(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월28일
(11) 등록번호 10-1248642
(24) 등록일자 2013년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61M 1/18 (2006.01) *A61M 1/34* (2006.01)
B01D 35/00 (2006.01) *B01D 61/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7000564
(22) 출원일자(국제) 2005년06월09일
심사청구일자 2010년06월09일
(85) 번역문제출일자 2007년01월09일
(65) 공개번호 10-2007-0024716
(43) 공개일자 2007년03월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/020036
(87) 국제공개번호 WO 2005/123952
국제공개일자 2005년12월29일
(30) 우선권주장
60/578,061 2004년06월09일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
JP2651279 B2
WO1998030327 A1
US6544732 B1
전체 청구항 수 : 총 25 항 심사관 : 서대종

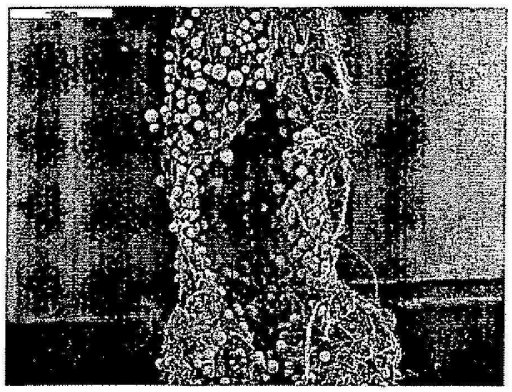
(73) 특허권자
폐써겐 리무벌 앤드 다이어그너스틱 테크널라지스 인코포레이티드
미국 디이 19801, 윌밍턴, 텐스 앤드 킹 스트리츠, 원 로드니 스퀘어, 10층
(72) 발명자
카보넬, 루벤 지.
미국, 노스캐롤라이나 27612, 롤리, 6105 갓프리 드라이브
(74) 대리인
서경민, 서만규

(54) 발명의 명칭 **샘플로부터 목적 약물을 제거하기 위한 다공성 기질 내함침된 입자들**

(57) 요 약

본 발명은 샘플로부터 목적 인자를 제거하기 위한 장치, 시험 키트 및 방법을 제공한다. 상기 장치는 10㎛ 보다 큰 구멍 크기를 갖는 하나 이상의 다공성 매트릭스, 및 그 안에 함침된 다수의 입자들을 포함한다. 상기 목적 인자들은 상기 장치에 부착되어 샘플로부터 제거된다.

대 표 도 - 도3



(30) 우선권주장
60/616,118 2004년10월06일 미국(US)
60/617,669 2004년10월13일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

샘플로부터 적어도 하나의 목적 인자를 필터 및 분리하는 장치에 있어서,

상기 장치를 통한 흐름을 이용하고, 상기 장치가 층 안에 함침되거나 또는 층들 사이로 샌드위치된 다수의 입자와 함께 부착된 다공성 부직포 직물의 제1 층 및 제2 층을 포함하는 수지-포함된 막들의 적층 포함하고, 상기 다공성 부직포 직물이 10㎛-500㎛의 구멍 크기를 가지며, 상기 입자가 40-200 ㎛의 크기이고, 여기서 상기 적어도 하나의 목적 인자가 다공성 부직포 직물, 입자 또는 둘 다에 부착하여 상기 샘플로부터 제거되는 것을 특징으로 하는 샘플로부터 적어도 하나의 목적 인자를 필터 및 분리하는 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 흐름이 중량 또는 펌프 장치를 통해 유도되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 장치가 하나 이상의 부직포 직물의 단일층을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 장치가 다공성 부직포 직물의 1 내지 25 단일층, 이어서 수지-포함된 막들의 1 내지 50 층, 이어서 다공성 부직포 직물의 1 내지 25 단일층 을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 적층들이 함께 용접되어지는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 적층들이 플라스틱 케이싱에 조립되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 다공성 부직포 직물이 천연 섬유, 합성 섬유 또는 둘 다를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 다공성 부직포 직물이 폴리프로필렌 또는 폴리에스테르 섬유를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 입자가 다공성, 비다공성 또는 둘 다인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 다공성 부직포 직물, 입자 또는 둘 다 균일하거나 또는 다양한 구멍 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 입자들이 0.001 ㎛~0.1 ㎛의 구멍 크기를 가지는 다공성 입자인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 입자가 1-2m^2/건식 수지g 내지 300m^2/건식 수지g 범위의 표면적을 갖는 상호연결된 구멍을 가지는 다공성 수지를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 입자들은 폴리메타크릴레이트, 메타크릴레이트 수지, 변성된 수지 또는 그의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 변성된 수지는 하기의 화학식으로 표시되고, 프라이머리 아민기에 말단화된 친수성 스페이스 사슬로 유도체화된 다공성 입자화된 메타크릴레이트 수지를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

$HW\text{-}65\text{-}O\text{-}R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}NH_2$

(리간드 밀도는 100㎛ol/mL이고, R은 수산기를 가진 지방족기(hydroxylated aliphaticgroup)이고, 상기 HW-65는 65㎛의 입자크기 및 1000 Å의 구멍 크기를 갖는 메타크릴레이트 입자이다.)

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 입자가 단섬유인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 단섬유가 1~20 ㎛ 이상의 길이 대 직경 비를 갖는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 목적 인자가 상기 입자, 다공성 부직포 직물 또는 둘 다에 흡수, 흡착, 이온 교환, 공유결합, 소수성, 친화성 상호작용, 하전된 종의 형성, 친화성 리간드의 부착 또는 이의 혼합방법을 통해 부착되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 다공성 부직포 섬유, 입자 또는 둘 다가 목적 인자와 상호 작용하고 결합하는 반응적 기능기로 하나 이상의 내부 표면, 외부 표면 또는 둘 다가 기능화된 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 적어도 하나의 반응적 기능기가 에폭시, 포르밀, 트레실, 히드록시숙시닌이미드 에스테르, 술폰산, 4차 아민, 카르복실기, 1차 아민, 시아노, 시클로헥실, 옥틸 및 옥타데실기, 에폭시드, 옥시레인(oxirane), N-히드록시숙시닌이미드 에스테르, 술포닐 에스테르, 이미다졸릴, 카바메이트, 4차 아민, 카르복실기, 염료 리간드, 친화성 리간드, 항원-항체, 핵산 분자, 이온교환, 킬레이션, 산화/환원반응, 입체적 배제 반응, 촉매반응, 소수성 반응, 또는 역상(reverse phase)용 반응적 기능기, 또는 그의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 입자가 변성된 수지를 포함하고, 상기 다공성 부직포 직물이 플라즈마 처리된 폴리프로필렌을 포함하며, 상기 반응적 기능기가 프라이머리 아민(primary amine) 및 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 친수성 스페이서를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 샘플이 혈액 샘플이고, 적어도 하나 이상의 목적 인자가 프리온, 바이러스, 박테리아, 원생동물 및 독소 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 22

(a) 입자를 다공성 부직포 직물의 제1 층에 확산시키는 단계, (b) 상기 제1 층 위로 다공성 부직포 직물의 제2 층을 놓는 단계, 및 (c) 캘린더 롤을 통과시켜 결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항의 장치를 제조하는 방법.

청구항 23

(a) 하나 이상의 목적 인자를 잠재적으로 포함하는 샘플을 제공하는 단계;

(b) 그 안에 함침되거나 또는 그 사이에 샌드위치된 다수의 입자와 함께 결합된 다공성 부직포 직물의 제1 층 및 제2 층을 포함하는 수지-포함된 막들의 적층을 포함하는 장치를 제공하는 단계, 상기 다공성 부직포 직물이 10㎛-500㎛의 구멍 크기를 가지고, 상기 입자가 40-200㎛의 크기를 가지며;

(c) 상기 샘플을 장치에 적용하는 단계;

(d) 상기 입자에 적어도 하나 이상의 목적 인자를 부착하는 단계; 및

(e) 샘플로부터 적어도 하나 이상의 목적 인자를 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 샘플에서 적어도 하나 이상의 목적 인자를 분리하는 방법.

청구항 24

(i) 하나 이상의 완충액, 시약, 화학적 약제, 기능화제, 효소, 검출제, 대조 물질을 포함하는 용기, (ii) 시험 키트의 사용 설명서, 및 (iii) 포장재 중에서 하나 이상; 및 제1항의 장치를 포함하는 것을 특징으로 하는 목적물 분리 및 샘플 정제용 시험 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 검출제가 여러 가지 효소, 배합군(prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질, 생물적발광 물질, 방사성 물질, 분산염료, 금입자 또는 그의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 시험 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2004년 10월 13일에 출원된 미국 임시출원 제60/617,669호, 2004년 10월 6일에 출원된 미국 임시출원 제60/616,118호, 2004년 6월 9일에 출원된 미국 임시출원 제60/578,061호에 기초하여 미국특허법 제119(e)(37 U.S.A. §119(e))에 따른 이익을 주장하며, 그의 전체 내용은 본 발명에 참조로서 통합된다.

[0002] 본 발명은 샘플로부터 목적 인자을 제거하는 방법 및 장치에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생물학적 샘플로부터 병원체(pathogens)를 제거하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 생물학적 종들의 고체 지지체(solid supports)에 대한 흡착 방법으로 다성분 흥수(multicomponents stream)로부터 목적 분자들을 정제, 검출 및 제거하는 많은 응용분야들이 발견되었다. 예를 들어, 이온교환, 소수성 및 친화성(affinity) 리간드들은 크로마토그래피 지지체에 우선하여 많은 시약들을 흡착하여 수용액으로부터 그들을 분리하는데 영향을 미칠 수 있다. 한번 흡착되면, 상기 생물학적 약제는 생성물로서 용리되거나 ELISA 또는 다른 분석 연구에 의해 검출될 수 있다.

[0004] 몇 가지 예에서, 목적하는 생물학적 약제를 포함하는 용액은 또한 적혈구(red blood cells), 박테리아, 리포솜(liposome), 백혈구(leukocyte) 및 여러가지 크기의 응집체와같은 큰 엔티티(entities)들을 포함한다. 이들 많은 예에서, 커다란 응집체들을 지지체에 결합하는 목적 생물학적 약제의 능력을 방해하지 않고서 상기 고체 매트릭스 또는 지지체를 통해 흘러가게 할 수 있는 것이 바람직하다. 따라서, 고체 매트릭스 내에는 커다란 엔티티의 흐름을 수용할만큼 큰 구멍 공간(pore space)이 필요하다. 불행하게도, 커다란 구멍 공간은 작은 표면적을 가져 목적 인자에 결합하는 고체 매트릭스의 용량을 제한할 수 있다.

[0005] 다른 경우에서, 더 작은 목적 인자들을 흡착적으로 분리하기에 용이하게 하도록 커다란 입자들을 실질적으로 여과하는 것이 바람직하다. 한 실시예는 세포외 생성물(extracellular product)을 회수하기 위하여 배양 배지로부터 세포들을 제거하는 것이다.

[0006] 게다가, 매우 큰 생물학적 엔티티들을 여과보다는 결합하는 것이 바람직한 예들이 많다. 예를 들어, 생물학적 약제의 혼합물로부터 감염성 프리온(infective prion), 바이러스, 박테리아, 및 독소(toxin)들을 포함하

는 많은 병원체들을 특이적으로 흡착하는 것이 중요하다. 이들 엔티티들은 현재 이용가능한 샘플 정제 및 분리 장치에서는 결합에 필요한 작은 구멍들에 접근하는데 어려움이 있다.

[0007] 용융된 갈색 폴리머 섬유 또는 스펀본드 직물(spunbonded webs)로도 알려진, 부직포(nonwoven) 섬유 또는 피륙(web)이 또한 알려져 있으며 공기 및 수용액으로부터 미세 입자들을 여과 및 분리하는데 사용된다(예를 들어 U.S. 특허 제4,011,067호 및 제4,604,203호 참조, 각각은 본 발명에 참조로서 전체적으로 통합된다). 부직포 피륙에 흡착적 입자들의 부하(loading) 또한 종래기술로서 알려져 있다(미국특허 제4,433,024호; 제4,797,318호 및 제4,957,943호 참조, 이들 각각은 참조로서 여기에 전체적으로 통합되어 있다.) 입자 및 기체 오염물을 제거하기 위한 호흡면(respiratory surface), 보호복(protective garment), 용액 체류 제품(fluid retaining articles), 및 오일용 와이퍼를 포함하는 여러가지로 응용될 수 있다.

[0008] 가장 최근에는 정제 및 분리용 입자 함침된 부직포 직물(particle impregnated nonwoven fabrics)의 제조가 보고되었다. 예를 들어 미국특허 제5,328,758호는 여기 참조로서 전체적으로 통합되었다. 본 특허는 친화성 리간드 부착용 기능성 입자들을 개시하고 있다. 상기 입자들이 용융 브로우 단계(melt blowing stage) 동안 폴리머 섬유로 블로우된 것이 개시되어 있다. 상기 부직포 직물은 0.24~10㎛, 바람직하게는 0.5~5㎛의 구멍 크기를 갖는 구멍들을 포함한다. 상기 함침포(impregranated fabric) 재료는 적어도 2초의 거리 타임(Gurley Time)을 가져야만 한다.

[0009] 국제특허공보 제WO93/01880는 0.01㎛ 보다 작은 섬유 직경과 1~50㎛의 길이를 갖는 수많은 작은 섬유 조각들의 덩어리와, 3~15㎜의 평균길이를 갖는 회전가능하고 직조가능한 짧은 섬유를 함께 배지에 분산시켜 제조한 백혈구-제거 부직포 직물 필터 재료를 개시하고 있다. 미국특허 제4,550,123호 및 제4,342,811호 각각은 전체적으로 본 발명에 참조로서 통합되어 있으며, 미세 다공성 폴리머 섬유 및 필름에 대해 기술하고 있으며, 이들은 증기, 액체 및 용질을 흡수할 수 있는 입자들을 포함하고 있다. 전형적인 흡수제 입자들은 활성 탄소, 실리카겔 및 분자 필터형 물질들을 포함한다.

[0010] 여기 기술된 본 발명은 선행기술의 장치보다 시간 및 비용을 줄이면서도 효율과 특이성을 증가시킨, 샘플로부터 목적 인자를 정제, 검출 및 제거하는 장치 및 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0011] **III. 발명의 요약**

[0012] 본 발명은 샘플로부터 목적 인자를 제거하는 방법, 장치 및 키트(kit)를 제공한다.

[0013] 제1 양태에서, 본 발명은 샘플로부터 적어도 하나의 목적 인자를 분리하는 장치를 제공한다. 상기 장치는 10㎛ 보다 큰 구멍 크기를 갖는 하나 이상의 다공성 매트릭스를 포함하며, 여기서 적어도 하나의 목적 인자는 하나 이상의 다공성 매트릭스, 입자, 또는 둘 다에 부착하여 샘플로부터 제거된다. 한 실시예에서, 상기 다공성 매트릭스, 입자 또는 둘 다는 균일하거나 다양한 구멍 크기를 갖는다. 또 다른 실시예에서, 상기 입자들은 약 0.001~0.1㎛의 구멍 크기를 갖는다. 또 다른 실시예에서, 상기 입자들은 1~2m^2/건식 수지(dried resin)g ~ 300 m^2/건식 수지g의 표면적을 갖는 서로 연결된 구멍들을 갖는 다공성 수지를 포함한다.

[0014] 또 다른 실시예에서, 상기 다공성 매트릭스는 천연 섬유, 합성 섬유 또는 둘다를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 상기 다공성 매트릭스는 적어도 하나의 부직포 직물을 포함한다. 또 다른 실시예에서 상기 다공성 매트릭스는 같거나 다른 타입의 직포 및/또는 부직포 직물의 혼합이다.

[0015] 또 다른 실시예에서, 청구항 1의 장치는, 그 입자들이 폴리메타크릴레이트, 메타크릴레이트 수지, 변성된 수지(modified resin), 또는 그의 혼합을 포함한다.

[0016] 또 다른 실시예에서, 상기 장치는 변성된 수지를 포함하며 하나 이상의 다공성 매트릭스는, 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 친수성 스페이서(hydrophilic spacer) 및 프라이머리 아민(primary amine)를 갖는 리간드를 포함하는 반응적 기능기(reactive group)로 기능화된 플라스마 처리된 폴리프로필렌을 포함한다.

[0017] 또 다른 실시예에서, 입자들은 하나 이상의 다공성 매트릭스들 사이에 샌드위치되어 있다.

[0018] 하나의 실시예에서, 상기 입자들, 상기 다공성 매트릭스 또는 둘 다는 하나 이상의 반응적 기능기로 기능화되어 있다. 상기 목적 인자들은, 흡수, 흡착, 이온교환, 공유결합, 소수성, 이중극자(dipole), 사중극자(quadrupole), 수소결합, 특이적 상호작용, 전하된 종의 형성을 통해, 특이적 리간드에 대한 친화성 상호작용,

또는 그의 결합을 통해, 입자, 다공성 매트릭스 또는 둘 다에 부착되어 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 입자들은, 예시의 방법으로 이에 제한되지는 않지만, FRACTOGEL ™ 등, TOYOPEARL ™, TSK-GEL™ 폴리머 매트릭스를 포함하는 폴리메타크릴레이트 또는 메타크릴레이트 수지이다. 또 다른 실시예에서, 상기 수지는 예를 들어 아미노 650U, 아미노 650 M 또는 아미노 650M 또는 아미노 650U의 부분적으로 아세틸화된 것을 포함하는 TOYOPEARL ™,아미노 650이다. 부분적으로 아세틸화된 수지는 약 5%~95% 또는 그 이상 아세틸화된 수지를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 부분적으로 아세틸화된 수지는 약 10%~85% 아세틸화된 수지를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 부분적으로 아세틸화된 수지는 약 20%~75% 아세틸화된 수지를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 부분적으로 아세틸화된 수지는 약 30%~60% 아세틸화된 수지를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 부분적으로 아세틸화된 수지는 약 40%~60% 아세틸화된 수지를 포함한다. 여기서 그러한 특정 범위를 설명함에 있어서, 언급된 범위들은 또한 그 언급된 범위들 사이의 모든 구체적인 정수 함량을 다 포함하는 것이다. 예를 들어 약 40~60%의 범위에서는 실제로 각각의 상세한 범위를 함께 설명하지 않는다 하여도, 45%, 50%, 55%, 57% 등을 포함하는 것을 말한다. 또 다른 실시예에서, 상기 수지는 습식 수지(wet resin)(즉, 완전히 수화됨), 건식 수지(즉, 샘플과 접촉전에 사전 수화되지 않음, 및/또는 샘플과 접촉전에 수화되었으나 사전 건조됨)를 포함한다. 부분적으로 아세틸화된 건식 및/또는 습식 수지의 사용은 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 장치는 목적 인자를 흡착할 수 있는 능력을 갖는 기능화된 다공성 부직포 또는 직포 매트릭스를 포함한다. 하나의 실시예에서, 상기 장치는 다공성 매트릭스 뿐만 아니라 비다공성 매트릭스를 포함하며, 그러한 매트릭스의 하나 또는 둘 다는 기능화되어 있을 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 다공성 매트릭스는 10㎛보다 큰 크기의 균일하거나 다양한 구멍을 포함한다.

[0020] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 샘플로부터 적어도 하나의 목적 인자를 분리하는 방법을 제공한다; (a) 하나 이상의 목적 인자를 잠재적으로 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) (i) 10㎛ 보다 큰 크기의 구멍을 갖는 하나 이상의 다공성 매트릭스, 및 (ii) 다공성 매트릭스에 함침된 다수의 입자들을 포함하는 장치를 제공하며, 여기서 상기 입자들은 적어도 하나의 목적 인자를 부착할 수 있는 능력을 갖는, 상기 장치를 제공하는 단계; (c) 상기 샘플을 장치에 적용시키는 단계; (d)적어도 하나의 목적 인자를 입자, 하나 이상의 다공성 매트릭스 또는 둘 다에 부착시키는 단계; 및 (e) 상기 샘플로부터 적어도 하나의 목적 인자를 분리시키는 단계.

[0021] 다른 양태로서, 본 발명은, (i) 10㎛ 보다 큰 크기의 구멍을 갖고, 그안에 다수의 입자들이 함침된 다공성 매트릭스를 포함하는 장치, (ii) 완충액, 시약, 화학적 약물, 기능화 시약, 효소, 검출제, 대조물질(control materials)을 하나 이상 포함하는 용기, (iii) 시험 키트 사용 설명서, 및 (iv) 포장재를 하나 이상 포함하는 목적 분리, 검출 및 샘플 정제용 시험 키트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에서는 다음 도면 및 본 발명의 설명, 및 청구범위, 공지된 기술에 따라서 당업자에게 명백할 것이다.

실 시 예

[0032] **V. 발명의 상세한 설명**

[0033] 샘플로부터 목적 분자를 효율적으로 분리하기 위한 방법, 장치 및 키트를 여기에 기술한다. 본 발명의 방법, 키트 및 장치는 세포로부터의 발현된 유전자 산물의 정제, 분리, 및 가공, 생물학적약제의 생성 및 전달, 및 예후(prognostic), 진단, 및/또는 검출 응용들을 포함하는 여러 가지 응용분야에서 유용하다. 여기 기술된 본 발명은 샘플의 다른 성분들을 분리하고, 목적 인자와 결합하는 커다란 표면을 제공하면서 장치를 통해 커다란 종들을 흐르게 하는 새로운 장치를 규정한다.

[0034] 본 발명의 특별한 응용은 프리온, 바이러스, 곰팡이, 세균 및 독소와 같은 병원체(pathegen)를 생물학적 샘플, 예를 들어 전혈, 적혈구 세포 함유 조성물, 적혈구 세포 농축액(red blood cell concentrate), 혈소판 농축액(platelet concentrate), 플라스마, 플라스마 유도체, 백혈구, 백혈구 제거된 혈액(leukodepleted blood), 포유류 세포 배양, 발효 액체 배지(fermentation broth) 및 생물학적약제학의 제조 및 전달을 위해 사용된 다른 배지로부터 제거하는 것과 관련이 있다.

[0035] **1. 정의**

[0036] 본 출원에서 사용된 정의들은 설명을 위한 것이며 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다.

[0037] 여기서 사용된 것처럼, "변성된 수지(modified resin)"는 본 발명의 범위 내에서 폭넓게 정의되며 기능기를 갖거나 갖지 않은 수지의 유사물, 변이체 및 기능적 유도체를 포함한다. 상기 변성은 예를 들어, 화학적 엔티티(예를 들어 아미노산)을 특정 수지, 또는 그의 기능기, 또는 둘 다에 치환, 결실 또는 첨가하는 것을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 치환, 아세틸화, 및/또는 수지의 부분적 아세틸화가 변성된 수지의 정의에 포함된다.

[0038] 여기에 사용된 것으로서, "목적 인자(target agent)"는 본 발명의 범위에 폭넓게 정의되며, 본 발명의 장치에 의해 포획되는 화학적, 생물학적 또는 물리학적 인자들을 포함한다. 목적인자는 그 중에서도 분자, 화합물, 세포 구성물, 소기관(organelle), 응집체(aggregate), 독소, 프리온, 및 바이러스, 세균, 곰팡이, 및 원생동물(protozoa)을 포함하는 병원체와 같은 미생물을 포함한다. 목적 분자들은 또한 폴리뉴클레오티드 분자들, 예를 들어, DNA, RNA, DNA-RNA 하이드리드, 안티센스(antisense RNA), cDNA, 게놈 DNA, mRNA, 리보자임(ribozyme), 자연, 합성 또는 재조합 핵산 분자, 올리고펩티드, 올리고뉴클레오티드, 펩티드, 펩티드-핵산 하이브리드, 항원, 항체, 항체 단편(antibody fragment), vWF:FVIII와 같은 커다란 단백질 및 응집체, 및 HDL과 같은 폴리머 분자들을 무엇보다 포함한다.

[0039] 여기서 사용된, 용어 "병원체(pathoen)"은 혈액 샘플과 같은 생물학적 샘플에서 발견되거나 감염시킬 수 있는 복제가능한 인자들을 의미한다. 그러한 병원체는 일반적으로 전혈 또는 혈액 구성성분 내에 발견되거나 감염시키는 것으로당업자에게 알려진 여러 가지 바이러스, 세균, 원생동물(protozoa), 및 기생충 및 아직 알려지지 않은 다른 병원성 오염물을 포함한다. 그러한 병원체의 설명적 예시는, 이에 한정되지는 않지만, 연쇄상구균 종(*Streptococcus* species), 대장균종(*Escherichia* species) 및 바실리우스 종(*Bacillus* species)와 같은 세균; HIV 바이러스(human immunodeficiency virus) 및 다른 레트로바이러스, 허피스 바이러스(herpes virus), 파라믹소바이러스(*paramyxovirus*), 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 간염 바이러스(hepatitis viruses)(감염 A, 감염 B 및 감염 C 바이러스를 포함), 폭스바이러스(pox virus) 및 토가 바이러스(toga virous)와 같은 바이러스; 열원충(plasmodium species)를 포함하는 말라리아 기생충, 및 파동편모충(trypanosomal parasite)과 같은 기생충을 포함한다.

[0040] 여기 사용된 것으로 "샘플"은 본 발명의 방법 및 장치에 의해 포획될 수 있는 목적 인자를 포함하는 것이라면 어느 샘플이든 포함한다. 샘플들은 목적 인자를 잠재적으로 포함하는 어떠한 공급원으로부터 얻어질 수도 있다. 그러한 공급원들은 동물, 식물, 토양, 공기, 물, 곰팡이, 세균, 및 박테리아들이 그중에서 특히 포함된다. 동물 샘플들은 예를 들어, 그중에서도 특히 조직 생검(tissue biopsy), 혈액, 머리카락, 볼 스크레이프(buccal scrape), 플라스마, 혈청(serum), 피부, 복수(ascite), 다수 삼출물(plural effusion), 흉강천자액(thoracentesis fluid), 척수액(spinal fluid), 림프액(lymph fluid), 골수(bone marrow), 호흡성액(respiratory fluid), 장액(intestinal fluid), 생식액(genital fluid), 대변, 소변, 가래, 눈물, 침, 종양, 기관, 조직, 시험관 내 세포 배양 구성분의 샘플, 태아 세포, 태반 세포 또는 양수세포 및/또는 양수로부터 얻어진다.

[0041] 여기 사용된 "세포 배양 배지"는 예를 들어, 세균, 이스트 및 다른 미생물 세포 배양 배지, 포유류 세포 배양 배지, 식물 세포 배양, 및 곤충 배양, 발효 액체 배지 및 생물학적약제의 제조 및 전달에 사용되는 다른 배지와 같은 진핵 또는 원핵 배양 배지 및 치료제제(preparation of therapeutic)를 포함한다.

[0042] 여기 사용된 "혈액 샘플"은 예를 들지만 제한하는 것은 아니며, 다른 혈액 샘플들 중에서 특히, 전혈(whole blood), 적혈구 세포-함유 조성물(예를 들어, 적혈구 농축액 및 혈소판 농축액), 백혈구, 및 백혈구 혈액, 혈액 응고인자, 효소, 알부민, 플라스미노겐(plasminogen), 및 면역글로블린과 같은 혈액 단백질; 및 플라스마(plasma), 플라스마 유도체, 및 플라스마-함유 조성물을 포함한다.

[0043] 여기 사용된 것으로, 상기 용어 "적혈구-함유 조성물"은 전혈, 적혈구 농축액 및 적혈구를 포함하는 다른 조성물을 의미한다. 적혈구 세포외에, 상기 조성물은 또한, ARC-8, 뉴트리셀(Nutricell)(AS-3), ADSOL(AS-1), 옵티솔(Optisol)(AS-5) 또는 RAS-2(에리트로솔:Erythrosol)과 같은 생물학적으로 허용가능한 용액, 및 하나 이상의 세포 혈액 성분, 하나 이상의 혈액 단백질, 또는 하나 이상의 세포 혈액 성분 및/또는 하나 이상의 혈액 단백질의 혼합물을 포함할 수 있다. 그러한 조성물들은 또한 플라스마와 같은 액상 혈액 성분을 포함할 수도 있다.

[0044] 여기 사용된 "입자"는 1~200㎛ 이상의 직경을 갖는 유기 또는 무기의 다공성 또는 비다공성 형태를 의미하며, 이들은 예를 들지만 한정하는 것은 아니며, 과립(granule), 구슬(bead), 수지 또는 분말과 같은 흡착 입자들외에 약 1~20㎛ 이상의 길이 대 직경 비를 갖는 섬유를 포함한다.

[0045] 여기 사용된 "흡수(sorbent)", "흡착적(sorptive) 또는 "흡착(sorption)은 흡수 또는 흡착에 의해 잡고 유지할 수 있는 것을 의미한다.

[0046] 여기 사용된, "부착(attachment)"은 본 발명의 범위 내에서 폭 넓게 정의되는 것으로 두 개의 엔티티들 사이의 물리적, 화학적 또는 생물학적 결합 과정의 어떠한 형태도 포함하며, 예를 들지만 한정하는 것은 아니며, 흡수, 흡착, 공유결합, 이온 교환, 소수성, 수소결합, 이중극자, 사중극자 또는 친화성 상호작용, 하전된 종들의 형성, 친화성 리간드의 부착(예를 들어, 펩티드, 올리고뉴클레오티드, 단백질, 스페이서 암(spacer arm), 소수성 모이어티, 불소화된 재료를 포함)을 포함한다.

[0047] 여기서, "스파이크 용액(spiked solution)"은 소정량의 목적 단백질, 독소, 바이러스, 세균 또는 다른 유기물을 순수하게, 부분적으로 정제되거나 조형태(crude form)로 수용한 용액을 의미한다.

[0048] **2. 다공성 매트릭스**

[0049] 본 발명의 장치는 그 안에 함침된 입자들을 갖는 다공성 매트릭스를 포함한다. 다공성 매트릭스의 선택은 본 발명의 범위 내에서 폭넓게 다양할 수 있다. 유용한 매트릭스는 직포 및 부직포 직물(섬유성 피륙: fibrous webs), 미세다공 섬유, 및 미세다공막을 포함한다. 이들 섬유들은 용융 블로우, 스핀바인딩(spinbonding), 및 전자스핀(electrospinning)을 포함하는, 종래 기술로 잘 알려진 어떠한 재료 및 방법으로도 만들어질 수 있다.

[0050] 섬유성 피륙은 특히 그러한 피륙이 커다란 표면적을 제공하고 제조가 용이한 바람직한 부직포 직물성 피륙을 사용하며, 낮은 제조단가, 및 섬유성 직물 및 섬유 밀도를 다양하게 변화시킬 수 있기 때문에 특히 바람직하다. 예를 들어 0.05~50㎛으로 폭넓고 다양한 섬유 직경을, 본 발명의 장치를 제조하는데 사용된다. 매트릭스 두께는 장치의 원하는 용도에 맞추어, 예를 들어 0.1㎛~100cm 두께 이상으로 변화시킬 수 있다. 상기 매트릭스는 단일 시트의 형태로 사용되거나 원하는 흡착 능력을 얻도록 적층된 형태로 사용될 수 있다. 한 실시예에서 다공성 매트릭스의 캘린더 또는 가압은 원하는 두께 또는 구멍 크기를 얻기 위해 필요하다. 본 발명 장치의 다공성 매트릭스는, 원하는 응용분야에 적용하기 위하여 다공성 매트릭스의 정확한 물리적 및 화학적 성질에 따라 다양한 천연 및 합성 섬유로 만들어진다. 본 발명의 다공성 매트릭스는 예를 들어 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 레이온, 아라미드(aramid), 및 또는 목화(cotton)을 포함하는 천연 또는 합성 공급원으로부터 선택된다.

[0051] 본 발명의 범위에는 다른 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 두 개 이상의 다른 매트릭스를 사용하는 것이 포함된다. 본 발명의 한 실시예에서, 다공성 매트릭스는 같거나 다른 직포 및/또는 부직포 직물의 두 개 이상의 혼방이다. 또 다른 실시예에서, 다른 구멍 크기의 두 개 이상의 다공성 매트릭스의 하이브리드가 사용되며, 더 작은 구멍 크기를 갖는 하나의 매트릭스는 더 작은 물질을 포획하도록 작용하고, 더 큰 구멍 크기를 갖는 다른 매트릭스는 더 큰 물질(예를 들어 백혈구)를 위한 필터로 작용한다. 다른 실시예에서, 소정의 구멍 크기를 갖는 친화성 분리용 기능화된 다공성 매트릭스는 지지체로서 다른 막 내에 위치한다.

[0052] **2.1. 부직포 직물(Nonwoven Fabrics)**

[0053] 부직포 직물는 무작위적 섬유성 피륙으로, 기계적, 습식 또는 에어레이법(air-laid means)으로 형성되며 단면을 통해 상호연결 개구 면적(interconnecting open area)를 갖는다. 부직포 직물은 통상 평편한 다공성 시트로서, 별도 섬유 또는 용융 플라스틱 또는 플라스틱 필름으로부터 직접 제조된다. 이들 직물들은 예를 들어 접착적 결합을 포함하는 여러 가지 다양한 기술을 사용하여 기계적, 열적 또는 화학적으로 섬유 또는 실의 얽힘 또는 필름의 천공(perforating film), 천자(needling) 또는 유체분류(fluid jet)에 의한 기계적 연동, 얽힘, 열적 결합, 및 봉합(stitch)에 의해 서로 결합된 시트 또는 피륙 구조물로 폭넓게 정의된다.

[0054] 전형적으로 부직포 직물은 1~500㎛의 평균 구멍 흐름(mean pore flow:MPF) 직경을 갖는다. 한 실시예에서 다공성 매트릭스는 적어도 10㎛ 구멍 크기를 갖는다. 바람직한 실시예에서 다공성 매트릭스는 10㎛ 이상의 구멍 크기를 갖는다. 더 바람직한 실시예에서 다공성 매트릭스는 15㎛ 이상의 구멍 크기를 갖는다. 그러한 구체적인 수치값의 설명에서, 상기 값들은 또한 상기 설명된 값들 사이의 구체적인 정수값 모두를 포함한다. 예를 들어 10㎛ 이상은 각각의 구체적인 범위에 대하여 실질적인 언급 없이도 12, 20, 30, 45, 70, 100, 200, 300, 400 및 500㎛ 등을 포함하는 것을 의미한다.

[0055] 상기 섬유의 평균 구멍 직경은 생물학적 혼합물에서 커다란 응집체가 흐르는데 필요한 구멍 직경에 대응하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 적혈구 세포에서, 구멍 흐름 직경은 약 12㎛ 정도일 것이다. 이러한 경우에, 12㎛ 이상의 직경을 갖는 다공성 또는 비다공성 입자들은 상기 섬유들 사이의 공간에 붙잡힐 것이며 입자들은 여전히 목적 종들의 흡착에 사용될 수 있다. 결과로서, 매우 작은 직경의 입자들이 흡착에 사용되는 동안 더 구멍 공간

들을 통해 더 큰 종들이 흐를 수 있게 된다.

[0056] 부직포 직물들은 제조 방법에 따라 예를 들어 약 0.01~10㎛ 의 직경을 갖는 섬유로 만들어진다. 상기 섬유들은 천연 섬유 및 합성 섬유를 포함하는 다양한 범위의 물질들로 이루어진다. 천연 섬유들은 다른 것들보다 특히 예를 들어 셀룰로오스, 목화 및 울을 포함한다. 합성 섬유는 폴리프로필렌 및 폴리에스테르(PET, 폴리에틸렌 테레프탈레이트)와 같은 일반적인 폴리머를 포함한다. 적당한 폴리머들은 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌과 같은 폴리알킬렌, 폴리비닐클로라이드, 여러 가지 나일론과 같은 폴리아미드, 폴리스티렌, 폴리아릴술폰, 폴리비닐 알콜, 폴리부틸렌, 에틸비닐아세테이트, 폴리메틸 메타크릴레이트와 같은 폴리아크릴레이트, 폴리카보네이트, 셀룰로오스아세테이트 부티레이트(butyrate)와 같은 셀룰로오스계, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트)와 같은 폴리에스테르, 폴리이미드, 및 폴리에테르 폴리우레탄과 같은 폴리우레탄, 및 그의 혼합물을 포함한다.

[0057] 부직포 직물들은 또한 폴리에스테르 및 폴리알킬렌과 같은 공압출 폴리머(co-extruded polymer)의 결합으로부터 제조될 수 있다. 상술된 폴리머의 모노머의 코폴리머들 또한 본 발명의 범위내에 포함된다. 추가적으로 부직포 직물들은 미세 섬유 및 권축인조섬유(crimped staple fiber)의 친밀혼방(intimate blend)인 혼합 피륙들이다. 한 실시예에서, 본 발명 장치의 부직포 직물은 또한 미국 특허 제4,433,024호(전체적으로 본 발명에 통합됨)에 기술된 것처럼, 섬유의 한면 또는 양면에 라미네이트된 투과성 지지체 직물이며, 또한 추가적으로 보강섬유를 포함한다.

[0058] 부직포 직물들은 용융 블로우(meltblowing) 및 스핀바인딩(spinbinding)을 포함하여 다른 방법으로 제조된다. 부직포 직물들을 함께 결합시키는 몇 가지 기계적 접근법이 있으며, 예를 들어 막들을 초음파 커터/접착기(sealer) 사용 또는 프레스를 사용하여 열과 압력을 동시에 가하여 함께 용접한다. 건식(dry-laid) 부직포는 섬유층들을 포함하며 각 층은 무작위적으로 위치하거나 평행한 섬유를 포함한다. 접착제나 열로 결합하는 것은 건식 부직포 직물에 필요하다. 습식(wet-laid) 부직포 직물은 물 슬러리로부터 섬유 침작으로 층형성된 무작위적 배열의 층상 섬유를 포함하는 종이류 부직포(paper-like nonwoven)이다. 바늘구멍난(needlepunched) 부직포 직물는 구성된 섬유의 얽힘 조건에 따라 특징되며, 이러한 얽힘은 열, 습기 및 교반을 섬유성 피륙에 적용시킨 결과이다. 스펀레이스 부직포(spunlaced nonwoven) 섬유는 고속 워터젯(water jet)(또한 물얽힘(hydroentanglement)라 불리는 과정)의 작용으로 얽혀진 섬유를 갖는다.

[0059] **3. 입자들**

[0060] 제1 양태에서, 본 발명의 장치는 다공성 매트릭스뿐만 아니라 입자들을 포함한다. 입자들은 목적 인자에 부착하는 능력을 갖는다. 상기 입자들은 다공성, 비다공성 또는 둘 다이다. 한 실시예에서, 상기 다공성 입자들은 목적 인자를 흡수 또는 흡착할 수 있는 흡수성 입자들이다. 상기 입자들은 하나의 물질 또는 둘 이상의 물질의 혼합이며, 이러한 물질들은 유기 유동액 또는 수용성 유동액에서 비팽창 또는 팽창가능하며 실질적으로 물 또는 유동액에서 불용성이다. 넓은 범위 내에 속하는 둘 이상의 입자크기의 입자들을 사용하는 몇 가지 예에서 이점을 발견하였다.

[0061] 입자들의 크기 및 형태는 본 발명의 범위 내에서 광범위하게 변할 수 있으며 그러한 입자들이 통합된 다공성 매트릭스 지지체의 형태에 따라 어느정도 연관이 있다. 예를 들어, 입자들은 구형, 직사각형, 또는 불규칙형태 또는 그의 혼합형태를 갖는다.

[0062] 본 발명에 사용된 입자들은 약 1-2㎛ 에서 200-300㎛ 범위 내에 분명한 크기를 갖는다. 일반적으로 유용한 입자 크기의 차이는, 입자들이 통합된 다공성 매트릭스 타입, 다공성 매트릭스 형성에 유용한 방법 및 장치 그리고 그렇게 형성된 매트릭스의 다공성(porosity)에 의해 정해진다. 예를 들어 부직포 직물성 피륙 및 가는 섬유(fibrillated) 폴리머 매트릭스는 전체적인 크기 범위의 입자들로 제조될 수 있다. 바람직하게는 약 40-200㎛ 크기 입자들은 부직포에 사용되는 반면에 1-100㎛ 크기 입자들은 가는 섬유 폴리테트라플루오로에틸렌(polytetrafluoroethylene:PTFE) 매트릭스에 바람직하다.

[0063] 본 발명의 범위에 또한 포함되는 것은 광범위하게 다양한 범위의 구멍 크기를 갖는 입자들이다. 상대적으로 큰 구멍 크기를 갖는 입자들은 단백질과 같이 큰 목적 분자들을 포획하기에 효율적인 반면에, 더 작은 구멍 크기를 갖는 입자들은 더 작은 분자들을 포획하기에 사용된다. 이용가능한 구멍 크기의 범위는 예를 들어, 약 0.001-0.1㎛ 이다. 한 실시예에서 상기 구멍 크기는 약 0.1-0.55㎛ 이다. 다른 실시예에서 상기 구멍 크기는 약 0.6-2㎛ 이다. 또 다른 실시예에서 상기 구멍 크기는 약 0.25-5㎛ 이다. 여기서 그러한 구체적인 범위로 설명한 것으로, 상기 범위가 설명된 범위 내 구체적인 모든 정수 값을 또한 포함한다. 예를 들어, 약 0.1-0.55㎛의 범위에

서, 실질적으로 각각의 구체적인 범위를 언급하지 않아도, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5㎛ 등을 포함하는 것이다.

[0064] 상기 입자들은 폴리머 또는 코폴리머 일 수 있는 유기 화합물 또는 탄소로 만들어진다. 예를 들어 입자들은, 그 중 특히 스티렌 및 디비닐벤젠의 코폴리머 및 그의 유도체, 폴리메타크릴레이트 에스테르, 유도된 알즈락톤 폴리머(derivatized azlactone polymer) 또는 코폴리머, 실리카, 알루미나, 알루미늄옥사이드, 티타니아, 티타늄옥사이드, 지르코니아(zirconia) 및 다른 세라믹 물질과 같은 유기 코팅된 무기 산화물 입자, 유리, 셀룰로오스, 아가로오스, 및 폴리스티렌 및 폴리메틸메타크릴레이트를 포함하는 다양한 다른 폴리머, 아크릴 섬유 및 전기 이동에 사용되는 다른 형태의 겔로 만들어진다.

[0065] 본 발명의 목적에 적당한 다른 입자들은 그들의 외부 및/또는 내부 표면에 불용성, 팽창가능성 또는 비팽창성 흡수성 물질로 코팅될 수 있는 입자들이면 어느것이든 포함한다. 한 실시예에서, 상기 입자들은 그들의 원래 건식 중량에 대하여 약 2-5 배의 부피로 팽창한다.

[0066] 코팅의 기능은 특이적 기능성과 물리적 성질을 제공하는 것이며, 원하는 특이적 분리 분석법에 따라 맞추어질 수 있다. 이들 기능은 흡수, 이온교환, 킬레이션, 입체적 배제, 키럴(chiral), 친화성등을 포함한다. 그러한 코팅용 입자 물질들은 무기 산화물 입자가 바람직하며, 가장 바람직하게는 실리카 입자이다. 코팅된 표면을 갖는 그러한 입자들은 종래 기술[예를 들어, Snyder and Kikrland, "introduction to Modern Liquid Chromatography", 2d Ed., John Wiley & Sons, Inc.(1979) and H. Figge et al., Journal of chromatography 351(1986) 393-408]에 잘 알려져 있으며 변성된 실리카 입자, 시아노, 시클로헥실, C_8(옥틸), 및 C_{18}(옥타데실) 기를 포함하는 공유 결합된 유기성 기능기를 갖는 실리카 입자를 포함한다. 상기 코팅은 폴리머를 원위치에 가교시켜 기계적으로 적용시키거나 입자 표면에 공유적으로 결합된 기능기일 수 있다.

[0067] 다공성 매트릭스에 통합된 입자의 함량은 본 발명의 범위 내에 폭넓게 다양하게 변화할 수 있다. 일반적으로 입자들의 함량은 장치의 약 1-99 부피%이다. 바람직하게는 그 함량은 20 부피% 이상이며 더욱 바람직하게는 50 부피% 이상이다. 본 발명의 장치는 입자의 95 중량% 이상까지 포함할 수 있어, 잠재적으로 높은 목적물 부착 능력을 제공한다. 본 발명의 입자들은 일반적으로 폭넓은 범위의 pH 값, 예를 들어 4 이하의 pH 값에서 12 이상의 pH 값에서 견딜수 있다.

[0068] 본 발명의 입자들은 휘발성이며 여러가지 다양한 크로마토그래피 또는 비크로마토그래피적 분리 분석법을 수행하는데 사용된다. 본 발명의 범위 내에 속하는 분리 방법의 예는, 샘플의 다른 성분들로부터 화학적 또는 생물학적 목적 인자를 분리, 측정 또는 수집하는 다른 방법중 특히, 역상 분리, 친화성 분리, 확장 베드 분리(expanded bed separation), 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 크로마토그래피 성분 분리, 고체상 추출을 포함한다. 상기 입자들은 또한 결합하여 샘플로부터 핵산 분자 및/또는 폴리펩티드 목적 인자를 분리하는데 사용된다.

[0069] 본 발명의 장치에 사용되는 바람직한 입자들은 다공성 수지이다. 흡착 분리용 다공성 수지는 실리카, 유리, 셀룰로오스, 아가로스; 그리고 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 아가로스, 하이드로겔, 아크릴 수지 및 전기 이동에 사용된 다른 형태의 겔을 포함하는 다양한 다른 폴리머를 포함하여 다양한 다른 물질로 이용할 수 있다. 실리카, 유리 및 폴리머와 같은 많은 다공성 흡착 수지는 건조될 수 있으며 약 1-2m^2/건식 수지g 내지 300m^2/건식 수지g 범위의 표면적을 갖는 상호연결된 구멍을 갖는다. 다른 형태의 수지들은 구조의 손상없이는 건조될 수 없는 가교된 겔이다. 이들 형태의 수지는 물질이 가교된 매트릭스를 통해 균일하게 확산할 수 있기 때문에 정상적으로는 특정 표면적을 갖지 않는다.

[0070] 천연 또는 변성된 수지의 유사물(analogue), 변이체 및 기능적 유도체를 포함하는 변성된 수지, 또는 그의 기능기를 사용하는 것도 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 변성은, 예를 들어, 화학적 엔티티(예를 들어 아미노산)을 특정 수지, 또는 그의 기능기에 대하여 치환, 결실 또는 첨가하는 것을 포함한다. 예를 들어, 수지의 아미노산 치환, 아세틸화, 및/또는 부분적 아세틸화는 본 발명의 범위에 포함된다. 수지의 기능기에 대한 변형은 본 발명에 따라 변성된 수지의 범위 내에 또한 포함된다.

[0071] 본 발명의 범위 내에서 유용한 천연 또는 변성된 수지의 다른 형태들은, 이에 한정되지는 않지만, 페닐 세파로오스(phenyl sepharose), 부틸 세파로오스, 옥틸세파로오스, 디비닐 벤젠으로 가교된 폴리스티렌, 히드로셀(hydrocell) C3 폴리스티렌-디비닐벤젠, 히드로셀 C4 폴리스티렌-디비닐벤젠, 히드로셀 페닐 폴리스티렌-디비닐벤젠, 메틸 HIC 메타크릴레이트, 부틸 HIC 메타크릴레이트, 광-기공-하이-페닐(wide-pore-hi-phenyl), 분획겔 EMD(fractogel EMD), 소수성 수지-프로필 메타크릴레이트 코-폴리머 분획겔 EMD, 소수성 수지-페닐 메타크릴레

이트 코폴리머 옥틸 세파로스, 페닐 세파로스, 토요펄(Toyopearl) HIC, 토요펄 아미노-650S, 토요펄 아미노-650M, 토요펄 아미노-650C, 토요펄 아미노-650EC, 토요펄 부틸-650S, 토요펄 부틸-650C, 토요펄 부틸-650M, 토요펄 에테르-650S, 토요펄 에테르-650C, 토요펄 에테르-650M, 토요펄 헥실-650S, 토요펄 헥실-650C, 토요펄 헥실-650M, 토요펄 페닐-650S, 토요펄 페닐-650C(PRDT), 토요펄 페닐-650M, 및 토요펄 659CU(PRDT)를 그중에서 특히 포함한다. 모든 토요펄 수지는 토소 바이오셉(Tosoh Biosep, Montgomeryville, PA)에서 상업적으로 이용가능하다. 세파로스 수지는 GE 헬스케어(GE Healthcare, Piscataway, NJ.)에서 이용가능하다. 분획겔 수지는 머크(Merck), 다름슈타트(Darmstadt, Germany)에서 이용가능하다. 히드로셀 수지는 바이오크롬 랩 인코포레이션(BioChrom Labs, Inc., Terre Haute, IN)을 통해 이용가능하다. 나머지 수지들은 대중에게 이용가능한 수지의 여러가지 기본 재료의 일반적인 명칭이다.

[0072] 만약 다공성 수지가 컬럼에 포장된다면, 흐름에 이용가능한 수력학 직경(hydrodynamic diameter)은 입자 직경 및 층공극율(bed void fraction)에 의해 결정된다.

수학식 1

[0074]
$$D_h = \frac{d_p}{3}\,\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}$$

[0075] 여기서 D_h는 입자들 사이의 흐름을 위한 등가 유압직경(equivalent hydraulic diameter)이며, dp는 입자 직경, 그리고 ε 은 공극율이다.

[0076] 결과로서, 컬럼을 통해 커다란 종들이 흐르도록 하기 위하여, 수지로의 흡착에 대한 확산 저항(diffusion resistance)을 교대로 증가시키는 커다란 입자들을 사용하는 것이 필요하다. 예를 들어 컬럼을 통해 적혈구 세포를 흐르게 하기 위해서는, 만약 층 다공성(bed porosity)이 약 0.4라면 입자간 공간에 14㎛ 구멍 직경을 제공하기 위하여 약 65㎛ 직경 입자들이 필요하다.

[0077] **4. 수지 함침된 부직포 직물(Resin Impregnated Nonwoven Fabric:RINs)**

[0078] 매트릭스로 입자를 통합하는 것은 여러 가지 방법으로 이루어질 수 있다. 평균 구멍 직경을 제어한 부직포 직물을 제조할 수 있기 때문에, 상술한 것과 같은 다공성 수지 입자들을 부직포 직물을 제조하는 섬유들 내에 함침시키는 것이 가능하다.

[0079] 이들 함침된 부직포 직물들은 여러가지 방법으로 만들어질 수 있다. 예를 들어, 두 개의 사전에 형성된 부직포 직물들 사이에서 건식 입자들이 물얽힘(hydroentangled)으로 함침될 수 있다. 선택적으로 건식 입자들은 섬유가 용융블로우 또는 스핀바인딩 과정에서 형성되는 동안 도입될 수 있다. 또한, 습식 레이(wet-laying) 방법을 사용하면서 수지 입자들을 얽히게 할 수 있다. 한 실시예에서 상기 입자들은 물얽힘에 의해 이미 형성된 섬유들 내로 함침되며 폴리머 섬유 매트릭스와 입자들을 용융 결합하지 않을 것이다.

[0080] 한 바람직한 제조방법은 용융블로우 또는 스핀바인딩으로 이미 제조된 부직포 직물을 직접 캘린더하는 것이다. 한 실시예에서, 상기 막이 단위 면적당 소정 질량의 입자로 덮여지도록, 직접 캘린더에 의해 일정 질량 속도로 전달된 입자들을 균일하게 상기 부직포 직물에 확산시킨다.한번 입자들이 확산되면, 제2 막을 제1 막 위에 놓고 샌드위치를 만들고 상기 결합된 것을 낮은 온도 및 압력에서 두 개의 막들이 서로 결합할 수 있도록 캘린더 롤을 통과시킨다. 표면상 입자 밀도는 약 0.1~10gm/m2 이상의 범위이다. 본 장치에 사용된 막의 구멍 크기는, 그들의 구멍 크기가 10㎛ 이상이기 때문에 예를 들어 적혈구와 같은 더 큰 엔티티가 관통할 수 있게 한다. 상기 막의 입자들은 예를 들어 적혈구 세포 농축물 및 플라스마의 프리온 단백질과 같은 목적 인자에 용이하게 입자들을 결합시키는 리간드에 부착된다.

[0081] 캘린더 방법의 진행은 통상 부직포 결합을 위해 고온을 요구하나 상기 온도는 입자들의 용융 온도 이하로 유지

되어 그들의 성능에 영향을 미치지 않는다. 한 실시예에서, 더 크거나 조밀한 입자들은 물얽힘에 의한 부직포 막들 사이에 놓여질 수 있다.

[0082] 부직포 직물의 밀도 및 중량은 다양한 범위 값을 지녀 원하는 구멍 치수를 유지하면서 직물상에 높은 입자 밀도를 확보할 수 있다. 약 60%w/w의 입자 농도로 직물내에 함침될 수 있다. 부직포 직물을 제조하는 일반적인 방법은 모두, 두 개의 다른 폴리머를 갖는 공압출뿐만 아니라 두 개의 다른 폴리머 섬유를 갖는 직물을 포함하여, 본 방법에 사용될 수 있다. 유연성 때문에 습식 및 건식 수지 둘 다 함침될 수 있다. 만약 필요하다면 단섬유(chopped fiber)가 직물 내에 포함되어 필요한 치수의 흐름 구멍을 허용하면서도 입자들을 포획을 용이하게 할 수 있다.

[0083] 단섬유들은 통상 1/2 인치 길이 보다 작으며, 방추(spindle)나 롤 주변에 권취된 단일 섬유를 절단하여 제조된다. 상기 단섬유화는 회전 칼날이나 다른 날카로운 절단면을 사용하여 기계적으로 수행한다. 단섬유는 매우 작은(약 1㎛ 보다 작음) 내지 큰(>100㎛) 범위의 직경을 갖는 다양한 폴리머 또는 탄소 섬유로 만들어질 수 있다. 하나의 실시예에서, 특이적 리간드를 상기 섬유상에 화학적으로 이식하거나 코팅한 후 약 1/2 인치의 길이로 섬유를 절단한다. 단섬유는 이후, 적혈구 세포와 같은 커다란 엔티티가 막을 관통(>10㎛ 구멍 크기)할 수 있기에 적당한 구멍 크기 및 섬유 직경을 갖는 단일 층상의 부직포 직물(폴리프로필렌 또는 다른 폴리머) 위에 분포될 수 있다.

[0084] 단섬유들은 섬유들의 분포가 균일하게 되도록 하는 소정의 속도로 막에 전달될 수 있다. 한번 단섬유들이 표면에 도착하면, 제2 층의 부직포 직물을 상기 단섬유의 상부에 놓고 그 결합된 것을 캘린더를 관통시켜 두 개의 부직포 층들을 결합시킨다. 한 실시예에서, 다공성 매트릭스 막 또는 단섬유들은 리간드로 기능화되고 다른 막 내에, 예를 들어 에어레이 기술에 의해 놓여진다. 다른 실시예에서, 상기 리간드들은 폴리머에 부착되어 연속적으로 섬유로 압출된다. 상기 섬유는 작은 조각을 만들도록 절단되어 두 개의 막들 사이에 용이하게 삽입될 수 있게 한다.

[0085] **5. 표면 개질(Surface Modification)**

[0086] 본 발명의 범위내에 또한 포함되는 것은 표면 개질된 부직포 또는 직포 직물(surface modified nonwoven or woven fabrics:SMNs)와 표면개질된 입자들이며, 이들은 반응적 기능기로 하나 이상의 내부 및/또는 외부 표면이 기능화되어 있다. 기능화는 하나 이상의 반응적 기능기를 다공성 매트릭스 표면(예를 들어 직포 또는 부직포 직물), 입자 또는 둘 다에 첨가함으로써 얻어진다. 상기 반응적 기능기는 상기 목적 인자와 상호작용하고 결합한다. 상기 반응적 기능기 및 목적 인자들 사이의 상호작용은 화학적, 물리적 및/또는 생물학적 상호작용이다.

[0087] 하나의 실시예에서, 다공성 매트릭스, 입자 또는 둘 다 목적 인자와 공유적 화학 결합을 형성할 수 있는 기능기로 개질된 표면이다. 본 발명의 범위 내에 유용한 기능기는 이에 한정되지는 않지만, 에폭시, 포르밀, 트레실(tresyl), 히드록시숙신이미드 에스테르(hydroxysuccinimide ester)의 하나 이상의 기능기를 그중 특히 포함한다. 본 발명의 범위 내의 유용한 다른 기능기는, 이에 한정되지는 않지만, 술폰산, 4차 아민, 카르복실기, 일차 아민, 시아노, 시클로헥실, 옥틸 및 옥타데실기, 옥시레인(oxirane), N-카르복시숙신이미드 에스테르, 술포닐 에스테르, 이미다졸카바메이트, 4차 아민, 카르복실기, 염료 리간드(dye ligand), 친화성 리간드, 항원-항체, 핵산 분자, 이온 교환, 킬레이션, 산화/환원 반응, 입체적 배제 반응, 촉매 반응, 소수성 반응, 역상, 및 크로마토그래피 분리에서 일반적으로 일어날 수 있는 다른 반응을 위한 기능기를 포함한다.

[0088] 상기 기능기는, 예를 들어 리간드는 상기 지지체에 화학적으로 공액되거나 스트렙타비딘(streptavidin), 베타 알라닌, 글리신-세린 포함하는 폴리머, 화학식 -(CH_2)-의 짧은 사슬 탄화수소, 폴리에틸렌 글리콜, 엡실론 아미노 카프로산(epsilon amino caproic acid), 및--O(CH_2)n을 포함하는 링커(여기서 n은 1-30)와 같은 링커(linker)를 통해 부착될 수 있다. 만약 원한다면 상기 리간드는 하나 또는 몇 가지 다른 분열가능한 링커(cleavable linker), 예를 들어 빛이나 산에 의해 분해될 수 있는 몇 가지 다른 분열가능한 모이어티에 부착되어, 분석용 리간드 집단을 선택적으로 분리할 수 있게 한다. 분리된 리간드들은 예를 들어 단백질 및 엔안티오머(enantiomeric) 분리용 친화성 정제 배지(affinity purification media)(예를 들어, 샘플내 목적물의 농축, 분리, 검출, 특성화, 정량, 동정), 진단 치료 도구, 화학적 반응의 촉매 및 증진인자(enhancer), 및 단백질의 선택적 안정화제로서 사용될 수 있다.

[0089] 한 실시예에서, 부직포 막은 기능기로서 친화성 리간드로 코팅되며, 상기 친화성 리간드는 그들 표면에서 프리

온에 대하여 특이적 친화성을 갖는다. 친화성 리간드의 예는, 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 친수성 스페이서를 갖는 일차 아민을 포함한다. 상기 리간드는 화학적 이식(chemical grafting)을 통해 또는 라텍스 에멀젼 코팅 방법(패팅: padding)으로 상기 막[예를 들어 매코파마사(Macopharma)의 플라스마 처리된 폴리프로필렌] 위에 놓여질 수 있다.

[0090] **5.1. 다공성 매트릭스상의 리간드의 폴리머화(Polymerization of Ligands on Porous Matrix)**

[0091] 다공성 매트릭스 상의 모노머의 폴리머화는 에폭시기를 이들 매트릭스 표면 위에 도입하여, 차례로 매트릭스 표면에 리간드의 화학적 부착을 용이하게 하는 것이다. 하나의 실시예에서, 목화, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 및 나일론 직물에 패딩으로 모노머 에멀젼을 적용시킨다. 패딩은 직물의 염색, 탈색 및 코팅을 하는 섬유 산업에서 사용된 연속적인 과정이다. 패딩에 대한 추가적인 정보는 셀라니스(Celanese) LLC 웹사이트:www.vectranfiber.com에서 찾을 수 있으며, 참조로서 본 발명에 통합되어 있다. 일반적으로 패딩은, 직물이 계속적으로 액체 경로를 통과하여 액체로 직물을 함침시키고 과량의 용액을 짜내도록 롤러들 사이를 관통하는 스퀴지 롤러(squeeze rollers) 세트로 이루어진다. 단일-딥(single-dip), 단일-닙(single-nip) 패딩 기술을 사용하는 것이 가능하다. 하베이시(Habeish) 등은(IMPROVING COTTON DYEING AND OTHER PROPERTIES BY EMULSION POLYMERIZATION WITH GLYCIDYL METHACRYLATE, American Dyestuff Reporter, April, 26-34(1986), 참조로서 여기에 통합됨)은 패딩 기술을 사용하여 목화 섬유에 글리시딜 메타크릴레이트(glcidyl methacrylate:GMA) 에멀젼을 적용시켰다. 패딩후, 과량의 물을 증발시키고 가온하면서 폴리머화를 수행한다. 섬유 표면상의 폴리머의 함량은 약 1-10% 이상의 범위이다. 폴리머화는 또한 원하는 구멍 크기(>10 ㎛)를 갖는 PET, PP 등의 부직포 피륙에서 수행될 수 있다.

[0092] **5.2 직물 상의 라텍스 코팅**

[0093] 라텍스 에멀젼은 원하는 폴리머의 작은 입자들을 만들기 위하여 물속에서 종래 에멀젼 폴리머화를 하여 합성된다. 여러가지 용해성 및 유리 라디칼 개시자 및 비-음이온성 및 음이온성 표면활성제는 에멀젼을 제조하기 위하여 사용될 수 있다. 한 실시예에서, 단일 섬유 또는 PP, PET 및 다른 폴리머의 부직포 피륙을 상술한 것처럼 패딩하여 다공성 매트릭스 상에 상기 라텍스 에멀젼을 코팅한다. 이러한 접근 형태는 드 부스(De Boos) 및 제드리넥(Jedlinek)에 의해 제시되어 있다[APPLICATION OF EPOXY FUNCTIONAL POLYCRYLATE EMULSION TO TEXTILES, J. Macromol, Sci-Chem. A17(2), 311-235(1982), 참조로 여기에 통합되어 있다].

[0094] **6. 사용방법**

[0095] 본 발명의 방법, 키트 및 장치는 발현된 시험실 내 유전자 산물의 예후(prognostic), 진단(diagnostic), 검출, 정제, 분리, 가공, 및 생물약제의 제조와 전달을 포함하는 여러 응용분야에서 유용하다. 본 발명은, 막 작용을 위해 일반적으로 이용될 수 있는 것이라면 어떠한 장치에도, 평판(flat plate)으로부터, 나권형(spiral wound) 또는 공동 섬유 카트리지 장치(hollow fiber cartridge device)에도 적용될 수 있다. 원하는 압력 적하(pressure drop) 및 흐름 속도에 따라, 중량에서부터 펌프까지 일반적인 방법 어느 것이든 사용하여 장치를 통해 흐름을 유도할 수 있다.

[0096] 본 발명의 정제 및 추출 기술은 정제 단계 수의 감소, 수율의 개선, 순도의증가 및 전통 방법과 관련한 한계성 극복이라는 점에서 종래 정제 기술을 뛰어넘는 장점을 제공한다.

[0097] 본 발명의 장치는 샘플로부터 병원체의 소량을 분리할 수 있을 정도로 매우 민감하다. 한 실시예에서, 본 발명의 장치는 PrP^{c} PrP^{sc}, PrP^{res}, 바이러스, 세균 및 독소와 같은 병원체를 전혈, 적혈구 농축액, 혈소판 농축액, 플라스마, 플라스마 유도체, 백혈구, 백혈구제거된 혈액, 포유류 세포 배양, 발효 액체 배지 및 생물학적약제의 제조 및 전송에 사용되는 다른 배지 및 치료제로부터 제거하는데 사용된다. 다발성 병원체는 본 발명이 장치를 사용하여 치료제 및/또는 약제학적 제품의 생성을 목적으로 하는 플라스마의 가공 산업에서 동시에 그리고 빠르게 샘플로부터 분리될 수 있다.

[0098] 특히, 본 발명의 방법 및 장치는 단백질 정제 과정을 최적화하고 효율성 및 순도를 증가시켜 생물학적 약제를 제조하는 과정을 개선한다. 생물학적약제는 단백질, 펩티드 또는 다른 복합체 폴리뉴클레오티드 또는 단백질계

거대분자(집합적으로 "유전자 산물")인 약품들이다. 그들의 제조 과정은 그의 숙주 생물량(host biomass), 예를 들어 플라스마 또는 다른 인간 및 비인간 생물학적 공급원(예를 들어, 재조합 또는 비재조합 세포 배양, 형질전환 동물의 우유 또는 재조합 또는 비재조합 식물 추출물)과 같은 숙주 생물량으로부터 원하는 유전자 산물을 회수하는 것과 관련이 있다. 생물량으로부터 원하는 단백질을 상업적으로 가치있는 수율로 분리하는 것은 후자가 원하지 않은 숙주 단백질, 핵산 분자 및 다른 자연 발생하는 화학적 엔티티를 포함하고 있기 때문에 난제이다.

[0099] 단배질 분리 및 정제 과정은 단백질의 다양성, 가능한 오염물 및 불순물의 다른 성질, 및 배지로부터 분리하려는 생성물의 함량으로 인하여 독특한 어려움을 제시하고 있다. 종래 정제 기술은 일반적으로 일련의 정제 단계들과 관련이 있다. 각 단계에서, 수율이 감소하고 제조 비용이 증가한다. 단백질 분리 및 정제는 전형적으로 총 제조 비용의 50% 이상을 대표한다.

[0100] 다른 실시예에서, 본 발명의 장치는 두 개의 동시적 작용을 수행하도록 고안된다; 흡착뿐만 아니라 여과. 이러한 실시예에서, 상기 섬유 구멍 크기는 커다란 입자적 물질을 배제시킬 수 있을만큼 충분히 작으면서 동시에 원하는 분자를 포함하는 샘플의 이동을 허용할 수 있을 만큼 충분히 큰 구멍 크기를 유지한다. 이러한 기술은 단일 장치에서 동시적으로 여과 및 흡착 단계를 수행하며, 흡착 컬럼 크로마코그래피 후 막 여과를 하는 과정을 대체할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 장치는 배양 배지로부터 직접적으로 세포외적으로 분비된 원하거나 원하지 않은 분자를 흡수할 수 있게 한다.

[0101] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 장치는 생체기술 산업에서 흡수적 제거 기술용 컬럼에 대안으로 사용된다. 이들 기술은 예를 들어, 이온 교환, 킬레이션, 산화/환원 반응, 입체적 배제, 촉매작용, 소수성 상호작용, 역상, 염료 리간드, 친화성 리간드, 항원-항체 및 크로마토그래피 및/또는 다른 분리 기술에서 일반적으로 일어나게 되는 다른 상호작용과 같은 생화학적 상호작용을 이용한다.

[0102] **7. 시험 키트**

[0103] 본 발명의 범위에 또한 포함되는 것은 샘플로부터 목적 인자를 분리하여 샘플을 정제하는 시험 장치이다.

[0104] 완전한 시험 키트는 생물학적 샘플의 목적물 분리 및 정제용 용액 및 장치를 포함한다. 예를 들어, 상기 시험 키트는 높은 처리량 샘플 정제를 위해 96,384 또는 1536 웰 플레이트; 및/또는 개별 단백질, 항체, 및 플레이트 포맷(plate format)에서 단백질 분리를 위해 필요한 용액을 주문에 맞추기 위한, 본 발명의 장치 내 입자들에 리간드를 부착시키는 용액을 포함한다.

[0105] 일반적으로, 본 발명의 시험 키트는 다음을 하나 이상 포함한다:(1) 여기 기술된 장치를 포함하는 하나 이상의 용기; (2)여기 기술된 방법을 실행하는 안내서; (3) 하나 이상의 분석 성분; 및 (4)포장재. 여기 기술된 장치들은 본 발명의 분리 방법을 수행하는데 필요한 성분들 모두 다 필요한 것은 아니지만 많은 것을 포함하여 포장된다. 예를 들어, 시험 키트는 그중에서 특히 하나 이상의 완충액, 시약, 화학제(chemical agent), 기능화제, 효소, 검출제, 대조 물질외에 다공성 매트릭스 및 입자들을 포함하는 장치를 포함한다.

[0106] 한 실시예에서, 상기 키트는 추가적으로 별도 용기내 기능기를 포함하며, 상기 기능기는 분석을 수행하기 전에 입자 및/또는 다공성 매트릭스에 부착되어야만 할 것이다. 선택적으로 상기 장치는 기능기 없는 키트 내에 제공될 수도 있으며, 이런 경우에는 다공성 매트릭스, 입자, 또는 둘 다가 바람직하게 사전 기능화된다.

[0107] 본 발명의 장치는 원하는 크기 및 형태 어떠한 것일 수 있다. 바람직하게 상기 장치는 시트류 물질, 예를 들어 디스크 또는 스트립 형태(strip form)이다. 키트의 부품으로 제공될 수 있는 다른 물품들은 고체 표면 주사기, 피펫, 큐벳(cuvette) 및 용기를 포함한다. 다공성 매트릭스 또는 입자들을, 단일층 물질, 또는 폴리머 또는 공유적으로 결합하는 기능적 분자로 그대로 가교시켜 제조된 더 두꺼운 물질로 상기 다공성 매트릭스 또는 입자의 표면을 코팅하여 크로마토그래피 선택성 및 분리 효율을 최적화시킬 수 있다.

[0108] 다공성 매트릭스, 입자 또는 둘 다를 검출가능제에 결합시키면 검출이 용이해질 수 있다. 검출가능제의 예로는, 이에 한정되지는 않지만, 여러가지 효소, 배합군(prosthetic group), 형광물질, 발광물질(luminescent material), 생체발광물질(bioluminescent material), 방사성 물질(radioactive material), 분산 염료(disperse dye), 금 입자 또는 그의 결합을 포함한다.

[0109] **실시예**

[0110] 여기 기술된 방법 및 응용들에 다른 적당한 변형 및 적용을 하는 것은 당업자에게 알려진 정보와 여기 포함된 본 발명의 설명으로부터 용이하게 명백히 알 수 있으며, 본 발명의 범위 또는 그의 실시예로부터 벗어나지 않고

제조할 수 있다는 것은 관련 기술분야의 당업자가 알 수 있는 것이다. 지금부터 본 발명의 더욱 상세히 설명하며, 다음 실시예를 참조로 하여 동일한 내용이 더욱 명백히 이해될 것이며, 여기 포함된 것은 단지 이해를 목적으로 한 것이며 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0111] **실시예 1: 표면 개질 부직포 직물(Surface Modified Nonwoven Fabrics: SMNs)**

[0112] 표면 개질 부직포 직물는 흡수될 목적 종들이 클 때 특히 유용하며, 이것은 수지의 구멍들을 관통할 수 없다. 이러한 예에서 부직포 직물을 이루는 섬유 표면을 목적 인자의 흡착에 영향을 미치도록 개질하였다. 상기 흡착 단계는 이온 교환, 소수성, 또는 친화성 상호작용 또는 다른 일반적인 흡착 과정과 관련이 있다. 만약 SMN이 입자들 없이 사용된다면, 부착에 이용되는 물질의 단위 부피당 표면적은 직물의 다공성 및 섬유의 직경에 의해 제어된다.

수학식 2

[0113] $$a_v = \frac{4}{d_f}(1-\varepsilon)$$

[0114] 여기서, a_v는 고체 단위 부피당 특이적 표면적이고, d_f는 섬유 직경이며, ε 은 공극율(void fraction)이다.

[0115] 섬유 직경이 100nm~10㎛ 범위 어느 것이나 이용가능하기 때문에, 다공성은 일반적으로 0.4-0.5이며, 매우 큰 표면적이 본 발명에서 얻어질 수 있다. 예를 들어 0.1㎛ 의 섬유 직경을 사용하면, 직물의 단위 부피당 표면적은 다음 수가 될 것이다.

수학식 3

[0116] $$a_v = 2x\ 10^7\ m^2/m^3 = 20\ m^2/cm^3$$

[0117] 이것은 많은 다공성 크로마토그래피 지지체의 단위 부피당 표면적에 뒤떨어지지 않는다. 그러나 직물의 평균 구멍 흐름 직경이 독립적으로 제어될 수 있기 때문에, 상기 구멍 크기들은 몇 마이크론 직경에 도달할 수 있다. 전기방사(electrospinning)와 같은 기술들은 더 작은 직경을 만들 수 있어, 결과적으로 부피당 더 큰 면적을 제조할 수 있다.

[0118] 상기 장치에 목적 인자를 결합시키는 것을 용이하게 하고 본 장치에 사용된 특이적 다공성 매트릭스의 화학성과 상용성이 있는 표면개질이라면 어느 것이든 본 발명의 범위에 포함된다. 표면개질로는 예를 들어, 하전된 종들의 형성, 친화성 리간드의 부착, 펩티드, 올리고뉴클레오티드, 단백질, 스페이서 암, 소수성 모이어티, 불소화된 물질 들을 그 중 특히 포함한다.

[0119] 부직포 직물에서 섬유들의 표면은 매끄러운 경향이 있기 때문에, 이들 표면은 프리온 단백질, 바이러스 또는 세균과 같은 특히 큰 종들에 친화성 리간드를 노출시키기 위한 바람직한 배열로 나타난다.

[0120] **실시예 2: 프리온 단백질(PrP) 제거용 장치 구성**

[0121] 본 실시예는 여러 가지 기하학의 비다공성 표면에 흡착성을 부여함으로써, 내인성 전달성 해면뇌병증(spongiform encephalopathy) 감염력(infectivity)을 제거할 수 있는 다른 장치 구성을 고안할 수 있다 것을 나타낸다. 적혈구 농축액으로부터 내인성 감염력은 약 200ng/ml의 총 농도에서 감염성 PrP^{sc}(프리온 단백질의 스크라피형) 또는 PrP^{res}(프리온 단백질의 저항성형)을 제거하는 것과 관련이 있다. 적혈구 농축액(rbcc) 함유 350ml의 자루에는 총 $7x10^{-5}$ g의 PrP가 있었다. 단층 단백질이 약 2mg/m^2 밀도의 단층으로 표면을 코팅한다면, 내인성 PrP 모두를 결합시키기에 필요한 총 표면적은 다음과 같이 계산된다.

수학식 4

[0122] $$A=\frac{7x\ 10^{-5}g}{2x\ 10^{-3}g/m^{2}}=3.5x\ 10^{-2}\ m^{2}$$

[0123] 여기서 A는 장치의 총 면적이다.

[0124] 상기 식에서 명백한 것처럼, 프리온에 결합하는데 필요한 총 면적은 상대적으로 작으며 정확한 표면 밀도에서 친화성 리간드를 노출시키는데 적당한 몇 몇 장치의 기하학이 필요하다.

[0125] **A. 사각형 시트**

[0126] 혈액에 노출된 리간드로 코팅된 두 측면을 갖는 부직포 직물의 N 사각형 시트 세트는 다음 식에 따라 총 표면적을 갖는다:

수학식 5

[0127] $$2NL^{2}=3.5x\ 10^{-2}\ m^{2}$$

[0128] 여기서 N은 시트의 수이고 L은 사각형 시트의 길이/넓이이다. 10개 시트의 경우(N=10)에, 각 시트의 필요한 넓이는 다음이 될 것이다.

수학식 6

[0129] L=0.042m=4.2cm

[0130] 이러한 형태의 장치는, 도 2에 도시된 것처럼 시트들 사이에 구불구불한 경로로 유동액이 흐르는 엇갈린 배열의 시트로 이루어진다.

[0131] **B. 코팅된 섬유들(Coated Fibers)**

[0132] 외부에 친화성 리간드로 코팅된 N 부직포 직물 세트는 다음과 같은 총 표면적을 갖는다.

수학식 7

[0133] $N2\pi RL=3.5x10^{-2}\ m^{2}$

[0134] $NRL=5.57x10^{-3}\ m^{2}$

[0135] 여기서 R은 섬유의 반지름이다.

[0136] 예를 들어 5㎛의 반지름과 5cm의 길이를 갖는 섬유의 수는 다음이 될 것이다.

수학식 8

[0137] N=22,280

[0138] 이들 섬유의 부피는 다음이 될 것이다.

수학식 9

$$V_f = N\pi R^2 L = 8.74x\,10^{-8}\ m^3 x \frac{10^6 ml}{m^3} = 0.087ml$$

[0139]

[0140] 여기서 V_f는 섬유의 부피이다.

[0141] 상기 식에서 명백히 알 수 있듯이, 섬유의 부피는 상대적으로 작으며, 이는 근본적으로 단위 부피당 표면적을 매우 높이 올리게 하는 작은 직경의 섬유로 인한 것이다. 그러한 섬유 매트를 통해 적혈구 세포가 적절히 흐르도록 하기 위하여 다공성은 예를 들어 50%로 상당히 높아야만 한다. 이러한 경우에, 상기 장치의 부피는 대략 섬유 부피의 두배 또는 0.17ml일 것이다. 이는 매우 작은 부피이며, 이러한 형태의 포획을 위한 장치는 용량의 요구를 맞추기 위하여 장치를 크게할 필요가 없다는 것을 다시 한번 나타낸다. 예를 들어, 반지름 2cm의 섬유 매트는 이러한 부피를 제공하기 위하여 단지 약 0.133mm 두께를 가질 것이다. 하나 이상의 섬유 시트는 외부에 친화성 리간드로 코팅될 수 있다.

[0142] **C. 입자들**

[0143] 작은 비다공성 입자들은 또한 단위 부피당 매우 높은 표면적을 나타낸다.

[0144] 상기 언급된 표면적을 갖는데 필요한 입자의 수 및 부피는 실린더형 구조의 경우에 사용된 것과 유사한 방법으로 컴퓨터화하였다.

수학식 10

$$N = \frac{3.5x\,10^{-2}\ m^2}{4\pi R^2},\quad V_s = \frac{4}{3}\pi R^3 N$$

[0145]

[0146] 여기서 Vs는 입자의 부피이다.

[0147] 반지름이 10㎛라면, 식 5에 의해 입자의 수와 부피는

화학식 11

[0148] $N=2.79x10^7$

[0149] $V_s=1.17x10^{-7}\ m^3=0.117ml$

[0150] 이다.

[0151] 상기 식은 극단적으로 매우 작은 부피의 매우 작은 입자들을 나타낸다. 작은 입자들은, 상기 시스템을 통해 적혈구 세포들을 용이하게 흐르게 하기 위하여 커다른 구멍들을 갖는, 더 큰 입자들로 분산되거나 가교된 겔(아가로스와 같은) 내에 현탁될 수 있다.

[0152] **실시예 3: 수지를 갖고 또는 수지 없이 캘린더하여 두 개층의 막들을 결합시킴(Bonding Two Layers of Memberanes by Calendering With or Without Resin)**

[0153] 프리온 제거 장치를 개발시키기 위하여, 두 개 층의 폴리프로필렌 막들을 실온/400PLI 및 150F/100PLI, 수지밀도 1mg/cm^2로 연속적으로 캘린더하였다. 캘린더 막들을 초음파 봉합기를 사용하여 밀봉하였다. 캘린더된 막 샘플들로부터 용혈(hemolysis)의 퍼센트는 허용가능한 범위 내였다. 캘린더는 두 개 막 층들 사이에 아미노산 650M 수지의 함침을 위해 사용되었다.

[0154] 토요폴 아미노 650M 수지 입자들은 부직포 직물 막들의 두 층 사이에 함침되었다. 마코파마 루코필터(leucofilter)에 현재 사용되는 폴리프로필렌(내층)과 폴리에스테르(외층) 막들은, 그들이 이미 인간 혈액 가공

용으로 승인된 것이기 때문에 이들 막들로 사용되는데 좋은 후보들이다.

[0155] 입자들이 장치를 통해 적혈구가 흐르는 것을 방해하지 않고 고정될 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, 내부 및/또는 외부 층 막들을 입자를 가지고 또는 입자들없이 캘린더하였다. 캘린더는 두개 롤러들 사이에 막들을 프레스하여 시트로 만드는 것으로 수행하였다.

[0156] 물질 및 방법

[0157] 폴리프로필렌 막(PP)의 한 롤 및 폴리에스테르 막(PET) 한 롤을 3 인치 내부 직경 플라스틱 방추에 권취하였다. 상기 롤의 넓이는 약 0.5m 이었다. 상기 막들은 22.5cm 넓이와 800m 길이이었다. 막들을 22.5cm x 22.5 cm 정사각형 시트로 절단하였다. 건식 수지를 막의 일면에 1mg/cm^2로 펼치고, 다른 막으로 덮었다. 막 단독 샘플들은 수지 전개가 필요하지 않았다. 상기 샘플들을 두 개의 캘린더 롤을 통과시켰으며, 하나는 엠보싱 롤(embossed roll)이고 하나는 스므스 롤(smooth roll)이었다. 캘린더를 위해 온도를 증가시키기 위하여 두 개 롤들을 가열하였다. 상기 롤들 사이의 압력을 또한 제어하였다. 캘린더된 샘플들을 가시화 검사, 중량 측정, SEM(전자 현미경 스캐닝: scanning electron microscopy)로 단면 검사, 구멍 크기 시험, 및 전혈이 캘린더된 장치를 통과한 후 흐름의 용혈 퍼센트 시험으로 시험하였다.

[0158] 용혈 퍼센트의 측정을 위한 방법(Procedure for measurement of percent hemolysis)

[0159] 막 샘플들을 25mm 원으로 절단하고, 밀리포어 스윈넥스 25mm 필터 홀더(Millipore Swinnex 25mm filter holder)에 넣었다. 각 샘플들을 유통(flow through) 시험을 두번 하였고, 96-웰 플레이트에 세번 시험하였다. 각 샘플들을 2ml 작동 완충액(working buffer)(작동 완충액은 20mM 시트레이트 및 140mM NaCl, pH 7.0)으로 세정하고 전혈을 0.5mL/min의 속도로 꼭대기로부터 막을 통해 펌프하였다. 유통 5ml를 각 샘플로부터 수집하였다. 유통 또는 미처리된 혈액을 12000rpm으로 10분 동안 4℃에서 원심분리하여 탈리액(supernatant)을 얻었다. 각 샘플로부터 3개의 100㎕ 일정부분을 96 웰 플레이트 3개 웰에 놓았다. 각 플레이트의 UV 흡광도는 415nm에서 판독하였다. A_{415nm}의 평균값은 동일한 혈액의 100% 용해의 값으로 나누었다. 용혈의 퍼센트가 만약 1% 이하이면 허용가능하다.

[0160] **결과**

표 1

[0161] 캘린더 및 가시화 검사를 위해 사용된 조건

캘린더로 제조한 샘플						
샘플	막		온도(F)		압력	
번호	캘린더	수지	엠보싱 롤	스무스롤	(PLI)*	결과
1	내부/내부 막	있음	냉각	냉각	100	큰 면적의 포켓
2	내부/내부 막	있음	냉각	냉각	200	중간 면적의 포켓
3	내부/내부 막	있음	냉각	냉각	300	작은 면적의 포켓
4	내부/내부 막	있음	냉각	냉각	400	분리된 작은 면적의 포켓
5	내부/외부 막	있음	냉각	냉각	300	거의 결합되지 않은, 큰 포켓
6	내부/내부 막	있음	120	120	100	작은 면적의 포켓
7	내부/내부 막	있음	140	140	100	분리된 작은 면적의 포켓
8	내부/외부 막	있음	150	150	100	잘 결합되지 않은, 큰 포켓
9	내부/외부 막	있음	150	150	200	나쁘게 결합된, 작은 포켓
10	내부/외부 막	있음	180	180	200	나쁘게 결합된, 작은 포켓
11	내부/외부 막	있음	180	180	400	느슨하게 결합된
12	내부/외부 막	있음	냉각	냉각	400	거의 결합되지 않음
13	내부/내부 막	있음	150	150	100	매우 좋음, 소량의 포켓
14	내부/내부 막	없음	냉각	냉각	100	느슨하게 결합된, 포켓을 갖음
15	내부/내부 막	없음	냉각	냉각	400	단단하게 결합된, 포켓없음
16	내부/내부 막	없음	157	153	100	매우 잘 결합됨
17	내부/내부 막	없음	157	153	400	단단하게 결합됨
18	내부/외부 막	없음	157	153	400	느슨하게 결합됨
19	외부/외부 막	없음	180	180	400	거의 결합되지 않음, 큰 포켓
20	외부/외부 막	없음	220	220	400	작은 포켓을 갖고 결합됨

21	외부/외부 막	없음	220	220	600	매우 잘 결합됨
* PLI = 파운드/선형 인치						

[0162] 가시화 검사로부터 샘플 번호 4, 7, 및 13이 실행 입자중 가장 좋은 것으로 결정되었다. 롤의 온도를 증가시킬 때, 샘플 4 및 13에 나타난 것처럼 막들을 결합하는데 낮은 온도를 사용할 수 있다. 외부층 막들을 내부층보다 더 많이 두껍고 더 단단한 폴리에스테르로 만들었다. 외부층을 외부 또는 내부층 막과 캘린더하기 위하여, 샘플 21에 나타난 것처럼 더 높은 롤 온도 및 압력이 필요하다.

표 2

[0163] 중량 측정

캘린더된 샘플의 중량		
샘플	수지	중량(gsm)
단일 내부층		41
단일 내부층		67
내부/내부층 캘린더 함		82
내부/내부층 캘린더 함	1mg/cm2	92
내부/외부층 캘린더 합		107
내부/외부층 캘린더 함	1mg/cm2	117
외부/외부층 캘린더 함	1mg/cm2	129

[0164] 수지 밀도에 대하여, 1 mg/cm^2는 10 mg/m^2($1mg/cm^2$ x $10^4 mg/cm^2$ = $10mg/cm^2$)과 동등하다. 단일층, 이중층 및 수지로 함침된 이중층의 중량은 상대적으로 비례한다. 상기 결과는 수지가 두 개 층의 막들 사이에서 잘 유지되었다는 것을 보여주는 것이다.

[0165] 샘플 11 및 13의 스캐닝 전자 현미경 사진(SEM)은 대부분의 수지 입자들이 캘린더후에 불활성이며, 몇 몇은 분열되었을때 조차 무손상인 것으로 밝혀졌다. 샘픔 2는 또한 SEM으로 검사하였고 유사한 결과를 나타내었다. 캘린더의 엠보싱 롤에 2mmx2mm의 사각형 격자 공간이 있었다. 캘린더하는 동안, 막들은 격자가 닿은 곳에 강하게 프레스되었다. 이 면적을 결합 면적(bonding area)으로 불린다. 상기 포켓 면적은 결합 면적과 가장 먼 지역의 면적을 의미한다.

[0166] 샘플 11은 하나의 내부 층 및 하나의 외부층 사이의 수지 입자들을 고정시키는 예이다. 도 3은 50X 확대의 샘플 11의 포켓 면적을 나타낸다. 샘플 13은 두 개의 내부층들 사이의 수지 입자들을 고정시킨 예이다. 도 4는 50X 확대한 샘플 13의 포켓 지역을 나타낸다.

[0167] 구멍 크기 분포

[0168] 캘린더된 샘플들의 구멍 크기 분포 결과를 표 3에 나타내었다. 캘린더된 샘플에 대하여, 가장 작은, 평균, 및 가장 큰 구멍 크기들은 단일 층에 비하여 30%~50% 감소하였다. 구멍 크기의 감소가 장치를 통과하는 적혈구 세포들을 저해하는지 여부를 결정하기 위하여, 전혈 유통의 용혈에 대한 시험을 더 수행하였다.

표 3

[0169] 캘린더된 샘플의 구멍 크기 분포

샘플 번호	막	수지	롤 온도(F)		압력 (PLI)	구멍 크기 분포(㎛)		
			엠보싱	스무스		가장 작음	중간	가장 큼

1	내부/내부층	있음	냉각	냉각	100	2.28	3.62	7.71
2	내부/내부층	있음	냉각	냉각	200	2.10	4.52	8.80
3	내부/내부층	있음	냉각	냉각	300	1.91	3.89	7.80
4	내부/내부층	있음	냉각	냉각	400	1.99	4.69	9.62
15	내부/내부층	없음	냉각	냉각	400	2.06	3.90	9.26
7	내부/내부층	있음	140	140	100	1.82	4.05	8.00
13	내부/내부층	있음	150	150	100	1.99	4.88	8.73
16	내부/내부층	없음	157	153	100	2.11	4.04	8.79
PP	단일내부층					4.15	7.03	13.91
11	내부/외부층	있음	180	180	400	1.12	3.32	7.99
18	내부/외부층	없음	157	153	400	1.64	3.45	8.65
21	외부/외부층	없음	220	220	600	N/A	17.76	47.35
PET	단일외부층					23.61	35.81	79.04

[0170] **실시예 4: 높은 입자 밀도를 사용하여 캘린더를 최적화함(Optimization of calendering using high particle densities)**

[0171] 본 시험에서 사용된 캘린더 롤은 BF 퍼킨스(BF Perkins)사의 프로메틱(ProMetic)에서 주문한 것이다. 상기 롤은 벌집 형태로 조각되고, 테플론 방출 코팅으로 코팅된 스테인레스스틸로 제조되었다. 사용된 백 롤(back roll)은 코팅된 고무였다(3/4" 에서 1" 두께).

[0172] 건식 수지의 4g 샘플을 수동으로 플라스마-처리된 폴리프로필렌 막 30cm x 20cm(600cm^2) 조각으로 펼쳤으며, 이는 6.6mg 수지/cm^2에 대응한다. 막의 2차 조각을 수지층 위에 놓고, 상기 샌드위치를 10m/min의 속도로 캘린더 롤을 통과시켰다. 다음 표는 상기 시험동안 얻어진 결과를 포함한다.

표 4

[0173] 캘린더 최적화 결과

시험	설정 온도 (°F)	측정된 온도 (°F)	갭[1] (㎛)	결과
1	212	198	203	입자와 또는 입자없이 결합하지 않음
2	230	215	0	막이 약하게 용융됨
3	245	236	0	이전보다 나음, 그러나 너무 약함
4	255	245	0	수지 없이 좋은 결합, 그러나 수지보다 덜 효율적
5	260	248	0	수지와 그리고 수지없이 좋은 결과
6	275	-	0	온도가 너무 높고, 최상 막이 바닥에 융합하지 않으나 롤에 부착됨
7	265	-	0	수지와 함께 또는 수지 없이 이 온도에서 좋은 결과를 얻음

[0174] 1) 0 갭은 1/1000 인치로 바닥 롤을 패턴이 관통하는 것을 나타낸다.

[0175] 상기 샘플을 현미경으로 관찰하였고, 작은 구멍이 없었다. 각 시험의 조각을 추후 참조를 위하여 (단지 수지 없는 것만) 유지하였다.

[0176] **실시예 5 수지 함침된 캘린더된 막의 β-락토클로블린의 결합과 흐름 특성(Binding of a β-Lactoglobulin and Flow Characteristics of Resin-Impregnated Calendered Membranes)**

[0177] 이 실험은 모델 단백질(β-락토글로블린)을, 건식 수지를 4mg/cm^2의 밀도로 포함하는 캘린더된 막 물질에 결합시키기 위한 돌파구를 결정하기 위하여 수행되었다.

[0178] 프로필렌 막 물질을 170°F 및 150 파운드/선인치(PLI)에서 4mg/cm^2 밀도의 건식 수지를 포함하여 캘린더하였다. 이 막 물질은 절단하여 밀리포어 스윈넥스 필터 장치내로 조립하였다. 각 필터 장치는 1-4 막층 + 비캘린더된 막 층을 필터 장치의 출구쪽에 포함하였다. 0.5mg/mL β-락토글로블린의 1XPBS 용액을 연동펌프(peristaltic pump)를 사용하여 1.5mL/min의 속도로 필터 장치를 통과시켰다. 0.5mL의 분획물(fraction)을 4분 동안 수집하고 피어스 마이크로 비씨에이 분석키트(Pierce Micro BCA assay kit: Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 그들의 단백질 농도를 분석하였다.

[0179] 도 5-7은 다른 수의 막층에 대하여 수집된 12 분획물들의 마이크로 비씨에이 분석 결과를 나타낸다. 수지 없이 캘린더된 막은 대조군으로 사용되었다. 이 실험 결과는 수지 포함된 막과 대조군 사이에서 결합의 차이를 나타낸다. 모든 운전에서 자유로운 농도(unbound concentration)의 유사한 초기 기울기를 나타내었다; 그러나 층 2-4는 다음 포화 조건(saturated condition)을 나타내기에 충분할만큼 오래 운전되지는 않았다.

표 5

[0180] 수지 중량당 결합된 단백질 함량과 총 결합된 단백질

총 단백질 결합 mg			
막	대조군	수지	mg 결합/수지g
1 층	0.805	1.095	4.5
2 층	0.792	1.493	5.4
3 층	0.731	2.085	6.9
4 층	0.776	1.859	4.2

[0181] 일반적으로 결합된 단백질의 함량은 각각 막 추가시 증가하고 3개 층의 막에서 피크이며 이어서 4개층인 경우 약간 감소를 나타내었다(표 5). 2-4 층의 막을 포함하는 필터가 포화된 조건을 나타내기에 충분하도록 오래 운전되지 않았기 때문에 결합이 완료되었는지는 확실하지 않다.

[0182] **실시예 6 막 롤 상의 입자 분포(Particle distribution on Membrane Rolls)**

[0183] 입자 확산 장치(particle spreading unit)는 이전에 사용된 비드(bead)의 수동 분포를 대체하기 위해 개발되었다. 상기 장치는 시험되어 왔고 조정되었다.

[0184] 분말 도포기(powder applicator)는 수동으로 60%까지 설정되고, 이는 6.52~6.99kg/시간(표시됨)의 분산 속도와 등가이다. 중량으로 결정된 측정된 분산 속도는 6.65kg/h(3 치수의 평균)이고 6.96kg/h 목적값의 5% 이내이었다.

[0185] 분산된 분말은 균일하게 분포된 것으로 나타났으며(가시화 평가) 그리고 막의 말단에 넘치지 않았다. 도 9는 약 1시간 동안 라인(line)을 운전한 후 바닥 막 위에 분포된 입자들을 나타낸다. 입자들을 포함하는 지역에 의해 형성된 날카로운 말단은 막의 양 측면에 보여질 수 있다. 다른 인식가능한 특징은, 어느 정도 제조 시간 후에서도 컨베이어 벨트 상에 분말이 부족한 것이다.

[0186] **실시예 7:프리온 결합제(Prions binders)**

[0187] 프리온을 결합하는데 사용된 수지의 리스트는 다음에 개시된다:

[0188] a) 아미노 650M - 펩티드 및 다른 리간드를 결합시키는 기본 수지. 이 기본 수지는 프리온 단백질, 정상 PrPc 및 감염성 PrPsc(또는 PrPres) 모두를 결합시키는 데 유용한 것으로 나타났다. 상기 수지는 컬럼 크로마토그래피 포맷에 사용되었고 우리는 시험실 내 기술(웨스턴 블랏: Western Blot)에 의한 검출 한계까지, 전혈, 플라스마, 적혈구 세포로부터 PrPsc(햄스터, 마우스 vCJD, 마우스 후쿠오카, 인간 spCJD 및 인간 vCJD)의 제거/결합을 나타내었고 및 햄스터 263K 스크래피 감염능의 감소, 즉 약 4 log의 생체내 모델(적혈구 세포 농축액)을 나타내었다.

[0189] b) 토요펄-SYA-이 트리펩티드는 프리온 단백질, 정상 PrPc 및 감염성 PrPsc(또는 PrPres) 둘 다를 결합시키는데 유용한 것으로 나타났다. 상기 수지는 컬럼 크로마토그래피 포맷에 사용되었고, 우리는 시험실 내 기술(웨스턴 블랏)에 의한 검출 한계까지, 적혈구 세포 농축액으로부터 PrPsc(햄스터, 마우스 vCJD, 마우스 후쿠오카, 인간 spCJD 및 인간 vCJD)의 제거/결합을 나타내었고 및 햄스터 263K 스크래피 감염력의 감소, 즉 약 4 log의 생체내 모델(적혈구 세포 농축액)을 나타내었다.

[0190] c) 토요펄-DVR-이 트리펩티드는 프리온 단백질, 정상 PrPc 및 감염성 PrPsc(또는 PrPres) 둘 다를 결합시키는데 유용한 것으로 나타났다. 상기 수지는 컬럼 크로마토그래피 포맷에 사용되었고, 우리는 시험실 내 기술(웨스턴 블랏)에 의한 검출 한계까지 적혈구 세포 농축액으로부터 PrPsc(햄스터, 마우스 vCJD, 마우스 후쿠오카, 인간 spCJD 및 인간 vCJD)의 제거/결합 및 햄스터 263K 스크래피 감염능의 감소, 즉 약 4 log의 생체내 모델(적혈구 세포 농축액)을 나타내었다.

[0191] 상기 아미노 650M, SYA 및 DVR은 실물 크기, 즉 수지상을 지나간 적혈구 세포 농축액 1 실물 단위(약 350ml)로 사용되었다. 컬럼 크기는 팽창된 수지 10ml 이었다. SYA, DVR 및 아미노는 400μmol/g(건식 수지)에서 기능한다.

[0192] **실시예 8. 완충액, 여과된 플라스마, 및 전혈 내로 스파이크된 SBH로부터 아미노 650M 및 아미노 650U에 대한 PrP^{sc} 결합의 비교(Comparision of PrP^{sc} Binding to Amino 650M and Amino 650U from SBH Spiked Into Buffer, Filtered Plasma, And Whole Blood)**

[0193] 아미노 650U는 아미노 650M을 포함하는 다른 비드 크기의 혼합물이며 650M 제조보다 덜 비싸다. 아미노 650U는 내인성 PrP와 현재 사용되는 모든 매트릭스, 완충액, 여과된 플라스마 및 전혈 내에서 PrP^{sc}에 결합하는 능력에 대하여 시험되었고 이것을 스파이크된 전혈으로 시험된 아미노 650M과의 결합과 비교하였다. 상기 실험은 스파크된 완충액, 플라스마, 및 전혈의 PrP^{sc}의 아미노 650U에 대한 결합을 비교하고 플라스마 및 전체혈액으로부터 아미노 650U에 대한 내인성 PrPc의 결합을 안정시키도록 디자인되었다. 추가적으로, 상기 실험은 PrP^{c}의 제거에서 루코여과(leukofiltration) 효과를 결정하도록 디자인되었다. 스파이크된 완충액은 작동 완충액에 뇌 균등질(brain homogenate)을 첨가한 것이다. 스파이크된 전혈은 인간 또는 햄스터 전혈에 뇌 균등질을 첨가한 것이다

[0194] 플라스마 또는 전혈에서 존재할 때 650U 또는 650M에 의한 프리온 제거에는 신호에 차이가 없었다. 아미노 650U 및 650M 은 동일하게 기능을 수행한 것으로 결론지어졌다. 루코여과에 의해 제거된 PrP^{c}의 함량은 혈소판 및 백혈구 내에서 평가된 것보다 많다. 그러므로 루코여과가 또한 플라스마-유도된 PrP^{c}의 일부를 포획했다는 것이 가능하다. 루코필터는 인간 및 햄스터 플라스마-유도된 PrP^{c} 의 포획에 관하여 다르게 행동하였다는 것으로 나타났다. 햄스터 플라스마 PrP^{c} 는 필터로 포획되지 않은 반면에 인간 PrP^{c}는 필터로 포획될 수 있다. 결국, 두 결과들의 차이는 PrP^{c}과 감염성 사이의 상관관계가 없다는 것일 것이다.

[0195] 루코여과에 의해 제거된 PrP^{c}의 함량은 혈소판 및 백혈구 내에 함께 평가된 것보다 많았다. 그러므로 루코여과는 또한 플라스마-유도된 PrP^{c} 의 일부를 포획할 수 있었다. 루코필터는 인간 및 햄스터 플라스마-유도된 PrP^{c} 의 포획에 관하여 다르게 행동하였다는 것으로 나타났다. 햄스터 플라스마 PrP^{c} 는 필터로 포획되지 않은 반면에 인간 PrP^{c}는 필터로 포획될 수 있다. 결국, 두 결과들의 차이는 PrP^{c}과 감염성 사이의 상관관계가 없다는 것일 것이다.

[0196] **실시예 9: 햄스터 뇌 PrP^{sc}의 AMN 수지에 대한 결합(Binding of Hamster Brain PrP^{sc} to AMN Resins)**

[0197] 결합의 비교예는 일련의 수지(예를 들어, AMN-13, 14, 15, 16 및 17, 아미노 650M 및 아미노 650U)에 대하여 수행하였다. AMN 시리즈는 다음과 같이 아미노 치환체를 변화시켜 650U(새롭게 650C-생성물로 정해짐) 샘플에 관한 것이다.

[0198] AMN-13; 0.094eq/L

[0199] AMN-14; 0.078eq/L

[0200] AMN-15; 0.072eq/L

[0201] AMN-16; 0.063eq/L

[0202] AMN-17; 0.098eq/L

[0203] 상기 수지는 스파이크된 완충액, 플라스마, 및 전혈의 PrP^{sc}에 결합되었다. 상기 결과들은 모든 AMN 수지들이 스파이크된 완충액 및 스파이크된 전혈 둘 다를 가지고 시험될 때 동등하게 잘 결합한다는 것을 나타내었다. 게다가, AMN 수지와의 신호는 아미노 650M 및 650U 과의 것과 같다. 스파이크된 플라스마로부터 PrP의 수지 결합을 비교하면 모든 다른 수지들에 비하여 아미노 650M으로부터 약간 더 강한 신호가 있었다. AMN중에서 수지 #13이 약한 PrP 신호를 갖는 것으로 나타났으나, 아미노 650U에 비교할만 한 반면에 #15, 16, 17은 모두 아미노 650U 보다 더 낮게 수행하였다. AMN 14, 15, 16, 17 수지들 사이에 주목할만한 차이는 없었다.

[0204] 결론적으로, 상기 연구는 수지들 사이의 더욱 밀접한 유사성을 나타내었으며 가장 중요하게는 아미노 650M 보다 650U와 더 밀접한 상관관계를 나타내었다. 플라스마로 관찰된 차이점들은, 적어도 치환체의 정도를 감소시킨 것이 유리하며 수지가 아미노 650M 에 더 밀접하게 행동한다는 것을 암시하였다.

[0205] **실시예 10: 수지-포함된 막들에 결합된 단백질으 추출 및 정상 햄스터 뇌 균등질의 PrPc의 결합의 결정 (Extraction of Proteins Bound to Resin-Embedded Membranes and Determination of Binding of PrP^{c} from Normal Hamster Brain Homogenate)**

[0206] 수지 함침된 캘린더된 막을 사용하는 새로운 장치의 개발로 상기 수지로부터 결합된 단백질의 추출을 위한 새로운 방법을 개발할 필요성이 대두되었다. 변화는 조성물, 농축액 및 추출 용매의 부피뿐만 아니라 물질의 처리에 대하여 이루어져야만 한다. 상기 실험은 또한 토요펄 아미노 650M 수지-함침된 막 및 그의 완전히 아세틸화된 형태를 사용하여, 새로운 포맷으로 결합 평가를 수행하도록 디자인 되었다.

[0207] 정상 햄스터 뇌 균등질(HaBH)는 사코실(sarkosyl)로 처리하고 중지하였다. 얻어진 탈리액을 작용 완충액 또는 인간 전혈을 사용하여 1%의 최종 농도로 희석하였다. 스파이크된 용액의 50ml를, 4mg/cm^2의 크로마토그래피 수지 최대 용량, 또는 토요펄 아미노 650M 또는 그의 완전히 아세틸화된 형태의 대조군으로서 동일한 수지의 축소된 치환체 용량으로, 함침된 캘린더된 막 4개 샌드위치를 포함하는 47mm 스윈넥스 필터 홀더(밀리포어)를 통과시켰다. 사용된 흐름 속도는 0.5mL/min이었으며 연동 펌프를 사용하였다. 각 5mL씩 10개를 각 스파이크된 용액 및 막 형태에 따라 각각 수집하였다. 스파이크된 완충액으로 시험된 두 개 막들의 유통 샘플을 ELISA로 분석하였다. 수지적으로 아세틸화된 수지를 포함하고 스파이크된 전혈으로 시험된 막을 작용 완충액으로 세정하였다.

[0208] 막의 일부(경우에 따라선 전체 층)을 SDS PAGE 샘플 완충액 또는 99% 포름산으로 처리하였다. 포름산의 처리는 99% 포름산 0.5ml와 20% SDS 10㎕를 막 샌드위치의 1/4에 첨가하고, 이어서 액체의 제거 위해 1시간 동안 배양, 스피드백(SpeedVac)을 사용하여 증발하는 것으로 이루어졌다. 상기 샘플들은 물을 사용하여 15㎕로 부피를 조정하고, 이어서 2X 샘플 완충액 15㎕ 를 첨가하였다. 샘플 완충액의 처리는 3mL의 1X 샘플 완충액을 모든층의 막에 첨가하고, 이어서 30분 동안 배양하고 7분동안 가열하는 것으로 이루어졌다. 상기 용액은 막을 프레스하지 않고 거두었으며, 짧게 원심분리하여 모든 수지를 제거하였다. 상기 처리의 변화를 또한 시험하였다. 이것은 1ml의 2X 샘플 완충액을 필터의 1/4에 해당하는 별도의 분리된 층의 막에 첨가하고, 1 시간 배양하고, 이어서 그들중 하나만 가열하는 것으로 이루어진다. 가열없이 샘플 완충액으로 용리하는 것은 필터 홀더를 해체하면 감염력을 이용시 너무 큰 위험이 될 때 사용될 수 있다.

[0209] 시험된 최종 조건은 접종 용액(challenge solution)와 접촉하는 제1, 제2, 제3 및 제4막에 대한 결합을 검증하기 위하여 샘플 완충액으로 막의 1/4을 배양하는 것이다. 샘플들을 SDS-PAGE 겔 상에서 운전하고 총 단백질에 대하여 얼룩지어졌다. 웨스턴 블랏을 또한 수행하였다. 필터 홀더의 공극 부피는 약 7mL이었다. 필터, 각각을 통해, 이어서 공기를 통해 접종 용액 50ml를 통과시킨 후, 회수된 부피는 전혈에 대하여 45 및 47ml이었다. 스파이크된 완충액을 사용할 때, 회수된 부피는 46 및 46ml 이었다. 다른 접종 용액을 사용할 때 특별히 주목할만한 큰 차이는 없었다.

[0210] 열려지는 제1 필터 홀더는 스파이크된 전혈으로 접종된 완전히 아세틸화된 토요펄을 갖는 막을 포함하는 것이었다. 공기 통과 및 완충액으로의 세정에도 불구하고 여전히 필터 내부에 혈액 일부가 남았다. 완충액으로 막을 세정하려는 동안, 수지의 다량 손실이 발생하였고 막을 폐기하였다.

[0211] 전혈으로 접종된 토요펄 아미노 650M을 사용한 필터 홀더를 과량 200ml 완충액으로 세정하였다. 상기 흐름 속도는 맥스(상세히 999) 보다 더 높았다. 홀더를 열었을 때 여전히 내부에 혈액이 남아있는 것이 주목되었으며, 특히 층들 사이에 남아있는 것이 주목되었다. 방사 분배기(radial distributor)로 윤곽이 형성된 한쌍의 부분들이 세척동안 우회된 것이 또한 발견되었다.

[0212] 막 층을 4개로 절단하였다. 한 조각들은 4개의 분리된 층을 가지며 샘플 완충액으로 처리되어 만약 층들이 다른 결합을 갖고 있는지 조사하였다. 다른 1/4을 또한 조각으로 분리하여 포름산 처리를 하였다. 남은 두 개의 1/4 조각들을 가열 여부에 따른 처리를 비교하기 위하여 사용하였다.

[0213] 스파이크된 완충액으로 접종된 두 개의 필터를 20mL의 작용 완충액 각각으로 세정하였다. 상기 필터를 열고 전체 층들을 작은 유리 바이알(vial)로 옮기고 이에 3ml의 샘플 완충액을 첨가하였다.

[0214] 캘린더 막에 함침된 수지는 컬럼 포맷내에서 동일한 PrP 결합 성질 특성을 유지하는 것으로 나타났다. 완전히 아세틸화된 아미노는 아미노 신호에 비하여 더 약한 막-결합된 PrP 신호를 나타내었으며, 이는 완전히 아세틸화된 아미노는 Prp와 충분히 결합하지 않을 수 있다는 결론을 암시한다. 대체적으로 상기 결과들은 혼합형이나 또는 화학적 합성에 의한 50% 아세틸화가 PrP^{res} 결합을 감소시킨다는 것을 나타내었다.

[0215] **실시예 11: 입자 함침된 막을 포함하는 필터에 대한 정상 햄스터 뇌 균등질의 PrP^{c}의 결합(Binding of PrP^{c} From Normal Hamster Brain Homogenate To Filters Containing Particle-Impregnated Membranes)**

[0216] 다음 실험은 수지 입자를 포함하는 막에 의한 정상 햄스터 뇌 균등질(NBH)의 정상 PrP(PrP^{c})의 결합을 나타낸다.

[0217] 이전 실시예에서 기술된 용리 방법을 본 샘플에 적용하였다. 필터를 열고, 막을 유리 바이알에 넣고 NuPage 샘플 완충액 2ml(Invitrogen corporation, Carlsbad, CA)로 혼합하면서 배양하였다. 상기 바이알을 가열하고 필터 밖으로 나온 수지를 수집하였다. 상기 용리된 단백질의 웨스턴 블랏의 결과는 상기 방법이 막으로부터 PrP를 용리하였다는 것을 나타내었다. 상기 결과들은 또한 수지 없는 필터보다 수지 결합된 필터가 더 PrP와 결합한다는 것을 나타낸다.

[0218] **실시예 12: 입자 함침막을 포함하는 필터에 대한 스크래피 뇌 균등질의 PrP^{c}의 결합(Binding of PrP^{c} From Scrapie Brain Homogenate To Filters Containing Particle-Impregnated Membranes)**

[0219] 다음 실험은 전혈 및 완충액 내로 스파이크된 감염성 햄스터 뇌 균등질(SBH)의 PrPsc과 결합하는데 있어서 필터 성능을 나타낸다. 상기 필터는 용량 감소된 수지뿐만 아니라 완전한 용량의 수지로 함침된 막을 포함하며, 대조군으로서 수지 없는 것 사용하였다.

[0220] 용리는 NuPage 샘플 완충액(실시예 10에 기술된 추출에 따름) 2ml를 주입하는 것으로 이루어졌다. 용리된 단백질의 웨스턴 블랏은 PK(단백질 키나아제) 없을 때 강한 신호 그러나 PK 있을 때 약한 신호를 나타내었다. 단백질을 2%SDS로 용리하였기 때문에, 상기 PK 침지(digestion)는 0.2% SDS(표준 절차) 대신에 2% 세제 농도하에서 수행하였다. PK를 사용한 PrP^{res} 의 약한 신호는 반응혼합물에서 과량의 SDS로 인한 것 같다. 상기 결과들은 수지 사용하지 않은 막은 더 약한 신호를 나타내나, 모든 시험된 다른 수지에 대해서는 유사한 신호강도를 나타내었다. 완전한 용량의 수지 그리고 수지 없이 완충액 및 전혈 내의 SBH들 사이에는 큰 차이가 없었다. 감소된 용량의 수지는 스파이크된 혈액에 비하여 스파이크된 완충액일 때 더 강한 신호를 나타내었다.

[0221] **실시예 13: 기본형 필터의 시험(Testing of Prototype Filter)**

[0222] 실시예에서, 상기 필터를, 최종 장치에 유사한 구성으로, 플라스틱 케이스에 조립하고 함께 용접하였다. 그러한 장치의 성능을 여러가지 접종, 스파이크 및 비스파이크를 사용하여 평가하였다. 한 실시예에서, 최종 장치는 비캘린더 막(1-25 또는 그 이상) 층과, 이어서 상기 비캘린더된 막의 1-25층 사이에 수치 함침된 막의 여러층(1~50, 장치의 원하는 용량에 따라 다름)을 포함하는 단단하거나 유연한 플라스틱 케이스로 구성되었다. 상기 필터들을 초음파 절단기/봉합기를 사용하여 또는 가열 및 가압을 동시에 행하는 프레스를 사용하여 함께 용접하

였다. 이 실시예에서는 열과 가압을 사용하였다.

[0223] 햄스터 뇌 균등질을 0.5% 사코실로 처리하고 완충액, 여과된 플라스마, 및 전혈으로 100배 희석하고 수지에 대한 접종(challenge)로서 사용되었다. 상기 수지는 80ml 샘플을 0.5ml/min의 속도로 연동 펌프를 사용하여 접종되었다. 수지 결합된 PrP^{res} 샘플들의 웨스턴 블랏을 PK 침지(digestion) 없이 수행하였다. 상기 결과들은 막들이 완충액 및 플라스마에서 스파크로 잘 수행되나 혈액내 동일한 스파크로는 감소된 것으로 나타났음을 보여준다.

[0224] **실시예 14: 일련의 필터 장치에 의한 스파크된 RBCC로부터 PrP 제거(Removal of PrP from Spiked RBCC By A Series of Filter Devices)**

[0225] 본 실험은 입자 함침된 장치를 포함하는 장치를 사용하여 스파이크된 적혈구 농축액(red blood cell concentrate:RBCC)에서 PrP를 제거하는 것을 나타낸다. 상기 장치가 과량의 목적 단백질로 접종되었기 때문에, 일련의 장치가 사용되었다. 사용된 RBCC의 총 부피는 1 장치와 등가이다.

[0226] 모든 여과는 두드러진 문제없이 진행되었고 펌프가 모든 여과에 사용되었다. 모든 필터는 부드러운 케이스를 갖고 누출에 대하여 사전 시험되었다. 사전 시험 및 실제 실험에서 누수된 필터는 없었다. 여과시간은 RBCC(~300ml)의 1 단위 각각에 대하여 약 10분이었다. 필터를 460ml의 작용 완충액(시트레이트)로 세척하였다. 세척 단계의 효율은 세척후 필터 색을 검사하는 것으로 경험적으로 평가하였다.

[0227] 세척후, 상기 필터에 공기를 주입하여 필터 내 모든 액체를 제거하였다. 상기 필터를 용리를 위하여 ~4.6ml 샘플 완충액으로 처리하였다(필터의 한 측면에 주입). 샘플 완충액을 수집하고 필터의 다른 측면에 주입하였다. 상기 단계를 3번 수행하였다. 상기 결과는 PrP^{res} 가 필터 1을 빠져나오고 필터 2에서 포획된 것으로 예상된 것으로 나타났으며, 이는 접종된 것이 1개 필터 세트의 용량을 초과하였기 때문이다. PrP^{res}는 또한 필터 3의 용출물에 또한 존재할 수 있으나 웨스턴 블랏의 검출 한계 이하에 있다. 제1 PRDT 감염력 연구에서 RBCC에 대한 것에 비하여 이들 결과는 상기 필터들이 컬럼 포맷에서 사용된 동일한 수지만큼 잘 수행하였다는 것을 나타낸다. 사전연구에서와 같이, 과량의 PrP^{res}는 필터를 관통하였고 모든 PrP^{res}가 제1 필터에서 포획되지는 않았다는 것은 놀라운 일이 아니다.

[0228] **실시예 15: 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 테레프탈레이트, 목화 및 나일론 기질 상에 글리시딜메타크릴레이트의 이식(Grafting glycidylmethacrylate on polypropylene, polyethylene, terephthalate, cotton and nylon substrates)**

[0229] 이식은 폴리머의 표면 성질을 변화시키는 효율적인 방법이다. 기질의 우수한 기계적 성질과 함께 특이성 리간드를 꼬리로 갖은 이식된 폴리머는 단백질 결합을 위한 가장 다양한 방법을 이식하며, 이것을 응용하기 위해서는 때때로 충분한 기계적 강도뿐 아니라 리간드를 변화시킬 필요가 있다. 이러한 실시예에서, 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET), 목화 및 나일론 기질상에 글리시티딜메타크릴레이트(GMA)를 이식하는 것은 인간 혈액으로부터 PrP^{c}를 제거하는 본 연구를 이용할 수 있는 가능성을 보여주기 위하여 수행되었다.

[0230] **절차:**

[0231] 본 시험에 사용된 기질은 목화 직포 직물, 나일론 직포 직물, PP 부직포 직물, PP 부직포 막(마코파마 PP175), PP 섬유 및 PET 섬유(the College of Textile at NCSU)를 포함한다.

[0232] 이식을 다음 단계로 수행하였다:

[0233] 1. 샘플을 아세톤으로 세 번 세척하였다;

[0234] 2. 샘플을 3 시간 이상 진공하에서 건조하였다.

[0235] 3. 샘플을 750W에서 15초 동안 아르곤 플라스마로 처리하였다;

[0236] 4. 샘플을 30분 동안 공기에 노출하였다;

[0237] 5. 샘플을 6시간 동안 UV 챔버의 10% GMA 용액에 침지하였다. 상기 UV 강도는 1.1W/m^2이었다. 챔버의 온도는 30℃이고 샘플 랙(sample rack)의 온도는 60℃ 이상이었다.

[0238] 6. UV 폴리머화후에, 샘플을 3 번동안 아세톤으로 세척하였다;

[0239] 7. 샘플을 진공 오븐에서 건조하였다.

[0240] 이 단계에서, 샘플을 체중 증가 및 IR 스펙트럼에 대하여 분석만하였다. 분석후, 이식된 PP 부직포 직물 및 PP 부직포 막을 60℃에서 밤새 암모니아 수화물 용액에서 더 아민화하였다. 이 샘플들을 세척하고 원소 분석(elemental analysis)를 위해 건조하였다.

[0241] **결과:**

[0242] 중량 측정 및 IR 현미경의 결과로부터, PP 기질은 목화, 나일론 및 PET등 다른 기질보다 매우 더 좋은 이식 결과를 보여준다. PP 섬유, PP부직포 및 PP 부직포 막(마코파마), 3가지 타입의 PP 기질을 시험하였다. 이식후 체중 증가는 각각 85%, 154% 및 57% 이었다(표 6). 이들 값들은 다른 기질의 것(-3% 내지 4%)보다 더 많이 높다. 이들 결과들을 IR 스펙트럼으로 더 확인하고, 여기서 이식된 PP계는 카르보닐기에 관련된 1720cm^{-1}에서 그리고 에폭시드기(epoxide group)와 관련된 845 및 910cm^{-1}에서 강한 피크를 나타낸다. 다른 기질들은 이식후 샘플과 블랭크 샘플을 비교할 때 큰 변화를 나타내지 않았다.

[0243] 여러 가지 기질에 대한 이식의 차이에 대한 이유는 여전히 분명하지 않다. 한가지 가능한 이유는 C-H 결합이 다른 환경에서보다 PP 환경에서 깨어지는게 더 용이할 수도 있다는 것이다. 다른 가능한 이유는 나일론 및 목화 직물 샘플은 우리에게 알려지지 않은 표면 처리를 가질 수 있다는 것이다. 아세톤으로 단순히 세척하는 것으로는 마무리(finishing)를 제거하는데 충분하지 않을 수 있다.

[0244] 원래 PP섬유 및 부직포 막(마코파마 PP175)에 대하여 샘플은 840-920cm^{-1}에서 피크를 나타낸다. 그러나, PP 부직포 직물에서는 어떠한 피크도 나타나지 않았다. 전자의 피크들은 샘플 표면의 산화 결과일 수 있으며, 고온에서 가공한 결과이다.

[0245] IP 스펙트럼으로부터 아민화된 마코파머 샘플은 -OH 및 아민화 결과인 $-NH_2$ 기로 인하여 3400 cm-1에서 더 넓은 피크를 나타낸다.

[0246] **부직포 재료의 표면적의 결정(Determination of surface area of non-woven materials)**

[0247] 부직포 재료의 표면적을 결정하는 것은 부직포를 형성하는 섬유의 복잡한 연결로 인하여 용이한 일이 아니다. 그러나, 단일 섬유의 표면적은 섬유 및 길이의 현미경 상들을 측정하여 정확하게 결정할 수 있다. 그러므로 이론적으로 이식방법으로 동일한 재료의 섬유들을 통해 부직포 재료의 표면적을 측정하는 것이 가능하며, 이는 섬유의 표면 성질이 부직포 재질의 것과 동일하다는 조건하에서이다. 이 방법은 다음 식에 의해 표시될 수 있다.

[0248] $W_t = D(S_f + S_{NW})$

[0249] 여기서 W_t는 이식후 체중 증가, S_f는 섬유 표면적이고 S_{NW}는 부직포 재료의 표면적이다. 식에서 단지 두 개가 미지의 것이다: D 및 S_{NW}, 이는 두 개의 독립된 실험으로 결정될 수 있다.

[0250] 이 방법으로 결정된 면적은 각 타입 반응에 대응하는 효과적인 표면적이다. 실제로, 기질의 표면적에 따른 반응의 정도는 본 발명에 사용될 수 있다.

[0251] **결론:**

[0252] 몇 몇 폴리머 기질 상에 GMA를 이식하는 일차 시험은 PP가 그러한 이식에서 이상적인 기질이라는 것을 나타낸다. PP상에 GMA를 이식하는 체중 증가는 60%~160%으로 PP재료의 형태에 따라 변화한다. 이식 효과는 또한 FTIR 스펙트럼에 의해 확인된다. 게다가, 이식을 기초로, 부직포 재료의 표면적을 측정하기 위한 간단한 방법이

제안되었다.(표 6)

표 6

[0253] 체중 증가에서 측정된 이식의 효과

샘플이름	기질	UV 시간 (hr)	초기 중량 (g)	중량 증가(%)
Co-g-GMA-032905	목화 직포 직물	0.6	0.1283	-1.8
Ny-g-GMA-032905	나일론 직포 직물	0.6	0.1323	-0.7
PP-g-GMA-032905	PP 부직포	0.6	0.1179	1.7
Co-g-GMA-033105	목화 직포 직물	6	0.0954	-2.8
Ny-g-GMA-033105	나일론 직포 직물	6	0.1446	-1.4
PP-g-GMA-033105	PP 부직포	6	0.1537	91
Mac-PP-g-GMA-040805	마코파마 PP 부직포 막	6	0.0668	57
NW-PP-g-GMA-040805	PP 부직포 직물	6	0.0738	154
FB-PP-g-GMA-040805	PP 섬유	6	0.0789	85
FB-PET-g-GMA-040805	PET 섬유	6	0.0517	4

[0254] **실시예 16: PGMA 섬유, 정전방사 피륙, PGMA 이식되고 패드된 PP기질에 의한 PrP^c의 결합(Binding of PrPc by PGMA fibers, electro-spun web, PGMA grafted and padded PP substrates)**

[0255] 목적:

[0256] PGMA 섬유, 정전방사 피륙 및 GMA 이식 및 패드된 폴리프로필렌 부직포에 의한 PrPc의 결합을 결정

[0257] 절차:

[0258] 시험된 재료는 폴리글리시딜메타크릴레이트(PGMA) 용융 방적 섬유(melt spun fibers), PGMA 정전방사 피륙, PGMA 이식 및 패드된 폴리프로필렌(GMA-g-PP) 부직포 직물이었다. 상기 기질들은 College of Textiles at North Carolina State University의 샘플, MacoPharma PP 175, 및 마코파마 PP 235이다. 각 재료에 대하여, 단백질 결합을 위하여 두 개의 복사품을 준비하였다.

[0259] 샘플들을 중량 및 보이는 면적(직물의 측정된 면적) 두 가지로 준비하였다. 2차 방법은 단지, 패드된 마코파마 막과 같은 사각형 샘플에 적용하였다.

[0260] 모든 샘플을 작은 조각들로 절단하였다. 각 샘플을 1% 정상 햄스터 뇌 균등질(HaBH) 5ml를 포함하는 원뿔형 튜브(conical tube)(50ml)내로 침지하였다. 샘플을 30분 동안 흔들리는 플랫폼에서 배양하였다. 그후, 샘플을 흔들리는 플랫폼에 3번 10분 동안 10ml 샘플 완충액으로 세척하였다.

[0261] **결과:**

[0262] 원소 분석으로 결정된 샘플 중량, 면적 및 아미노화를 다음 표 7에 나타내었다

표 7

[0263] 샘플의 원소 분석

이름	중량(g)	N%
PGMA-섬유 A	0.1009	3.8%
PGMA-섬유 B	0.1011	3.8%
PGMA-g-PP A	0.1007	2.6%
PGMA-g-PP B	0.1009	2.6%

PGMA-g-PP(마코175)A	0.1011	1.5%
PGMA-g-PP(마코175)B	0.1010	1.5%
PGMA-p-PP1A	0.1015	이용불가능
PGMA-p-PP1B	0.1007	이용불가능
PGMA-p-PP2A	0.1007	이용불가능
PGMA-p-PP2B	0.1012	이용불가능
PGMA-p-PP3A	0.1012	이용불가능
PGMA-p-PP3B	0.1007	이용불가능
블랭크-부직포-PPA	0.1009	없음
블랭크-부직포-PPB	0.1011	없음
블랭크-마코 175 A	0.1011	없음
블랭크-마코 175 B	0.1006	없음
650MA	0.1016	0.6%
650MB	0.1011	0.6%
정전방사 A	0.1001	이용불가능
정전방사 B	0.1005	이용불가능
	면적(cm2)	
PGMA-p-PP(마코235)6A	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)6B	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)7A	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)7B	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)9A	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)9B	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)10a	4x4	이용불가능
PGMA-p-PP(마코235)10B	4x4	이용불가능
블랭크 -마코 235A	4x4	이용불가능
블랭크-마코 235B	4x4	이용불가능

[0264] 웨스턴 블랏의 결과를 기초로 PGMA 이식된 PP 및 PGMA 패드된 PP 둘다 프리온과 결합한다.

[0265] **등가(EQUIVALENTS)**

[0266] 여기 설명적으로 기술된 본 발명은 여기에 구체적으로 개시된 어떤 원소나 원소들, 제한이나 제한이 없는 경우 적절하게 실시될 수도 있다. 여기 사용된 용어나 표현은 설명적 용어로서 사용되며 제한이 아니며, 그러한 용어의 사용과 표현은 나타나고 기술된 특징들의 등가물들을 배제하고자 하는 것이 아니며, 본 발명의 범위 내에서 여러가지 변형이 가능한 것으로 인식된다. 그러므로 본 발명이 구체적으로 여기에 개시되어 왔지만, 여기 개시된 개념의 선택적 특징, 변형 및 수정은 당업자에게 재분류될 수 있으며, 그러한 변형과 수정은 첨부된 청구범위에서 정의된 본 발명의 범위 내인 것으로 판단된다.

[0267] 여기 논의된 모든 참조문헌들은 참조로서 통합된다. 당업자는 본 발명을 여기 그 자체의 목적뿐만 아니라 언급된 목적과 이점을 달성하기 위하여 그리고 목적을 수행하기 위하여 용이하게 잘 적용할 것이다. 본 발명은 기술적 범위나 필수적 구성에서 벗어나지 않고서도 다른 구체적인 형태로 구현될 수 있다. 오히려, 본 명세서를 읽은 후, 여러 가지 다른 구현예, 변형 및 등가의 것들을 재분류해야 한다는 사실은, 본 발명의 기술적 사상 및 첨부된 특허청구범위를 벗어나지 않고도, 당업자에게 분명히 암시되고 있다는 것이 명백하다.

산업상 이용 가능성

[0268] 본 발명은 샘플로부터 목적 인자을 제거하는 방법 및 장치에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생물학적 샘플로부터 병원체(pathogens)의 제거에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 제1도는 수지 함침된 부직포 직물(resin impregnated nonwoven fabrics: RINs)에 대한 개략적 표시를 도시한 것이다. 상기 부직포 직물은 약 12㎛ 구멍크기를 가지며 다공성 수지 지지체로 함침되어 있다. 평균 구멍 크기

는 적혈구가 어떠한 손상 표시를 나타내지 않고 장치를 통해 자유롭게 흐를 수 있을만큼 충분히 크다. 입자들(10), 섬유들(20), 함침된 입자들(11) 및 부직포 직물(21)는 여기에 도시된다.

[0024] 제2도는 부직포 또는 직포 직물의 사각형 시트로 구성된 장치를 개략적으로 표시한 것을 도시한 것이다. 엇갈린 배열의 부직포 또는 직포 직물의 양측면을 친화성 리간드로 코팅한다. 상기 샘플들은 상기 시트들 사이에 구불구불한 경로(tortuous path)로 흐른다. 상기 시트의 구멍 크기는 원하는 응용형태에 따라 조절된다.

[0025] 제3도는 수지 있는, 150F, 100 파운드 퍼 리니어 인치(pound per linear inch:PLI)로 캘린더 처리된 샘플 13 내부/내부 층의 스캐닝 전자 현미경 사진을 도시하고 있다. 상기 현미경 사진은 50X 확대로 샘플 13의 포켓 에어리어(pocket area)를 나타낸다.

[0026] 제4도는 수지 있는, 180F, 및 400PLI에서 캘린더 처리된 샘플 11 내부/외부 층과 수지의 스캐닝 전자 현미경 사진을 도시한 것이다. 상기 전자 현미경 사진은 50X 확대로 샘플 11의 포켓 에어리어를 나타낸다.

[0027] 제5도는 다른 수의 막(다공성 매트릭스) 층에 대해 수집된 12 분획물의 마이크로 비씨에이 분석(Micro BCA assay)의 결과를 나타내는 바그래프(bargraph)를 도시한 것이다. 다른 β-락토글로블린 농도들이 1층의 수지-포함된 막("수지"라 표지) 또는 1층의 막("대조군"이라 표지)을 관통하는 용액의 유통 분획에 나타났다.

[0028] 제6도는 다른 수의 막층에 대해 수집된 12 분획물의 마이크로 비씨에이 분석의 결과를 나타내는 바그래프를 도시하고 있다. 다른 β-락토글로블린 농도들을 2 층의 수지-포함된 막("수지"라 표지) 또는 2 층의 막("대조군"이라 표지)을 관통하는 용액의 유통 분획물에 나타내었다.

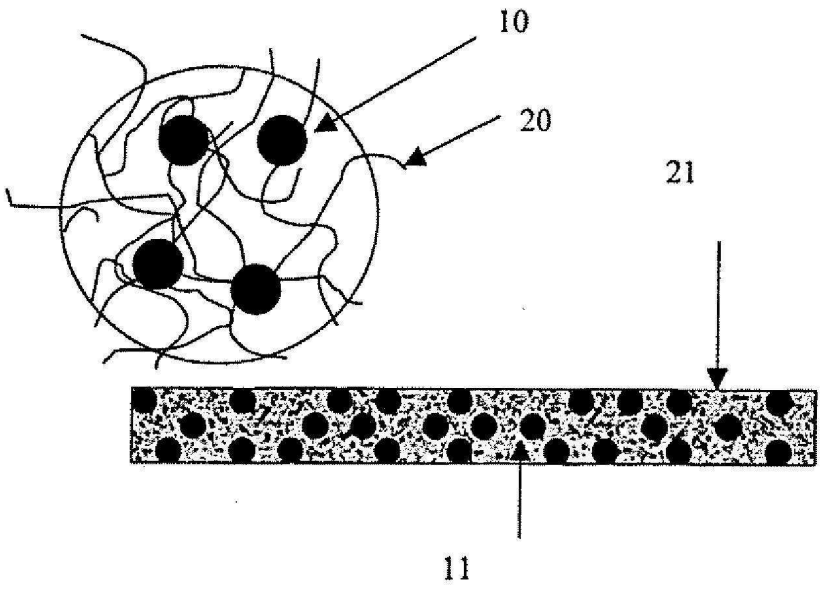
[0029] 제7도는 다른 수의 막층에 대해 수집된 12 분획물들의 마이크로 비씨에이 분석의 결과를 나타내는 바그래프이다. 다른 β-락토글로블린 농도들이 3층의 수지-포함된 막("수지"라 표지) 또는 3 층의 막("대조군"이라 표지)을 관통하는 용액의 유통 분획물들에 나타내었다.

[0030] 제8도는 다른 수의 막층에 대해 수집된 12 분획물들의 마이크로 비씨에이 분석의 결과를 나타내는 바그래프이다. 다른 β-락토글로블린 농도들을 4층의 수지-포함된 막("수지"라 표지) 또는 4 층의 막("대조군"이라 표지)을 관통하는 용액의 유통 분획물들에 나타내었다.

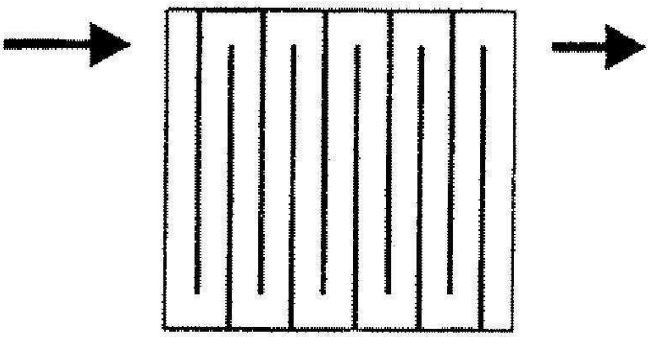
[0031] 제9도는 막 롤 상의 입자들의 분포도를 도시한 것이다. 수지 입자들은 막의 말단에 넘치지 않고 바닥 막에 균일하게 분산되었다.

도면

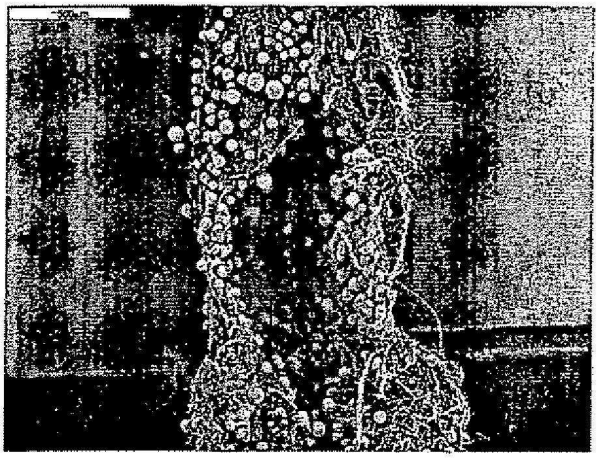
도면1



도면2



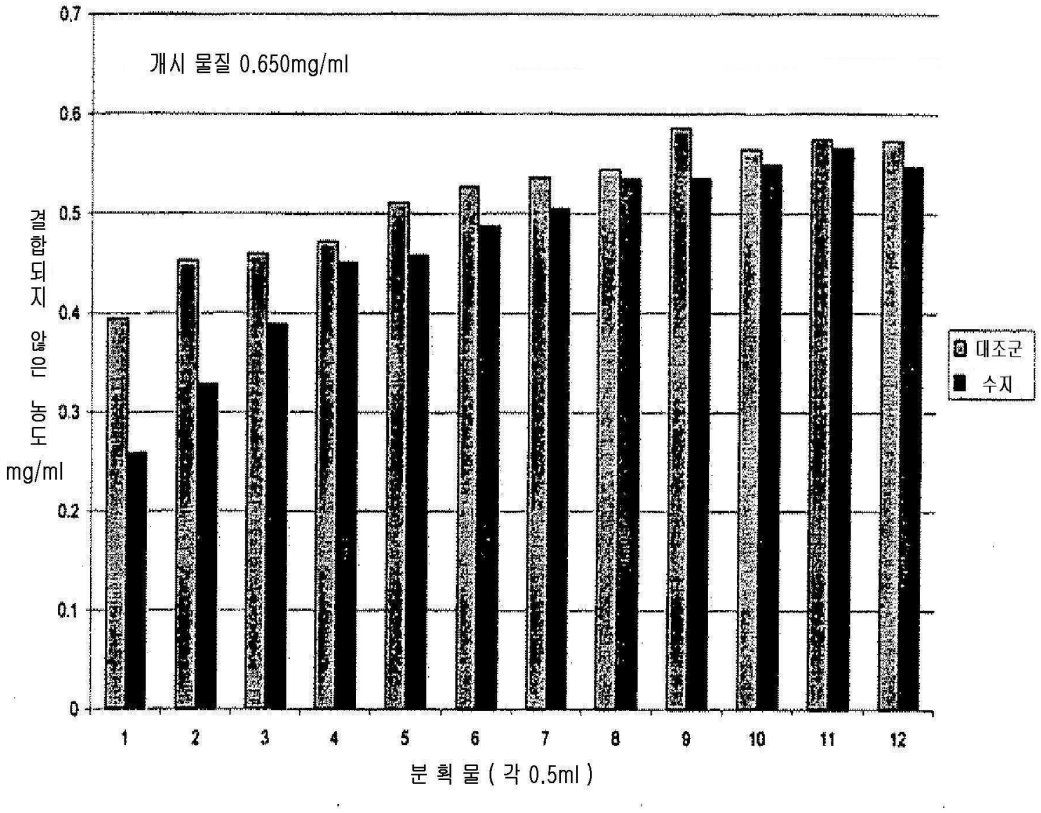
도면3



도면4

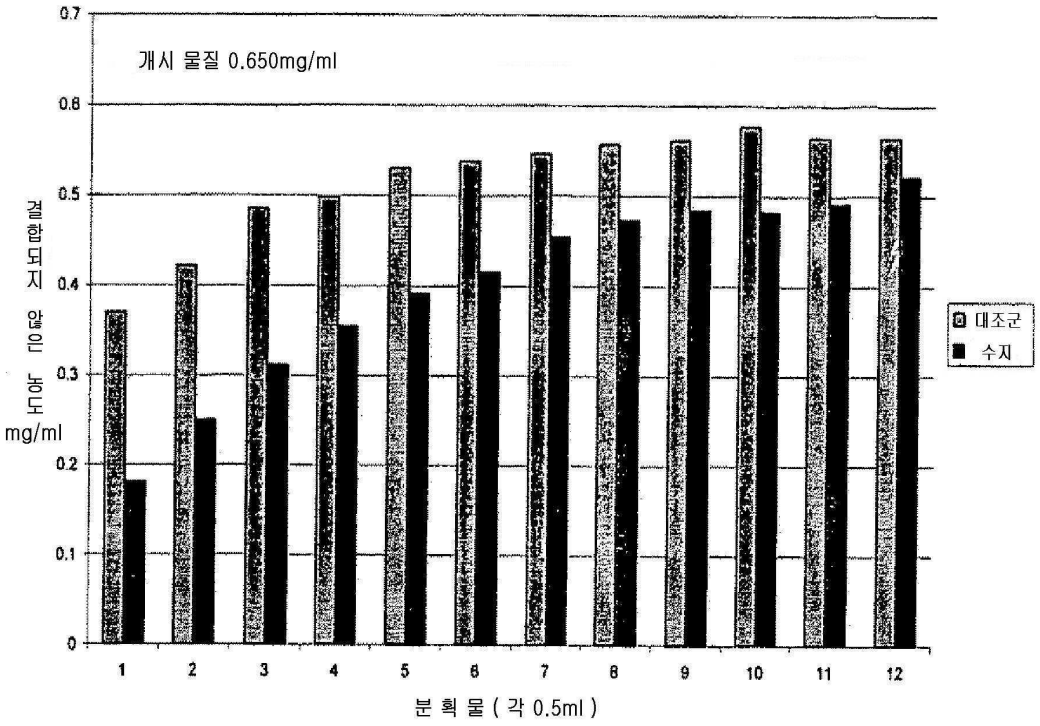
도면5

1 층


개시 물질 0.650mg/ml
결합되지 않은 농도 mg/ml
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
분 획 물 (각 0.5ml)
대조군
수지

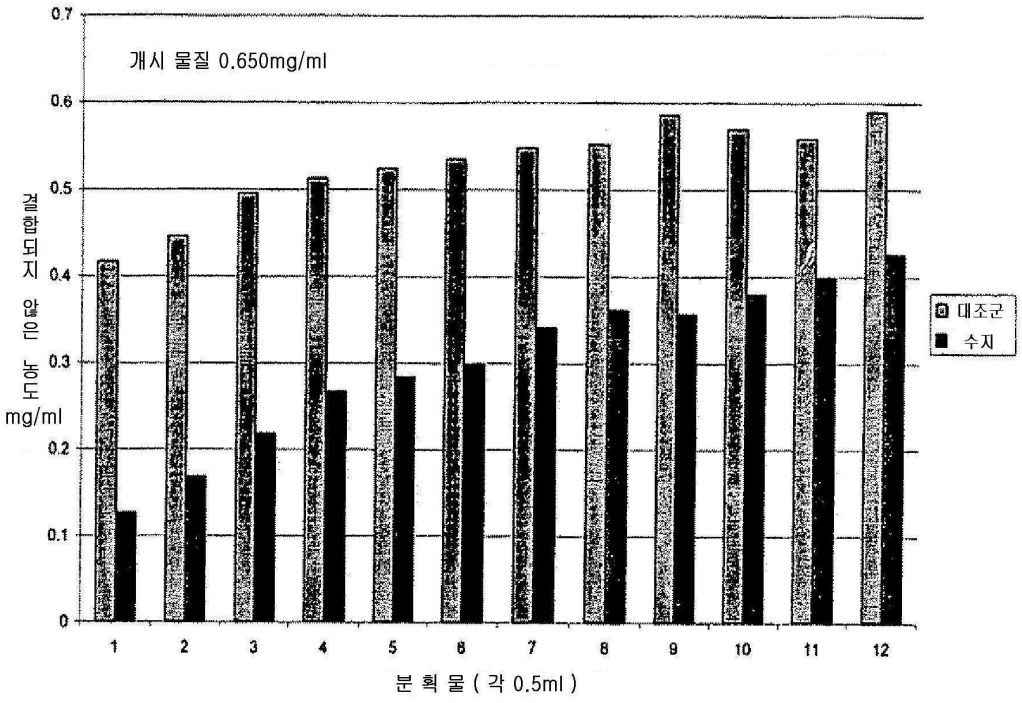
도면6

2 층

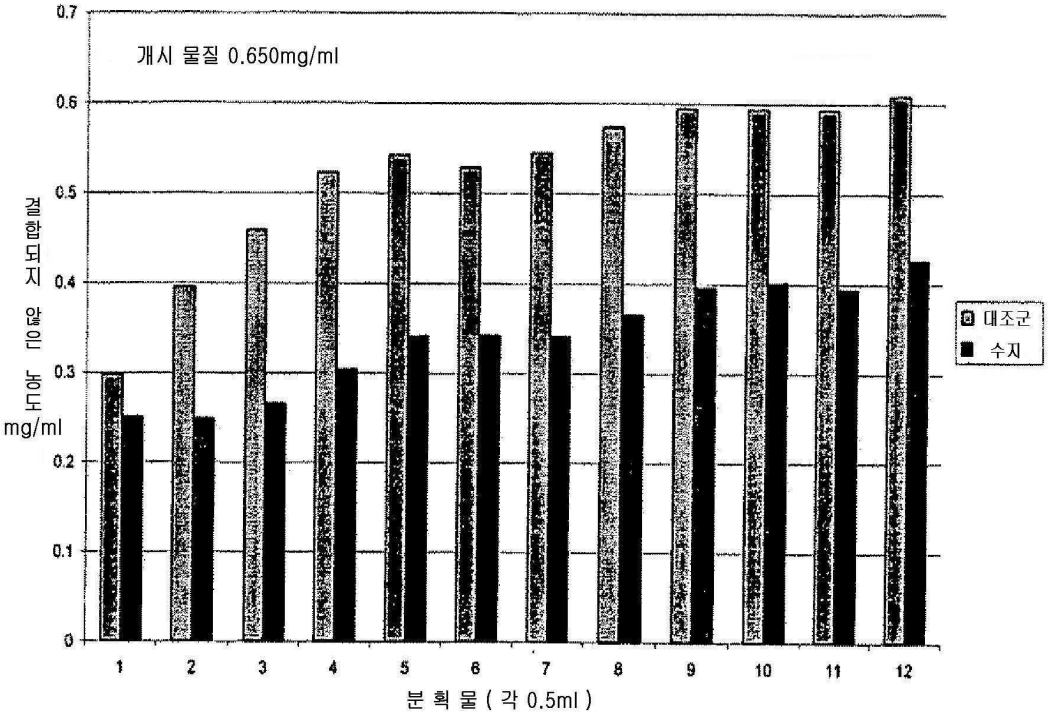
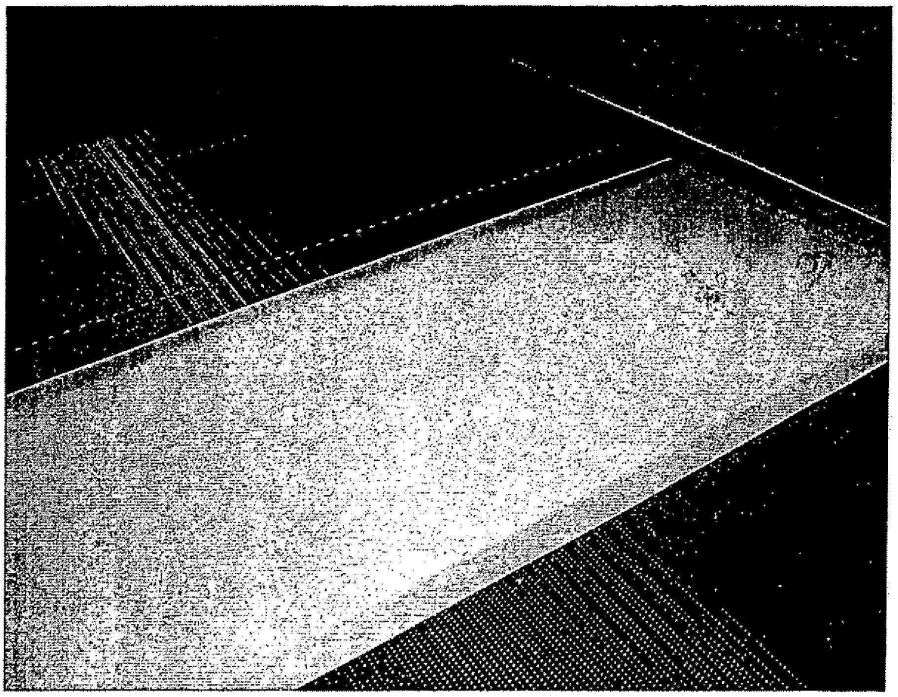

개시 물질 0.650mg/ml
결합되지 않은 농도 mg/ml
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
분 획 물 (각 0.5ml)
대조군
수지

도면7

3 층


개시 물질 0.650mg/ml
결합되지 않은 농도 mg/ml
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
분획물 (각 0.5ml)
대조군
수지

도면8


4 층
개시 물질 0.650mg/ml
결합되지 않은 농도 mg/ml
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
분 획 물 (각 0.5ml)
대조군
수지

도면9