(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102203173 B
(45)授权公告日 2014.04.02

(21)申请号 200980142280.7

(22)申请日 2009.09.18

(30)优先权数据
61/098,337 2008.09.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.04.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/057465 2009.09.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/033794 EN 2010.03.25

(73)专利权人 3M创新有限公司
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 卡纳安·塞莎德里
杰拉尔德·K·拉斯穆森
克林顿·P·小沃勒
道格拉斯·E·韦斯 何毅

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112
代理人 丁业平 金小芳

(51)Int.Cl.
C08J 7/18(2006.01)
G01N 33/566(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)

(56)对比文件
EP 1228756 A1,2002.08.07, 说明书0009-0010,0028-0034段.
EP 1228756 A1,2002.08.07, 说明书0009-0010,0028-0034段.
WO 99/32158 A2,1999.07.01, 说明书第3页第16-23行.
US 6033719 A,2000.03.07, 权利要求1-76.

审查员 吴浩

权利要求书3页 说明书18页

(54)发明名称

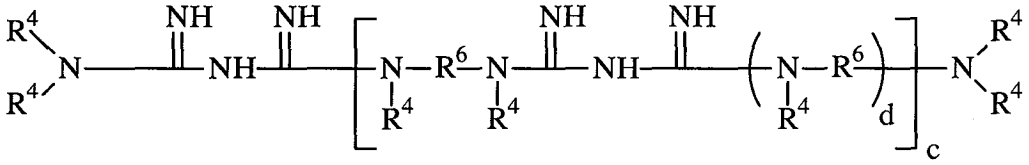
配体接枝官能化基材

(57)摘要

本发明公开了聚乙烯亚胺和聚亚烷基双胍配体官能化基材、制备配体官能化基材的方法以及使用官能化基材的方法。

CN 102203173 B

1. 一种用于从生物样品中选择性地结合并除去生物材料的制品，所述制品包括 a) 具有从基材的表面伸出的接枝的亲电官能团的经取代的基材与 b) 下式配体化合物的反应产物：



其中：

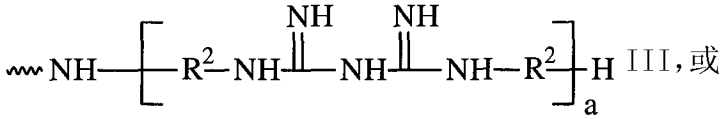
每个 R^4 独立地为 H、烷基或芳基，

每个 R^6 独立地为亚烷基或亚芳基，

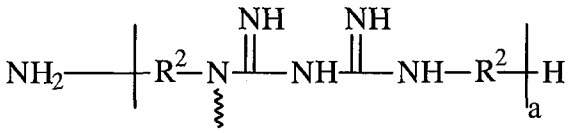
c 为 1 至 500 的整数，且

d 为 0 或 1。

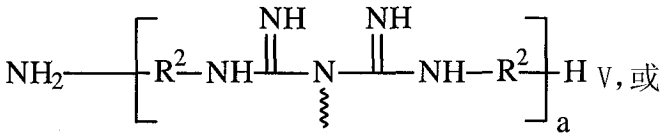
2. 根据权利要求 1 所述的制品，其中所述反应产物具有下列式中的一种或多种所示的双胍配体基团：



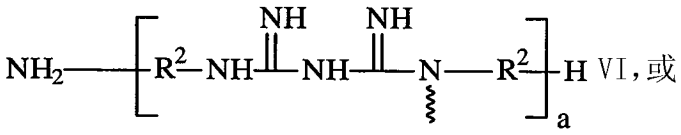
III，或



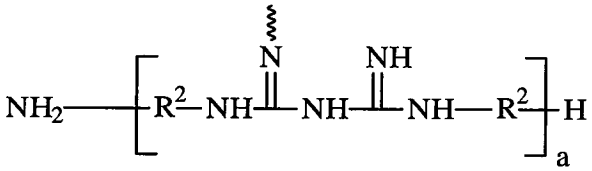
IV，或



V，或



VI，或



VII，

其中：

R^2 为亚芳基或亚烷基，且 a 至少为 1。

3. 根据权利要求 1 所述的制品，还包括在所述基材的表面上的接枝的季铵基团。

4. 根据权利要求 1 所述的制品，其中所述基材为多孔基材。

5. 根据权利要求 1 所述的制品，其中所述基材为热塑性聚合物。

6. 根据权利要求 5 所述的制品，其中所述热塑性聚合物选自聚烯烃、聚异戊二烯、聚丁二烯、氟化聚合物、氯化聚合物、聚酰胺、聚酰亚胺、聚醚、聚醚砜、聚砜、聚乙酸乙烯酯、乙酸乙烯酯的共聚物、聚磷腈、聚乙烯基酯、聚乙烯基醚、聚乙烯醇以及聚碳酸酯。

7. 根据权利要求 1 所述的制品，其中所述接枝的亲电官能团选自 (i) 环氧基团或开环

的环氧连接基团、(ii) 吖内酯基团或开环的吖内酯连接基团，或 (iii) 异氰酸基。

8. 根据权利要求 1 所述的制品，还包括接枝的离子基团或亲水性基团。

9. 根据权利要求 1 所述的制品，其中所述基材包括多孔膜、多孔非织造网或多孔纤维。

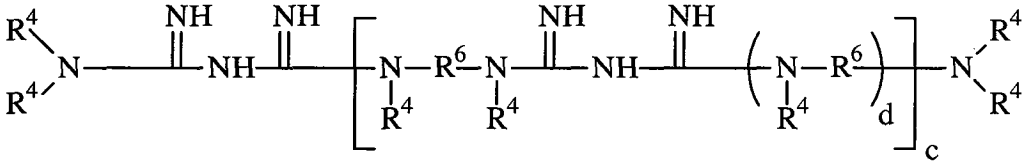
10. 根据权利要求 5 所述的制品，其中所述热塑性聚合物为聚乙烯 - 共 - 聚乙烯醇。

11. 一种制备根据权利要求 1 所述的制品的方法，包括：

1) 提供热塑性聚合物基材；

2) 将亲电官能团接枝至所述基材的表面以制备具有从其表面伸出的接枝的亲电官能团的基材；和

3) 使所述接枝的亲电官能团与如下配体化合物反应：



其中：

每个 R^4 独立地为 H、烷基或芳基，

每个 R^6 独立地为亚烷基或亚芳基，

c 为 1 至 500 的整数，且

d 为 0 或 1，

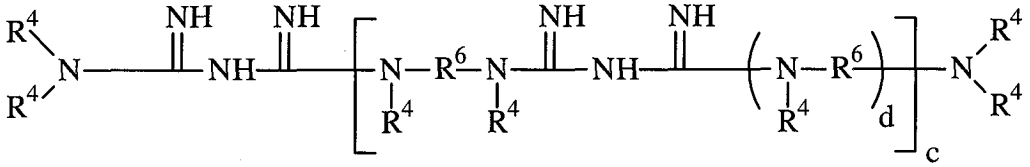
从而制得具有从所述基材的表面伸出的接枝配体基团的基材。

12. 一种制备根据权利要求 1 所述的制品的方法，包括：

1) 提供热塑性聚合物基材；

2) 通过电离辐射将官能团接枝至所述基材的表面，以制备具有从其表面伸出的接枝的亲电官能团的基材；和

3) 使所述接枝的官能团与如下配体化合物反应：



其中：

每个 R^4 独立地为 H、烷基或芳基，

每个 R^6 独立地为亚烷基或亚芳基，

c 为 1 至 500 的整数，且

d 为 0 或 1；

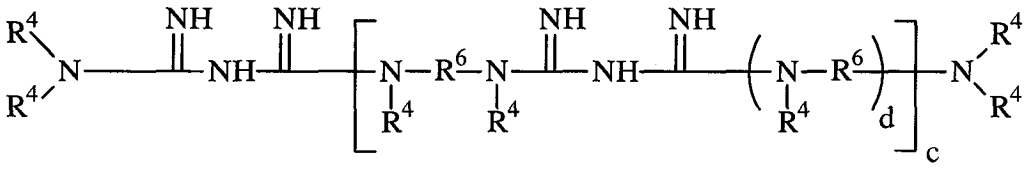
从而制得具有从所述基材的表面伸出的接枝配体基团的基材。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，还包括在所述基材的表面上的接枝的季铵基团。

14. 根据权利要求 12 所述的方法，还包括在所述基材的表面上的接枝的聚（氧化烯）亲水性基团。

15. 根据权利要求 1 所述的制品，包括具有间隙表面和外表面的多孔热塑性基础基材；

和从所述多孔基础基材的表面伸出的电离辐射接枝的配体基团，其中所述接枝配体基团包含接枝的亲电官能团与如下配体化合物的反应产物：



其中：

每个 R^4 独立地为 H、烷基或芳基，

每个 R^6 独立地为亚烷基或亚芳基，

c 为 1 至 500 的整数，且

d 为 0 或 1；并且还包括接枝的离子基团或亲水性基团。

配体接枝官能化基材

[0001] 本申请以美国公司 3M Innovative Properties Company 的名义作为国际专利申请提交，并要求 2008 年 9 月 19 日提交的美国临时专利申请序列号 No.61/098,337 的优先权。

技术领域

[0002] 本发明涉及配体官能化基材以及用于制备该基材的方法。该官能化基材可用于从生物样品中选择性结合和除去生物材料，例如病毒。

背景技术

[0003] 靶标生物材料，例如病毒和生物大分子（包括活细胞的组分或产物，例如蛋白质、碳水化合物、脂质和核酸）的检测、定量、分离和纯化一直以来都是研究人员的目标。从诊断上来讲，检测和定量是重要的，例如，作为各种生理状况（例如疾病）的指示。对于治疗和在生物医学研究中，生物大分子的分离和纯化是重要的。生物大分子例如酶（其为特殊的一类能催化化学反应的蛋白质）在工业上也是有用的；已对酶进行了分离、纯化，然后用于制备甜味剂、抗生素和多种有机化合物（例如乙醇、乙酸、赖氨酸、天冬氨酸和生物有用的产品，例如抗体和类固醇）。

[0004] 在其体内天然状态下，这些生物大分子的结构和相应的生物活性一般来讲保持在相当窄的 pH 和离子强度范围内。因此，任何分离和纯化操作必须考虑这些因素以便所得的处理后的生物大分子具有效力。

[0005] 根据溶质在流动相（其可以是气体或液体）和固定相之间的交换，可对生物产物混合物进行色谱分离和纯化操作。由于各溶质与固定相的结合相互作用不同，溶液混合物中各种溶质得以实现分离。当受到流动相的离解和置换作用时，与相互作用不太强的溶质相比，较强的结合相互作用一般导致保留时间较长，从而可以实现分离和纯化。

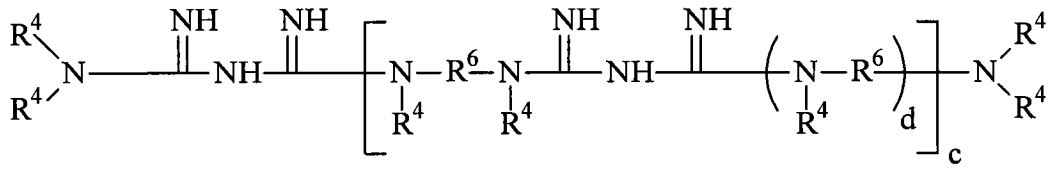
[0006] 大多数当前的捕获或纯化色谱法是通过常规的柱色谱技术实现的。这些技术在下游纯化中具有严重的瓶颈问题，因为使用这种技术的通过量比较低。缓解这些问题的尝试包括增加色谱柱的直径，但这继而由于有效且可重复性装柱的困难而面临挑战。较大的色谱柱直径还会增加难以解决的沟流发生。另外，在常规的色谱柱中，当检测到所需要产物的漏过量高于某一水平时，所述吸收操作会被停止。这会引起吸附介质的动态吸附或有效吸附容量将显著小于总吸附或静态吸附容量。鉴于一些色谱树脂成本较高，这种有效性的缩减会导致严重的经济后果。

[0007] 聚合物树脂被广泛用于各种靶标化合物的分离和纯化。例如，基于离子基团的存在、基于靶标化合物的尺寸、基于疏水相互作用、基于特定的受体－配体亲和相互作用，或基于共价键的形成或前述相互作用的组合，聚合物树脂可用于纯化或分离靶标化合物。在本领域中，需要对病毒具有增强的亲和力的聚合物基材，以使得能从生物样品有效除去病毒。在本领域中还需要配体官能化膜，该膜可克服扩散和结合的局限性，并且可以在高通过量和较低压降下操作。

发明内容

[0008] 本发明涉及配体官能化基材（优选多孔基材）和制备该基材的方法。更具体地讲，该官能化基材包括基础基材，优选多孔基础基材，其已被改性以提供接枝配体基团，该接枝配体基团具有用于结合带电生物材料（例如病毒）的必要特异性结合能力。所述配体官能化基材可描述为基材与式 I 或 II 的配体化合物的接枝反应产物：

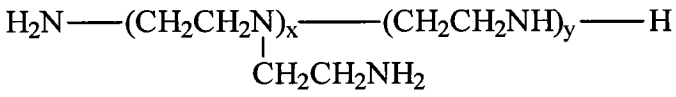
[0009]



I

[0010] 其中每个 R^4 独立地为 H、烷基或芳基，每个 R^6 独立地为亚烷基或亚芳基，c 可为 0 或 1 至 500 的整数，且 d 为 0 或 1，前提是当 d 为 0 时，c 为 1 至 500；或

[0011]



II

[0012] 其中 x 可为 0，y 至少为 1，且 x+y 为 2 至 2000。

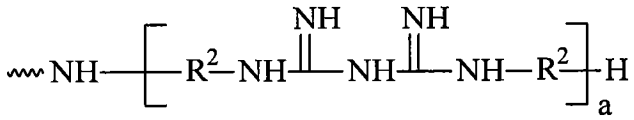
[0013] 提供了制备配体官能化基材的方法。该方法可包括提供基材，优选多孔基材，所述基材可为热塑性聚合物或多糖聚合物；将亲电官能团接枝至基材的表面以制备具有从其表面伸出的接枝的亲电官能团的基材；以及使该接枝的亲电官能团与式 I 和 / 或 II 的配体化合物反应以制备具有从基材的表面伸出的接枝的配体基团的基材。

[0014] 在一些实施例中，基材聚合物具有表面官能团，接枝化合物可结合至该表面官能团。接枝化合物具有对基材聚合物的表面官能团来说是反应性的第一官能团以及对配体化合物的胺（或亚胺）来说是反应性的第二亲电官能团。例如，多糖基材具有羟基，所述羟基可通过与接枝化合物的加成、缩合或置换反应而与接枝化合物反应，从而提供用于随后与配体化合物反应的接枝的反应性亲电官能团。

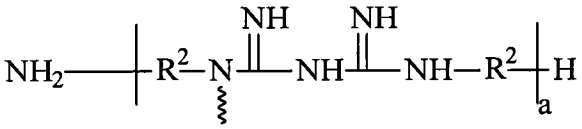
[0015] 在其他实施例中，所述基材聚合物不具有这种表面官能团；可将诸如聚丙烯之类的聚合物暴露于等离子体放电，从而提供可用于与接枝化合物反应的表面羟基。或者，可使用具有烯键式不饱和基团和第二反应性亲电官能团的烯键式不饱和接枝单体接枝诸如聚丙烯之类的聚合物，所述烯键式不饱和基团用于电离辐射引发接枝以将自由基提供至聚合物表面，所述第二反应性亲电官能团用于随后的与配体化合物的反应。

[0016] 提供了一种制品，其包括基材，优选具有间隙表面和外表面的多孔基材，以及从基材的表面伸出的接枝的双胍配体基团，所述配体基团衍生自式 I 的配体化合物，所述接枝的双胍配体基团对应于式 III 至 VIII 中的一者或多者，其中 R^2 和 a 如之前所定义。为了举例说明，仅显示双胍混合物。使用双 - 双胍和聚（双胍）化合物形成类似的连接。

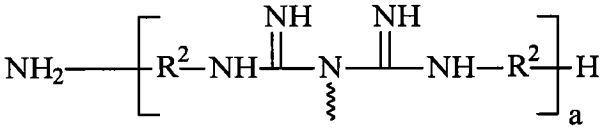
[0017]



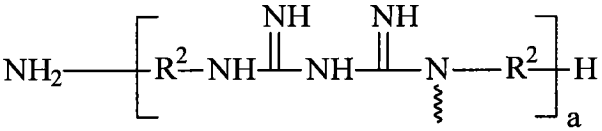
III，或



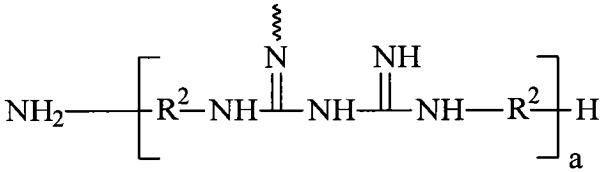
IV，或



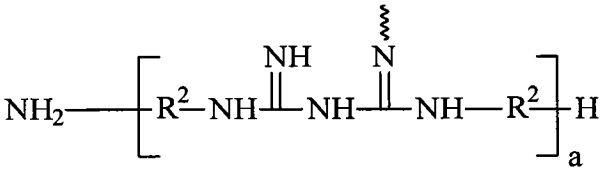
V，或



VI，或



VII，或

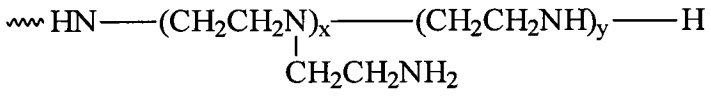


VIII

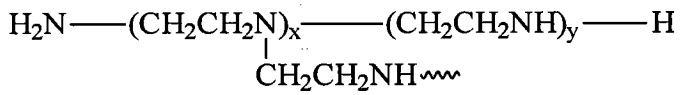
[0018] 式 I 的双胍、双 - 双胍和聚（双胍）化合物的制备是本领域已知的。可参考描述许多双胍的合成的如下文献 :F. H. S. Curd 和 F. L. Rose, J. Chem. Soc. ,1946,729-737、O ′ Malley 等人, J. Appl. Microbiol. 103 :1158,2007 和 East 等人, Polymer,38 :3973,1997。F. L. Rose 和 G. Swain, J. Chem. Soc. ,1956,4422-4425 讨论了双 - 双胍的合成。应当理解,使用胺和二氰基胺制备双胍可得到包含如式 I 的那些的复杂的产物混合物。特别是,双胍可具有端氰基或悬垂的氰基。

[0019] 或者,提供了一种制品,其包括基材,优选具有间隙表面和外表面的多孔基材,以及从基材的表面伸出的接枝的配体基团,所述配体基团衍生自式 II 的配体化合物,所述接枝的配体基团对应于式 IX 至 XII 中的一者或多者,其中 x 和 y 如之前所定义。

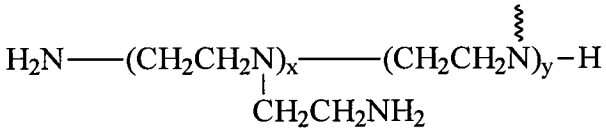
[0020]



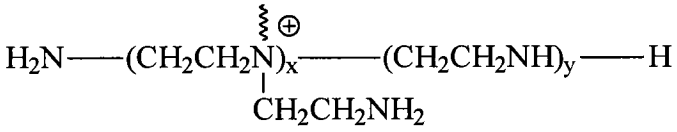
IX，或



X，或

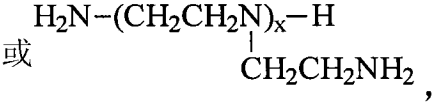


XI，或



XII。

[0021] 或者，对于式 II 的配体化合物，可将接枝的配体基团描述为具有下式的重复单元：

[0022] $-(CH_2CH_2NH)_y-H$ 和 / 或 ，

[0023] 其中 x 和 y 的每一个可为 0 或非 0 值，且 x 和 / 或 y 至少为 2。所述重复单元可通过一个或多个氮原子接枝至基材的表面，如上所述。应当理解，聚亚烷基亚胺的制备得到复杂的产物混合物或更复杂的支化混合物，所述复杂的产物混合物可包括线性或支化的聚合物，并可为上述单元的无规共聚物、嵌段共聚物或交替共聚物。

[0024] 关于上述式 III 至 XII，“～”表示在配体基团和基础基材的表面之间插入的共价键或有机连接基团。连接基团表示接枝单体或接枝化合物的残基。制品还可包括从基材的表面伸出的接枝的离子或亲水性基团。

[0025] 在审阅了对本发明所公开的实施例和所附的权利要求书的以下详细描述之后，本发明的这些和其他特征和优点将变得显而易见。

具体实施方式

[0026] 在本公开的制品和方法中，配体官能化制品通过如下方法提供：通过接枝将基材官能化，随后使该接枝官能化基材与式 I 和 II 的配体化合物以及任选与离子或亲水性化合物或者离子或亲水性接枝单体反应。与在表面改性之前的基础基材相比，配体官能化基材通常对带电的生物材料（如寄主细胞蛋白质、DNA、RNA 和病毒）具有增强的结合选择性。对这种生物材料的结合选择性允许带正电的材料（如抗体）通过，因为它们不结合至配体官能团。配体官能化基材通过标靶生物分子与配体基团之间的离子相互作用而允许选择性地捕获或结合标靶生物材料，而不具有对配体基团的特异性结合相互作用的其他材料则通过。

[0027] 配体官能化基材包括多种组分，其包括但不限于 (1) 基础基材，和 (2)(a) 从所述

基础基材的表面伸出的接枝反应性亲电官能团与 (b) 一个或多个式 I 或 II 的配体化合物的反应产物。反应产物对应于式 III 至 XII 中的一者或多者。优选地，基础基材为具有间隙表面和外表面的多孔基础基材。基材可为热塑性聚合物或多糖聚合物。

[0028] 在一个实施例中，基材包含多糖。术语“多糖”包括每分子由通过糖苷键合连接的许多、数百或数千个单糖单元组成的化合物。它们的分子量通常大于约 5,000，且范围可高达数百万道尔顿。它们通常为天然存在的聚合物，例如淀粉、糖原、纤维素、阿拉伯树胶、琼脂和甲壳质。多糖应具有一个或多个反应性羟基。其可为直链或支链。用于本发明目的的最有用的多糖为纤维素。

[0029] 多糖优选为完全未保护的，具有游离态的全部羟基。对羟基进行一定封闭是可能的，例如，通过酰化或氨酰化。然而，对多糖的羟基大量封闭是不利的，因为多糖会因此失去其亲水性特性，所述亲水性特性提供了与生物分子的适当的化学相容的相互作用。若多糖变得过于疏水，则与诸如蛋白质之类的分子的负相互作用导致可能的非特异性结合和变性现象。另外，若多糖羟基的遮蔽过于大量，则聚合物的反应性大大降低。由于所有这些原因，优选的是保持基本上全部羟基为游离状态。多糖通过本文所述的反应性官能团而得以化学活化。

[0030] 纤维素为优选的多糖。“纤维素”旨在意指任何方便的和市售形式的纤维素（如木浆、棉、大麻、苎麻）或再生形式的纤维素（如人造丝）。合适形式的纤维素的选择并不关键。纤维素为由 β 1,4 连接的葡萄糖单元组成的天然存在的多糖。在天然态，相邻纤维素链由大量氢键连接，从而形成微晶区域。具有较少氢键的无定形区域散布于这些区域。有限的酸水解导致无定形区域的优先损失，得到所谓的微晶纤维素。可用于本发明的纤维素为天然态的纤维素或微晶态的纤维素。另外，衍生自棉绒的纤维素优于衍生自木浆的纤维素，因为后者含有木质素。

[0031] 将配体基团连接至多糖材料的化学反应通常在结晶区域中难以进行，但在无定形区域中更易发生。例如，使官能团取代进入纤维素对其结构具有破坏效果。若完全进行，则纤维素基体将被破坏，并最终形成水溶性聚合物。该现象的典型例子为现有技术的羟乙基纤维素和纤维素胶，在溶解于水中之后它们变成常用的粘合剂和粘结剂。

[0032] 在多糖分子中的每个糖单元可具有三个或更多个反应性羟基。全部或一部分羟基可被配体基团取代。然而，得自这种反应的产物将具有三个或更多个的取代程度，这在离子交换材料的情况中可使聚合物变性。即使在低于出现完全水溶性的取代水平的更低取代水平下，这种多糖衍生物也可能不适合作为色谱载体。因此，将多糖的取代有利地限制在更多的无定形区域的反应性中心，且很少超过约 1mEQ/gm 糖聚合物干重的水平进行。在该取代水平下，多糖结构的天然构造仅略微被改性，且低密度、非均匀的交换位点易于接近大生物分子。

[0033] 因此本发明的分子载体的最终结构包含多糖链，该多糖链在沿该链的许多位点处被配体基团共价接枝改性。

[0034] 基材可以为任何形式，例如膜或片。优选地，基材（例如多糖基材）为多孔的，其包括但不限于多孔膜、多孔非织造网和多孔纤维。基材可通过多种方法制得，包括自溶剂、湿法纤维或干法纤维铸塑。

[0035] 在另一实施例中，基材可由任何合适的热塑性聚合物材料形成。合适的聚合物材

料包括但不限于聚烯烃、聚（异戊二烯）、聚（丁二烯）、氟化聚合物、氯化聚合物、聚酰胺、聚酰亚胺、聚醚、聚（醚砜）、聚（砜）、聚（乙酸乙烯酯）、乙酸乙烯酯的共聚物如聚（乙烯）-共-聚（乙烯醇）、聚（磷腈）、聚（乙烯基酯）、聚（乙烯基醚）、聚（乙烯醇）以及聚（碳酸酯）。

[0036] 在一些实施例中，热塑性聚合物可被表面处理（例如通过等离子体放电）以将合适的官能团提供给基材的表面。表面处理提供了诸如羟基之类的官能团，从而能够用接枝化合物进行接枝并能够随后与配体化合物反应。一个这种可用的等离子处理描述于U.S.7,125,603(David 等人）。

[0037] 合适的聚烯烃包括但不限于聚（乙烯）、聚（丙烯）、聚（1-丁烯）、乙烯和丙烯的共聚物、α 烯烃共聚物（例如乙烯或丙烯与1-丁烯、1-己烯、1-辛烯和1-癸烯的共聚物）、聚（乙烯-共-1-丁烯）以及聚（乙烯-共-1-丁烯-共-1-己烯）。

[0038] 合适的氟化聚合物包括但不限于聚氟乙烯、聚偏二氟乙烯、偏二氟乙烯的共聚物（例如聚（偏二氟乙烯-共-六氟丙烯））和三氟氯乙烯的共聚物（例如聚（乙烯-共-三氟氯乙烯））。

[0039] 合适的聚酰胺包括但不限于聚（亚氨基己二酰亚氨基六亚甲基）、聚（亚氨基己二酰亚氨基十亚甲基）以及聚己内酰胺。合适的聚酰亚胺包括但不限于聚（均苯四酰亚胺）。

[0040] 合适的聚（醚砜）包括但不限于聚（二苯醚砜）和聚（二苯砜-共-氧化二苯砜）。

[0041] 合适的乙酸乙烯酯的共聚物包括但不限于聚（乙烯-共-乙酸乙烯酯）以及其中乙酸酯基团中的至少一些已被水解而提供多种聚（乙烯醇）的那些共聚物。

[0042] 优选的基材为多孔基材，其为亲水性微孔膜，如热致相分离 (TIPS) 膜。常通过形成热塑性材料和具有超出该热塑性材料的熔点的第二材料的溶液来制备 TIPS 膜。当冷却时，热塑性材料结晶并且与第二材料相分离。结晶材料通常为拉伸的。可任选在拉伸之前或之后移除第二材料。微孔膜在U.S.4,529,256(Shipman)、4,726,989(Mrozinski)、4,867,881(Kinzer)、5,120,594(Mrozinski)、5,260,360(Mrozinski) 和No.5,962,544(Waller, Jr.）中有所公开。一些示例性的 TIPS 膜包括聚（偏二氟乙烯）(PVDF)、聚烯烃如聚乙烯或聚丙烯、含乙烯基的聚合物或共聚物如乙烯-乙烯醇共聚物，以及含丁二烯的聚合物或共聚物，和含丙烯酸酯的聚合物或共聚物。对于某些应用，包含 PVDF 的 TIPS 膜尤其可取。包含 PVDF 的 TIPS 膜进一步描述于 U.S.7,338,692(Smith 等人）中。

[0043] 基础基材可以为任何形式，例如膜或片。优选基础基材为多孔的。合适的多孔基础基材包括（但不限于）：多孔膜、多孔非织造网和多孔纤维。

[0044] 在许多实施例中，基础基材具有通常大于约 0.2 微米的平均孔径以使体积排阻分离最小化、使扩散限制最小化以及使基于靶标分子结合的表面积和分离最大化。一般来讲，当用于结合病毒时，孔径在 0.1 至 10 微米的范围内，优选 0.5 至 3 微米，最优选 0.8 至 2 微米。结合其他靶标分子的效率可导致不同的最佳范围。

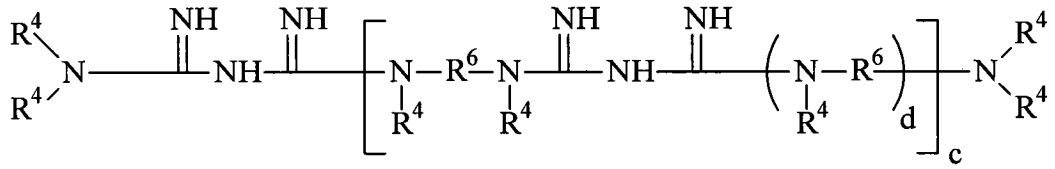
[0045] 官能化基材（无论热塑性基材或多糖基材）具有连接至基础基材的表面的接枝基团，该接枝基团包括 a) 至少一个配体基团，以及 b) 任选的一个或多个亲水性基团和 / 或离子基团。

[0046] 在其上具有反应性基团的基材进一步与配体化合物反应以提供接枝至该基材的

表面的配体基团。

[0047] 在另一个实施例中，配体化合物具有下式：

[0048]

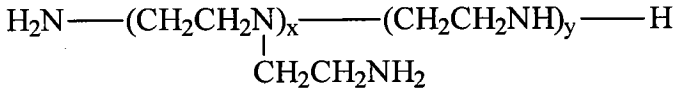


I

[0049] 其中每个 R^4 独立地为 H、烷基或芳基，每个 R^6 独立地为亚烷基或亚芳基，c 可为 0 或 1 至 500 的整数，优选至少为 5，更优选为 5-500；且 d 为 0 或 1，前提是当 d 为 0 时，c 为 1 至 500；

[0050] 或

[0051]



II

[0052] 其中 x 和 y 至少为 1，且 x+y 为 2 至 2000。当接枝至基材的表面时，接枝的配体基团可由式 III 至 XII（如上所述）表示。

[0053] 可使用工序的组合来制备上述配体官能化基材。在一些实施例中，方法包括提供基材，优选可为热塑性聚合物或多糖聚合物的多孔基材，使用接枝化合物或接枝单体将亲电官能团接枝至基材的表面，从而制得具有从基材的表面伸出的接枝的亲电官能团的基材；以及使所述接枝的亲电官能团与式 I 或 II 的配体化合物反应，从而制得具有如式 III 至 XII 所示的从基材的表面伸出的接枝配体基团的基材。

[0054] 在一个实施例中，方法包括 1) 提供基础多糖基材，优选具有间隙表面和外表面的多孔基础基材；2) 通过与具有可与多糖基材的羟基反应的第一官能团和第二官能团的接枝化合物接触而接枝基础多糖基材，从而制得具有接枝的第二官能团的表面改性多糖基材，所述第二接枝的官能团为亲电官能团或可转化为亲电官能团的基团；以及 3) 随后使所述具有接枝的亲电官能团的表面改性多糖基材与式 I 和 / 或 II 的配体化合物接触。

[0055] 在一个实施例中，步骤 2 的接枝化合物具有可与配体化合物的胺（或亚胺）基反应的第二亲电官能团。在另一个实施例中，接枝化合物具有可转化为可与配体化合物的胺基反应的亲电官能团的官能团。例如，可首先使多糖基材与烯丙基缩水甘油醚反应，其中环氧基对多糖聚合物的羟基是反应性的。然而，所得接枝的烯丙基对配体化合物的胺基是非反应性的，但其可与 N- 溴代琥珀酰亚胺或溴水反应而生成溴端基，该溴端基是亲电的并可与式 I 和 II 的配体化合物的胺（或亚胺）基反应（通过亲核取代）。

[0056] 在一个实施例中，接枝化合物具有能够与多糖的羟基反应形成共价键的基团。化学基团能够在水溶液中在最高至多糖开始分解或解聚的温度（例如 0° 至 120℃）下与羟基反应，由此与羟基形成共价键。由于水以相对于多糖的羟基相当大的过量存在，自发地与水反应的化学基团（例如异氰酸酯基团）较不合适。

[0057] 接枝化合物的羟基反应性基团可为活化的羧基（如从肽化学已知的活化羧基）或 O- 烷基化试剂（如卤代烷或环氧基）。O- 烷基化共聚单体的代表为丙烯酸酐和甲基丙烯酸酐、丙烯酰 N- 羟基琥珀酰亚胺或甲基丙烯酰 N- 羟基琥珀酰亚胺、丙烯酸或甲基丙烯酸的

Ω-卤代-烷基酯（其中烷基通常含有2至6个碳原子）、烯丙基卤化物、氯甲基苯乙烯、氯乙酰氧基烯丙基醚和具有缩水甘油基的化合物。后者为缩水甘油醇分别与不饱和醇或不饱和羧酸之间形成的醚或酯。缩水甘油醇为具有3至18个碳原子的脂族和脂环族醇和醚醇，其由α，β-不饱和羧酸（优选丙烯酸或甲基丙烯酸）酯化，或者由烯属或炔属不饱和醇醚化。典型的化合物为丙烯酸缩水甘油酯和甲基丙烯酸缩水甘油酯、4,5-环氧基-丙烯酸戊酯、甲基丙烯酸4-(2,3-环氧基-丙基)-N-丁基酯、丙烯酸9,10-环氧基-十八酯、甲基丙烯酸4-(2,3-环氧基丙基)-环己酯、乙二醇-单缩水甘油醚丙烯酸酯和烯丙基缩水甘油醚。

[0058] 可用于接枝至多糖基材的表面的其他可用的接枝化合物包括氰尿酰氯、N-羟基琥珀酰亚胺酯、如描述于U.S.7,402,678(Benson等人）中的具有末端酰基磺酰胺基团的多官能化合物、描述于U.S.2005/0142296A(Lakshmi等人）中的卤代磷腈化合物、描述于U.S.2007/0065490(Schaberg等人）中的三嗪化合物、描述于U.S.7,361,767和U.S.7,169,933(Benson等人）中的N-磺酰基二甲酰亚胺化合物。

[0059] 在一些实施例中，多糖基材还包含接枝的离子基团，如季铵基团。这种基团可通过使多糖基材与环氧氯丙烷和碱接触，与叔胺或仲胺反应然后烷基化而接枝。或者，季铵基团可通过与缩水甘油基三甲基氯化铵的反应而接枝至基材的表面。在一些实施例中，多糖基材还包含接枝的亲水性基团，如聚环氧乙烷基团，其可通过基材与诸如聚环氧乙烷一元酸或聚环氧乙烷二元酸之类的化合物的反应而接枝。

[0060] 有利的是将不含诸如多糖的羟基之类的官能团的其他聚合物用电离辐射接枝技术进行官能化。在该实施例中，将热塑性聚合物，如聚丙烯或聚偏二氟乙烯(PVDF)首先用接枝单体接枝，随后与式I或II的配体化合物反应。接枝单体具有烯键式不饱和基团，当在基材的存在下将其暴露于电离辐射时，该烯键式不饱和基团导致自由基引发共价结合至基材的表面。因此，基材为接枝单体所官能化。

[0061] 官能化基材具有连接至基础基材的表面的接枝物质：接枝单体。接枝单体接枝至多孔基础基材的表面导致可与配体化合物或式I和II的胺（或亚胺）基团反应的官能团连接。该胺基可存在于配体化合物的末端，如伯胺，或者可存在于配体化合物的内部，如仲胺，或者作为在支化部分上的伯胺。接枝单体既具有(a)可自由基聚合的基团，又具有(b)其上的至少一种另外的第二官能团。接枝单体的另外的第二官能团可为亲电基团或可转化为亲电基团的另一官能团。

[0062] 可自由基聚合的基团通常为烯键式不饱和基团，如（甲基）丙烯酰基或乙烯基。当暴露于电子束或其他电离辐射时，可自由基聚合的基团通常可与多孔基础基材的表面反应。也就是说，接枝单体的可自由基聚合基团与多孔基础基材的表面在电子束存在条件下的反应导致形成连接至多孔基础基材上的接枝物质。一种或多种接枝单体可被接枝至多孔基础基材的间隙表面和外表面上。

[0063] 除了具有可自由基聚合的基团之外，合适的接枝单体具有对配体化合物的胺基反应性的另外的官能团（如环氧基、吖内酯基、异氰酸根基、卤素基团）或可被进一步活化以对配体化合物的胺基反应性的另外的官能团（如烯丙基）。也就是说，在通过涉及可自由基聚合的基团的反应将接枝单体连接至多孔基础基材之后，可使所得接枝物质的另外的官能团进一步与配体化合物反应。

[0064] 此外，任选的接枝单体可具有用于提供另外的反应性或对特定分析物的结合特异性（或阻止其他分析物的结合）的官能团，如离子基团、第二烯键式不饱和基团、氧化烯基团或疏水性基团。在这些情况中，另外的官能团可为官能化基材赋予所需的表面性质，如对特定类型的化合物的亲和力。如果接枝物质包含离子基团，那么官能化基材常将具有对带相反电荷的化合物的亲和力。也就是说，具有带负电基团的化合物可被吸引至含有带阳离子基团的接枝物质的官能化基材，而具有带正电基团的化合物可被吸引至含有带阴离子基团的接枝物质的官能化基材。此外，接枝物质可为官能化基材赋予亲水表面，所述官能化基材在用接枝物质表面改性之前包括具有疏水表面的多孔基础基材。也就是说，包含氧化烯基团的接枝物质可为所得的官能化基材赋予亲水特性。

[0065] 一些接枝单体具有 a) 用于接枝至基材的表面的第一烯键式不饱和基团和 b) 为环氧基的另外的官能团。该类别内的合适接枝单体包括但不限于（甲基）丙烯酸缩水甘油酯。该类别的接枝单体可形成含有至少一个可用于进一步反应的环氧基团的官能化基材。环氧基可与配体化合物反应，这导致环氧环的打开和连接基团的形成，所述连接基团起到将配体化合物连接至多孔基础基材的作用。当环氧基与配体化合物的伯胺基反应时，通过环氧基的开环形成的连接基团常含有基团 -C(OH)HCH_2NH-。环氧基可与其他反应物（如另一亲核化合物）反应以为基础基材赋予所需的表面性质（例如对于特定化合物或具有不同反应性的官能团的结合特异性）。

[0066] 其他接枝单体具有 (a) 为烯键式不饱和基团的可自由基聚合基团和 (b) 为吖内酯基或吖内酯基的前体的另外的官能团。合适的接枝单体包括但不限于乙烯基吖内酯，如 2- 乙烯基 -4,4- 二甲基吖内酯和 N- 丙烯酰基 -2- 甲基丙氨酸。此类接枝单体可提供具有至少一个可用于与配体化合物进一步反应的吖内酯基团（或吖内酯基团的前体）的官能化基材。吖内酯基团可与其他反应物（如另一单体）或与亲核化合物反应以给多孔基础基材赋予所需的表面性质（例如对于特定化合物或具有不同反应性的官能团的结合特异性）。吖内酯基团与配体化合物的反应例如导致吖内酯环打开和连接基团的形成，该连接基团起到将亲核化合物连接至多孔基础基材的作用。通过吖内酯基的开环形成的连接基团常含有基团 CH_2 = CH-(CO)NHC(R^3)$_2$(CO)-，其中 R^3 为烷基，如甲基。

[0067] 在一些实施例中，吖内酯基可与单官能胺（如烯丙基胺）反应，其中胺基可通过开环反应与吖内酯基反应并导致含有基团 CH_2 = CH-(CO)NHC(R^3)$_2$(CO)NH-CH_2-CH = CH_2 的连接的形成。然后可将接枝的烯丙基转化为亲电官能团以进一步与式 I 和 II 的配体化合物反应。例如，末端烯丙基可通过合适的溴化试剂（如 N- 溴代琥珀酰亚胺）进行溴化以生成末端亲电溴化物，其随后可与式 I 和 II 的配体化合物的亲核氮原子反应而生成式 III 至 XII 的悬垂配体基团。

[0068] 在一些实施例中，吖内酯基团可与多功能胺（如含有两个伯氨基的二胺或含有三个伯氨基的三胺）反应。氨基中的一个可通过开环反应与吖内酯基反应，导致在亲核化合物与基础基材之间形成含有基团 -(CO)NHCR^3_2(CO)- 的连接。第二氨基或第二和第三氨基可为官能化基材赋予亲水性特性。在一些例子中，多功能胺为聚亚烷基二醇二胺或聚亚烷基二醇三胺并且与二氢唑酮基团的反应导致含有聚亚烷基二醇基团（即聚氧化烯基团）的接枝物质的连接。聚亚烷基二醇基团以及任何末端伯氨基往往为官能化基材赋予亲水性特性。

[0069] 其他接枝单体具有 (a) 为烯键式不饱和基团的可自由基聚合的基团和 (b) 为异氰酸基的另外的官能团。合适的接枝单体包括但不限于异氰酸根合烷基（甲基）丙烯酸酯，例如 2- 氰酸根合乙基甲基丙烯酸酯和 2- 异氰酸根合乙基丙烯酸酯。该类接枝单体可形成含有至少一个可用于反应的异氰酸基的官能化基材。异氰酸基可与其他反应物（如配体化合物）或与亲核化合物反应以向官能化基材赋予所需的表面性质（例如对于特定化合物或具有不同反应性的官能团的亲和力）。异氰酸基与配体化合物的胺基的反应导致脲键的形成。

[0070] 其他任选的接枝单体具有 (a) 为烯键式不饱和基团的可自由基聚合的基团和 (b) 另外的离子官能团。离子基团可带有正电荷、负电荷或它们的组合。对于一些合适的离子单体，取决于 pH 条件，离子基团可以是中性的或带电荷的。该类单体通常用于赋予所需的对一种或多种带有相反电荷的化合物的表面结合特异性或用于降低对一种或多种带有类似电荷的化合物的亲和力。

[0071] 一些示例性的带负电的离子接枝单体包括但不限于 N- 丙烯酰胺甲磺酸、2- 丙烯酰胺乙磺酸、2- 丙烯酰胺基 -2- 甲基 -1- 丙磺酸和 2- 甲基丙烯酰胺基 -2- 甲基 -1- 丙磺酸。也可以使用这些酸性单体的盐。这些盐的反离子可为（例如）铵离子、钾离子、锂离子或钠离子。

[0072] 其他合适的带负电的离子接枝单体包括磺酸，如乙烯基磺酸和 4- 苯乙烯磺酸；（甲基）丙烯酰胺膦酸，如（甲基）丙烯酰胺烷基膦酸（例如 2- 丙烯酰胺乙基膦酸和 3- 甲基丙烯酰胺丙基膦酸）；丙烯酸和甲基丙烯酸；以及羧基烷基（甲基）丙烯酸酯，例如 2- 羧乙基丙烯酸酯、2- 羧乙基甲基丙烯酸酯、3- 羧基丙基丙烯酸酯和 3- 羧基丙基甲基丙烯酸酯。还有其他合适的酸性单体包括（甲基）丙烯酰氨基酸，如在 U.S. 4,157,418(Heilmann) 中描述的那些，将该专利以引用的方式并入本文。示例性的（甲基）丙烯酰氨基酸包括但不限于 N- 丙烯酰基甘氨酸、N- 丙烯酰基天冬氨酸、N- 丙烯酰基 -β- 丙氨酸和 2- 丙烯酰胺乙醇酸。也可以使用任何这些酸单体的盐。

[0073] 能够提供正电荷的一些示例性离子接枝单体为氨基（甲基）丙烯酸酯或氨基（甲基）丙烯酰胺或者它们的季铵盐。这些季铵盐的反离子通常为卤化物、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐等等。示例性的氨基（甲基）丙烯酸酯包括 N,N- 二烷基氨基烷基（甲基）丙烯酸酯，例如 N,N- 二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯、N,N- 二甲基氨基乙基丙烯酸酯、N,N- 二乙基氨基乙基甲基丙烯酸酯、N,N- 二乙基氨基乙基丙烯酸酯、N,N- 二甲基氨基丙基甲基丙烯酸酯、N,N- 二甲基氨基丙基丙烯酸酯、N- 叔丁基氨基丙基甲基丙烯酸酯、N- 叔丁基氨基丙基丙烯酸酯等。示例性的氨基（甲基）丙烯酰胺包括 N-(3- 氨基丙基）甲基丙烯酰胺、N-(3- 氨基丙基）丙烯酰胺、N-[3-（二甲基氨基）丙基］甲基丙烯酰胺、N-(3- 咪唑基丙基）甲基丙烯酰胺、N-(3- 咪唑基丙基）丙烯酰胺、N-(2- 咪唑基乙基）甲基丙烯酰胺、N-(1,1- 二甲基 -3- 咪唑基丙基）甲基丙烯酰胺、N-(1,1- 二甲基 -3- 咪唑基丙基）丙烯酰胺、N-(3- 苯并咪唑基丙基）丙烯酰胺和 N-(3- 苯并咪唑基丙基）甲基丙烯酰胺。

[0074] 示例性的离子单体的季盐包括但不限于（甲基）丙烯酰胺基烷基三甲基铵盐（例如 3- 甲基丙烯酰胺基丙基三甲基氯化铵和 3- 丙烯酰胺基丙基三甲基氯化铵）和（甲基）丙烯酰氧基烷基三甲基铵盐（例如 2- 丙烯酰氧基乙基三甲基氯化铵、2- 甲基丙烯酰氧基乙基三甲基氯化铵、3- 甲基丙烯酰氧基 -2- 羟基丙基三甲基氯化铵、3- 丙烯酰氧基 -2- 羟基

丙基三甲基氯化铵和 2- 丙烯酰氧基乙基三甲基硫酸甲酯铵盐）。

[0075] 可为基材的表面提供带正电基团的其他接枝单体包括链烯基吖内酯的二烷基氨基烷基氨加合物（例如乙烯基二甲基吖内酯的 2-（二乙基氨基）乙胺、(2- 氨基乙基）三甲基氯化铵和 3-（二甲基氨基）丙胺加合物）和二烯丙基胺单体（例如二烯丙基氯化铵和二烯丙基二甲基氯化铵）。

[0076] 本发明的官能化基材可使用上述接枝单体中的一种或上述接枝单体中的两种或更多种的混合物制得，从而提供用于与配体化合物进一步反应的官能团和 / 或改变基础基材的表面性质。当上述接枝单体中的两种或更多种用于改变多孔基础基材的表面性质时，所述单体可在单一反应步骤中（即在暴露于电子束时两种或更多种接枝单体全部存在）或在接续反应步骤中（即在第一次暴露于电子束时第一接枝单体存在，在第二次暴露于电子束时第二接枝单体存在）被接枝至多孔基础基材上。

[0077] 应当理解，接枝单体可在基材的表面聚合，从而得到具有悬垂亲电官能团的接枝聚合物。然后这些悬垂亲电官能团可进一步与式 I 和 II 的配体单体反应而得到具有悬垂配体基团的接枝聚合物。这种聚合物可描述为基材～ $(M_{配体})_m$，其中 $M_{配体}$ 代表具有悬垂配体基团的聚合的接枝单体，且 m 至少为 2。这种聚合物还可包含其他任选的接枝单体。

[0078] 对于辐射接枝，方法的一个实施例包括 1) 提供基础基材，优选具有间隙表面和外表面的多孔基础基材 ;2) 使该多孔基材吸入第一溶液，该第一溶液包含 (a) 一种或多种具有至少一个丙烯酰基和至少一个第二亲电官能团或可转化为亲电官能团的第二官能团的接枝单体 ;3) 将吸液的多孔基础基材暴露于电离辐射，优选电子束或 γ 辐射，从而形成第一官能化基材，该第一官能化基材包含具有连接至其表面的接枝的亲电官能团（来自接枝单体）的基础基材 ;以及 4) 使所述具有接枝的亲电官能团的基材与式 I 或 II 的配体化合物接触，从而制得具有连接至其表面的接枝配体基团的基材，如式 III 至 XII 所示。

[0079] 在另一实施例中，吸液步骤 2 可包括使基材吸入具有亲电官能团的接枝单体。该亲电官能团可进一步使用具有亲核官能团和可转化为亲电基团的第二非亲电基团的化合物进行官能化。例如，可将诸如乙烯基二甲基吖内酯之类的接枝单体接枝至基材的表面。这又可与亲核化合物如烯丙基胺反应，其烯丙基不与配体化合物反应，但可通过与 N- 溴代琥珀酰亚胺或溴水反应而转化为亲电基团，如溴基团。

[0080] 在一些实施例中，吸入溶液可包含任选的可为基材的表面赋予接枝的离子或亲水性基团的接枝单体。例如，任选的接枝单体可包含亲水性的聚环氧乙烷的单丙烯酸酯和二丙烯酸酯。

[0081] 在另一实施例中，该方法包括 1) 提供具有间隙表面和外表面的多孔基础基材 ;2) 使多孔基础基材吸入第一溶液以形成吸液的多孔基础基材，所述第一溶液包含 (a) 至少一种具有丙烯酸酯基团和光引发剂基团的接枝单体以及 (b) 一种或多种具有至少一个丙烯酸酯基团和至少一个另外的烯键式不饱和的可自由基聚合的基团的单体 ;以及任选包含 (c) 一种或多种具有至少一个可自由基聚合的基团和亲电基团的另外的单体 ;3) 将所述吸液的多孔基础基材暴露于控制量的电子束辐射以形成包含连接至多孔基础基材的表面的接枝光引发剂基团的第一官能化基材，4) 任选使所述包含接枝光引发剂基团的基材吸入包含具有亲电基团的接枝单体的吸入溶液 ;5) 将包含接枝光引发剂基团的多孔基础基材暴露于控制量的 UV 辐射以聚合或交联剩余的烯键式不饱和的可自由基聚合的基团，并引入

具有亲电基团的接枝单体，以及 6）使具有接枝亲电基团的基材接触式 I 和 / 或 II 的配体化合物，其中步骤 2 或 4 中的至少一者包括具有亲电基团的接枝单体。

[0082] 关于该方法的另外的参考可见于受让者的共同待审的申请 U.S.2009/0098359，将该申请以全文引用方式并入本文。

[0083] 电离辐射接枝方法涉及用电离辐射照射基材的表面以在此表面上（单体在其上被接枝）制备自由基反应位点。“电离辐射”意指剂量和能量足以导致在基础基材的表面上形成自由基反应位点的辐射。电离辐射可包括 β、γ、电子束、x 射线和电磁辐射的其他形式。在某些情况下，电晕辐射可为具有足够高的能量的辐射。该辐射具有足够高的能量，使得当被基础基材的表面吸收时，足够的能量被转移到该载体以导致在该载体中化学键的裂解以及在该载体上导致形成自由基位点。

[0084] 高能辐射剂量以千戈瑞 (kGys) 计量。剂量可以期望水平的单剂量或以累积至期望水平的多剂量来施用。取决于辐射源，剂量可累积地在约 1kGys 至约 100kGys 范围内。一般来讲，电子束剂量高于 γ。优选地，当使用电子束时，对于耐辐射损伤的基材，累积剂量超过 30kGys。当使用 γ 辐射时，对于所有聚合物，在 3 至 7kGys 范围内的剂量通常是可接受的。

[0085] 对于该接枝方法，优选电子束和 γ 辐射，因为其商业来源易于获得。电子束发生器可从多种来源商购获得，包括得自 Energy Sciences, Inc.(Wilmington, MA) 的 ESI “ELECTROCURE”EB SYSTEM 和得自 PCTEngineered Systems, LLC(Davenport, IA) 的 BROADBEAM EBPROCESSOR。γ 放射的来源可商购自 MDS Nordion，其使用钴 -60 高能源。对于任何指定部分的装置和辐射样品位置，释放的剂量可根据名称为“Practice for Use of a Radiochromic Film Dosimetry System”（放射性铬膜剂量测定系统使用规范）的 ASTM E-1275 来测量。通过改变源强度和面积传播 (area spread)，可获得各种剂量率。

[0086] 辐射接枝方法的进一步的细节可见于受让人的 U.S.2007/0154703(Waller 等人)，将该专利以全文引用方式并入本文。

[0087] 在一个实施例中，该方法提供了一种具有接枝配体官能化表面的制品，包含接枝官能团与一种或多种配体单体的反应产物。制备配体官能化基材的方法改变了多孔基础基材的初始性质，因为接枝的物质包括配体基团。本发明使得具有基础基材的许多优点（例如机械和热稳定性、多孔性），但具有对生物分子（例如病毒）的增强的结合特异性（其由用于形成给定官能化基材的单体和步骤造成）的配体官能化基材的形成成为可能。本发明可降低或消除与由亲水性聚合物形成的多孔基础基材相关的许多已知问题，这些问题包括但不限于湿膨胀问题；未润湿条件下的脆性问题；机械强度弱；以及差的抗溶剂、抗腐蚀性和 / 或抗酸性能力。

[0088] 在一个实施例中，具有任选的亲水性基团的接枝单体可用于为疏水性基础基材（如 PVDF 基材）赋予亲水性特性。这些接枝单体可具有亲水聚环氧烷基团。

[0089] 或者，任选的接枝单体可任选含有离子基团。在这些情况中，用可含有接枝的丙烯酸酯基团或非丙烯酸酯聚合型基团和亲水基团（如季铵基团）的单体赋予亲水性。此类离子基团还可通过排斥在合适的 pH 下具有类似电荷如离子基团的生物物质而为官能化基材赋予增强的选择性。

[0090] 配体官能化的多孔基材特别适合作为用于从生物样品选择性地结合和去除病毒

（如内源或外来病毒）的过滤介质。当配体接枝到基础基材（直接或间接接枝），该配体官能化基材是耐用的。本发明然后进一步提供了从含病毒样品（例如生物样品）移除病毒的方法，该方法包括使样品接触本文所述的配体官能化基材。

[0091] 对置于溶液中的中性病毒，当该溶液包含 0 至约 50mM 的盐时，使样品与病毒捕获膜接触足够的时间以得到至少 1.0 的对数减少值 (LRV)，优选地，对于置于溶液中的中性病毒，当该溶液包含 0 至约 100mM 的盐时，得到至少 1.0 的对数减少值 (LRV)，更优选地，对于置于溶液中的中性病毒，当该溶液包含 0 至约 150mM 的盐时，仍然得到至少 1.0 的对数减少值 (LRV)。还更优选的是，对于置于溶液中的中性病毒，当该溶液包含 0 至约 50mM 的盐时，使溶液与病毒捕获膜接触足够的时间以得到至少 5.0 的对数减少值 (LRV)，优选地，对于置于溶液中的中性病毒，当该溶液包含 0 至约 100mM 的盐时，得到至少 5.0 的对数减少值 (LRV)，更优选地，对于置于溶液中的中性病毒，当该溶液包含 0 至约 150mM 的盐时，仍然得到至少 5.0 的对数减少值 (LRV)。术语中性病毒用于表示等电点 (pI) 约为 7，或任选地标称为 6 至 8 之间的任何病毒。或者，可使用术语“近中性”。样品溶液 pH 为使得病毒为带负电的。

[0092] 在盐的存在下的病毒清除率（称为“耐盐性”）的重要性在于生物医药制造中所用的许多处理溶液的电导率在 15-30mS/cm 的范围内。耐盐性相比于常规 Q 配体 (AETMA，2- 氨基乙基三甲基氯化铵）进行测量，该常规 Q 配体在电导率低于目标范围三到六倍时快速失去对一些病毒（例如φX174）的捕获能力，例如当 NaCl 浓度从 0 升高到 50mM 时，病毒清除率从六个对数减少值 (LRV) 降低至一个对数减少值 (LRV)。诸如φX174和 PM2 之类的病毒具有接近 7 的 pI（φX174的 pI：6.6；PM2 的 pI：7.3；脊髓灰质炎病毒 1 型的 pI：7.5(Brunhilde 菌株)），并为中性或近中性。

[0093] 在许多实施例中，基材可被官能化，使得其他蛋白质从配体官能化基材被排除或排斥，而病毒和其他带负电的物质（如宿主细胞蛋白质、DNA 等）结合至配体官能团。另外，如上文描述的，可将该基材直接或间接接枝有一种或多种离子单体。具体地讲，该多孔基材可包含在所选的生物样品溶液 pH 下带正电的接枝离子基团，以产生对蛋白质（例如单克隆抗体，它们中的许多在中性 pH 下带正电）的静电排斥。

[0094] 可通过增加配体的 pKa，或接枝另外的带正电的官能团，以及调节溶液的 pH，使得 mAb 和配体在上样时都带正电，从而实现对蛋白质结合（如 mAb 结合）的抑制。这引起配体和基材的表面对 mAb 的静电排斥。相反，病毒通常带负电并结合至配体。大多数治疗性 mAb 往往具有 8 和 10 之间的 pI。因此，mAb 在中性 pH 下是带正电的，这防止它们结合到基材的表面。在另一方面，病毒可具有多种 pI，且许多具有 7 以下的 pI。因此，样品溶液的 pH 应保持在所关注蛋白质（如 mAb) 的等电点以下和病毒的等电点以上。

[0095] 根据上述标准和结果来选择本文的配体和其他接枝官能团，即，其为耐盐的并具有高 pKa（例如＞ 10)，从而引起 mAb 的静电排斥。将配体固定到多孔膜上，含病毒流体流穿过膜而病毒被配体捕获。

[0096] 在一些实施例中，含有结合的病毒的接枝制品是一次性的。在此类实施例中，优选地，病毒与过滤介质的结合基本上是不可逆的，因为不需要回收结合的病毒。然而，可通过增加洗脱液的离子强度来逆转病毒的结合。相反，在蛋白质结合的许多情况中，此结合现象必须是可逆的或所需蛋白质不能从柱上洗脱。

[0097] 用于病毒捕获的基材可以是任何前文所描述的基材，但优选是微孔膜。期望的膜

孔径为 0.1 至 10μm，优选为 0.5 至 3 微米，最优选为 0.8 至 2 微米。对于内孔结构，具有高表面积的膜是可取的，其通常对应于细小孔径。然而，如果孔径太小，则膜往往被存在于样品溶液中的细小颗粒堵塞。

[0098] 如果需要，可通过使用多个堆叠的、配体官能化多孔膜作为过滤元件来改善病毒结合和捕获的效率。因此本发明提供一种过滤元件，其包括一层或多层多孔配体官能化基材。各个层可以相同或不同，并且可具有不同孔隙度和上述单体的接枝度的层。过滤元件还可包括上游预过滤层和下游支承层。根据需要，各个过滤元件可以是平面的或折叠的。

[0099] 合适的预过滤器和支承层材料的例子包括多孔膜：聚丙烯、聚酯、聚酰胺、树脂粘合的或无粘合剂的纤维（例如玻璃纤维）以及其他合成材料（织造或非织造羊毛结构）的任何合适的多孔膜；烧结的材料，例如聚烯烃、金属和陶瓷；纱线；专用滤纸（例如纤维、纤维素、聚烯烃和粘合剂的混合物）；聚合物膜，等等。

[0100] 在另一个实施例中，提供了一种滤筒，其包括上述过滤元件。在另一个实施例中，提供一种过滤组件，其包括过滤元件和过滤壳体。在又一实施例中，本发明涉及一种病毒捕获的方法，其包括如下步骤：a) 提供包括本公开的配体官能化基础基材的一层或多层的过滤元件，以及 b) 使含有病毒的移动生物溶液冲击在过滤元件的上游表面上足够的时间以实现病毒的结合。

[0101] 上文描述了本发明，下面以举例的方式进一步说明本发明，这些实例不应当以任何方式被解释为对本发明的范围的强制限制。相反，应当清楚地理解，可以诉诸多种其他实施例、修改形式及其等同物，在本领域内的技术人员阅读本文的具体实施方式后，在不脱离本发明的精神和 / 或所附权利要求的范围的前提下，这些其他实施例、修改形式及其等同物将不言自明。

[0102] 实例

[0103] 材料：

[0104] M_w 为约 25,000 的聚乙烯亚胺购自 Alpha Aesar(Ward Hill，MA)。

[0105] M_w 为约 25,000 的聚六亚甲基双胍购自 Arch Chemical(South Plainfield，NJ)。

[0106] 孔径为 0.45μm，直径为 25mm 且平均厚度为 180μm 的再生纤维素 (RC) 盘以 184 型获自 Sartorius，Germany。

[0107] PVDF 膜；TIPS（热致相分离）多孔膜，0.1mm(5 密耳）厚，具有约 4.5sec/50cc 空气的格利（空气流），泡点孔径为约 1.9 微米，1.4μm 平均孔径，72％多孔，水通量时间为约 10sec（使用 100mL 水，47mm Pall Gelman 过滤漏斗 4238，在 23Hg 真空下）。可参考 U.S.7,338,692(Smith 等人）。

[0108] “VAZPIA”指的是根据 U.S.5,506,279(Babu 等人）的实例 1 制得的 2- 丙烯酰甘氨酸、2-(4-(2- 羟基 -2 甲基丙酰）苯氧基）乙酯。

[0109] “PEG 400 二丙烯酸酯”指聚乙二醇的二丙烯酸酯，分子量 400，Aldrich Chemical Co。

[0110] 膜测试：

[0111] 染料分析：

[0112] 通过与带负电的橙色染料反应以比色测定法测试用胺配体衍生化的 RC 膜的相对离子容量。将 Tropaeolin O(Acros，Geel，Belgium) 溶解于 66％ (v/v) 的乙醇中至 0.5mg/

mL 的浓度。RC 膜在 20％的乙醇中冲洗，然后于 22℃在 Tropaeolin O 溶液中温育 4 小时。然后从染料溶液中移出膜，并用 20％的乙醇彻底洗涤以去除未结合的染料。使用空白 RC 膜作为对照物以消除任何潜在的非特异性结合的影响。最后，使用 ColorQuest 色度计 (HunterLab，Reston，VA) 测量染色膜的颜色 (a^*)。

[0113] 牛血清白蛋白的结合：

[0114] 通过以下步骤分析该膜的蛋白质结合：将测试分析物的溶液通过 6 层膜叠堆，该膜叠堆被打孔成 25mm 直径的圆盘并置于附接到 AKTA 色谱系统 (GE Healthcare，NY) 的 25mm 直径的夹持器上。通过将牛血清白蛋白 (BSA) 溶解于 50mM bisTris 缓冲液 pH 6 至 0.2mg/mL 的浓度（通过在 280nm 处的吸光度确定）而制得进料溶液。以 5mL/min 的流量将 BSA 进料溶液泵送穿过膜吸附器直至通过在 280nm 处的吸光度观察到完全渗透。使用标准色谱技术评估膜的动态结合容量。

[0115] 病毒捕获的测定：

[0116] 使用在“PDA Technical Report 41(TR41)，Virus Filtration”(PDA 技术报告 41(TR41)，病毒过滤）中描述的在食品和药品管理局开发的标准方案来测量病毒捕获。测试病毒是噬菌体**φX174. A**。制备标准母液，该标准母液含有在 pH 7.5 的 10mM TRIS-HCl 缓冲液中的 10^9 至 10^{12}pfu/ml（空斑形成单位）并具有 0、50 和 150mM 的 NaCl 浓度。如上文所述使该母液液流过膜叠堆。在上样过程中，以 5mL/min 的流量将 50mL 测试溶液 (challengesolution) 泵送穿过膜吸附器，每 10ml 收集流过样品。用分段收集器以 1ml 的级分收集流出物。对应于透过膜的 10ml、20ml、30ml、40ml 和 50ml 的总通过量的级分被取走并进行若干次十倍稀释。对病毒母液也进行类似的系列稀释。然后将稀释的级分与大肠杆菌溶液培养并接种于琼脂平板上，同时添加由胰酶大豆肉汤组成的生长培养基。将倒转的平板培养过夜，然后对菌斑进行计数。由已知的对应稀释系数以及噬菌体的初始浓度来估计 LRV（或病毒载量的对数减少）并使用公式 (1) 进行计算：

[0117]

$$LRV = \log_{10}\left(\frac{\text{滴度}_{\text{测试物}}(pfu/mL)}{\text{滴度}_{\text{样品}}(pfu/mL)}\right) \qquad (1)$$

[0118] 实例 1 和 2

[0119] 部分 A：具有接枝的亲电基团的基材膜的制备：

[0120] 通过如下方法实现含胺配体接枝至 RC 基础膜。首先，通过在 22℃下在 5％的烯丙基缩水甘油基醚（作为接枝化合物）在 30％氢氧化钠中的溶液中使膜反应过夜而活化纤维素基材上的羟基。通过使用 10g/L 的 N- 溴代琥珀酰亚胺溶液溴化 2 小时将共价结合的烯丙基转化为亲电性溴基团。

[0121] 部分 B：官能团在活化的膜上的接枝：

[0122] 在部分 A 中制得的膜上的接枝的溴基团通过亲核取代被胺配体取代，其中溴化的膜与胺配体溶液在 22℃下反应 2 天以确保高的胺取代量。配体溶液如下：对于聚乙烯亚胺 (PEI) 和聚六亚甲基双胍 (PHMB)，为 pH11 的水溶液中的 10％ (w/w) 固体。在三种盐含量下的 BSA 容量和 ΦX174LRV 清除示于表 1 中。

[0123] 表 1：

[0124]

配体	BSA 容量 (mg/mL)	ΦX174LRV		
		0mM NaCl	50mM NaCl	150mM NaCl
PHMB	8 ± 1	8.8 ± 0.3	8.5 ± 0.9	7.1 ± 0.1
PEI	6.1 ± 0.6	8.7 ± 0.3	6.1 ± 0.4	5.8 ± 0.8

[0125] [1] 数值报道为平均值 ±SD，n = 2。

[0126] 实例 3

[0127] 使 PVDF 多孔基材吸入含有可以 PA SR-344™ 得自 Exton 的 SartomerInc 的 10.0wt.％ PEG 400 二丙烯酸酯单体和 90.0wt.％甲醇的溶液。然后将涂布的多孔基材‘湿’放置于两层厚度为约 100 微米的 PET 膜（第一层和第二层）之间。将可移除的第一层和可移除的第二层的每一者置于涂布的多孔基材的相对面上，并且用手持式橡胶辊挤出过量的溶液和夹带的气泡。将该多层结构在载体网上传送穿过电子束。用电压设定为 300keV 且剂量为 20kGy 的 ESI CB-300 电子束上的电子束照射该多层结构。在照射后 2 分钟，从所述第一和第二 PET 层移出亲水性官能化多孔基材。将该膜浸入一托盘水中，使其与 DI 水交换三次以清洗膜中未反应的单体，并随后进行风干。

[0128] 在含有在 20％的 DI 水和 70％的甲醇中的 10.0％乙烯基二甲基吖内酯 - 烯丙基胺加合物的溶液中涂布该亲水性 PVDF 多孔基材。使所述溶液填充的膜再次经受电压设定为 300keV，剂量为 40kGy 的电子束，其也将该单体接枝至 PVDF 基材的表面。在 2 分钟之后，打开 PET 层叠物，将接枝的 PVDF 膜浸入一托盘水中，使其与 DI 水交换三次中以清洗膜中未反应的单体，并随后进行风干。除了接枝的 PEG 二丙烯酸酯之外，据信乙烯基二甲基吖内酯 - 烯丙基胺加合物 $CH_2=CH-(CO)NHC(CH_3)_2(CO)NH-CH_2-CH=CH_2$ 可直接接枝至基材的表面；即：基材 $-CH_2CH_2-(CO)NHC(CH_3)_2(CO)NH-CH_2-CH=CH_2$，从而提供用于转化为亲电性末端溴基团（$-CH_2CH_2CH_2Br$ 和 / 或 $-CH_2CHBrCH_3$）以随后与配体化合物反应的末端烯丙基。当接枝时，也可聚合二甲基吖内酯 - 烯丙基胺加合物以制得具有多个悬垂 $-(CO)NHC(CH_3)_2(CO)NH-CH_2-CH=CH_2$ 基团（其也可转化为末端溴基团）的接枝的丙烯酸酯聚合物。所述二甲基吖内酯 - 烯丙基胺加合物也可与任何来自 PEG 二丙烯酸酯的未反应的丙烯酸酯基团聚合。

[0129] 将烯丙基官能化的 PVDF 膜的 15.2cm×17.7cm(6 英寸 ×7 英寸）样品置于 500mL 聚乙烯瓶中，并用 500mL 的 N- 溴代琥珀酰亚胺在去离子水中的 10 克 /L 溶液覆盖。将瓶子密封，并在环境温度下静置过夜。倒掉过量的溶液，在去离子水流下清洗膜 30 分钟。然后用聚乙烯亚胺 (PEI) 在去离子水中的 10 重量％的溶液填充所述瓶子，将瓶子密封，在环境温度下来回翻滚该混合物 4 天。倾析出过量的溶液，将瓶子充满去离子水，静置 30 分钟，再次倾析。该过程重复另外 4 次直至完全清洗衍生化的膜，然后使所述膜风干。

[0130] 实例 4

[0131] 如下实例使用在申请人的共同待审的申请 U.S.2009/0098359（将其以全文引用方式并入本文）中描述的一般程序。

[0132] 使 PVDF 多孔基材吸入含有可以 SR-344™ 得自 Exton 的 Sartomer Inc. 的 10.0wt.％ PEG 400 二丙烯酸酯单体和 90.0wt.％甲醇的溶液。然后将涂布的多孔基材‘湿’放置于两层厚度为约 100 微米的 PET 膜（第一层和第二层）之间。将可移除的第一层和可移除的第二层的每一者置于涂布的多孔基材的相对面上，并且用手持式橡胶辊挤出过量的溶液和夹带的气泡。将该多层结构在载体网上传送穿过电子束。用电压设定为 300keV 且

剂量为 20kGy 的 ESI CB-300 电子束上的电子束照射该多层结构。在照射后 2 分钟，从所述第一和第二 PET 层移出亲水性官能化多孔基材。将膜浸入一托盘水中，使其与 DI 水交换三次以清洗膜中未反应的单体，并随后进行风干，以制得具有接枝的亲水性聚环氧乙烷基团的基材。

[0133] 将包含 1％ VAZPIA 光引发剂和 5％ 3-(丙烯酰氧基)-2-羟基丙基甲基丙烯酸酯 (Ac-Mac) 的两个官能化自由基可聚合的活性单体在甲醇中合并以制得涂布溶液，使用相同的程序将该涂布溶液吸入至步骤 1 的亲水性 PVDF 膜中。使所述溶液填充的膜再次经受电压设定为 300keV，剂量为 40kGy 的电子束，其也将这些单体接枝至 PVDF 基材的表面。在 2 分钟之后，打开 PET 层叠物，然后使接枝的 PVDF 膜风干且不清洗，从而制得具有接枝的光引发剂基团和接枝的甲基丙烯酸酯基团的膜。

[0134] 使用电子束方法优选将具有更快反应的丙烯酸酯单体部分的 Ac-Mac 接枝至载体表面。这使得 AC-Mac 的大部分较慢的甲基丙烯酸酯部分为自由的，以用于随后的使用 UV 法的聚合。在步骤 2 中也接枝光引发剂 VAZPIA。因此，这些接枝的链具有在相同链上的自由基活性部分和光引发剂部分。在第三官能化步骤中，将含有在 20％ DI 水和 70％甲醇中的 10.0％乙烯基二甲基吖内酯－烯丙基胺加合物的涂布溶液吸入至步骤 1&&2 的接枝的 TIPS PVDF 微孔膜。再次将该多孔膜‘湿’夹在 PET 膜之间并封闭，任何过量的溶液或夹带的气泡用辊去除。然后使用 Quantum Technologies(Quant 48) 系统使用 UVA 灯 UV 照射样品，样品在 UV 处理器下以约 30.4cm(1 英尺)/ 分钟 (121.9cm(4 英尺) 曝光长度，单侧在 31mW/cm^2) 的速度运行。翻转样品层叠物，并以相同速度再次运行。在 UV 辐射之后，从层叠物移出接枝的多孔膜，通过将该接枝的多孔膜浸入一托盘水内并使其与清水交换三次而将其清洗。让该官能化膜风干。所得膜具有接枝于基材的表面的接枝的二甲基吖内酯－烯丙基胺加合物基团。这种接枝可通过由接枝的光引发剂单体或由接枝的 AcMac 单体的甲基丙烯酸酯基团产生的自由基而引发。再次，二甲基吖内酯－烯丙基胺加合物可制得具有悬垂的来自每个丙烯酸酯聚合物单元的 $-(CO)NHC(CH_3)_2(CO)NH-CH_2-CH=CH_2$ 基团的接枝的丙烯酸酯聚合物。

[0135] 根据实例 3 的程序，用 PEI 接枝烯丙基官能化 PVDF 膜的 15.2cm×17.7cm(6 英寸 ×7 英寸) 样品。

[0136] 实例 5-6

[0137] 使 PVDF 多孔基材吸入含有 10.0wt.％的 PEG 400 二丙烯酸酯单体 SR-344™ 和 90.0wt.％的甲醇的溶液。然后将涂布的多孔基材‘湿’放置于两层厚度为约 100 微米的聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 膜 (第一层和第二层) 之间。将可移除的第一层和可移除的第二层的每一者置于涂布的多孔基材的相对面上，并且用手持式橡胶辊挤出过量的溶液和夹带的气泡。将该多层结构在载体网上传送穿过电子束。用电压设定为 300keV 且剂量为 20kGy 的 ESI CB-300 电子束上的电子束照射该多层结构。在照射后 2 分钟，从所述第一和第二 PET 层移出亲水性官能化多孔基材。将该膜浸入一托盘水中，使其与去离子水交换两次以清洗膜中未反应的单体，并随后进行风干。

[0138] 然后通过两个交替程序的每一个第二次接枝所得亲水性膜：

[0139] 直接。将膜再次层叠，吸入甲基丙烯酸缩水甘油酯在甲醇中的 20％溶液，并使其通过电子束，在 300kV 的加速电压下接收 40kGy 的剂量。移出接枝膜，在异丙醇中清洗两次并

干燥。

[0140] 间接。将膜插入手套箱中的封口袋中，并在小于 40ppm 氧的气氛下密封。从手套箱移出密封袋并使其通过电子束，在 300kV 电压下接收 40kGy 的剂量。将该密封袋再送入手套箱中，在小于 40ppm 氧的气氛下打开，移出膜并将其置入另一未照射的封口袋中，吸入足够的 20％甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 在甲醇中的溶液以润湿该膜。密封该袋以防止蒸发，在将膜移出并在异丙醇中清洗两次并干燥之前，使吸液的膜静置 4 小时的时间。

[0141] 通过与 PEI 在去离子水中的 10 重量％溶液反应 24 小时，使环氧乙烷官能化的 PVDF 膜的大约 15.2cm×17.7cm(6 英寸 ×7 英寸) 的样品与 PEI 反应，然后如实例 3 所述清洗并进行风干。

[0142] 存 150mM NaCl 下的 ΦX174 清除

[0143]

实例	说明	ΦX174LRV
3	PEI/VDM 烯丙基	8.0
4	PEI/VDM 烯丙基	8.1
5	PEI/GMA(间接)	6.3
6	PEI/GMA(直接)	8.2

[0144] 50mL 级分的 LRV 结果