(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월10일
(11) 등록번호 10-1876794
(24) 등록일자 2018년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/727 (2006.01) *A61K 31/70* (2006.01)
A61M 1/36 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7035273(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년12월01일
심사청구일자 2015년11월30일
(85) 번역문제출일자 2014년12월16일
(65) 공개번호 10-2015-0013310
(43) 공개일자 2015년02월04일
(62) 원출원 특허 10-2012-7017243
원출원일자(국제) 2010년12월01일
심사청구일자 2012년07월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/058596
(87) 국제공개번호 WO 2011/068897
국제공개일자 2011년06월09일
(30) 우선권주장
61/265,675 2009년12월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US05211850 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자
엑스테라 메디컬 코퍼레이션
미국 캘리포니아 마르티네즈 스위트 비 아놀드 드라이브 757 (우: 94553)
(72) 발명자
워드 로버트 에스.
미국 캘리포니아주 94563 오디나 비어 허모사 9
맥크리어 키이스 알.
미국 캘리포니아주 94518 콩코드 람베스 레인 1854
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

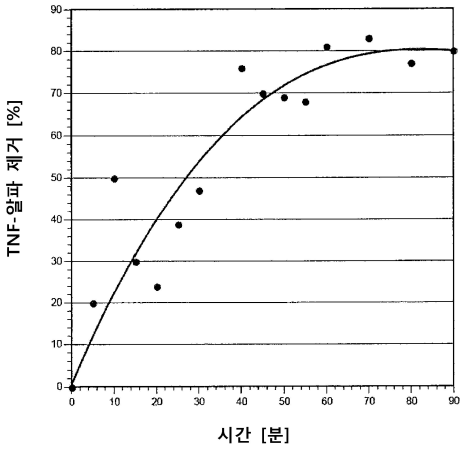
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **표면 고정화된 다당류를 이용하여 혈액으로부터 사이토카인을 제거하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈액을 헤파린, 헤파란 설페이트 및/또는 제거될 사이토카인 또는 헤파린(흡수질)에 대한 결합 친화도을 갖는 기타 분자 또는 화학 그룹(흡수제 매체 또는 매체)으로 표면 처리된 고체, 기본적으로는 비 마이크로-다공성인 기질과 접촉시킴으로써 혈액 또는 혈청으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하는 방법에 관한 것으로서, 상기 기질 내의 인터스티셜 채널의 크기는, 적당한 흡수 용량을 제공하는 한편 흡수 매체를 통한 혈액이 상대적으로 높은 유동 속도로 흐를 수 있도록, 매체 표면적의 양 및 매체의 결합 자리의 표면 농도와 균형이 맞추어져 있다.

대 표 도



(72) 발명자

램 올레

스웨덴 에스-167 40 브롬마 트라네베르크스 스트란트 11

아돌프스선 라즈

스웨덴 에스이-754 31 웁살라 딤가탄 23

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080077405 A*

WO2008157570 A1

WO2008157570 A2*

JP2005532130 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

헤파린화된 매체(heparinized media); 및 폴리에틸렌 이민(PEI), 키토산 및 시알산(sialic acid)으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 내재적으로 혈전형성성인 매체(inherently thrombogenic media)의 혼합물로부터 형성된 흡착층(adsorption bed)을 갖는 고체 기질을 용기 내에 포함하는, 혈액으로부터 하나 이상의 사이토카인 또는 바이러스, 박테리아 및 기생충으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 병원체를 제거하기 위한 장치로서,

상기 기질은 혈액이 상기 기질 내 포어를 통과하지 않을 정도의 입자, 비드, 섬유, 망상 포말 또는 나권형 치밀 막이고,

상기 개개의 기질 간 인터스티셜(interstitial) 채널 공간의 크기 및 상기 기질의 인터스티셜 표면적의 양은, 상기 혈액이 24 cm/분 이상의 선형 유속으로 상기 기질과 접촉하면서 유동시 상기 사이토카인 또는 병원체가 상기 흡착층 상의 결합 자리에 결합하여 상기 혈액으로부터 분리되게 하고, 상기 기질을 통과하는 상기 혈액의 유동 수송(flow transport)이 브라운 확산 수송 방법보다는 대류 수송에 의한 것이 되게 하는 정도이고,

상기 개개의 기질 간 인터스티셜 채널 공간의 크기는 또한 적혈구 세포의 수송이 가능할 정도로 큰, 장치.

청구항 12

제11항에 있어서, 혈액이 연속적으로 또는 평행한 유동으로 매체의 혼합물과 접촉하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 13

제11항에 있어서, 용기 내 매체의 혼합물이 용기의 입구, 출구, 또는 입구 및 출구에 혼합되지 않은 혜파린화된 매체를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈액 또는 혈청(이하 "혈액")을 고체, 특히 헤파린, 헤파린 설페이트 및/또는 제거될 사이토카인 또는 병원체(흡수질)에 대한 결합 친화성을 갖는 기타 분자 또는 화학 그룹(흡수제 매체 또는 매체)과 같은 다당류 흡수제로 표면 처리된 비미세다공성 기질과 접촉시킴으로써, 혈액 또는 혈청으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하는 방법으로서, 여기서, 적정 흡수 능력을 제공하는 한편 혈액이 상대적으로 높은 유동 속도로 흡수제 매체를 통과하도록 하기 위하여, 매체 내의 인터스티셜(interstitial) 채널 크기는 매체 표면적의 양 및 매체의 결합 자리의 표면 농도와 균형이 맞추어져 있다. 그 결과 매체의 결합 자리로의 흡수질 수송이 주로 강제 대류(forced convection)에 의해 일어난다. (강제) 대류는, 예를 들어, 펌프에 의해 발생된 압력 구배에 의하거나, 외부 압력을 유연성 용기에(또는 내부 압력을 경질 용기에) 적용하는 것에 의하거나, 두부/상승 중력차(gravity head/elevation difference)에 의하거나, 치료 환자에 있어서의 동맥 및 정맥 혈압 차이에 의하여 생성되는 유동이다. 본 발명은 임상적 체외 혈액 회로, 예를 들어, 투석, 심폐 바이패스, 및 혈액의 체외 막 산소공급에서 전형적으로 사용되는 안전한 유동 속도 범위 내에서 임상 관련 흡착 능력을 제공한다. 이 방법은, 다공성 흡수제 매체 사용시 전형적으로 요구되는 흡수질의 훨씬 더 느린 확산 수송(diffusive transport)과 직접적으로 대조되는데, 상기 다공성 흡수제 매체는 흡수질이 상기 매체 상, 후방, 또는 내부의 흡착 부위에 결합하기 전에 미세다공성 막을 통과하고/하거나 미세 구멍 내부로 확산하는 것을 요구하고 따라서 혈액의 매 통과시마다 상당한 분리를 달성하기 위해서는 매우 낮은 유동 속도를 요한다. 본 발명은 다당류 흡수제, 예컨데 헤파린, 헤파란 설페이트, 및/또는 다른 흡수제 물질로 코팅된 본질적으로 비다공성인 기질을 혈액과 접촉시킴으로써 혈액으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하여 질병을 치료하는 방법; 및 상기 방법 및 치료를 수행하기 위한 장치를 또한 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 다양한 질환 병태는 혈류 중 사이토카인 및/또는 병원체의 농도가 상승하는 특징이 있다. 일부 이러한 병태는 병원체를 죽이기 위해 디자인된 요법, 예를 들어, 항감염 약품(anti-infective pharmaceuticals)과 같은 의약의 투여를 통하여 치료된다. 다른 일부 병태는 환자의 혈액 유래(blood-borne) 사이토카인 또는 병원체의 농도 감소를 시도하는 요법에 의해 치료된다. 기타 질환은 환자의 혈액으로부터 특정 성분만을 직접 제거를 시도하는 요법에 의해 치료된다.

[0003] 예를 들어, 길랑 바레 증후군(Guillian-Barre syndrome)은 바이러스 감염에 의해 촉발되는 자가면역 장애로 이해되고 있는데, 이는 몸의 면역계가 환자의 신경계를 공격할 수 있는 항체 또는 기타 단백질을 과도하게 생성시키고 마비 수준의 증가를 유발한다. 이러한 환자들은 뒤이은 바이러스 감염에 의해 병태가 재발하기 쉽지만 시간이 지나면 대부분 회복한다. 길랑 바레 증후군를 치료하는 한 가지 방법은 환자의 신경계를 공격하는 것으로 여겨지는 항체를 제거함으로써 환자의 혈액을 '청소'하기 위한 혈장정화요법(plasmapheresis)을 포함한다.

[0004] 생물학적으로 활성인 특정 탄수화물 및 다당류가 혈액 및 생물학적 유체(biological fluids)로부터 해로운 물질을 제거할 수 있다.

[0005] 헤파린은 포유동물 조직으로부터 분리될 수 있는 다당류이다. 이는 포유동물 조직에서 매우 특이적 분포를 갖는데, 오직 비만 세포(mast cell)의 호염기성 과립(basophilic granules)에만 존재한다. 1916년 미국의 과학자 매클레인(McLean)에 의해 발견된 이후, 헤파린이 혈액 응고를 막을 수 있으며 몸에서 그 반감기가 비교적 짧다는 것이 알려졌다. 프리 드럭의 주사에 의해 투여된 전신성 헤파린은 50년 이상 임상적으로 안정적이고 효과적인 혈액 항응고제(anticoagulant) 및 항혈전제(antithrombotic agent)로 사용되어 왔다. 혈액 응고에 대한 헤파린의 효과는 투여를 멈춘 후 상당히 신속하게 사라져, 수술 및 기타 처치 중에 효과적이고 안정적으로 사용할 수 있다. 즉, 헤파린의 항응고제 및 항혈전제로서의 특성은 많은 의료상 처치(medical procedures) 중 유용한데, 예를 들어, 이는 혈액 및 체외 회로의 인공 표면 간의 바람직하지 못한 상호작용을 최소화시킨다. 처치가 끝나면, 헤파린의 투여가 종료된다. 환자의 혈액 중 헤파린의 농도는 몸에서 반감기가 짧기 때문에 수 시간 내에 안정적인 수준으로 감소한다. 이는 수술 부위에서 출혈로 인한 합병증을 막는 혈액의 응고 능력에 치유 여부가 달려 있는 수술 이후 특히 중요하다. 혈전색전성 질환(thromboembolic disorder)의 치료, 표면 유발 트롬빈형성(surface induced thrombogenesis)에서의 잘 정립되고 지속적인 사용 외에, 최근 헤파린은 그 항응고제 기능과 무관해 보이는 기타 광범위한 기능을 갖는다는 것이 발견되었다. 예를 들어, 혈액의 많은 단백질이 헤파린 및/또는, 건강한 혈관의 관강내(luminal) 혈액-접촉 표면을 포함하는 동물 조직에서 발견되는, 밀접히 관련된 다당류 헤파란 설페이트(heparan sulfate)에 높은 친화도로 결합하는 것으로 현재 알려져 있다(여기서 이는 혈관 벽과의 접촉에 의한 응고로부터 순환하는 혈액이 응고되는 것을 막는 기능을 할 수 있다). 일부 예는 안티트롬빈(AT), 피브로넥틴, 비트로넥틴, 성장인자(예를 들어, 섬유아세포 성장인자, 인슐린유사 성장인자 등)이다. 인간 혈청 알부민(HSA) 또한 헤파린에 결합하나, 혈액 중 그의 높은 농도에도 불구하고 친화도는 더 낮다.

[0006] 다른 이들은 감염을 저해하기 위해 헤파린 단편 및/또는 소위 시알산 함유 단편(sialic-containing fragments)을 직접 혈관계에 도입함으로써 전신성, 프리 헤파린의 선택적 흡수 특성을 이용하는 것을 고려해 왔다. 이러한 요법은 이들 단편이 미생물의 렉틴(lectin)에 결합하고 미생물을 차단하여 미생물이 포유동물 세포 표면의 수용체에 결합할 수 없도록 한다는 가정에 기초하고 있다. 이러한 접근은 많은 과학자들에 의해 연구되었으나, 지금까지는 제한적인 성공만이 보고되었다. 가장 공통적인 문제는 병원체 미생물을 임상적으로 유용한 수준으로 감소시키기 위해, 예를 들어, 주사에 의해 혈류로 도입된 많은 양의 프리 헤파린과 관련된, 출혈로 인한 합병증이었다. 본 발명은 헤파린이 효능을 갖기 위해 어떠한 전신성, 프리 헤파린도 필요하지 않으므로, 출혈로 인한 합병증을 제거할 수 있다. 이는 헤파린 또는 헤파란 설페이트를 고표면적을 갖는 고체 기질에 영구적으로 결합시키고, 이를 흡수 매체를 함유하는 카트리지 또는 필터 내에서 혈액에 노출시킴으로써 달성된다.

[0007] 하기 레퍼런스들은 상기 문제들을 다룬다:

[0008] Weber *et al.*(Weber V, Linsberger I, Ettenauer M, Loth F, *et al.* Development of specific adsorbents for human tumor necrosis factor-alpha: influence of antibody immobilization on performance and biocompatibility. *Biomacromolecules* 2005; **6**: 1864-1870)은 모노클로날 항-TNF 항체로 코팅된 셀룰로오스 미세 입자를 이용하여 TNF의 의미 있는 시험관 내 결합을 보고하였다. 한편, Haase *et al.* (Haase M, Bellomo R, Baldwin I, Haase-Fielitz A, *et al.* The effect of three different miniaturized blood purification devices on plasma cytokine concentration in an ex vivo model of endotoxinemia. *Int J Artif Organs* 2008; **31**: 722-729)은, 다공성 흡수 매체를 가진 점을 제외하고는 본 방법과 유사한 생체외 방법을 이용하여 IL-6에서가 아닌, IL-1ra에서의 의미 있는 감소를 보고하였다. 생체 내에서, Mariano *et al.* (Mariano F, Fonsato V, Lanfranco G, Pohlmeier R, *et al.* Tailoring high-cut-off membranes and feasible application in sepsis-associated acute renal failure: in vitro studies. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 1116-1126)은 혈액관류(hemoperfusion) 및 고 컷-오프 폴리설폰 막(high cut-off polysulphone membrane)을 이용하여 순환하는 여러 사이토카인을 상당히 줄일 수 있었으나, 또한 혈청 알부민이 손실되었다고 보고하였다. 이들 발견으로부터 추정되는 임상적 관련성은, 패혈성 쇼크(septic shock)를 겪는 33명의 환자들에 대한 무작위 연구에서 순환 엔도톡신인 IL-6, 및 C5a의 수준을 선택적 면역흡착(immunoabsorption)에 의해 일제히 감소시켜 기관의 기능을 개선할 수 있었던 Schefold *et al.*(Schefold JC, von Haehling S, Corsepius M, Pohle C, *et al.* A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. *Shock* 2007; **28**: 418-425)에 의해 증명되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 포유동물의 혈액을 고체, 특히 선택적 흡수제 분자인 생분자 또는 화학 그룹으로 코팅된 비다공성 기질과 접촉시킴으로써 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하기 위한 방법을 제공하는 것이다. 이러한 선택적 흡수제 분자는, 헤파린, 헤파란 설페이트, 폴리에틸렌 이민(PEI), 시알산, 히알루론산, 및 만노스 시퀀스를 갖는 탄소화물을 포함할 수 있다. 예방 목적으로 사용되는 경우, 예를 들어, 보존 혈액의 채혈 또는 수혈 중, 또는 혈액의 환자 대 환자의 직접 수혈 중, 본 발명은 질병의 확산을 줄이거나 제거하기 위하여 사용될 수 있다. 그리하여, 본 발명은 질병을 예방하고, 이미 감염된 환자에 있어서 질병의 치료를 돕는데 사용될 수 있다.

[0010] 본 발명의 하나의 목적은, 포유동물의 혈액을 고체, 특히 헤파린 및/또는 기타 흡수제 물질로 코팅된 비다공성 기질과 접촉시킴으로써 포유동물 혈액으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하고, 그 혈액을 다시 그 질병을 겪고 있는 환자에게 돌려줌으로써 현존하는 질병에 대한 치료 요법을 제공하는 것이다.

[0011] 상기 언급된 목적은 본 발명의 범위를 제한하려는 의도로 기재된 것이 아니다.

과제의 해결 수단

[0012] **1. 혈액으로부터 사이토카인 또는 병원체의 제거**

[0013] 본 발명의 첫 번째 측면은, 예를 들어, 헤파린 및/또는 기타 흡수제 탄수화물 및/또는 다당류로 코팅된 고체 기질에 혈액을 접촉시킴으로써, 포유동물의 혈액과 같은 혈액으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하기 위한 방법을 제공한다.

[0014] 이 방법의 구체예에 있어서, 헤파린은 기질의 표면에 고정화된다. 본 발명자들은 표면에 결합된 고정화된 헤파린이 혈액으로부터 상당한 양의 사이토카인 및 병원체를 제거하는데 효과적이라는 점을 발견하였다. 그러나, 체외 혈액 회로에 전형적인 유속은 흡수제 "층"이 상대적으로 높은 속도에서 안전하게 작동할 수 있도록 디자인될 것을 요구한다. 이는 부분적으로는 천천히 움직이고 정체되어 위험한 혈전을 형성하려는 전반적인 경향 때문이다. 본 발명에서, 기질은 충분히 큰 인터스티셜 치수(interstitial dimension)를 가져 큰 압력 손실(pressure drop) 없이 높은 유속이 가능하도록 디자인된다. 즉, 혈액이 포유동물 환자로부터서 취해질 때 그 기질을 통과하는데, 여기서 흡수질의 흡수제 층 표면으로의 전달은 주로 강제 대류에 의하는 것으로 특징지어 진다. 이는 고다공성 흡수제 매체(예를 들어, 다공성 실리카, 세파덱스, 가교결합된 폴리스티렌 및 기타 크기 배체 매체), 및 기타 많은 미세다공성 매체를 사용할 때 일어나는, 훨씬 더 느린 분자적 확산과 대조적이다. 또한, 친화도 요법(affinity therapy) 중 혈액 세포 및/또는 고분자량의 용질에 의한 흡착 매체의 접촉을 예방하기 위하여 선택적으로-투과가능한 막이 흡수제 매체와 같이 사용되는 경우, 분자적 확산이 필요하다.

[0015] 대류 수송 중 헤파린 및/또는 기타 흡수제 분자에 의한 사이토카인 및 병원체의 결합은 체외 혈액 회로의 (안전한) 작동에 있어서 전형적으로 이용되는 상대적으로 고-유동(high-flow) 조건 하, 예를 들어, 유동 선속에 의해 측정된 경우, 8cm/분 이상, 바람직하게는 약 24cm/분 이상, 더 바람직하게는 약 24 내지 329cm/분 이상, 또는 유속으로 측정된 경우, 약 50mL/분 초과, 바람직하게는 150mL/분 초과, 그러나 약 2000mL/분 미만에서 특히 효과적이다. 미세다공성 매체의 공극 내에서의 흡착은, 이와 대조적으로, 적당한 분리 또는 정제를 달성하기 위하여 실제 크기의 흡수 층을 통해 훨씬 낮은 유속, 즉 50mL/분 내지 1mL/분 미만을 요구할 수 있다.

[0016] 엄격히 말하면, 강제 대류에 의해 (기본적으로 비다공성 매체의) 결합 자리로 흡수질을 전달하는데 필요한 체류 시간이 더 적은 것과 비교하여, 흡수질이 매체 내 흡수제 자리로 확산 이동(diffusive transport)하기 위해서는 매체가 훨씬 더 길어질 필요가 있는데, 이는 흡착 컬럼에서의 '체류 시간(residence time)'때문이라고 판단된다. 그러나, 실제 안정적이고 효과적인 흡수제 카트리지, 컬럼, 필터 등의 치수에는 제한이 있으며, 특히 그것이 함유할 수 있는 최대 홀드-업 부피, 및 흡착 매체를 지난 혈액 또는 혈청의 유동 속도와 관련하여서는 그러하다. 이러한 이유로 인해, 흡착 장치를 통한 유동 속도는 중요한 디자인 변수라고 판단된다.

[0017] 대류 동역학 및 확산 동역학을 유동하는 혈액으로부터 사이토카인 또는 병원체를 제거하는 데 있어 비교해볼 수 있다: 일반적으로 확산 수송에 의존하는 흡착 매체는 미세 공극의 존재로 인해 극히 넓은 내부 표면적을 갖는 매우 다공성인 물질을 사용한다. 이와 반대로, 대류 수송에 적합한 매체는 일반적으로, 입자, 비드, 섬유, 망상 포말, 또는 임의의 나권형 치밀 막(spiral-wound dense membrane)과 같은, 기본적으로 비다공성인 물질인 고체 간 육안으로 보이는 "채널" 또는 가시적인 작은 틈에 의존한다.

[0018] 강제 대류 수송에 의존하는 매체는 일반적으로 고-유동 속도에 더 적합한 반면, 훨씬 더 느린 확산 수송에 의존하는 매체는 고 유동 속도 및 더 짧은 체류 시간이 필요한 경우 훨씬 덜 효과적이다. 이러한 이유로 인해, 체외

혈액 정제 장치에 있어서, 흡수질이 흡수제 매체 내의 공극으로 늦게 확산될 필요가 없는 흡착 매체가 더 바람직하다. 혈액이 수공 물질로부터 제작된 회로를 통해 펌프되는 경우, 정체를 막고 응고의 위험을 줄이기 위하여 상대적으로 높은 혈액 유동 속도를 이용하는 것이 일반적이다. 반면, 극도로 높은 유동 속도는 피해야 하는데, 혈액을 높은 전단 속도 및, 혈액을 파열시키거나 아니면 손상시킬 수 있는, 부딪힘으로 인한 손상에 노출시킬 수 있기 때문이다. 그러므로, 본 발명은 바람직한 대류 수송 특성 및 그의 바람직하고 더 빠른 동역학을 이용하여 혈액으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하는 방법 및 장치를 제공한다. 이는 혈액을, 흡수제 분자, 예를 들어, 헤파린 분자로 표면 처리되고 혈액으로부터 사이토카인 또는 병원체를 제거하기 위하여 이들과 결합할 수 있는, 기본적으로 비다공성인 기질 위로 통과/흐르게 함으로써 가능하다. 또한, 표면 처리로 기질이 효과적으로 비다공성으로 되는 경우, 본 발명에서 미세다공성 기질을 사용하는 것도 가능하다. 이는 매체 제조 중의 표면 처리가 공극을 차단하는 경우, 의도적으로 또는 우연히 일어날 수 있다. 이는 미세공극 기질을, 흡수질이 매체에 결합하기 위하여 공극으로 확산될 필요가 없는 기질로 전환시킨다.

[0019] 이식가능한 장치 역시 가능하나, 청구범위의 방법들은 1차적으로 체외 요법(extracorporeal therapies) 또는 처치에 적용되도록 의도되었다. "체외 요법"이란 몸 밖에서 수행되는 처치를 의미하는데, 예를 들어, 산소, 혈액-항응고제, 마취제 등의 바람직한 산물이 체액에 첨가되는 요법이다. 이와 달리, 자연발생적인 독소와 같은 바람직하지 않은 산물을 특정 유형의 체외 회로에 의해 체액으로부터 제거할 수 있다. 그 예로는 혈액투석 및 혈액여과를 들 수 있는데, 이는 혈액으로부터 노폐물을 제거하는 기술을 대표한다. 활성 탄소에의 흡착은 혈액 유래 독소 등을 제거하기 위하여 사용되어 왔다.

[0020] 포유동물의 전체 혈액 및 혈청이 본 발명에서 사용될 수 있다. 청구범위의 방법들에서 사용될 수 있는 혈액 또는 혈청의 양은 제한받지 않는다. 그 양은 1mL 미만에서부터 1L를 초과하여, 환자에게 지속적인 재순환이 필요한 경우 환자의 전체 혈액 부피를 포함하는 범위일 수 있다. 필요한 경우, 흡착 층을 통과하는 하나 이상의 경로가 이용될 수도 있다. 혈액은 인간 또는 동물의 혈액일 수 있다.

[0021] 본 발명의 흡착 매체는, 50mL/분 초과, 및 바람직하게는 150 내지 2000mL/분 사이의 유동 속도를 갖는 전통적인 체외 혈액 순환에서의 사용에 최적화되었다. 유동 선속으로 측정된 경우, 8cm/분 이상, 바람직하게는 약 24cm/분 이상, 더 바람직하게는 24 내지 329cm/분 이상이다. 이러한 높은 유동 속도는 흡착 컬럼 내에서 체류시간을 줄이고 대류 수송이 브라운 확산 수송보다 우세하도록 한다. 이는 TNF-α와 같은 큰 분자량의 단백질 또는 사이토카인 및 바이러스, 박테리아 및 기생충 같은 더 큰 입자의 결합에 있어 특히 중요한데, 왜냐하면 이들은 매우 느리게 확산하기 때문이다. 본 발명에 있어서, 사이토카인 또는 병원체를 제거할 수 있는 흡착 자리는 주로, 혈액이 통과하여 흐르거나 강제 대류에 의해 전달되는, 매체 층(media bed)의 작은 틈 내 표면에 있다. 혈액을 처리하기 위하여, 인터스티셜 채널은 적혈구 세포의 수송이 가능할 정도로 클 필요가 있는데, 이는 평균 직경이 6 미크론이다. 충전된 흡착 카트리지를 높은 혈액 유동 속도를 갖는 체외 회로에 장착하기 위하여, 인터스티셜 채널은 적혈구 세포의 직경보다 훨씬 더 커야 한다. 이는 용혈을 일으키는 높은 전단 속도를 방지하는 한편, 동시에 충전 층 또는 카트리지를 통과하는 혈액의 압력 강하를 최소화할 수 있다. 또한, 바람직하게는 매체는 경질이어서 압축으로 인해 필터 카트리지를 막히게 할 수 있는 변형을 최소화한다. 이들 바람직한 예들에 기반하여, 최적화된 경질 매체는, 예를 들어, 고-유동 체외 혈액 회로에서의 병원체 및/또는 사이토카인의 효과적인 제거를 위하여, 인터스티셜 채널 크기 및 전체 표면적 간에 균형을 맞아야 한다.

[0022] **2. 본 발명에서 사용되는 기질.**

[0023] 형태 및 조성에 있어서 다양한 물질이 본 발명에서의 기질로 사용될 수 있다. 적당한 모든 기질들은 고표면적을 제공하는 한편, 흡수질이 (1차적으로) 강제 대류 수송에 의해 결합하는 흡수제 자리로 흡수질을 전달하는 것을 촉진한다. 전형적으로, 이 매체는 컬럼과 같은 용기 내에 충전된 상태로 제공되는데, 이는 매체가 유동하는 혈액을 따라 움직(매체 이동(media migration)이라고 알려짐)이지 않도록 매체를 고정하도록 디자인되며, 혈류가 필연적으로 모든 매체의 표면을 지나가도록 한다. 흡착 매체를 생성하기 위한 유용한 기질은 비다공성 경질 비드, 입자, 또는 패킹(packing), 망상 포말, (예를 들어, 소결된 비드 또는 입자로부터 형성되는) 경질 모노리식 층(monolithic bed), 직물 또는 부질포로 충전된 컬럼, 실 또는 고체 또는 (미세다공성이 아닌) 치밀한 모노필라멘트 중공 섬유로 충전된 컬럼, 평판 필름 또는 치밀한 막으로부터 형성된 나권형 카트리지, 또는 혼합된 비드/패브릭 카트리지와 같은 매체의 조합을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 적당한 기질은 처음에는 비다공성이었지만 표면 처리 전, 흡착 자리의 생성 중 또는 그 후, 종점-부착된 헤파린을 통해 표면 처리되는 경우 필연적으로 비다공성이 된다.

[0024] 컬럼은 혈액 또는 혈청에 고표면적을 부여하는 매크로다공성(macroporous) 구조를 갖는 한편, 큰 혈압 강하 및

높은 전단 속도를 방지한다. 용혈에 의한 혈액 손상 위험뿐만 아니라, 높은 혈압 강하도 피해야 하는데, 혈압 강하에 반응하는 자동 멈춤 기능이 있는 체외 회로를 정지시킬 수 있기 때문이다.

[0025] 또한, 기질은 차단막(barrier membrane)이라고 알려진 치밀한 형태를 취할 수 있다. 이러한 구체예에서, 비다공성 막의 표면은 막 표면에 헤파린, 헤파란 설페이트 또는 기타 흡수제 다당류를, 이들로부터 유래하지 않은 흡수 그룹(absorbing group)과 함께 결합시킴으로써 변형된다. 이와 달리, 미세다공성 막은 결합 자리의 부착 전, 그 중간 또는 그 후에 기본적으로 비다공성인 물질, 예를 들어, 폴리머로 공극을 채움으로써 비다공성이 되거나 "치밀'해진다. 시트 또는 (중공) 섬유 형태의 막은, 본 발명의 실제 사용에 적합한, 혈액 접촉을 위한 고표면적을 제공하기 위하여 하우징 내에 배열될 수 있다.

[0026] 2.1. 기질로서의 비드

[0027] 유용한 기질 하나는 고체 비드 또는 입자 형태이다. '비드'는 주어진 유동 속도 하에서의 변형/압축을 견딜 만큼 충분히 경질인 물질로 만들어질 수 있다. 내변형성은 자유 부피 및 충전층 '접촉기(contactor)'의 낮은 후속 압력 강하를 유지하기 위하여 기본적이다. 기질 벌크에서의 접근 가능한 공극이 실질적으로 존재하지 않으면 흡수질이 흡수 전 공극으로 확산될 필요가 없다. 본 발명의 흡수 자리는 1차적으로 매체의 표면에 존재하고, 그리하여 주로 대류 수송에 의해 그 표면으로 전달된 혈액 안의 흡수질에 접근 가능하게 위치한다. 적당한 기질은 그 표면이 완벽하게 매끄러울 필요가 없는데, 왜냐하면 거친 표면은, 예를 들어, 헤파린의 공유 결합 또는 이온 결합에 의한, 결합 자리의 부착을 위한 표면적을 바람직하게 증가시키기 때문이다. 반면, 흡수질이 결합 자리에 부착하기 전에 공극으로 확산될 필요가 없도록 하기 위하여 주로 분자 직경을 갖는 접근 가능한 내부 공극은 피한다.

[0028] 다양한 종류의 비드가 본 발명에서 사용될 수 있다. 유용한 비드는 본 발명에서 사용 중 변형/압축을 피하기 위하여 충분한 크기 및 경도를 가져야 하고, 본 발명에서 사용되기 위한 헤파린으로 코팅될 수 있는 충분한 표면적을 가져야 한다.

[0029] 기질 경도가 충분하다는 증거는 물 또는 살린(saline)이 임상에서 전형적으로 사용되는 속도로 약 한 시간 흐르는 동안 흡착 층에 걸쳐 증가된 큰 압력 강하가 없다는 것이다: 예를 들어, 유사한 살린의 유동 속도로 측정한 경우, 증가한 압력 강하는 (유동의 첫 일분 내에 측정된) 최초 압력 강하에 대해 10 내지 50% 미만.

[0030] 비드 또는 기타 고표면적 기질은 천연 또는 합성 폴리머 또는, 유리, 세라믹 및 금속을 포함하는 비-폴리머(non-polymeric) 물질과 같은, 여과할 수 있는 불순물이 기본적으로 없는 다수의 상이한 생체적합(biocompatible) 물질로부터 만들어질 수 있다. 몇 가지 폴리머의 예는 폴리우레탄, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에틸렌 또는 에틸렌 및 기타 모노머의 코폴리머, 폴리에틸렌 이민, 폴리프로필렌, 및 폴리이소부틸렌을 포함한다. 유용한 기질의 예는 비다공성 초고분자 폴리에틸렌(Ultra High Molecular Weight PolyEthylene; UHMWPE)을 포함한다. 기타 적당한 비드는 폴리스티레렌, 고밀도 및 저밀도 폴리에틸렌, 실리카, 폴리우레탄, 및 키토산이다.

[0031] 이러한 비드를 만드는 방법은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다. 폴리에틸렌 비드 및 기타 폴리올레핀은 합성 공정 중 직접 생성되며 자주 추가의 크기 축소 없이 사용될 수 있다. 기타 폴리머는 갈거나 분무 건조할 필요가 있을 수 있고, 분류 아니면 가공하여 원하는 크기 분포 및 크기를 갖는 비드를 생산할 수 있다.

[0032] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 방법에서의 사용을 위해, 체외 혈액 여과를 위한 개별 비드 간 채널 또는 인터스티셜 공간의 크기는 카트리지의 주입구 및 유출구 사이에서 큰 압력 강하를 막고, 고 유동 환경에서의 개별 비드 사이에서 혈액 세포가 안전하게 흐르며, 혈액의 사이토카인 또는 병원체에 다당류 흡수제의 결합을 위한 적당한 인터스티셜 표면적을 제공하기 위하여 최적화되어야 한다. 대략 둥근 모양의 300 미크론 비드의 폐쇄형 충전 층에 있어서, 적당한 인터스티셜 공극 크기는 직경이 대략 68 미크론이다. 비드는 약 100 미크론 내지 약 500 미크론의 직경을 갖는 것이 유용하다. 비드의 평균 크기는 150 내지 450 미크론일 수 있다. 예를 들어, 0.3mm의 평균 직경을 갖는 Polymer Technology Group(Berkeley, USA)사의 폴리에틸렌 비드가 적당하다. 인터스티셜 공극은 비드 크기의 함수이다.

[0033] 사용을 위해, 적당한 비드를 컬럼과 같은 용기에 하우징된다.

[0034] 기타 적당한 형태의 기질은 아래에 설명되어 있다.

[0035] 망상 포말은 열린 셀(cell)을 가지며, 예를 들어, 폴리우레탄 및 폴리에틸렌으로부터 만들어질 수 있다. 공극 크기는 제조방법을 제어함으로써 조절할 수 있다. 일반적으로, 망상 포말은 인치당 3 내지 100개의 공극을 가질

수 있고 66cm^2/cm^3 이상의 표면적을 나타낼 수 있다.

[0036] 비드는 화학적 방법 아니면 물리적 방법을 통하여 모노리식 공극 구조로 소결될 수 있다. 폴리에틸렌 비드는 카트리지에서 그의 녹는점 위로 비드를 가열하고 압력을 가함으로써 소결될 수 있다. 그 결과로 생긴 인터스티셜 공극 크기는 동일한 크기의 소결되지 않은 비드 충전 층의 인터스티셜 공극 크기보다 약간 축소된다. 이러한 축소는 경험적으로 판정될 수 있으며 원하는 최종 인터스티셜 공극 크기를 생성하기 위하여 이용될 수 있다.

[0037] 컬럼 또는 기타 하우징 형태는 직물, 헤파린화된(heparinized) 부직포 아니면 헤파린, 헤파란 설페이트로 충전되거나, 하우징이 기질 매체로 충전된 후, 임의의 비-헤파린 흡수 자리(non-heparin absorption sites)가 예를 들어, 공유 결합, 이온 결합 또는 기타 화학적 또는 물리적 결합에 의해 부착될 수 있다. 짜기(weaving) 또는 뜨기(knitting) 또는 부직망(non-woven web)의 형성 중 섬유 데니어(fiber denier) 및 섬유 밀도를 제어함으로써, 인터스티셜 공극 크기를 제어할 수 있다. 유용한 부직포는, 섬유의 얽힘 및/또는 교차형 섬유(intersecting fibers)의 접착(adhesion) 또는 응집(cohesion)에 의해 결합된 무작위 방향성을 갖는, 펠트(felts), 용융취입(melt-blown), 또는 정전기적으로 자은(electrostatically spun) 망의 형태일 수 있다. 유용한 직물은 더 뚜렷하고 무작위적이지 않은 구조를 갖는다.

[0038] 컬럼은 섬유 또는 섬유로부터 만들어진 실로 충전될 수 있다. 폴리에틸렌, 및 기타 섬유가, 중공 섬유 막이 통상적인 혈액 투석 카트리지 또는 혈액 산화기 내에 장착되는 것과 같은 방식으로 카트리지에 충전될 수 있는, 가는 중공 또는 고체 모노필라멘트 섬유 또는 멀티필라멘트 실로 끌어들여질 수 있다. 본 발명에서, 다공성 중공 섬유는 외부 및/또는 내부 표면에 헤파린 또는 기타 흡수제를 결합시키기 전, 그 중 또는 그 후에는 원래 치밀하거나 비다공성이다. Royal DSM사의 Dyneema Purity®는 UHMWPE로 만들어진 고강도 고체 섬유이다. Dyneema가 헤파린화되고 카트리지에 충전되면 사이토카인 및 병원체를 제거하기 위한 고표면적 지지체를 제공할 수 있다.

[0039] 나권형 카트리지는 인접 표면의 접촉을 막기 위하여 임의의 스페이서(spacer) 물질과 단단하게 결합된 가는 필름 또는 막을 함유한다. 상기 막은 폴리우레탄, 폴리에틸렌 폴리프로필렌, 폴리설폰, 폴리카보네이트, PET, PBT, 등과 같은 폴리머로 만들어질 수 있다.

[0040] 2.2. 흡수제 다당류의 부착

[0041] 본 발명의 흡수제 다당류는 공유 부착 또는 이온 부착을 포함하는 다양한 방법에 의해 고체 기질 표면에 결합될 수 있다.

[0042] 본 발명의 흡수제 매체는 고체 기질 표면에 공유적으로 연결된 헤파린을 포함할 수 있다. Wendel 및 Ziemer에 의해 리뷰 아티클(H.P Wendel and G. Ziemer, European Journal of Cardio-thoracic Surgery 16 (1999) 342-350)에 설명된 바와 같은, 그 자체로 잘 알려진 다양한 방법이 원하는 기질에 헤파린을 부착시키기 위하여 사용될 수 있다. 하나의 구체예에서, 헤파린은 종점 공유 부착에 의해 고체 기질에 연결된다. 이 방법은 기질 표면으로부터 혈류로 들어갈 수 있는 헤파린 방출을 감소 또는 제거함으로써 장치의 안정성을 증가시킨다. 혈액에 의한 그리고 혈액으로의 헤파린 '침출(leaching)'은 피해야 하는데, 이것이 출혈 및 헤파린-유발 혈소판감소증(thrombocytopenia)의 위험을 증가시킬 수 있기 때문이다.

[0043] 헤파린과 같은 다당류가 고체 기질에 결합하면 비-공유 부착에 비해 표면 밀도 및 고정된 분자의 방향과 같은 변수를 더 잘 제어할 수 있다. 발명자들은 이들 변수가 고정된 탄수화물 분자에 결합하는 적정 사이토카인 또는 병원체를 제공하기 위해 중요하다는 것을 보여주었다. 고체 기질 표면에서의 헤파린 농도는 1 내지 10$\mu g/cm^2$ 범위일 수 있다. 종점 공유 부착이란 헤파린과 같은 다당류가 헤파린 분자의 말단 잔기를 통하여 고체 기질에 공유적으로 부착되는 것을 의미한다. 또한, 헤파린은 복수 지점에서 결합할 수도 있다. 종점 부착이 바람직하다.

[0044] 비드가 사용되는 경우, 이것은 헤파린 또는 기타 화합물과 같은 다당류의 부착 이전에 친수성화될 수 있다. 비드를 제조하는 가능한 방법은 산 에칭, 플라스마 처리, 포타슘 퍼망가네이트와 같은 강 산화제에의 노출을 포함한다.

[0045] 2.3. 기질 1 그람 당 다당류의 양

[0046] 기질 1 그람 당 다당류의 양은 변할 수 있다. 하나의 특정 구체예에 있어서, 비드가 사용되는 경우, 비드 1 그람 당 헤파린과 같은 다당류의 양은 사용된 층의 수 및 또한 비드의 크기에 의해 판정된다. 비드가 클수록 비드 1 그람 당 헤파린과 같은 다당류는 더 작아진다. 하나의 바람직한 양은 MBTH 방법을 1회 실시한 경우 비드 1 그

람 당 헤파린 2.0±0.5mg이다.

[0047] 청구된 방법에 있어서 사용된 다당류의 분자량은 변할 수 있다. 예를 들어, 고유 헤파린(native heparin)은 22kDa의 분자량을 갖는다. 질산 분해된 헤파린은 8kDa의 분자량을 갖는다.

[0048] **3. 상이한 표면 기능성을 갖는 비드 혼합물**

[0049] 헤파린은 사이토카인, 병원체 및 기타 단백질에 결합할 수 있는 생물학적으로 활성인 탄수화물이다. 그러나, 헤파린은 혈액 응고를 막는 가장 잘 알려지고 가장 널리 사용되는 항응고제이다. 임상적으로 헤파린은 주사용, 전신성 항응고제로서 50년 이상 안전하게 사용되어 왔다. 또한, 헤파린은 오직 안정성을 향상시키기 위한 목적으로 혈액-접촉용 의료 장비를 위한 코팅제 또는 표면 처리제로서 수년간 사용되어 왔다. 대량 수송 목적을 위해 넓은 표면적이 혈액에 접촉하여야 하는 장치에 있어서 특히 중요하다. 그 예로는 투석기 또는 혈액 산소공급기를 들 수 있다. 본 발명에서 사용되는 흡착 매체 표면은 헤파린과 두 가지 목적을 위해 결합한다: 1) 병원체, 사이토카인 및 기타 질병을 일으키는 혈액 유래 물질과 결합하는 헤파린의 능력, 및 2) 혈액 응고 및 외부, 예를 들어, 인공의 표면과 접촉에 따른 관련 반응을 막는 헤파린의 능력. 따라서, 헤파린이 혈액 및 기타 생물학적 유체로부터 유해 물질을 제거하는 동안 효능 및 안정성 모두를 제공하므로, 헤파린은 본 발명의 흡착 매체의 중요한 구성성분이 된다.

[0050] 헤파린 및 헤파란 설페이트 외에도, 고정화된 헤파린 단독에 의해서는 효과적으로 제거되지 않는 유해 물질을 혈액 및 생물학적 유체로부터 제거할 수 있는 다른 탄수화물을 포함하는 기타 생물학적으로 활성인 화학적 모이어티(moiety)가 존재한다. 예를 들어, 고 양이온성, 양전하 탄수화물인 키토산이 엔도톡신에 결합한다. 폴리에틸렌 이민(PEI)과 같은 기타 양전하 분자들 역시 엔도톡신에 결합할 수 있다. 그러나, 양이온 표면은 헤파린화된 표면에 비해 혈액과의 양립가능성이 상당히 낮고, 혈액 접촉 장치에서의 위험한 상태인 혈전형성(thrombogenicity) 증가로 이어질 수 있다. (「Sagnella S., 및 Mai-Ngam K. 2005, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 42, pp. 147-155, *Chitosan based surfactant polymers designed to improve blood compatibility on biomaterials*」및 「Keuren J.F.W., Wielders S.J.H., Willems G.M., Morra M., Cahalan L., Cahalan P., 및 Lindhout T. 2003, Biomaterials, Vol. 24, pp. 1917-1924.*Thrombogenecity of polysaccharide-coated surfaces*」을 참고하라). 혈액으로부터 LPS 또는 엔도톡신을 제거하기 위해 생리활성 흡수제로서 PEI, 키토산 또는 다른 내재적으로 혈전형성성인(thrombogenic) 표면을 함유하는 흡착(adsorption) 카트리지를 사용하는 것이 가능하지만, 심각한 응고 위험 때문에, 환자는 고 투여량의 전신성 항응고제를 필요로 할 것이다. 전신성 헤파린의 경우, 이는 출혈 위험 및 혈소판 감소증으로 이어질 수 있다.

[0051] 본 발명의 방법은 헤파린화된 매체(heparinized media) 및 내재적으로 혈전형성성인 매체(inherently thrombogenic media)의 혼합물로부터 흡착층을 제조하는 것이다. 헤파린화된 표면 및, 예를 들어, 양이온성 표면(또는 다른 내재적으로 혈전형성성인 표면)의 양자 모두를 사용하여 흡착 카트리지를 어셈블리함으로써, 사이토카인, 병원체, 및 엔도톡신 모두를 혈액 또는 생물학적 유체로부터 안전하게 제거할 수 있다.

[0052] 또 다른 생물학적으로 활성이나, 혈전형성성인 탄수화물은 시알산이다. 시알산은 인플루엔자를 포함하는 바이러스의 렉틴과 결합하는 것으로 알려져 있다(「C, Mandal. 1990, Experientia, Vol. 46, pp. 433-439, *Sialic acid binding Lectins.*」). 헤파린화된 비드 및 시알산으로 코팅된 비드의 혼합된 카트리지는, 예를 들어, 인플루엔자 유행병이 발생하는 동안 환자 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0053] 보통 복부 패혈증 쇼크(abdominal septic shock)는 그람 음성균인 *E. coli*에 의해 발생한다. 그람 음성균은 전형적으로 헤파린에 결합하지 않으므로 사이토카인 및/또는 에엔도톡신 외에 이들 박테리아를 결합시키기 위하여 다기능성 흡착 컬럼을 갖는 것이 유용할 수 있다. 메틸 α-D-만노피라노시드와 같은, 만노스 시퀀스가 있는 탄수화물은 *E. coli*, *K.pneumonia*, *P. aeruginosa*, 및 *Salmonella*에 결합하는 것으로 알려져 있다(「Ofek I., 및 Beachey E.H. 1, 1978, Infection and Immunity, Vol. 22, pp. 247-254, *Mannose Binding and Epithelial Cell Adherence of Escherichia coli* 」및 「Sharon, N. 2, 1987, FEBS letters, Vol. 217, pp. 145-157 *Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease.*」).

[0054] 상기 구체예의 이용은, 혈전형성성 표면과 밀접히 접촉하거나 가까이 근접하는 항-혈전형성성 표면이, 만일 상기 내재적으로 혈전형성성인 표면이 단독으로 사용될 경우 발생하게 되는 임상적으로 유의적인 혈전 형성을 방지할 수 있다는 사상에 근거한 것이다. 비드 또는 입자 형태의 흡착 매체의 경우, 본 발명의 바람직한 적용은 상이한 흡착 매체를 카트리지 또는 기타 하우징에 패킹하기 전에 이들을 서로 배합하는 것이다. 이는 인접한 비드 표면의 다양한 화학 물질들 간의 밀접한 접촉을 제공하는 한편, 흡착 카트리지 또는 필터의 효유율적인 제조

를 가능하게 한다. 관련된 한 방법은 이들 상이한 매체를 하우징 내에 '파르페-타입'의 배열로 층층히 쌓음으로써 혈액이 연속적으로 또는 평행한 유동으로 상기 상이한 매체와 접촉하게 하는 것이다. 상기 상이한 매체를 카트리지 내 배열하는 한 가지 방법은 혼합되지 않은 항-혈전형성성 매체를 상기 카트리지의 입구 및/또는 출구에 위치시키고, 상기 입구 및 출구 영역 사이에 위치시킨 보다 많은 혈전형성성 매체를 함유하는 임의의 혼합된 영역을 만드는 것이다. 섬유 형태의 매체인 경우, 혼합된 섬유로부터 패브릭을 형성하기 위하여 혼합된 직물, 자인 구조 또는 부직포 구조를 섬유 산업에서 잘 알려진 방법에 의해 제조할 수 있다. 이와 달리, 하나의 섬유 타입이 접촉에 의한 혈액 응고를 적극적으로 방지하는 표면을 함유하는 한, 사는 상이한 표면 화학물질을 갖는 2 이상의 섬유로부터 제조된 더 가는 멀티필라멘트사 또는 모노필라멘트로부터 제조될 수 있다. 혼합된 섬유사는 이후 혈액 접촉을 위한 패브릭을 제조하기 위하여 사용될 수 있다. 중성 섬유 또는 고체 섬유 흡착 매체가 배합될 수 있으며 중공-섬유 투석기 또는 산소공급기를 닮은 카트리지를 만들기 위해 사용될 수 있다. 나권형 흡착 카트리지에서 사용되는 유형의 막 또는 필름-타입의 흡착 매체의 경우, 혈액이 동시에 양 화학물질에 (거의) 동시에 접촉하도록 2 이상의 표면 화학물질을 서로 가까이 근접시켜 사용할 수 있다. 이는 막 필름의 표면층 내에서의 다양한 결합 그룹을 규칙적이거나 무작위적으로 배열하거나, 둘 중 하나는 항혈전성인 밀접-배치된 막 필름들 사이에 혈액의 유동 경로를 형성함으로써 수행될 수 있다.

[0055] **4. 본 발명의 방법의 용도를 위한 장치**

[0056] 본 발명의 기타 측면은, 흡수제 변경된 고체 기질 및 사이토카인 또는 병원체에 대한 결합 친화성을 갖는 흡수제를 포함하는 장치의, 포유동물의 혈액으로부터 사이토카인 또는 병원체를 체외에서 제거하는 용도를 제공하는 것이다.

[0057] 본 발명에 따른 용도 및 방법에서 언급된 것과 같은 장치는 예를 들어, 신부전증 환자의 혈액 또는 혈청의 체외적 치료를 위한 통상적인 장치를 포함한다.

[0058] 체외 순환용 혈액 접촉 의료 장치에서의 국소 혈액 유동은 고여 있는 영역에서의 혈소판의 전단 활성화 및 집적에 의한 응고 형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이에 따라, 본 발명의 다양한 측면에서 사용되는 것과 같은 장치는 이러한 문제를 발생시키지 않도록 디자인되어야 한다.

[0059] 본 발명의 일부 구체예에서 사용되는 것과 같은 장치는 예를 들어, 다음의 특성을 가질 수 있다:

[0060] 150 내지 2000ml/min 범위의 혈액 유동, 또는 유동 선속으로 측정한 경우, 8cm/min 이상의 혈액 유동.

[0061] 낮은 유동 저항성

[0062] 여기에 고정된 탄수화물을 갖는 예를 들어, 약 0.1 내지 $1m^2$의 큰 표면적.

[0063] 안정적인 코팅(접촉의 결과 탄수화물이 혈액으로 임상적으로 위험한 누출이 없을 것).

[0064] 장치에 있어서 적당한 혈액동태학적 특성(고여있는 영역이 없을 것).

[0065] 적정 생체적합성.

[0066] 본 발명에 따른 용도 또는 방법에서 사용될 수 있는 이러한 장치는 사이토카인 분자를 제거하기 위한 체외 혈액여과 장치이자 고 유동 속도가 가능한 소아 혈류 투석기이나 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 장치의 한 예는 Exthera Medical로부터 얻을 수 있다. Gambro AB(Sweden)사의 Prisma M10 혈액여과기/투석기와 같은 혈액 또는 혈청의 체외 처리를 위한 장치의 기타 모델 또는 유형도 사용될 수 있다.

[0067] 고-유동 조건은 상기 확산 한계보다 높은 혈액 유동으로 정의될 수 있다.

[0068] **5. 사이토카인**

[0069] 본 원에서 사용된 바와 같이, 용어 "사이토카인"은, 예를 들어, 미생물 감염 또는 면역과 관련되어 방출되는 단백질을 의미하는데, 이는 인터루킨, 인터페론, 키모카인 및 종양 괴사 인자를 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 사이토카인의 예는 세포 부착 분자(VCAM), 항트로빈, 노말 T 발현 및 분비 단백질의 활성에 의해 조절되는 단백질(RANTES), 인터페론, 종양 괴사 인자 알파(TNF-α), 종양 괴사 인사 베타(TNF-β), 인터루킨-Ⅰ(IL-Ⅰ), IL-8, GRO-α 및 인터루킨-6(IL-6)이다.

[0070] 또한, 헤파린-결합 분자를 강하게 흡수함으로써 혈액으로부터 사이토카인을 선택적으로 제거하는 방법을 제공한다. 일부 분자는 다른 것들보다 헤파린에 대해 더 강한 결합 친화성을 갖는다. 예를 들어, TNF-α는 헤파린에

대해 높은 친화성을 갖는다.

[0071] 6. 병원체

[0072] 본 발명의 추가적인 측면은 포유동물의 혈액을 상기 방법에서 개시된 고체 기질과 접촉시킴으로써 포유동물의 혈액으로부터 사이토카인 및/또는 병원체를 제거하여 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 헤파린화된 기질을 이용하여 혈액으로부터 제거될 수 있는 병원체의 예는 다음을 포함한다:

[0073] 바이러스 - 아데노바이러스, 코로나바이러스, 뎅기열 바이러스, 간염 B, 간염 C, HIV, HPV 거대세포바이러스, 및 기타.

[0074] 박테리아 - *Bacillus anthracis, Chlamydia pneumoniaem, Listeria* monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, MRSA, *Streptococcus pyrogenes,Yersinia enterocolitica,* 및 기타.

[0075] 기생충 - *Giardia lambitia, plasmodium spp.* 및 기타.

[0076] 또한, 「Chen, Y. Gotte M., Liu J., and Park P.W., Mol. Cells, 26, 415-426」를 참고하라.

[0077] 본 발명에 따라 치료되는 질병의 한 가지 예는 패혈증이다. 일반적으로, 패혈증은 장기 부전 및 자주 사망에 이르게 할 수 있는 감염에 대한 전신성 반응이라고 본다. 그 병태는 박테리아, 바이러스, 기생충 또는 진균 감염에 의해 촉발될 수 있다. 특히 그 병태는 이미 면역 저하된 환자가 있는 병원에서 특히 위험한 것으로 알려져 있다. 패혈증을 앓는 동안, 환자는 소위 사이토카인 폭풍(cytokine storm)을 경험하고 환자의 면역계는 건강한 조직을 공격하여 고-관류된 기관에서의 복합 장기 부전에 이르게 한다. TNF-α 및 기타 염증성 분자를 줄이는 것은 면역 반응을 조절하고 장기 보존 전략으로서 사용될 수 있다. 또한, 추가의 군집 형성의 감소를 돕는, 혈액 중의 어떠한 헤파린-결합 병원체라도 제거될 수 있으며 감염 치료에 필요한 항생제의 양을 줄일 수 있다. 이는 항생제 요법에 따르는 부작용의 위험을 줄임으로써 환자의 안전을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 분석된 사이토카인의 전- 및 후-칼럼 농도에 관한 것이다.

도 2a 및 도 2b는 헤파린화된 크리스탈에 흡수된 TNF-α의 양 및 대조군에 대한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 8. 실시예

[0080] 본 발명의 다양한 측면은 다음의 실시예에서 추가로 기술된다. 이러한 실시예는 제한하려는 것이 아니다. 예를 들면, 본 실시예에서 헤파린이 사용된다. 그러나, 다른 탄수화물 및 다당류 흡착제가 단독으로 또는 하기에 예시된 헤파린-코팅된 기판에 추가하여 사용될 수 있다.

[0081] 8.1. 실시예 1

[0082] *헤파린 칼럼의 제조*

[0083] 평균 직경 0.3 mm (lot 제180153번)를 갖는, 폴리에틸렌(PE) 비드를 Polymer Technology Group (Berkeley, USA)에 의해 공급받고 칼럼 (Mobicol, 1 mL)은 MoBiTec (Germany)로부터 입수하였다. 헤파린 및 폴리에틸렌이민(PEI)은 각각 Scientific Protein Laboratories (Waunakee, Wisconsin, USA) 및 BASF (Ludwigshafen, Germany)로부터 구입하였다. 사용되는 모든 화학물질은 분석 등급 이상이었다.

[0084] Larm 등 (Larm O, Larsson R, Olsson P. 변형된 환원 말단 잔기를 통한 헤파린의 선택적 공유결합에 의해 제조된 신규의 비-혈전성 표면. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983; **11**: 161-173)이 기술한 바와 같이 비드 위에 헤파린의 고정을 수행하였다.

[0085] 하기에 기술된 일반적인 공정을 사용하여 중합표면을 헤파린화하였다.

[0086] 중합 표면(포타슘 과망간산염, 암모늄퍼옥시디설페이트)은 일부 반응성 작용기 ($-SO_3H$, -OH, -C=O, -C=C-)와 함께 친수성 특징을 도입하기 위해 산화제로 에칭하였다. 또한 표면은 플라즈마 또는 코로나로 에칭할 수 있다. 예를 들면, PE-비드는 산화제 (황산 중의 포타슘 과망간산염)로 에칭하였다. OH-그룹 및 이중결합을 함유하는 이러한 친수성화된 비드, 그 중에서 나중에 대조군으로서 사용한다.

[0087] 폴리아민, 폴리에틸렌이민 (PEI) 또는 키토산으로 처리함으로써 반응성 아미노 작용기를 도입하였다. 일부 목적을 위해 크로톤알데하이드 또는 글루타르알데하이드와 같은, 이작용기 시약으로 크로스 링킹에 의해 표면에 폴리아민을 안정화시켰다.

[0088] 황산화 다당류(덱스트란 설페이트 또는 헤파린)로 이온성 크로스 링킹에 의해 코팅을 추가로 안정화하였다. 필요한 경우 이러한 단계를 반복하고 샌드위치 구조를 형성하였다. 각각의 단계 사이에 주의하면서 린싱(물, 적합한 버퍼)을 수행하여야 하였다. PEI 또는 키토산의 마지막 첨가 후에, 천연 헤파린의 환원 말단 잔기에서 알데하이드 작용을 이용하는, 환원성 아민화에 의해 천연 헤파린의 아민화된 표면에 종점 부착(EPA)을 수행하였다.

[0089] 환원 말단 잔기에서 더 반응성이 있는 알데하이드 작용은 헤파린의 부분적, 질소의 분해에 의해 달성할 수 있다. 반응시간은 줄어들지만, 고정된 헤파린은 더 작은 분자량을 갖게 된다. 환원성 아민화에 의해, 수용액 내에서 커플링을 수행한다(시아노보로하이드라이드, $CNBH_3^-$).

[0090] 이러한 대체 방법으로서, 아민화된 매체를 아세테이트 버퍼 (800 ml, 0.1 M, pH 4.0) 및 4.0 g 질산에 부유시키고(suspended) 분해된 헤파린 (Pharmacia사의 헤파린, 스웨덴)을 첨가하였다. 0.5 시간 동안 셰이킹 후에 $NaBH_3CN$ (0.4 g)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 24 시간 동안 셰이크한 후, 헤파린화된 매체를 생성하기 위해 상기와 같이 처리하였다.

[0091] 헤파린 1-10 $\mu g/cm^2$을 유리, 셀룰로그, 키틴 등과 같은 모든 친수성 표면, 및 폴리비닐 클로라이드, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리스티렌, PTFE 등과 같은 거의 모든 소수성 중합체와 커플링할 수 있다.

[0092] 헤파린에 공유결합으로 부착된 종점을 갖는 만들어진 PE-비드를 에틸렌옥사이드(ETO)로 살균하고 0.9% 소듐 클로라이드 및 초순수로 린스한다. MBTH 법(Larm O, Larsson R, Olsson P. 변형된 환원 말단 잔기를 통한 헤파린의 선택적 공유결합에 의해 제조된 신규의 비-트롬보겐성 표면. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983; 11: 161-173 및 Riesenfeld J, Roden L. 헤파린 및 동족 다당류 내에서 N-황산화, N-아세틸화, 및 비치환된 글루코사민 아미노 그룹의 정량적 분석. *Anal Biochem* 1990; 188: 383-389)에 의해 판정된 헤파린의 양은 비드 1g당 2.0mg의 헤파린이었다.

[0093] 사용된 폴리에틸렌 비드는 0.3 mm 평균 직경을 가졌으며 헤파린 분자가 표면에 공유적으로 종점 부착되어 탄수화물 사슬이 헤파린/헤파란 설페이트에 대한 친화성을 갖는 단백질에 대해 더 쉽게 접근 가능하도록 하는 것을 보장하는 기술에 의해 헤파린화하였다. 고정된 헤파린의 평균 분자량은 약 8 kDa이 되도록하였으나, 2 mg(대략 360 IU와 동등)을 비드 1 그램당 각각 커플링하였다. 과-헤파린화되었으나, 비-헤파린화되지 않은 비드를 통과하는 혈액으로부터 안티트롬빈 (AT) 농도의 75%의 예상되는 제거에 의해 이러한 표면의 무결성을 확인하였다.

[0094] 이러한 데이터는 Bindslev 등(Bindslev L, Eklund J, Norlander O, Swedenborg J, 등 표면 헤파린화된 인공폐로 수행되는 체외의 이산화탄소 제거에 의한 급성 호흡 부전의 치료. *Anesthesiology* 1987; **67**: 117-120.)에 의해 발행된 표면 헤파린화된 산소공급기를 사용하는 패혈증 환자에 대한 체외의 폐 보조 (ECLA)에서 이미 관찰된 것과 잘 부합한다.

[0095] 8.2. 실시예 2

[0096] *환자*

[0097] 캐롤린스카(Karolinska) 대학 병원의 지역 윤리 위원회가 연구 프로토콜을 승인하였고 각각의 환자로부터 서명된 정보 동의를 얻었다. 3명의 패혈증 (열 >38℃, 오한, 백혈구 >12 x 10^9 세포/L) 환자 (2M/1F, 연령 43, 56 및 68세; **표 1**) 혈액투석기로부터 동맥혈을 얻었다.

표 1. 수혈하는 환자의 임상적 특징

환자	성별	연령 (세)	체온 (°C)	심박동 수 (박동/분)	평균 혈압 (mmHg)	호흡률 (호흡/분)	백혈구 수 (10^9/L)
1	남성	43	39.2°	110	76	20	19.0
2	남성	56	38.6°	90	95	18	17.5
3	여성	68	38.5°	100	89	21	19.5

[0098]

[0099] 환자에게 광범위 항생제 (아미노글루코시드와 함께 세프타지딤 또는 세프록심; 각각 1투여량) 및 헤파린 (투석 시작 시 200 IU/kg 체중)을 미리 투여하였다. 혈액을 EDTA 진공 튜브에 수집하였고 즉시 인접한 룸(room)으로 옮겨 미리 제조된 칼럼에 1 mL를 적용하였고 1, 5 및 10 mL/분 중 하나로 롤러-펌프를 사용하여 통과시켰다. 칼럼을 통과한 혈액을 즉시 다른 한쪽 끝에 수집하였고 냉장-원심분리하였다 (4500 G). 그 다음 상청액을 수집하고 이후 분석을 위해 -80℃에서 냉동시킨다.

[0100] 8.3. 실시예 3

[0101] *사이토카인의 정량적 분석*

[0102] 플레이트 리더(reader) (Multiskan Ascent)와 광루미네선스를 사용하여 사이토카인의 양을 결정한다. 3개의 웰(well)에서 각각의 샘플을 측정하고 분석에 기하 평균을 사용하였다. 모든 키트에서 인트라어세이(intraassay) 변동계수는 8% 미만이었다. 우리는 Coamatic 안티트롬빈 키트 (Haemochrom, cat # 8211991), Quantikine Human IL-6 (R&D Systems, cat # D6050), Quantikine Human IL-10 (R&D Systems, cat # D1000B), 단백질 C 항원 테스트 96 (HL Scandinavia AB, product #H5285), Human CCL5/RANTES Quantikine (R&D Systems, cat #DRN00B), Quantikine Human sVCAM-1 (CD106) (R&D Systems, cat # DVC00), Quantikine Human IFN-감마 (R&D Systems, cat # DIF50), Quantikine HS TNF-알파/TNFSF1A (R&D Systems, cat # HSTA00D) 및 BD OptEIA Human C5a ELISA 키트 II (BD Biosciences, cat # 557965)를 사용하였다.

[0103] *통계적 평가*

[0104] 중요성을 나타내는 0.05 미만의 양측(two-tailed) p-값으로, 각각의 사이토카인의 전후 칼럼 혈액 농도를 비교하기 위해 짝지은 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하였다. 결과를 **표 2**에 요약하였다.

표 2. 다른 칼럼 통한 혈액 통과 전후 측정된 시토킨의 농도.

시토킨		대조군 비드		헤파린화된 비드	
	통과 전	*통과 후*	*p-값*	*통과 후*	*p-값*
10 g 비드 / 1 mL 혈액					
VCAM *(ng/mL)*	115.5	99.0 (-14%)	0.30	88.8 (-23%)	<0.05
IL-6 *(pg/mL)*	19.7	17.4 (-12%)	0.17	15.0 (-24%)	0.16
RANTES *(pg/mL)*	147.1	832.5 (+466%)	<0.05	156.4 (+6%)	0.61
인터페론-g *(pg/mL)*	340.0	296.0 (-13%)	0.32	287.0 (-16%)	0.45
TNF-α *(pg/mL)*	50.3	45.6 (-9%)	0.46	20.6 (-59%)	<0.01
안티트롬빈 *(% 활성)*	105.0	92.5	0.10	26.0	<0.01
1 g 비드 / 1 mL 혈액					
VCAM *(ng/mL)*	115.5	99.5 (-14%)	0.30	89.2 (-23%)	<0.05
IL-6 *(pg/mL)*	19.7	17.5 (-11%)	0.17	15.9 (-19%)	0.16
RANTES *(pg/mL)*	147.1	833.0 (+466%)	<0.05	156.8 (+7%)	0.61
인터페론-g *(pg/mL)*	340.0	296.7 (-13%)	0.32	287.5 (-15%)	0.45
TNF-α *(pg/mL)*	50.3	46.3 (-8%)	0.46	21.1 (-58%)	<0.01
안티트롬빈 *(% 활성)*	105.0	93.0	0.10	26.8	<0.01

[0105]

[0106] *사이토카인 결합*

[0107] 분석된 사이토카인의 전- 및 후-칼럼 농도를 표 2 및 도 1에 나타내었다. 간단히, 헤파린화된 비드를 통한 통과는 비-헤파린화된 비드와 비교할 때 혈액 VCAM 및 TNF에서 상당히 더 큰 감소를 일으켰다.

[0108] *비드 부피의 영향*

[0109] 1:1 및 1:10 혈액-대-비드 부피로 얻어진 데이터는 상당히 다르지 않았다 (표 2).

[0110] *유속의 영향*

[0111] 1부터 10mL/분까지 다양한 혈액 유속은 각각의 사이토카인의 제거된 양에 상당한 영향을 주지 않았고, 관찰된 고정된 헤파린 분자에 대한 결합은 매우 빠른 사건이며 확산 운동에 의존하지 않는다는 것을 분명히 나타낸다.

[0112] 8.4. 실시예 4

[0113] 이 실시예에서, 첨가했던 재조합 TNF-α인 혈소판 부족 혈장 5 리터를 임상적으로 규격화된 카트리지로 테스트하였다. 실시예 1에서 기술된 바와 같이 300 ml 카트리지를 헤파린화된 PE 비드와 패킹하였다. 50도의 온도로 16 시간 사이클을 사용하여 ETO 살균을 사용하여 장치를 살균하였다. 연구를 시작하기 전에 추가 12 시간 동안 장치에서 "가스가 빠져나가도록" 하였다.

[0114] 냉동의, 여과되지 않은 돼지의 헤파린화된 혈소판 부족 혈장 5.1L를 Innovative Research사로부터 구입하였고, 사용하는 날까지 -20도 냉동고에 저장하였다. Invitrogen사로부터 분말 형태인 Recombinant Human Tumor Necrosis Factor-α 1mg을 제공받았다.

[0115] 오전 공정 중 -20 도 냉동고에서 혈장을 꺼내어 해동을 위해 온수조에 넣었다. 농도 1mg/ml로 재구성하기 위해 1ml 멸균수를 1mg 분말의 TNF-α와 혼합하였다.

[0116] Fresenius Kidney 대신에 seraph 혈액여과기로 설정된 폐쇄 시스템에서 "콤비세트(Combiset)" 혈액투석 혈액 튜빙(tubing) (Fresenius 기계에 사용되는 표준 튜빙)으로 Fresenius 2008K 투석 기계를 설정하였다. 혈장 5L를 환자의 동맥 및 정맥 관에 연결된 5L 저장백으로 옮겼다. 튜빙과 함께 투석 기계가 제대로 작동하고 폐쇄 회로를 통해 공기가 없도록 준비하였다.

[0117] 혈장 5L 백을 공정을 통해 온도를 유지하도록 Bair Hugger 보온 블랭킷으로 감싸 플레이트 락커에 두었다. 이때 투입 전 대조군 샘플을 수집하여 급성냉동을 위해 액체 질소에 두었다. 그 다음 샘플을 샘플 저장박스로 옮기고 드라이아이스를 두었다. 모든 연결을 확인한 후, 0.415ml TNF-α를 저장백의 포트(port)로 주입하였다. TNF-α와 함께 혈장을 투입 후 대조군 샘플을 수집하기 전에 10분 동안 락커에서 혼합되도록 하였다. 투입 후 대조군 샘플을 수집하였고, 액체 질소 내에서 급속냉동한 뒤, 드라이아이스가 놓인 샘플 박스로 옮겼다. 투석 시스템을 살린으로 정화하였고 혈장이 폐쇄 시스템을 통과할 때 시스템 클록(clock)을 시작하였다. 첫 번째 샘플을 5분에 필터로부터 상부로 수집하였다.

[0118] 테스트 실시의 첫 번째 시간 동안, 혈액여과기의 포트 바로 상부 및 또한 바로 하부로부터 매 5분마다 샘플을 수집하였다. 샘플을 액체 질소 내에서 급속냉동하고 드라이아이스가 놓인 샘플 저장 박스에 두었다.

[0119] 테스트 실시의 두 번째 및 세 번째 시간 동안, 혈액여과기의 포트 바로 상부 및 또한 바로 하부로부터 매 10분마다 샘플을 수집하였다. 샘플을 액체 질소 내에서 급속냉동하고 드라이아이스가 놓인 샘플 저장 박스에 두었다.

[0120] 테스트 실시의 네 번째 및 다섯 번째 시간 동안, 포트 상부 및 하부로부터 매 20분마다 샘플을 수집하였다. 또한 이러한 샘플을 액체 질소 내에서 급속냉동하고 드라이아이스가 놓인 샘플 저장 박스에 두었다.

[0121] 각각의 샘플 수집에서, 각각의 시점에 대한 상부 및 하부 둘 다, 잔여의 TNF-α를 피하기 위해 새 니들 및 새 시린지를 사용하였다.

[0122] 혈장 내 TNF-α의 양을 모니터하기 위해 ELISA를 수행하였다. 96-웰 플레이트를 코팅하기 위해, 포획 항체(capture antibody) 10 ㎕를 코팅 버퍼 A 10 ㎕로 희석하였고 각각의 웰에 100 ㎕를 첨가하였다. 플레이트를 파라필름으로 덮고 4°C에서 하룻밤 또는 주말동안 저장하였다. 샘플을 -80℃ 냉동고로부터 제거하고, 기록하고, 해동되도록 하였다. 플레이트를 4℃ 냉장고로부터 제거하였고 웰을 흡입하여, 어세이 버퍼 400 ㎕/웰로 한번 세척한 다음, 뒤집어서 흡수성 종이 타올로 블롯팅(blotting) 하였다. 에세이 버퍼 300 ㎕를 각각의 웰에 첨가하였고 플레이트를 60분 동안 인큐베이션하였다. 이 시간 동안에, 에세이 버퍼로 희석함으로써 CytoSet을 포함하는 표준을 제조하였다. 해동된 샘플을 어세이 버퍼로 희석하였다. 샘플을 희석하면, 그것을 냉동고 박스에서 적절한 위치로 재배치하였고 기록으로서 나타내어 -80℃ 냉동고로 회복하였다. 플레이트를 어세이 버퍼 400 ㎕/웰로 다시 세척하고, 뒤집어서 블롯팅하였다. ELISA 템플릿 쉬트에 따라 100 ㎕를 웰에 배치하였다. 샘플 및 표준의 복제를 실시하였고 각각의 플레이트에 대한 표준 곡선을 나타내었다. 검출항체 8.8 ㎕를 5.49 mL 어세이 버퍼로 희석하였고 모든 샘플 및 표준을 첨가하자마자 50 ㎕를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 회전 셰이커 상에서 실온으로 3시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하였고 상기 기술된 바와 같이 5번 흡입하였다. 스트렙타아비딘 컨쥬게이트 (16 ㎕)를 어세이 버퍼 10 mL로 희석하였고 100 mL를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 회전 셰이커 상에서 실온으로 30분간 인큐베이션한 다음 어세이 버퍼로 상기 기술된 바와 같이 5번 세척하였다. TMB 용액 100 ㎕를 각각의 웰에 첨가하였고 플레이트를 회전 셰이커 상에서 30분 추가로 인큐베이션 하였다. 정지액 100 ㎕를 각각의 웰에 첨가하였고 정지액 첨가 30분 내에 $V_{최대}$ 플레이트 리더(reader) 450 nm에서 플레이트를 읽었다.

[0123] 테스트의 결과를 도 1에서 플롯팅하였다. TNF가 리치한(rich) 혈청의 지속적인 사이클링 40분 내에, 차후의 방출이 없는 TNF의 80% 감소가 관찰되었다. 이상적인 혼합으로, 혈장 내의 모든 TNF는 33분 내에 흡착 칼럼을 통과하였을 것이다. 대류 운동을 기초로 하는 흡착을 통한 TNF-α의 제거는 대부분의 TNF가 이 기간 동안 캡쳐된 것을 입증한다.

[0124] 8.5. 실시예 5

[0125] 석영 크리스탈 마이크로밸런스(QCM) 시험을 TNF-α의 헤파린화된 표면에의 비경합적 결합 능력을 정규화하였다. QCM은 특이적으로 제조된 크리스탈에서의 흡수제 중량을 검출할 수 있는 기술이다. 최소 검출 한계는 0.5ng/cm^2이다. QZCM은 크리스탈의 공명 진동수를 검출한다. 흡착을 통해 크리스탈 질량이 증가함에 따라 공명 주파수는 질량 증가에 비례하여 변한다. 질량 변화(Δm)는 다음 방정식에 의해 기술된다.

[0126] $$\Delta m = -C\frac{1}{n}\Delta f$$

[0127] C = 17.7ngsm^{-2}s^{-1} n = 배진동

[0128] 폴리스티렌 코팅된 QCM 크리스탈을 실시예 1에서 설명된 방법에 따라 헤파린화하였다. 재조합 TNF-α 를 PBS에 첨가하여 최종 농도가 83㎍/L인 용액을 제조하였다. 이후, 용액을 4개의 QCM 크리스탈을 함유하는 세포를 통과시켜 50㎕/min의 속도로 흘려주었다. 2개의 크리스탈을 헤파린화하였으며, 2개는 대조군 크리스탈이었다(미처리된 폴리스티렌). 시험은 총 20시간 걸렸다. 헤파린화된 크리스탈에 흡수된 TNF-α의 양 및 대조군에 대한 결과를 도 2에 나타냈다. 헤파린화된 크리스탈에 흡수된 TNF-α의 최대량은 1234ng/m2이었으며, 대조군 표면에서의 흡수는 무시할만 하였다.

[0129] 8.6. 실시예 6

[0130] *Bacillus anthracis* 감염된 마카크로부터 채취한 플라스마로부터 사이토카인의 제거를 테스트하는 연구를 헤파린화된 비드를 이용하여 수행하였다. 플라스마는 여러 동물이 죽었을 때 수집하였으며 풀링하였다. 1ml의 필터 시린지를 실시예 1에서 개괄한 공정에 따라 헤파린화된 0.5 그람의 PE 비드 아니면 대조군으로 사용하기 위한 무처리 PE 비드와 패킹하였다. 탑(top) 다공성 플레이트를 비드의 탑에 두고 살린 또는 플라스마를 필터 시린지에 첨가할 때 비드가 떠다니지 않도록 하였다. 필터 시린지를 2ml의 Tris-완충 살린(TBS)를 이용하여 준비하였다. 2ml의 살린을 5ml 시린지를 이용하여 필터 시린지를 통과시켰다. 이후 5ml 시린지의 플런저(plunger)를 뽑아 4ml의 공기로 채웠다. 이후, 공기를 필터 시린지를 통과시켜 남아있는 살린을 비드 밖으로 밀어냈다. 이후, 0.5ml의 플라스마를 5ml의 시린지로 취한 후 필터 시린지를 통하여 프레스하였다. 추가로 4ml의 공기를 필터 시린지를 통과시켜 잔류하는 플라스마를 모두 제거하였다. 플라스마를 시린지를 통하여 빼낸 후, 사이토카인 농축 분석을 위하여 앨리쿼트를 샘플링하고 급속 냉동하였다. GRO-α, IL-8, MIP-1β, Rantes, 및 TNF-β를 테스트하기 위하여 Luminex® Multiplex 분석법을 이용하였다. 그 결과를 표 3에 요약하였다.

[0131] 표 3.

[0132]

사이토카인	통과 이전 수준 (pg/ml)	대조군 비드를 통한 통과 (pg/ml)	대조군에서 제거된 %	헤파린 비드를 통한 통과 (pg/ml)	헤파린 비드에서 제거된 %
GRO-α	263.5	158.5	39.8%	77.66	70.6%
IL-8	504.9	460.8	8.7%	312.4	38.1%
MIP-1β	66.2	56.4	14.8%	51.8	21.8%
RANTES	1105.3	930.3	15.8%	559.7	49.4%
TNF-α	7.3	7.9	-8.2%	4.3	41.4%

[0133] 8.7. 실시예 7

[0134] *레이어드 조립체(layered assembly)를 이용하여 사이토카인 및 엔도톡신을* 결합하기 위한 카트리지

[0135] 카트리지를 2개의 상이한 흡착 매체를 이용하여 제작하였다. 사이토카인을 캡쳐하기 위하여 헤파린화된 비드를 이용하였으며 엔도톡신을 캡쳐하기 위하여 PEI 비드를 이용하였다. 헤파린화된 비드 대 PEI 비율을 조절함으로써, 혈액 적합성을 유지할 수 있다. PEI 비드를 실시예 1의 첫 번째 두 단계를 따라 제조하였다.

[0136] 이 실시예에 있어서, 카트리지를 헤파린화된 비드 및 폴리에틸렌이민(PEI) 코팅된 비드와 함께 제작하였다. 300ml의 흡착 컬럼을 수직 스탠드에 고정시켰다. 이후, 평균 300 미크론인 헤파린화된 비드 50ml을 카트리지에 첨가하고 정착시켰다. PEI 및 헤파린화된 비드의 50:50 혼합물을 첨가하여 200ml이 되게 하였다. 이후, 카트리

지를 최종 50ml의 헤파린화된 비드로 꼭대기까지 채웠다. 이후, 카트리지를 실링하고 비드의 폐쇄 패킹이 흡착 매체의 레이어드 구조를 유지하게 하였다. 이 카트리지에서, 2/3번째 비드가 헤파린화되었으며 1/3번째가 아미노화되어 고유하게 혈전성이 되었다.

[0137] 8.8. 실시예 8

[0138] *균일한 비드 혼합물을 이용하여 사이토카인 및 엔도톡신에 결합시키기 위한* 카트리지

[0139] 2개의 상이한 흡착 매체를 이용하여 카트리지를 제작하였다. 사이토카인을 캡쳐하기 위하여 헤파린화된 비드를 이용하였으며 엔도톡신을 캡쳐하기 위하여 PEI 비드를 이용하였다. 헤파린화된 비드 대 PEI 비드의 비율을 조절함으로써, 장치의 전체 혈액 적합성을 유지할 수 있다.

[0140] 이 실시예에 있어서, 카트리지는 헤파린화된 비드 및 PEI 코팅된 비드로 제작하였다. 300ml의 흡착 컬럼을 수직 스탠드에 고정시켰다. 100ml의 PEI 코팅된 비드를 200ml의 헤파린화된 비드에 첨가하였으며 완전히 혼합하였다. 이후, 300ml의 비드를 카트리지에 처첨가하여 실링하였다. 비드의 폐쇄 패킹은 비드의 무작위 혼합물을 유지한다. 이 카트리지에 있어서 2/3번째 비드가 헤파린되었으며 1/3번째 비드가 아미노화되었다.

[0141] 8.9. 실시예 9

[0142] 레이어드 조립체를 이용하여 사이토카인, 그람음성 박테이아, 및 엔도톡신을 결합시키기 위한 카트리지

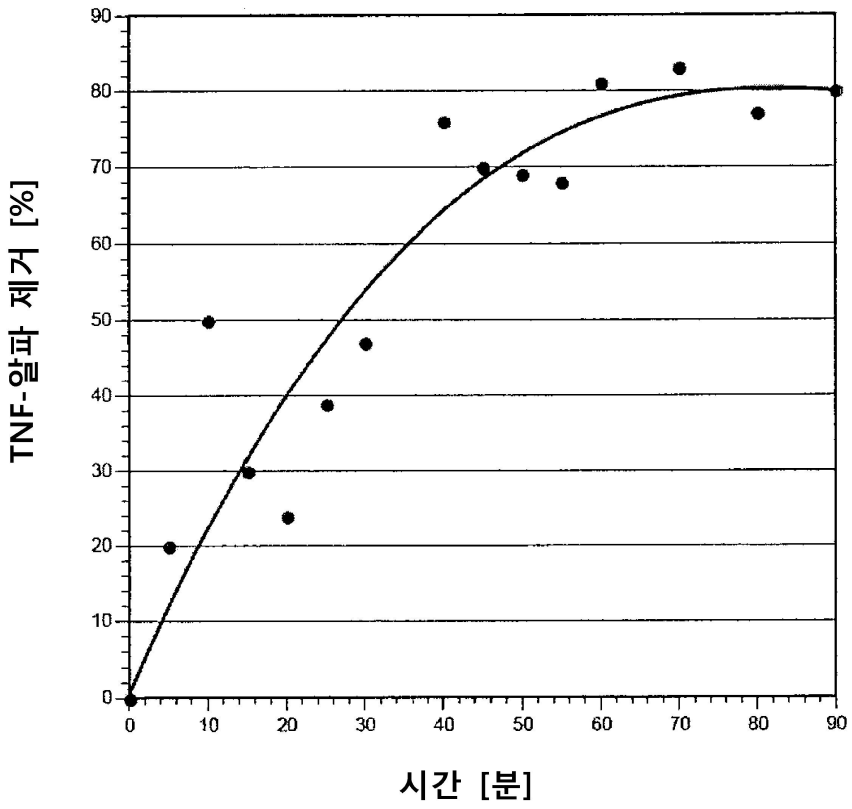
[0143] 카트리지를 상이한 흡착 매체를 이용하여 제작하였다. 사이토카인을 캡쳐하기 위하여 헤파린화된 비드를 이용하였고 그람음성 박테리아를 캡쳐하기 위하여 만노스 관능화된 비드를 이용하였으며 엔도톡신을 캡쳐하기 위하여 PEI 비드를 이용하였다. 헤파린화된 비드, 만노스 관능화된 비드, 및 PEI 코팅된 비드의 비율을 조절함으로써, 혈액 적합성을 유지할 수 있다.

[0144] 300ml의 흡착 컬럼을 수직 스탠드에 고정시켰다. 평균 300 미크론인 헤파린화된 비드 50ml을 카트리지에 첨가하고 가라앉도록 하였다. 200ml의 비드와 , 동일한 양의 헤파린화된 비드, PEI 비드 및 만노스 관능화된 비드를 카트리지에 첨가하였다. 이후, 카트리지를 50ml의 헤파린화된 비드로 꼭대기까지 채웠다. 이후, 카트리지를 실링하였으며 비드의 폐쇄 패킹은 흡착 매체의 레이어드 구조를 유지하였다. 이 카트리지에 있어서, 비드의 55.6%는 헤파린화되었으며, 22.2%는 PEI 비드였고, 22.2%는 만노스 관능화되었다.

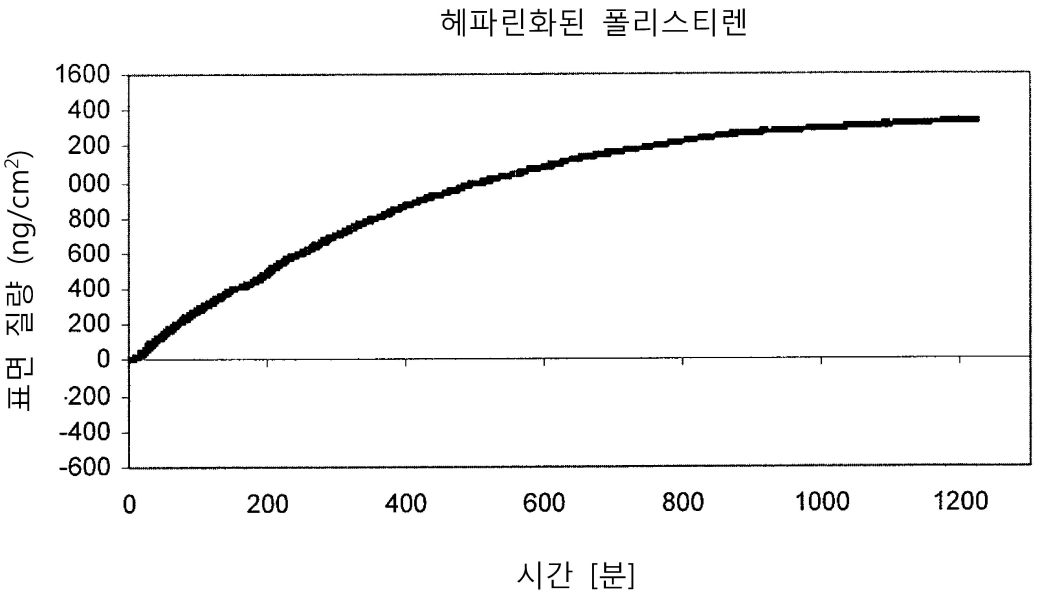
[0145] 본 발명의 구체예는 하기 청구항에서 더 설명된다.

도면

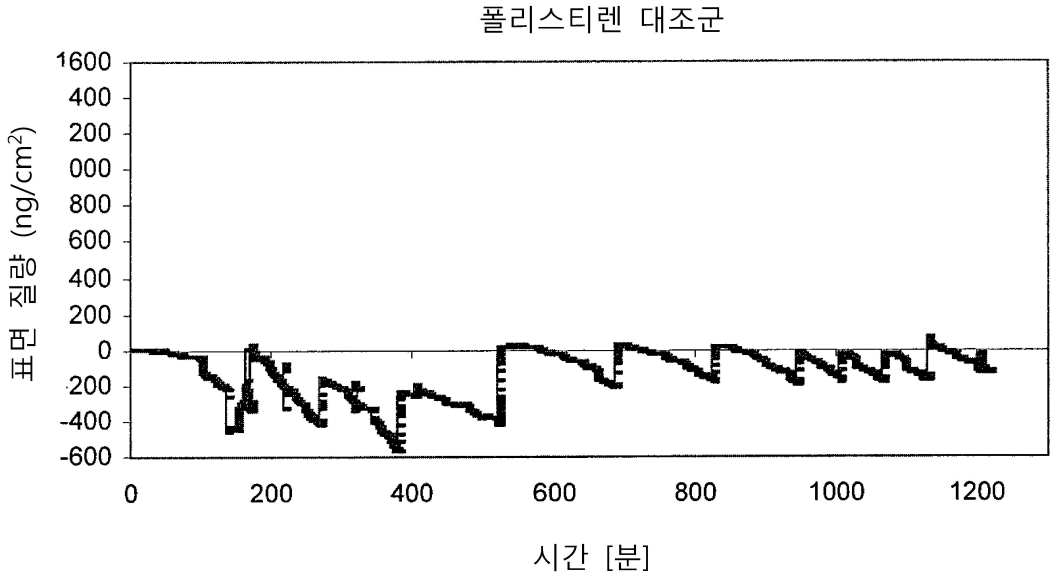
도면1


TNF-알파 제거 [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
시간 [분]

도면2a


헤파린화된 폴리스티렌
표면 질량 (ng/cm²)
1600
400
200
000
800
600
400
200
0
-200
-400
-600
0
200
400
600
800
1000
1200
시간 [분]

도면2b


폴리스티렌 대조군
표면 질량 (ng/cm²)
1600
400
200
000
800
600
400
200
0
-200
-400
-600
0
200
400
600
800
1000
1200
시간 [분]