



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104168998 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201280070878. 1 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2012. 02. 28 *B01J 20/26* (2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *C08F 8/00* (2006. 01)
2014. 08. 28 *C08J 3/24* (2006. 01)
(86) PCT国际申请的申请数据 *B01D 15/38* (2006. 01)
PCT/EP2012/053332 2012. 02. 28 *B82Y 40/00* (2006. 01)
(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/127433 EN 2013. 09. 06
(71) 申请人 米普萨卢斯公司
地址 丹麦维路姆
(72) 发明人 克劳斯·格利高里斯
伊恩·艾伦·尼科尔斯
尼古拉斯·奥托·克罗赫
(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
代理人 杨洲 郑霞

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

通过交联制备分子印迹聚合物

(57) 摘要

本发明提供一种用于制备不溶的分子印迹聚合物 (MIP) 的改进的方法, 该方法包括 :a) 提供 1) 基本上全部结合模板试剂且 2) 具有能够在使用填充床色谱法的色谱步骤中使它们分离的尺寸的可溶的或部分可溶的 MIP, b) 交联在步骤 a 中提供的结合模板试剂的可溶的 MIP, 以便获得不溶的结合模板试剂的 MIP, 并且 c) 可选择地分离、浓缩或纯化在步骤 b 中通过所述交联获得的所述 MIP。在令人关注的实施方案中, 步骤 a 包括亲和纯化过程, 该过程确保步骤 a 中提供的 MIP 确实全部是模板的结合剂。

1. 一种用于制备不溶的分子印迹聚合物 (MIP) 的方法,所述方法包括:
 - a. 提供可溶的或部分可溶的 MIP,所述可溶的或部分可溶的 MIP 1) 基本上全部结合模板试剂且 2) 具有能够在使用填充床色谱法的色谱步骤中使它们分离的尺寸,
 - b. 交联在步骤 a 中提供的结合模板试剂的可溶的 MIP,以便获得不溶的结合模板试剂的 MIP,并且
 - c. 可选择地分离、浓缩或纯化在步骤 b 中通过所述交联获得的所述 MIP。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 a 中提供的所述可溶的或部分可溶的 MIP 的尺寸使得它们将被过滤穿过具有 900nm 截留量的膜过滤器,优选具有 450nm 截留量的膜过滤器。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述可溶的或部分可溶的 MIP 通过由包含与模板试剂混合的至少一种可聚合的试剂的组合物制备结合模板试剂的可溶的或部分可溶的 MIP 来提供。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中步骤 a 中的所述可溶的或部分可溶的 MIP 由选自以下的方法制备:1) 通过聚合成较大的颗粒尺寸随后微粉化的 MIP 制备,2) 通过缩聚的 MIP 制备和 3) 通过原位聚合的 MIP 制备。
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其中所述结合模板试剂的 MIP 基本上全部结合相同的模板试剂。
6. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其中所述结合模板试剂的 MIP 结合至少两种不同的模板试剂。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤 a 中用来制备所述可溶的或部分可溶的 MIP 的所述可聚合的试剂包括可选择地受保护的官能团,且其中所述官能团如果被保护,那么在步骤 a 中制备所述可溶的或部分可溶的 MIP 之后,但在步骤 b 之前被脱保护。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中在步骤 b 中的所述交联涉及所述可溶的或部分可溶的 MIP 的所述官能团。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤 b 中的所述交联不涉及所述 MIP 的模板试剂结合区域的交联。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中步骤 b 需要在所述 MIP 上的所述模板试剂结合区域在交联过程期间被模板试剂或其模拟物阻塞。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在供应所述可溶的或不溶的 MIP 之后,步骤 a 需要至少一个亲和纯化步骤,每一步骤使用模板试剂或靶试剂或其模拟物作为亲和纯化试剂,以便富集对所述模板试剂、靶试剂或其模拟物具有亲和力的可溶的 MIP。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述亲和纯化步骤包括至少两个后续轮次的亲和纯化,其中用于每个轮次的所述亲和纯化试剂通过未用于所述至少两个轮次的亲和纯化中的任何其他轮次的官能团被固定于色谱基质。
13. 根据权利要求 11 或 12 所述的方法,其中所述亲和纯化步骤使用填充床色谱基质。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤 b 中的所述交联在模具中或在支架的存在下进行,以便将获得的所述 MIP 铸造成期望的形状。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述 MIP 被铸造成海绵、网、纤维材料、过滤器或

纤维的形状。

16. 一种分子印迹聚合物,其是通过根据权利要求 1-15 中任一项所述的方法可获得的。

17. 一种组合物,包含根据权利要求 16 的分子印迹聚合物,优选地由根据权利要求 16 的分子印迹聚合物组成。

通过交联制备分子印迹聚合物

发明领域

[0001] 本发明涉及具有高的结合能力和特异性的分子印迹聚合物 (MIP) 的制备。特别地,本发明的方法提供一种制备不溶的(即:高分子量)MIP 的组合物的方法,该 MIP 全部是特定靶试剂的结合剂。本发明还涉及制备由不溶的 MIP 组成的物品的方法,其中所述物品能够具有几乎任何期望的形状和结构。

[0002] 发明背景

[0003] 合成聚合物的分子印迹是一种其中能够聚合的官能化的和交联的试剂(通常为单体)在担当分子模板的靶分子的存在下共聚的方法。在聚合前,官能化单体通过非共价相互作用与模板形成络合物或者共价结合形成模板的可聚合衍生物。在聚合后,单体的官能团通过高度交联的聚合结构保持在合适位置。随后通过溶剂萃取和/或化学分裂除去模板露出大小和形状与靶分子互补的结合位点。以这种方式,分子记忆被引入该聚合物中(现称为“分子印迹聚合物”或“MIP”),现该聚合物能够以非常高度的特异性重新结合靶。

[0004] 最初,MIP 在 HPLC 中用作固定相,显著地用于手性拆分。随后,它们的使用被扩展到其他分析技术,诸如薄层色谱法、毛细管电泳、固相萃取以及免疫测定型结合实验。该结合位点通常具有接近那些抗体-抗原系统的亲和性和选择性。这些模拟物显示了优于用于传感器技术的抗体的一些明显的优势。由于他们的高度交联性质,MIP 本质上是稳定的且坚固的,便于它们应用在极端环境中,诸如在酸、碱或金属离子的存在下,在有机溶剂中或高温和高压下。而且,MIP 生产相对便宜且能够长时间在室温下以干燥状态存储。

[0005] 因此,原则上所有的 MIP 以下面的方式制备:混合单体(或可聚合的试剂)和靶(或模板)分子,进行自组装,添加交叉结合剂且能够开始聚合。在聚合后,聚合物通常(但不是总是,参见下面)被分解成小的片段且靶分子被萃取。如果 MIP 被放入到靶分子的溶液中,它们将与 MIP 重新结合(还参见:Yu Cong;Leif Schweitz 和 Ioana Wärmarmark-Surugiu)。

[0006] MIP 的历史

[0007] MIP 制备的第一实例中的一个是在早在 1949 年的时候(Dickey)描述的,他使用一种用于染料选择识别的二氧化硅(水玻璃)。很久以后,描述了建立网络的其他种类的自组织系统,其中特定地结合靶/分析物是可能的(Ramström 等人,Schweitz 等人,以及 Vlatakis 等人)。

[0008] 单体和聚合的选择

[0009] 在 20 世纪 70 年代和 80 年代(参见 1986 年的 Shea、1990 年的 Shea 以及 1987 年的 Wulff)描述了将模板/靶分子直接与用于建立支架的聚合物共价结合的概念。该权利要求是直接结合会导致结合位点更均匀分布遍布聚合物。然而,同时这留下了在聚合后除去模板的问题。为了除去模板,聚合物的微粉化和化学键断裂两者是需要的。

[0010] 制备 MIP 而不将模板束缚于在聚合期间使用的单体中的一个通常产生良好的 MIP,但是在文献中的经验是许多 MIP 粒子将包含趋向以分子的较少特异性部分结合模板/分析物的结合位点且因此未给予所得的 MIP 期望的特异性。对于用于分析目的特别地如果

靶是分离分子的立体异构体的形式的 MIP 这是非常重要的,然而在主要目的是加强所得的 MIP 的全部结合能力的情况下,这是不太重要的。

[0011] 在某些分析情况下,已被证明,模板必须具有不同的身份,即而不是使用实际的模板,产生的 MIP 为了不污染待分析的样品被建立覆盖模板的“模拟物”。明确地,能够确保在分析物和 MIP 之间特异性结合的模板模拟物的识别可能构成艰巨的任务。

[0012] 制备 MIP 的完全不同的方法是通过聚合混合物,同时单体、交叉结合剂和模板(或模板模拟物)以微粒形式保持在乳状液中,因此直接将生成的 MIP 作为颗粒留下(Funke 等人)。以此方法制备的 MIP 颗粒的大小将取决于单体的浓度和搅拌速度(测定在乳状液中的液滴尺寸)以及类似的。(为了让粒径下降到 $1\ \mu\text{m}$,需要在超过 1000rpm 下搅拌溶液)。根据文献,这类方法的缺点是长的制备时间和低产率。

[0013] 通常,现有技术通常描述了制备可再生的 MIP 的难点,其中能力和特异性两者未受损害(因此低于期望的)。

[0014] 美国专利 4,111,863 描述了“一种非可膨胀的三维聚合物,其具有光学活性化合物的残基的成分,该残基是以化学方法从所述聚合物可除去的以在所述聚合物的物理结构中留下与光学活性化合物的所述残基的大小与形状相一致的空腔,以及在与光学活性化合物的所述残基的化学结构相一致的所述聚合物的空腔内的官能团的特定空间排列……”,该光学活性化合物作为随后 MIP 应该能够特意结合的模板。

[0015] 在美国专利 5,110,833 中的“一种生产合成酶或合成抗体的方法,包括在印迹分子周围的单体的定位、交联剂的添加、聚合为聚合物且随后印迹分子的除去,因此在聚合物中生成与所述印迹分子相一致的空穴”被要求以增加 MIP 对于模板分子的特异性。换言之,在 US 5,110,833 中要求的性能改进是基于在聚合之前使模板分子和单体单元之间的接触最佳化。

[0016] 在美国专利 6,881,804 中,在 MIP 中的多孔性的引入通过增加到达试图与模板相互作用的空腔的通道被描述作为增加 MIP 性能的手段。

[0017] 在美国专利 6,638,498 中特别选定的单体被要求用于胆汁酸特异性 MIP 的产生,并且在 US 2004/0157209 A1 中,建议在聚合之前使模板分子固定在支撑物材料上。在 MIP 制备之前或期间发生的所有过程的步骤的改善 MIP 性能的所有建议涉及单体的化学特性或 MIP 的结构。

[0018] US 5,994,110 公开了 MIP,该 MIP 原位产生以形成小的聚合物/低聚物,该聚合物/低聚物包括与模板分子互补的结构。该聚合物或低聚物在生物分子周围形成涂层或图像,涂层或图像从生物分子中除去,且例如可以作为治疗或预防试剂即药物使用的不连续的实体由生物分子衍生。由于这种类型的生产方法,US 5,994,110 没有使用作为在传统的 MIP 颗粒制备中的微粉化步骤。US 5,994,110 建议将 MIP 与非结合剂分离,但是建议的方法全部依赖 MIP 的极小的尺寸,该 MIP 例如通过色谱法但仅当 MIP 是可溶的实体时产生的。例如特别指出,根据 US 5,994,110 的治疗活性的 MIP 是显示 1-200kDa 范围的下限的分子量的那些 MIP。进一步,US 5,994,110 未公开用于将悬浮的不溶的 MIP 分成一方面“好的粘结剂”和另一方面“不太有效的或非结合剂”的任何方法。

[0019] US 2009/0194481 涉及一种可通过使之前制备的 MIP 凝聚获得的复合材料。

[0020] 本受让人之前提交了 WO 2007/095949,其涉及具有对模板/靶的改进的亲合力

的 MIP 组合物的制备。简言之,该方法需使不溶的 MIP 受到通过包括如上描述的微粉化的传统方法而制备,然后随后使它们受到适合于亲和纯化的不溶材料的亲和纯化程序;在 WO 2007/095949 中讨论的有用的技术是膨胀床吸附和胶结。因为发现现有技术的不溶的 MIP 组合物包括仅微弱地或根本不与预定靶试剂结合的 MIP 的大片段,所以该技术提供 MIP 组合物,其中组合物中所有的或基本上所有的 MIP 结合相同的靶试剂。

[0021] 本受让人之前还提交了 WO 2011/033021,其涉及可用于诸如 MIP 的多特异性受体的纯化方案—该方法使用至少 2 个连续轮次(round)的亲和纯化,其中亲和纯化的捕获剂在至少两个轮次的每次中通过不同官能团结合至支撑物。当结合位点在纯化的第一个轮次期间可以从与受体的相互作用中“隐藏”,而被暴露用于与在后续轮次中的受体结合时,该技术确保仅有结合在捕获剂上的所有相关的结合位点的多特异性受体通过整个纯化过程。为了允许以诸如苯丙氨酸的氨基酸为靶的 MIP 的制备,在 WO2011/033021 中的技术已特别地设计。

[0022] 发明目的

[0023] 本发明的实施方案的目的提供用于供应不溶的 MIP,即能够借助于过滤和/或离心分离从水溶液中分离出的 MIP 的新方法。本发明的实施方案的进一步目的提供用于制备由这样的不溶的 MIP 组成的物品/设备的方法,还提供这样的物品/设备。

[0024] 发明概述

[0025] 如上文详述的,用于制备不溶的 MIP 的传统方法包括在模板试剂的存在下制备高度交联的聚合物结构,然后是不同程度的交联结构的微粉化,接着除去模板以便将结合模板的空穴暴露于周围的溶剂。为了获得具有高结合能力和特异性的不溶的 MIP 的制备,这样的组合物能够经历亲和纯化,诸如在 WO 2007/095949 中公开的膨胀床吸附或胶结。

[0026] 本发明者现在已发现,此技术可行的替代方案是制备可溶的 MIP,随后亲和纯化该可溶的 MIP,且最后借助于交联反应偶联可溶的 MIP 以便产生如本文描述的不溶的 MIP。

[0027] 已知,纳米级颗粒(大约 50nm)在体内可用于消除在血流中的毒素(Hoshino 等人(2008))。还已知,因为纳米级颗粒在蛋白质大小的范围且表现为它们好像是可溶的,所以纳米级颗粒能够在以填充床模式设置的常规的色谱法通过亲和色谱法被分离或纯化(Piletsky 等人(2006),Guerreiro 等人(2009))。

[0028] 如果这样的纳米级 MIP 先通过亲和色谱法纯化且随后交联以形成使它们不溶的显著较大的尺寸,例如 0.5–50 μm 的颗粒,它们将可用于与通过更传统的方法制备的不溶的 MIP 相同的用途。

[0029] 因此,本发明在其最广泛的方面涉及一种用于制备不溶的分子印迹聚合物(MIP)的方法,该方法包括:

[0030] a. 提供可溶的或部分可溶的 MIP,所述可溶的或部分可溶的 MIP 1)基本上全部结合模板试剂且 2)具有能够在使用填充床色谱法的色谱步骤中使它们分离,

[0031] b. 交联在步骤 a 中提供的结合模板试剂的可溶的 MIP,以便获得不溶的 MIP,并且

[0032] 可选择地分离、浓缩或纯化在步骤 b 中获得的 MIP。

[0033] 通过该技术取得一些优势:

[0034] 首先,在步骤 a 中利用任何制备方案制备不溶的 MIP 是可能的,该制备方案包括针对制备可溶的 MIP 的在背景部分描述的那些方案。所以 MIP 能够以所需要的大小通过沉淀

聚合或原位杂化来合成（参见下文）且减小尺寸的步骤能够被简化或避免。

[0035] 其次，在步骤 a 之后获得的材料呈使得它适合于通过使用填充床色谱法的色谱法进行纯化的形式，该填充床色谱法可能比胶结或膨胀床色谱法更方便，这是由于大范围的不同色谱介质和不同柱形式的可用性且还因为常规的填充床色谱法是较便宜的，特别是在大规模中应用时。

[0036] 同样地，不管是否在步骤 a 和 b 之间引入纯化步骤，在步骤 a 中获得可溶的或部分可溶的 MIP 的事实使得可以在能够将 MIP 衍生产物塑造或铸造成任何期望的形状或形式的情况下在步骤 b 中完成随后的交联。

[0037] 颗粒越小，在颗粒间的结合能力的变化越大。即极小的颗粒能够被分类到比较大的颗粒甚至更高的能力。在极端条件下，如果 MIP 借助于使用微粉化的传统 MIP 制备而产生，于是将尺寸减小到 MIP 具有一个或零个结合位点的程度，则在 MIP 样品中的不同种类之间具有最大的差别。

[0038] 而且，使用填充床的常规的色谱法比膨胀床色谱法更便宜，特别是在大规模中使用时。

[0039] 如果该方法需要在纯化步骤之前减小 MIP 的尺寸，在减小尺寸步骤中的产率将远高于当将尺寸减小到例如 1-10 μm 时。

[0040] 由于极小的（例如，纳米级）颗粒因增加了至表面的通道而能够通过简单的渗析洗涤，因而除去模板的洗涤步骤将更容易完成。

[0041] 当 MIP 被亲和纯化较大的不溶颗粒，例如 $>1 \mu\text{m}$ 时，通常假设可从外表面到达的每聚合物的结合位点的数量和性质代表了其余的聚合物颗粒。当 MIP 颗粒变得越小时，这种假设变得越接近事实。

[0042] US 2009/0194481 提供一种与本方法具有一些相似的方法。然而 US2009/0194481 未考虑进入到附聚过程（例如交联过程）的原料 MIP 的质量，所以依据通过在 US 2009/0194481 中的过程获得的复合材料的结合亲和力的质量至多与通过 MIP 原始材料显示的结合亲和力一样。本发明提供一种改进的原料，且如下详细描述还解决了保持原料 MIP 的亲和力的问题。

[0043] 发明的详细公开内容

[0044] 定义

[0045] “分子印迹聚合物” (MIP) 是包括与一种或多种模板试剂至少部分相对应的空穴（或空腔）的聚合物，该模板试剂在聚合前并入包括交联单体的单体基质中。聚合后所得的聚合物包括形状与模板试剂对应的许多空穴。通常 MIP 被分成小颗粒，从而促进模板的除去且使部分空穴是敞开的以便与模板试剂相似或相同的靶分子相互作用。

[0046] “未加工的 MIP”是在作为传统的 MIP 制备过程的一部分的交联后制备的 MIP，但其还未受到任何微粉化且因此还并入模板试剂或至少碎片来源于 MIP 结构中的空穴中的模板试剂。

[0047] 在本上下文中的“交联”表示导致形成网状结构的聚合物的多方向链延伸或支化的过程。交联可以通过官能度大于 2 的单体的聚合（通过缩合模式）或者通过由例如照射或各种化学反应完成的预聚物分子之间的共价键合来产生。交联使得聚合物对热、光以及其他物理作用更有抵抗力，给予聚合物高度尺寸稳定性、机械强度以及耐化学和溶剂性。交

联不应该与聚合物的“接枝”混淆，聚合物的“接枝”是一种用于制备分枝大分子的技术，其中分枝通常是来自聚合物主链的不同类型且分枝仅通过一个单一的官能度结合。与交联相反，接枝即在接枝聚合物中不会导致聚合物固定网络的形成。

[0048] “微粉化”表示将可能仍包含模板的 MIP 分离成为更小颗粒的过程。可以使用适合于此目的的任何方法。

[0049] “靶分子”或“靶试剂”是本上下文中 MIP 能够特异性结合的任何分子 / 试剂，且通常是预期当为了一个目的而最终使用 MIP 时纯化的 MIP 应该结合的分子 / 试剂。当讨论 MIP 与这样的“试剂”结合时，术语“靶分子”与术语“试剂”在本上下文中可交换地使用，但应当注意用于组成本发明方法的一部分的纯化步骤的“试剂”不一定必须与靶分子相同 - 而是，试剂完全是可用于本文讨论的纯化步骤的靶分子的模拟物或衍生物。相比于靶分子，试剂可以例如构成较大分子的一部分 - 例如，如果预期的靶分子是氨基酸，构成蛋白质或肽的一部分的相应的氨基酸残基还可以用作纯化步骤中的试剂。例如，本发明的方法可以包括建立以富集结合氨基酸残基的 MIP 的纯化过程，其中在纯化中的一个步骤使用氨基酸在 C- 末端的肽，且其中另一个步骤使用肽的在 N- 末端的氨基酸 - 在这种情况下，试剂是用于纯化步骤的物质，然而“靶分子”被认为是通过富集的 MIP 有效结合的物质。靶试剂还可以由许多分子构成 - 这是相关的，如果靶试剂是分子配合物，例如可能是这种情况，如果靶试剂是受体和配体之间的配合物（在其最广泛的含义中，因此也包括抗体和抗原之间的配合物）- 应已知，受体和配体之间的一些配合物可以获得独特的三维结构，使得如果使用 MIP 配合物的存在能够区别于未结合的配体或受体的存在，即特异性识别配合物。

[0050] 同样地，“模板分子”或“靶试剂”通常是与靶分子 / 试剂相同，但也可以是它们的模拟物或衍生物（即，具有至少部分相同的与靶分子相匹配的三维结构和轮廓的分子 - 模拟物可以例如由靶分子的片段构成）。模板分子 / 试剂作为随后将能够结合靶分子的 MIP 结构中的空腔的“生产者”。

[0051] “亲和纯化”表示用于纯化使用在物质和结合伙伴之间的特异性结合的物质的一种方法。很多这样的方法利用捕获剂结合到捕获物质的固体支撑物（诸如色谱基质）。在本领域中已知的典型实例是使用抗体作为捕获剂的亲和纯化，该捕获剂结合到用于纯化结合抗体的抗原的色谱珠。应理解，根据本发明应用的纯化方法是能够捕获本文讨论的悬浮的可溶的 MIP 的那些方法。因此，典型的亲和纯化方法可以是在例如 HPLC（高效液相色谱法）或 FPLC（快速蛋白液相色谱）或本领域技术人员已知的其他这样的填充床技术中使用填充亲和柱的色谱法。

[0052] “固相”是在本上下文中可以借助于共价或非共价结合用来固定捕获剂的任何物质。因此，在色谱基质材料的制备中常规使用的任何材料（塑料聚合物，糖类，金属，玻璃，二氧化硅，橡胶等）可以用作固相。固相材料可以包含合适的官能团，该官能团允许该捕获剂结合到所讨论的材料。这样的衍生物材料是在蛋白质和其他大分子色谱纯化领域中技术人员已知的。此外，固相可以具有允许捕获相对大的和不溶的颗粒，诸如 MIP（当与如蛋白质的单个生物分子相比较时）的任何物理形式。因此，固相可以是以纤维（优选地空心的）、色谱基质（优选地适于 EBA 的基质）、珠（优选地可以通过电磁方法分离的那些）的形式，或任何其它合适的形式，参见下文。

[0053] 表达“可溶的 MIP”指的是足够小尺寸的 MIP，以便允许借助于利用色谱基质材料

的填充床的传统色谱方法从液体媒介物中分离它们。通常,可溶的MIP将具有允许它通过微孔材料,诸如带有一个450nm的截留量的膜过滤器而被过滤的尺寸和形状。如下文详述的,尺寸较小的可溶的MIP也可考虑作为用于本发明的原料,且这样的可溶的MIP可以通过带有例如小至400nm、350nm、300nm、250nm、200nm、150nm、100nm、50nm以及10nm的截留量的膜过滤器而被过滤。

[0054] 表达“不溶的MIP”指的是实际上不能借助于使用色谱基质材料的填充床的传统的色谱法来纯化的MIP。通常不溶的MIP将通过微孔材料,诸如带有等于或小于900nm的截留量的膜过滤器保留。这些MIP特别适合作为用于在胃肠道中使用的药物,因为它们的不溶性限制或阻止从胃肠道进入身体(例如,进入循环)的它们的通道。换言之,当口服给药时,使用的不溶的MIP将基本上限于胃肠道保留,直到它们在排泄物中被处理为止。

[0055] 表达“部分可溶的MIP”表示通过微孔材料诸如带有450nm的截留量的膜过滤器被保留,但通过微孔材料诸如带有900nm截留量的膜过滤器被过滤的MIP。根据这样的部分可溶的MIP的亲水性,它们在填充床色谱中的行为将变化。优选的部分可溶的MIP将通过具有800nm截留量的膜被过滤,其中更优选的部分可溶的MIP将分别通过具有700、600以及500nm截留量的膜被过滤。

[0056] 本发明的具体实施方式

[0057] 为提供步骤a中的可溶的或部分可溶的MIP以上可以根据本发明通过本领域中任何已知的方法来实现,且原料可溶的或部分可溶的MIP可以例如从商业来源获得。步骤a的本质特征是提供的MIP足够小,以便能够随后通过使用带有色谱基质材料的填充床的常规亲和色谱法的步骤纯化它们,然而获得或生成可溶的或部分可溶的MIP的精确方法是次要重要的。

[0058] 将理解,本发明将下述内容包括在其范围内:可溶的或部分可溶的MIP通过由包含与模板试剂混合的至少一种可聚合的试剂的组合物制备结合模板试剂的可溶的或部分可溶的MIP来提供-即在本发明的某些实施方案中,可溶的或部分可溶的MIP的供应是通过本身已知的制备步骤来获得。

[0059] 例如,在WO 2007/095949中通常公开的方法是有用的,其中MIP通过常规的方法制备且随后微粒化至期望的小尺寸。通过使用该方法,制备的MIP可以使尺寸减小到期望的任何小尺寸且例如通过过滤与较大的残余的MIP分离。随后,获得的极小的MIP可以受到常规的亲和纯化方案,诸如使用传统的填充床柱的亲和色谱法。在洗脱MIP后,所得的MIP片段将几乎完全由全部结合了用于MIP制备初始阶段的模板试剂的可溶的或部分可溶的MIP组成。

[0060] 此外,可以通过使用用于制备可溶的MIP的上述讨论的任一种方法来制备具有期望的小尺寸的MIP。如实例,在本发明的方法中的步骤a可以需要通过沉淀缩合(Hoshino等人(2008))或通过原位聚合(如在US5,994,110中公开的)制备MIP。

[0061] 在优选的实施方案中,在步骤a中制备的可溶的或部分可溶的MIP的尺寸使得它们将被过滤穿过具有900nm截留量的膜过滤器来过滤,因为这通常确保MIP将能够使用亲和色谱法在填充床柱中被分离。然而,较小尺寸的颗粒能够获得,其中颗粒的最小尺寸通常由用于MIP的配体中的预期结合位点的尺寸制约:预期结合位点越小,MIP越小,所以本发明考虑部分可溶的或可溶的MIP的使用(参见上文),该部分可溶的或可溶的MIP将通

过具有选自 800nm、700nm、600nm、500nm、450nm、400nm、350nm、300nm、250nm、200nm、150nm、100nm、50nm 以及 10nm 的截留量的膜过滤器来过滤。

[0062] 在本发明方法的一些实施方案中,结合模板试剂的 MIP 基本上全部结合相同的模板试剂-即,在此实施方案中,在步骤 a 中提供的可溶的或部分可溶的 MIP 在相同的模板分子/试剂的存在下在一个或多个聚合过程中产生。

[0063] 可选择地,结合模板试剂的 MIP 结合至少两种不同的模板试剂-即,在此实施方案中,在步骤 a 中提供的可溶的或部分可溶的 MIP 在包括许多模板分子/试剂的过程中产生或在步骤 a 中可溶的或部分可溶的 MIP 由 MIP 的混合物组成,该 MIP 混合物针对许多不同的模板分子/试剂而产生。

[0064] 如果在步骤 a 中被用来制备可溶的或部分可溶的 MIP 的可聚合的试剂包括可选择地受保护的官能团,其中所述官能团如果被保护,那么在步骤 a 中制备可溶的或部分可溶的 MIP 之后但在步骤 b 之前被脱保护,这是有利的。这种方法促进随后步骤 b 中的交联,该交联有利地使可溶的或部分可溶的 MIP 的官能团参与。

[0065] 在步骤 a 后的可选择的纯化

[0066] 为了确保可溶的或部分可溶的 MIP 全部结合模板试剂,本文描述的所有的实施方案如果需要可以包括亲和纯化步骤-这是相关的,例如如果在步骤 a 中的可溶的或部分可溶的 MIP 是从商业来源获得的且并不都是模板/靶的结合剂,或者如果用于制备它们的方法本身并不能确保所有的 MIP 结合模板。所以,在此实施方案中,在供应可溶的或部分可溶的 MIP 后,步骤 a 需要使用模板试剂或靶试剂或它们的模拟物作为亲和纯化试剂的至少一个亲和纯化步骤,以富集对所述模板、靶或它们的模拟物具有亲和力的可溶的 MIP。

[0067] 纯化步骤的目的是在使用基本上专门由结合模板/靶的 MIP 构成的原料的阶段中进行交联,以避免包含不结合或微弱结合的 MIP。

[0068] 在上述的在步骤 a 中提供的可溶的或部分可溶的 MIP 结合多个模板试剂的实施方案中,亲和纯化可以由对应于结合模板/靶试剂的所有相关的 MIP 的捕获剂被用作一步纯化中的捕获剂的步骤组成,或可选择地亲和纯化以一系列步骤进行(在每个步骤中使用一种捕获剂),其中不包含在前一捕获步骤中捕获的 MIP 的洗脱部分经历随后的步骤以捕获结合其他捕获剂的那些 MIP-这些一系列步骤之后,汇合在每一个纯化步骤中捕获的 MIP。这些方法最终均提供所有结合靶的 MIP 的混合物,且其中混合物结合一种以上的靶。

[0069] 确保仅有结合模板的 MIP 被作为步骤 b 中的起始点的更简单方法是提供 MIP 的多个集合,其中每个 MIP 集合由结合相同模板/靶的 MIP 组成-即单一的靶 MIP 以常规的方法获得/制备且可选择地富集,且随后单一靶 MIP 在实施步骤 b 之前汇合。因此,在此实施方案中,进行了可溶的和部分可溶的 MIP 的一系列并行供应,该 MIP 被合并,随后合并的 MIP 在步骤 b 中交联。

[0070] 在特别的实施方案中,上文详述的任一亲和纯化方法可以包括至少两个后续轮次的亲和纯化,其中在每个轮次中使用的亲和纯化试剂通过未用于至少两个轮次的亲和纯化中的任何其他轮次的官能团被固定于色谱基质。

[0071] 此特别的实施方案因此使用在 WO 2011/033021 中公开的技术,该技术具有下述结果:富集的可溶的或部分可溶的 MIP 的每一个能够结合在其各自的模板/靶上的一个以上不连续的有效结合位点。因此本发明涉及一种用于制备结合试剂的富集的可溶的或部分

可溶的 MIP 的组合物的方法在步骤 a 中的用途,其中所述 MIP 各自特异性地结合在所述试剂上的至少两个不连续的位点,该方法包括

[0072] i) 提供包含所述 MIP 的样品,

[0073] ii) 使所述样品经历亲和色谱法的第一步骤,其中所述试剂被用作亲和纯化试剂,且其中所述试剂通过结合至所述至少两个不连续的位点中的单个位点被固定于固相或部分固相,

[0074] iii) 再生结合于试剂的受体,

[0075] iv) 使在前一步骤中再生的 MIP 经历亲和色谱法的至少一个进一步的步骤,其中所述试剂用作亲和纯化试剂,且其中所述试剂通过结合于所述至少两个不连续的位点中的另一个被固定于固相或部分固相,且再生结合于试剂的 MIP,

[0076] 其中,在每个所述亲和色谱法的至少一个进一步的步骤中,所述至少两个不连续的位点中的所述另一个不同于之前在步骤 b 和 d 中用于将试剂固定于固相或部分固相的所述至少两个不连续的位点中的任一个。

[0077] 关于此实施方案的细节被公开于 WO 2011/033021 中,在此通过引用将其全部并入本文。

[0078] 如本文讨论的,特别优选地,亲和纯化步骤使用填充床色谱基质。然而,EBA 被用来纯化来自包含可溶的、部分可溶的和不可溶的颗粒的粗样品的可溶的或部分可溶的 MIP。

[0079] 通常,模板试剂和亲和纯化试剂的选择取决于所制备的不可溶的 MIP 的确切的预期最终用途 - 用于在分析应用中使用的 MIP,所选择的任一配体可以构成模板试剂或它的模拟物。

[0080] 特别优选的模板分子 / 试剂和靶分子 / 试剂公开于 WO 2011/033021 和 WO 2007/095949 中,且在这两篇参考文献中就模板和靶分子以及它们的模拟物而言的所有公开内容加以必要的变更应用于本发明。靶分子 / 试剂或模板的实例为:

[0081] a. 具有式 $H_3N^+-CH(R)-COO^-$ 的化学物质,诸如氨基酸,或试剂可以是具有至多 12 个氨基酸残基的肽,诸如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 个氨基酸。氨基酸通常选自苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苏氨酸、缬氨酸和赖氨酸。此外,肽通常是在其序列内包括选自由苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苏氨酸、缬氨酸和赖氨酸组成的组的至少一种氨基酸的肽。在特别地实施方案中,这些氨基酸表现为肽中的 N- 末端和 / 或 C- 末端氨基酸。在实施方案中,试剂为肽,其通常为二肽、三肽、四肽或五肽。

[0082] b. 碳水化合物,诸如具有最多 10 个单糖单元的支链或直链的低聚糖。在某些实施方案中,碳水化合物因此选自单糖、二糖和三糖。特别令人关注的碳水化合物是 D- 半乳糖和乳糖。

[0083] c. 脂肪酸或脂类;如果试剂是脂类,其通常选自由胆固醇、甘油三酯和胆汁酸或它们的盐组成的组。

[0084] d. 低聚核苷酸或低聚核苷酸衍生物,诸如选自由 RNA 低聚核苷酸、DNA 低聚核苷酸、LNA 低聚核苷酸、PNA 低聚核苷酸以及混合的低聚核苷酸组成的组的低聚核苷酸或低聚核苷酸衍生物。在某些实施方案中,低聚核苷酸或低聚核苷酸衍生物是混合的低聚核苷酸,其包含至少一种核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单元和至少一种 LNA 或 PNA 核苷酸单元。

[0085] e. 是靶模板 a-d 的组的任何分子（即，包括来自组 a-d 中的至少两种的组分的分子）；实例是脂肽类或糖肽类。

[0086] 步骤 b 中的交联

[0087] 不同的策略可被设想用于可溶的或部分可溶的 MIP 的交联。

[0088] 通常，公开于 US 2009/0194481 中的用于附聚 MIP 的方法全部可用于本发明的步骤 b 中。US 2009/0194481 因此通过引用被合并，特别地在其中公开内容的范围内涉及用于将小的 MIP 结合成更大结构的交联。

[0089] 在交联可以发生之前，官能团优选地在颗粒上是可用的。在聚合后，官能团能够被掺入到聚合物中或接枝在聚合物上（且如果该策略被使用，使尺寸减小）。官能团作为被保护的或未被保护的官能团的任一者能够被引入到聚合物中或接枝到聚合物。

[0090] 官能团可选自由 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NRH}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{N}^+\text{R}_3$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CHCH}_2$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 X （例如卤素和卤化物衍生物）和关于诸如酯、酰卤、酸酐、酰胺（伯和仲）、磺酰胺类和脒的活性衍生物组成的组。作为引入特别用于交联目的的官能团的替代方案，在可溶的或部分可溶的 MIP 产生之后，已被包括在作为官能化单体的 MIP 中的官能化单体或官能团的活性衍生物之一上的官能团可以被制备。一个实例是来自甲基丙烯酸 - 极经常用于 MIP 合成的官能化单体的 COOH 能够转变为活性的 N - 羟基琥珀酰亚胺酯，且随后包含两个或更多个氨基基团的化合物能够被用作交联剂。另一个实例是如果 β - 环糊精被用作 MIP 中的官能化单体：在那种情况下，在 β - 环糊精上的羟基能够被用作用于使用例如二乙烯砷作为交联剂的交联的操控物 (handle)。

[0091] 交联试剂被加入到可溶的或部分可溶的 MIP 溶液中。交联试剂能够是二价、三价或多价中的任一者，且应该具有能够与在可溶的或部分可溶的 MIP 颗粒中的官能团反应的官能团，并且诸如溶剂、 pH 、温度等的反应条件应该促进该反应。该反应应该持续直到获得所期望的 / 所要求的大小的交联颗粒为止。这可以通过参数控制，诸如可溶的 MIP 的浓度、交联试剂的浓度、MIP 和交联试剂之间的浓度比、反应淬灭物质的添加、温度的改变、反应混合物的稀释等。

[0092] 如果交联的颗粒在非系统性作用模式中被用于治疗性处理，获得的不溶的 MIP 的优选尺寸范围是 $0.5\text{--}50\ \mu\text{m}$ 以防止颗粒从胃肠道被吸收。

[0093] 可选择地，在步骤 b 中的交联如上描述的在模具中或支架的存在下进行，以使得获得的 MIP 铸造成期望的形状 - 在此实施方案中，获得的 MIP 的尺寸可以远大于 $50\ \mu\text{m}$ ，因为这样的交联聚合物可以具有甚至允许手动操控 MIP 结构的尺寸。例如 MIP 可以被铸造成海绵、网、纤维材料、过滤器、纤维的形状，这使 MIP 设备能够可用于大规模的操作中（例如，或污水净化）或使 MIP 设备能够呈功能化表面的形式（诸如微量滴定板或类似物）。

[0094] 在交联反应期间，优选地交联不涉及 MIP 的模板结合区域。例如步骤 b 可以需要在 MIP 上的模板结合区域在交联过程期间被模板分子 / 试剂或其模拟物阻塞，即配体特异性结合位点能够例如在交联发生时，通过具有存在于溶液中的模板或配体或它们的衍生物、模拟物或类似物而被保护。该方法将使在单独的可溶的 MIP 颗粒中的结合位点免受在配体随后（交联后）重新结合中的空间位阻。例如，如果不足量的配体被用于反应中作为避免交联的保护剂，这将是用于在交联完成后保存较好的结合位点的内在选择。

[0095] 步骤 c 中的可选择的分离

[0096] 本发明过程中的最后步骤需要可选择地纯化或分离所产生的不溶的 MIP。本领域已知的任何方法可以被使用,诸如例如离心分离、过滤、渗析等。如果所使用的交联方法无法确保所产生的所有 MIP 是靶 / 模板的有效结合剂,那么还可以使用如在 WO 2007/095949 中描述的那些亲和纯化方法 – 即, EBA 或胶结可以用于此步骤中。然而,由于包括当制备不溶的 MIP 时使结合位点或结合空穴免受步骤 b 中的交联过程的优势,本发明最优选的实施方案依靠诸如离心分离或过滤的更快速且简单的方法。

[0097] 根据本发明的制备的 MIP 的用途

[0098] 本发明还涉及用于治疗、改善或预防疾病的方法,该疾病选自自由苯丙酮尿症 (PKU, Fölling 氏疾病)、高苯丙氨酸血症 (HPA)、尿黑酸尿症 (黑尿症)、酪氨酸血症、高酪氨酸血症、重症肌无力、组氨酸血症、尿刊酸尿症、槭糖尿症 (MSUD)、异戊酸血症 (异戊酰辅酶 A 脱氢酶缺乏症)、高胱氨酸尿症、丙酸血症、甲基丙二酸血症、戊二酸尿症 1 型 (GA-1) 以及半乳糖血症组成的组,该方法包括给予需要它们的患者的胃肠道有效量的根据本发明制备的分子印迹聚合物 (MIP) 的组合物,且所述组合物能够结合所述疾病的症状诱发试剂且所述 MIP 按照本发明公开的制备 – 在此上下文中,参考 WO 2011/033021 中的公开内容,其中关于这些疾病和相关的症状诱发试剂提供了细节。有关此方面的是根据本发明制备的 MIP 的组合物用于在这样方法中使用。

[0099] 可选择地,疾病为高胆固醇血症。这里参考 WO 2011/033021 和 WO2007/095949 两者中的公开内容,其中用于 MIP 的相关靶被详述。

[0100] 本发明的 MIP 和 MIP 组合物

[0101] 本发明还涉及新的 MIP 和新的 MIP 组合物。由于用来交联单独的 MIP 的技术 – 以及其他,在最初的不溶的 MIP 之间提供唯一的接合点的交联官能团的选择,因而通过本发明的方法可获得的 MIP 在结构上与通过传统方法获得的不溶的 MIP 不同。特别地,当使用针对避免在 MIP 的模板结合位点中进行交联的交联条件时,参见上文,每个交联的 MIP 的物理结构将与已知的不溶的 MIP 是可区分的。

[0102] 在交联前纯化的实例

[0103] 聚合物以 L-苯基丙氨酸作为靶来合成,并随后通过机械分级和球磨随后离心分离将尺寸减小至可溶的颗粒。为从该可溶的 MIP 片段中除去靶分子和其他杂质,样品广泛地用 PBS 渗析。样品此后被应用于常规的填充床色谱柱。柱基质是在纯化前与肽 Gly-(L)Phe 结合的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化的琼脂糖凝胶 4 FF (GE Lifescience, 17-0906-01)。柱床大小为约 30ml,且流速为 1ml/min。该色谱最后在 210nm 处联机 (online)。在注入后,大的贯通峰 (run-through peak) 在大约 9-20min 时被看到。结合于柱的 MIP 通过在 70min 时,在流动的缓冲液中 10mg/ml 施加 1ml 苯丙氨酸被洗脱出该柱。在 78-83min 时的小峰 (相比于贯通峰约 1-2% 的尺寸) 被收集并广泛用 PBS 渗析以从洗脱组分中除去 Phe。在 94-102min 时,包含 Phe 的极大峰被洗脱。最后,该洗脱的 MIP 样品被测试对 Phe 的结合能力并与原料相比较。该 Phe 结合能力测试通过将添加有 ³H 标记的 Phe 的 Phe 加入到 MIP 的样品且结合 MIP 的 Phe 通过将样品穿过体积排阻色谱柱 (GE Lifescience 28-9180-04) 与未结合的 Phe 分离,且最后在与闪烁液混合后在闪烁计数器中计数。MIP 在 78-83min 的峰值表明 Phe 结合能力比未纯化的 MIP 高 500 多倍。

[0104] 参考文献列表

- [0105] 1) Yu Cong, Ph.D 论文: "Molecular Recognition Studies Based on Imprinting Technology", Dept. of Pure and Applied Biochemistry, University of Lund, Sweden 1998.
- [0106] 2) Leif Schweitz, Ph.D 论文: "Molecular Imprinted Matrices for Electrochromotography", Technical Analytical Chemistry, University of Lund, Sweden 2001.
- [0107] 3) Ioana **Wärnmark-Surugiu**, Ph.D 论文: "Antibodies and Antibody Mimics in Binding Assays", Dept. of Pure and Applied Biochemistry, University of Lund, Sweden 2002.
- [0108] 4) Dickey FH, "The preparation of specific absorbents" Proc. Natl. Acad. Sci. 35(1949) 227-229.
- [0109] 5) **Ramström** O 等人 J. Mol. Recog. 9(1996) 691-696
- [0110] 6) Schweitz L 等人 J Chromatog. A 792(1997) 401-409
- [0111] 7) Vlatakis G 等人 "Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting" Nature 361(1993) 645-647
- [0112] 8) Funke, W. 等人, Adv. Polym. Sci. 136(1998) 139-243
- [0113] 9) Shea KJ 和 Dogherty TK, J. Am. Chem. Soc. 108(1986) 1091-1093
- [0114] 10) Shea KJ, Stoddard GJ, Shavelle DM, Wakui F 和 Choate RM Macromolecules 23(1990) 4497-4507
- [0115] 11) Wulff G 和 Poll HG Makromol. Chem. 188(1987) 741-748
- [0116] 12) Hoshino 等人 (2008), JACS 130 ;15242-3
- [0117] 13) Hoshino 等人 (2010), JACS 132 ;6644-5
- [0118] 14) Piletsky 等人 (2006), Biopolymers and Cell 22 ;63-67
- [0119] 15) Guerreiro 等人 (2009), Biosensors and Bioelectronics 24 ;2740-2743