

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C03C 25/00(45) 공고일자 1993년07월14일
(11) 공고번호 특 1993-0006326

(21) 출원번호	특 1986-0005109	(65) 공개번호	특 1987-0001126
(22) 출원일자	1986년06월26일	(43) 공개일자	1987년03월11일

(30) 우선권주장 P3523969.7 1985년07월04일 독일(DE)
 (71) 출원인 브링거 만하임 게엠베하 다음, 포우케트
 독일연방공화국 6800 만하임 31

(72) 발명자 한스 비엘린거
 독일연방공화국 6940 바인하임 임 랑게반 7
 헬무트 프라이택
 독일연방공화국 6940 바인하임 안 데어 찌이겔휴우데 13
 (74) 대리인 남상욱, 남상선

심사관 : 정상석 (책자공보 제3333호)**(54) 응고에 종립인 친수성 유리섬유****요약**

내용 없음.

대표도**도1****명세서**

[발명의 명칭]

응고에 종립인 친수성 유리섬유

[도면의 간단한 설명]

제1도는 시험스트립의 구성을 나타내는 도면.

제2도는 프로트롬빈 시간에 대한 퍽크 %를 나타낸 도면.

* 도면의 주요부분에 대한 부호의 설명

- | | |
|------------------|------------------------|
| 1 : 폴리스티렌 담체호일 | 2 : 접착제 |
| 3 : 나일론망 | 4 : 본 발명에 따른 유리섬유 플리이스 |
| 5 : 산화 매트릭스 | 6 : 제제 매트릭스 |
| 7 : 폴리카보네이트 덮개호일 | |

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 응고에 종립인 친수성 유리섬유, 그의 제조방법 및 혈액으로 부터 혈장을 분리하기 위한 제제에 관한 것이다.

유럽특허 공보 제 00 45 476호는 간단한 방법으로 전혈로부터 성분물질을 측정할 수 있게 만드는, 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 분리하기 위한 제제 및 방법을 기술하고 있다. 이 특허명세서에 따르면, 2.5 μ이하의 섬유직경을 가진 유리섬유의 층을 통해 전혈이 흘러가게 함으로써 혈장이 적혈구로부터 분리되어질 수 있으며, 이 유리섬유는 적혈구를 걸러낸다. 이것에 의해 혈액은 바람직하게는 직사각형의 유리섬유 플리이스(fleece)의 한끝에 붙고, 이곳으로부터 혈장이 모세관 현상으로 다른 지역으로 운반된다. 혈장을 얻는 과정후, 혈장이 담긴 유리섬유 플리이스의 부분위에, 파라미터(parameter)가 확산 반사율의 측정을 통해 결정되게 되는 검출반응이 수행되는 반응에 필요한 시약을 함유하는 매트릭스(종이, 흡착필름등)가 압착된다.

이 간단한 혈장수득 및 혈장운반계는 지혈학적 문제의 경사범위에서 결정되어지는 파라미터를 제외

하고는 모든 임상화학적으로 중요한 파라미터에 대해 사용될 수 있다. 원칙적으로, 비처리된 유리가 혈액 또는 혈장의 응고에 영향을 주기때문에, 응고분석은 실리콘 수지의 피복에 의해 비활성화되는 합성수지 용기 또는 유리용기에서 수행된다는 것을 공지된 사실이다. 따라서, 활성화에 의해, 유리는 혈장 및 정상범위에 있는 응고인자인, 혈장이 프로트롬빈 시간을 단축시킨다. 낮은 비율의 혈장의 경우, 프로트롬빈 시간은 응고인자의 비활성화에 의해서 연장된다. 특히, 이것에 의해 유리는 제V인자 및 제IIa인자를 비활성화시킨다. 이같은 비활성화 및 이에 따라 인위적으로 연장된 프로트롬빈 시간에 기인하여, 각각의 응고인자의 비율이 바뀌지므로 진단용으로는 사용할수 없다. 퍼센트(쿼크%)로서 주어진 프로트롬빈 시간치는 피브리노겐 농도이외에, 제II, V, VII 및 X인자의 활성도를 포함한다. 건강한 공혈자로부터의 공혈은 100% 혈장으로 정의되며, 생리식염수로 희석함으로써 이에 상응하는 낮은 비율의 혈장이 제조된다. 이러한 연속된 희석방법에 의해, 참조곡선은 환자의 혈장에 대한 프로트롬빈 시간치가 측정되는 것에 근거하여 만들어진다.

그러나, 또한 활성화된 부분적 프로트롬빈 시간(PTT)의 결정은 제X II 및 X I 인자의 비활성화에 의해 악영향을 받는다. 향-트롬빈 III 및 헤파린의 검출은 유리에 의한 트롬빈의 비활성화에 의해 상당히 방해된다.

그러므로, 본 발명의 목적은 분리 및 운반성질의 변화없이 응고에 중립이고 이에 따라 또한 지혈학적 검사용으로 사용될 수 있도록 유럽특허 공보 제 00 45 476호에 따르는 분리 및 전달계를 변형시키는 데에 있다.

특히, 합성수지로 만든 섬유물질의 사용이라는 해결가능성이 있다. 그러나, 적혈구에 대한 분리작용에 대해, 이 섬유물질은 원하는 성질을 가지지 않으며, 부분적으로는, 혈장을고에 상당히 영향을 미친다. 유리가 실리콘 수지 애밀션에 의한 실리콘화에 의해 표면피복될 수 있고, 이것에 의해 응고인자의 영향이 배제된다는 것은 더욱 알려진 사실이다. 그러나, 유리섬유같은 특별한 경우에, 이 실리콘화는 더이상 습식이 일어날수 없도록 표면의 강한 소수성을 유발시키고, 따라서 섬유는 완전히 적혈구 분리 및 혈장운반성질을 상실한다.

놀랍게도, 본 발명자들은 유리섬유표면을 어떤 실란에 의해 화학적으로 변형시켜서, 유리섬유 표면이, 예를들어 유리섬유 플리이스의 흡착을 위해 필요하지만, 응고인자에 대한 영향을 잊게하는, 즉 응고에 중립이 되게하는 친수성을 보유하도록 할 수 있다는 것을 발견하였다.

다음 일반식(I)의 화합물로 유리섬유를 처리함으로써, 즉 알콕시기를 중간분해시켜서 히드록실기를 얻고, 이 히드록실기를 유리섬유표면의 반응위치에 연속반응시킴으로써, 상기 설명한 성질을 갖는 유리섬유가 얻어진다.

본 목적을 위하여 사용한 화합물은 다음 일반식(I)을 갖는다 :



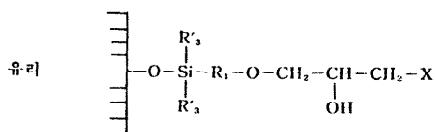
상기식에서, R₁은 C₂ 내지 C₆를 포함하는 알킬렌기이며, R₂는 6개이하의 C원자를 포함하는 알콕시기이며, R₃는 6개이하의 C원자를 포함하는 알킬 또는 알콕시기이다.

유리섬유의 처리는 수용액에서 쉽게 산 조절되는 일반식(I)의 화합물을 사용함으로써 공자의 방법으로 수행된다(FEBS Lett.93, 5-6/1978). 이같은 과정의 경우, 유리표면과 반응하는 반응성 Si-아기가 형성될뿐 아니라, 옥시란 고리가 반응하여 디올이 얻어진다. 알콕시기 R₂를 갖는 실란을 사용할 때, 단일분자층이 얻어진다. 2 또는 3개의 알콕시기를 갖는 실란을 사용할 때, 반응 조건에 따라, 다중축합에 의해서 실란이 서로 반응하므로, 다중피막(1-30층 및 정상적으로 4-12층)이 얻어진다.

유리한 가능성은 임의적으로 약 영기에 의한 촉매작용으로 무수유기용매중의 일반식(I)의 화합물을 위한 유리표면의 피복, 및 수용액중에서의 산 촉매 작용에 의해 디올을 수득하기위한 옥시란 고리의 연속 반응이다(Advan. Chromatogr.21, 48-53/1978). 이 방법에 따라서, 단일분자층 또는 몇몇 실란 분자의 두께를 가지는 층이 형성된다.

또한, 필연적이고 부가되는 경비가 정당화되는 한은, 유리응고에 대해 중립성을 유리하지만 친수성 정도를 변화시키는 리간드를 더 붙이기 위하여, 옥시란기 또는 디올기의 반응성을 이용하는 것이 또한 가능하다. 이것에 의해 강한 이온성 리간드는 응고에 영향을 주므로 배제되지만 아미노산과 펩티드의 결합은 유리할 수 있다. 단일 히드록시 알코올에 의한 옥시란 고리의 가알코올 분해로 보다 소수성인 글리콜 모노에테르가 수득되며, 폴리올에 의한 분해로 친수성 폴리올 화합물이 수득된다.

얻어진 최종 생성물은 하기의 도식적으로 도해된 구조를 갖는다.



상기식에서, R₁은 C₂ 내지 C₆를 포함하는 알킬렌기이고, X는 히드록실기, 하나이상의 히드록실기에 의해 임의적으로 치환된 알콕시기, 또는 아미노산 또는 펩티드 잔기이고, R₃'은 저급알킬기이거나 또는 인접기의 실리콘 원자에 연결된 산소다리거나 또는 유리표면에 연결된 산소다리이다.

이같은 방법으로 변형된 유리/유리섬유는 응고단계 과정동안 중립성을 갖는다.

알킬렌기 R₁은 C₂ 내지 C₆를 포함하는 직쇄 또는 분기쇄일 수 있으며, 실리콘 원자는 적어도 2개의 C 원자에 의해 에테르 산소로부터 분리된다. 알킬렌기 R₁으로서는 에틸렌기 및 프로필렌기가 바람직하다.

알킬 및 알콕시기 R₂ 및 R₃는 6개이하의 C원자를 포함하는 직쇄 및 분기쇄일 수 있으며, 제조하고 반응시키기에 간단한 메틸, 에틸, 메톡시 및 에톡시기가 바람직하다. X가 알콕시기인 한은, 이것은 또한 6개 이하의 C원자를 포함하며, 메톡시, 에톡시, 프로포시, 2-히드록시에틸렌옥시 및 2,4-디히드록시 프로필렌옥시가 바람직한 기이다. 아미노산 및 펩티드 잔기는 그것에 의해 응고단계가 방해되지 않는 사람활성에 존재하는 아미노산 및 펩티드, 특히 일부만으로 부터 유도되는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 유리섬유는 통상의 방법에 따라 하기 실시예에서 설명되는 바와같이, 응고 파라미터를 결정하기위해 제제에 사용될 수 있는 플리이스로 전환된다. 제제에 사용된 유리섬유는 0.2 내지 5 μ, 바람직하게는 0.5~2.5 μ의 평균직경 및 0.1 내지 0.5g/cm²의 밀도를 가질수 있다. 그러나, 이것은 또한 유럽특허 공보 제 00 45 476호에 따라 혈장을 얻기위해 짧은 칼럼의 형태로 사용될 수 있고, 그렇게 얻어진 혈장은 응고시험에서 통상의 방법으로 사용되어질 수 있다. 이것에 의해, 바람직하게는, 섬유는 칼럼에 층을 이루며, 칼럼의 윗부분은 혈액의 도포를 위한 수단이 제공되고 혈장의 제거를 위한 수단이 제공된다.

응고파라미터 결정용 진단제제의 사용 및 혈장의 분리를 위한, 본 발명에 따르는 제제의 추가의 구현은 유럽특허 공보 제 00 45 476호에서 제시한 제제를 참고로하여 유사하게 제조할 수 있다. 그같은 제제에서는, 본 발명에 따른 유리섬유층뿐만 아니라 혈장과 접촉되는 다른 모든 부분이 특히, 당 업자에게 공지된 적합한 합성수지가 사용되는 응고에 중립인 물질로 이루어져야 한다는 것은 명백하다. 그같은 제제에서, 유리섬유층은 바람직하게는 다층 진단제의 최상층이고, 바람직하게는 순서대로 하나 또는 그이상의 시약층과 흡수접촉되거나 또는 접촉할 수 있는 혈장운반층과 흡수 접촉한다.

다음 실시예는 본 발명의 설명을 목적으로 주어진 것이다.

[실시예 1]

응고에 중립인 유리섬유의 제조

산(예를들어, 염산 또는 아세트산)을 가하여 pH 2.0~4.0, 바람직하게는 pH 3.0으로 조절한 물 1ℓ에 5~50g, 바람직하게는 20g의 r-글리시독시프로필 트리메톡시 실란을 가한다. 메탄올을 분해하고 Si-아기를 형성시키기 위해, 혼합물을 혼탁이 더이상 나타나지 않을때까지 교반한다. 반응은 온도를 증가시킴으로써 촉진시킬수 있다. 80°C에서 1시간의 반응시간이 특히 유용한 것으로 입증되었다. 유리섬유 0.5g 내지 10g, 바람직하게는 2g 내지 7g를 이용액에 넣는다. 혼합물을 1시간 내지 4시간, 바람직하게는 1시간동안 교반하면, 이것에 의해 실란은 유리표면에 결합되고 옥시란 고리는 반응하여 디올기가 얻어진다. 온도를 더 올리면, 반응은 보다 빠르게 진행된다. 유리섬유를 흡입여과하고 물로 충분히 씻는다. 염산으로 pH 2.0 내지 4.0, 바람직하게는 pH 3.0으로 조절한 물 1ℓ에 유리섬유를 슬러리화하고, 그로부터 엽상형성기상에서 표면중량이 20~200g/m²인 엽상을 형성시킨다. 선택되어진 표면중량은 형성된 플리이스의 예정응도에 따라 선택될수 있다(이것을 설명한 실시예 참조).

[실시예 2]

응고에 중립인 유리섬유의 시험

실시예 1에 따라서 생성된 유리섬유 40mg을 항응고제로 처리한 환자뿐만 아니라 건강한 공혈자로 부터의 공혈 300μl와 섞고, 37°C에서 1분간 인큐베이션 시킨후, 혈장을 원심분리하여 분리한다. 유리로의 처리전후에 혈장으로 프로트롬빈 시간을 검사한다. 이것에 의해 응고시험이 사용될 수 있다.

응고단계를 염화칼슘 및 트롬보플라스틴을 사용하여 시작하고 갈고리 형태의 털을 시료에 넣고, 피브린섬유가 형성될 때 까지의 시간을 측정한다. 또한 분광학적 시험을 프로트롬빈 시간결정을 위하여 사용할 수 있다(Becher, U. et al., Neue Aspekte in der Gegerinnungsdiagnostik, F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart-New York(1984).pp 17-30).

더욱이, 트롬빈(제 IIa인자)의 영향을 다음과 같이 시험한다. 3U/ml 트롬빈이 포함된 수용액 300μl를 상기 설명한 방법으로 유리와 같이 섞는다. 유리가 본 발명의 방법에 따라 변형된 모든 실험의 경우에서, 변형된 유리로의 처리전후에 혈장의 응고방식에서 어떠한 차이도 나타나지 않는다. 트로빈활성(트롬빈은 비처리된 유리에 의해서 비활성화된다)은 또한 변하지 않고 유지된다.

트롬빈의 활성결정은 기질로서 Tos-Gly-Pro-Arg-p-니트로아닐린을 사용하여 수행한다. 이 목적을 위하여, 2ml의 Tris/HCl 완충용액 2.00mmol/l, pH8.1)을 50μl 트롬빈용액과 25°C에서 3분간 인큐베이션시킨다음, 반응을 3.8mmol/l 기질 100μl로 출발하여 역학을 기록한다.

[실시예 3]

프로트롬빈 시간의 결정

시험 시약 매트릭스의 제조

60~70mL/m²의 표면흡수성을 가진 종이를 다음 조성물의 수용액으로 침지시킨다.

hepes 250mmol/l (완충용액)

Tos-Gly-Pro-Arg-p-페닐렌디아민 1mmol/l (기질)

N-(4-플루오로페닐)-N-메틸아미노-메탄-포스포산 30mmol/l (결합제)

토끼뇌 트롬보 플라스틴

1.2g/ℓ.

이 용액을 수산화나트륨수용액으로 pH 7.3으로 조정한다.

건조후, 15mm 폭의 스트립을 침지된 종이로부터 잘라낸다.

산화 매트릭스

약 40μm의 필라멘트 두께 및 60μm의 메쉬 크기를 가진 나이론 망(Type NY 20 HC Super of the Firm Zürcher Beuteltuchfabrik, 스위스)을 페리시안화칼륨 50mmol/ℓ 과 염화칼슘 50mmol/ℓ 의 수용액으로 침지시킨다. 건조시킨후 15mm 폭의 스트립을 침지된 망으로부터 잘라낸다.

시험설정

본 발명에 따라서 100mm 폭의 폴리스티렌 호일에 15mm 폭내에 50-60g/m² 표면무게를 지닌 유리섬유 플리이스를 놓고, 그 위에 놓여진, 140μm의 필라멘트 두께 및 250μm 메쉬폭을 가진 나일론망으로 고정시키고 한 끝을 부착시킨다(참조 제1도). 유리섬유 플리이스의 자유로운 끝에서, 산화매트릭스 및 시약 매트릭스를 15mm 폭의 200μ 두께의 투명한 다탄산염 호일로 덮고, 견고하게 부착한 다른 한 쪽위에 놓는다(참조 제1도). 그렇게하여 제조된 밴드는 6mm 폭스트립으로 자른다. 첨부한 도면의 제1도는 시험스트립의 설정을 나타낸다;

프로트롬빈 시간의 결정

본 발명에 따르는 유리섬유로 제조된 시험스트립과 실란화하지 않은 유리섬유의 비교.

유리섬유 플리이스가 고정되어진 나일론 망위에 생리식염수 용액중의 100%, 50%, 33%, 25%, 12.2% 혈액의 시트레이트 혈액 희석시리즈(헤모크릿 약 40%) 35μl을 피펫으로 옮긴다. 적혈구는 분리부분에서 유지된다. 그다음 시험 스트립을 37°C로 가온하고, 색의 형성은 레미션 분광기록기로 시간에 따라 기록한다. 실제로 본 발명에 따른 유리섬유를 사용함으로써, 비처리 유리섬유를 사용하는 것보다 높은 시그날이 있음을 관찰하였다. 실란화된 유리섬유를 사용할 때, 프로트롬빈 시간으로서 10% 경감의 레미션 감소가 일어나는 시간을 취할수 있다. 대조적으로, 비처리된 유리섬유를 사용할 때, 4% 경감의 변화가 생기는 범위안의 시간만이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 유리섬유를 사용한 시험의 경우에는 편차는, 또한 유리가 응고단계 과정에서 방해를 주지않으므로 현저하게 감소한다. 그 차이는 다음표에서 실례를 들었다(프로트롬빈 시간은 퍼센트로 나타낸다).

[표 1]

퍼센트 %	본 발명에 따른 유리섬유 플리이스로 수행한 시험	피복하지 않은 유리 플리이스로 수행한 시험	시트레이트 혈장으로 수행한 분광시험
			0.1U 감소하는데 걸리는 시간(초)
100%	36.2	27.5	33.2
50%	44.7	48.8	45.8
33%	53.2	71.8	57.8
25%	61.0	94.4	67.0
12.5%	95.1	200.0	116.0

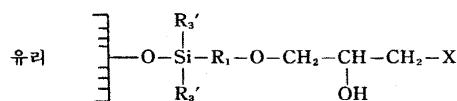
상기 표로부터, 응고시험에 의한 응고분석으로 알 수 있는 바와같이, 유리에 의한 활성화는 건강한 공혈자(100% 혈장)로 부터의 혈장이 경우에 생기는 반면, 낮은 퍼센트의 혈장은 명백히 비활성화된다.

더욱이, 본 발명에 따라서 유리섬유로 수행한 시험설정을 하여 얻어진 참조곡선은, 분광기록적 퍼센트 시험과 매우 유사하다(첨부된 도면의 제2도 참조).

(57) 청구의 범위

청구항 1

유리섬유 표면에 다음 구조의 실란이 결합된, 응고에 중립인 친수성 유리섬유 ;



상기식에서, R₁은 C₂ 내지 C₆를 포함하는 알킬렌기이고, X는 하드록실기, 하나 또는 그 이상의 하드록실기로 임의로 치환된 알콕시기, 또는 아미노산 또는 펩티드 잔기이고, 그리고 R₃'은 저급알킬기 또는 인접한 기의 실리콘원자 또는 유리표면에 연결된 산소다리이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 실란층이 1 내지 30분자 두께인 것을 특징으로 하는 유리섬유.

청구항 3

제2항에 있어서, 실란층이 4 내지 12분자 두께인 것을 특징으로 하는 유리섬유.

청구항 4

제1항에 있어서, 실제로 앞서 제시 및 예시한 유리섬유.

청구항 5

깨끗한 유리섬유를 하기 일반식(I)의 실란과 반응시키는, 제1항에 따르는 유리섬유의 제조방법 :



상기식에서, R_1 은 C_2 내지 C_6 를 포함한 알킬렌기이며, R_2 는 6개이하의 C원자를 포함한 알콕시기이고, R_3 은 6개 이하의 C원자를 포함한 알킬기 또는 알콕시기이고, 여기서 옥시란기는 가수분해, 가알코올분해에 의해 또는 아미노산 또는 펩티드와 반응하여 X기로 전환된다.

청구항 6

제5항에 있어서, 반응이 수용액에서 산성촉매의 존재하에서 수행되며, 히드록실기가 X기로서 얻어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 반응이 무수매질에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

실제로 상기에 제시하고 예시한 바와같은 제1항에 따른 유리섬유의 생산방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항중의 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 유리섬유.

청구항 10

유리섬유가 제1항 내지 제4항중의 어느 한 항에 따르는, 0.2 내지 0.5μ 의 평균직경 및 0.1 내지 $0.5g/cm^3$ 의 밀도를 지닌 유리섬유층으로 이루어진, 지혈학적 시험을 위한 혈액으로부터 혈장분리를 위한 제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 유리섬유가 평균직경이 0.5 내지 2.5μ 인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 유리섬유가 칼럼에서 층을 이루고, 칼럼의 윗부분에는 혈액의 도포수단이 제공되며, 칼럼의 끝부분을 혈장제거수단이 제공되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서, 유리섬유층이 유리섬유종이 또는 유리섬유 플리이스로 이루어지며, 응고파라미터 검출을 위한 진단제의 일부인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 14

제13항에 있어서, 유리섬유층이 다층 진단제의 최상층인 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 15

제13항에 있어서, 순서대로 하나 또는 그 이상의 시약층과 흡수접촉되거나 또는 접촉될 수 있는 혈장운반층과 유리섬유층이 흡수 접촉되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 16

실제 상기에 제시하고 예시한 바와같은 지혈학적 시험용으로 혈액으로부터 혈장분리를 위한 제제.

청구항 17

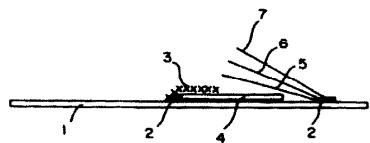
지혈학적 검사를 위한, 제1항 내지 제4항중의 어느 한 항에 따르는 유리섬유의 사용.

청구항 18

지혈학적 검사를 위한 제제의 제조를 위한, 제1항 내지 제4항중의 어느 한 항에 따르는 유리섬유의 사용.

도면

도면1



도면2

