

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)*C07H 21/00* (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0037337

(43) 공개일자

2006년05월03일

(21) 출원번호 10-2006-7000635

(22) 출원일자 2006년01월10일

번역문 제출일자 2006년01월10일

(86) 국제출원번호 PCT/IL2004/000669

(87) 국제공개번호

WO 2005/010141

국제출원일자 2004년07월22일

국제공개일자

2005년02월03일

(30) 우선권주장

157086

2003년07월24일

이스라엘(IL)

(71) 출원인

아피싱크 바이오테크놀로지 리미티드

이스라엘 55572 커얏-오노, 예후다 하마카비 스트리트 11

(72) 발명자

팻초닉 가이

이스라엘 55572 커얏-오노, 예후다 하마카비 스트리트 11

(74) 대리인

황의만

심사청구 : 없음

(54) 관심의 대상이 되는 분자를 정제 및 결정화하기 위한 조성물

요약

물질의 조성물이 제공된다. 본 조성물은 코디네이터 이온 또는 분자와 함께 인큐베이션시킬 때 물질의 조성물이 비공유 결합 복합체를 형성하도록 지배할 수 있는 선택된 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드를 포함한다. 또한, 표적 정제, 결정화 및 면역화하기 위해 이러한 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 관심의 대상이 되는 분자를 정제 및 결정화하는데 사용할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

연구, 진단 및 치료에서 단백질 및 다른 거대분자의 사용이 점점 증가하고 있다. 단백질은 전형적으로 생산 공정의 비용의 대부분(총 비용의 60% 이하)을 차지하는 정제를 수반하는 대규모의 재조합 기술에 의해 생성된다. 따라서, 정제와 관련된 비용이 높기 때문에 재조합 단백질 산물을 대규모로 사용하는 것은 저지되고 있다.

현존하는 단백질 정제 방법은 다양한 크로마토그래피 기술의 조합 사용에 따라 달라진다. 이 기술들은 다른 특징들 중에서 그의 전하, 소수성의 정도 또는 크기에 기초로 하여 단백질 혼합물을 분리한다. 수개의 상이한 크로마토그래피 수지를 각각의 이들 기술에 사용함으로써, 정제 방법을 분리를 위해 표적화된 특정 단백질에 정확하게 적합화시킬 수 있다. 각각의 이들 분리 방법의 본질은 단백질들이 긴 칼럼에서 상이한 속도로 아래로 이동할 수 있도록 함으로써 칼럼에서 더욱 더 아래로 이동함에 따라 증가하는 물리적인 분리를 수행하거나, 단백질들을 특이적으로 분리 매질에 부착시켜 상이한 용매에 의해 분별 용출되도록 하는 것이다. 몇몇 경우에서, 원하는 단백질은 "유통식(flow-through)"으로 발견되는 반면, 불순물은 칼럼에 결합하도록 칼럼을 디자인한다.

친화 침전(AP)이 단백질 침전을 위한 가장 효과적이고 고도한 접근법이다[Mattiasson(1998); Hilbrig and Freitag (2003) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 790(1-2): 79-90]. 현재 본 분야의 AP는 리간드와 커플링된 "스마트 폴리머(Smart polymers)"를 사용한다. "스마트 폴리머"[또는 자극-반응성의 "인텔리전트" 폴리머 또는 친화성 마크로 리간드(AML)]는 pH, 온도, 방사성 등의 변화와 같은 작은 물리 또는 화학적 자극에 대하여 큰 성질 변화를 나타내면서 반응하는 폴리머이다. 이들 폴리머는 다수의 형태를 취할 수 있다; 수용액에 용해될 수 있거나, 수-고체 경계면상에 부착되거나 용해되거나, 가교결합하여 하이드로겔을 형성할 수 있다[Hoffman J Controlled Release (1987) 6: 297-305; Hoffman Intelligent polymers. In: Park K, ed. Controlled drug delivery. Washington: ACS Publications, (1997) 485-98; Hoffman Intelligent polymers in medicine and biotechnology. Artif Organs(1995) 19: 458-467]. 전형적으로, 폴리머의 중요한 반응이 자극을 받으면 용액중 스마트 폴리머는 상-분리를 함에 따라 돌연 혼탁화되거나; 표면-흡착되거나 용해된 스마트 폴리머는 붕괴되어 경계면을 친수성으로부터 소수성으로 전환시키고; (하이드로겔 형태의 가교결합된) 스마트 폴리머는 급격하게 붕괴되고 그의 팽윤성 용액을 다량 방출할 것이다. 수성 매질에 겔을 재-팽윤시키거나 폴리머를 재용해시켜야 할 경우 역전 속도는 자주 더욱 저속화되지만, 자극이 역전화되면 상기 현상도 역전될 것이다.

"스마트" 폴리머는 생체분자와 물리적으로 혼합되거나, 화학적으로 그에 컨쥬게이트되어 생물학적 및 물리화학적 자극에 반응할 수 있는 거대 패밀리의 폴리머-생체 분자 시스템을 형성할 수 있다. 폴리머와 컨쥬게이트될 수 있는 생체분자는 단백질 및 올리고펩티드, 당 및 폴리사카라이드, 싱글- 및 더블-스트랜드 올리고뉴클레오티드 및 DNA 플라스미드, 단순 지질 및 인지질, 및 광범위한 인지 리간드 및 합성 약물 분자를 포함한다.

다수의 구조적 파라미터가 관심의 대상이 되는 단백질을 특이적으로 침전시키는 스마트 폴리머의 능력을 조절한다; 스마트 폴리머는 리간드 커플링을 위한 반응 그룹을 포함하여야 하고; 불순물과는 강하게 상호작용을 하지 않아야 하며; 리간드가 표적 단백질과 상호작용 할 수 있도록 하여야 하고; 매질의 성질이 변하면 폴리머를 완전하게 상 분리시켜야 하고; 조밀한 침전물을 형성하여야 하고; 겔 구조내로 불순물이 포착되는 것을 차단시켜야 하며 침전물이 형성된 후에는 용이하게 용해되어야 한다.

다수의 상이한 천연 및 합성 폴리머가 AP에 사용될 수 있지만[Mattiasson (1998) J. Mol. Recognit. 11: 211], 현재 이용 가능한 스마트 폴리머를 사용하여 실시된 친화 침전은 하나 또는 수개의 상기 기술된 요건을 충족시키지 못했기 때문에 이상적인 스마트 폴리머는 여전히 정의할 수 없는 상태로 남아 있다[Hilbrig and Freitag (2003), supra].

효과적이고 단순한 단백질 정제 기술의 유용성 또한 단백질 순도가 광범위하게 결정 형성에 영향을 주는 단백질 결정화에 사용될 수 있다. 단백질의 공간적 구조가 그의 생물학적 기능의 이해 및 궁극적으로는 신규한 약물 요법의 디자인에 중요하다. 통상적으로 단백질의 공간적 구조는 그의 결정으로부터 x-선 회절에 의해 측정된다. 불행하게도, 대체로 충분하게 고품질의 단백질을 결정을 생산하는 것은 매우 어렵고, 이러한 난점은 단백질 샘플의 구조를 과학적으로 측정하고 확인함에 있어 주된 제한 요소가 된다. 과포화 용액으로부터 단백질 결정을 생산하는 선행 기술의 방법은 장황하고 시간이 많이 소요되며, x-선 회절 연구에 적절한 결정으로서 100,000개 이상의 상이한 단백질중 20% 미만이 생산되었다.

막 단백질은 결정화를 위해 가장 관심의 대상이 되는(challenging) 단백질 그룹을 제시한다. 막 단백질로서 이용가능한 3D 구조의 갯수는 약 20인 반면, 막 단백질은 프로테오믹의 1/3을 구성하는 것으로 예상된다. 막 단백질을 결정화하고자 하는 경우 다수의 장애를 극복하여야 한다. 이들은 천연 자원으로부터의 단백질 존재도가 낮고, 본래의 환경(즉, 지질이중층)으

로부터 소수성 막 단백질을 가용화시켜야 하며, 계면 활성제 용액중에서는 변성하고, 응집하고/응집하거나 분해되는 경향을 갖는다는 것을 포함한다. 몇몇 계면활성제는 안정 파트너가 표적 단백질과 결합하는 것을 방해할 수 있기 때문에 가용성 계면활성제의 선택이 또다른 문제를 제시한다.

막 단백질 결정화에 2개의 접근법이 시도되어 왔다.

가장 최근까지, 대다수의 막 단백질의 X-선 결정 구조는 단백질-계면활성제 복합체의 용액으로부터 직접 형성된 결정을 사용하여 측정되어 왔다. 결정화되는 용질이 단순한 단백질만이 아닌 단백질과 계면활성제의 복합체인 경우에만 단백질-계면활성제 복합체의 결정 형성은 가용성 단백질의 것과 동등한 것이라고 생각할 수 있다. 결정 패킹을 통해 계면활성제 부위는 밀접하게 병치하지만, 실제 격자 경계면은 단백질-단백질 상호작용에 의해 형성된다. 이들 단백질-단백질을 접촉 시키는데 사용될 수 있는 표면적을 증가시키기 위하여, 결정 생산 기회를 증가시킬 항체 단편을 첨가하는 것이 연구를 통해 제안되었다[Hunte and Michel(2002) Curr. Opin. Struct. Biol. 12: 503-508]. 그러나, 각 막 단백질에 특이적인 모노클로날 항체를 형성하여야 하기 때문에, 다양한 막 단백질에 이 기술을 적용하는 것은 어렵다.

추가로, 어떤 계면활성제 미셀(micelle)도 단백질의 지질이중층 환경을 완전하고 정확하게 재생시킬 수 없다고 논의되고 있다.

따라서, 막 단백질을 결정화하려는 노력은 이중층 환경내에서 결정을 생산하는 쪽으로 이루어져야 한다. 이 접근법을 사용하여 막 단백질의 결정을 생성시키기 위해 많은 시도가 이루어졌다. 이는 연속성 이중층 구조를 포함하는 겔-양 물질을 형성하는 입방체의 지질 상(phase)의 존재하에 형성된 박테리오폭신(bacteriorhodopsin) 결정의 생성 [Landau and Rosenbuch(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14532-14535] 및 원시 7개의 막횡단 나선형 단백질의 결정화에 성공적인 것으로 입증된 입방체로의 결정화를 포함한다[Gordeliy (2002) Nature 419: 484-487; Luecke (2001) Science 293: 1499-1503; Kolbe (2000) Science 288: 1390-1396; Royant (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10131-10136]. 그러나, 입방체 접근법을 사용한 다른 막 단백질의 결정은 단백질-계면 활성제 복합체 용액으로부터 직접 형성된 결정과 같은 고품질을 갖지 못했다[Chiu(2000) Acta. Crystallogr. D. 56: 781-784].

따라서, 상기와 같은 제한 없이 분자를 정제 및 결정화하기 위한 조성물 및 그를 사용하는 방법에 대한 필요성이 광범위하게 인지되고 있으며, 상기 조성물 및 방법을 갖는 것이 매우 이로운 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명의 하나의 일면에 따라, 코디네이터 이온 또는 분자와 함께 인큐베이션시킬 때(co-incubate) 물질의 조성물이 비공유결합 복합체를 형성하도록 지배할 수 있는 선택된 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드를 포함하는 물질의 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 일면에 따라, (a) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 포함하는 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키고; (b) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합한 복합체를 포함하는 침전물을 수집함으로써 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 정제하는 것을 포함하여, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 정제하는 방법을 제공한다.

본 발명의 바람직한 일례에서 추가적인 특징에 따라, 상기 방법은 침전물로부터 관심의 대상이 되는 분자를 추가로 회수하는 것을 포함한다.

본 발명의 또다른 일면에 따라, 대상으로부터 수득한 생물학적 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하되, 관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 복합체의 형성이 대상에서 관심의 대상이 되는 분자와 관련된 질병 소질, 또는 그의 존재를 표시함을 특징으로 하여, 대상에서 관심의 대상이 되는 분자와 관련된 질병 소질, 또는 그의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

추가로, 본 발명의 또다른 일면에 따라, (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하되, 그에 결합하였을 때 관심의 대상이 되는 분자의 상대적인 공간 배치 및 배향을 한정하여 유도성 결정화 조건하에 그로부터 결정의 형성을 촉진시키기 위하여 선택됨을 특징으로 하여, 관심의 대상이 되는 분자를 결정화시키기 위한 조성물을 제공한다.

본 발명의 추가의 일면에 따라, 관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하되, 그에 결합하였을 때 관심의 대상이 되는 분자의 상대적인 공간 배치 및 배향을 한정하여 유도성 결정화 조건하에 그로부터 결정의 형성을 촉진시키기 위하여 선택되는 결정화 조성물과 접촉시키는 것을 포함하여, 관심의 대상이 되는 분자를 결정화하는 방법을 제공한다.

본 발명의 추가의 일면에 따라, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 제 1 영역, 및 코디네이터 이온 또는 분자와 결합할 수 있고, 분자가 코디네이터 이온 또는 분자에 노출될 경우 폴리머를 형성하도록 디자인된 제 2 영역을 갖는 분자를 포함하는 물질의 조성물을 제공한다.

본 발명의 추가의 일면에 따라, (a) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 포함하는 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키고; (b) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포에 결합된 복합체를 포함하는 침전물을 제거하여 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 고갈시키는 것을 포함하여, 샘플로부터 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 고갈시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 추가의 일면에 따라, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터가 관심의 대상이 되는 표적 분자를 포함하는 복합체를 형성하여 관심의 대상이 되는 표적 분자의 면역원성을 증진시킬 수 있도록 관심의 대상이 되는 표적 분자를 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하여, 관심의 대상이 되는 표적 분자의 면역원성을 증진시키는 방법을 제공한다.

기술된 바람직한 일례에서 추가의 특징에 따라, 관심의 대상이 되는 분자는 단백질, 핵산 서열, 저분자 화합물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

기술된 바람직한 일례에서 추가의 특징에 따라, 적어도 하나의 리간드는 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

기술된 바람직한 일례에서 추가의 특징에 따라, 적어도 하나의 리간드는 링커를 통해 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착된다.

기술된 바람직한 일례에서 추가의 특징에 따라, 코디네이트 부위는 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자-풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

기술된 바람직한 일례에서 추가의 특징에 따라, 코디네이터 이온 또는 분자는 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 (poor) 분자 및 전자-풍부 (rich) 분자로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

본 발명은 분자를 정제하기 위한 조성물 및 방법을 제공하므로써 현재 공지되어 있는 구성의 단점을 성공적으로 해결하게 되었다.

달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 포함된 분야의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 동일하거나 유사한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적절한 방법 및 물질은 하기에 기술한다. 일치하지 않는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서에서 조정될 것이다. 추가로, 물질, 방법, 및 일례는 단지 예시적인 것이며 제한하고자 하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

본 발명은 첨부된 도면과 관련하여 단지 일례로서 여기에 기술된다. 도면과 관련하여 상세하게는 도시한 도면은 일례로서, 단지 본 발명의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 원리 및 개념적 양상을 가장 유용하고 쉽게 이해할 수 있게 설명하도록 하기 위해 나타낸다. 이 점에서, 본 발명을 근본적으로 이해하는데 필요한 설명 보다 더 상세하게 본 발명을 구조적으로 설명하고자 하는 시도는 이루어지지 않았지만, 도면에 의한 설명은 본 발명의 일부 형태가 실제로 어떻게 구체화될 수 있는지를 당업자들에게 명백하게 한다.

도면에서,

도 1a-f는 본 발명의 조성물의 수개의 구조를 도식으로 설명한다. 도 1a-c는 2개의 코디네이트 부위에 결합하는 리간드를 나타낸다. 도 1d-f는 다수의 코디네이트 부위에 결합하는 리간드를 나타낸다. Z는 코디네이트 부위를 나타낸다.

도 2a-b는 본 발명의 조성물을 사용하는 표적 분자의 침전을 도식으로 설명한다. 비스-킬레이트제에 공유결합적으로 부착된 리간드를 표적 분자의 존재하에 인큐베이션시킨다(도 2a). 금속(M^+ , M^{2+} , M^{3+} , Ma^{4+})의 첨가를 통해 킬레이트제와 결합하고 금속 이온에 비공유결합적으로 결합한 표적 분자를 포함하는 매트릭스를 형성한다(도 2b).

도 3a-e는 침전물로부터 표적 분자를 회수하는 단계를 도식으로 설명한다. 도 3a에는 금속과 리간드-결합 킬레이트제의 결합에 대하여 경쟁하는 유리 킬레이트제의 첨가를 나타낸다. 도 3b에는 유리 경쟁 킬레이트제 및 복합 금속으로부터의 리간드-결합 표적 분자의 중력-기초 분리를 나타낸다(도 3c). 도 3d에는 고정화된 금속 칼럼상에 리간드-결합 표적 분자를 로딩하여 복합체와 결합할 수 있도록 하는 것을 나타낸다. 적절한 용출 조건하에서 표적 분자는 용출되는 반면, 리간드-코디네이트 부위 분자는 용출되지 못한다. 추가로 표적 분자를 정제하기 위하여 탈염 단계를 추가할 수 있다. 경쟁 킬레이트제를 칼럼에 가한 후 투석 또는 한외여과하여 리간드-킬레이트제 분자를 재생시킨다(도 3e).

도 4는 침전물로부터 표적 분자를 직접 용출시키는 것을 도식으로 설명하며, 여기에서, 표적 분자 및 리간드 사이의 결합은 감소하는 반면, 킬레이트제-금속 복합체는 유지된다.

도 5는 표적 분자를 용출시킨 후 침전 유니트(즉, 리간드-코디네이트 부위)를 재생시키는 것을 도식으로 설명한다. 이 경우, 경쟁 킬레이트제를 첨가하고, 적절한 분리 방법, 예로서 투석 및 한외여과를 적용시켜 회수한다.

도 6a-c는 코디네이트 부위로서 핵산 서열을 사용하는 표적 분자의 침전을 도식으로 설명한다. 공유결합된 비스-뉴클레오타이드 서열(코디네이트 부위)을 포함하는 리간드를 표적 분자의 존재하에 인큐베이션시킨다(도 6a). 상보성 서열을 첨가하여 리간드-코디네이트 부위: 표적 분자: 상보성 서열을 포함하는 매트릭스를 형성한다(코디네이터 분자, 도 6b). 비대칭성 코디네이트 서열 또한 나타낸다(도 6c).

도 7a-b는 코디네이트 부위로서 바이오틴을 사용하는 표적 분자의 침전을 도식으로 설명한다. 공유결합된 비스-바이오틴 또는 바이오틴 유도체 예로서: DSB-X 바이오틴을 포함하는 리간드를 표적 분자의 존재하에 인큐베이션시킨다(도 7a). 아비딘(또는 그의 유도체)을 도입하여 리간드-코디네이트 부위(바이오틴): 표적 분자: 아비딘을 포함하는 네트워크를 형성한다(도 7b).

도 8a-c는 코디네이트 부위로서 전자 풍부 분자를 사용하는 표적 분자의 침전을 도식으로 설명한다. 공유결합된 비스-전자 풍부 엔티티를 포함하는 리간드를 표적 분자의 존재하에 인큐베이션시킨다(도 8a). 복합체를 형성하는 특성을 갖는 비스(또한 트리스, 테트라) 전자 부족 유도체를 가하여 리간드-코디네이트 부위(전자 부족 분자): 표적 분자: 비스-전자 부족 부위를 포함하는 비공유결합 네트워크를 형성한다(도 8b). 본 발명에 따라 피크르산 및 인돌 시스템 또한 사용할 수 있다(도 8c).

도 9는 리간드로서 사용된 결합 단백질 A(ProA)를 사용하는 표적 항체의 침전을 도식으로 설명한다. 적절한 코디네이터의 첨가로 단백질 A-코디네이트 부위: 코디네이터: 표적 분자의 네트워크를 형성한다.

도 10a-b는 막 단백질의 결정화를 위한 본 발명의 복합체의 사용을 도식으로 설명한다. 결정화 조성물의 존재하에서 2D (또는 3D) 구조의 일반적 형성을 제시하고, 여기에서, 코디네이트 그들 서로는 연결되어 있지 않다(도 10a). 2개의 항원으로 변형된 특정 리간드, 및 코디네이터로서 작용하는 특정 항원에서 지향된 모노클로날 항체(mAb)를 사용하는 추가의 상세한 일례를 도 10b에 도시한다.

도 11a-b는 막 단백질의 결정 형성을 위한 금속 복합체(도 11a) 및 뉴클레오-복합체(도 11b)의 용도를 도식적으로 설명한다.

도 11c는 본 발명의 조성물을 사용하는 3차원 구조의 막 복합체를 도식으로 설명한다. 단백질의 소수성 영역은 계면활성제 미셀로 둘러싸여 있다. Z는 다가 코디네이터(즉, 적어도 2가 코디네이터)를 나타낸다.

도 12는 공유결합 링커를 통해 리간드에 결합된 적절한 킬레이트제를 통해 단일 금속 코디네이터에 결합된 3개의 리간드로 구성된 비공유결합 조성물의 형성을 도식으로 설명한다.

도 13a-b는 하이드록사메이트 유도체를 포함하는 3개의 관심의 대상이 되는 변형을 도식으로 설명하며(도 13a), 트리-비공유결합 리간드 복합체는 Fe^{3+} 이온의 존재하에 형성된다(도 13b).

도 14는 리간드-킬레이트제 분자의 형성을 위한 2-단계 합성 방법을 도식으로 설명한다.

도 15a-b 매질내 존재하는 양이온만을 교환하면서 동일한 리간드-링커-킬레이트제 분자를 사용하여 디(도 15a) 및 트리(도 15b) 비공유결합 리간드 형성을 도식으로 설명한다.

도 16a-c는 전자 부족/풍부 관계에 의해 코디네이트된 본 발명의 조성물을 도식으로 설명한다. 전자 부족 부위로 리간드를 변형시키고(도 16a) 트리 공유결합 전자 풍부 부위를 합성하여(도 16b), 도 16 c에 나타난 구조의 복합체를 형성한다.

도 17은 리간드-전자 풍부 또는 리간드-전자 부족 유도체를 제조하는 2 단계 합성 방법을 도식으로 설명한다.

도 18은 전자 풍부 및 전자 부족 부위를 사용하여 리간드 복합체를 형성하기 위한 펩티드의 용도를 도식으로 설명한다.

도 19는 킬레이트제-금속 및 전자 풍부 및 부족 관계를 사용한 리간드 복합체 형성을 도식으로 설명한다.

도 20은 킬레이트제-전자 부족 유도체를 제조하는 1 단계 합성 방법을 도식으로 설명한다.

도 21a-b는 동일한 킬레이트제-전자 부족(카테콜-TNB) 유도체를 사용하여 단지 매질중 양이온을 교환하여 디 및 트리 공유결합 전자 부족 부위를 형성하는 것을 도식으로 설명한다.

도 22a-b는 전자 풍부 부위를 포함하는 펩티드를 가하여 다이머 및 트리머를 형성하는 것을 도식으로 설명한다.

도 23a-b는 전자 풍부/부족 관계를 통해 코디네이트된 2개의 킬레이트제에 부착된 리간드를 포함하는 조성물을 가함으로써 폴리머를 형성하는 것을 도식으로 설명한다.

도 24는 비공유결합 단백질 다이머의 자유로운 이동을 제한할 수 있는 가능성을 도식으로 설명한다. 적절한 금속이 첨가된 리간드-링커-킬레이트제를 통해 비공유결합 다이머를 형성한 후, 공유결합 전자 부족 부위(예: 트리니트로벤젠-트리니트로벤젠 = TNB-TNB)를 가하여 2개의 접근가능한 단백질상의 전자 풍부 잔기(예:Trp)를 동시에 결합시켜 이동을 제한시키고 결정 구조를 형성시킨다.

도 25는 본 발명의 조성물에서 각각 코디네이트 부위 및 코디네이터 이온으로서 사용할 수 있는 킬레이트제 및 금속을 도식으로 설명한다.

도 26은 본 발명의 조성물에서 코디네이트 부위로서 사용할 수 있는 전자 풍부 및 전자 부족 부위를 도식으로 설명한다.

실시예

바람직한 일례의 설명

본 발명은 관심의 대상이 되는 분자를 정제하고 결정화시키기 위하여 사용될 수 있는 조성물에 관한 것이다.

도면 및 첨부된 명세서를 참고로 하여 본 발명의 원리 및 작용은 더욱 잘 이해될 것이다.

본 발명의 적어도 하나의 일례를 더욱 상세히 설명하기 앞서, 본 발명을 그의 적용에서 하기 명세서에서 설명되거나 실시예에서 예시화된 설명으로 제한하고자 하는 것이 아니라는 것을 이해하여야 한다. 본 발명은 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있거나, 다른 일례일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 어구 및 용어는 설명하기 위함이며 제한하고자 하는 것은 아님을 이해하여야 한다.

정제 단계가 단백질의 대규모 생산에 포함되는 비용을 대부분 차지하기 때문에 비용면에서 효율적인 단백질, 예로서, 치료적 단백질의 대규모 생산은 고속의 효율적인 정제 방법 개발에 의존한다.

따라서, 단백질 및 다른 상업적으로 중요한 분자를 정제하기 위하여 사용될 수 있는, 간단하고, 비용면에서 효율적인 방법이 요구되고 있다.

단백질 정제법에 있어 현 기술적 수준은 관심의 대상이 되는 단백질에 결합하는, 인지 유닛과 커플링된 "스마트" 폴리머의 사용에 기초하는 친화 침전(AP)에 있다. 이 스마트 폴리머는 환경 자극의 작은 변화에 대하여 물리적 상태 또는 성질에서의 큰 변화, 때때로 불연속적인 변화를 나타내며 반응하여 수용액으로부터 상을 분리하거나, 하이드로겔 크기에서 크기 순서를 변화시키고 관심의 대상이 되는 분자를 침전시킨다. 그러나, 현재, 침전 공정시 불순물의 포획, 폴리머 매트릭스에 대한 불순물의 흡착, 단백질 인지 유닛의 친화성 감소 및 정제 단백질의 활성이 저하될 수 있는 작업 조건을 포함하는 수개의 결합에 기인하여 스마트 폴리머의 장래성은 파악되지 못했다.

본 발명자들은 실시하기 위하여 본 발명을 축소시키면서, 단백질 및 관심의 대상이 되는 다른 분자 및 세포를 비용면에서 효율적이고, 효과적으로 정제시키기 위하여 사용할 수 있는 신규한 조성물을 디자인하였다.

하기 실험부 및 이하 설명되는 바와 같이, 본 발명의 조성물은 표적 분자에 특이적으로 결합하여 온화한 조건하에서 침전되고 수집될 수 있는 비공유결합 복합체를 형성한다. 추가로, 선행 기술의 정제 조성물과는 대조적으로, 본 발명의 조성물은 표적 분자에 대한 리간드의 친화도를 감소시키고 사용되는 리간드의 양을 제한하고, 많은 유지비를 요하는 복잡한 실험실용 장비(HPLC)의 사용을 필요로 하고, 칼럼을 오염시키고 칼럼의 사용을 단일 공유결합 리간드로 제한하는 것(스마트 폴리머와 같은 것)에는 고정화되지 않는다

따라서, 본 발명의 일면에 따라 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포의 정제에 적합한 물질의 조성물을 제공한다.

표적 분자는 단백질, 탄수화물, 당단백질 또는 핵산 서열(예: DNA, 예로서, 플라스미드, RNA)와 같은 거대분자, 또는 화합물질과 같은 저분자일 수 있다. 본 명세서에서 대부분의 일례로서 단백질성 표적 분자를 기술하지만, 본 발명을 상기 표적으로 제한하고자 하는 것은 아님을 이해하여야 한다.

표적 세포는 진핵 세포, 원핵 세포 또는 바이러스 세포일 수 있다.

본 발명의 물질의 조성물은 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자 또는 세포와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드 및 코디네이터 이온 또는 분자와 함께 인큐베이션시킬 때 물질의 조성물이 비공유결합 복합체를 형성하도록 지배할 수 있는 선택된 적어도 하나의 코디네이트 부위를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "리간드"는 바람직하게 높은 친화도(예: $K_D < 10^{-5}$)로 관심의 대상이 되는 표적 분자와 결합하고 둘은 특이적으로 상호작용할 수 있는 합성 또는 자연발생된 분자를 말한다. 관심의 대상이 되는 표적이 세포일 경우, 리간드는 세포 표면상에서 발현되는(예: 세포 마커), 단백질, 탄수화물 또는 화합물질과 결합할 수 있는 것으로부터 선택된다. 바람직하게, 관심의 대상이 되는 분자 또는 세포와의 리간드 결합은 비공유결합이다. 본 발명의 일면에 따른 리간드는 모노, 바이(항체, 성장 인자) 또는 다가 리간드일 수 있고, 관심의 대상이 되는 하나 이상의 분자 또는 세포에 대하여 친화성을 나타낼 수 있다(예: 이중-특이성 항체). 본 발명에 따라 사용할 수 있는 리간드의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 항체, 유사물질(예: Affibodies[®] 참조: 미국특허 제 5,831,012호, 제 6,534,628호 및 제 6,740,734호) 또는 그의 단편, 에피

토프 태그, 항원, 바이오틴 및 그의 유도체, 아비딘 및 그의 유도체, 금속 이온, 수용체 및 그의 단편(예: EGF 결합 영역), 효소(예: 프로테아제) 및 그의 뮤턴트(예: 촉매적으로 불활성), 기질(예: 헤파린), 렉틴(예: 콘카나발린 A), 탄수화물(예: 헤파린), 핵산 서열[예: 압타머 및 Spiegelmers[Wlotzka[®] (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 8898-02], 천연 기질 또는 보조인자의 구조를 모사하고 발색단으로 구성되고(예: 염료, 안트라퀴논, 또는 파탈로시아닌), 반응 그룹에 연결된(예: 모노- 또는 디클로로트리아진 환, 참조, Denzili(2001) J Biochem Biophys Methods. 49 (1-3): 391-416)) 주로 효소의 촉매 부위와 상호작용하는 염료, 저분자 화합물질, 수용체 리간드(예: 성장 인자 및 호르몬), 결합 작용은 동일하지만 화학 구조는 상이한 유사물질, 또는 그의 단편(예: EGF 영역), 이온 리간드(예: 칼모듈린), 단백질 A, 단백질 G 및 단백질 L 또는 그의 유사물질(예: PAM, 참조, Fassina(1996) J. Mol. Recognit. 9: 564-9], 화합물질(예: 효소 및 혈청 알부민에 결합하는 시바크론 블루; 아미노산, 예로서, 세린 프로테아제와 결합하는 아르기닌 및 리신) 및 자기 분자, 예로서 고회전 유기 분자 및 폴리머(참조, <http://www.chem.unl.edu/rajca/highspin.html>)를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 어구 "코디네이트 부위"는 코디네이터 이온 또는 분자에 대하여 충분한 친화도(예: $K_D < 10^{-5}$)를 갖는 분자를 말한다. 코디네이터 이온 또는 분자와 함께 인큐베이션시킬 때 코디네이트 부위는 본 발명의 일면인 물질의 조성물이 비공유결합 복합체를 형성하도록 할 수 있다. 본 발명에 따라 사용할 수 있는 코디네이트 부위의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 에피토프(항체의 파라토프가 결합하는 항원결정기), 항체, 킬레이트제(예: His-태그, 참조, 하기의 실시예의 실시예 1에서 예시된 다른 예, 도 1, 25 및 26), 바이오틴(참조, 도 7), 핵산 서열(참조, 도 6), 단백질 A 또는 G(도 9), 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자(참조, 하기의 실시예의 실시예 2 및 도 8) 및 상기 기술된 다른 분자(참조, 리간드에 대한 일례)를 포함한다.

다수의 코디네이터 부위는 상기 기술된 리간드와 결합할 수 있다는 것을 이해하여야 한다(참조, 도 1a-f).

추가로, 상이한 코디네이터 부위가 킬레이트제 및 전자 풍부/부족 분자와 같은 리간드에 부착되어 도 19에 제시된 것과 같은 복합체를 형성할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 각각 도 23a-b 및 24에 도시한 바와 같이, 상기와 같은 결합 부위의 조합은 관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 폴리머 또는 정연한(ordered) 시트(즉, 네트워크)의 형성을 매개할 수 있다.

복합체로부터 관심의 대상이 되는 분자를 회수할 때 경쟁 및/또는 추가의 문제들을 막기 위해서는, 코디네이트 부위-리간드 상호작용 또는 코디네이트 부위-표적 분자 상호작용의 가능성을 없애도록 코디네이트 부위를 선택한다. 예를 들면, 리간드가 코디네이트 부위보다는 관심의 대상이 되는 이뮤노글로블린에 대하여 친화성을 갖는 항원인 경우, 항원에 결합할 수 있는 항체 또는 에피토프 태그는 바람직하지 못하다.

본 명세서에서 사용되는 어구 "코디네이터 이온 또는 분자"는 본 발명의 일면의 물질의 조성물이 비공유결합 복합체를 형성하도록 지배할 수 있는 코디네이트 부위에 대하여 충분한 친화도(예: $K_D < 10^{-5}$)를 나타내는 가용성 엔티티를 말한다. 본 발명에 따라 사용할 수 있는 코디네이터 분자의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 아비딘 및 그의 유도체, 항체, 전자 풍부 분자, 전자 부족 분자 등을 포함한다. 본 발명에 따라 사용할 수 있는 코디네이터 이온의 예로서, 제한하는 것은 아니지만, 1가, 2가, 3가 금속을 포함한다. 도 25에 본 발명에 따라 코디네이터 이온으로서 사용할 수 있는 킬레이트제 및 금속의 예를 도시한다. 도 26에 본 발명에 의해 사용될 수 있는 전자 풍부 분자 및 전자 부족 분자의 예를 열거한다. 항체들 및 항체 단편, 및 단일쇄 항체를 생성하는 방법(문헌{Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, (참고 문헌으로서 인용됨); Goldenberg, 미국특허 제 4,036,945호 및 제 4,331,647호, 및 그에 포함된 참고문헌; 참조 Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959); Whitlow and Filpula, Methods 2: 97-105 (1991); Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11: 1271-77 (1993); 및 미국특허 제 4,946,778호})에 기술되어 있다.

바람직하게, 본 발명의 일면의 조성물은 코디네이터 이온 또는 분자를 포함한다.

본 발명의 이러한 일면의 리간드는 코디네이트 부위에 직접 결합될 수 있고, 이는 둘의 화학적 성질에 따라 달라진다. 처음부터 끝까지 관심의 대상이 되는 분자에 대한 리간드의 인지(예, 친화도)를 유지하는 것으로 추정된다. 필요할 경우(예, 입체장애), 리간드는 링커(linker)를 통해 코디네이트 부위에 결합될 수 있다. 일반적인 리간드로 대표적인 킬레이트제의 변형에 대한 일반적인 합성 경로가 도 14에 도시된다. 문헌[Margherita et al. (1993) J. Biochem. Biophys. Methods 38: 17-28]에는 본 발명의 코디네이트 부위에 리간드를 부착시키는데 사용될 수 있는 합성법이 제공되어 있다.

거기에 결합된 리간드 및 코디네이트 부위가 둘다 단백질(예, 각각 성장인자 또는 에피토프 태그)인 경우, 융합 단백질의 합성은 분자생물학적 방법(예, PCR) 또는 생화학적 방법(고상 펩티드 합성)에 의해 수행될 수 있다.

본 발명의 복합체는 다양한 복잡도 수준(complexity level), 예컨대 모노머(3개의 리간드 복합체를 나타내는 도 12 및 도 13a-b 참조), 다이머, 폴리머(실시부의 실시예 3에 나타낸 바와 같이 결합 링커를 통한 폴리머의 형성을 나타내는 도 23a-b 참조), 시트(표적 분자의 단일 표면 노출된 Trp 잔기가 TNB---TNB 엔티티와 전자 풍부/부족 관계를 형성할 때 시트가 형성되는 도 24 참조) 및 3차원(3D) 구조를 형성할 수 있는 격자(예를 들어, 하나 보다 많은 표면 노출된 Trp 잔기가 전자 풍부/부족 관계를 형성하는 경우)을 가지고 있다. 복합체의 복잡도가 높아질수록 더욱 견고해지기 때문에 이 구조는 이하에 추가로 설명되는 바와 같이 결정화 공정에서 사용가능하다는 것이 충분히 입증될 것이다. 또한, 큰 복합체는 더욱 빠르게 상분리하여 추가의 원심분리 단계의 사용을 무효화시킬 것이다.

본 발명의 조성물은 이하에 설명되는 바와 같이 추가의 완충제 및 첨가제를 포함할 수 있는 정제 키트내로 팩킹될 수 있다. 이러한 키트가 단일 샘플로부터 다수의 분자를 정제하기 위한 다수의 리간드를 포함할 수 있음이 인지될 것이다. 그러나, 침전(예, 동일한 반응 완충제, 온도 조건, pH 등을 사용) 및 추가의 정제 단계를 단순화하기 위해, 코디네이트 부위 및 코디네이트 이온 또는 분자는 동일한 것으로 선택된다.

상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 샘플로부터 관심의 대상이 되는 분자 또는 세포를 정제하는데 사용될 수 있다.

즉, 본 발명의 다른 일면에 따라, 관심의 대상이 되는 분자를 정제하는 방법이 제공된다.

상기 언급된 용어 "정제"는 본 발명의 조성물 및 그의 침전물에 결합했을 때 용해도를 변화시킴으로써(즉, 상분리) 샘플로부터 관심의 대상이 되는 분자를 적어도 분리하는 것을 의미한다.

본 발명의 이러한 일면의 방법은 관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 샘플을 본 발명의 조성물과 접촉시키고, 본 발명에 따른 물질의 조성물과 관심의 대상이 되는 분자로부터 형성된 복합체를 포함하는 침전물을 회수하여 관심의 대상이 되는 분자를 정제함으로써 수행된다.

본 명세서에 사용된 용어 "샘플"은 관심의 대상이 되는 분자 및 가능하게는 하나 이상의 오염물(즉, 목적하는 관심의 대상이 되는 분자와는 다른 물질)을 포함하는 용액을 말한다. 예를 들어, 관심의 대상이 되는 분자가 분비된 재조합 폴리펩티드인 경우, 샘플은 재조합 폴리펩티드 이외에 세포로부터 분비되는 대사산물 및 다른 폴리펩티드 뿐만 아니라 혈청 단백질을 포함할 수 있는 적응용 배지(conditioned medium)일 수 있다. 샘플이 오염물을 포함하지 않는 경우, 정제는 농축을 말한다.

정제를 개시하기 위해, 본 발명에 따른 물질의 조성물을 먼저 샘플과 접촉시킨다. 이것은 바람직하게는 코디네이트 부위에 부착된 리간드를 샘플에 첨가하여 관심의 대상이 되는 분자를 리간드에 결합시킨 다음, 코디네이트 이온 또는 분자를 첨가하여 복합체를 형성하고 관심의 대상이 되는 분자를 침전시킴으로써 수행된다. 복합체의 신속한 형성(오염물이 포착될 수 있음)을 방지하기 위해, 교반하면서 샘플에 코디네이트를 천천히 첨가하는 것이 바람직하다. 또한, 침전 속도는 이하에 추가로 설명되는, 면역원의 형성의 경우와 같이 다양한 적용예에서 유리할 수 있는 더 작은 복합체를 또한 형성가능케 하는 유리 코디네이트 엔티티(free coordinating entity)(즉, 리간드에 결합하지 않음)를 첨가함으로써 조절될 수 있다.

일부의 경우(예를 들어 큰 복합체의 경우)에는 원심분리가 필요하지 않지만, 일단 상술된 복합체가 형성되면(초 내지 시간) 복합체의 침전물은 원심분리(예, 초원심분리)에 의해 촉진된다.

의도하는 용도에 따라, 복합체로부터 관심의 대상이 되는 분자를 회수하기 위해 관심의 대상이 되는 분자인 침전물을 추가의 정제 단계에서 처리할 수 있다. 이것은 당업계에 널리 알려진 많은 생화학적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예로는 소수성 상호작용 크로마토그래피(예, 페닐 세파로스)상의 분획, 에탄올 침전, 등전 포커싱(isoelectric focusing), 역상 HPLC, 실리카상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스의 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전(ammonium sulfate precipitation), 하이드록실아파이트(hydroxylapatite) 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피(예, 포착제로서 단백질 A, 단백질 G, 및 항체, 특이 기질, 리간드 또는 항원 사용)가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

복합체 형성동안 침전된 저친화성 결합 불순물을 용출시키기 위해, 깨끗한(clean) 반응액(예, 완충제)을 침전물에 단순 첨가할 수 있음이 추가로 인지될 것이다.

상술한 정제 과정에서 어느 과정은 표적 분자의 수율 및 순도를 증가시키기 위해 샘플(예, 침전물)에 반복적으로 적용될 수 있음이 인지될 것이다.

바람직하게도, 물질의 조성물 및 코디네이터 이온 또는 분자는 형성된 복합체로부터 표적 분자를 신속하고 용이하게 분리할 수 있도록 선택된다. 예를 들어, 코디네이트 부위가 코디네이터에 결합하는 것을 방해하지 않는 용출 조건이 사용되는 한, 관심의 대상이 되는 분자는 복합체로부터 직접 용출될 수 있다(도 4-5 참조). 예를 들어, 복합체에 사용된 코디네이트 부위가 킬레이트제인 경우, 금속-킬레이트제가 상호작용하지 않는 것이 널리 입증되었기 때문에, 관심의 대상이 되는 분자를 용출하기 위해 큰 이온세기가 적용될 수 있다. 다르게는, 금속-킬레이트제 상호작용은 이러한 조건에서 표적 분자를 용출할 수 있는 고염농도(high salt) 조건에 대해 내성을 보이기 때문에, 카오트로픽 염(chaotropic salt)에 의한 용출이 사용될 수 있다[Porath (1983) Biochemistry 22: 1621-1630].

복합체는 코디네이터 금속과 경쟁하는 유리(변형되지 않은) 킬레이트제(즉, 코디네이트 부위)의 첨가에 의해 재용해될 수 있다(도 3). 그 후, 대부분의 킬레이트 금속 및 경쟁 킬레이트제를 제거하기 위해 한외여과 또는 투석이 사용될 수 있다. 그 후, 용해된 복합체(즉, 관심의 대상이 되는 분자:리간드-코디네이트 부위)는 고정화 금속 친화성 칼럼(immobilized metal affinity column)[예, 이미노디아세트산(IDA) 및 니트릴로트리아세트산(NTA)]에 로딩될 수 있다(loaded). 고정화성 킬레이트제가 사용되는 경우(예, 카테콜), 그것에 결합하는 대신 칼럼으로부터 리간드:킬레이트제 시약의 용출을 피하도록, 동일한 것에 의하거나 고정화 금속에 대해 유사한 결합 친화도를 가진 다른 킬레이트제로 변형된 고정화 금속 친화성 이온 칼럼을 사용하는 것이 추정됨이 인지될 것이다.

적합한 용출 조건을 적용하면 칼럼에 결합된 리간드-코디네이트 부위를 지닌 표적분자가 용출될 것이다. 최종 탈염 공정을 적용하여 최종 생성물을 수득할 수 있다.

이러한 융합 분자의 합성은 본 명세서에 기술된 방법에 관련된 대부분의 비용 및 노동력의 원인이 되기 때문에, 리간드-코디네이트 부위의 재생은 경제적 가치가 높다. 따라서, 예를 들어 리간드-코디네이트 부위의 재생은 상술한 칼럼에 경쟁 킬레이트제를 로딩하거나 칼럼의 pH를 변화시킨 다음, 유리 킬레이트제와 목적하는 리간드-코디네이트 부위를 분리할 수 있는 한외여과에 의해 달성될 수 있다.

상술한 정제 방법은 재조합 성장인자 및 혈액 단백질 산물[예, 폰 빌레브란트 병(von Willebrand's disease)과 A형 혈우병 각각에 대한 대체 요법에서 효과가 있는 치료용 단백질인 폰 빌레브란트 인자 및 인자 VIII]과 같이 연구적 또는 임상적 가치가 높은 다양한 재조합 및 천연 물질을 분리하는데 적용될 수 있다.

상술된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 또한 세포중 특정 개체군을 분리하는데 사용될 수 있다.

인간의 장기 부족으로 인해, 시험관내 기관형성(organogenesis)이 최적의 대응으로서 부상되고 있음이 널리 입증되었다. 이러한 목적을 위해, 임의의 목적하는 세포 계보로 분화시킬 수 있는 줄기세포가 분리되어야 한다. 즉, 예를 들어 조혈 줄기/전구 세포를 분리하기 위해, 이런 세포 개체군에 특이적인 표면 마커(surface marker), 예컨대 CD34 및 CD105에 결합하는 다수의 리간드가 사용될 수 있다[Pierelli (2001) Leuk. Lymphoma 42 (6): 1195-206 참조].

다른 예는 콘카나발린 A와 같은 렉틴 리간드를 사용하는 적혈구의 분리이다[Sharon (1972) Science 177: 949; Goldstein (1965) Biochemistry 4: 876].

바이러스 세포 분리는 관심의 대상이 되는 바이러스 세포에 특이적인 각종 리간드를 사용하여 수행될 수 있다[http://www.bdbiosciences.com/clontech/archive/JAN04UPD/Adeno-X.shtml 참조].

특히, 레트로바이러스는 헤파린 리간드를 포함하도록 디자인된 본 발명의 조성물에 의해 분리될 수 있다[Kohleisen (1996) J Virol Methods 60 (1): 89-101].

상술한 방법을 사용하는 세포 분리는, 밀도 또는 크기에 기초하여 세포를 분리하는데 효과가 있는 샘플 용적축소(de-bulking)의 이전 단계들(예, 원심분리) 및 선택적인 세포-농축의 추가의 단계들(예, FACS)에 의해 수행될 수 있다.

정제 능력 이외에, 본 발명의 조성물은 또한 원치않은 분자 또는 세포로부터 샘플을 고갈시키는데 사용될 수 있다.

이것은 복합체가 형성되도록(상술함) 원치않는 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 포함하는 샘플을 본 발명의 조성물과 접촉시켜 복합체를 형성시키고(상술함), 침전물을 제거함으로써 수행된다. 정제된 샘플은 상청액이다.

이 방법은 예를 들어 골수 샘플로부터 종양 세포의 고갈, 말초혈액, 지라, 가슴샘, 림프 또는 골수 샘플로부터 T 세포 및 $CD8^+$ 세포 또는 $CD4^+$ 세포의 분리 및 농축을 위한 B 세포 및 단핵세포의 고갈, 생물학적 샘플로부터 병원체 및 원치않는 물질(예, 프리온, 독소)의 고갈, 단백질 정제(예, BSA와 같은 고분자량 단백질의 고갈) 등에서 다양한 용도를 가진다.

상술된 바와 같이, 다중(multiple) 리간드는 체액으로부터 매우 풍부한 단백질을 제거하는 경우에서와 같이, 주어진 샘플로부터 다수의 표적을 고갈시키는데 사용될 수 있다(예, 알부민, IgG, 항트립신, IgA, 트랜스페린 및 합토클로빈, <http://www.chem.agilent.com/cag/prod/ca/51882709small.pdf> 참조).

본 발명의 신규한 조성물의 독특한 특성은 선행기술의 침전 조성물(예, 스마트 폴리머)을 능가하는 다수의 이점을 제공하는데, 이들 이점중 일부를 아래 요약한다.

(i) 저가의 정제; 본 방법은 HPLC와 같은 정교한 실험장치에 의존하지 않아, 기계관리 및 운전에서 따른 비용을 피할 수 있다.

(ii) 확대 용이(Easy up scaling); 본 방법은 확산 한계를 가진 친화성 칼럼의 제한된 용량(capacity)에 의해 한정되지 않는다. 본래, 첨가되는 침전 복합체의 양은 비제한적이다.

(iii) 온화한 침전 공정; 이는 pH, 이온세기 또는 온도의 실질적인 변화로부터 제한되지 않는다.

(iv) 침전 공정의 조절; 침전은 침전 혼합물에 적절한 코디네이터 이온 또는 분자의 저속 첨가; 1가 및/또는 다가 코디네이터의 사용; 코디네이트 부위에 대해 상이한 친화도를 가진 코디네이터 이온 또는 분자의 사용; 비공유결합 폴리머, 시트 또는 격자의 형성전, 형성중 또는 형성후 불순물의 비특이적 결합 및 포착을 방지하기 위한 비고정화 유리 코디네이트 부위의 첨가[Mattiasson et al., (1998) J. Mol. Recognit. 11: 211-216; Hilbrig and Freitag (2003) J. Chromatogr. B 790: 79-90]에 의해; 및 온도 조건의 변화에 의해 조절될 수 있다. 여러 분자는 온도가 감소함에 따라 용해도가 감소하므로, 따라서 온도 조건을 조절하면 침전 속도 및 침전 정도를 조절할 수 있음이 널리 입증되었다. 저온 조건은 신속한 침전 공정으로 인한 불순물의 포착을 야기할 수 있는 반면, 고온 조건은 표적 분자의 수율을 낮출 수 있음(예, 변성 온도)이 인지될 것이다. 즉, 상기 파라미터를 고려하면서 최적의 온도 조건을 달성하는 것이 추정된다.

(v) 오염 원인의 감소; 오염물은 코디네이터 엔티티와 결합할 수 없고, 그 자체로 이들은 비공유결합 매트릭스에 단단히 결합할 수 없어, 용출 단계 이전에 제거된다. 또한, 리간드의 생물학적 배경[리간드와 함께 공정제되는(co-purified) 분자]으로부터 제거되는 오염물은 변형될 수 있고, 리간드 그자체[단, 리간드 및 오염물은 동일한 화학적 성질(예, 둘다 단백질임)을 공유함]는 침전 복합체의 일부가 될 수 있다. 적합한 용출 조건하에, 표적 분자는 회수될 것이나 변형된 오염물은 회수되지 않을 것이다.

(vi) 균질용액에서 결합; 균질용액에서의 결합은 친화성 크로마토그래피와 같은 불균질 상(phase)에서보다 더 빠르고 더 효과적인 것이 널리 입증되어 있다[AC, Schneider et al., (1981) Ann. NY Acad. Sci. 369, 257-263; Lowe (2001) J. Biochem. Biophys. Methods 49, 561-574]. 예를들어, 고분자량 폴리머(AP에 사용됨)는 용액중에서 다수의 친화성 분리 방법에서와 같이 표적분자와 같은 거대분자의 도입 액세스(access)를 차단하는 매우 감겨진 점성 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다[Vaida et al., (1999) Biotechnol. Bioeng. 64: 418].

(vii) 리간드의 비고정화 - 상기에 추가로 설명되었다.

(viii) 복합체의 재용해화 용이성; 복합체는 비공유결합적 상호작용에 의해 생성된다.

(ix) 열악한 조건하에서의 정화; 조성물은 매트릭스에 공유결합적으로 결합되지 않으며, 그 자체로 임의의 디바이스로부터 제거될 수 있어, 정화 조건을 적용하여 비특이적으로 결합된 불순물로부터 디바이스(칼럼)를 청소할 수 있다.

본 발명에 따른 조성물은 다이머, 트리머, 폴리머, 시트 또는 격자에서와 같이 정연한(ordered) 복합체에 관심의 대상이 되는 분자를 배열하는 능력을 가지므로, 본 발명의 조성물은 단백질, 특히 막 단백질과 같은 거대분자의 결정화를 촉진하는데 사용가능하다. 당업계에 널리 알려진 바와 같이, 결정 구조는 3차원 공간에서의 분자의 정연한 배열을 나타낸다. 이러한 정연한 배열은 제시된 공간내의 유리 분자의 수를 감소시킴으로써 생성될 수 있다(도 10a-b 및 11a-c 참조).

따라서, 본 발명의 다른 일면에 따라, 관심의 대상이 되는 분자를 결정화시키기 위한 조성물이 제공된다.

본 명세서에 사용된 용어 "결정화"는 그 원자 및 대개는 외부 평면(external plane face)의 규칙적으로 반복되는 배열을 형성하도록 관심의 대상이 되는 분자를 고체화하는 것을 말한다.

본 발명에 따른 이러한 일면의 조성물은, 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하되, 그에 결합하였을 때 관심의 대상이 되는 분자의 상대적인 공간 배치 및 배향을 한정하여 유도성 결정화 조건하에 그로부터 결정의 형성을 촉진하기 위해 선택된다.

공유결합 다중-리간드 복합체가 가용성 단백질의 결정화에 이미 사용되었음이 인지될 것이다[Dessen (1995) Biochemistry 34: 4933-4942; Moothoo (1998) Acta. Cryst. D54 1023-1025; Bhattacharyya (1987) J. Biol. Chem. 262: 1288-1293]. 그러나, 분자당 2개 이상의 리간드를 가진 다중-리간드 복합체의 합성은 기술적으로 어렵고 비용이 많이 든다; 또한, 다중-리간드 복합체내의 모든 표적 결합 부위를 점유하기에 충분한 표적분자와 결합하도록 리간드간의 최적 거리를 갖는 다중-리간드 복합체를 합성하기 전에 표적 단백질의 3차원 구조가 공지되어야 하며, 그 자체로 이들 리간드들은 막 단백질의 결정화에 결코 사용되지 않았다.

본 발명은 비공유결합 다중-리간드(리간드-코디네이트 부위의 일반적인 구조를 가짐)에서 기본 단위만 합성함으로써 이러한 문제점을 회피하여, 달성하기가 더욱 용이하고, 더욱 신속하며 더욱 값이 싸다. 이 기본 단위는 다가의 코디네이터 이온 또는 분자를 첨가함으로써 비공유결합-리간드만을 형성하였다. 즉, 결정화 실험에 사용될 수 있는 디, 트리, 테트라 또는 그 이상의 다중-리간드를 생성하도록 단일 합성 단계가 사용된다.

관심 대상이 되는 분자(바람직하게는 막 단백질)의 결정을 생성하기 위해, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 예정된(predetermined) 순도 및 농도로 제공된 관심 대상이 되는 분자를 포함하는 샘플과 접촉된다.

전형적으로, 결정화 샘플은 액체 샘플이다. 예를 들어, 관심 대상이 되는 분자가 막 단백질인 경우, 본 발명의 이러한 일면에 따른 결정화 샘플은 막 표본(막 표본)이다. 막 표본을 생성하는 방법은 문헌[Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)]에 기술되어 있다.

일단 관심 대상이 되는 분자가 본 발명의 조성물에 결합되면, 그의 상대적인 공간 배치 및 배향이 충분히 한정되도록, 샘플을 적합한 결정화 조건으로 처리한다. 관심 대상이 되는 분자의 결정화를 촉진하기 위해, 당업계에 공지된 몇몇 결정화 접근법이 샘플에 적용될 수 있다. 결정화 접근법의 예로 자유 계면 확산법(free interface diffusion method) [Salemme, F.R. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 151: 533-539], 현적법(hanging drop method) 또는 시팅 드롭 방법(sitting drop method)에서의 증기 확산(McPherson, A. (1982) Preparation and Analysis of Protein Crystals, John Wiley and Son, New York, pp 82-127), 및 액체 투석법(Bailey, K. (1940) Nature 145: 934-935)이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

현재, 현적법은 용액으로부터 거대분자 결정을 성장시키는데 가장 통상적으로 사용되는 방법이고; 이 접근법은 주로 단백질 결정을 생성하는데 적합하다. 전형적으로, 단백질 용액을 함유하는 드롭렛(droplet)을 커버 슬립(cover slip)위에 스폿팅하고, 저장기가 구비된 밀폐 챔버에서 고농도의 침전제를 사용하여 현탁시킨다. 시간이 경과함에 따라, 드롭렛의 용액은 드롭렛으로부터 수증기의 확산에 의해 저장기와 평형화되고, 드롭렛내의 단백질과 침전제의 농도가 서서히 증가하여 단백질이 침전화 또는 결정화된다.

상술한 방법을 사용하여 수득된 결정은 바람직하게는 3Å 미만, 더욱 바람직하게는 2.5Å 미만, 더욱더 바람직하게는 2Å 미만의 분해능(resolution)을 가진다.

본 발명의 조성물은 혈청 샘플과 같은 복합체 혼합물로부터 검체를 에세이하는데 있어서 명백한 유용성을 가질 수 있고, 명백한 진단상의 이점을 가질 수 있다.

즉, 본 발명에 의해 대상에게서 관심 대상이 되는 분자와 관련된 질병 소질 또는 그의 존재를 검출하는 방법이 예측된다.

관심의 대상이 되는 분자와 관련된 질병의 예는 전립선 특이 항원의 존재에 의해 검출될 수 있는 전립선 암이다[PSA, 예, >0.4 ng/ml, Boccon-Gibod Int J Clin Pract. (2004) 58 (4): 382-90].

관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 복합체의 형성 수준이 대상에서 관심의 대상이 되는 분자와 관련된 질병 소질 또는 그의 존재를 표시하는 바, 본 발명의 조성물을 대상으로부터 수득한 생물학적 샘플과 접촉시킨다.

본 명세서에 사용된 어구 "생물학적 샘플"은 대상으로부터 분리된 조직 또는 체액의 샘플을 말하는 것으로, 예를 들어 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부의 외부(external section), 기도, 장관, 비뇨생식관, 눈물, 침, 젖, 혈액 세포, 종양, 신경조직, 기관, 및 또한 생체내 세포 배양액 성분의 샘플이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

복합체내에서 관심의 대상이 되는 분자의 검출 및 정량을 촉진하기 위해, 생물학적 샘플 또는 조성물은 바람직하게는 표시된다(예, 형광, 방사능 표지).

본 발명의 조성물은 또한 임상, 환경, 건강 및 안전, 원격조작(remote sensing), 군수, 식품/음료 및 화학 처리 적용에 있어서 매우 중요할 수 있는 액체 또는 기체 샘플에 존재하는 물질의 정성 및 정량에 사용될 수 있다.

비정상적인 단백질 상호작용은 많은 병원성 장애의 발달을 지배한다. 예를 들어, 신경계내 시냅스 단백질의 비정상적인 상호작용 및 미스폴딩(misfolding)은 다양한 신경계 장애에서 신경변성을 야기하는 중요한 발병 경과(event)이다. 이들로는 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD) 및 루이소체 치매(DLB)가 포함된다. AD의 경우, 아밀로이드 전구체 단백질 대사의 단백질분해 산물인 미스폴딩 아밀로이드 베타 펩티드 1-41(Aβeta)은 신경원성 소포체에 및 세포외에 응집체(즉, 플라크)로서 축적된다. 본 발명의 조성물은 이러한 거대분자 복합체를 방해하여 상기 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

약학조성물의 투여 및 생성 방법은 예를 들어 문헌[Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1 p.1]에 기술되어 있다.

본 발명의 조성물은 진단용 또는 치료용 키트에 포함될 수 있다. 예를 들어 특정 질환의 조성물은 적합한 완충제 및 보존제와 함께 하나 이상의 용기중에 포장되어, 진단용 또는 치료학적 처치용으로 사용될 수 있다.

따라서, 리간드 및 코디네이트 부위는 하나의 용기에 도입될 수 있고, 코디네이트 부위 또는 이온은 다른 용기에 도입될 수 있다. 바람직하게도, 용기는 라벨을 포함한다. 적합한 용기로는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 및 시험관이 포함된다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같이 다양한 물질로부터 형성될 수 있다.

또한, 안정화제, 완충제, 차단제(blocker) 등과 같은 다른 첨가제가 또한 첨가될 수 있다.

항원의 면역원성을 증진시키기 위한 다수의 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, KLH, BSA 티로글로불린 및 오브 알부민과 같은 큰 담체에의 항원분자(예, 펩티드)의 가교결합을 포함하는 합텐 담체(hapten carrier) 컨쥬게이션은 면역원성을 지배하는 것으로 알려진 파라미터인 상기 분자의 분자 크기를 향상시키기 위해 사용될 수 있다[Harlow and Lane (1998) A laboratory manual Infra 참조]. 그러나, 항원 분자의 공유결합 가교결합은 구조를 변화시켜, 항원 전달(antigenic presentation)을 제한한다. 이러한 문제를 피하기 위해 각종 기질에 대한 항원분자의 비공유결합 고정화가 시도되었다[Sheibani Frazier (1998) BioTechniques 25: 28]. 따라서, 본 발명의 조성물은 이것을 매개하는데 사용될 수 있다.

즉, 본 발명은 또한 본 발명의 조성물을 사용하여 관심의 대상이 되는 분자의 면역원성을 증진시키는 방법을 예측한다. 본 명세서에 사용된 용어 "면역원성"은 유기체내에서의 면역 반응(예, 항체)을 유발하는 분자의 능력을 말한다.

형성된 복합체가 면역원으로서의 역할을 갖는 바, 본 방법은 관심의 대상이 되는 분자를 본 발명의 조성물과 접촉시키는 것에 의해 수행된다. 이러한 복합체를 동물 숙주에 주사하여 면역 반응을 생성시킬 수 있다.

즉, 예를 들어 항체 반응을 생성하도록, 상술한 면역원성 조성물을 동물 숙주(예, 래빗 또는 마우스)에 피내주사한다. 1-4 번 주사후(즉, 부스트(boost)), 혈청을 수집하고(약 최초 주사의 약 14주), 예를 들어 리간드가 단백질 A인 샘플에서 상술한 검체 검출 방법을 사용하여 항체가를 결정한다. 다르거나 추가로, 친화성 크로마토그래피 또는 ELISA가 수행된다.

본 발명의 조성물은 본 명세서에 기술된 것과 같은 유용성과 별 차이가 없고, 친화성 크로마토그래피에 도움을 주는 (attributed) 다수의 다른 유용성을 가질 수 있음이 인지될 것이다[참조예, Wen-Chien and Kelvin (2004) Analytical Biochemistry 324: 1-10].

본 발명의 추가의 목적, 장점 및 신규한 특징은 비한정적인 하기 실시예의 실험을 통해 당업자들에게 자명할 것이다. 또한 상기 설명되고 이하 청구 범위에서 청구하는 본 발명의 다양한 일례 및 일면은 하기 실시예를 통해 실험적으로 입증될 것이다.

실시예

상기한 설명과 함께 하기 실시예를 참고하여 본 발명을 비한정적으로 설명한다.

일반적으로, 본 명세서에 사용된 명명법 및 본 발명에 사용된 실험 과정은 분자적, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다[참조예, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al., (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국특허 제 4,666, 828호; 제 4,683,202호; 제 4,801,531호; 제 5,192,659호 및 제 5,272,057호에 설명된 방법; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al., (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980)]; 이용가능한 번역분석법은 특허 및 과학 문헌에 널리 기술되어 있다[참조예, 미국특허 제 3,791,932호; 제 3,839,153호; 제 3,850,752호; 제 3,850, 578호; 제 3,853,987호; 제 3,867,517호; 제 3,879,262호; 제 3,901,654호; 제 3,935,074호; 제 3,984,533호; 제 3,996,345호; 제 4,034,074호; 제 4,098,876호; 제 4,879,219호; 제 5,011,771호 및 제 5,281,521호; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)](본원에 충분히 설명된 바와 같이 언급된 모든 참고문헌은 참고로서 본원에 포함된다). 이 문서 전체를 통해 다른 일반 문헌이 제공된다. 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있고 독자의 용이를 위해 제공된다. 이에 포함된 모든 정보는 본 명세서에서 참고적으로 인용된다.

실시예 1

킬레이트제-금속 복합체를 이용한 비공유결합 다중-리간드 복합체의 합성

특이성 및 친화성이 다른 킬레이트제의 금속과 결합하는 능력이 문헌에 충분히 기술되어 있다. 본 발명의 비공유결합 다중-리간드 복합체를 생성하기 위해, (목적하는 길이의) 링커를 특이적 리간드와 결합하도록, 그리고 킬레이트제를 다음의 일반적인 구조를 생성하도록 변형시킨다: 리간드---링커---킬레이트제.

그후, 적합한 금속의 첨가에 의해 비공유결합 다중-리간드 복합체가 형성되어야 한다(도 12).

예를 들어, Fe^{3+} 이온의 존재하에 비공유결합 다중-리간드 복합체가 형성되도록(도 13b), 하이드록사메이트(공지된 Fe^{3+} 킬레이트제임) 유도체가 합성된다(도 13a). 일반적인 리간드로 대표적인 킬레이트제를 변형시키는 일반적인 합성 경로가 도 14에 도시된다. 이러한 합성법은 앞의 문헌[Margherita et al., 1999]에 의해 발표된 것과 유사할 수 있다.

비공유결합 다중-리간드 복합체의 제조에 킬레이트를 이용할 경우, $[1,10\text{-페난트롤린}]_2\text{-Cu}^{2+}$ 또는 $[1,10\text{-페난트롤린}]_3\text{-Ru}^{3+}$ 의 경우에서와 같이, 화학정량(stoichiometry)이 상이한 금속과 결합하는 일부 킬레이트제의 능력으로부터 기인하는 추가의 이점을 가질 수 있다[Onfelt et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5708-5713].

이러한 현상은 이를 사용하여 디(도 15a) 및 트리(도 15b) 비공유결합 다중-리간드 복합체(리간드----링커----킬레이트제 유도체)의 형성에 이용될 수 있다.

실시예 2

전자 풍부-부족 복합체를 사용한 비공유결합 다중-리간드 복합체의 합성

전자 수용체는 " π 과잉(excessive)" 헤테로사이클릭 인돌 환 시스템과 쉽게 분자 복합체를 형성한다. 인돌 피크르산은 약 130 년전에 기술된 이러한 형태의 첫번째 복합체이었고[Baeyer and Caro, (1877) Ber. 10: 1262], 이와 동일한 전자 수용체는 몇 년뒤 자스민 오일로부터 인돌을 분리하기 위해 사용되었다. 그후, 피크르산은 반응 혼합물로부터 복합체로서 인돌을 분리 및 확인하기 위해 자주 사용되어 왔다. 그 후, 1,3,5-트리니트로 벤젠은 착화제로서 도입되어 같은 목적을 위해 종종 사용되었다[Merchant and Salagar, (1963) Current Sci. 32: 18]. 인돌의 다른 고체 복합체는 전자 수용체, 예컨대 스티프닉산(styphnic acid)[Marion, L., and Oldfield, C.W., (1947) Cdn. J. Res. 25B 1], 피크릴 할라이드(picryl halide)[Triebs, W., (1961) Chem. Ber. 94: 2142], 2,4,5,7-테트라니트로-9-플루오레논[Hutzinger, O., and Jamieson, W.D., Anal. Biochem. (1970) 35, 351-358] 및 1-플루오로-2,4-디니트로벤젠과 1-클로로-2,4-디니트로벤젠[Elguero et al., (1967) Anals Real Soc. Espan. Fis. Quim. (Madrid) ser. B 63,905 (1967); Wilshire, J.F.K., Australian J. Chem. 19, 1935 (1966)]을 사용하여 제조되었다.

도 16은 리간드----링커----전자 부족 (E. 부족) 유도체의 하나의 일례를 설명하며, 도 16b는 사용가능한 전자 풍부 공유결합 트리머의 일례를 나타낸다. 트리니트로벤젠(도 16a) 및 인돌(도 16b) 유도체와 함께 혼합하는 것에 의해 다중-리간드 복합체가 형성될(도 16c) 것으로 예측된다. 반대의 복합체, 즉 전자 풍부 부위와 전자 부족 공유결합 트리머를 가진 리간드 유도체가 또한 합성될 수 있음이 인지될 것이다.

상기 리간드 유도체에 대한 가능한 합성 경로가 도 17에 도시된다.

Trp 잔기(또는 임의의 다른 전자 풍부 또는 부족 부위)를 가진 합성 펩티드(또는 임의의 펩티드)가 비공유결합 다중-리간드 복합체의 제조에 사용될 수 있다. 도 18은 4개의 Trp 잔기(4개의 전자 풍부 부위)를 갖는 합성 펩티드의 일례로서, 전자 부족 부위(트리니트로벤젠)로 변형된 리간드 유도체의 존재하에 형성될 수 있는 테트라-비공유-리간드임을 나타낸다.

실시예 3

전자 풍부-부족 및 킬레이트제-금속 관계의 조합을 사용한 비공유결합 다중-리간드 복합체의 합성

하나는 비공유결합 다중-리간드 복합체를 형성하도록, 상기 실시예 1 및 2에 설명된 바와 같이 2개의 복합화능(complexing ability)을 결합할 수 있다. 이러한 비공유결합 다중-리간드 복합체의 일반적인 구조의 일례가 도 19에 도시된다.

이를 위해서는 전자 부족 부분에 공유결합적으로 결합되는 킬레이트제가 필요하다. 이러한 조합을 생성하기 위한 합성 경로를 도 20에 나타낸다.

예를 들어, M^{2+} 및 M^{3+} 금속 둘다에 결합할 수 있는 킬레이트제(예, 카테콜)는 M^{2+} 및 M^{3+} 금속의 존재하에 비공유결합-디-리간드(도 21a) 또는 비공유결합-트리-리간드(도 21b)을 형성할 수 있다.

Trp 잔기(또는 임의의 다른 전자 풍부 잔기)와 펩티드(또는 폴리펩티드)가 존재하면 도 22a-b에 도시된 구조가 형성될 수 있다.

2개의 상기 결합 관계의 조합(전자 풍부-부족과 함께 킬레이트제-금속)은 추가의 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 비공유결합-다중-리간드-폴리머 복합체의 형성능. 이것은 2개의 킬레이트제와 이들 사이의 전자 풍부 부위를 합성함으로써 달성될 수 있다(도 23a). 리간드----E. 부족 유도체의 존재하에서, 리간드의 비공유결합 폴리머를 나타내는 도 23b에 도시된 복합체가 형성될 것으로 예측된다.

일단 다이머, 트리머, 테트라머 등이 형성되면, 더욱 정연하게(order) 될 수있도록 (예를 들어 리간드----킬레이트제 유도체에 의해) 상기 운동의 자유를 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 만일 관심의 대상이 되는 단백질이 공유결합 디-전자-부족 부위(예컨대 디-트리니트로벤젠, 예를 들어 TNB---TNB)에 접근하기 쉬운 전자 풍부 부위(예컨대 Trp)를 가지면, 복합체는 2개의 비공유결합 다이머 사이에 형성될 수 있다(도 24). 이것에 의해 다중-리간드와 단백질의 정연한 시트가 형성될 수 있다.

명확하게 하기 위해 별도의 구체예의 문맥에 기술된 본 발명의 특징은 또한 하나의 구체예에 함께 제공될 수 있음이 인지될 것이다. 반대로, 요약하여 하나의 구체예의 문맥에 기술된 본 발명의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 적합한 서브컴비네이션에 제공될 수 있다.

본 발명은 그의 특정 구체예와 함께 기술되었지만 다양한 대안, 수정 및 변형도 본 분야의 기술자에게 자명할 것이라는 것은 명백하다. 따라서, 첨부되는 청구범위의 정신 및 광범위한 범위내에 포함되는 모든 대안, 수정 및 변형도 포함시키고자 한다. 본 명세서에서 언급된 모든 공개 문헌, 특허 및 특허 출원은 이들 각각의 공개 문헌, 특허 및 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 이들 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로서 인용되는 것까지도 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로서 포함된다. 추가로, 본 명세서에서 참고 문헌의 인용 또는 확인은 상기 문헌이 본 발명의 선행 기술로서 이용가능하다는 것을 허가하는 것으로 이해되어서는 안된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

코디네이터 이온 또는 분자와 함께 인큐베이션시킬 때 물질의 조성물이 비공유결합 복합체를 형성하도록 지배할 수 있는 선택된 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드를 포함하는 물질의 조성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 복합체가 폴리머 복합체인 조성물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 표적 분자가 단백질, 핵산 서열, 저분자 화학물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 표적 세포가 진핵 세포, 원핵 세포 및 바이러스 세포로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 조성물.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 상기 코디네이트 이온 또는 분자가 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 10.

(a) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 포함하는 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키고; (b) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포와 결합한 복합체를 포함하는 침전물을 수집함으로써 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 정제하는 것을 포함하여, 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 정제하는 방법.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 분자가 단백질, 핵산 서열, 저분자 화합물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 12.

제 10 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 표적 세포가 진핵 세포, 원핵 세포 및 바이러스 세포로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 13.

제 10 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 14.

제 10 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 방법.

청구항 15.

제 10 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 16.

제 10 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자가 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 17.

제 10 항에 있어서, 침전물로부터 관심의 대상이 되는 분자를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 18.

대상으로부터 수득한 생물학적 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하되, 관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 복합체의 형성이 대상에서 관심의 대상이 되는 분자와 관련된 질병 소질, 또는 그의 존재를 표시함을 특징으로 하여, 대상에서 관심의 대상이 되는 분자와 관련된 질병 소질, 또는 그의 존재를 검출하는 방법.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 분자가 단백질, 핵산 서열, 저분자 화합물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 20.

제 18 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 21.

제 18 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 방법.

청구항 22.

제 18 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 23.

제 18 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자가 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 24.

(i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하되, 그에 결합하였을 때 관심의 대상이 되는 분자의 상대적인 공간 배치 및 배향을 한정하여 유도성 결정화 조건하에 그로부터 결정의 형성을 촉진시키기 위하여 선택됨을 특징으로 하여, 관심의 대상이 되는 분자를 결정화시키기 위한 조성물.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 분자가 단백질, 핵산 서열, 저분자 화합물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 26.

제 24 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 27.

제 24 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 조성물.

청구항 28.

제 24 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 29.

제 24 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자가 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

청구항 30.

관심의 대상이 되는 분자를 포함하는 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하되, 그에 결합하였을 때 관심의 대상이 되는 분자의 상대적인 공간 배치 및 배향을 한정하여 유도성 결정화 조건하에 그로부터 결정의 형성을 촉진시키기 위하여 선택되는 결정화 조성물과 접촉시키는 것을 포함하여, 관심의 대상이 되는 분자를 결정화하는 방법.

청구항 31.

제 30 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 분자가 단백질, 핵산 서열 및 저분자 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 32.

제 30 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 33.

제 30 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 방법.

청구항 34.

제 30 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 35.

제 30 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자가 금속, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 36.

관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 제 1 영역, 및 코디네이터 이온 또는 분자와 결합할 수 있고, 분자가 코디네이터 이온 또는 분자에 노출될 경우 폴리머를 형성하도록 디자인된 제 2 영역을 갖는 분자를 포함하는 물질의 조성물.

청구항 37.

제 36 항에 있어서, 상기 제 2 영역이 2개 이상의 코디네이터 이온 또는 분자와 결합할 수 있는 조성물.

청구항 38.

제 36 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자의 결합이 비공유결합인 조성물.

청구항 39.

(a) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 포함하는 샘플을 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있고, 적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터는 함께 인큐베이션시킬 때 복합체를 형성할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키고; (b) 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포에 결합된 복합체를 포함하는 침전물을 제거하여 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 고갈시키는 것을 포함하여, 샘플로부터 관심의 대상이 되는 표적 분자 또는 세포를 고갈시키는 방법.

청구항 40.

제 39 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 분자가 단백질, 핵산 서열, 저분자 화합물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 41.

제 39 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 표적 세포가 진핵 세포, 원핵 세포 및 바이러스 세포로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 42.

제 39 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 43.

제 39 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 방법.

청구항 44.

제 39 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 45.

제 39 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자가 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 46.

적어도 하나의 코디네이트 부위 및 코디네이터가 관심의 대상이 되는 표적 분자를 포함하는 복합체를 형성하여 관심의 대상이 되는 표적 분자의 면역원성을 증진시킬 수 있도록, 관심의 대상이 되는 표적 분자를 (i) 적어도 하나의 코디네이트 부

위에 부착되며, 관심의 대상이 되는 표적 분자와 결합할 수 있는 적어도 하나의 리간드; 및 (ii) 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위와 비공유결합적으로 결합할 수 있는 코디네이터를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함하여, 관심의 대상이 되는 표적 분자의 면역원성을 증진시키는 방법.

청구항 47.

제 46 항에 있어서, 상기 관심의 대상이 되는 분자가 단백질, 핵산 서열, 저분자 화합물질 및 이온으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 48.

제 46 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 성장인자, 호르몬, 핵산 서열, 항체, 에피토프 태그, 아비딘, 바이오틴, 효소 기질 및 효소로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 49.

제 46 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리간드가 링커를 통해 상기 적어도 하나의 코디네이트 부위에 부착되는 방법.

청구항 50.

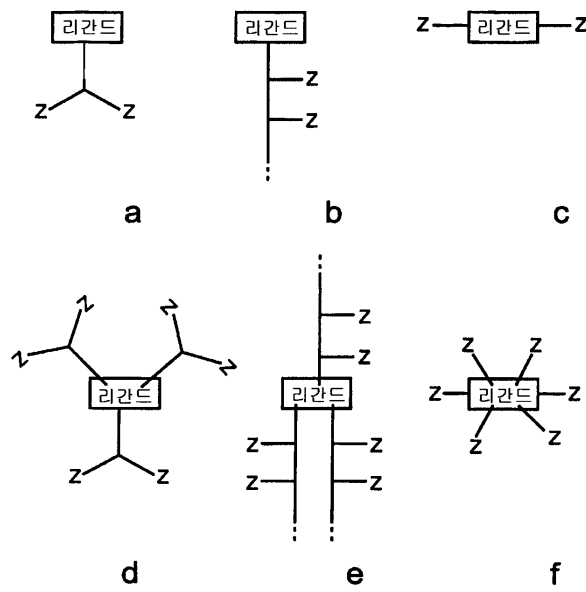
제 46 항에 있어서, 상기 코디네이트 부위가 킬레이트제, 바이오틴, 핵산 서열, 에피토프 태그, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 51.

제 46 항에 있어서, 상기 코디네이터 이온 또는 분자가 금속 이온, 아비딘, 핵산 서열, 전자 부족 분자 및 전자 풍부 분자로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

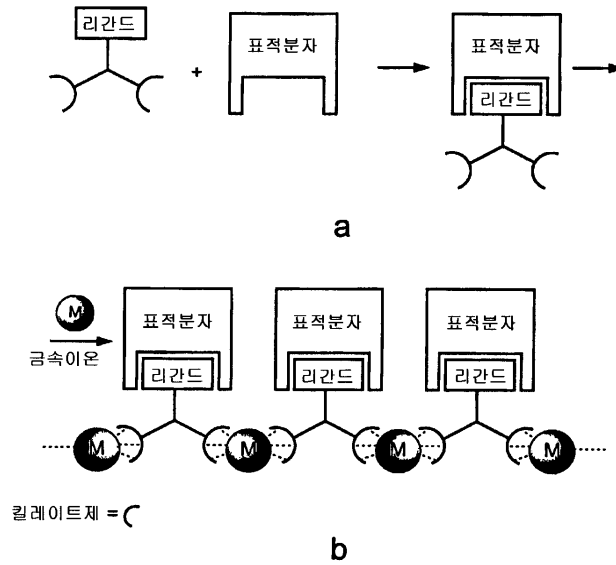
도면

도면1

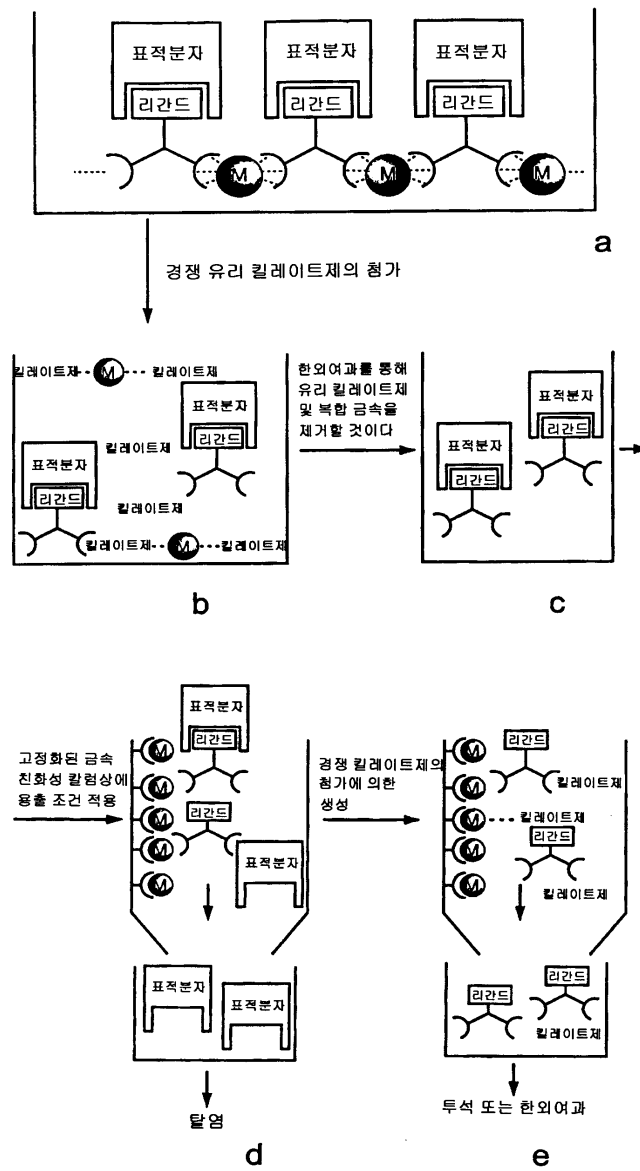


Z = 킬레이트제 및/뉴클레오타이드 서열 및/바이오틴, (및 그의 유도체)
및/전자 풍부(rich) 또는 부족(poor) 엔티티 등

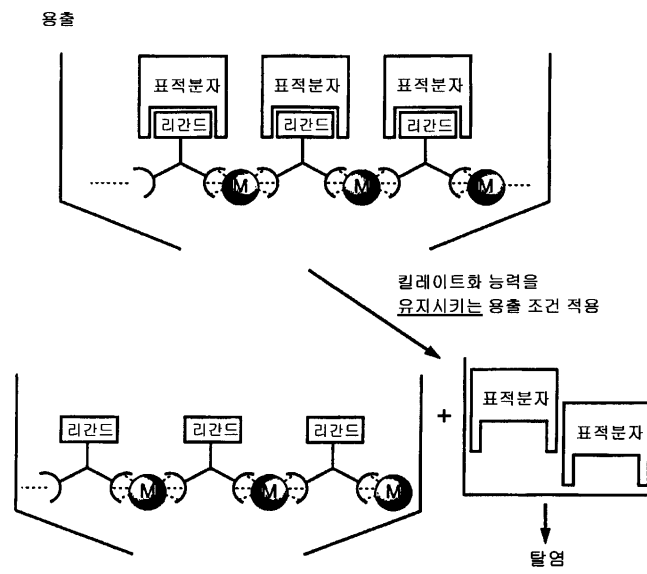
도면2



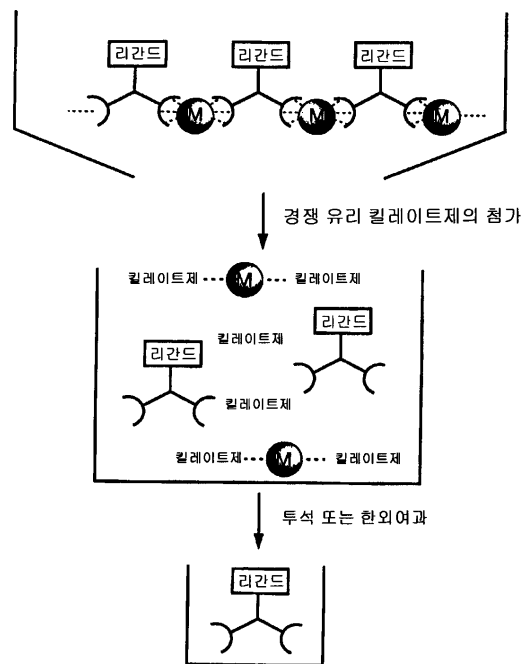
도면3



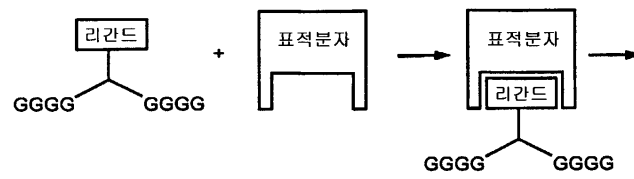
도면4



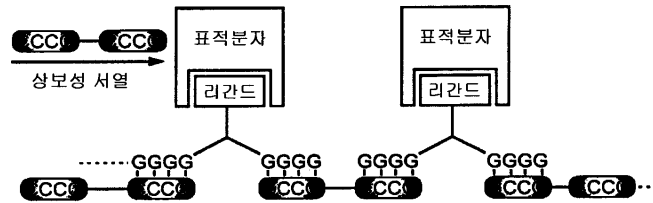
도면5



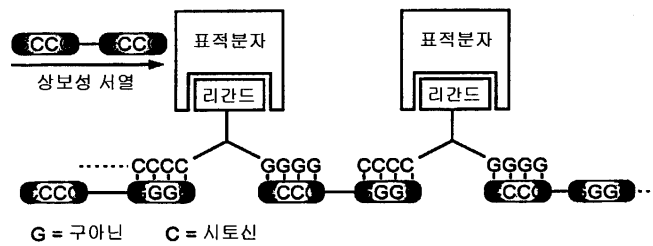
도면6



a

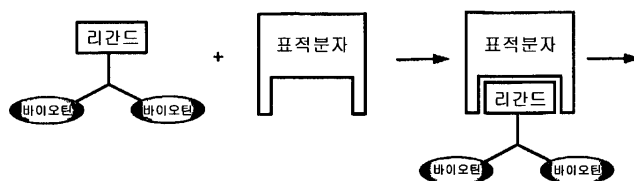


b

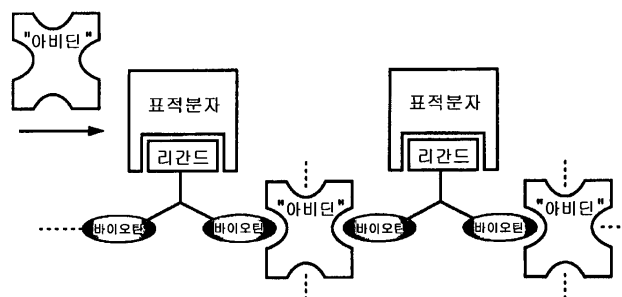


c

도면7



a

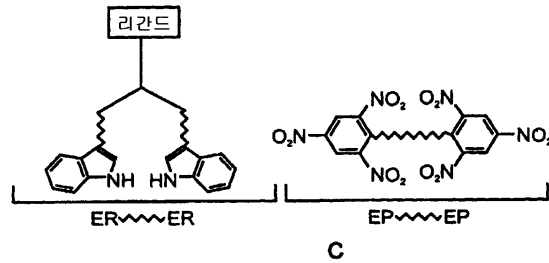
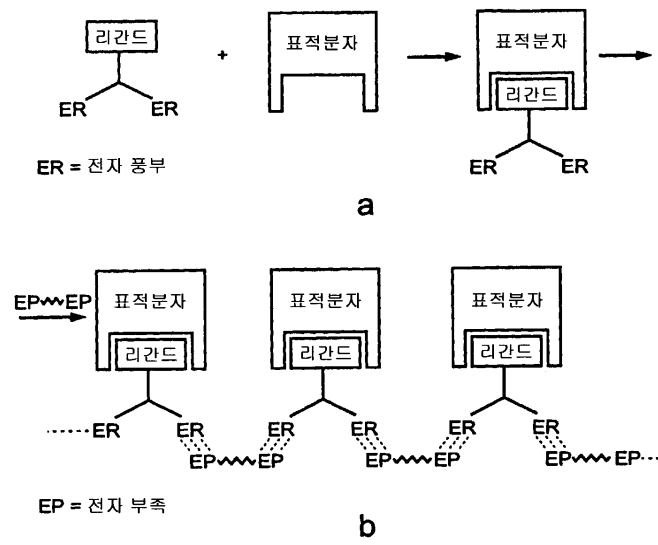


"아비딘" = 아비딘, 니트로아비딘, 요오도아비딘, 또는 다른 아비딘 유도체.

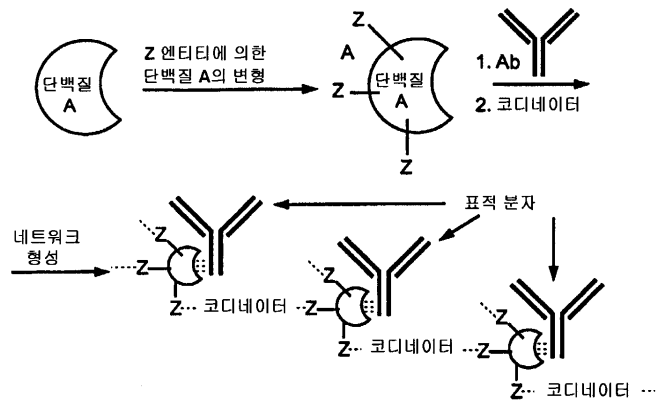
바이오틴 = 바이오틴, DSB-X 바이오틴, 또는 다른 바이오틴 유도체.

b

도면8

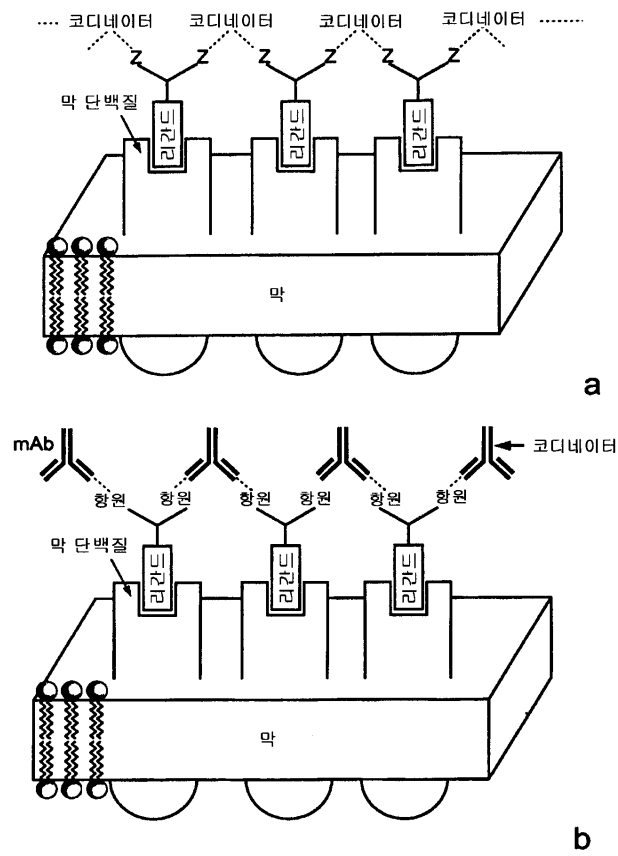


도면9

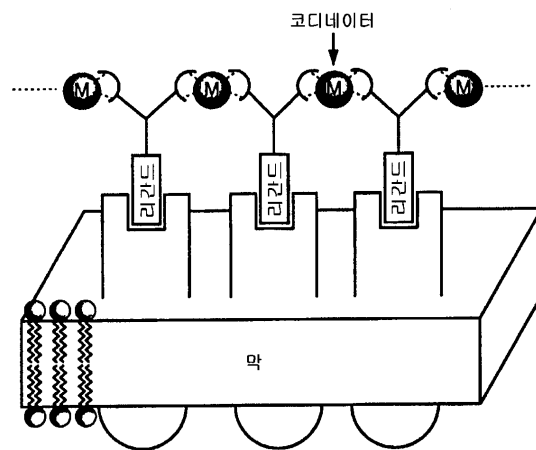


Z = 킬레이트제, 바이오틴, 뉴클레오타이드 서열, 풍부(rich)/부족(poor), 엔티티 등
코디네이터 = 금속, 아비딘, 상보성 뉴클레오타이드 서열, 전자 풍부/부족 엔티티 등

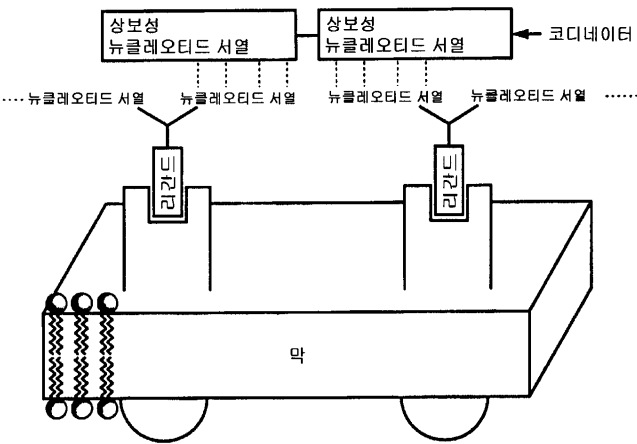
도면10



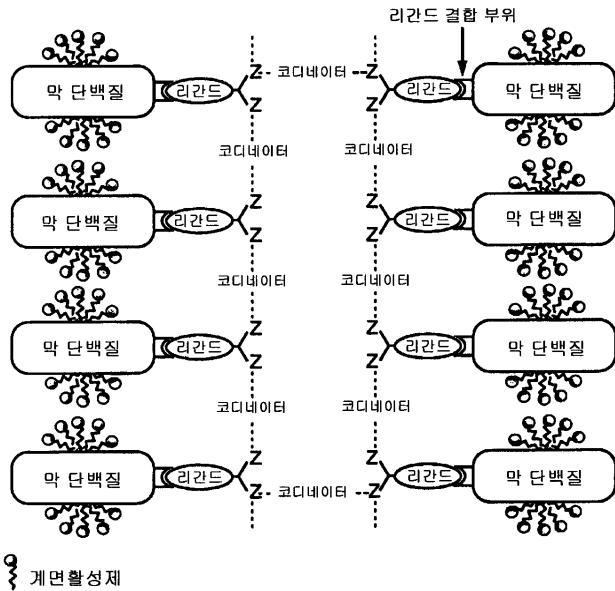
도면11a



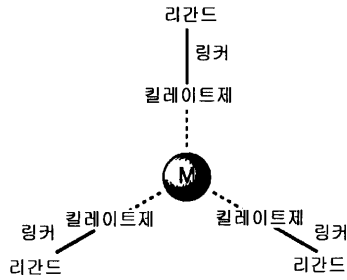
도면11b



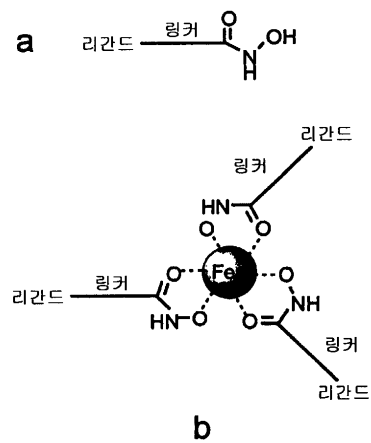
도면11c



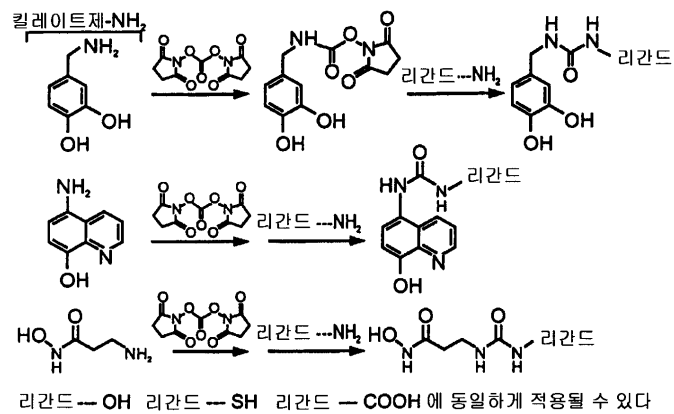
도면12



도면13

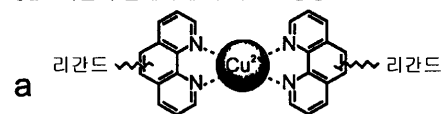


도면14

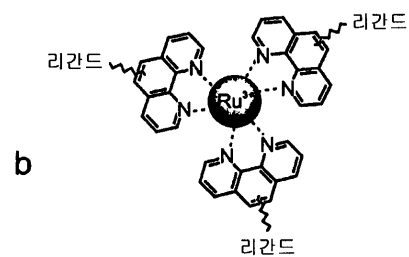


도면15

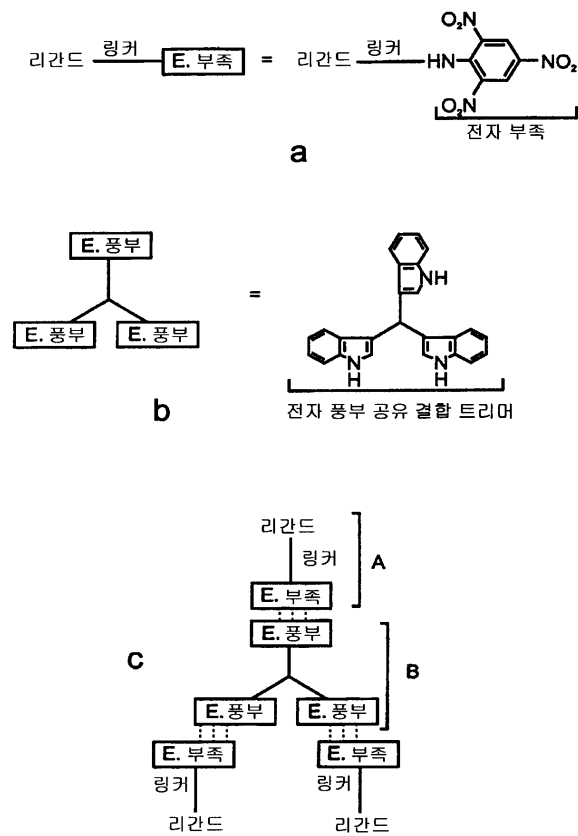
Cu²⁺ 이온의 존재하에 디-리간드 형성:



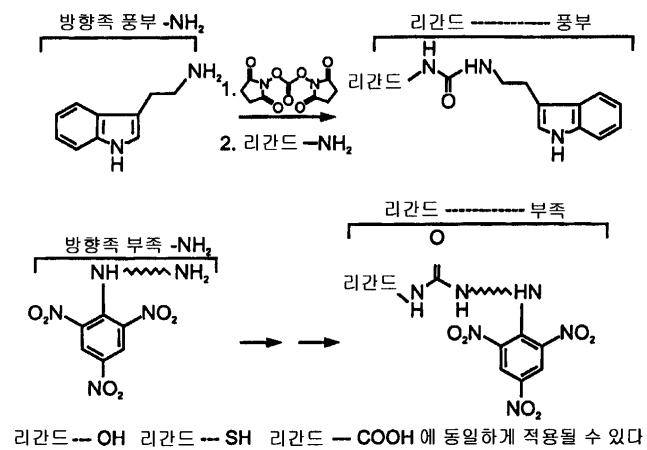
Ru³⁺ 이온의 존재하에 트리-리간드 형성:



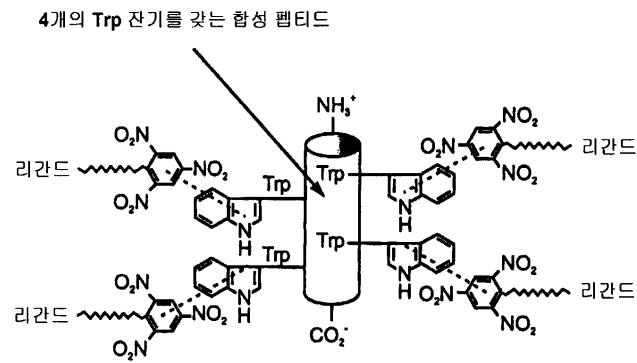
도면16



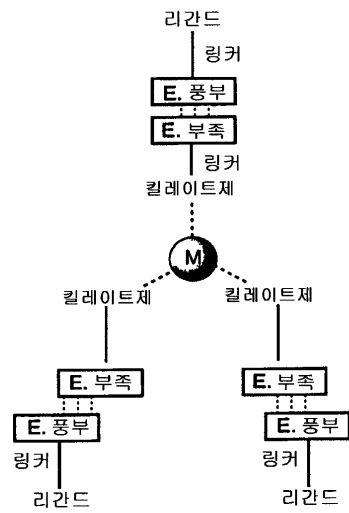
도면17



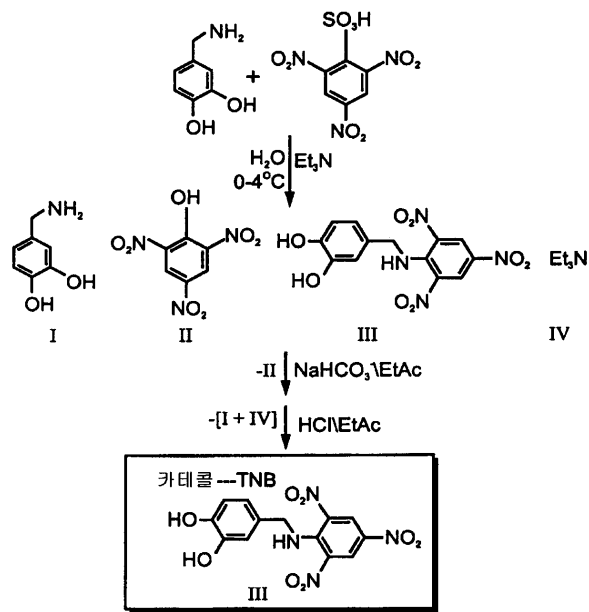
도면18



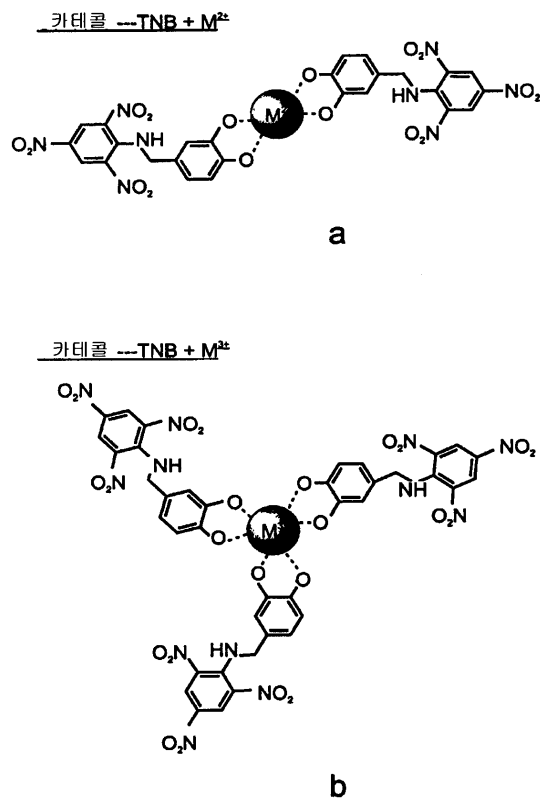
도면19



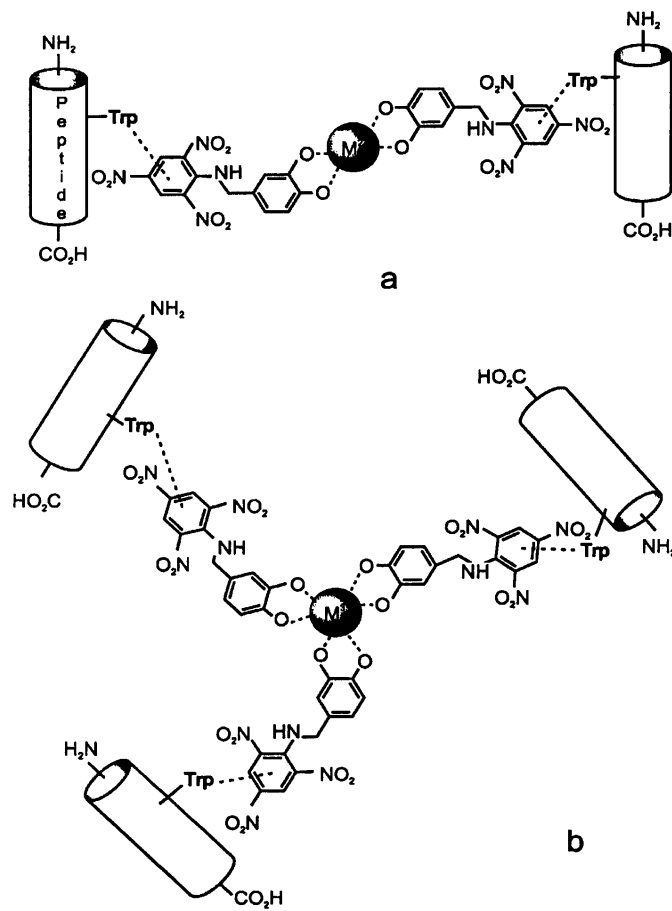
도면20



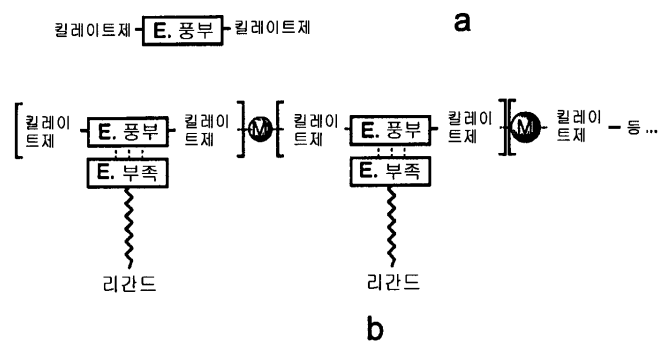
도면21



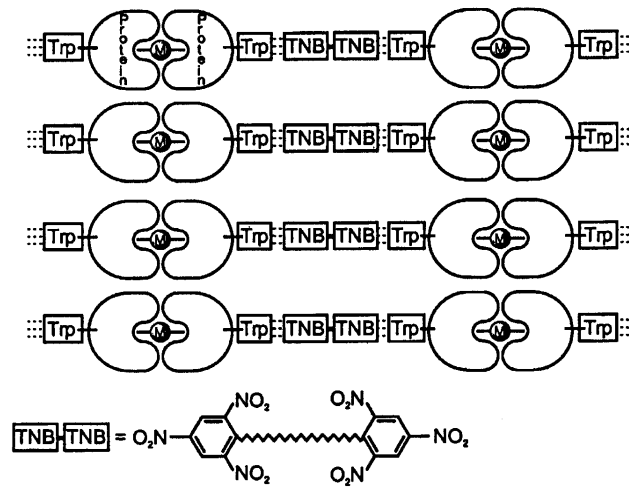
도면22



도면23

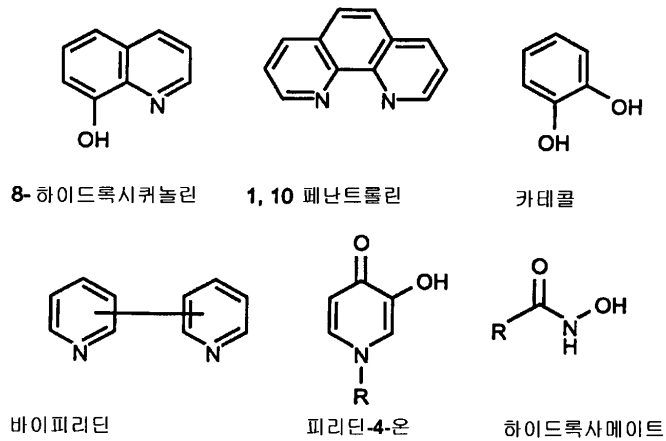


도면24



도면25

킬레이트제의 예:



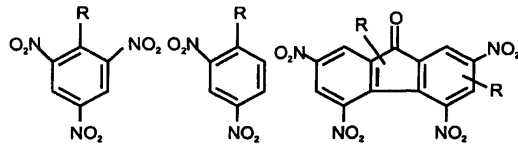
금속 예:

M^{2+} , M^{3+} , 또는 M^{4+}

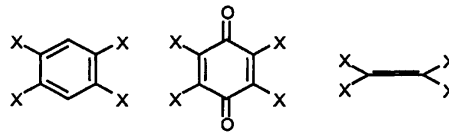
예로서 : Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ru^{3+} , Al^{3+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , 등 ...

도면26

전자 부족 분자의 예:

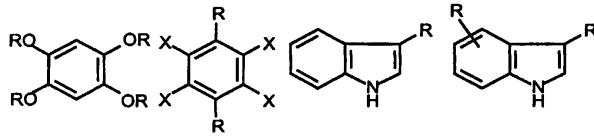


R=NHR, NR₂, OR, SR, NHCOR, 등...



X=Cl, Br, I, F, CN, 또는 흡인 그룹

전자 풍부 분자의 예:



X=Cl, Br, I, F, CN, 또는 흡인 그룹

R=NHR, NR₂, OR, SR, NHCOR, 등...