(含有中间体 A2 的浆状物)中并搅拌 4 小时, 过滤, 用 1000 ml 偶合缓冲液洗涤并于 2000 ml 偶合缓冲液中再打浆。再将这个过滤/洗涤/再打浆步骤重复两次。最终产物为实施例 9 并保存于 20% EtOH 中。

将 850 g 甲苯和 13.37 g 3-氨基丙基三乙氧基硅烷加入到 2000 ml 圆底烧瓶中。然后, 将 200 g 二氧化硅(Grace Davison 硅胶#2408, 于 100°C 老化 40 小时, 于 200°C 煅烧 2 小时)加入到圆底烧瓶中, 接着加入 15 颗沸石。将圆底烧瓶置于加热夹套中并装上冷凝器。加热夹套连接至以 115 rpm 的速度运转的定轨摇床顶部。在整个反应过程中 N₂ 通过圆底烧瓶和冷凝器以除去空气。将样品回流 4 小时, 然后过滤并用

2×1000 ml 甲苯洗涤，于 115℃干燥并于 150℃煅烧 2 小时。该样品标记为中间体 A3。

将 1600 ml 1.0 M NaCl 与 215 g 中间体 A3 在 2000 ml 烧杯中混合并用磁力搅拌器搅拌。初始 pH 为 8.66。滴加 1.0 M HCl 直至 pH 变为 2.0。pH 在 2.0 维持 15 分钟。将样品过滤并用 5×1000 ml DI H₂O 洗涤，于 115℃干燥并于 200℃煅烧 2 小时。该样品标记为中间体 B3。

将 680 g 甲苯和 441.68 g 乙酰氧基甲基三乙氧基硅烷在 2000 ml 圆底烧瓶中混合。然后将 206 g 中间体 B3 与 15 颗沸石一起加入。将圆底烧瓶置于加热夹套中并装上冷凝器。将加热夹套连接至以 115 rpm 的速度运转的定轨摇床顶部。在整个反应过程中 N₂ 通过圆底烧瓶和冷凝器以除去空气。将样品回流过夜(约 16 小时)，过滤，用 3×1000 ml 甲苯洗涤，于 115℃干燥并于 150℃煅烧 2 小时。该样品标记为中间体 C3。

将 1000 ml 0.1 M HCl 与 212 g 中间体 C3 一起加入到 2000 ml 圆底烧瓶中。将 15 颗沸石置于圆底烧瓶中，将圆底烧瓶置于加热夹套中并装上冷凝器。将加热夹套连接至以 115 rpm 的速度运转的定轨摇床顶部。在整个反应过程中 N₂ 通过圆底烧瓶和冷凝器以除去空气。将样品回流 4 小时，过滤，用 3×1000 ml DI H₂O 洗涤，于 115℃干燥并于 150℃煅烧 2 小时。该样品标记为中间体 D3。

将 208 g 中间体 D3 和 500 ml 偶合缓冲液(0.1 M Na₂PO₄ + 0.15 M NaCl (pH 7.0))在 4000 ml 烧杯中混合并搅拌。将 500 ml 偶合剂与 7.88 cc 50 wt. % 戊二醛和 30.96 g NaCNBH₃ 一起加入到 1000 ml 烧杯中。将混合物搅拌至溶解，然后加入到浆状中间体 D3 中。将所得混合物搅拌 4 小时，过滤，用 1000 ml 偶合缓冲液洗涤并于 2000 ml 偶合缓冲液中再打浆。将过滤/洗涤/再打浆的步骤再重复两次。将再洗涤和再打浆的样品过滤，然后用 1000 ml 20% EtOH 洗涤。将这个过滤/洗涤的步骤再重复两次。最终产物为实施例 10 产物并保存在 20% EtOH 中。

实施例 11 - 固定化方法

称出适量选择的酶，以在 100 ml 偶合缓冲液(100 mM Na₂PO₄ + 150 mM NaCl (pH 7.0))中产生所需浓度(0.05-1.0 mg 蛋白/ml)。将 1 g (二氧化硅基础)实施例 9 或实施例 10 的最终产物与 126 mg NaCNBH₃ 一起加入到酶中。将反应物在台式摇床上于室温以 150 rpm 振摇 2 小时。然后将反应物过滤并用 BCA 测定试剂盒测定滤液中剩余的蛋白含量。样品用 100 ml 偶合缓冲液至少洗涤两次，或直到滤液中发现不到有蛋白活性(通过四肽活性来测量)。然后，将样品与 126 mg NaCNBH₃ 一起再次置于 100 ml 偶合缓冲液中，并于室温以 150 rpm 振摇 2 小时。将样品过滤，用 100 ml 偶合缓冲液至少洗涤两次，于抽滤下风干。然后将样品在 40℃ 恒温箱中干燥 20 分钟。将样品保存在 PTFE-封盖的玻璃管形瓶中。

实施例 12 - 催化: α -糜蛋白酶水解反应 - 四肽水解

将适量的固定在选择的载体(实施例 9 或 10)上的 α -糜蛋白酶(CT)置于 20 ml 玻璃闪烁瓶中(对于大多数反应使用 2 mg 制剂)。加入 10 ml 反应缓冲液并将样品平衡 2 分钟。将水解的底物四肽 N-琥珀酰基- α - α -脯氨酸苯丙氨酸对硝基酰基苯胺(Sigma #S-7388)(反应物分子)转入到反应容器的 200 μ l DMF 中使最终四肽浓度为 0.1 mM (最终 DMF 浓度 2%v/v)。将反应在台式摇床上于室温以 150 rpm 进行。以适当的时间间隔取 1.5 ml 等分试样且由于对硝基酰基苯胺的释放于 410 nm 处测量所得吸收值增加，期间总转化率保持低于 10%。将等分试样返回反应容器中并继续反应。这种方法确保计算的起始速率基于线性反应时间。

图 11 显示当实施例 9 或实施例 10 载体上的酶载量不同时 CT 催化四肽水解绝对速率的比较。结果清晰表明当酶载于实施例 10 载体钝化的表面时，有较大的速率促进作用。也注意到随着载量的增加，绝对速率稳定，这表明对该酶有最佳的载量和最佳的二氧化硅孔径分

布, 如本应该的那样。这如图 12 所示, 图 12 举例说明比活性(每 mM 酶)对两实施例载体载量的图。再者, 实施例 10 载体的比活性比实施例 9 载体的比活性高得多。

实施例 13 - 催化: α -糜蛋白酶有机反应 - 甲基酯到丙基酯的酯交换

将适量的固定化 CT 置于 20 ml 玻璃闪烁瓶(对于大多数反应使用 15 mg 制剂)。将 5 ml 含有 1.0 M 丙醇和 25 mM n-乙酰基-L-苯丙氨酸的反应混合物加入到闪烁瓶中以引发反应。将反应以 45° 角在 30°C 温育摇床上(200 rpm)进行。期间以适当的时间间隔取等分试样, 期间总转化率保持低于 10%。这确保计算的起始速率基于线性反应时间。将等分试样在 1.5 ml eppendorf 离心管中离心以除去固定化酶。上清液通过 GC 分析。图 13 显示当 CT 载于实施例 9 的载体(141 mg CT/g)或实施例 10 的载体(138 mg CT/g)时转化率对时间的图。再者, 在这个有机的情况, 实施例 10 的载体比实施例 9 的载体有较大的速率促进作用, 这表明表面钝化防止非选择性结合并给出较大活性的优点。

实施例 14 - 催化: B-脂酶水解反应 - 甘油三丁酸酯水解

在该水解中, 底物甘油三丁酸酯由念珠菌(*Candida anartica*)B-脂酶对甘油和丁酸之间的酯键进行水解。用恒定 pH(pH stat)系统通过监测随着反应的进行向溶液中加的碱量来跟踪丁酸的释放。随着反应的进行, 跟踪由于丁酸释放引起的酸化并容易地计算起始速率。用纯丁酸对加入到反应范围的转化碱来作校准曲线。

将 50 mg 载于实施例 9 或 10 的载体上的脂酶加入到恒定 pH 反应容器中的 25 ml 100 mM PBS + 150 mM NaCl 缓冲液(pH 7.0)中。所有试验均以临界搅拌速度进行, 这克服了油/水界面对反应的限制。通过向反应混合物中加入 730 μ l 甘油三丁酸酯(最终浓度 0.1 M)来开始反应。将反应进行至少 10 分钟以得到碱摄入的线性速率。(理想地, 所

有测量于 10%总转化率发生前进行)。反复试验决定读数之间的时间间隔，总时间过程对低酶载量可长至 40 分钟到对最高酶载量可短至 10 分钟。

图 14 显示当实施例 9 或实施例 10 载体上的酶载量不同时由 B-脂酶催化甘油三丁酸酯水解绝对速率的比较。这些结果清晰地表明当酶载于实施例 10 载体钝化的表面时有较大的速率促进作用。然而，当酶载于实施例 9 的非钝化表面时活性基本消失。

实施例 15 – 催化: B-脂酶有机反应 - β -苯乙醇(Sec-Phenylethyl)的酯交换

在这个酯交换中，底物醇(β -苯乙醇)用乙酸酯(乙酸乙烯酯)酰化。随着反应的进行，底物和产物的峰通过 GC 来监测。首先制备 100 mM 用 300 mM 乙酸乙烯酯加料的 β -苯乙醇己烷储备溶液。

将 10 mg 脂酶(念珠菌(*Candida anartica*))加入到反应容器中。用移液管向反应容器(20 ml 或更大的容器)中加入 5.0 ml 储备溶液以开始反应。在测量的时间过程中反应于室温在摇床进行。随着反应进行，没有明显变化。为进行测量，用移液管将 0.25 ml 反应混合物(包括二氧化硅载体)加入到 2.0 ml 离心管中并离心。剩余的反应混合物继续振荡。用移液管从离心管中取出 0.150 ml 上清液，小心操作以便不扰乱底部的二氧化硅，并置于有限体积的 GC 瓶中。(理想地，所有测量于 10%总转化率发生前进行。)采取一些反复试验以决定测量之间的时间间隔。然而，每个反应应取最少 8 个时间点以决定起始速率。这里总时间过程需用 300 分钟。

反应混合物的分析于带自动进样器的 Shimadzu GC17A 上进行。相关方法参数如下：

柱:	Supelco MDN-1 熔融石英毛细管柱 30 m, 0.32 mm ID, 0.25 mm 膜厚度
烘箱:	125°C 等温, 等待时间 5.5 分钟, 250°C 进样口和检测器温度

进样:	1.0 μ l 进样量
检测器:	火焰电离检测器
洗脱:	溶剂-2.6 分钟 底物-3.8 分钟 产物-5.0 分钟

图 15 显示当实施例 9 或实施例 10 载体上酶载量不同时由 B-脂酶催化酯交换绝对速率的比较。这些结果清晰地表明当酶载于实施例 10 载体钝化的表面时有较大的速率促进作用。然而，当酶载于实施例 9 非钝化表面时活性基本消失。

本文引用的所有文章、书籍、专利、专利申请和专利出版物通过引用而整体结合至本文。尽管结合实施例和优选的实施方案描述了本发明，但可理解前述内容性质上是示例性和说明性的，且用于举例说明本发明及其优选的实施方案。通过常规试验，本领域技术人员将认识到可进行显而易见的修改和改变而没有背离本发明的宗旨。因此，本发明并非通过上述说明书而是通过权利要求书及其等价内容来定义。

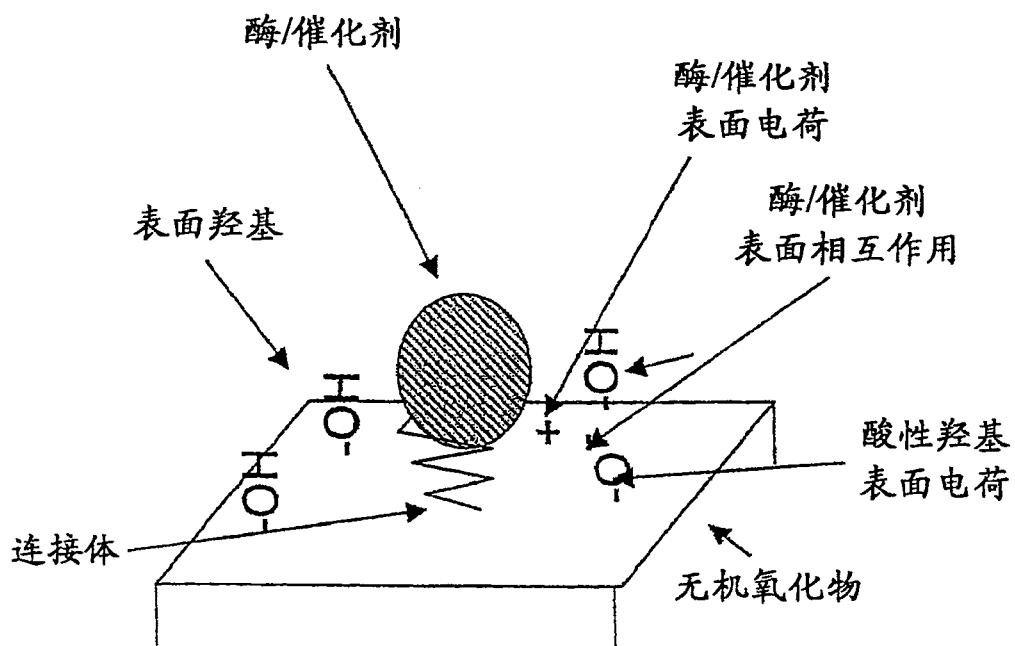


图 1

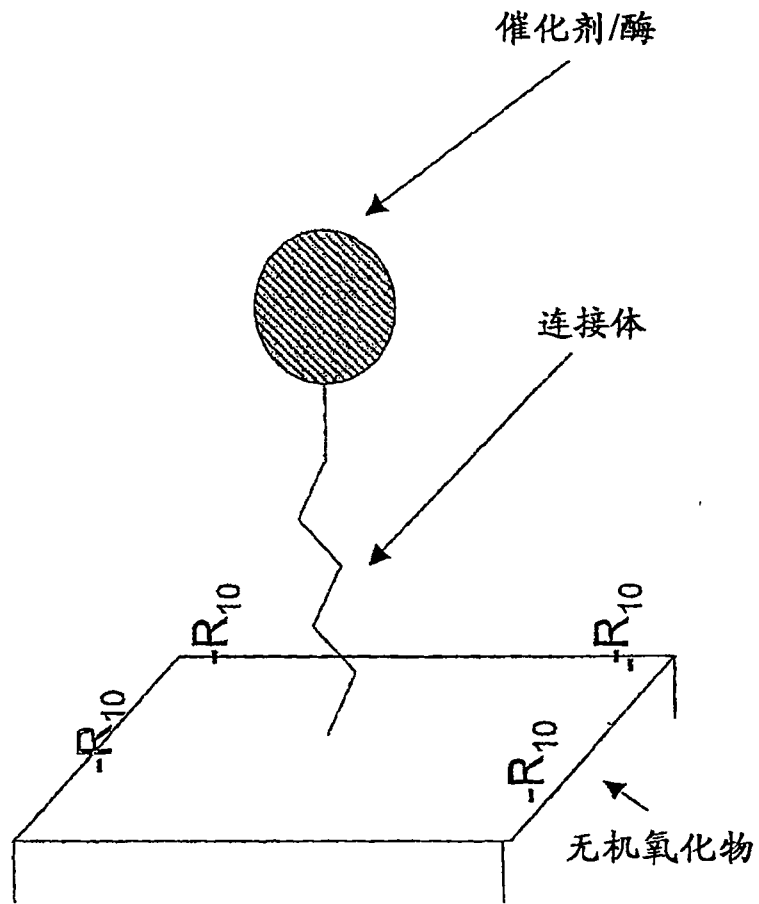


图 2

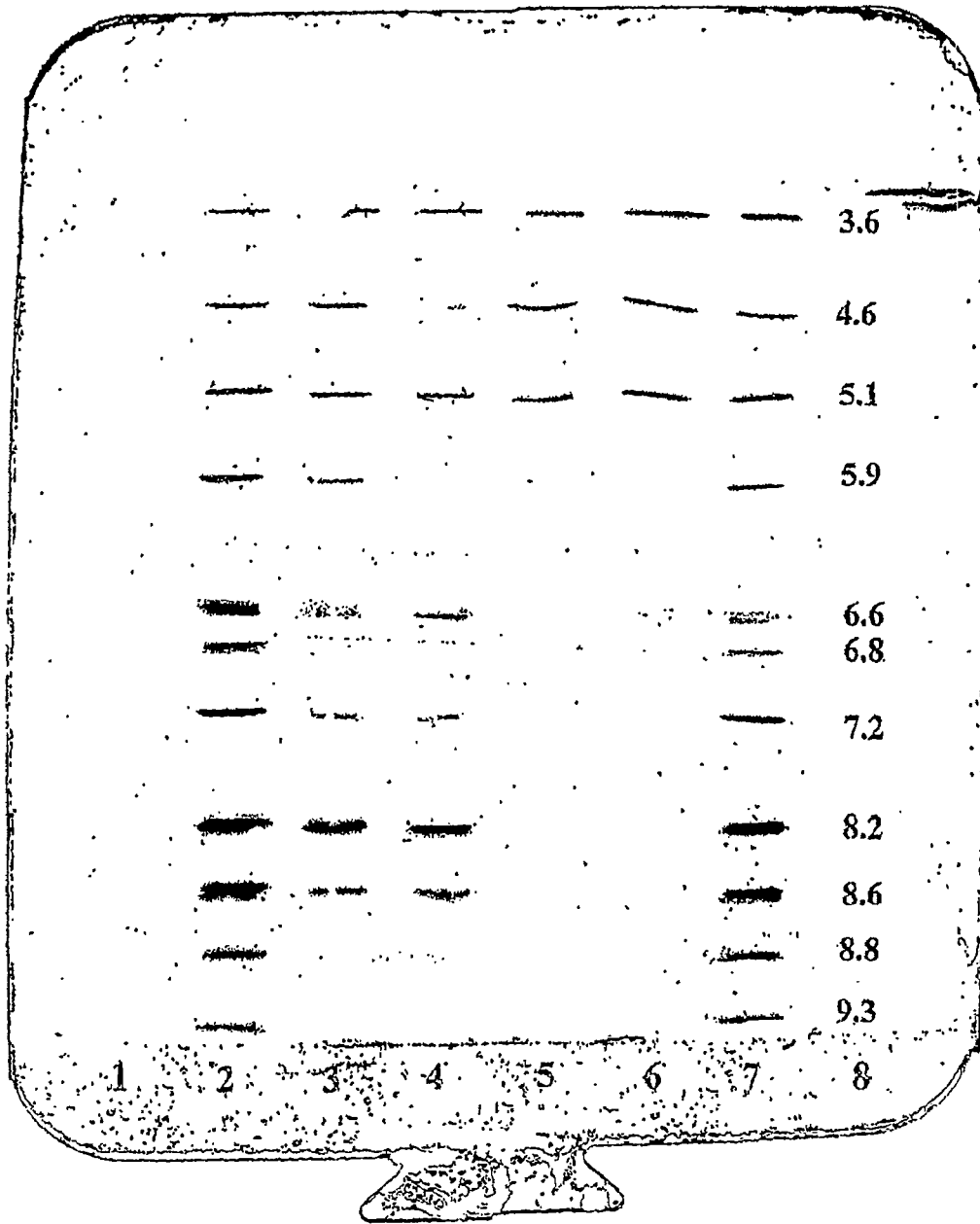


图 3

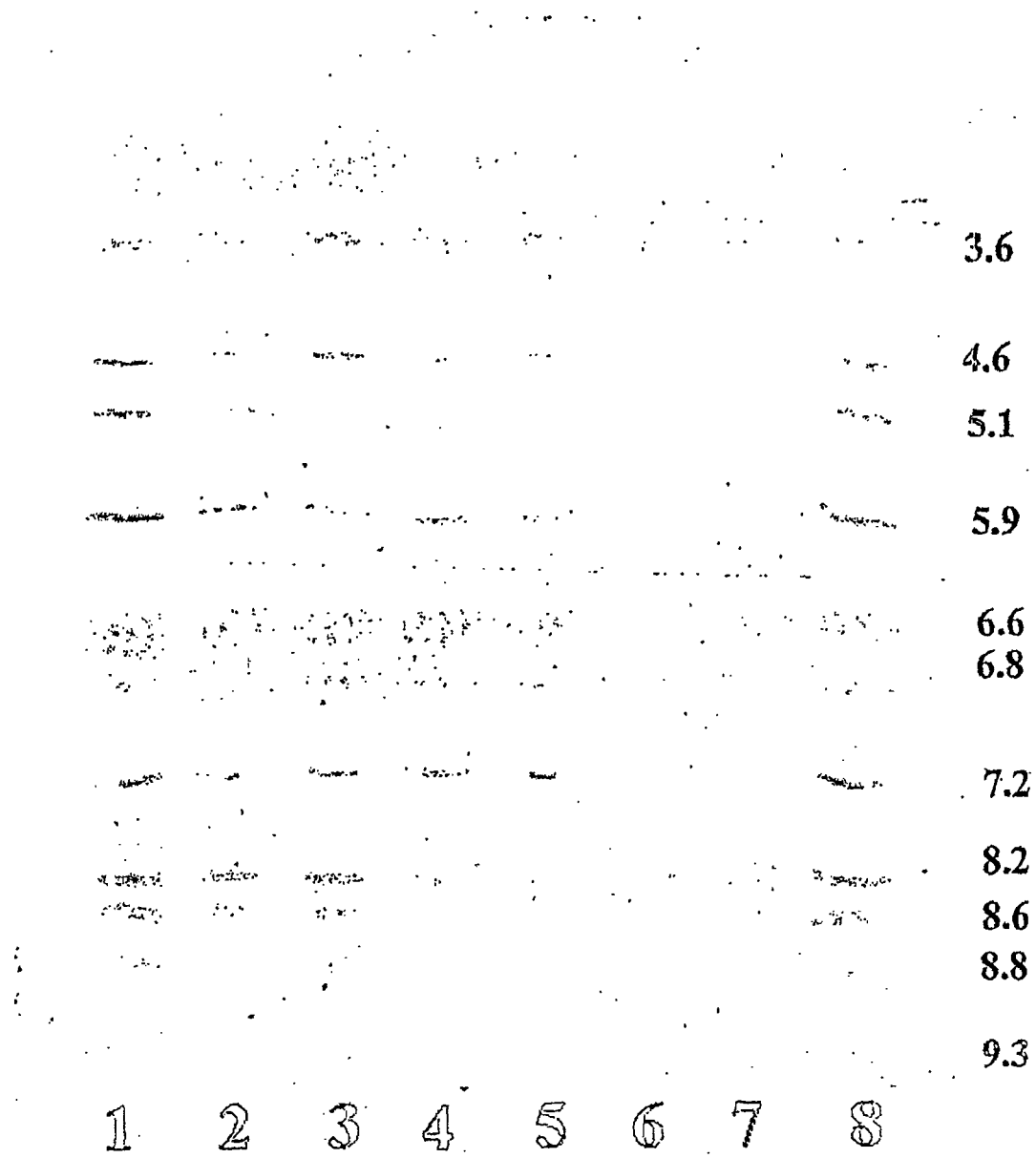


图 4

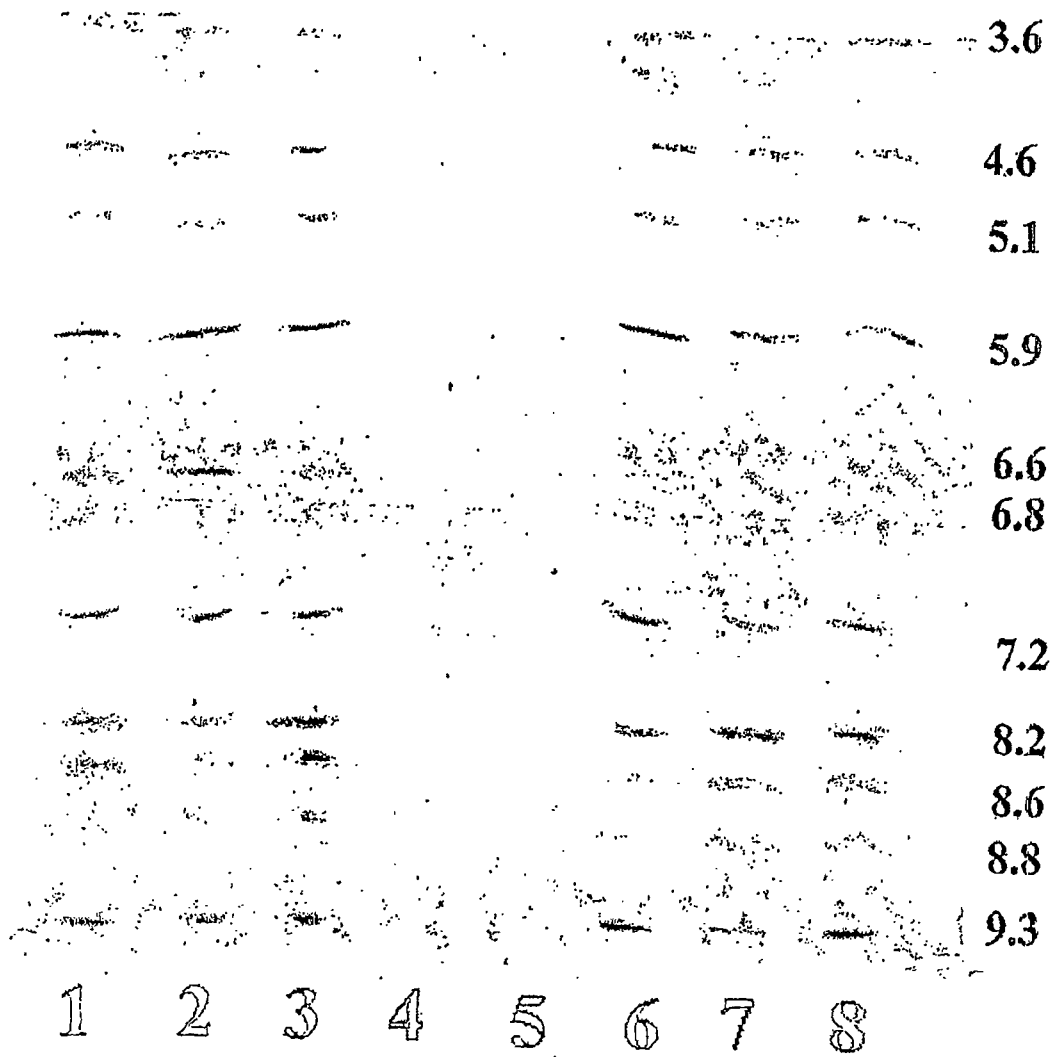


图 5

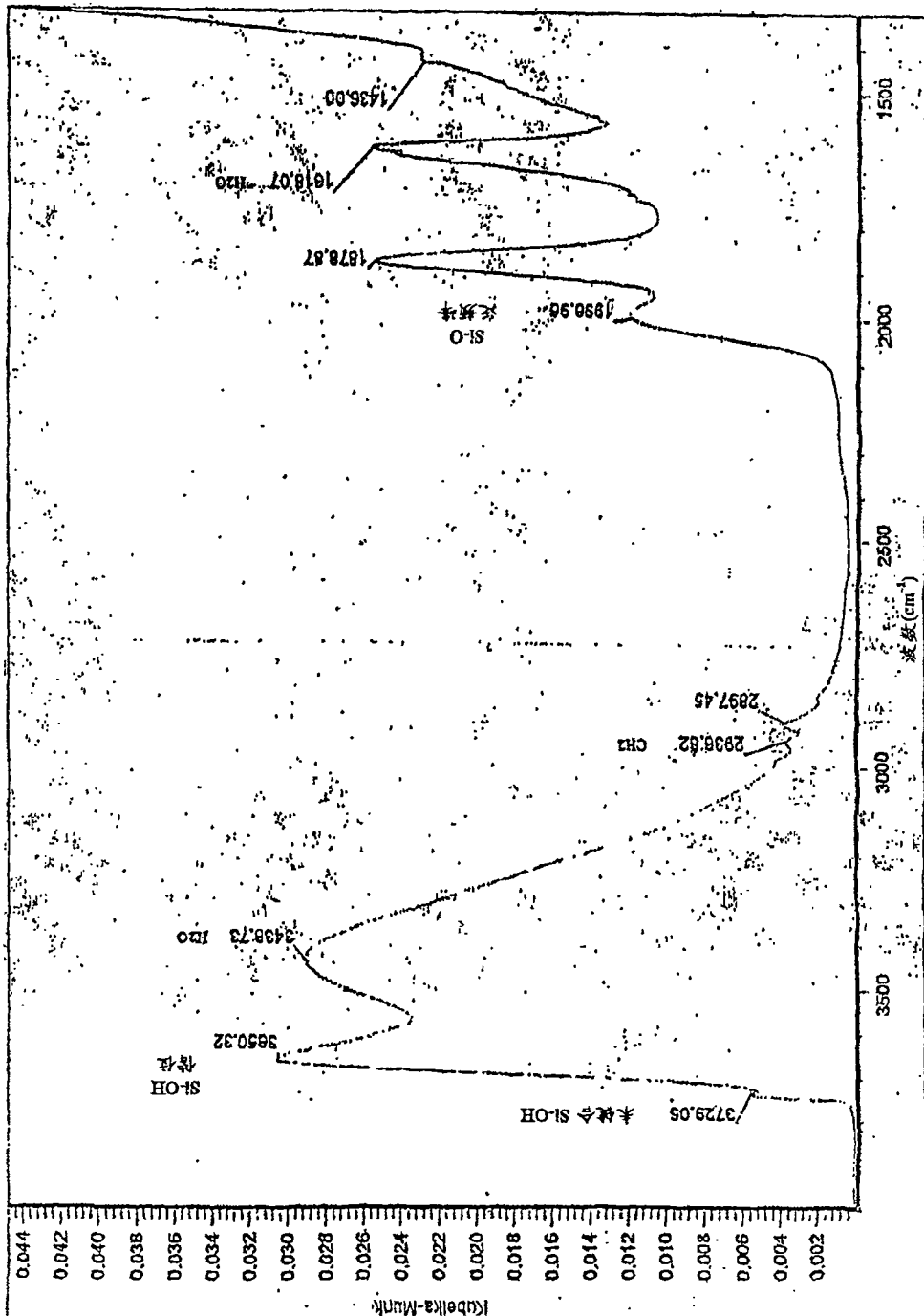


图 6

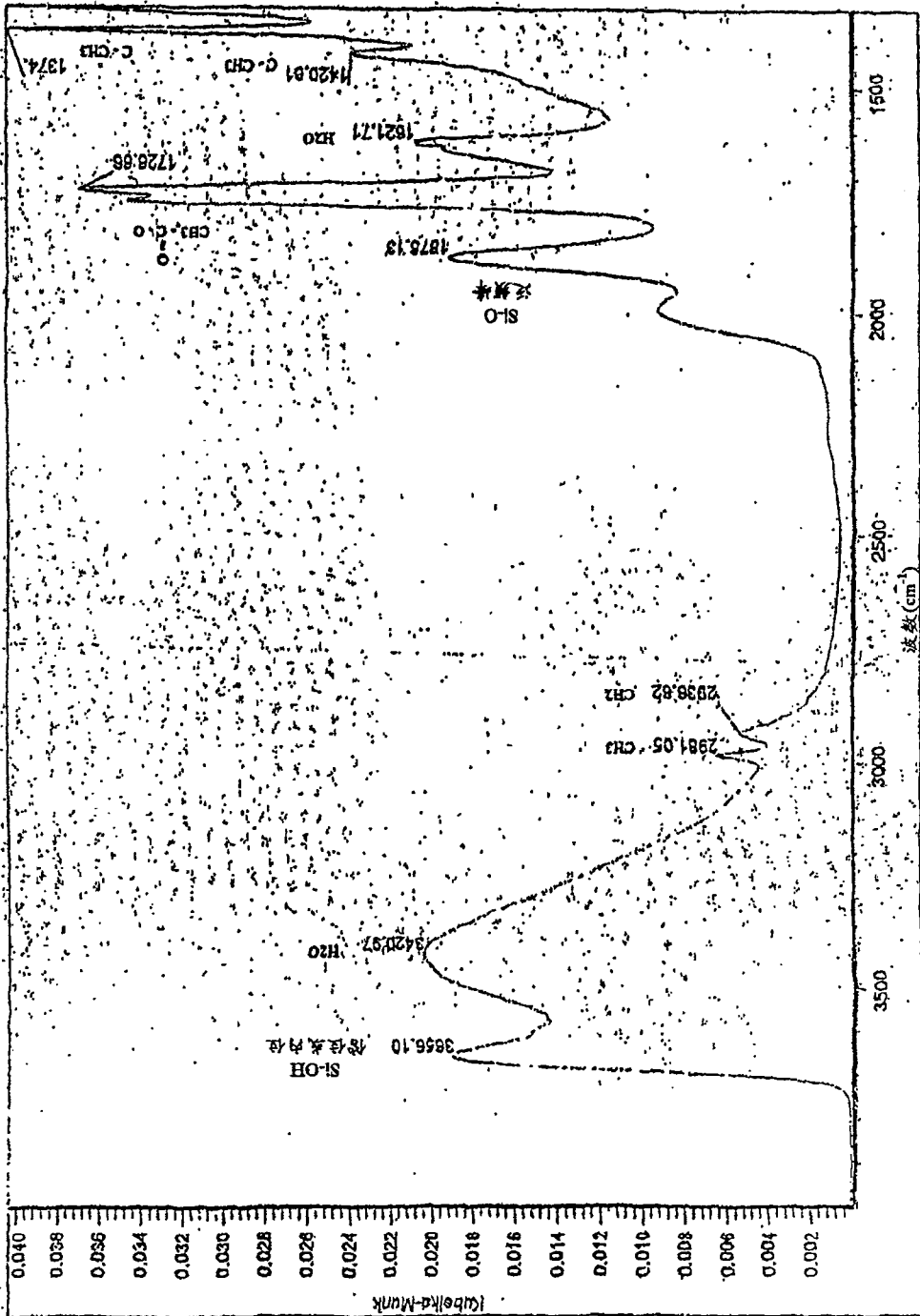


图 7

图 8

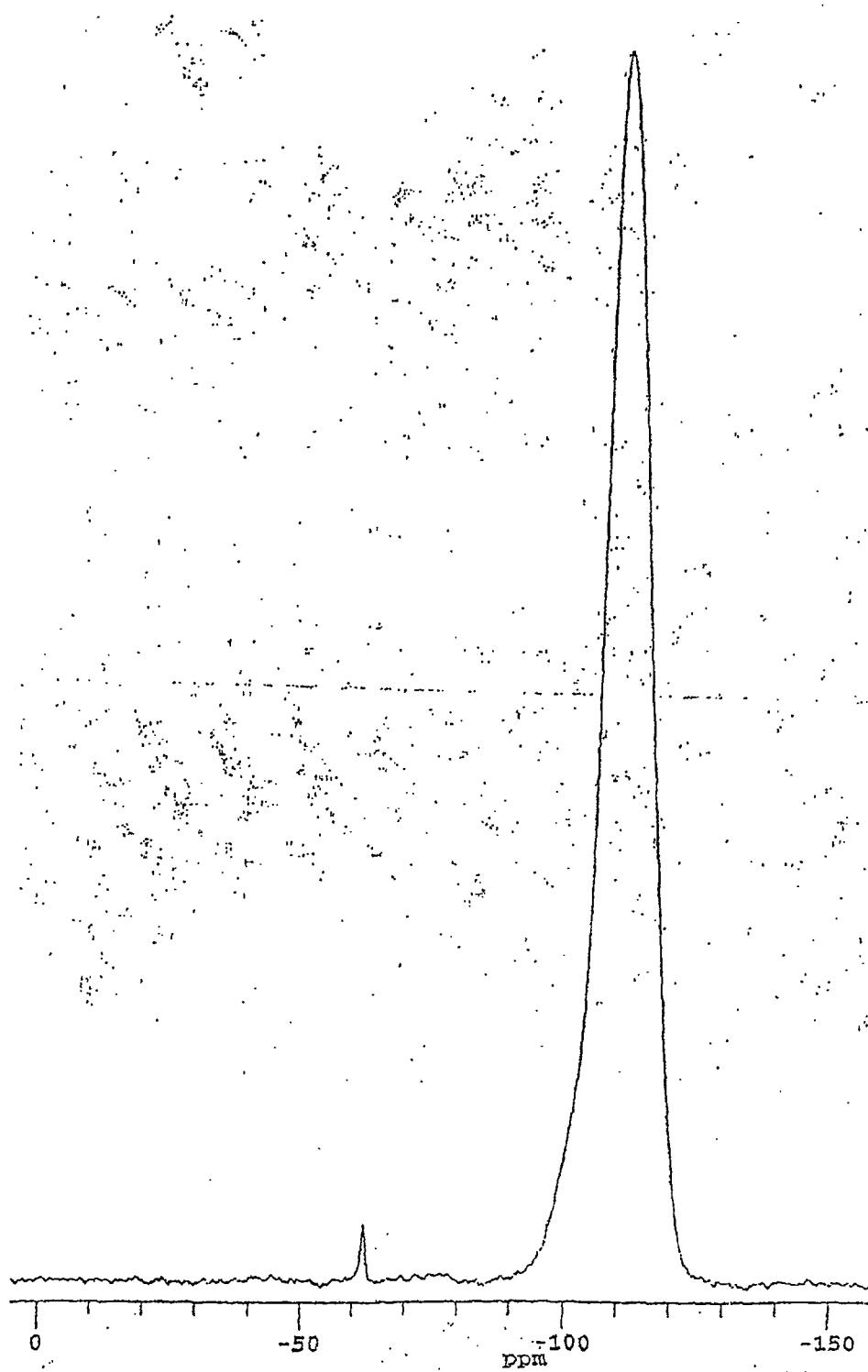


图9

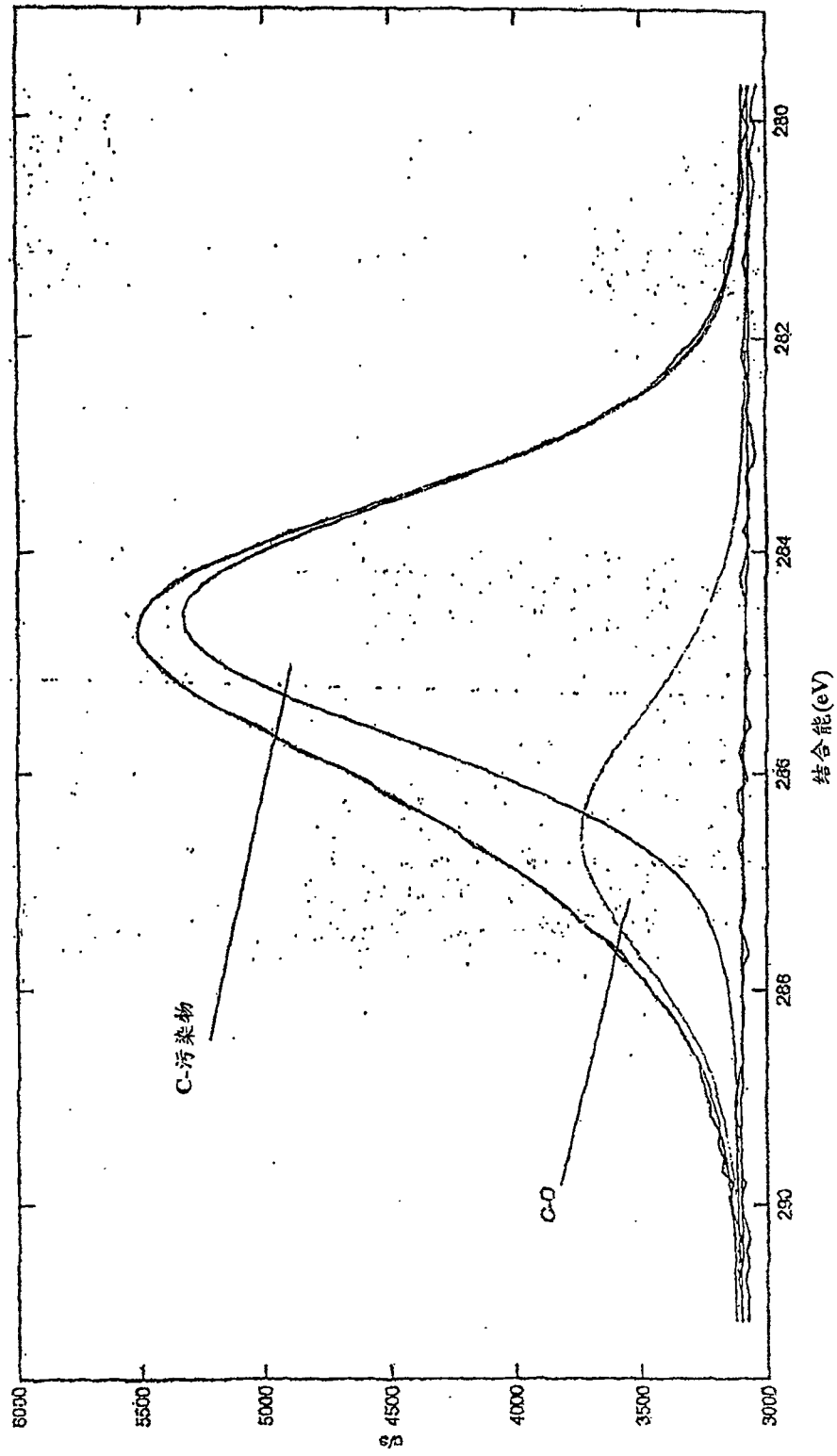
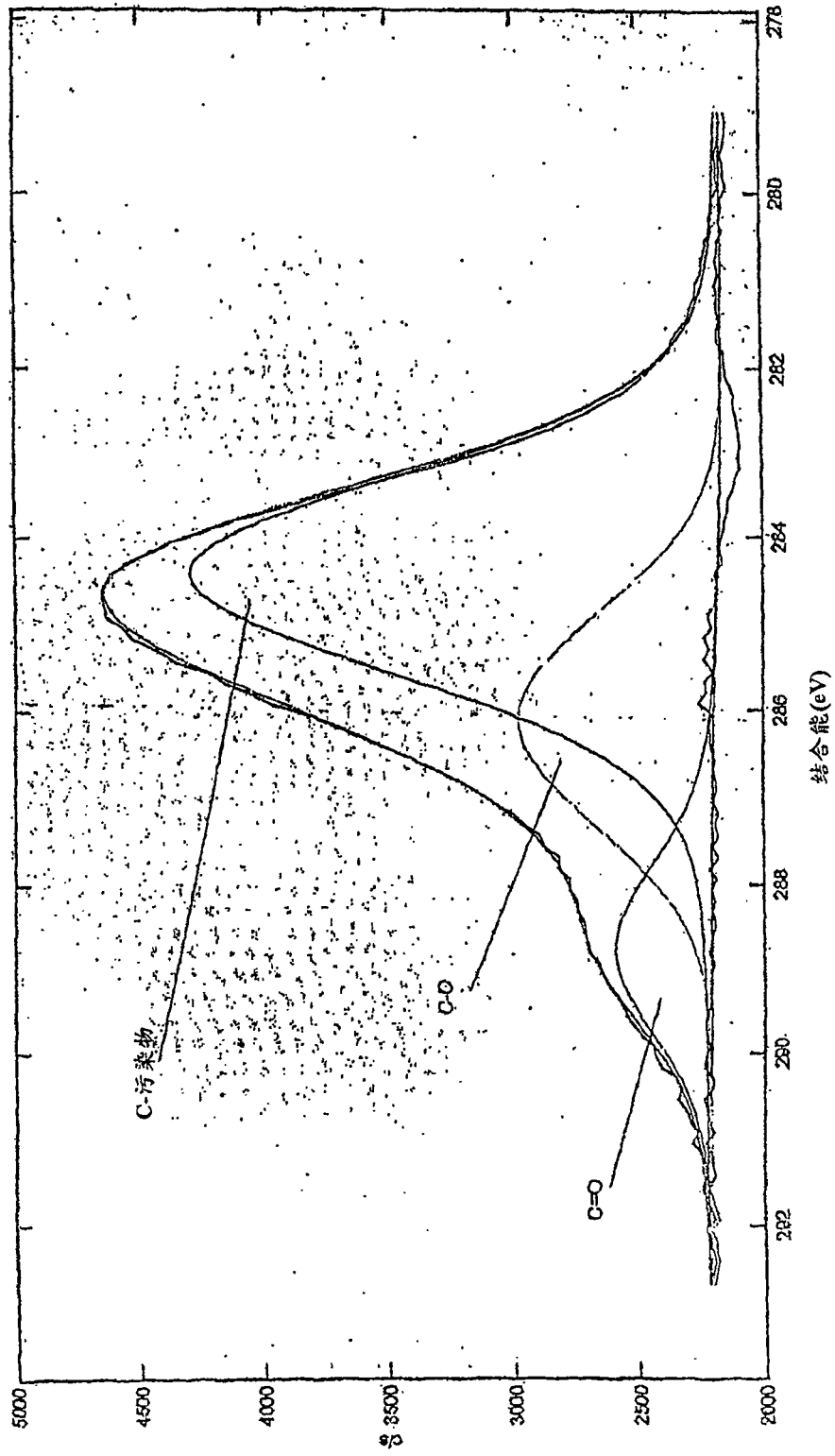


图 10



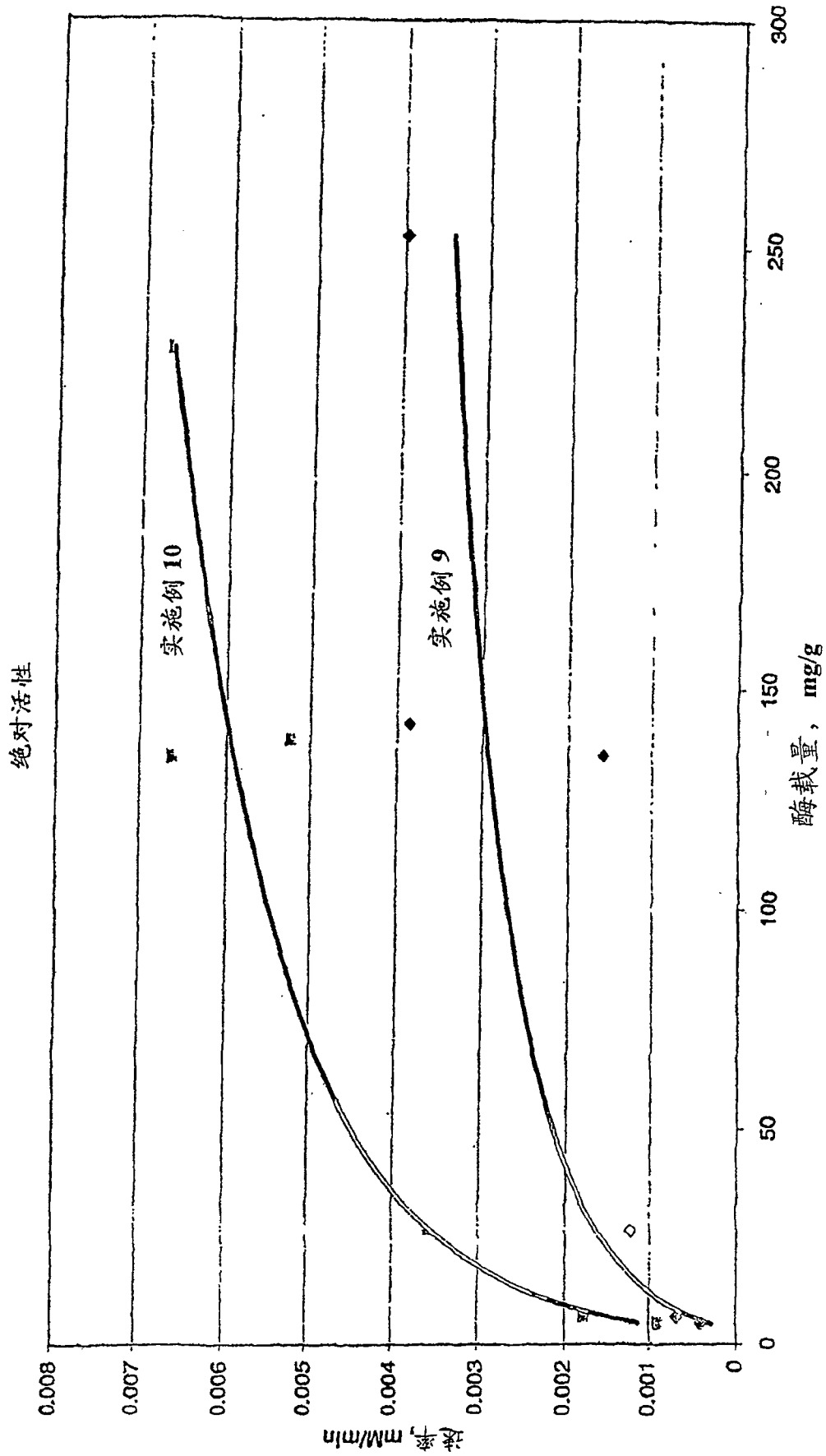


图 11

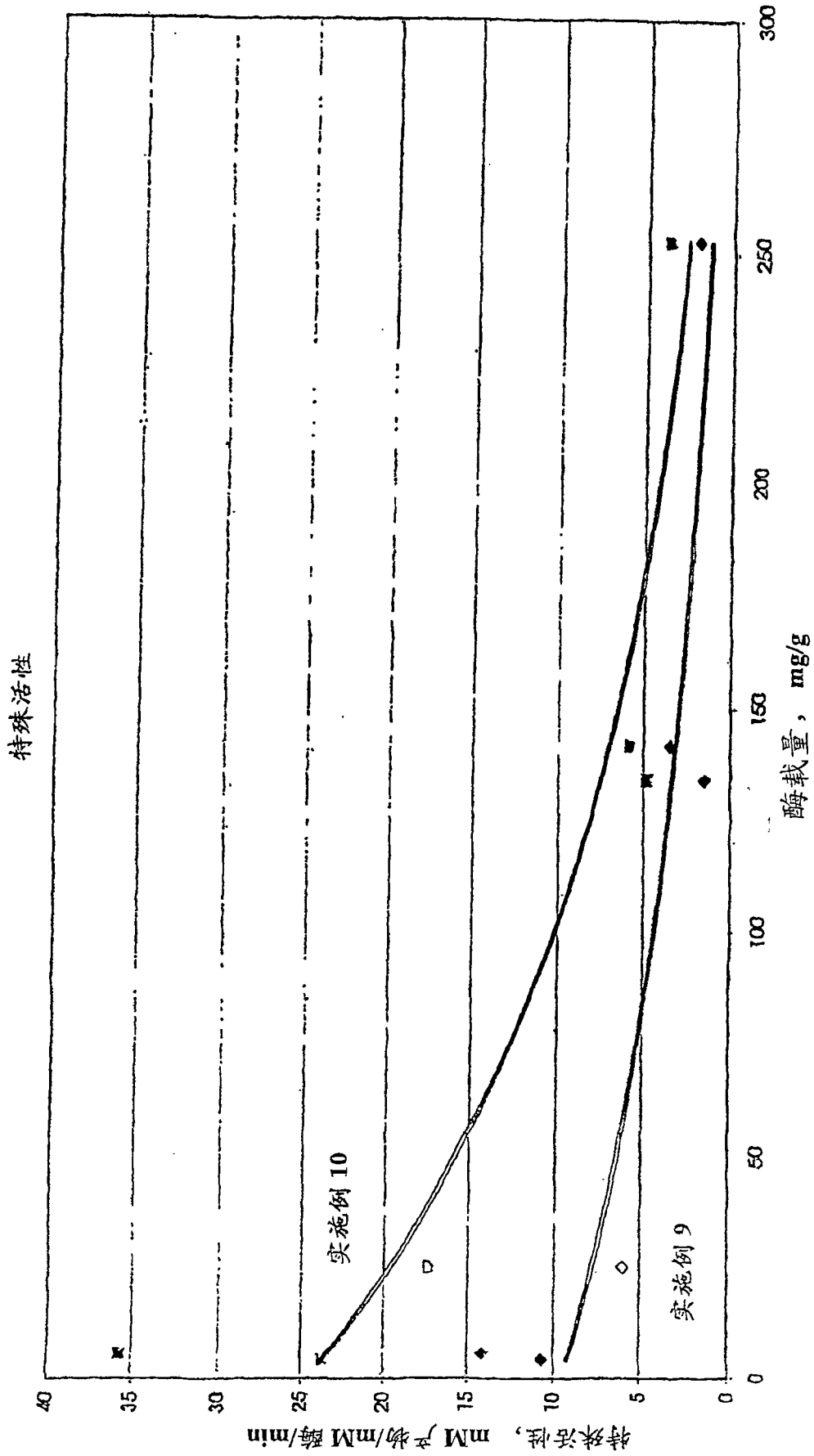


图 12

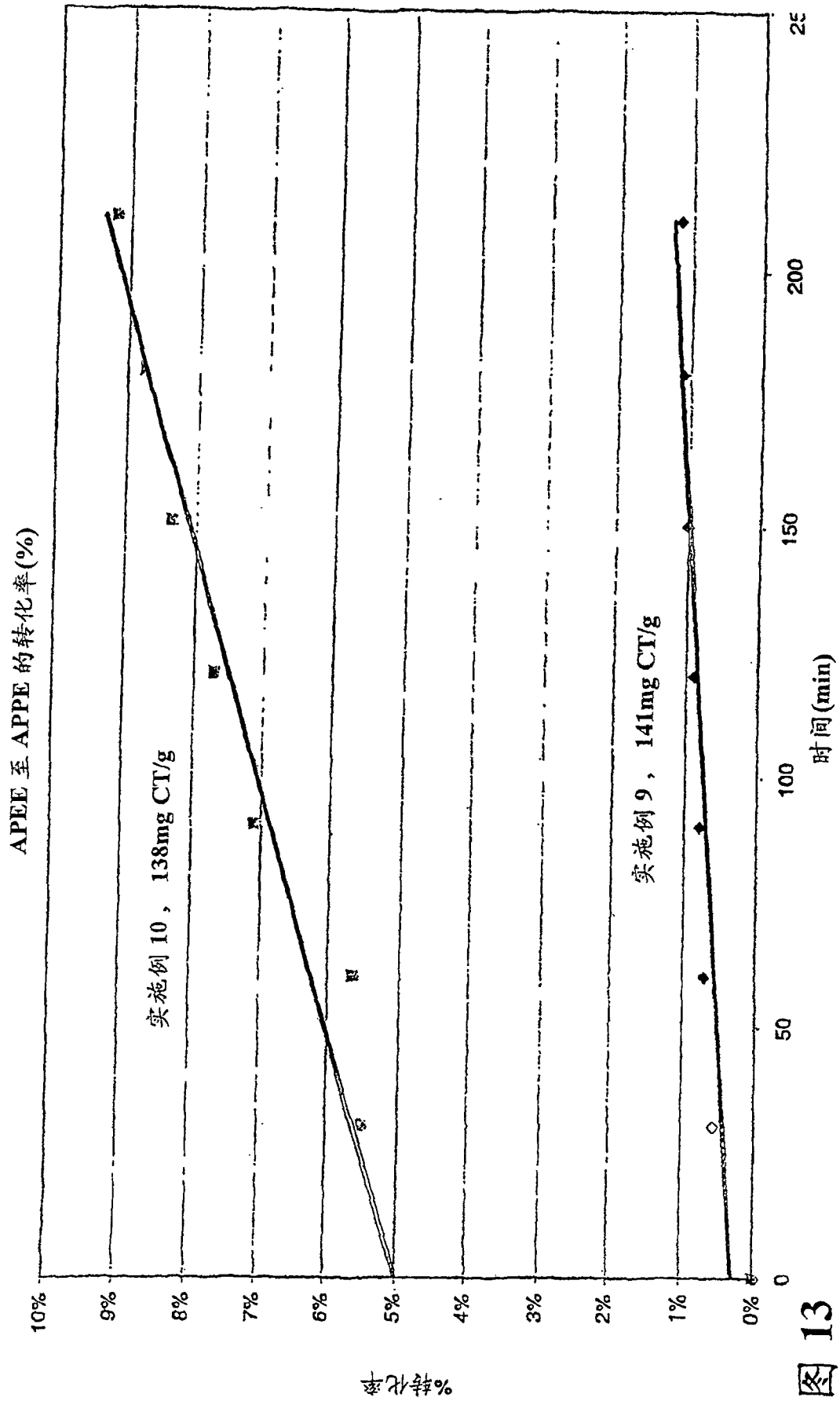


图 13

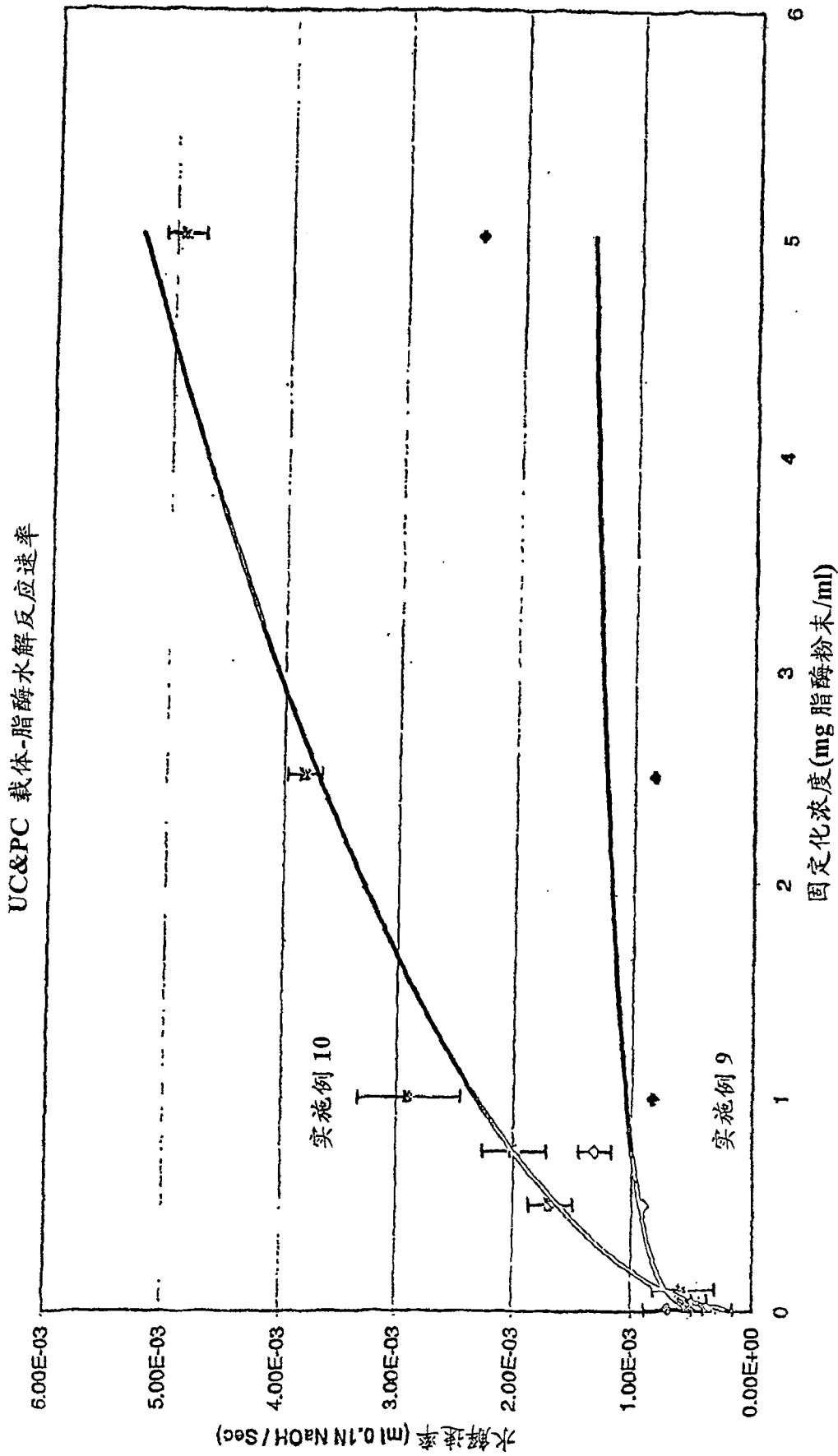


图 14

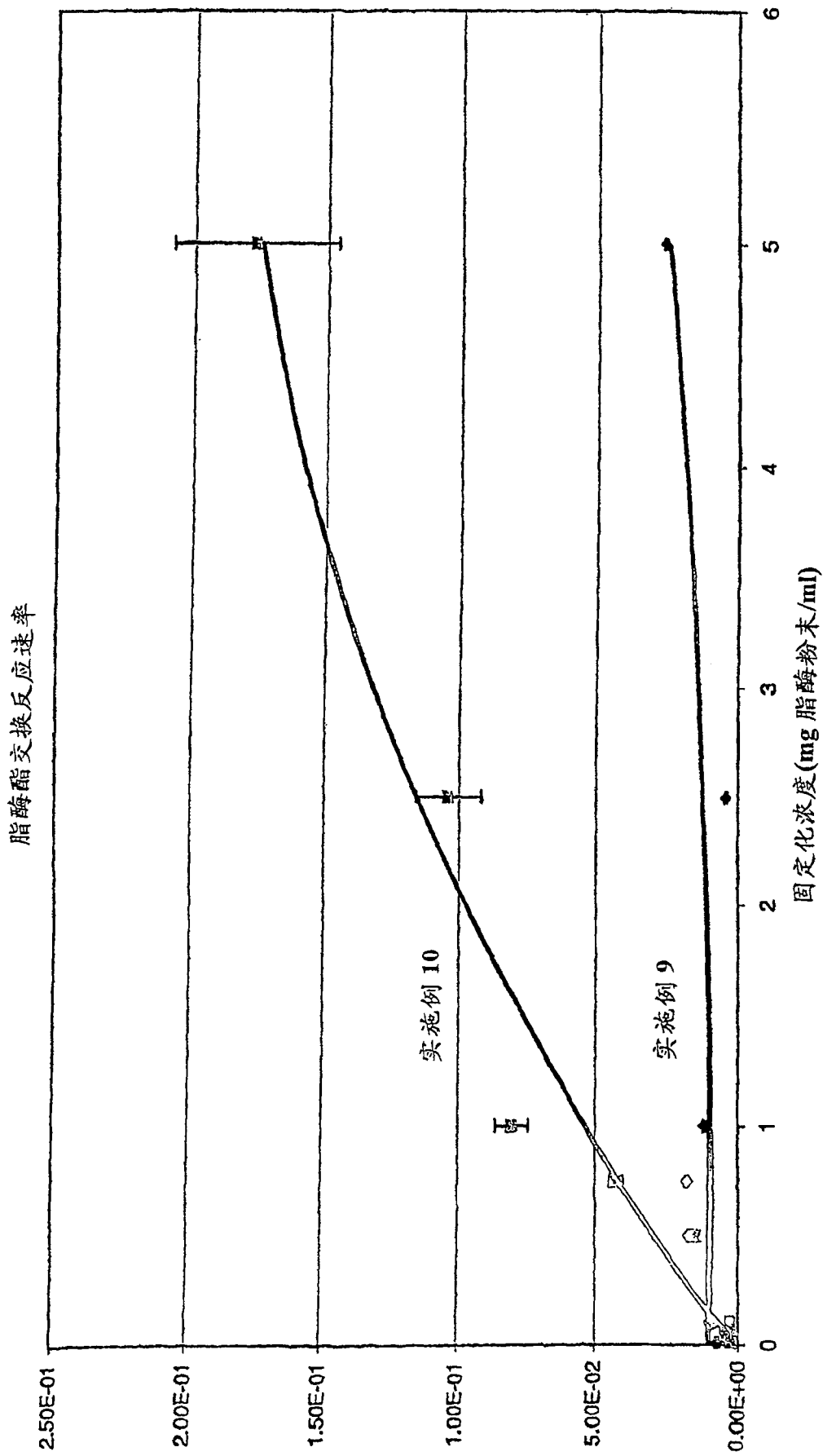


图 15

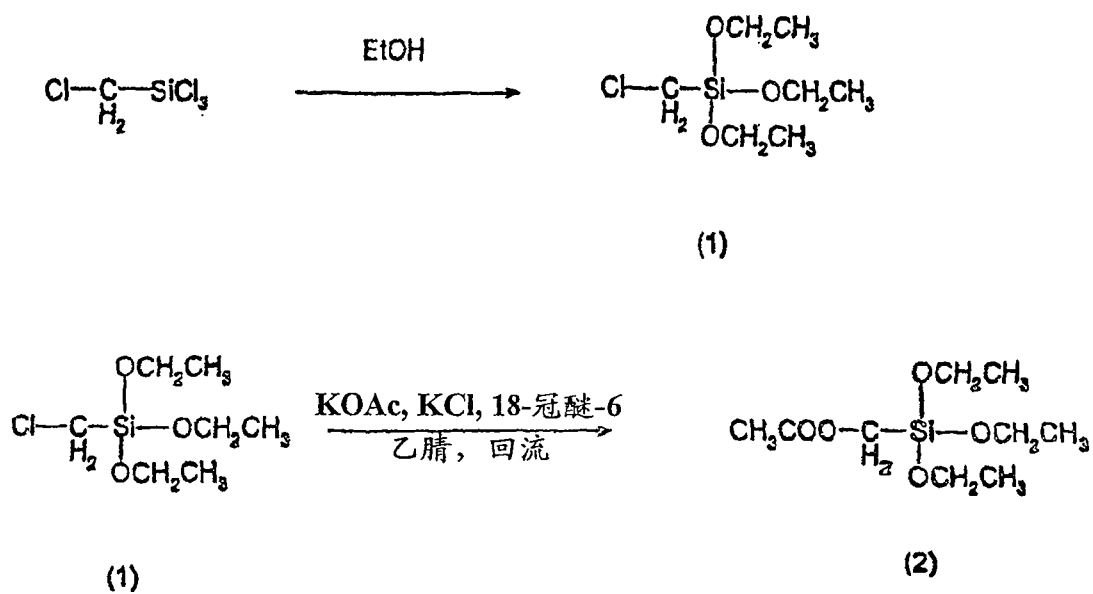


图 16

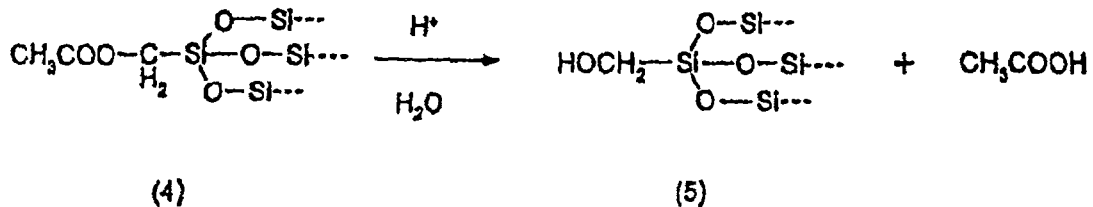
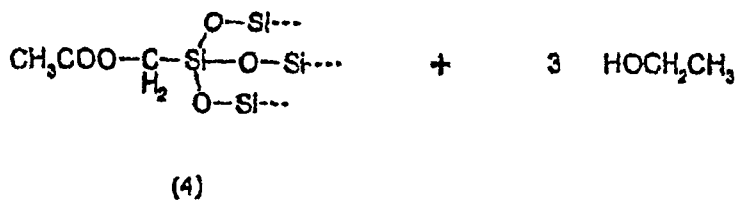
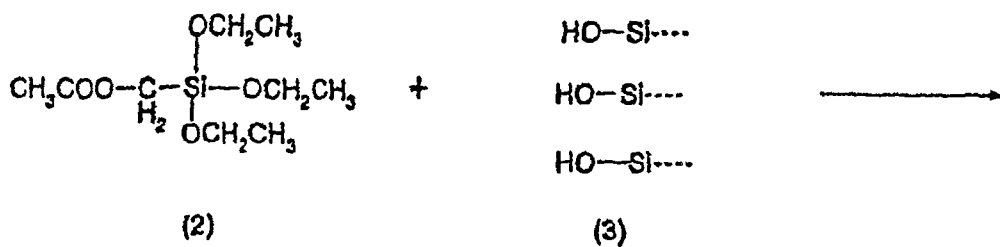


图 17

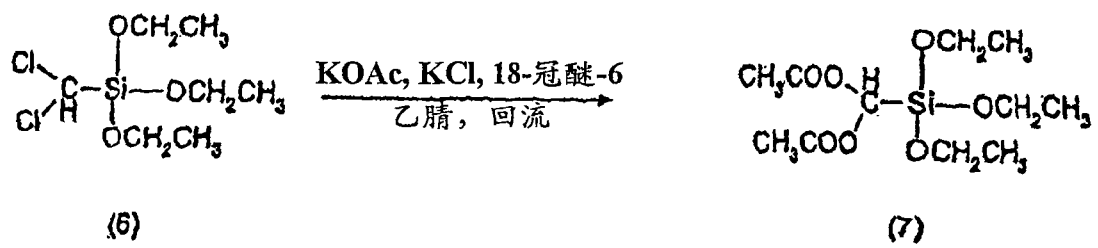


图 18

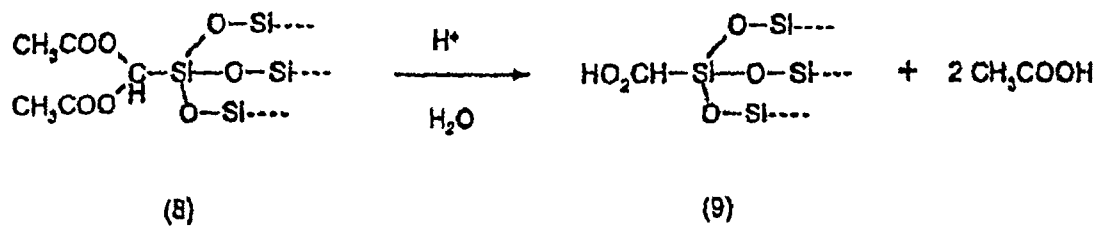
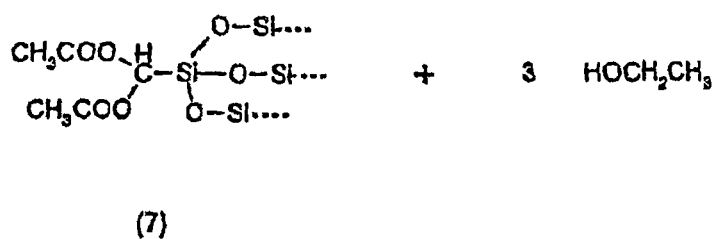
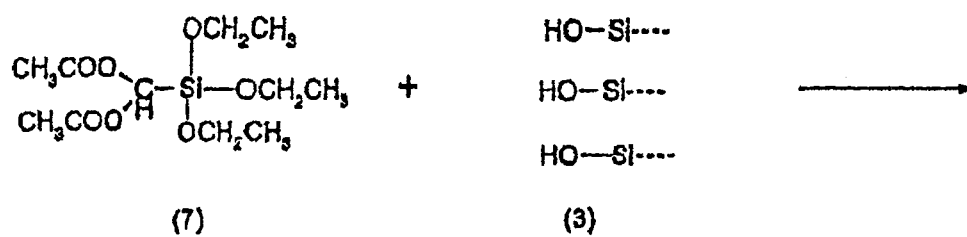


图 19

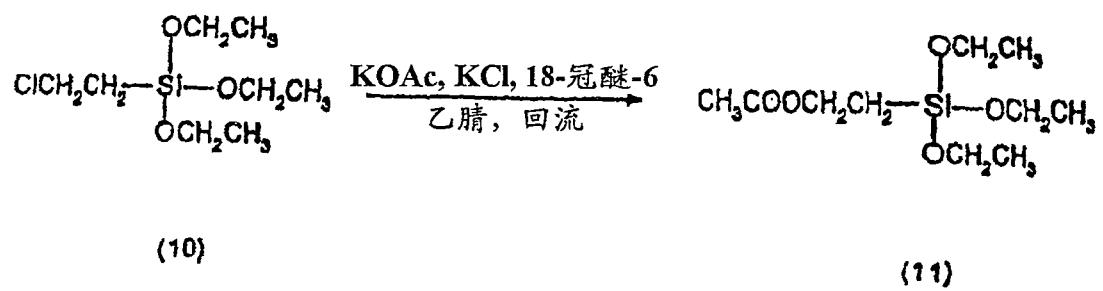


图 20

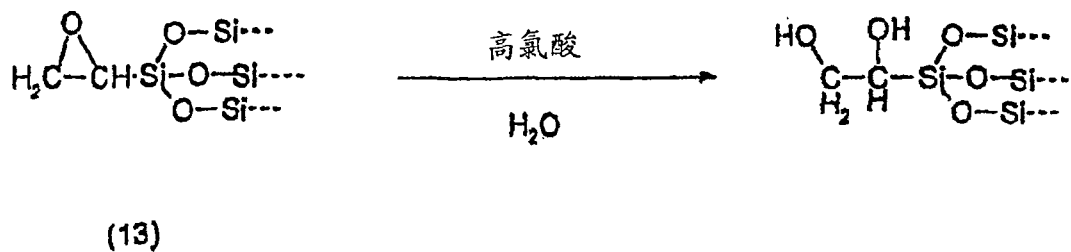
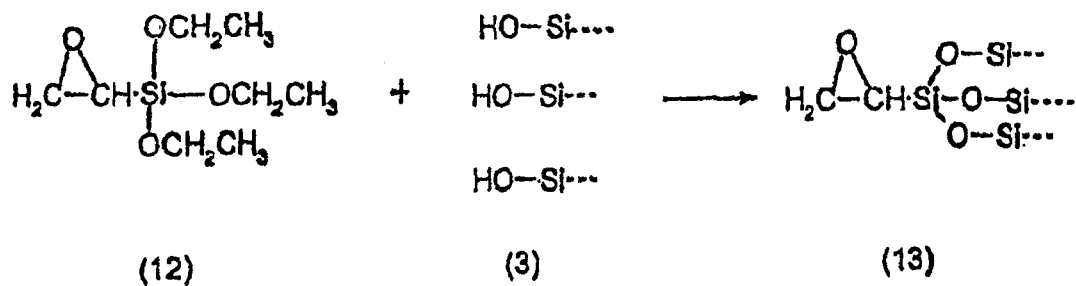


图 21

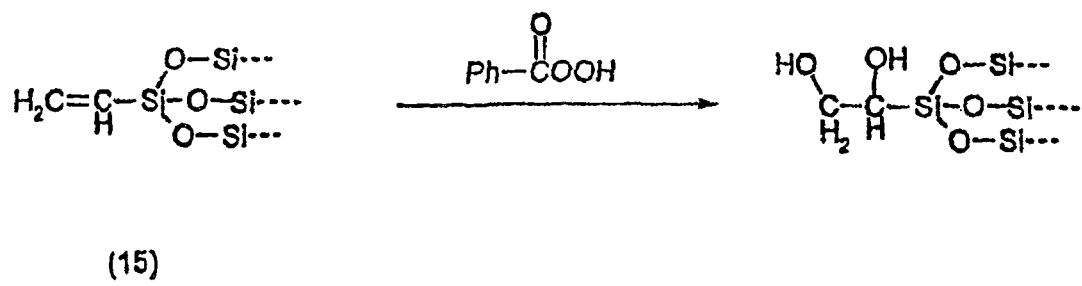


图 22

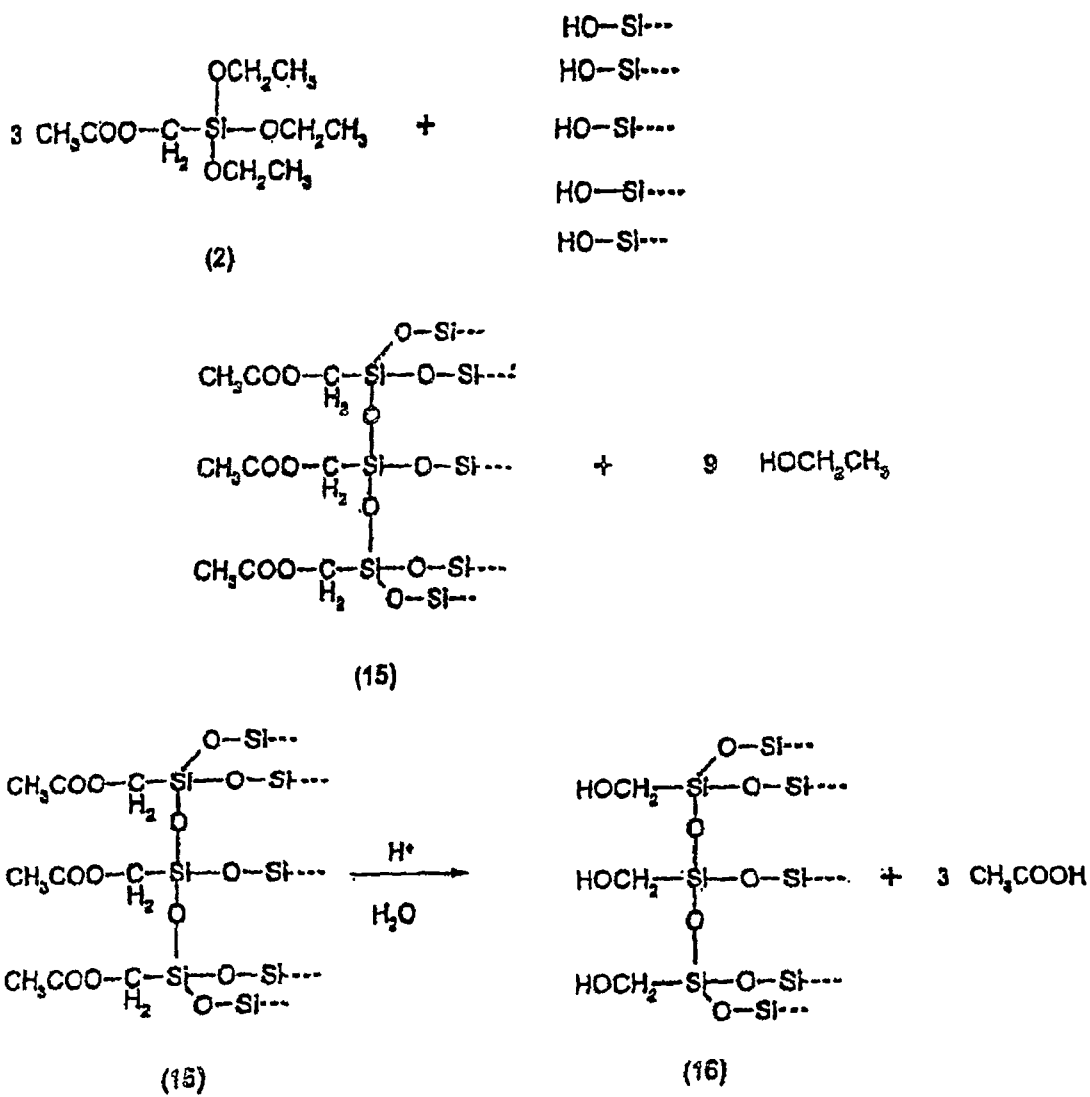


图 23

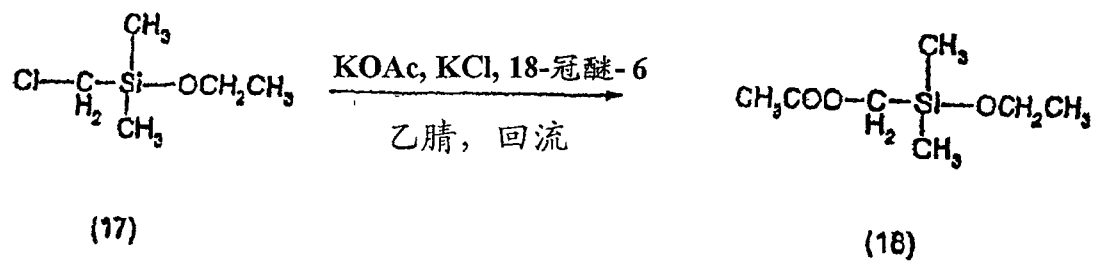
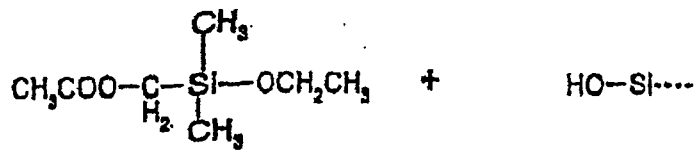
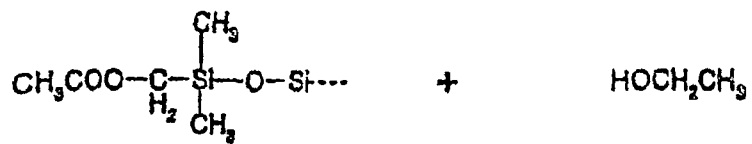


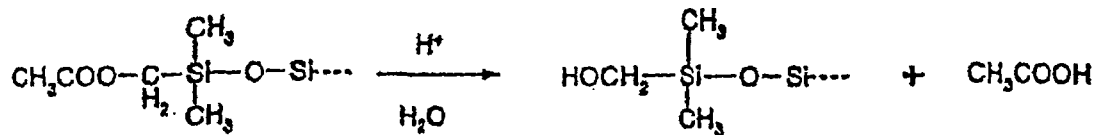
图 24



(18)



(19)



(19)

(20)

图 25