



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월05일

(11) 등록번호 10-1966483

(24) 등록일자 2019년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01J 20/26 (2006.01) B01D 15/38 (2006.01)

C08F 8/00 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7027058

(22) 출원일자(국제) 2012년02월28일

심사청구일자 2017년02월23일

(85) 번역문제출일자 2014년09월26일

(65) 공개번호 10-2014-0127910

(43) 공개일자 2014년11월04일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/053332

(87) 국제공개번호 WO 2013/127433

국제공개일자 2013년09월06일

(56) 선행기술조사문헌

JP2004018576 A

US20090194481 A1

WO2011033021 A2

(73) 특허권자

미프살러스 에이피에스

덴마크, 디케이-2830 비름, 푸레소베즈 109

(72) 발명자

그레고리우스, 클라우스

덴마크, 디케이-2860 소보르그, 럭캐스보르그 알레 15

니콜스, 이안, 알랜

스웨덴, 에스-392 47 칼마르, 스텐빅스바겐 16

크로흐, 니콜라스, 오또

덴마크, 디케이-2830 비름, 푸레소베 109

(74) 대리인

허용록

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 김준규

(54) 발명의 명칭 가교에 의한 분자 각인 폴리머의 제조

(57) 요 약

본 발명은 불용성 분자 각인 폴리머(MIP) 제조를 위한 개선된 방법으로서, a) 1) 실질적으로 모두 주형체들과 결합하고 2) 충진충 크로마토그래피를 이용하는 단계에서 분리될 수 있는 크기를 갖는, 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제공하는 단계, b) 불용성 MIP들을 획득하기 위해, a 단계에서 제공된 주형체 결합 가용성 MIP들을 가교시키는 단계, 및 c) 선택적으로 b 단계에서 가교에 의해 획득된 MIP들을 분리, 농축 또는 정제하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 흥미로운 실시예에서, a 단계는 친화성 정제 절차를 포함하며, 이는 a 단계에서 제공된 MIP들이 모두 주형의 결합체라는 것을 보장한다.

명세서

청구범위

청구항 1

불용성 분자 각인 폴리머(MIP)들의 제조 방법으로서,

- a. 1) 모두 주형제들과 결합하고 2) 충진층 크로마토그래피를 이용하는 크로마토그래피 단계에서 분리될 수 있으며 900 nm 컷오프의 막 여과기를 통해 여과되는 크기를 갖는, 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제공하는 단계,
 - b. 불용성 주형제 결합 MIP들을 획득하기 위해, 상기 a 단계에서 제공된 주형제 결합 가용성 MIP들을 가교시키는 단계, 및
 - c. 상기 b 단계에서 가교에 의해 얻어진 MIP들을 선택적으로 분리, 농축 또는 정제하는 단계
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a 단계에서 제공되는 가용성 또는 반가용성 MIP들의 크기는 450 nm 컷오프의 막 여과기를 통해 여과되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가용성 또는 반가용성 MIP들은, 주형제와 주형제 결합 가용성 또는 반가용성 MIP들의 혼합물 내에 적어도 하나의 중합체를 포함하는 조성물로부터 제조하여 제공되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 a 단계의 가용성 또는 반가용성 MIP들은 1) 더 큰 입자 크기로의 중합 후 미세화에 의한 MIP 제조, 2) 중합 축합에 의한 MIP 제조, 및 3) 인-시츄(in situ) 중합에 의한 MIP 제조로부터 선택되는 방법으로부터 제조되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

모든 상기 주형제 결합 MIP들은 동일한 주형제와 결합하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 주형제 결합 MIP들은 적어도 두 개의 상이한 주형제와 결합하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 a 단계의 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제조하는 데 사용되는 상기 중합체는 보호된 작용기들을 임의적으로 포함하며, a 단계에서 상기 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제조한 후에 하지만 b 단계 이전에, 상기 보호된 작용기들은 탈보호되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 b 단계의 가교는 상기 가용성 또는 반가용성 MIP들의 상기 작용기들을 포함하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 b 단계의 가교는 상기 MIP들의 주형제 결합 영역들의 가교를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법..

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 b 단계는 상기 MIP들 상의 주형제 결합 영역들이 주형제 또는 주형제의 모방체에 의해 가교 공정 동안 차단되는 단계를 수반하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 a 단계는, 상기 가용성 또는 불용성 MIP들의 제공 후에, 각 단계가 친화성 정제제로서 주형제 또는 표적제 또는 이들의 모방체를 사용하는 적어도 하나의 친화성 정제 단계를 수반하여, 상기 주형제, 표적제, 또는 이들의 모방체에 대해 친화성을 갖는 가용성 MIP들로 농축하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 친화성 정제 단계는 적어도 2 회의 후속 친화성 정제 순서를 포함하며, 각 순서에서 사용되는 상기 친화성 정제제는 상기 적어도 2 회의 친화성 정제에서 사용되지 않는 작용기를 통해 크로마토그래피 기질에 고정화되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 친화성 정제 단계는 충진총 크로마토그래피 기질을 이용하는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 b 단계의 가교는 상기 획득된 MIP들을 소정의 형태로 주조하기 위해 몰드에서 또는 지지체의 존재 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 MIP들은 스펀지, 망사, 섬유재, 필터, 또는 섬유의 형태로 주조되는 것을 특징으로 하는 불용성 분자 각인 폴리머들의 제조 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 결합 능력 및 특이성이 높은 분자 각인 폴리머(MIP)의 제조에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 방법은 모든 MIP들이 특정 표적체(target agent)의 결합체인 불용성(즉, 고분자량) MIP 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 실질적으로 임의의 원하는 형태 또는 구조를 가질 수 있는, 불용성 MIP들로 구성된 물품을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 합성 폴리머의 분자 각인은 분자 주형(molecular template)으로 작용하는 표적 분자(target molecule)가 있을 때 중합 가능한 작용제 및 가교제(대체로 단량체)가 공중합되는 공정이다. 중합 전에, 작용성 단량체들은 비공유 상호 작용을 통해 주형(template)과 작물을 형성하거나, 또는 중합 가능한 주형 유도체를 형성하면서 공유적으로 결합한다. 중합 후에, 단량체들의 작용기들은 고도로 가교된 폴리머 구조에 의해 제 위치에 고정된다. 이후 용매 추출 및/또는 화학적 절단에 의해 주형을 제거하면 크기 및 형태에서 표적 분자를 보완하는 결합 부위를 드러나게 한다. 이러한 방식으로, 매우 높은 특이성을 가지고 표적과 재결합할 수 있게 되는 폴리머(이하 "분자 각인 폴리머" 또는 "MIP"라고 칭함)에 분자 메모리가 도입된다.

[0003] 원래, MIP는 키랄 분리(chiral separation)로 유명한 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)에서 고정상으로 사용되었다. 이후, MIP의 사용은 박층 크로마토그래피, 모세관 전기영동, 고상 추출, 및 면역측정 타입의 결합 측정법과 같은 다른 분석 기법들에까지 확대되어 왔다. 결합 부위는 흔히 항체-항원 시스템의 친화성 및 선택성에 근접하는 친화성 및 선택성을 갖는다. 이러한 모방체(mimic)들은 센서 기술에 대하여 항체보다 어느 정도 분명한 장점을 나타낸다. 고도로 가교된 특성 때문에, MIP는 본래 안정적이고 강하여, 산, 염기, 또는 금속 이온이 존재하는 환경, 유기 용매, 또는 고온 및 고압과 같은 극한 환경에서 그 적용을 용이하게 한다. 또한, MIP는 상대적으로 저비용으로 제조되고 상온에서 오랜 기간 동안 건조 상태로 보관될 수 있다.

[0004] 따라서, 원칙적으로 모든 MIP는 다음 방식으로 제조된다: 단량체(또는 중합체(polymerizable agent)) 및 표적(또는 주형) 분자를 혼합하고, 자가 조립이 일어나고, 가교제(cross binder)를 첨가하여, 중합이 개시될 수 있다. 중합 이후 폴리머는 대체로(항상 그렇지 않음, 이하 참조) 작은 부분들로 나누어지고 표적 분자가 추출된다. MIP를 표적 분자의 용액에 넣으면 MIP에 재결합된다(참조 : Yu Cong; Leif Schweitz; and Ioana Warnmark-Surugiu).

MIP의 역사

[0006] MIP 제조의 최초의 예들 중 하나는 염료의 선택적 인식을 위해 일종의 실리카(물유리)를 사용했던 1949년(Dickey)까지 거슬러 올라간다. 훨씬 후에, 표적/피분석물과 특이적으로 결합할 수 있는, 망상 구조를 형성하기 위한 다른 종류의 자가 조직 체계들이 등장하였다(Ramstrom et al., Schweitz et al., and Vlatakis et al.).

단량체의 선택 및 중합

[0008] 1970년대와 1980년대에(참조 Shea 1986, Shea 1990 및 Wulff 1987) 지지체(scaffold)를 만드는 데 사용되는 폴리머에 주형/표적 분자를 직접 공유적으로 결합하는 개념이 등장하였다. 직접 결합을 하면 폴리머 전체에 걸쳐 더 균일한 분포의 결합 부위들을 유도할 것이라는 주장이었다. 그러나, 동시에 이것은 중합 후 주형을 제거하는 문제를 남긴다. 주형을 제거하기 위해서는 폴리머의 미세화(micronization) 및 화학 결합 분리가 모두 필요하다.

[0009] 주형을 중합 과정 동안 사용되는 단량체들 중 하나에 테터링(tethering) 하지 않고 MIP를 제조하면 흔히 양질의 MIP를 만들어 내지만, 문헌상의 경험으로 본다면 많은 MIP 입자들이 분자의 덜 특이한 부분에서 주형/피분석물과 결합하는 경향이 있는 결합 부위들을 포함할 것이고 따라서 생성된 MIP의 원하는 특이성을 보여주지 못한다. 이것은 특히 그 목적이 분자들의 입체이성질체 형태들을 분리하는 것이라면 분석 목적에 사용되는 MIP에 있어서 매우 중요하고, 반면 생성된 MIP의 전체 결합 능력을 향상시키는 것이 주된 목적인 경우에는 덜 중요하다.

- [0010] 어떤 분석 상황에서, 주형은 상이한 식별성을 가져야 함이 증명되었다. 즉, 실제 주형을 사용하는 것 대신에, 제조된 MIP들은 분석될 샘플을 오염시키지 않기 위해 주형 "모방체" 상에 형성된다. 피분석물과 MIP 사이의 특이적 결합을 확보할 수 있는 주형 모방체의 식별이 어려운 일이 될 수 있음이 분명하다.
- [0011] MIP를 제조하는 완전히 다른 방법은 단량체, 가교제 및 주형(또는 주형 모방체)이 에멀션에서 입자 형태로 유지되면서 생성된 MIP를 직접 입자로 남겨두면서 혼합물을 중합하는 방법이다(Funke et al.). 이 공정으로 만들어지는 MIP의 입자 크기는 무엇보다도, 단량체 농도 및 교반 속도(에멀션에서 액적 크기를 결정함)에 의존한다($1 \mu\text{m}$ 이하의 입자 크기를 획득하기 위해서는 1000 rpm 이상으로 용액을 교반할 필요가 있음). 문헌에 따르면, 이 유형의 공정에서 단점은 긴 제조 시간 및 낮은 수율이다.
- [0012] 일반적으로, 종래 기술은 재생 가능한 MIP 제조에 대한 어려움을 흔히 기술하는데, 결합 능력 및 특이성 양자가 모두 절충되지는 않는다(따라서 원하는 것보다 낮음).
- [0013] 미국 특허 제 4,111,863호는 "광학적으로 활성인 화합물의 잔기인 성분을 갖는 비팽창성 3차원 폴리머이며, 잔기는 상기 폴리머로부터 화학적으로 제거될 수 있어서 상기 폴리머의 물리적 구조에 상기 광학적으로 활성인 화합물의 잔기의 크기 및 형태에 해당하는 공극(void)을 남기고, 상기 폴리머의 공극 내에 상기 광학적으로 활성인 화합물의 잔기의 화학적 구조에 대응하는 작용기들의 특정한 입체적 배열을 남긴다."라고 기술하고 있고, "광학적으로 활성인 화합물"은 이후 의도적으로 MIP가 결합할 수 있어야 하는 주형이다.
- [0014] 미국 특허 제 5,110,833호는 주형 분자 쪽으로 MIP의 특이성을 증가시키기 위해 "인쇄 분자 주위로 단량체를 배향하는 단계, 가교제를 첨가하는 단계, 폴리머로 중합하고 이후 인쇄 분자를 제거하여 상기 인쇄 분자에 대응하는 폴리머에 공동(cavity)을 형성하는 단계를 포함하는, 합성 효소 또는 합성 항체의 제조 방법"이 청구되어 있다. 다시 말해, 미국 특허 제 5,110,833호에 청구된 성능 개선은 중합 이전에 주형 분자와 단량체 유닛들 사이의 접촉을 최적화하는 것에 기초한 것이다.
- [0015] 미국 특허 제 6,881,804호에는 주형과의 상호 작용을 하도록 의도된 공극으로의 접촉 기회를 증가시킴에 의해 MIP의 성능을 증가시키는 수단으로서, MIP로의 다공성(porosity)의 도입이 기술되어 있다.
- [0016] 미국 특허 제 6,638,498호에는 특이적으로 선택된 단량체들이 담즙산 특이성 MIP의 형성을 위해 청구되어 있고, 미국 특허 제 2004/0157209 A1호에는 중합 이전에 지지 물질 상에 주형 분자를 고정화하는 것이 제안되어 있다. MIP의 성능을 개선하기 위한 모든 제안들은 단량체의 화학적 특성 또는 MIP의 구성을 다루며, 모두 MIP의 제조 동안 또는 이전에 일어나는 공정 단계들이다.
- [0017] 미국 특허 제 5,994,110호에 개시된 MIP들은 작은 폴리머/올리고머를 형성하기 위해 인-시츄(in-situ)로 제조되며, 주형 분자를 보완하는 구조를 포함한다. 폴리머 또는 올리고머는 생체 분자 주위에 코팅 또는 이미지를 형성하며, 코팅 또는 이미지는 그로부터 제거되고, 예컨대, 치료제 또는 예방제, 즉 의약품으로 사용될 수 있는 별개의 개체들이 그로부터 유도된다. 이러한 유형의 제조 공정으로 인해, 미국 특허 제 5,994,110호는 종래의 MIP 입자 제조에서처럼 미세화 단계를 이용하지 않는다. 미국 특허 제 5,994,110호는 비결합제로부터 MIP의 분리를 제안하고 있으나, 제안된 방법들은 모두, 예컨대 MIP가 가용성 개체일 경우에만 크로마토그래피를 통해 제조된 MIP의 매우 작은 크기에 의존한다. 예컨대, 미국 특허 제 5,994,110에 따른 치료상으로 활성인 MIP는 낮은 쪽의 분자량 범위가 1 내지 200 kDa인 MIP라는 것을 특이적으로 나타낸다. 또한, 미국 특허 제 5,994,110호는 혼탁된 불용성 MIP들을 한편으로는 "양질의 결합체"로, 다른 한편으로는 "덜 효과적인 결합체 또는 비결합체"로 분리하는 어떤 수단도 개시하지 않는다.
- [0018] 미국 특허 제 2009/0194481호는 미리 제조된 MIP를 합쳐서 획득할 수 있는 복합 재료에 관한 것이다.
- [0019] 본 출원인은 이전에, 주형/표적에 대해 개선된 친화성을 갖는 MIP 조성물의 제조에 관한 국제특허 제 2007/095949호를 출원하였다. 간략하게, 그 방법은 종래의 수단에 의해 제조된 불용성 MIP가 상기의 미세화를 포함하는 단계를 거치고, 이후 불용성 물질을 친화성 정제하는 데 적합한 친화성 정제 절차를 거치게 하는 단계를 수반한다; 국제특허 제 2007/095949호에서 개시된 유용한 기술들은 확장된 베드 흡착(expanded bed adsorption) 및 응집반응(agglutination)이다. 종래 기술의 불용성 MIP 조성물은 의도된 표적제에 단지 약하게 결합되거나 또는 전혀 결합되지 않는 많은 부분의 MIP들을 포함하는 것이 발견되었으므로, 이 기술은 그 조성물에서 모든 또는 실질적으로 모든 MIP들이 동일한 표적제와 결합하는 MIP 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 출원인은 또한 MIP와 같은 다중 특이성(multi-specific) 수용체에 유용한 정제 방법에 관한 국제특허 제 2011/033021호를 출원하였다. 이 방법은 적어도 두 차례의 연속적 친화성 정제를 이용하는데, 친화성 정제에서

포착제(capture agent)는 적어도 두 차례 각각에서 상이한 작용기들을 통해 지지체에 결합된다. 첫 번째 차례의 정제 동안 수용체들과의 상호 작용으로부터 "숨겨질" 수도 있는 결합 부위들이 다음 차례(들)에서 수용체들과 결합하기 위해 노출되기 때문에 이 기술은 포착제 상의 모든 관련 결합 부위들과 결합하는 다중 특이성 수용체들만이 전체 정체 과정을 통과하는 것을 보장한다. 국제특허 제 2011/033021호는 특히 페닐알라닌과 같은 아미노산을 표적으로 하는 MIP의 제조를 위해 고안되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021]

본 발명의 목적은 여과 및/또는 원심분리 방법에 의해 수용액으로부터 분리될 수 있는 불용성 MIP들을 공급하는 신규의 방법들을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 이러한 불용성 MIP들로 이루어진 물품/장치의 제조 방법 및 그러한 물품/장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022]

상술한 바와 같이, 불용성 MIP를 제조하는 종래의 접근은 주형제(template agent)가 있을 때 고도로 가교된 폴리머 구조를 제조하는 단계, 가교된 구조의 미세화 정도를 변화시키는 단계, 이후 주형을 제거하여 주위의 용매에 주형 결합 공동들을 노출시키는 단계를 포함한다. 결합 능력 및 특이성이 높은 불용성 MIP를 제조하기 위해서, 이러한 조성물은 국제특허 제 2007/095949호에 개시된 확장된 베드 흡착 또는 응집반응 같은 친화성 정체를 거칠 수 있다.

[0023]

본 발명자들은 이 기술에 대한 성공 가능한 대안은 본원에서 기술된 것처럼 가용성 MIP들을 제조하고 나서 가용성 MIP들을 친화성 정제하고, 최종적으로 가교 반응에 의해 가용성 MIP들을 결합시켜 불용성인 MIP들을 생산하는 것임을 알아냈다.

[0024]

나노 크기(약 50 nm)의 입자들은 생체 내에서 혈류 내 독소들을 제거하는 데 유용한 것으로 알려져 있다 (Hoshino et al.(2008)). 나노 크기의 입자들은 단백질 크기 범위이고 가용성인 것처럼 거동하므로, 충진층 방식의 종래 크로마토그래피 장치에서 친화성 크로마토그래피에 의해 나노 크기의 입자들이 분리되고 정제될 수 있다는 것 또한 알려져 있다(Pilesky et al.(2006), Guerreiro et al.(2009)).

[0025]

이러한 나노 크기의 MIP들이 친화성 크로마토그래피에 의해 우선 정제되고 나서 이후 가교되어 입자들을 불용성이 되도록 하는 실질적으로 더 큰 크기, 예컨대 0.5 내지 50 μm의 입자들을 형성한다면, 보다 종래의 접근에 의해 제조된 불용성 MIP들과 동일한 목적에 이용될 수 있을 것이다.

[0026]

따라서, 가장 폭 넓은 양태에서, 본 발명은 불용성 분자 각인 폴리머(MIP)의 제조 방법으로서,

[0027]

a. 1) 실질적으로 모두 주형제와 결합하고 2) 충진층 크로마토그래피를 이용하는 크로마토그래피 단계에서 분리될 수 있는 크기를 갖는, 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제공하는 단계,

[0028]

b. 불용성 MIP들을 획득하기 위해, a 단계에서 제공된 주형제 결합 가용성 MIP들을 가교시키는 단계, 및

[0029]

선택적으로 b 단계에서 획득된 MIP들을 분리, 농축 또는 정제하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0030]

몇 가지 장점들이 이 기술에 의해 얻어진다.

[0031]

우선, 배경 기술에서 설명된, 가용성 MIP들을 제조할 목적의 절차들을 포함하는 임의의 제조 절차를 a 단계에서 이용하여 불용성 MIP들을 제조하는 것이 가능하다. 따라서, MIP들이 침전 중합(precipitation polymerization) 또는 인-시츄 혼성화(hybridization, 이하 참조)에 의해 필요한 크기로 합성될 수 있고 축소(downsizing) 단계를 단순화하거나 피할 수 있다.

[0032]

둘째, a 단계 이후 획득된 물질은 충진층 크로마토그래피를 이용하는 크로마토그래피에 의해 정제하기에 적합하도록 하는 형태이며, 폭 넓은 범위의 상이한 크로마토그래피 매개체 및 상이한 컬럼 형식들을 이용할 수 있고, 또한 종래의 충진층 크로마토그래피 방법들이, 특히 대규모로 적용될 때, 덜 비싸기 때문에 응집반응 또는 확장된 베드 크로마토그래피보다 더 편리할 수 있다.

[0033]

또한, a 단계 및 b 단계 사이에 정제 단계의 도입과 무관하게, 가용성 또는 반가용성 MIP들이 a 단계에서 획득

된다는 사실로 인해 MIP 유도 제품을 임의의 원하는 형태 또는 형상으로 성형 또는 주조할 수 있는 환경 하에서 b 단계의 후속적 가교를 수행하는 것이 가능하다.

[0034] 입자가 더 작을수록 입자들 간의 결합 능력 변화가 더 크다. 즉, 매우 작은 입자들은 더 큰 입자들보다 훨씬 더 큰 결합 능력으로 분류될 수 있다. 극단적으로, 종래의 MIP 제조 방법에 의해 제조된 MIP들이 하나의 결합 부위를 갖거나 또는 결합 부위를 갖지 않을 정도로 미세화하고 난 후 축소할 경우, MIP 샘플에서 상이한 종들 간의 차이가 최대가 될 것이다.

[0035] 또한, 충진층 베드를 이용한 종래의 크로마토그래피는, 특히 대규모로 이용될 때, 확장된 베드 크로마토그래피 보다 훨씬 저렴하다.

[0036] 상기 방법이 정제 단계 이전에 MIP들의 축소를 수반할 경우, 축소 단계에서 수율은 예컨대 1 내지 10 μm 로 축소 할 때보다 훨씬 더 높다.

[0037] 매우 작은(예컨대, 나노 크기) 입자들은 표면으로의 접촉 기회가 증가하여 간단한 투석(dialysis)에 의해 세척될 수 있기 때문에 주형을 제거하는 세척 단계가 더 용이하게 이루어질 수 있다.

[0038] MIP들이 더 큰 크기의, 예컨대 1 μm 보다 큰 불용성 입자들로 친화성 정제될 경우, 외면으로부터 접근할 수 있는 폴리머 당 결합 부위의 수와 질은 보통 나머지 폴리머 입자들을 대표하는 것으로 가정된다. MIP 입자가 더 작을 수록 이 가정은 점점 진실에 가까워진다.

[0039] 미국 특허 제 2009/0194481호는 본 발명의 접근과 일부 유사한 방법을 제공한다. 그러나, 미국 특허 제 2009/0194481호는 결합(agglomeration) 공정(예컨대 가교 공정)에 투입되는 출발 물질 MIP들의 질을 고려하고 있지 않으므로 미국 특허 제 2009/0194481호의 공정에 의해 획득되는 복합 재료의 결합 친화성에 관한 질은 기껏해야 MIP 출발 물질에 의해 나타나는 결합 친화성과 같은 정도이다. 본 발명은 개선된 출발 물질을 제공하며, 이하에서 상술되는 것처럼 출발 물질 MIP들의 친화성을 유지하는 문제도 다룬다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 정의

[0041] "분자 각인 폴리머(MIP)"는 중합 반응 이전에 가교 단량체들을 포함하는 단량체 기질(matrix)에 포함된 하나 이상의 주형체에 적어도 부분적으로 대응하는 공동(또는 궁극)을 포함하는 폴리머이다. 중합 반응 이후 생기는 폴리머는 형태에 있어서 주형체에 대응하는 다수의 공동들을 포함한다. 일반적으로 MIP는 작은 입자들로 분리되어서, 주형의 제거를 용이하게 하고 주형체와 유사 또는 동일한 표적 분자와의 상호 작용을 위해 일부 공동들을 열리게 한다.

[0042] "처리되지 않은(raw) MIP"는 종래의 MIP 제조 공정의 일부로서의 가교 후에 제조된 MIP이며, 아직 어떠한 미세화도 거치지 않았기 때문에 MIP 구조의 공동 내에 여전히 주형체 또는 적어도 주형체들로부터 유도된 잔해를 포함한다.

[0043] 본 명세서에서 "가교"는 망상 구조의 형성으로 이어지는 폴리머의 다방향 사슬 확장 또는 분기 공정을 의미한다. 가교는 (축합 방식에 의해) 2보다 큰 작용기를 가진 단량체들의 중합 반응을 통해, 또는 예컨대 조사(irradiation) 또는 화학 반응들에 의해 달성된 정형(preformed) 폴리머 분자들 사이의 공유 결합에 의해 생길 수 있다. 가교는 폴리머를 열, 광, 및 기타 물리적 작용에 더 잘 견디게 하여, 고도의 치수 안정성, 기계적 강도, 내화학성 및 내용매성을 부여한다. 가교는 폴리머의 "접목(grafting)"과 혼동되면 안 되는데, 접목은 일반적으로 가지들이 폴리머 골격구조와 상이한 유형인 분기된 거대분자를 제조하는 기술로서, 가지들은 하나의 단일 작용기를 통해서만 결합된다. 가교와 달리, 접목은 고정된 폴리머 망상구조의 형성, 즉, 접목된 폴리머로 이루어지지 않는다.

[0044] "미세화"는 여전히 더 작은 입자들로 주형을 포함할 수 있는 MIP들을 분리시키는 공정을 의미한다. 이 목적에 적합한 임의의 방법이 사용될 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 "표적 분자" 또는 "표적제"는 MIP가 특이적으로 결합될 수 있는 임의의 분자/작용물질(agent)이며, 일반적으로 어떤 목적을 위해 MIP를 궁극적으로 이용할 때, 정제된 MIP들이 결합되도록 의도된 분자/작용물질이다. 본 명세서에서 "표적 분자"란 용어는, 이러한 "작용물질"로 MIP를 결합하는 것을 설명할 때, "작용물질"이란 용어와 교체 가능하게 사용되었으나, 본 발명의 방법의 일부를 형성하는 정제 단계에서 사용된 "작용물질"은 반드시 표적 분자와 동일할 필요는 없고, 오히려 작용물질은 흔히 본원에서 설명된 정제 단계들에 유용한

표적 분자의 모방체 또는 유도체이다. 작용물질은 예컨대 표적 분자에 비해 더 큰 분자의 구성 부분일 수 있다. 예를 들어, 의도된 표적 분자가 아미노산인 경우, 단백질 또는 웹티드의 일부를 형성하는 해당 아미노산 잔기도 정제 단계에서 작용물질로서 유용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 공정은 아미노산 잔기와 결합하는 MIP들로 농축하기 위해 마련된 정제 공정을 포함할 수 있고, 정제 단계의 한 단계는 아미노산이 C 말단인 웹티드를 이용하며, 다른 단계는 웹티드의 N 말단인 아미노산을 이용한다. 이러한 경우, 작용물질은 정제 단계에서 사용되는 물질인 반면, "표적 분자"는 농축된 MIP들에 의해 효과적으로 결합된 물질(들)로 간주된다. 표적체는 수개의 분자들로 구성될 수도 있으며, 이는 표적체가 분자 착물인 경우, 예컨대 표적체가 수용체와 리간드 사이의 착물인 경우 관련이 있다(따라서 가장 넓은 의미에서, 항체 및 항원 사이의 착물도 포함함). 수용체와 리간드 사이의 일부 착물들은 특유의 3차원 구조를 이를 수 있어서 특이적으로 착물을 인식하는 MIP들을 사용할 경우 결합되지 않은 리간드 또는 수용체의 존재로부터 착물의 존재를 구별할 수 있다. 유사하게, "주형 분자" 또는 "표적체"는 표적 분자/작용물질과 대체로 동일하지만, 이들의 모방체 또는 유도체일 수도 있다(즉, 표적 분자의 3D 구조 및 윤곽과 일치하며 적어도 부분적으로 동일한 3D 구조 및 윤곽을 갖는 분자인 모방체는 예를 들어 표적 분자의 일부에 의해 구성될 수 있다). 주형 분자/작용물질은 이후 표적 분자와 결합할 수 있도록 하는 MIP 구조에서 공극의 "생성자(generator)"로서 역할한다.

[0046] "친화성 정제"는 물질과 피결합체 사이의 특이 결합을 이용하여 물질을 정제하는 임의의 방법을 의미한다. 이러한 많은 방법들은 물질을 포착하는 고체 지지체(예컨대, 크로마토그래피 기질)에 결합되는 포착제를 이용한다. 본 기술분야에서 알려진 일반적인 예는 항체와 결합하는 항원들을 정제하기 위해 크로마토그래피 비드들에 결합된 포착제로서 항체를 사용하는 친화성 정제이다. 본 발명에 따라 적용된 친화성 정제 방법들은 본원에서 설명된 혼탁된 가용성 MIP들을 포착할 수 있는 방법들로 이해된다. 따라서, 일반적인 친화성 정제 방법은 예컨대 HPLC(고속 액체 크로마토그래피) 또는 FPLC(고속 단백질 액체 크로마토그래피) 또는 본 기술분야의 당업자에게 알려진 그 외의 충진층 기술들의 충진된 친화성 컬럼을 이용한 크로마토그래피가 될 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 "고상"은 공유 또는 비공유 결합에 의해 포착제를 고정하는 데 이용될 수 있는 임의의 물질이다. 따라서, 크로마토그래피 기질 물질들을 제조하는 데 종래에 사용된 임의의 물질(플라스틱, 당, 금속, 유리, 실리카, 고무 등)이 고상으로서 역할할 수 있다. 고상 물질은 문제의 물질에 포착제가 결합하도록 하는 적절한 작용기를 포함할 수 있다. 이러한 유도 물질들은 단백질 또는 다른 거대분자의 크로마토그래피 정제 기술 분야의 당업자에게 알려져 있다. 또한, 고상은 (단백질과 같은 단일 생체분자와 비교할 때) MIP와 같이 상대적으로 크고 불용성인 입자들을 포착하도록 하는 임의의 물리적 형태를 가질 수 있다. 따라서, 고상은 섬유(바람직하게는 중공섬유), 크로마토그래피 기질(바람직하게는 EBA에 적합한 기질), 비드(바람직하게는 전자기 방법에 의해 분리될 수 있는 비드) 또는 그 외의 임의의 적절한 형태일 수 있다(이하 참조).

[0048] "가용성 MIP"란 표현은 크로마토그래피 기질 물질의 충진층을 이용하는 종래의 크로마토그래피 방법에 의해 액체 운반체로부터 분리될 수 있는 충분히 작은 크기의 MIP를 의미한다. 일반적으로, 가용성 MIP는 450 nm 컷오프(cutoff)의 막 여과기(membrane filter)와 같은 미세공성(micorporous) 물질을 통해 여과될 수 있는 크기와 형태를 가질 수 있다. 이하 상술하는 바와 같이, 더 작은 크기의 가용성 MIP들도 본 발명의 출발 물질로서 고려될 수 있으며, 이러한 가용성 MIP들은 예컨대 400 nm, 350 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 50 nm, 및 10 nm와 같이 작은 컷오프의 막 여과기를 통해 여과될 수 있다.

[0049] "불용성 MIP"란 표현은 크로마토그래피 기질 물질의 충진층을 이용하는 종래의 크로마토그래피 방법에 의해 실질적으로 정제될 수 없는 MIP를 의미한다. 일반적으로, 불용성 MIP는 900 nm 또는 그보다 작은 컷오프의 막 여과기 같은 미세공성 물질에 의해 잔류할 것이다. 이러한 MIP들은 그 불용성으로 인해 위장관으로부터 인체 내로 (예컨대 순환계 내로) 들어오는 것을 제한하거나 방지하므로 위장관에서의 사용을 위한 의약품으로 특히 적합하다. 다시 말해, 경구로 투여되는 경우, 사용된 MIP들은 배설물로 배출되기 전까지 실질적으로 위장관에 갇혀 있는 상태로 남을 것이다.

[0050] "반가용성 MIP"란 표현은 450 nm 컷오프의 막 여과기와 같은 미세공성 물질에 의해서는 잔류하지만, 900 nm 컷오프의 막 여과기와 같은 미세공성 물질을 통해서는 여과되는 MIP를 의미한다. 이러한 반가용성 MIP의 친수성에 따라, 충진층 크로마토그래피 내의 거동은 변할 것이다. 바람직한 반가용성 MIP들은 800 nm 컷오프의 막을 통해 여과될 것이며, 더 바람직한 반가용성 MIP들은 700, 600, 및 500 nm 컷오프의 막을 통해 각각 여과될 것이다.

[0051] 본 발명의 구체적 실시예들

- [0052] 상기 a 단계에서 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제공하는 것은 본 기술 분야에서 공지된 임의의 방법에 의해 본 발명에 따라 달성될 수 있으며, 출발 물질인 가용성 또는 반가용성 MIP들은 예를 들어 상용 원료로부터 획득할 수 있다. 제공된 MIP들이 충분히 작아서 이후 크로마토그래피 기질 물질의 충진층을 이용하는 종래의 친화성 크로마토그래피의 한 단계를 통해 정제할 수 있도록 한다는 것이 a 단계의 중요한 특징인 반면, 가용성 또는 반가용성 MIP들을 획득하고 생성하는 정확한 방법은 비교적 중요하지 않다.
- [0053] 본 발명은 주형제와 주형제 결합 가용성 또는 반가용성 MIP들의 혼합물 내에 적어도 하나의 중합체를 포함하는 조성물로부터 제조하여 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제공하는 것을 본 발명의 범위 내에 포함하는 것으로 이해된다. 즉, 본 발명의 어떤 실시예들에서, 가용성 또는 반가용성 MIP들은 그 자체가 공지된 제조 단계에 의해 달성된다.
- [0054] 예를 들어, 종래의 방법에 의해 MIP들이 제조되고 이후 원하는 작은 크기로 미세화되는, 국제특허 제 2007/095949호에 일반적으로 개시된 방법이 유용하다. 이 접근법을 이용하면, 제조된 MIP들은 원하는 임의의 작은 크기까지 작아질 수 있고 예컨대 여과에 의해 더 큰 잔여 MIP들로부터 분리될 수 있다. 이후, 획득된 매우 작은 MIP들은 종래의 충진층 컬럼을 이용하는 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 친화성 정제 방법을 거칠 수 있다. MIP들을 분리한 후 생기는 일부의 MIP들은 거의 모두 MIP 제조의 초기 단계에서 사용된 주형제와 모두 결합하는 가용성 또는 반가용성 MIP들로 이루어질 것이다.
- [0055] 또한, 가용성 MIP들을 제조하는 상기 임의의 방법들을 이용하여 원하는 작은 크기를 갖는 MIP를 제조하는 것이 가능하다. 예로서, 본 발명의 a 단계는 침전 축합(precipitation condensation, Hoshino et al.(2008)) 또는 (미국 특허 제 5,994,110호에 개시된) 인-시츄 중합 반응에 의한 MIP들의 제조를 수반할 수 있다.
- [0056] 바람직한 실시예에서, a 단계에서 제조된 가용성 또는 반가용성 MIP들의 크기는 900 nm 컷오프의 막 여과기를 통해 여과될 정도로서, 보통 이것은 MIP들이 충진층 컬럼에서 친화성 크로마토그래피를 이용하여 분리될 수 있을 것이란 것을 보장한다. 그러나, 더 작은 크기의 입자들이 획득될 수 있는데, 일반적으로 입자들의 최소 크기는 MIP들에 대한 리간드 내의 의도된 결합 부위 크기에 지배된다: 의도된 결합 부위가 작을수록, MIP들은 더 작아지므로, 본 발명은 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 450 nm, 400 nm, 350 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 50 nm, 및 10 nm로부터 선택되는 컷오프의 막 여과기를 통해 여과될 반가용성 또는 가용성 MIP들(상기 참조)의 사용을 고려한다.
- [0057] 본 발명의 방법에 대한 일부 실시예들에서, 주형제 결합 MIP들은 실질적으로 모두 동일한 주형제와 결합한다. 즉, 본 실시예에서, a 단계에서 제공되는 가용성 또는 반가용성 MIP들은 동일한 주형 분자/작용물질이 있을 때 하나 이상의 중합 공정에서 생성된다.
- [0058] 대안적으로, 주형제 결합 MIP들은 적어도 두 개의 상이한 주형제와 결합한다. 즉, 본 실시예에서, a 단계에서 제공되는 가용성 또는 반가용성 MIP들은 몇몇의 주형 분자들/작용물질들을 포함하는 공정에서 생성되거나 또는 a 단계의 가용성 또는 반가용성 MIP들은 몇몇의 상이한 주형 분자들/작용물질들에 대해 생성된 MIP들의 혼합물로 구성된다.
- [0059] a 단계에서 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제조하는 데 사용되는 중합체(들)는 보호된 작용기들을 선택적으로 포함하면 유리하며, 작용기들은, 보호되더라도, a 단계에서 가용성 또는 반가용성 MIP들을 제조한 후에, 그러나 b 단계 이전에, 보호되지 않는다. 이 접근법은 b 단계에서 후속적 가교를 용이하게 하며, 바람직하게는 가용성 또는 반가용성 MIP들의 작용기들을 포함한다.
- [0060] **a 단계 이후의 선택적 정제**
- [0061] 본원에서 설명되는 모든 실시예들은, 필요할 경우, 친화성 정제 단계를 포함하여 가용성 또는 반가용성 MIP들이 모두 주형제들과 결합하는 것을 보장한다. 예컨대 이것은 a 단계의 가용성 또는 반가용성 MIP들이 상용 원료로부터 획득되고 모두가 주형/표적의 결합체는 아닐 경우, 또는 모든 MIP들이 주형과 결합하는 것을 그 제조 방법 그 자체가 보장하지 않을 경우 관련이 있다. 따라서, 본 실시예에서, a 단계는, 가용성 또는 불용성 MIP들의 제공 후에, 친화성 정제제로서 주형제 또는 표적제 또는 이들의 모방체를 사용하는 적어도 하나의 친화성 정제 단계를 수반하여, 상기 주형, 표적 또는 이들의 모방체에 대해 친화성을 갖는 가용성 MIP들로 농축한다.
- [0062] 정제 단계의 목적은 실질적으로 주형/표적과 결합하는 MIP들로만 구성된 출발 물질을 사용하여 가교를 수행하여 결합되지 않거나 약하게 결합된 MIP들이 포함되는 것을 피하기 위함이다.

- [0063] a 단계에서 제공되는 가용성 또는 반가용성 MIP들이 복수의 주형제들과 결합하는 상기 설명된 실시예들에서, 친화성 정체는, 모든 관련 MIP 결합 주형/표적 작용물질들에 대응하는 포착제들이 한 단계의 정체에서 포착제로서 사용되는 단계로 구성될 수 있거나, 또는 대안적으로 이전 단계들에서 포착된 MIP들을 포함하지 않는 분리된 일부가 후속 단계들을 거쳐서 다른 포착제(들)와 결합하는 MIP들을 포착하는 (각 단계에서 하나의 포착제를 사용하는) 순차적 단계들로 친화성 정체가 수행되는 단계로 구성될 수 있다. 이러한 순차적 단계들 이후에는 각각의 정체 단계에서 포착된 MIP들을 모은다. 이러한 접근법들 모두는 궁극적으로 모두가 표적과 결합하는 MIP들의 혼합물을 제공하는데, 이 혼합물은 둘 이상의 표적과 결합한다.
- [0064] 주형 결합 MIP들만이 b 단계에서 출발 지점으로서 사용되는 것을 보장하는 더 간단한 방법은 복수의 MIP 무리를 제공하는 것으로서, 각각의 MIP 무리는 동일한 주형/표적과 결합하는 MIP들로 구성된다. 즉, 단일 표적 MIP들을 종래의 방법으로 획득/제조하고 선택적으로 농축하고 이후 b 단계를 수행하기 전에 단일 표적 MIP들을 모은다. 따라서, 본 실시예에서, 가용성 또는 반가용성 MIP들의 일련의 병렬적 제공을 수행하고, MIP들을 결합하고, 이후 결합된 MIP들을 b 단계에서 가교시킨다.
- [0065] 특정 실시예에서, 상술한 임의의 친화성 정체 방법은 적어도 두 개의 후속 친화성 정체 차례를 포함하며, 각 차례에서 사용되는 친화성 정체제는 상기 적어도 두 차례 이외의 임의의 친화성 정체에서 사용되지 않는 작용기를 통해 크로마토그래피 기질에 고정화된다.
- [0066] 따라서, 본 특정 실시예는 농축된 각각의 가용성 또는 반가용성 MIP들이 각각의 주형/표적 상의 둘 이상의 별개의 효과적인 결합 부위와 결합할 수 있는 결과가 있는 국제특허 제 2011/033021호에 개시된 기술을 이용한다. 따라서, 본 발명은 작용물질과 결합하는 가용성 또는 반가용성 MIP들로 농축된 조성물을 제조하는 방법을 a 단계에서 사용함을 포함하며, 상기 MIP들 각각은 상기 작용물질 상의 적어도 두 개의 별개 부위에서 특이적으로 결합하고, 상기 방법은
- [0067] i) 상기 MIP들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계,
- [0068] ii) 상기 샘플을 친화성 크로마토그래피의 제 1 단계를 거치게 하는 단계로서, 상기 작용물질은 친화성 정체제로서 사용되고, 상기 적어도 두 개의 별개 부위 중 한 부위와의 결합을 통해 고상 또는 반고상에 고정되는, 단계,
- [0069] iii) 상기 작용물질과 결합하는 수용체들을 회수하는 단계,
- [0070] iv) 이전 단계에서 회수된 MIP들을 적어도 하나의 추가적 친화성 크로마토그래피 단계를 거치게 하는 단계로서, 상기 작용물질은 친화성 정체제로서 사용되고, 상기 적어도 두 개의 별개 부위 중 또 다른 한 부위와의 결합을 통해 상기 작용물질이 고상 또는 반고상에 고정되는, 단계 및 상기 작용물질과 결합한 MIP들을 회수하는 단계를 포함하며,
- [0071] 상기 적어도 하나의 추가적 친화성 크로마토그래피 단계 각각에서, 상기 적어도 두 개의 별개의 부위 중 또 다른 한 부위는 상기 작용물질을 고상 또는 반고상에 고정화하기 위해 b 단계 및 d 단계에서 이미 사용된 상기 적어도 두 개의 별개의 부위 중 임의의 한 부위와 다르다.
- [0072] 본 실시예와 관련된 상세한 설명은 국제특허 제 2011/033021호에 설명되어 있으며, 본원에서 그 전체 내용을 참조로 통합한다.
- [0073] 본원에서 설명한 바와 같이, 친화성 정체 단계는 충진층 크로마토그래피 기질을 이용하는 것이 특히 바람직하다. 그러나, 가용성, 반가용성 및 불용성 입자들을 함유한 처리되지 않은 샘플로부터 가용성 또는 반가용성 MIP들을 정체하기 위해 EBA가 사용될 수 있다.
- [0074] 일반적으로, 주형제와 친화성 정체제의 선택은 제조된 불용성 MIP들의 정확히 의도된 최종 용도에 의존한다. 분석용으로 사용되는 MIP들에 대해, 임의의 리간드 선택으로 주형제 또는 주형제의 모방체를 구성할 수 있다.
- [0075] 특히 바람직한 주형 분자들/작용물질들 및 표적 분자들/작용물질들이 국제특허 제 2011/033021호 및 제 2007/095949호에 설명되어 있으며, 두 개의 참조에서 주형 및 표적 분자들뿐만 아니라 이들의 모방체들과 관련하여 개시된 모든 내용은 필요한 부분에 대해 약간의 수정을 하여 본 발명에 적용된다. 표적 분자들/작용물질들 또는 주형들의 예는 다음과 같다.
- [0076] a: 아미노산과 같이 H_3N^+ - $\text{CH}(\text{R})-\text{COO}^-$ 를 갖는 화학 물질, 또는 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 아미노산과 같이 최대 12개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드일 수 있는 작용물질. 아미노산은 일반적으로 페닐알

라닌, 티로신, 히스티딘, 류신, 메티오닌, 이소류신, 트리토판, 트레오닌, 발린, 및 리신으로부터 선택된다. 또한, 웨프티드는 일반적으로 서열 내에 페닐알라닌, 티로신, 히스티딘, 류신, 메티오닌, 이소류신, 트리토판, 트레오닌, 발린, 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 것이다. 특정 실시예들에서, 이러한 아미노산들은 웨프티드에서 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산으로 나타난다. 작용물질이 웨프티드인 실시예들에서, 웨프티드는 일반적으로 디웨프티드, 트리웨프티드, 테트라웨프티드 또는 펜타웨프티드이다.

[0077] b: 최대 10 단당류 유닛을 갖는 분기된 또는 선형 올리고당과 같은 탄수화물. 따라서, 어떤 실시예들에서, 탄수화물은 단당류, 이당류, 및 삼당류로부터 선택된다. 특히 바람직한 탄수화물은 D-갈락토스 및 젖당이다.

[0078] c: 지방산 또는 지질; 결국 작용물질은 지질이며, 일반적으로 콜레스테롤, 트리글리세리드, 및 담즙산 또는 그 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079] d: RNA 올리고뉴클레오티드, DNA 올리고뉴클레오티드, LNA 올리고뉴클레오티드, PNA 올리고뉴클레오티드, 및 혼합 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유도체와 같은 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유도체. 어떤 실시예들에서, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유도체는 혼합 올리고뉴클레오티드이며, 적어도 하나의 리보- 또는 디옥시리보뉴클레오티드 유닛 및 적어도 하나의 LNA 또는 PNA 뉴클레오티드 유닛을 포함한다.

[0080] e: 표적 주형 a 내지 d의 조합인 임의의 문자들(즉, a 내지 d군 중 적어도 두 개로부터의 성분을 포함하는 문자들, 예컨대 지질- 또는 당웨프티드들).

b 단계에서의 가교

[0082] 가용성 또는 반가용성 MIP들의 가교를 위해 다른 방법들이 고려될 수 있다.

[0083] 일반적으로, 미국 특허 제 2009/0194481호에 개시된 MIP들을 결합하는 방법들은 모두 본 발명의 b 단계에서 유용하다. 따라서, 미국 특허 제 2009/0194481호는 특히, 작은 MIP들을 더 큰 구조로 결합하기 위한 가교와 관련된 개시에 있어서 참조로서 통합된다.

[0084] 작용기는 바람직하게 가교가 발생하기 전에 입자 상에서 이용 가능하다. 작용기는 중합 반응(및 필요하다면 축소) 이후 폴리머로 합쳐지거나 또는 폴리머 상에 접목될 수 있다. 작용기들은 보호되거나 또는 보호되지 않는 작용기들로서 폴리머에 포함되거나 또는 폴리머에 접목될 수 있다.

[0085] 작용기는 $-NH_2$, $-NRH$, $-NR_2$, $-N^+R_3$, $-OH$, $-SH$, $-COOH$, $-CHCH_2$, $-NCO$, $-NCS$, X(즉, 할로겐 및 할로겐화물 유도체) 및 이들의 활성 유도체, 예컨대 에스테르, 염화 산, 무수물, 아미드(1차 및 2차), 설포나마이드, 및 아미딘 들로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 가교 목적으로 특이적으로 작용기를 도입하는 것의 대안으로서, 작용성 단량체들 중 하나 상의 작용기 또는 MIP 내에 작용성 단량체로서 이미 포함된 작용기의 반응성 유도체가 가용성 또는 반가용성 MIP가 만들어진 후에 마련될 수 있다. 일례로, 예컨대 MIP 합성에서 매우 흔히 사용되는 작용성 단량체인 메타크릴산으로부터의 COOH는 활성 N-하이드록시석신이미드 에스테르로 변환될 수 있고, 이후 2개 이상의 아미노기를 포함하는 화합물이 가교제로 사용될 수 있다. 다른 예는 베타-시클로덱스트린이 MIP에서 작용성 단량체로 사용될 경우인데, 이 경우 베타-시클로덱스트린 상의 수산기는 예컨대 디비닐 술폰을 가교제로 사용하여 가교용 핸들로 사용될 수 있다.

[0086] 가용성 또는 반가용성 MIP의 용액에 가교 시약을 첨가한다. 가교 시약은 디, 트리, 또는 다가일 수 있고, 가용성 또는 반가용성 MIP 입자들에 있는 작용기들과 반응할 수 있는 작용기들을 가져야 하고, 용매, pH, 온도 등과 같은 반응 조건은 반응을 촉진시켜야 한다. 반응은 원하는/필요한 크기의 가교된 입자들이 획득될 때까지 계속되어야 한다. 이는 가용성 MIP의 농도, 가교 시약의 농도, MIP들 및 가교 시약 간의 농도비, 반응 종료 물질의 첨가, 온도 변화, 반응 혼합물의 희석, 등과 같은 파라미터들에 의해 조절될 수 있다.

[0087] 가교된 입자들이 비침투성 방식의 치료법에 사용될 경우 입자들이 위장관으로부터 흡수되는 것을 막기 위해서는, 획득된 불용성 MIP들의 바람직한 크기 범위는 0.5 내지 50 μm 이다.

[0088] 대안적으로, b 단계의 가교는 상기 설명한 바와 같이, 획득된 MIP들을 원하는 형태로 주조하기 위해 몰드(mould)에서 또는 지지체가 있는 데에서 수행된다. 본 실시예에서, 이러한 가교된 폴리머는 MIP 구조를 심지어 손으로 다룰 수 있는 크기를 가질 수 있으므로, 획득된 MIP들의 크기는 50 μm 보다 활씬 클 수 있다. 예를 들어, MIP들은 스펀지, 망사, 섬유재, 필터, 섬유의 형태로 주조될 수 있으며, MIP 장치를 대규모 작업(예컨대 폐수

정제)에서 유용하게 할 수 있거나, 또는 MIP 장치를 기능화 표면들(예컨대 미세적정판 등) 형태로 할 수 있게 한다.

[0089] 가교 반응 동안 가교는 MIP들의 주형 결합 영역을 포함하지 않는 것이 바람직하다. 예를 들어, b 단계는 MIP들 상의 주형 결합 영역들이 주형 분자/작용물질 또는 이들의 모방체에 의해 가교 공정 동안 차단되는 것을 수반한다. 즉 리간드-특이성 결합 부위는 예컨대 가교가 일어나는 동안 용액 내에 존재하는 주형 또는 리간드, 또는 이들의 유도체, 모방체 또는 유사체를 가짐으로써 보호될 수 있다. 이 접근법은 리간드의 후속 (가교 이후) 재 결합에서 입체적으로 방해받는 것으로부터 개별 가용성 MIP 입자 내 결합 부위들을 보호한다. 예를 들어, 불충분한 양의 리간드가 가교에 대한 보호제로 사용될 경우, 가교가 완료된 후 우수한 결합 부위들의 보호를 위한 내재적 선택이 있을 것이다.

c 단계에서의 선택적 분리

[0091] 본 발명의 공정에서 마지막 단계는 제조된 불용성 MIP들의 선택적 정제 또는 분리를 수반한다. 예를 들어 원심분리, 여과, 투석 등과 같은 본 기술 분야에서 공지된 임의의 방법이 이용될 수 있다. 결국 채택된 가교 방법은 제조된 모든 MIP들이 표적/주형의 실제 결합체라는 것을 보장하지 않았고, 국제특허 제 2007/095949호에서 설명된 것과 같은 친화성 정제 방법들을 채용하는 것도 가능하다. 즉, 이 단계에서 EBA 또는 응집반응을 이용할 수 있다. 그러나, 결합 부위들 또는 결합 지역들이 b 단계의 가교 공정으로부터 보호되는 불용성 MIP들을 제조할 경우 포함된 장점들로 인해, 본 발명의 가장 바람직한 실시예들은 원심분리 또는 여과와 같은 보다 빠르고 간단한 방법들에 따른다.

[0092] 본 발명에 따라 제조된 MIP들의 용도

[0093] 본 발명은 또한 폐닐케톤뇨증(PKU, 폴링 내질환), 폐닐알라닌과잉혈증(HPA), 알캅تون뇨증(검은 소변 질병), 티로신혈증, 고티로신혈증, 중증 근무력증, 히스티딘 혈증, 유로카니 산뇨증, 단풍시럽뇨병, 이소발레르산혈증(이소발레릴-CoA-탈수소효소 결핍), 호모시스틴뇨증, 프로피온산혈증, 메틸말론산혈증, 글루타릭 산뇨증 타입 1(GA-1), 및 갈락토스혈증으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병의 치료, 개선, 예방을 위한 방법으로서, 본 발명에 따라 제조된 효과적인 양의 분자 각인 폴리머(MIP) 조성물을 필요로 하는 환자의 위장관에 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이며, 상기 조성물은 상기 질병의 증상 유발 물질과 결합할 수 있고, 상기 MIP들은 본 발명에 설명된 바와 같이 제조된다. 본 명세서에서는, 이러한 질병 및 관련 증상 유발 물질에 관한 상세한 설명이 있는 국제특허 제 2011/033021호에 개시된 것을 참조한다. 이러한 방법에서의 사용을 위해 본 발명에 따라 제조된 MIP들의 조성물은 이 양태와 관련된다.

[0094] 대안적으로, 질병은 과잉콜레스테롤증이다. 본원에서는 MIP들에 대한 관련 표적들이 상세히 설명된 국제특허 제 2011/033021호 및 제 2007/095949호에 개시된 내용을 참조한다.

[0095] 본 발명의 MIP들 및 MIP 조성물

[0096] 또한 본 발명은 신규 MIP들 및 MIP들의 신규 조성물들에 관한 것이다. 본 발명의 방법들에 의해 획득할 수 있는 MIP들은 개별 MIP들을 가교하는 데 사용된 기술들로 인해 종래의 방법들에 의해 획득한 불용성 MIP들과 구조적으로 구별된다. 무엇보다, 가교 작용기의 선택은 본래 불용성인 MIP들 간의 특유의 부착을 제공한다. 특히, MIP들의 주형 결합 부위에서 가교를 피할 목적의 가교 조건을 이용할 경우, 각각의 가교된 MIP의 물리적 구조는 공지의 불용성 MIP들과 구별될 수 있을 것이다(상기 참조).

[0097] 가교 이전의 정제의 예

[0098] L-페닐알라닌을 표적으로 하여 폴리머를 합성하였고, 이후 기계적 선별 및 볼-밀링에 의해 가용성 입자들의 크기를 줄이고 나서, 원심분리하였다. 이 가용성 MIP들 일부로부터 표적 분자들 및 기타 불순물들을 제거하기 위해 PBS에 대하여 샘플을 광범위하게 투석하였다. 이후, 샘플을 종래의 충진층 크로마토그래피 컬럼에 가하였다. 컬럼 기질은 N-하이드록시선파미딜(NHS) 활성화 세파로오스 4FF(GE Lifescience, 17-0906-01) 이었고, 정제 이전에 웨티드 Gly-(L)Phe를 컬럼 기질에 결합시켰다. 컬럼 베드 크기는 약 30 ml이고, 유량은 1 ml/min이었다.

크로마토그래피를 210 nm에서 온라인 수행하였다. 주입 후 약 9 내지 20분에서 큰 런-쓰루(run-through) 피크가 나타났다. 70분에 러닝 버퍼(running buffer)에서 10 mg/ml의 페닐알라닌 1 ml을 가하여, 컬럼에 결합된 MIP들을 분리하였다. 78 내지 83분에서 작은 피크(런-쓰루 피크에 비해 약 1 내지 2 % 크기)를 수집하고 PBS에 대해 광범위하게 투석하여, 분리된 일부로부터 Phe를 제거하였다. 94 내지 102분에 Phe를 포함한 매우 큰 피크가 분리되었다. 마지막으로, 분리된 MIP 샘플을 Phe 결합 능력에 대해 평가하고, 출발 물질과 비교하였다. 이 Phe 결합 능력 평가는 ^3H 분류(^3H -labeled) Phe가 첨가된 Phe를 MIP 샘플에 첨가하여 행하였고, 분자체 크로마토그래피 컬럼(size exclusion chromatography column, GE Lifescience 28-9180-04)을 통해 샘플을 통과시켜 결합되지 않은 Phe로부터 MIP가 결합된 Phe를 분리하였고, 마지막으로 신틸레이션 유체와 혼합한 후 신틸레이션 계수기에서 카운팅하였다. 78 내지 83분 피크에서의 MIP들은 정제되지 않은 MIP들보다 500배 더 큰 Phe 결합 능력을 나타내었다.

[0099] 참고문헌

- [0100] 1) Yu Cong, Ph. D-thesis: "Molecular Recognition Studies Based on Imprinting Technology", Dept. of Pure and Applied Biochemistry, University of Lund, Sweden 1998.
- [0101] 2) Leif Schweitz, Ph-D-Thesis: "Molecular Imprinted Matrices for Electrochromatography", Technical Analytical Chemistry, University of Lund, Sweden 2001.
- [0102] 3) Ioana Warnmark-Surugiu, Ph.D-thesis: "Antibodies and Antibody Mimics in Binding Assays", Dept. of Pure and Applied Biochemistry, University of Lund, Sweden 2002.
- [0103] 4) Dickey FH, "The preparation of specific absorbents" Proc. Natl. Acad. Sci. 35(1949)227- 229.
- [0104] 5) Ramstrom O et al J. Mol. Recog. 9(1996)691-696
- [0105] 6) Schweitz L et al J Chromatog. A 792(1997)401-409
- [0106] 7) Vlatakis G et al "Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting" Nature 361(1993)645-647
- [0107] 8) Funke, W. et al, Adv. Polym. Sci. 136(1998) 139-243
- [0108] 9) Shea KJ and Dogherty TK, J. Am. Chem. Soc. 108(1986) 1091-1093
- [0109] 10) Shea KJ, Stoddard GJ, Shavelle DM, Wakui F and Choate RM Macromolecules 23(1990)4497-4507
- [0110] 11) Wulff G and Poll HG Makromol. Chem. 188(1987)741-748
- [0111] 12) Hoshino et al (2008), JACS 130; 15242-3
- [0112] 13) Hoshino et al (2010), JACS 132; 6644-5
- [0113] 14) Piletsky et al (2006), Biopolymers and Cell 22; 63-67
- [0114] 15) Guerreiro et al (2009), Biosensors and Bioelectronics 24; 2740-2743