



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106255520 B

(45) 授权公告日 2022.08.12

(21) 申请号 201580020663.2

(22) 申请日 2015.04.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106255520 A

(43) 申请公布日 2016.12.21

(30) 优先权数据
61/984,013 2014.04.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.20

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/026340 2015.04.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/164198 EN 2015.10.29

(73) 专利权人 艾克塞拉医疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·麦克雷 R·沃德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.
A61M 1/36 (2006.01)

审查员 朱书华

权利要求书1页 说明书19页 附图4页

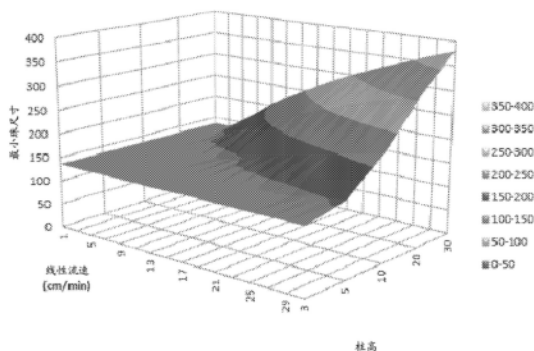
(54) 发明名称

使用高流速从血液除去细菌的方法

(57) 摘要

本发明提供使用吸附介质从全血、血清或血浆去除显著量的细菌(例如,革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌,包括对硫酸乙酰肝素无亲和力或具有低亲和力的细菌)的方法。该方法可以用于涉及高体积流速和高线性流速的体外处理中。

作为线性流速和柱高函数的最小珠尺寸
—仅刚性介质



1. 一种用于从取自疑似细菌感染的受试者的样品中除去细菌的离体方法,其中所述细菌对硫酸乙酰肝素无可检测的亲合力,所述方法包括:

(i) 将取自所述受试者的样品,其中所述样品选自全血、血清和血浆,以400cm/min至1000 cm/min的线性流速接触吸附介质,以允许附着复合物形成,其中附着复合物包含细菌和吸附介质,其中吸附介质是在其表面上具有多糖吸附剂的高表面积 of 的实心基质,其中所述多糖吸附剂是肝素或硫酸乙酰肝素,其中所述实心基质包含多个刚性聚合物珠子,

其中刚性聚合物珠子是选自聚氨酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯或乙烯和其他单体的共聚物、聚乙烯亚胺、聚丙烯和聚异丁烯的成员,且

其中最小的颈大小为使用以下公式计算的21微米:

$$a = d_p \left(\frac{2\sqrt{3}}{3} - 1 \right)$$

其中, a 是具有珠子直径 d_p 为至少136 μm 的珠子之间的最小孔隙;

其中所述细菌选自大肠杆菌、鲍氏不动杆菌和抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌,

和

(ii) 将样品与附着复合物分离,产生所述细菌含量减少的样品,其中样品中的细菌减少75%至99.9%。

2. 权利要求1的方法,其中所述细菌是抗碳青霉烯大肠杆菌。

3. 权利要求1或2的方法,其中样品选自血清和血浆。

4. 权利要求1或2的方法,其中样品是全血。

5. 权利要求1或2的方法,其中刚性聚合物珠子是聚乙烯或乙烯和其他单体的共聚物。

6. 权利要求1或2的方法,其中所述多糖吸附剂是肝素。

7. 权利要求6的方法,其中珠子包被了0.27mg至10mg肝素/克珠子。

8. 权利要求7的方法,其中珠子包被了 2 ± 0.5 mg肝素/克珠子。

9. 权利要求1或2的方法,其中样品中的细菌在体外肝素结合试验中是失败的。

10. 权利要求1或2的方法,其中样品具有500 cm/min至1000 cm/min的线性流速。

11. 权利要求1或2的方法,其中样品具有50 ml/min至5 L/min的体积流速。

使用高流速从血液除去细菌的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2014年4月24日提交的美国临时专利申请No.61/984,013的优先权,将其教导全部按引用并入本文中用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 血流感染,或菌血症,是重症监护室(ICU)面临的一项主要挑战。菌血症可以快速导致脓毒性休克、脑膜炎、心内膜炎、骨髓炎和其他转移性并发症。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)和肠杆菌科细菌(*Enterobacteriaceae*)是最常见的引起菌血症和医院感染的细菌。菌血症患者的结果严重性与细菌负载量和菌血症的持续时间有关。例如,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌血症患者的定量RT-PCR研究表明,当rDNA的数量提高至超过1,238拷贝/ml时,死亡率从14.3%提高至42.9%,而脓毒性休克从31.4%提高至85.7%。还发现,高血液浓度的脑膜炎奈瑟氏球菌(*N.meningitides*)与延长的住院时间、肢体或组织的损害、透析需求、以及患者死亡率有关。另一项研究表明,肺炎球菌性(*Pneumococcal*)肺炎的严重性与血液中的细菌负载量有关:具有超过1000个肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)DNA拷贝/ml血液的患者的死亡率为25.9%,而呈现低于1000个拷贝/ml的患者的死亡率为6.1%。在再一项研究中,初次诊断后48至96小时之间的随访阳性血液培养,被证实是复杂金黄色葡萄球菌菌血症的最强预示物。而常常延迟的合适抗生素治疗可以加大有效菌血症治疗的困难性。延迟治疗的每一小时,死亡风险增加7%以上。

[0005] 对抗细菌感染的常规策略是施用特异性地杀灭细菌并同时最小化宿主组织损伤的活性药物。由于目前可得的较为有效的抗生素中一些具有非常大的毒性,这构成了一项主要的挑战。例如,万古霉素有肾毒性,对于正在经历体外氧合的患者,万古霉素可以很快变为禁忌的。即使新的抗生素被成功研发出来解决目前的抗药性,新的超级细菌也将继续出现。显然,除了药物开发之外,还需要对抗感染的新策略。

[0006] 抗药性病原体是正在增长的对健康护理系统的威胁。CDC最近警告了抗碳青霉烯肠杆菌(CRE;“超级细菌”)的出现。CRE菌血症的死亡率可以高达50%。CRE对甚至最强的现有抗生素具有的抗药性,使得临床医生只有很少的治疗选择。医院获得性CRE感染的发病率在过去10年提高了400%。目前,CRE菌血症大多数是医院感染,但存在社区获得性CRE发病率可能提高的担心。目前,减少CRE感染的唯一策略是教育和预防。

[0007] 需要一种可以快速地减少细菌负载量和缩短菌血症持续时间的安全广谱技术。本发明通过提供一种高表面积体外亲和吸附介质(adsorption media)而满足了这种和其他需求,所述的体外亲和吸附介质可以快速且安全地从全血或全血清中除去病原体。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明提供,甚至无需首先鉴定血液中存在的细菌类型,可以快速减少细菌载量并且缩短菌血症持续时间的方法。

[0010] 在一些方面,本文提供用于从取自疑似细菌感染的受试者的样品中除去细菌的离体方法。该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成或由以下步骤组成:使取自受试者

的样品接触吸附介质,以允许附着复合物(adhering complex)形成,其中附着复合物包含细菌和吸附介质;将样品与附着复合物分离,以产生细菌含量减少的样品。典型地,吸附介质包含在柱、容器或筒(cartridge)内。

[0011] 在一些实施方案中,样品选自全血、血清和血浆。在其他实施方案中,样品是全血。

[0012] 在一些实施方案中,吸附介质是不含多糖吸附剂的具有亲水性表面的高表面积实心基质。在一些情况中,实心基质包括多个刚性聚合物珠。在一些实施方案中,刚性聚合物珠选自聚氨酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯或乙烯和其他单体的共聚物、聚乙烯亚胺、聚丙烯和聚异丁烯。在其他实施方案中,实心基质包含一个或多个中空纤维或纱线。

[0013] 在一些实施方案中,亲水性表面是阳离子表面。在其他实施方案中,亲水性表面是电中性表面。

[0014] 在一些实施方案中,样品中的细菌减少约20%至约99.9%。在其他实施方案中,样品中的细菌减少约20%至约40%。

[0015] 在一些实施方案中,细菌是革兰氏阴性细菌。在其他实施方案中,细菌是革兰氏阳性细菌。在其他实施方案中,细菌选自大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、抗碳青霉烯大肠杆菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌和超广谱β内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)和抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)。在再其他实施方案中,细菌选自金黄色葡萄球菌、抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)和大肠杆菌。

[0016] 在一些实施方案中,吸附介质的阳离子表面与选自大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、抗碳青霉烯大肠杆菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌和超广谱β内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌、屎肠球菌、鲍氏不动杆菌和抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)的细菌形成附着复合物。在其他实施方案中,电中性表面与选自金黄色葡萄球菌、抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)和大肠杆菌的细菌形成附着复合物。

[0017] 在一些方面,本文提供一种从取自疑似细菌感染的受试者的样品中除去细菌的离体方法,其中已知该细菌对硫酸乙酰肝素具有低亲和力或无亲和力。该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成或由以下步骤组成:使取自受试者的样品接触吸附介质,以允许附着复合物形成,其中吸附介质是在其表面上具有至少一种多糖吸附剂的高表面积的实心基质,以及将样品与附着复合物分离,以产生细菌含量减少的样品。附着复合物包含细菌和吸附介质。典型地,吸附介质包含在柱、容器或筒内。在特定方面,样品离开柱、容器或筒,而附着复合物留下。

[0018] 在一些实施方案中,样品选自全血、血清和血浆。在其他实施方案中,样品是全血。

[0019] 在一些实施方案中,实心基质包含多个刚性聚合物珠。在一些情况中,刚性聚合物珠选自聚氨酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯或乙烯和其他单体的共聚物、聚乙烯亚胺、聚丙烯和聚异丁烯。在其他实施方案中,实心基质包含一个或多个中空纤维或纱线。

[0020] 在一些实施方案中,所述至少多糖吸附剂选自肝素、硫酸乙酰肝素、透明质酸、唾液酸、具有甘露糖序列的碳水化合物和壳聚糖。在其他实施方案中,所述至少多糖吸附剂是肝素或硫酸乙酰肝素。在一些实施方案中,所述至少多糖吸附剂是肝素。

[0021] 在一些实施方案中,以约0.27mg至约10mg肝素/克珠子包被珠子。在其他实施方案

中,以 2 ± 0.5 mg肝素/克珠子包被珠子。

[0022] 在一些实施方案中,样品中的细菌减少约20%至约99.9%。在其他实施方案中,样品中的细菌减少约20%至约40%。

[0023] 在一些实施方案中,细菌是革兰氏阴性细菌。在其他实施方案中,细菌是革兰氏阳性细菌。在再其他实施方案中,细菌选自大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、鲍氏不动杆菌、尿肠球菌、抗碳青霉烯大肠杆菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌和超广谱 β 内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌。

[0024] 在一些实施方案中,本文提供一种用于从取自正在经历透析或体外氧合的受试者的样品中除去细菌的离体方法。该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成或由以下步骤组成:使取自受试者的样品接触包含吸附介质的吸附筒,其中吸附筒与透析筒或氧合器串联以允许附着复合物形成,以及将样品与附着复合物分离以产生细菌含量减少的样品。附着复合物包含细菌和吸附介质。典型地,吸附介质包含在柱、容器或筒内。在特定方面中,样品离开柱、容器或筒,而附着复合物留下。

[0025] 在一些实施方案中,样品具有少于200ml的总血液体积。

[0026] 在一些实施方案中,吸附筒具有1cm-50cm的柱高。在一些实施方案中,吸附筒具有1cm-50cm的柱直径。

[0027] 在一些实施方案中,与透析筒相比,吸附筒离受试者较近。在其他实施方案中,与透析筒相比,吸附筒离受试者较远。

[0028] 结合以下的附图和详细描述阅读时,这些和其他方面、目的和优势将变得更清楚。

[0029] 附图简述

[0030] 图1A-B显示吸附介质和人血液的比较。图1A显示吸附介质,图1B显示人血涂片的图像。

[0031] 图2显示,细菌(例如金黄色葡萄球菌和衣原体(*Chlamydia*))和病毒(例如,痘病毒、疱疹病毒、流感病毒和小核糖核酸病毒(脊髓灰质炎病毒))的大小比较。

[0032] 图3举例说明具有直径(d)的含有吸附介质的珠子和具有直径(a)的细胞的横截面。

[0033] 图4举例说明,对于接受强制对流的刚性介质,作为线性流速和吸附筒柱高的函数的最小珠子大小。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明部分基于如下吸附介质的发现,所述吸附介质能有效从血液(例如全血和血清)除去显著量的细菌(例如,革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌,包括对硫酸乙酰肝素具有未知亲和力或具有低亲和力的细菌)。此外,吸附介质可以用于涉及高体积流速和高线性流速的体外处理(extracorporeal treatment)中。通常,吸附介质包含在柱、容器或筒内。在特定方面中,样品离开柱、容器或筒,而附着复合物留下。

[0036] 本发明的第一方面提供一种通过使血液接触实心基质(solid substrate)从血液(如哺乳动物血液)除去细菌的方法。本发明人已经发现,实心基质的表面结构对于除去病原体如细菌病原体或病毒是有效的。

[0037] 本发明的基质具有足够大的间隙空间,以允许血液高流速通过基质而没有大的压力降。例如,在从哺乳动物患者获取血液后,使血液以一定的流速通过基质,其中被吸附物

至吸附床表面的递送主要以强制对流为特征。适用于对流运送的基质,通常依赖于基本无孔的实心材料之间的宏观“通道”或可见间隙,所述材料如颗粒、珠子、纤维、纱线、网状泡沫、或任选螺旋卷绕的致密膜。

[0038] 这不同于高度多孔的吸附介质(例如,多孔硅, **Sephadex®**, 交联聚苯乙烯和其他大小排阻介质)和使用慢得多的分子扩散过程的许多其他微孔介质。依赖于扩散运输的吸附基质通常由具有微孔和极高内表面积的多孔材料组成。

[0039] I. 定义

[0040] 术语“体外治疗”(extracorporeal therapy)包括在身体外部(即,离体(ex vivo))进行的医学程序。在一些情况中,体外治疗包括从个体取出体液(如,血液)并在将体液返回个体之前将所需产品(例如但不限于,氧、血液抗凝剂、麻醉剂等)加入体液中的方法。在其他情况中,体外治疗包括从身体或体液除去不合需要的产物,如天然产生的毒素、毒物或病毒。体外治疗的非限制性实例包括,单采血液成分术、自体输血、血液透析、血液过滤、血浆去除术、体外循环(ECC)、体外生命支持(ECLS)、体外膜氧合(ECMO)和心肺旁路术。

[0041] 术语“高流速”或“高流动条件”包括高于扩散限的血液流动速率或速度。

[0042] 术语“吸附介质”包括这样的物质,其中细胞、生物体、病毒、病原体、多肽、多核苷酸、化学分子、生物分子可以与其表面附着并从样品(血液)中除去。

[0043] 术语“附着复合物”包括至少两种分子的复合物,其中第一分子附着(例如,连接、偶联或结合)在表面(如基质)上,第二分子附着在第一分子上。例如,病原体或病毒可以附着在肝素上形成附着复合物。通常,在本发明的方法中,附着复合物留下,样品中的病原体或病毒被清除掉。

[0044] 术语“高表面积”包括具有大的比表面积与体积比的特性。

[0045] 术语“吸附剂”包括具有与其附着(例如,连接、偶联或结合)的化合物、生物分子或材料的实心基质。在一些情况中,吸附剂是实心基质自身。在一个实施方案中,吸附剂是具有与其结合的多糖(如肝素)的聚合物树脂。基质可以是聚合物珠、纤维或纱线。

[0046] 术语“刚性聚合物珠”是指由聚合物树脂制得的珠子、细粒、小球、球、颗粒、微囊、球体、微球体、纳米球体、微珠、纳米珠、微粒、纳米颗粒等。聚合物珠可以用作基质。

[0047] 术语“纤维”或“纱线”可用作实心基质。纤维或纱线可以由合成聚合物或天然聚合物或其混合物制得。在一些情况中,在将肝素或其他吸附剂结合至纤维或纱线的外和/或内表面之前、期间或之后,使最初多孔的中空纤维或纱线变得致密或无孔。

[0048] 术语“碳水化合物”是指含有碳、氢和氧原子的分子,并且通常具有经验式 $C_x(HO_2)_y$,其中 x 和 y 是不同的数字。碳水化合物的实例包括单糖、双糖、寡糖和多糖。

[0049] 术语“多糖”是指通过糖苷键结合在一起的单糖单位的分子,具有经验式 $C_x(HO_2)_y$,其中 x 在200至约3000之间。

[0050] 术语“亲水性表面”包括,当表面是平面时,水接触角小于 90° 的表面。

[0051] 在细菌的上下文中,术语“对硫酸乙酰肝素低的亲和力”是指,细菌对硫酸乙酰肝素具有低的结合亲和力。在一些实施方案中,使用标准试验,如酶联免疫吸附试验(ELISA),测定针对硫酸乙酰肝素的结合亲和力。在其他实施方案中,基于预测性分析,如通过分析病原体(例如,细菌)表达的推定的硫酸乙酰肝素结合蛋白,来确定结合亲和力。术语“对硫酸乙酰肝素无亲和力”是指,细菌对硫酸乙酰肝素不具有结合亲和力或具有低于可检测亲和

力的结合亲和力,或对硫酸乙酰肝素无已知的结合。在一些情况中,对硫酸乙酰肝素无亲和力包括对硫酸乙酰肝素无预测的结合亲和力。

[0052] II. 实施方案详述

[0053] A. 通过对流运输的细菌病原体的结合

[0054] 在体外血液循环安全操作常用的相对高流动条件下,例如,按线性流速测量, $\geq 8\text{cm/min}$,优选约 $\geq 30\text{cm/min}$,和更优选约 $30\text{-}1,000\text{cm/min}$,细菌病原体在对流运输过程中与本发明的基本上无孔的吸附基质的结合,是特别有效的。

[0055] 在一些实施方案中,以约 8cm/min 至约 $1,000\text{cm/min}$,例如,约 8cm/min 至约 30cm/min ,约 25cm/min 至约 100cm/min ,约 50cm/min 至约 200cm/min ,约 100cm/min 至约 $1,000\text{cm/min}$,约 200cm/min 至约 1000cm/min ,约 400cm/min 至约 1000cm/min ,约 500cm/min 至约 1000cm/min ,约 600cm/min 至约 1000cm/min ,约 100cm/min 至约 500cm/min ,或约 300cm/min 至约 800cm/min 的线性流速,吸附介质在体外回路中从全血除去病原体。在一些情况中,流速为约 $10\text{、}15\text{、}20\text{、}25\text{、}30\text{、}35\text{、}40\text{、}45\text{、}50\text{、}55\text{、}60\text{、}65\text{、}70\text{、}75\text{、}80\text{、}85\text{、}90\text{、}95\text{、}100\text{cm/min}$ 或约 $25\text{-}40\text{cm/min}$ 。

[0056] 在其他实施方案中,以约 50mL/min 至约 5L/min ,例如, 50mL/min , 100mL/min , 150mL/min , 200mL/min , 250mL/min , 300mL/min , 350mL/min , 400mL/min , 500mL/min , 550mL/min , 600mL/min , 650mL/min , 700mL/min , 750mL/min , 800mL/min , 850mL/min , 900mL/min , 950mL/min , 1.0L/min , 1.5L/min , 2.0L/min , 2.5L/min , 3.0L/min , 3.5L/min , 4.0L/min , 4.5L/min 和 5L/min 的体积流速,吸附介质在体外循环中从全血中除去病原体。在一些实施方案中,流速优选为 $>150\text{mL/min}$ 。

[0057] 相反,高度多孔的吸附介质需要小于 1mL/min 至约小于 50mL/分钟 的低得多的流速。另外,与使用强制对流将被吸附物运送至结合位点的介质相比,要求被吸附物扩散运送至介质内的吸附剂位点的介质,需要长得多的在吸附基质上的停留时间(例如,被吸附物(例如,细菌)接触吸附介质的时间量),这与标准体外血液系统是不相容的。

[0058] 通常认为,与使用强制对流将被吸附物运送至(基本上无孔介质上的)结合位点所需要的较短停留时间相比,当介质要求被吸附物扩散运送至介质内的吸附剂位点时,需要更长的吸附柱上“停留时间”。然而,尤其是考虑到其可以容纳的最大血液容纳体积、以及血液或血清通过吸附介质的流动速度,对于安全有效的吸附筒、柱、过滤器等的尺寸存在着实际的限制。基于此原因,通过吸附装置的平均流速被认为是一个设计变量。

[0059] 依赖于强制对流运送的基质通常更适于高流速,而依赖于慢得多的扩散运送的基质在要求高流速和较短停留时间时效率低得多。为此,在体外血液纯化装置中,优选被吸附物快速地扩散通过吸附基质内的孔。在将血液泵过由人造材料制成的回路时,通常的实践是,使用相对高的血液流速,以防止停滞和降低凝结风险。另一方面,可以避免极高流速,因为极高的流速会使血细胞暴露于可能破坏或损害血细胞的高剪切率和撞击损伤。因此,本发明提供从血液除去细菌病原体的方法和装置,其使用对流运送的优选特征及其合乎需要的更快速动力学。这可以通过使血液通过/流过基本上无微孔的基质(例如,实心基质)来实现,所述基质能够结合所需的细胞因子、病原体或细菌,以将其从血液中去掉。

[0060] 本文提供的吸附介质可以以 $>50\text{mL/min}$,优选约 150mL/min 至 5L/min 的流速,用于传统的体外血液循环中。如果按线性流速测量, $\geq 8\text{cm/min}$,优选约 $\geq 24\text{cm/min}$ 和更优选约

24-329cm/min,或更高。例如,流速可以为25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800cm/min或更高。这样的高流速造成在吸附柱内短的停留时间,对流运送相对于布朗扩散运送占优势。这对于结合扩散缓慢的较大颗粒,如病毒、细菌和寄生虫以及其他蛋白质和病原体,特别重要。

[0061] 可用于除去细菌病原体的主要吸附位点位于床、容器或筒介质间隙的表面,血液通过强制对流流过或递送通过所述间隙。为了处理血液,间隙通道需要足够大以允许运送平均直径为6微米的红细胞。为了允许填充的吸附筒放置在具有高血液流速的体外回路中,间隙通道可以比红细胞的直径大几倍。这可以防止或基本上消除导致溶血的高剪切速率,而同时使流过填充床或筒的血液的压力降最小化。此外,介质优选是刚性的,以最小化由压实引起的可能堵塞滤筒的变形。基于这些优选,优化的刚性介质可以在间隙通道大小和总表面积之间达成平衡,例如,以在高流速体外血液回路中有效去除病原体和/或细胞因子。

[0062] 本发明方法旨在主要应用于体外治疗或程序中以及可植入装置中。

[0063] 来自哺乳动物的全血和血清可以用于本发明。可以用于本发明方法的血液或血清的量没有限制。其范围可以从少于1mL至大于1L,在连续再循环回患者时,可以高达并且包括患者或受试者的全部血液体积。如果需要,可以一次或多次通过吸附床。血液可以是人类或动物血液。

[0064] 在一些实施方案中,样品(例如,全血或血清)中的细菌或病原体减少约20%至约90%,例如,约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或99.9%。在其他实施方案中,样品中的细菌减少约20%至约40%,例如,约20%、25%、30%、35%或40%,或约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或99.9%的细菌或病原体减少。

[0065] 在一些实施方案中,样品中的细菌是革兰氏阴性细菌,如不保留结晶紫染料任何细菌。革兰氏阴性细菌的非限制性实例是肺炎克雷伯氏菌、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、衣原体属(*Chlamydia*)、嗜血杆菌属(*Hemophilus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、军团菌属(*Legionella*)、其他肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌,及其抗药株。在其他实施方案中,样品中的细菌是革兰氏阳性细菌,如保留结晶紫染料任何细菌。革兰氏阳性细菌的非限制性实例是放线菌属(*Actinomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、绿色链球菌(*Streptococcus viridans*)、肠球菌属(*Enterococci*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、屎肠球菌、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),及其抗药株。

[0066] 在一些实施方案中,本文提供的方法用于从全血或血清样品中除去革兰氏阴性细菌。在其他实施方案中,所述方法用于从样品中除去革兰氏阳性细菌。在再其他实施方案

中,本文中所述的在其表面上具有多糖吸附剂的吸附介质用于从样品中除去细菌,如大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、鲍氏不动杆菌、尿肠球菌、抗碳青霉烯大肠杆菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌、和/或超广谱 β 内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌。

[0067] 在一些实施方案中,具有电中性的亲水性表面的吸附介质用于从全血或血清样品中除去金黄色葡萄球菌、抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)和/或大肠杆菌。在其他实施方案中,具有阳离子表面(亲水性表面)的吸附介质用于从样品中除去大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、抗碳青霉烯大肠杆菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌和超广谱 β 内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌、尿肠球菌、鲍氏不动杆菌和抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)。

[0068] B. 吸附介质

[0069] 各种形状和组成的材料可以用作本发明的基质(substrate)。所有合适的吸附介质提供高表面积,同时促进被吸附物(主要)通过强制对流运送至结合它们的吸附位点。用于形成吸附介质的有用基质包括无孔刚性珠子、颗粒或包装材料、网状泡沫、刚性整体床(例如,从烧结的珠子或颗粒形成)、填充了纺织织物或无纺布的柱子、填充了纱线或实心或中空的无微孔单丝纤维的柱子、从平膜或致密膜形成的螺旋卷绕筒,或介质的组合如混合的珠子/织物筒。在一些实施方案中,用于本发明的合适基质可以是这样的基质,其初始是微孔的,但在形成吸附位点之前、期间或之后在处理表面时成为基本上无孔的。

[0070] 一种有用的基质是实心珠子或颗粒的形式。珠子可以由足够刚性的材料制成,以抵御在所遇到的流速下的变形或压紧。在一些实施方案中,足够的基质刚性是指,在典型的临床流速下在大约一小时的水或盐水流动过程中无显著增大的跨吸附床的压力降。例如,合适的基质刚性是,在例如盐水的相似流速下测量时,相对于初始压力降(例如,在流动的第一分钟内测量的),压力降的增加 $<10-50\%$ 。

[0071] 吸附剂基质珠子可以从基本上不含可浸出杂质的各种不同的生物相容性材料制得,如天然或合成聚合物或非聚合材料,包括玻璃、陶瓷和金属。一些示例性聚合物包括聚氨酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯或乙烯和其他单体的共聚物、聚乙烯亚胺、聚丙烯和聚异丁烯。有用的基质的实例包括无孔超高分子量聚乙烯(UHMWPE)。其他合适的珠子是聚苯乙烯、高密度和低密度聚乙烯、硅石、聚氨酯和壳聚糖。

[0072] 可以将基质如珠子、纤维、纱线等制成表面粗糙或地表形貌(topography),以提高吸附表面积。例如,可以通过提高表面积与体积比来提高表面积。如图1A中所示,凹凸不平的和波浪形的表面产生更多的细菌和病原体结合位点。典型地,自由形式、形状或几何形状可以产生更大的表面积并且是有利的。图1A显示了从反应器收获出来的UHMWPE珠子。

[0073] 用于制备珠子的方法是本领域已知的。例如,在合成过程中直接产生合适的聚乙烯珠子和其他聚烯烃珠子。在一些情况中,将珠子加工成所需的大小和形状。其他聚合物可能需要研磨或喷雾干燥和归类,或另外加工以形成所需大小分布和形状的珠子。

[0074] 在一些方面中,本发明的吸附介质提供表面以附着可以结合细菌病原体的多糖吸附剂。在一些实施方案中,吸附介质包括具有高表面积的实心基质,其在表面上具有至少一种多糖吸附剂。

[0075] 在其他方面中,本发明的吸附介质提供了不含多糖吸附剂的亲水性表面(“裸表面”)。在一些实施方案中,吸附介质包括具有高表面积和亲水性阳离子表面的实心基质。在其他实施方案中,吸附介质包括具有高表面积和亲水性中性表面的实心基质。

[0076] 实心基质可以由例如但不限于聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、硅石、乳胶、玻璃、纤维素、交联琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联葡聚糖、交联海藻酸盐、硅氧烷、含氟聚合物和其他合成聚合物制得。具有高表面积 of 实心基质可以是多个吸附剂单层、滤器、膜、实心纤维、中空纤维、颗粒或珠子。任选，实心基质可以以提供大表面积的其他形式或形状存在。

[0077] 在一些情况中，实心基质是多个刚性聚合物珠子，如聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、硅石、乳胶、玻璃、纤维素、交联琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联葡聚糖、交联海藻酸盐、硅氧烷、含氟聚合物和合成聚合物珠子。优选，刚性聚合物珠子是聚乙烯珠。

[0078] 实心基质的大小可以根据试验中使用的测试样品的体积或其他参数来选择。在一些实施方案中，多个刚性聚合物珠子的每个珠子具有约 $1\mu\text{m}$ 至约 1mm ，例如， $1\mu\text{m}$ 、 $2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、 $4\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 、 $7\mu\text{m}$ 、 $8\mu\text{m}$ 、 $9\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $15\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ 、 $30\mu\text{m}$ 、 $35\mu\text{m}$ 、 $45\mu\text{m}$ 、 $55\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}$ 、 $65\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $75\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$ 、 $85\mu\text{m}$ 、 $90\mu\text{m}$ 、 $95\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $300\mu\text{m}$ 、 $400\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ 、 $600\mu\text{m}$ 、 $700\mu\text{m}$ 、 $800\mu\text{m}$ 、 $900\mu\text{m}$ 或 1mm 的平均外径。在其他实施方案中，多个刚性聚合物珠子的每个珠子具有约 $10\mu\text{m}$ 至约 $200\mu\text{m}$ ，例如， $10\mu\text{m}$ 、 $15\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ 、 $30\mu\text{m}$ 、 $35\mu\text{m}$ 、 $45\mu\text{m}$ 、 $55\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}$ 、 $65\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $75\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$ 、 $85\mu\text{m}$ 、 $90\mu\text{m}$ 、 $95\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $105\mu\text{m}$ 、 $110\mu\text{m}$ 、 $115\mu\text{m}$ 、 $120\mu\text{m}$ 、 $125\mu\text{m}$ 、 $130\mu\text{m}$ 、 $135\mu\text{m}$ 、 $140\mu\text{m}$ 、 $145\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}$ 、 $155\mu\text{m}$ 、 $160\mu\text{m}$ 、 $165\mu\text{m}$ 、 $170\mu\text{m}$ 、 $175\mu\text{m}$ 、 $180\mu\text{m}$ 、 $185\mu\text{m}$ 、 $190\mu\text{m}$ 、 $195\mu\text{m}$ 或 $200\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0079] 在一些实施方案中，有用的珠子具有约 $100\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 或更大直径的大小，例如， $100\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}$ 、 $300\mu\text{m}$ 、 $350\mu\text{m}$ 、 $400\mu\text{m}$ 、 $450\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ 或更大的直径。珠子的平均大小可以从约 $150\mu\text{m}$ 至约 $450\mu\text{m}$ 直径，例如， $150\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}$ 、 $300\mu\text{m}$ 、 $350\mu\text{m}$ 、 $400\mu\text{m}$ 或 $450\mu\text{m}$ 直径。例如，来自 Polymer Technology Group (Berkeley, CA) 的具有 $300\mu\text{m}$ 平均直径的聚乙烯珠子适用于本发明。

[0080] 在一些实施方案中，基质是屏障膜，例如，无孔膜。或者，可以通过用基本上无孔的材料（例如，聚合物）填充，使得微孔膜成为无孔的。薄片或实心或中空纤维形式的膜可以排列在壳体或容器内。

[0081] 吸附介质可以在容纳器，如柱、筒、管、离心管、床等，或任何容纳器中，在所述容纳器中，没有被捕获在结合多糖的吸附介质上的血液细胞可以被去除，而不干扰细菌病原体附着于介质。

[0082] 基质通常被填装在壳体或容器内，如柱子，所述壳体或容器被设计成可以在容器内容纳基质并且允许血液或血清流过基质或床的表面。可以在容器内排列基质，以使被吸附物与基质的吸附剂侧的结合最大化。壳体或容器可以具有大孔表面结构，以向血液或血清提供大的表面积。

[0083] 可以在柱子或其他壳体形状中装填纺织的或无纺的肝素化织物，或可以在壳体装填了基质介质后，通过例如共价、离子或其他化学或物理键，结合肝素、硫酸乙酰肝素或任选的非肝素吸附位点。通过控制机织或针织过程中或非织网络形成过程中纤维丹尼尔数和织物密度，可以控制间隙的孔径。有用的无纺布可以是毡、熔喷或静电纺网络的形式（具有随机取向，通过纤维的缠绕和/或交错纤维的粘合或凝聚而结合在一起）。有用的织物具有更明确的和非随机的结构。

[0084] 柱子或壳体可以装填纤维或由纤维制成的纱线。聚乙烯和其他纤维，可以拉成细

的中空或实心单丝纤维或多丝纱线,其可以装填至筒中,装填方式可以与将中空纤维膜安装至常规血液透析筒或血液氧合器的方式相同。在本发明中,可以在将肝素或其他吸附剂结合至外表面和/或内表面之前、期间或之后,使最初有孔的中空纤维变成致密的或无孔的。来自Royal DSM的Dyneema **Purity**®是由UHMWPE制得的高强度实心纤维。超高分子量聚乙烯(UHMWPE,UHMW)是热塑性聚乙烯的子集。Dyneema可以被肝素化并且装填至筒中,以提供高表面积支持体,用于去除细胞因子、细菌和病原体。

[0085] 螺旋卷绕筒含有薄膜或膜,其与可选间隔材料紧密卷绕在一起以防止相邻表面接触。膜可以从聚合物制得,所述聚合物如聚氨酯、聚乙烯聚丙烯、聚砜、聚碳酸酯、PET、PBT等。

[0086] 如上所述,在一些情况中,为用于本发明的方法,可以对用于体外血液过滤的珠子之间的通道或间隙空间的大小进行优化,以防止筒的进口和出口之间的高压力降,以允许血细胞在高流动环境中在珠子之间安全通过,以及提供合适的间隙表面积用于多糖吸附剂与血液中的细胞因子或病原体的结合。例如,在300微米的大致球形珠子的紧密填充床中,合适的间隙孔径为大约68微米直径。

[0087] 在一些实施方案中,吸附介质的刚性珠子具有如表5中所列的平均直径。在一些实施方案中,吸附介质的非珠基质,如纺织的纱线或纤维,具有如表6中所列的大孔径。

[0088] C. 制备吸附介质的方法

[0089] 本文描述的实心基质的表面可以官能化,以允许本文中所述的多糖吸附剂的共价结合。在一个实施方案中,实心基质的表面具有至少一个化学基团,如胺基。

[0090] 多糖,如肝素或硫酸乙酰肝素,或其他多糖,可以通过共价端点结合(end-point attachment)(例如,通过肝素分子的末端残基共价结合),连接在吸附介质的表面上。与非共价结合相比,共价结合有利地更好控制了固定化分子的方向及其表面密度。特别地,这些长链碳水化合物的端点结合可以提供间隔物功能,导致更高浓度的可接近碳水化合物寡聚物可用于病原体结合。实际上,与本领域中通常使用的肝素片段包被的常规表面相比,一些病原体结合全长肝素(例如,具有10kDa以上平均分子量的肝素)包被的表面要有效得多。

[0091] 在一些实施方案中,固定化全长肝素分子具有10kDa以上的平均分子量。在其他实施方案中,固定化肝素分子具有15kDa以上的平均分子量。在另一个实施方案中,固定化肝素分子具有21kDa以上的平均分子量。在再另一个实施方案中,固定化肝素分子具有30kDa以上的平均分子量。优选,固定化肝素分子具有15-25kDa范围内的平均分子量。平均分子量可以更高,如在25-35kDa的范围内。

[0092] 在一些实施方案中,实心基质上肝素吸附剂的表面浓度在 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围内,例如, $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $11\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $12\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $13\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $14\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $16\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $17\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $18\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $19\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在其他实施方案中,实心基质上乙酰肝素吸附剂的表面浓度在 $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至 $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的范围内,例如, $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $11\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $12\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $13\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $14\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0093] 每克基质的多糖吸附剂的量可以改变。在一个特定的实施方案中,如果使用珠子,每克珠子的多糖(如肝素)的量由使用的层数以及珠子的大小来确定。珠子越大,每克珠子的多糖(如肝素)越少。按照MBTH方法(Larm等,Biomater Med Devices ArtifOrgans,1983,

11:161-173和Riesenfeld和Rosen, Anal Biochem, 1990, 188:383-389), 一个优选量是 2.0 ± 0.5 mg肝素/g珠子。

[0094] 可以通过肝素分子的醛基与吸附介质表面上存在的伯氨基反应, 实现全长肝素分子与表面的共价结合。所有碳水化合物的固有性质在于它们在其还原端具有半缩醛。这种缩醛与醛形式处于平衡中并且可以与伯胺形成席夫碱。这些席夫碱随后可以被还原成稳定的仲胺。在一些实施方案中, 通过共价缀合, 将全长肝素固定在实心基质表面上。在其他实施方案中, 全长肝素通过稳定的仲氨基共价结合至所述吸附介质。

[0095] 在一些情况中, 制备吸附剂的各种方法和吸附剂本身公开于美国专利No. 8, 663, 148和美国专利申请公开No. US2009/0136586、US2010/0249689、US2011/0184377和US2012/0305482中, 其公开内容全部按引用并入用于所有目的。

[0096] 在一些实施方案中, 在结合多糖(如肝素)或其他化合物之前, 将吸附介质亲水化。用于制备基质的亲水性表面的方法包括酸蚀刻、等离子体处理和暴露于强氧化剂。例如, 可以用氧化剂, 如高锰酸钾、过硫酸铵等, 蚀刻聚合物表面, 如聚乙烯(PE)珠子, 以引入亲水性以及一些反应性官能团(例如, 磺酰基、羟基、羧基、羰基或碳双键)。表面可以用等离子体或电晕蚀刻。例如, 可以用硫酸中的高锰酸钾蚀刻PE珠, 以产生具有含羟基和碳双键的亲水性表面的珠子。

[0097] D. 吸附介质的混合物

[0098] 在一些情况中, 本发明的方法从抗血栓形成性(antithrombogenic)肝素化介质和另一固有致血栓形成性(thrombogenic)介质的混合物, 制备吸附床。通过给吸附筒装配肝素化表面和例如亲水性表面(阳离子或中性表面), 细菌病原体均可以从血液或其他生物流体中被安全地去除。例如, 肝素化介质可以形成1%至99%的吸附床, 固有致血栓形成的基质可以形成99%至1%的吸附床。

[0099] 在本发明的一些实施方案中, 吸附介质提供抗血栓形成性表面, 其与致血栓形成性表面密切接触或紧靠。这种吸附介质可以防止在单独使用固有致血栓形成性表面时会发生的临床上显著的血栓形成。

[0100] 在珠子或颗粒形式的吸附介质的情况中, 本发明的优选应用是, 在将吸附介质填充至筒或其他壳体中之前, 将不同的吸附基质混合在一起。这可以造成邻近珠子上的各种表面化学之间的密切接触, 同时允许吸附筒或滤器的有效制造。相关的方法是, 将不同介质以“冻糕型”排列层放在壳体内, 从而血液可以逐次或在平行流动中接触不同的介质。不同介质在筒内的一种排列方式是, 将未混合的抗血栓形成性介质放置在筒的进口和/或出口, 含有较多致血栓形成性介质的任选混合的区域介于进口和出口区域之间。

[0101] 在纤维形式的介质的情况中, 可以通过纺织工业中公知的方法来制备混合的机织、针织或非织结构, 以从混合纤维形成织物。或者, 可以从更细的多丝纱线或单丝制得纱线, 其中所述多丝纱线或单丝从具有不同表面化学的两个或多个纤维制得, 条件是一种纤维类型含有接触时可以积极地防止血液凝固的表面。然后将混合纤维纱线用于制备用于血液接触的织物。可以混合中空纤维或实心纤维吸附介质, 用于制备类似中空纤维透析器或氧合器的筒。对于在螺旋卷绕式吸附筒中使用的膜或薄膜型吸附介质, 两种或多种表面化学可以彼此紧靠地使用, 从而使得血液必须(几乎)同时地接触两种表面化学。这可以通过膜薄膜表面层内各种结合基团的规律或随机排列, 或通过两个空间接近的膜薄膜

(其中之一是抗血栓形成的)之间形成血液的流动通路来实现。

[0102] E. 体外血液过滤

[0103] 在一些方面中,本文中提供的方法可以用于包含吸附介质的装置中,用于从哺乳动物血液(例如,人血液)体外去除病原体。例如,所述装置可以是用于体外处理患者(例如,患有肾衰竭的受试者)的血液或血清的常规装置。

[0104] 已知,在接触血液的体外循环用医疗装置中,局部的血液流动模式可以通过滞流区域(stagnant zone)中血小板的剪切激活和聚集而影响凝块形成。含有本文中提供的吸附介质的装置可以例如具有以下的一个或多个特性:a) 150-5,000ml/min的血流,或如果通过线性流速测量, $\geq 8\text{cm/min}$;b) 低流动阻力;c) 大表面积的其上固定有碳水化合物的基质,例如,约 $0.1-1\text{m}^2$;d) 稳定的包被(例如,没有临床上显著的碳水化合物渗漏至与其接触的血液中);e) 装置中合适的血液动力学特性(例如,无滞流区域);和f) 最佳的生物相容性。

[0105] 根据本发明方法使用的装置的非限制性实例包括体外膜氧合(ECMO)装置、儿科hemoflow透析器(用于除去细胞因子分子的体外血液过滤装置)、或可以适应高流速的其他体外装置。

[0106] 本发明的方法可以在其他常规治疗(例如,抗生素的给药)之前或之后使用。

[0107] 在一些实施方案中,所述方法在连续环路中进行,其中样品(例如,全血)从身体中抽出并根据本文中提供的方法处理,然后所得到的样品(例如,含有减少含量的细菌病原体的样品)被重新引入体内,由此形成包括患者的部分血流的环路。

[0108] 在其他实施方案中,本文中提供的方法可以结合其他技术来过滤或处理哺乳动物血液。例如,基于对流动力学的筒随后可以与常规体外回路串联使用,所述常规体外回路如心肺旁路术(CPB)、血液透析、体外血液氧合和臭氧化(EBOO)等。

[0109] 本发明的各个方面将在以下实施例中进一步描述。这些实施例不旨在构成限制。例如,在本发明的实施例中,使用了肝素。然而,可以单独地或在以下举例说明的肝素包被的基质以外还使用其他碳水化合物和多糖吸附剂。

实施例

[0110] 提供以下实施例,以举例说明但非限制本发明。

[0111] 实施例1. 对硫酸乙酰肝素具有低或不可检测的亲力的细菌的去除

[0112] 本实施例举例说明,使用肝素包被的珠子从全血中去除对硫酸乙酰肝素具有低亲力和或不可检测亲力的细菌病原体。

[0113] 文献中已经报道,超过50种不同的病原体在其病理过程中靶向共结合蛋白聚糖(syndecan)上的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖作为初始结合位点。令人惊讶地,与表面结合的肝素可以作为结合生物体的硫酸乙酰肝素的替代品起作用。

[0114] 我们的研究已经表明,肝素化的吸附介质可以从全血中除去高浓度的金黄色葡萄球菌和MRSA。此外,研究还表明,与肝素化表面结合的细菌不被杀死,并因此不会将潜在的炎性毒素及其副产物释放至血液中。因此,肝素结合的介质可以用于体外装置中,以有效且安全地从受感染血液中除去循环的细菌,包括抗药株。

[0115] 本实施例测试了已知的硫酸乙酰肝素结合性病原体和未知或未预期结合肝素的病原体。此外,还发现,亲水性对照(阳离子的或电中性的)可以作为结合病原体的有效表面

起作用。电中性表面通常在去除病原体方面没有肝素化表面那样有效,但使用一般的亲水性表面来研发病原体减少技术是可行的。亲水性阳离子表面也显示出了合理的去除病原体的能力。

[0116] 本实施例说明,包含表面结合的肝素的吸附介质可以用于去除预期的硫酸乙酰肝素结合性病原体,如金黄色葡萄球菌、抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)、粪肠球菌、抗万古霉素粪肠球菌、HSV-1和HSV-2以及白色念珠菌(*Candida albicans*)。

[0117] 本实施例说明,包含表面结合的肝素的吸附介质可以用于从血液中除去低(例如,零)亲和力硫酸乙酰肝素结合性病原体,如,大肠杆菌、抗碳青霉烯大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌、超广谱 β 内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌、屎肠球菌、鲍氏不动杆菌和肺炎葡萄球菌。

[0118] 特别地,包含中性亲水性表面的吸附介质可以去除例如金黄色葡萄球菌、抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)和大肠杆菌。此外,包含阳离子亲水性表面的吸附介质可以去除例如大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、抗碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌、超广谱 β 内酰胺酶肺炎克雷伯氏菌、屎肠球菌、鲍氏不动杆菌和抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)。

[0119] 金黄色葡萄球菌或抗二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)菌血症呈现出对肝素和硫酸肝素(HS)的天然亲和力。已经研发了依赖于这种天然机制从血液中去除细菌的亲和力吸附技术。主要配体是端点结合的肝素(end-point attached heparin)——硫酸乙酰肝素的类似物。肝素不仅提供从全血除去细菌的作用机制,还提供可以增强体外回路安全性的抗血栓形成表面。

[0120] 靶向碳水化合物和蛋白聚糖用于初始附着是大部分病原体的共同机制。例如,流感病毒结合唾液酸——存在于许多糖蛋白中的一种碳水化合物。许多革兰氏阴性细菌具有位于菌毛顶端的甘露糖结合性粘附素。已经证实被细菌靶向的其他碳水化合物包括L-岩藻糖、半乳糖和各种葡糖胺或半乳糖胺。病原体结合碳水化合物的共性在于,糖萼在细胞表面上普遍存在的性质。

[0121] 在本实施例中靶向的细菌包括大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌,及其抗碳青霉烯株,以及铜绿假单胞菌。针对革兰氏阴性细菌,报道了许多不同的粘附素。研究最多的是1型、3型、P型和S型菌毛以及外膜蛋白A(Omp A)。已经表明1型菌毛和OmpA涉及与内皮细胞的附着。1型菌毛介导与甘露糖的附着(甘露糖敏感型),并在肠杆菌科的大多数细菌中表达。其他菌毛具有针对不同碳水化合物的粘附素并且被认为是抗甘露糖的。典型地,几种类型的菌毛会同时表达。

[0122] 此外,已经证实,甘露糖敏感型粘附素存在于细菌细胞表面上,即使在菌毛没有表达时也是如此。1型菌毛已经显示出与人脑微血管内皮细胞相互作用,表明菌毛可以在血液中表达。肺炎克雷伯氏菌的抗药株表达较高浓度的1型和3型菌毛。

[0123] 研究了肝素化表面对金黄色葡萄球菌、MRSA、肺炎葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、单纯疱疹病毒、特定外毒素和其他HS靶向性病原体的靶向去除。体外研究已经证实了这些病原体和毒素中的许多对肝素化介质的亲和力。

[0124] 研发的第二种吸附介质是靶向革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌和鲍氏不动杆菌)的甘露糖官能化表面。体外研究证实,甘露糖介质可以结合这些病原体。证

明了MRSA对甘露糖介质没有亲和力。然而,肝素化介质在去除这些预期对肝素不具有高亲和力的革兰氏阴性细菌时也非常有效。这些结果是出乎预料的,因此不可能单独地基于文献来预测哪些细菌可以通过肝素化表面从血液去除。

[0125] 结果

[0126] A. 结果

[0127] 从全血成功去除细菌的第一例报道公开于2011年(Mattsby-Baltzer等, J.Microbiol.Biotechnol.,2011,21(6),659-664)。研究显示,使用肝素化介质从全血中去除了高浓度的金黄色葡萄球菌和MRSA。此外,使用PCR证明,在细菌附着于肝素化表面后,细菌不被杀死并且因此没有潜在的炎性毒素/副产物被释放至血流中。使用肝素化介质可以构建能够安全地从血液中去掉循环细菌(与抗药性无关)的非常广谱的装置。

[0128] 肝素吸附基质并非通过向处理的血液或血制品中添加任何可检测的化学物质来发挥作用。相反,其使用(非浸取)共价结合的、端点结合的肝素在不受扩散限制的快速吸附过程中作为配体。

[0129] 如本文中讨论的,可以使用肝素化介质从全血中去掉金黄色葡萄球菌和MRSA。在这个研究中测试了金黄色葡萄球菌和MRSA的几个菌株。结果显示于表1中。金黄色葡萄球菌和MRSA的几个菌株以高产率从全血中被去除。根据菌株,通过肝素化介质去除了高达85%的MRSA。

[0130] 表1. 从全血中去掉金黄色葡萄球菌和MRSA菌株

测试的金黄色葡萄球菌和 MRSA 菌株				
	SA1800T	MRSA485	MRSA251	MRSA860
[0131] 在一次通过中的去除%	62%	85%	59%	70%

[0132] 在体外血液研究中,85%的MRSA在单次通过介质后被去除(表2)。

[0133] 表2. 药敏性和抗药性病原体的去除

细菌	%减少	性能(CFU/g)
革兰氏阳性细菌		
MRSA	91.57%	3.69E+05
肺炎葡萄球菌	53.06%	1.73E+05
粪肠球菌	99.04%	2.12E+06
粪肠球菌(VRE)	91.25%	1.88E+06
屎肠球菌	56.38%	1.72E+06

[0135] 细菌的起始浓度为 5×10^6 CFU/mL。除了结合MRSA,PCR分析表明肝素化表面不是杀菌的。这是重要的发现,表明在细菌结合介质后(死)细菌的细胞组分(对接受者可能是炎性和毒性的)不会被释放至血液中。

[0136] 进行了其他研究来测试各种病原体对肝素化介质的亲和力。在这些研究中,在2.5ml过滤注射器中装填肝素化介质或对照介质,以测试各种革兰氏阴性和革兰氏阳性细

菌的去除。使用标准方法培养细菌并且在去纤维蛋白马血中稀释。然后使血液通过盐水冲洗的介质,总共3次,然后涂布以进行CFU计数。靶向的CFU/ml浓度是用于抗微生物测试的典型浓度,范围在 10^5 至 10^6 CFU/ml之间。

[0137] 使用肝素化介质去除病原体的概述表格,显示在表2中。

[0138] B. 意料之外的结果

[0139] 测试了文献中报道的对肝素或硫酸乙酰肝素具有很小亲和力、无亲和力或未知亲和力的几个病原体,所用方案与用于肝素结合性病原体的方案相同。表3列出了这些细菌和结果。令人惊讶地,从血液中以高浓度除去了许多革兰氏阴性细菌及其抗药株。

[0140] 表3. 使用肝素化表面对革兰氏阴性细菌的意料之外的去除

革兰氏阴性细菌	%减少	性能 (CFU/g)
肺炎克雷伯氏菌 (CRE)	99.94%	4.66E+05
肺炎克雷伯氏菌	36.57%	4.90E+05
大肠杆菌 (CRE)	99.93%	8.56E+05
大肠杆菌	99.75%	2.04E+06
鲍氏不动杆菌	79.13%	4.83E+05

[0142] 结论

[0143] 结果表明,肝素化介质具有非常高的从血液中去掉广谱细菌的能力。出乎预料地,还去除了对肝素或硫酸肝素具有未知亲和力或具有很小亲和力的几种细菌。因此,关于许多病原体可能具有或可能不具有的对肝素化表面化学的亲和力,几乎不存在可预测性。几种革兰氏阳性细菌(包括报道的肝素结合性病原体)的吸附表明,这些病原体特异性地结合肝素化表面。不受限于任何特定的理论,认为吸附介质上的亲水性表面,如中性或阳离子表面,可以用于去除对肝素或硫酸乙酰肝素具有未知亲和力(或低亲和力)的细菌。备选地,以上所列革兰氏阴性细菌的结合可能是通过特异性位点的相互作用或通过非特异性结合而实现的。吸附介质的表面地表形貌对这种结合可能是重要的。

[0144] 实施例2. 具有亲水性表面的吸附介质

[0145] 本实施例显示,包含亲水性表面的吸附介质可以用于从全血或血清去除细菌。

[0146] 本文中所述的吸附介质含有能够使其结合病原体(如对肝素不具有亲和力或具有低亲和力的那些病原体)的表面地表形貌(图1A)。不受限于任何特定理论,认为粗糙的、凸凹不平的或波浪形的表面可以有助于细菌与吸附介质的亲和。

[0147] 图1B显示了人血涂片图像,用于比较。图2显示了细菌(例如,金黄色葡萄球菌和衣原体)和病毒(例如,痘病毒、疱疹病毒、流感病毒和小核糖核酸病毒(脊髓灰质炎病毒))的大小比较。

[0148] 实施例3: 用于高线性流速体外治疗中的血液过滤器

[0149] 本实施例提供了用于适应高线性流速的体外过滤筒的示例性设计。

[0150] 可以设计体外血液过滤器,使其可以在普通泵系统使用的特定流速下安全地操作。如果跨血液过滤器的压力降太大,溶血可能发生。典型地,使用低于34kPa的压力操作透析系统,以避免溶血的风险。

[0151] 对于装了填充的吸附剂介质的筒,跨筒的压力降取决于流速、颗粒大小、颗粒模块、填充介质的高度和血液的粘度。如果过滤器介质不够刚性,那么随着增加的血流,可能

发生介质的压实,导致降低的孔隙率,从而可能造成不安全的压力。

[0152] 第一个待确定的变量是针对特定的柱高和线性流速可以容许的最小颗粒大小。透析系统的典型流速为100至400mg/min之间,根据筒的直径,其等于大致8至30cm/min的线性流速。心肺旁路术 (CPB) 和体外膜氧合器 (ECMO) 的典型体积流速可以高达5000ml/min。因此,根据筒宽度,线性流速可以高达1000cm/min。如果将筒制得较宽,则可以降低线性流速,以减小压力。

[0153] 在基于线性流速和颗粒大小确定最小颗粒大小时,需要不超过可能引起溶血的压力。Blake-Kozeny等式描述了跨刚性实体填充介质的压力降。

$$[0154] \quad \Delta P = \mu \times \left(\frac{Ko}{d_p^2} \right) \frac{(1 - \epsilon)^2}{\epsilon^2} L \times u$$

[0155] 其中 μ 是血液粘度;Ko是常数; d_p 是颗粒直径; ϵ 是间隙床孔隙率或空体积;L是填充介质的高度;和u是线性流速。

[0156] 针对 d_p ,可以将等式解为:

$$[0157] \quad d_p = \sqrt{\frac{\mu \times Ko \times (1 - \epsilon)^2}{\Delta P \times \epsilon^2} L \times u}$$

[0158] 如果34kPa是最大容许压力,那么使用以下变量,确定作为流速和柱高的函数的颗粒大小。

[0159] $\mu =$ **4 cp** **血液粘度**
 $Ko =$ **150** **常数**
 $\epsilon =$ **0.36** **(根据填充率, 范围可以从 0.3 - 0.5)**
 $\Delta P =$ **34 kPa** **最大容许压力**
255 mmHg
4.9 PSI

$$[0160] \quad \frac{(1 - \epsilon)^2}{\epsilon^2} = 8.78$$

$$[0161] \quad \frac{\mu \times Ko}{\Delta P} = 1.76E-05$$

[0162] 表4中给出了针对给定的线性速度和柱高的最小珠子直径。

[0163] 表4. 低体积流速

[0164] 珠子直径(微米)

		L (以cm计的柱高)				
		3	5	10	20	30
[0165]	1	22	28	39	56	68
	3	37	48	68	96	118
	5	48	62	88	124	152
	7	57	74	104	147	180

[0166] 表4. 低体积流速

[0167] 珠子直径(微米)

u (cm/min)		L (以cm计的柱高)				
		3	5	10	20	30
[0168]	9	65	83	118	167	205
	11	72	92	131	185	226
	13	78	100	142	201	246
	15	83	108	152	216	264
	17	89	115	162	230	281
	19	94	121	172	243	297
	21	99	128	180	255	312
	23	103	133	189	267	327
	25	108	139	197	278	341
	27	112	145	205	289	354
	29	116	150	212	300	367
	31	120	155	219	310	380

[0169] 然而,还要考虑血细胞的大小,有效孔径不能太小以致阻塞血细胞的通过。巨噬细胞是血液中的最大的细胞,约21微米,因此重要的是允许这些细胞通过过滤器介质(图3)。

[0170] 以下更全面地描述图3中由“a”表示的进料喉尺寸,即,填充介质中珠子间最小的孔隙。可以通过以下等式计算颈大小。

[0171]
$$a = d_p \cdot \frac{2\sqrt{3}}{3} - 1$$

[0172] 最小的颈大小必须为至少21微米。因此,最小的珠子大小为:

[0173]
$$d_{pmin} = \frac{a}{\frac{2\sqrt{3}}{3} - 1}$$

[0174] 其中 $d_{pmin} = 136$ 微米

[0175] 因此,容许的最小大小为136微米。表5显示对于直径等于或大于136 μ m的珠子有用的线性流速和柱高。

[0176] 表5. 与线性流和柱高相关的珠子大小

		珠子直径 (微米)							珠子直径 (微米)				
		L (以cm计的柱高)							L (以cm计的柱高)				
u (cm/min)		3	5	10	20	30	u (cm/min)		3	5	10	20	30
[0177]	1	136	136	136	136	136	1	136	136	136	136	136	136
	3	136	136	136	136	136	76	188	243	343	485	594	
	5	136	136	136	136	152	151	265	342	484	684	838	
	7	136	136	136	147	180	226	324	418	592	837	1025	
	9	136	136	136	167	205	301	374	483	683	966	1183	
	11	136	136	136	185	226	376	418	540	763	1079	1322	
	13	136	136	142	201	246	451	458	591	836	1182	1448	
	15	136	136	152	216	264	526	494	638	903	1277	1564	
	17	136	136	162	230	281	601	529	682	965	1365	1671	
	19	136	136	172	243	297	676	561	724	1023	1447	1773	
	21	136	136	180	255	312	751	591	763	1079	1525	1868	
	23	136	136	189	267	327	826	620	800	1131	1600	1959	
	25	136	139	197	278	341	901	647	835	1181	1671	2046	
	27	136	145	205	289	354	976	674	870	1230	1739	2130	
	29	136	150	212	300	367	1051	699	902	1276	1805	2210	
	31	136	155	219	310	380	1126	723	934	1321	1868	2288	

[0178] 图4是表5的曲线图。该曲线在y轴上显示了最小珠子大小,在x轴上显示了线性流速,在z轴上显示了柱高。因为珠子大小的截留值为136微米,图4具有6个不同灰度。因此,没有给出代表低于该尺寸的珠子的色度(例如,0-50和50-100)。

[0179] 数据用于确定非珠材料(如机织纱线或纤维)的最小孔隙大小。下表(表6)提供了与柱高和线性流速相关的相应最小孔隙大小。

[0180] 表6. 用于非珠材料的大孔径

		大孔径							大孔径				
		L (以cm计的柱高)							L (以cm计的柱高)				
u (cm/min)		3	5	10	20	30	u (cm/min)		3	5	10	20	30
[0181]	1	21	21	21	21	21	1	21	21	21	21	21	21
	3	21	21	21	21	21	76	29	38	53	75	92	
	5	21	21	21	21	24	151	41	53	75	106	130	
	7	21	21	21	23	28	226	50	65	92	129	159	
	9	21	21	21	26	32	301	58	75	106	149	183	
	11	21	21	21	29	35	376	65	83	118	167	205	
	13	21	21	22	31	38	451	71	91	129	183	224	
	15	21	21	24	33	41	526	76	99	140	197	242	
	17	21	21	25	36	43	601	82	106	149	211	259	
	19	21	21	27	38	46	676	87	112	158	224	274	
	21	21	21	28	39	48	751	91	118	167	236	289	
	23	21	21	29	41	51	826	96	124	175	247	303	
	25	21	22	30	43	53	901	100	129	183	258	317	
	27	21	22	32	45	55	976	104	135	190	269	329	
	29	21	23	33	46	57	1051	108	140	197	279	342	
	31	21	24	34	48	59	1126	112	144	204	289	354	

[0182] 如果吸附介质是可压缩的,由于流动血液的剪切应力,大孔径将作为流速的函数降低。可压缩介质可以“预先压缩”,以针对所需的流速获得如表6中计算的最小孔径。对于松散填充的可压缩介质,大孔径必须在流动条件下不降至低于表6中的值,否则系统的压力将提高,这可能导致溶血并且巨噬细胞也可能被滤出。

[0183] 除了确定颗粒大小和/或大孔径,可以确定体外过滤筒的直径(例如,内径)。表7提供了在特定体积流速下获得需要的线性流速所需的有用筒直径。

[0184] 表7. 筒直径

		筒直径 (cm)						筒直径 (cm)							
		期望的体积流速 (ml/min)						期望的体积流速 (ml/min)							
u (cm/min)		50	100	150	300	500	1000	u (cm/min)		500	1000	2000	3000	4000	5000
		14.													
	1	1	20.0	24.5	34.6	44.7	63.2	1	44.7	63.2	89.4	109.5	126.5	141.4	
	3	8.2	11.5	14.1	20.0	25.8	36.5	76	5.1	7.3	10.3	12.6	14.5	16.2	
	5	6.3	8.9	11.0	15.5	20.0	28.3	151	3.6	5.1	7.3	8.9	10.3	11.5	
	7	5.3	7.6	9.3	13.1	16.9	23.9	226	3.0	4.2	5.9	7.3	8.4	9.4	
	9	4.7	6.7	8.2	11.5	14.9	21.1	301	2.6	3.6	5.2	6.3	7.3	8.2	
	11	4.3	6.0	7.4	10.4	13.5	19.1	376	2.3	3.3	4.6	5.6	6.5	7.3	
	13	3.9	5.5	6.8	9.6	12.4	17.5	451	2.1	3.0	4.2	5.2	6.0	6.7	
	15	3.7	5.2	6.3	8.9	11.5	16.3	526	1.9	2.8	3.9	4.8	5.5	6.2	
	17	3.4	4.9	5.9	8.4	10.8	15.3	601	1.8	2.6	3.6	4.5	5.2	5.8	
	19	3.2	4.6	5.6	7.9	10.3	14.5	676	1.7	2.4	3.4	4.2	4.9	5.4	
	21	3.1	4.4	5.3	7.6	9.8	13.8	751	1.6	2.3	3.3	4.0	4.6	5.2	
	23	2.9	4.2	5.1	7.2	9.3	13.2	826	1.6	2.2	3.1	3.8	4.4	4.9	
	25	2.8	4.0	4.9	6.9	8.9	12.6	901	1.5	2.1	3.0	3.6	4.2	4.7	
	27	2.7	3.8	4.7	6.7	8.6	12.2	976	1.4	2.0	2.9	3.5	4.0	4.5	
	29	2.6	3.7	4.5	6.4	8.3	11.7	1051	1.4	2.0	2.8	3.4	3.9	4.4	
	31	2.5	3.6	4.4	6.2	8.0	11.4	1126	1.3	1.9	2.7	3.3	3.8	4.2	

[0186] 另一个需要考虑的因素是体外装置使用的总血液体积。例如,在体外循环处理过程中从身体取出的总体积通常不超过患者血液的8-10%。对于平均的成年人,这等于500ml血液。典型的透析筒和管血液体积可以为250-300ml。如果透析筒与吸附筒串联使用,那么吸附筒的血液体积应当不超过200ml。表8中提供了用于本发明的吸附筒的实际尺寸。

[0187] 表8. 填充柱的血液体积 (ml) -0.36空体积比

		柱高 (cm)				
		3	5	10	20	30
	直径					
	1	0.84834	1.4139	2.8278	5.6556	8.4834
	5	21.2085	35.3475	70.695	141.39	212.085
	10	84.834	141.39	282.78	565.56	848.34
	15	190.8765	318.1275	636.255	1272.51	1908.765
	20	339.336	565.56	1131.12	2262.24	3393.36

[0189] 本实施例提供了以上描述的吸附介质和吸附筒的示例性实施方案。吸附介质可以用于使用高达5000ml/min的体积流速和高达1000cm/min的线性流速的体外治疗中。

[0190] 实施例4. 用于丙肝病毒和乙肝病毒去除的血液过滤器

[0191] 本实施例提供了用于去除丙肝病毒和乙肝病毒的体外过滤筒。在此实施例中,将吸附介质混合。混合的介质包含70:30比例的肝素化聚乙烯珠子:固定于纤维素凝胶的蛋白A。

[0192] 肝素化PE珠子具有共价端点连接至胺化PE珠子的亚硝酸降解的肝素。肝素化PE珠子含有2.6mg肝素/g珠子。

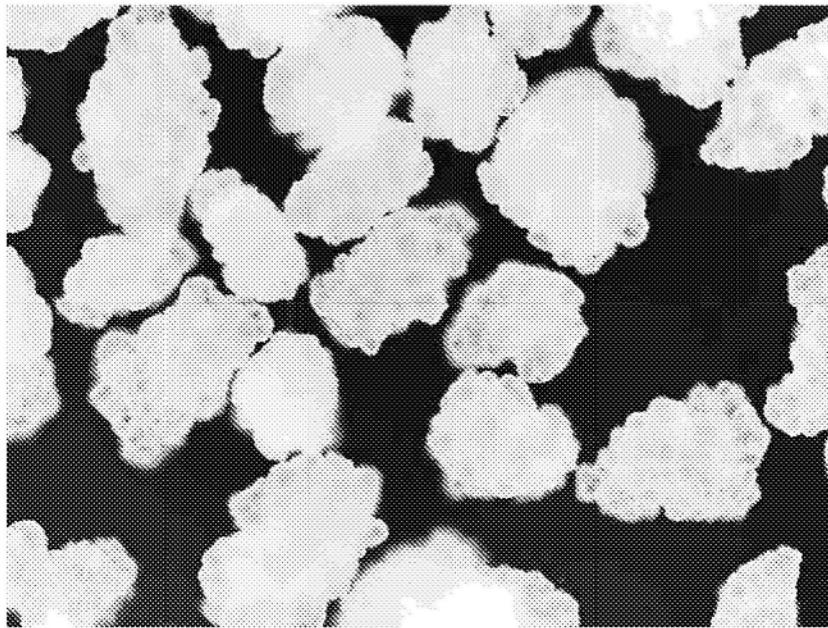
[0193] 使用0.1M醋酸盐缓冲液pH4.0 (100ml) 和亚硝酸降解的肝素 (1.6g), 制备亚硝酸降

解的肝素至胺化PE珠子的共价端点连接。振荡15min后,加入溶解于0.1M醋酸盐缓冲液pH4.0(10ml)中的 NaBH_3CN (100mg)。将反应混合物在室温下振荡24h并且加入另外的溶解于0.1M醋酸盐缓冲液pH4.0(10ml)中的 NaBH_3CN (100mg),并且在室温下继续再振荡24h,以产生肝素的共价端点连接。

[0194] 在0.5mL的0.05M硼酸盐缓冲液(pH10.0)中,溶解4mg蛋白A(Sigma),加入0.01N NaOH/水,使pH为10,并且制成1.0mL的总体积(蛋白A溶液)。将这蛋白溶液(总量)加入1mL的环氧激活的纤维素凝胶中,将混合物在37°C振荡16小时,用足量的PBS(补充了150mM氯化钠的10mM磷酸盐缓冲液)洗涤,以提供GCL 2000m-蛋白A。

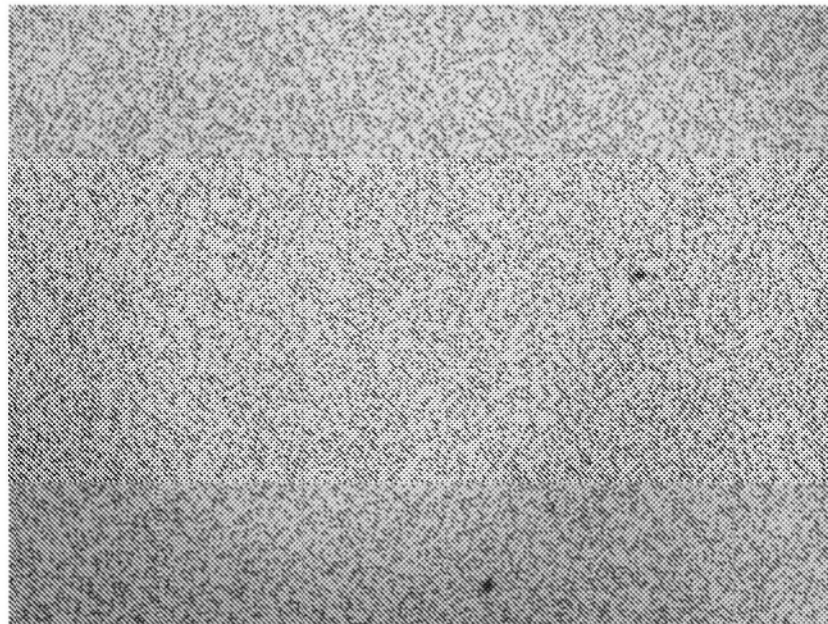
[0195] 混合的吸附介质用于从血液除去丙肝病毒和乙肝病毒。

[0196] 可以理解,本文中描述的实施例和实施方案只是用于举例说明性的目的,本领域技术人员鉴于这些描述将明了各种的变化或改变,这些变化和改变包括在本申请的精神和范畴内以及后附权利要求的范围内。本文中引用的所有出版物、专利和专利申请就其全部内容按引用并入本文中用于所有目的。



100x 放大

图1A



100x 放大

图1B

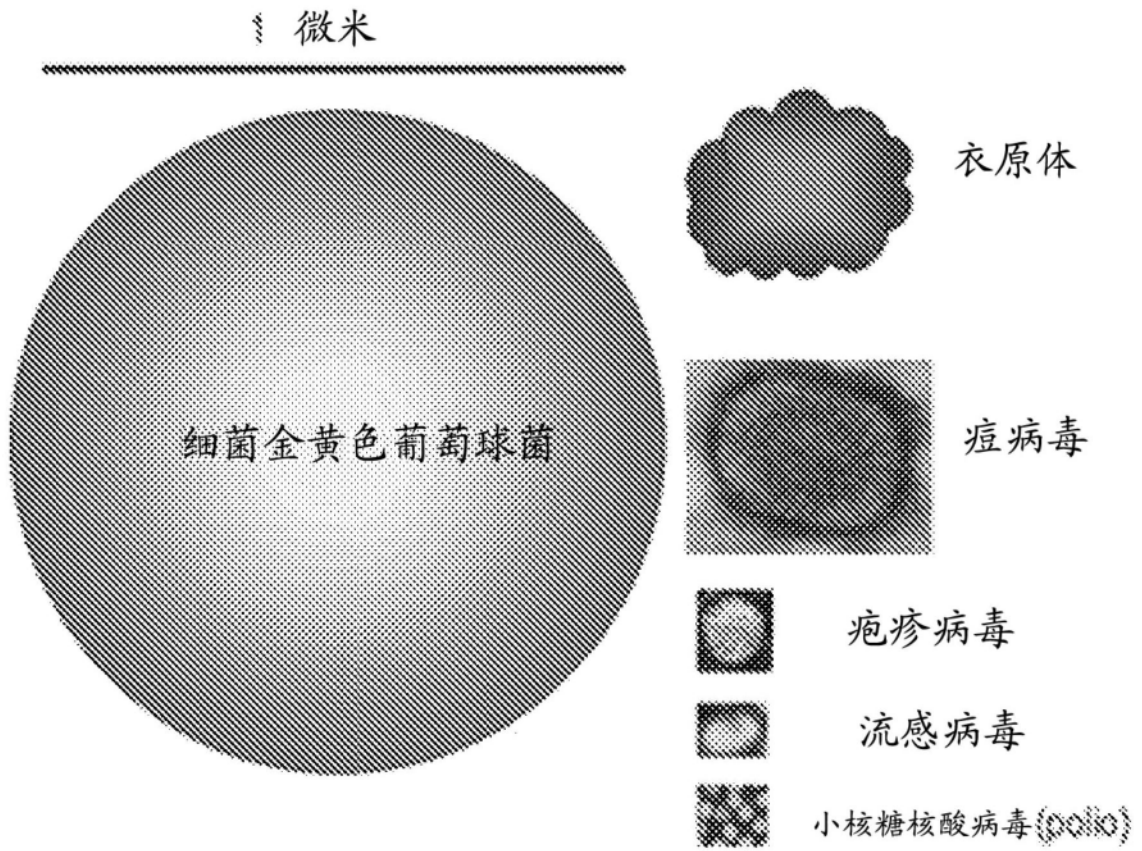


图2

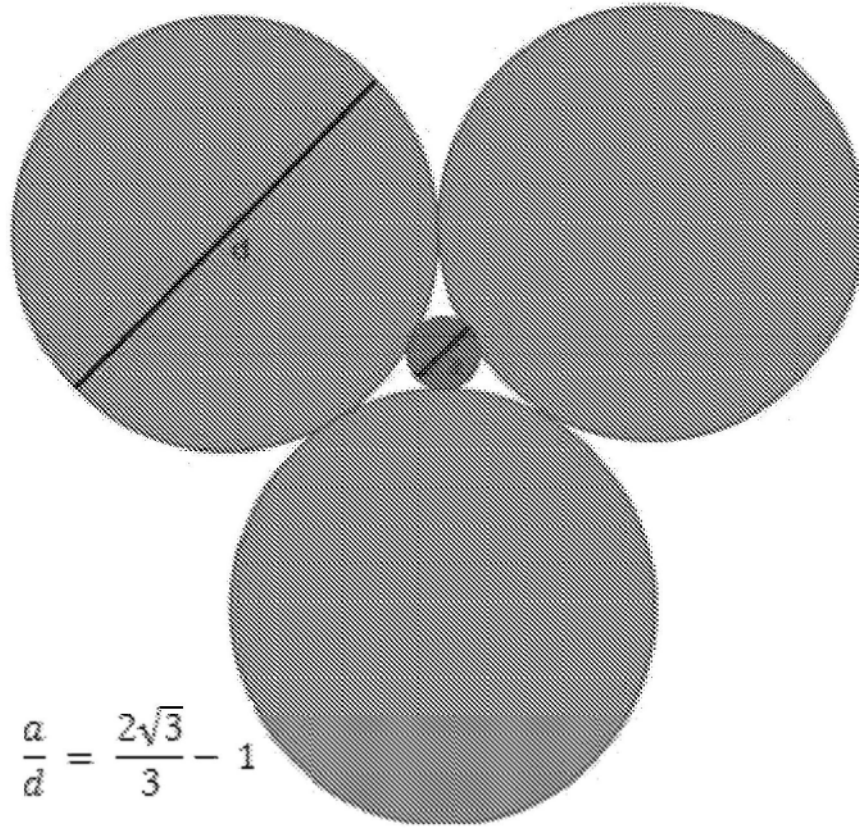


图3

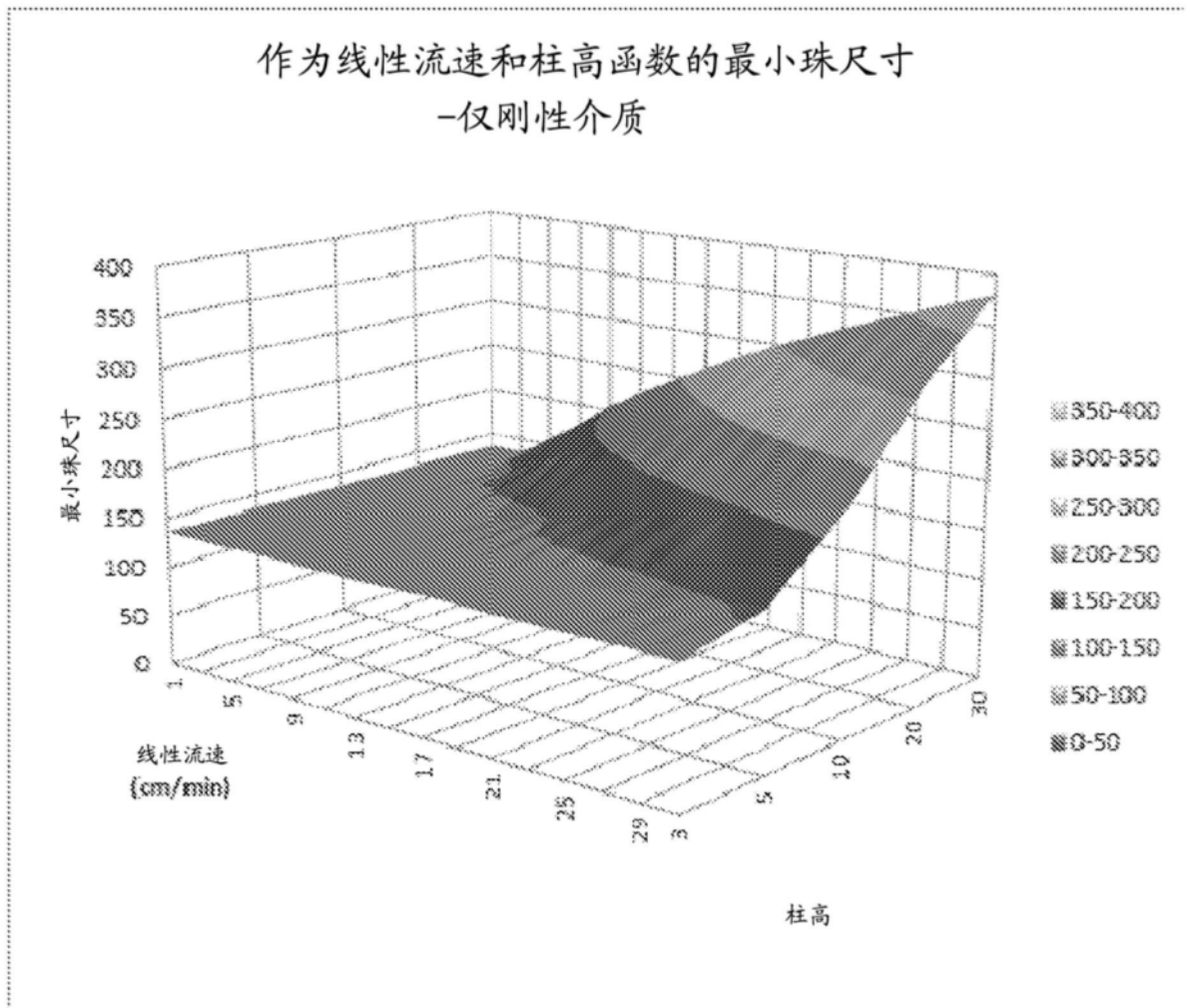


图4