

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4485742号
(P4485742)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月2日(2010.4.2)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 B 63/00 (2006.01)	C O 7 B 63/00 F
C O 7 B 57/00 (2006.01)	C O 7 B 57/00 3 1 0
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z
G O 1 N 33/566 (2006.01)	G O 1 N 33/566

請求項の数 19 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-532935 (P2002-532935)	(73) 特許権者	502266191 クランフィールド ユニバーシティ イギリス国, ベッドフォードシャー エム ケー45 4ディーティー, ミルトン ケ イネス, シルソエ
(86) (22) 出願日	平成13年10月4日(2001.10.4)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(65) 公表番号	特表2004-510788 (P2004-510788A)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(43) 公表日	平成16年4月8日(2004.4.8)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/004446	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 国際公開番号	W02002/029412	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(87) 国際公開日	平成14年4月11日(2002.4.11)		
審査請求日	平成16年10月1日(2004.10.1)		
(31) 優先権主張番号	0024276.8		
(32) 優先日	平成12年10月4日(2000.10.4)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択的結合材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鋳型材料に選択的に結合することができる選択的結合材料を調製するための方法であって、

(a) 鋳型材料及び分散媒を含んで成る組成物を調製し；

(b) 当該組成物を凍結し；そして

(c) 凍結した組成物から少なくとも部分的に鋳型材料を除去し、結合部位であって鋳型材料が除去された部位を有する凍結した分散媒を残すこと、

を含んで成る方法。

【請求項 2】

段階(c)において、鋳型材料がそれらの溶媒を用いて洗浄することによって除去される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

段階(c)において、鋳型材料が電気透析によって除去される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

鋳型材料が、タンパク質、生物学的受容体、核酸、染色体、細胞、ウイルス、微生物、組織試料、炭水化物、オリゴ糖、多糖、核タンパク質、ムコタンパク質、リポタンパク質、合成タンパク質、糖タンパク質、グルコサミノグリカン、ステロイド、免疫抑制剤、ホルモン、ヘパリン、抗生物質、ビタミン及び薬物から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

分散媒が水、水性溶媒、無機性の液体、有機溶媒、金属、可融性の有機化合物、可融性の無機化合物、ポリマー及びガスから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記分散媒が液体であり、そして段階(a)で調製された前記組成物が鋳型材料の溶液である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

溶液が水によるものであり、そして鋳型材料がタンパク質である、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

鋳型材料が固体の支持体上に固定化されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

鋳型材料が異なる融点を有する二層間に分配されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

結合部位であって鋳型材料が除去された部位を有する凍結した分散媒から成る、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製される、選択的結合材料。

【請求項 11】

分離マトリックスとしての請求項 10 に記載の材料の使用。

20

【請求項 12】

鋳型材料又はその類似物を検査し、又はアッセイするためのセンサー又はアッセイのための認識因子としての請求項 10 に記載の材料の使用。

【請求項 13】

分子種を検出し、又はアッセイするための方法であって、
 (a)分散媒及び、前記分子種と選択的に相互作用することができる材料、を含んで成る組成物を調製し；
 (b)当該組成物を凍結し；そして
 (c)凍結した組成物を、当該凍結した組成物中の前記材料と選択的に相互作用するように、前記分子種を含む溶液と接触させること、
 を含んで成る方法。

30

【請求項 14】

選択的に相互作用することができる材料が、タンパク質、生物学的受容体、核酸、染色体、細胞、ウイルス、微生物、組織試料、炭水化物、オリゴ糖、多糖、核タンパク質、ムコタンパク質、リポタンパク質、合成タンパク質、糖タンパク質、グルコサミノグリカン、ステロイド、免疫抑制剤、ホルモン、ヘパリン、抗生物質、ビタミン及び薬物から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

分散媒が水、水性溶媒、無機性の液体、有機溶媒、金属、可融性の有機化合物、可融性の無機化合物、ポリマー及びガスから選択される、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記分散媒が液体であり、そして段階(a)で調製された前記組成物が選択的に相互作用することができる材料の溶液である、請求項 14 又は 15 に記載の方法。

【請求項 17】

溶液が水によるものであり、そして選択的に相互作用することができる材料がタンパク質である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

選択的に相互作用することができる材料が固体の支持体上に固定化されている、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 19】

選択的に相互作用することができる材料が異なる融点を有する二層間に分配されている、請求項 13 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、選択的結合材料、それらの調製及び使用に関する。

【0002】

背景技術

Polyakovは、1930年代に鑄型分子の存在下でケイ酸を濃縮することによって調製した基質特異的材料について説明した(Zhur. Fiz. Khim.2:799(1931);10:100(1937);4:454(1933))。更に最近の研究者は、鑄型分子の存在下で重合化される、有機モノマーを使用してきた(例えば、米国特許第5110833号、第5728296号、第5756717号、WO 9641173)。

10

【0003】

発明の開示

最初の観点において、本発明は、鑄型材料に選択的に結合することができる選択的結合材料を調製するための方法であって、

(a)鑄型材料及び分散媒を含んで成る組成物を調製し；

(b)当該組成物を凍結し；そして

(c)凍結した組成物から少なくとも部分的に鑄型材料を除去し、結合部位であって鑄型材料が除去された部位を有する凍結した分散媒を残すこと、

20

を含んで成る方法、を提供する。

【0004】

鑄型材料は、タンパク質、生物学的受容体、核酸、染色体、細胞、ウイルス、微生物、組織試料、炭水化物、オリゴ糖、多糖、核タンパク質、ムコタンパク質、リポタンパク質、合成タンパク質、糖タンパク質、グルコサミノグリカン、ステロイド、免疫抑制剤、ホルモン、ヘパリン、抗生物質、ビタミン及び薬物から選択されることがある。

【0005】

分散媒は、水、水性溶媒、水溶液、無機性の液体、有機溶媒、金属、可融性の有機化合物、可融性の無機化合物、ポリマー及びガスから選択されることがある。鑄型材料が分子である場合、分散媒は通常その溶媒である。組成物は懸濁液であってもよく、これは通常鑄型材料が複合体、例えば組織試料である場合の状態である。熔融金属は、通常低融点の金属、例えば水銀及びガリウムに限定される。温度及び/又は圧力の調整によって液化され、そして凝固されうる気体も使用され得る。

30

【0006】

好ましい組成物は、例えばタンパク質の水溶液である。

【0007】

組成物は二層の系であってもよく、例えば不混和性溶媒(例えば、水と有機溶媒、例えばクロロホルム又はエーテル)間に分配された鑄型材料を含むものである。これらのうちのより高温で凍結するものだけが段階(b)で凍結され得る。

40

【0008】

鑄型材料が可溶性である場合、段階(c)は通常、好ましくは凍結した分散媒が実質的に可溶でない溶媒を用いる(例えば、クロロホルム、アセトニトリル又は氷から材料を除去するための他の有機溶媒又は混合物を用いる)、その溶解を包含する。適当な材料は、電気透析によって除去することができる。粒子材料の場合は特に、機械的な除去が適切なことがある。

【0009】

本発明は、好ましくは500Daを超える分子サイズの鑄型分子を使用する。

【0010】

凍結してインプリントされた液体は、インプリントされていない材料より優れた所定の親

50

和性及び特異性を有し、そして伝統的な架橋型インプリントポリマーよりもはるかに容易に調製され得る。本発明に記載の様に調製された材料は、分離及び精製における吸着剤として、並びにセンサー及びアッセイにおける触媒及び認識材料として使用され得る。

【0011】

第二の観点において、本発明は、上記方法によって調製されるような選択的結合材料を提供する。

【0012】

更なる観点において、本発明は、選択的な結合能を活用するその様な材料の使用を提供する。分離マトリックスとしての使用を以下に例示する。センサー又はアレイにおける使用例は、それらを利用する免疫センサー及びアッセイにおける抗体の代わりに我々の材料を用いることを包含することがある。触媒としての使用例は、鑄型材料として遷移状態に類似するものを利用して、その様な遷移状態を介して進行する反応を触媒することができる材料を製造することを包含する。

【0013】

より更なる観点において、本発明は、選択的結合材料を調製し、そして使用方法であって：

(a) 鑄型材料及び分散媒を含んで成る組成物を調製し；

(b) 当該組成物を凍結し；そして

(c) 凍結した組成物を、凍結した組成物中の鑄型材料と選択的に相互作用する分子種を含む溶液と接触させること、
を含んで成る方法を提供する。

【0014】

伝統的なインプリントポリマー化は、小さな有機物質、例えば薬物、又はタンパク質若しくは細胞でもありうる鑄型の周囲の硬質ポリマーネットワークの形成を含む。この方法で調製した分子インプリントポリマー(MIP)は、支配的に共有結合の相互作用によって共に結合したモノマーから成る。

【0015】

本発明は、様々な観点において、鑄型の存在下で溶媒又は他の液体を凍結することによる基質特異的材料の形成を説明する。溶媒が、せいぜい機能性モノマーと鑄型との間の複合体の形成を容易にする反応媒体という第二の役割を果たす伝統的なMIPの調製とは反対に、この新規なアプローチは、凍結した溶媒が吸着剤として作用する能力に依拠する。鑄型の存在下で調製された場合、凍結した溶媒は、空にされ、そして鑄型分子の再結合のために使用され得る鑄型分子によって占められた空洞を含む。形成したインプリントの構造は、鑄型分子のものと類似の構造及び形状を有する鑄型又は分子の構造と相補的であるべきである。

【0016】

鑄型材料が凍結した分散媒から除去されない態様において、鑄型は固定されたままである。当該分子、懸濁液の粒子又は組織の少なくとも一部は、曝露され、そしてその後の作用(認識、結合、触媒、検出等)にとって利用可能なままである。その様な材料は、分離マトリックス、センサー又はアッセイの因子として、並びに触媒として使用され得る。

【0017】

本発明の実施形態

1. イソプロテレノール特異的吸着剤の調製

Sephadex G25を、試料当たり30mg、フィルトレーションマイクロプレートのウェルに移し、そして0.2mlの、1mg/mlの(+)-イソプロテレノール(+)-酒石酸水素塩溶液中で一晩膨潤させた。過剰な溶液を減圧下での濾過によって除去し、そして吸着剤を0.2mlのクロロホルムで2回で流した。膨潤した吸着剤を - 15 で12時間凍結した。吸着剤を - 15 でのアセトニトリルで4回洗浄した。ブランクの材料は、イソプロテレノールの非存在下であることを除き、同様の方法で調製した。調製した吸着剤の吸着特性は、0.1~10mg/mlに及ぶ濃度の相当する解析物の0.15mlのアリコートを追加することによって評価した。溶

10

20

30

40

50

液中のイソプロテレノールの濃度は、280nmで分光光度計によって測定した。吸収解析の結果は、鑄型の存在下で調製された氷が、図1のブランク試料よりも鑄型に対してより高い親和性を有することを示す。同時に、Sephadex G25自体はイソプロテレノールに対して親和性を有さない。

【0018】

イソプロテレノールの存在下で調製した同一の材料は、イソプロテレノールと類似の構造を有する化合物を用いた実験においてHPLCによって解析された。この解析結果は、氷が溶液中に存在した標的化合物に対して最大の親和性を有することを示す(図2)。HPLCカラム(100x4.6mmの内径)は、1mg/mlの(+イソプロテレノール(MIP)又は水(ブランク)中で膨潤した約1gのSephadex G25で充填した。カラムをクロロホルムで洗浄し、そして-15
10
で12時間凍結した。全てのクロマトグラフィーの実験は、280nmでの検出及び1ml/分の流速を用いて-10で実施した。カラムは、安定な基準線が得られ、そして溶媒が10%水性アセトニトリルで交換されるまでオンラインで洗浄した。0.1mg/mlの濃度の、20µlの解析物の溶液をインジェクションに使用した。Ipr(+は(+イソプロテレノール、Ipr(-)は(-イソプロテレノール、Pheはフェニレフリン、Proはプロプラノロール、Epiはエピネフリン、Nepはノルエピネフリンである。

【0019】

2. L-フェニルアラニン特異的材料の調製

本実験は、Waters社の、キャピラリー電気泳動ユニットQuanta 4000Eを用いて実施した。キャピラリー(fused silica, 80cm, 100µmの内径、Polymicro Technologies, Hallow, UK
20
)の35cm部分を、冷凍ユニットと繋がれ、そして-14.5の温度に冷却された断熱チューブに挿入した。キャピラリーは、9.5mM HCl中のL-Pheの2mM溶液を充填され、そしてキャピラリーの管腔の内側にある液体の完全な凍結を可能にするために、-14.5で1時間インキュベートされた。氷から鑄型を溶出するために、13kVの電圧をキャピラリーに適用し、そして基準線が安定するまで維持された。9.5mM HCl中で2mMの濃度に希釈されたD-Phe, L-Phe又はラセミ化合物の試料は、キャピラリー内に流体力学的に6秒間インジェクションされた。ランは13kVを適用することによって実施された(電流は10µAである)。同一の実験は、鑄型の非存在下で形成した、ブランクの氷を用いて実施した。この解析結果は、L-Pheの存在下、キャピラリー中で形成した氷が鑄型に対して増大した親和性を有し、そして光学鏡像異性体を分離するために使用され得ることを証明した(図4)。
30
L-PheとD-Pheの分離は、コントロール(ブランク)の氷が充填されたキャピラリーが使用された場合には観察されなかった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、材料の存在下で形成した氷とその非存在下で形成した氷に対する鑄型材料(「mip」)の吸収を比較する吸着等温線を示す。

【図2a】 図2aは、解析物のうちの1つを存在下で調製した選択的結合材料を含むカラムを通過した各種解析物の容積比K'を示す。

【図2b】 図2bは、解析物のうちの1つを存在下で調製した選択的結合材料を含むカラムを通過した各種解析物の分離係数を示す。

【図3】 図3は、L-フェニルアラニンの存在下で形成した氷で充填されたキャピラリー中のD-フェニルアラニンとL-フェニルアラニンの混合物の電気泳動結果を示すトレースである。
40

【 図 1 】

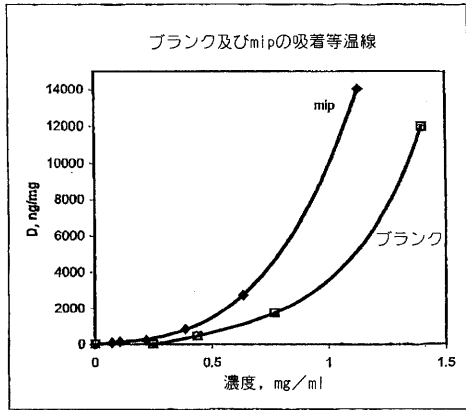


Fig. 1

【 図 2 a 】

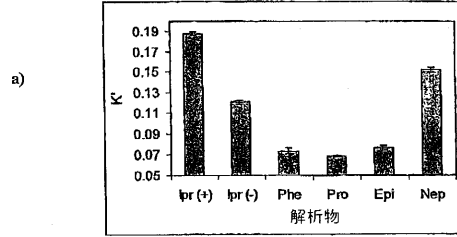


Fig. 2a

【 図 2 b 】

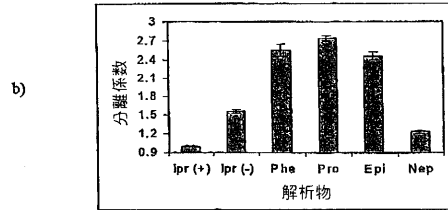


Fig. 2b

【 図 3 】

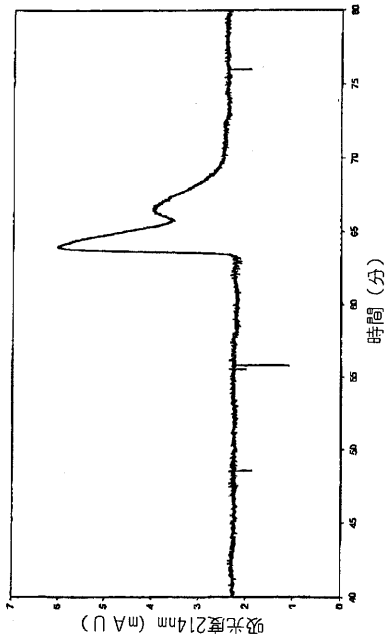


Fig. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 C 213/10	(2006.01)	C 0 7 C 213/10
C 0 7 C 215/60	(2006.01)	C 0 7 C 215/60
C 0 7 C 227/40	(2006.01)	C 0 7 C 227/40
C 0 7 C 229/36	(2006.01)	C 0 7 C 229/36

- (72)発明者 ピレッキー,セルギー アナトリヨビチ
イギリス国,ベッドフォードシャー エムケー43 0エスエス,クランフィールド,ウォーリー
エンド,ザ グリーン 1
- (72)発明者 ピレッカ,オレナ ボロディミリフナ
イギリス国,ベッドフォードシャー エムケー43 0エスエス,クランフィールド,ウォーリー
エンド,ザ グリーン 1
- (72)発明者 カリム,カルク
イギリス国,ケンブリッジシャー シービー4 2イーディー,ケンブリッジ,ガーニー ウェイ
1 2
- (72)発明者 ターナー,アンソニー ピーター フランシス
イギリス国,バッキンガムシャー エムケー16 9エイチエイチ,ノース クローリー,ブルッ
ク エンド 8
- (72)発明者 ボッシ,アレサンドラ
イタリア国,イ-21100 バレーセ,ピア ブルニコ,28

審査官 品川 陽子

- (56)参考文献 特開平10-002891(JP,A)
米国特許第05756717(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/543

G01N 33/531

C07B 63/00

C12Q 1/68

G01N 33/566

专利名称(译)	选择的结合材料		
公开(公告)号	JP4485742B2	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	JP2002532935	申请日	2001-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	克兰菲尔德大学		
申请(专利权)人(译)	克兰菲尔德大学		
当前申请(专利权)人(译)	克兰菲尔德大学		
[标]发明人	ピレツキーセルギーアナトリヨビチ ピレツカオレナポロディミリフナ カリムカルク ターナーアンソニーピーターフランシス ボツシアレサンドラ		
发明人	ピレツキー,セルギー アナトリヨビチ ピレツカ,オレナ ポロディミリフナ カリム,カルク ターナー,アンソニー ピーター フランシス ボツシ,アレサンドラ		
IPC分类号	C07B63/00 C07B57/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 C07C213/10 C07C215/60 C07C227/40 C07C229/36 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 B01J20/3057 G01N2600/00 Y10S436/815 Y10S436/816 Y10S436/817 Y10S436/818 Y10S436/901		
FI分类号	C07B63/00.F C07B57/00.310 C12Q1/68.A G01N33/53.Z G01N33/566 C07C213/10 C07C215/60 C07C227/40 C07C229/36		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	2000024276 2000-10-04 GB		
其他公开文献	JP2004510788A5 JP2004510788A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

将模板 (优选分子大小大于500Da或更大的分子, 例如细胞, 病毒或组织样品) 溶解或悬浮在液体中。将液体冷冻并除去模板 (例如, 通过裂解或电泳, 或机械方式) 以留下“印迹”冷冻液体。这使得可以选择性地吸附模板物质。它可用作分离介质, 传感器和分析中的识别介质, 也可用作催化剂。

