



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102363624 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201110167613. 0

研究进展. 《影响科学与光化学》. 2010, 第 28 卷 (第 1 期), 65-78.

(22) 申请日 2011. 06. 20

审查员 吕健

(30) 优先权数据

61/356, 115 2010. 06. 18 US

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港九龙红磡

(72) 发明人 李蓓 何健民

(74) 专利代理机构 北京金思港知识产权代理有限公司 11349

代理人 邵毓琴

(51) Int. Cl.

C07K 1/22(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007184120 A1, 2007. 08. 09,

CN 1445797 A, 2003. 10. 01,

CN 101512013 A, 2009. 08. 19,

王莹. 核壳型纳米粒子合成方法及其性能的

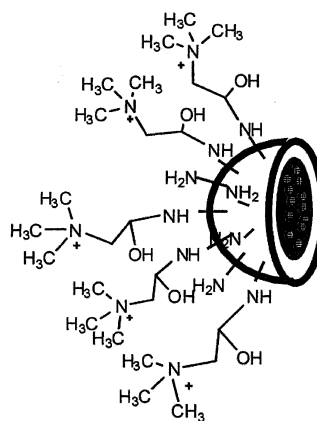
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

使用两亲核-壳型纳米吸附剂对内毒素的去除

(57) 摘要

一种使用核-壳型纳米颗粒从蛋白质制备物中去除内毒素的方法, 所述核-壳型纳米颗粒具有选择性地吸附蛋白质混合物中的内毒素分子的能力。所述方法包括如下步骤:(a) 制备多个核-壳型纳米颗粒;(b) 将所述核-壳型纳米颗粒添加到含有内毒素的蛋白质制备物中;(c) 将所述核-壳型纳米颗粒与所述蛋白质制备物一起温育一段时间;和(d) 从所述蛋白质制备物中分离出纳米颗粒。



1. 一种从混合物中去除内毒素的方法,所述方法包括如下步骤:
  - (a) 获得多个核-壳型纳米颗粒,所述颗粒包含乙烯基聚合物的核或乙烯基聚合物和磁性纳米颗粒的核,和含有在邻近季铵离子的 $\beta$ -羟基的阳离子水溶性聚合物的壳;
  - (b) 将所述核-壳型纳米颗粒添加到含有内毒素的蛋白质制备物中;
  - (c) 将所述纳米颗粒与所述蛋白质制备物一起温育一段时间;和
  - (d) 从所述蛋白质制备物中分离出纳米颗粒。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述蛋白质制备物在缓冲液中并具有3至10的pH值。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述缓冲液选自由乙酸盐缓冲液、磷酸钠缓冲液、TRIS和1×PBS组成的组。
4. 如权利要求2所述的方法,其中所述缓冲液是乙酸盐缓冲液,并且所述pH值为4至5。
5. 如权利要求2所述的方法,其中所述缓冲液是磷酸钠缓冲液,并且所述pH值为6至8。
6. 如权利要求2所述的方法,其中所述缓冲液是TRIS,并且所述pH值为9左右。
7. 如权利要求2所述的方法,其中所述缓冲液是1×PBS,并且所述pH值为7.2左右。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述蛋白质制备物具有5mM至15mM的电解质浓度。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述电解质浓度为约10mM。
10. 如权利要求1所述的方法,其中所述蛋白质制备物具有与1×PBS的电解质浓度相同的电解质浓度。
11. 如权利要求1所述的方法,其中所述蛋白质制备物包含等电点在4至11之间的蛋白。
12. 如权利要求1所述的方法,其中所述核-壳型纳米颗粒具有磁性,并且通过磁力进行步骤(d)中从所述蛋白质制备物中对纳米颗粒的分离。
13. 如权利要求1所述的方法,其中所述核-壳型纳米颗粒是非磁性的,并且通过过滤或通过离心进行步骤(d)中从所述蛋白质制备物中对纳米颗粒的分离。

## 使用两亲核 - 壳型纳米吸附剂对内毒素的去除

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是在 2009 年 1 月 26 日提交的美国专利申请 No. 12/359, 393 的部分继续申请 (continuation-in-part application), 并要求受益于在 2010 年 6 月 18 日提交的美国临时申请 No. 61/356, 115 的权益。在此通过参考方式引入前述两份申请的全部内容。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及从蛋白质制备物 (proteins preparation) 中去除内毒素的方法。具体地说, 本发明涉及使用两亲核 - 壳型纳米吸附剂 (amphiphilic core-shell nanosorbent) 从蛋白质混合物中选择性地去除内毒素的方法。

### 背景技术

[0004] 内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 来自大部分革兰氏阴性细菌 (包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)) 的细胞壁, 并且经常在蛋白质生成的过程中大量存在。由于少量内毒素的存在可以对动物造成严重的炎症和脓毒性休克, 因此蛋白质药物的 LPS 水平应当低于 10EU/mL, 以确保该药物通过静脉注射的安全使用。

[0005] 目前降低内毒素的手段主要基于带正电的吸附剂和带负电的内毒素之间的静电相互作用。例如, 过滤、阳离子交换层析、Triton X-114 相分离、阳离子聚合物吸附剂 (如组胺 - 或组氨酸 - 固定化琼脂糖 (Sepharose) 和葡聚糖包被颗粒是常用的方法。然而, 这些方法在将内毒素从含有其他酸性蛋白如牛血清白蛋白 (BSA) 的蛋白质溶液中去除时选择性欠佳。选择性欠佳的原因在于, 酸性蛋白质和内毒素在中性 pH 时具有相同的负电荷, 因而通过静电相互作用进行的吸附无法区分不同的酸性蛋白质, 导致目标酸性蛋白质的大量损失。

[0006] 为了选择性地只吸附蛋白质混合物中的 LPS, 而不吸附其他蛋白质, Miltenyi Biotech. 研发了一类包被有多阳离子配体的磁性颗粒 (它们的具体化学组成没有公开)。据称所述颗粒能够从 BSA 溶液中选择性地吸附 LPS, LPS 的去除效率高达 99%, 而 BSA 的回收率为 96%。然而, 如此高的选择性只能在相对较低的缓冲强度 (例如 0.1M 磷酸盐缓冲液, pH 7) 和特定的缓冲液类型 (磷酸盐缓冲液) 中实现。对于其他缓冲溶液如在 50mM Tris 缓冲液 (pH 7), 尽管仍然可以实现高的 LPS 去除效率, 但是蛋白质回收率显著降低到 67%。实现选择性去除 LPS 的另一种手段是使用多粘菌素 B- 固定化柱。其选择性能归因于脂质 A 与 LPS 分子之间的疏水性相互作用。然而, 该方法在采用小样品体积时蛋白质损失严重。由在表面上固定有阳离子配体如多粘素 B、聚-L-赖氨酸和多 (乙烯亚胺) 的尼龙制得的微滤膜也有用来选择性地去除 LPS。尽管聚合物包被膜可以得到满意的吸附性能并对内毒素表现出选择性, 但是它们良好的性能限于低盐浓度 (例如 0.02M 磷酸盐缓冲液)。另外, 多粘素 B 在 LPS 吸附过程中的渗漏问题是一种严重的问题, 这是因为多粘素 B 对动物具有神经毒性和肾毒性。该方法的另一个问题是过滤器封堵, 这是与微滤膜使用有关的一个常见问题。因此, 仍然非常需要能够在缓冲溶液的大范围的 pH、盐浓度和类型下在酸性或碱性蛋

白质溶液存在的情况下选择性地并有效地去除内毒素的方法。

[0007] Chisso Corp. 公开了由聚赖氨酸固定化纤维素多孔性微球制成的吸附剂 (Chisso Corp. :Cellufine™ ET clean)。这些吸附剂在生理缓冲液 (离子强度为 0.1 至 0.5M, pH7) 下表现出满意的 LPS 吸收能力和选择性。这些材料的成功归因于两个主要特征:选择性内毒素结合配体聚赖氨酸和多孔性结构的存在。多孔性结构的存在为选择性吸收和捕获 LPS 分子提供了大的表面积和适当的孔径尺寸,这是因为内毒素分子小到足以扩散到颗粒小孔中,并保留在微球内。较大尺寸的蛋白由于它们的尺寸大于微球小孔的排阻限而被迅速洗脱。然而,由于多孔性纤维素微球采用随机悬浮交联法制备,它们的颗粒和孔径不均一,造成再现性欠佳。另外,该方法包括多步骤表面修饰并采用昂贵的试剂如聚赖氨酸。使用多孔性材料经常碰到的另一个问题是缓慢的 LPS 吸附动力学,这是因为 LPS 必须从外部环境扩散到微球的小孔中以进行吸附。因此,该方法非常耗时 (批量方法需要 2 小时的温育时间)。作为亲和层析法,当将微球填充到柱子中时,必须保持缓慢的流速 (0.17mL/min (毫升/分钟) 至 0.5mL/min) 以实现 LPS 的高效去除。

[0008] 最近,据 Yuan 等报道,在使用一种含有在邻近季铵离子的  $\beta$  位带有羟基的配体的吸附剂时,内毒素的吸附能力在 pH 小于 7 时能够提高近 8 倍。该显著改善归因于内毒素分子的磷酸基团的氢原子和  $\beta$ -羟基的氧原子之间的强的氢键结合。所述氢键结合导致八元环的形成。然而,由于配体和吸附剂的接枝密度低,该方法得到的 LPS 吸附效率难以满意。另外,针对 LPS 的最佳工作 pH 必须低于 pH 7,因而限制了蛋白质的范围。

[0009] 因此,一直非常需要克服上述问题的去除内毒素的新方法。

## 发明内容

[0010] 因此,本发明的一个目的是提供一种以高选择性和高效率从蛋白质制备物中去除内毒素的方法,并且所述方法在缓冲溶液的宽范围的 pH、盐浓度和类型下在酸性或碱性蛋白质溶液中进行。该目的通过使用两亲核-壳型纳米吸附剂来实现,所述两亲核-壳型纳米吸附剂具有选择性吸附在蛋白质混合物中的内毒素的能力。尽管无意受特定理论的束缚,但是据信所述纳米吸附剂包含乙烯基聚合物的核或乙烯基聚合物和磁性纳米颗粒的核,和含有在邻近季铵离子的  $\beta$ -羟基的阳离子水溶性聚合物的壳 (如图 1 所示)。所述两亲核-壳型纳米吸附剂具有高的内毒素结合能力,该能力归因于各种分子相互作用 (如疏水性和静电相互作用) 以及氢键结合。在本发明中描述的去内毒素的所述方法包括在纳米吸附剂存在下温育蛋白质溶液,然后进行磁性分离或过滤。经纯化的蛋白质溶液具有非常低的内毒素水平,因而允许进行进一步的处理、分析或者甚至直接施用于动物。

[0011] 优选的是,根据本发明的去除内毒素的方法包括如下步骤:(a) 制备多个核-壳型纳米颗粒;(b) 将所述核-壳型纳米颗粒添加到含有内毒素的蛋白质制备物中;(c) 将所述纳米颗粒与所述蛋白质制备物一起温育一段时间;(d) 从所述蛋白质制备物中分离出纳米颗粒。所述蛋白质制备物可以在由本领域普通技术人员所选择的任何适当的缓冲液中。适当缓冲液的实例为乙酸盐缓冲液、磷酸钠缓冲液、TRIS、1×PBS 等。所述蛋白质制备物的电解质浓度可以具有宽的范围 (优选为 10mM),并且可以与生理值相同。所述蛋白质制备物还可以具有宽范围的 pH 值,例如 3 至 10。

## 附图说明

[0012] 图 1 是本发明中使用的磁性核 - 壳型纳米吸附剂的结构示意图。

[0013] 图 2 显示了制备本发明中使用的磁性核 - 壳型纳米吸附剂时的合成步骤。

[0014] 图 3 是显示根据本发明使用磁性核 - 壳型纳米吸附剂去除内毒素的程序的示意图。

## 具体实施方式

### [0015] 核 - 壳型纳米吸附剂

[0016] 本发明方法使用一类核 - 壳型纳米吸附剂, 所述核 - 壳型纳米吸附剂已经在专利申请 (美国专利申请 No. 12/359, 393) 中公开。所述两亲核 - 壳型纳米吸附剂具有选择性吸附蛋白质混合物中的内毒素分子的能力。如图 1 所示, 所述纳米吸附剂包含乙烯基聚合物的核或乙烯基聚合物和磁性纳米颗粒的核, 和含有在邻近季铵离子的  $\beta$ -羟基的阳离子水溶性聚合物的壳。所述壳可以通过各种特制 (tailor-made) 分子相互作用而选择性地结合内毒素分子。

[0017] 在该纳米吸附剂中使用的核材料包括诸如聚 (甲基丙烯酸甲酯)、聚苯乙烯、聚 (丙烯酸正丁酯) 等疏水性乙烯基聚合物, 还包括乙烯基聚合物的混合物。所述核还可以是交联亲水性聚合物如聚 (N-异丙基丙烯酰胺)。出于随后在磁场分离纳米吸附剂的目的, 磁性纳米颗粒可以包封在疏水性核中。磁性纳米颗粒具有式  $MO \cdot Fe_2O_3$ , 其中 M 是铁、镍、钴、锰、铜和铂。在一个优选的实施方式中, 所述核由聚 (甲基丙烯酸甲酯) 和磁赤铁矿纳米颗粒组成。所述阳离子壳材料是天然的或合成的含有在邻近季铵离子的  $\beta$ -羟基的水溶性聚合物。所述水溶性聚合物的实例包括 N-丙烯酰基糖如脱乙酰壳多糖, 或其他生物聚合物和合成的含氨基的聚合物如聚乙烯亚胺、聚 (乙烯胺)-co-聚 (乙烯醇) 聚 (乙烯胺)-co-(聚丙烯腈) 等。在该优选的实施方式中, 在所述壳中使用的含氮化合物由脱乙酰壳多糖或其衍生物制得。邻近季铵离子的所述  $\beta$ -羟基可以通过共价连接的方式导入到所述水溶性聚合物上。

[0018] 所述两亲核 - 壳型纳米吸附剂不受特别限制, 可以是固定到膜上的球形多孔性颗粒和凝胶的任何形式。所述纳米吸附剂还可以是磁性或非磁性形式。当所述纳米吸附剂为非磁性形式时, 该纳米吸附剂可以使用离心和 / 或膜过滤从蛋白质溶液中分离。当所述纳米吸附剂为磁性形式时, 它们可以使用磁力或采用上述用于去除非磁性纳米吸附剂的任意方法进行分离。在该优选的实施方式中, 将具有磁性的球形纳米吸附剂用于小体积 (小于 10mL) 的内毒素去除。

[0019] 制备磁性核 - 壳型纳米吸附剂的方法不受特别限制, 并且已经公开在该专利申请中 (美国专利申请 No. 12/359, 393)。所述磁性纳米吸附剂通过在乙烯基包被磁性纳米颗粒的存在下, 由来自含有氨基的水溶性聚合物的乙烯基单体 (一种或多种) 的过氧化氢诱导接枝聚合进行合成。反应步骤包括: (1) 合成柠檬酸盐包被磁性纳米颗粒; (2) 对柠檬酸酯包被纳米颗粒进行表面修饰以含有乙烯基包被表面; (3) 通过来自含有氨基的水溶性聚合物或来自同时含有氨基和邻近季铵离子的  $\beta$ -羟基的水溶性聚合物的乙烯基单体 (一种或多种) 的过氧化氢诱导接枝聚合包封乙烯基包被磁性纳米颗粒。使用所述方法所制备的核 - 壳型纳米吸附剂具有非常均一的尺寸分布 (多分散性小于 1.20), 并且它们的颗粒尺寸

在 100nm 至 500nm 之间,但是也可以制得其它颗粒尺寸。

[0020] 在含氨基的水溶性聚合物的亲水性壳上产生邻近季铵离子的  $\beta$ -羟基的方法是共价连接方式。亲水性壳的伯胺基团采用环氧化合物作为反应性官能团进行转化,其中所述化合物由在其侧链的季铵基团组成,如缩水甘油基三甲基氯化铵。应该理解的是,所述化合物作为例子提供,其他化合物也可以用来达到满意的结果。

[0021] 这种修饰的优选例说明如下:对于总共 250mL 的溶液,在 50°C 至 60°C 在  $N_2$  氛围下,将 1.6g 的缩水甘油基三甲基氯化铵 (GTMAC) 添加到 250mL 的核-壳型颗粒分散液 (0.25 重量%,在水中) 中。在 80°C 在氮气下连续搅拌所得到的混合物 2 小时。反应后,通过反复膜过滤 (使用 100nm 孔径膜) 对所述颗粒分散液进行纯化,直到滤液的电导率接近所用蒸馏水的电导率。

[0022] 制备磁性核-壳型纳米吸附剂的具体实施方式包括如图 2 所示的 4 个步骤并说明如下。

[0023] 步骤 1:柠檬酸盐包被磁性纳米颗粒的合成

[0024] 将  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (1.99g) 和无水  $FeCl_3$  (3.25g) 分别溶解在水 (20mL) 中,并在剧烈搅拌下混合。然后在室温下向在搅拌中的混合物中添加  $NH_4OH$  溶液 (0.6M, 200mL),再立即加入  $NH_4OH$  浓溶液 (25 重量%, 30mL) 以使反应 pH 保持在 11 至 12 之间。在室温下持续搅拌所得的黑色分散液 1 小时,然后加热回流 1 小时而获得褐色分散液。然后通过反复离心 (3000-6000rpm (转/分钟), 20 分钟)、倾析和再分散循环 3 次直到获得稳定的褐色磁性分散液,对磁性纳米颗粒进行纯化。总共为 100mL 的如先前所述制备的  $\gamma-Fe_2O_3$  纳米颗粒分散液 (2.42 重量%) 用  $HNO_3$  溶液 (4M, 100mL) 酸化,然后再以 3000rpm 离心以收集磁性纳米颗粒。将所收集的磁性纳米颗粒重分散到水 (200mL) 中,并加热回流该分散液。然后,添加二水合柠檬酸三钠 (11.7g),再在回流条件下将混合物加热 1 小时,以生成柠檬酸盐包被氧化铁 (iron oxide) 纳米颗粒。通过如下方法对该褐色分散液进行纯化:在水中透析 (10kDa 截留分子量, Sigma-Aldrich),每天换水,直到水的电导率与所用纯净水的电导率相当为止。

[0025] 步骤 2:乙烯基包被磁性纳米颗粒的合成

[0026] 首先获得上述  $c-Fe_2O_3$  纳米颗粒。通过将经纯化的柠檬酸盐包被纳米颗粒 (8.5 重量%, 20mL) 分散液与甲醇 (80mL) 于 40°C 预混合 1 小时,在  $c-Fe_2O_3$  纳米颗粒的表面上包被二氧化硅前体层。添加浓氨水溶液 (25 重量%, 1.8mL) 并在 40°C 搅拌所得混合物 30 分钟。接着,向反应器中加入原硅酸四乙酯 (TEOS, 1.0mL) 并持续搅拌该混合物 24 小时。最后,添加甲基丙烯酸 3-(三甲氧基甲硅烷基) 丙基酯 (MPS, 5.3mL) 并让该混合物反应 24 小时,得到乙烯基包被的  $\gamma-Fe_2O_3$  纳米颗粒。通过隔着容器壁放置永久磁铁 (4 特斯拉) 收集该乙烯基包被的纳米颗粒,然后弃掉溶液。将所收集的磁性纳米颗粒重分散到乙醇中,并将该分散液转移到透析管 (10kDa 截留分子量, Sigma-Aldrich) 中,在乙醇中透析 1 周,每天更换乙醇,以去除未反应的 MPS、TEOS 和  $NH_3$ 。通过使用 PerkinElmer UV-vis 分光光度计 (Lambda 35) 在 203.5nm 进行紫外线 (UV) 测量来监测通过透析去除的未反应的 MPS 分子的量。最后,将经纯化的分散液浓缩至 10.0 重量%的固体含量以进行后续反应。

[0027] 步骤 3:磁性核-壳型 (MCS) 颗粒的合成

[0028] 对于共总为 25mL 的溶液,将 1mL 乙烯基包被的伽马相氧化铁纳米颗粒分散液 (10

重量%，在乙醇中）与乙醇混合，然后与 22mL 含有 0.25g 脱乙酰壳多糖和 0.6 体积%乙酸（99 重量%）的脱乙酰壳多糖溶液混合，使得 H<sub>2</sub>O/乙醇的最终体积比为 12.5 : 1。然后将分散液转移到配有温度计、冷凝器、磁力搅拌器和氮气入口的水套瓶中。对该分散液鼓入氮气 20 分钟并在 80℃ 搅拌，然后加入 MMA (0.6g) 和 TBHP (终浓度为 0.1mM)。在氮气下在 80℃ 将所得混合物持续搅拌 2 小时。反应后，过滤颗粒分散液以去除在聚合过程中所产生的沉淀（如果有的话）。采用重量分析法测定 MMA 转化率（转化%）。通过反复离心、倾析、再分散循环直到上清液的电导率接近所用蒸馏水的电导率，对颗粒分散液进行纯化。

[0029] 步骤 4:磁性核-壳型纳米吸附剂的合成

[0030] 对于总共为 250mL 的溶液，在 50℃ 至 60℃ 在 N<sub>2</sub> 气氛下，将 1.60g 缩水甘油基三甲基氯化铵 (GTMAC) 添加到 250mL 磁性核-壳型颗粒分散液 (0.25 重量%，在水中) 中。在 80℃ 在氮气下将所得混合物持续搅拌 2 小时。反应后，通过反复膜过滤（使用 100nm 孔径膜）直至滤液的电导率接近所用蒸馏水的电导率来纯化颗粒分散液。

[0031] 使用核-壳型纳米吸附剂进行内毒素的选择性去除

[0032] 通过使用本发明中的两亲核-壳型纳米吸附剂从含内毒素的液体中选择性地去除内毒素的方法不受特别限制。该方法在从生理缓冲液（如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或在静脉注射前的最后步骤中使用的缓冲液中的含其他蛋白质的溶液中去内毒素时特别有效。图 3 显示了基于根据本发明的磁性核-壳型纳米吸附剂的具体内毒素去除方法，该方法包括在预先确定的优化条件下将所述蛋白质溶液与所述纳米吸附剂一起温育，然后进行磁性分离并得到经纯化的蛋白质溶液。所收集的蛋白质溶液具有非常低的内毒素水平，可以直接用于进一步的处理、分析或甚至施用于动物。下文提供了根据本发明的方法的具体实施方式。

[0033] 实施例 1:内毒素吸附的表征

[0034] 称重实施例 1 中制备的各磁性核-壳型纳米吸附剂，并将其分散在水中。它们的最终浓度全部为 0.55%。对于总共为 2mL 的溶液，将 0.35mL 平均直径为 150nm 的磁性核-壳型纳米吸附剂导入到 1mL 磷酸钠缓冲液 (pH6.995, 20mM)。然后，向其中加入 3ng/mL 来自大肠杆菌的内毒素（由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造的 LPS）并在室温下温育 30 分钟。温育后，对该混合物进行磁性分离，收集经纯化的溶液。使用 Tachypleus Amebocytelysate (TAL) 分析法对所处理溶液的内毒素浓度进行测量 (Zhanjiang A&C biological Ltd.)。

[0035] 采用与实施例 1 中相同的方式进行磁性核-壳型纳米吸附剂对其他缓冲液和 pH 溶液中的内毒素吸附的实验。吸附效率和能力的结果总结在表 1 中。所述纳米吸附剂在宽的 pH 范围和各种缓冲试剂中表现出高的内毒素去除效率（大于 98%）。

[0036] 表 1. 在各种缓冲液和 pH 溶液中的内毒素吸附量

[0037]

缓冲液/缓冲试剂	pH 范围	电解液浓度	内毒素去除效率(%)	纳米吸附剂的内毒素量 (EU/mg)
乙酸盐缓冲液	4	10 mM	98.5-98.67%	1555-1557
	5	10 mM	98.17-98.33%	1550-1553
	6	10 mM	98.3-98.5%	1553-1555
	7	10 mM	99.17-99.33%	1566-1568
磷酸钠	8	10 mM	99.67-99.83%	1576-1577
TRIS	9	10 mM	93.5-93.67%	1476-1479
1×PBS	7.2	1×	99.67-99.83%	1573-1576

[0038] 实施例 2:内毒素的选择性去除的方法

[0039] 对于总共为 2mL 的溶液,将 0.35mL 平均直径为 150nm 的磁性核-壳型纳米吸附剂导入到 0.2mL 10× 磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.2) 中。然后,向其中加入 0.4mL 牛血清白蛋白 (BSA,5mg/mL),再加入 3ng/mL 来自大肠杆菌的内毒素 (由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造的 LPS)。然后,在室温下将混合物温育 30 分钟。温育后,对该混合物进行磁性分离,收集经纯化的溶液。使用 Tachypleus Amebocytelysate (TAL) 分析法对所得溶液的内毒素浓度进行测量,并通过根据 Bradford 法的蛋白质分析法测定蛋白质浓度。

[0040] 采用与实施例 1 中的相同方式进行纳米吸附剂在各种蛋白质混合物的存在下对内毒素的吸附的实验。吸附效率和吸附量的结果总结在表 2 中。所述纳米吸附剂在生理缓冲液 (1×PBS) 下表现出高的内毒素吸附 (大于 98%),并且几乎没有蛋白质吸附 (大于 99% 的蛋白质回收率)。该结果表明,所述纳米吸附剂即使在负性蛋白质的存在下也能够选择性地去除内毒素。

[0041] 表 2. 使用磁性核-壳型纳米吸附剂对各种蛋白质混合物进行选择性内毒素吸附

[0042]

蛋白质	等电点 (pI)	缓冲液	蛋白质浓度 (mg/mL)	内毒素单位的初始量	吸附量 (EU/mg)	内毒素去除 (%)	蛋白质回收率 (%)
BSA	4.7	1×PBS	1.0	3000	1566-1568	99.0-99.2	>99
人类精氨酸酶	9.3	1×PBS	0.09	3000-4000	1573-1576	99.7-99.8	>99
溶菌酶	10.7	1×PBS	1.0	3000	1555-1558	98.5-98.67	>99

[0043] 虽然已经描述并指出本发明应用于其优选的实施方式的基本新特征,但是应当理解的是,本领域技术人员可以对所述具体实施方式的形式和细节作出各种省略、替换以及改变,这些并没有脱离本发明的实质。本发明不受仅作为例子提供的上述实施方式的限制,而是可以以各种方式在所附专利权利要求书限定的保护范围内加以改进。



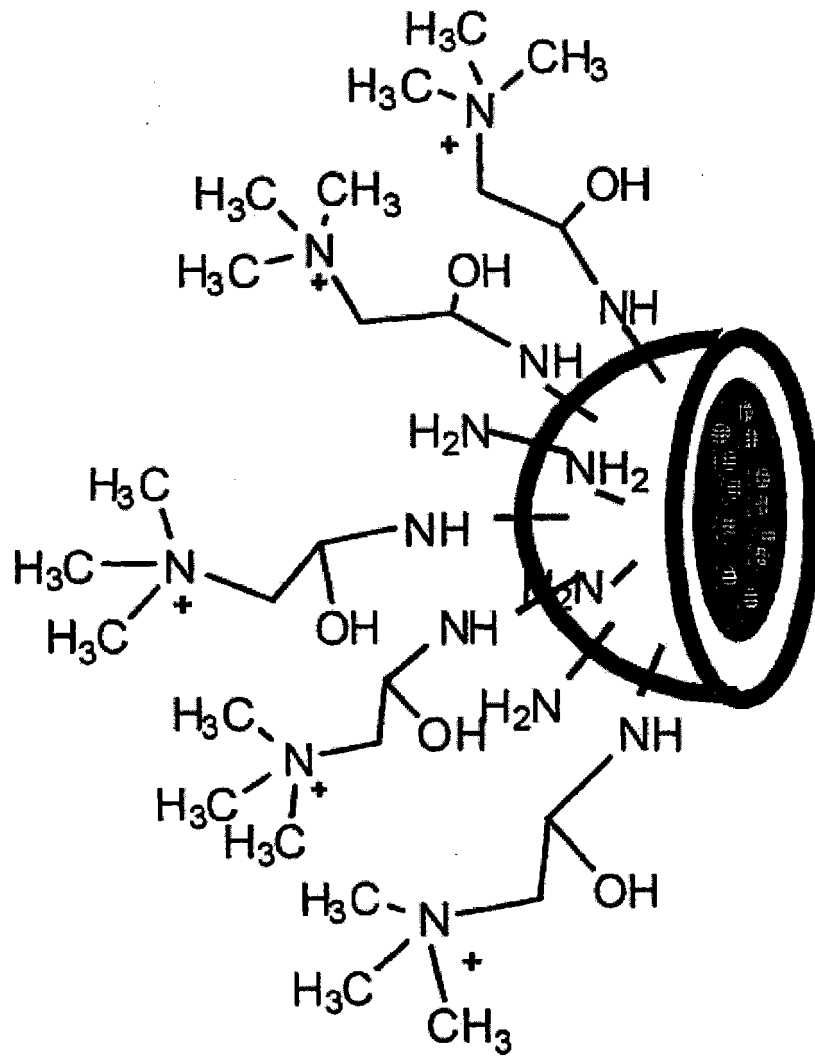
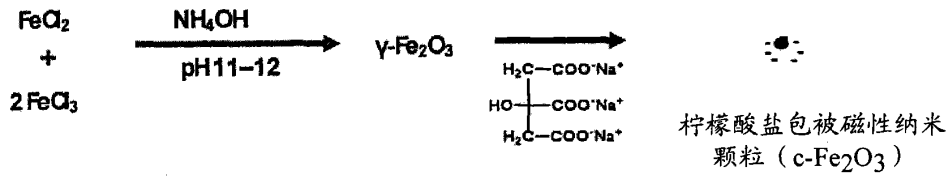
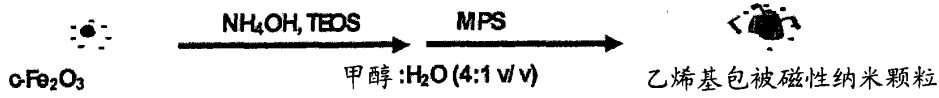


图 1

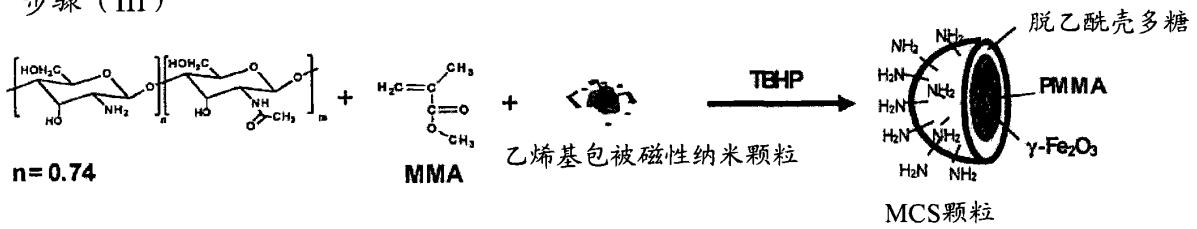
步骤 (I)



步骤 (II)



步骤 (III)



步骤 (IV)

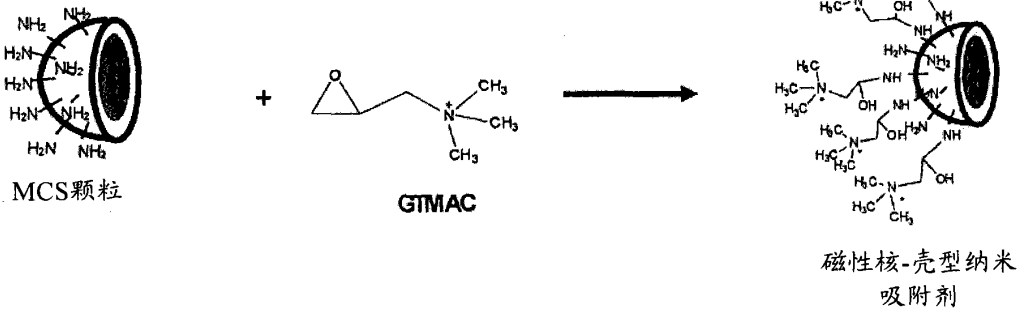


图 2

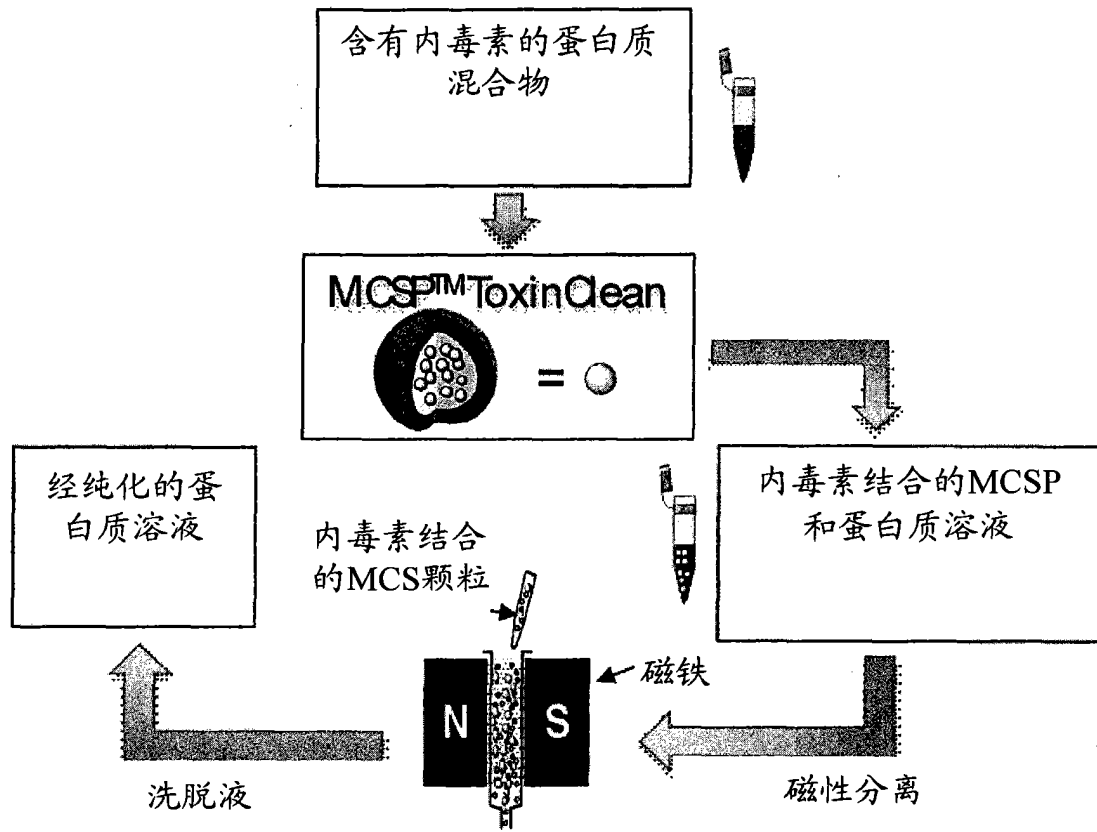


图 3