



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103221079 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201180040297. 9

B01J 20/26(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 22

B01J 20/32(2006. 01)

(30) 优先权数据

A1073/2010 2010. 06. 24 AT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 02. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AT2011/000273 2011. 06. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/160149 DE 2011. 12. 29

(73) 专利权人 弗雷森纽斯医疗护理德国有限责任公司

地址 德国巴特洪堡

(72) 发明人 迪特尔·法尔肯哈根 史蒂芬·哈姆
简·哈特曼 维多利亚·韦伯

(74) 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所
(普通合伙) 31218

代理人 陈酩 翟羽

(51) Int. Cl.

A61M 1/36(2006. 01)

B01D 15/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 95/04559 A1, 1995. 02. 16,

CN 102725008 A, 2012. 10. 10,

US 5510242 A, 1996. 04. 23,

US 2004/0228829 A1, 2004. 11. 18,

M. Brandl, etc.. Particle Transfer
and Detection in a Microspheres based
Detoxification System. 《International
Conference on Biocomputation,
Bioinformatics, and Biomedical
Technologise》. 2008,

审查员 王雪莉

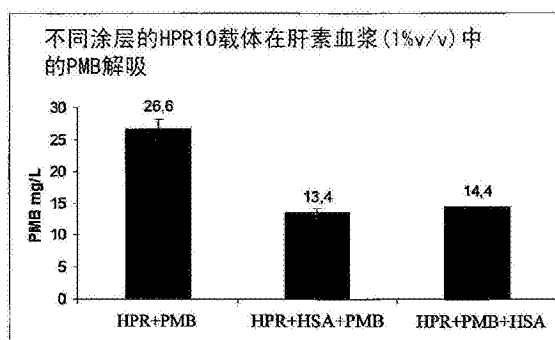
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

新颖的内毒素吸着剂

(57) 摘要

本发明涉及用于从生物流体中去除内毒素的吸着剂,其包含不溶于水的多孔载体,该载体具有中性的、疏水的表面,其中该载体的表面带有以多粘菌素和白蛋白制成的吸附涂层,其中多粘菌素和白蛋白以非共价的方式与该载体的表面结合。本发明进一步涉及用于生产这样的吸着剂的方法。该吸着剂在体外血液净化中使用,特别是为了治疗患有败血症的人士。



1. 用于从生物流体中去除内毒素的吸着剂,其包含不溶于水的多孔载体,该载体具有中性的、疏水的表面,其中该载体的表面带有以多粘菌素和白蛋白制成的吸附涂层,其中多粘菌素和白蛋白以非共价的方式与该载体的表面结合。

2. 如权利要求 1 所述的吸着剂,其特征在于该载体为疏水的聚合物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的吸着剂,其特征在于该疏水的聚合物为已交联的聚苯乙烯聚合物。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的吸着剂,其特征在于该疏水的聚合物为聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物。

5. 如权利要求 1 所述的吸着剂,其特征在于该载体的平均孔隙大小为至少 15nm。

6. 如权利要求 1 所述的吸着剂,其特征在于该载体的平均孔隙大小为至少 30nm。

7. 如权利要求 1 所述的吸着剂,其特征在于该载体的平均孔隙大小为不大于 120nm。

8. 如权利要求 1 所述的吸着剂,其特征在于该吸着剂呈微粒的形式。

9. 如权利要求 8 所述的吸着剂,其特征在于这些微粒的粒子大小为 20 μm 或更小。

10. 如权利要求 8 所述的吸着剂,其特征在于这些微粒的粒子大小为 8 μm 或更小。

11. 如权利要求 8 所述的吸着剂,其特征在于这些微粒的粒子大小为 5 μm 或更小。

12. 含有如权利要求 1 至 11 中任一项所述的吸着剂的吸着设备。

13. 含有如权利要求 1 至 11 中任一项所述的吸着剂悬浮液的血浆回路。

14. 用于生产如权利要求 1 至 11 中任一项所述的吸着剂的方法,该方法包含以下步骤:

a) 提供不溶于水的多孔载体,该载体具有中性的、疏水的表面,

b) 通过使该载体与含有多粘菌素的水溶液接触并培养该载体,以多粘菌素吸附地涂覆该载体的表面,

c) 洗涤该载体,以去除任何未结合的多粘菌素,

d) 通过使该载体与含有白蛋白的水溶液接触并培养该载体,以白蛋白吸附地涂覆该以多粘菌素涂覆过的载体的表面。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于该方法还包含洗涤该载体,以去除任何未结合的白蛋白。

16. 如权利要求 14 或 15 所述的方法,其特征在于在这些步骤 b) 和 c) 之间或在这些步骤 c) 和 d) 之间对该载体进行高压灭菌。

17. 基于微球的解毒系统 (MDS),其包括如权利要求 1 至 11 中任一项所述的吸着剂。

新颖的内毒素吸着剂

技术领域

[0001] 本发明涉及以多粘菌素涂覆的吸着剂,用于从生物流体中去除内毒素。

背景技术

[0002] 内毒素为革兰氏阴性细菌的细胞壁中的脂多糖(LPS),并且通过细胞裂解而被释放。事实上,脂多糖为革兰氏阴性细菌的外细胞膜中最为常见的脂质成分。内毒素为致热物质,即随着内毒素在例如由微生物引起的中毒过程中到达体内,则受感染的人会表现出严重的炎症反应并发烧,以及呈现全身性的效应。在血液回路中存在内毒素会导致免疫细胞不受控的活化,并导致凝血系统失衡。取决于其浓度,其可导致败血症,败血症的病征包括(其中包括)高烧、低血压,在严重的情况下,病征并包括多器官衰竭。败血症是一种须非常认真地对待的疾病;患有严重的败血症或败血性休克的人的死亡率达约 30-60%,这取决于该疾病的严重程度。此外,免疫力受损的病人(例如肝病病人或化疗中的病人)易于受到细菌感染,并因而呈现内毒素中毒的症状。

[0003] 脂多糖分子的结构为三个部分:脂质 A 形成朝向细菌细胞的分子区域;脂质 A 将该分子紧固至革兰氏阴性细菌的外膜。此外,该 LPS 分子具有在中央的、被高度保存的核心范围,其被结合至脂质 A。第三和最外部的区域由 O- 特定多糖(O- 抗原)形成,其结构在不同革兰氏阴性细菌中变化可以很大。毒性效应可追溯到脂质 A,其仅在细胞裂解时释出。

[0004] 通过合适的吸着剂能够从被内毒素污染的生物流体(例如血液或血浆)中去除内毒素。对患有内毒素中毒或败血症的病人的治疗是尤其在体外血液净化(分离术(apheresis))期间中进行的。

[0005] 分离术方法是在体外进行的程序,当中与病理生理学相关的血液和血浆成分(例如生物分子如(糖)蛋白、肽、脂质、脂蛋白以及脂多糖),以及血液细胞和血浆都会被去除。分离术方法一方面能够被用于诊断和治疗的目的,而另一方面其构成了从健康的人得到足够的量以及足够高纯度的特定血液成分的非常有效的机会。该治疗性的分离术具有重大的意义,因为在特定的迹象中,这经常是药物治疗外非常有效的备选方案,具有的副作用降到最小。因此,在血浆分离术方法中,血浆能够被完全分离并被替代溶液取代,或者通过吸着剂的方式从其中仅分离特定的成分(例如 LDL、内毒素或免疫球蛋白),而该血浆随后返回至供体/病人。

[0006] 为了从被内毒素污染的生物流体(大部分情况下为血液或血浆)中去除内毒素,其与吸着设备通常内含的吸着剂紧密地接触。内毒素被结合至该吸着剂的表面,并因此从该生物流体中被去除。没有内毒素的生物流体返回至病人。这吸着设备排列在体外血液回路中的血液的一侧,或者排列在体外血液净化设备的血浆回路中的滤液的一侧。在这方法中,与内毒素结合的能力和速度取决于吸着剂的性质。

[0007] 吸着剂与内毒素结合的速度对病人的存活率是决定性的。用来从病人的血液中去去除内毒素的剩余时间是非常短的(<12 个小时),而在败血症中,可能仅有数小时。

[0008] 已知阴离子交换树脂(例如结合至纤维素的 DEAE 或 PEI 基团)非常适合用于与内

毒素结合。然而,其与体内凝固系统的重要因子(例如蛋白 C 和蛋白 S)不想要的结合,以及与其相关的凝固问题都是不利的。

[0009] 通过使用特定的吸着剂,而这些吸着剂带有对抗内毒素的固化抗体,能够避免这些凝固问题。然而,由于经济上的原因,此种可能性的应用是有限的。

[0010] 在一开始提到的吸着剂的类型,其中的多粘菌素分子在不溶于水的多孔载体上固化,已知为非常有用的替代物。

[0011] 多粘菌素是用于治疗革兰氏阴性细菌感染的抗生素物质。多粘菌素通过提高细胞膜的渗透性,干扰细胞壁结构,导致细胞裂解。多粘菌素不但与磷脂结合,还更会以高亲和力与脂多糖(内毒素)结合。由于多粘菌素具有毒害神经和毒害肾脏的效应,故仅有多粘菌素 B 和多粘菌素 E (粘菌素)达到一定的治疗意义。多粘菌素 B 和多粘菌素 E 因此仅适用于口服及局部的治疗形式。由于其毒性效应而不适用于内毒素中毒或败血症的以非经肠道的、全身性的治疗。

[0012] 由于多粘菌素具有毒害神经和毒害肾脏的效应,故此在病人安全方面,为了将多粘菌素与载体结合在临床上应用以多粘菌素涂覆的吸着剂是很重要的,而该载体越趋稳固越好,以将病人血液的多粘菌素污染(例如通过多粘菌素自行与载体分离)降至最低或将其避免。因此,似乎已被证实以共价的形式将多粘菌素(特别是多粘菌素 B)结合至不溶于水的载体并使用因此以多粘菌素 B 涂覆的载体作为吸着剂以从被污染的生物流体中去除内毒素是有需要的。

[0013] 第 EP0110409A 号欧洲专利公开了由多孔玻璃(FPG2000)制成的多粘菌素 B 固化的载体,以及基于纤维素(Cellulofine A-3)的多粘菌素 B 固化的多糖载体。由纤维素或衍生的纤维素制成的、与多粘菌素 B 形成共价键的微粒亦是已知的 [Weber V., Loth F., Linsberger I., Falkenhagen D.: Int. J. Artif. Organs 25 (7), 679]。使用具多粘菌素涂层的纤维素载体能够达至高度的内毒素吸附,然而,其亦具有缺点,就是多粘菌素 B 与这些载体形成共价键是颇费劲的,因此在与该多粘菌素结合之前,该纤维素必须在化学上先被活化。

[0014] 第 EP0129786A2 号欧洲专利记载了一种具有纤维性载体的内毒素解毒物料,多粘菌素以共价的形式于其上固化。该纤维性载体设有功能团,来以共价的形式将多粘菌素键合至载体的表面。来自于第 EP0129786 的内毒素解毒物料作为用于吸附模块的填充物料已在市场上出现(商品名:Toraymyxin) [Shoji H. 2003. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin)], 而且其在当时是唯一获准在体外血液净化的范畴中在商业临床治疗败血症中去除内毒素的吸着剂。关于具有固化的多粘菌素 B 的纤维载体之有效性的评论文献已出版 [Cruz DN et al. 2007; Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. Crit. Care 11 (3): 137], 当中提到该治疗方法的质素并非理想。

[0015] 该些基于通过多粘菌素来结合内毒素的已知吸着剂具有与内毒素结合能力低以及结合速度慢的缺点。由于多粘菌素经由 NH_2 基团被结合至聚合物,故削弱了其对内毒素的可及性。其他的缺点因昂贵和复杂的生产方法以及与其相关的更高的生产成本而起。

[0016] 虽然通过临床用药上述的 Toraymyxin 吸附模块已能够降低患有内毒素中毒(特别是败血症)的病人的死亡率,但是尽管采用了最大量的治疗,患有严重败血症和败血性休

克的病人的死亡率仍然非常高。由于此原因以及败血症情况的发生率高且正在增长中,对于具有改良的对内毒素吸着表现并且符合其临床给药方面的高安全要求的吸着剂,有着高需求。

发明内容

[0017] 本发明的目的为提供一种吸着剂,通过使用该吸着剂可从生物流体中大量和高速地去除内毒素,并且不会对病人构成额外的健康风险,在临床应用上属安全。

[0018] 此目的通过一开始提到的以多粘菌素涂覆的、用于从生物流体中去除内毒素的吸着剂而实现,根据本发明,其包含不溶于水的多孔载体,该载体具有中性的、疏水的表面,其中该载体的表面带有以多粘菌素和白蛋白制成的吸附剂涂层,其中多粘菌素和白蛋白以非共价的方式与该载体的表面键合。

[0019] 归功于根据本发明的吸着剂,与多粘菌素在其中共价键合的吸着剂相比,吸着内毒素的能力和吸着内毒素的速度得到了显著的提升。本案发明人已确立与已知的吸着剂相比,通过根据本发明的吸着剂在一段短的作用时间之后,便可在意料不到的程度上,在被内毒素污染的生物流体中与大量的内毒素结合 (bound)。由于大量的生物流体能够在短时间内变成没有内毒素,故此这在治疗上具有很大的优点,特别是对于患有败血症的病人。通过根据本发明的吸着剂,患有严重败血症的病病人的存活率就可提高。如上文已经提及,通过吸着剂来结合内毒素的速度对病人的存活是具决定性的。归功于根据本发明的吸着剂,在体外血液净化的范畴中治疗的时间也能够缩短,因而可节省时间、金钱和人力资源。

[0020] 此外,发明人注意到了一意外的事实:归功于以多粘菌素和白蛋白两者制成的载体的吸附剂涂层,与仅以多粘菌素吸附地涂覆的载体相比,可大大减少多粘菌素从该载体的表面解吸。有赖本发明,从该载体表面解吸的多粘菌素明显较少。结果,进入生物流体,特别是血液,的有毒多粘菌素明显较少,从而可以将病人的安全保持在非常高的水平。与仅以多粘菌素吸附地涂覆的载体相比,额外以白蛋白涂覆不会损害多粘菌素对内毒素的吸着。

[0021] 正如已经提到的,许多吸收体的缺点是不但会消除要去除的物质,而且大量生理上重要的蛋白和 / 或凝血系统的因子(包括抗凝剂和促凝物质两者)亦会被消除。此外,可确立血液中如蛋白 C 的重要天然凝血因子或添加到血液中如肝素的凝血抑制剂,被根据本发明的吸着剂吸附程度微小,而意外的是,与仅以多粘菌素涂覆的载体相比,甚至可观察到根据本发明的吸着剂对肝素和蛋白 C 吸附得较少。因此,可将体内凝血系统失衡或者在体外或体内血液回路中有不想要的抗凝的风险减到最低。

[0022] 与已知的吸着剂相比,本发明的另一优点在于其特别简单的生产过程。与从现有技术中已知的吸着剂相比,多粘菌素并非共价地键合,而是使用多粘菌素分子的疏水部分,特别是经由在载体的中性的、疏水的表面上的疏水相互作用而被固化的。根据本发明的吸着剂的对内毒素结合的效力增强可被解释如下:使用疏水相互作用作介导的结合使多粘菌素的 NH_2 基团外露,而其全部在实质上可用于与内毒素结合。将多粘菌素固化在载体上无需复杂的化学步骤。白蛋白亦非共价地键合,而亦是经由吸附过程,其无须任何额外化学固化和交联步骤或者使用化学物(须在临床上应用该吸着剂前被去除且无任何残留物)。以白蛋白作吸附涂层表面为已知的方法;举例来说,在免疫测定中,会运用如 ELISA、牛血清白蛋白 (BSA) 来避免非特异性的结合。因此能够经济地并可重复地生产根据本发明的吸着剂,

而无须使用任何额外化学物。

[0023] 因此,术语多粘菌素和白蛋白的“吸附涂层”指多粘菌素和白蛋白经由吸附过程而与表面结合,并因此与该载体的表面非共价地键合。就如上文已经提到,可假设是疏水相互作用特别发挥了重要的作用。疏水相互作用具有重要的生物化学意义,并基于以下现象:疏水分子在极性环境中趋向于缔合(associate)。疏水相互作用因此就其本身而言不是一种力,而是受极性环境所迫使。在本发明中,疏水相互作用特别在多粘菌素分子的疏水部分、白蛋白的疏水侧链以及多孔载体的中性的、疏水的内外表面之间发生。本领域技术人员对以两亲分子作表面的吸附涂层是熟悉的。举例而言,一些主要的色谱分离方法,例如以疏水相互作用的原理为基础的 HIC (疏水作用色谱法)或反相色谱法,通常可达成分子与载体表面之间非常牢固的结合。其他非共价的相互作用包括(但不限于)离子键合、氢桥键合和范德华(van der Waal)相互作用,也可对多粘菌素和白蛋白的吸附发挥作用。根据本发明的作用的一个解释可以是,事实上,通过多粘菌素和白蛋白分子之间的许多非共价相互作用而解吸的多粘菌素减少了,达到了根据本发明的作用。

[0024] 在本公开的内容中,术语“吸着剂”应被理解为用于进行吸着的剂体,优选为进行吸附的剂体,即位于生物流体中的分子通过吸着剂的表面力而被紧固。在说明书中,除了术语“吸着剂”,还使用了术语“吸附剂体(adsorption agent)”或“吸附剂(adsorption agent)”或“吸附体(adsorber)”。根据本发明,提供吸着剂,以从被内毒素污染的生物流体中吸附内毒素。根据本发明的吸着剂尤其用于体外血液净化中,特别是用于有败血症情况的病人身上。

[0025] 本文所使用的术语“白蛋白”指自然存在的白蛋白,特别是人血白蛋白、其类似物和其变体。此外,术语“白蛋白”包含类似白蛋白的多肽。类似白蛋白的多肽与白蛋白在其结构方面相似,并具有类似白蛋白的特性。类似白蛋白的多肽是从(其中包括)如前白蛋白的亚型白蛋白衍生的。类似白蛋白的多肽可来自天然来源或可以人工合成。

[0026] 在本发明的范围内使用的措辞“生物流体”可指无细胞的液体(特别是血浆)和含有细胞的液体(特别是血液)。由于在体外血液净化的过程中还须将其他液体,例如含有凝血抑制剂的溶液(肝素溶液、柠檬酸盐溶液)或替代溶液(电解质、补充液体流失的液体),导入体外血液回路或血浆回路中,故此生物流体还可被理解为已稀释的血液或已稀释的血浆。本发明主要拟用于人类医药领域,因此主要涉及人类的生物流体。然而,这不排除本发明还可被用于兽医领域。

[0027] 多粘菌素是原本源自多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)的已知化合物。特别须注意的是多粘菌素 B 和多粘菌素 E (粘菌素)对本发明是有用的。

[0028] 在本公开内容的文义中,独立权利要求 1 中所使用的术语“不溶于水的多孔载体,该载体具有中性的、疏水的表面”指多孔的、不溶于水的固体,其具有内外表面。该些内外表面是中性的和疏水的。术语“中性的”应被理解为非离子性的。本发明尤其指向微粒状的载体。

[0029] 在生产根据本发明的吸着剂时,多粘菌素和白蛋白在不同但连续的涂覆步骤中被吸附至载体。由此,已证实首先以多粘菌素吸附地涂覆该载体,随后以洗涤步骤来去除任何多余多粘菌素,以在其后以白蛋白进行吸附涂覆是有用的。这样就有可能在两个涂覆步骤之间引入高压灭菌步骤。在原理上,首先以白蛋白并其后以多粘菌素涂覆该载体也是可能

的;然而,由于在高压灭菌的环境中的白蛋白涂层会变性,因而所有步骤都须以无菌溶液进行,特别是无菌过滤溶液,故此要无菌生产这样的载体会较为繁琐。因此,在以多粘菌素吸附地涂覆该载体并其后以白蛋白进行涂覆后,对该载体进行灭菌是有利的。亦适于生产根据本发明的吸着剂的无菌白蛋白溶液经常被采用且市面上有售(如人血白蛋白,20%,奥克特珐玛,奥地利维也纳)。

[0030] 根据本发明的吸着剂优选通过包含以下步骤的方法生产,而该方法亦构成本发明的一部分:

[0031] a) 提供不溶于水的多孔载体,该载体具有中性的、疏水的表面,

[0032] b) 通过使该载体与含有多粘菌素的水溶液接触并培养该载体,以多粘菌素吸附地涂覆该载体的表面,

[0033] c) 洗涤该载体,以去除任何未结合的多粘菌素,

[0034] d) 通过使该载体与含有白蛋白的水溶液接触并培养该载体,以白蛋白吸附地涂覆该已被多粘菌素涂覆的载体的表面,以及

[0035] e) 视情况而洗涤该载体,以去除任何未结合的白蛋白。

[0036] 该洗涤步骤 e) 是可自由选择的并因此可以省略。然而,若在应用该以多粘菌素和白蛋白涂覆的载体前须暂时存放一段较长时间,则在存放该载体前进行步骤 e) 为恰当。

[0037] 使用可药用的盐来制备含有多粘菌素和白蛋白的水溶液。使用如钠的可药用阳离子以影响离子的强度。在用于净化血液的应用方面,据此该吸着剂直接接触血液,白蛋白优选在等渗溶液中稀释,更优选在等渗盐水中稀释。如上文所述,市面上有售合适的无菌白蛋白溶液。在生产过程中,洗涤载体以去除任何未结合的多粘菌素或白蛋白优选亦以等渗溶液进行,特别是等渗盐水。

[0038] 为了符合该吸着剂对无菌性的高要求,在步骤 b) 和 c) 之间或在步骤 c) 和 d) 之间对该载体进行高压灭菌是有用的。按照惯有做法进行高压灭菌,例如在 121° C 下进行 20 分钟。技术人员将理解,在高压灭菌后要用的溶液,即含有白蛋白的水溶液和用于洗涤的溶液,应符合临床要求,即其尤其须为无菌的和无热原的。

[0039] 若载体是疏水的聚合物,则在实践中是特别有利的。该载体物料,特别是在孔隙度和粒子大小方面,的良好可重复性因而得以确保。可另外将孔隙度和粒子大小改变得非常恰当。该疏水的聚合物既能为均聚物,又能为杂聚物。已证实已交联的聚苯乙烯聚合物特别有利于实际性能。在体外血液净化期间,对与病人体液接触的装置组件的无菌性有高要求。对吸着剂来说亦然。已交联的聚苯乙烯聚合物以对热力和化学物方面的高稳定性著称,而且已在临床实践中被证实。

[0040] 多粘菌素和载体之间的疏水相互作用的强度一方面由中性的、疏水的载体的疏水性所决定,另一方面由介质的离子强度所决定。如上文所述,多粘菌素具有毒害神经和毒害肾脏的效应。因此,理想为多粘菌素以尽可能最牢固的方式与载体的内外表面结合。在特别优选的变体中,已交联的聚苯乙烯聚合物为聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物。聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物的表面具有高度疏水性,因而可达致多粘菌素非常牢固地与载体表面结合。当然,可使用其他为本领域技术人员所熟知的中性的、疏水的、具有高度疏水性的聚合物。然而,已发现多粘菌素在中性的、疏水的聚合物上固化之后,仍有一定数量的多粘菌素会从载体表面解吸,并被释放至生物流体中。确实,这解吸不会对多粘菌素吸着内毒素的能力造

成显著影响；然而，即使小量的多粘菌素亦可出现毒害神经和毒害肾脏的效应，并因此对病人的健康构成危险。归功于根据本发明的吸着剂，其除了以多粘菌素涂覆外还以白蛋白涂覆，可显著减少多粘菌素的解吸。

[0041] 此外，已发现就吸附内毒素而言，多孔载体的孔隙大小也是重要的。因此，若多孔载体具有确定的平均孔隙大小则为有利，就可重复性来说亦然。载体的平均孔隙大小总是在多粘菌素经由疏水相互作用而被固化之前的平均孔隙大小。

[0042] 若多孔载体生产自合成的聚合物，则平均孔隙大小就能被设定得特别恰当。虽然本领域技术人员知道术语“平均孔隙大小”应如何被理解，并知道如何能够特意设定孔隙度或平均孔隙大小，但尽管如此，为求清晰，将简要地界定此术语。平均孔隙大小指孔隙的平均直径。在多孔物料的孔隙直径的高斯(Gaussian)大小分布中，平均孔隙直径为与分布曲线的最高值相对应的孔隙直径。举例来说，可使用氮吸附法(如在 Weber et al. 2008; Neutral styrene-divinyl benzene copolymers for adsorption of toxins in liver failure. *Biomacromolecules* 9(4):1322-1328 中所述)或使用压汞法确定平均孔隙直径。通过改变所参与的单体或共单体、溶液、或调制剂的浓度来设定聚合物的孔隙大小。所选定的聚合物孔隙越小，可用于吸着(特别是吸附)的聚合物的内表面面积就越大。孔隙越大，孔隙对更大分子的可及性就越好。在上述由 Weber 等人所著的出版物中，描述了用于生产具有确定孔隙大小的合成的、疏水的聚合物的方法，其可用于本发明。

[0043] 已证明，若该载体的平均孔隙大小为至少 15nm，则吸着剂可达到的内毒素吸着会特别良好。优选地，该载体的平均孔隙大小为至少 30nm。然而，若未涂覆的载体的平均孔隙大小不大于 120nm，则在体外血液净化的临床应用上是有利的。否则该吸着剂的内表面面积会变得太小；结果会降低对内毒素的吸着能力(对内毒素的吸附能力)。因此，载体的平均孔隙大小优选为选自 15nm 至 120nm 的范围。

[0044] 在一变体中，未涂覆的载体的平均孔隙大小有利地约为 30 - 40nm。在此变体中，内毒素从生物流体中以特别高的速度和高效率被消除，因此只需要少量的吸着剂去与大量的内毒素结合。

[0045] 举例来说，当根据本发明的吸着剂在体外血浆回路中被用作悬浮液时，可选择其浓度为 1% (Vol%)。含有呈微粒形式的吸着剂悬浮液的体外血浆回路为基于微球的解毒系统(MDS)的核心成分。从第 EP0776223B 号欧洲专利和第 5,855,782 号美国专利中可知 MDS。

[0046] 此外，在吸着程序期间，根据本发明的吸着剂的形式也是重要的。在有利的变体中，根据本发明的吸着剂呈微粒的形式。粒子大小会影响吸附的动力作用。此外，当粒子小时，会有大的表面积 / 体积比。在有利的子变体中，该些微粒的粒子大小为 20 μm 或更小。

[0047] 微粒尤其地被用在如上文所述的 MDS 中。在膜状过滤器的滤液的一侧上，微粒以悬浮液的方式于净化回路(血浆回路)中循环。然而，若膜状过滤器泄漏，则存在着以下危险：微粒会到达体外血液回路，接着到达病人的身体，并在其中导致肺栓塞。出于这个原因，在另一子变体中，由于粒子小能够避免肺栓塞的危险，故此若微粒的粒子大小为 8 μm 或更小则是有利的，理想为 5 μm 或更小。

[0048] 根据本发明的吸着剂主要用于体外血液净化(分离术)。

[0049] 在本发明的重要应用中，该吸着剂可用作吸着设备的填充物料。吸着设备能够以滤柱或滤筒实施。取决于使用何种血液净化装置或使用何种血液净化方法(血液灌流

(hemoperfusion)、血浆分离术(plasmapheresis)/血浆吸附(plasmasorption))而定,吸着设备可位于体外血液回路中的血液的一侧,或者位于血浆回路中的滤液的一侧。生物流体(血液或血浆)流过该吸着设备,内毒素与吸着剂中已固化的多粘菌素分子结合。已净化的血液或血浆流回至病人。

[0050] 另一可能的用途涉及血浆回路,其中所提供的吸着剂在血浆中以悬浮液的形式分布。此种血浆回路的例子为作为装置元件在上述 MDS 中可见。所提供的在血浆回路中的吸着剂悬浮液优选呈微粒形式。

[0051] 虽然根据本发明的内毒素吸着剂主要用于体外血液净化(分离术)中,但将其用于色谱法中亦是可想的。该吸着剂因此能够被用作为色谱柱的填充物料,用于净化被内毒素污染的血液或血浆。从生物流体或水中去除内毒素的其他应用也是可想的。

[0052] 根据本发明的吸着剂或含有根据本发明的吸着剂的吸着设备或含有根据本发明的吸着剂悬浮液的血浆回路特别适合用于治疗败血症。

[0053] 此外,本发明涉及用于从生物流体中去除内毒素的方法,其中使被内毒素污染的生物流体与根据本发明的吸着剂接触。如上文所述,该生物流体可流过含有该吸着剂的吸着设备。然而,该吸着剂也能够悬浮在该生物流体中。后者的例子为上述 MDS。生物流体可为血液或血浆。

具体实施方式

[0054] 下文以非限制性的例子为基础对本发明作更详细的说明。

[0055] 1. 例 1:生产根据本发明的吸着剂(吸附体)

[0056] 为了生产根据本发明的吸着剂,首先以多粘菌素 B (PMB) 然后以人血清白蛋白(HSA) 吸附地涂覆中性的、疏水的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物。

[0057] 1.1. 提供具有中性的、疏水的表面的不溶于水的多孔载体

[0058] 从陶氏化学公司购入不同粒子大小的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物(在下文简称为“聚合物”或“载体”或“未涂覆的吸附体”),其平均孔隙大小为 30 至 40nm。表 1 列出了该些聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物。

[0059] 表 1:聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物

[0060]	标号	制造商的标号	粒子大小[μm]
	#1824	Microadsorber	5
	HPR10	Amberchrom® HPR10	10

[0061] 载体 #1824 由制造商以悬浮液提供,并在 NaCl 中洗涤 5 次。

[0062] 根据制造商的说明对载体 HPR10 进行预处理。

[0063] 1.2. 以多粘菌素 B (PMB) 和人血清白蛋白(HSA) 吸附地涂覆聚合物

[0064] 根据以下步骤,以 PMB 和 HSA 涂覆表 1 列出的载体 #1824 和 HPR10:

[0065] a) 就涂覆方面,生产合适分量的 5mg/ml 浓度的 PMB 溶液。多粘菌素 B (PMB) 购自西格玛奥德里奇公司(货号:81334,批号 1348744)。就涂覆方面,在 10ml LAL 水中溶解 50mg PMB,生产多粘菌素 B 溶液(PMB 溶液)。

[0066] b) 对已预处理的载体进行离心(离心力 4,000g, 10 分钟), 弃置上层清液, 以移液管对每 ml 载体沉淀物移入 5ml PMB 溶液, 用作涂覆。

[0067] c) 以该 PMB 溶液在 20° C 下培养该载体 60 分钟。

[0068] d) 在培养期后, 对现以 PMB 涂覆的吸附体悬浮液在无菌玻璃小瓶中进行 121° C 下进行高压灭菌 20 分钟。

[0069] e) 其后, 对该以 PMB 涂覆的吸附体进行离心(离心力 4,000g, 10 分钟), 并在 5 倍量的 0.9%NaCl 中洗涤 3 次。

[0070] f) 可将该以 PMB 涂覆的吸附体作为 50% 悬浮液在 0.9%NaCl 中临时贮存到冰箱里, 并可立即进一步以 HSA 涂覆。

[0071] g) 就以 HSA 吸附地涂覆方面, 制备足够分量的 10% 人血清白蛋白溶液(HSA 溶液)(来源: 人血白蛋白, 20%, 奥克特珐玛, 奥地利维也纳)。

[0072] h) 对该以 PMB 涂覆并已高压灭菌的吸附体进行离心(离心力 4,000g, 10 分钟), 弃置上层清液, 以移液管对每 ml 吸附体沉淀物移入 2.5ml HSA 溶液, 用作涂覆。

[0073] i) 以该 HSA 溶液在 10° C 下培养该吸附体悬浮液至少 12 小时。

[0074] j) 在培养期后, 在 5 倍量的 0.9%NaCl 溶液中洗涤该以 PMB 和 HSA 涂覆的吸附体一次。

[0075] k) 将该以 PMB 和 HSA 涂覆的吸附体作为 50% 悬浮液在 0.9%NaCl 中贮存到冰箱里。

[0076] 由于为了涂覆该载体而添加的 PMB 分量几乎全被吸附, 故此 PMB 的量达到每 g 湿的吸附体有 25mg。

[0077] 表 2 概述了所得的根据本发明以 PMB 和 HSA 涂覆的吸附体:

[0078] 表 2: 根据本发明以 PMB 和 HSA 涂覆的吸附体

[0079]

以 PMB 和 HSA 涂覆的吸附体标号
#1824+PMB+HSA
HPR10+PMB+HSA

[0080] 2. 例 2: 多粘菌素 B 的解吸和对内毒素的吸附——批量测试

[0081] 2.1. 吸附体物料

[0082] 在批量测试中检测多粘菌素 B 从该吸附体 HPR10+PMB+HSA 的表面的解吸和该吸附体 HPR10+PMB+HSA 对内毒素的吸附。

[0083] 在多粘菌素 B 解吸测试中, 将该以 PMB 和 HSA 涂覆的吸附体 HPR10+PMB+HSA (生产方式见第 1.2 节例 1) 与另外两个吸附体作比较:

[0084] ● HPR10+PMB: 载体 HPR10, 仅以 PMB 涂覆。按照在第 1.2 节中的生产方案步骤 a) - f) 生产。

[0085] ● HPR10+HSA+PMB: 载体 HPR10, 其首先以白蛋白然后以多粘菌素 B 涂覆。

[0086] 按照以下步骤 a) 至 j) 生产此吸附体, 其亦为根据本发明的吸附体:

[0087] a) 对已预处理的 HPR10 作为 50% 悬浮液在 0.9%NaCl 中 121° C 下进行高压灭菌 20 分钟。

- [0088] b) 在高压灭菌步骤后,对该载体进行离心,其后进行以白蛋白涂覆的步骤。
- [0089] c) 就涂覆方面,制备合适分量的 10%HSA 溶液(来源:人血白蛋白,20%,奥克特玛玛,奥地利维也纳),以移液管对每 ml 载体沉淀物移入 2.5ml HSA 溶液,用作涂覆。
- [0090] d) 以该 HSA 溶液在 10° C 下培养该载体悬浮液至少 12 小时。
- [0091] e) 在培养期后,在 5 倍量的 0.9%NaCl 溶液中洗涤该以 HSA 涂覆的 HPR10 吸附体一次,并将其离心(4,000g,10 分钟)。弃置上层清液,其后以 PMB 进行涂覆:
- [0092] f) 就以 PMB 涂覆方面,制备合适分量的 5mg/ml 浓度的 PMB 溶液。多粘菌素 B(PMB)购自西格玛奥德里奇公司(货号:81334,批号 1348744)。
- [0093] g) 以移液管对每 ml 吸附体沉淀物移入 5ml PMB 溶液,用作涂覆。
- [0094] h) 以该 PMB 溶液在 20° C 下培养该吸附体悬浮液 60 分钟。
- [0095] i) 在培养期后,对该吸附体悬浮液进行离心(4,000g,10 分钟),并在 5 倍量的 0.9%NaCl 中洗涤 3 次。
- [0096] j) 将该最终以 HSA 和 PMB 涂覆的 HPR10 吸附体(HPR10+HSA+PMB)作为 50% 悬浮液在 0.9%NaCl 中贮存到冰箱里。
- [0097] 在检测对内毒素的吸附时,对 HPR10+PMB+HSA 和 HPR10+PMB 互相比。作为对照,无吸附体的试管(Ko o Ads)以同样的方式被测试。

[0098] 2.2. 批量测试

- [0099] 使用内毒素加样(5ng/ml),在肝素血浆中培养 1%(v/v) 吸附体(HPR10+PMB、HPR10+HSA+PMB 和 HPR10+PMB+HSA)。
- [0100] 使用 LPS *Pseudomonas aeruginosa*(西格玛奥德里奇公司,L7018,批号 128K4115)作内毒素加样。将在 -70° C 下贮存在微量离心管中的已被分成多份(每份为 100 μ l 110³g/ml(mg/ml))的内毒素解冻,并将其与 900 μ l LAL 水混合。随后,该些内毒素在 NaCl 中进一步稀释至所需的 50ng/ml 浓度。在该测试的批次中,内毒素溶液进一步稀释至 5ng/ml 的最终浓度。
- [0101] 在 3、6 和 24 小时后取样,并以 PMB 测定法 [Cao et al., 2008. Development and validation of reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for polymyxin B in human plasma. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62:1009-1014] 分析在肝素血浆中 PMB 解吸的量。重复进行该批量测试两次。在 24 小时后,HPR10+PMB 的平均 PMB 解吸量为 26.6mg/l、HPR10+HSA+PMB 为 13.4mg/l 而 HPR10+PMB+HSA 为 14.4mg/l (见图 1)。当根据本发明以 PMB 和 HSA 涂覆吸着剂(HPR+HSA+PMB 和 HPR+PMB+HSA)时,与仅以多粘菌素涂覆的吸着剂(HPR10+PMB)相比,PMB 从该吸附体表面的解吸可减少 45%。
- [0102] 额外以白蛋白涂覆并未损害对内毒素的吸附能力(见图 2)。
- [0103] 综上所述,根据本发明的吸着剂确实与仅以多粘菌素涂覆的吸着剂具有同样高的内毒素吸着效率和速度。然而,额外以白蛋白涂覆导致从载体解吸的有毒多粘菌素 B 显著减少,并因此提高对病人的安全性。

[0104] 3. 例 3:对肝素和蛋白 C 的吸附

[0105] 3.1. 测试背景

- [0106] 许多吸附体的缺点是不但会消除要去除的物质,在本案是内毒素,而且大量生理上重要的蛋白和凝血系统的因子(包括抗凝剂和促凝物质两者)亦会被消除。在这方面,须

特别提到病人自身的凝血抑制剂,如蛋白 C 和蛋白 S。特别重要的是作为凝血抑制因子的蛋白 C。体内蛋白 C 的浓度下降会导致严重的凝血并发症,如静脉血栓形成和肺栓塞。通过输注额外引入到体外血液回路中的抗凝剂肝素会被许多吸附体消除。这会导致体内凝血系统失衡以及在体外和 / 或体内血液回路中有不想要的抗凝作用,给病人带来很大的危害。

[0107] 因此,在这例 3 中的测试用来在不想要的对肝素和蛋白 C 的吸附方面来检测根据本发明的新颖吸着剂。对两种不同粒子大小(#1824/5 μm 和 HPR10/10 μm ——见例 1)和带有不同涂层(未涂覆 / 仅以多粘菌素 B 涂覆 / 以多粘菌素 B 和人血清白蛋白涂覆)的不同载体作比较。在肝素血浆(与肝素混合的血浆)中检测对肝素的吸附。在柠檬酸盐血浆(与柠檬酸盐混合的血浆)中检测对蛋白 C 的吸附。

[0108] 3.2. 吸附体物料

[0109] 带有不同涂层的吸附体互相比:

[0110] - 未涂覆的载体(#1824 和 HPR10),

[0111] - 仅以多粘菌素 B 涂覆的载体(#1824+PMB 和 HPR10+PMB),以及

[0112] - 根据本发明以多粘菌素 B 和白蛋白涂覆的载体(#1824+PMB+HSA 和 HPR10+PMB+HSA)。

[0113] 如上文在第 1.2 节中的生产方案所述般制备根据本发明的吸附体 #1824+PMB+HSA 和 HPR10+PMB+HSA 的 50% 吸附体悬浮液。按照在例 1 中的生产方案的步骤 a) - f) 制备的该些吸附体的 50% 吸附体悬浮液,其仅以多粘菌素 B 涂覆。

[0114] 表 3 列出了在这例 3 中使用的吸附体。

[0115] 表 3:

[0116]

吸附体标号	吸附体说明
#1824	未涂覆的 microadsorber
#1824+PMB	Microadsorber, 以多粘菌素 B 涂覆
#1824+PMB+HSA	Microadsorber, 首先以多粘菌素 B 然后以 HSA 涂覆
HPR10	未涂覆的 Amberchrom® HPR10
HPR10+PMB	Amberchrom® HPR10, 以多粘菌素 B 涂覆
HPR10+PMB+HSA	Amberchrom® HPR10, 首先以多粘菌素 B 然后以 HSA 涂覆

[0117] 作为对照,充有血浆而无吸附体的试管(Ko o Ads)以同样的方式被测试。

[0118] 3.3. 血浆

[0119] a) 肝素血浆(标称:每 ml 血浆 10IU 肝素)

[0120] b) 柠檬酸盐血浆(标称:每 ml 血浆 11mmol 柠檬酸盐)

[0121] 3.4. 批量测试

[0122] 进行两项批量测试 A 和 B。在该测试的批次中,在试管中以肝素血浆(批量测试 A)和以柠檬酸盐血浆(批量测试 B)培养不同吸附体的 50% 吸附体悬浮液,借此在各测试中将 1470ml 血浆与 30ml 吸附体悬浮液混合。

[0123] 在 0、15 和 60 分钟的时间分析(在肝素血浆中)对肝素和(在柠檬酸盐血浆中)对蛋白 C 的吸附：

[0124] 在 15 和 60 分钟后取样：

[0125] 在 15 分钟后，取出 500 μ l 样本，并以 4,000g 的离心力离心 5 分钟，然后以等分试样：1x100 μ l(蛋白 C)、1x250 μ l(肝素)、1x 余下部分(约 150 μ l)。该些等分试样在 -20° C 下贮存以待分析。

[0126] 在 60 分钟后，取出 500 μ l 样本，并以 4,000g 的离心力离心 5 分钟，然后以等分试样：1x100 μ l(蛋白 C)、1x250 μ l(肝素)、1x 余下部分(约 150 μ l)。该些等分试样在 -20° C 下贮存以待分析。

[0127] 3.5. 批量测试的结果

[0128] 图 3 和 4 载列了该些批量测试的结果：

[0129] 图 3 显示了该些不同吸附体在肝素血浆中对肝素的吸附。意外的是，其显示了使用根据本发明以多粘菌素 B 和 HSA 涂覆的吸着剂(吸附体)，特别是使用粒子小(粒子大小为 5 μ m)的吸附体，可减少不想要的对肝素的吸附。

[0130] 图 4 显示了该些不同吸附体在柠檬酸盐血浆中对蛋白 C 的吸附。其显示了根据本发明的吸附体几乎不会吸附蛋白 C，而与其他吸附体(未涂覆或仅以多粘菌素 B 涂覆)相比，对蛋白 C 的吸附基本上维持一致(HPR10+PMB+HSA - 10 μ m 粒子直径)或甚至明显减少(#1824+PMB+HSA - 5 μ m 粒子直径)。

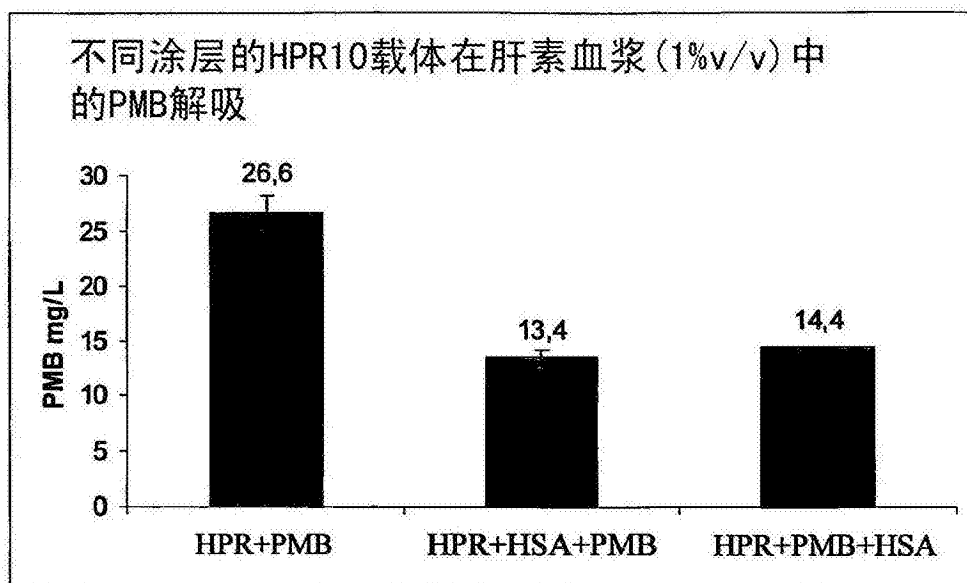


图 1

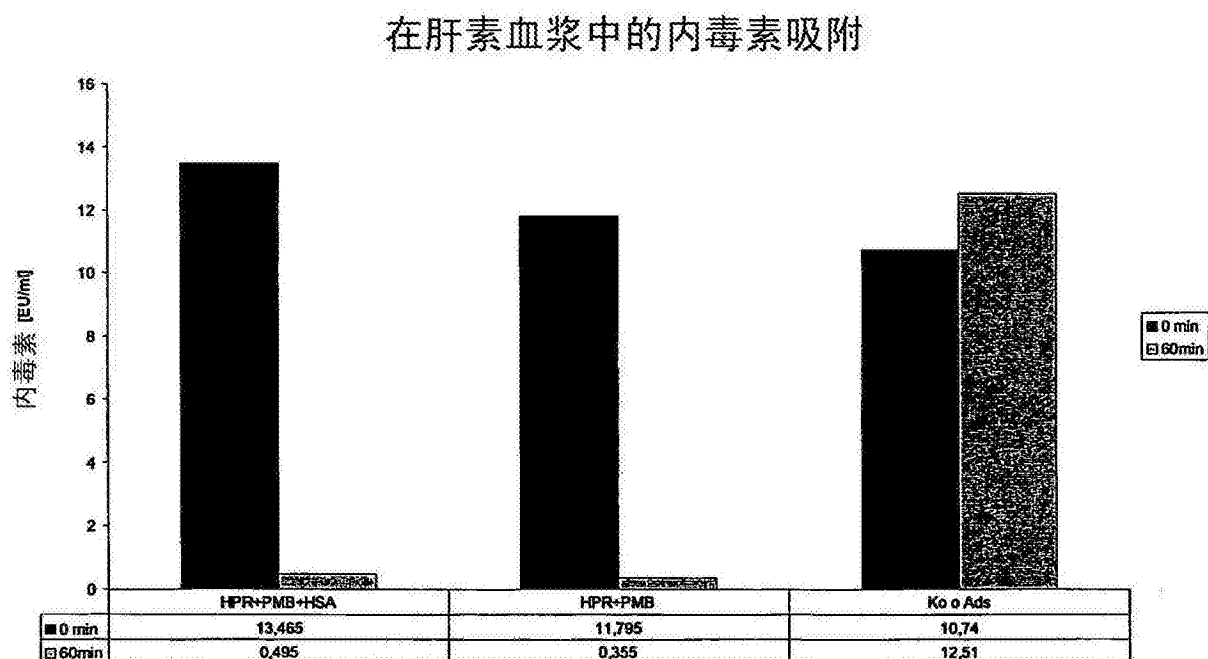


图 2

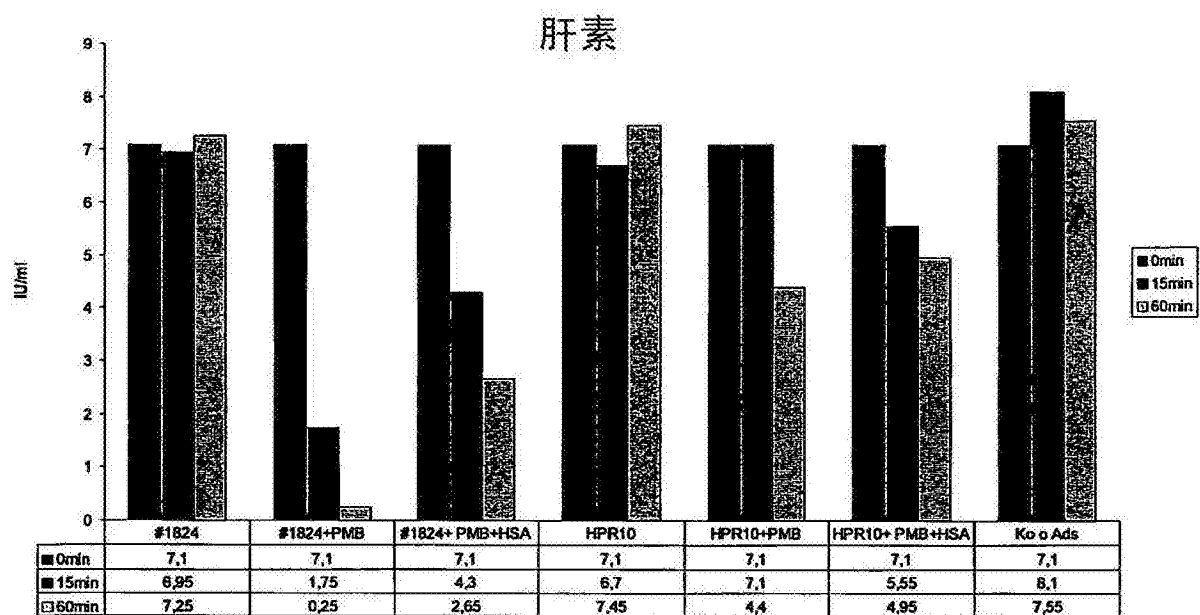


图 3

在柠檬酸盐血浆中的蛋白C

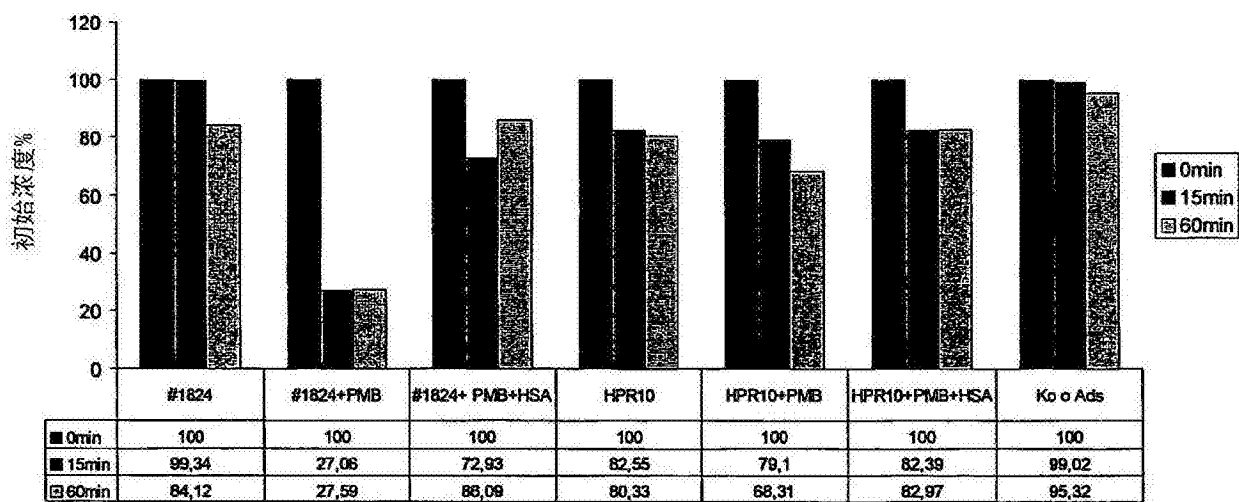


图 4