(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113646013 B
(45)授权公告日 2024.02.20

(21)申请号 202080021266.8
(22)申请日 2020.03.13
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113646013 A
(43)申请公布日 2021.11.12
(30)优先权数据
62/818,265 2019.03.14 US
62/818,283 2019.03.14 US
62/818,299 2019.03.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/022543 2020.03.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/186134 EN 2020.09.17
(73)专利权人 华盛顿大学
地址 美国华盛顿
(72)发明人 江绍毅 林晓杰
乔纳森·希梅尔法布
巴迪·D·拉特纳
(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444
专利代理师 韩飞 葛强
(51)Int.Cl.
A61L 27/00(2006.01)
A61L 27/14(2006.01)
A61L 27/16(2006.01)
C08F 2/00(2006.01)
C08F 8/00(2006.01)
C08F 293/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 102333554 A,2012.01.25
JP 2005186617 A,2005.07.14
WO 2017222863 A1,2017.12.28
CN 104356569 A,2015.02.18
KR 20090081618 A,2009.07.29
JP 2004143431 A,2004.05.20
GB 1435714 A,1976.05.12
WO 2018174108 A1,2018.09.27
CN 111902150 A,2020.11.06
JP 2013159629 A,2013.08.19
US 2020308440 A1,2020.10.01
CN 107617126 A,2018.01.23
JP 2015181910 A,2015.10.22
CN 102775831 A,2012.11.14
CN 101302712 A,2008.11.12
JP 2017052706 A,2017.03.16 (续)
审查员 訾娅鑫

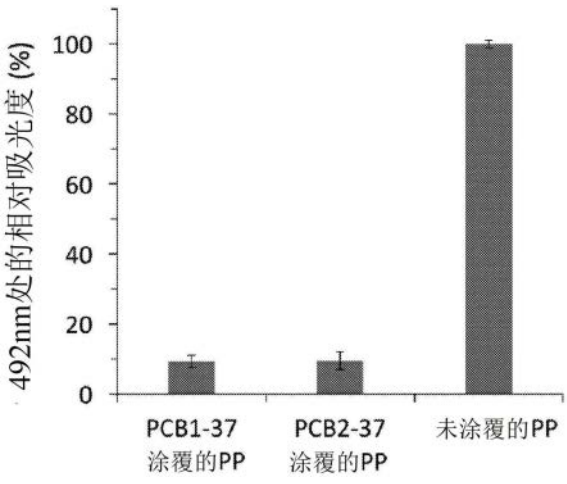
权利要求书2页 说明书42页 附图46页

(54)发明名称

两性离子共聚物涂料及其相关方法

(57)摘要

两性离子羧基甜菜碱共聚物及其在涂料中赋予表面,特别是血液接触医疗器械的表面防污和功能性的用途。



CN 113646013 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

US 2020190298 A1,2020.06.18

CN 103724595 A,2014.04.16

US 2010227077 A1,2010.09.09

US 2008139689 A1,2008.06.12

Lin, XJ;Wu, K;(...);Jiang, SY.Photoreactive Carboxybetaine Copolymers Impart Biocompatibility and Inhibit Plasticizer Leaching on Polyvinyl Chloride.ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES.2020,第12卷(第37期),41026-41037.

Xiaojie Lin等.“Photoreactive Polymers Bearing a Zwitterionic Phosphorylcholine Group for Surface Modification of Biomaterials”.《ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES》.2015,第7卷(第31期),第17489-17498页.

Jon Ladd等.“Zwitterionic Polymers Exhibiting High Resistance to Nonspecific Protein Adsorption from Human Serum and Plasma”.《BIOMACROMOLECULES》.2008,第9卷(第5期),第1357-1361页.

Xiaojie Lin等.“Photoreactive Polymers Bearing a Zwitterionic Phosphorylcholine Group for Surface Modification of Biomaterials”.《ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES》.2015,第7卷(第31期),第17489-17498页.

Jon Ladd等.“Zwitterionic Polymers Exhibiting High Resistance to Nonspecific Protein Adsorption from Human Serum and Plasma”.《BIOMACROMOLECULES》.2008,第9卷(第5期),第1357-1361页.

Jayakrishnan, A等.Phase transfer catalysed surface modification ofplasticized poly(vinyl chloride) in aqueousmedia to retard plasticizer migration.《POLYMER》.1996,第37卷(第23期),5213-5218.

Liu, QH等.Transparent Grafted Zwitterionic CopolymerCoatings That Exhibit Both Antifogging and Self-Cleaning Properties.《 ACS OMEGA》.2018,第3卷(第12期),17743-17750.

Lamba, NMK等.In vitro investigation of the blood response tomedical grade PVC and the effect of heparin onthe blood response.《BIOMATERIALS》.2000,第21卷(第1期),89-96.

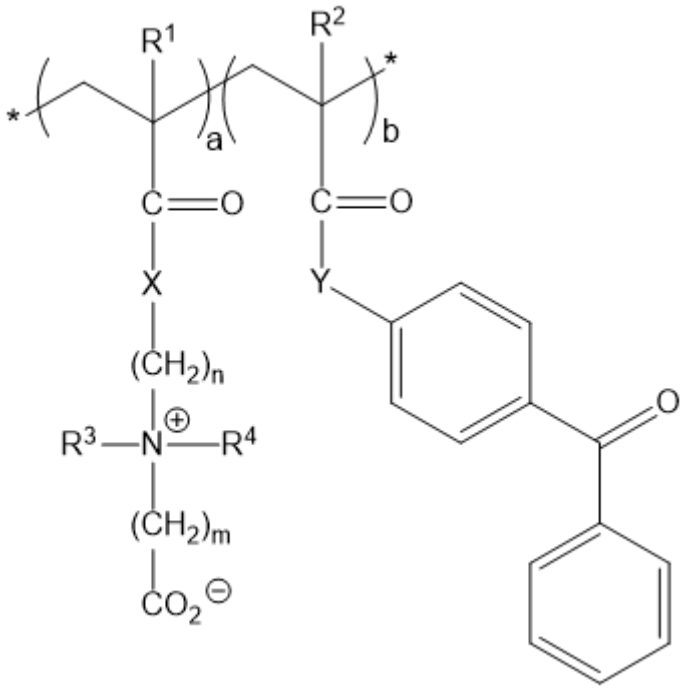
Xiaojie Lin等.“Photoreactive Polymers Bearing a Zwitterionic Phosphorylcholine Group for Surface Modification of Biomaterials”.《ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES》.2015,第7卷(第31期),第17489-17498页.

1.一种抑制或防止增塑剂从基材表面浸出的方法,包括:

(a)用包含共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分以提供经涂覆的表面,所述共聚物包含第一重复单元和第二重复单元,其中所述第一重复单元中的每一个包含侧接两性离子基团,以及其中所述第二重复单元中的每一个包含有效使表面上的共聚物交联的侧接光反应性基团,以提供经涂覆的表面;和

(b)用有效使所述表面上的所述共聚物交联的紫外光照射所述经涂覆的表面,从而提供有效抑制或防止增塑剂从所述表面浸出的经涂覆的表面;

其中所述共聚物具有式(III):



(III)

其中

R_1和R_2独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

R_3和R_4独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

X为O或NH;

Y为O或NH;

n为1至20的整数;

m为1至20的整数;

a为10 mol%至90 mol%;

b为10 mol%至90 mol%;

a + b为1.0;以及

*代表共聚物端基。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述表面是血液接触表面。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述基材是聚氨酯管、聚砜透析膜或基于烃的膜容器。

4.根据权利要求1所述的方法,其中用所述组合物涂覆所述表面包括将所述表面浸入所述组合物中。

5.根据权利要求1所述的方法,其中涂覆所述表面的至少一部分包括将所述组合物喷涂、旋涂、刷涂或滚涂到所述表面上。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述表面是基于烃的表面。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述表面是纤维素、醋酸纤维素、聚烯烃、聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯(PU)、聚砜(PSF)、聚(醚砜)(PES)、聚酰胺、聚丙烯酸、聚酰亚胺、芳族聚酯、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)或聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)表面。

8.根据权利要求1所述的方法,其中所述表面是聚氯乙烯表面或聚氨酯表面。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述表面是聚氯乙烯管或聚氨酯管的表面。

10.根据权利要求1所述的方法,其中所述共聚物还包含第三重复单元,其中所述第三重复单元中的每一个包含有效地将所述共聚物吸附到塑料表面的侧接疏水基团。

11.根据权利要求1所述的方法,其中m为1或2。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中a为70 mol%至90 mol%。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中a为80 mol%。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中b为10 mol%至30 mol%。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中b为20 mol%。

两性离子共聚物涂料及其相关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年3月14日提交的美国申请第62/818,265号、2019年3月14日提交的美国申请第62/818,283号和2019年3月14日提交的美国申请第62/818,299号的权益,每个申请通过引用以其整体明确并入本文。

[0003] 政府许可权声明

[0004] 本发明在由国家卫生科学研究所(National Institute of Health Sciences)授予的R01 HL089043号资助下在美国政府支持下完成。美国政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0005] 与血液接触的医疗器械表面的生物污染一直是血栓形成(thrombosis)的主要问题。蛋白质吸附是发生在与生物介质接触的生物材料表面的主要事件。非特异性蛋白质吸附引发生物污染,最终导致诸如血小板活化、血栓形成、补体活化和炎症反应等严重的不良生物反应。因此,抗血栓形成的血液接触器械努力有效地避免非特异性蛋白质吸附。这通过血液成分和与其接触的表面之间的超低污染界面实现。具有亲水性和电荷中性特性的合成聚合物生物材料由于其高生物相容性而具有前景。诸如聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)聚(HEMA)和聚(乙二醇)(PEG)传统的生物材料历来被用作表面改性的黄金标准。然而,聚(HEMA)的含水量低且对蛋白质吸附的抵抗力差,而PEG会引起不良反应,包括抗PEG抗体的出现和PEG诱导的组织组织学变化。

[0006] 已知在聚合物链表面形成的不能破坏的水合层可高效地排斥生物分子的吸附。因此,水合诱导的防污能力是亲水性防污聚合物生物材料的主要特征。包含超亲水两性离子基团,特别是磷酸胆碱(PC)、羧基甜菜碱(CB)和磺基甜菜碱(SB)的两性离子化合物,在过去的二十年中已普遍成为的血液惰性生物材料。具有内盐结构的超亲水性和电荷中性的两性离子基团可以形成一层不能被生物活性物种取代的强结合的水分子,从而抑制非特异性蛋白质吸附。最近,CB基聚合物在各种应用中都表现出优异的水合诱导防污能力,这使得它们对血液接触表面的使用非常有吸引力。此外,CB基团具有将生物分子(比如蛋白质、酶和寡核苷酸)共价固定在其羧基上的独特能力。

[0007] 使用两性离子聚合物进行表面改性可以通过“接枝自”或“接枝到”方法来实现。为了实现具有各种形状和尺寸的大型模塑医疗器械的非侵入性表面涂层,通过将具有不同结构(architectures)的各种聚合物(例如均聚物、无规共聚物和二-/三-/多嵌段共聚物)经由硅烷、儿茶酚和光/热诱导的共价键合简单地应用到各种表面使“接枝到”聚合物显示出更加强健。其中,无规型两亲性两性离子共聚物是一种简单而有效的防污材料,其可在血液接触表面长期有效地抵抗蛋白质吸附和血小板粘附。具有约30mol%亲水单元的聚(MPC-co-甲基丙烯酸正丁酯(BMA))已应用于医疗器械的许多表面且具有优异的生物相容性。然而,目前仍缺乏对CB无规共聚物的综合研究。此外,它们对末端羧基进行表面官能化的能力使它们成为一种有吸引力的表面改性材料。

[0008] 尽管防污聚合物材料的开发及其在表面涂层中的应用取得了进展,但仍需要改进

的材料和表面涂层,特别是需要可以容易地涂覆在表面上以有利地为血液接触的医疗器械表面提供防污表面的,改进的材料。本发明寻求满足这种需要并提供进一步的相关优点。

发明内容

[0009] 本发明提供两性离子共聚物及其用于涂料以赋予表面,特别是接触血液的医疗器械的表面防污和功能性的用途。在一些方面,本发明提供了官能化以用于其表面固定的两性离子共聚物、包含该两性离子共聚物的涂料组合物、由该两性离子共聚物制备的表面涂层、具有由该两性离子共聚物改性的表面的基材和具有由该两性离子共聚物改性的表面的医疗器械。

[0010] 一方面,本发明提供一种抑制或防止增塑剂从基材表面浸出的方法,包括:

[0011] (a)用包含共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分以提供经涂覆的表面,该共聚物包含第一重复单元和第二重复单元,其中第一重复单元中的每一个包含侧接两性离子基团,并且其中第二重复单元中的每一个包含有效使表面上的共聚物交联的侧接光反应性基团,以提供经涂覆的表面;和

[0012] (b)用有效使表面上的共聚物交联的光照射经涂覆的表面,从而提供有效抑制或防止增塑剂从表面浸出的经涂覆的表面。

[0013] 在一些实施方案中,该共聚物还包含第三重复单元,其中所述第三重复单元中的每一个包含有效地将共聚物吸附到表面的侧接疏水基团。

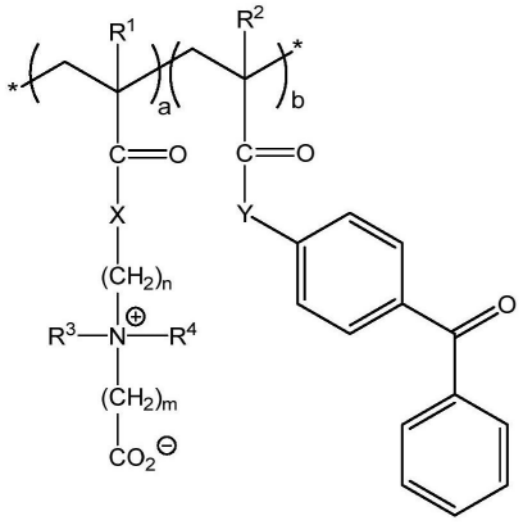
[0014] 通过上述方法有利地处理的表面包括基于烃的表面,诸如血液接触表面。代表性表面包括聚烯烃、聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯(PU)、聚砜(PSF)、聚(醚砜)(PES)、聚酰胺、聚丙烯酸、聚酰亚胺、芳族聚酯、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS))、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)表面。在一些实施方案中,该表面是聚氯乙烯表面或聚氨酯表面。在其他实施方案中,该表面是纤维素或醋酸纤维素表面。

[0015] 在一些实施方案中,该表面是聚氯乙烯管或聚氨酯管的表面。

[0016] 在其他实施方案中,该表面是血液接触表面,诸如透析膜或基于烃的膜容器。

[0017] 在上述方法中,用组合物涂覆表面包括将表面浸入该组合物中。在其他实施方案中,涂覆表面的至少一部分包括将组合物喷涂、旋涂、刷涂或滚涂到表面上。

[0018] 在一些实施方案中,该方法利用式(III)的共聚物:

[0019] 

(III)

[0020] 其中

[0021] R_1和R_2独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0022] R_3和R_4独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0023] X为O或NH;

[0024] Y为O或NH;

[0025] n为1至20的整数;

[0026] m为1至20的整数;

[0027] a为约0.10至约0.90mol%;

[0028] b为约0.10至约0.90mol%;

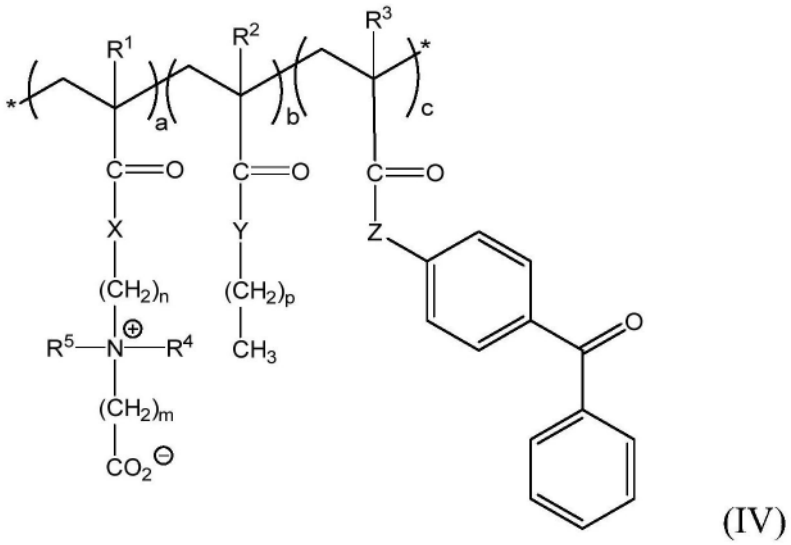
[0029] a+b为1.0;和

[0030] *代表共聚物端基。

[0031] 在这些实施方案的一些中,R_1为氢或甲基,R_2为氢或甲基,R_3和R_4为甲基,并且X为NH和Y为NH。在这些实施方案的另一些中,R_1为氢或甲基,R_2为氢或甲基,R_3和R_4为甲基,X为O,和Y为O。在一些实施方案中,n为2或3。在一些实施方案中,m为1或2。在一些实施方案中,a为约0.70至约0.90mol%。在这些实施方案的一些中,a为约0.80mol%。在一些实施方案中,b为约0.10至约0.30mol%。在这些实施方案的一些中,b为约0.20mol%。

[0032] 在一个实施方案中,该方法利用式(III)的聚合物,其中R_1为氢,R_2为氢,R_3和R_4为甲基,X为NH,Y为NH,n为3,和m为1。在这些实施方案的一些中,a为约0.80mol%。在这些实施方案的一些中,b为约0.20mol%。

[0033] 在其他实施方案中,该方法利用式(IV)的聚合物:

[0034] 

(IV)

[0035] 其中

[0036] R_1、R_2和R_3独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0037] R_4和R_5独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0038] X为O或NH;

[0039] Y为O或NH;

[0040] Z为O或NH;

[0041] n为1至20的整数;

[0042] m为1至20的整数;

[0043] p为0至20的整数;

[0044] a为约0.10至约0.90mol%;

[0045] b为约0.05至约0.95mol%;

[0046] c为约0.05至约0.95mol%;

[0047] a+b+c为1.0;和

[0048] *代表共聚物端基。

[0049] 另一方面,本发明提供可用于涂覆表面以赋予经涂覆的表面防污性能的两性离子共聚物。

[0050] 在一个实施方案中,本发明提供包含第一重复单元和第二重复单元的共聚物,其中第一重复单元中的每一个包含侧接两性离子基团,并且其中第二重复单元中的每一个包含有效使共聚物交联的侧接光反应性基团。在相关的实施方案中,该共聚物还包含第三重复单元,其中第三重复单元中的每一个包含有效地将共聚物吸附到表面的疏水基团。

[0051] 在另一个实施方案中,本发明提供包含第一重复单元、可选的第二重复单元和可选的第三重复单元的共聚物,条件是该共聚物包括至少第一重复单元和可选的第二重复单元或者包括至少第一重复单元和可选的第三重复单元,其中第一重复单元中的每一个包含侧接两性离子基团,其中第二重复单元中的每一个包含有效使共聚物交联的侧接光反应性基团,并且其中第三重复单元中的每一个包含有效地将所述共聚物吸附到表面的侧接疏水基团。

[0052] 在进一步的实施方案中,本发明提供了由式(I)表示的共聚物:

[0053] *-$(P_1)_a(P_2)_x(P_3)_y$-*(I)

[0054] 其中

[0055] P_1为具有侧接两性离子基团的重复单元，

[0056] P_2为具有侧接疏水基团的重复单元，

[0057] P_3为具有侧接光反应性基团的重复单元，

[0058] a为约0.10至约0.90mol％，

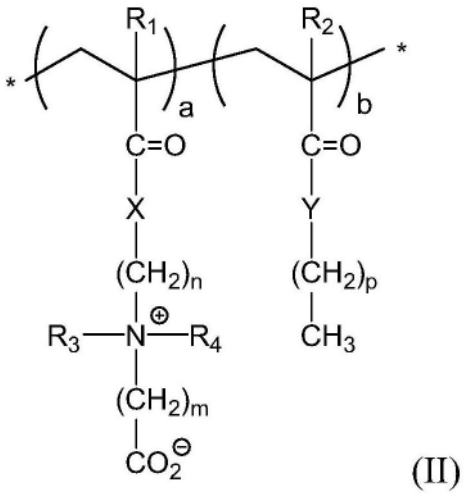
[0059] x为0至约0.95mol％，

[0060] y为0至约0.95mol％，

[0061] 条件是x和y不都为0,并且

[0062] a+x+y为1.0。

[0063] 在另一个实施方案中,本发明提供具有式(II)的两性离子/疏水共聚物：

[0064] 

(II)

[0065] 其中

[0066] R_1和R_2独立地为-$(CH_2)_x$H,其中x为0至20的整数；

[0067] R_3和R_4独立地为-$(CH_2)_x$H,其中x为0至20的整数；

[0068] X为O或NH；

[0069] Y为O或NH；

[0070] n为1至20的整数；

[0071] m为1至20的整数；

[0072] p为0至20的整数；

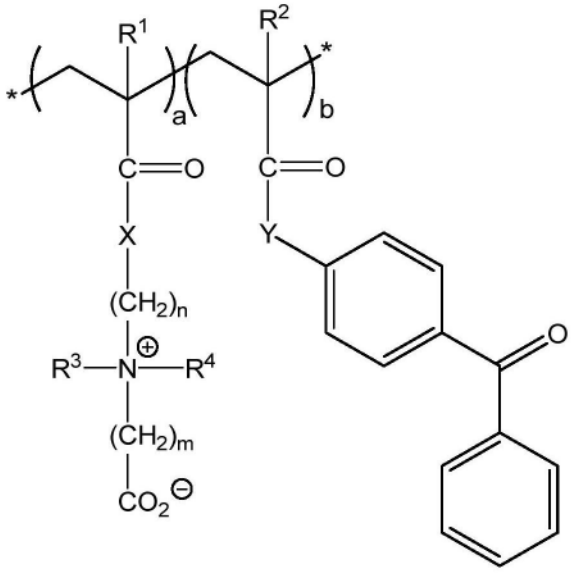
[0073] a为约0.10至约0.90mol％；

[0074] b为约0.10至约0.90mol％；

[0075] a+b为1.0;和

[0076] *代表共聚物端基。

[0077] 在另一个实施方案中,本发明提供具有式(III)的两性离子/疏水共聚物：

[0078] 

(III)

[0079] 其中

[0080] R_1和R_2独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0081] R_3和R_4独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0082] X为O或NH;

[0083] Y为O或NH;

[0084] n为1至20的整数;

[0085] m为1至20的整数;

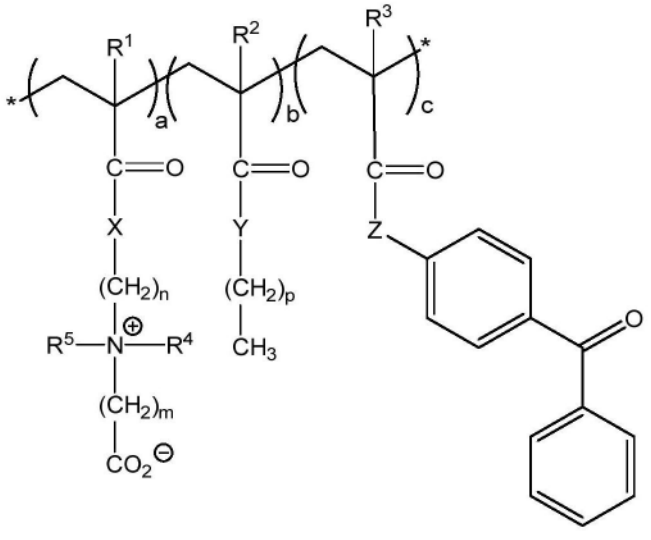
[0086] a为约0.10至约0.90mol%;

[0087] b为约0.10至约0.90mol%;

[0088] a+b为1.0;和

[0089] *代表共聚物端基。

[0090] 在进一步的实施方案中,本发明提供具有式(IV)的两性离子/疏水共聚物:

[0091] 

(IV)

[0092] 其中

[0093] R_1、R_2和R_3独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0094] R_4和R_5独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0095] X为O或NH;

[0096] Y为O或NH;

[0097] Z为O或NH;

[0098] n为1至20的整数;

[0099] m为1至20的整数;

[0100] p为0至20的整数;

[0101] a为约0.10至约0.90mol%;

[0102] b为约0.05至约0.95mol%;

[0103] c为约0.05至约0.95mol%;

[0104] a+b+c为1.0;和

[0105] *代表共聚物端基。

[0106] 在进一步的方面,本发明提供包括两性离子共聚物的涂料组合物以及使用两性离子共聚物和涂料组合物制备的经涂覆的表面。在一些实施方案中,该涂料组合物包括如本文所述的两性离子共聚物和可选的载体。在一些实施方案中,该涂料包括如本文所述的两性离子共聚物或衍生自如本文所述的两性离子共聚物(例如,光交联的两性离子共聚物)。

[0107] 在一些实施方案中,本发明提供其表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的两性离子共聚物的基材。合适的表面包括基于烃的表面和塑料表面。代表性表面包括聚烯烃、聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯(PU)、聚砜(PSF)、聚(醚砜)(PES)、聚酰胺、聚丙烯酸、聚酰亚胺、芳族聚酯、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)表面。在一些实施方案中,该表面是聚氯乙烯表面或聚氨酯表面。在其他实施方案中,该表面是纤维素或醋酸纤维素表面。

[0108] 在一些实施方案中,基材是PVC管、聚氨酯管、聚砜透析膜或基于烃的膜容器。

[0109] 在一些实施方案中,该基材是其表面的至少一部分或全部涂覆有如本文所述的两性离子共聚物的医疗器械。

[0110] 在一些实施方案中,该器械是来自I类、II类或III类的植入式/非植入式医疗器械。在一些实施方案中,该器械是板、盘、管、尖端、导管、人造血管、人造心脏或人造肺。在其他实施方案中,该器械是血液透析器、PVC管或聚氨酯管。

[0111] 在本发明的另一方面,提供使用该两性离子共聚物的方法。

[0112] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于涂覆基材的表面的方法,包括使该表面与包含如本文所述的本发明的两性离子共聚物的组合物接触。

[0113] 在相关实施方案中,本发明提供一种用于涂覆基材的表面的方法,包括:

[0114] (a)用包含如本文所述的两性离子共聚物的组合物涂覆基材的表面的至少一部分;和

[0115] (b)用有效使共聚物交联的光照射基材的表面。

[0116] 在另一个实施方案中,本发明提供一种使基材表面防污的方法,包括用包含如本文所述的两性离子共聚物的组合物涂覆该表面的至少一部分。

[0117] 在相关实施方案中,本发明提供一种使基材表面防污的方法,包括:

[0118] (a)用包含如本文所述的两性离子共聚物的组合物涂覆基材的表面的至少一部分;和

[0119] (b)用有效使共聚物交联的光照射基材的表面。

[0120] 在另一个实施方案中,本发明提供一种抑制血液蛋白质吸附在基材表面的方法,包括用包含如本文所述的两性离子共聚物的组合物涂覆该表面的至少一部分。

[0121] 在相关方法中,本发明提供一种抑制血液蛋白吸附在基材表面的方法,包括:

[0122] (a)用包含如本文所述的两性离子共聚物的组合物涂覆基材的表面的至少一部分;和

[0123] (b)用有效使共聚物交联的光照射基材的表面。

[0124] 在另一个实施方案中,本发明提供一种抑制或防止增塑剂从基材表面浸出的方法,包括:

[0125] (a)用包含如本文所述的两性离子共聚物的组合物涂覆基材的表面的至少一部分以提供经涂覆的表面。

[0126] 在一个相关的实施方案中,本发明提供一种抑制或防止增塑剂从基材表面浸出的方法,包括:

[0127] (a)用包含如本文所述的光反应性两性离子共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分以提供经涂覆的表面;和

[0128] (b)用有效使表面上的共聚物交联的光照射经涂覆的表面,从而提供有效抑制或防止增塑剂从表面浸出的经涂覆的表面。

[0129] 在上述一些方法中,用组合物接触或涂覆表面包括将表面浸入该组合物(例如,两性离子共聚物)中。在其他实施方案中,用组合物接触或涂覆表面包括将该组合物喷涂、旋转、刷涂或滚涂到表面上。

[0130] 合适的表面包括基于烃的表面和塑料表面。代表性表面包括聚烯烃、聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯(PU)、聚砜(PSF)、聚醚砜(PES)、聚酰胺、聚丙烯酸、聚酰亚胺、芳族聚酯、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)表面。在一些实施方案中,该表面是聚氯乙烯表面或聚氨酯表面。在其他实施方案中,该表面是纤维素或醋酸纤维素表面。

附图说明

[0131] 当结合附图时,通过参考以下详细描述本发明的前述方面和许多伴随的优点将变得更容易领会和更容易理解。

[0132] 图1是根据本发明制备超低污染和可功能化羧基甜菜碱(CB)聚合物表面的示意图。

[0133] 图2A和2B显示了本发明的代表性羧基甜菜碱(CB)无规共聚物的化学结构:聚(CB1-co-BMA)(PCB1)(图1A)和聚(CB2-co-BMA)(PCB2)(图1B)。CB后的数字1和2表示羧基和季铵阳离子之间的碳数。共聚物中每个单元的组成通过^{1}H-NMR谱中特征质子的积分计算,其中CB1单元为3.82ppm(-CH_2-,2H),CB2单元为2.42ppm(-CH_2-,2H),BMA单元为1.45-1.63ppm(-CH_2-,4H)。PCB2中的羧基可以通过EDC/NHS化学过程活化,并与例如蛋白质、酶和

适体/寡核苷酸的氨基共价键合。CB1为羧基甜菜碱丙烯酰胺,1-羧基-N,N-二甲基-N-(3'-丙烯酰胺丙基)乙铵内盐(ethanaminium inner salt);CB2为羧基甜菜碱甲基丙烯酸酯,2-羧基-N,N-二甲基-N-(2'-甲基丙烯酰氧基乙基)乙铵内盐;BMA是甲基丙烯酸正丁酯。

[0134] 图3是总结本发明代表性羧基甜菜碱无规共聚物特性的表格。

[0135] 图4比较了用本发明的代表性羧基甜菜碱无规共聚物PCB1-37和PCB2-37以0.5wt%浓度涂覆的PP表面上的纤维蛋白原(1.0mg/mL,1×PBS,pH 7.4)的相对吸附。

[0136] 图5A和5B比较了用不同浓度的不同CB无规共聚物(5A)和PCB1-37(5B)改性的聚丙烯(PP)基材在蒸馏水中测量的空气接触角。数字标识是指共聚物中两个单元的摩尔比(即PCB1-28中的28表示该共聚物中CB/BMA的摩尔比为2/8)。5A中的单个星号(*)表示与PCB1-37相比具有统计学显著差异($p<0.05$,n=5);和5B中的单个星号(*)表示与0.50wt%相比具有统计学显著差异($p<0.05$,n=5)。

[0137] 图6A和6B比较了用不同浓度的不同CB无规共聚物(6A)和PCB1-37(6B)涂覆的PP表面上纤维蛋白原(1.0mg/mL,1xPBS,pH7.4)的相对吸附量。数字标识是指共聚物中两个单元的摩尔比(即PCB1-28中的28表示该共聚物中CB/BMA的摩尔比为2/8)。5A中的单个星号(*)表示与PCB1-37相比具有统计学显著差异($p<0.05$,n=5);和5B中的单个星号(*)表示与0.50wt%相比具有统计学显著差异($p<0.05$,n=5)。在492nm处的相对吸光度表示纤维蛋白原的相对吸附量。

[0138] 图7A至7D在具有三种表面的96孔板:未涂覆的聚苯乙烯表面、PCB1-37涂覆的聚苯乙烯表面和具有超低附着表面的市售板(Corning Costar Corp.,Corning,NY,USA)上比较了针对(a)人血浆纤维蛋白原(Fg)(7A)、人血清白蛋白(HSA)(7B)、人血γ-球蛋白(7C)和人血清(7D)的非特异性蛋白质吸附。Corning超低表面涂层是一种共价结合到聚苯乙烯表面的亲水性、带中性电荷的涂层。将10%和100%的单一血液蛋白质和人血清用于评估它们的防污能力。未涂覆的表面和具有超低附着表面的市售产品用作对照。血液中100%的Fg、HSA和γ-球蛋白的浓度分别为3.0、45和16mg/mL。将正常人血清(汇集的混合性别)按原样使用,未经稀释。单个星号(*)表示与未涂覆的表面或市售超低附着表面相比具有统计学显著差异($p<0.01$,n=5);双星号(**)表示与未涂覆的表面相比具有统计学显著差异($p<0.01$,n=5)。

[0139] 图8是说明NIH3T3小鼠胚胎成纤维细胞在CB聚合物(PCB1-37)涂覆的TCPS表面(左)和原始TCPS表面(右)上的粘附和迁移行为的表面对比图。

[0140] 图9比较了涂覆有CB无规共聚物PCB2-37的96孔板上的表面官能化和特异性抗体-抗原相互作用。Fg和HSA都分别与由EDC/NHS化学活化的CB聚合物表面缀合。与HRP缀合的抗Fg用于评估特异性结合,以进一步验证使用96孔板进行诊断的可行性。在492nm处的吸光度间接表示表面上缀合的抗Fg的量。将未活化的表面和与HSA缀合的表面用作对照。单个星号(*)表示统计学显著差异($p<0.001$,n=5)。

[0141] 图10A是两性离子羧基甜菜碱(CB)共聚物涂覆的市售医用级血液接触PVC管的示意图。

[0142] 图10B显示了可用于本发明方法的代表性光反应性羧基甜菜碱(CB)聚合物的化学结构。

[0143] 图11A显示了透过市售医用级PVC管的UV光透过性。

[0144] 图11B显示了PCB共聚物上光敏(二苯甲酮)基团的透过光诱导的降解。

[0145] 图12A显示了市售扁平PVC管。

[0146] 图12B比较了未涂覆PVC膜和PCB涂覆的PVC膜上的水接触角。

[0147] 图13A至13D比较了以下四者的X射线光电子能谱(XPS)测量(survey)光谱:代表性PCB共聚物(13A)、未涂覆的市售PVC管(13B)、在干燥条件下储存1周的PCB涂覆的市售PVC管(13C)和在干燥条件下储存3周的PCB涂覆的市售PVC管(13D)。

[0148] 图14比较了100％人血清对PCB涂覆的和未涂覆的医用级PVC管的相对污垢。

[0149] 图15A至15C显示了以下聚合物的化学结构:聚(CBAA-co-BPAA)(PCB)(15A);聚(CBAA-co-BPAA-co-NB丙烯酰胺)(PCB-NB)(15B);和聚(PEGMA-co-BPAA)(PPB)(15C)。CBAA:羧基甜菜碱丙烯酰胺。BPAA:N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺。NB丙烯酰胺:尼罗蓝丙烯酰胺。PEGMA:聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯,平均Mn为360。

[0150] 图16A至16H涉及PCB聚合物在内管表面上的光诱导交联:PCB聚合物在内管表面上的透射光诱导交联(16A);透过市售医用级PVC管的UV光透过性(16B);内管表面上的PCB共聚物对透射光的光敏性(16C);纯DI水在未涂覆和PCB涂覆的PVC表面的水接触角(16D);PCB共聚物(16E)、未涂覆的市售PVC管(16F)、在干燥条件下储存1周的PCB涂覆的市售PVC管(16G)以及在干燥条件下储存3周的PCB涂覆的市售PVC管(16H)的X射线光电子能谱(XPS)测量光谱。使用285eV处的C1s峰作为参考对结合能(BE)进行校正。

[0151] 图17A至17F示出了防污能力评估:通过表面等离子体共振(SPR)生物传感器测试在四种不同流速(10、40、100和200μL/min)的动态条件下100％人血清在PVC表面和PCB聚合物涂覆的PVC表面的吸附行为(17A-17D)。不同的流速会在血清和管之间的界面上产生不同的剪切力。未涂覆:涂覆有PVC的SPR芯片。PCB涂覆的:涂覆有PVC第一层和PCB聚合物第二层的SPR芯片。PVC和PCB的厚度在干燥条件下测量,值分别为18±0.8nm和21±1.2nm。图17F显示使用Micro BCA蛋白质测定试剂盒测试在静态条件下100％人血清的吸附。未涂覆:市售PVC管。PCB涂覆的:在37℃的PBS(1×,pH7.4)中浸泡1周或3周的PCB涂覆的PVC管。结果表示为平均值±SD(n＝3;*p<0.001,并且**p>0.05)。

[0152] 图18A至18C显示了PCB聚合物的细胞毒性评估。孵育48小时后从PCB涂覆的管、未涂覆的管、乳胶和正常细胞培养基(18A)以及含有不同浓度PCB聚合物的细胞培养基(18B)中洗脱的NIH3T3小鼠胚胎成纤维细胞的相衬显微图像。比例尺:50μm。PCB聚合物的细胞毒性根据ISO10993-5指南进行检查。胞质酶乳酸脱氢酶(LDH)的释放通过将细胞与不同浓度的PCB聚合物在37℃下于5％CO_2中孵育1.0小时来确定(18C)。阴性对照(NC):用正常无血清细胞培养基培养细胞。阳性对照(PC):在无血清细胞培养基中用0.2vol％Tween 20培养细胞。所有培养基都补充有酚红和1×盘尼西林/链霉素。结果表示为平均值±SD(n＝5;*p<0.001,并且**p>0.05)。

[0153] 图19A至19D显示了PCB聚合物对血小板质量的影响。活化水平通过流式细胞术经由p-选择蛋白％进行评估(19A)。功能性通过冯维勒布兰德因子(von Willebrand Factor,VWF)结合亲和力进行评估(19B)。存活率通过流式细胞术经由膜联蛋白V％进行评估(19C)。形态得分(MS)用作血小板健康的简单指标,定义为4×(盘％)+2×(球％)+(枝％)(19D)。PCB涂覆的:PCB涂覆的PVC表面。未涂覆的:未涂覆的PVC表面。结果表示为平均值±SD(n＝5;*p<0.001,并且**p>0.05)。

[0154] 图20比较了光反应性PCB聚合物涂覆的增塑PVC和未涂覆的增塑PVC管中增塑剂的迁移。275nm波长处的吸光度与浸出的增塑剂的浓度成正比。结果表示为平均值±SD(n＝3;*p<0.001,并且**p<0.05)。

[0155] 图21比较了补体系统对不同PVC管的活化:PCB涂覆的、未涂覆的和PPB涂覆的。450nm波长处的吸光度与末端补体复合物(sC5b-9)的浓度成正比。结果表示为平均值±SD(n＝3;*p<0.001,并且**p>0.05)。

[0156] 图22A是用羧基甜菜碱(CB)共聚物对代表性市售血小板袋进行表面改性的示意图。

[0157] 图22B显示了本发明的代表性两性离子羧基甜菜碱(CB)共聚物的化学结构。

[0158] 图22C显示了代表性光反应性CB共聚物的光敏性。

[0159] 图23A至23F显示了根据本发明的代表性表面改性:透过市售血小板袋的UV光透过性和光敏性(二苯甲酮)基团的渗透光诱导的降解(23A);涂覆前后血小板袋的表面形态(23B);X射线光电子能谱(XPS)测量光谱,C1s、O 1s和N1s的高分辨率光谱以及五种不同样品的原子组成:(1)PCB共聚物,(2)市售血小板袋,(3)用乙醇冲洗的市售血小板袋,(4)PCB涂覆的市售血小板袋,和(5)浸泡在缓冲液中的PCB涂覆的市售血小板袋(分别为23C至23E);和蒸馏水中的静态空气接触角和干燥条件下的静态水接触角(23F)。

[0160] 图24A至24F显示了本发明的代表性两性离子羧基甜菜碱(CB)共聚物的防污能力评估:通过表面等离子体共振(SPR)测试的动态条件下人血蛋白质的吸附(24A);使用Micro BCA蛋白质测定试剂盒测试的在静态条件下人血蛋白质的吸附(24B);哺乳动物细胞(NIH3T3)的粘附行为(24C);新鲜人血小板的粘附行为(24D);表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)革兰氏阳性菌株(24E)和铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)革兰氏阴性菌株(24F)的粘附和生物膜形成。

[0161] 图25A至25H提供了根据本发明的代表性方法保存的血小板的评估:膜联蛋白V在保存的血小板上的表达水平(25A);p-选择蛋白(CD62)在保存的血小板上的表达水平(25B);保存的血小板的形态得分(25C);冯维勒布兰德因子(VWF)结合亲和力(25D);在栓塞测试期间达到100nN阈值的时间(25E);和血小板保存液中的pH(25F)、葡萄糖水平(25G)和乳酸水平(25H)。

[0162] 详细描述

[0163] 本发明提供两性离子共聚物及其在涂料中赋予表面,特别是接触血液的医疗器械的表面防污和功能性的用途。本发明提供官能化以用于其表面固定的两性离子共聚物、包含该两性离子共聚物的涂料组合物、由该两性离子共聚物制备的表面涂料、具有由该两性离子共聚物改性的表面的基材和具有由该两性离子共聚物改性的表面的医疗器械。

[0164] 两性离子共聚物

[0165] 一方面,本发明提供经官能化以将它们固定在表面上的两性离子共聚物。

[0166] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于涂覆表面的共聚物,该共聚物包含第一重复单元和第二重复单元,其中第一重复单元中的每一个包含侧接两性离子基团,并且其中第二重复单元中的每一个包含有效地将共聚物交联到塑料表面的侧接光反应性基团。在这些实施方案的一些中,该共聚物还包含第三重复单元,其中第三重复单元中的每一个包含有效地将共聚物吸附到塑料表面的疏水基团。

[0167] 在一些实施方案中,本发明提供一种可用于涂覆表面的共聚物,该共聚物包含第一重复单元、可选的第二重复单元和可选的第三重复单元,条件是该共聚物包含至少第一重复单元和可选的第二重复单元或者至少第一重复单元和可选的第三重复单元,其中第一重复单元中的每一个包含侧接两性离子基团,其中第二重复单元中的每一个包含有效地将共聚物交联到表面的侧接光反应性基团,并且其中第三重复单元中的每一个包含有效地将共聚物吸附到表面的侧接疏水基团。在这些实施方案中,该共聚物由式(I)表示:

[0168] $*-(P_1)_a(P_2)_x(P_3)y-*$ (I)

[0169] 其中

[0170] P_1为具有侧接两性离子基团的重复单元,

[0171] P_2为具有侧接疏水基团的重复单元,

[0172] P_3为具有侧接光反应性基团的重复单元,

[0173] a为约0.10至约0.90mol%,

[0174] x为0至约0.95mol%,

[0175] y为0至约0.95mol%,

[0176] 条件是x和y不都为0,并且

[0177] a+x+y为1.0。

[0178] 本发明的共聚物包含衍生自可聚合单体和共聚单体的重复单元。在由式(I)表示的共聚物中,重复单元P_1、P_2和P_3一起形成共聚物的主链(backbone)。每个重复单元包括两性离子基团、疏水基团或光反应性基团。在一些实施方案中,两性离子基团、疏水基团和光反应性基团中的每一个均是侧接基团(即,这些基团从共聚物主链侧垂)。在这些实施方案的一些中,具有侧接基团的共聚物由具有侧接基团的可聚合单体和共聚单体制备。

[0179] 共聚物主链的性质并不重要,只要主链不会不利地影响共聚物的整体性能,共聚物的两性离子基团、疏水基团和光反应性基团的性能即可。合适的共聚物主链包括聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯、聚脲、聚硫化物、聚砜、聚酰亚胺、聚环氧化物、芳族聚酯、纤维素、含氟聚合物、聚丙烯酸、聚酰胺、聚酐、聚醚、乙烯基聚合物、酚醛树脂、弹性体和其他加成聚合物。代表性共聚物主链包括本文详细描述的那些。

[0180] 如本文所用,术语“两性离子基团”是指包括至少两个官能团的基团,其中一个具有正电荷,一个具有负电荷,并且该基团的净电荷为零。代表性的两性离子基团包括羧基甜菜碱(CB)基团、磺基甜菜碱(SB)基团、磷酸甜菜碱(PHB)基团和磷酸胆碱(PC)基团。两性离子基团赋予用共聚物处理或涂覆的表面低污染和可功能化的特性。

[0181] 术语“疏水基团”是指是烃且本质上非极性的基团。疏水基团用于促进共聚物与用该共聚物处理的表面(例如,通过疏水-疏水相互作用)的结合。共聚物的疏水基团的性质并不重要,只要该基团实现共聚物与表面的结合足以满足处理或涂覆表面的预期用途并且不会不利地影响共聚物的两性离子基团或光反应性基团的性能即可。合适的疏水基团包括包含烃基的基团,诸如具有两个或更多个、三个或更多个、或者四个或更多个碳的烷基和亚烷基(例如,乙基、亚乙基、丙基、亚丙基、丁基、亚丁基基团)。代表性疏水基团包括C_3-C_{20}烷基(例如正丁基)、含苯环基团(例如苯基)、氟化烷基(例如三氟甲基)和氟化芳基基团。

[0182] 术语“光反应性基团”是指在用紫外光照射时变得对交联具有反应性的基团。侧接光反应性基团(即交联基团)用于促进共聚物与用该共聚物处理的表面的结合。共聚物的光

反应性基团的性质并不重要,只要该基团实现在表面上的共聚物交联足以稳定经处理或涂覆的表面上的共聚物并且不会不利地影响共聚物的两性离子基团或疏水基团的性能即可。合适的光反应性基团包括在用适当波长的光(例如,紫外线,250-370nm)照射时影响交联的基团。合适的光反应性基团衍生自芳族酮、叠氮化物、重氮二氮丙啶(diazo diazirine)基团。代表性的光反应性基团包括二苯甲酮、苯乙酮、苯基叠氮化物、芳基叠氮化物(例如,苯基叠氮化物)、叠氮基-甲基-香豆素、蒽醌和补骨脂素衍生物。

[0183] 本文所述的两性离子聚合物的光反应性基团有效地交联该共聚物。光反应性基团还有效地将两性离子共聚物交联到已涂覆有共聚物的表面上,其中该表面包括对光反应性基团具有反应性的C-H。两性离子共聚物可以交联的代表性表面包括含C-H的表面,诸如聚乙烯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚氯乙烯和环状聚烯烃表面。本文所述的光反应性两性离子共聚物不与不包含C-H反应性基团的金属、金属合金或陶瓷表面交联。如本文所述的光反应性两性离子共聚物的使用提供具有耐用网络聚合物膜的表面。

[0184] 在其他实施方案中,两性离子共聚物包括通过光和热活化的交联基团。在进一步的实施方案中,该共聚物包括通过热活化的交联基团。

[0185] 本发明的共聚物和用于本发明方法的那些共聚物包括通过共聚单体的共聚作用(例如,带有两性离子基团的可聚合单体、带有疏水基团的可聚合单体和带有光反应性基团的可聚合单体的共聚作用)制备的无规共聚物(例如,式(I)、(II)、(III)和(IV)的共聚物)。在本文描述和显示的共聚物式中,描述了包含两性离子基团的重复单元、包含疏水基团的重复单元和包含光反应性基团的重复单元。参见例如式(I)、(II)、(III)和(IV)。这些描述无意限制共聚物的性质;所描述的共聚物可以是具有指定数量的重复单元的无规共聚物(例如,对于式(I),“a”表示包含两性离子基团的重复单元,“x”表示包含疏水基团的重复单元,以及“y”表示包含光反应性基团的重复单元)。

[0186] 如上所述,如本文所述的共聚物可以包括另外的重复单元,只要该另外的重复单元不干扰或不利地影响共聚物的预期用途的性质即可。本发明的这些共聚物“包含”包括例如两性离子基团的重复单元,包括疏水基团的重复单元和包括光反应性基团的重复单元,以及其他重复单元。

[0187] 在一些实施方案中,本发明的共聚物仅包括例如包含两性离子基团的重复单元,包含疏水基团的重复单元和包含光反应性基团的重复单元。本发明的这些共聚物“由”包含两性离子基团的重复单元、包含疏水基团的重复单元和包含光反应性基团的重复单元“组成”,且不包含其他重复单元。

[0188] 本发明的两性离子共聚物包括高达约90mol%的两性离子基团。对于包括疏水基团的本发明的两性离子共聚物,该共聚物包括高达约70mol%的疏水基团。对于包括光反应性基团的本发明的两性离子共聚物,该共聚物包括高达约30mol%的光反应性基团。

[0189] 本发明的两性离子共聚物的重均分子量为约1,000至约2,000,000。

[0190] 两性离子/疏水共聚物

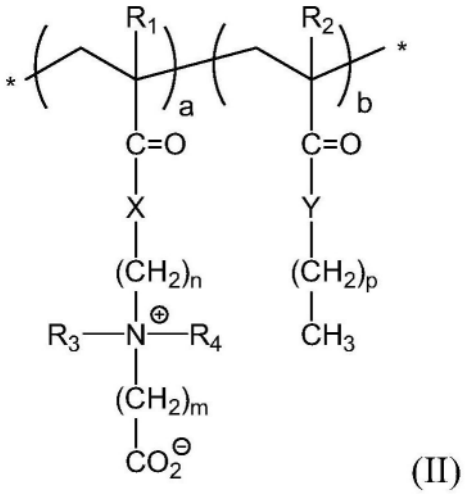
[0191] 在一个实施方案中,本发明提供具有两性离子基团和疏水基团的共聚物,每个基团都侧接在共聚物的主链上(即,两性离子/疏水共聚物)。侧接的两性离子基团赋予用共聚物处理或涂覆的表面低污染和可功能化的特性。侧接疏水基团用于促进共聚物与用该共聚物处理的表面的结合(例如,通过疏水-疏水相互作用)。共聚物主链上侧接的两性离子基团

和疏水基团的相对量可经由共聚物合成进行调节,以实现所需程度的低污染和官能化以及共聚物与表面的结合,其中的每一个都可以根据待处理或涂覆的表面的性质(例如,组成)进行调整。

[0192] 在一些方面,本发明提供一种经由浸涂技术使用两亲性两性离子(例如羧基甜菜碱,CB)无规共聚物对疏水材料的简单且有效的改性方法。通过调节该系列两亲共聚物中亲水单元和疏水单元的组成,探索了聚合性两亲性对防污能力的影响,并确定表面涂料的最佳组成。在CB无规共聚物涂覆的表面上测量了100%人血清吸附。将结果与具有"超低附着表面"的商购96孔板的结果进行比较。此外,随后通过CB内的羧基和抗原内的氨基之间的共价键合用抗纤维蛋白原将CB共聚物表面官能化。因此,这种CB聚合物材料和改性技术有望用于广泛的应用,包括防污医疗器械和医疗诊断。

[0193] 在一个实施方案中,本发明提供一种式(II)的共聚物:

[0194]



(II)

[0195] 其中

[0196] R_1和R_2独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0197] R_3和R_4独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0198] X为O或NH;

[0199] Y为O或NH;

[0200] n为1至20的整数;

[0201] m为1至20的整数;

[0202] p为0至20的整数;

[0203] a为约0.10至约0.90mol%;

[0204] b为约0.10至约0.90mol%;

[0205] a+b为1.0;和

[0206] *代表共聚物端基。

[0207] 在这些实施方案的一些中,R_1和R_2独立地选自由氢和甲基组成的组。

[0208] 在一些实施方案中,R_3和R_4独立地选自由氢和C1-C3烷基组成的组。

[0209] 在一些实施方案中,n为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,n为2或3。

[0210] 在一些实施方案中,m为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,m为1或2。

[0211] 在一些实施方案中,p为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,p为3。

[0212] 在一些实施方案中,a为约0.20至约0.40mol%。在一些实施方案中,a为约0.30mol%。

[0213] 在一些实施方案中,b为约0.60至约0.80mol%。在一些实施方案中,b为约0.70mol%。

[0214] 在一些实施方案中,R_1为氢或甲基,R_2为氢或甲基,R_3和R_4为甲基,并且X为NH和Y为O。

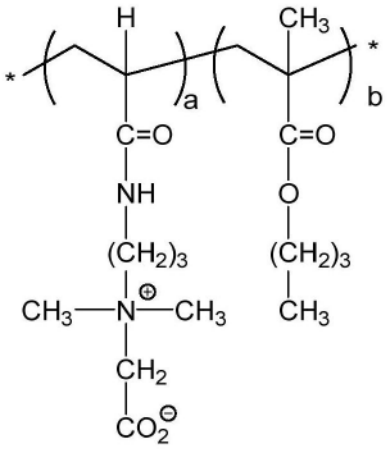
[0215] 在其他实施方案中,R_1为氢或甲基,R_2为氢或甲基,R_3和R_4为甲基,X为O,Y为O。

[0216] 在进一步的实施方案中,R_1为氢,R_2为甲基,R_3和R_4为甲基,X为NH,Y为O,n为3,m为1,p为2。在这些实施方案的一些中,a为约0.30mol%。

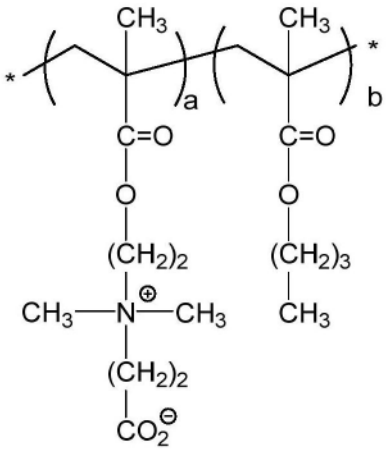
[0217] 在其他实施方案中,R_1为甲基,R_2为甲基,R_3和R_4为甲基,X为O,Y为O,n为2,m为2,p为2。在这些实施方案的一些中,a为约0.30mol%。

[0218] 以下是对本发明的代表性两性离子/疏水共聚物的制备、表征和用途以及它们在本发明的组合物和方法中的用途的描述。

[0219]



PCB1



PCB2

[0220] 本发明提供一种经由浸涂技术使用超低污染/可功能化羧基甜菜碱(CB)共聚物赋予疏水表面超亲水性的有效的表面改性方法。合成了一系列具有不同两亲性的CB无规共聚物并将其涂覆在疏水性聚丙烯(PP)和聚苯乙烯(PS)表面上。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选每种涂料的防污能力,并通过Micro BCA蛋白质测定试剂盒进一步针对100%人血清进行综合评估。含有约30mol%的CB单元的无规共聚物表现出超亲水性,其在DI水中的最高空气接触角大于165°,对100%人血清具有最佳的防污能力。与具有超低附着表面的商购96孔板相比,涂覆有最佳CB无规共聚物的96孔板的表面显示出显著更好的防污能力。小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)的粘附在涂覆有CB无规共聚物的表面上被完全抑制。此外,最佳的防污CB共聚物表面经由共价键合用抗原官能化,验证了其与其抗体的特异性相互作用。因此,这种CB无规共聚物能够为血液接触装置的疏水表面赋予超低污染和可功能化的能力。

[0221] 下面描述了代表性的聚羧基甜菜碱、它们的特性、它们在制备防污表面中的用途以及经涂覆的表面的特性。

[0222] 无规共聚物的合成。聚烯烃已被广泛制造以用于生物医学应用。然而,这些疏水性聚合的基于烃的材料会引发非特异性蛋白质吸附、血小板活化、血液凝固、血栓形成和其他

与生物污染相关的问题。对于实际应用,使用最简单的方法来实现既定目标是非常可取的。自由基聚合法是使聚合物从小规模实验室试验到大规模工业应用的最常见和有用的方法之一,特别是对于乙烯基单体的聚合。通过传统的自由基聚合方法,使用AIBN作为热自由基引发剂合成两亲性无规共聚物。这些反应溶液的粘度随着65℃下聚合的进行而逐渐增加,表明单体向共聚物转化。从^{1}H-NMR谱中特征峰的积分值得到各单体的单元分数(fraction):CB1单元为3.82ppm(-CH_2-,2H),CB2单元为2.42ppm(-CH_2-,2H),BMA单元为1.45-1.63ppm(-CH_2-,4H)。这些聚合物的化学结构和合成细节分别显示在图2A和2B以及表1(图3)中。聚合物链中的亲水性CB单元和疏水性BMA单元随机分布,总组成大约等于单体进料溶液的组成。CB无规共聚物在水性溶液中的溶解度主要取决于CB单元组成。含有大于30mol%的CB单元的共聚物很容易溶解在水性溶液中,而低于30mol%将变得不溶于水(表1)。因此,含有30mol%的CB单元的不溶于水的CB共聚物是这些共聚物中最好的涂料材料。这些结果与其他含有磷酰胆碱基团的无规共聚物相匹配,后者已被广泛用于生物医疗器械的表面改性。

[0223] 空气接触角和蛋白质吸附涂料的筛选。具有不同疏水/亲水组合物的两亲性CB共聚物可以赋予不同的防污能力。亲水性(CB)单元可以促进离子诱导的水合,其可以强烈地结合水分子以提高防污能力。然而,强的水合力可能会导致涂料材料从表面脱离。疏水性(BMA)单元将牢固地结合疏水性基材表面,以在水性溶液中稳定表面上的CB单元并提高涂料耐久性。因此,有必要以适当的CB/BMA摩尔比制备这些涂料无规聚合物,以使防污和表面结合性能最大化。图5A和5B中空气接触角的结果表明,含有约30mol%CB单元的共聚物表现出超亲水性,空气接触角高达165°。它的超亲水性与如图6A所示的其优异的性能有关,其中具有约30mol%CB单元的无规聚合物具有最强的蛋白质排斥能力。具有较高CB成分的其他聚合物由于他们在水性溶液中的高溶解度而很容易从PP表面脱离。尽管PCB1-28和PCB1-37都是水不溶性的,但较高的CB成分可以提高它们对非特异性蛋白质吸附的排斥能力。此外,聚合物溶液的浓度是影响两性离子聚合物的涂覆量和因此的防污能力的另一个重要因素。如图6B所示,随着聚合物浓度从0.03wt%增加到0.5wt%,Fg的吸附量急剧下降,而与未涂覆的基材相比,超过0.5wt%的污垢达到饱和的小于15%的相对低水平。此外,PCB1-37和PCB2-37聚合物都显示出相似的防污性能(图4)。

[0224] 使用光谱型椭偏仪,在干燥条件下通过比较在PBS(1×,pH7.4)中浸泡前后的CB涂覆的金芯片的聚合物厚度来确认CB聚合物(约30mol%CB单元)涂层的稳定性。浸泡前金基材上改性CB聚合物层的厚度计算为29.38±1.10nm。当薄膜厚度保持在28.80±0.73nm时,在将基材浸泡在PBS中达两个月后该值没有显著变化。

[0225] 来自100%血液蛋白质和血清中吸附蛋白质。血液组分与生物材料之间的相互作用可能引发一系列后续复杂的生物反应,包括蛋白质吸附、血小板粘附/活化、血液凝固和血栓形成。已将血浆蛋白的快速非特异性吸附看作是血液/材料相互作用期间在生物材料表面发生的第一个事件。因此,评估主要血浆蛋白(例如纤维蛋白原、白蛋白和γ-球蛋白)的吸附以了解生物材料的血液相容性至关重要。重要的是,该评估经常使用10%稀释的单一蛋白质溶液,但这种测试条件与实际血液环境相距甚远。如本文所述,使用了100%单一血液蛋白质和100%人血清。非特异性蛋白吸附量通过Micro BCA蛋白质测定试剂盒检测。

[0226] 在图7A至7D中,对于CB聚合物涂覆的表面,与未涂覆的表面相比,不同类型的蛋白

质和未稀释血清在10％和100％浓度下的吸附量显著降低,表明两性离子CB聚合物涂层可以赋予疏水性基于烃的表面超低污染能力。尽管具有超低附着表面的商购96孔板可以排斥较低(10％)浓度的单一蛋白质溶液中的蛋白质吸附,但当蛋白质浓度增加到100％时,仍有大约50％的蛋白质吸附(图7A和7B)。重要的是,尽管商购表面可以排斥10％浓度的单一血液蛋白质的吸附,但在浸泡在100％人血清或100％γ-球蛋白环境中后,它们完全失去了防污能力(图7C和7D)。

[0227] 细胞粘附。NIH3T3细胞能够在正常的组织培养聚苯乙烯(TCPS)板上粘附、增殖和迁移。在将它们接种到部分涂覆有两性离子CB共聚物的TCPS板表面后,细胞将在TCPS表面逐渐粘附并扩散。相比之下,大多数细胞将保持球形,且不能粘附在CB共聚物表面。在培养72小时并用新鲜培养基轻微冲洗后,在CB共聚物涂覆的表面上未观察到粘附细胞,而细胞在正常TCPS表面上增殖并在达到次融汇,且边界非常清晰(图8)。对于成纤维细胞,粘附对于维持多细胞结构和功能至关重要,这对于随后的增殖和迁移很重要。纤连蛋白在许多细胞类型的粘附中起主要作用,并且纤连蛋白的吸附将直接影响细胞向基材表面的粘附。超亲水性两性离子聚合物表面针对非特异性蛋白质(包括纤连蛋白)具有出色的防污能力。因此,CB聚合物涂层完全阻止了成纤维细胞粘附。

[0228] 表面官能化。为了进一步评估CB无规共聚物改性的96孔聚苯乙烯板缀合生物分子的能力和多功能性,分别将Fg和HSA经由EDC/NHS偶联化学共价固定。然后经由酶显色反应进行抗体检测。典型的抗体,将与HRP缀合的抗Fg添加到每个孔中,并确保与表面充分接触。显色反应的程度可以间接显示抗体检测量。未活化的CB表面将保持防污能力,表面上没有任何粘附的生物分子,从而导致没有后续的抗体检测(图9,Fg未活化)。对于与HSA共价键合而与抗Fg接触的表面,也没有特异性抗体-抗原诱导结合(图9,HSA活化和HSA未活化)。表面官能化的程度可以通过改变EDC/NHS浓度和抗体缀合缓冲液的pH来调整。先前的研究已表明,即使CB表面与生物分子部分缀合仍能保持防污能力。因此,这种CB聚合物修饰的96孔板有望用于检测复杂介质中的生物分子,包括血清、血浆和血液。

[0229] 实施例1描述了本发明的代表性两性离子/疏水共聚物的制备、表征和用途。

[0230] 两性离子/光反应共聚物

[0231] 在另一个实施方案中,本发明提供具有两性离子基团和光反应性基团的共聚物,每个基团都侧接在共聚物的主链上。侧接的两性离子基团赋予用该共聚物处理或涂覆的表面低污染和可功能化的特性。侧接光反应性基团用于促进共聚物与用共聚物处理的表面的结合(即,共价偶联)。侧接在共聚物主链的两性离子基团和光反应性基团的相对量可经由共聚物合成进行调节,以实现所需程度的低污染和功能化以及共聚物与表面的结合,其中的每一个都可以根据待处理或待涂覆的表面的性质(例如,组成)进行调整。

[0232] 植入的、血液接触医疗器械表面的生物污染仍然是不良生物反应的严重问题。医用级聚氯乙烯(PVC)材料,特别是作为血液接触管已在市场上使用了数十年。然而,它们在临床应用期间仍然面临着严重的生物污染问题。性质表明,低粘附和高可湿性表面是抑制表面生物污染和非温和相互作用引起的血液成分变化的关键。

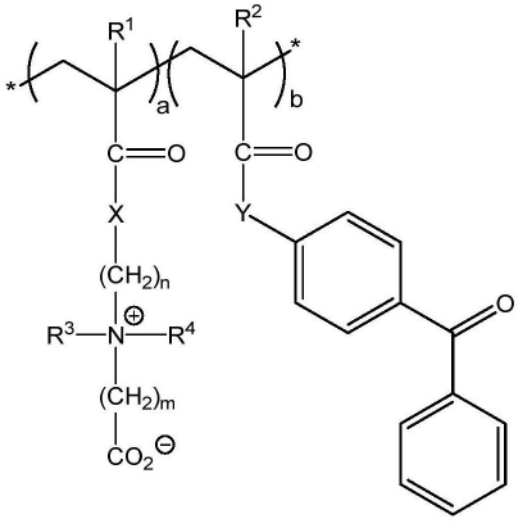
[0233] 医用级聚氯乙烯(PVC)管可耐受多种化学品、溶剂、腐蚀,并具有较长的预期寿命,并且还能耐受大多数消毒方法。PVC极其光滑的表面提供了最大的流体流动特性,从而减少了可能导致非特异性血液蛋白吸附和细菌生长的污垢积聚。然而,必须注意的是,大多数市

售医用级PVC管都掺有增塑剂(高达40％)以确保机械柔性,并且它们的表面是非常疏水的,当与人血液接触时可能会引起严重的不良反应,包括血液蛋白吸附、血小板活化/聚集、红细胞裂解、补体活化等。虽然目前市场上的医用级PVC管已经在医院中用于血液接触应用达几十年,但该管的设计初衷并不是为了避免上述问题。显然,医用级疏水性PVC基的材料已经显示出严重的凝血酶生成、补体激活等。因此,迫切需要赋予医用级PVC管表面生物相容性的组合物和方法。

[0234] 几十年来,亲水性仿生(bioinspired)防污材料一直用于医疗器械的表面涂覆。作为一种独特的两性离子材料,聚(羧基甜菜碱)(PCB)对未稀释的人血清或血浆显示出不可检测的蛋白质吸附(<0.3ng/cm^2),并在广泛的生物医学应用中广泛地报道不会引发不利的生物反应,这超出了常规亲水性或两亲性聚合物(例如PEG)的性能。具有内盐结构的具有超亲水性和电荷中性的羧基甜菜碱(CB)基团可形成一层不能被生物活性物质取代的强结合的水分子,从而完全抑制血液组分和管表面之间的非特异性相互作用。尽管如此,通过简单有效的方法将超亲水性CB聚合物直接稳定在市售疏水性产品的表面上以实现实际临床应用仍然是一个挑战。

[0235] 在一些实施方案中,两性离子/光反应性共聚物具有超亲水羧基甜菜碱(CB)单元和疏水性/光敏N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA)单元。在这些实施方案的一些中,该两性离子/光反应性共聚物具有式(III):

[0236]



(III)

[0237] 其中

[0238] R_1和R_2独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0239] R_3和R_4独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0240] X为O或NH;

[0241] Y为O或NH;

[0242] n为1至20的整数;

[0243] m为1至20的整数;

[0244] a为约0.10至约0.90mol％;

[0245] b为约0.10至约0.90mol％;

[0246] a+b为1.0;和

[0247] *代表共聚物端基。

[0248] 在这些实施方案的一些中,R_1和R_2独立地选自由氢和甲基组成的组。

[0249] 在一些实施方案中,R_3和R_4独立地选自由氢和C1-C3烷基组成的组。

[0250] 在一些实施方案中,n为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,n为2或3。

[0251] 在一些实施方案中,m为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,n为1或2。

[0252] 在一些实施方案中,a为约0.70至约0.90mol%。在一些实施方案中,a为约0.80mol%。

[0253] 在一些实施方案中,b为约0.10至约0.30mol%。在一些实施方案中,b为约0.20mol%。

[0254] 在一些实施方案中,R_1为氢或甲基,R_2为氢或甲基,R_3和R_4为甲基,并且X为NH和Y为NH。

[0255] 在其他实施方案中,R_1为氢或甲基,R_2为氢或甲基,R_3和R_4为甲基,X为O,Y为O。

[0256] 在进一步的实施方案中,R_1为氢,R_2为氢,R_3和R_4为甲基,X为NH,Y为NH,n为3,m为1。在这些实施方案的一些中,a为约0.80mol%,b为约0.20mol%。

[0257] 以下是对本发明的代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和用途以及它们在本发明的组合物和方法中的用途的描述。

[0258] 本发明提供一种表面改性策略,该策略经由简单有效的浸涂方法直接赋予市售疏水性医用级PVC管超亲水性和防污能力。该策略通过光诱导的缀合和自交联将两性离子羧基甜菜碱(CB)共聚物共价接枝到PVC管的内表面来实现。CB共聚物涂覆的市售医用级PVC管(Streamline Airless System Set,Medisystems Corporation,MA,USA)对100%人血清显示出高表面润湿性和超低污染。

[0259] 图10A是本发明方法的示意图:通过光诱导的缀合和交联将CB共聚物共价接枝到医用级PVC管的内表面。代表性的光反应性CB共聚物(图10B)通过常规自由基聚合制备,医用级PVC管由合成聚合物涂覆并在UV照射下稳定。与未涂覆的管相比,通过浸涂与PCB共聚物接枝的表面对100%人血清的非特异性蛋白质吸附表现出更好的抵抗力。因此,这种表面改性策略非常有希望用于提高当前市售医用级PVC管的生物相容性。

[0260] 通过传统的自由基聚合方法,使用AIBN作为热自由基引发剂合成两亲性无规共聚物。这些反应溶液的粘度随着65℃下聚合的进行而逐渐增加,表明单体向共聚物的转化。从^{1}H-NMR谱中特征峰的积分值的计算得到各单体的单元分数。所有功能单元的存在均通过^{1}H NMR得到验证,其中每个单体的单元分数由特征峰的积分值获得:CB单元为3.82ppm(-CH_2-,2H),BPAA单元为6.80-7.85ppm(二苯甲酮-H,9H)。该聚合物的化学结构示于图10B。聚合物链中的亲水性CB单体和疏水性/光敏性BPAA均随机分布,总组成大约等于单体进料溶液的组成。这些结果与其他含有磷酰胆碱基团的无规共聚物高度匹配,后者已被广泛用于生物医疗器械的表面改性。

[0261] UV光透过性测试表明,该PVC管材在312nm波长处具有50%的透光率,该波长是二苯甲酮基团的最佳照射波长(图11A)。因此,通过施加外部UV光可以容易地稳定内表面上物理粘附的聚合物。结果表明该聚合物对UV光(312nm)非常敏感,吸收光谱在300至350nm之间变化,表明发生了向PVC管表面的光诱导共价结合和自交联(图11B)。

[0262] 亲水性是PCB接枝表面的关键特性之一。干燥条件下的水接触角直接在涂覆的和

未涂覆的医用级PVC管上测量。结果表明,在弯曲的PVC管(图12A)上,PCB涂覆的管上的水接触角比未涂覆的管上的水接触角小得多。一般来说,PCB涂覆平坦的PVC表面的水接触角在10°左右,而未涂覆的PVC平坦表面的水接触角大于85°(图12B)。因此,PCB共聚物的接枝将疏水性PVC管表面转化为超亲水性表面。

[0263] 为了使我们的技术更接近临床应,将X射线光电子能谱(XPS)用于验证PCB聚合物的存在和稳定性。使用在285eV处的C1s峰作为参考校正结合能(BE)。XPS结果表明,PCB涂覆的表面具有与原始PCB聚合物相同的N1s峰(图13A至13D),并且即使在干燥状态和室温下保存3周后仍获得不变(steady)的原子组成(表1)。

[0264] 表1.不同样品的表面原子组成。

[0265]

样品	原子浓度(%)				
	C 1s	O 1s	N 1s	Cl 2p	Zn 2p
1) PCB 聚合物	79.9	14.4	5.9	/	/
2) 未涂覆的	86.4	8.6	/	3.3	1.7
3) 涂覆的(1 周)	74.0	15.3	5.7	5.0	/
4) 涂覆的(3 周)	74.6	16.2	5.5	3.7	/

[0266] 结果表明,成功地将PCB接枝在市售医用级PVC管的内表面,且具有优异的稳定性。有趣的是,从测量光谱中也观察到了锌(Zn 2p)的峰,这表明存在通常涂覆在医用级PVC表面以提高抗微生物能力的ZnO。

[0267] 生物污染评估对于评估当前设计策略的临床应用潜力至关重要。蛋白质吸附是发生在与生物环境接触的生物材料表面的主要事件。在图14中,与未涂覆的管相比,CB聚合物涂覆的管上的血清蛋白吸附量显著降低,表明两性离子CB聚合物涂层具有高抗污能力。重要的是,保存1周和3周的PCB涂覆的管的污垢水平没有差异。这进一步证明PCB涂层的稳定性以及与XPS结果的一致性。所有结果都表明,代表性的PCB共聚物可以赋予医用级PVC管超亲水性和持久的抗污能力。

[0268] 总之,一方面,本发明提供一种具有超亲水羧基甜菜碱(CB)单元和疏水性/光敏性N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA)单元的功能性无规型两亲性两性离子共聚物,其可用作表面涂料材料。与具有超低附着表面的市售未涂覆的医用级PVC管相比,CB无规共聚物改性的医用级PVC管具有显著改善的防污性能。经由浸涂方法表面涂覆对于大规模应用是有利地简单且有效的。它的实用性通过其实现非侵入性涂层和长期持续的能力得到进一步验证。因此,该技术有望用于广泛的医疗和工程应用,尤其是在医用级PVC管上应用。

[0269] 实施例2描述本发明的代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和用途。

[0270] 在相关的实施方案中,本发明提供经由一种简单且有效的方法直接抑制或防止增塑剂从表面(例如塑料表面,诸如聚氯乙烯表面(PVC)或聚氨酯(PU)表面),例如市售疏水性医用级PVC或PU管,浸出的表面改性策略。在一个实施方案中,该策略通过光诱导的缀合和自交联将两性离子羧基甜菜碱(CB)共聚物共价接枝到PVC管的内表面来实现。

[0271] 用本发明的两性离子共聚物对市售聚氯乙烯(PVC)医疗器械进行表面改性改善了PVC的生物相容性并防止了增塑剂(例如邻苯二甲酸酯,诸如邻苯二甲酸二-2-乙基已酯

(DEHP))在不同剪应力下从PVC迁移到患者。

[0272] 以下是对本发明的代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和赋予生物相容性并抑制增塑剂在聚氯乙烯上浸出的用途的描述。

[0273] 植入的、血液接触医疗器械表面的生物污染仍然是不良生物反应的严重问题。医用级聚氯乙烯(PVC)材料,特别是作为血液接触管和容器,已经使用了几十年。然而,这些材料在临床应用中面临(a)生物污染相关问题(例如,血小板活化、补体活化和凝血酶生成)和(b)毒性增塑剂的浸出问题。本发明提供一种表面改性方法,可以在各种动态扰动下显著防止市售医用级PVC材料上的血液蛋白污染、人血小板活化和补体活化。可以使用由两性离子羧基甜菜碱(CB)基团和光敏性交联基团组成的生物相容性聚合物,经由简单而有效的浸涂,以及随后的光照射来得到表面涂层。这种具有可调整的官能团的生物相容性聚合物可以以任何规模进行常规制造,并赋予市售PVC材料超亲水性和防污能力。此外,该聚合物有效地防止了毒性增塑剂从市售医用级PVC材料中浸出。这种技术很容易适用于需要生物相容性表面的许多其他医疗器械。

[0274] 医用级聚氯乙烯(PVC)因其对大多数化学品、溶剂和灭菌方法的耐受性以及其低成本,已将其用在柔性医疗产品中。尽管这些产品已经通过了最初的关键毒理学、生物学和生理学测试,但由于严重的血液蛋白吸附、血小板活化/聚集、红细胞裂解、凝血酶生成、补体活化等的出现,医用级PVC基的材料继续受到越来越多的批评,因为非生物相容性PVC和血液组分之间会发生不利的相互作用。血液蛋白粘附在决定材料的生物相容性方面起着重要作用,这被认为是引发后续不良反应的主要事件。因此,赋予医用级PVC生物相容性表面将有效减少生物污垢的积聚。

[0275] 事实上,医院中使用的所有塑料基一次性医疗器械中约有30%通常由柔性PVC制成,该柔性PVC与高达40wt%的增塑剂(例如邻苯二甲酸盐)物理混合以确保其作为血液接触管、容器等的机械柔性。重要的是,增塑剂在与血液接触时会不同程度地从PVC材料中浸出进入到患者体内,从而可能对一些患者群造成严重的不良健康影响(例如,肾毒性、内分泌毒性、生殖系统疾病、神经毒性、肝毒性和心脏毒性)。因此,已经报道了许多关于非毒性增塑剂和非迁移性替代增塑剂的研究。然而,由于缺乏对其长期健康效应、功能有效性和成本考虑的综合评估,目前市场上大部分医用级PVC材料仍采用常规方法制备,从而面临毒性增塑剂的浸出问题。因此,希望用有效消除生物污染引起的不良反应并防止毒性增塑剂的迁移、同时不影响PVC基的显著特性(诸如惰性、可灭菌性和柔性)的生物相容性材料对医用级PVC产品进行改性。

[0276] 目前提高医用级PVC材料生物相容性的方法包括引入疏水性成分(例如硅酮衍生物和聚四氟乙烯)、接枝亲水性抗污材料(例如烯丙胺、聚(丙烯酰胺)、聚乙二醇)和改变表面纳米/微米结构。然而,它们中没有一个清楚地展示同时解决非生物相容性和增塑剂浸出问题的能力。显然,含有污垢释放部分(例如,硅酮衍生物)的疏水性材料可能会在粘附释放循环期间表现出不良生物反应,诸如血小板/补体活化。重要的是,血液蛋白与疏水性表面具有更高的粘附亲和力,并且它们在吸附到疏水性表面时比吸附到亲水性表面上时显示出更少组织化的二级结构。

[0277] 几十年来,亲水性防污材料一直用于医疗器械的表面涂覆,其包括两性离子聚合物、聚(乙二醇)、聚(羟基官能丙烯酸酯)、聚(2-恶唑啉)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(丙三

醇)、肽和类肽。作为一种独特的两性离子材料,聚(羧基甜菜碱)(PCB)对未稀释的人血清或血浆显示出不可检测的蛋白质吸附(<0.3ng/cm^2),并在广泛的生物医学应用中广泛地报道不会引发不利的生物反应,这超出了常规亲水性或两亲性聚合物的性能。具有超亲水性和电荷中性的羧基甜菜碱(CB)基团可以形成一层强结合的水分子,从而完全抑制血液组分和管表面之间的非特异性相互作用。尽管如此,通过简单有效的方法将超亲水性CB聚合物直接稳定在市售疏水性管表面上以实现实际临床应用是一个巨大的挑战。此外,为了防止增塑剂浸出,增塑的PVC的表面改性是最常研究的策略之一,其中表面交联是最成功的技术。

[0278] 在一个实施方案中,本发明提供一种羧基甜菜碱共聚物(PCB)的表面改性方法,旨在直接赋予市售疏水性医用级增塑的PVC管(Streamline Airless System Set,Medisystems Corporation,MA,USA)超亲水性和防污能力,以及来自PVC管的低增塑剂迁移。通过自由基聚合制备具有可调官能团(即两性离子羧基甜菜碱基团和光敏性交联基团)的PCB共聚物。使用这种聚合物浸涂医用级增塑PVC管,然后在经涂覆的表面施加312nm波长的紫外(UV)光以稳定经涂覆的PCB聚合物层并防止增塑剂通过表面交联迁移。PCB聚合物的稳定性和非细胞毒性分别通过X射线光电子能谱(XPS)确认并基于ISO 10993-5指南进行检查。将经涂覆的PVC表面的润湿性和防污能力、血小板活化水平和补体活化水平直接与未涂覆的表面的那些进行比较。显然,使用表面等离子体共振(SPR)验证了在不同动态扰动/剪切应力下对100%人血清的防污能力,并有效防止了PVC管的增塑剂迁移。该方法证明了PCB共聚物在不同动态扰动下的生物相容性和抑制增塑剂浸出的能力。此外,这些材料和表面改性策略也适用于其他医疗器械。

[0279] 共聚物的合成。使用AIBN作为热自由基引发剂,通过常规自由基聚合方法合成光反应性两亲性无规共聚物。该方法可以确保可以以任何规模,特别是对于工业放大规模常规制造该种具有可调官能团的聚合物。这些反应溶液的粘度随着在65℃下的聚合而逐渐增加,表明单体向共聚物转化。聚(CBAA-co-BPAA)(PCB)聚合物的化学结构示于图15A中。CBAA基团具有超亲水性和完全电荷中性,可有效抑制血液蛋白质、细胞和细菌的粘附。光敏性基团(BPAA)可以通过光诱导的交联稳定PVC表面上的聚合物,从而进一步防止增塑剂迁移。所有官能单元的存在均通过^{1}H NMR验证,其中每个单体的单元分数由特征峰的积分值获得:CB单元为3.82ppm(-CH_2-,2H),BPAA单元为6.80-7.85ppm(二苯甲酮-H,9H)。聚合物链中的亲水性CB单体和疏水性/光敏性BPAA随机分布,总组成大约等于单体进料溶液的组成(表2)。聚(CBAA-co-BPAA-co-NB丙烯酰胺)(PCB-NB)和聚(PEGMA-co-BPAA)(PPB)的化学结构分别显示在图15B和15C中。

[0280] 表2.代表性合成共聚物的特性[a]

[0281]

	单体单元组成 (mol%)		引发剂 (mmol/L)	聚合时间 (h)	产率 (%)	分子量[c]		溶解度[d]	
	进料中 CBAA/BPAA	共聚物中[b] CBAA/BPAA				$M_w\times 10^4$	M_w/M_n	乙醇	水
PCB	80/20	81/19	5	16	88	4.6	2.1	++	++
PCB-NB	80/20	78/22	5	16	82	3.3	2.6	++	++
PPB[e]	80/20	79/21	5	16	81	4.2	2.2	++	++

[0282] [a][单体]＝0.5mol/L。所有聚合物的引发剂都是AIBN。聚合温度为65℃。[b]由CD_3OD中的^1H NMR谱确定。[c]分子量通过GPC在甲醇/水＝7/3、[LiBr]＝10mmol/L和聚(环氧乙烷)标准品中测定。M_w和M_n分别代表重均分子量和数均分子量。[d]对于每个聚合物样品,溶解度以10mg/mL的浓度确定,并描述为在25℃下可溶(+)或不溶(-)。[e]进料和共聚物中的摩尔比为PEGMA/BPAA。

[0283] 表面表征。UV光透过性测试表明,市售PVC管在312nm波长下具有50％的透光率(图16A和16B),该波长是PCB共聚物中二苯甲酮基团的最佳照射波长。因此,施加外部UV光将使管的内表面上的PCB聚合物稳定。(图16C)中的结果表明该聚合物对UV光(312nm)非常敏感,吸收光谱从300到350nm变化,表明PVC管表面发生了光诱导共价结合和自交联。亲水性是PCB接枝表面的关键特性之一。干燥条件下的水接触角直接在经涂覆的和未涂覆的医用级PVC管上测量。PCB涂覆的管上的水接触角远小于未涂覆的管上的水接触角(图16D)。一般来说,PCB涂覆的平坦PVC表面的水接触角在10°左右,而未涂覆的PVC平坦表面的水接触角大于85°。因此,PCB共聚物的接枝将疏水性PVC管表面转化为超亲水性。

[0284] 涂料稳定性。美国FDA要求与血液和血液组分接触的容器没有涂料浸出问题。为了使该技术更贴近实际应用,将X射线光电子能谱(XPS)用于验证PCB聚合物的存在和稳定性。使用285eV处的C1s峰作为参考校正结合能(BE)。XPS结果表明,PCB涂覆的表面具有与原始PCB聚合物相同的N1s峰(图16E至16H),并且即使在干燥状态和室温下保存3周后仍获得不变的原子组成。因此,PCB成功地接枝在市售医用级PVC管的内表面,且具有优异的稳定性。从测量光谱中还观察到锌(Zn 2p)的峰值,这表明存在通常涂覆在医用级PVC表面以提高抗微生物能力的锌化合物(例如ZnO)。此外,还评估了潮湿条件下PCB的稳定性。市售管涂覆有荧光标记的PCB聚合物(PCB-NB),并在37℃下浸泡在PBS/100％人血浆中。通过分析590nm波长的UV/Vis光谱来评估溶液中浸出的PCB-NB的量。结果表明,在37℃下于PBS或100％人血浆中浸泡24小时后,均未观察到PCB聚合物的吸收峰,这表明了PCB聚合物在潮湿条件下的稳定性。

[0285] 生物污染评估。蛋白质吸附在生物相容性评估中起着重要作用,它是生物环境中生物材料表面发生的主要事件。重要的是,蛋白质吸附行为取决于生物材料的表面特性和各种剪切应力。与对羟基封端的亲水表面相比,白蛋白和纤维蛋白原都对疏水性烷基表面显示出更强的结合亲和力和更少的组织化的二级结构,观察到对白蛋白的影响更大。随着

剪切速率的增加,观察到聚氨酯表面的血浆蛋白吸附减少。本文描述了分别使用具有可调流速的表面等离子体共振(SPR)生物传感器和Micro BCA蛋白质测定试剂盒的动态和静态条件下的血浆蛋白在两性离子羧基甜菜碱聚合物表面的吸附行为。

[0286] 在血清注射前和缓冲液洗涤后,使用SPR评估在未涂覆的(用PVC涂覆的SPR芯片)和PCB涂覆的(用PVC第一层和PCB聚合物第二层涂覆的SPR芯片)表面的非特异性吸附蛋白质的量(图17A至17D)。血清注射后的急剧增加归因于体积折射率的变化。为了补偿由于涂覆的聚合物层造成的SPR表面灵敏度损失,在不同的聚合物厚度下校准传感器对蛋白质吸附的响应。在四种不同流速10、40、100和200μL/min下,PCB涂覆的表面上的蛋白质吸附量分别为4.3、3.3、3.6和4.4ng/cm^2,而在未涂覆的表面上的蛋白质吸附量为78.7、85.9、81.9,和81.4ng/cm^2(图17E)。该结果表明,在动态条件下,无论剪切应力如何,与未涂覆的表面相比,PCB涂覆的表面具有超低污染(<5.0ng/cm^2)能力和<10%的污染,并且该结果与静态条件下Micro BCA蛋白质测定试剂盒的结果一致(图17F)。此外,在PBS中保存1周和3周的PCB涂覆的管的污垢水平没有差异。这进一步证明了PCB涂层的稳定性以及与干燥条件下的XPS结果的一致性。因此,两性离子PCB共聚物可以赋予医用级PVC管超亲水性和持久的抗污能力。

[0287] PCB聚合物毒性。PCB聚合物的细胞毒性根据ISO 10993-5指南进行检查。观察在PCB涂覆的管的洗脱液或含有溶解的PCB聚合物的培养基中培养的NIH3T3的形态,并将其与对照进行比较。如图18A所示,在来自PCB涂覆的管的洗脱液中培养的NIH3T3的形态与未涂覆的管和正常细胞培养基中的对照样品的形态没有差异。相比之下,细胞在用作阳性对照的毒性材料的乳胶洗脱液中培养后失去了原来的纺锤形。显然,与对照相比,在含有溶解的PCB聚合物的培养基中培养的细胞形态也没有改变(图18B)。因此,根据ISO 10993-5指南,PCB聚合物没有毒性。此外,通过LDH泄漏到培养基中来评估由不同浓度(0.00125、0.0025、0.01和0.1mg/ml)的PCB聚合物诱导的细胞毒性。将560nm处的吸光度值与相对LDH水平之间的正相关用于评估由聚合物引起的细胞膜损伤。用含PCB培养基培养的细胞的LDH释放量与正常条件下的培养物之间没有显著差异。相比之下,用0.20vol.%Tween 20培养基溶液培养的细胞释放的LDH水平远高于其他(图18C)。这些结果表明PCB聚合物不会对活细胞的膜产生细胞毒性作用。

[0288] PCB聚合物对血小板质量的影响。比较了PCB涂覆的PVC表面和未涂覆的PVC表面中血小板的质量,以验证PCB聚合物用于血液接触医疗器械的潜力。血小板活化水平和与冯维勒布兰德因子(VWF)的结合亲和力是评估血小板凝结能力的最关键参数,直接反映血小板的质量。p-选择蛋白(CD62)是一种糖蛋白,并且是一种充分描述的血小板活化标志物。在血小板活化期间,p-选择蛋白从细胞内颗粒转移到外膜。PCB涂覆的表面的血小板活化水平远低于未涂覆的PVC表面的活化水平,这表明通过使用PCB聚合物有效抑制血小板活化(图19A)。血小板的功能测试是评估血小板凝结能力的最关键参数。作为一种粘附性血浆糖蛋白,VWF在生理条件下的血小板栓塞形成中发挥着重要作用,使循环的血小板粘附并栓塞血管损伤部位。较高的平均荧光强度(MFI)(图19B)与和VWF的较高结合亲和力相关。PCB涂覆的表面的血小板在0到168小时内比未涂覆的表面的血小板具有更高的与VWF的结合亲和力,这在168小时后变得更加明显。膜联蛋白V通常用于通过其结合磷脂酰丝氨酸的能力来检测凋亡细胞,当磷脂酰丝氨酸在质膜外叶出现时是血小板凋亡的标志。因此,膜联蛋白V

的更高结合表明细胞凋亡增加而活力降低。如图19C所示,PCB涂覆的亲水性表面上的血小板比未涂覆的表面的血小板具有更低的膜联蛋白V结合水平,这表明PCB改性的表面可以有效地保持血小板活力。健康的灭活血小板呈最大直径为2-3μm的双凸盘状结构。随着血小板健康状况的恶化,发生从盘状向球状的形状变化(盘到球的转化)。将形态得分(MS)用作血小板健康的简单指标,并定义为4×(盘%)+2×(球%)+(枝%)。PCB涂覆的表面的血小板的MS值远高于未涂覆的PVC表面的血小板的MS值(图19D)。因此,疏水性PVC表面上的PCB聚合物可以有效防止血小板质量恶化,这使得PCB聚合物有望用于制造血液接触装置。

[0289] 增塑剂浸出。邻苯二甲酸酯,尤其是邻苯二甲酸二-2-乙基己酯(DEHP),由于易于塑化和加工以及具有竞争力的成本,因此成为市售PVC最常用的增塑剂。然而,尽管许多研究表明DEHP具有毒性,但含有DEHP的PVC材料仍然存在争议,并且并未被禁止用于生物医学应用。目前消除增塑材料毒性的方法包括(a)通过化学或物理表面改性抑制DEHP增塑剂的浸出,(b)开发DEHP的替代品(例如,己二酸酯、壬二酸酯、柠檬酸酯和偏苯三酸酯),和(c)创造不含增塑剂的PVC替代聚合物(例如,硅酮、聚氨酯和聚烯烃)。抑制DEHP的浸出可能是需要长期和全面评价的评估最充分的方法。显然,PVC材料的表面交联是现阶段有效防止DEHP浸出最成功的技术。DEHP在210nm、225nm和275nm附近具有三个光谱带。如本文所述,比较了涂覆的和未涂覆的PVC管在275nm波长处的吸收值。图20中的结果表明,自PCB涂覆的PVC管的浸出DEHP水平显著低于自未涂覆的管的,24小时时约为未涂覆的管的12%。这证明表面接枝的光反应性PCB聚合物有效地防止了DEHP的迁移,有望用于消除增塑的PVC材料的毒性。PCB聚合物的光诱导表面交联可能是在PVC表面稳定PCB聚合物并防止增塑剂迁移的关键。

[0290] 补体活化。补体系统包含一系列超过20种在血液和组织液中循环的蛋白质,是可以通过直接裂解或通过招募促进吞噬作用的白细胞来清除外来细胞和生物体的先天免疫系统的主要贡献者。补体系统通过三种途径活化:经典途径、替代途径和凝集素途径。人造生物材料表面主要通过吸附亚稳态补体蛋白质C3b来触发替代途径,这进一步启动整个补体级联反应,以诱导形成激活白细胞并诱导炎症反应的末端补体复合物(sC5b-9)。因此,sC5b-9的量反映了生物材料刺激补体系统的能力。重要的是,末端羟基(-OH)基团和聚(乙二醇)(PEG)链的氧化都经由替代途径强烈活化补体系统,因此共聚物聚(PEGMA-co-BPAA)(PPB)将是补体系统活化剂(阳性对照)。图21中的结果表明,与PCB涂覆的或未涂覆的医用级PVC材料接触的血清的末端补体复合物(sC5b-9)水平低于与PPB涂覆的材料接触的血清,这表明PCB聚合物对活化补体系统的亲和力比PPB涂覆的表面低。此外,补体级联在PCB涂覆的或未涂覆的表面都没有被完全抑制,且它们之间没有显著差异。这是因为在血清和空气(血浆蛋白变性和/或构象改变的)之间的界面处触发了额外补体活化,该活化被放大并且一旦被触发就无法终止。对于PPB涂覆的表面,由PPB共聚物引起的活化比血清/空气界面引起的活化要严重得多,因此整体活化水平高。因此,这些结果表明PCB聚合物不是补体活化生物材料。

[0291] 总之,在一个实施方案中,本发明提供一种功能性无规型两亲性两性离子共聚物,其包括超亲水性羧基甜菜碱(CB)单元和疏水性/光敏N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA),用作表面涂覆材料。CB无规共聚物改性的市售医用级PVC管可以在不同的动态扰动下显著防止血液蛋白污染、人血小板活化和补体活化。这种表面涂料经由浸涂方法,随后的

UV光照射,可以简单而有效地进行大规模应用。它的实用性通过其实现非侵入性涂层和长期持续的能力得到进一步验证。此外,该聚合物有效地防止了毒性增塑剂从市售医用级PVC材料中浸出。因此,该方法同时解决了PVC材料的非生物相容性和增塑剂浸出问题。该方法很容易适用于需要生物相容性和添加剂浸出抑制表面的许多其他医疗器械。

[0292] 实施例3描述本发明的代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和用于防止增塑剂从塑料表面浸出的用途。

[0293] 两性离子/疏水性/光反应性共聚物

[0294] 在进一步的实施方案中,本发明提供具有两性离子基团、疏水性基团和光反应性基团的共聚物,每个基团都侧接在共聚物的主链上。侧接的两性离子基团赋予用该共聚物处理或涂覆的表面低污染和可功能化的特性。侧接疏水性基团用于促进共聚物与用该共聚物处理的表面结合(例如,经由疏水-疏水相互作用)。侧接光反应性基团用于促进共聚物在用该共聚物处理的表面上的共聚物交联。共聚物主链上侧接的两性离子基团、疏水性基团和光反应基团的相对量可经由共聚物合成调节,以实现所需程度的低污染和功能化以及共聚物与表面的结合,其中的每一个都可以根据待处理或待涂覆的表面的性质(例如,组成)进行调节。

[0295] 在这些实施方案中的一些中,本发明提供用作血小板储存袋的表面涂覆材料的、具有超亲水羧基甜菜碱(CB)单元、疏水性结合甲基丙烯酸正丁酯(BMA)单元和疏性水/光敏N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA)单元的两性离子共聚物,用该共聚物涂覆血小板储存袋表面的方法,以及用该共聚物涂覆的血小板储存袋。

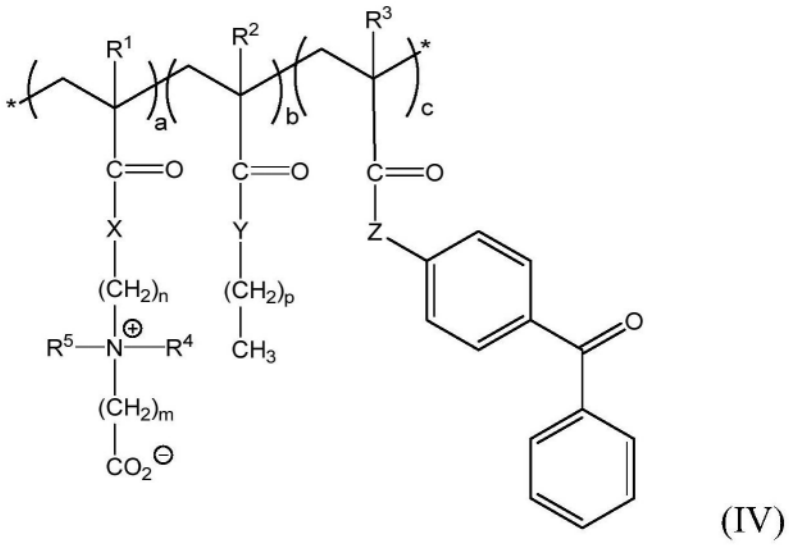
[0296] 血小板是独特的血液组分,其在止血、血栓形成、炎症和伤口愈合中起着至关重要的作用。基于血小板的疗法,即血小板输注,是治疗患有血小板减少症或血小板功能缺陷患者出血的有效方法。重要的是,在现有标准条件下,体外保存的血小板的保质期仅为其在体内血流(8-10天)中的一半(4-7天)。因此,需要改善血小板储存条件以延长其保质期,从而缓解对血小板不断增长的需求。血小板的保质期受到两个原因的强烈影响:(i)细菌污染和(ii)血小板储存病变(PSL)。通过严格的无菌采集和高度敏感的细菌诊断可以降低细菌污染的风险,而主要的限制因素PLS受储存条件的影响很大,包括容器、缓冲成分、温度、呼吸气体交换效率、pH降低、乳酸积累、营养素消耗等。尽管已经进行了很多尝试,包括新型存储介质添加剂、冷藏和冻干,但对于实际应用,聚氯乙烯当前的标准血小板保存仍然是在室温(20-24℃)下在疏水性(例如聚氯乙烯)储存袋内震荡(agitating)血小板。事实上,高质量的血小板储存从未延长到8天。导致质量损失的关键之一是血小板与非生物相容性储存袋表面之间的不利相互作用,包括不可恢复的血浆蛋白变性、血小板活化和疏水性增塑PVC材料上的生物膜形成。显然,医用级疏水性PVC基的材料也显示出严重的凝血酶生成和补体活化。因此,赋予储存袋疏水表面生物相容性仍然是一个主要挑战。

[0297] 目前,血小板袋的生物相容性从两个方面得到了改善:(i)用污垢释放材料(例如硅酮衍生物)的混合物改变表面纳米/微米结构/图案以赋予超疏水性,和(ii)接枝中性仿生防污材料(例如,两性离子聚合物、聚(乙二醇)或聚(2-恶唑啉))以赋予表面超亲水性。重要的是,用涉及冲洗过程的传统方法验证的防污表面是否是生物相容性表面仍是被怀疑的,因为疏水性材料,特别是那些含有污垢释放部分(例如,硅树脂)的材料,在粘附释放周期期间最终可能会表现出低生物污染但严重的不利生物反应(例如,血小板活化、补体活

化)。虽然血小板的活化通常被认为是纤维蛋白原吸附引起的粘附的后续反应,但非血小板/蛋白质粘附表面并不能完全阻止血小板活化。因此,对最终吸附的蛋白质/血小板的量的评估是不够的,并且研究溶液中的血小板特性至关重要。几十年来,亲水性仿生防污材料一直用于医疗器械的表面涂覆。作为一种独特的两性离子材料,聚(羧基甜菜碱)(PCB)对未稀释的人血清或血浆显示出不可检测的蛋白质吸附(<0.3ng/cm^2),并在广泛的生物医学应用中普遍报道不会引发不利的生物反应,这超出了常规亲水性或两亲性聚合物(例如,PEG)的性能。具有内盐结构的、具有超亲水性和电荷中性的羧基甜菜碱(CB)基团可形成一层不能被生物活性物质取代的强结合的水分子,从而完全抑制血液组分和袋表面之间的非特异性相互作用。尽管如此,通过简单有效的方法将超亲水性CB聚合物直接稳定在市售疏水性产品的表面上以实现实际临床应用仍然是一个挑战。

[0298] 在一些实施方案中,本发明提供一种式(IV)的共聚物:

[0299]



(IV)

[0300] 其中

[0301] R_1、R_2和R_3独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0302] R_4和R_5独立地为-$(CH_2)_xH$,其中x为0至20的整数;

[0303] X为O或NH;

[0304] Y为O或NH;

[0305] Z为O或NH;

[0306] n为1至20的整数;

[0307] m为1至20的整数;

[0308] p为0至20的整数;

[0309] a为约0.10至约0.90mol%;

[0310] b为约0.05至约0.95mol%;

[0311] c为约0.05至约0.95mol%;

[0312] a+b+c为1.0;和

[0313] *代表共聚物端基。

[0314] 在这些实施方案的一些中,R_1、R_2和R_3独立地选自由氢或甲基组成的组。

[0315] 在一些实施方案中,R_4和R_5独立地选自由氢或C1-C3烷基组成的组。

[0316] 在一些实施方案中,n为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,n为2或3。

[0317] 在一些实施方案中,m为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,m为1或2。

[0318] 在一些实施方案中,p为1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,p为3。

[0319] 在一些实施方案中,a为约0.70至约0.90mol%。在一些实施方案中,a为约0.70mol%。

[0320] 在一些实施方案中,b为约0.05至约0.25mol%。在一些实施方案中,b为约0.20mol%。

[0321] 在一些实施方案中,c为约0.05至约0.20mol%。在一些实施方案中,b为约0.10mol%。

[0322] 在一个实施方案中,R_1、R_2和R_3为氢,R_4和R_5为甲基,X为NH,Y为O,Z为NH。

[0323] 在另一个实施方案中,R_1、R_2和R_3为氢,R_4和R_5为甲基,X为NH,Y为O,Z为NH,n为3,m为1,且p为3。

[0324] 在上述实施方案的一些中,a为约0.70mol%,b为约0.20mol%,c为约0.10mol%。

[0325] 以下是对本发明的代表性两性离子/疏水性/光反应性共聚物的制备、表征和用途及其在本发明的组合物和方法中的用途的描述。

[0326] 本发明提供一种CB聚合物的表面改性策略,其通过极其简单有效的浸涂技术直接赋予市售疏水性血小板储存袋超亲水性和防污能力。这通过光诱导的缀合和交联将CB共聚物共价接枝到储存袋的内表面来实现(图22A)。CB部分是超亲水的,这使得它很难附着在市售疏水性血小板储存袋上,疏水性结合基团(甲基丙烯酸正丁酯,BMA)(例如,20mol%)和光敏性基团(二苯甲酮)(例如,10mol%)包含在该共聚物中。二苯甲酮基团已被广泛用作光引发剂以促进化学缀合,其在250至365nm的UV照射下产生提取脂肪族氢以形成共价结合的双自由基。为了将这种结合基团引入共聚物中,合成单体N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA),然后将其与其他单体共聚形成多功能共聚物(图22B)。功能单元的存在通过^{1}H NMR验证,其中每个单体的单元分数由特征峰的积分值获得:CB单元为3.82ppm(-CH_2-,2H),BMA单元为1.45-1.63ppm(-CH_2-,4H),BPAA单元为6.80-7.85ppm(二苯甲酮-H,9H)。结果表明,该聚合物对UV光(312nm)非常敏感,吸收光谱从300到350nm变化,这表明发生光诱导共价结合(图22C)。

[0327] 市售血小板袋的改性仅发生在内表面,而不会损害原袋的特性。为了实现这一目标,将代表性PCB聚合物以极低的浓度(0.5wt%)溶解到DI水中,然后在轻轻摇晃下注入袋中以确保所有表面都可以涂上该聚合物。UV光透过性测试表明,该袋在312nm波长处具有70%的光透射率,312nm波长正是二苯甲酮基团的最佳照射波长(图23A)。因此,通过施加外部UV光可以容易地稳定内表面上物理粘附的聚合物。使用这种技术的共聚物涂层厚度通常在<50nm左右,因此我们看不到与SEM图像的明显差异(图23B)。有趣的是发现了一个带纹理的表面,这种形态可以防止内表面在加热灭菌或血液处理期间堵塞。其他研究表明,与光滑表面相比,带纹理的表面具有更严重的生物污染。市售血小板袋主要由PVC与混合增塑剂(高达40%)制成,以确保袋子固有的机械柔性和透气性。因此,在短时间内(10秒)用乙醇简单冲洗表面以减少增塑剂对PCB稳定性的浸出影响。

[0328] 美国食品和药物管理局(FDA)要求将接触血液和血液组分的空容器不应有浸出问题。因此,为了使该技术更接近临床应用,将X射线光电子能谱(XPS)用于验证PCB稳定性。结

合能(BE)使用285eV处的C1s峰作为参考进行校正。XPS结果表明,PCB涂覆的表面具有与原始PCB聚合物相同的N1s峰(图23C和23D),并且即使在缓冲液中浸泡2周后仍获得不变的原子组成(图23E),这可以覆盖血小板的整个生命周期。因此,PCB成功地接枝在市售血小板袋的内表面上,并且具有优异的稳定性。有趣的是,从测量光谱中观察到了两个硅峰(Si 2s和Si 2p),这证明该袋用疏水性硅基材料处理过而具有污垢释放性能。通过在动态条件下实时监测对100%人血清的污染进一步证实了这种现象(图24A)。亲水性是PCB接枝表面的关键特性之一。测量了干燥条件下的水接触角和水性介质中的空气接触角。所有接触角直接从摄影图像测量。PCB涂覆的表面的水接触角从90°显著降低到10°,空气接触角从80°显著增加到160°(图23F)。因此,PCB共聚物的接枝将疏水性表面转化为超亲水性表面。

[0329] 尽管进行了数十年的研究,但植入的、血液接触医疗器械表面上的生物污染仍然是一个严重的问题。PCB涂覆的血小板袋将用于血小板保存,最终涉及与人血液蛋白质和血小板的直接接触。因此,生物污染评估对于评估当前设计策略的临床应用潜力至关重要。蛋白质吸附是发生在与生物环境接触的生物材料表面的主要事件。蛋白质在动态和静态条件下可能表现出不同的吸附行为。因此,使用表面等离子体共振(SPR)和Micro BCA蛋白质测定试剂盒分别在动态条件和静态条件下评估针对100%人血清的PCB涂覆的市售血小板袋。SPR广泛用于表征聚合物表面和蛋白质之间的原位实时相互作用,检测限<0.3ng/cm^2。SPR片依次旋涂有市售血小板袋/THF溶液和PCB共聚物/DI水溶液。第一层(熔融PVC袋)和第二层(PCB聚合物)的厚度在干燥条件下测量,其值为18±1.2nm和20±2.1nm。图24A示出了作为时间函数的归因于血清吸附的SPR信号的变化。对于涂覆有熔融血小板袋的芯片,波长偏移增加,随后在继续流经100%人血清时显示出稳定下降的趋势,这表明XPS结果证实了硅酮基添加剂可能引起的污垢释放行为。在血清注射点的信号的急剧增加归因于整体(bulk)折射率变化。从蛋白质注射前到用缓冲液洗涤后的波长偏移来评估非特异性吸附的量。PCB涂覆的和未涂覆的芯片的波长偏移分别为0.20和2.24nm,分别对应于3.4和38.1ng/cm^{2}的血清吸附。该结果表明,在动态条件下,与未涂覆的表面相比,PCB涂覆的表面具有超低污染(<5.0ng/cm^2)能力和小于10%的污染,这与Micro BCA蛋白质测定试剂盒结果一致(图24B)。

[0330] 纤连蛋白在许多细胞类型(包括成纤维细胞)的粘附中起主要作用。因此,NIH3T3成纤维细胞在PCB涂覆的防污表面上的粘附被完全抑制(图24C)。血小板粘附强烈依赖于吸附的纤维蛋白原/纤维蛋白、冯维勒布兰德因子(VWF)、纤连蛋白等,并且10ng/cm^{2}纤维蛋白原吸附可以引起全规模的血小板粘附(full-scale blood platelet adhesion)。具有PCB亲水性水合层的防污表面可以有效地保护表面免受污染和血小板活化(图24D)。尽管PVC基的材料已显示出对形成生物膜的细菌的结合亲和力,并且表皮葡萄球菌的革兰氏阳性菌株显示漏检的缓慢生长速度,但PCB涂覆的表面完全抑制了细菌的粘附(图24E和24F)。有趣的是,细菌偏好在纹理表面的凹部区域生长并形成生物膜。

[0331] 虽然已经将血小板的活化看作是纤维蛋白原吸附引起的粘附的后续反应,但非血小板/蛋白质粘附表面并不能完全阻止血小板活化。膜联蛋白V通常用于通过其结合磷脂酰丝氨酸的能力来检测凋亡细胞,当磷脂酰丝氨酸在质膜外叶出现时是血小板凋亡的标志。因此,膜联蛋白V结合水平越高代表细胞凋亡越严重。结果表明,与保存在未涂覆的袋中的那些相比,保存在PCB涂覆的亲水性袋中的血小板具有较低的膜联蛋白V结合水平,这表明

PCB表面可以有效地保持血小板活力(图25A)。血小板在正常情况下保持静息状态,然而,当遭受血管损伤时,由于血流速度变化引起的剪切应力以及随后的细胞信号传导事件会导致不可逆的血小板活化。p-选择蛋白(CD62)是一种糖蛋白,并且是充分描述的血小板活化的标志物。在血小板活化期间,p-选择蛋白从细胞内颗粒转移到外膜。图25B显示了与对照表面相比,由于较低的非特异性血小板-表面相互作用,在PCB涂覆的袋上有效抑制了血小板的活化。第8天时PCB涂覆的袋中血小板的活化水平与第5天时的对照样品相当。尽管如此,与冷藏保存的血小板相比,这样的血小板仍然具有非常高的代谢活性,因此即使对于PCB涂覆的袋中的血小板而言,其活化水平也显示出稳定增加的趋势。同时,血小板的高代谢活性和活化可能引起葡萄糖消耗增加(图25G)、乳酸积累(图25H),结果是,如果超过缓冲容量,则pH会下降(图25F)。pH降至6.2或更低会显著降低输血期间血小板的存活率。对于PCB涂覆的样品,与对照样品相比,葡萄糖消耗和乳酸积累不会严重影响pH值(>6.8)。将形态得分(MS)用作血小板健康的简单指标,并将其定义为4×(盘%)+2×(球%)+(枝%)。具有健康盘形态的血小板百分比越高,MS值越高。即使在8天后,储存在PCB涂覆的袋中的血小板的MS值也显示出更高的MS(图25C)。VWF与血小板的结合取决于与血小板GPIbα结合的A1结构域的构象,并且较高的MFI(平均荧光强度)与较高的结合亲和力相关。这是血小板止血功能的判断标准。结果表明,PCB涂覆的样品在第8天的MFI(320)高于对照样品在第5天的MFI(300)(图25D)。上述所有血小板评估结果表明,两性离子PCB共聚物表面可以有效缓解非特异性相互作用引起的血小板损伤,这使得我们的聚合物和表面改性策略具有更大的临床应用潜力。

[0332] 总之,一方面,本发明提供一种由超亲水性羧基甜菜碱(CB)单元、疏水性甲基丙烯酸正丁酯(BMA)单元和光敏性N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺单元(BPAA)组成的多功能无规两亲性两性离子共聚物,其用作表面涂覆材料。该聚合物可以通过简单有效的浸涂方法非侵入性地赋予市售疏水性血小板储存袋超亲水性和防污能力。与目前的标准保存方法相比,保存在这种PCB共聚物涂覆的血小板袋中的人血小板显示出显著改善的特性(例如,更高的活力、更低的活化率、更高的形态得分和更高的与VWF的结合亲和力)。该种涂覆策略经由浸涂方法提供一种简单而有效的大规模应用。因此,该技术有望用于广泛的医学和工程应用,特别是用于将人类血小板保质期延长到超出当前标准方法的范围。

[0333] 实施例4描述了本发明的代表性两性离子/疏水性/光反应性共聚物的制备、表征和用途。

[0334] 两性离子共聚物涂料组合物和基材涂覆表面

[0335] 在本发明的另一方面,提供涂料组合物。该涂料组合物包括如本文所述的两性离子共聚物(例如,式(I)、(II)、(III)或(IV)的共聚物)。除了两性离子共聚物之外,该涂料组合物任选地包括有效地将两性离子共聚物递送至待涂覆表面的载体或赋形剂。代表性的载体包括溶剂,诸如有机溶剂、水性溶剂以及混合的有机和水性溶剂,待施加的两性离子共聚物可溶于其中。该涂料组合物有效为基材表面提供涂层。

[0336] 对于使用包含光反应性基团的两性离子共聚物的实施方案,涂料源自如本文所述的共聚物。在将共聚物固定到表面的过程中,涂覆在表面上的共聚物被照射以实现共聚物交联,并且取决于表面,共聚物交联到表面。因此,对于这些实施方案,该涂料包含交联的两性离子共聚物并且取决于表面,包含也交联到表面的交联的两性离子共聚物。

[0337] 在另一方面,本发明提供一种基材,其表面的至少一部分或全部(例如,外部或内部)涂覆有本发明的共聚物(例如,式(I)、(II)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物。

[0338] 合适的基材具有为基于烃的表面的表面。合适的表面包括塑料表面和聚合物表面。代表性表面包括聚烯烃、聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯(PU)、聚砜(PSF)、聚(醚砜)(PES)、聚酰胺、聚丙烯酸、聚酰亚胺、芳族聚酯、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS))、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)表面。在一些实施方案中,该表面是聚氯乙烯表面或聚氨酯表面。在其他实施方案中,该表面是纤维素或醋酸纤维素表面。

[0339] 其他合适的表面包括金属、金属合金和陶瓷表面。

[0340] 在一些实施方案中,本发明提供一种医疗器械,其表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的共聚物或提供包含本发明共聚物的组合物。合适的医疗器械包括具有为基于烃的表面的表面的器械。代表性表面包括聚烯烃、聚酯、聚碳酸酯、聚氨酯(PU)、聚砜(PSF)、聚(醚砜)(PES)、聚酰胺、聚丙烯酸、聚酰亚胺、芳族聚酯、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)表面。在一些实施方案中,该表面是聚氯乙烯表面或聚氨酯表面。在其他实施方案中,该表面是纤维素或醋酸纤维素表面。

[0341] 代表性器械包括为板、盘、管、尖端、导管、人造血管、人造心脏或人造肺的器械。

[0342] 在一个实施方案中,本发明提供其内表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的组合物或共聚物的聚氯乙烯管。

[0343] 在另一个实施方案中,本发明提供其内表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的组合物或共聚物的聚氨酯管。

[0344] 在进一步的实施方案中,本发明提供其表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的组合物或共聚物的聚砜透析膜。

[0345] 在另一个实施方案中,本发明提供其内表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的组合物或共聚物的基于烃的膜容器。

[0346] 在另一个实施方案中,本发明提供其内表面的至少一部分或全部涂覆有本发明的组合物或共聚物的血小板储存袋。

[0347] 其中至少一个或多个表面有利地涂覆有本发明的共聚物或包含本发明的共聚物的组合物的其他代表性器械包括来自I类、II类或III类的植入式/非植入式医疗器械。

[0348] 如上所述,本文所述的两性离子共聚物可用于涂覆血液接触表面以赋予这些表面多种优点。包括血液接触表面的装置有血液透析装置的组件。有利地用本文所述的两性离子共聚物处理的血液透析装置的组件包括透析膜(例如,血液净化膜)和透析管(例如,聚氯乙烯和聚氨酯管)。有利地涂覆有两性离子共聚物的膜的表面包括纤维素、醋酸纤维素、聚(砜)(PSF)、聚(醚砜)(PES)、聚(二甲基硅氧烷)(PMDS)、聚(偏二氟乙烯)(PVDF)、聚(乳酸)(PLA)、聚氨酯(PU)和聚丙烯(PP)。

[0349] 使用两性离子共聚物的方法

[0350] 在进一步的方面,本发明提供使用本发明的两性离子共聚物(例如,式(I)、(II)、

(III)或(IV)的共聚物)和共聚物的组合物的方法。

[0351] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于涂覆基材表面的方法,包括使基材表面与本发明的共聚物(例如,式(I)、(II)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物接触。

[0352] 在一个相关的实施方案中,本发明提供一种用于涂覆基材防污的表面的方法,该方法包括用本发明的共聚物(例如,式(I)、(III)、或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分,并且用有效使表面上的共聚物交联的光照射基材表面。

[0353] 在另一个实施方案中,本发明提供使基材表面防污的方法,包括用本发明的共聚物(例如,式(I)、(II)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分。

[0354] 在一个相关的实施方案中,本发明提供一种使基材表面防污的方法,包括用本发明的共聚物(例如式(I)、(III)、或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分,并且用有效使表面上的共聚物交联的光照射基材表面。

[0355] 在进一步的实施方案中,本发明提供一种抑制血液蛋白质吸附在基材表面上的方法,包括用本发明的共聚物(例如,式(I)、(II)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分。

[0356] 在一个相关的实施方案中,本发明提供一种抑制血液蛋白质吸附在基材表面上的方法,包括用本发明的共聚物(例如式(I)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分,并且用有效使表面上的共聚物交联的光照射基材表面。

[0357] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于涂覆血小板储存袋的内表面的方法,包括使血小板储存袋的内表面与本发明的共聚物(例如,式(I)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物接触,并且用有效使血小板储存袋的接触内表面上的共聚物交联的光照射该表面。

[0358] 在另一个实施方案中,本发明提供一种涂覆聚氯乙烯管内表面的方法,包括使血小板储存袋的内表面与本发明的共聚物(例如,式(I)、(III)或(IV)的共聚物)或包含本发明共聚物的组合物接触,并用有效使聚氯乙烯管的接触内表面上的共聚物交联的光照射该表面。

[0359] 在其他实施方案中,本发明提供用于抑制或防止增塑剂从基材表面浸出的方法。在这些实施方案的一些中,该方法包括:

[0360] (a)用包含共聚物的组合物涂覆基材表面的至少一部分以提供经涂覆的表面,该共聚物包含第一重复单元和第二重复单元,其中第一重复单元中的每个包含侧接两性离子基团,并且其中第二重复单元中的每个包含有效使表面上的共聚物交联的侧接光反应性基团,以提供经涂覆的表面;和

[0361] (b)用有效使经涂覆的表面上的共聚物交联的光照射该表面,从而提供有效抑制或防止增塑剂从表面浸出的经涂覆的表面。

[0362] 在一些实施方案中,该共聚物还包含第三重复单元,其中第三重复单元中的每个包含有效地将共聚物吸附到表面的侧接疏水性基团。有用的两性离子共聚物包括式(I)、

(III)和(IV)的那些。

[0363] 在上述实施方案的一些中,使表面与组合物接触包括将表面浸入共聚物或组合物中。在这些实施方案的另一些中,使表面与组合物接触包括将共聚物或组合物喷涂、旋涂、刷涂或滚涂到表面上。

[0364] 在本发明方法的一些实施方案中,使表面与共聚物或共聚物组合物接触,或用共聚物或共聚物组合物涂覆表面,包括将表面浸入共聚物或共聚物组合物中。在这些实施方案的另一些中,使表面与共聚物或共聚物组合物接触,或用共聚物或共聚物组合物涂覆表面,包括将共聚物或共聚物组合物喷涂、旋涂、刷涂或滚涂到表面上。

[0365] 如本文所用,术语"约"是指指定值的±5%。

[0366] 提供以下实施例用于说明而非限制本发明。

实施例

[0367] 实施例1

[0368] 代表性两性离子/疏水共聚物的制备、表征和用途

[0369] 在该实施例中,描述了本发明的代表性两性离子/疏水共聚物的制备、表征和用途。

[0370] 材料。根据先前报道的方法分别合成羧基甜菜碱丙烯酰胺、1-羧基-N,N-二甲基-N-(3'-丙烯酰胺丙基)乙铵内盐(CB1)和羧基甜菜碱甲基丙烯酸酯、2-羧基-N,N-二甲基-N-(2'-甲基丙烯酰氧基乙基)乙铵内盐(CB2)。以下材料和试剂获自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA),无需任何进一步纯化即可使用:2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)、人血浆纤维蛋白原(Fg)、人血清白蛋白(HSA)、人血γ-球蛋白、醋酸钠(SA)、N-[三(羟甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸(TAPS)、1-癸硫醇、正十二烷基硫酸钠(SDS)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N-乙基-N'-(3-二乙基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)。甲基丙烯酸正丁酯(BMA)购自Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.(Portland,Oregon,USA)。与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗纤维蛋白原抗体购自Novus Biologicals(Littleton,CO,USA)。邻苯二胺二盐酸盐(OPD)获自Pierce(Rockford,Illinois,USA)。磷酸盐缓冲盐水(10×,溶液)、过氧化氢(H_2O_2,30%的水溶液)和盐酸(HCl)获自Fisher Scientific Co.(Fair Lawn,NJ)。正常人血清(汇集的混合性别)购自BioChemed Services(Winchester,VA)。Micro BCA蛋白质测定试剂盒和RBS^{TM}35浓缩物购自Thermo Scientific(Waltham,MA)。具有超低附着表面的多孔板购自Corning Costar Corp.(Corning,NY)。乙醇(200度(proof))购自Decon Labs(King of Prussia,PA)。水来自Millipore水净化系统,最小电阻率为18.0MΩcm。其他有机试剂和溶剂可作为超纯级试剂商购获得并按原样使用。

[0371] 聚合物的合成。通过传统的自由基聚合方法,使用AIBN作为引发剂合成两亲性无规共聚物聚(CB1-co-BMA)(PCB1)和聚(CB2-co-BMA)(PCB2),以前报道过类似的方法(Lin,X.;Konno,T.;Ishihara,K.,Cell-Membrane-Permeable and Cytocompatible Phospholipid Polymer Nanoprobes Conjugated with Molecular Beacons.Biomacromolecules 2014,15(1),150-157;和Lin,X.;Fukazawa,K.;Ishihara,K.,Photoinduced inhibition of DNA unwinding in vitro with water-soluble polymers containing both phosphorylcholine and photoreactive groups.Acta

Biomater.2016,40,226-234)。简而言之,将所需量的CB单体、BMA(CB/BMA的各种摩尔比:2/8、3/7、4/6、5/5、6/4、8/2)和AIBN溶解在乙醇中。将溶液转移到Pyrex® Vista™玻璃管反应器中,并在室温下进一步用氮气吹扫30分钟。在氮气保护气氛下,在密封的玻璃管中进行聚合。聚合后,将反应液轻轻滴入乙醚/氯仿混合溶剂中以使共聚物沉淀。将共聚物过滤并在室温下真空干燥24小时后收集为白色粉末。通过用大量Millipore水洗涤收集的白色聚合物粉末来去除残留的CB单体。然后,再次过过滤共聚物,用液氮冷冻并用冻干机(Labconco Co.,Ltd.,Kansas City,MO)在-80℃下处理48小时,将它们转化为干燥的白色粉末。使用^{1}H-NMR(AV-500,Bruker,German)确认纯化共聚物的化学结构,聚合物在-20℃下冷冻保存。

[0372] 涂覆条件的优化。将聚丙烯(PP)基材(ePlastic,SanDiego,CA,USA)切成0.5cm×0.5cm,在乙醇中超声清洗10分钟并在室温下干燥。将具有不同两亲性的CB共聚物分别以0.50wt%的浓度溶解在乙醇中。将每个基板浸入聚合物溶液中达10秒,然后在室温下在乙醇蒸气保护环境中在常压下蒸发溶剂。所有改性的PP基材在室温下浸泡在磷酸盐缓冲盐水(PBS,1×,pH 7.4)中1小时。然后,用DI水冲洗基材并在室温下真空干燥24小时。为了确定聚合物浓度对涂覆效率的影响,用不同浓度(0.03、0.06、0.13、0.25、0.5和1.00wt%)的CB共聚物涂覆清洁的PP基材以进行进一步测试。

[0373] 为了快速评估每种涂层的防污能力,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量吸附的单一蛋白质(纤维蛋白原)。简而言之,将聚合物涂覆的PP基材在PBS中预先润湿过夜,然后在25℃下浸入1.0mg/mL纤维蛋白原的PBS中达1小时。用新鲜的PBS冲洗后,室温下将PP基材浸泡在与HRP缀合的抗纤维蛋白原抗体溶液中达30分钟。然后,再次冲洗基材并使其与OPD/H_2O_2混合溶液再反应15分钟;混合溶液含有1.0mg/ml OPD和在柠檬酸盐缓冲液(1x,pH 5.0)中稀释1000倍的H_2O_2。用1.0N HCl淬灭反应后,使用酶标仪(BioTek Instruments Inc.,Winooski,VT)测量每种溶液在492nm处的吸光度。

[0374] 多孔板和金片上的表面涂层。采用上述浸涂溶剂蒸发方法,将原聚苯乙烯制成的96孔板简单地用CB共聚物进行改性。比较具有超低附着表面的市售96孔板和未涂覆的聚苯乙烯96孔板的抗污能力。金片使用电子束蒸发器由涂覆有第一层钛膜层(~2nm)和第二层金层(~48nm)的BK7载玻片制成。用丙酮、DI水和乙醇将该片在每种溶剂中超声清洗片5分钟。随后,将它们用UV/臭氧清洁剂处理30分钟,然后将它们浸入0.2Mm 1-癸硫醇中24小时以形成疏水性自组装单层。最后,使用与上述相同的过程用CB聚合物浸涂该片。在干燥条件下使用光谱椭偏仪(α-SE;J.A.Woolam Co.,Inc.,Tokyo,Japan)测量涂覆的聚合物层的厚度。

[0375] 自单一蛋白质溶液和100%人血清的蛋白质吸附。综合测试CB无规共聚物涂层对单一蛋白质和全人血清的防污能力。经常将10%浓度的单一血液蛋白质用作评估各种表面上的生物污染的标准。因此,针对100%单一血液蛋白质和100%人血清的防污能力的评估对于血液接触装置来说是有吸引力且必不可少的。在测试蛋白质吸附之前,在室温下用DI水预先润湿涂覆的96孔板。将Micro BCA蛋白质测定试剂盒用于评估对人血浆纤维蛋白原(Fg)、人血清白蛋白(HSA)、人血γ球蛋白和人血清的蛋白质吸附。Fg、HSA和γ-球蛋白的浓度分别为3.0、45和16mg/mL,相当于人血浆中浓度的100%。正常人血清(100%,汇集的混合性别)按原样使用。简而言之,将人类蛋白质(溶于PBS,1x,pH 7.4)或未稀释的人血清在预先润湿的孔中在37℃下孵育2小时,然后用新鲜的PBS(1x,pH 7.4)冲洗。在1.0ml的1.0wt%

正十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中使吸附的蛋白质脱离。将150μL上清液转移到96孔板中,并与另外150μL二喹啉甲酸(BCA)试剂轻轻混合。在37℃下孵育2小时后,通常由两个BCA分子与一个亚铜离子(Cu^{+1})螯合形成紫色产物,后者在碱性环境中被蛋白质从Cu^{+2}还原。最后,使用酶标仪测定562nm处的吸光度。562nm处的吸光度与吸附蛋白质的量的增加呈线性关系。

[0376] 细胞粘附。将从美国模式培养物保藏所(ATCC,Rockville,MD)获得的NIH3T3小鼠胚胎成纤维细胞在37℃下于含有5.0%CO_2的湿润气氛中,接种在聚苯乙烯组织培养皿(Φ=10cm,5.0×10^4个细胞/mL)中的补充有10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中。使用0.25%胰蛋白酶/EDTA传代次融汇细胞培养物。将灭菌的CB聚合物溶液(0.5wt%,乙醇)滴在组织培养板的表面上并在细胞培养罩中蒸发。然后,经涂覆的表面用PBS(1x,pH 7.4)冲洗并在室温下用DMEM预润湿过夜。在37℃下于含有5.0%CO_2的湿润气氛中,将NIH3T3细胞以5.0×10^4个细胞/mL的浓度接种在补充有10%FBS的DMEM中。培养3天后,更换培养基并使用Nikon Eclipse TE2000-U显微镜(Nikon Instruments,Melville,NY)观察部分涂覆的表面上的细胞的形态。

[0377] 表面功能化。在PCB2-37涂覆的96孔聚苯乙烯板上进行表面功能化。上面已经详细描述了使用浸涂和溶剂蒸发方法的表面改性过程。聚合物表面的羧基可以很容易地被EDC/NHS化学活化,并与例如蛋白质、酶和适体/寡核苷酸的氨基共价键合。简而言之,第一,在25℃下将0.15mL新鲜制备的含有0.1M NHS和0.4M EDC的DI水溶液加入到经涂覆的96孔板中达30分钟以活化羧酸酯基团。第二,去除EDC和NHS的溶液,并用10mM SA缓冲液(pH 5.0)冲洗孔表面3次。第三,将0.15mL于10mM TAPS(pH 8.2)中的Fg溶液(1.0mg/mL)添加到活化的孔中,并在25℃下反应30分钟。随后,先后用BA缓冲液(10mM硼酸和300mM氯化钠,pH 9.0)和磷酸盐缓冲盐水(PBS,1x,pH7.4)洗涤功能化表面3次,然后评估抗体-抗原特异性相互作用。随着上述蛋白质固定过程,残留的活化羧基也被去活化。Fg功能化的96孔板用新鲜的PBS轻轻冲洗3次。随后将0.15mL的PBS溶液中与HRP缀合的抗纤维蛋白原抗体加入每个孔中,在25℃下保持30分钟。之后,再次冲洗孔并使其与0.15mL的OPD/H_2O_2溶液再反应15分钟。通过加入0.15mL 1.0N的盐酸溶液淬灭显色反应。使用上述酶标仪测量每种溶液在492nm处的吸光度。为了进行比较,使用未活化的CB聚合物涂覆但与Fg接触的96孔板和活化的CB聚合物表面但用HSA功能化的96孔板作为对照。

[0378] 统计分析。所有图表和条形图均表示为上述三或五次重复实验的平均值±标准偏差(SD)。进行student'st-检验以确定观察到的差异是否具有统计学意义。

[0379] 实施例2

[0380] 代表两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和用途

[0381] 在该实施例中,描述了本发明的代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和用途。

[0382] 材料。根据先前报道的方法(Zhang,Z.;Vaisocherová,H.;Cheng,G.;Yang,W.;Xue,H.;Jiang,S.,Nonfouling Behavior of Polycarboxybetaine-Grafted Surfaces:Structural and Environmental Effects.Biomacromolecules 2008,9,2686-2692)合成羧基甜菜碱丙烯酰胺、1-羧基-N,N-二甲基-N-(3'-丙烯酰胺丙基)乙铵内盐(CBAA)。以下材料和试剂获自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO),无需任何进一步纯化即可使用:2,2'-偶氮二

异丁腈(AIBN)、1-癸硫醇和正十二烷基硫酸钠(SDS)。磷酸盐缓冲盐水(10×,溶液)获自Fisher Scientific Co.(FairLawn,NJ)。正常人血清(汇集的混合性别)购自BioChemed Services(Winchester,VA)。Micro BCA蛋白质测定试剂盒和RBS™35浓缩物购自Thermo Scientific(Waltham,MA)。乙醇(200度)购自Decon Labs(King of Prussia,PA)。水获自Millipore水净化系统,最小电阻率为18.0MΩcm。其他有机试剂和溶剂可作为超纯级试剂商购获得并按原样使用。

[0383] 聚合物合成和表征。通过甲基丙烯酰氯与4-氨基二苯甲酮反应合成光敏性单体N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA)。通过传统的自由基聚合方法使用AIBN作为热引发剂合成两亲性PCB共聚物,聚(CBAA-co-BPAA)(以前报道过类似的方法:Lin,X.;Fukazawa,K.;Ishihara,K.,Photoreactive Polymers Bearing a Zwitterionic Phosphorylcholine Group for Surface Modification of Biomaterials.ACS Applied Materials& Interfaces2015,7,17489-17498)。简而言之,将所需量的CB单体和引发剂溶解在乙醇中。将溶液转移到Pyrex Vista玻璃管反应器中,并在室温下进一步用氮气吹扫30分钟。在氮气保护气氛下,在密封的玻璃管中进行聚合。聚合后,将反应液轻轻滴入乙醚/氯仿混合不良溶剂中以使共聚物沉淀。将共聚物过滤并在室温下真空干燥24小时后收集为白色粉末。通过DI水透析4天去除残留的水溶性单体。然后,将共聚物用液氮冷冻,并用冻干机(Labconco Co.,Ltd.,Kansas City,MO)在-80℃下处理48小时。使用^{1}H NMR(AV-500,Bruker,Germany)确认纯化共聚物的化学结构,聚合物在-20℃下冷冻保存。将UV光(312nm,600mJ/cm^{2})施加到聚合物上,并使用Varian Cary 5000UV-Vis-NIR分光光度计评估光敏度。

[0384] 表面改性。将从Streamline Airless System Set(Medisystems Corporation,MA)获得的医用级PVC管切成10cm长。然后将PCB共聚物溶液(0.5wt%,乙醇)填充到管中,随后将其密封并置于旋转器上10分钟,以确保整个内表面与聚合物溶液接触。然后,去除聚合物溶液,并在室温下用干燥空气吹经涂覆的管。将外部UV光(312nm,600mJ/cm^{2})施加到经涂覆的管上以稳定内表面上的聚合物。使用无菌PBS(1×,pH 7.4)洗掉不稳定的聚合物并预先润湿表面,然后加入人血清进行污染测试。溶液通过0.45μm过滤器过滤灭菌。

[0385] 表面表征。每个样品的表面润湿性通过测量水接触角来表征。将蒸馏水加入未涂覆和PCB涂覆的PVC管中,然后观察水接触角。使用Kratos AXIS Ultra DLD光谱仪进行X射线光电子能谱(XPS)。分析四种不同样品的测量光谱和原子:(a)PCB共聚物,(b)未涂覆的市售PVC管,(c)在干燥条件下储存1周的PCB涂覆的市售PVC管,和(d)在干燥条件下储存3周的PCB涂覆的市售PVC管。

[0386] 生物污染评估。使用Micro BCA蛋白质测定试剂盒评估100%人血清在PCB涂覆的市售PVC管上的人血液蛋白质吸附。正常人血清(100%,汇集的混合性别)按原样使用。简而言之,向PCB涂覆的和未涂覆的PVC管(10cm长)中填充100%人血清,并在37℃下孵育2小时。然后,用新鲜的PBS(1x,pH 7.4)冲洗管。在1.0wt%的正十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中使吸附的蛋白质脱离。将150μL液体上清液转移到96孔板中,并与另外150μL的二喹啉甲酸(BCA)试剂轻轻混合。在37℃下孵育2小时后,通常由两分子BCA与一个亚铜离子(Cu^{+1})螯合形成紫色反应产物,亚铜离子在碱性环境中被蛋白质从Cu^{+2}还原。最后,使用酶标仪测定562nm处的吸光度。562nm处的吸光度与吸附蛋白质的量的增加呈线性关系。

[0387] 实施例3

[0388] 代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和防止增塑剂从塑料表面浸出的用途

[0389] 在该实施例中,描述了本发明的代表性两性离子/光反应性共聚物的制备、表征和防止增塑剂从塑料表面浸出的用途。

[0390] 材料。如实施例2所述合成羧基甜菜碱丙烯酰胺、1-羧基-N,N-二甲基-N-(3'-丙烯酰胺丙基)乙铵内盐(CBAA)。以下材料和试剂获自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA),无需任何进一步纯化即可使用:2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)和1-癸硫醇、正十二烷基硫酸钠(SDS)、聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯(PEGMA)(平均Mn 360)。尼罗蓝(NB)丙烯酰胺购自Polysciences,Inc.(Warrington,PA,USA)。正常人血清(100%,汇集的混合性别)购自BioChemed Services(Winchester,VA,USA)。MicroBCA蛋白质检测试剂盒和RBS 35浓缩物购自Thermo Scientific(Waltham,MA,USA)。磷酸盐缓冲盐水(10x,溶液)获自Fisher Scientific Co.(FairLawn,NJ,USA)。正常人血清(汇集的混合性别)购自BioChemed Services(Winchester,VA,USA)。Micro BCA蛋白质测定试剂盒和RBS™35浓缩物购自Thermo Scientific(Waltham,MA,USA)。乙醇(200度)购自Decon Labs(King of Prussia,PA,USA)。水来自Millipore水净化系统,最小电阻率为18.0MΩcm。其他有机试剂和溶剂可作为超纯级试剂商购获得并按原样使用。

[0391] 聚合物合成和表征。通过丙烯酰氯与4-氨基二苯甲酮之间的反应合成光敏性单体N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA)。通过常规自由基聚合方法使用AIBN作为热引发剂合成两亲性PCB共聚物聚(CBAA-co-BPAA),并如实施例2中所述对其进行表征。

[0392] 表面改性。将从Streamline Airless System Set(Medisystems Corporation,MA,USA)获得的医用级PVC管切成15cm长。然后将PCB共聚物溶液(0.5wt%)填充到管中,随后将其密封并置于旋转器上达10分钟,以确保整个内表面与聚合物溶液接触。然后,去除聚合物溶液,并在室温下用干燥空气吹经涂覆的管。将外部UV光(312nm,600mJ/cm^2)施加到经涂覆的管上以稳定内表面上的聚合物。使用无菌PBS(1×,pH 7.4)洗去物理吸附的聚合物并预润湿表面,然后加入人血清用于后续测试。为了评估PCB聚合物对血小板质量的影响,根据上述方法涂覆由增塑PVC制成的市售血小板袋(Teruflex,150mL,Terumo Corporation,Tokyo,Japan)。溶液通过0.45μm过滤器过滤灭菌。为了评估涂层的稳定性,根据上述方法将用尼罗蓝(PCB-NB)标记的PCB聚合物涂覆在PVC管上。向管中填充灭菌的PBS(1x,pH 7.4)并在37℃下孵育所需的时间段。使用UV-Vis-NIR分光光度计和荧光分光光度计获得溶液的UV/vis吸收光谱(250-800nm)和荧光光谱(激发:590nm、200-900nm)。

[0393] SPR片依次用丙酮、DI水和乙醇超声清洗5分钟。随后,将它们使用UV/臭氧清洁器清洁30分钟,然后将它们浸入0.2mM 1-癸硫醇中24小时以形成疏水性自组装单层。将市售PVC管和PCB聚合物分别溶解在四氢呋喃(THF)和DI水中。用这两种溶液依次旋涂SPR片。将UV光(312nm,600mJ/cm^2)施加到经涂覆的片的表面。在干燥条件下用光谱椭偏仪(α-SE;J.A.Woolam Co.,Inc.,Tokyo,Japan)测量涂覆的聚合物层的厚度。

[0394] 表面表征。每个样品的表面润湿性通过测量水接触角来表征。将蒸馏水加入未涂覆的和PCB涂覆的PVC管中,然后通过摄影图像分析在10秒内观察水接触角。对于每个样品,进行五次测量。使用Kratos AXIS Ultra DLD光谱仪进行X射线光电子能谱(XPS)。分析四个样品的测量光谱和原子组成:(1)PCB共聚物,(2)未涂覆的市售PVC管,(3)在干燥条件下储

存1周的PCB涂覆的市售PVC管,和(4)在干燥条件下储存3周的PCB涂覆的市售PVC管。结合能(BE)使用285eV处的C1s峰作为参考进行校正。获得XPS测量光谱、C 1s、O 1s和N1s的高分辨率光谱以及原子组成用于表面分析。

[0395] 生物污染评估。分别使用Micro BCA蛋白质测定试剂盒和表面等离子体共振(SPR)在静态条件和动态条件下评估PCB涂覆的市售PVC管对100％人血清的人血液蛋白质吸附。简而言之,向PCB涂覆的和未涂覆的PVC管(10cm长)填充100％人血清,并在37℃下孵育2小时。然后,用新鲜的PBS(1x,pH 7.4)冲洗管。在1.0wt％的正十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中使吸附的蛋白质脱离。液体上清液与二喹啉甲酸(BCA)试剂轻轻混合。使用酶标仪(BioTek Instruments Inc.,Winooski,VT,USA)测定562nm处的吸光度。使用SPR计算动态条件下人血蛋白质的吸附,SPR配备了四个独立的流道、温度控制、强度稳定器和用于输送液体样品的蠕动泵,用于实时监测聚合物表面与蛋白质溶液之间的相互作用。经涂覆的SPR片在PBS(1x,pH 7.4)中预先润湿。通过随后在25℃下以四种不同的流速(10、40、100和200μL/min)依次流动以下溶液来监测PCB涂覆的SPR片表面上的蛋白质吸附行为:(a)PBS溶液(1×,pH 7.4),10分钟;(b)未稀释的正常人血清,10分钟;和(c)PBS溶液(1×,pH 7.4),10分钟。在流动不同溶液时收集750nm处的数据,并通过确定由表面上的蛋白质吸附引起的波长变化来定量评估污垢量。

[0396] 聚合物细胞毒性。PCB聚合物的细胞毒性根据ISO 10993-5指南进行检查。简而言之,将快速生长的细胞系NIH3T3小鼠胚胎成纤维细胞接种在12孔板中,以在24小时内产生次融汇培养物。作为洗脱样品,将涂覆和未涂覆的PVC管切成0.2g相同形状,放入含有细胞培养基的板的两个独立TCPS孔中,然后在37℃下孵育24小时。将在正常培养基中孵育的TCPS板的空白孔用作阴性对照,而将一小块乳胶(从移液管球切下并在70％乙醇中灭菌)用作阳性对照。将提取介质从材料样品转移到一个次融汇细胞孔中,用于每种测试材料的三份样品中的每一个。将培养物在37℃下再孵育48小时,并在24和48小时的时间点取出进行显微镜检查。观察细胞与阴性对照细胞相比是否有由正常形态的任何变化表明的可见毒性迹象。使用ISO 10993-5制定的指南对反应性等级从0到4进行评级。PCB聚合物以不同浓度(0.00125、0.0025、0.01和0.1mg/mL)溶解在细胞培养基中,并与NIH3T3细胞一起转移到TCPS孔中,在37℃下再培养48小时。执行上述相同的检查规程。此外,使用乳酸脱氢酶活性测定试剂盒(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA)测定与合成PCB聚合物的细胞毒性相对应的胞质酶乳酸脱氢酶(LDH)的释放。

[0397] 增塑剂浸出。向PCB涂覆的和未涂覆的PVC管(15cm长)填充PBS溶液(1×,pH 7.4)并在37℃下孵育24小时。在4、12和24小时的时间点取出管内的溶液。使用UV-Vis-NIR分光光度计获得UV/vis吸收光谱(200-800nm)。比较涂覆的和未涂覆的PVC管在275nm波长处的吸收值。

[0398] 血小板质量。使用由增塑的PVC制成的市售柔性血小板袋(Teruflex,150mL,Terumo Corporation,Tokyo,Japan)综合评估PCB聚合物对血小板质量的影响。使用类似于上述规程的简单浸涂方法,使市售血小板袋涂覆有PCB聚合物。分别将相同体积(30mL)的新鲜血小板溶液加入PCB涂覆的和未涂覆的市售袋中。所有实验均在台式机上进行,样品储存在培养箱中的定轨振荡器(15rpm)上(5％CO_2,25℃)。评估膜联蛋白V和p-选择蛋白的表达、血小板形态得分和血小板与冯维勒布兰德因子(VWF)的结合能力。

[0399] 补体活化。使用相应的人ELISA试剂盒(Quidel,SanDiego,USA)基于sC5b-9测量补体活化。向涂覆的PVC管(15cm长)填充未活化的人血清并用胶带密封,然后在37℃下轻微旋转孵育。在所需的孵育时间段(90分钟)后,取出孵育的血清并用供应商提供的样品缓冲液稀释,并施加到预先涂有针对sC5b-9的抗体的96孔板上。其他步骤严格按照供应商的规程执行。使用酶标仪(BioTek Instruments Inc.,Winooski,VT,USA)测量sC5b-9的浓度作为显色底物的吸收(450nm)。通过与PCB相同的聚合和纯化方法制备两亲性共聚物聚(PEGMA-co-BPAA)(PPB)。涂覆有PPB的市售PVC管用作阳性对照样品。

[0400] 统计分析。所有图表和条形图均表示为上述三或五次重复实验的平均值±标准偏差(SD)。进行Student's t-检验以确定观察到的差异是否具有统计意义。

[0401] 实施例4

[0402] 代表性两性离子/疏水性/光反应性共聚物的制备、表征和用途

[0403] 在该实施例中,描述了本发明的代表性两性离子/疏水性/光反应性共聚物的制备、表征和用途。

[0404] 聚合物合成和表征。合成光敏性单体N-(4-苯甲酰基苯基)丙烯酰胺(BPAA)作为共价结合基团。通过传统的自由基聚合方法使用AIBN作为引发剂合成两亲性PCB共聚物,聚(CBAA-co-BMA-co-BPAA)。简而言之,将所需量的CB单体和引发剂溶解在乙醇中。将溶液转移到Pyrex Vista玻璃管反应器中,并在室温下进一步用氮气吹扫30分钟。在氮气保护气氛下,在密封的玻璃管中进行聚合。聚合后,将反应溶液轻轻滴入乙醚/氯仿混合溶剂中以使共聚物沉淀。将共聚物过滤并在室温下真空干燥24小时后收集为白色粉末。通过DI水透析4天去除残留的水溶性单体。然后,将共聚物用液氮冷冻,并用冻干机(Labconco Co.,Ltd.,Kansas City,MO)在-80℃下处理48小时。使用^{1}H NMR(AV-500,Bruker,Germany)确认纯化共聚物的化学结构,聚合物在-20℃下冷冻保存。将UV光(312nm,600mJ/cm^{2})施加到聚合物上,并使用Varian Cary 5000UV-Vis-NIR分光光度计评估光敏度。

[0405] 表面改性。将市售血小板袋(Teruflex,150mL,Terumo Corporation,Tokyo,Japan)用10mL乙醇冲洗10秒,并在室温下用干燥空气吹扫。然后将20mL的PCB聚合物水溶液(0.5wt%,DI水)注入袋中,并将袋子放在血小板储存振荡器上10分钟,以确保整个内表面与聚合物溶液接触。随后,使用注射器移除聚合物溶液,并在室温下用干燥空气吹经涂覆的袋过夜。将UV光(312nm,600mJ/cm^{2})施加在经涂覆的袋的每一侧以稳定表面上的聚合物。使用灭菌的PBS(1×,pH 7.4)洗掉不稳定的聚合物并预润湿表面,然后加入人血小板溶液。溶液通过0.45μm过滤器过滤灭菌。使用类似的浸涂方法涂覆市售血小板袋的小块(1cm×1cm)。SPR片使用电子束蒸发器由涂覆有第一钛膜层(约2nm)和第二金层(约48nm)的BK7载玻片制成。用丙酮、DI水和乙醇将该片在每种溶剂中超声清洗片5分钟。随后,将它们用UV/臭氧清洁器处理30分钟,然后将它们浸入0.2mM 1-癸硫醇中24小时以形成疏水性自组装单层。将市售血小板袋切割并以0.5wt%溶解到THF溶液中。该片依次用市售血小板袋/THF溶液和PCB共聚物/DI水溶液旋涂。将UV光(312nm,600mJ/cm^{2})施加到经涂覆的片的表面。在干燥条件下用光谱椭偏仪(α-SE;J.A.Woolam Co.,Inc.,Tokyo,Japan)测量涂覆的聚合物层的厚度。

[0406] 表面表征。每个样品的表面润湿性通过用静态接触角测角仪测量水和空气的接触角来表征。将蒸馏水滴沉积在基材表面上,通过摄影图像分析在10秒内测量水接触角。为了

测量空气接触角,在测量前将所有样品浸入蒸馏水中达1.0小时。将样品固定在定制支架上,然后浸入玻璃容器中的蒸馏水中。通过U形针在与测量表面接触的每个样品下方引入气泡。对于每个样品,测量五个不同的点。使用Kratos AXIS Ultra DLD光谱仪对五种不同样品进行XPS分析:(1)PCB共聚物,(2)市售血小板袋,(3)用乙醇冲洗的市售血小板袋,(4)PCB涂覆的市售血小板袋,和(5)浸泡在缓冲液中的PCB涂覆的市售血小板袋。记录XPS测量光谱、C 1s、O 1s和N1s的高分辨率光谱以及原子组成用于表面分析。使用便携式氧气计测试经涂覆的袋的O_2渗透性。

[0407] 人血液蛋白质吸附。使用Micro BCA蛋白质测定试剂盒和表面等离子体共振(SPR)分别在静态条件和动态条件下评估PCB涂覆的市售血小板袋对100%人血清的人血液蛋白质吸附。正常人血清(100%,汇集的混合性别)按原样使用。简而言之,将市售血小板袋的PCB涂覆小块(1cm×1cm)与血清在37℃下孵育2小时,然后用新鲜的PBS(1×,pH 7.4)冲洗。在1.0ml的1.0wt%正十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中使吸附的蛋白质脱离。将150μL液体上清液转移到96孔板中,并与另外150μL的二喹啉甲酸(BCA)试剂轻轻混合。在37℃下孵育2小时后,通常由两分子BCA与一个亚铜离子(Cu^{+1})螯合形成紫色反应产物,亚铜离子在碱性环境中被蛋白质从Cu^{+2}还原。最后,使用酶标仪测定562nm处的吸光度。562nm处的吸光度与吸附蛋白质的量的增加呈线性关系。使用SPR记录动态条件下人血液蛋白质的吸附,该SPR配备有四个单独的流道、温度控制、强度稳定器和用于输送液体样品的蠕动泵,用于实时监测聚合物表面与蛋白质之间的相互作用。经涂覆的SPR片在PBS(1x,pH 7.4)中预先润湿。测量前用PBS(1x)、H_2O、HCl(0.1N)和PBS(1x,pH 7.4)溶液充分冲洗液体流经的地方。通过随后在25℃下流动以下溶液来监测PCB涂覆的SPR片表面上的蛋白质吸附行为:(a)PBS溶液(1×,pH 7.4),10分钟,40μL/分钟;(b)未稀释的正常人血清,10分钟,40μL/分钟;和(c)PBS溶液(1×,pH 7.4),10分钟,40μL/分钟。随着不同溶液的流动,记录750nm处的波长。通过测量蛋白质吸附前后750nm处波长的变化来量化污垢量。

[0408] 细胞粘附。将从美国模式培养物保藏所(ATCC,Rockville,MD,USA)获得的NIH3T3小鼠胚胎成纤维细胞在37℃下于含有5.0%CO_2的湿润气氛中接种在聚苯乙烯组织培养皿(Φ=10cm,5.0×10^4个细胞/ml)中的补充有10%FBS的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中。使用0.25%胰蛋白酶/EDTA传代次融汇细胞培养物。将灭菌的CB聚合物溶液(0.5wt%,乙醇)滴在组织培养板的表面上并在细胞培养罩中蒸发。然后,经涂覆的表面在UV照射(312nm,600mJ/cm^2)下稳定并用PBS(1x,pH 7.4)冲洗。在37℃下,在含有5.0%CO_2的湿润气氛中,将NIH3T3细胞以5.0×10^4个细胞/mL的浓度接种在补充有10%FBS的DMEM中。培养3天后,更换培养基并使用Nikon Eclipse TE2000-U显微镜(Nikon Instruments,Melville,NY)观察部分涂覆的表面上的细胞的形态。

[0409] 人血小板粘附。在捐赠当天从Bloodworks Northwest(Seattle,WA)接收新鲜的人血小板。将500μL富含血小板的血浆(PRP)接种在24孔板中的样品的顶部,并在37℃下孵育45分钟。然后,将样品用无菌生理盐水(NS)冲洗并使用2.5%戊二醛溶液在25℃下固定4小时。之后,再次用无菌生理盐水(NS)冲洗样品并在25℃下干燥。使用Nikon Eclipse TE2000-U显微镜和扫描电子显微镜(SEM;NE-3200M;SEC;Korea)观察样品表面。

[0410] 细菌粘附试验。将表皮葡萄球菌的革兰氏阳性菌株和铜绿假单胞菌的革兰氏阴性菌株分别在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中于37℃下以200rpm振荡生长12小时。将悬浮培养物

稀释,然后在TSB中另外生长2小时以达到指数生长期。当第二次悬浮培养物在600nm处达到1.0的光密度时,将细菌以8000rpm离心并重新悬浮在无菌PBS(1×,pH 7.4)中至浓度为约1×10^8CFU/mL。然后将指数生长的细菌置于24孔板中的样品上,并在37℃下培养24小时。然后,用无菌PBS轻轻洗涤样品以去除非粘附细菌,然后用50nM SYTO9(绿色荧光核酸染色剂)染色。使用Nikon Eclipse TE2000-U显微镜直接观察结果。

[0411] 血小板性质评估。在捐赠当天从Bloodworks Northwest(Seattle,WA)接收新鲜的人血小板。将定制的ficoll程序用于稀释白细胞分离产品并将血小板以(2.0-4.3)×10^8个细胞/mL的浓度移至指定的袋子(Teruflex,Terumo Corporation,Tokyo,Japan)。正如Bloodworks NW报告的那样,所有储存的血小板集合物都符合制造商关于血小板浓度、总血小板计数和储存体积的指南。使用血液分析仪(ABX Diagnostics,Irvine,CA)进行血小板计数。所有实验均在台式机上进行,样品储存在培养箱中的定轨振荡器(15rpm)上(5%CO_2,25℃)。在室温下搅拌下将相同体积(30mL)的新鲜血小板溶液加入PCB涂覆的和未涂覆的市售袋(Teruflex,150mL,Terumo Corporation,Tokyo,Japan)中。这里,分别评估膜联蛋白V和p-选择蛋白的表达;血小板溶液的pH、葡萄糖和乳酸水平;血小板形态得分和血小板与冯维勒布兰德因子(VWF)的结合能力。

[0412] 膜联蛋白V。在不同的孵育期(1、6、24、48、120、144、168、192和216小时)后收获血小板,并在PBS(1×,pH 7.4)溶液中以5.0×10^6个细胞/mL的浓度、300g洗涤8分钟。弃去上清液后,用2.0mL结合缓冲液(膜联蛋白V结合缓冲液,10x浓缩物,BD PharmingenTM Becton,Dickinson and Company,NJ)重构血小板并轻轻混合。然后,将100μL转移到5.0mL培养液聚苯乙烯流式细胞术管(FalconTM,Thermo Fischer Scientific)中,用1.0μL FITC膜联蛋白V细胞凋亡检测试剂盒I(BD Biosciences,激发/发射:496/578nm)染色。细胞在室温下避光孵育20分钟。在FACScan流式细胞仪(Becton-Dickinson,San Jose,CA)中孵育后分析样品以检测膜联蛋白V结合水平。将保存在未涂覆的袋中的血小板用作对照样品。

[0413] p-选择蛋白(CD62)。在如上所示的相同孵育时间段后收获血小板,并将它们以5.0×10^6个细胞/mL重新悬浮在含有PBS(1×,pH 7.2)、0.2%胎牛血清和0.09%叠氮化钠的水性缓冲溶液中。然后以300g离心8分钟。弃去上清液后,以1:100的终浓度用1.0μL单克隆小鼠抗人抗体使血小板染色(FITC小鼠抗人CD62P,激发/发射:494/520m),用涡旋混合器轻轻均质化。然后将细胞在室温下避光孵育30分钟。孵育后,在FACSCAN中分析样品。将保存在未涂覆的袋中的血小板用作对照样品。

[0414] 形态得分。最健康的血小板呈盘状,最高分可为400(意味着100%的盘状形态),但新鲜供体血小板的得分通常为380左右。形态得分通常用于预测根据形状定义的血小板健康状况,其定义为:

[0415] M=4×(盘%)+2×(球%)+1×(枝%)

[0416] 用于VWF结合亲和力的MFI。使用糖蛋白Ib-α(BPIb-α)(抗CD42b荧光素;Life Technologies,Carlsbad,CA)的表达。使用Alexa Fluor 488标记的多克隆抗VWF抗体测定VWF与血小板的结合。血小板在室温下在pH 7.4、含有0.9%NaCl、补充有1.0mM $MgSO_4$的10mM HEPES缓冲液中孵育15分钟。收集抗VWF信号的中荧光强度(MFI),其中新鲜血小板的条件设置为100%。

[0417] 葡萄糖和乳酸水平。使用血-气分析仪(ABL800,Radiometer,Copenhagen,

Denmark),在第1、3、5和7天经由电化学信号测量葡萄糖(mmol/L)和乳酸(mmol/L)。葡萄糖测量测定血浆溶液中葡萄糖的浓度;这用作能源供应的标志物。乳酸测量测定血浆溶液中乳酸的浓度;这用作组织氧气需求和供应之间不平衡的标志物。在这里,使用电压表记录电极链的电位,并使用Nernst方程将其与样品浓度相关联。在测量和校准期间,电极信号以0.982秒的间隔记录。使用利用对不同物质(葡萄糖或乳酸盐)具有选择性的膜的安培计方法。

[0418] 尽管已经说明和描述了说明性实施方案,但是应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在其中进行各种改变。

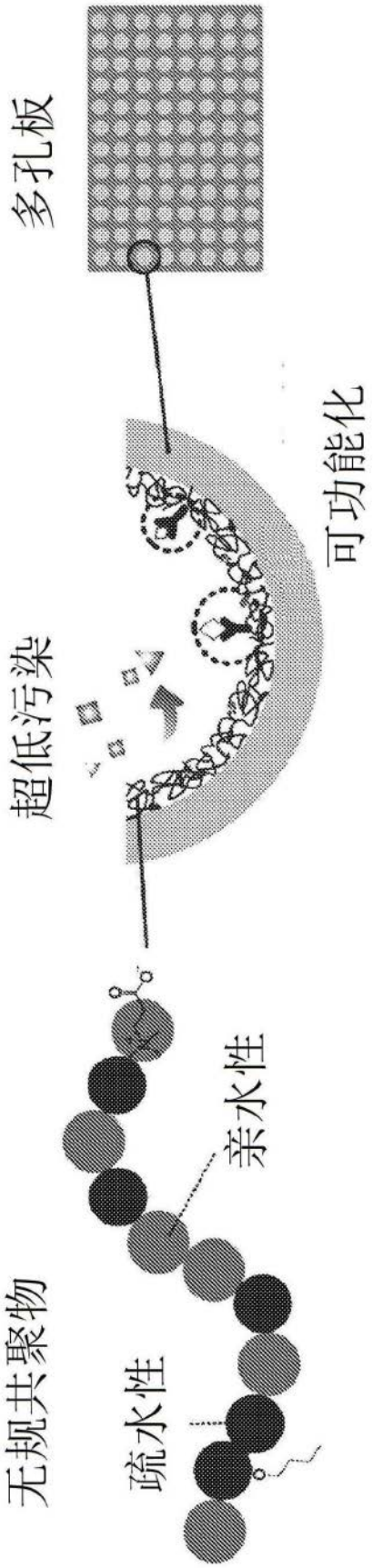


图1

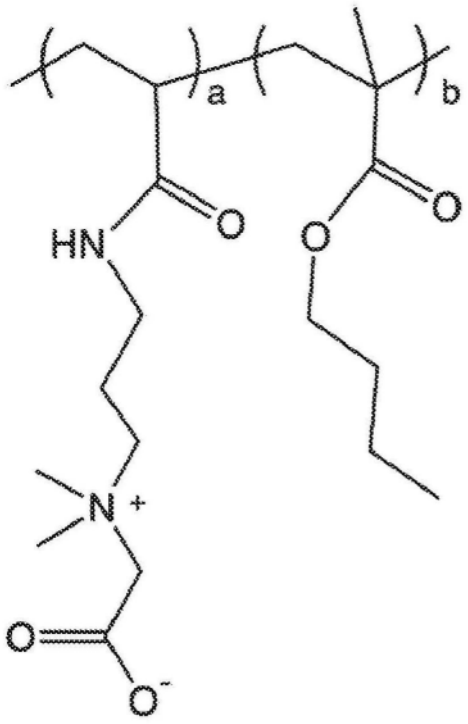


图2A

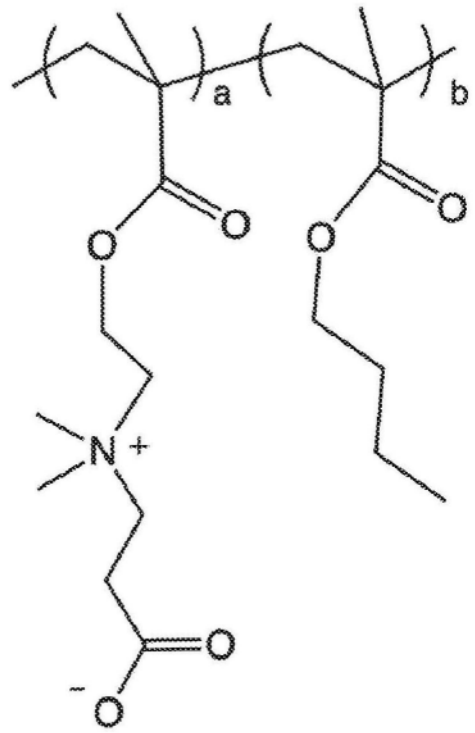


图2B

	单体单元组成 (mol %)		引发剂 (mmol/L)	聚合时间 (h)	产率 (%)	分子量 [c]		溶解度 [d]	
	进料中 CB / BMA	共聚物中 [b] CB / BMA				$M_w \times 10^4$	M_w/M_n	乙醇	水
PCB1-28	20 / 80	17 / 83	5	16	80	7.4	2.6	+ +	- -
PCB1-37	30 / 70	31 / 69	5	16	87	8.3	2.4	+ +	- -
PCB1-46	40 / 60	38 / 62	5	16	88	6.7	2.8	+ +	+ +
PCB1-55	50 / 50	50 / 50	5	16	78	7.1	2.3	+ +	+ +
PCB1-64	60 / 40	57 / 43	5	16	80	7.5	2.7	+ +	+ +
PCB1-82	80 / 20	82 / 18	5	16	85	6.9	2.5	+ +	+ +
PCB2-37	30 / 70	27 / 73	5	16	86	7.9	2.8	+ +	- -

图3.

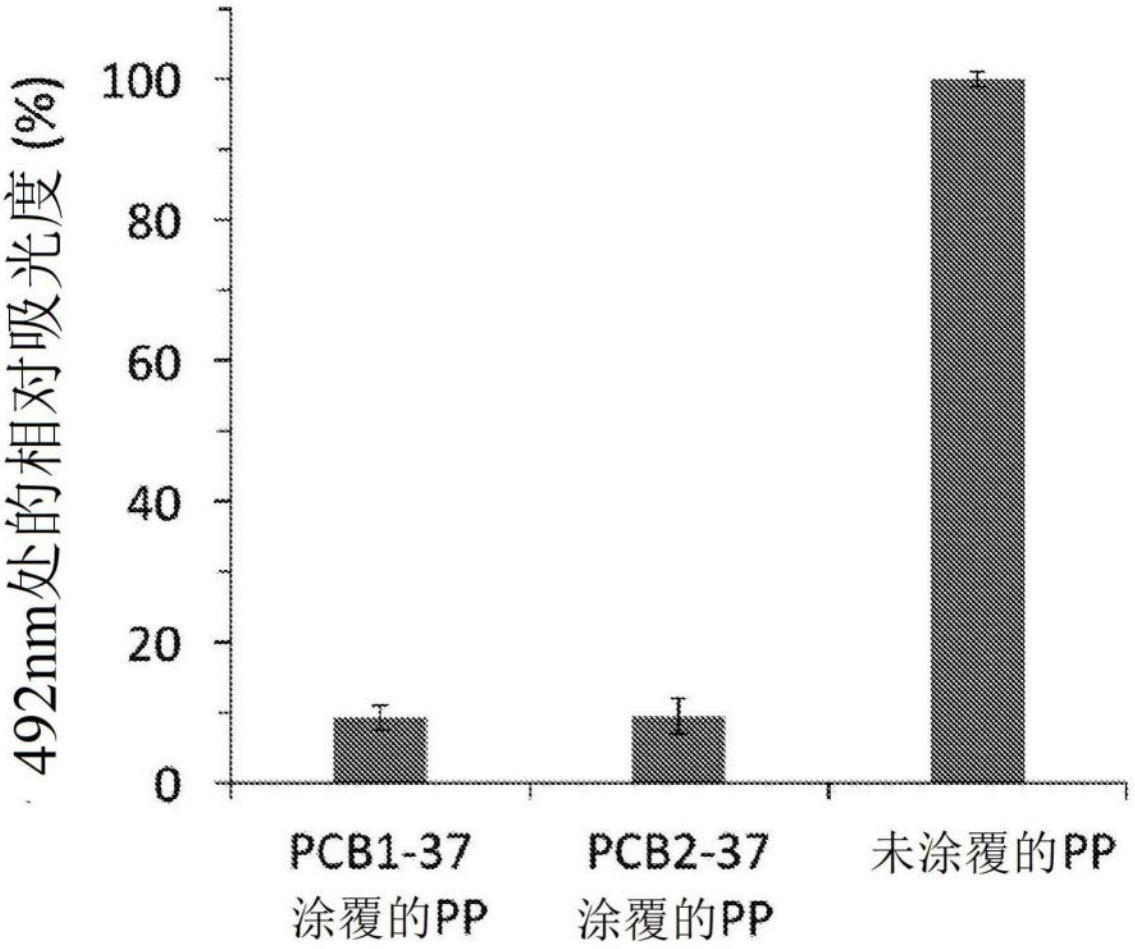

492nm处的相对吸光度 (%)
100
80
60
40
20
0
PCB1-37
涂覆的PP
PCB2-37
涂覆的PP
未涂覆的PP

图4.

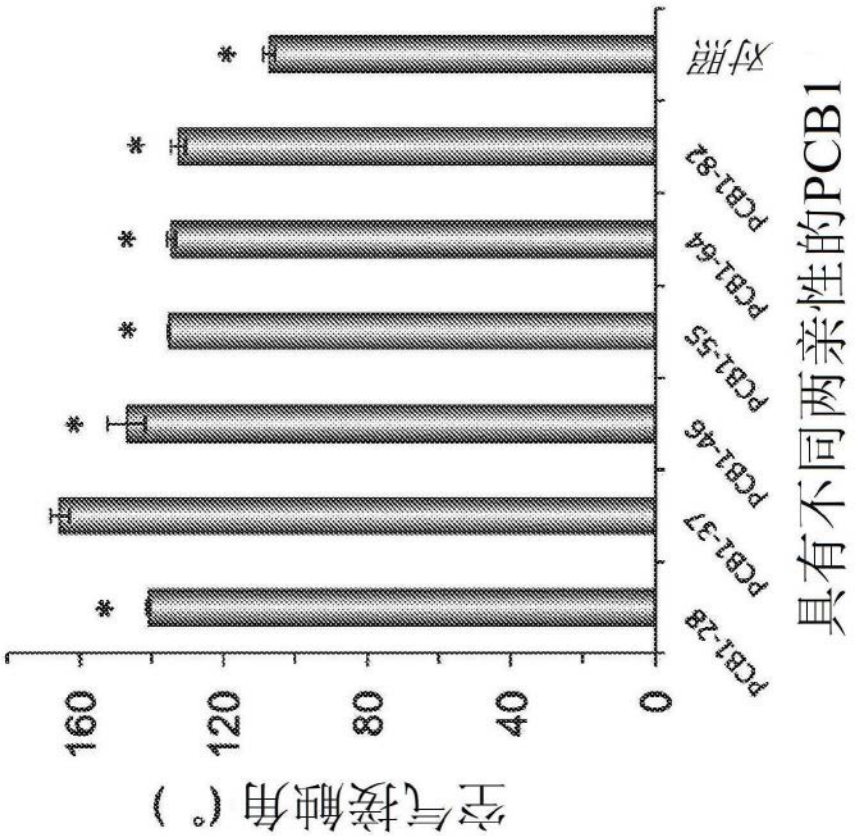

空气接触角(°)
160
120
80
40
0
具有不同两亲性的PCB1
PCB1-28
PCB1-37
PCB1-46
PCB1-55
PCB1-64
PCB1-82
对照

图5A

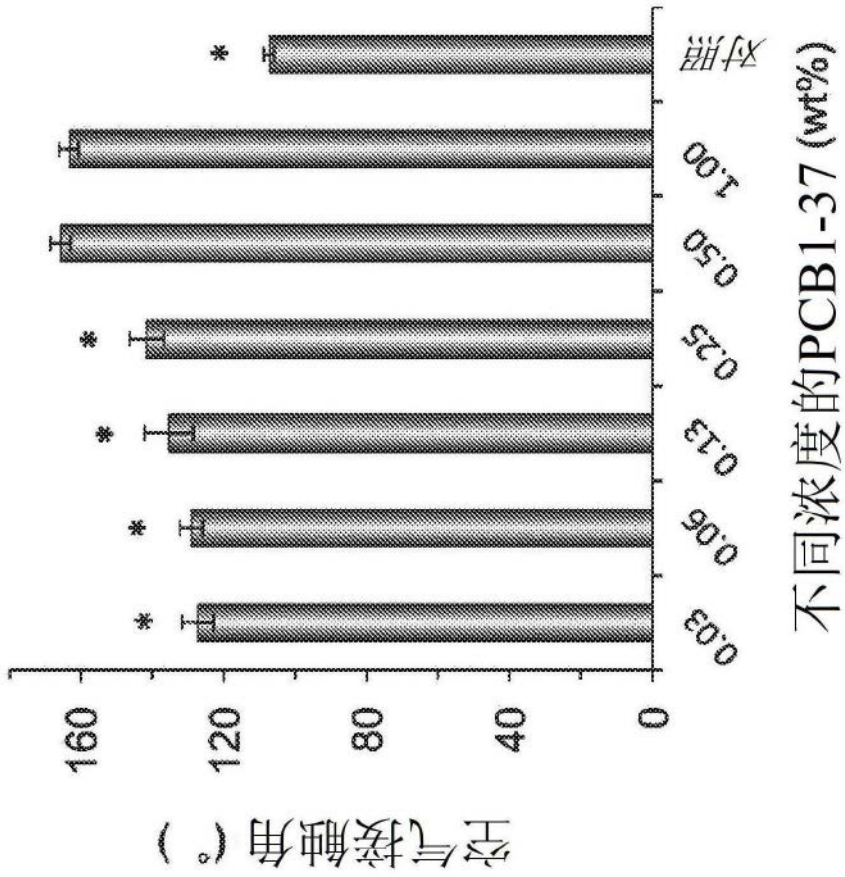


图5B

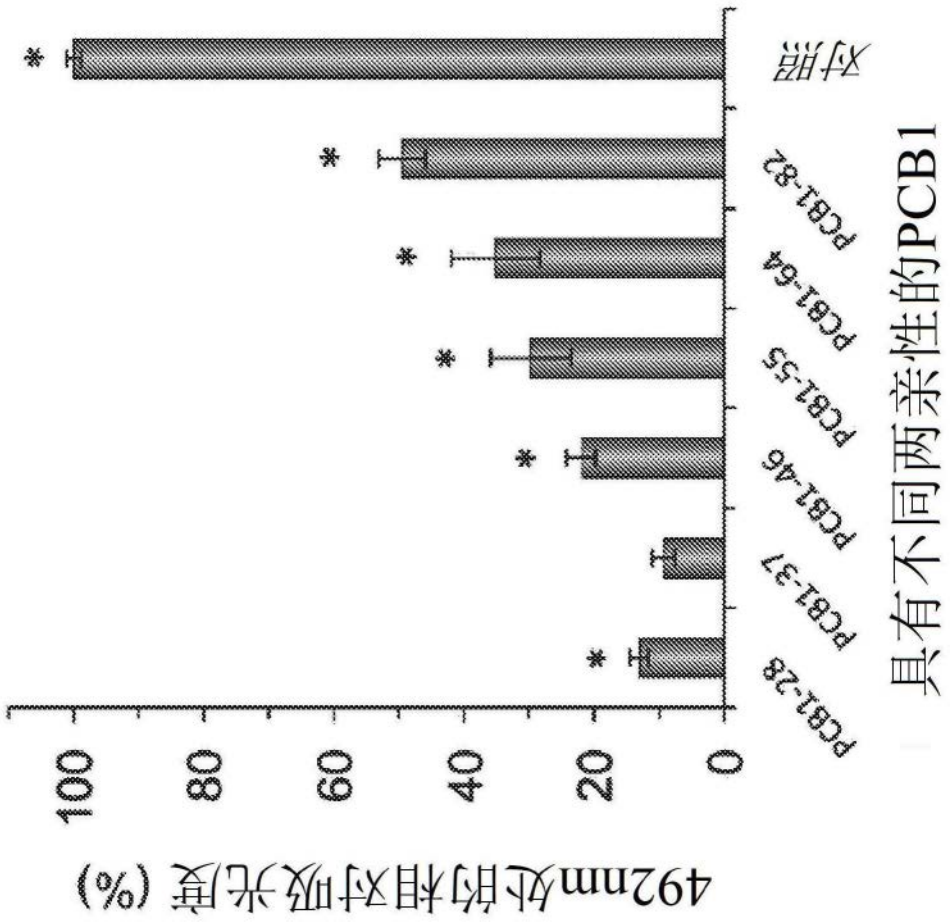

492nm处的相对吸光度 (%)
100
80
60
40
20
0
PCB1-28
PCB1-37
PCB1-46
PCB1-55
PCB1-64
PCB1-82
对照
具有不同两亲性的PCB1

图6A

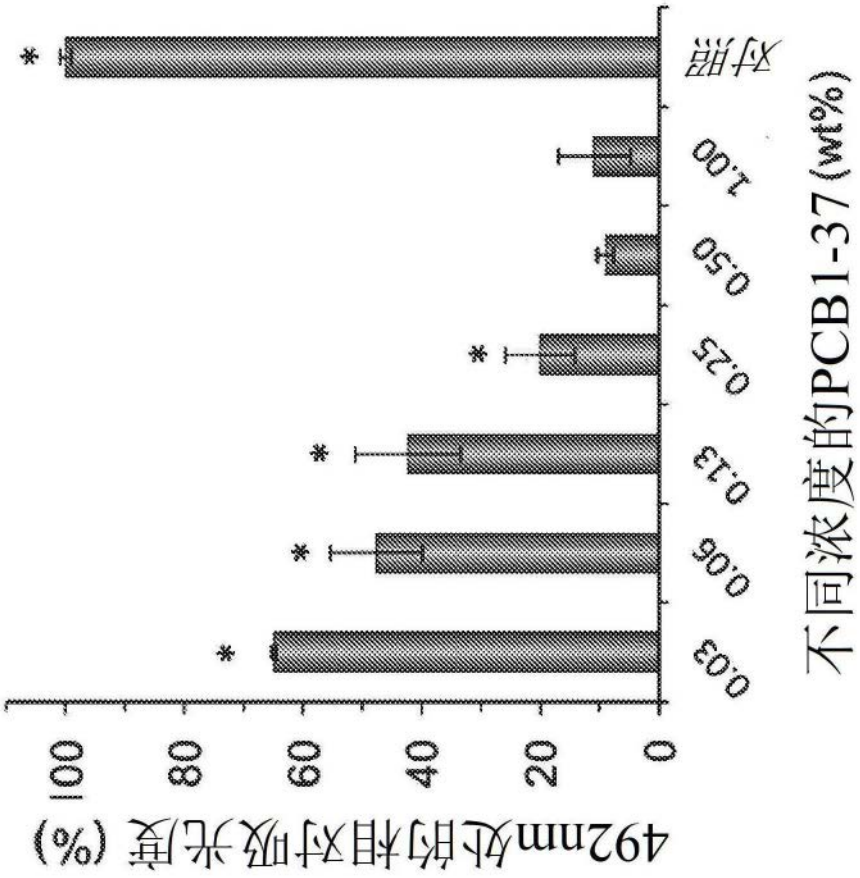

492nm处的相对吸光度 (%)
100
80
60
40
20
0
0.03
0.06
0.13
0.25
0.50
1.00
对照
不同浓度的PCB1-37 (wt%)

图6B

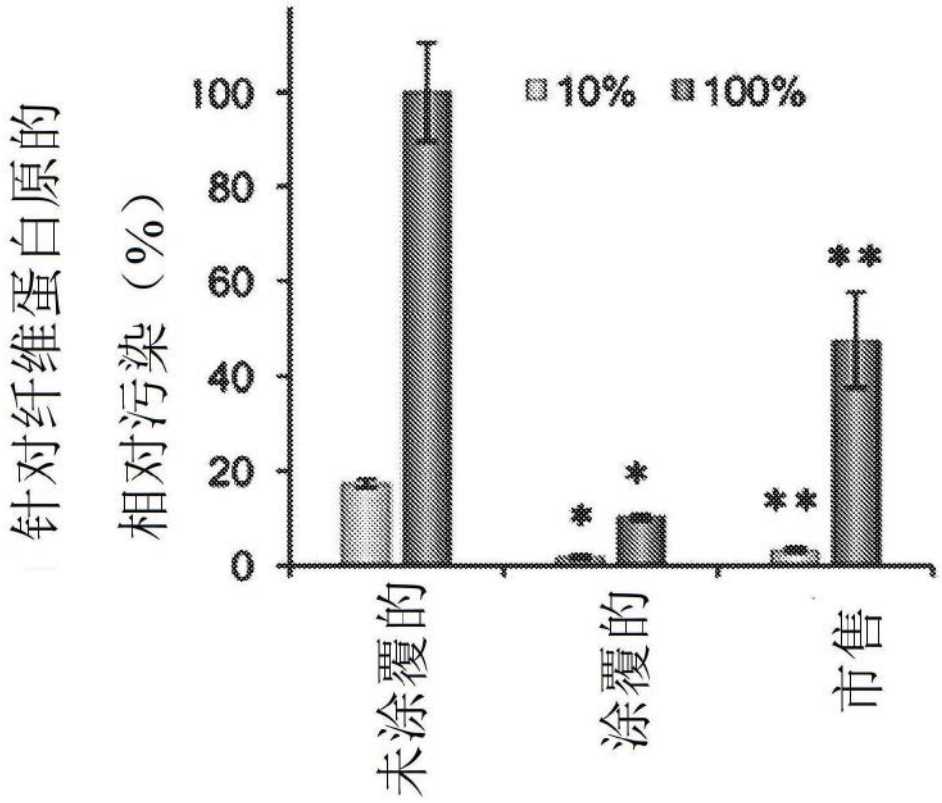


图7A

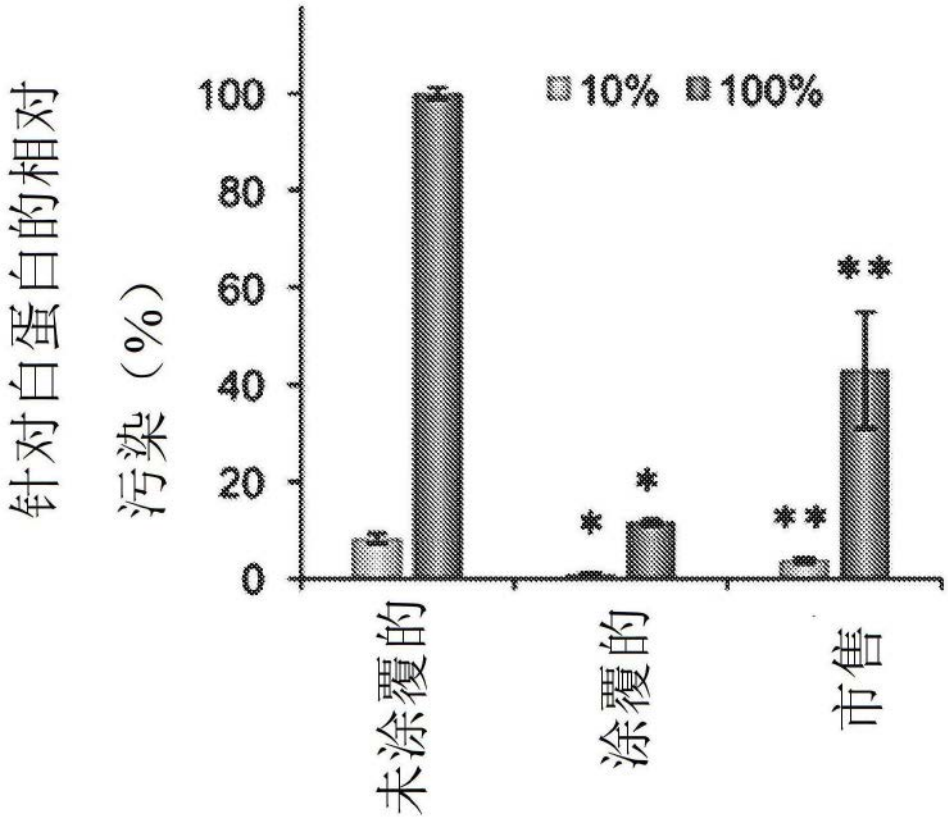


图7B

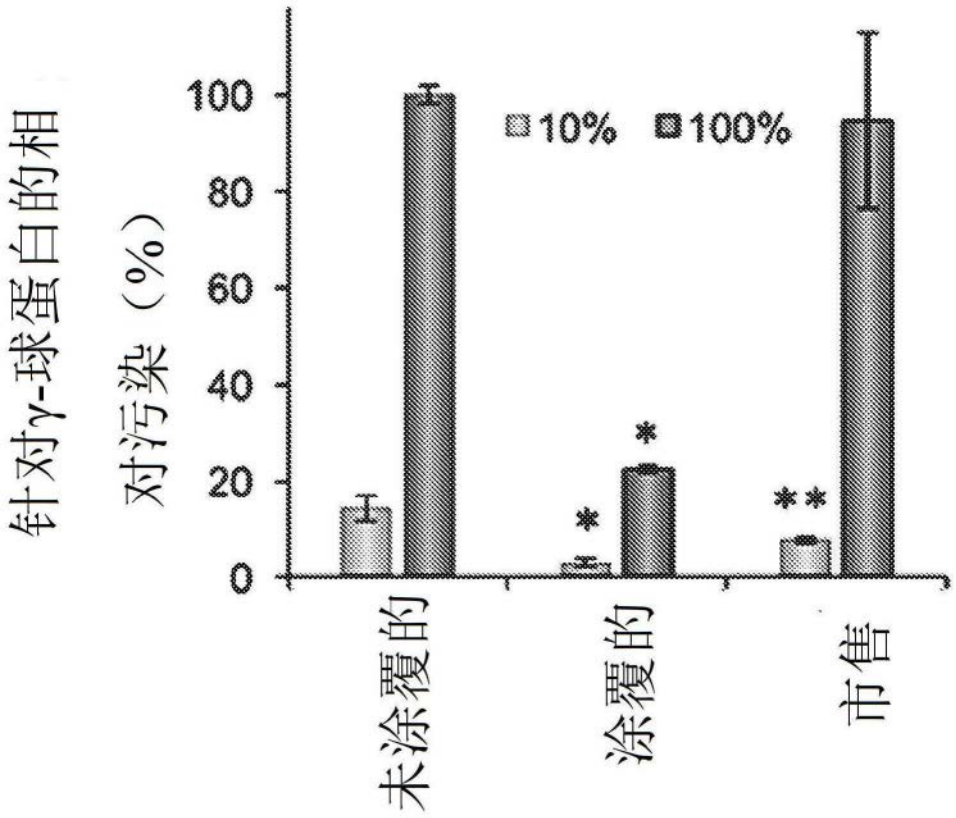


图7C

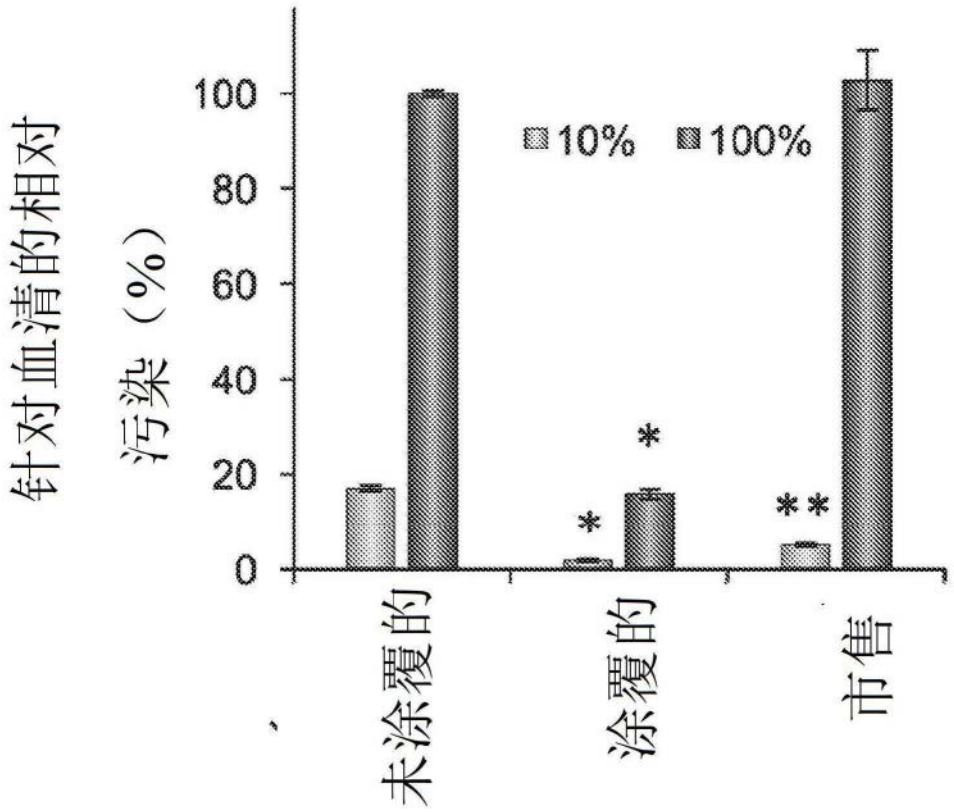


图7D

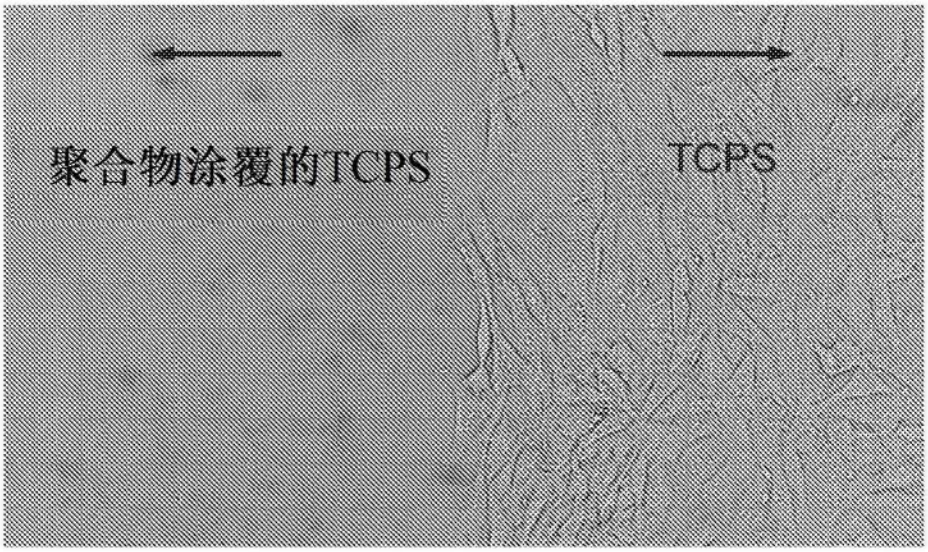


图8

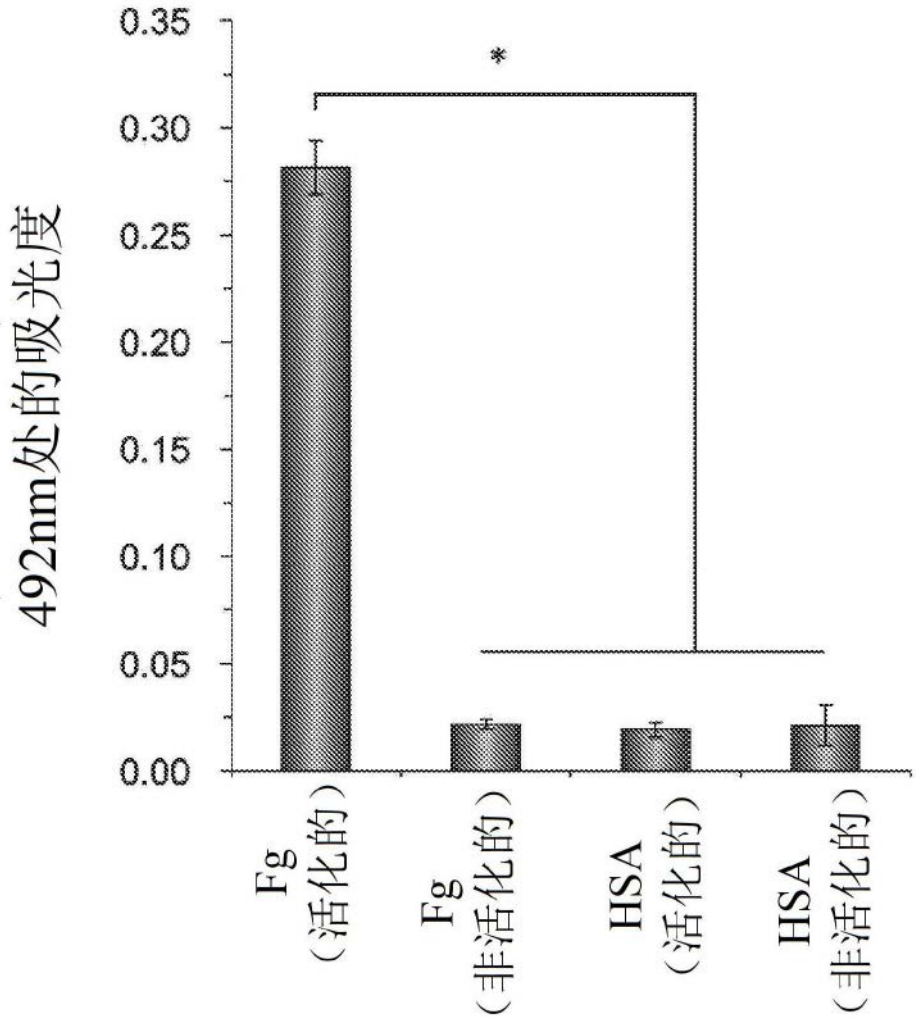

492nm处的吸光度
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
Fg（活化的）
Fg（非活化的）
HSA（活化的）
HSA（非活化的）

图9

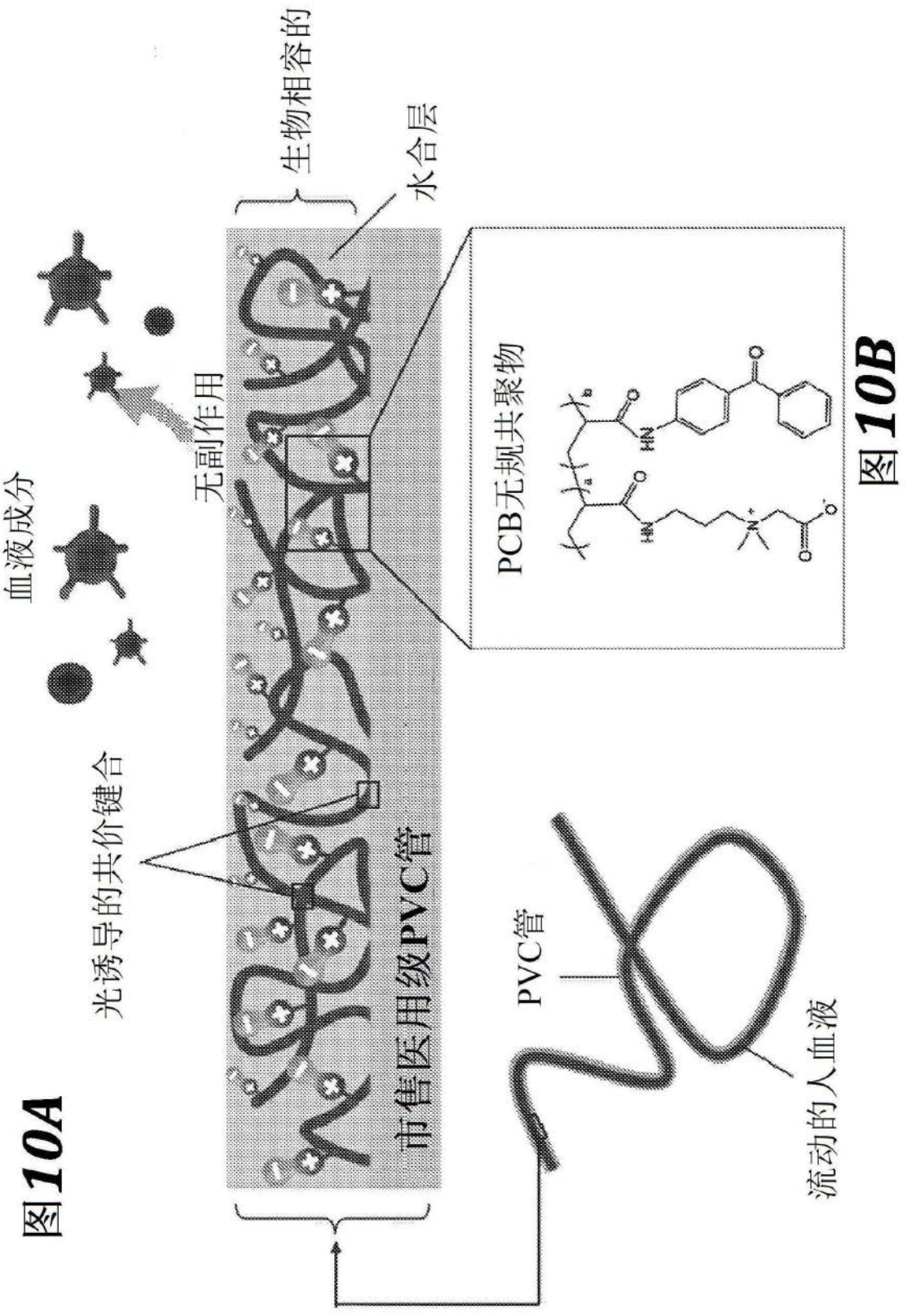

血液成分
光诱导的共价键合
无副作用
生物相容的
水合层
市售医用级PVC管
PCB无规共聚物
PVC管
流动的人血液

图10A 图10B

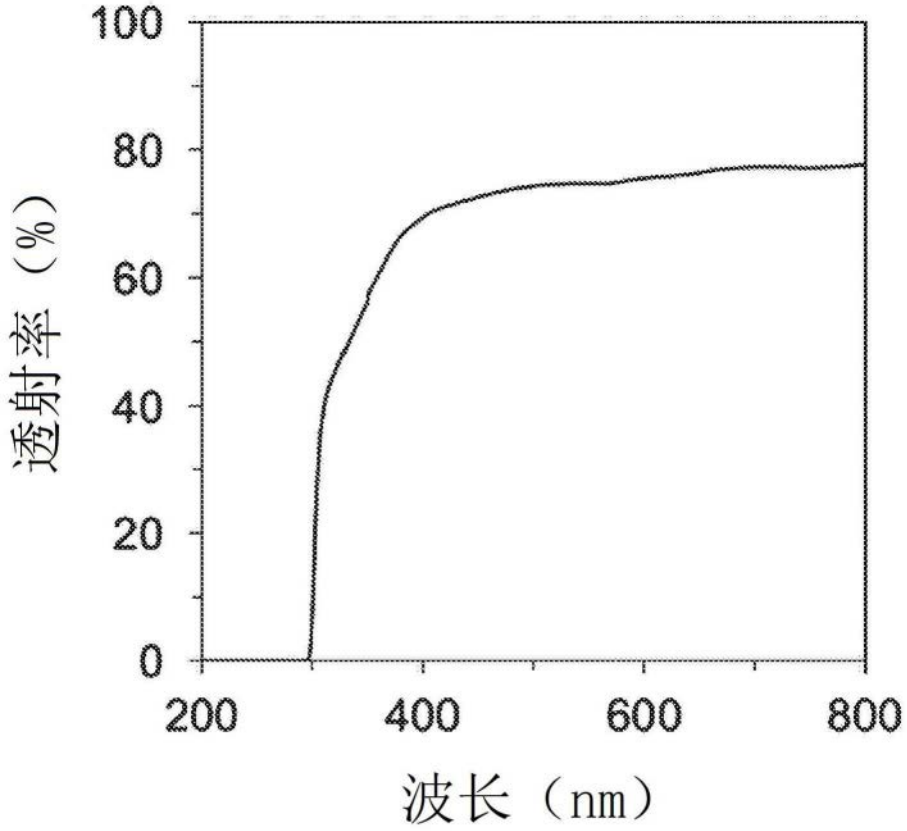

100
80
60
40
20
0
透射率（%）
200
400
600
800
波长（nm）

图11A

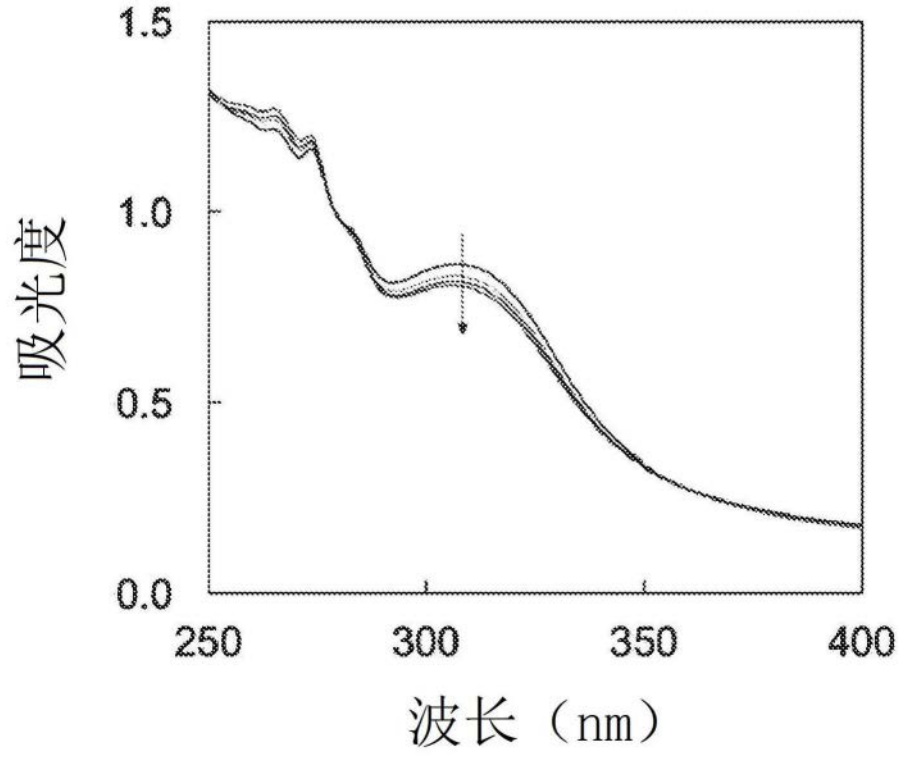

1.5
1.0
0.5
0.0
吸光度
250
300
350
400
波长（nm）

图11B

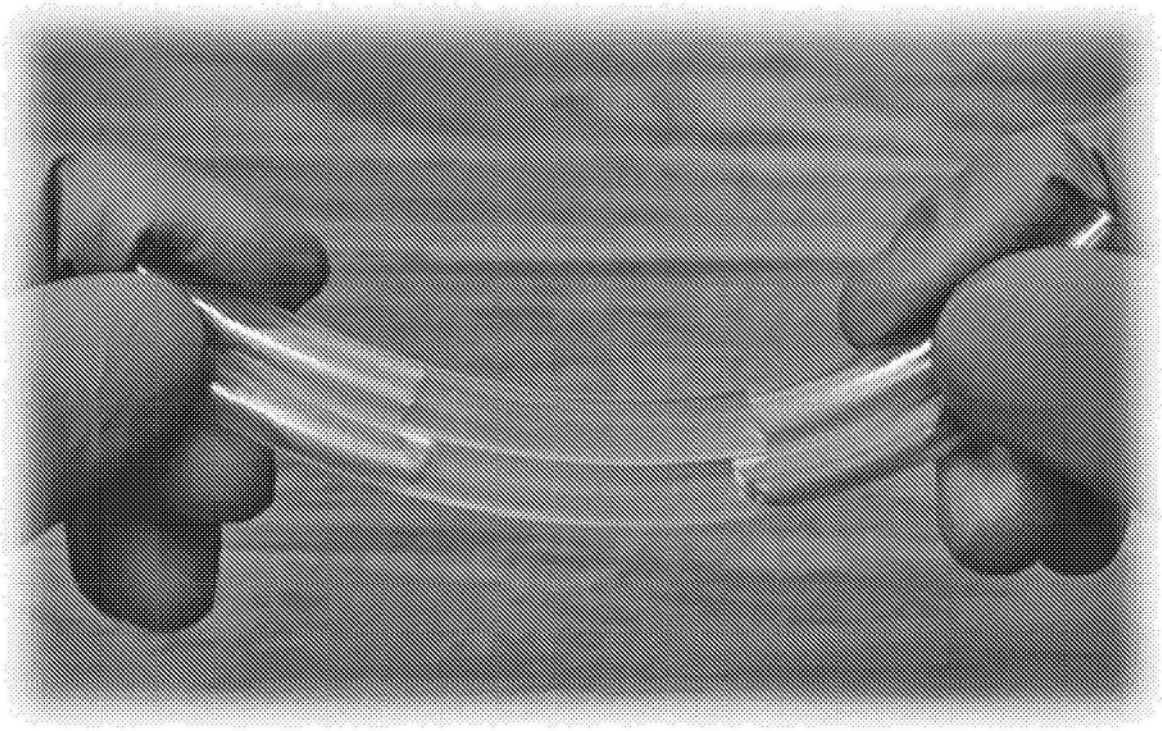


图12A

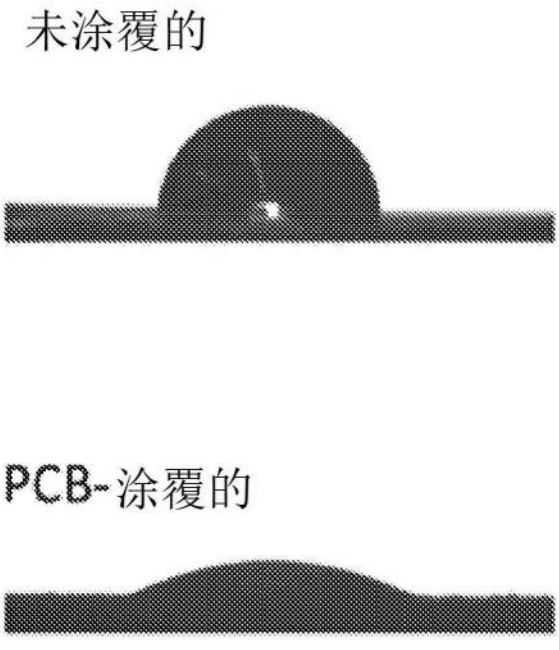


图12B

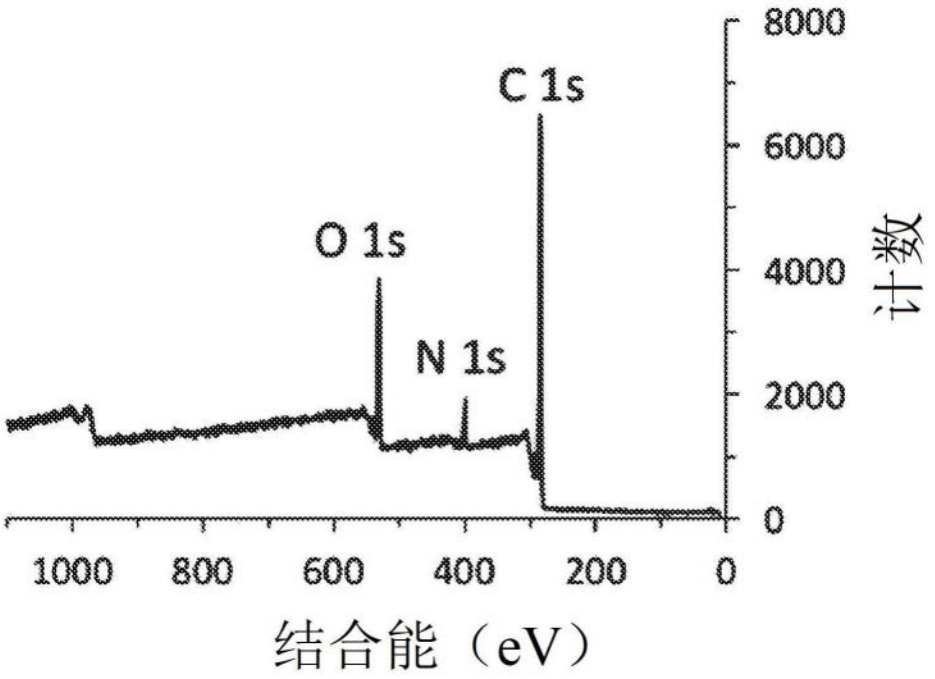

C 1s
O 1s
N 1s
8000
6000
4000
2000
0
计数
1000
800
600
400
200
0
结合能（eV）

图13A

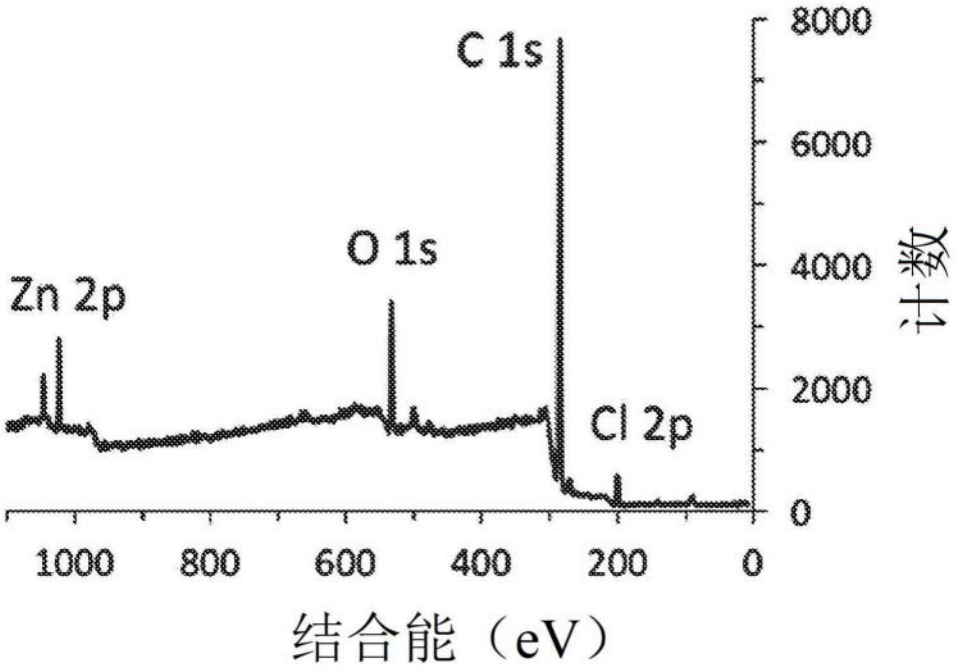

C 1s
O 1s
Zn 2p
Cl 2p
8000
6000
4000
2000
0
计数
1000
800
600
400
200
0
结合能（eV）

图13B

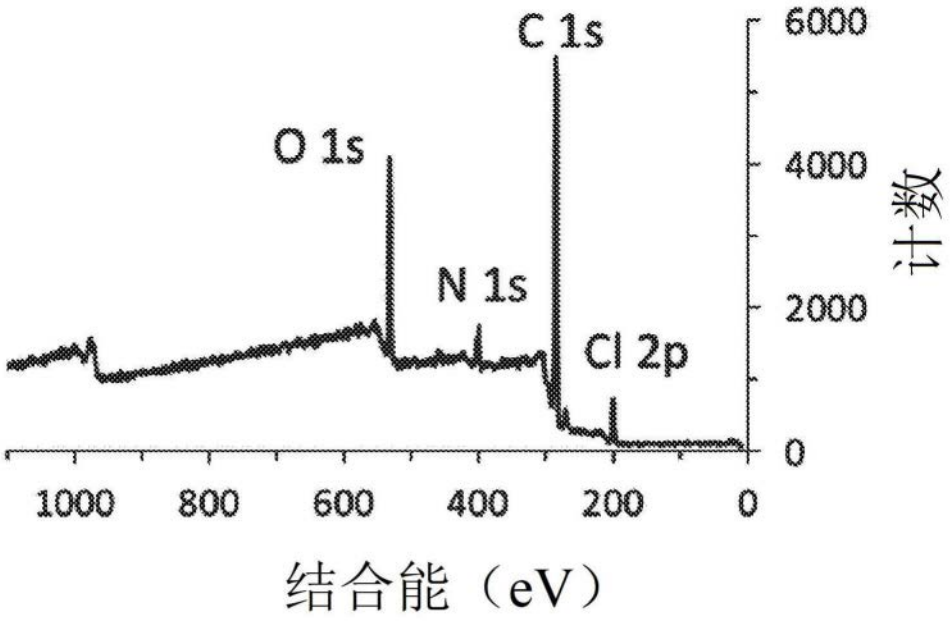

C 1s
O 1s
N 1s
Cl 2p
6000
4000
2000
0
计数
1000
800
600
400
200
0
结合能（eV）

FIG.13C

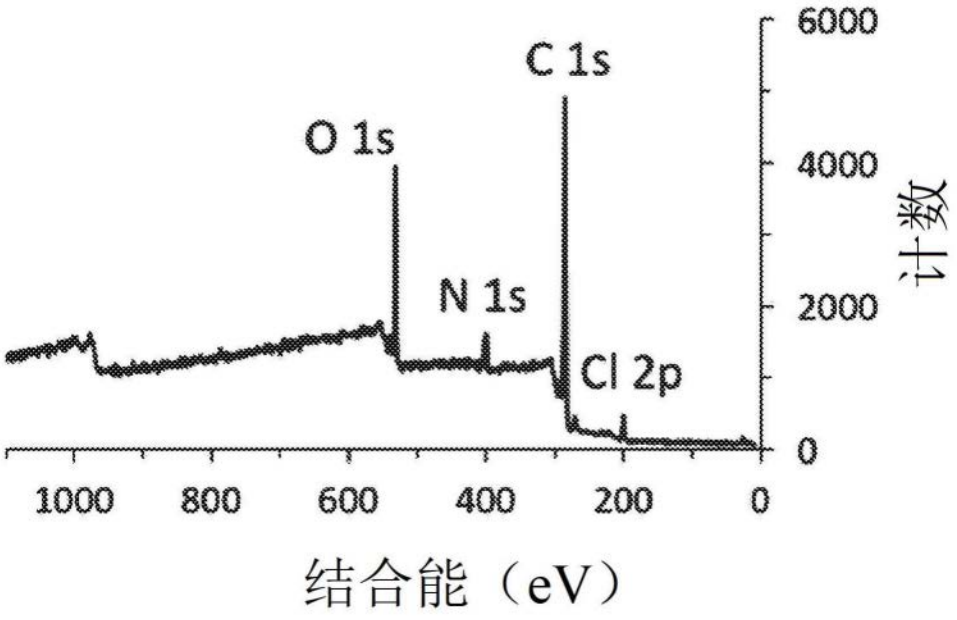

C 1s
O 1s
N 1s
Cl 2p
6000
4000
2000
0
计数
1000
800
600
400
200
0
结合能（eV）

图13D

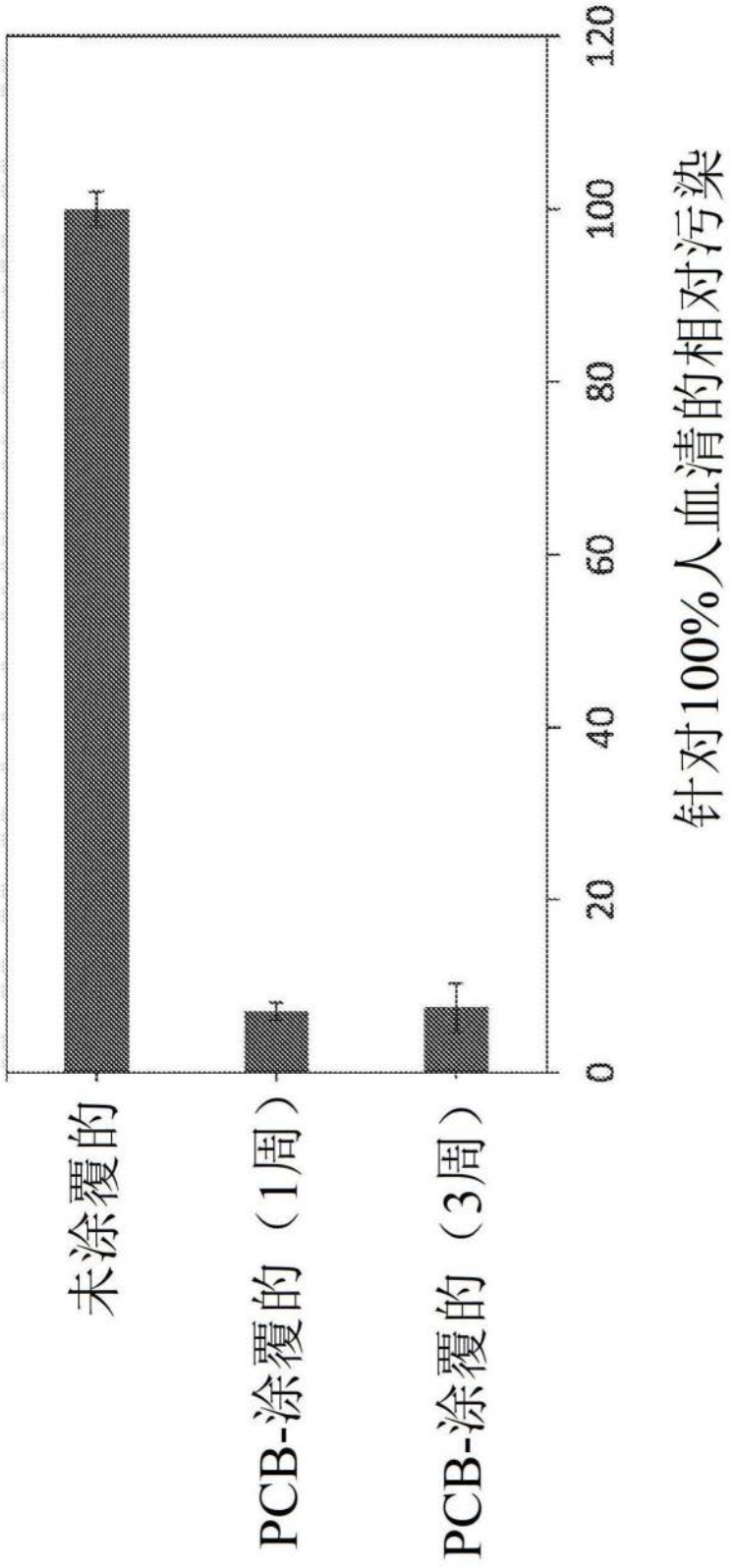


图14

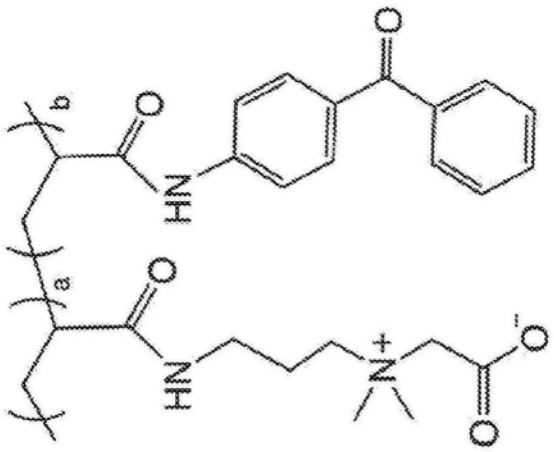


图15A

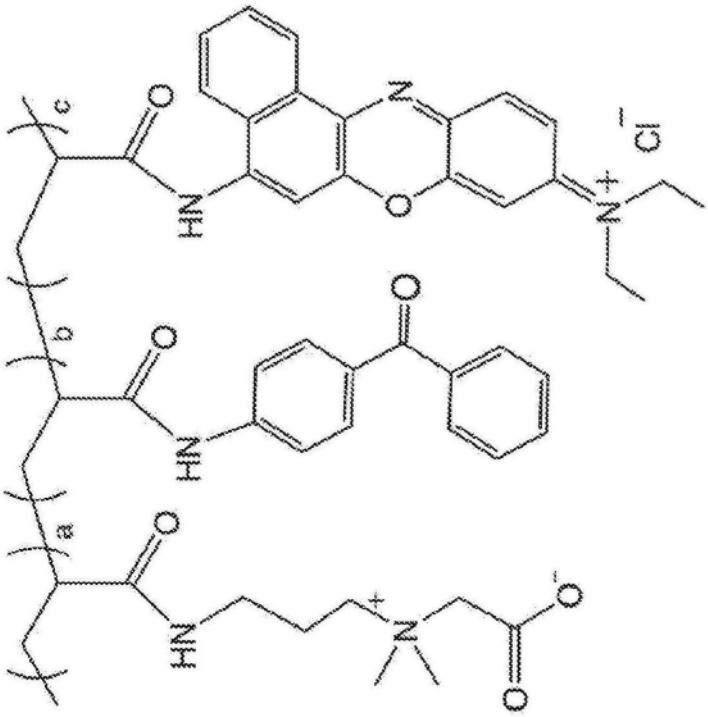


图15B

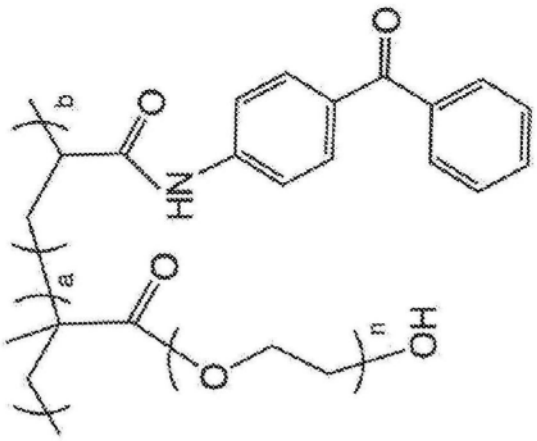


图15C

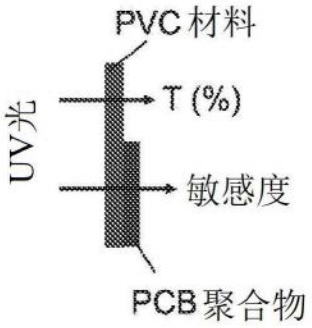


图16A

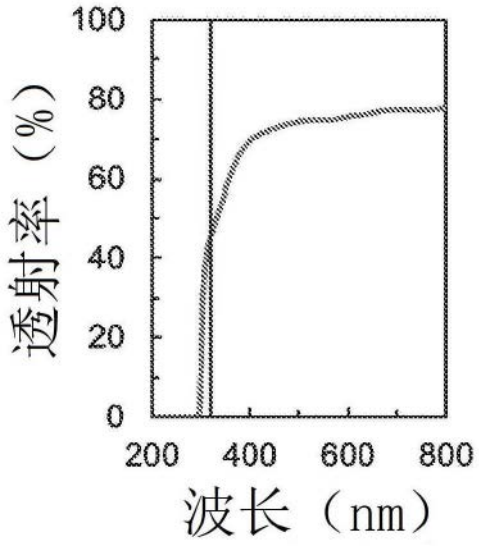


图16B

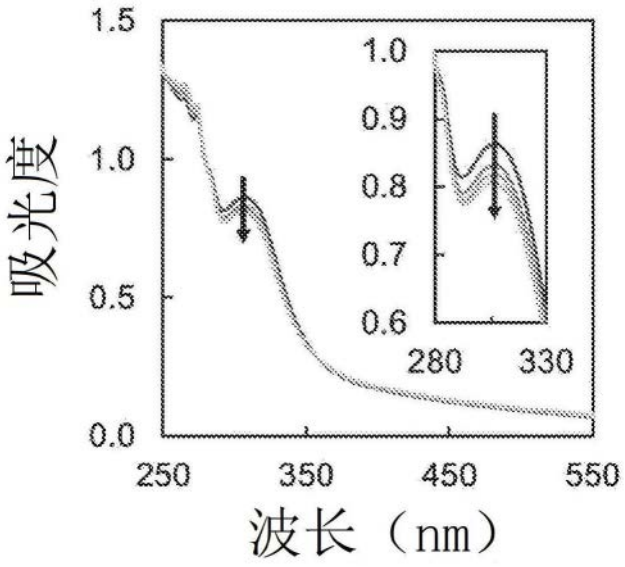

1.5
1.0
0.5
0.0
吸光度
250
350
450
550
波长（nm）
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
280
330

图16C

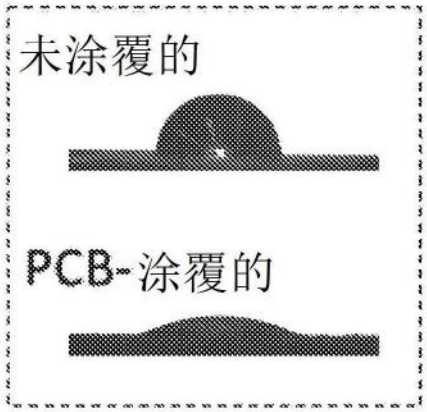

未涂覆的
PCB-涂覆的

图16D

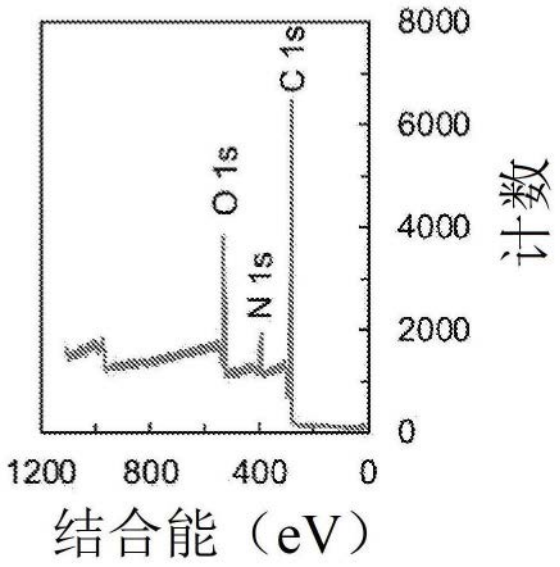

8000
6000
4000
2000
0
计数
C 1s
O 1s
N 1s
1200
800
400
0
结合能（eV）

图16E

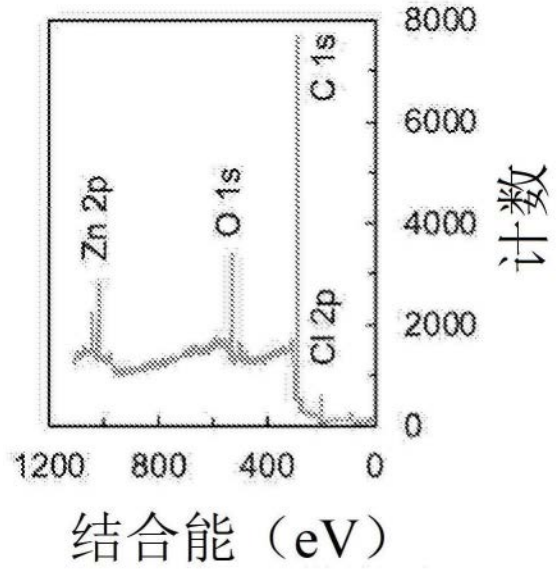

8000
6000
4000
2000
0
计数
C 1s
Zn 2p
O 1s
Cl 2p
1200
800
400
0
结合能（eV）

图16F

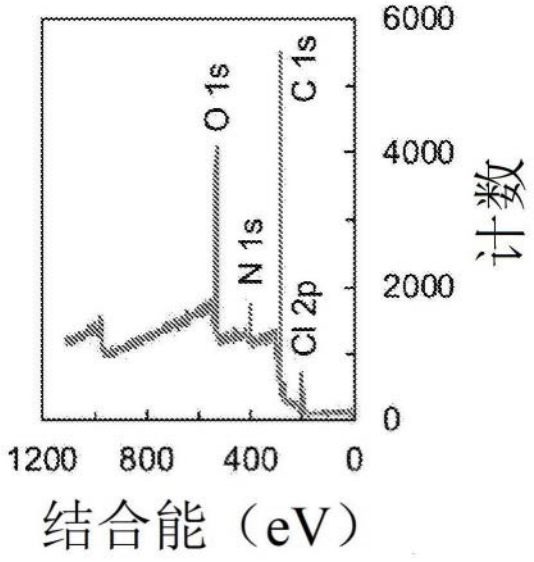

6000
4000
2000
0
计数
O 1s
C 1s
N 1s
Cl 2p
1200
800
400
0
结合能（eV）

图16G

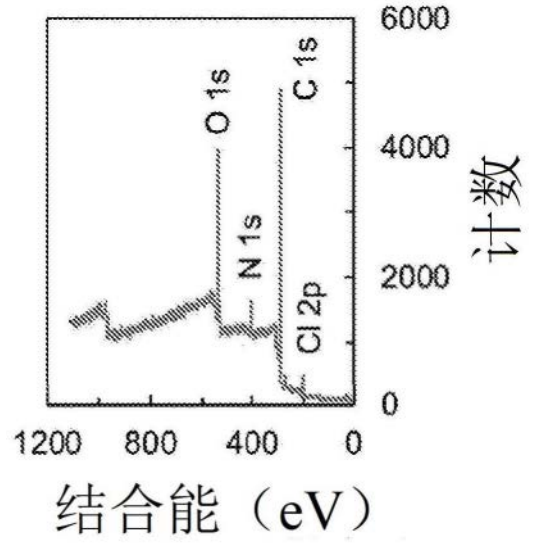

6000
4000
2000
0
计数
O 1s
C 1s
N 1s
Cl 2p
1200
800
400
0
结合能（eV）

图16H

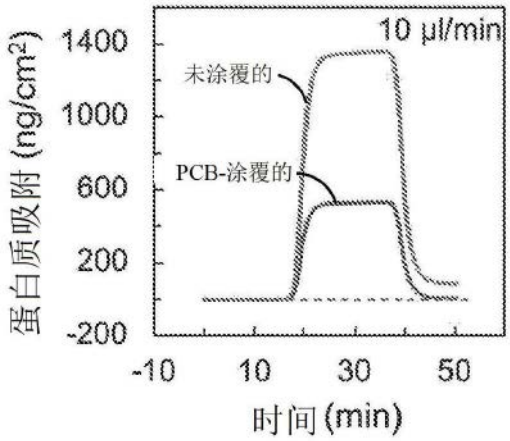


图17A

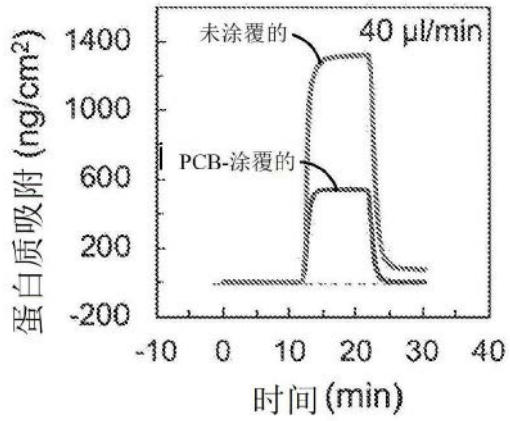


图17B

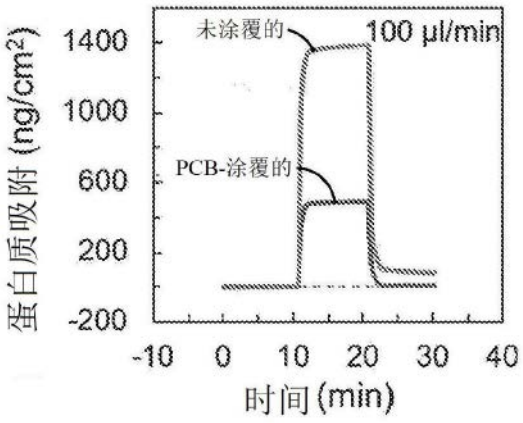


图17C

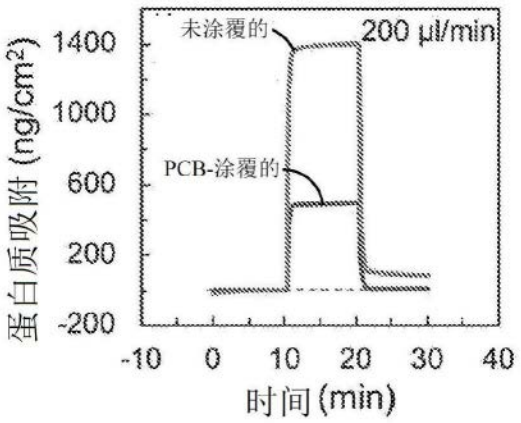


图17D

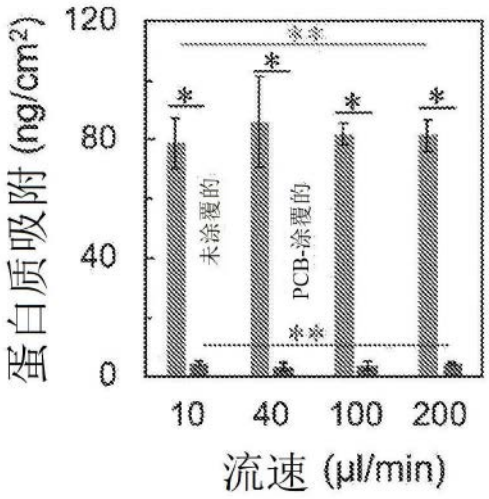


图17E

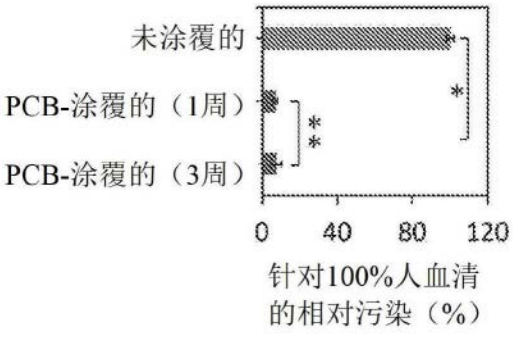


图17F

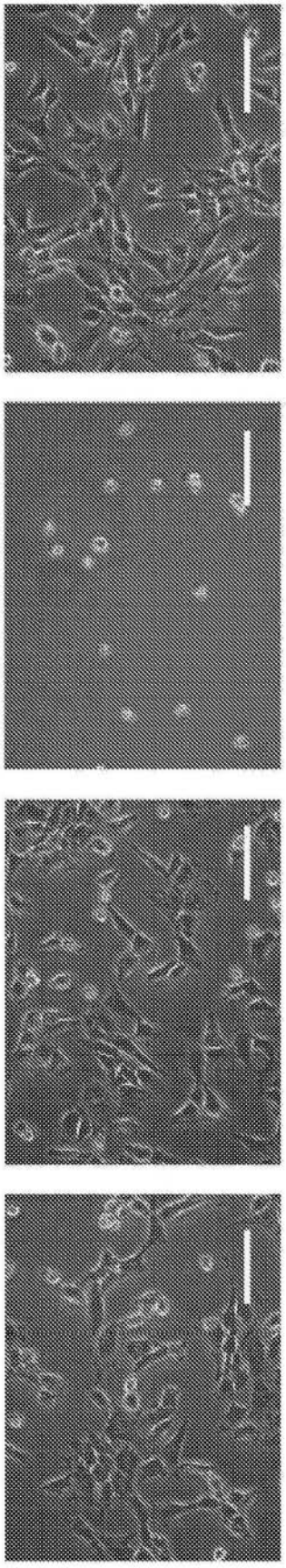


图18A

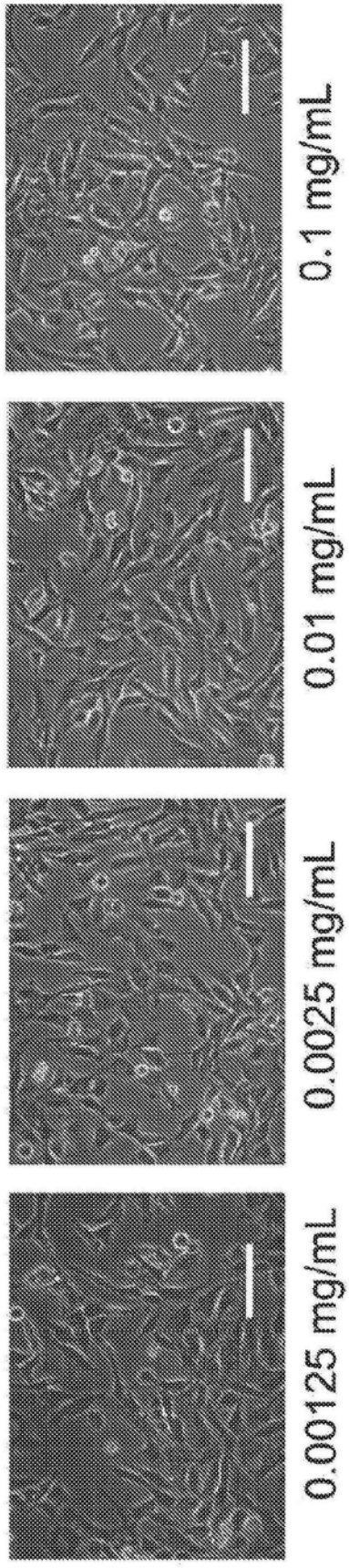


图18B

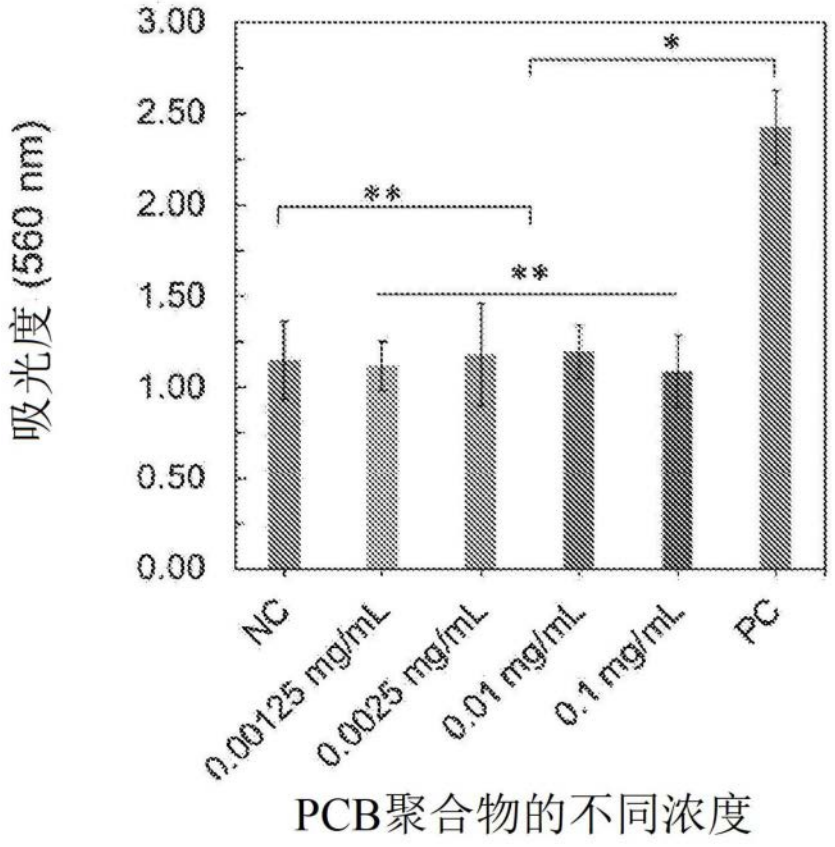

3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
吸光度 (560 nm)
**
**
*
NC
0.00125 mg/mL
0.0025 mg/mL
0.01 mg/mL
0.1 mg/mL
PC
PCB聚合物的不同浓度

图18C

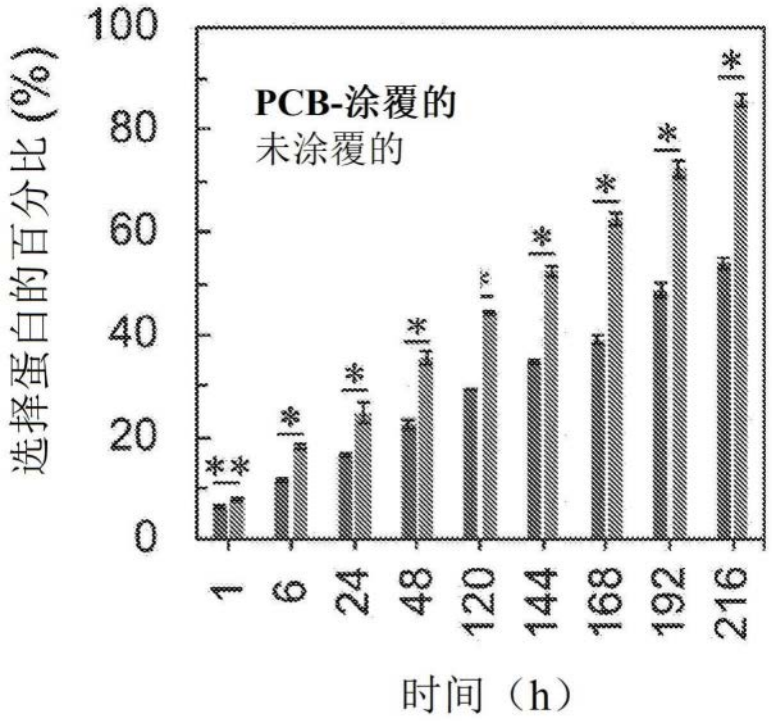

100
80
60
40
20
0
选择蛋白的百分比 (%)
PCB-涂覆的
未涂覆的
1
6
24
48
120
144
168
192
216
时间（h）

图19A

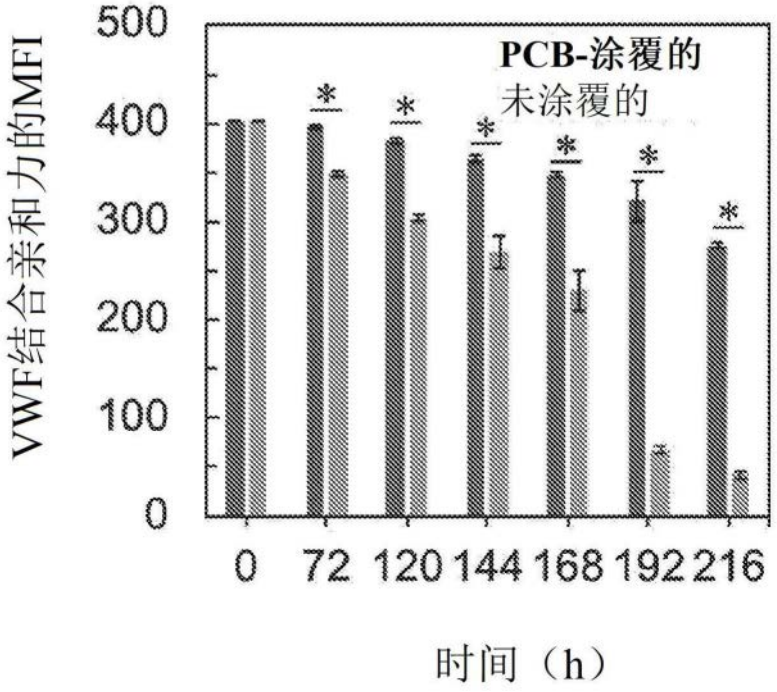

VWF结合亲和力的MFI
500
400
300
200
100
0
PCB-涂覆的
未涂覆的
0 72 120 144 168 192 216
时间（h）

图19B

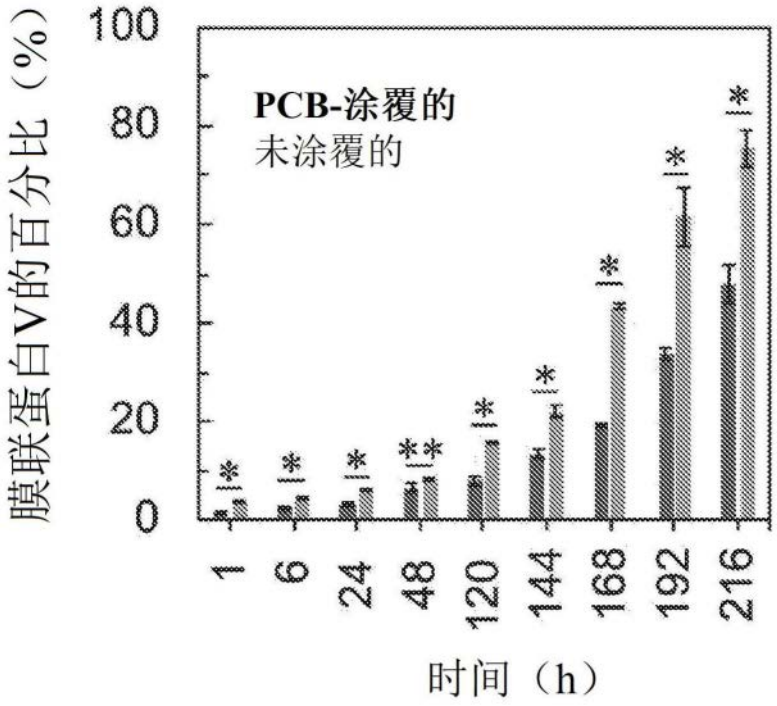

膜联蛋白V的百分比（%）
100
80
60
40
20
0
PCB-涂覆的
未涂覆的
1 6 24 48 120 144 168 192 216
时间（h）

图19C

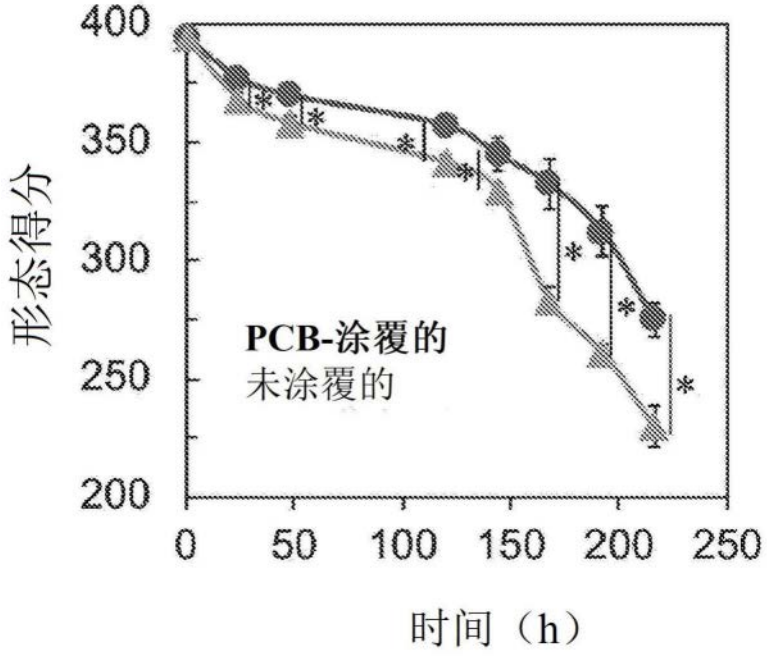

400
350
300
250
200
形态得分
PCB-涂覆的
未涂覆的
0
50
100
150
200
250
时间（h）

图19D

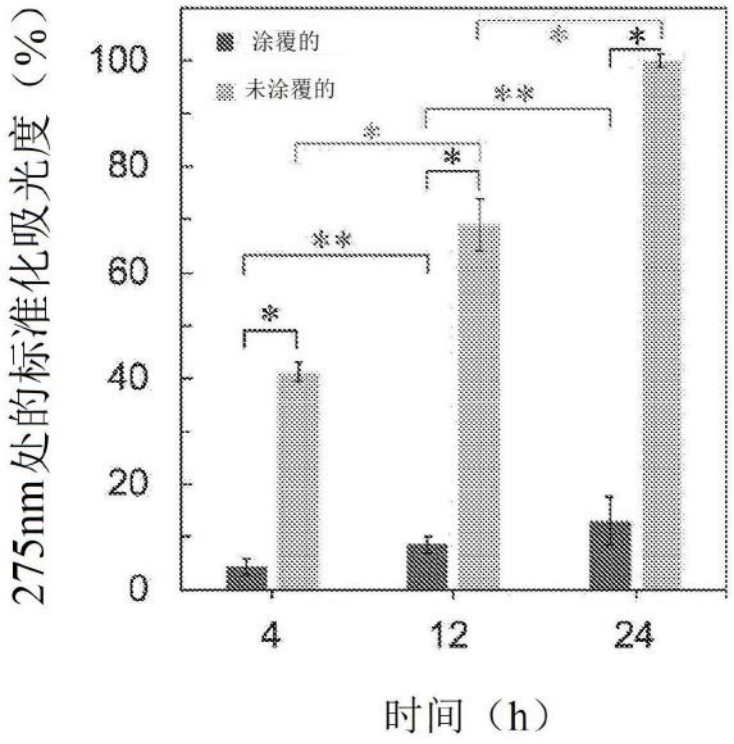

275nm处的标准化吸光度（%）
涂覆的
未涂覆的
100
80
60
40
20
0
4
12
24
时间（h）

图20

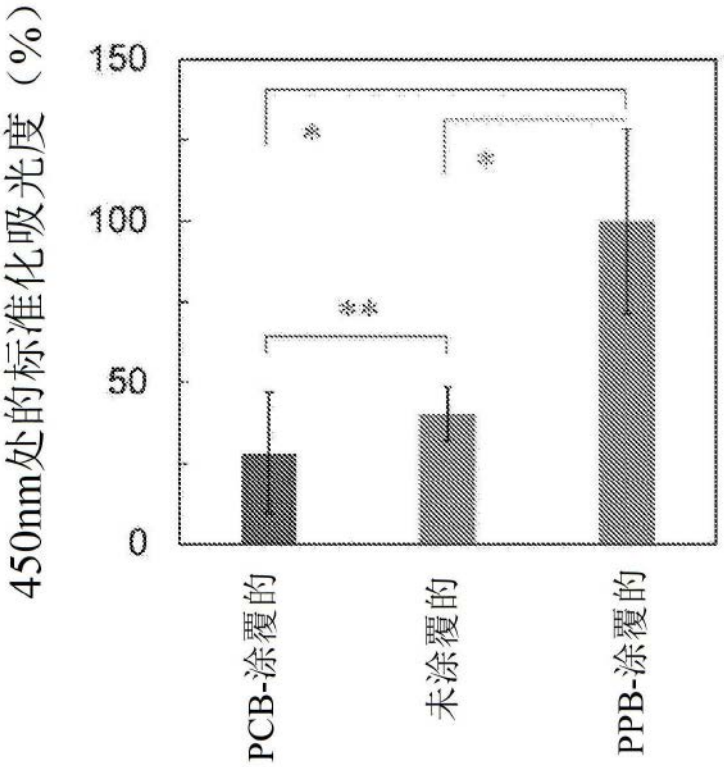


图21

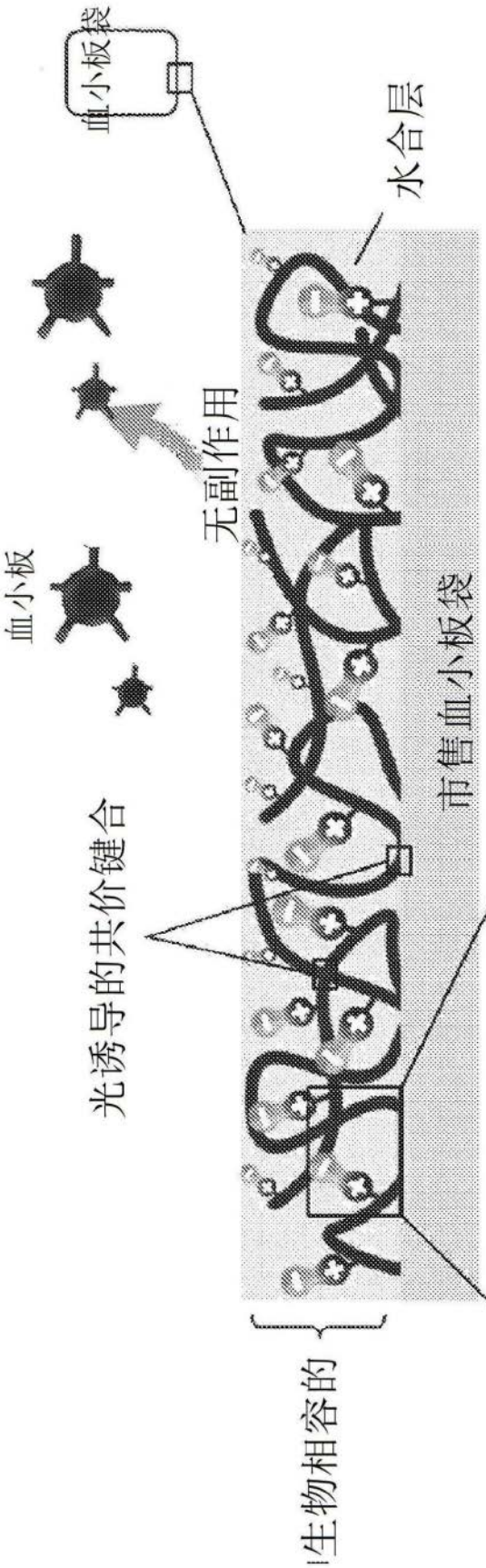


图 22A

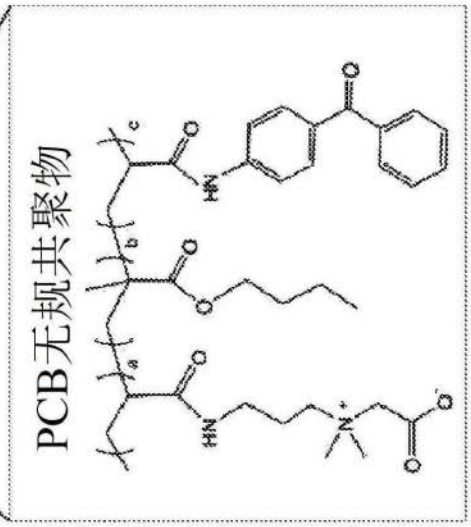


图 22B

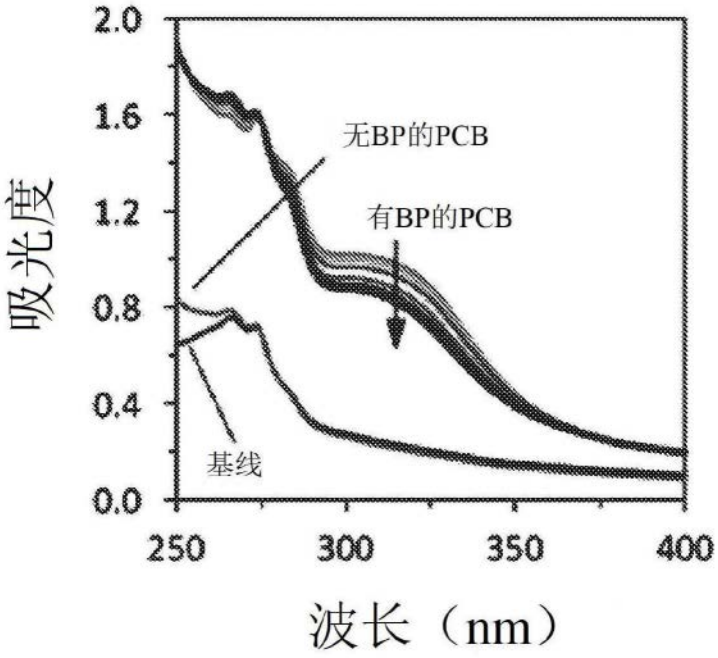

2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
吸光度
无BP的PCB
有BP的PCB
基线
250
300
350
400
波长（nm）

图22C

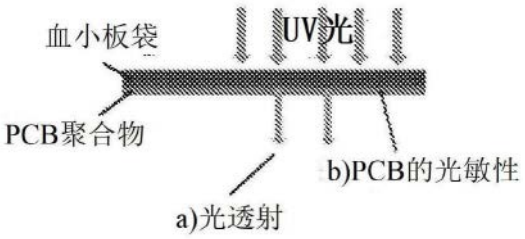

血小板袋
UV光
PCB聚合物
b)PCB的光敏性
a)光透射

图23A

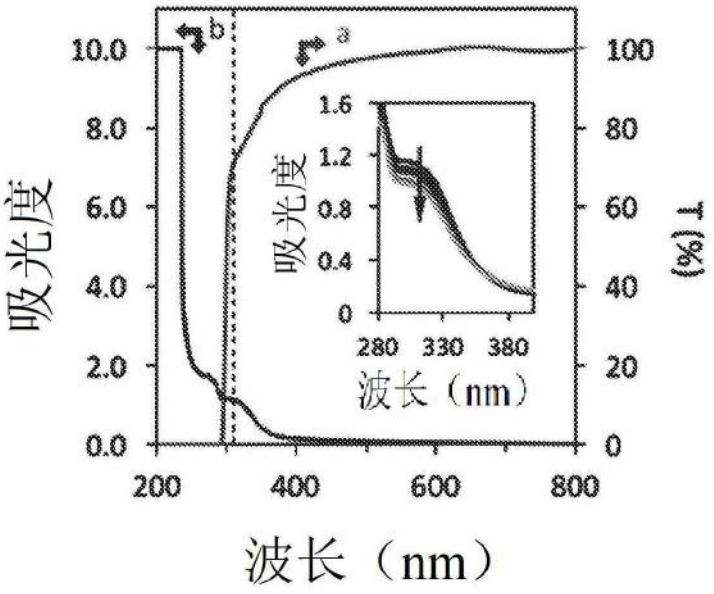

吸光度
T (%)
波长（nm）
a
b
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
100
80
60
40
20
0
200
400
600
800
1.6
1.2
0.8
0.4
0
280
330
380

图23B

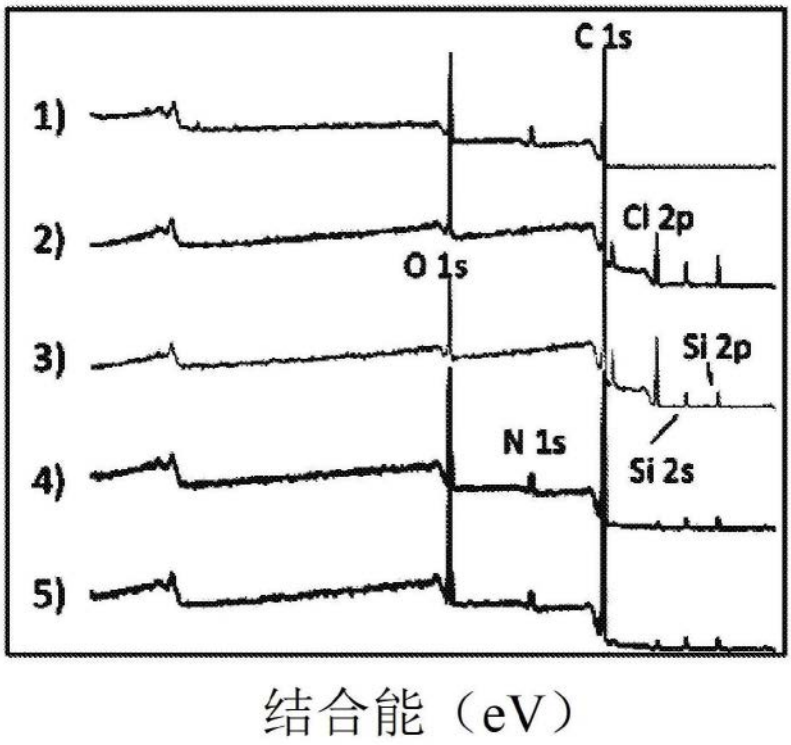

C 1s
Cl 2p
O 1s
Si 2p
N 1s
Si 2s
1)
2)
3)
4)
5)
结合能（eV）

图23C

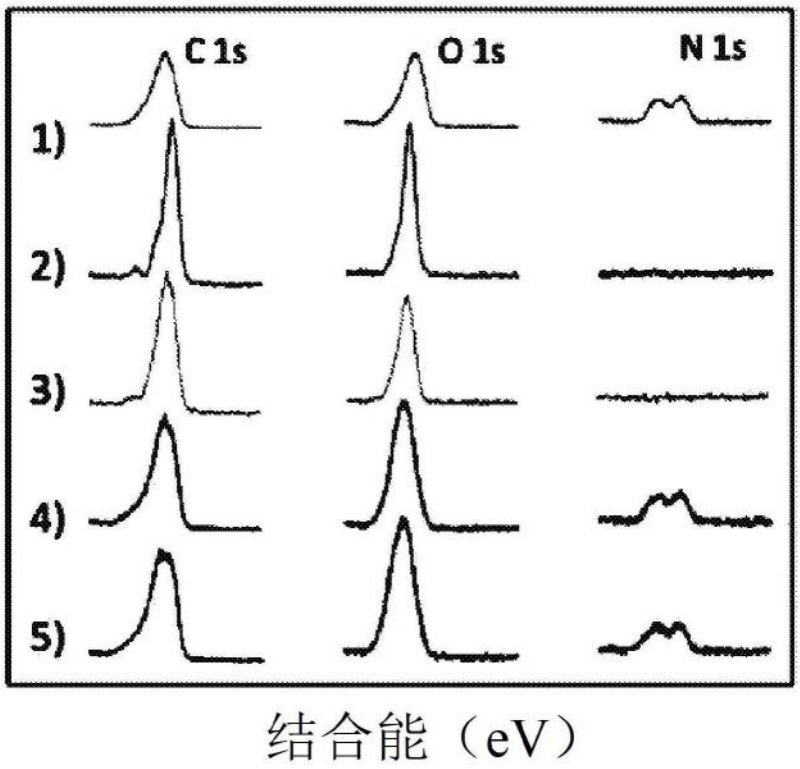


图23D

样品	原子浓度（%）				
	C 1s	O 1s	N 1s	Cl 2p	Si 2p
1)PCB聚合物	73.4	17.5	9.1	/	/
2)冲洗前未涂覆的	69.3	12.8	/	8.6	9.3
3)冲洗后未涂覆的	69.3	13.5	/	12.5	4.7
4)浸泡前PCB涂覆的	69.4	18.2	6.9	1.4	4.2
5)浸泡后PCB涂覆的	70.5	18.4	5.3	1.4	4.4

图23E

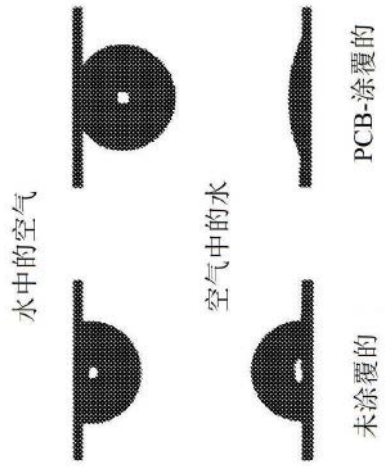


图23F

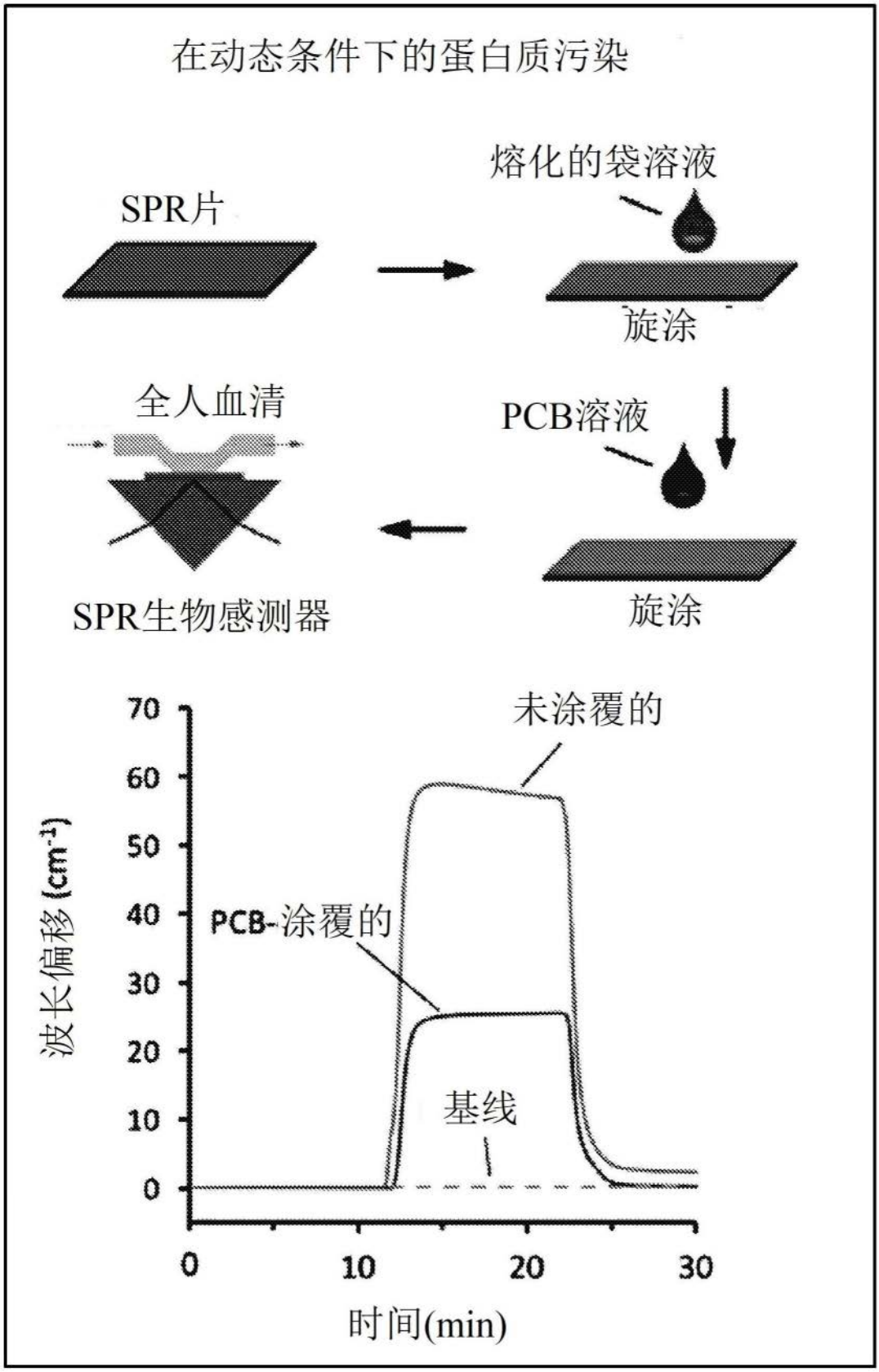

在动态条件下的蛋白质污染
熔化的袋溶液
SPR片
旋涂
全人血清
PCB溶液
SPR生物感测器
旋涂
未涂覆的
PCB-涂覆的
基线
波长偏移 (cm-1)
时间(min)
0
10
20
30
40
50
60
70

图24A

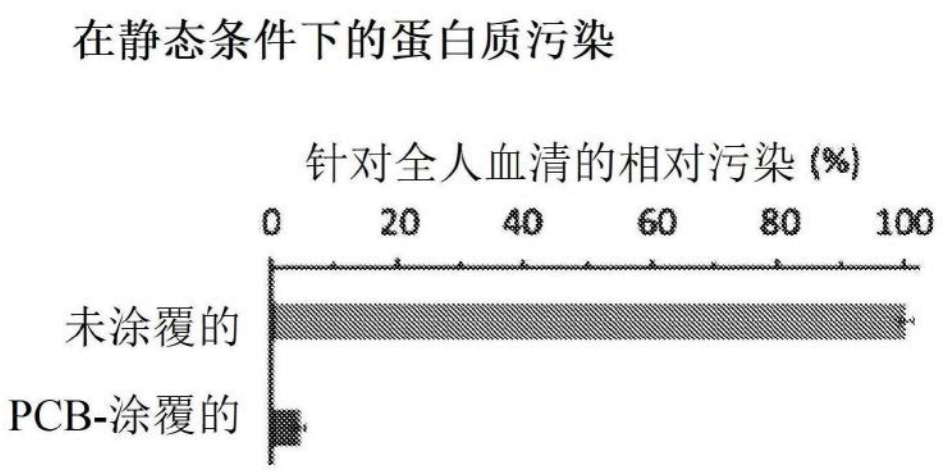

在静态条件下的蛋白质污染
针对全人血清的相对污染 (%)
0
20
40
60
80
100
未涂覆的
PCB-涂覆的

图24B

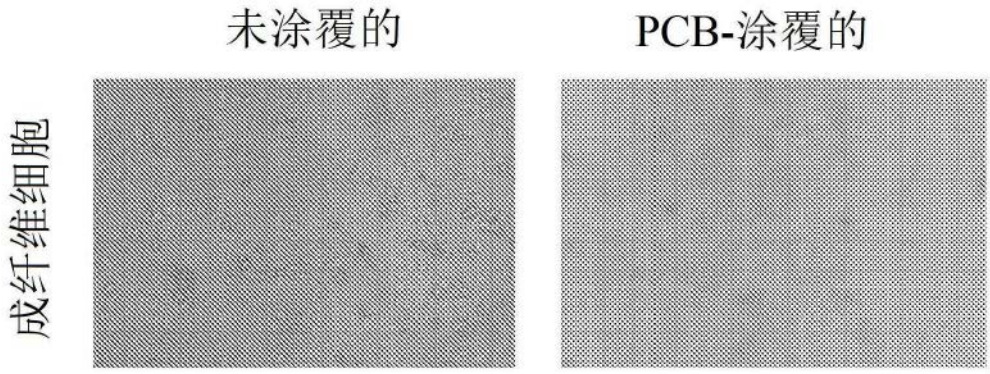

未涂覆的
PCB-涂覆的
成纤维细胞

图24C

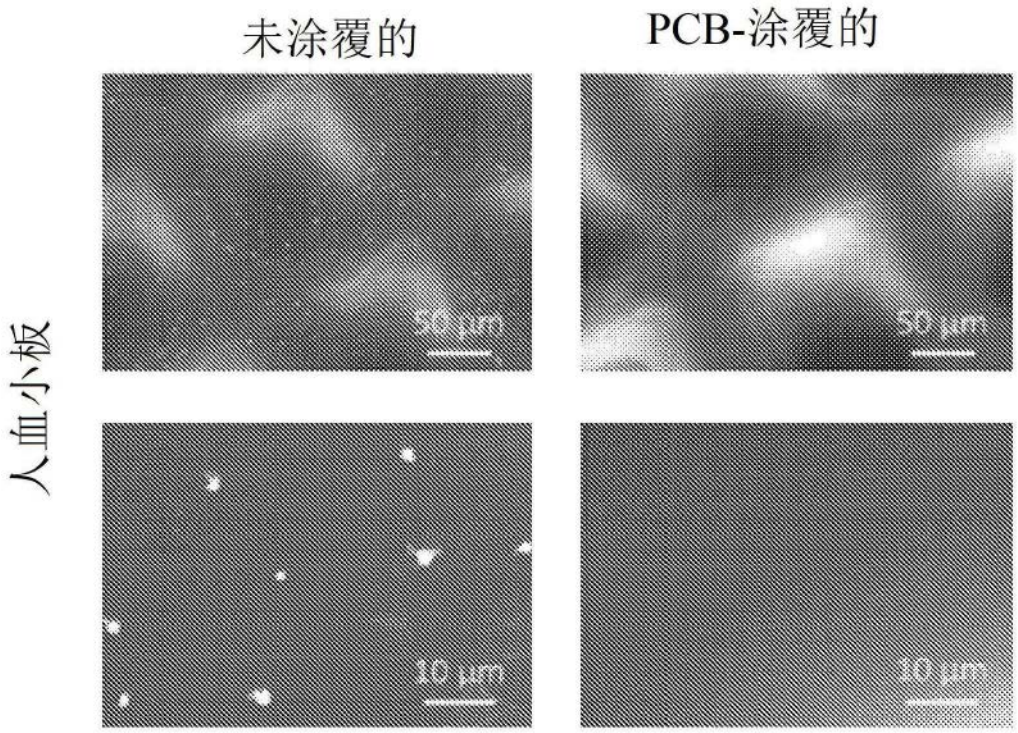

未涂覆的
PCB-涂覆的
人血小板
50 μm
50 μm
10 μm
10 μm

图24D

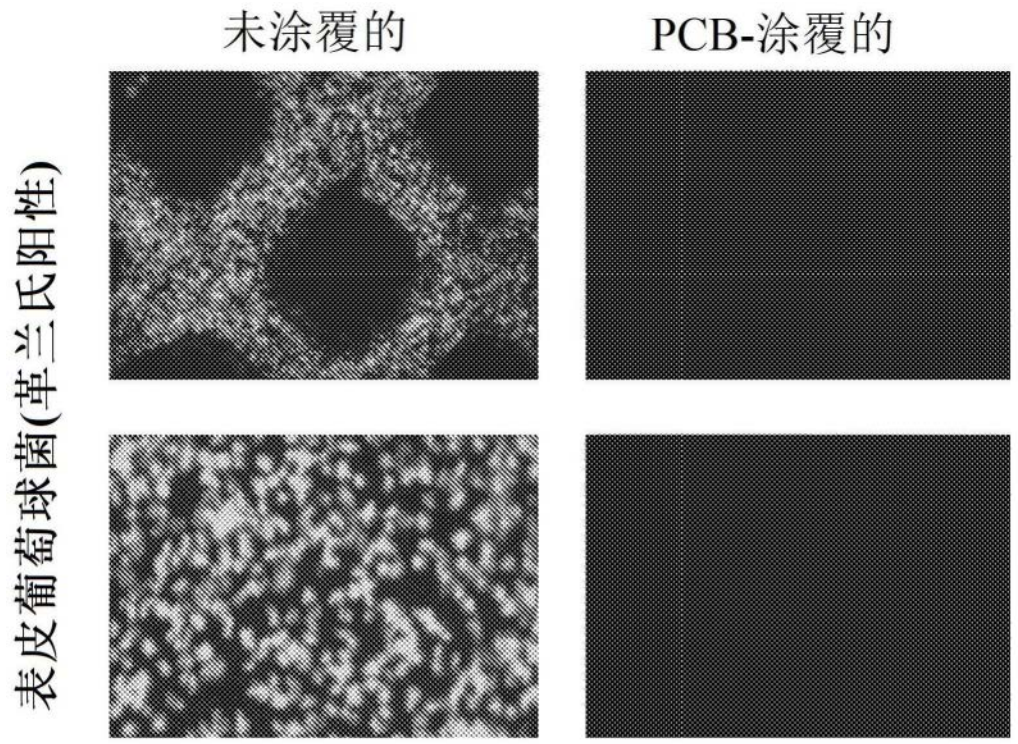

未涂覆的
PCB-涂覆的
表皮葡萄球菌(革兰氏阳性)

图24E

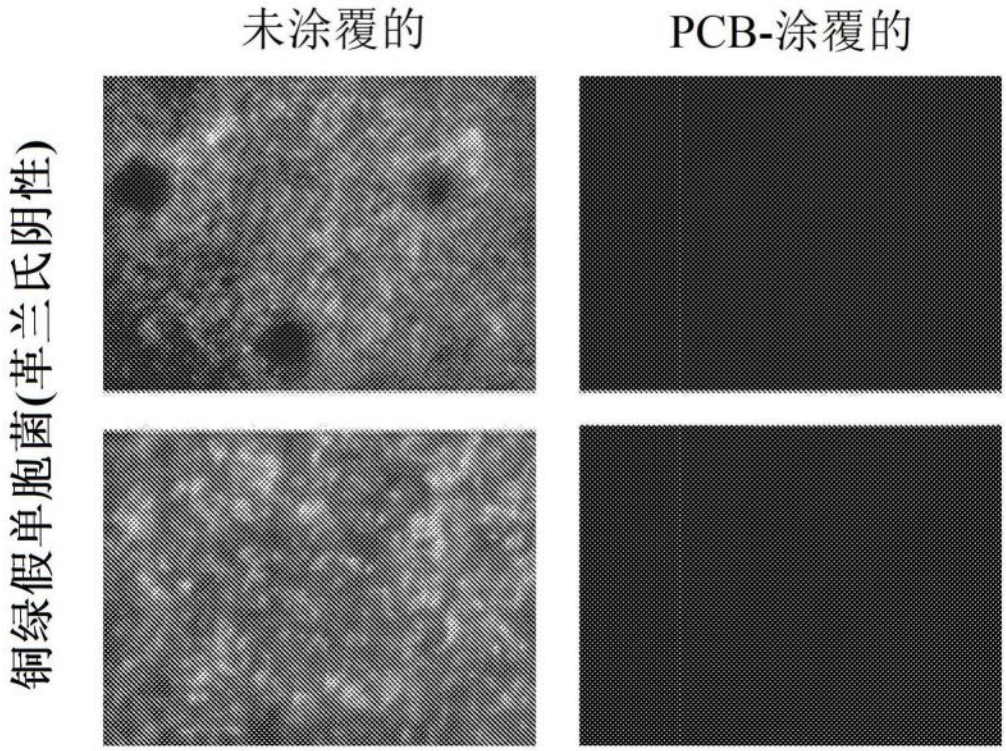

未涂覆的
PCB-涂覆的
铜绿假单胞菌(革兰氏阴性)

图24F

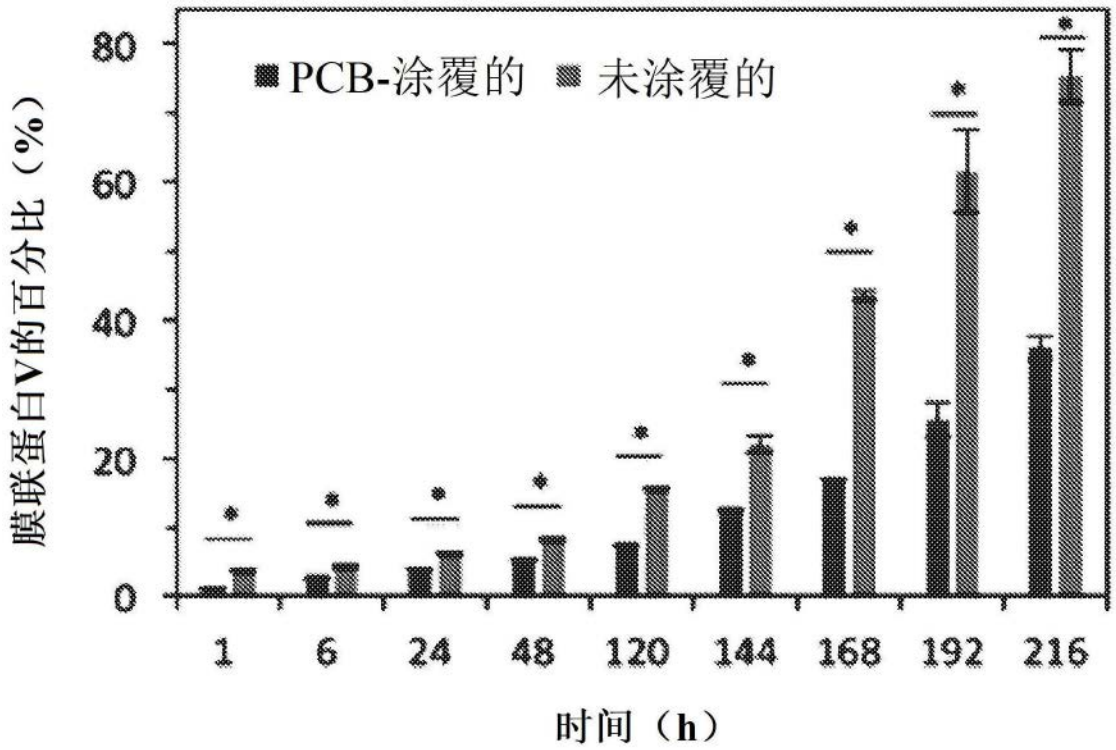

PCB-涂覆的
未涂覆的
膜联蛋白V的百分比（%）
0
20
40
60
80
1
6
24
48
120
144
168
192
216
时间（h）

图25A

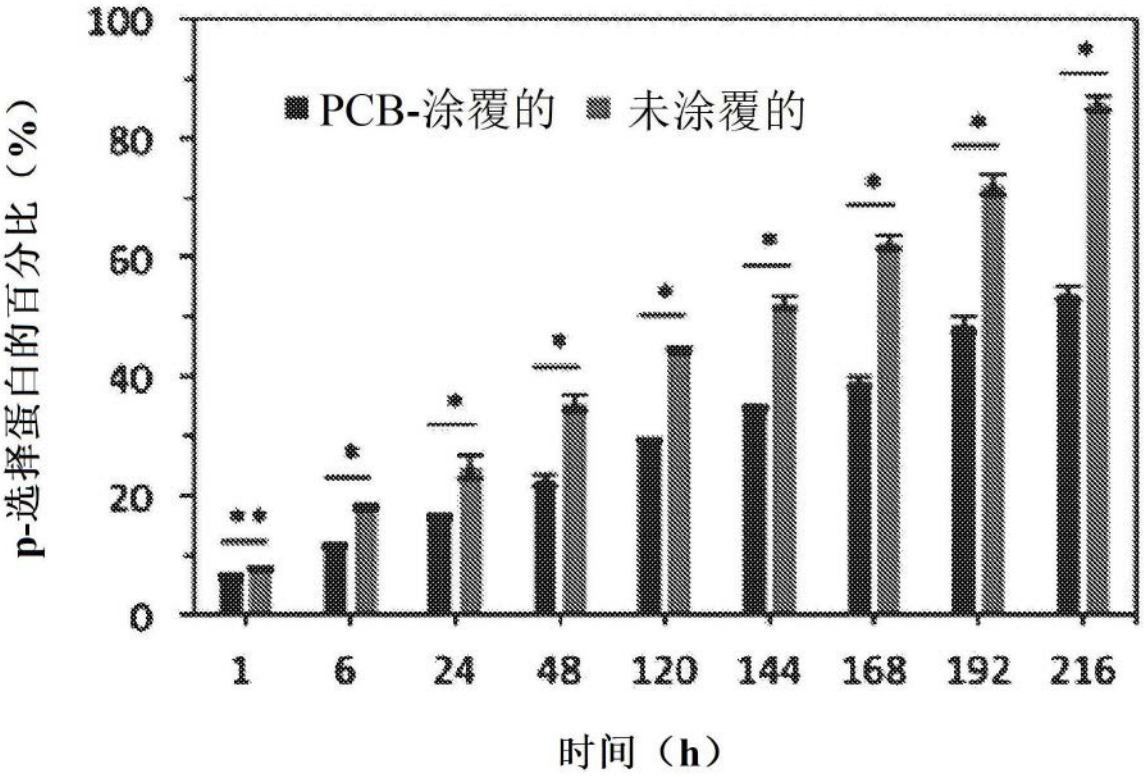

100
80
60
40
20
0
p-选择蛋白的百分比（%）
PCB-涂覆的
未涂覆的
*
1
6
24
48
120
144
168
192
216
时间（h）

图25B

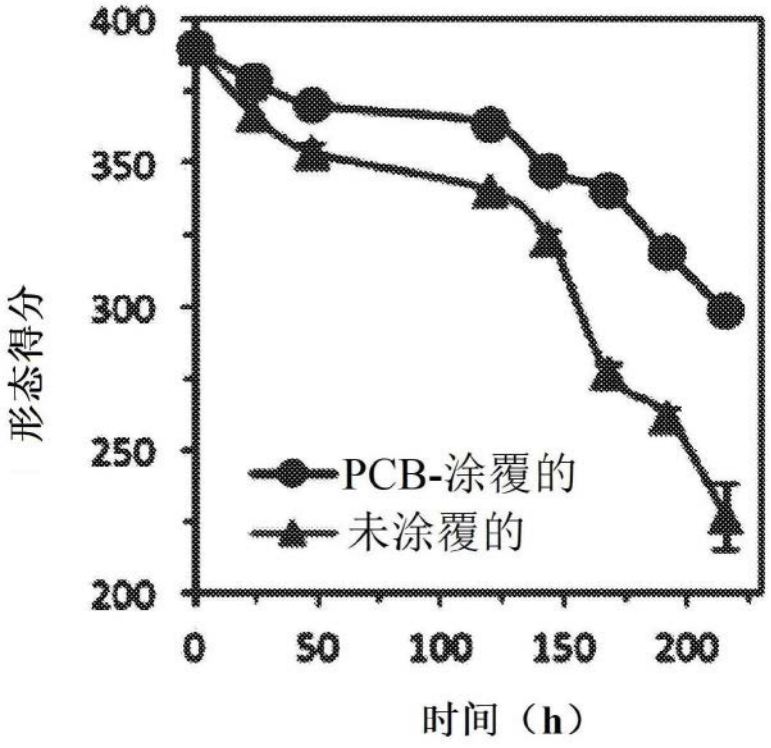

400
350
300
250
200
形态得分
PCB-涂覆的
未涂覆的
0
50
100
150
200
时间（h）

图25C

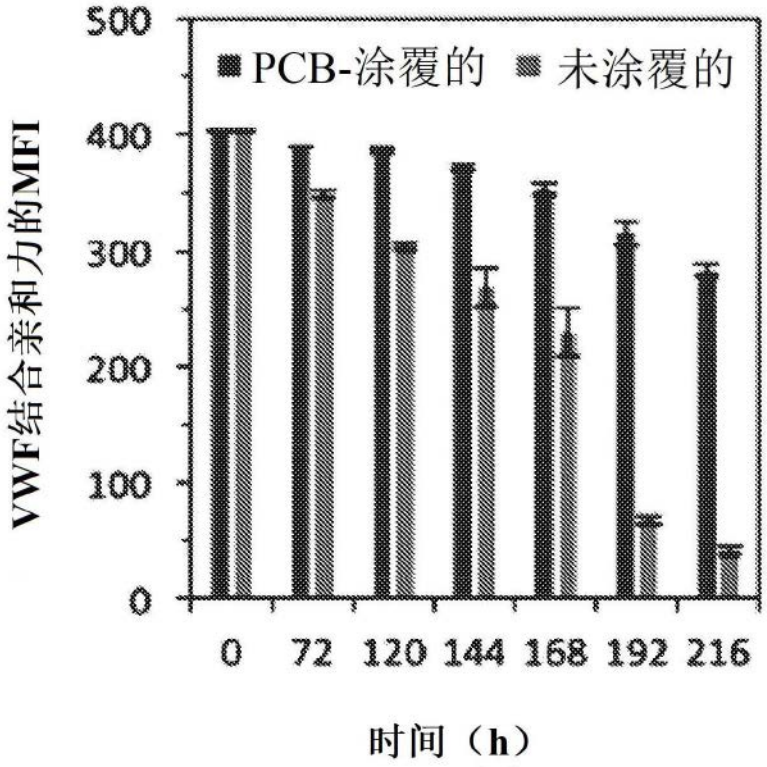

500
400
300
200
100
0
PCB-涂覆的
未涂覆的
VWF结合亲和力的MFI
0 72 120 144 168 192 216
时间（h）

图25D

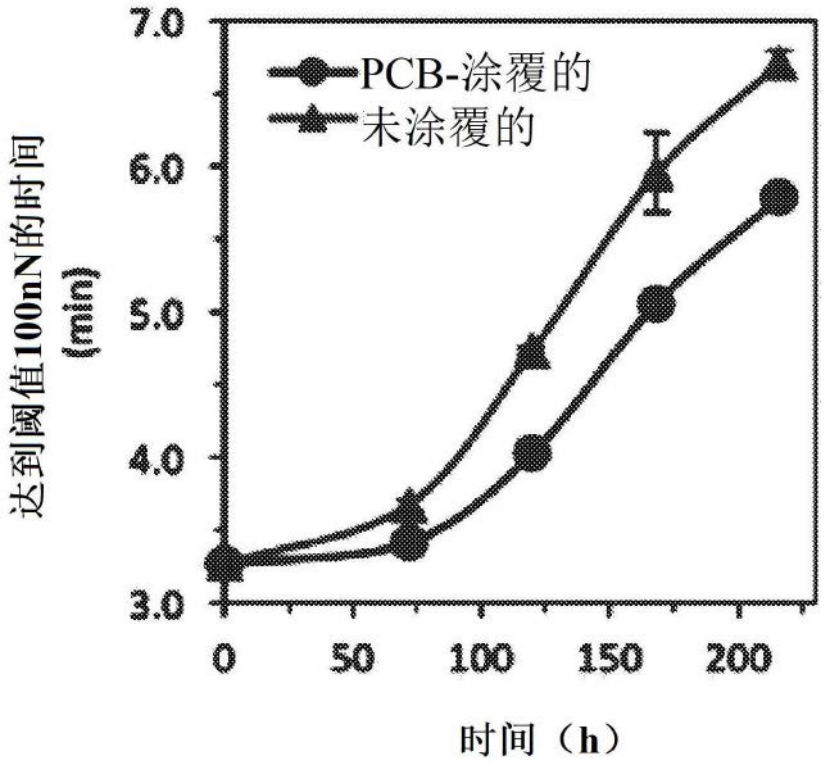

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
PCB-涂覆的
未涂覆的
达到阈值100nN的时间
(min)
0 50 100 150 200
时间（h）

图25E

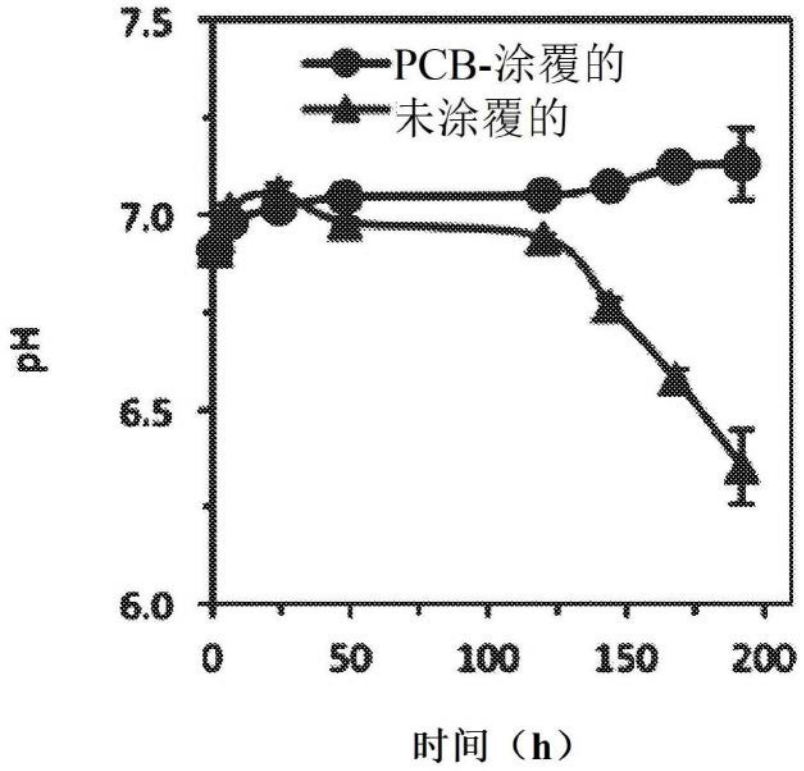

7.5
7.0
6.5
6.0
pH
PCB-涂覆的
未涂覆的
0
50
100
150
200
时间（h）

图25F

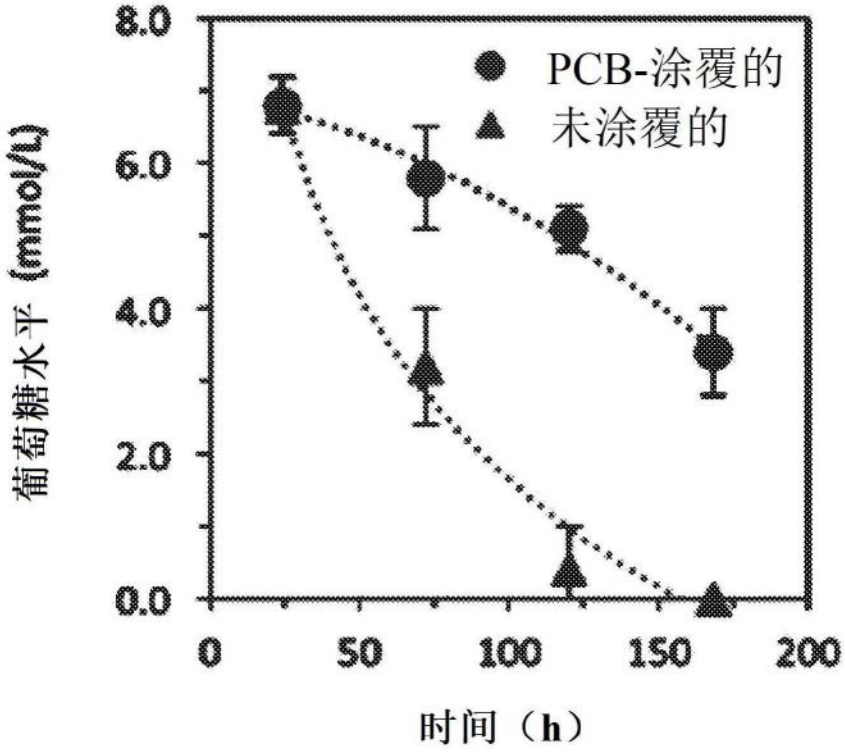

8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
葡萄糖水平（mmol/L）
PCB-涂覆的
未涂覆的
0
50
100
150
200
时间（h）

图25G

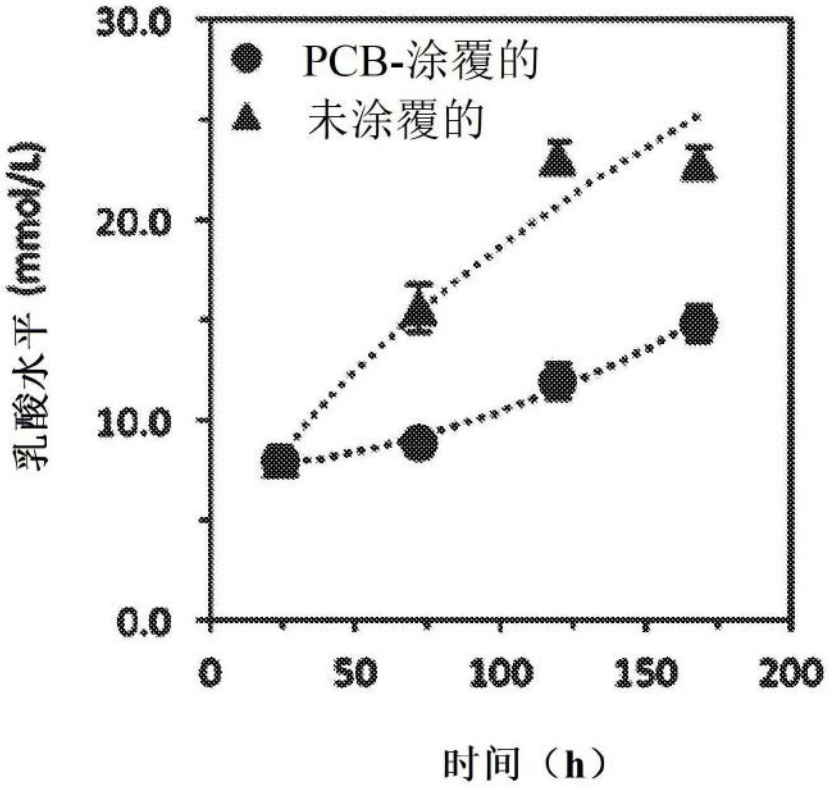


图25H