

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-510788

(P2004-510788A)

(43) 公表日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7B 63/00	CO7B 63/00 F	4B063
CO7B 57/00	CO7B 57/00 310	4H006
C12Q 1/68	C12Q 1/68 A	
GO1N 33/53	GO1N 33/53 Z	
GO1N 33/566	GO1N 33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-532935 (P2002-532935)	(71) 出願人	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ディーティアー, 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
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月4日 (2003.4.4)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/004446	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02002/029412	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(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	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択的結合材料

(57) 【要約】

鋳型（好ましくは500Da超の分子サイズの分子、又はより大きなもの、例えば細胞、ウイルス又は組織試料）を溶解し、又は液体中で懸濁する。当該液体を凍結し、そして「インプリント」された、凍結した液体を残すように鋳型を除去する（例えば溶解又は電気泳動によって、あるいは機械的に）。これにより、鋳型物質を選択的に吸着することが可能となる。これは分離媒体、センサー及びアッセイにおける認識因子として、並びに触媒として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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、鑄型材料が除去された結合部位を有する、凍結した分散媒をそのままの状態で維持せしめること、
- を含んで成る方法。

【請求項 2】

段階 (c) において、鑄型材料が機械的に除去される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

段階 (c) において、鑄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 4】

段階 (c) において、鑄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 5】

選択的結合材料を調製し、そして使用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。

20

【請求項 6】

前記段階 (c) が、分子認識、選択的結合、検査、アッセイ、触媒を達成するために使用される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

鑄型材料が、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 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8】

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 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

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鑄型材料の溶液である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

溶液が水によるものであり、そして鑄型材料がタンパク質である、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

鑄型材料が固体の支持体上に固定化される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法の方法。

【請求項 12】

異なる融点を有する鑄型材料が二層間に分配される、請求項 j 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

鑄型材料が除去された結合部位を有する凍結した分散媒から成る、請求項 1 ~ 4 又は 6 ~

50

12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14】

分離マトリックスとしての請求項13に記載の材料の使用。

【請求項15】

鑄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12に記載の材料の使用。

【請求項16】

触媒としての、請求項12に記載の材料の使用。

【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

Pol yak ov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)。

【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、鑄型材料が除去された結合部位を有する、凍結した分散媒をそのままの状態で維持せしめること、

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。溶融金属は、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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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、そして使用する方法であって：

- (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。

30

【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。

40

【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

50

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のクロコホルムで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。

10

【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。カラムをクロコホルムで洗浄し、そして-15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。

20

【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)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)。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。

30

40

【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。

50

【 図 2 b 】

図 2 b 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。

【 図 1 】

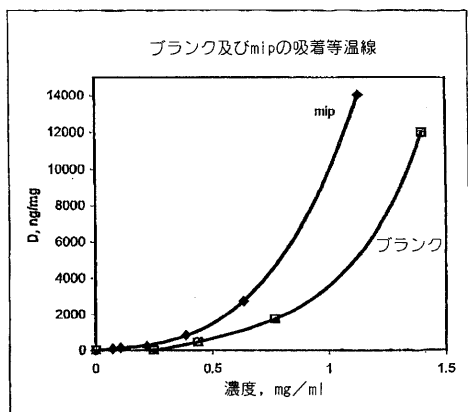


Fig. 1

【 図 2 a 】

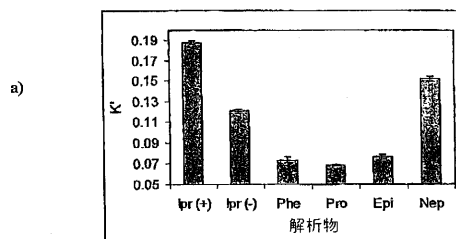


Fig. 2a

【 図 2 b 】

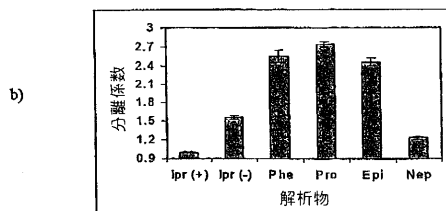


Fig. 2b

【 図 3 】

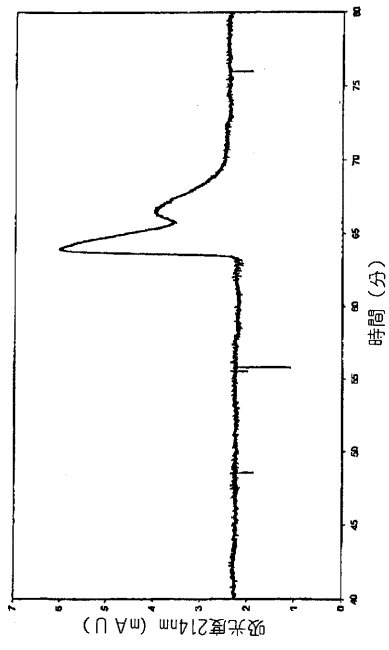


Fig. 3

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/29412 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543 (74) Agents: STUART, Ian et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/04446
- (22) International Filing Date: 4 October 2001 (04.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0024276.8 4 October 2000 (04.10.2000) GB (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (71) Applicant (for all designated States except US): CRANFIELD UNIVERSITY [GB/GB]; Silsoe, Milton Keynes, Bedfordshire MK45 4DT (GB). (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): PILETSKY, Sergiy, Anatolyovich [UA/GB]; 1 The Green, Wharley End, Cranfield, Bedfordshire MK43 0SS (GB). PILETSKA, Olena, Volodimirivna [UA/GB]; 1 The Green, Wharley End, Cranfield, Bedfordshire MK43 0SS (GB). KARIM, Khalku [GB/GB]; 12 Gurney Way, Cambridge, Cambridgeshire CB4 2ED (GB). TURNER, Anthony, Peter, Francis [GB/GB]; 8 Brook End, North Crawley, Buckinghamshire MK16 9HH (GB). BOSSI, Alessandra [IT/IT]; Via Brunico, 28, I-21100 Varese (IT).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
— entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/29412 A2

(54) Title: SELECTIVE BINDING MATERIALS

(57) Abstract: A template (a molecule preferably of molecular size > 500 Da, or a larger entity such as a cell, virus or tissue sample) is dissolved or suspended in a fluid. The fluid is frozen, and the template is removed (e.g. by dissolution or electrophoresis, or mechanically) to leave an "imprinted" frozen fluid. This is capable of selectively adsorbing the template substance. It is usable as a separation medium, a recognition element in sensors and assays, and as a catalyst.

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

1

SELECTIVE BINDING MATERIALSTechnical Field

The present invention relates to selective binding
5 materials, their preparation and uses.

Background Art

Polyakov in the 1930's described substrate-specific
materials prepared by condensing silicic acid in the
10 presence of template molecules (Zhur.Fiz.Khim.2:799
(1931); 10:100(1937); 4:454 (1933)). More recent workers
have used organic monomers, polymerized in the presence
of template molecules (e.g. USA patents 5110833, 5728296,
5756717, WO 9641173).

15

Disclosure of Invention

In a first aspect the present invention provides a
process for preparing a selective binding material
capable of selectively binding a template material
20 comprising:

- (a) preparing a composition comprising template
material and a carrier fluid;
- (b) freezing the composition; and
- (c) at least partially removing template material
25 from the frozen composition so as to leave frozen carrier

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

2

fluid with binding sites where template material has been removed.

The template material may be selected from proteins, biological receptors, nucleic acids, chromosomes, cells, viruses, microorganisms, tissue samples, carbohydrates, oligosaccharides, polysaccharides, nucleoproteins, mucoproteins, lipoproteins, synthetic proteins, glycoproteins, glucosaminoglycans, steroids, immunosuppressants, hormones, heparin, antibiotics, vitamins and drugs.

The carrier fluid may be selected from water, aqueous solvents, aqueous solutions, inorganic liquids, organic solvents, metals, fusible organic compounds, fusible inorganic compounds, polymers and gases. When the template material is molecular, the fluid will generally be a solvent therefor. The composition may be a suspension, as it generally will be if the template material is a complex entity, such as a tissue sample. Molten metals will generally be restricted to low melting metals e.g. mercury and gallium. Gases that can be liquefied and solidified by control of temperature and/or pressure may also be used.

Preferred compositions are aqueous solutions, e.g. of proteins.

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

3

A composition may be a 2-phase system, e.g. with the template material partitioned between immiscible solvents (e.g. water and an organic solvent such as chloroform or ether). Only the higher-freezing one of these may be
5 frozen in step (b).

When the template material is soluble, step (c) will usually involve its dissolution, preferably using a solvent in which the frozen carrier fluid is not substantially soluble (e.g. using chloroform,
10 acetonitrile or other organic solvents or mixtures to remove materials from ice). Suitable materials may be removed by electro dialysis. Particularly for particulate material, mechanical removal may be appropriate.

The invention preferably uses template molecules of
15 molecular size exceeding 500Da.

The frozen imprinted fluid has predetermined affinity and specificity superior to non-imprinted material and can be prepared much more easily than traditional cross-linked imprinted polymers. Materials
20 prepared as described in this invention can be used as adsorbents in separation and purification, as catalysts and as recognition materials in sensors and assays.

In a second aspect the present invention provides a selective binding material as prepared by the above
25 process.

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

4

In further aspects the invention provides uses of such materials exploiting their selective binding abilities. Use as a separation matrix is exemplified below. An example of use in a sensor or array could
5 involve using our materials in place of antibodies in immunosensors and assays employing them. An example of use as a catalyst would involve employing a transition state analogue as the template material to produce a material capable of catalysing a reaction that proceeds
10 through such a transition state.

In a yet further aspect the invention provides a process for preparing and using a selective binding material comprising:

- (a) preparing a composition comprising template
15 material and a carrier fluid;
- (b) freezing the composition; and
- (c) contacting the frozen composition with a solution containing a molecular species which selectively interacts with template material in the frozen
20 composition.

Traditional imprinting polymerisation includes formation of a rigid polymer network around a template which may be a small organic substance, such as a drug, or a protein or even a cell. Molecularly imprinted
25 polymers (MIPs) prepared in this way consist of monomer

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

5

units linked together by predominantly covalent interactions.

The present invention, in various aspects, describes the formation of the substrate-specific material by
5 freezing the solvent or other fluid in the presence of a template. In contrast to traditional MIP preparation, where solvent plays a secondary role, being at most a reaction medium which facilitates the complex formation between the functional monomers and the template, this
10 new approach relies on the ability of the frozen solvent to act as adsorbent. When prepared in the presence of template, frozen solvent contains cavities occupied by template molecules which can be emptied and used for re-binding of the template molecules. The structure of the
15 imprints formed should be complementary to the structure of the template or molecules with structure and shape similar to those of the template molecules.

In embodiments in which template material is not removed from the frozen carrier fluid, template will
20 remain immobilised. At least part of the molecules, suspension particles or tissue will remain exposed and available for a subsequent action (recognition, binding, catalysis, sensing etc.). Such material can be used as a separation matrix, element of sensor or assay and as a
25 catalyst.

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

6

Brief Description of Drawings

Fig. 1 shows adsorption isotherms comparing adsorption of a template material to ice formed in the presence of the material ("mip") and ice formed in its absence.

Fig. 2(a) and 2(b) show capacity factors K' (a) and separation factors (b) of a range of analytes passed through a column containing a selective binding material prepared in the presence of one of them.

Fig. 3 is a trace showing the result of electrophoresis of a mixture of D- and L-phenylalanine in a capillary filled with ice, formed in the presence of L-phenylalanine.

15

Modes For Carrying Out The Invention**1. Preparation of isoproterenol-specific adsorbent.**

Sephadex G25, 30 mg/sample were transferred into the wells of filtration microplates and swelled overnight in 0.2 ml 1 mg/ml solution of (+)-isoproterenol (+)-bitartrate salt. The excess of solution was removed by filtration under reduced pressure and adsorbent was flushed twice with 0.2 ml chloroform. The swelled adsorbent was frozen for 12 hours at -15°C . Adsorbent was washed four times with acetonitrile at -15°C . Blank

25

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

7

material was prepared in the same way but in the absence of isoproterenol. The adsorption properties of prepared adsorbents were evaluated by adding 0.15 ml aliquot of the corresponding analyte in the concentration ranging from 0.1 to 10 mg/ml. Concentration of isoproterenol in solution was measured spectrophotometrically at 280 nm. Results of the sorption analysis indicate that ice, prepared in the presence of template has higher affinity to the template than blank sample (Figure 1). At the same time Sephadex G25 itself has no affinity to isoproterenol.

The same material, prepared in the presence of isoproterenol has been analysed by HPLC in experiments with compounds having structure similar to that of isoproterenol. Results of this analysis indicate that the ice has highest affinity to the target compound presented in solution (Figure 2). An HPLC column (100 x 4.6 mm i.d.) was packed with approximately 1 g Sephadex G25 swelled in 1 mg/ml (+) isoproterenol (MIP) or water (Blank). Column was washed with chloroform and frozen at -15 °C for 12 hours. All chromatographic experiments were performed at -10°C using detection at 280 nm and flow rate 1 ml/min. The column was washed on-line with acetonitrile until a stable baseline was obtained and solvent replaced with 10% aqueous acetonitrile. 20 µl

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

8

solution of the analyte in 0.1 mg/ml concentration were used for the injections. Ipr (+) - (+) isoproterenol, Ipr (-) - (-) isoproterenol, Phe- phenylephrine, Pro- propranolol, Epi - epinephrine, Nep - norepinephrine.

5

2. Preparation of material specific for L-phenylalanine.

The experiment was done using capillary electrophoresis unit Quanta 4000E, Waters. A 35 cm portion of capillary (fused silica, 80cm, 100 um internal diameter - Polymicro Technologies, Hallow, UK) was inserted into insulated tubes connected with the refrigerating unit and cooled to a temperature of -14.5 °C. The capillary was filled with a 2 mM solution of L-Phe in 9.5 mM HCl, and incubated at -14.5 °C for 1 hour, to allow complete refrigeration of the liquid inside the capillary lumen. To elute the template from the ice a voltage of 13 kV was applied to the capillary and maintained until the baseline is stabilised. The sample, D-Phe, L-Phe or the racemate, diluted to a concentration of 2 mM in 9.5 mM HCl were injected hydrodynamically into the capillary for 6 sec. The run was performed by applying 13 kV (the current is 10 uA). The same experiment was performed using blank ice, formed in the absence of the template. The result of this analysis shown that the ice formed in the capillary in the presence of the L-Phe has enhanced

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

9

affinity to the template and can be used to separate optical enantiomers (Figure 4). No separation of L-Phe and D-Phe was observed when control (blank) ice filled capillary was used.

5

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

10

CLAIMS:

1. A process for preparing a selective binding material capable of selectively binding a template
5 material comprising:
 - (a) preparing a composition comprising template material and a carrier fluid;
 - (b) freezing the composition; and
 - (c) at least partially removing template material
10 from the frozen composition so as to leave frozen carrier fluid with binding sites where template material has been removed.

2. A process according to claim 1 wherein in step
15 (c) template material is removed mechanically.

3. A process according to claim 1 wherein in step (c) template material is removed by washing with a solvent therefor.
20

4. A process according to claim 1 wherein in step (c) template material is removed by electrodialysis.

5. A process for preparing and using a selective
25 binding material comprising:

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

11

(a) preparing a composition comprising template material and a carrier fluid;

(b) freezing the composition; and

(c) contacting the frozen composition with a

5 solution containing a molecular species which selectively interacts with template material in the frozen composition.

6. A process according to claim 5 wherein said

10 step (c) is used to effect molecular recognition, selective binding, sensing, assaying or catalysis.

7. A process according to any preceding claim where the template material is selected from proteins,

15 biological receptors, nucleic acids, chromosomes, cells, viruses, microorganisms, tissue samples, carbohydrates, oligosaccharides, polysaccharides, nucleoproteins, mucoproteins, lipoproteins, synthetic proteins, glycoproteins, glucosaminoglycans, steroids,

20 immunosuppressants, hormones, heparin, antibiotics, vitamins and drugs.

8. A process according to any preceding claim wherein the carrier fluid is selected from water, aqueous

25 solvents, inorganic liquids, organic solvents, metals,

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

12

fusible organic compounds, fusible inorganic compounds,
polymers and gases.

9. A process according to any preceding claim
5 wherein said carrier fluid is a liquid and said
composition prepared in step (a) is a solution of the
template material.

10. A process according to claim 9 where the
10 solution is in water and the template material is a
protein.

11. A process according to any of claims 1-8 where
the template material is immobilised onto a solid
15 support.

12. A process according to any of claims 1-11 where
the template material is distributed between two phases,
which have different melting points.

20

13. A selective binding material as prepared by the
process of any of claims 1-4 or 6-12 consisting of a
frozen carrier fluid having binding sites whence template
material has been removed.

25

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

13

14. Use of the material of claim 13 as a separation matrix.

15. Use of the material of claim 12 as a recognition element for a sensor or assay for sensing or assaying the template material or an analogue thereof.

16. Use of the material of claim 12 as a catalyst.

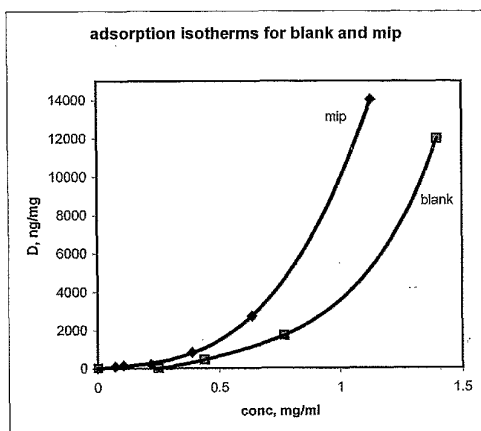


Fig. 1

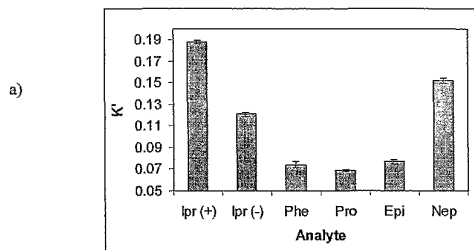


Fig. 2a

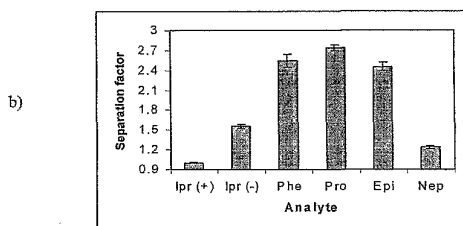


Fig. 2b

WO 02/29412

PCT/GB01/04446

3/3

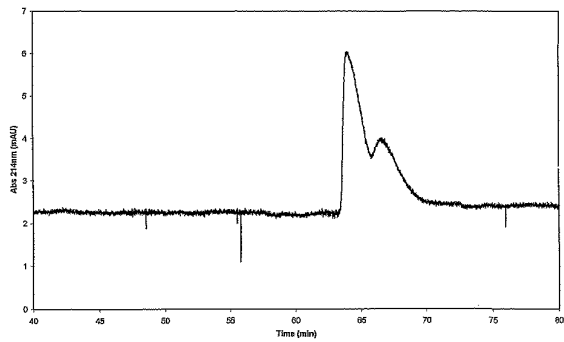


Fig. 3

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/029412 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/543, 33/531, C07K 1/22 (74) Agents: STUART, Ian et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/04446

(22) International Filing Date: 4 October 2001 (04.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0024276.8 4 October 2000 (04.10.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): CRANFIELD UNIVERSITY [GB/GB]; Silsoe, Milton Keynes, Bedfordshire MK45 4DT (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PILETSKY, Sergiy, Anatolyovich [UA/GB]; 1 The Green, Wharley End, Cranfield, Bedfordshire MK43 0SS (GB). PILETSKA, Olena, Volodimirivna [UA/GB]; 1 The Green, Wharley End, Cranfield, Bedfordshire MK43 0SS (GB). KARIM, Khalku [GB/GB]; 12 Garney Way, Cambridge, Cambridgeshire CB4 2TD (GB). TURNER, Anthony, Peter, Francis [GB/GB]; 8 Bessok End, North Crawley, Buckinghamshire MK16 9III (GB). BOSSI, Alessandra [IT/IT]; Via Brunico, 28, I-21100 Varese (IT).

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UG, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
16 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/029412 A3

(54) Title: SELECTIVE BINDING MATERIALS

(57) Abstract: A template (a molecule preferably of molecular size > 500 Da, or a larger entity such as a cell, virus or tissue sample) is dissolved or suspended in a fluid. The fluid is frozen, and the template is removed (e.g. by dissolution or electrophoresis, or mechanically) to leave an "imprinted" frozen fluid. This is capable of selectively adsorbing the template substance. It is usable as a separation medium, a recognition element in sensors and assays, and as a catalyst.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/04446
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 G01N33/531 C07K1/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 756 717 A (PALIWAL SANDEEP K ET AL) 26 May 1998 (1998-05-26) cited in the application claims 1,13	1-16
A	EP 0 797 096 A (BIO RAD LABORATORIES) 24 September 1997 (1997-09-24) cited in the application claim 1	1-16
A	OWENS P K ET AL: "Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, GB, vol. 18, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 146-154, XP004161227 ISSN: 0165-9936 the whole document	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
30 August 2002	06/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3019	Authorized officer Pellegrini, P	

Form PCT/ISN/210 (second sheet) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 01/04446

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5756717	A	26-05-1998	NONE
EP 0797096	A	24-09-1997	US 5728296 A 17-03-1998 CA 2199233 A1 20-09-1997 EP 0797096 A2 24-09-1997 JP 3068489 B2 24-07-2000 JP 10002891 A 06-01-1998 US 5916445 A 29-06-1999 US 5814223 A 29-09-1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 0 7 C 213/10	C 0 7 C 213/10	
C 0 7 C 215/60	C 0 7 C 215/60	
C 0 7 C 227/40	C 0 7 C 227/40	
C 0 7 C 229/36	C 0 7 C 229/36	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ピレツキー, 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 4 3 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 ピレツカ, オレナ ポロディミリフナ
イギリス国, ベッドフォードシャー エムケー 4 3 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 1 6 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 - 2 1 1 0 0 バレーセ, ピア ブルニコ, 2 8

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR55 QR82 QS32
QX01
4H006 AC83 AD17 BJ50 BN10 BN30 BS10 BU32

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004510788A5	公开(公告)日	2005-12-22
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		
[标]发明人	ピレツキーセルギーアナトリヨビチ ピレツカオレナボロディミリフナ 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 ボロディミリフナ 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	G01N33/53 C07B57/00 C07B63/00 C07C213/10 C07C215/60 C07C227/40 C07C229/36 C12Q1/68 G01N33/531 G01N33/566		
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		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063 /QR55 4B063/QR82 4B063/QS32 4B063/QX01 4H006/AC83 4H006/AD17 4H006/BJ50 4H006/BN10 4H006/BN30 4H006/BS10 4H006/BU32		
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	JP4485742B2 JP2004510788A		

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。(例如, 通过溶解或电泳或机械地) 冻结的液体, 而“印记”, 去除所述模具离开冷冻液体。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。