



(10) 申请公布号 CN 114555202 A

(43) 申请公布日 2022.05.27

(21) 申请号 202080074140.7

(22) 申请日 2020.10.21

(30) 优先权数据

19205109.2 2019.10.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/079544 2020.10.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/078760 EN 2021.04.29

(71) 申请人 默克专利股份公司

地址 德国达姆施塔特

(72) 发明人 B·T·霍格 P·L·沃尔特斯曼

A·J·巴德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 童春媛 林毅斌

(51) Int.Cl.

B01D 15/08 (2006.01)

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01)

B01J 20/288 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

C07D 213/40 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C08J 7/16 (2006.01)

权利要求书4页 说明书23页 附图2页

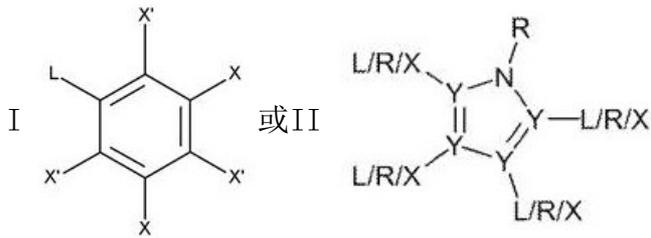
(54) 发明名称

基于卤素键合进行分离的材料和方法

(57) 摘要

本发明涉及一种带有包含卤素取代的芳环的官能团的新型固定相。目标分子可通过卤素键合与该固定相相互作用。该固定相适合于SPE或色谱分离。

1. 包含基础材料和至少一种类型的官能团的固定相,其中所述官能团选自
 $---N(R'_2)^+-ArX$,其中 R' 为H或C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C6芳基,并且 ArX 为



其中

L 为与 $---N(R'_2)^+$ 的键

X 和 X' 彼此独立地为H、I、Br或Cl或者另一吸电子基团比如F或 NO_2 或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或者给电子基团,

R 为H或C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C6芳基

Y 彼此独立地为C或N

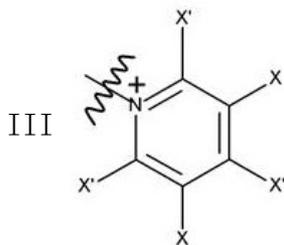
其中在式I中,至少一个 X 或 X' 为Cl、Br或I,

其中在式II中存在至少一个 L 并且

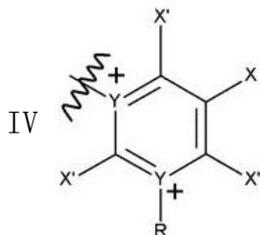
其中至少一个 Y 为C,并且其中对于每个为N的 Y ,在该N处没有 $L/R/X$;

或者所述官能团为带有至少一个Cl、Br或I残基的带正电荷的杂环芳族基团。

2. 根据权利要求1所述的固定相,其特征在于所述带有至少一个Cl、Br或I残基的带正电荷的杂环芳族基团具有以下结构中之一



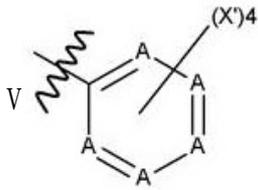
其中 X 彼此独立地为H、I、Br或Cl,且 X' 彼此独立地为H、I、Br、Cl、F、 NO_2 或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团,其中至少一个 X 或 X' 为Cl、Br或I;



其中 R 为H、C1-C10烷基、芳基、C1-C10烯基、C1-C10炔基或吸电子基团或给电子基团,

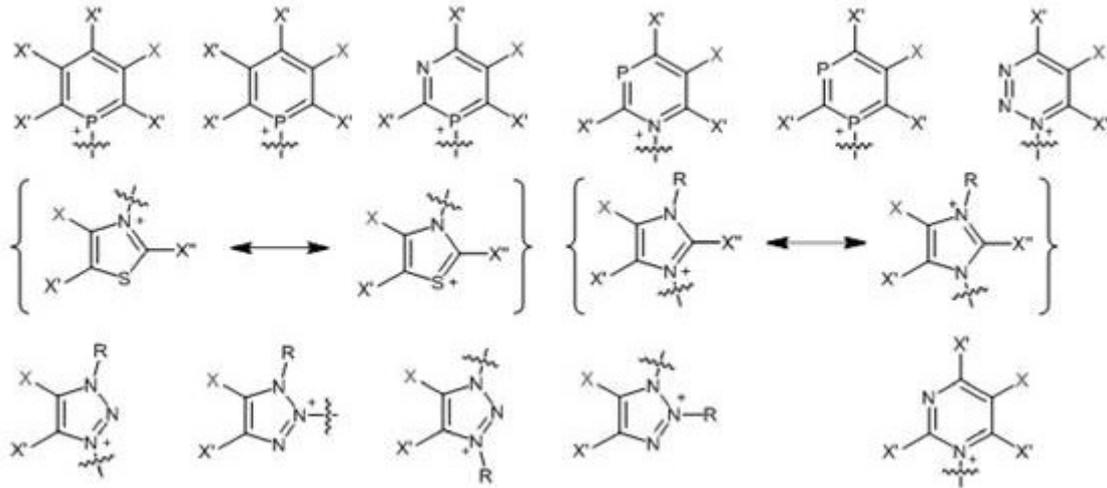
Y 彼此独立地为N或P,

X 彼此独立地为H、I、Br或Cl,且 X' 彼此独立地为H、I、Br、Cl、F、 NO_2 或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团,其中至少一个 X 或 X' 为Cl、Br或I;



其中芳环的一个不提供与所述基础材料的连接的原子A为O⁺或S⁺，而其他环原子A为C-X'，其中X'彼此独立地为H、I、Br、Cl或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团，其中至少一个X'为Cl、Br或I；

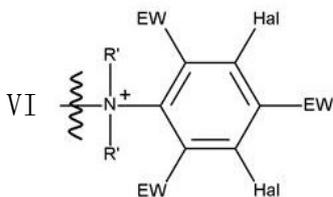
或以下结构中之一



其中X彼此独立地为H、C1至C6烷基基团、I、Br或Cl，且X'和X''彼此独立地为H、C1至C6烷基基团、I、Br、Cl或另一吸电子或给电子基团，R为H、C1-C6烷基、C6芳基、C1-C6烯基、C1-C6炔基或吸电子或给电子基团，并且其中至少一个X或X'为Cl、Br或I。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的固定相，其特征在于所述官能团具有一个杂环。

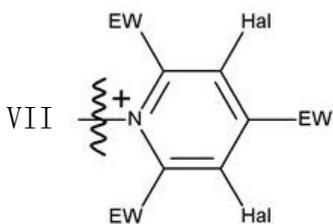
4. 根据权利要求1至3中一项或多项所述的固定相，其特征在于所述官能团选自以下中的一者或多者



其中R'为H或C1-C6烷基，优选甲基、乙基、丙基、异丙基，

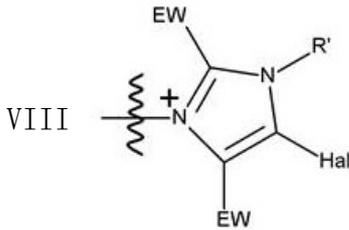
EW彼此独立地为H、CH₃或吸电子基团

并且Hal彼此独立地为H、CH₃、Cl、Br或I，其中至少一个Hal为Cl、Br或I；



其中EW彼此独立地为H、CH₃、吸电子基团

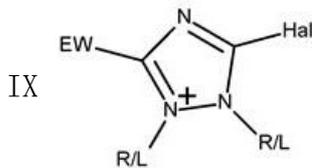
并且Hal彼此独立地为H、CH₃、Cl、Br或I,其中至少一个Hal为Cl、Br或I;



其中R' 为H或C1-C6烷基,优选甲基、乙基、丙基、异丙基,

EW彼此独立地为H、CH₃或吸电子基团

并且Hal为Cl、Br或I



其中一个R/L为H或C1-C6烷基而其他R/L为与所述基础材料的连接,

EW为H、CH₃或吸电子基团

并且Hal为Cl、Br或I。

5. 根据权利要求1至4中一项或多项所述的固定相,其特征在于所述官能团共价键合到所述基础材料。

6. 根据权利要求1至5中一项或多项所述的固定相,其特征在于所述基础材料为珠粒或膜。

7. 根据权利要求1至6中一项或多项所述的固定相,其特征在于所述官能团经由连接基团键合到所述基础材料。

8. 根据权利要求1至6中一项或多项所述的固定相,其特征在于所述官能团为接枝到所述基础材料上的聚合物链的端基。

9. 根据权利要求1至8中一项或多项所述的固定相,其特征在于所述基础材料为有机聚合物。

10. 一种色谱柱,所述色谱柱包含根据权利要求1至9中一项或多项所述的固定相。

11. 将目标分子与至少一种其他化合物分离的方法,其中使根据权利要求1至9中一项或多项所述的固定相与包含所述目标分子和所述至少一种其他化合物的液体接触,并且其中所述目标分子显示出的与所述固定相的相互作用不同于所述其他化合物的相互作用。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,化合物越能够给电子,则其与所述固定相的结合越强。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其特征在于,所述方法为将目标分子与至少一种其他化合物色谱分离的方法,其中根据权利要求1至9中一项或多项所述的固定相存在于色谱柱中,并让包含所述目标分子和所述至少一种其他化合物的液体过柱,由此,所述液体中存在的所述目标分子和所述其他化合物取决于它们与所述固定相的相互作用而从所述柱洗脱。

14. 根据权利要求11至13中一项或多项所述的方法,其特征在于,所述目标分子为蛋白质。

15. 根据权利要求11至14中一项或多项所述的方法,其特征在于,所述方法通过用一定pH和一定离子强度的水性上样缓冲液对根据本发明的固定相上样、并用具有相同pH但另一离子强度的水性洗脱缓冲液洗脱所述目标分子来进行。

基于卤素键合进行分离的材料和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种带有包含卤素取代的芳环的官能团的新型固定相。目标分子可通过卤素键合与该固定相相互作用。该固定相适合于SPE和色谱分离。

背景技术

[0002] 卤素键合是指一些分子RX（路易斯酸）中的卤素原子X与负位点如路易斯碱、在其他方面中性或阴离子路易斯碱的孤对电子的非共价相互作用。X可为氯、溴或碘。卤素键合可由卤素表面的最外部分上以R-X轴为中心的正静电势区域即 σ -空穴的存在来解释。从氯到溴再到碘，相互作用的强度增加，并可通过修正卤素的残基R来进一步修正。通常，卤素键合中的相互作用强度在10至180kJ/mol之间，因此与氢桥的强度相当。这可例如从DOI: 10.2021/acs.chem.rev.5b00484看到。

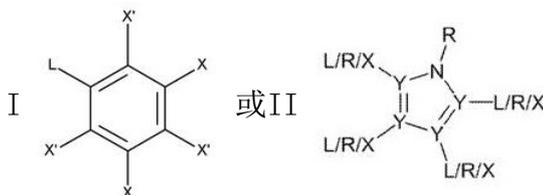
[0003] 目前，在超分子化学中、在催化中和在分子识别中，利用卤素键合来控制有机化合物的结晶。另外，卤素键合被应用于分离应用。Xiao Qing Yan 等人, *Analytica Chimica Acta* 753 (2012) 48-56公开了全氟化碘代烷的固相萃取。P. Peluso 等人., *Journal of Chromatography A*, 1467 (2016) 228-238描述了阻转异构多卤代4,4'-联吡啶的色谱对映分离。

[0004] 现已发现，卤素键合的原理不仅可用于分离形成该键的路易斯酸部分的含卤素分子R-X，而且还用于分离路易斯碱。发明人已发现，通过将某些分子R-X固定在固相上，广泛的包含路易斯碱部分的目标分子将可与固定的R-X相互作用。通过这种相互作用，可建立新的色谱分离原理，从而为色谱分离提供额外的自由度。可以表明，即便是蛋白质也可基于卤素键合来分离。

发明内容

[0005] 本发明因此涉及一种包含基础材料和至少一种类型的官能团的固定相，其中所述官能团为

$---N(R'_2)^+-ArX$ ，其中R' 为H或C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C6芳基，优选甲基、乙基、丙基、异丙基，并且ArX为



其中

L为与 $---N(R'_2)^+$ 的键

X和X' 彼此独立地为H、I、Br或Cl或者另一吸电子基团比如F或NO₂或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或者给电子基团，

R为H或C1-C6烷基、C1-C6烯基、C1-C6炔基、C6芳基

Y彼此独立地为C或N

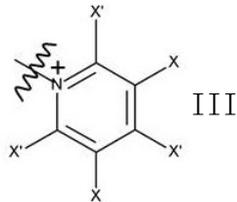
其中在式I中,至少一个X或X'为Cl、Br或I,优选X中的一个或两个为Cl、Br或I,

其中在式II中存在至少一个L并且

其中至少一个Y为C,并且其中对于每个为N的Y,在该N处没有L/R/X;

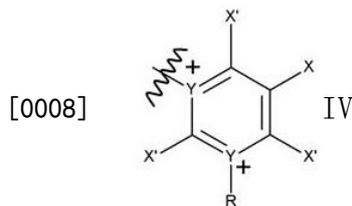
或者所述官能团为带有至少一个Cl、Br或I残基的带正电荷的杂环芳族基团。

[0006] 在一个优选的实施方案中,带有至少一个Cl、Br或I残基的带正电荷的杂环芳族基团具有以下结构中之一



其中X为H、I、Br或Cl, X'彼此独立地为H、I、Br、Cl、F、NO₂或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团,其中至少一个X或X'为Cl、Br或I,优选至少一个X为Cl、Br或I。

[0007] 式III中以及下式中的蛇形线示出了与基础材料的连结。这可能为单键或优选地连接基团或另一结构,例如,触角的一部分。

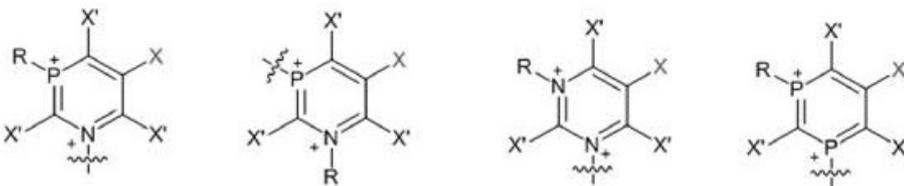


[0008] 其中R为H、C1-C10烷基、芳基、C1-C10烯基、C1-C10炔基或吸电子基团或给电子基团,

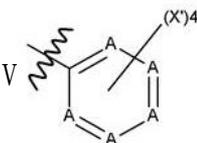
Y彼此独立地为N或P,

X为H、I、Br或Cl, X'彼此独立地为H、I、Br、Cl、F、NO₂或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团,其中至少一个X或X'为Cl、Br或I,优选X为Cl、Br或I。

[0009] 根据式IV的可能结构的实例有:



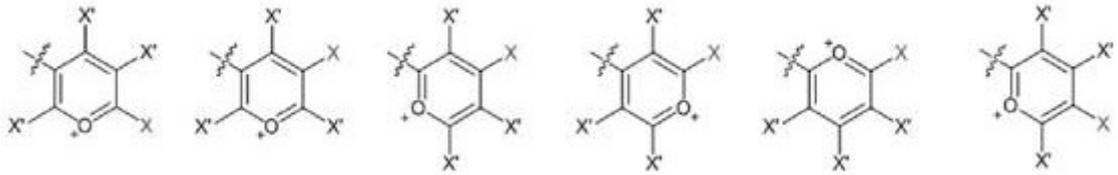
另一种可能的结构类似于式V,



其中芳环的一个原子A (不是提供与基础材料的连接的那个)为O⁺或S⁺,而其他环原子A为C-X',其中X'彼此独立地为H、C1至C6烷基基团、I、Br、Cl或另一吸电子基团或C1-

C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团，其中至少一个X'为Cl、Br或I。

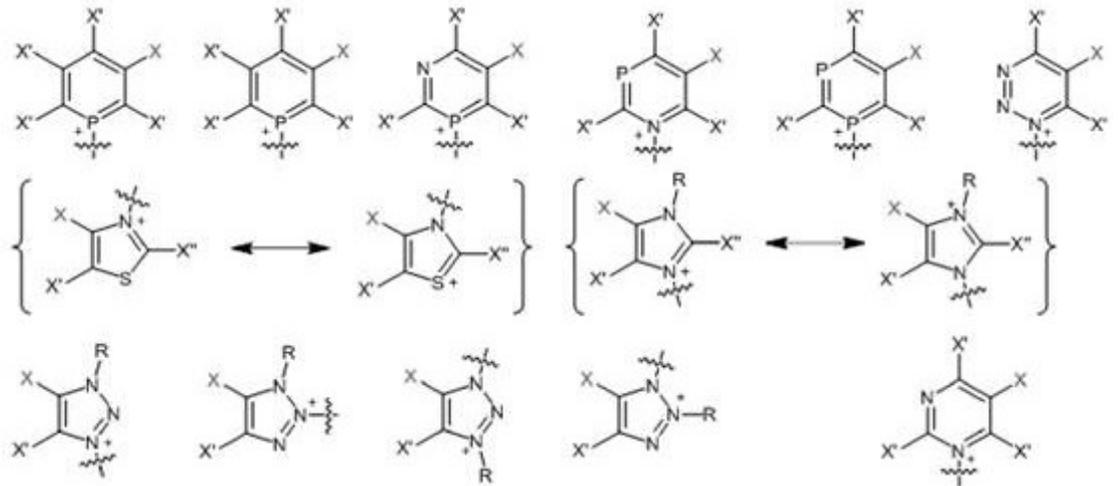
[0010] 根据式V的可能结构的实例有：



其中X彼此独立地为H、C1至C6烷基基团、I、Br或Cl，X'彼此独立地为H、C1至C6烷基基团、I、Br、Cl或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团，其中至少一个X或X'为Cl、Br或I，优选X为Cl、Br或I。

[0011] 相同的结构用S代替O是可能的。

[0012] 其他可能的结构如下：



其中X彼此独立地为H、C1至C6烷基基团、I、Br或Cl，X'和X''彼此独立地为H、I、Br、Cl或另一吸电子基团或C1-C10烷基、C1-C10烯基、C1-C10炔基、C6-C12芳基或给电子基团，R为H、C1-C6烷基、C6芳基、C1-C6烯基、C1-C6炔基或吸电子基团或给电子基团，并且其中至少一个X或X'为Cl、Br或I，优选X为Cl、Br或I。

[0013] 在一个优选的实施方案中，官能团的残基或取代基仅包含Cl、Br和/或I以及H、C1-C6烷基和/或一个或多个吸电子基团。

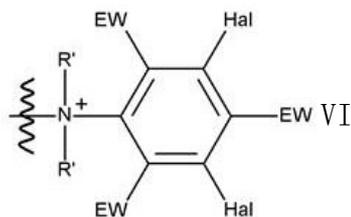
[0014] 在一个优选的实施方案中，官能团仅具有一个杂环。

[0015] 在另一个优选的实施方案中，杂环芳族基团具有一种类型的杂原子。

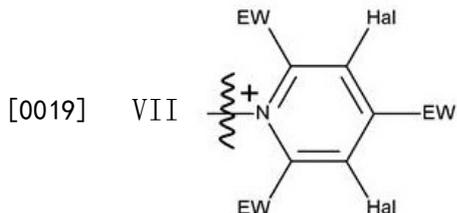
[0016] 在一个优选的实施方案中，杂环中的杂原子为N原子。

[0017] 在另一个优选的实施方案中，官能团的芳环被一个或两个碘原子取代。

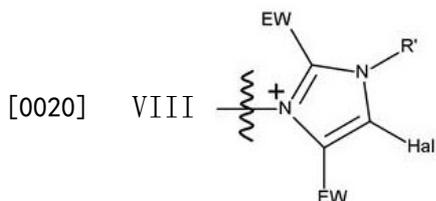
[0018] 最优的官能团的结构为：



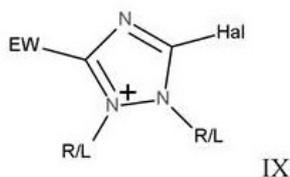
其中R' 为H或C1-C6烷基,优选甲基、乙基、丙基、异丙基,
EW彼此独立地为H、CH₃或吸电子基团,优选H、CH₃、F、Cl、NO₂
并且Hal彼此独立地为H、CH₃、Cl、Br或I,优选Br或I,其中至少一个Hal为Cl、Br或I。



其中EW彼此独立地为H、CH₃、吸电子基团,优选H、F、Cl、NO₂
并且Hal彼此独立地为H、CH₃、Cl、Br或I,优选Br或I,其中至少一个Hal为Cl、Br或I。



其中R' 为H或C1-C6烷基,优选甲基、乙基、丙基、异丙基,
EW彼此独立地为H、CH₃或吸电子基团,优选H、F、Cl、NO₂
并且Hal为Cl、Br或I,优选Br或I。



[0021] 其中一个R/L为H或C1-C6烷基,优选甲基、乙基、丙基、异丙基而其他R/L为与基础材料的连接,

EW为H、CH₃或吸电子基团,优选F、Cl、NO₂
并且Hal为Cl、Br或I,优选Br或I。

[0022] 非常优选的是根据结构VI、VII、VIII或IX的官能团,最优选VII,其经由聚合物链(也称为触角)连接到固体载体,所述连接使用根据式XIII的单体通过如下所述的接枝方法实现,其中R³为根据结构VI、VII、VIII和/或IX的官能团。任选地,还可另外使用包含其他R³的根据式III的其他单体,从而生成具有两个或更多个不同官能团的聚合物链,其至少一个官能团选自结构VI、VII、VIII和/或IX。

[0023] 在官能团具有一个或多个正电荷的情况下,存在负抗衡离子。抗衡离子的类型并不重要。合适的抗衡离子为卤素离子、乙酸根、硝酸根、三氟甲磺酸根等。

[0024] 在一个优选的实施方案中,官能团共价键合到基础材料。

[0025] 在一个实施方案中,基础材料为珠粒或膜。

[0026] 在一个实施方案中,官能团经由连接基团键合到基础材料。

[0027] 在一个实施方案中,官能团包含在聚合物链中,该聚合物链也称为触手,其接枝到基础材料上。

[0028] 在一个优选的实施方案中,基础材料为有机聚合物,优选基于聚苯乙烯或基于聚

乙烯醚的聚合物。

[0029] 本发明还涉及包含本发明的固定相的分离装置。

[0030] 在一个优选的实施方案中,分离装置为包含本发明的固定相的色谱柱。

[0031] 本发明还涉及将目标分子与至少一种其他化合物分离的方法,其中使优选存在于分离装置中的如上所述根据本发明的固定相与包含目标分子和至少一种其他化合物的液体接触,并且其中目标分子显示出的与固定相的结合不同于其他化合物的结合,例如与其他化合物相比,其与固定相的相互作用更强或更弱。

[0032] 在一个优选的实施方案中,化合物给电子的能力越强,则它与固定相的结合越强。

[0033] 在一个优选的实施方案中,所述方法为将目标分子与至少一种其他化合物色谱分离的方法,其中如上所述根据本发明的固定相存在于色谱柱中,并让包含目标分子和至少一种其他化合物的液体过柱,由此,液体中存在的目标分子和其他化合物取决于它们与固定相的相互作用而从柱洗脱。

[0034] 在一个优选的实施方案中,目标分子为蛋白质。

[0035] 在一个优选的实施方案中,所述方法通过用一定pH和一定离子强度的水性上样缓冲液对根据本发明的固定相上样、并用具有相同pH但另一离子强度的水性洗脱缓冲液洗脱目标分子来进行,其中所述另一离子强度通常为较高的离子强度。

[0036] 在另一个实施方案中,所述方法通过用一定pH和一定离子强度的水性上样缓冲液对根据本发明的固定相上样、并用另一pH和/或另一离子强度的水性缓冲液洗脱目标分子来进行。

[0037] 在另一个实施方案中,所述方法通过用有机上样介质对根据本发明的固定相上样、并用相同的介质或更极性的介质洗脱目标分子来进行,例如,使用梯度洗脱。有机上样介质为不包含超过10%的水的有机液体,例如,甲醇、乙醇、乙腈、THF、庚烷、甲苯等或其混合物。

[0038] 本发明还涉及具有不同pI (等电点)和/或不同羧酸含量的两种蛋白质通过卤素键合的色谱分离,优选使用根据本发明的固定相。

附图说明

[0039] 图1和2示出了用根据本发明的固定相和其他固定相完成的色谱图。更多细节可见于应用实施例2.1中。

具体实施方式

[0040] 在详细描述本发明之前,应理解本发明不限于具体的组合物或工艺步骤,因为它们可变化。必须注意,如在本说明书和附随的权利要求书中所用,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物,上下文另有明确规定除外。因此,例如,“配体”的提及包括多个配体,而“抗体”的提及包括多个抗体等。

[0041] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明相关领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。出于如本文所述的本发明的目的,定义了以下术语。

[0042] 如本文所用,术语“目标分子”是指应从样品中的一种或多种其他组分例如杂质分

开、分离或纯化的任何分子、物质或化合物。在生产和/或纯化过程中,目标分子通常存在于液体中。液体可为水、缓冲液、非水有机溶剂比如乙醇、乙腈、庚烷或上述液体的任何混合物。除了目标分子外,所述液体可包含一种或多种杂质。该液体也可称为样品。取决于所进行的工艺步骤,液体的组成可能在生产和/或纯化过程中发生变化。在色谱步骤之后,由于色谱步骤中使用的洗脱液,故液体通常包含与之前不同的其他溶剂。目标分子的实例有低分子量分子,比如具有约或低于2000g/mol的分子量的药物。目标分子也可为高分子量化合物,比如蛋白质,例如抗体。

[0043] 术语“抗体”是指具有特异性结合抗原的能力的蛋白质。“抗体”或“IgG”还指基本上由一个或多个免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽,其特异性结合并识别分析物(抗原)。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,它们又分别定义了免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0044] 一种示例性的免疫球蛋白(抗体)结构单元由两对多肽链组成,每对多肽链具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD),所述链例如通过链间二硫键稳定。每条链的N-末端定义了一个约100至110或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(V L)和可变重链(V H)分别是指这些轻链和重链。

[0045] 抗体可以是单克隆的或多克隆的并且可以单体或聚合物形式存在,例如,以五聚体形式存在的IgM抗体和/或以单体、二聚体或多聚体形式存在的IgA抗体。抗体还可包括多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们保留或经修饰以包含配体特异性的结合结构域即可。术语“片段”是指抗体或抗体链的一部分或部分,其包含比完整或完全抗体或抗体链少的氨基酸残基。片段可经由完整或完全抗体或抗体链的化学或酶处理获得。片段也可通过重组手段获得。当重组产生时,片段可单独表达,也可作为称为融合蛋白的较大蛋白质的一部分表达。示例性的片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc和/或Fv片段。示例性的融合蛋白包括Fc融合蛋白。根据本发明,融合蛋白也涵盖在术语“抗体”中。

[0046] 在一些实施方案中,抗体为含有Fc区的蛋白质,例如免疫球蛋白。

[0047] 如本文所用,除非另有说明,否则术语“样品”是指含有目标分子的任何组合物或混合物。样品可能来源于生物或其他来源。生物来源包括真核生物来源,比如动物或人类。样品还可包含发现与目标分子混合在一起的稀释剂、缓冲液、去污剂和污染物质等。

[0048] 如本文所用,术语“杂质”或“污染物”是指任何外来的或不想要的(objectionable)分子,包括生物大分子如DNA、RNA、一种或多种宿主细胞蛋白、核酸、内毒素、脂质、合成来源的杂质和一种或多种添加剂,其可能存在于含有将与一种或多种外来的或不想要的分子分离的目标分子的样品中。

[0049] 如本文可互换地使用的术语“纯化”、“分离”或“分开”是指通过将目标分子从包含目标分子和一种或多种其他组分例如杂质的组合物或样品分离来提高目标分子的纯度。通常,通过从组合物(完全地或部分地)去除至少一种杂质来提高目标分子的纯度。

[0050] 术语“色谱法”是指将目的分析物(例如,目标分子)与混合物中存在的其他分子分离的任何种类的技术。通常,由于混合物中个体分子在移动相的影响下、或者在结合和洗脱过程中迁移通过固定相的速率的差异,目标分子与其他分子分离开来。色谱分离方法的实例有反相色谱法、离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、亲和色谱法、疏水相互作用色谱法和

混合模式色谱法。本发明的色谱法基于卤素键合以及任选地另外一种或多种上文提到的其他分离方法。

[0051] “缓冲液”为通过其酸-碱共轭组分的作用抵抗pH变化的溶液。Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)中描述了各种缓冲液,其可取决于例如期望的缓冲液pH来使用。缓冲液的非限制性实例包括MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、甘氨酸和铵缓冲液以及这些的组合。水性缓冲液为其溶剂包含超过90%、优选100%的水的缓冲液。

[0052] 术语“固定相”是指在分离过程中将目标分子与混合物中存在的其他分子分离开来的任何种类的吸着剂、基质、树脂或固相。通常,由于混合物中个体分子与固定相结合和/或在移动相的影响下迁移通过固定相的速率的差异,目标分子与其他分子分离开来。固定相可放在柱或筒中。根据本发明的固定相包含至少一种类型的官能团。

[0053] “官能团”为连接到固定相的基础材料并决定固定相的结合性质的配体。“官能团”的实例包括但不限于离子交换基团、疏水相互作用基团、亲水相互作用基团、亲硫相互作用基团、金属亲和基团、亲和基团、生物亲和基团和混合模式基团(前述的组合)。根据本发明的固定相至少包含用于卤素键合的官能团。它们可另外还包含一种或多种如上文所列出的其他基团。通常,一个官能团具有超过一种结合性质。

[0054] 当以结合和洗脱模式对色谱柱“上样”时,使用缓冲液来将包含目标分子和一种或多种杂质的样品或组合物上样到色谱柱上。该缓冲液具有使得目标分子与固定相结合而理想地所有杂质均不结合并流过柱的电导率和/或pH。结合的目标分子与一种或多种杂质的分离可另外通过改变电导率和/或pH使得目标分子在一种或多种杂质之前或之后被洗出或洗脱来完成。

[0055] 通常将样品在其中上样到固定相上的缓冲液称为上样缓冲液或样品缓冲液。

[0056] 当对色谱柱“上样”以“流过”目标分子时,使用缓冲液来将包含目标分子和一种或多种杂质的样品或组合物上样到色谱柱上。该缓冲液具有使得目标分子不与固定相结合并流过柱而理想地所有杂质均与柱结合的电导率和/或pH。

[0057] 术语“平衡”是指在目标分子上样之前使用缓冲液来平衡固定相。通常,使用上样缓冲液来进行平衡。

[0058] “洗涤(wash/washing)”固定相指的是使适宜的液体例如缓冲液通行穿过或越过固定相。通常使用洗涤来在洗脱目标分子之前以结合/洗脱模式从固定相去除弱结合的污染物,或在上样之后去除未结合或弱结合的目标分子。

[0059] 在这种情况下,通常,洗涤缓冲液和上样缓冲液是相同的。在使用病毒灭活缓冲液的情况下,其用来在洗脱目标分子之前灭活某些存在的病毒。在这种情况下,通常,病毒灭活缓冲液与上样缓冲液不同,因为它可能含有一种或多种去污剂或具有不同的性质(pH/电导率/盐及其量)。

[0060] 也可使用洗涤来在目标分子洗脱之后从固定相去除污染物。这通过在目标分子的洗脱之后使适宜的液体例如缓冲液通行穿过或越过固定相来完成。在这种情况下,通常,洗涤缓冲液与上样缓冲液不同。它可能含有一种或多种去污剂或具有不同的性质(pH/电导率/盐及其量)。洗涤缓冲液可例如为酸性缓冲液。

[0061] 从固定相“洗脱”分子(例如,目标分子或杂质)指的是自其去除该分子。当用上样缓冲液的溶剂前沿(solvent front)、或通过改变溶液条件使得不同于上样缓冲液的缓冲液与目的分子竞争固定相上的配体位点来洗脱目标分子时,洗脱可直接以流过模式进行。一个非限制性实例为从离子交换树脂洗脱分子,做法是改变离子交换材料周围的缓冲液的离子强度使得该缓冲液与分子竞争离子交换材料上的带电位点。

[0062] 如本文可互换地使用的,术语“流过法”、“流过模式”和“流过操作”是指其中样品中与一种或多种杂质一道包含的至少一种目标分子预期流过色谱固定相的分离技术,该色谱固定相通常结合所述一种或多种杂质,其中目标分子通常不结合(即,流过)并用上样缓冲液从固定相洗脱。

[0063] 如本文所用,术语“结合和洗脱模式”和“结合和洗脱法”是指其中样品中所含的至少一种目标分子与合适的固定相结合并随后用不同于上样缓冲液的缓冲液洗脱的分离技术。

[0064] 固相萃取(SPE)为其中溶解或悬浮在液体混合物中的化合物与其他化合物取决于它们的物理和化学性质而分离的样品制备方法。结果是样品中的目标分子或不需要的杂质被保留在固定相上。通行穿过固定相的部分被收集或丢弃,这取决于它是含目标分子还是不需要的杂质。如果保留在固定相上的部分包含目标分子,则可在其中用适宜的洗脱液冲洗固定相的附加步骤中将它们从固定相去除以收集。

[0065] 粒度由激光衍射确定,优选使用Malvern的Master Sizer。

[0066] 孔隙尺寸由反相SEC确定。粒度通过筛分确定。

[0067] 吸电子基团包括氢和具有吸电子诱导和/或介观效应并且比氢电负性高的原子的原子或原子团。示例性的吸电子基团有H、I、Br、Cl、F、CO₂H、NO₂、CN。

[0068] 给电子基团包括具有给电子诱导和/或介观效应并且比氢电负性低的原子的原子或原子团。示例性的给电子基团有-OH、O-烷基。

[0069] 烷基或烷基基团表示通常具有1至20个C原子或具有如所指示的C原子数的直链或支链烷基基团,例如甲基、乙基、异丙基、丙基、丁基、仲丁基或叔丁基,此外,戊基、1-、2-或3-甲基丁基、1,1-、1,2-或2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基或正十二烷基、正十三烷基、正十四烷基、正十五烷基、正十六烷基、正十七烷基、正十八烷基、正十九烷基或正二十烷基,优选烷基基团具有1至10个C原子。

[0070] 烯基或烯基基团表示通常具有2至20个C原子的直链或支链烯基,其中另外,可存在多个双键,例如烯丙基、2-或3-丁烯基、异丁烯基、仲丁烯基,此外,4-戊烯基、异戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、-C₉H₁₇、-C₁₀H₁₉至-C₂₀H₃₉;优选烯丙基、2-或3-丁烯基、异丁烯基、仲丁烯基。

[0071] 芳基或芳基基团表示通常具有6至12个C原子的芳基基团,例如苯基、萘基或蒽基,它们可未被取代或者被Hal、NH₂、NAlk₂、NH烷基、NO₂、CN、SO₃H或O烷基取代。取代可由所指示的取代基发生一次或多次,优选一次。

[0072] 本发明提供了一类新的固定相,其可用作色谱法用或固相萃取用的分离材料,也称为树脂或基质。根据本发明的固定相包含基础材料和优选共价连接至基础材料的官能团。已发现,可使用卤素键合的原理来将目标分子与混合物中的其他化合物分离,这基于的是它们与固定相的不同结合,所述固定相包含具有与芳环连接的Cl、Br或优选I的官能团,

其中所述芳环由于与环直接相邻的正电荷或由于环内的正电荷而带正电荷。已发现,正电荷与和芳环结构连结的卤素原子的组合会在卤素原子处产生有效的 σ 空穴,这使得能够与路易斯碱有效地卤素键合。

[0073] 基础材料可由不规则形状或球形的颗粒组成,其粒度可在2至1000 μm 之间。优选粒度在3至300 μm 之间。

[0074] 特别地,基础材料可呈无孔、核-壳或优选多孔颗粒的形式。孔隙尺寸可在2至300nm之间。优选孔隙尺寸在5至200nm之间。

[0075] 基础材料同样也可呈膜、纤维、中空纤维、涂层、过滤器、毛细管、表面或整体模制品的形式。整体模制品优选为多孔的三维体,例如呈圆柱体形式。优选地,基础材料为多孔珠粒或膜。基础材料也可通过增材制造比如3D打印来制造。

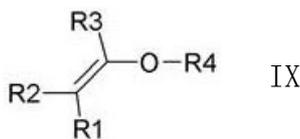
[0076] 在一个实施方案中,基础材料为无机材料,例如由金属氧化物比如 SiO_2 、 Al_2O_3 、二氧化钛、二氧化锆制成。其也可由其他基于二氧化硅的材料制成,比如可控孔隙玻璃。

[0077] 基础材料也可无机-有机杂化材料或有机和无机材料的任何其他组合。

[0078] 在另一个实施方案中,基础材料由天然聚合物制成,优选呈多孔珠粒的形式,例如基于琼脂糖的多糖、纤维素、纤维素衍生物和基于葡聚糖的聚合物。天然聚合物珠粒例如有称为Sephacrose[®]或Sephadex[®]的那种。在一个替代的实施方案中,基础材料由合成聚合物制成,优选呈多孔珠粒或膜的形式,由交联的合成聚合物组成,如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基酰胺等。优选基于聚苯乙烯、聚乙烯醇或(甲基)丙烯酸酯衍生物与具有脂族羟基基团的共聚单体的共聚物的聚合物。基于某种结构类型比如例如聚苯乙烯或聚乙烯醚的聚合物为包含所述结构的聚合物。它们可能还包含其他结构,例如产生自两种不同单体的共聚。

[0079] 在另一个优选的实施方案中,基础材料为基于聚乙烯醚的材料,尤其是通过来自组a)和b)的至少一种化合物的共聚形成的共聚物,其中

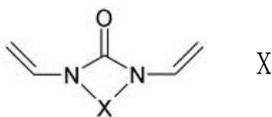
a) 至少一种式IX的亲水取代的烷基乙烯基醚



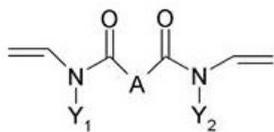
其中R1、R2、R3可彼此独立地为H或C1至C6烷基,优选H或-CH₃, R4为带有至少一个羟基基团的基团

和

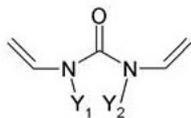
b) 至少一种符合式X和/或XI和/或XII的交联剂,



其中X为具有2至5个C原子、优选2或3个C原子的二价烷基基团,其中一个或多个不相邻且不紧邻N的亚甲基基团可被替换为O、C=O、S、S=O、SO₂、NH、NOH或N,并且所述亚甲基基团的一个或多个H原子可彼此独立地被羟基基团、C1-C6-烷基、卤素、NH₂、C5-C10-芳基、NH-(C1-C8)-烷基、N-(C1-C8)-烷基₂、C1-C6-烷氧基或C1-C6-烷基-OH所取代,和



XI



XII

其中式XI和XII中的Y1和Y2彼此独立地为

C1至C10烷基或环烷基, 其中一个或多个不相邻的亚甲基基团或不紧邻N的亚甲基基团可被替换为O、C=O、S、S=O、SO₂、NH、NOH或N, 并且所述亚甲基基团的一个或多个H可彼此独立地被羟基基团、C1-C6-烷基、卤素、NH₂、C5-C10-芳基、NH(C1-C8)烷基、N(C1-C8)烷基₂、C1-C6-烷氧基或C1-C6-烷基-OH所取代,

或C6至C18芳基, 其中芳基体系中的一个或多个H可彼此独立地被羟基基团、C1-C6-烷基、卤素、NH₂、NH(C1-C8)烷基、N(C1-C8)烷基₂、C1-C6-烷氧基或C1-C6-烷基-OH所取代, 并且

A为具有2至5个C原子、优选2或3个C原子的二价烷基基团, 其中一个或多个不相邻的亚甲基基团或不紧邻N的亚甲基基团可被替换为O、C=O、S、S=O、SO₂、NH、NOH或N并且所述亚甲基基团的一个或多个H可彼此独立地被羟基基团、C1-C6-烷基、卤素、NH₂、C5-C10-芳基、NH(C1-C8)烷基、N(C1-C8)烷基₂、C1-C6-烷氧基或C1-C6-烷基-OH所取代。

[0080] 式IX中的R4通常为带有至少一个羟基基团的烷基基团、脂环族基团或芳基基团。

[0081] 在一个非常优选的实施方案中, 基质通过选用自1,4-丁二醇单乙烯基醚、1,5-戊二醇单乙烯基醚、二乙二醇单乙烯基醚或环己烷二甲醇单乙烯基醚的亲水取代烷基乙烯基醚与作为交联剂的二乙烯基亚乙基脲(1,3-二乙烯基咪唑啉-2-酮)的共聚形成。

[0082] 合适的市售的基于乙烯基醚的基础材料的一个实例为Eshmuno® (德国Merck KGaA)。

[0083] 如上文所定义的官能团连接到所述基础材料。这可经由非共价或优选共价连接来完成。共价连接可例如通过将官能团直接键合到基础材料上的合适残基比如OH、NH₂、羧基、酚、酸酐、醛、环氧化物或巯基等来进行。

[0084] 也可以经由合适的连接基团来连接官能团。合适的连接基团的结构为

--X--Z--Y--, 其中X和Y为第一和第二反应性或可活化基团, 并且X和Y可各自独立地选自羟基、氨基、巯基、羧基、氧杂环丙烷基、甲酰基、卤素、异氰酸基和氯磺酰基等部分; Z可选自基团如

- (a) C1-C15-烷基,
- (b) 芳基
- (c) C1-C10烷基芳基,

(d) C1-C10烷基芳基C 1-6烷基, 其中烷基的1个、2个或更多个碳原子可被替换为氧、硫或氮, 并且其中芳基包括但不限于苯基、萘基、吡啶基或噻吩基, 并且其中一个或多个碳原子可被OH或C至C6烷基所取代; 和

(e) 2至10个氨基酸的肽,所述氨基酸包括但不限于L-和D-形式的氨基酸,包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸,天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、羟基赖氨酸、组氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、鸟氨酸、 β -丙氨酸、高丝氨酸、高酪氨酸、高苯丙氨酸和瓜氨酸。

[0085] 其他合适的间隔物可包括但不限于对苯醌、双-(重氮联苯胺)、3,6-双-(汞基甲基)二噁烷、双环氧乙烷、三聚氯氰、p,p'-二氟-m,m'-二环己基碳二亚胺、二硝基苯基砒、己二酰亚胺酸二甲酯、辛二亚氨酸二甲酯、二乙烯基砒、N,N'-亚乙基-双-(碘乙酰胺)、戊二醛、六亚甲基双-(马来酰亚胺)、六亚甲基二异氰酸酯、N,N'-1,3-亚苯基-双-(马来酰亚胺)、苯酚-2,4-二磺酰氯、四氮化邻联茴香胺、甲苯二异氰酸酯、伍德沃德氏试剂K、水溶性碳二亚胺、6-氨基己酸、六亚甲基二胺、1,7-二氨基-4-氮杂-庚烷(3,3'-二氨基-二丙胺)和氨基酸或肽。

[0086] 还可以通过聚合包含官能团和可聚合部分的单体来产生根据本发明的固定相。通过合适的单体的聚合产生的固定相的实例有通过聚合合适的苯乙烯或丙烯酰基单体产生的基于聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酰胺或聚丙烯酰胺的固定相。

[0087] 在另一个实施方案中,可通过将官能团接枝到基础材料上来产生固定相。

[0088] 在“接枝到”的情况下,聚合物链必须首先由单体形成并在第二步中结合到基础材料的表面。在“接枝自”的情况下,在基础材料的表面上引发聚合反应,并且接枝聚合物直接由个体单体构建。

[0089] 优选“接枝自”方法,并且特别优选其中仅形成少许必须分离走的副产物(如非共价键合聚合物)的变体。采用可控自由基聚合的方法,例如原子转移自由基聚合(ATRP)的方法,是合适的。这里,在第一步中,引发剂基团以期望的密度共价键合到基础材料的表面。引发剂基团可例如为经由酯官能键合的卤化物,如在2-溴-2-甲基丙酸酯中那样。在铜(I)盐的存在下在第二步中进行接枝聚合。

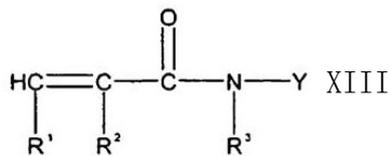
[0090] 适合于产生本发明的固定相的非常优选的一步接枝自聚合反应可由含羟基载体上的铈(IV)引发,而无需活化载体。

[0091] 这种铈(IV)引发的接枝优选根据EP 0 337 144或US 5,453,186进行。产生的链经由单体单元连接到基础材料。为此,将根据本发明的基础材料悬浮在单体的溶液中,优选水溶液中。聚合物材料的接枝在不包括氧的常规氧化还原聚合过程中实现。采用的聚合催化剂为铈(IV)离子,因为该催化剂在基础材料的表面上形成自由基位点,自此引发单体的接枝聚合。该反应通常在稀无机酸中进行。为了进行这种接枝聚合,酸通常在水溶液中采用,浓度范围为1至0.00001mol/l,优选0.1至0.001。非常特别优选使用稀硝酸,其以0.1至0.001mol/l的浓度采用。

[0092] 为了制备根据本发明的分离材料,通常向基础材料过量添加单体。通常,每升沉积的聚合物材料采用0.05至100mol的总单体,优选采用0.05-25mol/l。

[0093] 聚合通过涉及铈盐的终止反应终止。因此,(平均)链长可受到基础材料、引发剂和单体的浓度比率的影响。此外,可采用均一的单体或不同单体的混合物;在后一情况下,将形成接枝共聚物。

[0094] 有利地用于制备根据本发明的分离材料的单体为根据式XIII的那些



其中R¹、R²和Y彼此独立地为H或CH₃，优选H。

[0095] R³为根据本发明的官能团或包含本发明的官能团的化学结构。

[0096] 根据本发明的分离材料优选仅含有接枝到基础材料上的触角样线形聚合物结构，其由根据式XIII的单体构建。优选地，它们含有仅由一种类型的根据式XIII的单体构建的线形聚合物。

[0097] 但也可以通过两种或更多种根据式XIII的不同单体的共聚来构建线形聚合物。还可以通过一种或多种根据式XIII的不同单体与一种或多种其他可聚合单体比如其他丙烯酰胺、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯等的共聚来构建线形聚合物，这些其他可聚合单体是例如用离子、亲水或疏水基团官能化的。

[0098] 这同样适用于由不同的方法制成的根据本发明的固定相。它们可能包含一个、两个或更多个如上所述的用于卤素键合的官能团以及除了所述用于卤素键合的官能团之外的其他官能。这可能是例如离子、亲水或疏水基团。通过产生具有两种不同官能的固定相，获得具有由两种或若干类型的官能产生的分离性质的混合模式材料，其中在本发明的情况下，至少一个官能团适合于卤素键合。

[0099] 本发明还涉及包含根据本发明的固定相的分离装置。所述装置可例如用于固相萃取或用于色谱应用。在任何情况下，它都包含用于保持固定相的手段。固定相可能被装置包围或连接到装置。在一个实施方案中，装置包含具有入口和出口的外壳。在另一个实施方案中，其为平板或销钉，固定相连接到其一侧。在另一个实施方案中，其为包含固定相的过滤器。在一个优选的实施方案中，装置为包含根据本发明的上述固定相的色谱柱。色谱柱是本领域技术人员已知的。它们通常包含填充有固定相的圆柱形管或筒以及过滤器和/或用于将固定相固定在管或筒中的手段和任选地用于向和自管或筒递送溶剂的连接件。色谱柱的尺寸根据应用例如分析或制备而异。

[0100] 根据本发明的固定相也可描述为提供有分离效应物(separation effector)的基础材料，其中至少一个分离效应物包含如上文所定义的官能团。它们可用于一种或多种目标分子的选择性、部分选择性或非选择性结合或吸附，目的在于从样品液体中分离出来，或用于一种或多种次要组分的选择性、部分选择性或非选择性结合或吸附，目的在于从基质分离出次要组分，从天然来源分开、富集和/或耗减生物聚合物，从重组来源分开、富集和/或耗减生物聚合物，分开、富集和/或耗减蛋白质和肽，分开、富集和/或耗减单克隆和多克隆抗体，分开、富集和/或耗减病毒，分开、富集和/或耗减宿主细胞蛋白质，分开、富集和/或耗减ADC，分开、富集和/或耗减生物碱、脂质(比如甘油二酯或甘油三酯)、碳水化合物、核酸或其他生物分子。

[0101] 目标分子与来自样品的至少一种或多种其他物质分离，其中包含目标分子的样品为液体或溶解在液体中，使该液体与根据本发明的固定相接触。接触时间通常在30秒至24小时的范围内。根据液相色谱原理进行工作将是有利的，做法是使液体通行穿过含有根据本发明的固定相的色谱柱。液体可仅靠其重力过柱，或者其可借助于泵泵送穿过。一种替代

的方法是分批色谱法,其中只要目标分子需要能够与固定相结合,就通过搅拌或摇动将固定相与液体混合。同样可以根据色谱流化床的原理进行工作,做法是将待分离的液体引入到例如包含固定相的悬浮液中,其中选择分离材料使得其由于其高密度和/或磁芯而适合于期望的分离。

[0102] 如果色谱过程以结合和洗脱模式运行,则目标分子将与根据本发明的固定相结合。可任选地随后用洗涤缓冲液洗涤固定相,该洗涤缓冲液优选具有与使目标分子与固定相接触的液体相同的离子强度和相同的pH。洗涤缓冲液将去除所有不与固定相结合的物质。接着可在不使目标分子解吸的情况下用其他合适的缓冲液进行进一步的洗涤步骤。结合的目标分子的解吸通常通过改变洗脱液中的离子强度和/或通过改变洗脱液中的pH和/或通过改变溶剂来进行。可因此在洗脱液中以纯化和浓缩的形式获得目标分子。在从固定相解吸后,目标分子通常具有70%至99%、优选85%至99%、特别优选90%-99%的纯度。

[0103] 然而,如果色谱过程以流过模式运行,则目标分子保留在液相中,但其他伴随物质与固定相结合。然后通过收集通流的柱洗出液直接获得目标分子。

[0104] 根据本发明的固定相可用于许多不同的应用。它们可例如用于亲水和疏水分离以及用于水性和非水性分离。

[0105] 蛋白质比如胰岛素可例如在固定相上适当地纯化,该固定相包含键合了所述官能团的亲水性基础材料。优选地,所述官能团接枝到基础材料上。实施例2.1示出了一种适合于此应用的固定相。然后优选通过使用中性pH的水性缓冲体系并通过增加用于洗脱的缓冲液的离子强度(例如,通过添加氯化钠)来进行色谱分离。

[0106] 也可以使用本发明的色谱柱通过卤素键合来分离两种具有不同的pI(等电点)和/或不同的羧酸含量的蛋白质。羧酸,尤其是暴露在蛋白质表面的羧酸,可通过卤素键合与固定相相互作用。具有更高含量的可与固定相相互作用的羧酸基团的蛋白质将与固定相更强地结合并需要用更高的电导率来洗脱。实施例2.2中也示出了这一点。

[0107] 但键合了(优选通过接枝)所述官能团的基于亲水性基础材料的固定相也可用于分离有机溶剂体系中的目标分子。在这种情况下,可使用相同的溶剂、或通过缓慢增加与上样溶剂相比更极性的溶剂的量使用溶剂梯度,进行上样和洗脱。

[0108] 根据本发明的固定相还可包含疏水性基础材料,比如聚苯乙烯。所述官能团可例如经由合适的连接基团连接到聚苯乙烯基础材料。这样的固定相可合适地应用于使用有机溶剂进行上样和洗脱的低分子量化合物的分离。

[0109] 根据本发明的固定相和方法提供了一种新的可广泛应用的色谱分离原理。包含至少一个与带正电荷或可带电荷的芳环结构结合的Cl、Br或I的官能团的使用提供了广泛的配体,其可针对具体的分离任务进行调节。例如,卤素的选择可影响与目标分子相互作用的强度。通常,碘表现出最强的相互作用,其次是Br,而氯取代的官能团的相互作用最不强。

[0110] 另外,通过选择某些芳环结构或残基,也可改变相互作用的模式。例如,通常,芳环结构处的吸电子残基会扩大卤素结合效应,而给电子或烷基基团会降低卤素键合强度。可根据目标分子和待进行的分离来调节官能团的卤素结合强度。例如,可从仅包含一个Cl、Br或I残基并且除H外不包含其他残基的结构开始。如果要扩大强度,则可将卤素原子的类型换为Br或I和/或可增加卤素原子的数量和/或可插入另外的吸电子残基。另一方面,如果要降低卤素键合强度,则可将卤素原子的类型换为Br或Cl和/或可插入给电子基团,例如,0-

烷基基团或烷基基团。

[0111] 在一个实施方案中,根据本发明的固定相的卤素结合性质可被开启和关闭。当使用包含如式I或II中所示的官能团的固定相时,通过将苯胺样物质的氮原子质子化而包含与芳环相邻的正电荷,可以在低pH条件下“活化”固定相。只要与芳环相邻的氮原子被质子化,它就充当吸电子基团,从而支持位于相邻芳环处的卤素原子处的 σ 空穴和因此经由卤素键合的目标分子结合。然后可通过只是升高pH并通过使N原子去质子化从而消除其吸电子功能而使固定相“失活”来进行洗脱。

[0112] 也可以通过使用高浓度的盐比如氯化钠来抑制固定相的库仑相互作用。

[0113] 无需进一步详尽阐述,相信本领域技术人员可使用前面的描述充分利用本发明。优选的具体实施方案和实施例因此应解释为仅仅是示意性的,而不以任何方式限制本公开的其余部分。

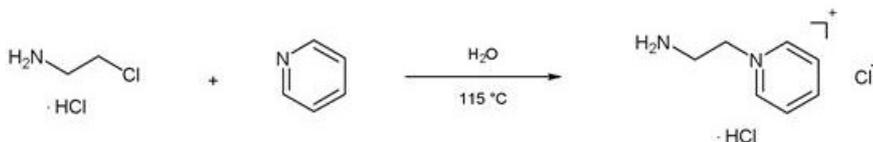
[0114] 上文和下文引用的所有申请、专利和出版物以及2019年10月24日提交的相应欧洲专利申请EP19205109.2的全部公开内容通过引用并入本文。

实施例

[0115] 以下实施例代表本发明的实际应用。

[0116] 1. 合成

N-(2-氨基乙基)-氯化吡啶鎓盐酸盐的合成



在圆底烧瓶中装入2-氯乙胺盐酸盐(4.04g,34.8mmol,1当量)和吡啶(5.40mL,68mmol,2当量)。在加入水(14mL)后,搅拌该两相体系并加热至回流14小时。澄清的黄色溶液用甲苯(2×25mL)、正戊烷(20mL)和异丙醇(3×50mL)洗涤并真空蒸发至干。得到呈无色固体的*N*-(2-氨基乙基)-氯化吡啶鎓盐酸盐。

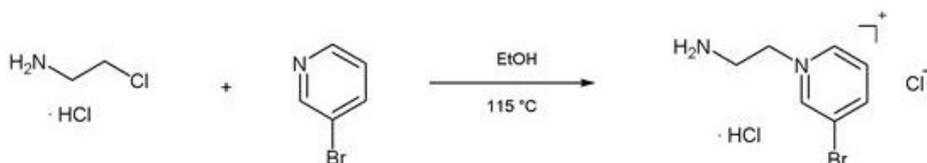
[0117] 收率:5.54g (28.4mmol,82%)。

[0118] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ = 3.80 (m, 2H, $\text{H}_2\text{N-CH}_2$), 5.08 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C-N}_{\text{吡啶}}$), 8.24 (m, 2H, 间位-H), 8.71 (m, 1H, 对位-H), 9.03 ppm (m, 2H, 邻位-H)。

[0119] Mp.:199 - 202°C。

[0120] MS (ESI) +:123.0 (100 %) $[\text{M}]^+$, 281.1 (22 %) , 2 $[\text{M}]^+ \text{Cl}^-$ 。

[0121] *N*-(2-氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓盐酸盐的合成



将2-氯乙胺盐酸盐(30.2g,260mmol,1当量)和3-溴吡啶(46.0g,291mmol,1.1当量)在乙醇(100mL)中的溶液搅拌并加热至回流两周。过滤沉淀物并用乙醇(5×5mL)洗涤。得到呈无色固体的*N*-(2-氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓盐酸盐。将滤液部分蒸发并再次加热至回流一周。所得无色固体用乙醇(5×5mL)洗涤,真空蒸发至干并加到先前的产物中。

[0122] 收率:41.2g (211mmol,81%)。

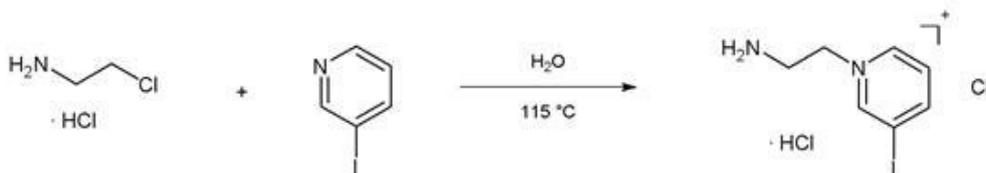
[0123] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ = 3.68 (t, 2H, J = 7 Hz, $\text{H}_2\text{N-CH}_2$), 4.95 (t, 2H, J = 7 Hz, $\text{H}_2\text{C-N}_{\text{吡啶}}$), 8.03 (m, 1H, 间位-H), 8.79 (m, 1H, 对位-H), 8.94 (m, 1H, 邻位-CH-CH-) 9.25 ppm (m, 1H, 邻位-CH-CBr-)。

[0124] 元素分析:计算值:N 10.26 %、C 30.69 %、H 4.05 %,测量值:N 10.34 %、C 30.76 %、H 3.99 %。

[0125] Mp.:237°C

MS (ESI) +:202.9 (100 %) $[\text{M}]^+$, 157.8 (6 %) $[\text{3-溴吡啶鎓}]^+$ 。

[0126] *N*-(2-氨基乙基)-3-碘氯化吡啶鎓盐酸盐的合成



将2-氯乙胺盐酸盐(30.0g,259mmol,1当量)与3-碘吡啶(57.2g,279mmol,1.1当量)溶解在乙醇(100mL)中,搅拌并加热至回流一周。过滤沉淀物并用乙醇(6×20mL)洗涤。得到呈无色固体的*N*-(2-氨基乙基)-3-碘氯化吡啶鎓盐酸盐。将滤液部分蒸发并再次加热至回流一周。所得无色固体用乙醇(4×5mL)洗涤,真空蒸发至干并加到先前的产物中。重复该程序直至总收率为76%。

[0127] 收率:68.2g (213mmol,76%)。

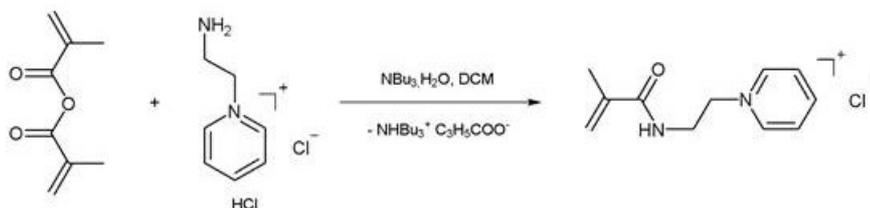
[0128] Mp.:268.2°C。

[0129] 元素分析:计算值:N 8.73 %、C 26.19 %、H 3.45 %,测量值:N 8.82 %、C 26.24 %、H 3.41 %。

[0130] MS (ESI) +:248.9 (100 %) $[\text{M}]^+$ 。

[0131] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ = 3.64 (t, 2H, J = 7 Hz, $\text{H}_2\text{N-CH}_2$), 4.88 (t, 2H, J = 7 Hz, $\text{H}_2\text{C-N}_{\text{吡啶}}$), 7.84 (t, J = 6 Hz 1H, 间位-H), 8.91 (m, 2H, 对位-H, 邻位-CH-CH-), 9.28 ppm (s, 1H, 邻位-CH-CBr-)。

[0132] 1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-氯化吡啶鎓的合成



将*N*-(2-氨基乙基)-氯化吡啶鎓盐酸盐(38.6g,147mmol)溶解在水(50mL)中,然后加入二氯甲烷(200mL)、三丁胺(54.7g,295mmol)和甲基丙烯酸酐(24.8g,161mmol)。将反应在室温下搅拌18小时,然后通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱法检查剩余的*N*-(2-氨基乙基)-氯化吡啶鎓。如果有剩余,则分离水层并再次与二氯甲烷混合,根据剩余的离析物添加三丁胺和甲基丙烯酸酐。

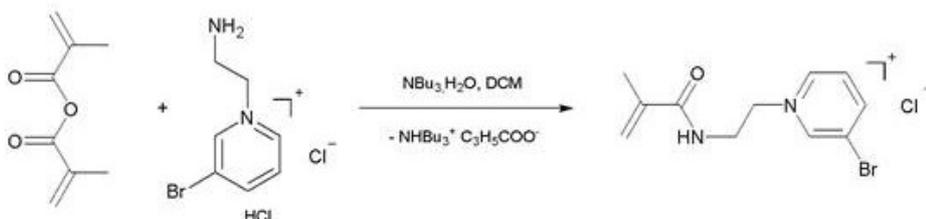
[0133] 分离水相并用二氯甲烷(2×50mL)洗涤。由于产物的聚合倾向,故通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱法在具有四苯基氯化磷的水溶液中测定收率。

[0134] 收率:26.2g (116mmol,71%)

MS (ESI) +:191.0 (100 %) $[M]^+$, 234.1 (28 %) $[1-(2-((2-甲基丙烯酰氨基乙基)氨基)乙基)吡啶鎓]^+$ 。

[0135] $^1\text{H-NMR}$ (H_2O , 300 MHz): $\delta = 1.69$ (s, 3H, CH_3), 3.77 (q, 2H, $J = 6$ Hz, HN-CH_2), 4.72 (t, 2H, $J = 5$ Hz, $\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2$), 5.32 (s, 1H, $=\text{CH}^{\text{a}}$), 5.51 (s, 1H, $=\text{CH}^{\text{b}}$), 8.01 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 间位-H), 8.18 (m, 1H, NH), 8.49 (m, 1H, $J = 8$ Hz, 对位-H), 8.81 (d, 2H, $J = 6$ Hz, 邻位-H)。

[0136] 1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓的合成



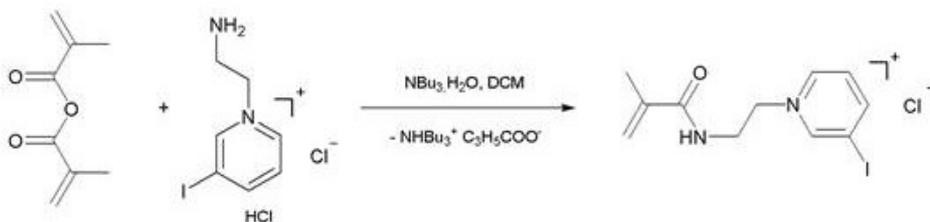
将 N -(2-氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓盐酸盐(3.09g,13.0mmol)溶解在水(5mL)中,然后加入二氯甲烷(50mL)、三丁胺(3.38g,14.2mmol)和甲基丙烯酸酐(2.24g,14.2mmol)。将反应在室温下搅拌19小时,然后通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱法检查剩余的 N -(2-氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓。如果有剩余,则分离水层并再次与二氯甲烷混合,根据剩余的离析物添加三丁胺和甲基丙烯酸酐。在室温下搅拌六小时后,分离水相,用二氯甲烷($3 \times 30\text{mL}$)洗涤并真空蒸发至干。得到呈棕色玻璃的3-溴-1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-氯化吡啶鎓。

[0137] 收率:2.77g (9.02mmol,70%)。

[0138] MS (ESI) +:217.0 (100 %) $[M]^+$, 575.0 (6 %) $2[M]^+\text{Cl}^-$ 。

[0139] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): $\delta = 1.78$ (s, 3H, CH_3), 3.81 (m, 2H, HN-CH_2), XXX (m, 2H, $\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 5.41 (s, 1H, $=\text{CH}_2^{\text{(A)}}$), 5.58 (s, 1H, $=\text{CH}_2^{\text{(B)}}$), 7.97 (m, 1H, 间位-H), 8.25 (m, 1H, 对位-H), 8.88 (m, 1H, N-CH-CH), 9.20 (s, 1H, N-CH-CBr)。

[0140] 3-碘-1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-氯化吡啶鎓的合成



将 N -(2-氨基乙基)-3-碘氯化吡啶鎓盐酸盐(32.0g,99.7mmol)溶解在水(50mL)中,然后加入二氯甲烷(200mL)、三丁胺(37.0g,200mmol)和甲基丙烯酸酐(17.8g,116mmol)。将反应在室温下搅拌17小时,然后通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱法检查剩余的 N -(2-氨基乙基)-3-碘氯化吡啶鎓。如果有剩余,则分离水层并再次与二氯甲烷混合,根据剩余的离析物添加三丁胺和甲基丙烯酸酐。

[0141] 分离水相,用二氯甲烷($2 \times 100\text{mL}$)洗涤并蒸发至干。留下呈棕色固体的3-碘-1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-氯化吡啶鎓。

[0142] 收率:33.76g (95.7mmol,96%)。

[0143] Mp.:254.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0144] 元素分析:计算值:N 7.94 %、C 37.47 %、H 4.00 %,测量值:N 7.67 %、C 36.14 %、H 4.35 %。

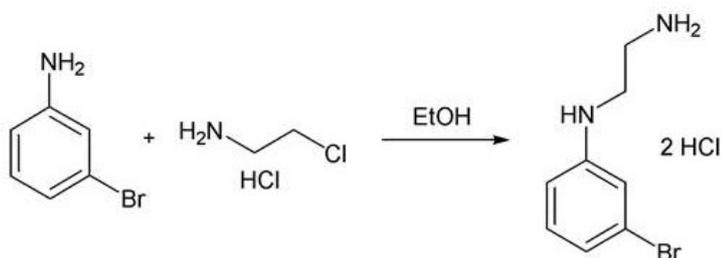
[0145] MS (ESI) $+$:317.0 (100 %) $[M]^+$ 。

[0146] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ = 1.79 (s, 3H, CH_3), 3.80 (t, J = 6 Hz, 2H, HN-NH_2), 5.41 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 5.57 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 7.79 (t, 1H, J = 7 Hz, 间位-H), 8.21 (m, 1H, NH), 8.86 (m, 2H, N-CH-CH-CH-), 9.22 ppm (s, 1H, N-CH-Cl-)。

[0147] $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -DEPT135-NMR (D_2O , 75 MHz): δ = 17.7 (CH_3), 39.8 ($-\text{NH-CH}_2-$), 61.2 ($-\text{NH-CH}_2-\text{CH}_2-$), 82.3 (Cl), 121.8 ($=\text{CH}_2$), 128.5 (间位-C), 138.3 ($\text{H}_3\text{C-C}$), 143.7 (N-CH-CH-), 150.3 (N-CH-Cl-), 154.4 (对位-C), 172.2 ppm (C=O)。

[0148] ^1H , ^{13}C -HMBC (D_2O , 300/75 MHz): δ = 4.7 / 61.2 ppm (J = 147 Hz, $\text{NH-CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$)。

[0149] N-(3-溴苯基)乙烷-1,2-二胺的合成



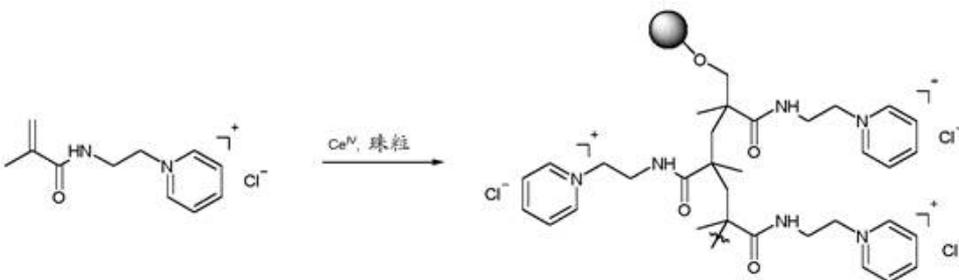
将3-溴苯胺(3.000g,25.86mmol)、2-氯乙烷-1-胺盐酸盐(4.786g,27.82mmol)和乙醇(11mL)加到100ml破碎器中。将反应混合物于室温下搅拌几分钟。然后将其放入微波反应容器中。将反应容器置于微波中并选择和开始以下方法:方法:快速测试;温度:110℃;功率:300W;压力:x巴;保持时间:30分钟;搅拌:关;冷却:关。冷却后选择和开始新的方法:方法:新方法;温度:120℃;功率:300W;压力:8巴;保持时间:30分钟;搅拌:开(中等);冷却:开。冷却过夜后过滤粉红色晶体,用异丙醇洗涤并真空蒸发至干。

[0150] 收率:1.221g (4.24mmol,16%)。

[0151] Mp.:212.0℃ - 213.0℃

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ = 3.12 (m, 2H, $\text{H}_2\text{N-CH}_2$), 3.38 (m, 2H, HN-CH_2), 6.66 (m, 1H, 邻位-CH-CH), 6.88 (m, 2H, 邻位-CH-CBr, 对位-H), 7.07 (m, 1H, 间位-H)。

[0152] 用1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)氯化吡啶鎓官能化珠粒



将1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-氯化吡啶鎓在水溶液(1.29mol/L,2.13mL,2.75mmol)中加到三颈圆底烧瓶中并加入水(15.3mL)。用硝酸将pH设置为1.5。加入由带有

OH基团的亲水性聚乙烯醚珠粒制成的基础材料,该基础材料类似于市售的Eshmuno®吸着剂(17.0g,湿)(珠粒)的基础材料。通过向滴液漏斗中加入硝酸(239 μ L,3.85mmol)、水(7mL)和硝酸铵铈(515mg,939 μ mol)来制备引发剂溶液。两种混合物均通过真空和氮气脱气。将悬浮液加热至30 $^{\circ}$ C并尽可能快地加入引发剂溶液。将混合物搅拌四小时,然后过滤并用以下物质洗涤:

3 \times 100mL去矿物质水(超纯水/Milli-Q®水)=VE水(去离子水)

7 \times 100mL 1M硫酸,0.2M抗坏血酸

10 \times 100mL去矿物质水

2 \times 100mL 1M氢氧化钠溶液

2 \times 100mL去矿物质水

用25%的盐酸调节pH至6.5 - 7.0

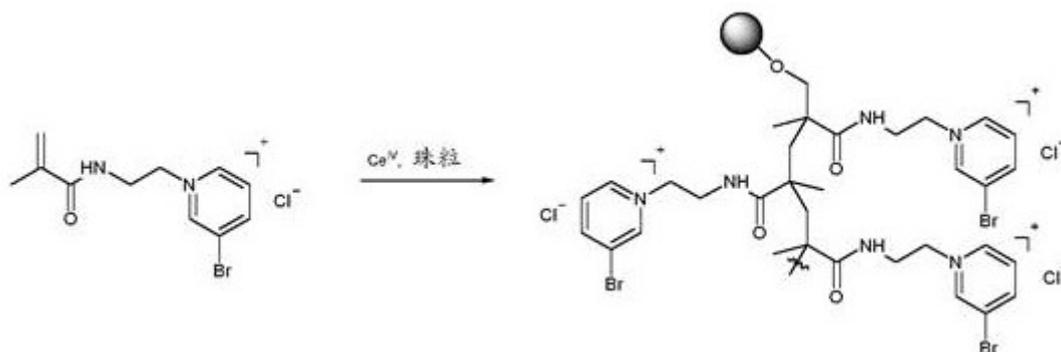
1 \times 100mL去矿物质水

1 \times 100mL乙醇。

[0153] 真空干燥所得无色固体

收率:3.38g。

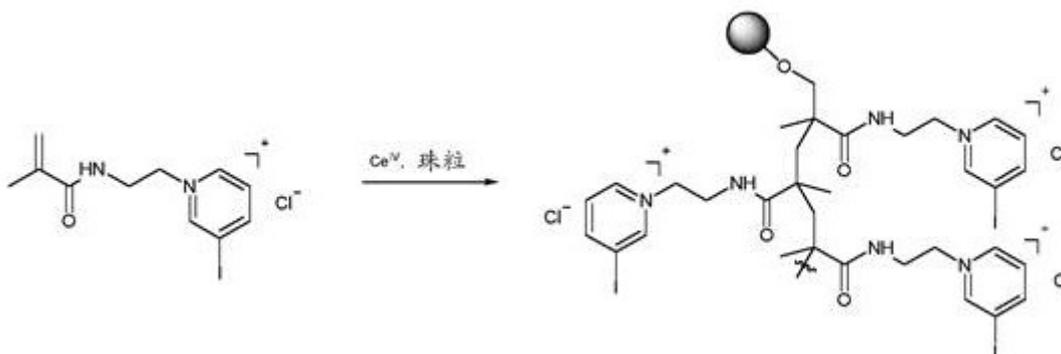
[0154] 用1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓官能化珠粒



将1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-3-溴氯化吡啶鎓(838mg,2.75mmol)加到三颈圆底烧瓶中并加入水(17.5mL)。用硝酸将pH设置为1.5。加入珠粒(17.0g,湿)。通过向滴液漏斗中加入硝酸(239 μ L,3.85mmol)、水(7mL)和硝酸铵铈(515mg,939 μ mol)来制备引发剂溶液。两种混合物均通过真空和氮气脱气。将悬浮液加热至30 $^{\circ}$ C并尽可能快地加入引发剂溶液。将混合物搅拌四小时,然后过滤并如上所述洗涤。真空干燥所得无色固体。

[0155] 收率:3.17g。

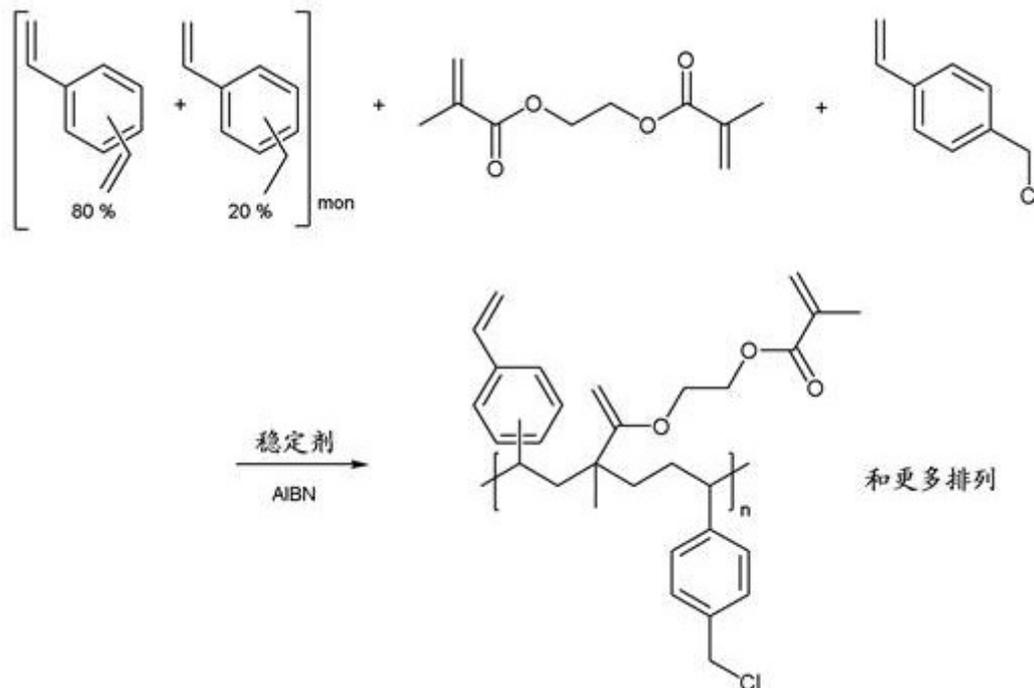
[0156] 用1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-3-碘氯化吡啶鎓官能化珠粒



将1-(2-甲基丙烯酰氨基乙基)-3-碘氯化吡啶鎓(970mg, 2.75mmol) 加到三颈圆底烧瓶中并加入水(17.5mL)。用硝酸将pH设置为1.5。加入珠粒(17.0g, 湿)。通过向滴液漏斗中加入硝酸(239 μ L, 3.85mmol)、水(7mL)和硝酸铵铈(515mg, 939 μ mol)来制备引发剂溶液。两种混合物均通过真空和氮气脱气。将悬浮液加热至30 $^{\circ}$ C并尽可能快地加入引发剂溶液。将混合物搅拌四小时,然后过滤并如上所述洗涤。真空干燥所得无色固体。

[0157] 收率:3.22g。

[0158] 基于苯乙烯的固定相的合成



向反应器中装入VE-水、十二烷-1-磺酸钠盐(表面活性剂)和聚乙烯醇40-88(稳定剂),并加入由DVB/乙基苯乙烯(80/20, 83.2g)、EGDMA(41.6g)、4-乙基苄基氯(13.9g)、甲苯(90.3g)、2-亚乙基-1-己醇(hexanole)(90.3g)和AIBN(1.0g)组成的有机相。

[0159] 将搅拌器速度设置为500rpm,持续10秒,并将所得乳液于25 $^{\circ}$ C下搅拌30分钟。

[0160] 加入水(640g)并将搅拌器的速度设置为120rpm。在乳液稳定后,开始温度斜坡。90分钟内从25 $^{\circ}$ C升至72 $^{\circ}$ C并在72 $^{\circ}$ C下保持120分钟。20分钟内从72 $^{\circ}$ C升至82 $^{\circ}$ C并在82 $^{\circ}$ C下保持120分钟。然后使温度在30分钟内降至60 $^{\circ}$ C并在此温度下保持12小时。

[0161] 所得聚合物用VE水和有机溶剂洗涤。

[0162] 然后将聚合物在真空中于50 $^{\circ}$ C干燥24小时。

[0163] 分析

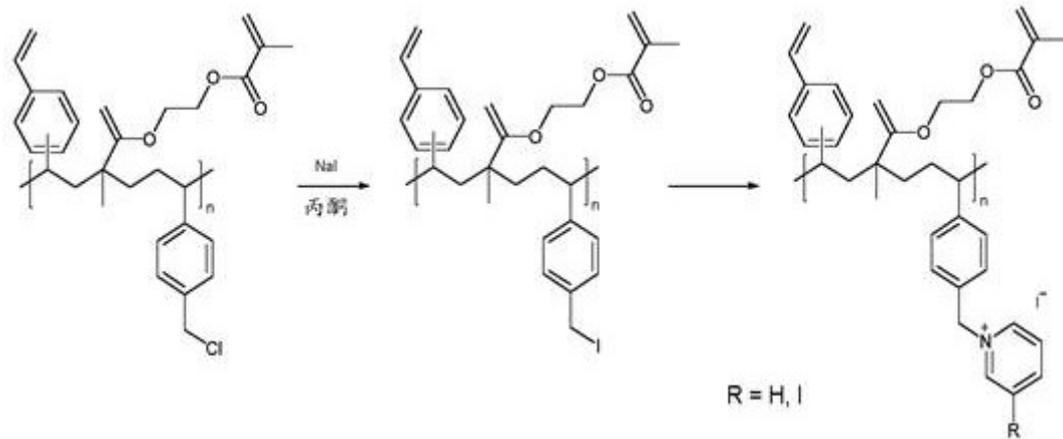
计算的Cl含量:2.33% Cl

X-射线荧光分析:2.5% Cl

元素分析:0.62% Cl。

[0164] 官能团的连接

基于苯乙烯的聚合物可在氯处被官能化。为此,首先通过Finkelstein反应将氯交换为碘,然后引入官能团。



[0165] 2. 应用实施例

2.1 使用官能化珠粒(具有如上所述制备的触角)来进行胰岛素的亲水分离

用官能化珠粒制备色谱柱。用带有用碘官能化的官能团的珠粒和带有不具有碘的官能团的珠粒制备柱。这样,如果所产生的分离仅对带有碘的固定相可见而其他方面相同但未被碘官能化的固定相则不可见,则可以确保所产生的分离确实是由于卤素键合。

[0166] 如下处理包含胰岛素和A21-脱酰胺胰岛素的样品:

条件1:

洗脱液: (A) 50mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH3.5

(B) 50mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1M NaCl pH3.5

梯度: 0-15min 100% (A)

30-50min 50% (A) 50% (B)

流速: 0.5mL/min

检测: UV214nm

温度: 25°C

结果可在图1中看到。

[0167] 曲线图示出了以下固定相的色谱图:

A 用带碘的官能团官能化的珠粒

B 用带碘的官能团官能化的珠粒(与A相比一半的量的官能团)

C 用无碘的官能团官能化的珠粒

D 用无碘的官能团官能化的珠粒(与C相比一半的量的官能团)

E 基础珠粒 - 未官能化

可以看到,使用带碘基团的材料曲线图A和B与不具有碘的材料相比显示出更强的保留。但胰岛素和A21-脱酰胺胰岛素没有分离开。

[0168] 条件2:

洗脱液: (A) 100mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH7,3

(B) 100mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 1M NaCl pH7,3

梯度: 0-15min 100% (A)

30-50min 50% (A) 50% (B)

流速: 0.5mL/min

检测: UV214nm

温度: 25°C

结果可在图2中看到。

[0169] 曲线图示出了以下固定相的色谱图:

A 用带碘的官能团官能化的珠粒

B 用带碘的官能团官能化的珠粒 (与A相比一半的量的官能团)

C 用无碘的官能团官能化的珠粒

D 用无碘的官能团官能化的珠粒 (与C相比一半的量的官能团)

E 基础珠粒 - 未官能化

可以看到,使用带碘基团的材料的曲线图A和B与不具有碘的材料相比显示出更强的保留,并且它们显示出胰岛素和A21-脱酰胺胰岛素的分离。材料C、D和E仅显示出非常少的胰岛素和A21-脱酰胺胰岛素的保留和分离。

[0170] 这表明胰岛素和A21-脱酰胺胰岛素的保留和分离确实基于的是卤素键合。A/B和C/D中使用的材料之间的唯一差异在于碘残基。

[0171] 2.2 使用官能化珠粒 (具有如上所述制备的触角) 来进行不同蛋白质的亲水分离

与具有较高pI (等电点) 的蛋白质相比,具有较低pI的蛋白质往往更强地与根据本发明的碘化固定相结合。具有较低pI的蛋白质需要较强的离子强度来洗脱。另外,具有较高羧酸含量的蛋白质往往更强地与固定相结合。这种影响取决于蛋白质的三级结构,故还必须考虑羧酸的暴露。因此,可以容易地分离出蛋白质比如碳酸酐酶和In1B321-GFP。

[0172] 如下处理包含下表所列蛋白质中之一的样品:

洗脱液: (A) 20mM三(羟甲基)氨基甲烷, pH8

(B) 20mM三(羟甲基)氨基甲烷 + 1M NaCl, pH8

梯度: 0-16mL 100% (A)

16-96mL, 从100% (A) 至50% (A) 50% (B)

96-120mL 100% (B)

流速: 4mL/min

检测: UV280 / UV260

温度: 4°C

名称	MW /		#Carboxy/MW	洗脱电导率
	kDa	pI		mS/cm
SD12	18	4.6	1.56	16.40
SD12_EKGE461ATGT	18	4.6	1.44	17.00
SD12_meth	18	4.6	1.56	16.00
SD12_EE480AA	18	4.7	1.44	15.70
SD12_EKGE461AHGH	18	4.8	1.44	17.10
B38	55	5.3	1.09	15.70
MBP	43	5.5	1.19	6.06
Pia-1	56	5.9	1.16	9.60
InlB321-GFP	60	5.9	1.17	17.40
碳酸酐酶	29	6.6	0.97	1.60
核糖核酸酶 A	14	8.6	0.71	5.20
细胞色素 C	12	9.6	1.00	7.95

此表示出了受试蛋白质的名称及其各自的值。MW:以kDa为单位的分子量,pI:等电点,#Carboxy/MW:羧酸数除以分子量,以及最大洗脱峰处的电导率。

[0173] 固定相上的官能团与羧酸之间的相互作用通过由3-碘-1-甲基吡啶鎓乙酸盐获得的晶体结构证明。尽管范德华半径之和为345pm,但碘与氧之间的距离仅为286pm。因此存在结合相互作用。

[0174] 2.3 使用官能化珠粒(如上所述制备)进行低分子量化合物的疏水分离

将固定相填充到玻璃柱中。洗脱液为正戊烷。用正戊烷洗涤柱,然后向柱施加分析物。借助于硅胶TLC板用UV指示剂和UV灯在柱出口处进行检测。 R_f 基于化合物洗脱前所用溶剂的重量除以每柱体积的溶剂质量来计算。

[0175] 结果可在表1中看到。

	无卤素 R _F -值	有 Br R _F -值	有 I R _F -值*
甲苯	2.97	2.72	3.64 (34 %)
苯	2.88	2.93	3.79 (29 %)
苯甲醚	2.74	3.11	3.93 (26 %)
PPh ₃	3.23	2.87	4.05 (41 %)
苯甲醛	2.75	3.26	4.20 (29 %)
吡啶	3.34	3.48	4.38 (25 %)
苯胺	5.49	5.17	7.72 (50%)
苄醇	5.98	5.30	8.06 (52 %)

[0176] 以R = H的树脂作为参考。具有给电子官能的不同物质以正戊烷作为流动相过柱。结果示出了保留因子,其在参考材料与Br-取代材料之间没有太大差异。但I-取代材料的保留因子与Br-取代材料相比显示出显著的升高(括号中的百分数)。取决于物质的官能团,限制高出25%至52%。

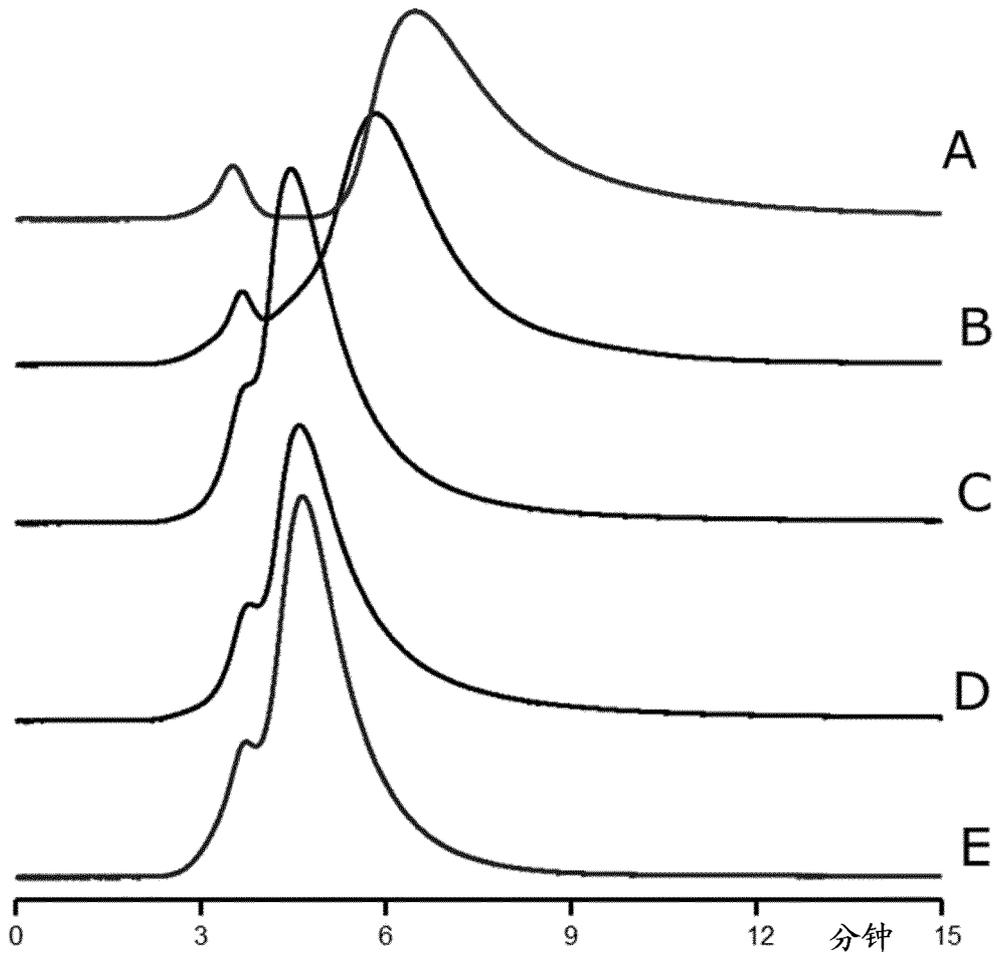


图 1

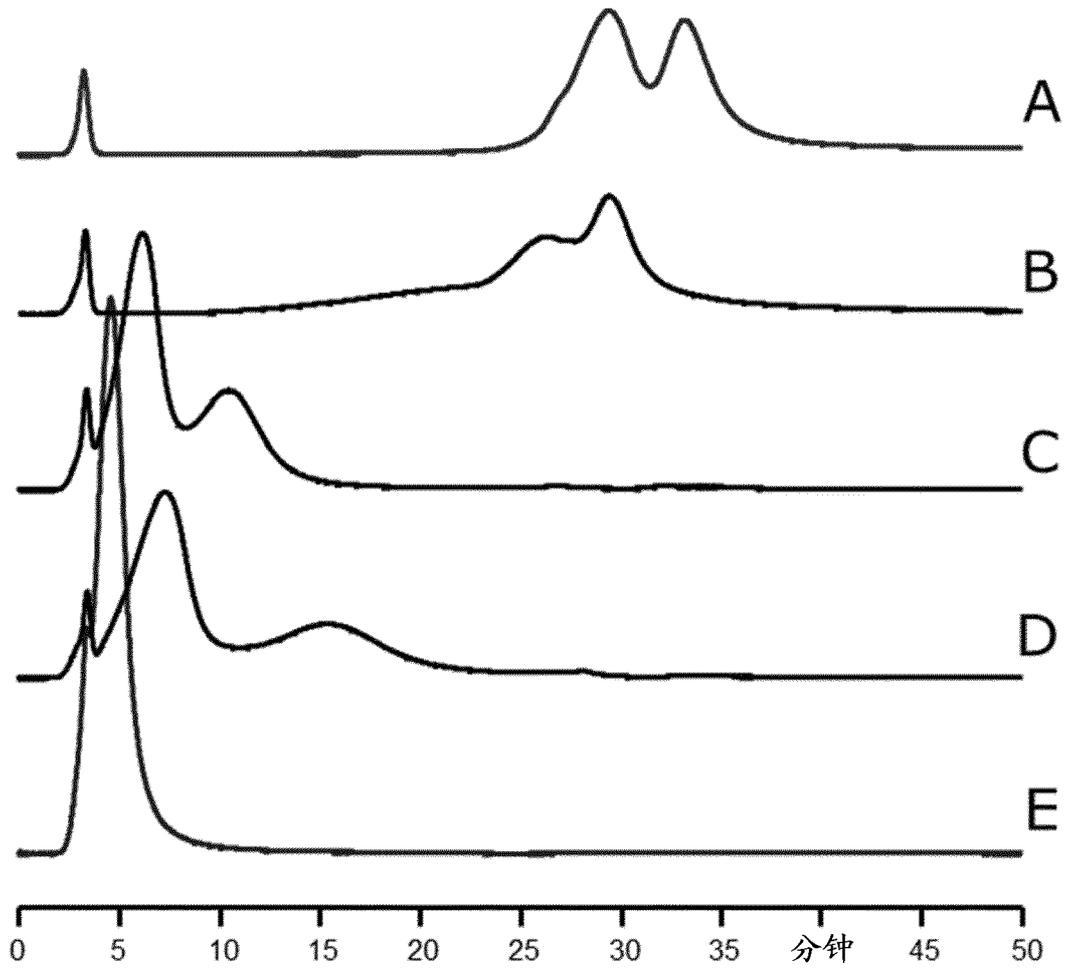


图 2