



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0077545
(43) 공개일자 2020년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08L 71/02 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08L 71/02 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7014562
(22) 출원일자(국제) 2018년10월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년05월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/078730
(87) 국제공개번호 WO 2019/081371
국제공개일자 2019년05월02일
(30) 우선권주장
PA201770806 2017년10월25일 덴마크(DK)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
아쿠아포린 에이에스
덴마크 디케이-2800 콘겐스 링비 뉴필레바이 78
(72) 발명자
스펠버, 마리아나
덴마크 2920 샤프로텐룬트 1-엔 스킴올단스베이 3
트베르모스 다나 크리스티나
덴마크 2400 코펜하겐 엔브이 1. 티브이 그란산게
르베이 5
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 신태양

전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **막형단 단백질을 혼입한 소포**

(57) 요약

본 발명은 막형단 단백질을 혼입하는 소포에 관한 것으로, 소포 형성 물질은 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리에테르아민의 혼합물을 포함한다. 본 발명에 따르는 소포는 일반적으로 지름의 실질적인 수축 없이 높은 온도를 견뎌내고, 이에 따라 투수성의 유지는 사실상 영향을 받지 않는다. Pluronic 기반 소포는 트리메소일 클로라이드(TMC)와의 화학 반응에 의해 폴리ամ이드 층에서 가교에 이용 가능한 더 큰 제타 전위 값으로 예시된 표면에 이용 가능한 많은 양의 아미노기를 갖는다.

(52) CPC특허분류

C08G 2650/50 (2013.01)

C08G 2650/58 (2013.01)

C08L 2203/02 (2013.01)

(72) 발명자

고레스키 라도슬로

덴마크 2450 코펜하겐 에스브이 에스티. 티에이치.
테글홀름 티베르가드 8

하우그스테드 프레데릭

덴마크 2100 코펜하겐 오 2 살 노르드르 프리하븐
스가드 54

(30) 우선권주장

PA201770915 2017년12월06일 덴마크(DK)

PA201870200 2018년04월05일 덴마크(DK)

PA201870553 2018년08월29일 덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

막횡단 단백질을 혼입하는 소포에 있어서,

상기 소포의 형성 물질은 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)과 폴리에테르아민의 혼합물을 포함하는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 중량 평균 분자량이 약 1,000Da 내지 약 15,000Da 사이의 실질적으로 선형 중합체인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 3

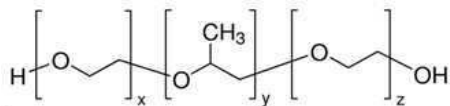
제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 중량 평균 분자량이 약 2,500Da 내지 약 10,000Da 사이의 실질적으로 선형 중합체인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 화학식이 하기와 같으며,



여기서:

x는 10~30 사이의 정수를 나타내고,

y는 50~100 사이의 정수를 나타내고,

z는 10~30 사이의 정수를 나타내는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 5

제4항에 있어서,

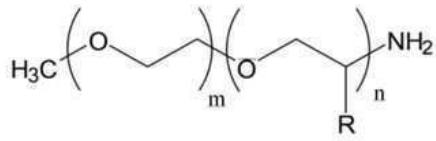
x는 15~30 사이의 정수를 나타내고,

y는 60~80 사이의 정수를 나타내고,

z는 15~25 사이의 정수를 나타내는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 폴리에테르아민은 화학식이 하기와 같은 일반적인 구조이며,



여기서:

m은 1~15의 정수이고,

n은 5~50의 정수이고,

R = CH₃인, 막형단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)과 폴리에테르아민 사이의 중량 비율은 1 내지 5인, 막형단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막형단 단백질은 아쿠아포린 수분 통로인, 막형단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막형단 단백질은 세제에서 용해되는, 막형단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세제는 라우릴디메틸아민 N-옥사이드(LDAO), 옥틸 글루코사이드(OG), 도데실 말토사이드(DDM) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 막형단 단백질을 혼입하는 소포.

청구항 11

막형단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법에 있어서,

- a. 막형단 단백질과 폴리에테르아민의 수용액을 혼합하는 단계;
- b. 단계 a에서 제조된 상기 혼합물에 수용액으로 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)를 첨가하는 단계; 및
- c. 단계 b에서 수득한 용액을 교반하는 단계;를 포함하는, 막형단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

pH가 7 내지 9 범위의 완충액의 첨가를 더 포함하는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

단계 c의 상기 교반은 12~16시간 동안 지속되는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 중량 평균 분자량이 약 1,000Da 내지 약 15,000Da 사이의 실질적으로 선형 중합체인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 15

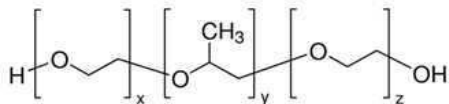
제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 중량 평균 분자량이 약 2,500Da 내지 약 10,000Da사이의 실질적으로 선형 중합체인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 화학식이 하기와 같으며,



여기서:

x는 10~30 사이의 정수를 나타내고,

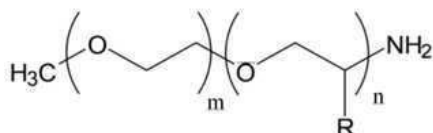
y는 50~100 사이의 정수를 나타내고,

z는 10~30 사이의 정수를 나타내는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리에테르아민은 화학식이 하기와 같은 일반적인 구조이며,



여기서:

m은 1~15의 정수이고,

n은 5~50의 정수이고,

R = CH₃인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 18

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)와 폴리에테르아민 사이의 중량 비율은 1 내지 5인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막횡단 단백질은 아쿠아포린 수분 통로인, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 20

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막횡단 단백질은 세제에서 용해되는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 21

제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세제는 라우릴디메틸아민 N-옥사이드(LDAO), 옥틸 글루코사이드(OG), 도데실 말토사이드(DDM) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 막횡단 단백질을 혼입하는 소포의 제조 방법.

청구항 22

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 소포를 포함하는 분리막.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 분리막은 상기 소포를 혼입하는 활성층과 다공성 지지막을 포함하는 분리막.

청구항 24

제22항 또는 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 활성층은 다공성 기질 막 상에 형성되는 박막 복합층에 혼입된 상기 소포를 포함하는 분리막.

청구항 25

제22항에 있어서,

상기 소포를 혼입하는 상기 활성층은 층별 증착 방법에 의해 형성되는 분리막.

청구항 26

다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법에 있어서,

a. 제11항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따라 제조한 상기 소포와 디아민 또는 트리아민 화합물을 포함하는 수용액을 제공하는 단계;

b. 다공성 지지막의 표면을 단계 a의 상기 수용액으로 덮는 단계;

c. 아실 할라이드 화합물을 포함하는 소수성 용액을 적용하는 단계; 및

d. 상기 수용액과 상기 소수성 용액이 계면 중합 반응을 수행하여 상기 박막 복합 층을 형성하게 하는 단계;를 포함하는, 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 디아민 화합물은 1,3-디아미노벤젠인, 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서,

상기 디아민 또는 트리아민 화합물 대 아실 할라이드 화합물의 중량 비율은 0:1 내지 30:1인, 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다공성 지지막은 폴리실폰 또는 폴리에테르실폰 중합체에 의해 형성되는, 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다공성 지지막은 중공사인, 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

하우징 내에 중공사 다발을 조립함으로써 중공사 모듈을 제조하는 추가 단계를 포함하며,

제1 용액을 통과시키기 위한 입구는 일단의 상기 중공사 루멘에 연결되고 출구는 타단의 루멘에 연결되고, 상기 하우징에 연결된 출구로 제2 용액을 통과시키기 위해 상기 하우징에 입구가 제공되는, 다공질 기질 막 상에 막 횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다공성 지지막은 평판(flat sheet)인, 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 평판 막을 권취함으로써 나선형 권취 막 모듈을 제조하는 추가 단계를 포함하는, 다공질 기질 막 상에 막 횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 막횡단 단백질을 혼입한 소포, 막횡단 단백질을 혼입한 소포를 제조하는 방법, 막횡단 단백질을 혼입한 소포를 포함하는 분리막 및 다공성 기질(substrate) 막 상에 막횡단 단백질을 혼입한 소포를 고정화하는 박막 복합층의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리머솜 또는 중합체 소포는 적합한 용매(예: 물)에서 양친매성 블록 공중합체에 의해 형성된 자기조립 구조이며, 막횡단 단백질과 같은 다양한 구조를 혼입할 수 있는 이중층 벽으로 둘러싸인 내부의 빈 공동을 나타낸다. 중합체 소포의 안정성은 형성 중합체의 분자량과 함께 증가하며, 중합체 소포의 투과성은 친수성 대 소수성 비와 함께 증가한다. 친수성 대 소수성 비 값이 낮은, 일반적으로 플루로닉(Pluronic)으로 알려진 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌(PEO-PPO-PEO) 블록 공중합체는 소포를 형성할 수 있으므로 투과막을 수득하는 데 적합하다. 유감스럽게도, 위 공중합체는 직접 용해에 의해 자기조립하기가 쉽지 않다. 미세유체 장치에서 조립하는 것이 더 적합하다(Debra F. do Nascimento et al, Microfluidic Fabrication of Pluronic Vesicles with Controlled Permeability Langmuir 2016, 32, 53505355). 더욱이, PPO/PEO 비가 매우 높은 플루로닉(예: 68/10)은 약 100nm의 소포 구조로 자기조립되는 것으로 공지되어 있으며, 이는 매우 안정적이지 않다. 중합된 펜타에리트리톨 테트라-아크릴레이트(PETA)의 영구 상호 침투 네트워크(IPN)를 통해 안정되더라도, 이들은 보관 기간이 1개월을 넘지 않는다(Feng Li, Pluronic polymersomes stabilized by core cross-linked polymer micelles, Soft Matter, 2009, 5, 4042-4046).

[0003] PPO/PEO 비가 작은 플루로닉은 음이온 계면활성제 또는 무기염류(예: 도데실 황산 나트륨 또는 NaF)의 존재 하에서 800nm에서 3000nm까지 구조를 형성하는 자기조립이 가능하다(Li, F.; Ketelaar, T.; Marcelis, A. T. M.; Leermakers, F. A. M.; Stuart, M. A. C.; Sudholter, E. J. R., Stabilization of polymersome vesicles by an interpenetrating polymer network. Macromolecules 2007, 40 (2), 329-333.; Chen, S.; Yang, B.; Guo, C.; Ma, J. H.; Yang, L. R.; Liang, X. F.; Hua, C.; Liu, H. Z., Spontaneous Vesicle Formation of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer. Journal of Physical Chemistry B 2008, 112 (49), 15659-15665.).

[0004] 플루로닉은 무독성으로 간주되며 약물 전달 시스템에 널리 사용되며 유전자 요법에 흥미로운 기회를 제공한다(Feng Li, Pluronic polymersomes stabilized by core cross-linked polymer micelles, Soft Matter, 2009, 5, 4042-4046). 많은 연구에서 폭넓은 스펙트럼의 항원과 함께 사용될 때 세포 매개와 항체 매개 면역 반응을 둘 다 증가시키기 위한 보조제로 플루로닉의 사용 가능성을 보여주었다(Jain-Gupta N, et al, Pluronic P85 enhances the efficacy of outer membrane vesicles as a subunit vaccine against Brucella melitensis

challenge in mice, FEMS Immunol Med Microbiol 66 (2012) 436-444).

[0005] 더 많은 연구에서는 더 많은 다양한 소수성 약물을 포함할 수 있는 미셀에서 폴록사머가 자기조립하여 인체로 수송할 수 있는 능력을 설명한다(Yapar AE, Inal O, Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Based Copolymers for Transdermal Drug Delivery: An Overview, Trop J Pharm Res, October2012;11 (5):855; Kamboj VK, Verma PK, Poloxamers based nanocarriers for drug delivery system, Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (2):264-269, Batrakova EV et al, Polymer Micelles as Drug Carriers). 플루로닉-폴리락틱 공중합체로 플루로닉을 포함하는 블록 공중합체는 다양한 화물(예: 인슐린)을 적재 및 수송할 수 있는 소포에서 자기조립된다(Xiong XY Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery, Journal of Controlled Release 120 (2007) 11-17).

[0006] 플루로닉은 DNA 세포내 흡수, 핵 전좌 및 유전자 발현 향상에 대한 효과를 포함하는 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. 친수성-친유성 밸런스 값이 높은 플루로닉은 세포질 내에서 균질 분포를 초래한다. 친수성-친유성 밸런스 값이 더 낮은 플루로닉은 핵 내에 위치하는 것을 선호한다(Fan W et al. Degradable gene delivery systems based on Pluronics-modified low-molecular-weight polyethyleneimine: preparation, characterization, intracellular trafficking, and cellular distribution, International Journal of Nanomedicine 2012;7 1127-1138).

[0007] 아쿠아포린과 같은 막횡단 단백질을 포함하는 소포는 정수(W02006/122566) 또는 염도차 발전(W02007/033675)과 같은 응용을 위해 아쿠아포린이 고정화된 막을 제조하는데 사용할 수 있다. 소포는 일반적으로 지지 기질 상에 층 또는 필름으로 증착되며, 이는 나노여과, 역삼투, 정삼투 또는 압력지연삼투에 의해 막을 통한 물 분자의 선택적 통과를 허용한다.

[0008] W02013/043118호는 아쿠아포린 수분 통로(AQP: aquaporin water channel)를 포함하는 소포가 고정화된 박막 복합체(TFC: thin film composite) 막을 개시하고 있다. 또한, 상기 호는 박막 복합체 막의 제조 방법과 나노여과 및 삼투여과 공정과 같은 여과 공정에서 박막 복합체 막의 용도를 개시하고 있다. W02010/146365호는 고정화된 AQP를 혼입하기 위한 소포 형성 물질로서 양친매성 삼중블록 공중합체를 사용하는 TFC-아쿠아포린-Z(AqpZ)의 여과막의 제조를 기술하고 있다. W02014/108827호는 아쿠아포린 수분 통로가 TFC 층 내로 혼입되기 전에 지질 또는 블록 공중합체 소포에 혼입될 수 있는 아쿠아포린 수분 통로를 포함하는 박막 복합체(TFC) 층으로 개질된 섬유를 갖는 중공사(HF: hollow fiber) 모듈을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 선행기술에서 전형적으로 소포 생산에 사용되는 양친매성 지질과 블록 공중합체는 주로 소수성 부분을 용해하기 위해 테트라클로로메탄(CCl₄) 또는 클로로포름(CHCl₃)과 같은 불쾌한(harsh) 용매에 용해될 필요가 있는 고체이다. 막 합성에서, 이 용매를 기화시켜 막 형성을 허용한 다음, AQP 막 단백질의 동시 혼입과 함께 양친매성 물질을 다양한 유화형(예:소포) 내로 가져오기 위해 다시 수화한다. 환경 영향이 더 적은 용매를 사용하는 공정을 개발하는 것이 바람직할 것이다.

[0010] 산업용 막은 분리 공정 또는 세정 공정 중에 고온에서 처리될 수 있다. 산업용 막이 유제품과 같은 식품의 처리에 사용될 경우, 미생물의 발생을 피하기 위해 막을 소독하는 것이 일반적으로 바람직하다. 소포가 혼입된 선행기술의 막은 고온에 노출될 경우 빠르게 열화하는 경향이 있다. 본 발명의 한 양태에서, 고온에서 처리 후 적합한 투수성을 유지하면서 더 높은 온도 안정성을 나타내는 막 내에 혼입하는 소포를 개발하는 것이 목적이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 막횡단 단백질을 혼입하는 소포에 관한 것으로, 소포 막 형성 물질은 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리에테르아민의 혼합물을 포함한다.

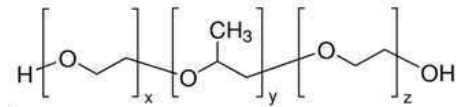
[0012] 본 발명에 따르는 소포는 일반적으로 지름의 실질적인 수축 없이 고온을 견딘다. 소포 지름의 수축이 적어 막의 기계적 치수 안정성이 높아져서 긴 수명을 제공한다. 또한, 수축이 적으므로 투수성이 사실상 영향을 받지 않는다.

[0013] 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 일반적으로 약 2,500Da 내지 약

10,000Da 사이의 중량 평균 분자량과 같이 약 1,000Da 내지 15,000Da 사이의 중량 평균 분자량을 갖는 실질적으로 선형 중합체이다. 특정 양태에서, 중량 평균 분자량은 3,000Da를 초과하며, 예컨대 4,000Da 초과, 바람직하게는 5,000Da를 초과한다. 그러나 일반적으로 이 양태의 중량 평균 분자량은 8,000Da 이하, 예컨대 7,000Da 이하, 바람직하게는 6,000Da 이하이다. 바람직한 양태로 중량 평균 분자량은 약 5,800Da이다.

[0014] 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 블록의 조성과 비율이 다를 수 있지만, 일반적으로 화합물은 하기 화학식으로 나타낼 수 있다.

화학식 1



[0015]

[0016] 여기서:

[0017] x는 10~30 사이의 정수를 나타내고,

[0018] y는 50~100 사이의 정수를 나타내고,

[0019] z는 10~30 사이의 정수를 나타낸다.

[0020] 본 발명의 특정 실시예에서, x는 15~25 사이의 정수를 나타내고, y는 60~80 사이의 정수를 나타내고, z는 15~25 사이의 정수를 나타낸다. 본 발명의 특정 실시예에서 x와 y는 의미가 같다. 또한, x와 z는 바람직하게는 약 20 이고 y는 약 70이다. 이 화합물은 Pluronic P-123으로 제공된다. 변경예에서, x와 z는 30~200 범위에 있고 y는 40~60 범위에 있다. 이 변경예에 따르는 특정 예는 폴록사머 407(BASF 상표명: 플루로닉 F127)이며, 여기서 x = z = 101이고 y = 56이다.

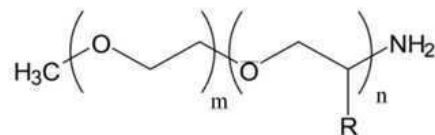
[0021] 폴리에테르아민은 일반적으로 폴리에테르 백본에 부착된 하나 이상의 1차 아미노기를 함유한다. 폴리에테르 백본은 일반적으로 프로필렌 옥사이드(PO) 또는 프로필렌 옥사이드(PO)와 에틸렌 옥사이드(EO)의 혼합물을 기재로 한다. 프로필렌 옥사이드(PO)와 에틸렌 옥사이드(EO)의 혼합물이 사용될 경우, PO/EO의 몰비는 일반적으로 1보다 높다. 즉, 폴리에테르아민은 주로 폴리프로필렌 글리콜(PPG)을 기재로 한다. 바람직한 양태에서, PO/EO의 몰비는 일반적으로 2보다 높고, 예컨대 3보다 높다.

[0022] 폴리에테르 백본은 1 내지 3개의 아민기를 함유할 수 있다. 즉, 폴리에테르는 모노아민, 디아민 또는 트리아민이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 폴리에테르 아민은 모노아민이다. 프로필렌 옥사이드(PO)와 에틸렌 옥사이드(EO)의 혼합물이 적용될 때, 아민기는 주로 분자의 프로필렌 옥사이드(PO) 부분의 끝에 위치한다.

[0023] 폴리에테르아민의 분자량은 일반적으로 범위가 500 내지 5000Da이다. 본 발명의 특정 양태에서, 분자량은 1000 내지 4000Da, 예컨대 1500 내지 3000Da이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 폴리에테르아민의 분자량은 약 2000Da이다.

[0024] 본 발명의 특정 실시예에서, 폴리에테르아민은 하기와 같은 일반적인 구조이다.

화학식 2



[0025]

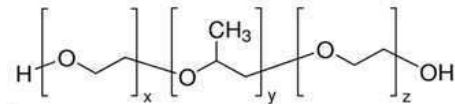
[0026] 여기서:

[0027] m은 1~15의 정수이고,

- [0028] n은 5-50의 정수이고,
- [0029] R = CH₃이다.
- [0030] 본 발명의 특정 양태에서, n/m 비는 1 이상, 예컨대 2 또는 3 또는 그 이상이다. 더 적합한 m은 2 내지 10, 예컨대 4-8의 정수를 나타낸다. 가장 바람직하게는 약 6이다. n은 10 내지 40의 범위, 예컨대 25 내지 35의 범위가 적합하다.
- [0031] 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)과 폴리에테르아민 사이의 비율은 폭넓게 선택할 수 있다. 그러나 일반적으로 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)과 폴리에테르아민 사이의 중량 비율은 1 내지 5이다.
- [0032] 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 프로필렌 글리콜 단위가 소수성 도메인 내로 조립되고 에틸렌 글리콜이 소포의 공간 내로 돌출하는 소포의 백본을 형성하는 것으로 현재 알려져 있다. 폴리에테르아민의 소수성 부분은 분자를 소포에 고정시켜 아민기가 소포의 공간으로 돌출하게 한다. 따라서, 폴리에테르아민은 소포의 표면을 아민기로 장식한다고 말할 수 있다.
- [0033] 막횡단 단백질은 자연 환경에서 전체 이중 지질막, 즉 세포 내부에서 세포의 공간까지 확장된다. 막횡단 단백질의 대부분은 특정 물질에 대한 관문으로 기능하여, 세포 내부와 세포 외액 사이에서 이들 물질의 교환을 허용한다. 막횡단 단백질의 특징은 막 내로 막횡단 단백질의 통합을 보장하는 소수성 영역의 존재이다. 막횡단 단백질은 또한 중공사 영역의 양쪽에 친수성 세그먼트를 가지며, 상기 친수성 세그먼트는 각각 세포의 내부와 세포 외액으로 향한다. 본 발명에서, 막횡단 단백질은 소포의 소수성 부분에 혼입된다.
- [0034] 막횡단 단백질은 본 발명에 개시된 막 물질에 혼입될 수 있지만, 일반적으로 이온(이온 통로)과 물(아쿠아포린 수분 통로)을 수송하는 막횡단 단백질을 사용하는 것이 바람직하다. 이온 통로에는 염화물 통로와 금속 이온 수송체가 포함된다. 염화물 이온 외에 염화물 통로는 일부 막횡단 단백질에서 HCO₃⁻, I⁻, SCN⁻ 및 NO₃⁻를 전도한다. 금속 이온 수송체는 마그네슘 수송체, 칼륨 이온 통로, 나트륨 이온 통로, 칼슘 통로, 양성자 통로 등을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 막횡단 단백질은 아쿠아포린 수분 통로이다. 아쿠아포린 수분 통로는 세포 내외부로 물 수송을 용이하게 한다. 산업용 막에서 아쿠아포린 수분 통로는 삼투에 의한 물의 유동을 보장하는 반면 용액 내 다른 염분은 거부된다.
- [0036] 막횡단 단백질은 수용액에서 응집 및 침전되는 경향이 있으므로 막횡단 단백질은 세제에 용해하는 것이 적합할 수 있다. 다수의 세제가 사용될 수 있지만, 일반적으로 세제는 라우릴디메틸아민 N-옥사이드(LDAO), 옥틸 글루코사이드(OG), 도데실 말토사이드(DDM) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0037] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 막횡단 단백질을 포함하는 소포의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0038] a. 막횡단 단백질과 폴리에테르아민의 수용액을 혼합하는 단계
- [0039] b. 단계 a에서 제조된 상기 혼합물에 수용액으로 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)을 첨가하는 단계
- [0040] c. 단계 b에서 수득한 용액을 교반하는 단계.
- [0041] 제조된 소포는 또한 폴리머줌 또는 중합체 소포로 지칭될 수 있다. 소포는 교반 단계 중에 적합한 용매(예: 물)에서 양친매성 블록 공중합체에 의해 형성된 자기조립 구조이다. 소포는 막횡단 단백질과 같은 다양한 구조를 포함할 수 있는 이중층 벽으로 둘러싸인 내부 빈 공동을 나타낸다.
- [0042] 중합체 소포의 안정성은 형성 중합체의 분자량에 따라 증가한다. 따라서, 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)의 평균 분자량은 1000달톤(Dalton) 이상이다. 그러나 분자량이 너무 크면 소포로 조립하기 어려운 경향이 있다. 따라서, 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)의 평균 분자량은 바람직하게는 15,000달톤(Dalton)을 넘지 않는다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 중량 평균 분자량이 약 2,500Da 내지 약 10,000Da의 실질적으로 선형 중합체이다. 본 발명의 변경예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)의 분자량은 10,000 내지 15,000Da이다.
- [0043] 소포의 투과성은 일반적으로 친수성 대 소수성 비가 증가함에 따라 증가한다. 따라서, 프로필렌 글리콜 단위의

양은 일반적으로 에틸렌 글리콜 단위의 양보다 더 높다. 일반적으로 플루로닉으로 알려진 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌(PEO-PPO-PEO) 블록 공중합체는 친수성 대 소수성 비가 낮으므로 투과막을 수득하는 데 적합하다. 본 발명의 일 실시예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)은 화학식이 하기와 같다.

화학식 3



[0044]

[0045] 여기서:

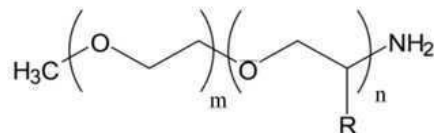
[0046] x는 10~30 사이, 바람직하게는 15~25 사이의 정수를 나타내고,

[0047] y는 50~100 사이, 바람직하게는 60~80 사이의 정수를 나타내고,

[0048] z는 10~30 사이, 바람직하게는 15~25 사이의 정수를 나타낸다.

[0049] 폴리에테르아민은 하기와 같은 일반적인 구조에 적합하다.

화학식 4



[0050]

[0051] 여기서:

[0052] m은 1~15의 정수이고,

[0053] n은 5~50의 정수이고,

[0054] R = CH₃이다.

[0055] 본 발명의 일 실시예에서 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)과 폴리에테르아민 사이의 중량 비율은 1 내지 5이다.

[0056] 아쿠아포린과 같은 수성 막횡단 단백질이 단계 a에서 폴리에테르아민과 혼합되기 전에, 막횡단 단백질은 세제에서 가용화한다. 세제에서 막횡단 단백질이 가용화하면 막횡단이 수용액에서 침전되는 경향을 방지하거나 개선한다. 세제는 라우릴디메틸아민 N-옥사이드(LDAO), 옥틸 글루코사이드(OG), 도데실 말토사이드(DDM) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 적합하게 선택된다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 개시된 바와 같이 생성된 소포는 분리막에 포함된다. 일 실시예에서, 분리막은 소포와 다공성 지지막을 혼입하는 활성층을 포함한다. 다공성 지지막은 막횡단 단백질에 의해 수송되는 물 플럭스 및/또는 이온을 실질적으로 방해해서는 안 된다. 다공성 지지막의 주요 목적은 소포를 혼입하는 활성층에 대한 스캐폴드(scaffold) 역할을 하여 막횡단 단백질이 우세한 차별 요소가 되도록 하는 것이다.

[0058] 본 발명의 바람직한 양태에서, 활성층은 다공성 기질 막 상에 형성된 박막 복합층에 혼입된 소포를 포함한다. 특정 이론에 구속되지 않되, 표면에 아민기를 함유하는 소포는 물리적으로 혼입되거나 고정화(흡수)될 뿐만 아니라 TFC 층에 화학적으로 결합할 것으로 여겨진다. 왜냐하면, 반응성 아민기는 트리메소일 클로라이드(TMC)와 같은 아실 클로라이드와 계면 중합 반응에 참여할 것이기 때문이다. 이러한 방식으로, 소포가 TFC 층에 공유 결합하여, 소포 로딩이 상대적으로 높아져 막을 통해 더 높은 물 플럭스가 발생할 것으로 예상된다. 또한, TFC 층에서 소포가 공유 결합하면 선택 막 층에 혼입될 때 아쿠아포린 및 아쿠아포린-혼입 소포의 안

정성 및/또는 수명이 더 높아지는 것으로 예상된다.

- [0059] 또한, 상기 막 통과 단백질이 이온 통로 또는 아쿠아포린 등을 포함하고, 막횡단 단백질을 포함하는 소포가 상기 활성 또는 선택 층에 고정화되거나 혼입될 때, 선택 및 수송 특성이 다양한 분리막 또는 여과막을 제조하는 것이 가능해진다. 즉, 예컨대 상기 막횡단 단백질이 이온 통로인 경우 이온 교환 막을 제조하고, 상기 막횡단 단백질이 아쿠아포린인 경우 물 여과막을 제조하는 것이 가능해진다. 막횡단 단백질은 자기조립 소포 내로 복잡체화 될 때 생물학적 활성 접힘 구조를 유지하기 때문에 분해로부터 보호될 수 있다. 민감한 양친매성 단백질조차도 충분히 안정되어 실험실 및 산업 규모의 분리막으로 가공될 때 원하는 기능을 유지한다.
- [0060] 본 발명은 또한 다공질 기질 막 상에 막횡단 단백질을 혼입하는 소포를 고정화하는 박막 복합 층의 제조 방법에 관한 것으로 하기 단계를 포함한다.
- [0061] a. 위에서 언급한 바와 같이 제조된 소포 및 디아민 또는 트리아민 화합물을 포함하는 수용액을 제공하는 단계,
- [0062] b. 다공성 지지막의 표면을 단계 a의 수용액으로 덮는 단계,
- [0063] c. 아실 할라이드 화합물을 포함하는 소수성 용액을 적용하는 단계, 및
- [0064] d. 수용액과 소수성 용액이 계면 중합 반응을 수행하여 박막 복합 층을 형성하게 하는 단계.
- [0065] 상기 디아민 화합물은 하기 예를 포함한 화합물의 범위 중에서 선택할 수 있다.
- [0066] 페닐렌디아민, 예컨대 m-페닐렌디아민, p-페닐렌디아민, 2,5-디클로로-p-페닐렌디아민, 2,5-디브로모-p-페닐렌디아민, 2,4,6-트리클로로-m-페닐렌디아민, 2,4,6-트리브로모-m-페닐렌디아민 등;
- [0067] 디아미노비페닐, 예컨대 2,2'-디아미노비페닐, 4,4'-디아미노비페닐, 3,3'-디클로로-4,4'-디아미노비페닐, 3,5,3', 5'-테트라브로모-4, 4'-디아미노비페닐 등;
- [0068] 디아미노디페닐메탄, 예컨대 4,4'-디아미노디페닐메탄, 3,3'-디아미노 디페닐메탄, 2,2'-디아미노디페닐메탄, 3,3'-디클로로-4,4'-디아미노디페닐메탄, 2,2'- 디클로로-4,4'-디아미노디페닐메탄, 3,5,3', 5'-테트라클로로-4,4'-디아미노디페닐메탄, 3,5,3', 5'-테트라브로모-4,4'-디아미노디페닐메탄 등;
- [0069] 디아미노비벤질, 예컨대 4,4'-디아미노비벤질, 3,5,3', 5'-테트라브로모-4,4'- 디아미노비벤질 등;
- [0070] 2,2-비스아미노페닐프로판, 예컨대 2,2-비스(4'-아미노페닐) 프로판, 2,2- 비스(3', 5'-디클로로-4'-아미노페닐) 프로판, 2,2-비스(3', 5'-디브로모-4'-아미노페닐)-프로판 등;
- [0071] 디아미노디페닐술폰, 예컨대 4,4'-디아미노디페닐술폰, 3,5,3', 5'- 테트라클로로 -4,4'- 디아미노디페닐술폰, 3,5,3', 5'- 테트라브로모 -4,4'-디아미노디페닐술폰 등;
- [0072] 디아미노벤조페논, 예컨대 4,4'-디아미노벤조페논, 2,2'-디아미노벤조페논, 3,3'-디클로로 -4,4'-디아미노벤조페논, 3,5,3',5'-테트라브로모-4,4'-디아미노벤조페논, 3,5,3', 5'-테트라클로로 -4,4'-디아미노벤조페논 등;
- [0073] 3,3'-디아미노디페닐 에테르, 예컨대 3,3'-디아미노디페닐 에테르, 4,4'-디아미노디페닐 에테르, 3,3'-디브로모-4,4'-디아미노디페닐 에테르 등. 피페라진, N-페닐-벤젠-1,3 디아민, 멜라닌 및 상기 화합물의 혼합물. 바람직한 양태에서, 디아민은 1,3-디아미노벤젠으로도 알려진 m-페닐렌디아민(MPD)으로 선택된다.
- [0074] 상기 트리아민 화합물은 예컨대 디에틸렌 트리아민, 디프로필렌 트리아민, 페닐렌트리아민, 비스(헥사메틸렌) 트리아민, 비스(헥사메틸렌) 트리아민, 비스(3-아미노프로필) 아민, 헥사메틸렌디아민, N-탈로우알킬 디프로필렌, 1,3,5-트리아진-2,4,6-트리아민 및 이들 화합물의 혼합물을 포함하는 다양한 화합물 중에서 선택될 수 있다.
- [0075] 상기 아실 할라이드 화합물은 일반적으로 디아민 또는 트리아민 화합물과의 반응에 이용 가능한 2개 또는 3개의 아실 할라이드기를 갖는다. 디아실 할라이드 또는 트리아실 할라이드 화합물의 적합한 예는 트리메소일 클로라이드(TMC), 트리메소일 브로마이드, 이소프탈로일 클로라이드(IPC), 이소프탈로일 브로마이드, 테레프탈로일 클로라이드(TPC), 테레프탈로일 브로마이드, 아디포일 클로라이드, 시아누릭 클로라이드 및 이들 화합물의 혼합물을 포함한다.
- [0076] 디아민 또는 트리아민 화합물의 아민기는 반응을 위해 아실 할라이드 화합물의 산 클로라이드 기와 경쟁할 것이다. 일반적으로, 디-아민 또는 트리-아민 화합물 대 아실 할라이드 화합물의 중량 비율은 0:1 내지 30:1이다. 표면에 고밀도의 소포가 필요한 경우, 디-아민 또는 트리-아민 기의 양은 일반적으로 위 범위의 아래인 0:1 내

지 1:1, 예컨대 0:1 내지 0.5:1 사이이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 더 단단한 TFC 층이 바람직하고 반응물의 선택은 위 범위의 위 끝인 1:1 내지 30:1, 바람직하게는 1:1 내지 5:1 사이이다.

- [0077] 아민 수용액은 다공성 지지막에 균일한 층으로 첨가되고 이어서 아실 할라이드 용액의 적용 전에 건조될 수 있다. 본 발명의 특정 실시예에서, 아민 수용액은 다공성 지지막에 적용되고, 이어서 다공성 지지막의 대향 측에 진공이 제공되어 아민 수용액의 다공성 구조 내로 침투를 자극한다. 진공을 완화한 후, 아실 클로라이드 용액은 아민과 아실 클로라이드의 반응에 의해 박막 복합 층의 형성에 적용된다. 진공의 사용은 다공성 지지막에 박막 복합 층의 더 나은 통합을 제공하는 것으로 예상된다.
- [0078] 다공성 지지막은 다수의 재료로 형성될 수 있다. 지지막이 TFC 층을 충분히 지지하고 작동 조건 동안 분해를 견딜 수 있는 것, 즉 막 한쪽의 압력 및/또는 화학적 환경을 견딜 수 있는 한, 재료의 특정 선택은 필수적이지 않다. 다공성 지지막 재료의 구체적인 예로는 폴리설폰 또는 폴리에테르설폰 중합체가 포함된다. 지지는 대칭 또는 비대칭일 수 있다. 다공성 지지막이 비대칭인 경우, TFC 층은 스킨 층 표면에 적절하게 형성된다.
- [0079] 다공성 지지막은 일부 실시예에서 직포 또는 부직포의 기계적 지지에 의해 추가로 지지되어 기계적 구조를 증가시키고 작동 중 파단 위험을 감소시킬 수 있다.
- [0080] 다공성 지지막은 평막, 관형막 또는 중공사막과 같은 당 업계에 공지된 임의의 물리적 모양일 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 중공사막은 더 높은 층진 밀도를 제공하기 때문에, 즉 활성 막 면적이 특정 부피에 대해 더 높으므로 바람직하다. 막은 당 업계에 공지된 바와 같이 함께 그룹화되거나 모듈로 조립될 수 있다. 따라서, 복수의 평막(flat sheet membrane)이 평판(plate-and-frame) 막 구성으로 조립될 수 있다. 평판 막 시스템은 플레이트형 구조 위에 놓인 막을 이용하며, 이는 프레임형 지지에 의해 함께 유지된다.
- [0081] 평막은 또한 나선형으로 감긴 필터 모듈로 조립될 수 있다. 평막 외에, 나선형으로 감긴 막 모듈은 공급 스페이서와 투과 튜브라고 불리는 중공 튜브 주위에 감긴 투과물 스페이서를 포함한다. 나선형으로 감긴 요소는 교차 흐름 기술을 이용하며, 그 구조로 인해 여러 길이, 직경 및 막 재료를 이용하여 다양한 구성으로 쉽게 만들 수 있다. 나선형으로 감긴 필터 모듈은 먼저 막을 배치한 다음 막이 안쪽을 향하도록 반으로 접는다. 이어서 공급 스페이서를 접힌 막 사이에 넣고 막 샌드위치를 형성한다. 공급 스페이서의 목적은 물이 막 표면들 사이에 흐르도록 공간을 제공하고 막 있들 사이에서 균일한 흐름을 허용하는 것이다. 다음에, 투과물 스페이서가 투과 튜브에 부착되고, 미리 제조된 막 샌드위치가 접착제를 사용하여 투과물 스페이서에 부착된다. 다음 투과 층은 놓여서 접착제로 밀봉되며, 필요한 투과물 스페이서가 모두 막에 부착될 때까지 전체 공정이 반복된다. 그런 다음 완성된 막 층을 튜브 주위에 감아 나선형을 만든다.
- [0082] 관형 막 모듈은 벽이 다공성인 튜브형 구조이다. 관형 모듈은 접선 방향 교차 흐름을 통해 작동하며 일반적으로 높은 용해 물질, 높은 부유 물질 및/또는 오일, 그리스 또는 지방이 있는 것과 같은 어려운 공급 흐름을 처리하는 데 사용된다. 관형 모듈은 최소 2개의 튜브, 즉 막 튜브로 불리는 내부 튜브와 셸인 외부 튜브로 구성된다. 공급 스트림은 막 튜브의 길이를 가로질러 외부 셸로 여과되고 농축물은 막 튜브의 반대쪽 끝에 모인다.
- [0083] 중공사막은 모듈로 조립될 수 있다. 따라서, 본 발명은 하우징 내에 중공사 다발을 조립함으로써 중공사 모듈을 제조하는 단계를 제공하며, 여기서 제1 용액을 통과시키기 위한 입구는 일단 중공사 루멘에 연결되고 출구는 타단의 루멘에 연결되고, 하우징에 연결된 출구로 제2 용액을 통과시키기 위해 하우징에 입구가 제공된다.
- [0084] 본 발명에 따라 제조된 막 모듈은 정삼투 구성과 역삼투 구성을 포함하여 다양한 구성에 사용될 수 있다.
- [0085] 본 발명은 또한 내부 화물을 포함하는 소포에 관한 것으로, 하진된 소포는 환경의 pH 변화에 따라 내부 화물을 방출할 수 있다. 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리에테르아민의 혼합물을 포함하는 소포는 pH 7 미만 또는 pH 8 이상과 같은 알칼리성 pH 값에서 안정된다. 그러나 소포의 외부 환경이 pH 7 이하 또는 pH 6 이하의 pH 값과 같은 산가로 변할 때, 소포 형성은 해리된다. 소포의 pH 선택 거동은 알칼리성 pH 값에서 소포에 화물을 혼입하고, 소포를 화물과 함께 원하는 위치로 수송하고, 소포를 산 조건에 노출시킴으로써 소포를 방출하여 소포를 해리시킬 수 있는 기회를 제공한다.
- [0086] 화물 전달용 소포는 소포 혼입 막횡단 단백질에 대해 상기 기재된 바와 조성과 제조 방법이 같다. 제조 방법으로 인해, 소포는 알칼리성 pH 값, 즉 pH 7 내지 pH 14 및 온도 30°C 내지 90°C에서 매우 알칼리성이다. 초기 테스트에 따르면, 소포는 실온에서 1년 이상 아무런 변화없이 안정적이다.
- [0087] 또한, 소포는 추가 정제 단계 없이 필요할 때 내부 화물을 쉽게 혼입할 수 있도록 중성 또는 염기성 pH에서 다시 조립된다.

[0088] 화물 물질을 포함하는 소포는 생물활성 모이어티를 포함하여 다양한 화물 물질의 인시츄(in situ) 또는 생체 내 전달을 위한 담체 시스템으로 사용될 수 있다. 화물 물질은 예컨대 소분자 약물, 생체 분자, 생체 고분자 및 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 생물활성 물질과 같은 생물활성 물질일 수 있다. 생물활성 물질은 비생물활성 담체 상에 지지될 수 있다. 화물 물질은 중합체 또는 무기 입자일 수 있다. 본 발명에 따르는 화물 물질로 이용될 수 있는 물질의 예시적인 예는 소분자 약물, 생체 분자, 생체 고분자(다당류, 글리코사미노글리칸 및 단백질 등을 포함), 세포 (살아있는 세포 포함), 치료제(즉, 인간과 같은 동물에서 측정 가능한 생리학적 반응을 일으키는 제제), 형광체, 발색제, 효소, 단백질(면역 조절 단백질 및 매트릭스 메탈로프로티나제 포함), 항생제, 마취제, 항체, 성장 인자, 호르몬, 항염증제, 진통제, 강심제, 항정신제, 충전제(예: 무기 및/또는 중합체 입자), 면역 치료제, 시토킨, 올리고 뉴클레오티드, 라벨(예: 형광체, 방사성 뉴클레오티드, 형광 성분, 화학 발광 성분, 자성 입자, 염료) 등 및 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

[0089] 본 발명에 따른 소포는 일반적으로 지름의 실질적인 수축 없이 높은 온도를 견뎌내고, 이에 따라 투수성의 유지하는 사실상 영향을 받지 않는다. Pluronic 기반 소포는 트리메소일 클로라이드(TMC)와의 화학 반응에 의해 폴리 아미드 층에서 가교에 이용 가능한 더 큰 제타 전위 값으로 예시된 표면에 이용 가능한 많은 양의 아미노기를 갖는 장점이 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090] 광범위하게 본 발명은 아쿠아포린 수분 통로와 같은 막횡단 단백질과 함께 자기조립된 소포를 형성하기 위해 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)와 폴리에테르아민의 혼합물의 용도에 관한 것이다. 막횡단 단백질이 혼입된 소포는 예컨대 물 분자가 막을 통과할 수 있도록 막횡단 단백질이 혼입 또는 고정화되는 분리막의 제조에 사용될 수 있다. 예컨대, 막횡단 단백질을 포함하는 분리막의 제조를 위해, 소포는, 예컨대 디아민 또는 트리아민과 같은 방향족 아민(예: 다공성 지지 구조물의 표면에 적용되는 1,3-디아미노벤젠(MPD)을 포함하는 수성 액체 조성물에 첨가될 수 있으며, 유기 용매에서 산 클로라이드 용액과 접촉할 때 계면 중합 반응에 참여하여 상기 지지 상에서 막막 복합체 형성 또는 선택 층을 형성함으로써 분리막을 형성하며, 상기 소포는 고정되거나 혼입되게 된다.

[0091] 특정 이론에 구속되기를 원하지 않으면서, 표면에 유리 유효 NH₂ 반응성기를 함유하는 소포는 물리적으로 혼입되거나 고정화(흡수)될 뿐만 아니라 TFC 층에 화학적으로 결합될 것으로 여겨진다. 왜냐하면, NH₂ 반응성기는 트리메소일 클로라이드(TMC)와 같은 아실 클로라이드와 계면 중합 반응에 참여할 것이기 때문이다. 이러한 방식으로, 소포가 TFC 층에 공유 결합될 것으로 예상된다. 또한, 반응성 성분의 적절한 조정에 의해, 높은 소포 로딩이 수득될 수 있고 이에 따라 막의 특정 영역을 통한 더 높은 플럭스가 수득될 수 있다고 생각된다. 또한, TFC 층에서 소포가 공유 결합하면 선택 막 층에 혼입될 때 막횡단 단백질을 포함하는 소포의 안정성 및/또는 수명이 더 높아지는 것으로 예상된다.

[0092] 또한, 상기 막 통과 단백질이 이온 통로 또는 아쿠아포린 등을 포함하고, 막횡단 단백질을 포함하는 소포가 상기 형성 또는 선택 층에 고정화되거나 혼입될 때, 선택 및 수송 특성이 다양한 신규 분리막 또는 여과막을 제조하는 것이 가능해진다. 즉, 예컨대 상기 막횡단 단백질이 이온 통로인 경우 이온 교환 막을 제조하고, 상기 막횡단 단백질이 아쿠아포린인 경우 물 여과막을 제조하는 것이 가능해진다. 막횡단 단백질은 자기조립 나노 구조로 복합체화될 때 생물학적 활성 접힘 구조를 유지하기 때문에 분해로부터 보호될 수 있고, 민감한 양친매성 단백질조차도 충분히 안정되어 실험실 및 산업 규모의 분리막으로 가공될 때 원하는 기능을 유지한다.

[0093] 본 발명의 분리막은 나노 여과 공정 또는 역삼투 공정에서 분리막을 통해 수용액을 여과하는 것과 같이 순수한 물 여과액을 제조하기 위한 산업적 또는 가정용 환경에서 유용하다. 본 발명의 목적상, 용어 "분리막"은 얇은 가교 방향족 폴리아미드 층 또는 필름 또는 교대로 하전된 고분자 전해질 층(L-B-L)과 같이 일층에 선택 층이 형성된 다공성 지지막을 포함하는 비대칭 막과 같은 물 여과 및 수분 분리를 위한 선택적 투과성 막과 반투과성 막을 포함한다. 타층은 일반적으로 폴리에스테르 섬유로 제조된 직포 또는 부직포 층 또는 메시(mesh)에 의해 강화될 수 있다.

[0094] 또한, 본 발명의 분리막은 생성물 용액의 농축 방법에 유용하며, 상기 방법은 필터 하우징이나 모듈에 장착된 본 발명의 분리막을 이용하여 예컨대 정삼투로 생성물 용액으로부터 물을 추출하는 단계를 포함한다.

[0095] 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 소포 제형을 포함하는 선택 층으로 개질된 중공사막 다발을 갖는 중공사(HF)

모듈을 포함한다. 바람직하게는, 선택 층은 계면 중합 반응을 통해 섬유의 내면 상에 형성된 박막 복합체(TFC) 층을 포함하고, 상기 TFC 층은 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리에테르아민의 혼합물로 구성된 소포에 혼입된 아쿠아포린 수분 통로를 포함한다.

[0096] 본 발명의 분리막은 압력지연삼투를 사용하여 염도차 전력을 생산하는 방법에 추가로 유용할 수 있으며, 상기 방법은 상기 분리막을 사용하여 정수압을 증가시키는 단계와 정수압의 증가를 염도차 발전의 공급원으로 사용하는 단계를 포함한다(참고: W02007/033675 및 W02014128293(A1)).

[0097] 본 발명에 사용된 용어 "아쿠아포린 수분 통로"는 기능성 천연 또는 합성 아쿠아포린 또는 아쿠아글리세로포린 수분 통로(예: 아쿠아포린 Z(AqpZ), GIPf, SoPIP2;1, 아쿠아포린 1 및/또는 아쿠아포린 2)를 포함한다. 아쿠아포린 수분 통로는 세균성 아쿠아포린과 진핵생물 아쿠아포린(예: 효모 아쿠아포린, 식물 아쿠아포린 및 포유동물 아쿠아포린)뿐만 아니라 관련 채널 단백질(예: 아쿠아글리세로포린)이 포함된다. 아쿠아포린과 아쿠아글리세로포린의 예에는 원핵생물 아쿠아포린(AqpZ); 포유동물 아쿠아포린(예: Aqp1 및 Aqp2); 식물 아쿠아포린(예: 혈장 고유 단백질(PIP), 토노플라스트 고유 단백질(TIP), 노들린 고유 단백질(NIP) 소형 고유 단백질(SIP)(예: SoPIP2;1, PttPIP2;5 및 PtPIP2;2); 효모 아쿠아포린(예: AQY1 및 AQY2); 및 아쿠아글리세로포린(예: GIpF 및 Yf1054)이 포함된다. 아쿠아포린 수분 통로 단백질은 본 발명에 기재된 방법에 따라 또는 Karlsson 등(FEBS Letters 537: 68-72, 2003) 또는 Jensen 등 US 2012/0080377 A1(예: 실시예 6 참조)에 따라 제조한다.

[0098] 본원에 사용된 용어 "분리막"은 물 및 선택적으로 다른 용질, 입자, 콜로이드 및 거대 분자의 음이온과 양이온을 포함하는 특정 소형 용질을 분리하는 데 유용한 막을 포함한다. 분리막의 예는 나노 여과(NF) 막, 정삼투(FO) 막 및 역삼투(RO) 막과 같은 "여과막"이다. 여과막의 한 유형은 종종 나노 여과 및 역삼투 막으로 분류되는 "박막 복합체"(TFC) 막이다. TFC 평막은 전형적으로 폴리에테르설폰 또는 폴리설폰 다공성 층의 상단에 폴리아미드 층을 부직포 또는 직포 지지체의 상부에 침착시킴으로써 제조된다. 폴리아미드 배제(rejection) 층은 유기 용매 내 아민 수용액과 산 클로라이드 용액의 계면 중합을 통해 형성된다. TFC 막은 WO 2013/043118 (Nanyang Technological University & Aquaporin A/S)에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 다른 유형의 여과막은 Gribova 등(Chem.Mater., 24: 854-869, 2012) 및 Wang 등(Membranes, 5(3): 369-384, 2015)에 기재된 바와 같이 LbL(layer-by-layer) 증착 방법에 의해 형성된 것들이다. 예를 들어, 본 발명의 소포는 Gribova 등의 도 4에 개략한 바와 같이 고분자 전해질 다층(PEM) 필름에 매립되거나 혼입될 수 있다.

[0099] 본원에 사용된 "박막-복합체"(TFC) 막은 아민 반응물, 바람직하게는 방향족 아민, 예컨대 수용액 내 디아민 또는 트리아민(예: 1,3-디아미노벤젠(m-페닐렌디아민, > 99%, Sigma-Aldrich로부터 구매한 것) 및 유기 용매에 용해된 아실 할라이드 반응물, 예컨대 2산 또는 3산 클로라이드, 바람직하게는 방향족 아실 할라이드(예: 벤젠-1,3,5-트리카르보닐 클로라이드(CAS 번호 84270-84-8, 트리메소일 클로라이드(TMC), 98%, Sigma-Aldrich)로부터 구매한 것)으로 상기 반응물은 계면 응축 중합 반응에서 결합한 것을 사용하여 제조할 수 있다(참고: Khorshidi 등(2016) Scientific Reports 6, 논문 번호: 22069 및 미국 특허 4,277,344호, 지지막(예: 폴리에테르설폰막의 표면에서 다공성 막 지지체에 적층된 폴리아미드를 포함하는 복합 막의 형성을 상세히 설명). 벤젠-1,3,5-트리카르보닐 클로라이드(트리메소일 클로라이드)는 헥산(> 99.9%, Fisher Chemicals), 헵탄, 옥탄, 노난, 데칸 등(직쇄형 또는 분지형 탄화수소) 또는 다른 저방향족 탄화수소 용매(예: Isopar™ G Fluid, 저악취 유체를 생산하기 위해 촉매 존재하에서 수소로 처리된 석유계 원료로부터 생산되며, 주요 성분은 이소알칸을 포함함)를 포함하는 C₆-C₁₂ 탄화수소와 같은 용매에 용해된다. Isopar™ G Fluid: 화학명: Hydrocarbons, C10-C12, isoalkanes, < 2% aromatics; CAS No: 64742-48-9, 화학명: Naphtha (petroleum), hydrotreated heavy (ExxonMobil Chemical의 것). 반응물 1,3-디아미노벤젠에 대한 대안에는 헥사메틸렌디아민 등과 같은 디아민을 포함하고, 반응물 벤젠-1,3,5-트리카르보닐 클로라이드에 대한 대안은 당 업계에 공지된 아디포일 클로라이드, 시아누르산 등을 포함한다.

[0100] 본 발명의 소포는 양친매성 물질의 친수성 및 소수성 상호 작용, 즉 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리에테르아민의 혼합물을 통해 소포가 형성되는 과정을 설명하기 위해 "자기조립"으로 지칭할 수 있다.

[0101] 본원에 사용된 "수력학적 지름"은 측정되는 입자와 동일한 방식으로 확산하는 가상 강구(hard sphere)의 크기로 정의된 동적 광 산란(DLS: dynamic light scattering)으로 측정된 수성 매질에서 나노 입자의 수력학적 크기를 나타낸다.

[0102] 정삼투(FO) 또는 직접 삼투는 선택 막과 투과 막을 사용하여 용해된 용질에서 물의 분리에 영향을 미치는 삼투 공정이다. 이러한 분리를 위한 동력은 본원에서 드로(draw)로 지칭하는 고농도 용액과 피드(feed)로 지칭하는

저농도 용액 사이의 삼투압 구배이다. 삼투압 구배는 막을 통한 물의 순 유동을 드로로 유도하여, 피드를 효과적으로 농축시킨다. 드로 용액은 단일 또는 복수의 간단한 염으로 구성되거나 정삼투 적용을 위해 특별히 맞춤화된 물질 일 수 있다. 공급 용액은 음료, 폐기물 스트림 또는 해수와 같은 희석된 생성물 스트림일 수 있다. 참고: IFOA, <http://forwardosmosis.biz/education/what-is-forward-osmosis/>.

- [0103] 따라서 FO의 대부분의 적용은 농축 공정의 부산물로서 제품 농축, 폐기물 농축 또는 깨끗한 물의 생산이라는 세 가지 범주로 분류된다. 본원에서 사용될 때 용어 "PAFO"(pressure assisted forward osmosis)는 압력 보조 정삼투 공정을 말한다.
- [0104] 본원에서 사용될 때 용어 "PRO"(pressure retarded osmosis)는 삼투 동력의 생성에 유용한 압력 지연 삼투를 말한다. 본 발명의 막은 모든 유형의 정삼투 공정에 유용하며 특히 각각의 정삼투 유형에 적합하게 적용될 수 있다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "역삼투"(RO: reverse osmosis)는 선택적으로 투과막에 적용된 피드 수압이 삼투압을 극복하기 위해 사용될 때를 말한다. 역삼투는 일반적으로 박테리아를 포함하여 공급수로부터 많은 유형의 용해 물질과 현탁 물질을 제거하며, 산업 공정과 음용수 생산 모두에 사용된다. RO 공정 동안, 용질은 막의 가압 면에 보유되고 순수 용매인 투과물은 다른 면으로 통과한다. 선택성은 막이 공극(구멍)을 통해 더 큰 분자 또는 이온을 허용하지 않으면서 더 작은 용액의 성분(예: 용매 분자)이 자유롭게 통과할 수 있도록 허용하는 것을 말한다. 저압역삼투(LPRO) 막은 일반적으로 약 5bar에서 최대 작동 압력인 약 25bar의 15 비유속(specific flux) LMH/bar에서 작동한다. LPRO는 낮은 공급 압력 범위에서 수행된다. 예컨대, 2~5bar는 때때로 초저압 역삼투로 지정된다. 당 업계에 공지된 LPRO 막은 약 45°C의 공급수 온도, 2 내지 11 범위의 공급수 pH 및 pH 1 내지 12 범위의 화학적 세정으로 일반적인 작동 한계를 갖는다.
- [0106] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예를 참조하여 추가로 설명한다.
- [0107] 실시예:
- [0108] 실시예 1
- [0109] Pluronic® P-123 트리블록 공중합체(폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) Mn 5800Da) 및 분자량이 공칭 2000인 Jeffamine® M-2005(폴리에테르아민)로부터 소포 제조 및 상기 소포를 사용한 수막 제조.
- [0110] 재료:
- [0111] 분자량이 5800Da이고 조성이 PEG20-PP070-PEG20인 Pluronic® P-123 트리블록 공중합체(폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)을 Sigma Aldrich로부터 구매하여 받은 대로 사용했다.
- [0112] Jeffamine® M-2005는 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리프로필렌 옥사이드 비가 29 대 6이고 분자량이 2000Da인 폴리에테르아민이며 Huntsman으로부터 구매하여 받은 대로 사용하였다.
- [0113] 8mL NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ 및 0.24g의 KH₂PO₄를 800mL MiliQ 정제 H₂O에 용해하고 HCL을 사용하여 pH를 7.2로 조정한 다음 부피를 1 L로 완성하여 인산 완충액 10mM(PBS)(pH 7.2, 136mM NaCl, 2.6mM Kcl)를 제조했다.
- [0114] 아쿠아포린 Z 5mg/mL 원액을 하기에 개시된 바와 같이 제조하였다. 기능성 아쿠아포린-Z는 담배 식각 바이러스 절단 부위를 갖는 His-tagged 단백질로서 대장균 균주 BL21(DE3) 박테리아 배양에서 과잉생산 했다. 융합 단백질은 264 아미노산과 27234 Da의 Mw를 갖는다. 대장균 DH5의 게놈 DNA를 AqpZ 유전자 증폭을 위한 공급원으로 사용하였다. AqpZ의 N-말단에서 담배 식각 바이러스 절단 부위(TEV); ENLYFQSN를 첨가한 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 AqpZ 유전자를 증폭하였다. 증폭된 AqpZ를 효소 NdeI과 BamHI로 분해한 다음 유사하게 분해된 6-His tagged 발현 pET28b 벡터 DNA에 결합(ligate)했다. 양성 클론은 PCR 검사로 확인했다. 이어서, 구조체의 진위를 DNA 서열 분석으로 확인하였다.
- [0115] 대장균 균주 BL21(DE3)을 단백질의 발현에 사용하였다. 50 µg/ml의 카나마이신을 함유하는 Luria Broth 배지를 37°C에서 13~16시간 동안 배양하고, 새로운 LB 브로스로 100배 희석하고 약 1.2~1.5의 밀도(600nm의 OD)로 증식시켰다. 원심 분리 전에 35°C에서 3시간 동안 1mM IPTG를 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 수확된 세포를 0.4mg/ml 리소자임, 50 단위 벤소나제 및 3% n-옥틸 β-D-글루코피라노사이드의 존재 하에 빙냉 결합 완충액(20mM 트리스 pH 8.0, 50mM NaCl, 2mM β-머캅토에탄올, 10% 글리세롤)에 다시 현탁시켰다. 샘플을

12,000Pa에서 미세유동화기에서 5회 용해 사이클에 적용하였다. 불용성 물질을 40,000 x g에서 30분 동안 원심 분리하여 펠릿화하였다. 상청액을 Q-세파로스 고속 흐름 컬럼(Amersham Pharmacia)을 통해 통과시키고, 통과액을 10회 수집하였다. 통과액 분획은 NaCl을 300mM까지 보충한 후 사전 평형화된 Ni-NTA 컬럼에 로딩 하였다. 컬럼을 100 컬럼 부피의 세척 완충액(20mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 25mM 이미다졸, 2mM β-머캅토에탄올, 10% 글리세롤)으로 세척하여 비특이적으로 결합된 물질을 제거하였다. Ni-NTA 아가로스 결합 물질을 5 베드 볼륨의 용리 완충액(20mM 트리스 pH 8.0, 300mM NaCl, 300mM 이미다졸, 2mM β-머캅토에탄올, 10% 15 글리세롤, 30mM n-옥틸 β-D-글루코피라노사이드 함유)으로 용리시켰다. AqpZ를 음이온 교환 크로마토그래피; monoQ 컬럼(GE Healthcare)로 추가 정제했다. 시료 혼합물을 희석 및 농축하여 Amicon 농축기로 염 및 이미다졸 농도를 약 10mM로 만들고, 막을 10,000Da로 차단한 후 MonoQ 컬럼에 로딩 하였다. 음이온 교환 크로마토그래피 중에 사용된 완충액은 (A) 20mM Tris pH 8.0, 30mM OG, 10% 글리세롤 및 (B) 20mM 20 Tris pH 8.0, 1M NaCl, 30mM OG, 10% 글리세롤이었다. 이온 교환 컬럼으로부터 AqpZ를 함유하는 용리된 피크 분획을 모았다. 정제된 AqpZ 추출물을 -80℃에서 동결 보관하였다.

- [0116] 정제 전날, AQP 추출물(-80℃ 냉동고에 보관)을 얼음 또는 4℃ 냉장고에서 해동시켰다. 완충액 부분 및 ddH2O를 4℃에서 준비하였다. AQP 추출물을 임의의 침전물을 용해시키기 위해 자석 스틱에 의해 얼음 수조에서 적절히 냉각한 비이커 안에서 교반하였다. 1.5 부피의 사전 냉각 LDAO-free AQP 결합 완충액을 1 부피의 가용화 추출물에 점차 첨가하고(추출 튜브 및 여과 컵을 행구기 위해 0.5 부피의 추가 완충액 사용), 잘 혼합하고, 평균 0.45 μM 진공 필터 컵을 통해 여과했다. 과도한 발포를 피하기 위해 필터 컵에 진공을 가하고 여과액을 얼음에 두어 2시간 이내에 사용하였다.
- [0117] Histrap 컬럼을 평균 수에 이어서 RT에서 AQP 결합 완충액으로 평형화시켰다. 유속을 1ml/분(1mL 사전 패킹 컬럼) 또는 2.5ml/분(5ml 사전 패킹 컬럼 및 자체 패킹 컬럼)으로 설정하였다. AKTA 프로그램을 사용하여 3회 희석된 추출물(빙수조에서)을 Histrap 컬럼에 로딩하였다. 유속을 1ml/분(1mL 사전 패킹 컬럼) 또는 2.5ml/분(5ml 사전 패킹 컬럼 및 자체 패킹 컬럼)으로 설정하였다. 로딩 부피는 30ml/ml 수지 미만이였다. 빙수조에서 추출물 통과액을 수집하고 추가 사용을 위해 4℃에서 보관하였다. 컬럼을 10CV(컬럼 부피) 빙냉 AQP 결합 완충액으로 세척하였다. 유속을 2.5ml/분(5ml 사전 패킹 컬럼 및 자체 패킹 컬럼)으로 설정하거나 1ml/분으로 1ml 사전 패킹 컬럼에 대해 설정하였다. AQP 단백질을 AKTA 프로그램을 사용하여 유속 2.5ml/분으로 빙냉 AQP 용리 완충액(10 컬럼 부피)으로 용리시켰다. 분획 부피를 10ml로 설정하고 0.5~1 CV 후 15mL PP 튜브에서 수집을 시작하였다.
- [0118] 용리된 분획을 캡핑하고 얼음 또는 4℃에 보관하였다. AQP의 순도와 입체 구조는 각각 변성 및 고유 PAGE 분석으로 조사했다. 단백질 농도는 Nanodrop으로 측정했다. 추출물 통과액은 적절한 품질의 AQP 조성물을 생성하기 위해 필요에 따라 두 번 및 세 번 처리할 수 있다.
- [0119] AQP 품질 분석을 통과한 경우, 2% LDAO를 함유하는 빙냉의 이미다졸이 없는 AQP 결합 완충액을 첨가하여 단백질 농도를 5mg/ml로 조정하였다. 마지막으로 AQP를 0.45 μM 평균 컵을 통한 여과로 평균하고, 1개월 이내에 사용하기 위해 냉장고에서 4℃에 보관하거나 아니면 냉동고에서 -80℃에 보관하였다.
- [0120] 제조 방법:
- [0121] 1. PBS에 폴리머를 유리 실린더의 최종 농도 10mg/mL로 용해하여 새로운 Pluronic® P-123 용액을 제조하는 단계.
- [0122] 2. 플라스크에서 15mg/mL Jeffamine® M-2005 무게를 재는 단계.
- [0123] 3. Aquaporin Z 원액을 1/200 AQPZ/중합체 몰 단백질 비율의 최종 농도로 첨가하는 단계(중합체는 Pluronic® P-123과 Jeffamine® M-2005의 합산한 양이다).
- [0124] 4. 단계 1에서 제조한 Pluronic® P-123 용액을 Jeffamine® M-2005와 Aquaporin Z의 혼합물에 첨가하여 9.9mg/mL에 도달하는 단계.
- [0125] 5. 실온에서 분당 170회전(20시간 이하)으로 혼합물을 밤새 교반하는 단계.
- [0126] 6. 다음날 아침 1~5단계 순서로 얻은 소포 제형을 보관 플라스크로 옮기고 상온으로 유지하는 단계.
- [0127] 소포 제형을 DLS, 제타 전위 및 0.5M NaCl에서 정지 유동 측정으로 크기, 투수성 및 제타 전위 관점에서 테스트했다. 결과는 5개의 상이한 배치에 대해 5회 측정했다.

표 1

제형(Formulation)	
Dh / nm (DLS)	200 nm ± 24 (90% ± 10%) 28 nm ± 2 (0% ± 10%)
제타 전위 / mV	3 ± 2
Ki / s ⁻¹	1702 ± 200

[0128]

[0129]

[0130]

[0131]

[0132]

[0133]

[0134]

[0135]

[0136]

[0137]

[0138]

[0139]

[0140]

[0141]

[0142]

[0143]

[0144]

[0145]

[0146]

[0147]

30℃ 내지 100℃의 다양한 온도에서 10분 동안 5mL의 소포 제형을 가온함으로써 온도 안정성과 열 거동을 시험하였고, 이들의 크기와 투수성은 DLS 및 정지-유동 측정으로 추가 결정했다.

열 처리는 제형의 안정성에 크게 영향을 미치지 않으므로, 실온에서 약 200nm 내지 약 1800nm의 더 큰 지름 수축이 발생하였다. 투수성의 관점에서 100℃까지 변화가 관찰되지 않았다. 1700 내지 1687 s⁻¹의 Ki 값이 기록되었다.

pH 거동은 1에서 7까지 다양한 pH에서 지름이 최대 20nm인 미셀까지 소포 제형의 분해와 기본 pH 값(9~13)에서 동일한 크기 180nm 및 약 1700s⁻¹의 Ki 값에서 재조립을 보여주었다.

실시예 2

BWRO(기수 역삼투) 막의 제조

이들 막은 요약된 하기 단계에 따라 제조했다.

a) MilliQ 물에 MPD를 용해시켜 2.5%(W/W) 농도를 얻는 단계(아래 참조)

b) Isopar의 TMC를 0.15% W/V의 최종 농도로 용해하는 단계

c) 직사각형 막을 바르는 단계(예: 5.5cm x 11cm Membrana 1FPH PES 막을 약 20mL/m² 막의 MPD 용액으로 바르고 약한 교반 하에 30초 동안 방치)

d) 실험실 건조지(예: Kim-Wipe)로 5~10초 동안 비활성면(뒷면)을 건조하는 단계

e) 막을 유리판 위에 놓고 표면이 윤기가 나는 상태에서 흐릿한 상태가 될 때까지 N₂로 부드럽게 건조하는 단계

f) 막 가장자리 주위에 테이프를 부착하는 단계(≈ 1mm)

g) 테이프를 붙인 막과 함께 유리판을 유리 또는 금속 용기에 넣고 한쪽 끝에 약 155mL/m² 막 TMC-Isopar를 추가하고 30초 동안 부드럽게 앞뒤로 흔드는 단계

h) 저장소에서 유리판을 제거하고 N₂로 10~15초 동안 건조하는 단계.

테이프를 제거한 후 막은 새로 형성된 활성면을 위로하여 MilliQ로 옮기고 필요한 경우 후속 단계에서 취급하는 동안 젖게 한다.

MPD 용액 계산:

1.05g의 MPD를 계량하고 35mL의 MilliQ에 용해시킨다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 액체 AQPZ 조성물 7mL를 첨가한다. 용액을 불활성 가스(Ar 또는 N₂)로 최대한 덮어서 유지한다.

이어서 5.5cm x 11cm 크기의 액체 AQPZ 제형을 갖는 TFC 막을 Sterlitech CF042 FO 셀(www.sterlitech.com)에 장착하고 60분(5개 막)의 시험과 900분(4개 막) 지속 시험을 FO 모드에서 피드로 탈이온수(MilliQ)를 드로로 1M NaCl 수용액을 사용하고, 268mL/분의 피드와 드로 속도로 수행하였다.

결과는 표 4에 제공된다.

표 4

[0148] 소포 제형은 RO 저압 막에서 테스트했다.

소포 제형	시료 수	Jw (L/m ² h)	NaCl 배제 (%)	적용 압력 (bar)
	6	7.15 ±0.5	90.5 ±0.1	5

[0149] 실시예 3

[0150] 수제 TFC FO(정삼투) 여과막의 제조

[0151] 이들 막은 요약된 하기 단계에 따라 제조했다.

[0152] a) 지지막(예: 평거형 구조의 5.5cm x 11cm 크기의 PES 부직포)을 제공하는 단계

[0153] b) 3wt% MPD를 3wt% ε-카프로락탐, 0.5wt% NMP 및 93.5wt% 탈이온수와 혼합하여 용액을 얻는 단계

[0154] c) 실시예 1의 0.1mg/mL의 액체 AQPZ 제형을 첨가하여 현탁액을 얻는 단계

[0155] d) c)에서 현탁액을 2시간 동안 배양하는 단계

[0156] e) 0.09wt% TMC, 0.9wt% 아세톤 및 99.01wt% Isopar에서 TMC 용액을 제조하는 단계

[0157] f) 현탁액에 지지막을 30초 동안 딥 코팅하는 단계

[0158] g) 에어 나이프로 건조하는 단계

[0159] h) 계면 중합을 위해 e)로부터의 TMC 용액을 첨가하는 단계

[0160] i) 이어서 흡 후드에서 2분간 건조하는 단계.

[0161] 3개의 막을 제조하고 60분 동안 피드로 500ppm NaCl을 사용하여 5bar에서 작동하는 Sterlitech CF042 RO 셀(www.sterlitech.com)에 장착 하였다.

[0162] 결과는 표 5에 제공된다.

표 5

[0163] 소포 제형은 RO 수제 막에서 테스트했다.

소포 제형	시료 수	Jw (L/m ² h)	Js (gmh)	Js/Jw
	3	10.84 ±1.2	2.03 ±0.2	0.18 ±0.1

[0164] 실시예 4

[0165] FO(정삼투) 막의 제조

[0166] 막형단 단백질의 수용액(상기 제조된 아쿠아포린 Z 원액)을 폴리에테르아민(15mg/mL Jeffamine® M-2005)과 먼저 혼합하여 1/200 AQPZ/중합체 물 단백질 비율의 최종 농도를 수득함으로써 AqpZ를 혼입하는 소포를 제조하였다. 이어서, PEO-PP0-PEO 수용액(PBS 중 분자량이 5800Da인 Pluronic® P-123을 최종 농도 10mg/mL)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 분당 170회전으로 밤새 교반하였다.

[0167] 이렇게 제조한 소포를 다공성 지지체 상에서 계면 중합에 의해 폴리아미드 박막 복합체(TFC) 막에 혼입시켰다. 소포 혼합물(상기 제조된 혼합물 6ml) 및 m-페닐렌디아민 용액(1.5g MPD를 52.5ml MilliQ에 용해시켜 제조)을 포함하는 수용액을 제조하였다. 유기 용액은 0.15% W/V 농도의 트리메소일 클로라이드(TMC) 및 Isopar E로 구성되었다.

[0168] 상술한 바와 같이 코팅 프로토콜은 다공성 지지체를 수용액으로 침지한 후, 과량을 부드럽게 제거하는 것을 포함하였다. 이어서, 유기 용액을 도포하고 폴리아미드 층을 형성하고, 과량의 유기 용액을 부드럽게 건조했다.

막은 시험 전에 밀리-Q 물에 보관했다.

[0169] 소포 특성: K_i 1412s⁻¹, pH 9.83, 제타 전위 -0.339(평균), 크기: 204nm(평균), 100% 모집단. 압출된 소포의 크기(수력학적 지름)는 Malvern의 ZetaSizer NanoZs를 사용하여 동적 광 산란으로 측정했다. AQP 채널을 통한 물 플럭스는 517nm에서 모노크로메이터 및 530nm에서 차단 필터를 사용하여 Bio-Logic SFM 300 정지 유동 장치를 사용하여 시험했다. 각각의 개별 정지 유동 시험에 대해, 0.13ml 압출 폴리머졸 또는 AQP 삽입 폴리머졸을 0.13ml NaCl 0.5M과 빠르게 혼합하여, 소포로부터 물 유출을 일으켜 소포 수축을 초래하였다. 동역학 데이터에 이중 지수 방정식을 적용하고 중합체 막을 통한 물 플럭스와 직접 비례하는 속도 상수(s⁻¹)를 측정하였다.

[0170] 시험은 1M 염을 드로 용액으로 하고 5µM 칼세인을 피드로 하여 정삼투 설정에서 수행되었다. 막의 활성 면이 피드 용액을 향하게 하여 드로 용액과 피드 용액을 역류 식으로 펌핑하였다. 결과는 하기 표 6에 제시되어 있다.

표 6

[0171]

소포 혼입	Jv	Js	칼세인 R	Js/Jv
있음	11,17±1.61	1,23±0.25	99,80 ±0.14	0,14±0.02
없음	4,85±1.02	0,82±0.74	99,85±0.02	0,15±0.10
상업적으로 사용 가능	>10	<3	>99%	<0.3

[0172] AqpZ 단백질을 포함하는 아미노 변형 소포를 포함하는 막은 소포가 없는 막과 비교할 때 성능이 개선되었다. 막을 통한 평균 물 플럭스(Jv)는 84%(Jv=11.17 ± 1.61 Lm⁻²h⁻¹ 대 Jv=4.85 ± 1.02 Lm⁻²h⁻¹) 개선되었으며, 칼세인 (R) 배제는 비슷한 수준(R>99%)에 머물렀다. 소포(Js=1.23 ± 0.25gm⁻²h⁻¹ 대 Js=0.82 ± 0.74 gm⁻²h⁻¹)을 혼입할 때 역염 플럭스(reverse salt flux)는 평균 50% 증가했다. 그럼에도 불구하고 특정 염 플럭스 Js/Jv를 통한 전반적인 성능은 비슷한 수준을 유지했다(소포가 있는 막의 경우 0.14 ± 0.02, 소포가 없는 막의 경우 0.15 ± 0.10).

[0173] 데이터는 아쿠아포린 단백질을 혼입하는 아미노 테크레이티드 소포가 AqpZ 단백질을 폴리ամ이드 막 내에 혼입하는 효율적인 방법이며, 특정 염 플럭스를 손상시키지 않으면서 물 플럭스를 개선한다는 것을 보여준다. 임의의 특정 이론에 구속되기를 원하지 않으면서, 표면에 아민기를 함유하는 소포가 물리적으로 혼입될 뿐만 아니라, 반응성 아민기가 존재하므로 TFC 막의 폴리ամ이드 층에 화학적으로 결합되는 것을 설명할 수 있다. 이들 아민기는 아실 클로라이드와 계면 중합 반응에 참여하여 층에 공유 결합된 소포를 수득한다. 공유 결합은 더 높은 소포 로딩과 이에 따르는 막을 통한 더 높은 물 플럭스 가능성을 열어 준다.

[0174] 실시예 5

[0175] 진공 매개 코팅

[0176] 다공성 지지체는 활성층이 위쪽을 향하고 진공 펌프가 그 아래에 비활성 층을 향한 상태로 흡입 셀에 장착되었다. TFC 층에 사용한 지지체는 Membrana GmbH의 MicroPES 1F PH 미세 다공성 지지체였다. RO 물에 MPD 및 제형 10-2-10을 함유하는 50mL의 수용액을 다공성 지지체를 덮는 흡입 셀에 부었다. 그 후, 100mBar의 흡입을 5분 동안 적용하여 MPD 및 제형을 지지체 위로 흡입했다. 진공을 끄고, TMC 및 Isopar-E를 함유하는 50mL의 유기 용액을 적용하고 1분의 반응 시간을 주어 계면 중합을 촉진시켰다. 이어서, 유기 용액을 씻어내고, 막을 3분 동안 건조한 후 QC 시험 준비가 될 때까지 RO 물을 함유한 페트리 접시로 옮겼다.

[0177] 제형 10-2-10: 10mg/ml Pluronic f127(플록사머 407) - 2mg/ml Jeffamine M2005 - 10mg/ml 아쿠아포린 원액. PBS 완충액 중(137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ 및 2mM의 KH₂PO₄).

표 7

[0178] 진공 매개 코팅에 의한 정삼투 막의 품질 테스트

진공 매개 코팅에 의한 정삼투 막의 품질 테스트 결과 여기서 Jw로 표시된 물 플럭스는 L/m ² h로 측정된다. 여기서 Js로 표시된 염 플럭스는 g/m ² h로 측정된다. 칼세인 배제는 %로 측정된다				
제형	시리즈 1	시리즈 2	시리즈 3	평균 및 표준편차
대조군 - 제형이 없는 수용액	Jw: 1,45 Js: 311,02 100%	Jw: 2,40 Js: 262,98 99,69%	- -	Jw: 1,92 ±0,5 Js: 287 ±24 99,9% ±0,2
2% v/v 제형	Jw: 2,72 Js: 1,39 99,93%	Jw: 2,32 Js:0,48 99,75%	Jw: 2,00 Js: 3,48 99,89%	Jw: 2,35 ±0,3 Js: 1,78 ±1,3 99,9% ±0,1
5% v/v 제형	Jw: 1,69 Js: 0,50 99,95%	Jw: 1,64 Js: 0,34 99,51%	Jw: 1,99 Js: 1,08 99,87%	Jw: 1,77 ±0,2 Js: 0,64 ±0,3 99,8% ±0,2
7% v/v 제형	Jw: 1,38 Js: 0,86 99,76%	Jw: 1,44 Js: 0,40 99,56%	Jw: 1,79 Js: 0,81 99,64%	Jw: 1,54 ±0,2 Js: 0,69 ±0,2 99,7% ±0,1
10% v/v 제형	Jw: 1,98 Js: 1,61 99,82%	Jw: 1,37 Js: 0,83 99,96%	Jw: 2,46 Js: 2,09 99,99%	Jw: 1,94 ±0,4 Js: 1,51 ±0,5 99,9% ±0,1

[0179] 물 플럭스 및 칼세인 배제는 대조군 쿠폰과 실질적으로 다르지 않았지만, 염 플럭스는 제형이 없는 TFC 층으로 코팅된 대조군과 대조적으로 제형을 함유하는 용액으로 코팅된 쿠폰에서 상당히 낮았다. 이는 제형의 존재가 염 플럭스를 감소시켰으며(따라서 염 배제가 증가함)을 나타낸다. 한 학생의 짝을 이루지 않은 t-검정에서는 대조군 막의 염 플럭스와 제형의 p-값이 0.053191(2%) 내지 0.053386(10%)인 염 플럭스를 비교할 때 강한 경향을 보여주었다. 코팅에 사용된 수용액에서 제형의 현명한 농도 증가는 염의 배제 수준에 영향을 미치지 않는 것으로 보였다.

[0180] 실시예 6

[0181] 막형단 단백질을 혼입한 아미노 테코레이티드 소포

[0182] Aquaporin Z를 혼입하는 소포의 제조 방법:

[0183] 1. PBS에 폴리머를 유리 실린더의 최종 농도 10mg/mL로 용해하여 새로운 Pluronic® P-123 용액을 제조하는 단계.

[0184] 2. 플라스크에서 15mg/mL Jeffamine® M-2005 무게를 재는 단계.

[0185] 3. Aquaporin Z 원액을 Jeffamine® M-2005 병에 추가하여 최종 농도 1/200 AQPZ/P-123-Jeffamine 물 단백질 비율을 얻는 단계.

[0186] 4. 단계 1에서 제조한 Pluronic® P-123 용액을 Jeffamine® M-2005와 Aquaporin Z의 혼합물에 첨가하여 9.9mg/mL에 도달하는 단계.

[0187] 5. 실온에서 분당 170회전(20시간 이하)으로 혼합물을 밤새 교반하는 단계.

[0188] 6. 다음날 아침 1~5단계 순서로 얻은 소포 제형을 보관 플라스크로 옮기고 상온으로 유지하는 단계.

[0189] Aquaporin Z를 혼입하지 않는 대조군 소포의 제조 방법:

[0190] 1. PBS에 폴리머를 유리 실린더의 최종 농도 10mg/mL로 용해하여 새로운 Pluronic® P-123 용액을 제조하는 단계.

[0191] 2. 플라스크에서 15mg/mL Jeffamine® M-2005 무게를 재는 단계.

[0192] 3. 단계 1에서 제조한 Pluronic® P-123 용액을 Jeffamine® M-2005의 혼합물에 첨가하여 9.9mg/mL에 도달하는

단계.

- [0193] 4. 실온에서 분당 170회전(20시간 이하)으로 혼합물을 밤새 교반하는 단계.
- [0194] 5. 다음날 아침 1~4단계 순서로 얻은 소포 제형을 보관 플라스크로 옮기고 상온으로 유지하는 단계.
- [0195] 소포 제형을 DLS, 제타 전위 및 0.5M NaCl에서 정지 유동 측정으로 크기, 투수성 및 제타 전위 관점에서 테스트 했다.
- [0196] 소포의 특성:
- [0197] 소포의 크기(수력학적 지름)는 Malvern의 ZetaSizer Nano ZS를 사용하여 동적 광 산란으로 측정했다. 소포 막을 통한 물 플럭스는 517nm에서 모노크로메이터 및 530nm에서 차단 필터를 사용하여 Bio-Logic SFM 300 정지 유동(SF) 장치를 사용하여 시험했다. 각각의 개별 SF 시험에 대해, 0.13ml 폴리머졸 또는 AQP 삽입 폴리머졸 시료를 0.13ml NaCl 0.5M과 빠르게 혼합하여, 소포로부터 물 유출을 일으켜 소포 수축을 초래하였다.

표 8

제형	수력학적 지름(nm) - % 강도		제타 전위 (mV)	pH	삼투 계수 $K_i(s^{-1})$
	모집단 1.	모집단 2.			
Aquaporin Z를 재구성하는 Pluronic [®] 소포	158 ± 63 - 93%	34 ± 8 - 7%	+ 3	9.91	1700
Aquaporin Z이 없는 Pluronic [®] 소포	147 ± 49 - 95%	33 ± 6 - 5%	+ 3	9.92	200

[0199] 표 8은 삼투 계수 K_i 를 보여주며, 이는 Aquaporin Z를 혼입한 소포와 혼입하지 않은 소포에 대한 정지 유동 광 산란 결과의 지수 성장에 기초하여 계산된다. 지수 성장의 분석은 가장 빠른 수축을 보이는 구조의 첫 번째 집단에서 이루어진다. 삼투 계수 $K_i(s^{-1})$ 는 중합체 막을 통한 물 플럭스와 직접 비례하며, 그 결과는 소포 내 아쿠아포린의 존재가 중합체 막을 통한 물 플럭스를 상당히 증가시킨다는 것을 보여준다. 소포의 다른 특성은 아쿠아포린 Z의 존재, 즉 수력학적 지름, 제타 전위 및 pH가 동일한 수준으로 유지됨으로써 실질적으로 영향을 받지 않는다.

[0200] 실시예 7

- [0201] Aquaporin Z를 재구성하는 소포를 포함하는 TFC FO 막의 제조 방법:
- [0202] a) 지지막(예: 평거형 구조의 5.5cm x 11cm 크기의 PES 부직포)을 제공하는 단계
- [0203] b) 2.5%(W/W) 농도를 얻기 위해 MilliQ 물에서 MPD 용액을 제조하는 단계 아쿠아포린을 막에 혼입하려면 소포 용액을 첨가한다. MPD 용액의 최종 농도는 10g/L 내지 100g/L 소포 용액을 함유 할 수 있다.
- [0204] c) 0.15%(W/V)를 얻기 위해 Isopar E에서 TMC 용액을 제조하는 단계
- [0205] d) 막 표면을 완전히 덮기 위해 MPD 용액에 직사각형 막을 담그는 단계
- [0206] e) 직사각형 막을 MPD 용액에서 옮겨 실험실 건조지(예: Kim-Wipe)에서 비활성 면이 되는 면을 5~10초 동안 건조하는 단계
- [0207] f) 막을 유리판 위에 놓고 표면이 윤기가 나는 상태에서 흐릿한 상태가 될 때까지 N2로 부드럽게 건조하는 단계
- [0208] g) 막 가장자리 주위에 테이프를 부착하는 단계(≈1mm)
- [0209] h) 테이프 막이 있는 유리판을 유리 용기에 옮기고 막 표면을 완전히 덮기 위해 TMC 용액으로 막을 덮는 단계
- [0210] i) 저장소에서 유리판을 제거하고 표면이 윤기가 나는 상태에서 흐릿한 상태가 될 때까지 N2로 건조하는 단계
- [0211] j) 약 10초 동안 수평 위치의 유리판에 막을 놓고 테이프를 제거하는 단계

[0212] k) MilliQ로 채워진 첫 번째 용기로 막을 5분간 읊기는 단계

[0213] l) 후속 단계에서 설명된 사전 테스트를 위해 막을 보관을 위해 MilliQ로 채워진 두 번째 용기로 막을 읊기는 단계.

[0214] TFC FO 막 테스트

[0215] 이어서 5.5cm x 11cm 크기의 Aquaporin Z 제형을 갖는 TFC FO 막을 Sterlitech CF042 FO 셀 (www.sterlitech.com)에 장착하고 FO 모드에서 200분의 지속 시험을, 피드로 탈이온수(MilliQ) 내 5 μM 칼세인 및 드로로 1M NaCl 수용액을 사용하고, 268mL/분의 피드와 드로 속도로 수행하였다.

표 9

[0216]

배치 내 막 수	소포	Jv 계산 [Lm ⁻² h ⁻¹]	Js 계산 [gm ⁻² h ⁻¹]	칼세인 배제 [%]	Js/Jv [gL ⁻¹]
1	Aquaporin Z를 혼입한 소포 1%	11.17	1.45	99.88	0.13
2		7.79	1.32	99.78	0.17
3		9.04	1.27	99.61	0.14
4		7.73	0.87	99.91	0.11
1	소포 없음	3.90	0.32	99.84	0.08
2		5.01	0.59	99.84	0.12
3		6.21	1.91	99.86	0.31
4		4.27	0.44	99.87	0.10

[0217] 표 9는 Aquaporin Z 단백질을 혼입한 소포가 혼입된 막 및 소포가 없는 단백질(대조군 막)과의 비교에 의한 FO 실험의 결과를 보여준다. Aquaporin Z를 혼입하는 소포의 혼입에 의해 Jv가 증가하고 Js/Jv가 동일한 수준으로 유지된다고 결론지을 수 있다.