



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1984989 B

(45) 授权公告日 2013.03.13

(21) 申请号 200580022886.9

(22) 申请日 2005.06.09

(30) 优先权数据

60/578,061 2004.06.09 US

60/616,118 2004.10.06 US

60/617,669 2004.10.13 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.01.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/020036 2005.06.09

(87) PCT申请的公布数据

W02005/123952 EN 2005.12.29

(73) 专利权人 病原体切除与诊断科技公司

地址 美国特拉华

(72) 发明人 R·G·卡博内尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

(51) Int. Cl.

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 25/20 (2006.01)

(56) 对比文件

US 6544732 B1, 2003.04.08, 第5栏第54—第6栏第14行, 第8栏第24—43行, 第15栏第35—61行, 第25栏第13—21和35—47行, 第26栏第18—32行.

US 6451260 B1, 2002.09.17, 说明书第3栏第37—57行, 第5栏第56—62行, 第6栏第11—28和47—58行, 第7栏第19—36行, 第11栏第41行—第12栏第15行, 第16栏第58行—第17栏第31行, 权利要求1和图1—3、5和6.

审查员 汪波莉

权利要求书 2 页 说明书 25 页

序列表 1 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于从样品中除去靶分析物的包埋多孔底物中的颗粒

(57) 摘要

本发明提供一种从样品中除去靶试剂的装置、试剂盒和方法。该装置包含一种或多种孔径大于 10 μm 的多孔性基质, 和多个浸入其中的颗粒。靶试剂附着到装置上, 并从样品中被除去。

1. 一种从样品中过滤并分离至少一种靶试剂的装置,所述样品在使用时流过所述装置,所述装置包含埋入树脂的膜的叠层,所述膜包括和多个浸入其中或夹杂在其间的颗粒结合在一起的第一和第二层多孔性无纺布物,所述多孔无纺布物具有大于 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的孔径,所述颗粒具有 $40\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$ 的粒径,其中所述至少一种靶试剂附着到多孔性无纺布物、颗粒或两者之上,并从样品中除去。

2. 权利要求 1 的装置,其中通过重力或泵诱导流过所述装置。

3. 权利要求 1 的装置,包括 1-25 个单层的非碾压膜,然后是埋入树脂的膜的 1-50 层,然后是 1-25 个单层的非碾压膜。

4. 权利要求 1 的装置,其中所述叠层是焊接在一起的。

5. 权利要求 3 的装置,其中所述叠层被组装在塑料套管中。

6. 权利要求 1 的装置,其中多孔性无纺布物由天然纤维、合成纤维或两者组成。

7. 权利要求 6 的装置,其中所述多孔性无纺布物由聚丙烯或聚酯纤维组成。

8. 权利要求 1 的装置,其中颗粒是多孔性的、非多孔性的,或两者兼是。

9. 权利要求 1 的装置,其中多孔性无纺布物、颗粒或两者具有均匀或不定的孔径。

10. 权利要求 9 的装置,其中该颗粒的孔径是 $0.001\text{ }\mu\text{m}$ 到 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 。

11. 权利要求 8 的装置,该颗粒包含具有互连孔的多孔性树脂,其表面积是 $1\text{--}2\text{m}^2/\text{g}$ 的干树脂到 $300\text{m}^2/\text{g}$ 的干树脂。

12. 权利要求 1 的装置,其中该颗粒包含聚甲基丙烯酸酯树脂、甲基丙烯酸酯树脂、改性树脂或其组合。

13. 权利要求 12 的装置,其中改性树脂包含 TOYOPEARLTMAMINO650。

14. 权利要求 1 的装置,其中所述颗粒是碎纤维。

15. 权利要求 1 的装置,其中至少一种靶试剂通过如下方式附着到颗粒、多孔性无纺布物或这两者上:吸附、吸收、离子交换、共价结合、疏水性作用、亲和作用、形成带电荷物,附着到亲和配体,或它们的组合。

16. 权利要求 1 的装置,其中用与靶试剂相互作用并结合的反应性基团官能化多孔性无纺布物、颗粒或两者的一个或多个内和 / 或外表面。

17. 权利要求 16 的装置,其中所述反应性基团包含选自如下的官能团:环氧、甲酰基、2,2,2-三氟乙磺酰基、羟基琥珀酰亚胺酯、磺酸、季胺、羧酸基、伯胺、氰基、环己基、辛基和十八烷基、环氧化物、环氧乙烷、N-羟基琥珀酰亚胺酯、磺酰酯、咪唑基氨基甲酸酯、季胺、羧酸基、染料配体、亲和配体、抗原-抗体、核酸分子,或其组合。

18. 权利要求 16 的装置,其中所述反应性基团是选自用于离子交换、螯合作用、氧化 / 还原反应、立体排阻反应、催化作用、疏水性反应、反相的反应性基团。

19. 权利要求 17 或 18 的装置,其中颗粒包含改性树脂,多孔性无纺布物包含等离子处理的聚丙烯,反应性基团包含具有伯胺的配体和包含聚乙二醇单元的亲水性间隔基。

20. 权利要求 1 的装置,其中该样品是血样,且至少一种靶试剂包含朊病毒蛋白、病毒、细菌、原生动物和毒素或其组合。

21. 制备权利要求 1 的装置的方法,所述方法包括如下步骤:(a) 将颗粒铺展到第一层多孔性无纺布物;(b) 将第二层多孔性无纺布物放置到所述第一层上;和(c) 使该组合通过碾压滚轮。

22. 一种从样品中分离至少一种靶试剂的方法,包括:

(a) 提供可能包含一种或多种靶试剂的样品;

(b) 提供一种装置,包括埋入树脂的膜的叠层,所述膜包括和多个浸入其中或夹杂在其间的颗粒结合在一起的第一和第二层多孔性无纺布物,所述多孔性无纺布物具有大于 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的孔径,所述颗粒具有 $40\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$ 的粒径;

(c) 将样品放入该装置中;

(d) 将至少一种靶试剂附着到颗粒上;和

(e) 从样品中分离至少一种靶试剂。

23. 一种分离靶标和纯化样品的试剂盒,包括 (i) 权利要求 1 的装置和下述任意组合:

(i) 容器,包含一种或多种缓冲液或试剂, (ii) 使用该试剂盒的说明书,和 (iii) 包装材料。

24. 权利要求 23 的试剂盒,其中所述试剂包括化学试剂、官能化试剂、检测剂或对照物质。

25. 权利要求 24 的试剂盒,其中检测剂包含各种酶、辅基、发光材料、放射性物质、分散染料、金颗粒或其组合。

26. 权利要求 25 的试剂盒,其中所述发光材料是荧光材料或生物发光材料。

用于从样品中除去靶分析物的包埋多孔底物中的颗粒

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请在 37U. S. C. 119(e) 下要求基于 2004 年 10 月 13 日提交的美国临时申请 60/617, 669 的优先权, 后者在 37U. S. C. 119(e) 下要求基于 2004 年 10 月 6 日提交的美国临时申请 60/616, 118 的优先权, 后者在 37U. S. C. 119(e) 下要求基于 2004 年 6 月 9 日提交的美国临时申请 60/578, 061 的优先权, 在此将它们的全部内容通过参考引入本文。

[0003] I. 发明领域

[0004] 本发明涉及从样品中除去靶试剂的装置和方法。特别地, 本发明涉及从生物样品中除去病原体。

[0005] II. 发明背景

[0006] 将生物种吸附到固体载体中的方法在从多组分流中纯化、检测或除去靶分子中发现了很多的实际应用。例如离子交换、疏水性和亲和配体能够优先将很多试剂吸附到色谱固定相中, 而影响它们从含水溶液中的分离。如果已经吸附, 生物试剂可以洗脱成为产品, 或者用 ELISA 或其他分析途径来检测。

[0007] 在一些例子中, 包含靶生物试剂的溶液也包含较大的实体例如红细胞、病毒、细菌、脂质体、白细胞和不同大小的聚集物。在许多这样的例子中, 需要允许较大的聚集物流过固体基质或载体, 而不会影响靶生物试剂与载体结合的能力。这就要求在固体基质中有足够大的孔域以容纳较大实体的流动。不幸的是, 较大的孔域可能只有较小的表面积, 这限制了固体基质结合到靶试剂上的能力。

[0008] 在另外的情况中, 需要事实上过滤掉较大的颗粒以促进较小的靶试剂的吸附分离。一个例子是从培养基中除去细胞以回收细胞外产物。

[0009] 此外, 还有许多要求结合而不是过滤掉非常大的生物实体的例子。例如, 从生物试剂的混合物中特异性地吸附许多病原体, 包括传染性的朊病毒蛋白、病毒、细菌和毒素是重要的。在当前使用的样品纯化和分离装置中, 这些实体通常难以进入需要结合的小孔中。

[0010] 无纺纤维或网状物, 也称熔化吹制聚合物纤维或纺丝粘合的网状物, 是众所周知的, 可以用于从空气和水溶液中过滤和分离细小的颗粒 (参见例如 U. S. 4, 011, 067 和 4, 604, 203, 在此通过参考将它们全部以整体引入本文)。在无纺网状物上负载吸着质颗粒也是本领域众所周知的 (参见例如 U. S. 4, 433, 024 ; 4, 797, 318 ; 和 4, 957, 943, 在此通过参考将它们全部以整体引入本文)。其应用包括在面部呼吸器中除去颗粒或气态污染物, 保护性的外套, 保留流体的物品, 和擦拭油污的抹布。

[0011] 近来, 报道了浸渍在无纺织物中, 用于分离和纯化的颗粒的制造方法。参见例如 U. S. 5, 328, 758, 在此通过参考将其整体引入本文。该专利教导了附着到亲和配体上的功能性颗粒。它披露了, 在熔化吹制阶段将该颗粒吹入到聚合物纤维中。该无纺织物包含孔径在 0.24 到 10 μm , 优选 0.5 到 5 μm 的孔。同时特别的是, 该浸渍的织物材料必须具有至少 2 秒的 Gurley 时间。

[0012] W093/01880 披露了一种除去白细胞的无纺织物过滤材料, 其制备方法包括, 大量的纤维直径不超过 0.01 μm 并且长度约 1 到 50 μm 的小纤维片, 与平均长度 3 到 15mm 的可

纺织和可编织的短纤维一起分散在介质中。U. S. 4, 550, 123 和 4, 342, 811 描述了一种微孔性的聚合纤维和薄膜, 其包含能吸附水蒸汽、液体和溶质的颗粒, 在此将它们全部以整体引入本文作为参考。典型的吸着颗粒包括活性炭、硅胶和分子过滤型材料。

[0013] 如所述, 本发明提供一种装置和方法, 用于样品的纯化和检测, 以及从样品中除去靶试剂, 与现有技术的装置相比, 其具有更高的效率和特异性, 并能节省大量地时间和成本。

[0014] III. 发明简述

[0015] 如本文所公开和描述, 本发明提供从样品中除去靶试剂的方法、装置和试剂盒。

[0016] 在一个方面, 本发明提供一种从样品中分离至少一种靶试剂的装置。该装置包括一种或多种孔径大于 $10\ \mu\text{m}$ 的多孔性基质, 和浸入其中的多个颗粒, 其中至少一种靶试剂附着到一种或多种多孔性基质、颗粒或两者之上, 并从样品中除去。在一个实施方案中, 多孔性基质、颗粒或两者都具有均匀或不定的孔径。在另一个实施方案中, 颗粒的孔径是约 $0.001\ \mu\text{m}$ 到 $0.1\ \mu\text{m}$ 。而在另一个实施方案中, 该颗粒包含具有互连孔的多孔性树脂, 其表面积是约 $1\text{--}2\text{m}^2/\text{g}$ 的干树脂到约 $300\text{m}^2/\text{g}$ 的干树脂。

[0017] 在另一个实施方案中, 该多孔性基质包含天然纤维、合成纤维或两者兼有。在一个优选的实施方案中, 该多孔性基质包含至少一种无纺布物。在另一个实施方案中, 该多孔性基质是两种或多种相同或不同类型的纺织和 / 或无纺布物的混合物。

[0018] 在另一个实施方案中, 权利要求 1 的装置, 其中该颗粒包含聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸树脂、改性树脂, 或其组合。

[0019] 在一个实施方案中, 该装置包含改性树脂, 一种或多种多孔性基质包含等离子处理的聚丙烯, 聚丙烯用包含配体的反应基团官能化, 该配体具有伯胺和包含聚乙二醇单元的亲水性间隔基。

[0020] 在另一个实施方案中, 该颗粒夹在一种或多种多孔性基质之间。

[0021] 在一个实施方案中, 颗粒、多孔性基质或两者都用一种或多种反应基团官能化。靶试剂通过吸附、吸收、离子交换、共价结合、疏水性、偶极、四极、氢键结合、特异性相互作用、形成带电荷物、通过与特定配体的亲和作用或其组合附着到颗粒、多孔性基质或两者上。在另一个实施方案中, 该颗粒是聚甲基丙烯酸酯或甲基丙烯酸树脂, 仅是举例, 其包括但不限于 FRACTOGEL™EMD、TOYOPEARL™ 或 TSK-GEL™ 聚合物基质。在另一个实施方案中, 该树脂是 TOYOPEARL™Amino650, 包括例如 Amino650U、Amino650M, 或部分乙酰化形式的 Amino650M 或 Amino650U。部分乙酰化的树脂包括约 5% 到约 95% 或更高乙酰化的树脂。在一个实施方案中, 部分乙酰化的树脂包括约 10% 到约 85% 乙酰化的树脂。在另一个实施方案中, 部分乙酰化的树脂包括约 20% 到约 75% 乙酰化的树脂。在另一个实施方案中, 部分乙酰化的树脂包括约 30% 到约 60% 乙酰化的树脂。在另一个实施方案中, 部分乙酰化的树脂包括约 40% 到约 60% 乙酰化的树脂。本文预计, 通过对这些范围的描述, 这些所述范围也包括在这些范围之间的所有特定整数值。例如, 在约 40 到 60% 的范围内, 预计也包括 45%, 50%, 55%, 57% 等等, 而没有实际引用每个特定范围。在另一个实施方案中, 该数脂包括湿树脂 (即完全预水合的)、干树脂 (即在与样品接触前未预水合的, 和 / 或先前是干燥的但在与样品接触前水合)。部分乙酰化的干和 / 或湿树脂的使用也包括在本发明的范围内。

[0022] 在另一方面, 该装置包含官能化的多孔性无纺或纺织基质, 其具有吸附靶试剂的

能力。在一个实施方案中,该装置包含非多孔性基质和多孔性基质,这两种基质中的一种或全部可以是官能化的。在另一个实施方案中,多孔性基质包含大于 $10\ \mu\text{m}$ 的均匀或不定的孔径。

[0023] 而在另一方面,本发明提供从样品中分离至少一种靶试剂的方法,包括:(a) 提供可能包含一种或多种靶试剂的样品;(b) 提供一种装置,包括(i) 一种或多种孔径大于 $10\ \mu\text{m}$ 的多孔性基质,和(ii) 浸入多孔性基质中的多个颗粒,其中该颗粒具有附着到至少一种靶试剂上的能力;(c) 将样品放入该装置中;(d) 将至少一种靶试剂附着到颗粒上、一种或多种多孔性基质上或附着到上述两者上;和(e) 从样品中分离至少一种靶试剂。

[0024] 在另一方面,本发明提供一种用于分离靶标、检测和样品纯化的试剂盒,包含下列的一种或多种(i) 装置,包含孔径大于 $10\ \mu\text{m}$ 的多孔性基质和浸入其中的多个颗粒,(ii) 容器,包含一种或多种缓冲液、试剂、化学试剂、官能化试剂、酶、检测剂、对照物质,(iii) 使用该试剂盒的说明书,和(iv) 包装材料。

[0025] 根据本领域已知的知识,根据本发明下文的附图和描述,和根据权利要求,本发明的其他优选实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0026] IV. 附图简述

[0027] 附图1描述了浸入树脂的无纺布物(RINs)的图示。该无纺布物的孔径是约 $12\ \mu\text{m}$,并浸入有多孔性树脂载体。平均孔径足够地大,以允许红细胞自由地流过该装置,而不会显示任何损害的迹象。颗粒(10)、纤维(20)、浸入的颗粒(11)和无纺布物(21)如图所示。

[0028] 附图2描述了包含无纺或纺织织物的正方形片的装置的图示。用亲和配体包被在无纺或纺织纤维片的交错阵列的两面。样品在这些片之间的弯曲通道中流动。根据所需的应用,调整这些片的孔径。

[0029] 附图3描述了用树脂以每线性英寸(PLI)150F和100磅碾压的样品13内/内层的扫描电子显微照片。该显微照片显示了在50X放大率下样品13的袋区域。

[0030] 附图4描述了用树脂以每线性英寸(PLI)180F和400磅碾压的样品11内/外层的扫描电子显微照片。该显微照片显示了在50X放大率下样品11的袋区域。

[0031] 附图5描述的直方图,其表示的是从不同数目的膜(多孔性基质)层收集的12个分数Micro BCA分析的结果。用通过埋入树脂的膜的一层(标记为“树脂”)或膜的一层(标记为“对照”)的溶液的流过分数的表示不同的 β -乳球蛋白浓度。

[0032] 附图6描述的直方图,其表示的是从不同数目的膜层收集的12个分数Micro BCA分析的结果。用通过埋入树脂的膜的两层(标记为“树脂”)或膜的两层(标记为“对照”)的溶液的流过分数的表示不同的 β -乳球蛋白浓度。

[0033] 附图7描述的是直方图,其表示的是从不同数目的膜层收集的12个分数Micro BCA分析的结果。用通过埋入树脂的膜的三层(标记为“树脂”)或膜的三层(标记为“对照”)的溶液的流过分数的表示不同的 β -乳球蛋白浓度。

[0034] 附图8描述的是直方图,其表示的是从不同数目的膜层收集的12个分数Micro BCA分析的结果。用通过埋入树脂的膜的四层(标记为“树脂”)或膜的四层(标记为“对照”)的溶液的流过分数的表示不同的 β -乳球蛋白浓度。

[0035] 附图9描述了在膜的卷中颗粒的分布。树脂颗粒均匀地分散在底部膜上,而没有溢出膜的边缘。

[0036] V. 发明详述

[0037] 下文将描述用于从样品中有效分离靶分子的方法、装置和试剂盒。本发明的方法、试剂盒和装置在各种应用中是有用的,尤其是包括从细胞中纯化、分离和处理表达的基因产物,生物药剂的生产和递送,和预防、诊断和 / 或检测应用。下文描述的是本发明定义的新装置,其可以从样品中分离不同的组分,并允许较大物质流过该装置,同时提供了较大的表面积来结合靶试剂。

[0038] 本发明的特定应用包括从生物样品例如,血样,包括全血、包含红细胞的组合物,红细胞浓缩物、血小板浓缩物、血浆、血浆衍生物、白细胞、白细胞贫耗的血、哺乳动物细胞培养物、发酵液和其他用于制备和递送生物药剂和制备治疗剂的其他介质中除去病原体例如朊病毒蛋白、病毒、真菌、细菌和毒素。

[0039] 1. 定义

[0040] 在本申请中使用的定义是用于解释说明的目的,而不是限制本发明的范围。

[0041] 在本文中,“改性树脂”在本发明的范围内是概括的定义,包括 具有或不具有官能团的树脂的类似物、变异体和官能化衍生物。改性包括例如化学实体(例如氨基酸)的取代、删除或加入到特定的树脂或其官能团上,或两者之上。例如,氨基取代、乙酰化和 / 或部分乙酰化的树脂包括在改性树脂的定义内。

[0042] 在本文中,“靶试剂”在本发明的范围内是概括的定义,包括通过本发明的装置俘获的化学、生物或物理试剂。特别地,靶试剂包括分子、化合物、细胞成分、细胞器、聚集物、毒素、朊病毒蛋白和微生物例如病原体包括病毒、细菌、真菌和原生动物。靶分子尤其也包括聚合物分子例如多核苷酸分子例如 DNA、RNA、DNA-RNA 杂交体、反义 RNA、cDNA、基因组 DNA、mRNA,核酶,天然、合成或重组核酸分子,寡肽,寡核苷酸,肽,肽 - 核苷酸杂交体,抗原,抗体,抗体片段,大蛋白质和聚集物例如 vWF :FVIII,和 HDL。

[0043] 在本文中,术语“病原体”是指任何在生物样品例如血样中可以发现或感染生物样品例如血样的可复制物质。这些病原体包括本领域技术人员已知的一般在全血或血液成分中发现或感染全血或血液成分的各种病毒、细菌、原生动物和寄生虫,和其他未知的病原性污染物。这些病原体的示例性例子包括但不限于,细菌,例如链球菌种、大肠杆菌种和杆菌种;病毒,例如人免疫缺陷病毒和其他逆转录病毒、疱疹病毒、副粘病毒、巨细胞病毒、肝炎病毒(包括甲型肝炎、乙型肝炎和丙型肝炎)、痘病毒和披膜病毒;和寄生虫,例如疟原虫,包括原质体种,和锥虫类寄生虫。

[0044] 在本文中,“样品”包括含有可以用本发明的装置和方法俘获的靶试剂的任何样品。样品可以来自可能包含靶试剂的任何来源。特别地,这些来源包括动物、植物、土壤、空气、水、真菌、细菌和病毒。特别地,动物样品来自例如活组织检查、血、毛发、颊拭子、血浆、血清、皮肤、腹水、多种渗出液、胸腔穿刺液、脊髓液、淋巴液、骨髓、呼吸器官的液体、肠液、生殖器的液体、粪便、尿、痰、泪、唾液、肿瘤、器官、组织、体外细胞培养成分样品、胎儿细胞、胎盘细胞或羊水细胞和 / 或液体。

[0045] 在本文中,“细胞培养基”包括任何的原核或真核培养基,例如,细菌、酵母和其他微生物细胞培养基,哺乳动物细胞培养基,植物细胞培养物,和昆虫培养物、发酵液和用于生产和递送生物药剂和制备治疗剂的其他培养基。

[0046] 在本文中,“血样”包括但不限于例如全血、包含红细胞的组合物(例如红细胞浓缩

物和血小板浓缩物)、白细胞和白细胞贫耗的血、血蛋白例如凝血因子、酶、白蛋白、纤溶酶原和免疫球蛋白;在其他血液样品中还包括液体血液成分,例如血浆、血浆衍生物和包含血浆的组合物。

[0047] 在本文中,术语“包含红细胞的组合物”是指全血、红细胞浓缩物和任何其他的包含红细胞的组合物。除了红细胞,该组合也可以包含生理相容的溶液,例如 ARC-8、Nutricell(AS-3)、ADSOL(AS-1)、Optisol(AS-5)或 RAS-2(Erythrosol)和一种或多种血细胞成分、一种或多种血液蛋白或一种或多种血细胞成分和/或一种或多种血液蛋白的混合物。这些组合物也可以包含液体血成分,例如血浆。

[0048] 在本文中,“颗粒”是指有机或无机多孔性或非多孔性的形式,其直径为约 1 到约 200 μm 或更大,特别是,其包括,例如但不限于,长度与直径比为约 1 μm 到约 20 μm 或更大的纤维,除了吸着质颗粒例如颗粒、小珠、树脂或粉末之外。

[0049] 在本文中,“吸着剂”、“吸着质”或“吸着”是指能够吸附并通过吸附或吸收保持。

[0050] 在本文中,“附着”在本发明的范围内是概括的定义,特别地,包括在两个实体之间任何类型的物理、化学或生物结合过程,包括,但不限于例如吸附、吸收、共价结合、离子交换、疏水性、氢键结合、偶极、四极或亲和作用、形成带电荷物、亲和配体(例如,包括肽、寡核苷酸、蛋白质、间隔臂、疏水性部分、氟化物)的附着。

[0051] 在本文中,“掺料溶液”涉及一种溶液,其已经接受了一定量的纯净、部分纯化或粗制形式的靶蛋白、毒素、病毒、细菌或其他有机体。

[0052] 2. 多孔性基质

[0053] 本发明的装置包含颗粒浸入其中的多孔性基质。在本发明的范围内多孔性基质的选择可以有很大改变。有用的基质包括纺织或无纺布物(例如纤维网状物)、微孔性纤维和微孔性膜。这些纤维是用本领域已知的任何材料和任何方法来制备的,包括熔化吹制、纺丝粘合和电纺织。

[0054] 纤维网状物是特别理想的,因为这些网状物提供了较大的表面积,而由于易于制造、材料成本较低和允许改变纤维织构和纤维密度,无纺布物网状物是优选的。在制备本发明的装置中使用的纤维直径范围可以是较大的,例如 0.05 到 50 μm 。改变基质厚度以适应装置的所需的应用,例如约 0.1 μm 到约 100cm 厚或更大。根据实现所需的吸附能力的需要,该基质可以以单片或叠加的形式使用。在一个实施方案中,需要碾压或加压多孔性基质,以达到所需的厚度和孔径。本发明装置的多孔性基质是由广泛的天然和合成纤维制成的,这根据最终应用的多孔性基质的精确的物理和化学性质来定。特别地,本发明的多孔性基质选自天然或合成来源,包括例如,聚酯、聚丙烯、人造丝、aramid 和/或棉花。

[0055] 同时,在本发明的范围内包括使用两种或多种不同的基质,其具有不同的化学或物理性质。在本发明的一个实施方案中,该多孔性基质是两种或多种相同或不同类型的纺织和/或无纺布物。在另一个实施方案中,使用不同孔径的两种或多种多孔性基质的杂交体,一种基质具有较小的孔径,用于俘获较小的物质,而另一种基质具有较大的孔径,用作较大物质(例如白细胞)的过滤器。在一个实施方案中,用于亲和分离的具有预定孔径的官能化的多孔性基质,被置于另一个膜内作为载体。

[0056] 2.1. 无纺布物

[0057] 无纺布物是任意的纤维网状物,用机械、湿或空气铺设法形成,其具有贯穿横切

面的互连的开放区域。无纺布物通常是平坦、多孔的片,其直接由分离的纤维或熔化的塑料或塑料薄膜制成。这些织物广泛地定义为片状或网状结构,其用各种技术例如粘着结合、通过针刺或液体喷射的机械集中连锁、缠绕、热结合和缝合,通过例如缠绕纤维或丝或穿孔性薄膜机械地、热地或化学地结合在一起。

[0058] 典型地,无纺布物具有的平均孔流 (MPF) 直径范围是约 1 到约 500 μm 。在一个实施方案中,多孔性基质的孔径是至少 10 μm 。在一个优选的实施方案中,多孔性基质的孔径大于 10 μm 。在另一个实施方案中,多孔性基质的孔径大于 15 μm 。这里打算引述这些特定数值,这些值也包括所述值之间的所有特定整数值。例如,大于 10 μm 也意欲包括 12, 20, 30, 45, 70, 100, 200, 300, 400 和 500 μm 等等,而没有实际引述的每个特定范围。

[0059] 可以选择织物的平均孔直径,以对应于在生物混合物中较大聚集物流动所需的孔直径。例如,当是红细胞时,孔流直径应当在约 12 μm 左右。在这种情况下,当任何直径大于 12 μm 的有孔或无孔颗粒俘获到纤维之间的空间中时,颗粒仍然可以用于吸附靶物质。因此,直径显著较小的颗粒可以用于吸附,同时允许较大物质流过孔的空间。

[0060] 无纺布物是用纤维制成的,根据制造方法其直径范围是例如从约 0.01 到约 10 μm 。纤维包括广泛种类的材料,所述材料包括天然纤维和合成纤维。特别地,天然纤维包括,例如纤维素、棉花和羊毛。合成纤维包括普通的聚合物例如聚丙烯和聚酯 (PET, 聚对苯二甲酸乙酯)。适当的聚合物包括聚烯烃例如聚乙烯和聚丙烯、聚氯乙烯、聚酰胺例如各种尼龙、聚苯乙烯、聚芳基砜、聚乙烯醇、聚丁烯、乙酸乙基乙烯酯、聚丙烯酸酯例如聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、纤维素例如醋酸丁酸纤维素、聚酯例如聚(对苯二酸乙酯)、聚酰亚胺和聚氨基甲酸酯例如聚醚聚氨基甲酸酯、及其组合。

[0061] 无纺布物也可以是由共挤出的聚合物例如聚酯和聚烯烃制成的。上述聚合物单体的共聚物也包括在本发明的范围内。另外,无纺布物是组合的网状物,其是精细纤维和卷曲的定长纤维的充分混合物。在一个实施方案中,本发明的装置的无纺布物也包括层压在织物的一面或两面的渗透性载体织物,如 U. S. 4, 433, 024 (在此通过参考将其整体引入本文) 所述,或者还包含增强纤维。

[0062] 无纺布物可以用不同的方法制成,包括熔化吹制和纺丝粘合。有数种机械途径来把无纺布物结合在一起,例如膜是用超声切割器 / 密封器来焊接到一起或通过同时应用热和压力压在一起。干燥铺设的无纺布物包含多层的纤维,每一层包含任意铺设或平行的纤维。使用粘合剂或热结合对于干燥铺设的无纺布物是必需的。湿法铺设的无纺布物是纸样的无纺布物,包含层状纤维的任意阵列,其分层是由纤维从水浆体中沉积而导致的。针穿孔的无纺布物的特征是组成它的纤维的缠绕情况,该缠绕是在纤维网状物上应用热、潮湿和搅动而导致的。纺织交织 (Spunlaced) 的无纺布物含有通过高速水喷射的作用 (该方法也称作水缠绕 (hydroentanglement)) 缠绕的纤维。

[0063] 3. 颗粒

[0064] 在一个方面,本发明的装置包括颗粒和多孔性基质。颗粒具有粘着到靶试剂上的能力。该颗粒是多孔的、非多孔的或两者兼是。在一个实施方案中,多孔性颗粒是吸着颗粒,能够吸附或吸收靶试剂。该颗粒是由一种材料或两种或多种材料的组合制成的,其中该材料在有机液或水液中是非溶胀的或溶胀的,其在水中或液体中是基本上不溶的。我们发现,在一些情况中使用具有两种或多种粒径范围较宽的颗粒是有利的。

[0065] 颗粒的粒径和形状可以在本发明的范围内广泛地不同,其在某种程度上取决于这些颗粒掺入其中的多孔性基质载体的类型。例如,颗粒是球形、规则形状或非规则形状或其组合。

[0066] 在本发明的装置中使用的颗粒具有为约 $1-2\ \mu\text{m}$ 到约 $200-300\ \mu\text{m}$ 的表观尺寸。一般地,有用的粒径的差异通过颗粒所掺入的多孔性基质的类型、用于形成多孔性基质的方法和设备及所形成的基质的孔隙率来规定。例如,无纺纤维网状物和含原纤维的聚合物基质可以制造或具有颗粒的全部粒径范围。优选地,约 $40-200\ \mu\text{m}$ 大小的颗粒用于无纺布,而 $1-100\ \mu\text{m}$ 大小的颗粒优选用于含原纤维的聚四氟乙烯 (PTFE) 基质。

[0067] 在本发明的范围内也包括孔径范围广泛的颗粒。孔径相对较大的颗粒用于有效地俘获较大的靶分子,例如蛋白质,而孔径相对较小的颗粒用于有效地俘获较小的靶分子。可用孔径的范围是例如,约 $0.001\ \mu\text{m}$ 到约 $0.1\ \mu\text{m}$ 。在一个实施方案中,孔径是约 $0.1-0.55\ \mu\text{m}$ 。在另一个实施方案中,孔径是约 $0.6-2\ \mu\text{m}$ 。在另一个实施方案中,孔径是约 $0.25-5\ \mu\text{m}$ 或更大。这里意欲通过对这些特定范围的描述,所述范围也包括在所述范围之间的所有特定整数值。例如,在约 $0.1-0.55\ \mu\text{m}$ 的范围内,它也打算包括 $0.2, 0.3, 0.4, 0.5\ \mu\text{m}$ 等,而没能实际引述每个特定范围。

[0068] 颗粒是由可以是聚合物或共聚物的碳或有机化合物构成的。例如,特别地,颗粒是由下列物质构成的:苯乙烯和二乙烯基苯和其衍生物的共聚物,聚甲基丙烯酸酯,衍生的二氢噁唑酮聚合物或共聚物,有机物包被的无机氧化物颗粒例如二氧化硅、铝、氧化铝、钛、氧化钛、锆,和其他陶瓷类物质、玻璃、纤维素、琼脂糖和种类广泛的不同聚合物,包括聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸树脂和用于电泳的其他类型的凝胶。

[0069] 适合本发明目的的其他颗粒包括任何可以用不溶性、水溶胀性或非水溶胀性吸着物质包被在其外和/或内表面上的颗粒。在一个实施方案中,颗粒溶胀到与其原先干重相比约 2-5 倍或更大的体积。

[0070] 包衣的功能是提供特定的功能和物理性质,所述功能和物理性质可以根据预期的特定分离测定来调整。这些功能包括吸附、离子交换、螯合作用、立体排阻、手性、亲和等等。优选用于包衣的颗粒材料包括无机氧化物颗粒,最优选二氧化硅颗粒。该具有包衣表面的颗粒是本领域众所周知的,参见例如 Snyder 和 Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2d Ed., John Wiley&Sons, Inc. (1979) 和 H. Figge 等人, Journal of Chromatography 351 (1986) 393-408, 包括改性二氧化硅颗粒,二氧化硅颗粒具有共价结合的有机基团包括氰基、环己基、 C_8 (辛基) 和 C_{18} (十八烷基)。该包衣可以通过聚合物的原位交联而机械地应用,或者可以是共价结合到颗粒表面的官能团。

[0071] 在本发明的范围内,掺入到多孔性基质中的颗粒的量可以广泛地不同。一般地,颗粒量的范围是该装置体积的约 1 到约 99%。优选地,该量大于 20% 体积,更优选大于 50% 体积。因此本发明的装置可以包含高达 95% 重量或更多的颗粒,因此为靶向附着提供了可能很高的容量。本发明的颗粒一般可以承受较宽范围的 pH 值,例如 pH 值约 4 或更低,到 pH 值约 12 或更高。

[0072] 本发明的颗粒是多用途的,可以用于进行各种的色谱或非色谱分离测定。在本发明的范围内关注的分离方法的例子在从样品的其他组分分离、测定或收集化学或生物靶试剂的其他方法中包括反相分离、亲和分离、膨胀床分离、离子交换色谱、凝胶过滤、色谱成份

分离、固相提取。该颗粒也可以用于结合,因此可以从样品中分离核酸分子和 / 或多肽靶试剂。

[0073] 本发明装置的优选颗粒是多孔性树脂。用于吸附分离的多孔性树脂在很多不同种类的材料,包括二氧化硅、玻璃、纤维、琼脂糖,和很多不同种类的聚合物,包括聚苯乙烯聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酰胺、琼脂糖、水凝胶、丙烯酸树脂和用于电泳的其他类型的凝胶中是有效的。很多多孔性吸附树脂例如二氧化硅、玻璃和聚合物可以是干燥的并具有互连的孔,其表面积在约 $1\text{--}2\text{m}^2/\text{g}$ 的干树脂到约 $300\text{m}^2/\text{g}$ 的干树脂。其他类型的树脂是交联的凝胶,其不能在不损坏结构的条件下干燥。这些类型的树脂通常不具有特定的表面积,因为这些物质能均匀地分散穿过交联的基质。

[0074] 在本发明的范围内也包括使用改性树脂,包括天然或改性树脂,或其官能团的类似物、变异体和官能化衍生物。改性包括例如化学实体(例如氨基酸)的取代、删除或加入到特定的树脂或其官能团上,或两者之上。例如,氨基取代、乙酰化和 / 或部分乙酰化的树脂包括在改性树脂的定义内。对树脂的官能团的任何修饰也包括在根据本发明的改性树脂的范围内。

[0075] 在本发明的范围内有用的其他类型的天然或改性树脂包括但不限于,苯基琼脂糖、丁基琼脂糖、辛基琼脂糖、与二乙烯基苯交联的苯乙烯、hydrocell C3 苯乙烯-二乙烯基苯、hydrocell C4 苯乙烯-二乙烯基苯、hydrocell 苯基苯乙烯-二乙烯基苯、甲基 HIC 甲基丙烯酸酯、丁基 HIC 甲基丙烯酸酯、wide-pore-hi- 苯基、fractogel EMD、疏水性树脂-丙基甲基丙烯酸酯共聚物 fractogel EMD、疏水性树脂-苯基甲基丙烯酸酯共聚物辛基琼脂糖、苯基琼脂糖、Toyopearl HIC、Toyopearl amino-6505、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-6505、Toyopearl phenyl-650C (PRDT)、Toyopearl phenyl-650M 和 Toyopearl 659CU (PRDT)。所有的 Toyopearl 树脂是商业可用的,来自 Tosoh Biosep, Montgomeryville, PA。琼脂糖树脂购自 GE Healthcare, Piscataway, NJ。Fractogel 树脂购自 Merck, Darmstadt, Germany。Hydrocell 树脂购自 BioChrom Labs, Inc., Terre Haute, IN。剩余的树脂是公开销售的树脂的各种基本材料的通用名称。

[0076] 如果将多孔性树脂包装到柱中,流动的有效流体直径是由颗粒直径和床空隙分数确定的:

$$[0077] \quad D_h = \frac{d_p}{3} \frac{\epsilon}{1-\epsilon} \quad (1)$$

[0078] 其中 D_h 是在颗粒之间流动的当量流体直径, d_p 是颗粒直径, ϵ 是空隙分数。

[0079] 因此,为允许较大物质流过柱,必需使用较大颗粒,这反过来又增加了吸附到树脂中的扩散阻力。例如,如果床空隙率是约 0.4,为允许红细胞流过柱,直径大约 $65\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒是必需的,以在颗粒之间的空间中提供 $14\text{ }\mu\text{m}$ 的孔径。

[0080] 4. 浸入树脂的无纺布物 (RINs)

[0081] 可以通过各种方法来把颗粒掺入到基质中。由于无纺布物可以制备成受控的平均

孔径,因此在无纺布制成的纤维中浸入例如上述的那些多孔性树脂颗粒是可能的。

[0082] 这些浸入的无纺布物可以用各种方法来制备。例如干颗粒可以用水缠绕到两种先前生成的无纺布物之间。可替代地,在熔化吹制或纺丝粘合期间形成纤维的同时,可以引入干颗粒。也可能的是,在用湿法铺设方法沾湿的同时,可以缠绕树脂颗粒。在一个实施方案中,通过水缠绕将颗粒浸入到已经形成的纤维中,而颗粒没有熔化结合到聚合物纤维基质上。

[0083] 一个优选的制造方法是直接碾压已制备好的无纺布物,其中该无纺布物可以是熔化吹制或纺丝粘合的。在一个实施方案中,通过直接碾压以固定的质量速率递送的颗粒使颗粒均匀地铺展到该无纺布物上,从而用每单位面积给定质量的颗粒覆盖该膜。一旦颗粒铺展,第二个膜被置于第一个膜之上而制成了夹层,该组合以某一样式通过碾压滚轮,该样式能够在低温和低压下将两层膜结合到一起。表面上颗粒的密度范围是约 0.1 到约 10gm/m² 或更大。由于膜的孔径大于 10 μm,因此用于该装置的膜的孔径允许较大的实体例如,红细胞通过。在膜中颗粒附着到配体上,这可以促进颗粒结合到,例如红细胞浓缩物和血浆中的朊病毒蛋白的靶试剂上。

[0084] 对于无纺布的结合,碾压方法的操作通常要求较高的温度,但该温度要保持在颗粒的熔化温度以下,并且不能影响它们的性能。在一个实施方案中,较大或密度较高的颗粒可以通过水缠绕置于无纺膜之间。

[0085] 无纺布物的密度和重量可以采用较宽范围的值,以确保在织物上较高的颗粒密度同时保持所需的孔大小。可以把约 60% w/w 浓度的颗粒浸入到织物中。制备无纺布物的所有常用方法都可以用于该方法,包括含两种不同聚合物纤维以及含两种不同聚合物的共挤出纤维的织物。由于其柔性,湿和干树脂都可以浸入。如果必要,碎纤维可以植入该织物中,以促进颗粒的俘获,同时仍允许所需大小的流动孔。

[0086] 碎纤维通常小于 1/2 英寸长,可以通过切割缠绕在纺锤或滚轮周围的单纤维来制备。用回转叶片或其他尖切面机械地完成该切割。碎纤维可以用直径非常小(小于约 1 μm)到较大(>100 μm)的各种聚合或碳纤维来制备。在一个实施方案中,特定配体用化学方法植入或包被到纤维上,然后将该纤维切成长度约 1/2 英寸。然后碎纤维可以分布到具有适当孔径和纤维直径的单层无纺布物(聚丙烯或其他聚合物)上,以允许较大的实体例如红细胞通过该膜(孔径>10 μm)。

[0087] 碎纤维可以以规定的速率递送到膜上,以确保在纤维上均匀地分布。当碎纤维在表面上时,无纺布物的第二层可以置于碎纤维的顶部,该组合可以通过碾压机以结合两个无纺层。在一个实施方案中,用配体将多孔性基质膜或碎纤维官能化,并通过例如空气铺设技术置于另一个膜内。在另一个实施方案中,该配体附着到聚合物上,然后将聚合物挤到纤维中。可以切割该纤维制成小段,该小段可以容易地融合到两膜之间。

[0088] 5. 表面修饰

[0089] 在本发明的范围内也包括在一或多个内和/或外表面用反应性基团官能化的表面修饰的无纺或纺织物(SMNs)和表面修饰的颗粒。实现官能化,包括将一种或多种反应性基团加入到多孔性基质(例如,纺织或无纺布物)、颗粒或两者的表面上。反应性基团与靶试剂相互作用并与之结合。反应性基团和靶试剂之间的相互作用是化学、物理和/或生物性相互作用。

[0090] 在一个实施方案中,多孔性基质、颗粒或两者是用官能团表面修饰的,其中该官能团能与靶试剂形成共价化学键。在本发明的范围内有用的官能团包括但不限于,一种或多种下列基团,特别是环氧、甲酰基、2,2,2-三氟乙磺酰基、羟基琥珀酰亚胺酯。在本发明的范围内有用的官能团包括但不限于,一种或多种下列基团,磺酸、季胺、羧酸基、伯胺、氰基、环己基、辛基和十八烷基、环氧乙烷、N-羟基琥珀酰亚胺酯、磺酰酯、咪唑基氨基甲酸酯、季胺、羧酸基、染料配体、亲和配体、抗原-抗体、核酸分子,用于离子交换、螯合作用、氧化/还原反应、立体排阻反应、催化作用、疏水性反应、反相和其他在色谱分离中常用的反应的基团。

[0091] 官能团例如配体用化学方法结合到载体上,或者可以通过联结子例如抗生蛋白链菌素、 β 丙氨酸、甘氨酸、包含甘氨酸-丝氨酸的聚合物、通式 $-(CH_2)_n-$ 的短链烃、聚乙二醇、 ϵ 氨基己酸和包含 $-O(CH_2)_n$, 其中 n 是 1-30 的联结子。如果需要,配体可通过一个或数个不同的可分开的联结子,例如不耐光或对酸敏感的部分附着,以使得全部配体选择性脱离以用于分析。分离的配体可以用作,例如蛋白质和对映体分离(例如从样品中浓缩、分离、检测、表征、定量或鉴别靶物质)的亲和提纯介质,用作诊断治疗手段、化学反应的催化剂和增强子,和作为蛋白质的选择性稳定剂。

[0092] 在一个实施方案,用作为官能团的亲和配体包被无纺膜,其中亲和配体与膜表面的朊病毒蛋白具有特异性亲和力。亲和配体的例子包括,具有包含聚乙二醇单元的亲水性间隔基的伯胺。该配体可以通过化学植入或通过胶乳乳化涂膜法(浸染(padding))置于膜(例如来自 Macopharma 的等离子(plasma)处理的聚丙烯)上。

[0093] 5.1. 多孔性基质上配体的聚合作用

[0094] 在多孔性基质上的单体的聚合作用在这些基质的表面上引入了环氧基,其接着又促进了配体化学地附着到基质的表面。在一个实施方案中,单体乳液通过浸染应用于棉花、聚丙烯、聚酯和尼龙织物上。浸染是一个连续的过程,其在纺织工业中用于干燥、漂白和包被织物。浸染的其他信息可以参见 Celanese LLC 的网站: www.vectranfiber.com, 通过参考引入本文。通常包括一组挤压辊的浸染法可以用于让织物连续通过液体来用液体浸渍织物,然后使之通过滚轮以挤出过量的溶液。使用单浸(single-dip),单浸浸染技术也是可能的。Habeish 等人,IMPROVING COTTON DYEING AND OTHER PROPERTIES BY EMULSION POLYMERIZATION WITH GLYCIDYMETHACRYLATE, American Dyestuff Reporter, April, 26-34(1986), (通过参考引入本文)使用浸染技术将甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)乳液应用于棉花纤维上。在浸染后,蒸发掉过量的水,在较高温度下进行聚合反应。在纤维表面上的聚合物量的范围是约 1 到约 10% 或更多。该聚合反应也可以在具有所需孔径($>10 \mu m$)的 PET、PP 等的无纺网状物上进行。

[0095] 5.2. 织物上的胶乳包衣

[0096] 可以用水中的常规乳液聚合来合成胶乳乳液,以得到所需聚合物的小颗粒。可以用各种可溶的和自由基引发剂和非阴离子和阴离子表面活性剂来创建该乳液。在一个实施方案中,通过上述的浸染在单纤维或 PP、PET 的无纺网状物和其他聚合物上将胶乳乳液包被在多孔性基质上。该类型方法的一个例子是由 De Boos 和 Jedlinek, APPLICATION OF EPOXY FUNCTIONAL POLYACRYLATE EMULSION TO TEXTILES, J Macromol. Sci-Chem. A17(2), 311-235(1982) 提供的,将其通过参考引入本文。

[0097] 6. 使用方法

[0098] 本发明的方法、试剂盒和装置在多种应用中都是有用的,包括预防、诊断、检测、纯化、分离、处理体外表达的基因产物,以及生产和递送生物药剂。本发明适用于通常可用于平板、螺旋状缠绕或甚至空心纤维盒装置的膜操作的任何装置。根据所需的压力差和流速,可以通过任何通常的方法—从重力到泵—诱导液流通过该装置。

[0099] 本发明的纯化和提取技术与常规的纯化技术相比,其优点在于减少了纯化步骤的数目、改进了收率、提高了纯度、并克服了与传统方法有关的局限性。

[0100] 本发明的装置是高敏感的,能够从样品中分离微小量的病原体。在一个实施方案中,本发明的装置用于从全血、红细胞浓缩物、血小板浓缩物、血浆、血浆衍生物、白细胞、白细胞贫耗的血、哺乳动物细胞培养物、发酵液和其他用于生产和递送生物药剂和制备治疗剂的培养基中除去病原体,例如包括 PrP^C, PrP^{Sc}, PrP^{res} 的朊病毒蛋白、病毒、细菌和毒素。通过本发明的装置可以同时和快速地从样品中分离多种病原体,其中该样品处意在生产治疗和 / 或药物产品的血浆处理工业的任意液流中。

[0101] 特别地,通过提高效率和纯度,本发明的方法和装置优化了蛋白质纯化方法和改进了生物药剂的制备方法。生物药剂是基于蛋白质、肽或其他复合的多核苷酸或蛋白质的大分子(统称为“基因产物”)的药物。它们的制备方法包括从其宿主生物量例如血浆或其他人和非人的生物来源(例如重组或非重组细胞培养物、转基因动物的乳液或重组或非重组的植物提取物)中回收所需的基因产物。从生物量中商业可行地分离所需蛋白质的收率是富有挑战性的,因为生物量中包含不希望有的宿主蛋白质、核酸分子和其他天然产生的化学实体。

[0102] 由于蛋白质的种类、可能的污染物和杂质的不同性质、从培养基中分离的产品的量的原因,蛋白质分离和纯化方法存在着独特的挑战性。常规的纯化技术一般包括一系列的纯化步骤。随着各个步骤的增加,收率降低而制造成本增加。蛋白质分离和纯化成本典型地占到了总制造成本的 50% 以上。

[0103] 在另一个实施方案中,设计本发明的装置,以使它们能同时进行两种操作:过滤和吸附。在该实施方案中,显著降低织物的孔径以拒绝较大的颗粒物质,而同时保持孔径足够地大,以允许包含所需分子的样品通过。该技术在一个装置中同时实现了过滤和吸附步骤,然后用吸附柱色谱法替代了膜过滤。例如本发明的装置使直接从培养基中吸附细胞外分泌的所需或不需要的分子成为可能。

[0104] 在另一个实施方案中,本发明的装置可以作为在生物技术工业中用于吸附除去技术的柱的替代品。这些技术利用生物化学相互作用,例如离子交换、螯合作用、氧化 / 还原反应、立体排阻反应、催化作用、疏水性反应、反相、染料配体、亲和配体、抗原 - 抗体和其他在色谱和 / 或其他分离技术中常用的相互作用。

[0105] 7. 试剂盒

[0106] 在本发明的范围内也包括通过从样品中分离靶试剂而用于样品纯化的试剂盒。

[0107] 完整的试剂盒包含用于生物样品分离靶标和纯化的溶液和装置。例如,该试剂盒包含用于高流通量的样品纯化的 96、384 或 1536 孔板,和 / 或在本发明的装置内用于将配体附着到颗粒上的溶液,以便以平板形式定制蛋白质分离所需的实体蛋白质、抗体和溶液。

[0108] 一般地,本发明的试剂盒包含如下的一种或多种:(1) 包含上述装置的一个或多个容器;(2) 实施所述方法的说明书;(3) 一个或多个测定元件;和(4) 包装材料。包装所述

的装置,即使不是全部,其也包括许多实施本发明的分离方法必需的元件。特别地,例如,试剂盒包括包含多孔性基质和颗粒的装置,此外还包括一种或多种缓冲液、试剂、化学试剂、官能化试剂、酶、检测剂、对照物质等等。

[0109] 在一个实施方案中,该试剂盒在分离容器中还包含官能团,在测定前该官能团必须附着到颗粒和/或多孔性基质上。可替代地,该装置可以是不含官能团地提供在试剂盒中,在此情况中多孔性基质、颗粒或两者优选是预官能化的。

[0110] 本发明的装置可以是任意所需的大小和形状。优选该装置是片样的材料,其例如是盘或带的形式。可以作为试剂盒的一部分提供的其他项目包括固体表面注射器、吸量管、试管和容器。通过多孔性基质或颗粒表面上聚合物的原位交联或共价结合官能化分子可以用单层物质或增厚物质包被多孔性基质或颗粒,这就允许对色谱法的选择性和分离效率进行优化。

[0111] 通过将多孔性基质、颗粒或两者偶合到可检测剂上可以促进检测。可检测剂的例子包括但不限于,各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性物质、分散染料、金颗粒或其组合。

具体实施方案

[0112] 相关领域的普通技术人员将会理解,以普通技术人员知道的信息来看,对所述方法和应用的其他适当的变更和改变根据本发明的说明书将是显而易见的,可以在不脱离本发明或其任意实施方案的范围情况下作出。现在本发明已经作了详细的描述,通过参考下列的实施例将会更清楚地理解同样的内容,下列实施例仅仅是用于解释说明的目的,而不是打算限制本发明。

[0113] 实施例 1:表面修饰的无纺布物(SMNs)

[0114] 当吸附的靶物质较大时,表面修饰的无纺布物是特别有用的,而且它不能渗透树脂的孔。在该情况下,修饰包含无纺布物的纤维的表面,以影响靶试剂的吸附。吸附步骤包括离子交换、疏水性或亲和作用或任何其他常用的吸附方法。如果使用没有颗粒的 SMN,可以通过织物的空隙率和纤维的直径来控制每单位体积的可用于附着的物质的表面积,

$$[0115] \quad a_v = \frac{4}{d_f} (1 - \epsilon) \quad (2)$$

[0116] 其中 a_v 是固体的每单位体积的比表面积, d_f 是纤维的直径, ϵ 是空隙分数。

[0117] 由于在 100nm 到 10 μ m 范围内的纤维直径都是可用的,而且孔 隙率通常在 0.4-0.5 的范围内,因此在这些装置中可以达到非常大的表面积。例如,当纤维直径是 0.1 μ m 时,每单位体积的织物的表面积大约是

$$[0118] \quad a_v = 2 \times 10^7 \text{ m}^2/\text{m}^3 = 20 \text{ m}^2/\text{cm}^3 \quad (3)$$

[0119] 该比较十分有利于每单位体积的许多多孔性色谱固定相的表面积。但是,由于可以独立地控制织物的平均孔流直径,该孔径可以达到直径为数微米。技术例如电纺织法(electrospinning)能够制备甚至更小的直径,在每实体积上产生更大的表面积。

[0120] 促进靶试剂结合到装置上并能与装置中所用的特定多孔性基质的化学性质相适应的任意表面修饰都在本发明的范围内。特别地,表面修饰包括,例如形成带电物质,亲和配体、肽、寡核苷酸、蛋白质、间隔臂、疏水性部分、氟化物的附着。

[0121] 由于在无纺织物中纤维的表面趋向于光滑,这些表面呈现出优选的构型,以把亲和配体暴露在特别大的物质例如朊病毒蛋白、病毒或细菌下。

[0122] 实施例 2:用于除去朊病毒蛋白 (PrP) 的装置构型

[0123] 本实施例证明了设计不同的装置构型,通过允许吸附到各种几何形状的非多孔性表面上,以除去内源性可传染的海绵状脑病感染物的可能性。红细胞浓缩物的内源性感染物包括除去总浓度约 200ng/ml 的感染性的 PrP^{sc} (绵羊疯痒病形式的朊病毒蛋白) 或 PrP^{res} (抗性形式的朊病毒蛋白)。在包含 350ml 红细胞浓缩物 (rbcc) 的袋中,总共有 $7 \times 10^{-5} \text{g}$ 的 PrP。假定单层的蛋白质包被在表面上,单层密度约 2mg/m^2 ,在 rbcc 中结合所有内源性 PrP 所需的总表面积如下来评价。

$$[0124] \quad A = \frac{7 \times 10^{-5} \text{g}}{2 \times 10^{-3} \text{g/m}^2} = 3.5 \times 10^{-2} \text{m}^2 \quad (4)$$

[0125] 其中 A 是装置的总面积。

[0126] 从上述等式明显可看出,结合朊病毒蛋白所需的总表面积相对较小,调节装置的数种形状来适合于以适当的表面密度暴露亲和配体。

[0127] A. 正方形片

[0128] 一组用暴露在血中的配体包被两面的无纺织物的 N 正方形片的总表面积是,

$$[0129] \quad 2NL^2 = 3.5 \times 10^{-2} \text{m}^2 \quad (5)$$

[0130] 其中 N 是片的数目, L 是正方形片的长度 / 宽度。当是 10 片 (N = 10) 时,每片所需的宽度是,

$$[0131] \quad L = 0.042 \text{m} = 4.2 \text{cm} \quad (6)$$

[0132] 该类型的装置包括片的交错针列和在片之间的弯曲通道中流动的液体,如附图 2 所示。

[0133] B. 包衣的纤维

[0134] 在外面用亲和配体包被的一组 N 无纺纤维具有的总表面积是

$$[0135] \quad N2\pi RL = 3.5 \times 10^{-2} \text{m}^2 \quad (7)$$

$$[0136] \quad NRL = 5.57 \times 10^{-3} \text{m}^2$$

[0137] 其中 R 是纤维的半径。

[0138] 例如,半径 $5 \mu \text{m}$ 和长度 5cm 的纤维的数目是

$$[0139] \quad N = 22,280 \quad (8)$$

[0140] 这些纤维的体积是

$$[0141] \quad V_f = N\pi R^2 L = 8.74 \times 10^{-8} \text{m}^3 \times 10^6 \text{ml/m}^3 = 0.087 \text{ml}$$

[0142] 其中 V_f 是纤维的体积。

[0143] 从上述等式明显看出,纤维的体积相对较小,这主要是由于纤维的直径非常小,使得每单位体积具有非常高的表面积。为允许红细胞适当地流过该纤维垫,孔隙率应当是相当高的,例如约 50%。在这种情况下,该装置的体积大约是纤维体积的 2 倍或是 0.17ml。该体积是非常小的,再一次证明了该俘获类型的装置不需要为支持容量需求而很大。例如,2cm 半径的纤维垫仅仅只需要约 0.135mm 厚就可以达到该体积。一个或多个片的纤维可以在外面用亲和配体包被。

[0144] C. 颗粒

[0145] 较小的非多孔性颗粒也显示了每单位体积非常高的表面积。

[0146] 用在圆柱结构的情况中所用的类似的方法来计算具有上述表面积所需要的颗粒的数目和体积，

$$[0147] \quad N = \frac{3.5 \times 10^{-2} \text{ m}^2}{4\pi R^2} \quad (10)$$

$$[0148] \quad V_s = \frac{4}{3} \pi R^3 N$$

[0149] 其中 V_s 是颗粒的体积。

[0150] 假定颗粒的半径是 $10 \mu\text{m}$ ，通过等式 5 得到的颗粒的数目和体积是

$$[0151] \quad N = 2.79 \times 10^7$$

$$[0152] \quad V_s = 1.17 \times 10^{-7} \text{ m}^3 = 0.117 \text{ ml} \quad (11)$$

[0153] 该等式显示的是非常小体积的小颗粒。小颗粒可以与较大的颗粒分散，或悬浮在具有较大孔的交联凝胶（例如琼脂糖）中，以允许红细胞容易地流过该系统。

[0154] 实施例 3：在有或没有树脂条件下，通过碾压结合两层膜

[0155] 为了发展一种除去朊病毒蛋白的装置，在室温 /400PLI 和 150F/100PLI 下，以 $1\text{mg}/\text{cm}^2$ 的树脂密度成功地碾压两层的聚丙烯膜。用超声密封器密封碾压后的膜。碾压膜样品中溶血的百分比是良好的，在可接受的限度内。用碾压将 Amino650M 树脂浸入到膜的两层之间。

[0156] Toyopearl Amino650M 树脂颗粒浸入到无纺布物膜的两层之间。当前在 MacoPharma leucofilters 中使用的聚丙烯（内层）和聚酯（外层）膜是这些膜的良好候选者，因为它们已经批准可以用于处理人的血液。

[0157] 为了研究颗粒是否可以在不妨碍红细胞流过该装置的条件固定化，在有或没有颗粒的条件下碾压内和 / 或外层膜。通过在两个滚轮之间施压将膜压入片中，来完成碾压。

[0158] 材料和方法

[0159] 将一卷聚丙烯膜 (PP) 和一卷聚酯膜 (PET) 缠绕在 3- 英寸内径的塑料纺锤上。这些卷的宽度是约 0.5 米。膜是 22.5cm 宽，800m 长。将膜切成 22.5cmx22.5cm 的正方形片。干树脂以 $1\text{mg}/\text{cm}^2$ 铺展到膜的一面，然后用另一个膜覆盖。单膜样品不需要用树脂涂布。将上述样品通过两个碾压滚轮，一个是压纹滚轮，一个是平滑滚轮。可以加热这两个滚轮以提高碾压的温度。也可以控制滚轮之间的压力。通过外观检查、重量测定、通过 SEM（扫描电子显微镜术）孔径测定的横切面检查和在全血流过碾压的装置后流过的溶血试验的百分比来测试碾压样品。

[0160] 测定溶血百分比的方法

[0161] 将膜样品切成 25mm 的环，置于 Millipore Swinnex25mm 滤器夹中。一式两份地测定流过的每种样品，然后一式三份地测定在 96- 孔板上的每种样品。用 2ml 操作缓冲液（操作缓冲液是 20mM 柠檬酸盐和 140mM NaCl, pH7.0）冲洗每种样品，然后以 0.5mL/ 分钟的速度从顶部将全血用泵抽吸通过膜。每种样品收集 5ml 的流过液。在 4°C 下以 12000rpm 将流过液或未处理的血离心 10 分钟，采集上清液。将每种样品的 3 个 $100 \mu\text{l}$ 等量部分置于 96 孔板的 3 个孔中。在 415nm 处读取每个板的 UV- 吸光度。 $A_{415\text{nm}}$ 的平均值除以相同血液的 100% 溶血的值。如果其小于 1%，那么溶血的百分比就是可以接受的。

[0162] 结果

[0163] 表 1. 碾压和外观检查的情况

[0164]

碾压得到的样品:			温度 (F)		压力	
样品	膜	树脂	压纹滚轮	平滑滚轮	(PLI) *	结果
序号	碾压的	树脂	压纹滚轮	平滑滚轮	(PLI) *	结果
1	内/内层	是	冷	冷	100	具有较大面积的袋
2	内/内层	是	冷	冷	200	具有中等面积的袋
3	内/内层	是	冷	冷	300	具有较小面积的袋
4	内/内层	是	冷	冷	400	具有分离的较小面积的袋
5	内/外层	是	冷	冷	300	几乎不结合, 较大的袋
6	内/内层	是	120	120	100	具有较小面积的袋
7	内/内层	是	140	140	100	具有分离的较小面积的袋
8	内/外层	是	150	150	100	未良好结合, 较大的袋
9	内/外层	是	150	150	200	结合较弱, 一些袋
10	内/外层	是	180	180	200	结合较弱, 一些袋
11	内/外层	是	180	180	400	松散结合
12	内/外层	是	冷	冷	400	几乎不结合
13	内/内层	是	150	150	100	非常好, 几乎没有袋
14	内/内层	无	冷	冷	100	松散结合, 有袋
15	内/内层	无	冷	冷	400	紧密结合, 没有袋
16	内/内层	无	157	153	100	非常好地结合
17	内/内层	无	157	153	400	紧密结合
18	内/外层	无	157	153	400	松散结合
19	外/外层	无	180	180	400	几乎不结合, 较大的袋
20	外/外层	无	220	220	400	结合有一些袋
21	外/外层	无	220	220	600	非常好地结合
*PLI=每线性英寸的磅数						

[0165] 从外观检查中可以确定, 样品序号 4, 7 和 13 对于颗粒植入是最好的。如样品 4 和 13 所示, 当提高滚轮的温度时, 可以将较低的压力用于膜结合。外层膜是由聚酯构成的, 其比内层要厚得多和硬得多。为了用外或内层膜碾压外层, 如样品 21 所示, 需要较高的滚轮温度和压力。

[0166] 表 2. 重量测定

[0167]

碾压样品的重量		
样品	树脂	重量 (gsm)
单内层		41
单外层		67
碾压的内/内层		82
碾压的内/内层	1 mg/cm ²	92
碾压的内/外层		107
碾压的内/外层	1 mg/cm ²	117
碾压的外/外层	1 mg/cm ²	129

[0168] 对于树脂密度, 1mg/cm² 相当于 10g/m² (1mg/cm² × 10⁴cm²/m² = 10g/cm²)。单层、双层和树脂植入的双层的重量是相对成比例的。结果表明, 树脂良好地保持在两层膜之间。

[0169] 样品 11 和 13 的扫描电子显微照片 (SEM) 表明, 在碾压后大部分的树脂颗粒都是完整的, 尽管仍有一些是破裂的。用 SEM 检查样品 2 也显示了类似的结果。在碾压机的压纹滚轮上有 2mm×2mm 方形的网格状空间。在碾压期间, 当与网格接触时, 该膜受到了高度的碾压。该区域也称作结合区域。而袋区域是距离结合区域最远的区域。

[0170] 样品 11 是在一个内层和一个外层之间固定的树脂颗粒的例子。附图 3 显示的是在 50X 放大率下样品 11 的袋区域。样品 13 是在两个内层之间固定的树脂颗粒的例子。附图 4 显示的是在 50X 放大率下样品 13 的袋区域。

[0171] 孔径分布

[0172] 碾压的样品的孔径分布的结果如下表 3 所示。对于碾压的样品, 与单层相比, 最小、中等和最大的孔径降低了 30% 到 50%。为确定孔径的降低是否阻碍了红细胞通过该装置, 进行进一步的流过的全血的溶血测定。

[0173] 表 3

[0174] 碾压的样品的孔径分布:

[0175]

样品 序号	膜	树脂	滚轮温度(°F)		压力 (PLI)	孔径分布(μm)		
			压纹	平滑		最小	中等	最大
1	内/内层	是	冷	冷	100	2.28	3.62	7.71
2	内/内层	是	冷	冷	200	2.10	4.52	8.80
3	内/内层	是	冷	冷	300	1.91	3.89	7.80
4	内/内层	是	冷	冷	400	1.99	4.69	9.62
15	内/内层	无	冷	冷	400	2.06	3.90	9.26
7	内/内层	是	140	140	100	1.82	4.05	8.00
13	内/内层	是	150	150	100	1.99	4.88	8.73
16	内/内层	无	157	153	100	2.11	4.04	8.79
PP	单内层					4.15	7.03	13.91
11	内/外层	是	180	180	400	1.12	3.32	7.99
18	内/外层	无	157	153	400	1.64	3.45	8.65
21	外/外层	无	220	220	600	N/A	17.76	47.35
PET	单外层					23.61	35.81	79.04

[0176] 实施例 4 使用高颗粒密度碾压的优化

[0177] 用于该试验的碾压滚轮是由 ProMetic 从 BF Perkins 订购的。该滚轮是由不锈钢构成的,刻有蜂窝状样式的纹,并用聚四氟乙烯树脂释放包衣包被。使用的反转滚轮用橡胶包被(3/4"到1"厚)。

[0178] 用手将 4 克干树脂样品铺展成 30cmx20cm(600cm²) 的用血浆处理的聚丙烯膜的样品。其对应于 6.6mg 树脂/cm² 的颗粒密度。膜的第二样品置于树脂层的顶部,让夹层以 10m/ 分钟的速度通过碾压机,下表包含了在此测定中得到的结果。

[0179] 表 4:碾压优化结果

[0180]

试验	设定温度(°F)	测定温度(°F)	间隙(μm)	结果
1	212	198	203	当有或没有颗粒时,未结合
2	230	215	0	膜较弱地融合
3	245	236	0	比先前好,但仍然太弱
4	255	245	0	无树脂时良好结合,但有树脂时效率较低
5	260	248	0	当有或没有树脂时,结果均良好
6	275	-	0	温度太高,顶部膜没有融合到底部,但粘合到了滚轮上
7	265	-	0	当有或没有树脂时,在该温度下均获得了良好的结果

[0181] 1)0 间隙表明样式穿透了底部滚轮 1/1000 英寸。

[0182] 在显微镜下观察样品,没有显示出小孔。保存每个试验的样品(仅仅是没有树脂的)以作为将来的参照品。

[0183] 实施例 5 β-乳球蛋白的结合和浸入树脂的碾压膜的流动性质

[0184] 进行本实验来确定模型蛋白质(β-乳球蛋白)与碾压膜材料结合的穿透曲线,其中该膜材料包含密度为 4mg/cm² 的干树脂。

[0185] 以每线性英寸 170 °F 和 150 磅碾压包含密度为 4mg/cm² 的干树脂的聚丙烯膜材料。

切割该膜材料,组装到 Millipore Swinnex 过滤单元中。每个过滤单元包含一叠 1 到 4 个膜的层而且在过滤单元的出口侧有一层非碾压膜。用蠕动泵将 0.5mg/mL β -乳球蛋白的 1X PBS 溶液以 1.5mL/分钟流过该过滤单元,在 4 分钟里收集 0.5mL 的部分,用 Pierce Micro BCA 测定试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 分析它们的蛋白质浓度。

[0186] 附图 5-7 显示的是在不同数目的膜层中收集的 12 个部分的 Micro BCA 测定的结果。没有树脂的碾压膜用作对照。该试验的结果表明了植入树脂的膜和对照品在结合方面的不同。所有的运行都显示了类似的未结合浓度的初始斜面,但是,层 2-4 没有足够长地运行来显示饱和浓度。

[0187] 表 5:总结合蛋白和每重量树脂结合的蛋白质的量

[0188]

结合的总蛋白质			
mg			
膜	对照	树脂	mg 结合/g 树脂
1 层	0.805	1.095	4.5
2 层	0.792	1.493	5.4
3 层	0.731	2.085	6.9
4 层	0.776	1.859	4.2

[0189] 结合的蛋白质的量一般随着每个附加的膜层而增加,在三层膜时达到峰值,在 4 层时有非常小的降低(表 5)。由于包含 2-4 层膜的过滤器不能足够长地运行来显示饱和浓度,因此不能确定它们是否进行了结合。

[0190] 实施例 6 膜滚轮上的颗粒分布

[0191] 发展颗粒铺展单元以取代以前使用的小珠的手工分布。该设备已经经过试验和校准。

[0192] 将粉末涂抹器手动设置成 60%,其相当于 6.52 到 6.99Kg/小时(显示)的分配速率。用重量测定的分配速率是 6.65Kg/小时(三次测定的平均值),在靶值 6.96Kg/小时的 5%以内。

[0193] 分配的粉末显示了均匀的分布(外观评价),没有溢出膜的边缘。附图 9 显示了在运行该线约 1 小时后底部膜上颗粒的分布。可以注意到膜的两面由包含颗粒的区域形成的尖锐边缘。另一个显著的特征是,甚至在制备一定时间以后,在输送带上也没有粉末。

[0194] 实施例 7:朊病毒蛋白联结子

[0195] 一组用于结合朊病毒蛋白的树脂公开如下。

[0196] a) Amino650M- 与肽和其它配体偶合的基础树脂。该基础树脂经证明可以用于结合朊病毒蛋白,无论是通常的 PrPc 还是感染的 PrPsc(或 PrPres)。该树脂可以用于柱色谱形式,我们已经证明,通过体外技术(Western Blot)可以从红细胞浓缩物、血浆、全血中除去/结合 PrPsc(仓鼠、小鼠 vCJD、小鼠 Fukuoka、人 spCJD 和人 vCJD)至检测极限,仓鼠 263K 绵羊疯痒病感染性即体内模型(红细胞浓缩物)降低约 4logs。

[0197] b) Toyopearl-SYA- 该三肽经证明可以用于结合朊病毒蛋白,无论是通常的 PrPc 还是感染的 PrPsc(或 PrPres)。该树脂可以用于柱色谱形式,我们已经证明,通过体外技术

(Western Blot) 可以从红细胞浓缩物中除去 / 结合 PrP^{sc} (仓鼠、小鼠 vCJD、小鼠 Fukuoka、人 spCJD 和人 vCJD) 至检测极限, 仓鼠 263K 绵羊疯痒病感染性, 即体内模型 (红细胞浓缩物) 降低约 4logs。

[0198] c) Toyopearl-DVR- 该三肽经证明可以用于结合朊病毒蛋白, 无论是通常的 PrP^c 还是感染的 PrP^{sc} (或 PrP^{res})。该树脂可以用于柱色谱形式, 我们已经证明, 通过体外技术 (Western Blot) 可以从红细胞浓缩物中除去 / 结合 PrP^{sc} (仓鼠、小鼠 vCJD、小鼠 Fukuoka、人 spCJD 和人 vCJD) 至检测极限, 仓鼠 263K 绵羊疯痒病感染性, 即体内模型 (红细胞浓缩物) 降低约 4logs。

[0199] amino650M、SYA 和 DVR 已经以满刻度来使用, 即 1 完整单元的红细胞浓缩物流过该树脂 (约 350ml)。柱的大小是 10ml 的溶胀树脂。SYA、DVR 和氨基功能在 400 μ mol/g (干树脂)。

[0200] 实施例 8. 从 SBH 掺料的缓冲液、过滤的血浆和全血中的 PrP^{sc} 结合 Amino650M 和 Amino650U 的比较

[0201] Amino650U 是不同大小的小珠的混合物, 其包括 Amino650M, 它比制造 650M 更为便宜。测定 Amino650U 的内源性 PrP 和在当前所用的所有基质、缓冲液、过滤的血浆和全血中与 PrP^{sc} 结合的能力, 并将其与掺料全血攻击的 Amino650M 的结合相比。设计该试验, 来比较掺料缓冲液、血浆和全血中 PrP^{sc} 与 Amino650U 的结合, 并确定血浆和全血中内源性 PrP^c 与 Amino650U 的结合。另外, 设计该试验, 来确定白细胞过滤在除去 PrP^c 中的作用。掺料缓冲液涉及的是在操作缓冲液中加入脑匀浆。掺料全血是在人或仓鼠全血中加入脑匀浆。

[0202] 当存在于血浆或全血中时, 通过 650U 或 650M 除去朊病毒蛋白没有发现信号的差异。因此, amino650U 和 650M 发挥了相同的作用。通过白细胞过滤除去的 PrP^c 量大于在血小板和白细胞一起中所估计的量。因此, 白细胞过滤还可能俘获一些血浆衍生的 PrP^c。这表明, 白细胞过滤器对俘获来自人或仓鼠血浆的 PrP^c 具有不同的作用。可能的是, 过滤器不会俘获仓鼠血浆的 PrP^c, 而俘获人血浆的 PrP^c。最后, 也可能的是, 两种结果之间的差异是由于 PrP^c 和感染性之间相互没有关系。

[0203] 白细胞过滤除去的 PrP^c 量大于在血小板和粒细胞共同中所测定的量。因此, 白细胞过滤还可能俘获一些血浆衍生的 PrP^c。这表明, 白细胞过滤器对俘获来自人或仓鼠血浆的 PrP^c 具有不同的作用。可能的是, 过滤器不会俘获仓鼠血浆的 PrP^c, 而俘获人血浆的 PrP^c。最后, 也可能的是, 两种结果之间的差异是由于 PrP^c 和感染性之间相互没有关系。

[0204] 实施例 9 仓鼠脑 PrP^{sc} 和 AMN 树脂的结合

[0205] 进行一系列树脂 (例如, AMN-13、14、15、16 和 17, Amino650M 和 Amino650U) 的对比结合试验。AMN 系列涉及 650U (近来称作 650C-prdt) 样品, 其具有如下的不同氨基取代水平:

[0206] AMN-13 ;0.094eq/L

[0207] AMN-14 ;0.078eq/L

[0208] AMN-15 ;0.072eq/L

[0209] AMN-16 ;0.063eq/L

[0210] AMN-17 ;0.098eq/L

[0211] 树脂在掺料缓冲液、血浆和全血中与 PrP^{sc} 结合。结果表明, 当用掺料缓冲液和掺

料全血攻击时,所有的 AMN 树脂都相同地良好结合。此外,AMN 树脂的信号与 amino650M 和 650U 相同。当比较与树脂在掺料血浆中与 PrP 的结合时,与其它所有树脂相比 Amino650M 有稍微强烈的信号。AMN 树脂中 #13 显示了较弱的 PrP 信号,但与 amino650U 非常相似,而 #15,16,17 都比 amino650U 表现的更好。在 AMN14、15、16、17 树脂之间没有观测到显著的差异。

[0212] 因此,研究表明了树脂之间更多的相似性,最重要的是它表明了与 650U 的关系比 650M 更为紧密。血浆中观测到差异表明,至少用那一攻击降低了取代的水平是有益的,树脂与 amino650M 进行的更紧密。

[0213] 实施例 10 提取与植入树脂的膜结合的蛋白质和检测正常仓鼠脑匀浆中的 PrP^c 的结合

[0214] 使用植入树脂的碾压膜的新装置的发展导致了对发展新的从树脂中提取结合蛋白的新方法的需求。对材料的处理以及提取溶液的组成、浓度和体积已经做出了一些改变。也设计该试验来用 Toyopearl Amino650M 树脂植入的膜和其完全乙酰化的形式,以新的形式进行结合评估。

[0215] 用肌氨酰处理正常的仓鼠脑匀浆 (HaBH) 并旋转。将所得到的上清液用操作缓冲液或人全血稀释成最终浓度 1%。50ml 的掺料溶液流过 47mm Swinnex 滤器夹 (Millipore), 该滤器夹包含 4 个夹层的以全容量植入了 4mg/cm² 色谱树脂的碾压膜,或者相同树脂的降低取代容量的形式作为 Toyopearl Amino650M 或其完全乙酰化形式的对照品。使用的流速是 0.5mL/ 分钟,使用蠕动泵。收集每种掺料溶液和膜类型的 5mL 的 10 组等量部分。通过 ELISA 分析用掺料缓冲液攻击的两种膜的流过样品。用操作缓冲液冲洗包含完全乙酰化树脂并用掺料全血攻击的膜。

[0216] 用 SDS-PAGE 样品缓冲液或 99% 的甲酸处理膜的部分 (在某些情况下是整叠)。用甲酸处理包括向 1/4 的膜夹层中加入 0.5mL99% 甲酸和 10L20% SDS,然后培养 1 小时除去液体,并用 SpeedVac 蒸发。用水将样品的体积调节到 15L,然后加入 15 μ L 的 2X 样品缓冲液。用样品缓冲液处理包括向膜的整叠中加入 3mL1X 的样品缓冲液,然后培养 30 分钟,并煮 7 分钟。在不压紧膜的情况下收集溶液,简单离心除去所有树脂。也可以试验上述处理的变体。包括向对应于 1/4 过滤器的膜的两个独立叠层中加入 1mL2X 样品缓冲液,培养一小时,然后仅煮沸它们中的一个。当使用感染性时,如果拆卸滤器夹变得太危险,可以不煮沸而用样品缓冲液洗脱。

[0217] 试验的最终情况是在样品缓冲液中培养膜的部分 (1/4),以验证结合到第一、第二、第三和第四个膜以与攻击溶液接触。然后在 SDS-PAGE 凝胶中运行该样品,并将总蛋白质染色。也可以进行蛋白质印迹法。滤器夹的空体积是约 7mL。在 50mL 的攻击溶液通过每个过滤器后,之后是空气,对于全血,回收的体积是 45 和 47mL。当使用掺料缓冲液时,回收的体积是 46 和 46mL。当使用不同的攻击溶液时,没有观察到显著的差异。

[0218] 待打开的第一滤器夹是包含完全乙酰化 Toyopearl 膜的那一种,其中用掺料全血来攻击该 Toyopearl。我们注意到,尽管通过了空气并用缓冲液洗涤,但在过滤器内仍然有一些血。在试图用缓冲液冲洗膜的期间,树脂没有显著的损失,并弃去该膜。

[0219] 用另外的 200mL 缓冲液冲洗具有用全血攻击的 Toyopearl amino650M 的滤器夹。流速高于最大值 (在刻度盘中是 999)。当打开该夹时,我们注意到,在里面,尤其是在层之

间仍然有一些血。我们也注意到,在洗涤期间,被径向分布器限定的几个部分被绕过。

[0220] 这一叠膜被切成 4 个等分,并些片中的其中之一具有分离的四个层,并用样品缓冲液处理来研究是否不同层有不同的结合。另一个等分也分成片,并用甲酸处理。剩余的两个等分用于比较在加热和不加热的条件下的处理。

[0221] 用 200mL 的操作缓冲液分别冲洗用掺料缓冲液攻击的两个过滤器。打开该过滤器,将整叠转移到小玻璃瓶中,向玻璃瓶中加入 3mL 的样品缓冲液。

[0222] 植入到碾压膜中的树脂在树脂为柱形式的特征中维持了相同的结合 PrP 的性质。与氨基信号相比,完全乙酰化的氨基显示了较弱的与膜结合的 PrP 信号,这就支持了下列的结论:完全乙酰化的氨基不能与 PrP 有效地结合。总之,结果表明,无论是混合物形式还是化学合成,50% 的乙酰化降低了 PrP^{res} 的结合。

[0223] 实施例 11 将正常仓鼠脑匀浆中的 PrP^c 结合到包含浸入颗粒的膜的过滤器上

[0224] 下列试验证明了包含树脂颗粒的膜结合正常仓鼠脑匀浆 (NBH) 中的正常 PrP (PrP^c)。

[0225] 将前述实施例描述的洗脱方法应用于这些样品。打开过滤器,将膜置于玻璃瓶中,与 2ml 的 NuPage 样品缓冲液 (Invitrogencorporation, Carlsbad, CA.) 混合培养。然后加热该玻璃瓶,收集从过滤器中出来的树脂。洗脱蛋白质的蛋白质印迹法结果表明,该方法从膜中洗脱出了 PrP。该结果也表明,含有树脂的过滤器比不含树脂的过滤器结合的 PrP 更多。

[0226] 实施例 12 将绵羊疯痒病脑匀浆中的 PrP^c 结合到包含浸入颗粒的膜的过滤器上

[0227] 本试验表明了与加入到全血和缓冲液中的感染性仓鼠脑匀浆 (SBH) 中的 PrP^{sc} 结合的过滤器的性能。该过滤器包含浸入了全容量树脂、降低容量的树脂,和没有树脂作为对照的膜。

[0228] 用注射 2ml 的 NuPage 样品缓冲液来完成洗脱 (根据实施例 10 的提取)。洗脱蛋白质的蛋白质印迹法表明,没有 PK (蛋白激酶) 时信号强烈,但有 PK 时信号较弱。由于用 2% SDS 洗脱该蛋白质,因此在 2% 的洗涤剂浓度下,而不是使用 2% SDS (标准方法) 进行 PK 的消化。可能的是,有 PK 时 PrP^{res} 较弱的信号是由于在反应混合物中有过量的 SDS。该结果表明,当膜不含树脂时信号较弱,但所有其他的受试树脂都具有类似的信号强度。在全容量树脂和没有树脂时,在缓冲液和在全血中的 SBH 之间没有观测到显著的差异。与掺料的血相比,掺料的缓冲液中降低容量的树脂显示了更强的信号。

[0229] 实施例 13 测定模型过滤器

[0230] 在本实施例中,将过滤器装配到塑料套管中,并以与最终装置类似的构型焊接到一起。用各种攻击物、掺料和非掺料物来评价这些装置的性能。在一个实施方案中,该最终装置包括硬的或柔软的塑料套管,该塑料套管包含多层的非碾压膜 (1 到约 25 或更多),然后是数层 (根据装置所需的容量,在 1 到约 50 之间) 的植入树脂的膜,和在 1 到约 25 层的非碾压膜。用超声切割器 / 密封器或通过使用压力来同时应用热和压力来把过滤器焊接到一起。在本实施例中,使用热和压力。

[0231] 用 0.5% 肌氨酰处理仓鼠脑匀浆,并在缓冲液、过滤血浆和全血中 100 倍稀释,并用作树脂的攻击物。用蠕动泵以 0.5ml / 分钟用 80ml 样品攻击树脂。在没有 PK 消化作用下,进行结合树脂的 PrP^{res} 样品的蛋白质印迹法。该结果表明该膜对缓冲液和血浆中的掺

料性能良好。但是对血液中相同的掺料减少。

[0232] 实施例 14 通过系列的过滤器装置从掺料的 RBCC 中除去 PrP

[0233] 本实验表示的是用包含浸入颗粒的装置的装置从掺料红细胞浓缩物 (RBCC) 中除去 PrP。由于用过量的靶蛋白来攻击该装置,因此要使用系列的装置。所使用的 RBCC 总体积等于一个单元。

[0234] 所有的过滤都可以进行而没有明显的问题,所有过滤都使用了泵。所有的过滤器具有软的套管,并预试验其渗漏。在预试验或在实际实验中所有的过滤器都不渗漏。每一个单元的 RBCC (~ 300ml) 的过滤时间是约 10 分钟。用约 460ml 的操作缓冲液 (柠檬酸盐) 来洗涤过滤器。可以通过在洗涤后检查过滤器的颜色来根据经验评价洗涤步骤的效率。

[0235] 在洗涤后,用空气注射该过滤器,以除去过滤器中的所有液体。用 ~ 4.6ml 的样品缓冲液处理该过滤器来洗脱 (在过滤器的一面注射)。收集样品缓冲液并在过滤器的另一面注射。将该步骤进行三次。结果表明 PrP^{res} 从过滤器 1 中逃脱,并被过滤器 2 俘获,这正是所希望的,因为所应用的攻击物高于一个过滤器组合的容量。PrP^{res} 也可以存在于过滤器 3 的洗脱液中,但是低于蛋白质印迹法的检测极限。该结果与在第一 PRDT 感染性研究中的 RBCC 的结果的比较表明,过滤器与在柱形式中所使用的树脂作用相等。根据前述的研究,较大过量的 PrP^{res} 通过了过滤器,并不令人惊讶地,在第一过滤器中并不是所有的 PrP^{res} 都被俘获。

[0236] 实施例 15 在聚丙烯、聚乙烯、对苯二酸酯、棉花和尼龙底物上植入甲基丙烯酸缩水甘油酯

[0237] 植入是一种有效的改变聚合物表面性质的方法。定制的含有特定配体和良好机械性质的底物的植入聚合物使得植入成为蛋白质结合的最多能的方法,其应用经常需要配体的改变和足够的机械强度。在本实施例中,在聚丙烯 (PP)、聚乙烯、对苯二酸酯 (PET)、棉花和尼龙底物上进行甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 的植入,以表明应用该途径从人血中除去 PrP^c 的可能性。

[0238] 步骤:

[0239] 用于该测定的底物包括棉花纺织物、尼龙纺织物、PP 无纺物、PP 无纺膜 (MacopharmaPP175)、PP 纤维和来自 NCSU 的纺织学院的 PET 纤维。

[0240] 通过下列步骤来进行植入:

[0241] 1. 用丙酮将样品洗涤 3 次;

[0242] 2. 将样品在真空干燥箱中干燥超过 3 小时;

[0243] 3. 在 750W 用氩等离子 (plasma) 处理样品 15 秒

[0244] 4. 将样品暴露在空气中 30 分钟;

[0245] 5. 然后将样品浸入到 UV 室的 10% GMA 溶液中 6 小时。UV 强度是 1.1W/m²。室的温度是 30℃,样品架的温度高于 60℃;

[0246] 6. 在 UV 聚合作用后,然后用丙酮将样品洗涤 3 次;

[0247] 7. 在真空干燥箱中干燥样品。

[0248] 在该阶段中,仅仅分析样品的重量增加和 IR 谱。在分析后,60℃下植入的 PP 无纺物和 PP 无纺膜在氨水溶液中进一步胺化过夜。然后洗涤这些样品,并干燥用于元素分析。

[0249] 结果:

[0250] 从重量测定和 IR 谱的结果可以看出,与其他底物、棉花、尼龙和 PET 相比,PP 底物显示了显著更好的植入结果。测定了这三种类型的 PP 底物,PP 纤维、PP 无纺布物和 PP 无纺膜 (Macopharma)。在植入后重量的增加分别是 85%、154%和 57% (表 6)。这些值比其他底物的值 (-3%到 4%) 要高得多。这些结果通过 IR 谱得到进一步证实,其中植入的 PP 系统在 1720cm^{-1} 显示的强峰与羰基相关,在 845 和 910cm^{-1} 与环氧化物相关,这是 GMA 的信号。当将空白样品和植入后样品比较时,其他底物没有显示很多的改变。

[0251] 在各种底物上植入差异的原因仍然不清楚。一个可能的理由是 C-H 键在 PP 环境中比在其他环境中更易于断裂。另一个可能的理由是尼龙和棉花织物样品可能有我们未知的表面处理。用丙酮简单的洗涤对于除去抛光是足够的。

[0252] 还有趣的是,我们注意到原 PP 纤维和无纺膜 (Macopharma PP175) 样品在 840 到 920cm^{-1} 范围内显示了峰。但是,PP 无纺布物没有显示这样的峰。前者的峰是样品表面氧化作用的结果,该样品表面在高温下进行了处理。

[0253] 在 IR 谱中,胺化的 Macopharma 样品在 3400cm^{-1} 显示了较宽的峰,这是由胺化产生的 -OH 和 -NH₂ 基团产生的。

[0254] 确定无纺材料的表面积

[0255] 由于形成无纺物的纤维的复杂连锁,确定无纺材料的表面积并不是容易的工作。但是,可以通过测定纤维的显微镜像和长度来精确地确定单纤维的表面积。因此,如果纤维的表面性质与无纺材料的表面性质相同,那么测定通过植入法植入的相同材料的纤维来测定无纺材料的表面积在理论上是可能的。可以通过下列等式来表达该方法:

$$[0256] \quad W_t = D(S_f + S_{NW})$$

[0257] 其中 W_t 是植入的重量增加, S_f 是纤维的表面积, S_{NW} 是无纺材料的表面积。在该等式中仅有两项是未知的: D 和 S_{NW} ,它们可以通过两个独立的实验来确定。

[0258] 通过该方法确定的面积是相应于每种类型反应的有效表面积。实际上,反应的程度取决于底物表面积的任何反应都可以使用该方法。

[0259] 结论:

[0260] 在数种聚合物底物上植入 GMA 的主要试验表明,PP 是这些植入的理想底物。根据 PP 材料的形状,在 PP 上植入 GMA 的重量增加是从 60%到 160%不等。植入的效果也可以通过 FTIR 谱得到证实。此外,基于植入,可以使用简单的方法来测定无纺材料的表面积 (表 6)。

[0261] 表 6 以重量增加测定的植入的效果

[0262]

样品名称	底物	UV 时间 (小时)	初始重量 (g)	重量的增加 (%)
Co-g-GMA-032905	棉花纺织物	0.6	0.1283	-1.8
Ny-g-GMA-032905	尼龙纺织物	0.6	0.1323	-0.7
PP-g-GMA-032905	PP 无纺布物	0.6	0.1179	1.7
Co-g-GMA-033105	棉花纺织物	6	0.0954	-2.8
Ny-g-GMA-033105	尼龙纺织物	6	0.1446	-1.4
PP-g-GMA-033105	PP 无纺布物	6	0.0537	91
Mac-PP-g-GMA-040805	Macopharma PP 无纺膜	6	0.0668	57
NW-PP-g-GMA-040805	PP 无纺布物	6	0.0738	154
FB-PP-g-GMA-040805	PP 纤维	6	0.0789	85
FB-PP-g-GMA-040805	PET 纤维	6	0.0517	4

[0263] 实施例 16 通过 PGMA 纤维、电纺织的网状物、PGMA 植入片和浸染的 PP 底物的 PrP^c 的结合

[0264] 目的：

[0265] 确定通过 PGMA 纤维、电纺织的网状物、PGMA 植入片和浸染的聚丙烯无纺布的 PrP^c 的结合。

[0266] 步骤：

[0267] 测定的材料是聚甲基丙烯酸缩水甘油酯 (PGMA) 熔化纺织纤维、PGMA 电纺织网状物、PGMA 植入片和浸染的聚丙烯 (GMA-g-PP) 无纺布织物。底物是来自北卡罗来纳州大学的纺织学院的样品, MacoPharmaPP175 和 Macopharma PP235。对于每种材料, 都制备两份复制品用于蛋白质结合。

[0268] 根据重量和表观面积 (织物的测定面积) 来制备样品。第二种方法仅应用于具有规则形状样品, 例如浸染的 Maco Pharma 膜。

[0269] 将所有样品都切成小片。然后将每个样品都浸入到包含 5ml 1% 正常仓鼠脑匀浆 (HaBH) 溶液的圆锥管 (50ml) 中。然后在摇动的平板上将样品培养 30 分钟。此后, 在摇动的平板上用 10ml 样品缓冲液洗涤样品 3 次, 每次 10 分钟。

[0270] 结果：

[0271] 通过元素分析确定的样品重量、面积和胺化水平如下表 7 所示。

[0272] 表 7 样品的元素分析

[0273]

名称	重量 (g)	N%
PGMA-纤维 A	0.1009	3.8%
PGMA-纤维 B	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-p-PP1A	0.1015	无效
PGMA-p-PP1B	0.1007	无效
PGMA-p-PP2A	0.1007	无效
PGMA-p-PP2B	0.1012	无效
PGMA-p-PP3A	0.1012	无效
PGMA-p-PP3B	0.1007	无效
空白-无纺-PPA	0.1009	无
空白-无纺-PPB	0.1011	无
空白-Macro175A	0.1011	无
空白-Macro175B	0.1006	无
650MA	0.1016	0.6%
650MB	0.1011	0.6%
电纺织 A	0.1001	无效
电纺织 B	0.1005	无效
	面积 (cm ²)	
PGMA-p-PP (Maco235) 6A	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 6B	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 7A	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 7B	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 9A	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 9B	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 10A	4x4	无效
PGMA-p-PP (Maco235) 10B	4x4	无效

空白-Macro235A	4x4	无效
空白-Macro235B	4x4	无效

[0274] 根据蛋白质印迹法的结果,植入 PGMA 的 PP 和浸染 PGMA 的 PP 都与朊病毒蛋白结合。

[0275] 等效手段

[0276] 在本文中进行了适当的解释说明的本发明可以在缺少本文没有明确公开的任何一个或多个组件,一种或多种限制的情况下实施。所使用的术语和表达形式是作为说明的术语,而不是进行限制,而且也不打算使用这些术语和表达形式以外的任何等效的特征或其一部分来显示和描述,但是应当意识到,各种可能的变更都在本发明所要求的范围内。因此,应当理解,尽管本发明已经在本文中具体地公开,但本领域技术人员也可以借助本文所公开的任意特征、变更和概念的变体,应当认为这些变更和变体也在本发明附属的权利要求所定义的本发明的范围内。

[0277] 本文所讨论的所有文献都通过参考引入。本领域的技术人员很容易即可意识到,可以很好地使本发明适应于完成目的,并获得所述的结果和优点,以及其固有的性质。本发明可以以其他特定的形式体现,而不脱离其精神和基本属性。相反地,可以清楚地理解,在阅读本说明书后,其实施手段可以有各种的实施方案,变更和等效手段,这就向本领域的技术人员暗示了它们本身,而不脱离本发明的精神和 / 或附属权利要求的范围。

[0001]

序列表

SEQ ID NO: 1

氨基酸

LAFGAA -

SEQ ID NO: 2

氨基酸

YRVTWG

SEQ ID NO: 3

氨基酸

FLQGQ

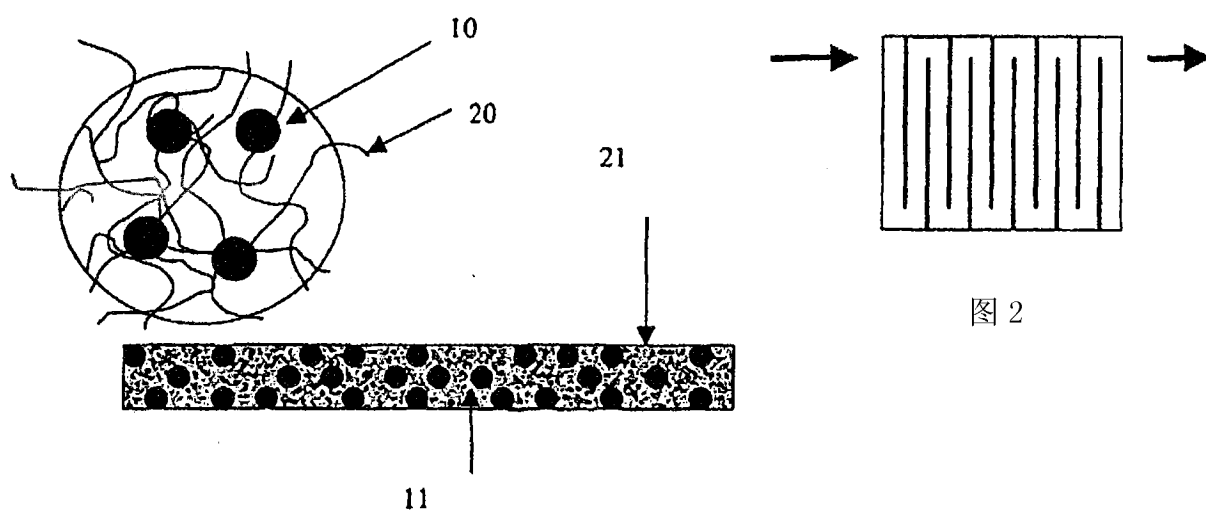


图 2

图 1

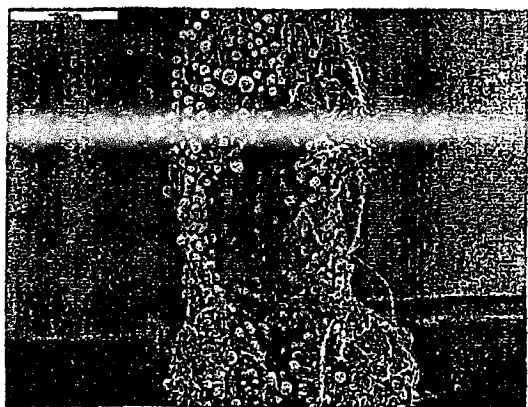


图 3

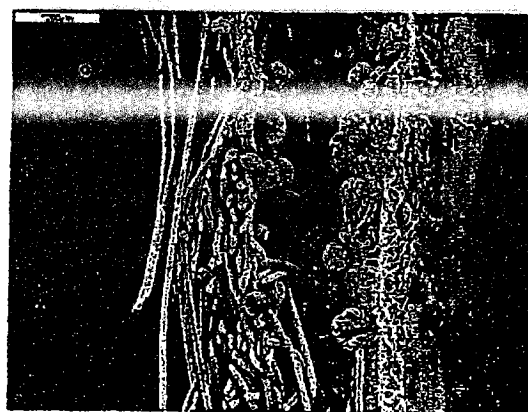


图 4

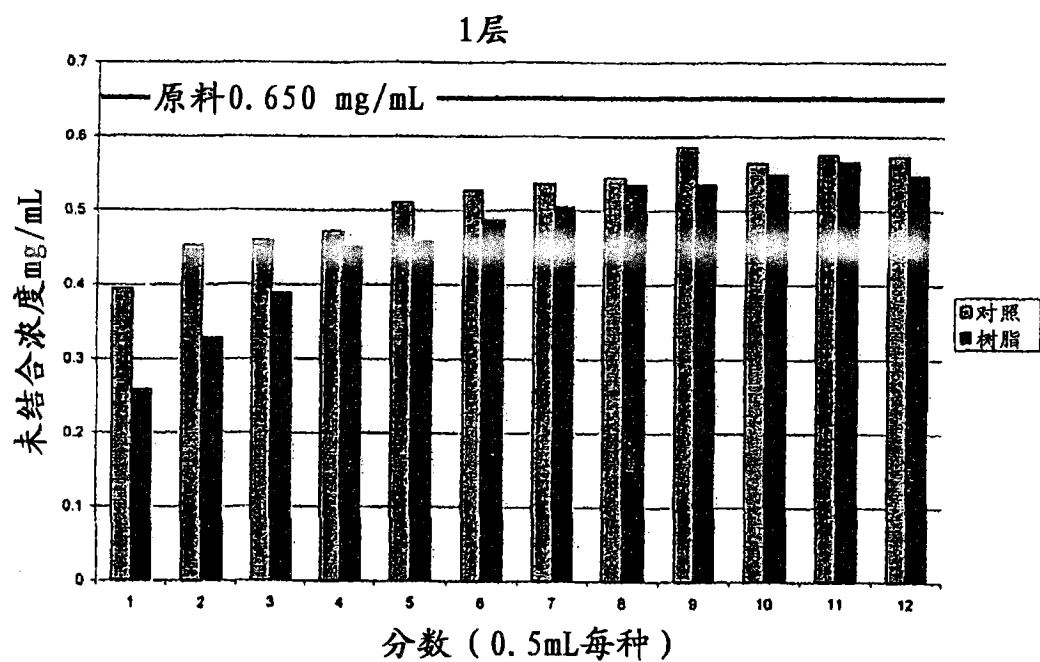


图 5

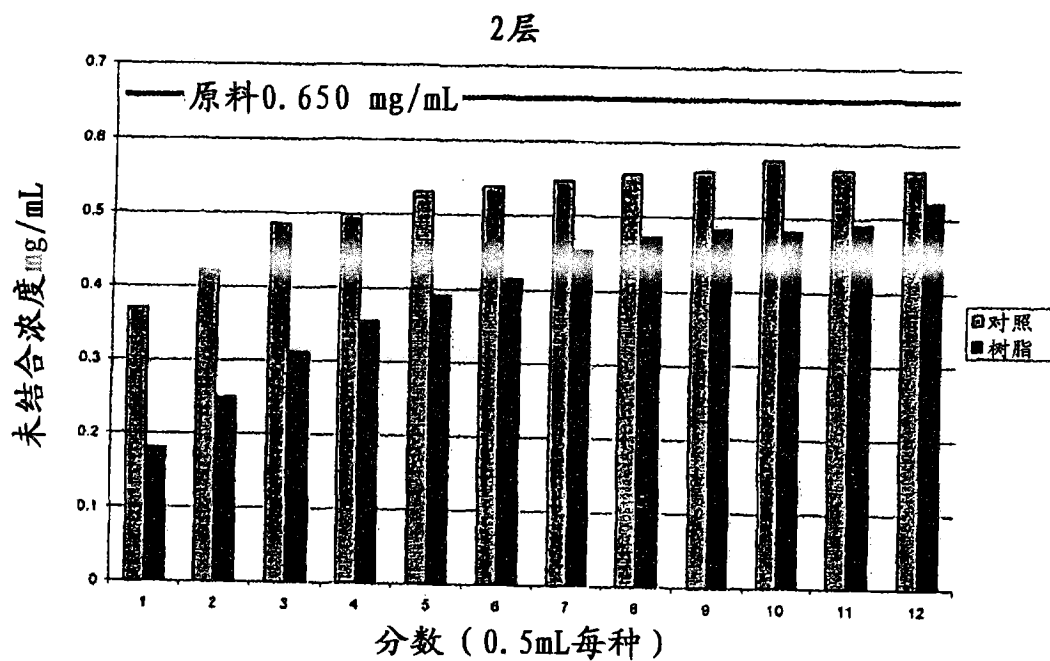


图 6

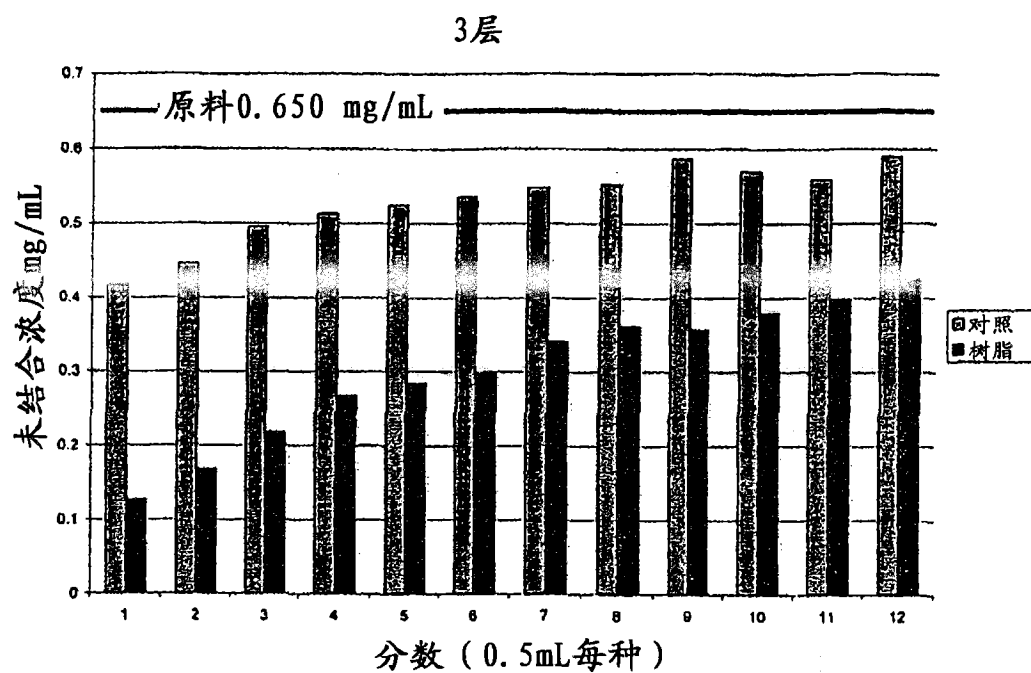


图 7

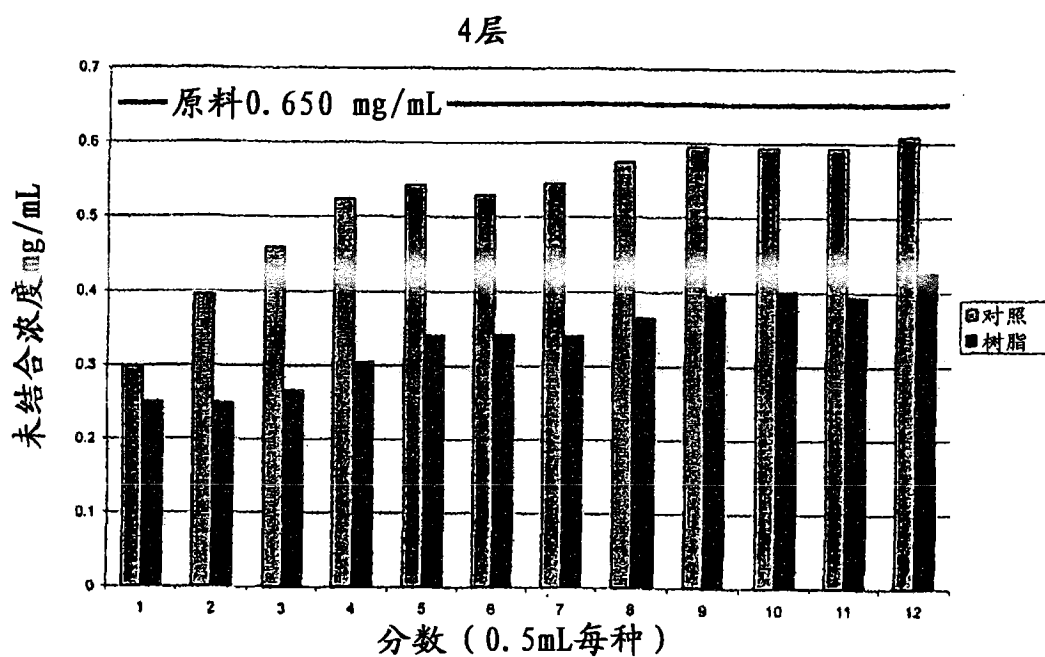


图 8

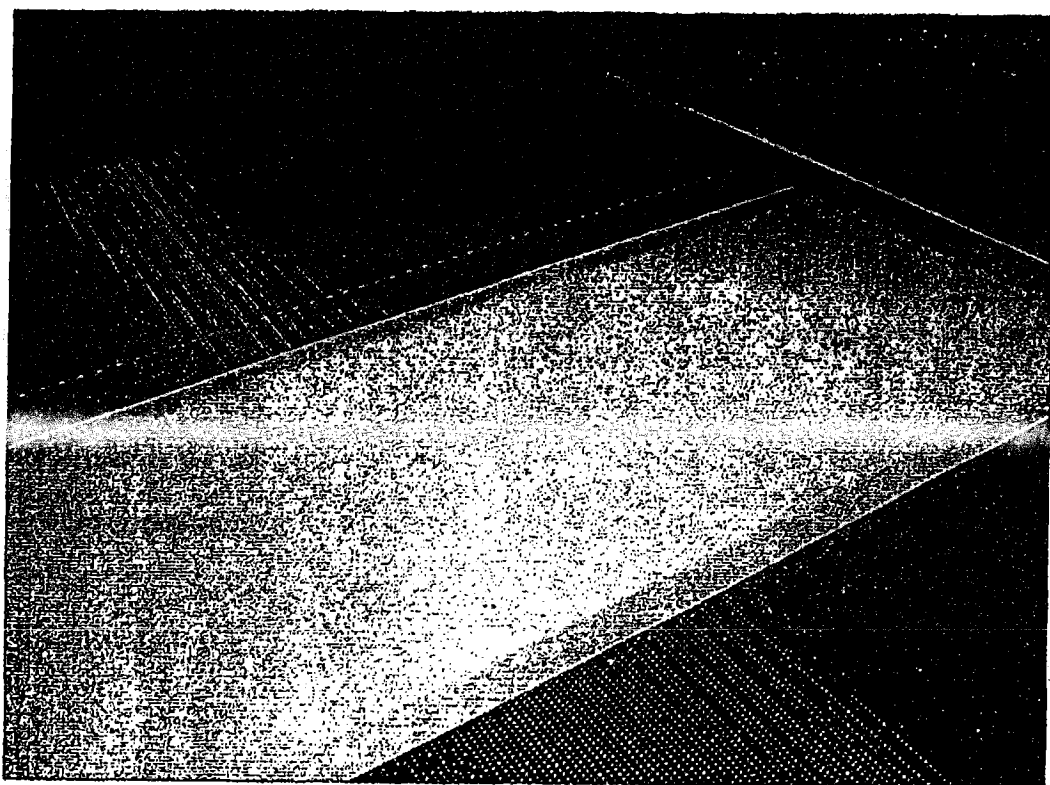


图 9

专利名称(译)	用于从样品中除去靶分析物的包埋多孔底物中的颗粒		
公开(公告)号	CN1984989B	公开(公告)日	2013-03-13
申请号	CN200580022886.9	申请日	2005-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	病原体切除与诊断科技公司		
申请(专利权)人(译)	病原体切除与诊断科技公司		
当前申请(专利权)人(译)	病原拆卸和诊断技术股份有限公司.		
[标]发明人	RG卡博内尔		
发明人	R·G·卡博内尔		
IPC分类号	C12M1/34 C12M3/00 G01N33/53 G01N25/20 B01L3/00 C12Q1/68 G01N1/28 G01N1/40		
CPC分类号	B01L3/5023 B01D15/00 B01D15/08 B01J20/28026 B01J20/28028 B01J20/28033 B01J20/28057 B01J20/28078 B01J20/28085 B01J20/28097 B01J20/286 B01J20/321 B01J20/3212 B01J20/3219 B01J20/3234 B01J20/3236 B01J20/3238 B01J20/327 B01J20/3274 B01J20/3276 B01J20/328 B01J20/3282 B01J20/3289 B01J20/3293 B01L2300/0848 G01N1/40 G01N1/405 G01N1/4077		
代理人(译)	李华英		
优先权	60/617669 2004-10-13 US 60/578061 2004-06-09 US 60/616118 2004-10-06 US		
其他公开文献	CN1984989A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种从样品中除去靶试剂的装置、试剂盒和方法。该装置包含一种或多种孔径大于10μm的多孔性基质，和多个浸入其中的颗粒。靶试剂附着到装置上，并从样品中被除去。

