



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103406111 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201310380649. 6

(22) 申请日 2013. 08. 28

(71) 申请人 天津优纳斯生物科技有限公司

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区
第四大街5号生物医药研发大厦A座
416室

(72) 发明人 欧来良 王为超 俞耀庭

(74) 专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限公司
12002

代理人 侯力

(51) Int. Cl.

B01J 20/26 (2006. 01)

B01J 20/28 (2006. 01)

B01J 20/30 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

用于血液灌流去除内毒素的吸附剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及用于血液灌流去除内毒素的吸附剂及其制备方法。该吸附剂以多孔球形合成高分子材料聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物为载体,该载体具有刚性的结构、大的孔径和亲水性的表面;配基为脂肪族二胺,载体经活化后以共价键的方式与配基偶联。该吸附剂制备简单、稳定性好、配基含量高和具有良好的血液相容性。该吸附剂在血液净化中以血浆或全血灌流的方式使用来去除患者血液中过高含量的内毒素。

1. 用于血液灌流去除内毒素的吸附剂,其特征在于是由刚性、多孔和亲水性的合成高分子材料聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物为载体,固定小分子脂肪族二胺作为吸附剂的亲和配基构成。

2. 根据权利要求1所述的吸附剂,其特征在于所用的合成高分子材料载体为球形,粒度为50-250 μm;功能基团为羟基,含量为80-500 μmol/ml。

3. 根据权利要求1所述的吸附剂,其特征在于载体材料具有多孔和大孔结构,孔隙率为40-85%,平均孔径为30-200nm。

4. 根据权利要求1所述的吸附剂,其特征在于所述的配基小分子脂肪族二胺的一个伯氨基和载体连接,另一个伯氨基作为亲和基团,配基固定量为60-400 μmol/ml。

5. 根据权利要求4所述的吸附剂,其特征在于所述的配基小分子脂肪族二胺的脂肪链长度为2-10个碳原子。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的吸附剂,其特征在于所述的载体材料聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物微球是以乙酸乙烯酯为单体、以三烯丙基异氰尿酸酯为交联剂,通过自由基引发悬浮聚合制备的;所述的单体和交联剂的重量比为0.5-8:1,所述的功能基团是通过共聚物微球的醇解反应获得的。

7. 一种权利要求1所述的用于血液灌流去除内毒素的吸附剂的制备方法,其特征包含以下的步骤:

第1、高分子载体材料的合成

第1.1、聚合:单体乙酸乙烯酯、交联剂三烯丙基异氰尿酸酯、致孔剂乙酸乙酯和正庚烷混合均匀,加入适量引发剂偶氮二异丁腈,溶解后加入含聚乙烯醇和氯化钠的水溶液,调整搅拌速度使液滴均匀分散,升温引发聚合,保温固化,过滤,乙醇充分洗涤后晾干,得到共聚物微球;

第1.2、醇解:将上述共聚物微粒加入到氢氧化钠甲醇溶液中,进行酯交换反应,反应完成后抽滤,用甲醇充分洗涤,晾干,得到合成高分子载体材料聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物微球;

第2、载体活化

用已知的试剂和方法对载体进行活化,如环氧氯丙烷和戊二醛等,但不限于这些;

活化后洗涤干净;

第3、固定配基

活化后的载体和2-10倍量载体体积的脂肪族二胺配基在30-80℃下进行反应,然后用纯水洗涤干净。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在第1步载体合成的具体操作是:

在单体乙酸乙烯酯和交联剂三烯丙基异氰尿酸酯以重量比为0.5-8:1的混合体系中,分别按体积质量比加入混合体系0.2-8倍的混合致孔剂和质量比0.05-0.5倍的自由基引发剂,搅拌溶解,升温至30-50℃,按体积质量比再加入混合体系5-30倍含质量份数0.2-5%的聚乙烯醇和含质量份数0.5-10%的氯化钠的水溶液,搅拌使均匀分散,升温至60-80℃,聚合1-5h,升温至70-90℃,聚合1-5h,过滤,分别用水和乙醇洗涤,干燥,得到共聚物微球;将微球加入到氢氧化钠甲醇溶液中进行醇解,完毕后用甲醇洗涤,干燥。

9. 权利要求1所述的吸附剂的应用,用于体外血浆或全血灌流,用于去除患者血液中含有过高的内毒素。

用于血液灌流去除内毒素的吸附剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域。涉及用于血液灌流去除内毒素的吸附剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 内毒素(ET)是一种毒性极强的致炎和热源物质,是一种脂多糖(LPS)。内毒素的化学结构比较复杂,本质上由三部分构成:多糖 O- 特异性抗原、核心多糖和类脂 A,其中类脂 A 由磷酸葡萄糖胺双糖和长链脂肪酸组成,被认为是内毒素的生物活性中心。

[0003] 内毒素是由革兰氏阴性菌细胞死亡时细胞壁释放,进入血液后即形成内毒素血症,可见于临床上的多种过程,如严重创伤、大面积烧伤、重度炎症等,具有高致死率(40%-90%),若治疗不及时会进一步导致全身炎症反应综合症(SIRS)、多器官功能不全综合症(MODS)甚至多脏器功能衰竭(MOF)。目前临床上尚未有行之有效的治疗内毒素血症的手段,但研究表明抑制内毒素的活性或有效降低血液中内毒素的含量能明显减轻机体对细菌感染的一系列反应,进而提高存活率。

[0004] 血液灌流技术可有效去除血液中的毒素和致病物质,在一些疾病的临床治疗上已经有了广泛的应用。多粘菌素 B 为配基的血液灌流吸附剂已经用于临床去除血液中含量过高的内毒素,国内外学者也进行了较多的此方面研究。

[0005] 如 200810028948. 2、ZL03144383. 4、200510046452. 4 等中国发明专利分别以球形多孔纤维素、壳聚糖、琼脂糖凝胶为载体,经活化后固定内毒素亲和配基制成吸附剂,体外吸附效果良好。此吸附剂载体材料为天然高分子材料,虽然这类材料具有天然的亲水性,血液相容性良好,凝胶材料孔隙率和孔径较大有利于大分子内毒素的吸附,但这类材料强度普遍很差,化学稳定性也不好,不利于灭菌和储存,给实际应用带来很大的麻烦。

[0006] 200180040297. 9、201310161110. 1 等中国发明专利分别公开了以聚苯乙烯-二乙烯苯共聚物为疏水性载体,固定或非共价结合亲和配基制成内毒素吸附剂。此材料机械强度高、化学性能稳定,利于储存和灭菌,活性基团含量高,可固定或结合更多的配基,表面的疏水性也有利于内毒素的吸附等优点,但其过高的疏水性特点会吸附血液中大量的有益组分,血液相容性普遍不好,且此树脂制备过程中需用到有毒害有机溶剂,处理不好的话风险很大。

[0007] 201110113987. 4 号中国发明专利公开了一种以琼脂凝胶为载体经活化后偶联分子簇骨架聚赖氨酸或聚天冬氨酸,然后通过缩合反应接枝小分子赖氨酸或甜菜碱作为亲和配基制成吸附剂,在体外静态条件下对人血清中内毒素的吸附率最高可达 65. 01%。此吸附剂采用先固定分子簇再在分子簇上接枝小分子作为配基以提高配基含量,但分子簇为大分子,本身能固定到载体上的量很低,且制备过程复杂,价格昂贵。

[0008] 多粘菌素 B 为内毒素较为特异性的亲和配基,被研究和应用较多,但多粘菌素 B 有潜在的肾脏和神经毒性,应考虑固定到载体上的方式,共价连接会降低配基的生物活性,非共价连接则有配基泄漏的风险。相比来说小分子配基则有更好的安全性。

[0009] 优秀的血液灌流吸附剂应该有(1)良好的机械强度和物理化学稳定性,以利于承受灌流时的压力、配基和微粒不易脱落、便于储存和灭菌;(2)良好的孔结构,以利于致病因子进入吸附剂内部完成吸附;(3)优异的血相容性,体现在材料上是有一定的亲水性,不吸附或破坏血液中其他组分;(4)一定的吸附特异性,特异性的吸附致病因子;(5)制备工艺简单,以降低生产和使用成本。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于克服现有技术存在的上述不足,提供一种新的用于血液灌流去除内毒素的吸附剂及其制备方法。

[0011] 本发明提供的用于血液灌流去除内毒素的吸附剂是以刚性、多孔和亲水性的球形合成高分子材料聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物为载体,固定小分子脂肪族二胺作为吸附剂的亲和配基构成。

[0012] 所述的载体材料为球形,粒度为 50-250 μm ;载体材料为刚性,有较高的机械强度;有可供反应的活性基团,具体为羟基,能保证材料有良好的亲水性和血液相容性,羟基含量 80-500 $\mu\text{mol/ml}$;载体材料为多孔结构,孔径大小可以保证内毒素分子自由进入,孔隙率为 40%-85%;载体材料还具有大孔结构,平均孔径为 30-200nm,优选 50-150nm。

[0013] 所述的吸附剂的配基为小分子脂肪族二胺类配基,两个伯氨基中的一个作为与载体结合的活性位点,另一个作为内毒素的亲和配基,配基固定量为 60-400 $\mu\text{mol/ml}$,配基脂肪链的长度宜为 2-10 个碳原子,优选 2-6 个碳原子。

[0014]

本发明提供的用于血液灌流去除内毒素的吸附剂的制备方法包括以下步骤:

第 1、高分子载体材料(聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物)的合成

第 1.1、聚合:单体乙酸乙烯酯、交联剂三烯丙基异氰尿酸酯、致孔剂乙酸乙酯和正庚烷混合均匀,加入适量引发剂偶氮二异丁腈,溶解后加入含聚乙烯醇和氯化钠的水溶液,调整搅拌速度使液滴均匀分散,升温引发聚合,保温固化,过滤,乙醇充分洗涤后晾干,得到共聚物微球;

第 1.2、醇解:将上述共聚物微粒加入到氢氧化钠甲醇溶液中,进行酯交换反应(或称醇解反应),反应完成后抽滤,用甲醇充分洗涤,晾干,得到合成高分子载体材料聚乙烯醇-三烯丙基异氰尿酸酯共聚物;

第 2、载体活化

用已知的试剂和方法对载体进行活化,如环氧氯丙烷和戊二醛等,但不限于这些。活化后洗涤干净;

第 3、固定配基

活化后的载体和 2-10 倍量载体体积的脂肪族二胺配基在 30-80 $^{\circ}\text{C}$ 下进行反应,然后用纯水洗涤干净。

[0015] 本发明所述第 1 步载体合成的具体操作是:

在单体乙酸乙烯酯和交联剂三烯丙基异氰尿酸酯以重量比为 0.5-8:1 的混合体系中,分别按体积质量比加入混合体系 0.2-8 倍的混合致孔剂和质量比 0.05-0.5 倍的自由基引发剂,搅拌溶解,升温至 30-50 $^{\circ}\text{C}$,按体积质量比再加入混合体系 5-30 倍(V/M)含质量份

数 0.2-5% 的聚乙烯醇和含质量份数 0.5-10% 的氯化钠的水溶液, 搅拌使均匀分散, 升温至 60-80℃, 聚合 1-5h, 升温至 70-90℃, 聚合 1-5h, 过滤, 分别用水和乙醇洗涤, 干燥, 得到微球; 将微球加入到氢氧化钠甲醇溶液中进行醇解, 完毕后用甲醇洗涤, 干燥。

[0016]

本发明载体材料和配基的偶联是通过文献可行的方法和反应条件偶联, 比如可以先将载体活化后固定配基, 也可以用双官能团偶联试剂来偶联载体和配基。

[0017] 为了在载体材料机械强度和基团含量之间达到平衡, 应控制载体材料制备原料单体和交联剂的比例, 本发明涉及的载体材料的制备原料单体和交联剂的重量比宜为 0.5-8:1, 优选 2-6:1。

[0018] 本发明涉及的吸附剂的配基固定量为 60-400 $\mu\text{mol/ml}$, 优选 80-200 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0019] 本发明涉及的吸附剂具有较高的机械强度和物理化学稳定性, 可采用常规的方法灭菌, 如湿热和射线等。

[0020] 本发明提供的吸附剂可用于血浆或全血灌流以去除患者血液中含有过高的内毒素来治疗内毒素血症相关疾病。

[0021]

本发明的优点和积极效果:

(1) 本发明提供的内毒素吸附剂相比以往的吸附剂具有更好的机械强度和物理化学稳定性, 易于灭菌和储存;

(2) 本发明提供的吸附剂的载体材料有类似聚乙烯醇的结构, 含有大量的羟基, 有良好的亲水性和血液相容性;

(3) 本发明提供的吸附剂的配基为小分子配基, 通过化学方法共价结合到载体材料上, 具有更好的安全性;

(4) 本发明提供的内毒素吸附剂的制备方法简单, 可靠, 可有效降低生产成本。

[0022]

具体实施方式

[0023] 以下结合实施例进一步说明本发明:

实施例 1

(1) 载体材料的制备

分别将 10g 乙酸乙烯酯, 20g 三烯丙基异氰尿酸酯, 3ml 乙酸乙酯和 3ml 正庚烷加入 500ml 三口烧瓶中, 升温至 40℃, 搅拌均匀后加入 0.3g 偶氮二异丁腈, 溶解后加入 1000ml 水溶液(含有 1.5% 的聚乙烯醇和 3% 的氯化钠), 调整搅拌速度使液滴均匀分散, 升温至 65℃, 保温聚合 1h, 然后升温至 75℃再维持 5h, 过滤得到白色球状共聚物, 水洗干净后用乙醇充分洗涤, 晾干。将上述共聚物微球加入到 12gNaOH 和 500ml 甲醇组成的溶液中, 在 40℃进行 18h 的酯交换反应(或称醇解反应), 反应完成后抽滤, 用甲醇洗涤, 晾干, 得到载体。羟基含量为 82 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0024] (2) 载体活化

10g 干燥的载体中加入 100ml 二甲基亚砜、80ml 环氧氯丙烷和 10ml 3mol/L 的 NaOH 溶液, 40℃下反应 5h, 抽滤, 用去离子水淋洗至中性, 其环氧值为 71 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0025] (3) 固定配基乙二胺配基

量取活化后的载体 10 ml, 吸干游离水, 加入 7.5 ml 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 并加入 20 ml 乙二胺, 32℃ 水浴振荡过夜, 反应完毕后用蒸馏水淋洗至中性。即得固定有乙二胺的吸附剂(吸附剂 1), 氨基含量为 66 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0026]**实施例 2****(1) 载体材料的制备**

分别将 20g 乙酸乙烯酯, 10g 三烯丙基异氰尿酸酯, 15ml 乙酸乙酯和 15ml 正庚烷加入 500ml 三口烧瓶中, 升温至 40℃, 搅拌均匀后加入 0.3g 偶氮二异丁腈, 溶解后加入 450ml 水溶液(含有 1.5% 的聚乙烯醇和 3% 的氯化钠), 调整搅拌速度使液滴均匀分散, 升温至 65℃, 保温聚合 2h, 然后升温至 75℃ 再维持 3h, 过滤得到白色球状共聚物, 水洗干净后用乙醇充分洗涤, 晾干。将上述共聚物微球加入到 12gNaOH 和 500ml 甲醇组成的溶液中, 在 40℃ 进行 18h 的酯交换反应(或称醇解反应), 反应完成后抽滤, 用甲醇洗涤, 晾干, 得到载体。羟基含量为 140 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0027] (2) 载体活化

10g 干燥的载体中加入 100ml 二甲基亚砷、90ml 环氧氯丙烷和 10ml 3mol/L 的 NaOH 溶液, 40℃ 下反应 5h, 抽滤, 用去离子水淋洗至中性, 其环氧值为 121 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0028] (3) 固定配基 1,4-丁二胺配基

量取活化后的载体 10 ml, 吸干游离水, 加入 7.5 ml 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 并加入 50 ml 1,4-丁二胺, 50℃ 水浴振荡过夜, 反应完毕后用蒸馏水淋洗至中性。即得固定有 1,4-丁二胺的吸附剂(吸附剂 2), 氨基含量为 102 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0029] 实施例 3**(1) 载体材料的制备**

分别将 24g 乙酸乙烯酯, 6g 三烯丙基异氰尿酸酯, 60ml 乙酸乙酯和 60ml 正庚烷加入 500ml 三口烧瓶中, 升温至 40℃, 搅拌均匀后加入 0.3g 偶氮二异丁腈, 溶解后加入 750ml 水溶液(含有 1.5% 的聚乙烯醇和 3% 的氯化钠), 调整搅拌速度使液滴均匀分散, 升温至 65℃, 保温聚合 5h, 然后升温至 75℃ 再维持 1h, 过滤得到白色球状共聚物, 水洗干净后用乙醇充分洗涤, 晾干。将上述共聚物微球加入到 12gNaOH 和 500ml 甲醇组成的溶液中, 在 40℃ 进行 18h 的酯交换反应(或称醇解反应), 反应完成后抽滤, 用甲醇洗涤, 晾干, 得到载体。羟基含量为 250 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0030] (2) 载体活化

10g 干燥的载体中加入 100ml 二甲基亚砷、90ml 环氧氯丙烷和 10ml 3mol/L 的 NaOH 溶液, 40℃ 下反应 5h, 抽滤, 用去离子水淋洗至中性, 其环氧值为 215 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0031] (3) 固定配基 1,6-己二胺配基

量取活化后的载体 10 ml, 吸干游离水, 加入 7.5 ml 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 并加入 50 ml 1,6-己二胺, 75℃ 水浴振荡过夜, 反应完毕后用蒸馏水淋洗至中性。即得固定有 1,6-己二胺的吸附剂(吸附剂 3), 氨基含量为 180 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0032] 实施例 4**(1) 载体材料的制备**

分别将 26.7g 乙酸乙烯酯, 3.3g 三烯丙基异氰尿酸酯, 60ml 乙酸乙酯和 60ml 正庚烷加入 500ml 三口烧瓶中, 升温至 40℃, 搅拌均匀后加入 0.3g 偶氮二异丁腈, 溶解后加入 750ml 水溶液(含有 1.5% 的聚乙烯醇和 3% 的氯化钠), 调整搅拌速度使液滴均匀分散, 升温至 65℃, 保温聚合 5h, 然后升温至 75℃再维持 1h, 过滤得到白色球状共聚物, 水洗干净后用乙醇充分洗涤, 晾干。将上述共聚物微球加入到 12gNaOH 和 500ml 甲醇组成的溶液中, 在 40℃进行 18h 的酯交换反应(或称醇解反应), 反应完成后抽滤, 用甲醇洗涤, 晾干, 得到载体。羟基含量为 335 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0033] (2) 载体活化

10g 干燥的载体中加入 100ml 二甲基亚砜、100ml 环氧氯丙烷和 10ml 3mol/L 的 NaOH 溶液, 40℃下反应 5h, 抽滤, 用去离子水淋洗至中性, 其环氧值为 286 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0034] (3) 固定配基 1, 10- 癸二胺配基

量取活化后的载体 10 ml, 吸干游离水, 加入 7.5 ml 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 并加入 100 ml 1, 10- 癸二胺, 78℃水浴振荡过夜, 反应完毕后用蒸馏水淋洗至中性。即得固定有 1, 10- 癸二胺的吸附剂(吸附剂 4), 氨基含量为 228 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0035] 实施例 5

(1) 载体材料的制备

分别将 26g 乙酸乙烯酯, 4g 三烯丙基异氰尿酸酯, 15ml 乙酸乙酯和 15ml 正庚烷加入 500ml 三口烧瓶中, 升温至 40℃, 搅拌均匀后加入 0.25g 偶氮二异丁腈, 溶解后加入 300ml 水溶液(含有 1.5% 的聚乙烯醇和 3% 的氯化钠), 调整搅拌速度使液滴均匀分散, 升温至 65℃, 保温聚合 5h, 然后升温至 75℃再维持 1h, 过滤得到白色球状共聚物, 水洗干净后用乙醇充分洗涤, 晾干。将上述共聚物微球加入到 12gNaOH 和 500ml 甲醇组成的溶液中, 在 40℃进行 18h 的酯交换反应(或称醇解反应), 反应完成后抽滤, 用甲醇洗涤, 晾干, 得到载体。羟基含量为 265 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0036] (2) 载体活化

10g 干燥的载体中加入 10% 的戊二醛溶液 50ml, 0.1mol/L 的 HCl 溶液 10ml, 40℃下反应 4h, 抽滤, 用去离子水淋洗至中性, 其醛基含量为 230 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0037] (3) 固定配基 1, 6- 己二胺配基

量取活化后的载体 10 ml, 吸干游离水, 加入 50 ml 1, 6- 己二胺, 40℃水浴振荡过夜, 反应完毕后用蒸馏水淋洗至中性。即得固定有 1, 6- 己二胺的吸附剂(吸附剂 5), 氨基含量为 198 $\mu\text{mol/ml}$ 。

[0038]

实施例 6

取上述五种吸附剂适量, 湿热灭菌后用氯化钠注射液淋洗干净, 精确量取 2.0ml 于 25ml 去除热源的锥形瓶中, 加入 10ml 受内毒素污染的血液或血浆(内毒素浓度 20EU/ml 左右), 密封后与 37℃下振荡吸附 2h, 然后用显色基质鲎试剂法检测吸附前后血液或血浆样品中内毒素的浓度, 计算吸附率。结果如表 1 所示。可见五种吸附剂无论在血浆中还是在全血中均对内毒素有较高的吸附效率。

[0039] 表 1 吸附剂对血浆和血液中内毒素的吸附性能

项目	配基类别	配基含量	血浆中吸附率	全血中吸附率
吸附剂 1	乙二胺	66 $\mu\text{mol/ml}$	72.1%	66.3%
吸附剂 2	1,4-丁二胺	102 $\mu\text{mol/ml}$	76.7%	71.8%
吸附剂 3	1,6-己二胺	180 $\mu\text{mol/ml}$	87.5%	83.8%
吸附剂 4	1,10-癸二胺	228 $\mu\text{mol/ml}$	84.3%	79.6%
吸附剂 5	1,6-己二胺	198 $\mu\text{mol/ml}$	89.8%	86.1%