(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 101049522 B
(45)授权公告日 2016.02.03

(21)申请号 200710086317.1

(22)申请日 2003.04.04

(30)优先权数据
0201257-3 2002.04.25 SE

(62)分案原申请数据
03809335.9 2003.04.04

(73)专利权人 阿尔特克医药股份公司
地址 瑞典隆德

(72)发明人 B·约翰逊 L·勒琼戈兰

(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 殷骏

(51)Int.Cl.
A61M 1/34(2006.01)
A61L 33/00(2006.01)
B01J 20/32(2006.01)
B01J 20/00(2006.01)

(56)对比文件
EP 0679436 A1,1995.11.02, 权利要求 1-12.
WO 0123413 A1,2001.04.05, 权利要求 1-26.

审查员 牛培利

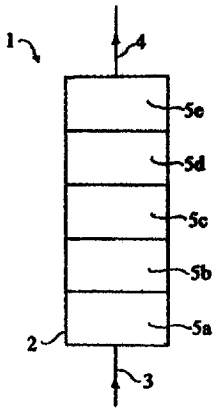
权利要求书2页 说明书16页 附图4页

(54)发明名称

改进的分离

(57)摘要

本发明涉及一种从全血或体液中选择性结合和分离至少一种成分的方法，由此能够使血液或体液经过刚性并整合的分离基质而不会被其排阻。所述基质具有孔径为5微米～500微米的多孔结构以及0.5cm^2～10m^{2}的活性表面，所述表面能够结合所述成分。



CN 101049522 B

1. 从水溶液中选择性去除内毒素的方法，包括：

将所述水溶液通过一个刚性并整合的分离基质而不会被所述基质排阻，所述基质具有孔径为 5 微米～ 500 微米的多孔结构以及 0.5cm^2～ 10m^{2}的活性表面，

通过在所述基质上固定的胆汁酸部分结合内毒素，

其中所述基质由选自下组的工艺获得，该组包括：烧结、模塑和发泡。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述胆汁酸部分为去氧胆酸部分。

3. 根据权利要求 1 的方法，进一步包括：

被覆或表面修饰所述基质的所述多孔结构，以便在所述多孔结构上排列所述胆汁酸部分。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中所述基质由选自下组的材料制成，包括金属、无机氧化物、碳、玻璃、陶瓷、合成聚合物和天然聚合物，和它们的组合。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中所述基质是由铁磁性金属制成的。

6. 根据权利要求 4 的方法，其中合成或天然聚合物被覆在所述材料上。

7. 根据权利要求 4 或 6 的方法，其中所述合成聚合物选自下组，包括：聚烯烃、含氟聚合物、聚酰胺、聚酰亚胺、聚亚胺、聚苯乙烯及其共聚物、硅橡胶、聚酯、聚醚、它们的共聚物和它们的杂化物。

8. 根据权利要求 4 或 6 的方法，其中所述合成聚合物选自下组，包括：乙烯聚合物、聚丙烯酸酯、聚碳酸酯、聚氨基甲酸酯、聚磺酸酯、聚乙二醇、聚环氧烷。

9. 根据权利要求 4 或 6 的方法，其中所述天然聚合物选自下组，包括：聚合糖类、聚氨基酸、其共聚物和其杂化物。

10. 根据权利要求 4 或 6 的方法，其中所述天然聚合物选自下组，包括：多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、其共聚物和其杂化物。

11. 根据权利要求 3 的方法，其中所述表面修饰的方法选自下组，包括：电沉积、电蒸发、等离子体化学沉积、离子等离子体流的沉积、等离子体聚合、等离子体增强的表面聚合体沉积和化学蒸汽沉积。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中交联臂在所述基质和胆汁酸部分之间共价偶联。

13. 根据权利要求 12 的方法，其中所述交联臂选自下组，包括：同基双功能性、异基双功能性和三功能性交联臂。

14. 根据权利要求 12 的方法，其中所述交联臂作为间隔臂在所述基质和胆汁酸部分间共价偶联。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述间隔臂选自下组，包括：硅烷、二异氰酸酯、乙醇酸酯、聚乙二醇、琥珀酰亚胺试剂、二肼、己二酸、二胺、氨基酸和聚氨基酸。

16. 根据权利要求 1 的方法用于从水溶液中选择性结合和分离内毒素的装置，其包含罩 (2)，入口 (3)，出口 (4) 和至少一个分离基质 (5a，5b，...)，所述基质是刚性并整合用于通过所述水溶液，所述基质具有孔径为 5 微米～ 500 微米的多孔结构以及 0.5cm^2～ 10m^{2}的活性表面，胆汁酸部分被固定于所述基质上并能够结合内毒素，其中所述分离基质具有由选自下组的工艺获得的多孔结构，包括烧结、模塑和发泡工艺。

17. 根据权利要求 16 的装置，其中所述胆汁酸部分为去氧胆酸部分。

18. 根据权利要求 16 或 17 的装置，其中所述分离基质在流向上包含按序排列的若干

盘。

改进的分离

[0001] 本分案申请是基于申请号为03809335.9，申请日为2003年4月4日，发明名称为“改进的分离”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及从全血或体液中除去成分的改进。更具体地，本发明涉及一种方法，其中能够使血液或体液经过刚性并整合的分离基质而不会被其排阻。

[0003] 炎性过程，如脓毒症，是导致人类发病率和死亡率的主要原因。据估计，每年仅在美国就发生400 000～500 000例脓毒症，导致100 000～175 000人死亡。在德国，已有报道显示在加强监护病房内患者的脓毒症发生率已高达19％。脓毒症也已成为加强监护病房内非外伤性疾病患者的主要致死原因。尽管在过去的几十年中对严重感染的治疗已取得较大进展，但脓毒症的发病率和致死率仍持续上升。

[0004] 根据感染生物体的类型将脓毒症分为三个主要类型。革兰阴性的脓毒症最为常见。这些感染的大多数是由大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌和绿脓假单胞菌引起的。革兰阳性病原体，如葡萄球菌和链球菌，是导致脓毒症的第二位主要的因素。第三位主要的类型包括真菌。真菌性感染占脓毒症病例相对小的百分比，但其能导致高死亡率。

[0005] 脓毒症中已被很好确定的机制涉及革兰阴性菌的毒性成分，即脂多糖细胞壁结构(LPS，内毒素)，其由脂肪酸基、磷酸基和糖链组成。

[0006] 已经鉴定了针对内毒素的某些宿主反应，如局部产生的细胞因子的释放。然而，在强烈刺激的情况下，其从外周血溢出并产生潜在有害效应，如诱导器官功能障碍。

[0007] 感染性休克的关键性介质是由单核细胞和巨噬细胞释放的肿瘤坏死因子(TNF-α)、白介素1(IL-1)和白介素17(IL-17)。它们协同作用产生能导致循环崩溃和多器官衰竭的生理学变化的级联反应。高浓度的TNF-α确实可以模拟脓毒症的症状和结局。

[0008] 正常情况下，内毒素被保持在肠腔中。例如，心肺转流术期间内脏缺血或氧化障碍(dysoxia)的存在导致粘膜屏障瓦解以及内毒素从肠腔至门脉循环的易位（即内毒素从肠至循环系统的转运）。

[0009] 多种类型的抗生素被广泛用于预防和治疗感染。然而，在不同的细菌种类中已经发展出了对很多常用抗生素的抗生素抗性。这对于医院驻留菌丛是尤为确切，医院中生物体处于持续选择压力下从而发展出抗性。此外，在医院中高密度的潜在感染患者和医务人员－至－医务人员和医务人员－至－患者的接触范围均有利于抗生素耐药生物体的播散。所使用的抗生素对施药者来说是最经济，最安全和简便的，而其可能不具有抑制特定感染的足够广的抗菌谱。由于抗生素能导致变态反应、与其它要药物交叉作用和导致对主要器官（例如肝，肾）的直接损害，而具有不同程度的毒性。很多抗生素还改变了正常肠内菌丛，这会导致腹泻和营养吸收不良。

[0010] 已知某些抗生素能够中和内毒素的作用，如多粘菌素B。该抗生素结合内毒素的脂质A部分并中和其活性。由于其毒性，故多粘菌素未能常规使用。其只能被给予处于持续监护且肾功能的监测下的患者。

[0011] 此外，为了克服抗细菌成分的主动免疫接种的某些固有局限，已经将多种技术用于制备内毒素结合抗体。通过用细菌免疫人类已经制备了大量抗体。为了发展治疗性抗体

的更稳固的制品，已经开发了数目众多的 LPS- 反应性单克隆抗体。不幸的是，临床研究并未得出有益结果。然而，应注意到这些试验是在脓毒症症状开始后对人体实施的。已得到广泛确信的是抗内毒素抗体治疗，在脓毒症后实施的，可产生较少有益作用，因为这些抗体不能逆转由内毒素启动的炎性级联反应。

[0012] 在 JP 06022633 中，描述了抗脂质抗体的吸附剂，其包括固定在水 - 不溶性多孔材料上的具有阴离子官能团的化合物。该多孔材料可以是琼脂糖，纤维素，葡聚糖，聚丙烯酰胺，玻璃，硅胶，或苯乙烯 - 二乙烯基苯共聚物所制备的刚性聚合物，且将该多孔材料作为分离颗粒床填充在分离装置中。

[0013] 在从血液中除去成分的尝试中，制备了不同的吸附材料。WO 01/23413 中公开了包含固定在固相支持介质上的配体的内毒素清除吸附剂。优选的支持介质是珠子的形式。当填充在分离装置中时，固相支持介质的多孔性足以允许血细胞在珠子间通过。

[0014] 在 WO 00/62836 中，吸附材料具有适于从血液中除去 β -2 微球蛋白的大小和结构。该文献中的吸附材料可以是具有被修饰以便阻止蛋白质和血小板吸附的珠子和孔的表面的大孔合成聚合物。然而，聚合物的独立球形珠在载荷约为 500g 时会被机械性破坏，所述载荷在例如用珠子填充柱时产生。所述载荷导致超过柱的显著压降。

[0015] 为了减少压降，EP 464872 中制备了吸附剂，其包括具有排阻极限为 10^6～ 10^9道尔顿的水 - 不溶性多孔刚性凝胶颗粒。凝胶床被用于在体外循环治疗中从血液或血浆中选择性除去脂蛋白。

[0016] 而且，在 WO 01/23413 中，清除内毒素的多孔支持材料是珠子，其可被填充至容器中，所述珠子具有当填充至柱和滤床时足以提供珠子间必需空间的大小。所述多孔支持材料还可以是微孔过滤空心纤维或平板膜以便将压降最小化。

[0017] 在 EP 424698 中描述了用于清除生物大分子的吸附剂，其包含粒度为 50 ～ 150 微米和排阻极限至少为 10^5道尔顿的多孔球形颗粒载体。将多粘菌素 B 偶联至所述颗粒，随后将颗粒填充至用于从全血中体外除去内毒素的系统中的套筒 (cartridge)。

[0018] 在这些用于从血液中体外除去毒性成分的传统系统中，首先用液体填充容器或套筒然后导入吸附性多孔珠。在 US 6,408,894 中公开了一种方法，其提供了珠子的更均匀分布和更致密填塞。该方法包括将液体和珠子的混合物以液体从混合物中挤出和从容器中挤出的方式强行填至容器中。

[0019] 因此，血细胞的除去有利于清除存在于血浆中的化合物如上述，例如在 WO 00/62836 或 WO 01/23413 中所述。然而，所述技术包括两个分离步骤，所述两个步骤均可以促成由于生物不相容性而产生的不利细胞活化的增高风险。

[0020] 本发明的目的是提供一种从全血或体液中选择性结合和分离至少一种成分的新方法，由此消除上述与炎性进程相关的问题。

[0021] 另一目的是提供这样一种方法，由此可对全血实施选择性结合和分离而无需将血液分离为血浆和血细胞。

[0022] 本发明更进一步的目的是提供这样一种方法，其不是大小依赖性的，即血液成分不通过排阻法进行分离。

[0023] 本发明更进一步的目的还在于提供这样一种方法，由此可在分离装置中获得高流速而不会产生随时间的显著压降。

[0024] 而更进一步的目的是提供这样一种方法，即使在高流速下也不需要将血液置于分离装置中的剪力下而能保持低管压力以便避免损伤血管。

[0025] 这些目标通过具有权利要求 1 的特征的本发明得以实现。本发明的其它优势将从权利要求 21 和从属权利要求中显而易见地得出。

[0026] 根据本发明，提供了从全血或体液中选择性结合和分离至少一种成分的方法。能使血液或体液经过刚性并整合的分离基质而不会被其排阻，所述基质具有孔径为 5 微米～ 500 微米的多孔结构以及 0.5cm^2～ 10m^2的活性表面，其能够结合一种或几种成分。

[0027] 在本发明优选的实施方案中基质还包括至少一种通过多孔结构的被覆和 / 或表面修饰的方法而引入的官能团。这导致所获活性表面，单独或与其自身的非官能化区联合，能够结合全血或体液的至少一种成分。要除去的成分可以是天然的以及非天然的，即与成分结合的特异性配体，如抗体。

[0028] 此外，官能团，通过多孔结构表面的直接或间接选择性转化获得的，已被进一步用于配体的固定。然而，多孔结构的官能团的使用可按本发明的方法进行。

[0029] 孔径以及骨骼样多孔结构的表面已被适用于进行全血纯化的本发明的分离基质中。然而，根据本发明的方法还可用于从其它体液以及水溶液中除去成分。本发明的一个重要方面是在分离步骤中既不会有任何成分也不会有任何溶剂从基质排阻。

[0030] 根据本发明，刚性并整合的基质应具有 0.5cm^2～ 10m^2的可用面积，而基质结构的密度在实施本发明方法中是非限制性的。

[0031] 关于这一点，术语“刚性”是指基质为非挠性的，不能被弯曲或变形，但能抵抗至少 0.5 巴的压力。术语“整合的”是指具有高表面积的基质是一个整体。

[0032] 本发明方法中基质的多孔结构由金属，无机氧化物，碳，玻璃，陶瓷，合成聚合物，和 / 或天然聚合物，或其混合物制成。具有明确孔径和高表面积的多孔固体金属结构可通过使用制备均一大小的孔的严格控制的烧结过程来制备。

[0033] 不同的聚合物已经制备成具有多孔结构、具有所需孔径以及对于基质的高表面积的经模塑的或挤出的多孔材料。它们还被发泡制备。例如，从异氰酸盐和多种其它有机化合物制备的聚氨基甲酸酯具有活性氢原子，其已经用于制备聚加成反应产物。该活性氢可来自双功能性或多功能性化合物，如多元醇、多胺。与水的反应可产生能用于特定配体共价固定的伯胺。

[0034] 已使用了广泛类型的金属和合金，如不锈钢、镍、钛、莫内尔合金、铬镍铁合金、哈斯特洛伊合金和其它特殊金属材料。高表面积无机氧化物，尤其是氧化铝和氧化锆，其已用制备具有确定孔结构的陶瓷材料的相同技术进行使用。而且，可购买具有适宜孔径的所述陶瓷以及热压结的玻璃。

[0035] 还使用了其它天然刚性材料，如无定形硅，例如沸石，和火山岩。

[0036] 天然材料及其杂化物（可用作本发明方法中的基质材料）是多糖，如纤维素，和其它聚合糖类材料。其它适宜的天然聚合材料是聚氨基酸，还可以是包括合成氨基酸、聚乳酸、聚乙醇酸及其与乳酸的共聚物的那些。

[0037] 关于这一点术语杂化物包括所述天然材料的衍生物，例如纤维素双乙酸盐，其优选是多糖衍生物。

[0038] 用于本发明中所使用基质的适宜的合成聚合物是聚烯烃，如聚乙烯、聚丙烯、聚丁

烯、聚甲基戊烯和乙烯乙酸乙烯共聚物；乙烯聚合物，如聚乙烯醇、聚乙烯缩醛和聚乙烯吡咯酮；含氟聚合物、如聚四氟乙烯、氟化乙烯－丙烯共聚物、聚氯氟乙烯、聚氟乙烯和聚偏1,1-二氟乙烯；聚丙烯酸酯、如聚甲基丙烯酸甲酯、氰基丙烯酸酯、聚丙烯腈、和聚甲基丙烯酸酯；聚酰胺，如聚丙烯酰胺；聚酰亚胺，如聚乙烯亚胺；聚苯乙烯及其共聚物，如聚苯乙烯和丙烯腈－丁二烯－苯乙烯聚合物；硅橡胶；多元酯或聚醚；聚碳酸酯；聚氨基甲酸酯；聚－磺酸酯；聚乙二醇；聚环氧烷如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷；及其共聚物或杂化物。

[0039] 在优选的实施方案中，将至少一种官能团引入刚性并整合的分离基质的多孔结构上。官能团可以是不同类型的，即阴离子类型、阳离子类型或非离子性类型。多孔结构的官能团已用于共价结合物质如肽／蛋白质和胆汁酸（例如脱氧胆酸），抗体及其片段以及其它生物分子和具有选择性结合内毒素和／或促炎症介质的物质。

[0040] 表面修饰，即间接方式的表面官能化，可通过电沉积，电蒸发，等离子体化学沉积，从离子等离子体流的沉积，或化学气相沉积（例如等离子体聚合，等离子体增强的表面聚合体沉积）的方法实施。表面修饰方法本身是已知的且可见于N.Inagaki,1996, Technomic Publishing, Lancaster, USA“Plasma surface modification and plasma polymerization”,。已经通过这些方法处理不同的三维基质结构，实现了活性表面非常均质的修饰。

[0041] 丙烯酸性或烯丙基性双键的双官能单体的和极性基团如OH、NH_2、CN和COOH的聚合已经用于制备具有高密度官能团的等离子体聚合物。例如，无机和有机表面的表面官能化已经在烯丙基化合物，如丙烯胺的等离子体环境中实施。

[0042] 在NH_3、O_2或CO_2等离子体环境中的有机聚合表面也是可能的，所述等离子体环境或者产生官能团＝NH、$-NH_2$、＝CN、-OH、或者-COOH。所使用气体的其它实例是本领域众所周知的。

[0043] 等离子体化学过程也已与经典的化学合成联合，而显著增强了表面修饰对聚合物的选择性。一种方法是在共存等离子体官能团的化学联合之后即应用特定等离子体气体表面官能化。

[0044] 引入官能团的另一方式是通过直接官能化的方法，即用聚合材料被覆表面。关于这一点已经将合成或天然聚合物被覆在高表面金属、无机氧化物、碳、玻璃、陶瓷，以及其它适宜的合成聚合物，和／或天然聚合物，或其混合物上。

[0045] 很多上述聚合物，尤其是那些无官能团的聚合物，如聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯等，需要进一步的处理以便改变其表面特性。由此，聚合物表面的等离子体或电晕处理，如上述，将产生非常独特的官能团，象羟基、羰基、羧基、氨基和亚氨基等，其可共价附着于表面。

[0046] 所述被覆还可以通过含有官能团的聚合物质的附着和吸附的方式而实施。所述物质的实例是聚赖氨酸、聚精氨酸、和聚乙烯亚胺。

[0047] 通过例如使用等离子体技术，可在多孔表面上获得聚乙烯亚胺样物质。当分离基质用于根据本发明的方法中从全血或体液中选择性结合和分离至少一种成分时，蛋白质性血液成分的亲水区和疏水区可与处理的表面发生相互作用以便除去所要除去的成分。在官能化后，当用于选择性结合和分离的基质表面包含聚烯烃，例如聚乙烯或聚丙烯时，氨基的正电荷也可用于静电相互作用而疏水区用于疏水作用。将该过程用在本发明方法中从而选

择性结合例如脂多糖的不同区域。

[0048] 聚合物和金属，具有例如反应性羟基，也可通过硅烷化而被官能化。

[0049] 由此，已经将多种不同的官能团共价偶联于高表面多孔基质结构。在直接和 / 或间接官能化后，多孔结构可具有亲水区以及疏水区，其可与不同的血液成分相互作用。由此，在制备用在根据本发明的方法中的表面时，使用了兴趣物质的特性。

[0050] 优选地，活性表面的官能团是巯基、羧化物、胺、醛、酮、羟基、卤素、肼类和活性氢。

[0051] 在另一优选的实施方案中，配体以共价的方式与高表面多孔结构的至少一种官能团偶联。关于这一点，配体是具有对要从全血或体液中除去的成分高亲和力的物质。由此，所述配体用于增强吸附特性和结合效能。

[0052] 配体可以是蛋白质，优选是重组蛋白质、肽、抗体或其片段、糖类例如多糖、激素、抗氧化剂、糖蛋白、脂蛋白、脂质、脂溶性维生素例如维生素 E、胆汁酸、活性染料、尿囊素、尿酸、或多粘菌素，或其组合。

[0053] 适宜的胆汁酸是脱氧胆酸，其是内源性疏水性物质。所述胆汁酸可或借助间隔臂与官能团直接偶联，或借助大分子偶联，然后按根据本发明的方法用于从血液、体液和水溶液中除去内毒素。

[0054] 关于这一点，间隔臂是能够将配体连接于多孔结构表面的分子，大或小。

[0055] 例如，如果在本发明方法中分离基质的多孔结构包括具有附加氨基的聚烯烃，该基团可含有与其偶联的白蛋白和依次与该大分子偶联的至少一种胆汁酸部分。

[0056] 由此，本发明还涉及固定在支持物上的胆汁酸部分用于从包含相同内容的水溶液中去除成分的新用途。优选地，胆汁酸部分是脱氧胆酸部分。

[0057] 由此，固定胆汁酸部分的适宜的固体支持物是具有孔径为 5 微米～ 500 微米，优选 70 微米～ 170 微米，以及活性表面为 0.5cm^2～ 10m^2的多孔结构的刚性并整合分离基质。

[0058] 本发明方法中的基质的配体还优选是白蛋白或用重组方法制备的白蛋白，其可用于替代血清白蛋白、多粘菌素 B（即疏水性结构上的带电荷的基团）或脱氧胆酸。

[0059] 由此，配体还可以以根据本发明的方法中的间隔臂而发挥作用。例如，其还可首先将人重组蛋白质或另一大分子（例如透明质酸）共价附着于多孔结构，其能允许随后的特异性针对要被除去成分的配体的结合。

[0060] 如必须，交联臂可在至少一种官能团和配体间以共价方式偶联。关于这一点，交联臂是将配体共价结合于支持性多孔结构的元件，当将配体连接在多孔结构自身的远侧时，该元件是间隔臂。所述分子间隔臂是本领域已知的。将其引入以便通过提供对配体更好的可用性从而增加对要从全血或体液中结合和分离的成分的亲和力。通过引入这些分子间隔臂还能增加多孔基质结构表面的生物相容性。

[0061] 交联臂 / 间隔臂可单独包括零长度交联臂或与介入性交联臂组合，获得的最终复合物通过将结构加入交联物质的化学物质的特性而结合在一起。这些介入性交联臂可以是同双官能性（例如二醛）、异双官能性（例如氨基酸）或三官能性交联类型。

[0062] 间隔臂的主要目的是增加所使用的特定配体的生物利用度。

[0063] 间隔臂可以是例如硅烷、二异氰酸酯、乙醇酸酯、聚乙二醇、琥珀酰亚胺试剂、二肼、己二酸、二氨、氨基酸、多或寡氨基酸、聚氨基酸、肽、或蛋白质。优选地，蛋白质是人重组蛋白质。

[0064] 交联臂的官能团被设计为与氨基 (Lys, Arg),与巯基 (Cys),或与羧基 (Asp, Glu) 反应,以便例证少数实例。

[0065] 关于反应基团化学这一点,可参照 Bioconjugate Techniques,GregT Hermanson, Academic Press,USA 1996。

[0066] 由此,本发明方法中的活性多孔基质表面能够单独或与多孔结构的可用表面的非官能化区联合除去例如内毒素。活性表面还可用作共价固定化学试剂,如生物分子象氨基酸,多肽和抗体的工具以便选择性增强所述特定成分的消除。

[0067] 分离基质,意在从全血或体液中选择性除去至少一种成分,可用具有依赖于预期应用的特定孔径和 / 或特定孔径范围的多孔结构制备。优选地,该多孔结构应允许血细胞通过。由此,特定类型的血细胞也可通过本发明方法而从全血中除去。所述细胞为存在疾患的细胞或具有特定表面受体的细胞,例如活化的吞噬细胞。

[0068] 用于特殊用途的金属结构可以是磁性的。磁性基质可以例如通过被覆热压结磁体和聚合物,例如聚乙烯而获得。然后实施细胞的有效去除而使得抗体,具有磁性葡聚糖铁标记,附着于血液中的特定细胞。

[0069] 孔径应为 5 微米～ 500 微米,优选 70 微米～ 170 微米,最优选 80 微米～ 100 微米,因此可保持高流速而不会发生细胞性损伤或细胞性排阻。由此,采用根据本发明的方法实施的分离不基于成分的任何大小分布。事实上,全血或体液的所有成分均可通过本发明方法进行清除。

[0070] 在除去一个或多个原发毒性效应物,即内毒素之后,可除去进一步的继发毒性效应物。继发效应物可以是细胞因子 (例如 TNF-α),白介素 (例如 I1-1),活性氧和氮根,等。

[0071] 当实施根据本发明的方法时,一种或几种分离基质被保护在罩内,所述罩可具有根据应用而不同的形状和可变化的和 / 或不同的入口和出口。然后可将所述装置用于内毒素清除和 / 或细胞因子清除和 / 或细胞因子中和。这可以通过将血液或其它体液经过装置,体内、并行或体外应用的,而得以实现,而不会发生液体被其中的刚性并整合的分离基质排阻。多孔结构的活性表面,其上的官能团和 / 或特异性配体然后选择性地从液体中结合和分离至少一种成分。该装置还适用于从水溶液中除去内毒素。

[0072] 本发明方法的重要特征是可以提供给感染性休克的所有方面,即原发以及继发毒性效应物可通过本发明方法而被除去。

[0073] 关于实施根据本发明的方法可以参照图 1。装置 1 包含罩 2,将装置的罩 (或套筒) 整合至闭式循环中,其中全血或体液通过泵的方式进行循环。在罩 2 中,排列至少一种分离基质 5a,5b,…,每种分离基质被预期能从全血或体液中除去一种成分。罩 2 具有入口 3 和出口 4,其位置并不重要只要在分离基质和罩中能获得足够的流量即可。优选地,将泵置于入口 3 的上游。

[0074] 以这种方式,可获得能够保持 5ml/ 小时～ 6000ml/ 分钟的流速而无显著压降的装置。当体外应用时,即使在非常高的流速下仍能获得从泵至管不超过 300mm Hg 的管压力。

[0075] 刚性的整合的分离基质可被制成用于本发明方法的不同的形状。例如,其可被设计为盘、杆、筒、环、球、管、空心管、平板或其它模塑的形状。

[0076] 因为每个基质中的流量依赖于其孔隙率,故可控制血液或体液中的成分与活性表面的接触时间。此外,通过改变孔隙率和分离装置中各分离基质的构型可在分离装置中产

生所需流量梯度。

[0077] 图 2 和图 3 中显示了装置的不同图式实施方式，其可在实施根据本发明的方法时使用。箭头指示独立的分离基质和其罩内的血液或体液流，大箭头表示具有比小箭头更高的流速。在不同构型的这些实例中，分离基质可具有相同或不同孔隙率，具有或不具有相同或不同类型的官能团或配体，以便从血液或体液中除去一种或几种成分。

[0078] 分离基质优选与罩（每个均具有入口 3 和出口 4）结合以便确保无液体或其中的成分被阻止进入基质或基质，即被其排阻。在图 2(a) 和 (b) 中，给出罩 2 内一个分离基质 5 的实例，该基质具有不同的构型。图 2(c) 和 (d) 中显示了罩 2 内两个分离基质 5a，5b 的实例。在图 2(c) 的装置中，在分离基质 5a 的外周的不可透过性被覆 6，如实用的皮，确保应用于该装置的所有材料将经过该整个基质。在图 2(d) 的装置中，另一方面，部分应用的材料在分离基质 5a 中的停留时间将短于在分离基质 5b 中的停留时间，反之亦然。

[0079] 图 3 中每个装置包括若干分离基质 5a-5g。图 3 中 (a) 隔断壁 7 确保流动通过所有基质。分离基质可相对其纵向而旁侧或横向放置，如图 3(b) 和 (c) 分别所示。图 3 中 (d) 装置包括不同大小的分离基质。

[0080] 总之，本发明方法可与体内、并行或体外使用的或独立的装置进行使用，由此所述装置能够降低循环内毒素和可能的有害的前炎性介质，尤其是 TNF-α，IL-1 和 IL-17，优选在血液中。其还可能从其它水溶液中选择性除去内毒素。所述成分被认为通过附着的方式而结合于刚性并整合的分离基质的活性表面。

附图说明：

[0081] 图 1 为包含分离基质的套筒的横截面的概略图，

[0082] 图 2a、b、c 和 d 为包含不同构形的分离基质的套筒的横截面的概略图；

[0083] 图 3a、b、c 和 d 为包含其它不同构形的分离基质的套筒的横截面的概略图；

[0084] 图 4 为包含具有很多基质板的套筒的测试系统的流程线概略图；

[0085] 图 5 全血在经套筒之前和之后的 TNF-α 含量的线图。

[0086] 图 6 为内毒素含量减少的线图。

实施例

[0087] 参照下述精心选择以便涵盖本发明的实施例进一步描述和例证本发明。因此，下述实施例不应被理解为在任何形式上限制本发明。

[0088] 表面修饰

[0089] 实施例 1.

[0090] 对于孔隙率为 350 微米以及活性表面为 10cm^{2}的多孔聚乙烯 (Porex Technologies，Germany) 基质的表面，通过使用 O_2以等离子体增强的化学气相沉积法 (Plasma Science，USA，Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System) 进行修饰。

[0091] 通过染料试验测定所获基质的多孔结构表面上羟基的形成，其亲水性得以证实。

[0092] 实施例 2.

[0093] 对于孔隙率为 100 微米以及活性表面为 20cm^{2}的多孔聚乙烯 (Porex Technologies，Germany) 基质的表面，通过使用 CO_2以等离子体增强的化学气相沉积法

(Plasma Science,USA,Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System)进行修饰。

[0094] 所获基质的多孔结构表面上羟基的形成和量通过转化为异羟肟酸而进行测定。关于这一点,所有异羟肟酸与三氯化铁在酸溶液中呈现红色或紫色,如Feigel等;Microchemie 15:18,1934中所述。

[0095] 实施例3.

[0096] 对于孔隙率为170微米以及活性表面为0.04m^2的多孔聚乙烯(Porex Technologies,Germany)基质的表面,通过使用丙烯胺以等离子体聚合法(Plasma Science,USA,Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System)进行修饰。

[0097] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量通过磺酸三硝基甲苯(TNBS)测定法进行测定。

[0098] 实施例4.

[0099] 对于孔隙率为70微米以及活性表面为0.26m^2的多孔聚乙烯(Porex Technologies,Germany)基质的表面,通过使用丙烯酸以等离子体聚合法(Plasma Science,USA,Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System)进行修饰。

[0100] 所获基质的多孔结构表面上羟基的量按实施例2中所述进行测定。

[0101] 实施例5.

[0102] 对于孔隙率为5微米以及活性表面为0.9m^2的多孔聚乙烯(Porex Technologies,Germany)基质的表面,通过使用NH_3以等离子体聚合法(Plasma Science,USA,Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System)进行修饰。

[0103] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例3中所述进行测定。

[0104] 实施例6.

[0105] 对于孔隙率为10微米以及活性表面为100cm^2的多孔聚四氟乙烯,PTFE(W.L.Gore&Assoc iatesInc.,USA)基质的表面,通过使用NH_3以等离子体增强的化学气相沉积法(Plasma Science,USA,Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System)进行修饰。

[0106] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例3中所述进行测定。

[0107] 实施例7.

[0108] 对于孔隙率为10微米以及活性表面为300cm^2的多孔,聚苯乙烯(Dow Chemical,USA)基质的表面,通过使用CO_2以等离子体增强的化学气相沉积法(Plasma Science,USA,Type PS 0350Plasma Surface Treatment System)进行修饰。

[0109] 所获基质的多孔结构表面上羟基的量按实施例2中所述进行测定。

[0110] 实施例8.

[0111] 对于孔隙率为80微米以及活性表面为100cm^2的多孔聚氨基甲酸酯(Polymers Unlimited,Sweden)基质的表面,在95%乙醇中通过2% Aldehydic Alkoxy Silane溶液,Art No.(PSX 1050,United Chemical Technologies Inc.,USA)的方法进行修饰。用乙酸将溶液的pH调整至pH 5.5,然后用溶液灌注经过基质,将其在室温下温育过夜并最后用0.9%生理盐水洗涤。

[0112] 所获基质的醛官能度通过用对苯二胺由过氧化氢的氧化的催化加速使用进行评价,对苯二胺在酸溶液中由过氧化氢的氧化的催化加速作用进行评价已知为Bandrowski氏碱。

[0113] 实施例 9.

[0114] 对于孔隙率为 200 微米以及活性表面为 0.5m^2的多孔聚硅氧烷 (Nusil, France) 基质的表面，在 95％乙醇中通过 2％胺－硅烷溶液 (Art No.0750, United Chemical Technologies Inc.,USA) 的方法进行修饰。将溶液灌注经过基质，将其在室温下温育过夜并最后用 0.9％生理盐水洗涤。

[0115] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例 3 中所述进行测定。

[0116] 通过共价结合方法的被覆

[0117] 实施例 10.

[0118] 将聚赖氨酸 (200mg) 溶于 10ml 的 50mM 碳酸钠溶液中然后将孔隙率为 100 微米的多孔聚碳酸酯 (MicroPore Plastics,USA) 基质浸入溶液中并保持于 4℃ 24 小时以便获得聚赖氨酸和聚碳酸酯基质间的共价结合。最后用过量蒸馏水洗涤多孔基质。

[0119] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例 3 中所述进行测定。

[0120] 实施例 11.

[0121] 根据实施例 4 所获的多孔聚乙烯基质用 1-环已基 -3-(2- 吗啉代乙基）碳二亚胺甲基－对－甲苯磺酸盐 (WCCM)(Aldrich) 的水溶液以 5ml/ 分钟的流速在闭路中于室温下灌注 6 小时。然后其用水冲洗并最后加入聚乙烯亚胺溶液 (Sigma)(10mg/ml,pH 7.0) 然后将基质温育过夜。

[0122] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例 3 中所述进行测定。

[0123] 实施例 12.

[0124] 根据实施例 3 所获的多孔聚乙烯基质在 0.2M 磷酸盐缓冲液，pH7.5 中通过使用 1.0％戊二醛而进行结合，然后以 1ml/ 分钟的流速于室温灌注 6 小时。然后在与透明质酸溶液 (2mg/ml) 于室温温育 16 小时前用缓冲液洗涤基质。最后冲洗掉过量的透明质酸。

[0125] 所获基质的多孔结构表面上透明质酸含量采用阿辛蓝 (Sigma) 进行证实和测定。

[0126] 通过附着方法的被覆

[0127] 实施例 13.

[0128] 具有 70 微米孔隙率和 0.18m^2的活性表面的多孔聚乙烯 (Porex Technologies, Germany) 基质用 2mg/ml 透明质酸溶液 (BioHyos, Sweden,12.10^6Da)pH 3.3(用 0.1M HCl 调整的) 以 1ml/ 分钟的流速在闭路中于室温下灌注 16 小时。

[0129] 所获基质的多孔结构表面上透明质酸含量按实施例 12 进行确定证实。

[0130] 实施例 14.

[0131] 将具有 70 微米孔隙率和 7.0m^2活性表面的多孔聚乙烯 (Porex Technologies, Germany) 基质置于玻璃管中。用在 350ml 水中且以 0.1M HCl 调整至 pH 3.3 的 0.13％聚赖氨酸 (Sigma) 溶液填充所述具有多孔基质的管。然后将聚赖氨酸溶液用其滤过基质以＜ 5ml/ 分钟的流速在室温下经过管再循环 16 小时。最后用反渗水冲洗多孔基质。

[0132] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例 3 进行测定。

[0133] 实施例 15.

[0134] 将具有 70 微米孔隙率和 3.4m^2的活性表面的多孔聚乙烯 (Porex Technologies, Germany) 基质置于玻璃管中。用在 350ml 反渗水中且以 0.1M HCl 调整至 pH 3.3 的 0.2％ Recombumin(重组人血清白蛋白，Hoechst-Pharma，USA) 溶液填充所述具有多孔基质的管。

[0135] 然后将 Recombumin 溶液用其滤过基质通过使用泵以＜ 5ml/ 分钟的流速在室温下经过管再循环 16 小时。最后用反渗水冲洗多孔基质。

[0136] 所获基质的多孔结构表面上表面蛋白质的含量通过使用考马斯亮蓝 (BioRad, USA) 进行测定。

[0137] 实施例 16.

[0138] 根据实施例 4 所获的多孔聚乙烯基质用聚乙烯亚胺 (Sigma) 溶液，10mg/ml，以 5ml/ 分钟的流速在闭路中灌注过夜。然后，用水冲洗多孔基质。

[0139] 所获基质的多孔结构表面上伯胺的量按实施例 3 中所述进行测定。

[0140] 配体的直接结合

[0141] 实施例 17.

[0142] 通过使用 WCCM 水溶液将根据实施例 5 所获多孔聚乙烯基质与脱氧胆酸盐 (DOC) 结合。将 300ml 40％二－甲酸甲酯 (DMF)(Sigma) 在水中的溶液（包含 1mmol 去氧胆酸钠）搅拌加入多孔聚碳酸酯，同时用 0.3M HCl 将 pH 调整至 pH 4.8。然后在 10 分钟的时间内，加入在 DMF ：水 (1 ： 1.8) 中 6mM WCCM 的溶液。通过加入 0.3M HCl 将悬液在 pH 4.8 保持 3 小时。

[0143] 使用胆汁酸试剂盒 (Sigma) 测定所获基质的多孔结构表面上的 DOC 含量。

[0144] 实施例 18.

[0145] 根据实施例 3 所获的多孔聚乙烯基质通过使用 12％的戊二醛的 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 于室温 24 小时而进行结合。用 0.15M 磷酸盐缓冲液洗涤基质然后以 1mg/ml 的浓度加入抗 CD14 抗体 (DAKO, Denmark) 然后 8℃温育 24 小时。随后实施氰基硼氢化钠还原以便制备稳定的仲胺键。

[0146] 通过在多孔基质温育前和后的抗体缓冲溶液的 UV 光谱学方法而间接地测定所获基质的多孔结构表面上的抗体含量。

[0147] 实施例 19.

[0148] 用 0.15M 磷酸盐缓冲液洗涤根据实施例 8 所获的多孔聚乙烯基质然后以 1mg/ml 的浓度加入重组 IL-1 受体 (Kineret,Amgen,USA) 然后 8℃温育 24 小时。随后实施氰基硼氢化钠还原以便制备稳定的仲胺键。

[0149] 通过在多孔基质温育前和后的 IL-1 受体缓冲溶液的 UV 光谱学方法而间接地测定所获基质的多孔结构表面上的 IL-1 受体含量。

[0150] 实施例 20.

[0151] 根据实施例 5 所获的多孔聚乙烯基质通过使用 1.0％戊二醛和 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 而进行结合。将基质用该溶液温育 3 小时。在用磷酸盐缓冲液洗涤后，将基质温育在硫酸多粘菌素 B(Sigma) 溶液 (1mg/ml) 中，经再循环过夜。最后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤基质。

[0152] 实施例 21.

[0153] 根据实施例 2 所获的多孔聚乙烯基质与 0.1M 2-(N- 吗啉代）甲磺酸 (MES) 缓冲液 (Sigma)(pH 4.8) 中浓度为 5mg/ml 重组 TNF-α 受体 (Enbrel, Wyeth, UK) 结合。然后加入 30mg/ml WCCM 的水溶液，然后将基质于 8℃温育过夜。最后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤基质。

[0154] 通过在多孔基质温育前和后的TNF-α 受体缓冲溶液的UV光谱学方法而间接地测定所获基质的多孔结构表面上的TNF-α 受体含量。

[0155] 实施例22.

[0156] 根据实施例3所获的多孔聚乙烯基质与抗-人TNF-α 抗体(Sigma)通过使用于0.2M磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中1.0%的戊二醛进行结合。将基质与TNF-α 抗体缓冲溶液温育3小时。在用磷酸盐缓冲液洗涤多孔基质后,磷酸盐缓冲液中的抗人TNF-α 抗体(1mg/ml)被加入,然后以1ml/分钟的流速经再循环于室温温育6小时。最后用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤基质。

[0157] 通过在多孔基质温育前和后的TNF-α 抗体缓冲溶液的UV光谱学方法而间接地测定所获基质的多孔结构表面上的TNF-α 抗体含量。

[0158] 实施例23.

[0159] 根据实施例5所获的多孔聚乙烯基质与0.1M MES缓冲液(pH 4.8)浓度为2mg/ml人杀菌性透过性增加的蛋白质(BPI)(Wieslab,Sweden)进行结合。将WCCM水溶液以15mg/ml的浓度加入该基质,然后将基质于8℃温育过夜。最后用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤基质。

[0160] 通过在多孔基质温育前和后的BPI缓冲溶液的UV光谱学方法而间接地测定所获基质的多孔结构表面上的BPI含量。

[0161] 实施例24.

[0162] 根据实施例15所获的多孔聚乙烯基质在浓度为1mg/ml的DOC的0.1M MES缓冲液(pH 4.8)的溶液中进行温育。然后加入WCCM的水溶液,然后将基质于8℃温育过夜。最后用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤基质。

[0163] 所获基质的多孔结构表面上的DOC含量如实施例17进行测定。

[0164] 使用间隔臂的配体结合

[0165] 实施例25.

[0166] 根据实施例3所获的多孔聚乙烯基质使用1.2%戊二醛的0.2M磷酸盐缓冲液(pH 7.0)于室温下活化24小时。用缓冲液洗涤基质,然后在1,6-二氨基己烷(DAH)(Sigma)的50mg/ml 0.2M磷酸盐缓冲液(pH7.0)温育24小时。此后,在溶液中加入10mg/ml氰基硼氢化钠(Sigma)。用0.1M磷酸盐缓冲液洗涤多孔基质,然后温育于DOC(1mg/ml)的0.1M MES缓冲液(pH 4.8)溶液中。然后加入WCCM的水溶液,然后将基质于8℃温育过夜。最后用0.1M磷酸盐缓冲液,pH 7.4洗涤基质。

[0167] 所获基质的多孔结构表面上的DOC含量如实施例17进行测定。

[0168] 实施例26.

[0169] 根据实施例5所获的多孔聚乙烯基质用1.2%戊二醛的0.2M磷酸盐缓冲液(pH 7.0)于室温活化24小时。

[0170] 用缓冲液洗涤基质,然后用浓度为10mg/ml的己二酸二酰肼(Aldrich)的0.2M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)温育24小时。然后在溶液中加入10mg/ml氰基硼氢化钠(Sigma)。

[0171] 用0.1M磷酸盐缓冲液洗涤多孔基质,然后用浓度为1mg/ml的DOC的0.1M MES缓冲液(pH 4.8)溶液进行温育。然后加入WCCM的水溶液,然后将基质于8℃温育过夜。最后用0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.4)洗涤基质。

[0172] 所获基质的多孔结构表面上的 DOC 含量如实施例 17 进行测定。

[0173] 实施例 27.

[0174] 通过使用 WCCM 水溶液将根据实施例 10 所获基质与 DOC 结合。将 300ml 40％ DMF(Sigma) 的水溶液（包含 1mmol 去氧胆酸钠）在搅拌时加入多孔聚碳酸酯基质。用 0.3M HCl 将悬液的 pH 调整为 4.8。在 10 分钟的时间内加入在 DMF ：水 (1 ： 1.8) 中 6mM WCCM 的溶液然后通过周期性加入 0.3M HCl 而将悬液在 pH 4.8 保持 3 小时。然后将其保持于室温 24 小时。

[0175] 所获基质的多孔结构表面上的 DOC 含量如实施例 17 进行测定。

[0176] 实施例 28.

[0177] 根据实施例 14 所获基质用 1.2％戊二醛的 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 于室温活化 10 小时，然后用过量缓冲液冲洗。将浓度为 10mg/ml 的聚乙烯亚胺 (Sigma) 的 0.1M 碳酸氢盐缓冲液 (pH 8.0)，导入多孔基质中，然后将基质与该溶液温育 16 小时。

[0178] 然后用缓冲液洗涤基质并通过使用 WCCM 水溶液与 DOC 结合。将 300ml 于水中的 40％ DMF(Sigma) 溶液（包含 1mmol 去氧胆酸钠）经搅拌加入多孔基质。用 0.3M HCl 将悬液的 pH 调整为 4.8。在 10 分钟的时间内加入 6mM WCCM 的 DMF ：水 (1 ： 1.8) 的溶液。然后通过周期性加入 0.3M HCl 而将悬液于 pH 4.8 保持 3 小时。然后将其保持在室温 24 小时。

[0179] 所获基质的多孔结构表面上的 DOC 含量如实施例 17 进行测定。

[0180] 实施例 29.

[0181] 根据实施例 3 所获多孔聚乙烯基质用 1.2％戊二醛的 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 于室温活化 24 小时。然后用缓冲液洗涤基质，然后用浓度为 50mg/ml 的 1,6- 二氨基己烷 (DAH)(Sigma) 的 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 温育 24 小时。然后用 0.1M 磷酸盐缓冲液洗涤多孔基质，并于 8℃作为悬液在浓度为 10mg/ml 的 TNF-α 受体 (Enbrel，Wyeth，UK) 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 溶液中温育 12 小时。然后将浓度为 10mg/ml 的氰基硼氢化钠溶液 (Sigma) 加入悬液。最后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤基质。

[0182] 通过在多孔基质温育前和后的 TNF-α 受体缓冲溶液的 UV 光谱学方法而间接地测定所获基质的多孔结构表面上的 TNF-α 受体含量。

[0183] 选择性结合和分离血液成分

[0184] 通过将全血经过成形为盘且活性表面为 0.02m^2的基质的滤器而实施细胞分离。

[0185] 用如图 4 所示的检测系统实施内毒素和细胞因子的去除。容器 8，用直至 2 升全血或血浆填充的，与泵 9 相连，压力监控器 10 和具有直至 40 个基质板的过滤装置 1，即提供直至 7m^2的活性表面，所述基质具有 70 ～ 130 微米的孔隙率。

[0186] 细胞分离

[0187] 实施例 30.

[0188] 具有 100 微米孔隙率的包含聚乙烯和磁性铁氧体 (80％ FeO，20％ BaO_2，Porex Technologies，Germany) 混合物的磁性多孔基质，用于通过使用特异性标记的抗 CD45+ 抗体 (MACS Antibody Microbeads ;Miltenyi Biotec，Germany) 而从全血中分离白细胞。在用所述抗体磁性标记白细胞后，将血液经过多孔基质。

[0189] 自动细胞计数器实施白细胞的细胞计数，其在分离后显示出血液中白细胞减少

90％。

[0190] 实施例 31.

[0191] 将孔隙率为 200 微米和活性表面为 0.2m²的多孔纤维素双乙酸盐 (Tenite, Eastman Chemicals, USA) 基质的表面，用于分离人吞噬性血细胞如中性粒细胞和单核细胞。在 EDTA 真空容器 (vacutainer) 管 (B&D,UK) 中收集人全血然后将血液经过多孔基质。

[0192] 收集的血液中中性粒细胞和单核细胞数量分别减少 50％和 35％，如通过使用 Türks 试剂在 Bürkner 腔中差异的细胞计数而在显微镜下所确定的。

[0193] 细胞因子的除去

[0194] 实施例 32.

[0195] 根据实施例 22 所获基质，其已经用内毒素除去性基团，用作图 4 所示检测系统中的多孔盘。

[0196] 在将抗 TNF-α 和戊二醛的多克隆抗体固定在多孔聚合物结构上的氨基上后研究从全血中清除 TNF-α 。通过将 LPS 加入血液而诱导 TNF-α 的产生，然后将活化的全血灌注装置中的固定的滤器。

[0197] 全血中 TNF-α 的量 (图 5) 被通过酶免疫分析法 (Enzymimmuno-assay, Milenia Biotec GmbH,Germany) 而确定为前 (◆) 和后 (■) 装置以便研究 TNF-α 由滤盘的摄取。如所示，可获得 TNF-α 在全血中病理浓度的显著的降低。

[0198] 内毒素的除去

[0199] 实施例 33.

[0200] 根据实施例 25 所获的基质，即等离子体修饰的聚乙烯基质，其上具有借助间隔臂二氨基己烷而固定在其上的 DOC，其首先经由戊二醛而偶联于基质然后通过使用碳二亚胺而偶联于脱氧胆酸。将所获基质用作如图 4 所示的系统的滤器装置中的多孔盘。

[0201] 按照与实施例 32 相似的方式实施从血浆中除去 LPS。

[0202] 血浆中 LPS 的量通过鲎阿米巴样细胞溶解物测定法 (Limulus Amebocyte Lysate assay)(Endochrome-K,Charles River Laboratories Inc.USA) 在经滤器装置的再循环期间以不同的时间间隔大批测定。

[0203] 图 6 中显示了内毒素 (pg/ml) 的量随时间减少。在再循环 2 小时后内毒素载荷从初始的 75pg/ml 降至检测极限 15pg/ml。

[0204] 实施例 34.

[0205] 将根据实施例 3 所获的基质 (非固定化氨基) 和实施例 17(固定化 DOC) 分别用作多孔盘并参照其消除 LPS 的能力进行比较。实施与实施例 33 相似的再循环实验，差别在于将 LPS 溶于蒸馏水中。

[0206] 按图 4 中所示测定 LPS 从水溶液中的消除，而再循环以 0.22ml/ 分钟的流速流经 10ml 装置中的每个滤器。

[0207] 下述表 1 中以再循环 120 分钟后占初始 LPS 浓度百分数给出来自实施例 3 和实施例 17 的两种基质分别清除 LPS 的值。

[0208] 表 1.

[0209]

	实施例 3	实施例 17
LPS 消除（%）	81	96

[0210] 血浆（实施例 34）和水（实施例 35）间消除程度的差异可用蛋白质，LPS 和配体的竞争相互作用进行解释。

[0211] 联合除去

[0212] 实施例 35.

[0213] 将根据实施例 19 和实施例 29 所获基质分别用于 TNF-α 和 IL-1 的联合除去。

[0214] 具有不同特异性的两种基质在如图 4 所示的两种滤器装置的闭环试验系统中串联连接。将容器中的全血保持在 37℃，通过加入 LPS 而活化，然后导入系统。从容器和滤器出口同时以不同的时间间隔进行取样以进行细胞因子分析。

[0215] 两种基质的结果均显示细胞因子 TNF-α 和 IL-1β 的浓度分别降低了 70％和 55％。

[0216] 下述表 2 总结了本发明方法用于从全血或体液中选择性结合和分离不同成分的多适用性和可观效能。为此目的，使用不同的多孔基质作为具有或不具有间隔臂时附着配体的支持。由此，固定方法分别用戊二醛通过使用两种末端 $-NH_2$和用具有一个末端 $-NH_2$和一个末端 -OH 或 -COOH 的 1- 乙基 -3(3- 二甲胺基丙胺）碳二亚胺进行实施。

[0217] 还使用了经由醛或氨基官能性硅烷偶联剂而用于氨基、抗体、酶、肽、蛋白质特异性结合的硅烷化，醛基自发地与胺、肽和蛋白质反应。

[0218] 表 2

[0219]

多孔基质	方法	间隔臂	配体	成分	效能％
聚乙烯	-	HA	DOC	LPS	80.1
聚乙烯	-	Poly-Lys	DOC	LPS	12.8
聚乙烯	$-NH_2$	DAH	DOC	LPS	29.6
聚乙烯	$-NH_2$	-	DOC	LPS	12.5
聚乙烯	$-NH_2$	DAH	多粘菌素 B	LPS	16.3

[0220]

聚乙烯	$-NH_2$	DAH	精氨酸	LPS	14.3
聚乙烯	$-NH_2$	DAH	Recombumin	LPS	18.3
聚乙烯	$-NH_2$	-	抗 -TNFαAb	TNF-α	63.2
聚乙烯	丙烯胺	PEI	DOC	LPS	33.4

聚乙烯	丙烯胺	聚赖氨酸	DOC	LPS	85.5
聚乙烯	-COOH	-	TNF-α 受体	TNF-α	59.2
聚乙烯	-COOH	-	白介素 -1 受体	IL-1	64.0
聚乙烯	-COOH	-	血栓调节蛋白	凝血酶	70.8
聚乙烯	-COOH	-	BPI	LPS	91.2
聚乙烯	-OH	Sil.ald.	TNF-α 受体	TNF-α	61.8
聚乙烯	-OH	Sil.ald.	白介素 -1 受体	IL-1	62.0
聚乙烯	-OH	Sil.ald.	血栓调节蛋白	凝血酶	73.7
聚乙烯	-OH	Sil.ald.	BPI	LPS	89.3
聚乙烯	HA	DAH	DOC	LPS	29.6
聚乙烯	聚赖氨酸	DAH	DOC	LPS	73.3

[0221] 表 2.（续）

[0222]

多孔基质	方法	间隔臂	配体	成分	效能%
聚乙烯	Recombumin	-	DOC	LPS	20.8
聚乙烯	$-NH_2$	GDA	抗 CD 11b Ab	粒细胞和单核细胞	50.2
聚乙烯	-OH	Sil.ald.	抗 CD 11b Ab	粒细胞和单核细胞	56.1
聚碳酸酯	-	聚赖氨酸	DOC	LPS	44.4
聚碳酸酯	-OH	Sil.ald.	TNF-α 受体	TNF-α	75.9
聚碳酸酯	-COOH	-	血栓调节蛋白	凝血酶	72.0
聚氨基甲酸酯	-	DHA	DOC	LPS	30.2
聚氨基甲酸酯	-	DHA	Recombumin	LPS	18.5
聚氨基甲酸酯	-	聚赖氨酸	DOC	LPS	14.8
聚氨基甲酸酯	-	Sil.ald.	TNF-α 受体	TNF-α	56.7

聚氨基甲酸酯	-	Sil.ald.	BPI	LPS	88.0
聚硅氧烷	-	Sil.ald.	TNF-α 受体	TNF-α	55.3
聚硅氧烷	-	Sil.ald.	血栓调节蛋白	凝血酶	68.2
沸石	-	Sil.ald.	TNF-α 受体	TNF-α	63.9
沸石	-	Sil.-NH_2	DOC	LPS	48.3
沸石		Sil.ald.	白介素 -1 受体	IL-1	60.1

[0223]

纤维素	CNBr	DAH	DOC	LPS	28.5
纤维素	CNBr	聚赖氨酸	DOC	LPS	39.2
PTFE	丙烯胺	DAH	TNF-α 受体	TNF-α	73.0
PTFE	-COOH	-	白介素 -1 受体	IL-1	77.7

[0224] 缩写 :BPI = 杀菌透性增加的蛋白质 ;DAH = 1,6- 二氨基 - 己烷 ;DOC = 脱氧胆酸 ;EDC = 1- 乙基 -3(3- 二甲胺基丙胺) 碳二亚胺 ;GDA = 戊二醛 ;HA = 透明质酸 ;IL-1 = 白介素 -1 ;PEI = 聚乙烯亚胺 ;Recombumin = 重组人血清白蛋白 ;Sil.ald. = 醛官能性硅烷偶联剂 ;Sil.-NH_2 = 氨基官能性硅烷偶联剂 ;TNF-α = 肿瘤坏死因子 -α 。

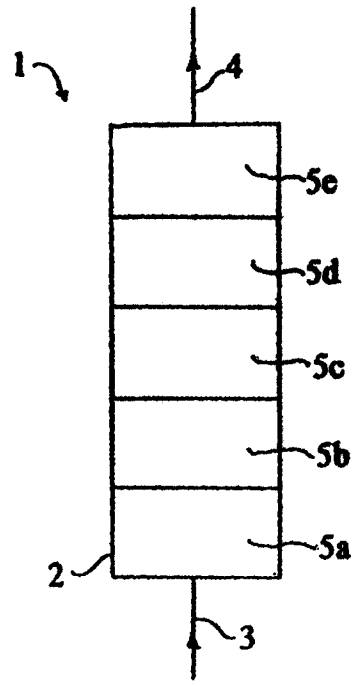


图 1

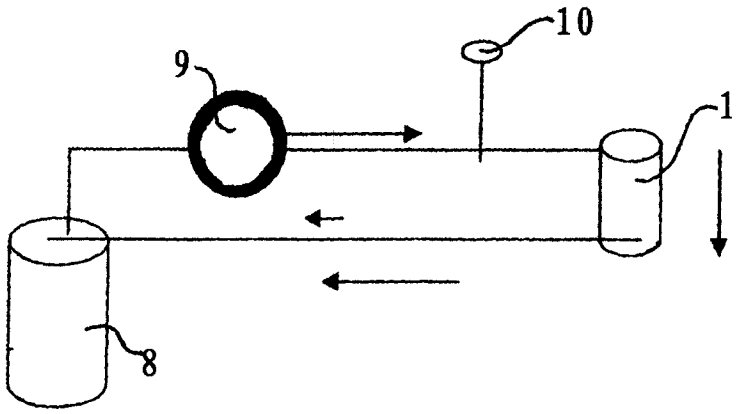


图 4

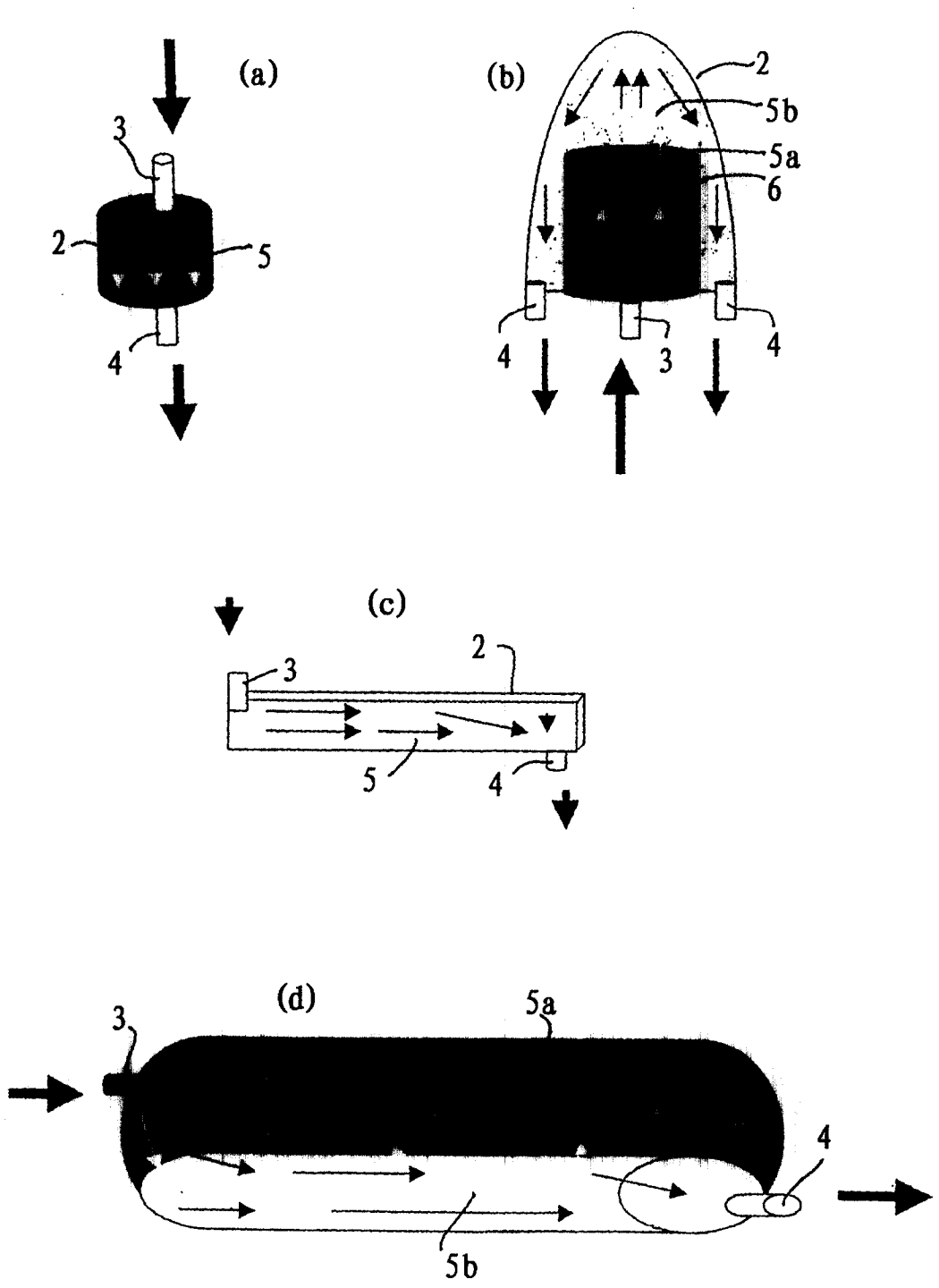


图 2

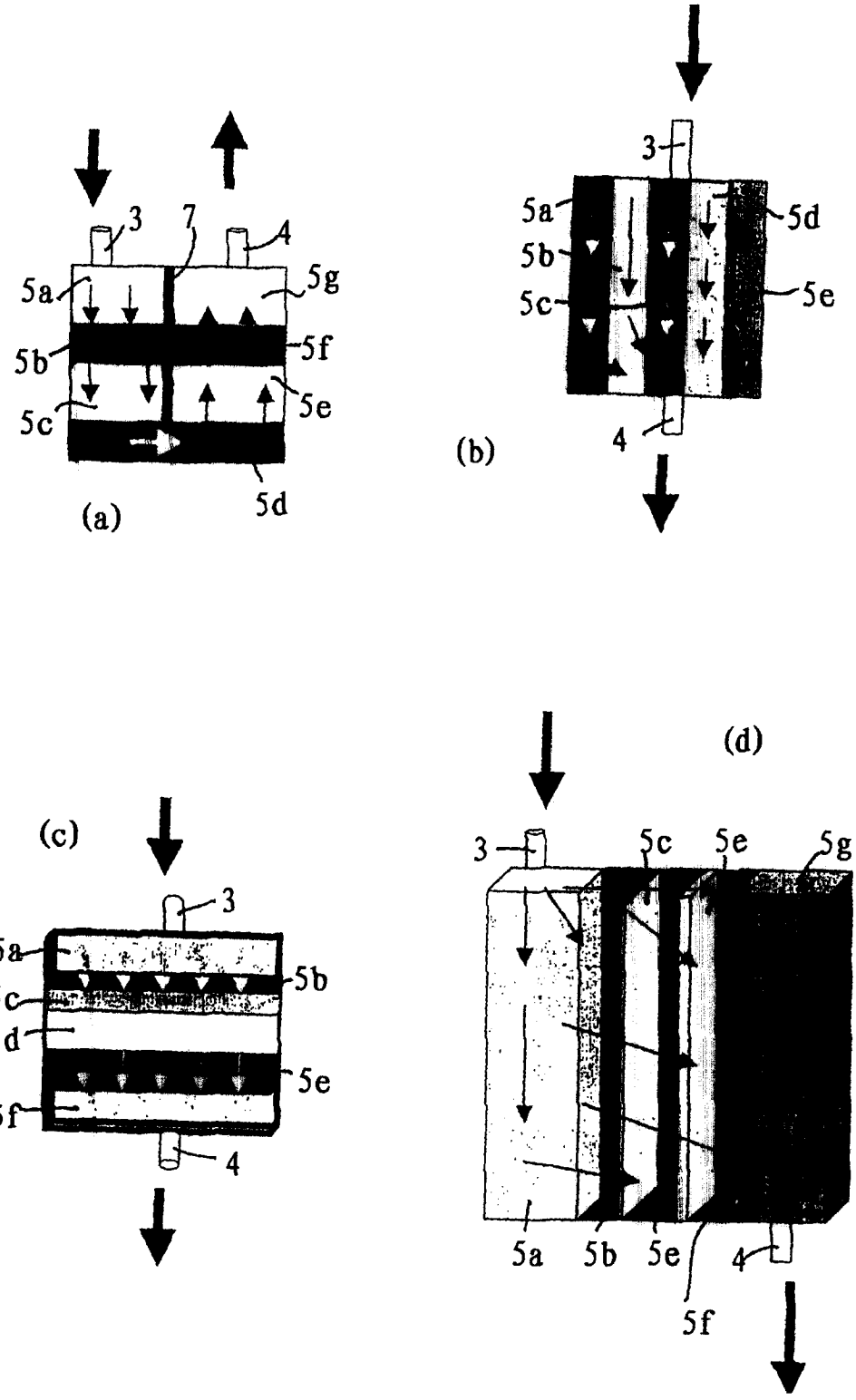

3
7
4
5a
5g
5b
5f
5c
5e
5d
(a)
3
5a
5b
5c
5d
5e
4
(b)
(c)
3
5a
5b
5c
5d
5e
5f
4
(d)
3
5c
5e
5g
5a
5b
5e
4
5f

图 3

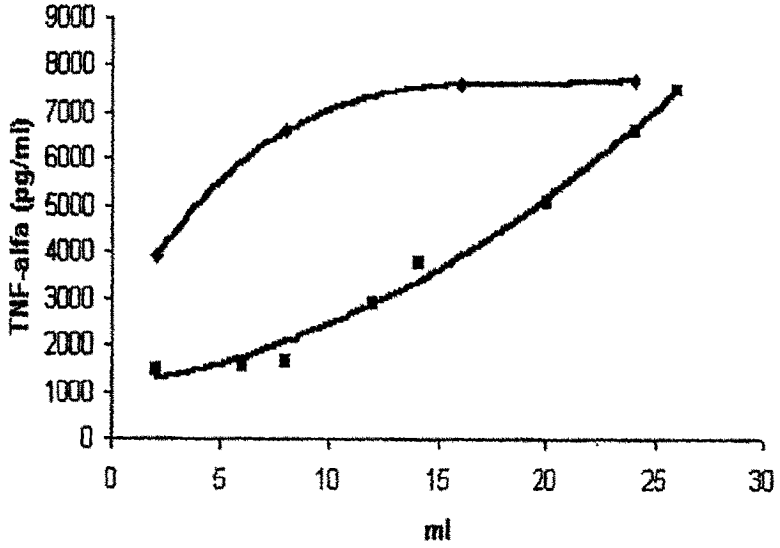

TNF-alfa (pg/ml)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
30
ml

图 5

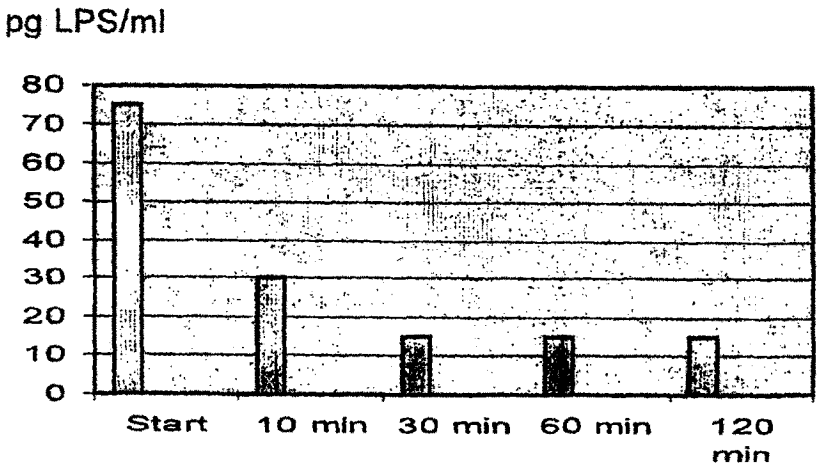

pg LPS/ml
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Start
10 min
30 min
60 min
120 min

图 6