

I. Область техники

Настоящее изобретение относится к устройствам и способам для удаления целевых агентов из образца. В частности, настоящее изобретение относится к удалению патогенов из биологических образцов.

II. Уровень техники

Процесс адсорбции биологических частиц на твердых подложках находит ряд практических применений при очистке, детектировании и удалении целевых молекул из многокомпонентных потоков. Например, ионообменные, гидрофобные и афинные лиганды способны адсорбировать множество агентов, преимущественно на хроматографических набивках, для осуществления их выделения из водных растворов. После адсорбции биологический агент может либо элюироваться в виде продукта, либо детектироваться посредством ELISA и других аналитических подходов.

В некоторых случаях раствор, содержащий целевой биологический агент, также содержит большие частицы, такие как эритроциты, вирусы, бактерии, липосомы, лейкоциты и агрегаты различных размеров. Во многих из этих случаев, является желательным, чтобы большие агрегаты имели возможность для протекания через твердую матрицу или набивку, не влияя на способность целевых биологических агентов к связыванию с набивкой. Это требует наличия в твердой матрице объемов пор, которые являются достаточно большими, чтобы соответствовать потоку больших частиц. К сожалению, большие объемы пор могут иметь низкую площадь поверхности, что ограничивает способность твердой матрицы к связыванию целевых агентов.

В других случаях является желательным реальное отфильтровывание больших частиц для облегчения адсорбционного выделения более мелких целевых агентов. Один из примеров представляет собой удаление клеток из культурной среды для извлечения внеклеточного продукта.

В дополнение к этому имеется множество примеров, когда является желательным связывание, а не фильтрование биологических частиц, которые являются очень большими. Например, является важной специфичная адсорбция многих патогенов, включая инфекционные прионы, вирусы, бактерии и токсины, из смесей биологических агентов. Эти частицы часто встречаются сложности при проникновении в такие малые поры, которые требуются для связывания в доступных в настоящее время устройствах для очистки и выделения образца.

Нетканые волокна или сетки, также упоминаемые как полимерные волокна, полученные раздувом из расплава, или связанные сетки из волокон, полученных вытягиванием из расплава, хорошо известны и используются для фильтрования и выделения мелкодисперсных частиц из воздуха и водных растворов (см., например, патенты США №№ 4011067 и 4604203, каждый из которых включен здесь в качестве ссылки во всей его полноте). Нагрузка адсорбирующихся материалов из частиц в нетканых сетках также хорошо известна в данной области (см., например, патенты США №№ 4433024; 4797318; и 4957943, каждый из которых включен здесь в качестве ссылки во всей его полноте). Применения включают в себя лицевые респираторы для удаления материалов из частиц и газообразных загрязнений, защитную одежду, изделия для удерживания текучих сред и салфетки для промокания масла.

Совсем недавно сообщалось о способах получения нетканых материалов, импрегнированных частицами для разделения и очистки. Смотри, например, патент США № 5328758, включенный сюда в качестве ссылки во всей его полноте. Патент говорит о функционализированных частицах для присоединения афинных лигандов. Описано, что частицы вдуваются в полимерные волокна во время стадии раздува из расплава. Нетканый материал содержит поры, имеющие размеры пор в пределах от 0,24 до 10 мкм, предпочтительно, от 0,5 до 5 мкм. Описывается также, что импрегнированный нетканый материал должен иметь Gurley Time (время, необходимое для прохождения 100 см³ воздуха через 1 кв.дюйм материала при нормальном давлении) по меньшей мере 2 с.

Публикация WO93/01880 описывает материал для фильтра из нетканого материала для удаления лейкоцитов, полученный посредством диспергирования в среде массы из большого количества малых кусочков волокон, имеющих диаметр волокна не более чем 0,01 мкм и длину примерно от 1 до 50 мкм, вместе с способными к прядению и переплетению короткими волокнами, имеющими среднюю длину от 3 до 15 мм. Патенты США №№ 4550123 и 4342811, каждый из которых включается сюда в качестве ссылки во всей его полноте, описывают микропористые полимерные волокна и пленки, которые содержат частицы, способные адсорбировать пары, жидкости и растворенные вещества. Типичные частицы сорбента включают в себя активированный уголь, силикагель и материалы типа молекулярных фильтров.

Настоящее изобретение, как здесь описано, предусматривает устройства и способы для очистки образца и детектирования и удаления целевых агентов из образца с повышенной эффективностью и специфичностью, и с достаточной экономией времени и средств, по сравнению с устройствами, известными из литературы.

III. Сущность изобретения

Настоящее изобретение, как здесь описывается и поясняется, предусматривает способы, устройства и наборы для удаления целевых агентов из образца.

В одном из аспектов настоящее изобретение предусматривает устройство для выделения по меньшей мере одного целевого агента из образца. Устройство содержит одну или более пористых матриц, имеющих размеры пор, большие чем 10 мкм, и множество частиц, импрегнированных в них, где по

меньшей мере один целевой агент соединяется с одной или более пористыми матрицами, частицами, или как с теми, так и с другими, и удаляется из образца. В одном из вариантов осуществления пористая матрица, частицы или как те, так и другие, имеют одинаковые или различные размеры пор. В другом варианте осуществления, частицы имеют размер пор примерно от 0,001 мкм примерно до 0,1 мкм. Еще в одном варианте осуществления частицы содержат пористую смолу, имеющую поры, соединенные с поверхностными областями, в пределах примерно от 1-2 м²/г сухой смолы примерно до 300 м²/г сухой смолы.

Еще в одном варианте осуществления пористая матрица содержит природные волокна, синтетические волокна или как те, так и другие. В предпочтительном варианте осуществления пористая матрица содержит по меньшей мере один нетканый материал. В другом варианте осуществления, пористая матрица представляет собой смесь из двух или более одинаковых или различных типов тканых и/или нетканых материалов.

Еще в одном варианте осуществления имеется устройство по п.1, в котором частицы содержат полиметакрилат, метакрилатную смолу, модифицированную смолу или их сочетание.

В одном из вариантов осуществления устройство содержит модифицированную смолу и одна или более пористых матриц содержат обработанный плазмой полипропилен, который функционализируется с помощью реакционноспособной группы, содержащей лиганд, имеющий первичный амин, и гидрофильный спейсер, содержащий единицы полиэтиленгликоля.

В другом варианте осуществления частицы находятся между одной или более пористыми матрицами.

В одном из вариантов осуществления частицы, пористая матрица или как те, так и другие, функционализируются с помощью одной или более реакционноспособных групп. Целевые агенты соединяются с частицами, с пористой матрицей, или как с первыми, так и со второй, посредством поглощения, адсорбции, ионного обмена, ковалентных связей, гидрофобного, дипольного, квадрупольного, водородного связывания, специфичных взаимодействий, образования заряженных частиц, посредством афинного взаимодействия со специфичными лигандами или их сочетания. Еще в одном варианте осуществления, частицы представляют собой полиметакрилатные или метакрилатные смолы, включающие в себя, в качестве примера, а не ограничения, полимерную матрицу FRACTOGEL™ EMD, TOYOPEARL™ или TSK-GEL™. Еще в одном варианте осуществления смола представляет собой TOYOPEARL™ Amino 650, включая, например, Amino 650 U, Amino 650 M или частично ацетилованную форму Amino 650M или Amino 650 U. Частично ацетилованная смола содержит примерно от 5 примерно до 95% или более ацетилованных смол. В одном из вариантов осуществления частично ацетилованная смола содержит примерно от 10 примерно до 85% ацетилованной смолы. В другом варианте осуществления, частично ацетилованная смола содержит примерно от 20 до 75% ацетилованной смолы. Еще в одном варианте осуществления частично ацетилованная смола содержит примерно от 30 до 60% ацетилованной смолы. В другом варианте осуществления частично ацетилованная смола содержит примерно от 40 до 60% ацетилованной смолы. Здесь предполагается, что при упоминании таких конкретных диапазонов упомянутые диапазоны также включают в себя все конкретные целые числа в указанных диапазонах. Например, в пределах примерно от 40 до 60%, как предполагается, охватывает также 45, 50, 55, 57% и тому подобное, без конкретного упоминания каждого указанного диапазона. В другом варианте осуществления смола включает в себя влажные смолы (то есть, полностью предварительно гидратированные), сухие смолы (то есть, не гидратированные предварительно перед вступлением в контакт с образцом, и/или изначально сухие, но гидратированные перед вступлением в контакт с образцом). Использование частично ацетилованной сухой и/или влажной смолы также охватывается рамками настоящего изобретения.

В другом аспекте устройство содержит функциональную пористую нетканую или тканую матрицу, которая имеет способность адсорбировать целевые агенты. В одном из вариантов осуществления устройство содержит непористую матрицу, а также пористую матрицу, одна или обе из этих матриц могут быть функционализированными. В другом варианте осуществления пористая матрица содержит одинаковые или различные размеры пор, большие чем 10 мкм.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы выделения по меньшей мере одного целевого агента из образца, включающие в себя: (а) создание образца, потенциально содержащего один или более целевых агентов; (b) создание устройства, содержащего (i) одну или более пористых матриц, имеющих размеры пор, большие чем 10 мкм, и (ii) множество частиц, импрегнированных в пористой матрице, где частицы имеют способность к присоединению по меньшей мере одного целевого агента; (с) воздействие устройства на образец; (d) присоединение по меньшей мере одного целевого агента к частицам, к одной или более пористым матрицам или как к тем, так и к другим; и (е) выделение по меньшей мере одного целевого агента из образца.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает тест-наборы для целевого разделения, детектирования и очистки образца, содержащие один или более из следующих компонентов: (i) устройство, содержащее пористую матрицу, имеющую размеры пор большие, чем 10 мкм, и множество частиц, импрегнированных в ней, (ii) контейнер, содержащий один или более компонентов из буферов, реаген-

тов, химических агентов, реагентов для функционализации, ферментов, агентов для детектирования, материалов для контроля, (iii) инструкции для использования тест-набора и (iv) упаковочные материалы.

Другие предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения будут ясны специалисту в данной области в свете того, что известно в данной области, в свете следующих далее чертежей и описания настоящего изобретения и в свете формулы изобретения.

IV. Краткое описание чертежей

Фиг. 1 изображает схематическое представление нетканых материалов, импрегнированных смолой (RIN). Нетканые материалы имеют размер пор примерно 12 мкм и импрегнированы набивкой из пористой смолы. Средний размер пор является достаточно большим для того, чтобы дать возможность эритроцитам свободно протекать через устройство, не проявляя никаких признаков какого-либо повреждения. Там показаны частицы (10), волокна (20), импрегнированные частицы (11) и нетканый материал (21).

Фиг. 2 изображает схематическое представление устройства, состоящего из квадратных листов нетканого или тканого материала. Пакетированный ряд из листов нетканого или тканого материала покрыт афинными лигандами на обеих сторонах. Образец протекает по сложному пути между листами. Размер пор в листах устанавливается в соответствии с желаемым применением.

Фиг. 3 показывает фотографию, сделанную с помощью сканирующего электронного микроскопа, внутреннего/наружного слоя образца 13 табл. 1, каландрированного при 150°F и при 100 фунтов на линейный дюйм (PLI) с помощью смолы. Фотография под микроскопом показывает области карманов образца 13 при увеличении 50X.

Фиг. 4 показывает фотографию, сделанную с помощью сканирующего электронного микроскопа, внутреннего/наружного слоя образца 11 табл. 1, каландрированного при 180°F и при 400 PLI с помощью смолы. Фотография под микроскопом показывает области карманов образца 11 при увеличении 50X.

Фиг. 5 изображает гистограмму, показывающую результаты анализа Micro BCA 12 фракций, собранных для различного количества слоев мембраны (пористой матрицы). Различные концентрации β-лактоглобулина показаны на неустойчивых фракциях раствора, прошедших через 1 слой мембраны с включенной смолой (отмеченных "смола") или один слой мембраны (отмеченных "контроль").

Фиг. 6 изображает гистограмму, показывающую результаты анализа Micro BCA 12 фракций, собранных для различного количества слоев мембран. Различные концентрации β-лактоглобулина показаны на неустойчивых фракциях раствора, прошедших через 2 слоя мембраны, с включенной смолой (отмеченных "смола") или 2 слоя мембраны (отмеченных "контроль").

Фиг. 7 изображает гистограмму, показывающую результаты анализа Micro BCA 12 фракций, собранных для различного количества слоев мембран. Различные концентрации β-лактоглобулина показаны на неустойчивых фракциях раствора, прошедших через 3 слоя мембраны, с включенной смолой (отмеченных "смола") или 3 слоя мембраны (отмеченных "контроль").

Фиг. 8 изображает гистограмму, показывающую результаты анализа Micro BCA 12 фракций, собранных для различного количества слоев мембран. Различные концентрации β-лактоглобулина показаны на неустойчивых фракциях раствора, прошедших через 4 слоя мембраны, с включенной смолой (отмеченных "смола") или 4 слоя мембраны (отмеченных "контроль").

Фиг. 9 изображает распределение частиц на рулонах мембран. Частицы смолы однородно диспергируются на нижней мембране без избытка над краями мембраны.

V. Подробное описание изобретения

Здесь описаны способы, устройства и наборы для эффективного выделения целевых молекул из образца. Способы, наборы и устройства по настоящему изобретению являются пригодными для использования во множестве применений, включая очистку, выделение и обработку экспрессируемых генных продуктов клеток, производство и доставку биофармацевтических агентов, и применения для прогностики, диагностики и/или детектирования, среди прочего. Настоящее изобретение, описанное здесь, описывает новые устройства, которые разделяют различные компоненты образца и дают возможность для протекания частиц большего размера через устройство, при этом обеспечивая большие площади поверхности для связывания целевых агентов.

Конкретные применения настоящего изобретения включают в себя удаление патогенов, таких как прионы, вирусы, грибки, бактерии и токсины, из биологических образцов, таких, например, как образец крови, включая цельную кровь, композиции, содержащие эритроциты, концентраты эритроцитов, концентраты тромбоцитов, плазму, производные плазмы, лейкоциты, кровь, обедненную лейкоцитами, культуру клеток млекопитающих, бульоны для ферментирования и другие среды, используемые для производства и доставки биофармацевтических агентов и для приготовления терапевтических агентов.

I. Определения

Определения, используемые в настоящей заявке, приводятся для иллюстративных целей и не ограничивают рамки настоящего изобретения.

Как здесь используется, термин "модифицированные смолы" в рамках настоящего изобретения определяется в широком смысле и включают в себя аналоги, варианты и функциональные производные смолы, с функциональной группой или без нее. Модификация включает в себя, например, замещение,

удаление или добавление химических групп (например, аминокислот) к конкретной смоле или к ее функциональной группе, или как к тем, так и к другим. Например, аминозамещение, ацетилирование, и/или частичное ацетилирование смол включаются в определение модифицированных смол.

Как здесь используется, термин "целевые агенты" в рамках настоящего изобретения определяется в широком смысле и включает в себя химические, биологические или физические агенты, которые захватываются посредством устройства по настоящему изобретению. Целевые агенты включают в себя молекулы, соединения, компоненты клеток, органеллы, агрегаты, токсины, прионы и микроорганизмы, такие как патогены, включая, вирусы, бактерии, грибки и протозоа, среди прочего. Целевые молекулы также включают в себя полимерные молекулы, такие как молекулы полинуклеотидов, например, ДНК, РНК, гибрид ДНК-РНК, противосмысловую РНК, кДНК, геномную ДНК, мРНК, рибозим, молекулы природных, синтетических или рекомбинантных нуклеиновых кислот, олигопептиды, олигонуклеотиды, пептиды, гибриды пептид-нуклеиновая кислота, антигены, антитела, фрагменты антител, большие белки и агрегаты, такие как vWF:FVIII и HDL, среди прочего.

Как здесь используется, термин "патоген", как предполагается, обозначает любой реплицируемый агент, который может находиться в биологическом образце, таком как образец крови, или инфицировать его. Такие патогены включают в себя различные вирусы, бактерии, протозоа и паразиты, известные специалистам в данной области, в целом, как находящиеся в цельной крови или в компонентах крови, инфицирующие их, и другие патогенные загрязнения, еще неизвестные. Иллюстративные примеры таких патогенов включают в себя, но, не ограничиваясь этим, бактерии, такие как виды *Streptococcus*, виды *Escherichia* и виды *Bacillus*; вирусы, такие как вирус иммунодефицита человека и другие ретровирусы, вирус герпеса, парамиксовирусы, цитомегаловирусы, вирусы гепатита (включая вирусы гепатита А, гепатита В и гепатита С), вирусы рох и вирусы *toga*; и паразиты, такие как малярийные паразиты, включая виды *Plasmodium*, и трипаносомальные паразиты.

Как здесь используется, термин "образец" включает в себя любой образец, содержащий целевой агент, который может захватываться с помощью устройства и способа по настоящему изобретению. Образцы могут быть получены из любого источника, который потенциально содержит целевой агент. Такие источники включают в себя животные, растения, почву, воздух, воду, грибки, бактерии и вирусы, среди прочего. Получают животные образцы, например, от биопсии тканей, образцы крови, волос, мазков слизистых, плазмы, сыворотки, кожи, асцитов, плевральных выпотов, торакальной жидкости, спинальной жидкости, лимфоидной жидкости, костного мозга, респираторной жидкости, интестинальной жидкости, генитальной жидкости, стула, мочи, мокроты, слез, слюны, опухолей, органов, тканей, образцов компонентов клеточной культуры *in vitro*, фетальных клеток, клеток плаценты или амниотических клеток и/или жидкости, среди прочего.

Как здесь используется, выражение "среды культур клеток" включает в себя любые среды культур прокариотов или эукариотов, такие, например, как среды культур бактериальных клеток, дрожжей и других микробиологических клеток, среды культур клеток млекопитающих, культуры растительных клеток и культуры насекомых, ферментационные бульоны и другие среды, используемые для получения и доставки биофармацевтических агентов и для приготовления терапевтических агентов.

Как здесь используется, термин "образец крови" включает в себя, например, и не в качестве ограничения, цельную кровь, композиции, содержащие эритроциты (например, концентраты эритроцитов и концентраты тромбоцитов), лейкоциты и кровь, обедненную лейкоцитами, белки крови, такие как факторы сворачивания крови, ферменты, альбумин, плазминоген и иммуноглобулины; и жидкие компоненты крови, такие как плазма, производные плазмы и композиции, содержащие плазму, среди прочих образцов крови.

Как здесь используется, термин "композиция, содержащая эритроциты" означает цельную кровь, концентраты эритроцитов и любую другую композицию, которая содержит эритроциты. Кроме эритроцитов композиция также может содержать биологически совместимый раствор, такой как ARC-8, Nutricell (AS-3), ADSOL (AS-1), Optisol (AS-5) или RAS-2 (Erythrosol), и один или несколько клеточных компонентов крови, один или несколько белков крови, или смесь одного или нескольких клеточных компонентов крови и/или одного или нескольких белков крови. Такие композиции могут также содержать жидкий компонент крови, такой как плазма.

Как здесь используется, термин "частица" означает органические или неорганические пористые или непористые формы, имеющие диаметр примерно от 1 примерно до 200 мкм или более, они включают в себя, например, и не в качестве ограничения, волокна с отношением длины к диаметру примерно от 1 примерно до 20 мкм или более, в дополнение к адсорбирующим частицам, таким как гранулы, шарики, смолы или порошки, среди прочего.

Как здесь используется, термин "сорбент" "адсорбирующий" или "сорбция" означают способность к захвату и удерживанию посредством либо поглощения, либо адсорбции.

Как здесь используется, термин "присоединение" в рамках настоящего изобретения определяется в широком смысле и включает в себя любой тип физических, химических или биологических процессов связывания между двумя частицами и включает в себя, например, и не в качестве ограничения, поглощение, адсорбцию, ковалентное связывание, ионный обмен, гидрофобное, водородное связывание, диполь-

ное, квадрупольное или аффинное взаимодействие, образование заряженных частиц, присоединение аффинных лигандов (то есть, включение пептидов, олигонуклеотидов, белков, спейсерных «ножек», гидрофобных остатков, фторированных материалов), среди прочего.

Как здесь используется, термин "дополненный раствор" относится к раствору, который получает определенное количество целевого белка, токсина, вируса, бактерии или другого организма, в его чистой, частично очищенной или исходной форме.

2. Пористая матрица

Устройства по настоящему изобретению содержат пористую матрицу, имеющую частицы, импрегнированные в ней. Выбор пористой матрицы может широко изменяться в рамках настоящего изобретения. Пригодные для использования матрицы включают в себя тканые и нетканые материалы (такие как волокнистые сетки), микропористые волокна и микропористые мембраны. Эти волокна могут изготавливаться из любых материалов и с помощью любых способов, известных в данной области, включая раздув расплава, связывание волокон, полученных вытягиванием из расплава, и распыление в электрическом поле из расплава.

Волокнистые сетки являются особенно желательными, поскольку такие сетки обеспечивают большие области поверхности, при этом нетканые волокнистые сетки являются предпочтительными, благодаря простоте производства, низкой стоимости материала и возможности изменения текстуры волокна и плотности волокна. Большое разнообразие диаметров волокон, например от 0,05 до 50 мкм, используется при изготовлении устройства по настоящему изобретению. Толщина матрицы изменяется в соответствии с желаемым использованием устройства, например толщиной примерно от 0,1 мкм примерно до 100 см или более. Матрица может использоваться в форме отдельного листа или пакетироваться, по желанию, с получением желаемой емкости для адсорбции. В одном из вариантов осуществления каландрирование или обработка под давлением пористой матрицы требуется для достижения желаемой толщины и размера пор. Пористая матрица устройств по настоящему изобретению изготавливается из большого разнообразия природных и синтетических волокон, в соответствии с точными физическими и химическими свойствами пористой матрицы, предназначенной для конечного применения. Пористую матрицу по настоящему изобретению выбирают из природных или синтетических источников, включая, например, сложный полиэфир, полипропилен, лен, арамид и/или хлопок, среди прочего.

Также в рамках настоящего изобретения находится использование двух или более различных матриц с различными химическими или физическими характеристиками. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения пористая матрица представляет собой смесь из двух или более одинаковых или различных типов тканых и/или нетканых материалов. В другом варианте осуществления используется гибридный из двух или более пористых матриц с различными размерами пор, одна матрица, имеющая меньший размер пор, действует, захватывая более мелкие материалы, в то время как другая матрица, имеющая большие размеры пор, действует в качестве фильтра для материалов больших размеров (лейкоцитов, например). В другом варианте осуществления функциональная пористая матрица для аффинных разделений, имеющая заданный размер пор, размещается внутри другой мембраны как набивка.

2.1. Нетканые материалы

Нетканые материалы представляют собой неупорядоченные волокнистые сетки, сформированные посредством механической, влажной или воздушной раскладки и имеющие в поперечном сечении соединяющиеся друг с другом открытые области. Нетканые материалы обычно представляют собой плоские пористые листы, которые изготавливают непосредственно из отдельных волокон или из расплавленного пластика, или пластиковой пленки. Такие материалы определяются в широком смысле как листовые или сетчатые структуры, связанные вместе, например, посредством пневмосоединения волокон или нитей, или перфорирования пленок, механически, термически или химически, с использованием различных технологий, включая адгезивное связывание, механическое переплетение посредством сшивания или с помощью струи жидкости, пневмосоединения, термического связывания и трикотажного переплетения.

Как правило, нетканые материалы имеют средние диаметры проточных пор (MPF), находящиеся в пределах примерно от 1 до 500 мкм. В одном из вариантов осуществления пористая матрица имеет размер пор по меньшей мере 10 мкм. В предпочтительном варианте осуществления пористая матрица имеет размер пор, больший чем 10 мкм. Еще в одном варианте осуществления пористая матрица имеет размер пор, больший чем 15 мкм. Здесь предполагается, что при упоминании таких конкретных численных значений упомянутые значения также включают в себя все конкретные значения целых чисел между упомянутыми значениями. Например, больший чем 10 мкм, как предполагается, также охватывают 12, 20, 30, 45, 70, 100, 200, 300, 400 и 500 мкм, и тому подобное, без конкретного упоминания здесь каждого конкретного диапазона.

Средний диаметр пор материала может выбираться так, чтобы он соответствовал желаемому диаметру пор для протекания больших агрегатов в биологической смеси. Например, в случае эритроцитов, диаметр проточных пор может составлять порядка примерно 12 мкм. В этом случае любая пористая или непористая матрица с диаметром гораздо больше 12 мкм будет захватываться в пространствах между волокнами, и частицы будут по-прежнему доступными для адсорбции целевых частиц. В результате, для

адсорбции могут использоваться частицы значительно меньшего диаметра, в то же время, делая возможным протекание частиц большего размера через объем пор.

Нетканые материалы изготавливают из волокон, которые в зависимости от способа получения имеют диаметры в пределах, например, примерно от 0,01 до 10 мкм. Волокна состоят из большого разнообразия материалов, включая природные волокна и синтетические волокна. Природные волокна включают в себя, например, целлюлозу, хлопок и шерсть, среди прочего. Синтетические волокна включают в себя обычные полимеры, такие как полипропилен и полиэстер (PET, полиэтилентетрафталат). Пригодные для использования полимеры включают в себя полиалкилены, такие как полиэтилен и полипропилен, поливинилхлорид, полиамиды, такие как различные нейлоны, полистиролы, полиарилсульфоны, поливиниловый спирт, полибутилен, этилвинилацетат, полиакрилаты, такие как полиметилметакрилат, поликарбонат, соединения целлюлозы, такие как ацетатбутират целлюлозы, сложные полиэфиры, такие как поли(этилентетрафталат), полиимиды и полиуретаны, такие как полиэфирполиуретаны и их сочетания.

Нетканые материалы могут также быть получены из сочетаний совместно экструдированных полимеров, таких как сложный полиэфир и полиалкилены. Сополимеры из мономеров полимеров, описанных выше, также включаются в рамки настоящего изобретения. В дополнение к этому, нетканые материалы представляют собой комбинированные сетки, которые представляют собой однородную смесь мелкодисперсных волокон и крученых штапельных волокон. В одном из вариантов осуществления нетканый материал устройства по настоящему изобретению также содержит проницаемый материал набивки, ламинированный на одной или на обеих сторонах материала, как описано в патенте США № 4433024 (включаемом сюда в качестве ссылки во всей его полноте), или дополнительно содержит армирующие волокна.

Нетканые материалы изготавливают с помощью различных средств, включая раздув из расплава и распыление из расплава. Имеется несколько механических подходов для связывания вместе нетканых материалов, например, мембраны свариваются вместе с использованием ультразвукового резака/герметизатора или посредством использования пресса, для одновременного приложения тепла и давления. Полученные с помощью сухой раскладки нетканые материалы содержат слои волокон, каждый слой содержит неупорядочно расположенные или параллельные волокна. Связывание с помощью адгезива или тепла является необходимым для полученного с помощью сухой раскладки нетканого материала. Полученные с помощью влажной раскладки нетканые материалы представляют собой бумагообразные нетканые материалы, содержащие неупорядоченный ряд расположенных слоями волокон, при этом расположение слоями возникает в результате осаждения волокон из водной суспензии. Полученные с помощью иглопробивной машины нетканые материалы отличаются переплетенным состоянием волокон, из которых они состоят, при этом переплетение происходит из-за приложения тепла, влажности и перемешивания к волокнистой сетке. Нетканые материалы с переплетением волокон под действием водяной струи имеют волокна, переплетающиеся под действием струй воды высокой скорости (способ также называют гидропереплетением).

3. Частицы

В одном из аспектов устройство по настоящему изобретению содержит частицы, так же как и пористую матрицу. Частицы обладают способностью к присоединению целевых агентов. Частицы являются пористыми, непористыми или как теми, так и другими. В одном из вариантов осуществления, пористые частицы представляют собой частицы сорбента, способные адсорбировать или поглощать целевой агент. Частицы изготавливают из одного материала или сочетания двух или более материалов, эти материалы являются ненабухающими или набухающими в органических жидкостях или водных жидкостях и являются по существу нерастворимыми в воде или жидкостях. Как обнаружено, в некоторых случаях является преимущественным использование частиц в двух или более диапазонах размеров частиц, попадающих в широкий диапазон.

Размер и форма частиц в рамках настоящего изобретения может изменяться в широких пределах и зависит до некоторой степени от набивки пористой матрицы, в которую включаются такие частицы. Например, частицы имеют сферическую форму, регулярную форму или нерегулярную форму, или их сочетание.

Частицы, используемые в устройстве по настоящему изобретению, имеют видимый размер в диапазоне примерно от 1-2 до 200-300 мкм. Как правило, различия в размерах используемых частиц диктуются типом пористой матрицы, в которую включаются частицы, способами и оборудованием, которые используются для формирования пористой матрицы, и пористостью матрицы, формируемой таким образом. Например, нетканые волокнистые сетки и матрицы из фибриллярных полимеров могут изготавливаться с полным диапазоном размеров частиц. Предпочтительно частицы размера примерно 40-200 мкм используются для нетканых материалов, в то время как частицы размером 1-100 мкм являются предпочтительными для матриц из фибриллярного политетрафторэтилена (PTFE).

Также включенными в рамки настоящего изобретения являются частицы, имеющие широкий диапазон размеров пор. Частицы с относительно большим размером пор используются для эффективного захвата целевых молекул больших размеров, таких как белки, в то время как частицы с меньшими разме-

рами пор используются для эффективного захвата целевых молекул меньшего размера. Диапазон доступных размеров пор составляет, например, примерно от 0,001 до 0,1 мкм. В одном из вариантов осуществления размеры пор составляют примерно 0,1-0,55 мкм. В другом варианте осуществления размеры пор составляют примерно 0,6-2 мкм. Еще в одном варианте осуществления размеры пор составляют примерно 0,25-5 мкм или более. Здесь предполагается, что при упоминании таких конкретных диапазонов упомянутые диапазоны также включают в себя все конкретные значения целых чисел в упоминаемых диапазонах. Например, в пределах примерно 0,1-0,55 мкм, как предполагается, также охватывает 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мкм, и тому подобное, без реального упоминания каждого конкретного диапазона.

Частицы изготавливают из углерода или органического соединения, который может представлять собой полимер или сополимер. Например, частицы изготавливают из сополимера стирола и дивинилбензола и их производных, сложного полиметакрилатного эфира, полимера или сополимера дериватизованного азлактона, частиц из неорганических оксидов с органическим покрытием, таких как окись кремния, окись алюминия, оксид алюминия, окись титана, оксид титана, окись циркония и другие керамические материалы, стекло, целлюлоза, агароза, и из большого разнообразия различных полимеров, включая полистирол и полиметилметакрилат, акриловые смолы и другие типы гелей, используемых для электрофореза, среди прочего.

Другие частицы, пригодные для целей настоящего изобретения, включают в себя любую частицу, которая может быть покрыта нерастворимыми, набухающими, или ненабухающими материалами сорбентов на их наружных и/или внутренних поверхностях. В одном из вариантов осуществления частицы набухают до объема, примерно в 2-5 раз или более превышающего их исходную сухую массу.

Функционирование покрытия предназначено для обеспечения конкретных функциональностей и физических свойств, которые могут подбираться в соответствии с конкретным предполагаемым анализом с выделением. Эти функции включают в себя сорбцию, ионный обмен, хелатирования, стерическую эксклюзию, хиральность, афинность, и тому подобное. Предпочтительный материал частиц для таких покрытий включает в себя частицы из неорганических оксидов, наиболее предпочтительно, частицы из окиси кремния. Такие частицы, имеющие покрытие на поверхности, хорошо известны в данной области, см., например, Snyder and Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2d Ed., John Wiley & Sons, Inc. (1979), и H. Figge et al., Journal of Chromatography 351 (1986) 393-408, и включают в себя частицы из модифицированной окиси кремния, частицы из окиси кремния, имеющие ковалентно связанные органические группы, включая циано, циклогексильную, C₈ (октильную) и C₁₈ (октадецильную) группы. Покрытия могут наноситься механически посредством поперечной сшивки полимеров *in situ* или могут представлять собой функциональные группы, ковалентно связанные с поверхностью частиц.

Количество частиц, включенных в пористую матрицу, в рамках настоящего изобретения может широко изменяться. Как правило, количество частиц изменяется в пределах примерно от 1 до 99% от объема устройства. Предпочтительно имеется количество, большее чем 20% объемных, более предпочтительно, большее чем 50 об.%. Таким образом, устройство по настоящему изобретению может содержать до 95% или более массовых частиц, тем самым, обеспечивая потенциально высокую емкость для целевого присоединения. Частицы по настоящему изобретению, как правило, выдерживают широкий диапазон значений pH, например, от значения pH примерно 4 или ниже до значений pH примерно 12 или выше.

Частицы по настоящему изобретению являются универсальными и используются для осуществления разнообразных хроматографических или нехроматографических анализов с разделением. Примеры способов разделения, предусматриваемых в рамках настоящего изобретения, включают в себя разделение с помощью обращенной фазы, афинное разделение, разделение с помощью разрыхленного слоя, ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, разделение хроматографических компонентов, твердофазную экстракцию, среди других способов разделения, измерения или сбора химических или биологических целевых агентов среди других компонентов образца. Частицы также используются для связывания и, тем самым, выделения молекул нуклеиновых кислот и/или полипептидных целевых агентов из образца.

Предпочтительная частица устройства по настоящему изобретению представляет собой пористую смолу. Пористые смолы для адсорбционных разделений являются доступными при большом разнообразии различных материалов, включая окись кремния, стекло, целлюлозу, агарозу, и при широком разнообразии различных полимеров, включая полистирол, полиметилметакрилат, полиакриламид, агарозу, гидрогель, акриловые смолы и другие типы гелей, используемых для электрофореза. Многие из пористых адсорбционных смол, таких как окись кремния, стекло и полимеры, могут сушиться и имеют соединенные между собой поры с площадью поверхности в пределах примерно от 1-2 м²/г сухой смолы до более 300 м²/г сухой смолы. Другие типы смол являются поперечно-сшитыми гелями, которые не могут быть высушены без повреждения структуры. Такие типы смол обычно не имеют конкретной площади поверхности, поскольку материалы способны диффундировать однородно через поперечно-сшитую матрицу.

Также охваченным рамками настоящего изобретения является использование модифицированных смол, включая аналоги, варианты и функциональные производные природной или модифицированной смолы, или ее функциональных групп. Модификация включает в себя, например, замещение, удаление

или добавление химических остатков (например, аминокислот) к конкретной смоле или ее функциональной группе, или как к той, так и к этой. Например, amino замещение, ацелирование и/или частичное ацелирование смол включаются в рамки настоящего изобретения. Любая модификация функциональной группы смолы также включается в рамки модифицированных смол в соответствии с настоящим изобретением.

Другие типы природных или модифицированных смол, пригодных для использования в рамках настоящего изобретения, включают в себя, но, не ограничиваясь этим, фенолсефарозу, бутилсефарозу, октилсефарозу, полистирол, поперечно-сшитый с помощью дивинилбензола, полистирол-дивинилбензол Hydrocell C3, полистирол-дивинилбензол Hydrocell C4, фенол полистирол-дивинилбензол Hydrocell, метил НИС метакрилат (для гидрофобной хроматографии), бутил НИС метакрилат (для гидрофобной хроматографии), высший фенол с широкими порами, Fractogel EMD, сополимер гидрофобной смолы Fractogel EMD-пропилметакрилата, сополимер гидрофобной смолы - фенолметакрилата, октилсефароза, фенолсефароза, Toyopearl НИС, Toyopearl Amino-650S, Toyopearl Amino-650M, Toyopearl Amino-650C, Toyopearl Amino-650EC, Toyopearl butyl-650S, Toyopearl butyl-650C, Toyopearl butyl-650M, Toyopearl ether-650S, Toyopearl ether-650C, Toyopearl ether-650M, Toyopearl hexyl-650S, Toyopearl hexyl-650C, Toyopearl hexyl-650M, Toyopearl phenyl-650S, Toyopearl phenyl-650C (PRDT), Toyopearl phenyl-650M и Toyopearl 659 CU (PRDT), среди прочего. Все смолы Toyopearl являются коммерчески доступными от Tosoh Biosep, Montgomeryville, PA. Смолы на основе сефарозы являются доступными от GE Healthcare, Piscataway, NJ. Смолы Fractogel являются доступными от Merck, Darmstadt, Germany. Смолы Hydrocell являются доступными от BioChrom Labs, Inc., Terre Haute, IN. Остальные смолы являются общими наименованиями для множества основных материалов для смол, которые являются доступными общественности.

Если пористые смолы набиты в колонку, гидродинамический диаметр для потока определяется диаметром частицы и долей свободного объема слоя

$$D_h = \frac{d_p \varepsilon}{3(1-\varepsilon)} \quad (1)$$

где D_h представляет собой эквивалентный гидравлический диаметр для потока между частицами, d_p представляет собой диаметр частицы, и ε представляет собой долю свободного объема.

В результате, чтобы сделать возможным протекание больших частиц через колонку, необходимо использовать большие частицы, которые в свою очередь увеличивают диффузионное сопротивление для адсорбции в смоле. Например, чтобы дать возможность эритроцитам для протекания через колонку, частицы диаметром примерно 65 мкм необходимы для получения диаметра пор 14 мкм в объеме между частицами, если пористость слоя равна примерно 0,4.

4. Нетканые материалы, импрегнированные смолой (RIN)

Включение частиц в матрицу может достигаться с помощью различных способов. Поскольку нетканые материалы могут изготавливаться с контролируемым средним диаметром пор, является возможным импрегнирование пористых частиц смолы, таких как те, которые описаны выше, внутри волокон, составляющих нетканый материал.

Эти импрегнированные нетканые материалы могут изготавливаться различными способами. Например, сухие частицы могут гидродинамически закрепляться между двумя предварительно полученными неткаными материалами. Альтернативно, сухие частицы могут вводиться в то время, когда волокна формируются посредством раздува расплава или вытягивания из расплава. Является также возможным переплетение частиц смолы в то время, когда они влажные, используя способы влажной раскладки. В одном из вариантов осуществления, частицы импрегнируются в уже сформированные волокна посредством гидродинамического закрепления и связывание в расплаве частиц с матрицей полимерных волокон не должно использоваться.

Один из предпочтительных способов изготовления представляет собой непосредственное каландрирование уже полученных нетканых материалов, которые могут быть получены посредством либо раздува расплава или посредством распыления из расплава. В одном из вариантов осуществления на нетканом материале однородно распределяются частицы, которые доставляются с фиксированной массовой скоростью, с помощью непосредственного каландрирования, так что мембрана покрывается заданной массой частиц на единицу площади. После распределения частиц, вторую мембрану располагают поверх первой, с получением сэндвича, и сочетание проходит через каландрирующие валки со структурой, которые могут связывать две мембраны вместе при низкой температуре и давлении. Плотность частиц на поверхности находится в пределах примерно от 0,1 примерно до 10 г/м² или более. Размер пор мембран, используемых для этого устройства, дает возможность частицам большего размера, таким, например, как эритроциты, для прохождения, поскольку их размер пор больше чем 10 мкм. Частицы в мембране присоединяются к лиганду, который облегчает связывание частиц с целевыми агентами, такими, например, как белки прионов из концентрата эритроцитов и плазмы.

Операция способа каландрирования обычно требует высокой температуры для связывания нетканых материалов, но температура поддерживается ниже температуры плавления частиц и не влияет на их рабочие характеристики. В одном из вариантов осуществления частицы большего размера или плотности могли бы размещаться между неткаными мембранами с помощью гидродинамического закрепления.

Плотность и масса нетканого материала может принимать широкий диапазон значений для того, чтобы обеспечить высокую плотность частиц на материале, в то же время, поддерживая желаемые размеры пор. Концентрации частиц приблизительно 60% мас./мас. могут импрегнироваться в материалы. Все обычные способы изготовления нетканых материалов могут использоваться для этой процедуры, включая материалы с двумя различными полимерными волокнами, а также совместно экструдированные волокна с двумя различными полимерами. Благодаря этой гибкости могут импрегнироваться как влажные, так и сухие смолы. Если это необходимо, резанные волокна могут погружаться в материал для облегчения захвата частиц, в то же время, по-прежнему оставляя возможными проточные поры с необходимыми размерами.

Резанные волокна обычно имеют длину меньше чем 1/2 дюйма, и их получают посредством резки одного волокна, которое навито вокруг шпинделя или валика. Резание осуществляется механически с использованием вращающихся ножей или других острых режущих поверхностей. Резанные волокна могут изготавливаться из множества полимерных или углеродных волокон, имеющих диапазон диаметров от очень малых (меньше, примерно, чем 1 мкм) до больших (> 100 мкм). В одном из вариантов осуществления, конкретные лиганды химически прививаются или наносятся в виде покрытия на волокно, а затем волокно нарезается на отрезки длиной приблизительно 1/2 дюйма. Затем резанные волокна могут распределяться по одному слою нетканого материала (полипропилена или другого полимера) с размером пор и диаметром волокон, пригодным для того, чтобы сделать возможным прохождение через мембрану больших частиц, таких как эритроциты (размеры пор >10 мкм).

Резанные волокна могут доставляться к мембране с заданной скоростью для обеспечения однородности распределения волокон. После того как резанные волокна окажутся на поверхности, второй слой нетканого материала может помещаться поверх резанных волокон и сочетание может пропускаться через каландр для связывания двух нетканых слоев. В одном из вариантов осуществления мембрану пористой матрицы или резанные волокна функционализируют с помощью лиганда и помещают внутри другой мембраны, например, на основе технологии аэродинамической раскладки. В другом варианте осуществления лиганды присоединяются к полимеру, который впоследствии экструдирован в виде волокна. Волокно может быть резанным, с получением малых сегментов, которые могли бы легко встраиваться между двумя мембранами.

5. Модификация поверхности

Также включаются в рамки настоящего изобретения поверхностно-модифицированные нетканые или тканые материалы (SMN) и поверхностно модифицированные частицы, которые функционализируются на одной или нескольких внутренних и/или наружных поверхностях с помощью реакционноспособной группы. Функционализация достигается посредством добавления одной или нескольких реакционноспособных групп на поверхность пористой матрицы (например, тканого или нетканого материала), частиц, либо как на ту, так и на другую. Реакционноспособная группа взаимодействует с целевым агентом и связывает его. Взаимодействие между реакционноспособной группой и целевым агентом представляет собой химическое, физическое и/или биологическое взаимодействие.

В одном из вариантов осуществления пористая матрица, частицы или как та, так и другие, поверхностно модифицируются с помощью функциональной группы, способной образовывать ковалентную химическую связь с целевым агентом. Функциональные группы, пригодные для использования в рамках настоящего изобретения, включают в себя, но, не ограничиваясь этим, одну или несколько из следующих групп: эпокси, формильной, трезильной, групп сложных гидроксисукцинимидных эфиров, среди прочего. Другие группы, пригодные для использования в рамках настоящего изобретения, включают в себя, но, не ограничиваясь этим, одну или несколько из следующих групп: групп сульфоновой кислоты, четвертичных аминов, карбоксильных групп, первичных аминов, циано, циклогексильной, октильной и октадецильной групп, групп оксирана, сложных N-гидроксисукцинимидных эфиров, сложных сульфонильных эфиров, имидазолилкарбамата, четвертичных аминов, карбоксильных групп, лиганда красителя, афинного лиганда, антиген-антитело, молекул нуклеиновых кислот, групп для ионного обмена, хелатирования, реакций окисления/восстановления, реакций стерического вытеснения, реакций катализа, гидрофобных реакций, обращенной фазы и других реакций, обычно встречающихся при хроматографических разделениях.

Функциональные группы, например, лиганды, химически конъюгируются с набивкой или могут присоединяться посредством линкеров, таких как стрептавидин, бета-аланин, глицин, полимеры, содержащие глицин-серин, короткоцепочечные углеводороды формулы $-(CH_2)_n-$, полиэтиленгликоль, эпсилон-аминокапроновая кислота и линкеры, содержащие $-O(CH_2)_n-$, где n равно 1-30. Если это желательно, лиганд (лиганды) может присоединяться посредством одного или посредством нескольких различных расщепляемых линкеров, например, фотолabileльных или кислотно-лабильных остатков, делая возможным селективное отсоединение популяции лигандов для анализа. Отсоединенные лиганды могут использоваться, например, как среды афинной очистки для белков и для разделения энантиомеров (например, для концентрирования, выделения, детектирования, характеристики, количественного определения или идентификации мишеней в образце), в качестве диагностических терапевтических инструментов, катали-

заторов и энхансеров химических реакций и в качестве селективных стабилизаторов белков.

В одном из вариантов осуществления нетканые мембраны покрываются афинными лигандами в качестве функциональной группы, эти афинные лиганды имеют специфическую афинность к прионам на своей поверхности. Пример афинных лигандов включает в себя, первичный амин с гидрофильным спейсером, содержащим единицы полиэтиленгликоля. Лиганды могут помещаться на мембрану (например, обработанный плазмой полипропилен от Masopharma) посредством химической прививки или посредством способа нанесения покрытия из эмульсии латекса (плюсования).

5.1. Полимеризация лигандов на пористой матрице

Полимеризация мономеров на пористой матрице вводит эпоксигруппы на поверхность этих матриц, что в свою очередь, облегчает химическое присоединение лиганда к поверхности матрицы. В одном из вариантов осуществления эмульсия мономера наносится на хлопковую, полипропиленовую, полиэстровую и нейлоновую ткань посредством плюсования. Плюсование представляет собой непрерывный способ, который используется в текстильной промышленности для крашения, отбеливания и нанесения покрытия на ткань. Дополнительная информация о плюсовании находится на Celanese LLC web site: www.vectranfiber.com, который включается сюда в качестве ссылок. Плюсование, как правило, состоит из набора отжимных валков, используемых для импрегнирования ткани жидкостью посредством непрерывного прохождения ткани через жидкость, а затем между валками, для отжима избытка раствора. Является возможным использование технологии однократной пропитки, одинарного плюсования. Habeish et al., IMPROVING COTTON DYEING AND OTHER PROPERTIES BY EMULSION POLYMERIZATION WITH GLYCIDYL METHACRYLATE, American Dyestuff Reporter, April, 26-34 (1986), включается сюда в качестве ссылки, наносили эмульсии глицидилметакрилата (GMA) на хлопковые волокна, используя технологии плюсования. После плюсования, избыток воды испаряется, и осуществляется полимеризация при повышенных температурах. Количество полимера на поверхности волокна находится в пределах примерно от 1 примерно до 10% или более. Полимеризация может также осуществляться на нетканых сетках из PET, PP, и тому подобное, с желаемым размером пор (> 10 мкм).

5.2. Латексные покрытия на материалах

Латексные эмульсии синтезируются посредством обычной эмульсионной полимеризации в воде, с получением малых частиц желаемого полимера. Различные растворимые и свободно радикальные инициаторы и неионные и анионные поверхностно-активные вещества могут использоваться для создания эмульсий. В одном из вариантов осуществления покрытия из латексных эмульсий наносится на пористую матрицу посредством плюсования, как описано выше, либо на отдельные волокна, либо на нетканые сетки из PP, PET, и других полимеров. Пример этого типа подхода приводят De Boos and Jedlinek, APPLICATION OF EPOXY FUNCTIONAL Polyacrylate emulsion to TEXTILES, J. Macromol. Sci-Chem. A17(2), 311-235 (1982), включается сюда в качестве ссылки.

6. Способы применения

Способы, наборы и устройства по настоящему изобретению являются пригодными для использования в различных применениях, включая прогностику, диагностику, детектирование, очистку, разделение, обработку экспрессированных *in vitro* генных продуктов и производство, и доставку биофармацевтических агентов. Настоящее изобретение является применимым к любому устройству, которое является обычно доступным для мембранных операций, из плоских, спиральных устройств картриджей или даже устройств картриджей с полыми волокнами. Поток через устройство может вызываться с помощью любых обычных средств, от силы тяжести до насосов, в зависимости от желаемого перепада давления и скорости потока.

Технологии очистки и извлечения по настоящему изобретению предлагают преимущества по сравнению с обычными технологиями очистки, уменьшая количество стадий очистки, улучшая выходы, увеличивая чистоту и преодолевая ограничения, связанные с традиционными способами.

Устройства по настоящему изобретению являются очень чувствительными, способными к выделению очень малых количеств патогенов из образца. В одном из вариантов осуществления, устройства по настоящему изобретению используются для удаления патогенов, таких как прионы, включая PrP^c, PrP^{sc}, PrP^{res}, вирусы, бактерии и токсины из цельной крови, концентратов эритроцитов, концентратов тромбоцитов, плазмы, производных плазмы, лейкоцитов, крови, обедненной лейкоцитами, культуры клеток млекопитающих, ферментационных бульонов и других сред, используемых для производства и доставки биофармацевтических агентов и приготовления терапевтических агентов. Множество патогенов могут выделяться из образца одновременно и быстро, с помощью устройств по настоящему изобретению, из любого потока при промышленной переработке плазмы, предназначенной для производства терапевтических и/или фармацевтических продуктов.

В частности, способы и устройства по настоящему изобретению оптимизируют процесс очистки белков и усовершенствуют процесс производства биофармацевтических агентов посредством увеличения эффективности и чистоты. Биофармацевтические агенты представляют собой лекарственные средства, которые представляют собой белки, пептиды или другие сложные полинуклеотиды или макромолекулы на основе белков (коллективно "генные продукты"). Способ их получения включает в себя извлечение желаемого генного продукта от биомассы его хозяина, такой как плазма или другие биологические

источники, у людей и нелюдей (например, рекомбинантные или не рекомбинантные культуры клеток, молоко трансгенных животных или экстракты рекомбинантных или не рекомбинантных растений). Выделение коммерчески жизнеспособных выходов желаемого белка из биомассы представляет собой проблему, поскольку последнее содержит ненужные белки хозяина, молекулы нуклеиновых кислот и другие, имеющиеся в природе химические частицы.

Способы выделения и очистки белков представляют собой уникальные по сложности проблемы, из-за разнообразия белков, различной природы возможных загрязнений и примесей и количества продукта, который должен выделяться из сред. Обычные технологии очистки, как правило, включают в себя ряд стадий очистки. На каждой стадии выход уменьшается и затраты на производство увеличиваются. Затраты на выделение и очистку белков, как правило, составляют более 50% от всех затрат на производство.

В другом варианте осуществления устройства по настоящему изобретению конструируются таким образом, что они осуществляют две одновременных операции: фильтрование, а также адсорбцию. В настоящем варианте осуществления размер пор материала уменьшается существенно, чтобы удержать материал, состоящий из больших частиц, при этом в то же самое время, поддерживая размер пор достаточно большой, чтобы сделать возможным прохождение образца, содержащего желаемые молекулы. Эта технология осуществляет одновременные стадии фильтрования и адсорбции в одном устройстве и заменяет мембранную фильтрацию с последующей адсорбционной колоночной хроматографией. Например, устройства по настоящему изобретению делают возможным адсорбцию желаемой или нежелательной молекулы, секретлируемой внеклеточно, непосредственно из культурной среды.

В другом варианте осуществления, устройства по настоящему изобретению используют в качестве альтернативы колонкам для технологий адсорбционного удаления в биотехнологической промышленности. Эти технологии используют биохимические взаимодействия, такие как, например, ионный обмен, хелатирование, реакции окисления/восстановления, стерическая эксклюзия, катализ, гидрофобное взаимодействие, обращенная фаза, лиганд красителя, афинный лиганд, антиген-антитело и другие взаимодействия, обычно встречающиеся в хроматографических и/или других технологиях разделения.

7. Тест-наборы

Также включенными в рамки настоящего изобретения являются тест-наборы для очистки образца посредством выделения целевых агентов из образца.

Полные тест-наборы содержат растворы и устройства для целевого разделения и очистки биологических образцов. Например, тест-набор содержит 96, 384 или 1536-луночный планшет для высокопроизводительной очистки образца и/или растворы для присоединения лигандов к частицам в устройстве по настоящему изобретению, для подбора индивидуальных белков, антител и растворов, необходимых для разделения белков в формате планшета.

Как правило, тест-наборы по настоящему изобретению содержат один или более следующих компонентов: (1) один или более контейнеров, содержащих устройства, как здесь описано; (2) инструкции для осуществления способов, описанных здесь; (3) один или более компонентов для анализа и (4) упаковочные материалы. Устройства, описанные здесь, являются упакованными, чтобы они содержали многие, если не все, необходимые компоненты для осуществления способов разделения по настоящему изобретению. Например, тест-наборы содержат устройство, содержащее пористую матрицу и частицы, в дополнение к одному или более компонентам из буферов, реагентов, химических агентов, реагентов для функционализации, ферментов, агентов для детектирования, материалов для контроля или чего-либо подобного, среди прочего.

В одном из вариантов осуществления набор дополнительно содержит функциональные группы в отдельных контейнерах, и функциональные группы должны присоединяться к частицам и/или пористой матрице перед осуществлением анализа. Альтернативно, устройство может снабжаться набором без функциональных групп, в этом случае пористая матрица, частицы, или как та, так и другие, предпочтительно являются предварительно функционализированными.

Устройства по настоящему изобретению могут иметь любой желательный размер и форму. Предпочтительно устройство представляет собой материал в виде листа, который находится, например, в форме диска или полоски. Другие компоненты, которые могут предусматриваться в виде части тест-набора, включают в себя шприцы для твердых поверхностей, пипетки, кюветы и контейнеры. Нанесение покрытия на пористую матрицу или частицы из монослоев материалов или более толстых слоев материалов, обеспечиваемое посредством поперечной сшивки полимеров *in situ* или ковалентного связывания функциональных молекул на поверхностях пористой матрицы или частиц, делает возможной оптимизацию, как хроматографической селективности, так и эффективности разделения.

Детектирование может облегчаться посредством связывания пористой матрицы, частиц, или их обоих, с детектируемым агентом. Примеры детектируемых агентов включают в себя, но, не ограничиваются этим, различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, дисперсные красители, частицы золота или их сочетания.

Примеры

Специалисту в данной области будет понятно, что другие пригодные для использования модификации и адаптации способов и применений, описанных здесь, являются очевидными из приведенного здесь описания настоящего изобретения, с учетом информации, известной специалисту в данной области, и могут быть осуществлены без отклонения от рамок настоящего изобретения или любого варианта его осуществления. Настоящее изобретение, описанное подробно выше, будет более ясно понятно со ссылками на следующие далее примеры, которые включаются сюда только для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

Пример 1. Поверхностно модифицированные нетканые материалы (SMN)

Поверхностно модифицированные нетканые материалы являются особенно пригодными для использования, когда целевые частицы, которые должны адсорбироваться, являются большими, и они не способны проникнуть в поры смол. В этом случае поверхность волокон, составляющих нетканый материал, модифицируется для осуществления адсорбции целевых агентов. Стадия адсорбции включает в себя ионный обмен, гидрофобные или афинные взаимодействия или любые другие обычные процессы адсорбции. Если SMN используется без частиц, площадь поверхности материала на единицу объема, доступная для присоединения, контролируется пористостью материала и диаметром волокон:

$$a_v = \frac{4}{d_f}(1 - \varepsilon) \quad (2)$$

где a_v представляет собой удельную площадь поверхности на единицу объема твердого продукта, d_f представляет собой диаметр волокна, и ε представляет собой долю свободного объема.

Поскольку являются доступными диаметры волокон где-то в пределах от 100 нм до 10 мкм, и пористости, как правило, находятся в пределах от 0,4 до 0,5, в этих устройствах могут быть достигнуты очень большие площади поверхности. Например, при диаметре волокна 0,1 мкм, площадь поверхности на единицу объема материала должна быть порядка,

$$a_v = 2 \times 10^7 \text{ м}^2/\text{м}^3 = 20 \text{ м}^2/\text{см}^3 \quad (3)$$

Это вполне благоприятное значение при сравнении с площадью поверхности на единицу объема многих пористых хроматографических набивок. Однако, поскольку средний диаметр проточных пор материала может контролироваться независимо, размеры пор могут достигать нескольких микрон в диаметре. Технологии, такие как распыление из расплава в электрическом поле, способны производить даже меньшие диаметры, что приводит к гораздо большим площадям на объем.

Любая модификация поверхности, которая облегчает связывание целевого агента с устройством и является совместимой с химическим составом конкретных пористых матриц, используемым в устройстве, охватывается рамками настоящего изобретения. Модификация поверхности включает в себя, например, образование заряженных частиц, присоединение афинных лигандов, пептидов, олигонуклеотидов, белков, спейсерных ножек, гидрофобных остатков, фторированных материалов, среди прочего.

Поскольку поверхность волокон в нетканых материалах имеет тенденцию к тому, чтобы быть гладкой, эти поверхности присутствуют в предпочтительной конфигурации для экспонирования афинных лигандов для особенно больших частиц, таких как белки прионов, вирусы или бактерии.

Пример 2. Конфигурация устройства для удаления белка приона (PrP)

Этот пример демонстрирует возможность конструирования других конфигураций устройства для удаления эндогенной передаваемой инфекции губчатой энцефалопатии, делая возможной адсорбцию на непористых поверхностях с различными геометриями. Эндогенная инфекция от концентратов эритроцитов включает в себя удаление инфекционного PrP^{sc} (скрепи формы белка приона) или PrP^{res} (устойчивой формы белка приона) при общей концентрации приблизительно 200 нг/мл. В мешке концентрата эритроцитов (гбсс), содержащем 350 мл, имеется в целом 7×10^{-5} г PrP. При условии, что монослой белков покрывает поверхность в виде монослоя с плотностью приблизительно $2 \text{ мг}/\text{м}^2$, общая площадь поверхности, необходимая для связывания всех эндогенных PrP в гбсс, оценивается следующим образом:

$$A = \frac{7 \times 10^{-5} \text{ г}}{2 \times 10^{-3} \text{ г}/\text{м}^2} = 3,5 \times 10^{-2} \text{ м}^2 \quad (4)$$

где A представляет собой общую площадь устройства.

Как ясно из уравнения выше, общая поверхность, необходимая для связывания прионов, является относительно малой и соответствует нескольким геометриям устройства, пригодным для экспонирования афинных лигандов при правильной поверхностной плотности.

A. Квадратные листы

Набор из N квадратных листов из нетканого материала, имеющих на обеих сторонах покрытие из лигандов, экспонируемых для крови, имеет общую площадь поверхности, соответствующую

$$2NL^2 = 3,5 \times 10^{-2} \text{ м}^2 \quad (5)$$

где N представляет собой количество листов, а L представляет собой длину/ширину квадратного листа. В случае 10 листов (N=10), необходимая ширина каждого листа была бы

$$L = 0,042 \text{ м} = 4,2 \text{ см} \quad (6)$$

Устройство этого типа состоит из пакетированного ряда листов, когда жидкость протекает по сложному пути между листами, как демонстрируется на фиг. 2.

В. Волокна с покрытием

Набор из N нетканых волокон, покрытых снаружи афинными лигандами, имеет общую поверхность, соответствующую

$$\begin{aligned} N2\pi RL &= 3,5 \times 10^{-2} \text{ м}^2 \\ NRL &= 5,57 \times 10^{-3} \text{ м}^2 \end{aligned} \quad (7)$$

где R представляет собой радиус волокна.

Например, количество волокон радиусом 5 мкм и длиной 5 см составляло бы

$$N = 22280 \quad (8)$$

Объем этих волокон составлял бы

$$V_f = N\pi R^2 L = 8,74 \times 10^{-8} \text{ м}^3 \times \frac{10^6 \text{ мл}}{\text{м}^3} = 0,087 \text{ мл} \quad (9)$$

где V_f представляет собой объем волокон.

Как ясно из уравнения выше, объем волокон является относительно малым, что связано, прежде всего, с очень малым диаметром волокна, что приводит к очень большой площади поверхности на единицу объема. Чтобы сделать возможным соответствующее протекание эритроцитов через такой волокнистый мат, пористость должна быть умеренно высокой, например, примерно 50%. В этом случае объем устройства должен примерно в два раза превышать объем волокон или 0,17 мл. Это очень малый объем, опять же показывающий, что устройство для этого типа захвата не должно быть большим, чтобы удовлетворять требованиям по емкости. Например, волокнистый мат радиусом 2 см должен иметь толщину всего лишь приблизительно 0,135 мм, чтобы обеспечить этот объем. Один или несколько листов из волокон могут иметь снаружи покрытие из афинных лигандов.

С. Частицы

Малые непористые частицы также демонстрируют очень высокую площадь поверхности на единицу объема.

Количество и объем частиц, необходимое для того, чтобы иметь площадь поверхности, определенную выше, вычисляется способом, подобным тому, который используется в случае цилиндрических структур

$$\begin{aligned} N &= \frac{3,5 \times 10^{-2} \text{ м}^2}{4\pi R^2} \\ V_s &= \frac{4}{3} \pi R^3 N \end{aligned} \quad (10)$$

где V_s представляет собой объем частицы.

При условии, что у частиц радиус равен 10 мкм, количество и объем частиц, соответствующие уравнению 5, составляют

$$\begin{aligned} N &= 2,79 \times 10^7 \\ V_s &= 1,17 \times 10^{-7} \text{ м}^3 = 0,117 \text{ мл} \end{aligned} \quad (11)$$

Уравнение показывает, что нужен исключительно малый объем малых частиц. Малые частицы могут диспергироваться с помощью больших частиц или суспендироваться в поперечно-сшитом геле (таким как агароза) с большими порами, чтобы сделать возможным легкое протекание эритроцитов через систему.

Пример 3. Связывание двух слоев мембран посредством каландрирования со смолой или без нее

Для разработки устройства для удаления прионов два слоя полипропиленовых мембран успешно каландрируют при комнатной температуре/400 PLI и при 150°F/100 PLI, при плотности смолы 1 мг/см². Каландрированные мембраны герметизируют с использованием ультразвукового герметизатора. Процент гемолиза от образцов каландрированных мембран хорошо укладывается в приемлемый диапазон. Каландрирование используют для импрегнирования смолы Amino 650M между двумя слоями мембран.

Частицы смолы Toyorearl Amino 650M импрегнируют между двумя слоями мембран из нетканого материала. Полипропиленовая (внутренний слой) и полиэстровая (наружный слой) мембраны, которые в настоящее время используют в фильтрах для лейкоцитов MascoPharma, представляют собой хороших кандидатов в эти мембраны, поскольку они уже одобрены для переработки крови человека.

Чтобы исследовать, могут ли частицы иммобилизоваться без создания препятствий для потока эритроцитов через устройство, мембраны внутреннего и/или наружного слоя каландрируют с частицами или без них. Каландрирование осуществляют посредством прессования мембраны между двумя валками в листах.

Материалы и методы

Один рулон полипропиленовой мембраны (PP) и один рулон полиэстровой мембраны (PET) навивают на пластиковый валик, с внутренним диаметром 3 дюйма. Ширина рулонов составляет примерно 0,5 м. Мембраны имеют ширину 22,5 см и длину 800 м. Мембраны нарезают на квадратные листы 22,5 см × 22,5 см. Сухую смолу распределяют при плотности 1 мг/см² на одной стороне мембраны, а затем покрывают другой мембраной. Образцы одной лишь мембраны не требуют распределения смолы. Указанные выше образцы проходят через два каландровых валька, один тиснильный валок и один гладкий валок. Оба валька могут нагреваться для увеличения температуры, для каландрирования. Давление между вальками также контролируют. Каландрированные образцы исследуют посредством визуальной проверки, измерения массы, исследования поперечного сечения с помощью SEM (сканирующей электронной микроскопии), в исследовании размера пор, и в исследовании процента гемолиза для потока после прохождения цельной крови через каландрированное устройство.

Процедура для измерения процента гемолиза

Образцы мембран нарезают на 25 мм кружки и помещают в фильтродержатели для 25 мм фильтров Millipore Swinnox. Каждый образец исследуют по два раза на сквозное протекание, а затем три раза на 96-луночных планшетах. Каждый образец промывают 2 мл рабочего буфера (рабочий буфер представляет собой 20 мм цитрата и 140 мм NaCl, pH 7,0), затем цельную кровь прокачивают через мембраны сверху при скорости 0,5 мл/мин. По 5 мл сквозного потока собирают от каждого образца. Сквозной поток или необработанную кровь центрифугируют при 12000 об./мин в течение 10 мин, при 4°C, с получением супернатанта. По три 100 мкл аликвоты от каждого образца помещают в три лунки 96-луночного планшета. УФ поглощение каждого планшета регистрируют на 415 нм. Среднее значение $A_{415\text{нм}}$ делят на значение для 100% лизиса той же самой крови. Процент гемолиза является приемлемым, если он ниже 1%.

Результаты

Таблица 1. Условия, используемые для каландрирования и визуальной проверки

Образцы, изготовленные посредством каландрирования						
Образец	Мембраны		Температура (F)		Давление	
№	Каландрированная	Смола	Тиснильный валок	Гладкий валок	(PLI) *	Результаты
1	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	100	С большой площадью карманов
2	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	200	Со средней площадью карманов
3	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	300	С малой площадью карманов
4	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	400	С изолированной малой площадью карманов
5	Внутренний/наружный слой	Да	Холодный	Холодный	300	Едва связанные, большие карманы
6	Внутренний/внутренний слой	Да	120	120	100	С малой площадью карманов
7	Внутренний/внутренний слой	Да	140	140	100	С изолированной малой площадью карманов
8	Внутренний/наружный слой	Да	150	150	100	Не связываются, как следует, большие карманы

9	Внутренний/ наружный слой	Да	150	150	200	Плохо связанные, некоторое количество карманов
10	Внутренний/ наружный слой	Да	180	180	200	Плохо связанные, некоторое количество карманов
11	Внутренний/ наружный слой	Да	180	180	400	Слабо связанные
12	Внутренний/ наружный слой	Да	Холодный	Холодный	400	Едва связанные
13	Внутренний/ внутренний слой	Да	150	150	100	Очень хорошо, с небольшим количеством карманов
14	Внутренний/ внутренний слой	Нет	Холодный	Холодный	100	Слабо связанные, с карманами
15	Внутренний/ внутренний слой	Нет	Холодный	Холодный	400	Плотно связанные, без карманов
16	Внутренний/ внутренний слой	Нет	157	153	100	Очень хорошо связанные
17	Внутренний/ внутренний слой	Нет	157	153	400	Плотно связанные
18	Внутренний/ наружный слой	Нет	157	153	400	Слабо связанные
19	Наружный/ наружный слой	Нет	180	180	400	Едва связанные, большие карманы
20	Наружный/ наружный слой	Нет	220	220	400	Связанные с некоторым
	слой					количеством карманов
21	Наружный/ наружный слой	Нет	220	220	600	Очень хорошо связанные
*PLI = фунты на линейный дюйм						

По визуальной проверке образцы №№ 4, 7 и 13 определяются как наилучшие для включения частиц. Когда температура валков увеличивается, для связывания мембран может использоваться более низкое давление, как показано для образцов 4 и 13. Мембрана наружного слоя изготовлена из полиэстера, который гораздо толще и жестче, чем внутренний слой. Для каландрирования наружного слоя вместе с мембраной либо наружного, либо внутреннего слоя, требуются более высокие температуры валков и давления, как показано для образца 21.

Таблица 2. Измерение массы

Масса каландрированных образцов:		
Образцы	Смола	Масса (г/м ²)
Отдельный внутренний слой		41
Отдельный наружный слой		67
Каландрированный внутренний/внутренний слой		82
Каландрированный внутренний/внутренний слой	1 мг/см ²	92
Каландрированный внутренний/наружный слой		107
Каландрированный внутренний/наружный слой	1 мг/см ²	117
Каландрированный наружный/наружный слой	1 мг/см ²	129

Для плотности смолы 1 мг/см² равен 10 г/м² (1 мг/см² × 10⁴ см²/м² = 10 г/см²). Масса отдельного слоя, двойного слоя и двойного слоя, с включенной смолой, является относительно пропорциональной. Результаты показывают, что смола хорошо удерживается между двумя слоями мембран.

Фотография, сделанная с помощью сканирующего электронного микроскопа (SEM), образцов 11 и 13 показывает, что большинство частиц смолы остаются интактными после каландрирования, даже если некоторые из них растрескиваются. Образец 2 также исследуется с помощью SEM и показывает сходные результаты. На тисильном валке каландра имеются квадратные упорядоченные пространства 2 мм × 2 мм с ребрами по краям. Во время каландрирования мембраны сильно сжимаются там, где их касается эта решетка из ребер. Эта площадь упоминается как площадь связывания. Площадь карманов относится к площади, которая расположена дальше всего от площади связывания.

Образец 11 представляет собой пример иммобилизации частиц смолы между одним внутренним слоем и одним наружным слоем. Фиг. 3 показывает площади карманов образца 11 при увеличении 50X. Образец 13 представляет собой пример иммобилизации частиц смолы между двумя внутренними слоями. Фиг. 4 показывает площади карманов образца 13 при увеличении 50X.

Распределение размеров пор

Результаты для распределения размеров пор каландрированных образцов показаны в табл. 3, ниже. Для каландрированных образцов наименьший, средний и наибольший размеры пор уменьшаются на 30-50% по сравнению с отдельным слоем. Для определения того, затрудняет ли уменьшение размера пор прохождение эритроцитов через устройство, осуществляют дополнительные исследования гемолиза сквозного потока цельной крови.

Таблица 3. Распределение размеров пор каландрированных образцов

№ образца	Мембрана	Смола	Температура валков (°F)		Давление (PLI)	Распределение размеров пор (мкм)		
			Тисильный	Гладкий		Наименьший	Средний	Наибольший
1	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	100	2,28	3,62	7,71
2	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	200	2,10	4,52	8,80
3	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	300	1,91	3,89	7,80
4	Внутренний/внутренний слой	Да	Холодный	Холодный	400	1,99	4,69	9,62
15	Внутренний/внутренний слой	Нет	Холодный	Холодный	400	2,06	3,90	9,26
7	Внутренний/внутренний	Да	140	140	100	1,82	4,05	8,00

	слой							
13	Внутренний/ внутренний слой	Да	150	150	100	1,99	4,88	8,73
16	Внутренний/ внутренний слой	Нет	157	153	100	2,11	4,04	8,79
PP	Отдельный внутренний слой					4,15	7,03	13,91
11	Внутренний/ наружный слой	Да	180	180	400	1,12	3,32	7,99
18	Внутренний /наружный слой	Нет	157	153	400	1,64	3,45	8,65
21	Наружный/ наружный слой	Нет	220	220	600	Не измерялся	17,76	47,35
PET	Отдельный наружный слой					23,61	35,81	79,04

Пример 4. Оптимизация каландрирования с использованием высоких плотностей частиц

Каландровый валок, используемый в настоящем исследовании, заказан ProMetic от BF Perkins. Валок изготовлен из нержавеющей стали, на нем выправлена сотовая структура и имеется съемное покрытие из Teflon. Противоположный используемый валок покрыт каучуком (толщиной от 3/4 дюйма до 1 дюйма).

Четырехграммовые образцы сухой смолы распределяют вручную на 30 см x 20 см (600 см²) образчиках из обработанной плазмой полипропиленовой мембраны, что соответствует плотности частиц 6,6 мг смолы/см². Второй образчик мембраны помещают поверх слоя смолы, и этот сэндвич пропускают через каландровые валки при скорости 10 м/мин. Следующая далее таблица содержит результаты, полученные во время исследований.

Таблица 4. Результаты оптимизации каландрирования

Опыт	Заданная температура (°F)	Измеренная температура (°F)	зазор ¹ (мкм)	Результаты
1	212	198	203	Нет связывания, с частицами или без
2	230	215	0	Мембраны слабо сливаются
3	245	236	0	Лучше чем раньше, но по-прежнему слишком слабо
4	255	245	0	Хорошее связывание без смолы, но менее эффективное со смолой
5	260	248	0	Хорошие результаты со смолой и без нее
6	275	-	0	Температура слишком высокая, верхняя мембрана не сливается с нижней, но прилипает к валку
7	265	-	0	Хорошие результаты достигаются при этой температуре со смолой и без нее

1) Нулевой зазор означает, что структура проникает в нижний валок на 1/1000 дюйма. Образцы наблюдаются под микроскопом, и демонстрируют отсутствие сквозных отверстий. Образ-

чик от каждого опыта сохраняют (только без смолы) для будущего сравнения.

Пример 5. Связывание β -лактоглобулина и характеристики протекания каландрированных мембран, импрегнированных смолой

Осуществляют эксперимент для определения кривых прохождения для связывания модельного белка (β -лактоглобулина) с каландрированными мембранными материалами, содержащими сухую смолу при плотности 4 мг/см².

Материал полипропиленовой мембраны каландрируют при 170°F и 150 фунтов на линейный дюйм (PLI), и он содержит сухую смолу при плотности 4 мг/см². Этот мембранный материал нарезают и собирают в узле фильтра Millipore Swinnox. Каждый узел фильтра содержит пакет, от 1 до 4 слоев мембран плюс слой некаландрированной мембраны на выходной стороне узла фильтра. Раствор 0,5 мг/мл β -лактоглобулина в IX PBS пропускают через узел фильтра при скорости 1,5 мл/мин с использованием перистальтического насоса. Фракции по 0,5 мл собирают в течение 4 мин и анализируют на концентрацию белка в них с использованием набора для анализов Pierce Micro BCA (Pierce, Rockford, IL).

Фиг. 5-7 показывают результаты анализа с помощью Micro BCA 12 фракций, собранных для различного количества слоев мембран. Каландрированные мембраны без смолы используют в качестве контроля. Результаты этого эксперимента показывают различия в связывании между мембранами с захваченной смолой и контролем. Все опыты демонстрируют сходную исходную крутизну несвязанной концентрации; однако слои 2-4 не исследуются достаточно долго, чтобы продемонстрировать условия насыщения.

Таблица 5. Общее количество связанного белка и количество связанного белка на единицу массы смолы

Общее количество связанного белка, мг			
Мембрана	Контроль	Смола	мг связанного/г смолы
1 Слой	0,805	1,095	4,5
2 Слоя	0,792	1,493	5,4
3 Слоя	0,731	2,085	6,9
4 Слоя	0,776	1,859	4,2

Количество связанного белка, как правило, возрастает после каждого дополнительного слоя мембраны, проходя через пик на трех слоях мембраны, с последующим очень малым уменьшением при четырех слоях (табл. 5). Поскольку фильтры, содержащие 2-4 слоя мембран, не работали достаточно долго, чтобы продемонстрировать условия насыщения, не определено, что они осуществляют связывание.

Пример 6. Распределение частиц на рулонах мембран

Разработан узел распределения частиц, чтобы заменить распределение шариков вручную, используемое ранее. Оборудование исследуется и калибруется.

Апликатор порошка настраивается вручную на 60%, что эквивалентно скорости распределения от 6,52 до 6,99 кг/ч (видимой). Измеренная скорость распределения, определяемая по массе, равна 6,65 кг/ч (среднее значение для трех определений), в пределах 5% от целевого значения 6,96 кг/ч.

Распределяемый порошок, на вид, распределяется с однородностью (визуальная оценка) и без избытка на краях мембраны. Фиг. 9 показывает распределение частиц на нижней мембране после работы линии в течение примерно 1 ч. Резкие края, формируемые у области, содержащей частицы, могут быть отмечены на обеих сторонах мембраны. Другая заметная особенность представляет собой отсутствие порошка на конвейерной ленте, даже после некоторого времени работы.

Пример 7. Связующие вещества для прионов

Список смол, используемых для связывания прионов, описывается ниже.

а) Amino 650M - основная смола для связывания пептида и других лигандов. Это основная смола демонстрирует пригодность для связывания белка приона, как нормального PrP^{sc}, так и инфекционного PrP^{sc} (или PrP^{res}). Смола используется в формате хроматографической колонки, и было продемонстрировано удаление/связывание PrP^{sc} (хомячка, мыши vCJD, мыши Fukuoka, человека spCJD и человека vCJD) из концентратов эритроцитов, плазмы, цельной крови, до предела детектирования, с помощью методик *in vitro* (Western Blot), и уменьшения 263К скрепи инфекции у хомячка, то есть, у модели *in vivo* (концентрата эритроцитов) примерно на 4 log.

б) Toyorearl - SYA - Этот трипептид демонстрирует пригодность для связывания белка приона, как нормального PrP^{sc}, так и инфицированного PrP^{sc} (или PrP^{res}). Смола используется в формате хроматографической колонки, и авторы продемонстрировали удаление/связывание PrP^{sc} (хомячка, мыши vCJD, мыши Fukuoka, человека spCJD и человека vCJD) из концентратов эритроцитов, плазмы, цельной крови, до предела детектирования, с помощью методик *in vitro* (Western Blot), и уменьшения 263К скрепи инфекции у хомячка, то есть, у модели, *in vivo* (концентрат эритроцитов) примерно 4 log.

в) Toyorearl - DVR - Этот трипептид демонстрирует пригодность для связывания белка приона, как нормального PrP^{sc}, так и инфицированного PrP^{sc} (или PrP^{res}). Смола используется в формате хромато-

графической колонки, и авторы продемонстрировали удаление/связывание PrP^{sc} (хомячка, мыши vCJD, мыши Fukuoka, человека spCJD и человека vCJD) из концентратов эритроцитов, плазмы, цельной крови, до предела детектирования, с помощью методик *in vitro* (Western Blot), и уменьшения 263K скрепи инфекции у хомячка, то есть, у модели *in vivo* (концентрат эритроцитов) примерно на 4 log.

Amino 650M, SYA и DVR используют в полном масштабе, то есть, 1 полная единица концентрата эритроцитов проходит через смолу (примерно 350 мл). Размер колонки равен 10 мл набухшей смолы SYA, DVR и аминокислотной группы при 400 мкмоль/г (сухой смолы).

Пример 8. Сравнение связывания PrP^{sc} на Amino 650M и Amino 650U из SBH, введенного в буфер, отфильтрованной плазмы и цельной крови

Amino 650U представляет собой смесь шариков различных размеров, которая содержит Amino 650M и является менее дорогостоящей при производстве, чем 650M. Amino 650U исследуют на эндогенный PrP и на ее способность к связыванию PrP^{sc} во всех матрицах, используемых в настоящее время, в буфере, отфильтрованной плазме и цельной крови, и ее сравнивают со связыванием с помощью Amino 650M, стимулированной с помощью дополнительной цельной крови. Эксперимент разрабатывают для сравнения связывания PrP^{sc} из дополнительного буфера, плазмы и цельной крови с Amino 650U и для установления связывания эндогенного PrP^c из плазмы и цельной крови с Amino 650U. В дополнение к этому разрабатывается эксперимент для определения эффекта фильтрации лейкоцитов при удалении PrP^c. Дополнительный буфер относится к добавлению гомогената мозга к рабочему буферу. Дополненная цельная кровь представляет собой добавление гомогената мозга к цельной крови человека или хомячка.

Не обнаружено разницы в сигнале для удаления приона посредством 650 U или 650 M, когда он присутствует в плазме или в цельной крови. Вывод: Amino 650 U и 650 M имеют одинаковые характеристики. Количество PrP^c, удаляемое посредством фильтрации лейкоцитов, больше, чем, согласно оценкам, должно присутствовать в тромбоцитах и лейкоцитах вместе. Таким образом, возможно, что фильтрация лейкоцитов захватывают также некоторую часть PrP^c, полученного в плазме. Показано, что фильтры для лейкоцитов ведут себя по-разному относительно захвата полученного из плазмы человека и хомячка PrP^c. Возможно, что, хотя PrP^c из плазмы хомячка не захватывается фильтром, PrP^c из плазмы человека захватывается. Наконец, является также вероятным, что разница между двумя результатами связана с отсутствием корреляции между PrP^c и инфекционностью.

Количество PrP^c, удаляемое посредством фильтрации лейкоцитов, больше, чем согласно оценкам, должно присутствовать в тромбоцитах и лейкоцитах вместе. Таким образом, возможно, что фильтрация лейкоцитов захватывают также некоторую часть PrP^c, полученного в плазме. Показано, что фильтры для лейкоцитов ведут себя по-разному относительно захвата PrP^c, полученного из плазмы человека и хомячка. Возможно, что, хотя PrP^c из плазмы хомячка не захватывается фильтром, PrP^c из плазмы человека захватывается. Наконец, является также вероятным, что разница между двумя результатами связана с отсутствием корреляции между PrP^c и инфекционностью.

Пример 9. Связывание PrP^{sc} мозга хомячка со смолами AMN

Сравнительные эксперименты по связыванию осуществляют для ряда смол (например, AMN-13, 14, 15, 16, и 17, Amino 650M и Amino 650U). Ряд AMN связан с образцами 650 U (новое обозначение 650C-grdt) посредством изменения уровней аминокислотного замещения следующим образом:

AMN-13	0,094	экв/л
AMN-14	0,078	экв/л
AMN-15	0,072	экв/л
AMN-16	0,063	экв/л
AMN-17	0,098	экв/л

Смолы связываются с PrP^{sc} из дополнительного буфера, плазмы и цельной крови. Результаты демонстрируют, что все смолы AMN связываются одинаково хорошо, когда стимулируются как дополнительным буфером, так и дополнительной цельной кровью. Кроме того, сигнал для смол AMN такой же, как для Amino 650M и 650U. Сравнивая связывание со смолой для PrP из дополнительной плазмы, имеется чуть более интенсивный сигнал от Amino 650M по сравнению со всеми другими смолами. Среди смол AMN, № 13, видимо, имеет пик сигнала PrP, но очень сравнимый с Amino 650 U, в то время как № 15, 16, 17, все, имеют лучшие характеристики, чем AMINO 650 U. Не наблюдается заметных различий между смолами AMN 14, 15, 16, 17.

В итоге, исследование демонстрирует больше сходства среди смол, и что важнее всего, демонстрируется более близкая корреляция с Amino 650U, чем с 650M. Различия, наблюдаемые для плазмы, говорят, что, по меньшей мере, для стимулирования, понижение уровня замещения было бы выгодно, и характеристики смолы ближе к Amino 650M.

Пример 10. Экстракция белков, связанных с мембранами, включенными в смолу, и определение связывания PrP^c из гомогената нормального мозга хомячка

Разработка нового устройства, использующего каландрированные мембраны с включенной смолой, приводит к необходимости в разработке новых процедур для экстракции связанных белков из смол. Необходимо осуществить изменения относительно манипуляций с материалом, а также композиций, концентраций и объемов экстракционного раствора. Также разрабатывается эксперимент для осуществления

оценок связывания в новом формате, с использованием как включенных в смолу мембран Toyopearl Amino 650M, так и их полностью ацетилованной формы.

Гомогенат нормального мозга хомячка (NBH) обрабатывают саркозилем и центрифугируют. Полученный супернатант разбавляют до конечной концентрации 1% с использованием рабочего буфера или цельной крови человека. Пятьдесят миллилитров дополненного раствора пропускают через 47 мм фильтродержатели для фильтров Swinnex (Millipore), содержащие по 4 сэндвича каландрированных мембран, с включенными 4 мг/см² хроматографической смолы, при полной емкости, или с формой той же смолы с пониженной емкостью замещения, в качестве контроля, либо Toyopearl Amino 650M, либо ее полностью ацетилованной формы. Используют скорость потока 0,5 мл/мин, с использованием перистальтического насоса. Десять аликвот, по 5 мл каждая, собирают для каждого из дополненных растворов и типов мембраны. Образцы от сквозного потока для обеих мембран, стимулируемых дополненным буфером, анализируют посредством ELISA. Мембраны, содержащие полностью ацетилованную смолу и стимулируемые дополненной цельной кровью, промывают с использованием рабочего буфера.

Секции мембран (в некоторых случаях, весь пакет) обрабатывают либо буфером для образца, для SDS-PAGE, либо 99% муравьиной кислотой. Обработка муравьиной кислотой заключается в добавлении 0,5 мл 99% муравьиной кислоты и 10 мкл 20% SDS к 1 четверти мембранного сэндвича, с последующим инкубированием в течение 1 ч, удалением жидкости и выпариванием с использованием SpeedVac. У образцов их объемы доводят до 15 мкл с использованием воды, с последующим добавлением 15 мкл 2X буфера для образца. Обработка буфером для образца состоит в добавлении 3 мл IX буфера для образца к полному пакету мембран, с последующим инкубированием в течение 30 мин, и кипячением в течение 7 мин. Раствор харвестировать без сжатия мембран, и центрифугируют в течение короткого времени для удаления всей смолы. Исследуется также некоторый вариант указанной выше обработки. Он состоит в добавлении 1 мл 2X буфера для образца к двум отдельным пакетам мембран, соответствующим ¼ фильтра, инкубировании в течение 1 ч, с последующим кипячением только одной из них. Элюирование с помощью буфера для образца может использоваться, если разборка фильтродержателей фильтров становится слишком рискованной, когда используется инфекция.

Конечное исследуемое условие представляет собой инкубирование секций (1/4) мембран вместе с буфером для образца, для проверки связывания с первой, второй, третьей и четвертой мембраной, для контакта со стимулирующим раствором. Затем образцы наносят на гели SDS-PAGE и окрашивают на общее содержание белка. Также осуществляют исследование Western blots. Объем пустот фильтродержателя составляет приблизительно 7 мл. После прохождения через каждый из фильтров 50 мл стимулирующего раствора, а затем воздуха, извлеченные объемы составляют 45 и 47 мл, для цельной крови. Когда используют дополненный буфер, извлеченные объемы равны 46 и 46 мл. Нет значительной разницы, отмеченной, когда используют различные стимулирующие растворы.

Первый фильтродержатель, который должен открываться, представляет собой фильтродержатель, содержащий мембрану с полностью ацетилованной Toyopearl, который стимулируют дополненной цельной кровью. Отмечено, что, несмотря на пропускание воздуха и промывку буфером, в фильтре по-прежнему остается некоторое количество крови. Во время попытки промывки мембран буфером, имеется значительная потеря смолы, и мембрану выбрасывают.

Фильтродержатель с Toyopearl Amino 650M, стимулируемой цельной кровью, промывают дополнительными 200 мл буфера. Скорость потока больше чем максимальная (999, по шкале). При открывании фильтродержателя отмечено, что внутри по-прежнему имеется некоторое количество крови, в особенности, между слоями. Отмечено также, что пара секций, отмеченных радиальным распределителем, обтекаются во время промывки.

Пакет мембран разрезают на 4 четверти. Один из кусков разделяют на четыре слоя и обрабатывают буфером для образца, чтобы исследовать, имеют ли различные слои различное связывание. Другую четверть также разделяют на куски и подвергают обработке муравьиной кислотой. Оставшиеся две четверти используют для сравнения обработки с нагревом и без него.

Два фильтра, стимулируемые дополненным буфером, промывают, каждый, 200 мл рабочего буфера. Фильтры открывают, и весь пакет переносят в маленький стеклянный флакон, в который добавляют 3 мл буфера для образца.

Смола, включенная в каландрированные мембраны, видимо, сохраняет такие же свойства связывания PrP, которые характерны для смолы в формате колонки. Полностью ацетилованная Amino демонстрирует более слабый сигнал связанного с мембраной PrP, по сравнению с сигналом от Amino, подводя вывод, что полностью ацетилованная Amino может и не связывать PrP эффективно. Как правило, результаты показывают, что 50% ацетилование, либо в форме смеси, либо посредством химического синтеза, уменьшает связывание PrP^{res}.

Пример 11. Связывание PrP^c из гомогената нормального мозга хомячка с фильтрами, содержащими импрегнированные частицами мембраны

Следующий далее эксперимент демонстрирует связывание нормального PrP (PrP^c) из гомогената нормального мозга хомячка (NBH) с мембранами, содержащими частицы смолы.

Способ элюирования, описанный в предыдущем примере, применяют к этим образцам. Фильтр от-

крявают, мембраны помещают в стеклянный флакон и инкубируют при смешивании с 2 мл буфера для образца NuPage (Invitrogen corporation, Carlsbad, CA.) Затем флакон нагревают и собирают смолу, которая выходит из фильтра. Результаты Western blot для элюируемых белков показывают, что способ элюирует PrP из мембраны. Результаты также показывают, что фильтры со смолами связывают больше PrP, чем фильтр без смолы.

Пример 12. Связывание PrP^c из гомогената скрепи мозга с фильтрами, содержащими импрегнированные частицами мембраны

Этот эксперимент демонстрирует рабочие характеристики фильтров при связывании PrP^{sc} от гомогената инфекционного мозга хомячка (SBH), в дополненной цельной крови и в буфере. Фильтры содержат мембраны, импрегнированные смолами при полной емкости, а также смолой с пониженной емкостью, и мембраны без смолы, в качестве контроля.

Элюирование осуществляют с помощью инъекции 2 мл буфера для образца NuPage (в соответствии с экстракцией, описанной в примере 10). Western blot элюированных белков показывает сильный сигнал без PK (протеинкиназы), но слабые сигналы в присутствии PK. Поскольку белки элюируются в присутствии 2% SDS, ферментацию PK осуществляют при 2% концентрации детергента вместо 0,2% SDS (стандартная процедура). Является вероятным то, что слабый сигнал от PrP^{res} в присутствии PK связан с избытком SDS в реакционной смеси. Результаты показывают более слабый сигнал для мембран без смолы, но сходные интенсивности сигнала для всех других исследуемых смол. Не наблюдается отличий между SBH в буфере и в цельной крови, для смол с полной емкостью и без смол. Смола с пониженной емкостью демонстрирует более сильный сигнал в присутствии дополненного буфера по сравнению с дополненной кровью.

Пример 13. Исследование прототипа фильтра

В этом примере фильтры собирают в пластиковых корпусах и сваривают вместе в конфигурации, подобной конечному устройству. Характеристики такого устройства оценивают с использованием различных стимулирующих факторов, дополненных и недополненных. В одном из вариантов осуществления конечное устройство состоит из жесткого или гибкого пластикового корпуса, содержащего слои некаландрированной мембраны (от 1 примерно до 25 или более), с последующими несколькими слоями (в пределах между 1 и примерно 50, в зависимости от желаемой емкости устройства) мембран с включенной смолой, и в пределах 1 примерно 25 слоев некаландрированных мембран. Фильтры свариваются вместе с использованием ультразвукового резака/герметизатора или посредством использования прессы для одновременного приложения тепла и давления. В этом примере используют тепло и давление.

Гомогенат мозга хомячка обрабатывают 0,5% саркозила и разбавляют 100-кратно в буфере, отфильтрованную плазму и цельную кровь используют в качестве стимулирующего фактора для смол. Смолы стимулируются 80 мл образца, при 0,5 мл/мин, с помощью перистальтического насоса. Western blots образцов PrP^{res}, связанных со смолой, осуществляют без ферментации PK. Результаты показывают, что мембраны имеют хорошие характеристики в присутствии метки в буфере и в плазме, но при той же метке в крови характеристики, видимо, ухудшаются.

Пример 14. Удаление PrP из дополненного RBCC с помощью ряда устройств фильтров

Этот эксперимент показывает удаление PrP из дополненного концентрата эритроцитов (RBCC) с использованием устройства, содержащего импрегнированное частицами устройство. Поскольку устройство стимулируется избытком целевого белка, используют ряд устройств. Общий объем используемого RBCC эквивалентен одной единице.

Все фильтрования осуществляются без каких-либо видимых проблем, и для всех фильтрований используют насос. Все фильтры имеют мягкие корпуса и предварительно проверяются на протечку. Ни один из фильтров не протекает в предварительных исследованиях или в реальном эксперименте. Время фильтрования составляет примерно 10 минут, каждое, для одной единицы RBCC (~300 мл). Фильтры промывают примерно 460 мл рабочего буфера (цитрата). Эффективность стадии промывки оценивается эмпирически посредством оценки цвета фильтра после промывки.

После промывки в фильтры инжектируют воздух для удаления всей жидкости в фильтре. Фильтры обрабатывают ~4,6 мл буфера для образца, для элюирования (инжектируют с одной стороны фильтра). Буфер для образца собирают и инжектируют с другой стороны фильтра. Эту стадию осуществляют три раза. Результаты показывают, что PrP^{res} покидает фильтр 1 и захватывается фильтром 2, что является ожидаемым, поскольку прилагаемый стимулирующий фактор выше, чем емкость одного набора фильтров. PrP^{res} может также присутствовать в элюате из фильтра 3, но ниже предела детектирования Western blot. Эти результаты, по сравнению с результатами на RBCC в первом исследовании инфекции PRDT, показывают, что фильтры имеют настолько же хорошие рабочие характеристики, как и такие же смолы, используемые в формате колонки. Как и в предыдущем исследовании, большой избыток PrP^{res} проходит через фильтры, и не является неожиданным, что не весь PrP^{res} захватывается в первом фильтре.

Пример 15. Прививка глицидилметакрилата на подложках из полипропилена, полиэтилентетрафталата, хлопка и нейлона

Прививка представляет собой эффективный способ изменения поверхностных свойств полимеров.

Привитые полимеры, получаемые вместе со специфичными лигандами, в сочетании с превосходными механическими свойствами подложек, делают прививку наиболее универсальным способом связывания белков, применения которого часто требуют изменений лигандов, а также достаточной механической прочности. В этом примере осуществляют прививку глицидилметакрилата (GMA) на подложках из полипропилена (PP), полиэтилентетрафталата (PET), хлопка и нейлона, чтобы показать возможность применения этого подхода для удаления PrP^c из крови человека.

Процедура

Подложки, используемые для исследований, включают в себя хлопковую ткань, тканый материал из нейлона, нетканый PP материал, нетканую мембрану PP (Macopharma PP175), PP волокна и PET волокна от College of Textile в NCSU.

Прививку осуществляют с помощью следующих стадий:

1. Образцы три раза промывают ацетоном;
2. Образцы сушат в вакуумной печи в течение более трех часов;
3. Образцы обрабатывают аргонной плазмой в течение 15 с при 750 Вт;
4. Образцы экспонируют для воздуха в течение 30 мин;
5. Затем образцы погружают в 10% раствор GMA, в УФ камере в течение 6 ч. Интенсивность УФ равна 1,1 Вт/м². Температура камеры равна 30°C, а температура стойки с образцом выше 60°C;
6. Затем после УФ полимеризации образцы промывают ацетоном три раза;
7. Образцы сушат в вакуумной печи.

На этой стадии образцы анализируют только на их увеличение массы и ИК-спектр. После анализа привитой PP нетканый материал и PP нетканая мембрана дополнительно аминируются в растворе гидроксида аммония при 60°C в течение ночи. Затем эти образцы промывают и сушат для элементного анализа.

Результаты

По результатам гравиметрического измерения и ИК-спектроскопии PP подложки показывают значительно лучшие результаты прививки, чем другие подложки, хлопок, нейлон и PET. Исследуют три типа PP подложек, PP волокно, PP нетканый материал и PP нетканую мембрану (Macopharma). Увеличение массы после прививки составляет 85, 154 и 57%, соответственно (табл. 6). Эти значения гораздо выше, чем значения (от -3 до 4%) для других подложек. Эти результаты дополнительно подтверждаются ИК спектрами, где привитые PP системы показывают сильные пики при 1720 см⁻¹, связанные с карбонильной группой, и на 845 и 910 см⁻¹, связанные с эпоксидной группой, сигнатуру GMA. Другие подложки не показывают такого изменения, когда сравнивают исходный образец с образцами после прививки.

Величины для различий в прививке на различных подложках по-прежнему не понятны. Одна из возможных причин заключается в том, что связь С-Н может легче разрушаться в окружающей среде PP, чем в другой окружающей среде. Другая возможная причина заключается в том, что образцы нейлонового и хлопкового материала могут иметь поверхность, обработанную способом, не известным авторам. Простая промывка ацетоном может быть не достаточной для удаления отделки.

Также интересно отметить, что исходные образцы PP волокна и нетканой мембраны (Macopharma PP175) показывают пики в диапазоне от 840 до 920 см⁻¹. Однако таких пиков не продемонстрировано для PP нетканых материалов. Пики для первого случая могут представлять собой результаты окисления поверхностей образцов, которые возникают при обработке при высоких температурах.

По ИК-спектру аминированный образец Macopharma показывает более широкий пик при 3400 см⁻¹, который приписывается группам -ОН и -NH₂, результатам аминирования.

Определение площади поверхности нетканых материалов

Определение площади поверхности нетканых материалов является непростой задачей из-за сложных соединений между собой волокон, которые образуют нетканый материал. Однако площадь поверхности отдельного волокна может быть определена точно посредством измерения микроскопических изображений волокна и длины. По этой причине, теоретически возможно измерение площади поверхности нетканых материалов с помощью волокон таких же материалов, посредством способа прививки, при условии, что поверхностные свойства волокон такие же, как у нетканых материалов. Этот способ может быть выражен посредством следующего уравнения:

$$W_t = D(S_f + S_m)$$

где W_t представляет собой увеличение массы при прививке,

S_f представляет собой площадь поверхности волокна и

S_m представляет собой площадь поверхности нетканого материала.

В уравнении только два неизвестных: D и S_m , которые могут определяться с помощью двух независимых экспериментов.

Площадь, определяемая с помощью этого способа, представляет собой эффективную площадь поверхности, соответствующую каждому типу реакции. Реально для этого способа могут использоваться любые реакции, степени которых зависят от площади поверхности подложек.

Выводы:

Первичные исследования прививки GMA на нескольких полимерных подложках показывают, что

PP представляет собой идеальную подложку для такой прививки. Увеличение массы при прививке GMA на PP изменяется от 60 до 160%, в зависимости от формы PP материалов. Эффекты прививки также подтверждаются спектрами FTIR (ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье). Кроме того, на основе прививки, предложен простой способ измерения площади поверхности нетканых материалов (табл. 6).

Таблица 6. Эффект прививки, измеряемый по увеличению массы

Наименование образца	Подложка	Время УФ (час)	Начальная масса (г)	Увеличение массы (%)
Co-g-GMA-032905	Хлопковая ткань	0,6	0,1283	-1,8
Nu-g-GMA-032905	Нейлоновая ткань	0,6	0,1323	-0,7
PP-g-GMA-032905	Нетканый PP	0,6	0,1179	1,7
Co-g-GMA-033105	Хлопковая ткань	6	0,0954	-2,8
Nu-g-GMA-033105	Нейлоновая ткань	6	0,1446	-1,4
PP-g-GMA-033105	Нетканый PP	6	0,0537	91
Mac-PP-g-GMA-040805	Нетканная мембрана MasoPharma PP	6	0,0668	57
NW-PP-g-GMA-040805	Нетканый PP материал	6	0,0738	154
FB-PP-g-GMA-040805	PP волокна	6	0,0789	85
FB-PET-g-GMA-040805	PET волокна	6	0,0517	4

Пример 16. Связывание PpP^c посредством волокон PGMA, сетки, полученной распылением из расплава в электрическом поле, привитого PGMA и полученного плюсованием с помощью PGMA PP

Цель

Определение связывания PpP^c с помощью волокон PGMA, сетки, полученной распылением из расплава в электрическом поле, и нетканого полипропилена, привитого GMA и полученного плюсованием с помощью PGMA.

Процедура

Исследуемые материалы представляют собой вытянутые из расплава волокна полиглицидилметакрилата (PGMA), сетки из PGMA, полученные распылением из расплава в электрическом поле, привитые PGMA и полученные плюсованием с помощью PGMA полипропиленовые (GMA-g-PP) нетканые материалы. Подложки представляют собой образцы от College of Textiles, North Carolina State University, MasoPharma PP175 и MasoPharma PP 235. Для каждого материала, готовят две реплики для связывания белка.

Приготавливают образцы, как с массовой площадью, так и с видимой площадью (измеренной площадью материала). Второй способ применяется только к образцам с регулярными формами, таким как полученные плюсованием мембраны MasoPharma.

Все образцы нарезают на маленькие кусочки. Затем каждый образец погружают в коническую пробирку (50 мл), содержащую 5 мл 1% раствора гомогената нормального мозга хомячка (HaBH). Затем образцы инкубируют на качающейся платформе в течение 30 мин. После этого образцы промывают с помощью 10 мл буфера для образца, три раза по 10 мин, на качающейся платформе.

Результаты

Масса, площадь и уровень аминирования образца, который определяют по элементному анализу, показаны ниже, в следующей далее табл. 7

Таблица 7. Элементный анализ образцов

Наименование	Масса (г)	N%
PGMA-FiberA	0,1009	3,8%
PGMA-FiberB	0,1011	3,8%
PGMA-g-PPA	0,1007	2,6%
PGMA-g-PPB	0,1009	2,6%
PGMA-g-PP (Maco175) A	0,1011	1,5%
PGMA-g-PP (Maco175) B	0,1010	1,5%
PGMA-g-PP1A	0,1015	Недоступен
PGMA-g-PP1B	0,1007	Недоступен
PGMA-g-PP2A	0,1007	Недоступен
PGMA-g-PP2B	0,1012	Недоступен
PGMA-g-PP3A	0,1012	Недоступен
PGMA-g-PP3B	01,07	Недоступен
Контроль-Nonwoven-PPA	0,1009	Нет
Контроль-Nonwoven-PPB	0,1011	Нет
Контроль-Maco175A	0.1011	Нет
Контроль-Maco175B	0,1006	Нет
650MA	0,1016	0,6%
650MB	0,1011	0,6%
Полученный распылением из расплава в электрическом поле Spun A	0,1001	Недоступен
Полученный распылением из расплава в электрическом поле Spun B	0,1005	Недоступен
	Area (cm ²)	
PGMA-p-PP (Maco235) 6A	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 6B	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 7A	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 7B	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 9A	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 9b	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 10 ^a	4x4	Недоступен
PGMA-p-PP (Maco235) 10B	4x4	Недоступен
Контроль-Maco235A	4x4	Недоступен
Контроль-Maco235B	4x4	Недоступен

На основе результатов Western blot, как PP, привитой PGMA, так и PP, полученный плюсованием с помощью PGMA, связывают прион.

Эквиваленты

Настоящее изобретение, иллюстративно описанное здесь, соответствующим образом может осуществляться в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые не описаны здесь конкретно. Термины и выражения, которые использованы, используются как термины описания, а не ограничения, и нет предположения, что использование таких терминов и выражений исключает любые эквиваленты и особенности, показанные и описанные, или их части, но следует заметить, что различные модификации являются возможными в рамках заявляемого изобретения. Таким образом, необходимо принять во внимание, что, хотя настоящее изобретение описано здесь конкретно, необязательные

особенности, модификации и вариации концепций, описанных здесь, могут быть предложены специалистом в данной области, и что такие модификации и вариации рассматриваются как находящиеся в рамках настоящего изобретения, как определяется прилагаемой формулой изобретения.

Все ссылки, описанные здесь, включаются в качестве ссылок. Специалист в данной области легко поймет, что настоящее изобретение хорошо приспособлено для осуществления целей и получения рассмотренных результатов и преимуществ, а также тех, которые ему присущи. Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, без отклонения от его духа или главных атрибутов. Наоборот, необходимо четко понять, что могут быть предложены различные другие его варианты осуществления, модификации, и эквиваленты, которые после прочтения настоящего описания могут служить сами по себе специалистам в данной области без отклонения от духа настоящего изобретения и/или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для выделения по меньшей мере одного целевого агента из образца, содержащего одну или более пористых матриц, имеющих размеры пор, большие чем 10 мкм, и множество частиц, импрегнированных в них, где по меньшей мере один целевой агент присоединяется к одной или более пористым матрицам, частицам или как к тем, так и к другим, и удаляется из образца.

2. Устройство по п.1, в котором частицы являются пористыми, непористыми или как теми, так и другими.

3. Устройство по п.1, в котором одна или более пористых матриц, частиц или как тех, так и других, имеют одинаковые или различные размеры пор.

4. Устройство по п.2, в котором частицы имеют размер пор от примерно 0,001 до примерно 0,1 мкм.

5. Устройство по п.1, в котором одна или более пористых матриц включают в себя по меньшей мере один нетканый материал.

6. Устройство по п.1, в котором одна или более пористых матриц включают в себя природные волокна, синтетические волокна или как те, так и другие.

7. Устройство по п.2, в котором частицы содержат пористую смолу, имеющую соединенные между собой поры с площадями поверхности в пределах от примерно 1-2 м²/г сухой смолы до примерно 300 м²/г сухой смолы.

8. Устройство по п.1, в котором по меньшей мере один целевой агент присоединяется к частицам, к одной или более пористым матрицам или как к тем, так и к другим, посредством впитывания, адсорбции, ионного обмена, ковалентных связей, гидрофобных, афинных взаимодействий, образования заряженных частиц, присоединения афинных лигандов или их сочетания.

9. Устройство по п.1, в котором одна или более пористых матриц, частиц, или как тех, так и других, являются поверхностно модифицированными посредством по меньшей мере одной реакционноспособной группы, включающей в себя химическую группу, биологическую группу или как ту, так и другую.

10. Устройство по п.9, в котором по меньшей мере одна реакционноспособная группа содержит функциональную группу, включающую в себя эпокси, формильную, трезильную группу, группы сложных гидроксисукцинимидных эфиров, группу сульфоновой кислоты, группы четвертичных аминов, карбоксильные группы, группы первичных аминов, циано, циклогексильную, октильную и октадецильную группы, группы эпоксида, оксирана, сложных N-гидроксисукцинимидных эфиров, сложных сульфонильных эфиров, имидазолилкарбаматов, четвертичных аминов, карбоксильные группы, группы лиганда красителя, афинного лиганда, антиген-антитело, молекулы нуклеиновых кислот, реакционноспособные группы для ионного обмена, хелатирования, реакций окисления/восстановления, реакций стерической эксклюзии, реакций катализа гидрофобных реакций или обращенной фазы, или их сочетания.

11. Устройство по п.1, в котором образец представляет собой образец крови и по меньшей мере один целевой агент включает в себя прионы, вирусы, бактерии, протозоа и токсины или их сочетания.

12. Устройство по п.1, в котором частицы содержат полиметакрилатную смолу, метакрилатную смолу, модифицированную смолу или их сочетания.

13. Устройство по п.12, в котором модифицированная смола включает в себя TOYOPEARL™ AMINO 650.

14. Устройство по п.7, в котором смола включает в себя влажную смолу, сухую смолу или их сочетание.

15. Устройство по п.10, в котором частицы содержат модифицированную смолу, одна или более пористых матриц содержат обработанный плазмой полипропилен, и реакционноспособная группа содержит лиганд, имеющий первичный амин, и гидрофильный спейсер, содержащий единицы полиэтиленгликоля.

16. Устройство по п.1, в котором частицы заключены между слоями одной или более пористых матриц.

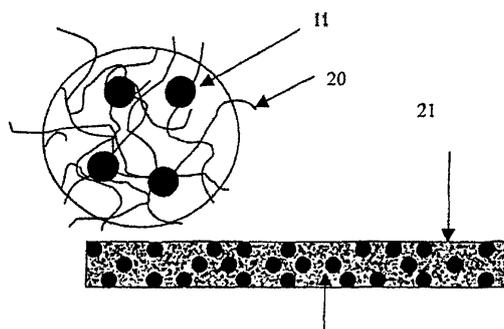
17. Способ выделения по меньшей мере одного целевого агента из образца, включающий в себя приведение в контакт устройства по любому из пп.1-16 с образцом, в результате чего осуществля-

ется присоединение по меньшей мере одного целевого агента к частицам, к одной или более пористым матрицам или как к тем, так и к другим; и

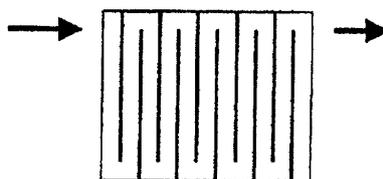
выделение по меньшей мере одного целевого агента из образца.

18. Тест-набор для целевого выделения и очистки образца, содержащий (i) устройство, содержащее одну или более пористых матриц, имеющих размеры пор больше чем 10 мкм, и множество частиц, импрегнированных в них, (ii) контейнер, содержащий один или более компонентов из буферов, реагентов, химических агентов, реагентов для функционализации, ферментов, агентов для детектирования, материалов для контроля, (iii) инструкции для использования тест-набора, (iv) упаковочные материалы или любое сочетание из (ii), (iii) и (iv).

19. Тест-набор по п.18, в котором агенты для детектирования включают в себя различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, дисперсные красители, частицы золота или их сочетание.



11
Фиг. 1



Фиг. 2

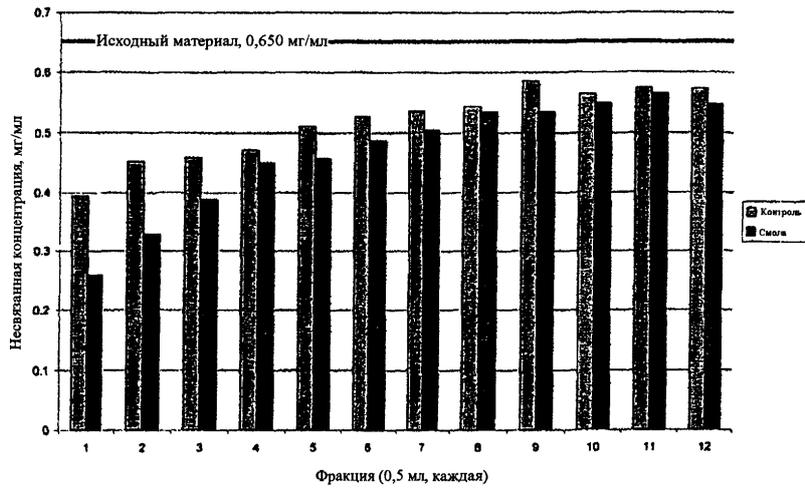


Фиг. 3



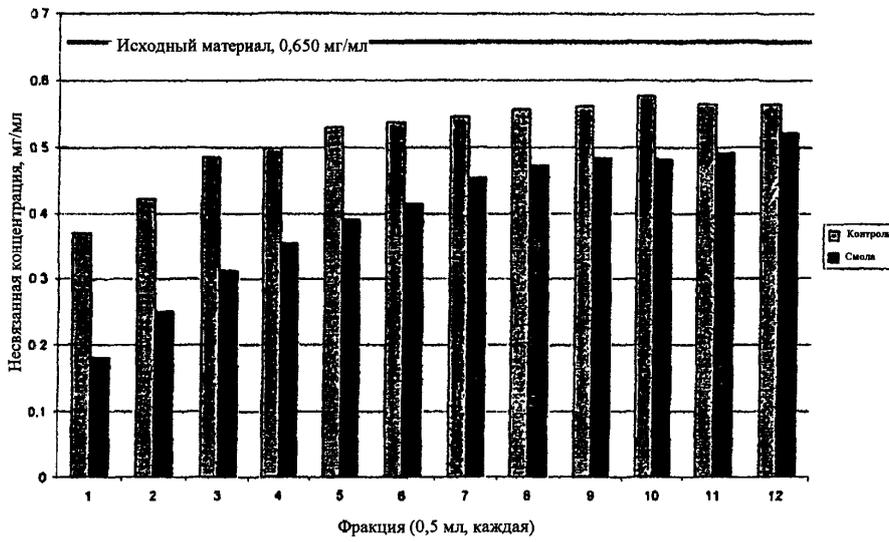
Фиг. 4

1 слой



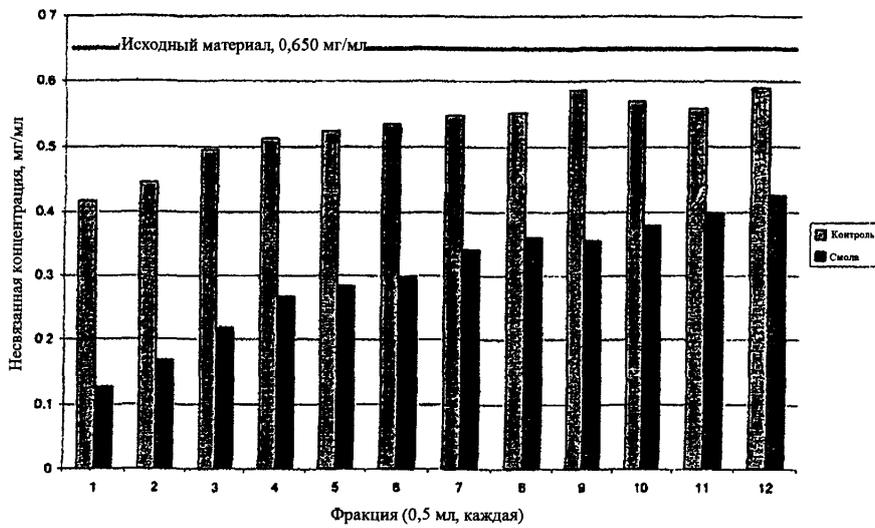
Фиг. 5

2 слой



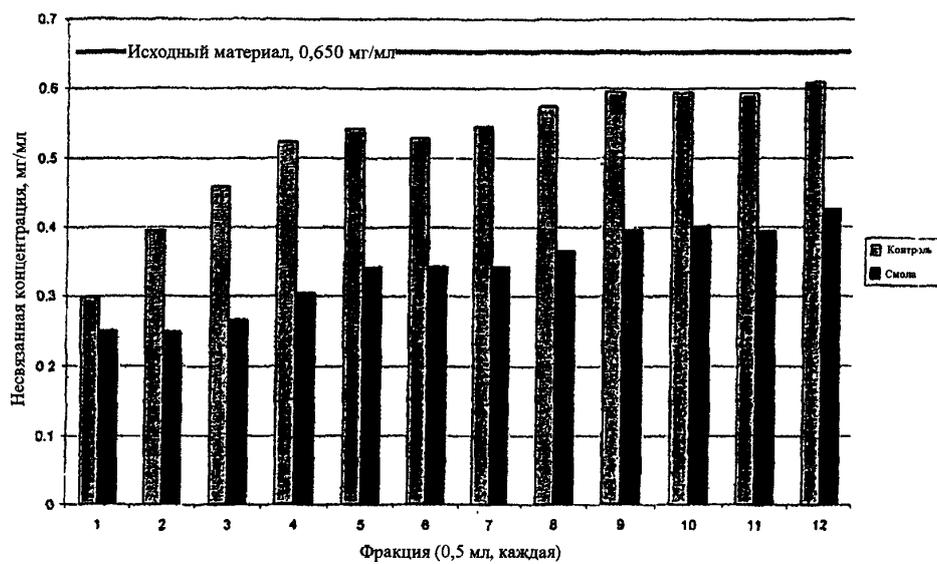
Фиг. 6

3 слой

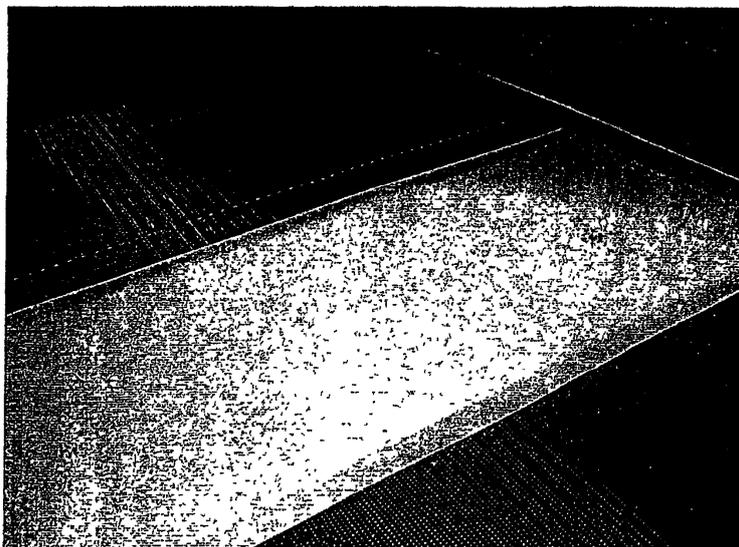


Фиг. 7

4 слоя



Фиг. 8



Фиг. 9

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1

Аминокислоты

LAFGAA –

SEQ ID NO: 2

Аминокислоты

YRVTWG

SEQ ID NO: 3

Аминокислоты

FLQGQ



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6