



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1930304 B

(45) 授权公告日 2016.01.06

(21) 申请号 200480040816.1

G01N 33/533(2006.01)

(22) 申请日 2004.11.22

G01N 33/553(2006.01)

(30) 优先权数据

60/523,692 2003.11.21 US

60/580,728 2004.06.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2006.07.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2004/038877 2004.11.22

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2005/051295 EN 2005.06.09

(73) 专利权人 ANP 技术公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 R · 殷 D · 秦 J · 潘

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 蒋康铭

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 9/96(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

US 4289872 A,1981.09.15,摘要.

US 5919442 A,1999.07.06,图1,图2,图
23,图24,权利要求2,4,8,23,30,实施例
4-6,9,15,16,17,说明书第3栏第13-14
行,24-25行,第19栏第3-7行,第20栏
第2-3行,.

审查员 田园

权利要求书3页 说明书20页 附图7页

(54) 发明名称

不对称支化的聚合物缀合物和微阵列检测

(57) 摘要

不对称支化的聚合物缀合物和微阵列检测不
对称支化的聚合物与生物活性剂结合以用于各种
目的,包括药物递送以及与结合对的成员之一缀
合用于检测。

1. 一种无规支化的聚合物缀合物,其包括 (a) 至少一种无规支化的聚合物,其被改性以包含形成支链的官能团,并且所述无规支化聚合物不包含中心核,所述无规支化的聚合物包含不对称的支链和不对称的支链结合点;和 (b) 至少一种生物活性剂;其中,所述至少一种无规支化的聚合物通过共价或非共价键与所述至少一种生物活性剂连接。

2. 权利要求 1 的缀合物,其中所述生物活性剂是诊断剂、治疗剂或诊断剂和治疗剂的组合。

3. 权利要求 1 的缀合物,其中所述无规支化的聚合物通过共价或非共价键与另一种生物活性剂连接。

4. 权利要求 1 的缀合物,其中所述无规支化的聚合物是通过 Michael 加成反应,将丙烯酸甲酯引入到聚乙烯亚胺的伯和 / 或仲胺基上改性的聚乙烯亚胺。

5. 权利要求 1 的缀合物,其中所述无规支化的聚合物是改性的聚噁唑啉,所述的改性包括在无规支化的聚噁唑啉的链端用另一种小分子封端或与其反应,以在聚合物链端产生各种官能团,包括伯胺、仲胺、叔胺、羧酸酯、羟基、烷基、氟代烷基、芳基、PEG、乙酸酯、酰胺和 / 或酯基团。

6. 权利要求 5 的缀合物,其中所述无规支化的聚噁唑啉是聚(2-甲基噁唑啉)或聚(2-乙基噁唑啉)。

7. 权利要求 6 的缀合物,其中所述改性的无规支化的聚噁唑啉包括改性的聚(2-乙基噁唑啉),所述的改性的聚(2-乙基噁唑啉)为具有伯胺链基团的烷基改性的无规不对称支化的聚(2-乙基噁唑啉)。

8. 权利要求 1 的缀合物,其中所述生物活性剂是金属。

9. 权利要求 8 的缀合物,其中所述金属是过渡金属、碱金属、碱土金属、镧系元素或铜系元素。

10. 包含权利要求 1 的缀合物和报告剂分子的检测试剂盒,所述缀合物中包含的改性的无规支化的聚合物包括改性的无规不对称支化的聚乙烯亚胺或者改性的无规不对称支化的聚噁唑啉,无规不对称支化的聚乙烯亚胺的改性包括通过 Michael 加成反应,将丙烯酸甲酯引入到聚乙烯亚胺的伯和 / 或仲胺基上,无规不对称支化的聚噁唑啉的改性包括在无规支化的聚噁唑啉的链端用另一种小分子封端或与其反应,以在聚合物链端产生各种官能团,包括伯胺、仲胺、叔胺、羧酸酯、羟基、烷基、氟代烷基、芳基、PEG、乙酸酯、酰胺和 / 或酯基团。

11. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述生物活性剂是相应的结合对成员之一。

12. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述结合对包括抗体、其抗原结合部分、抗原或其含表位的部分。

13. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述报告剂分子包括着色、发光或荧光颗粒或部分,酶,或它们的组合。

14. 权利要求 13 的试剂盒,其中所述荧光或发光颗粒或部分包括量子点、纳米晶体、上

转换磷光颗粒或含荧光团的乳胶珠。

15. 权利要求 13 的试剂盒, 其中所述着色颗粒包括包含金或银的胶体金属、着色乳胶珠或着色染料。

16. 权利要求 10 的试剂盒, 其中所述试剂盒包括含有所述缀合物和所述报告剂分子的固体相。

17. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述固体相包含平坦表面或膜。

18. 权利要求 17 的试剂盒, 其中所述平坦表面包括硅片、石英、玻璃、金属或塑料。

19. 权利要求 17 的试剂盒, 其中所述膜包括纸、塑料膜、尼龙膜或硝化纤维素。

20. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述固体相包括微阵列或珠阵列。

21. 权利要求 10 的试剂盒, 其中所述报告剂分子生成可以通过颜色或者通过光检测的产物。

22. 权利要求 10 的试剂盒, 其中所述生物活性剂包括生物聚合物, 所述生物活性剂结合的目标包括病原体、毒素、神经递质或激素。

23. 权利要求 22 的试剂盒, 其中所述病原体是细菌、孢子、寄生虫或病毒。

24. 权利要求 22 的试剂盒, 其中所述生物聚合物是多肽、多糖或多聚核苷酸。

25. 权利要求 24 的试剂盒, 其中所述多肽是酶。

26. 权利要求 24 的试剂盒, 其中所述多肽是抗体、其抗原结合部分、抗原或其含表位的部分。

27. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述固体相包括纤维素试纸、横向流动免疫检测或微阵列。

28. 一种非诊断目的的检测目标分子的方法, 包括, 得到怀疑含有所述目标分子的样品, 将所述样品暴露于权利要求 1 的缀合物, 其中所述生物活性剂特异地结合所述目标分子, 和确定是否形成所述缀合物和所述目标分子的复合物, 其中, 所述缀合物中包含的改性的支化的聚合物包括改性的无规不对称支化的聚乙烯亚胺或者改性的无规不对称支化的聚噁唑啉, 无规不对称支化的聚乙烯亚胺的改性包括通过 Michael 加成反应, 将丙烯酸甲酯引入到聚乙烯亚胺的伯和 / 或仲胺基上, 无规支化的聚噁唑啉的改性包括在无规不对称支化的聚噁唑啉的链端用另一种小分子封端或与其反应, 以在聚合物链端产生各种官能团, 包括伯胺、仲胺、叔胺、羧酸酯、羟基、烷基、氟代烷基、芳基、PEG、乙酸酯、酰胺和 / 或酯基团。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所述确定步骤包括报告剂分子。

30. 权利要求 28 的方法, 其中所述报告剂分子的存在是通过视觉确定的。

31. 权利要求 28 的方法, 其中所述报告剂分子的存在是使用机械设备检测的。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述机械设备包括检测设备。

33. 权利要求 31 的方法, 其中所述机械设备包括数字化数据的传感设备和数据存储设备。

34. 权利要求 31 的方法, 其中所述机械设备包括显示设备。

35. 权利要求 31 的方法, 其中所述机械设备是手持式装置。

36. 权利要求 31 的方法, 进一步包括数据传输设备。

37. 权利要求 31 的方法,其中所述机械设备是便携式的。
38. 权利要求 31 的方法,其中所述机械设备包括检测信号定量设备。
39. 权利要求 36 的方法,其中所述传输设备是无线设备。
40. 权利要求 1 的缀合物,其中所述生物活性剂是药物。
41. 权利要求 40 的缀合物,其中所述药物是麻醉剂、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、止痛剂、抗高血压药、消炎药、解毒剂、抗组胺剂、化学治疗剂、抗抑郁剂、镇静剂、兴奋剂、安定药、泌尿抗感染剂、血管收缩剂、维生素、心脏药、免疫抑制剂或营养补充物。
42. 权利要求 40 的缀合物,其中所述药物是生物聚合物。
43. 权利要求 40 的缀合物,其中所述药物是激素。
44. 权利要求 40 的缀合物,其中所述药物是被所述聚合物包裹的。
45. 权利要求 42 的缀合物,其中所述生物聚合物是多肽或多聚核苷酸。
46. 权利要求 45 的缀合物,其中所述多聚核苷酸是 DNA 或 RNA。
47. 权利要求 45 的缀合物,其中所述多肽结合到配体或结合到抗原。
48. 权利要求 47 的缀合物,其中结合到抗原的多肽是免疫球蛋白或其抗原结合部分。
49. 权利要求 46 的缀合物,其中所述 RNA 是 RNAi。

不对称支化的聚合物缀合物和微阵列检测

技术领域

[0001] 本发明涉及在复合材料,例如缀合物,以及其它材料,特别是具有生物活性和目标识别能力的那些中使用不对称支化的聚合物,所述缀合物可以用于与在农业、环境研究、诊断学、药物监测、药物目标筛选、先导化合物优化和治疗学中的应用相关的检测应用中。

背景技术

[0002] 不对称支化的聚合物

[0003] 近年来,开发了称为树枝形聚合物 (dendritic polymer) 的一类新聚合物,其包括星爆树形分子 (starburst dendrimer) (或致密星形聚合物) 和梳爆树形接枝分子 (combburst dendrigrafts) (或超梳形支化聚合物) 两者,并在工业和学术实验室中得到广泛研究 (Dendritic Molecules, edited by GR Newkome et al., VCH, Weinheim, 1996, 和 Dendrimers and Other Dendritic Polymers, edited by JMJ Frechet and DA Tomalia, John Wiley & Sons, Ltd., 2001)。这些聚合物通常展示出如下特点: (a) 良好限定的中心核分子, (b) 带有对称 (等同) 支链结合点的至少两个同心的树枝形层 (代), 和 (c) 外部表面基团, 如同在 Tomalia 的美国专利 4435548 ; 4507466 ; 4568737 ; 4587329 ; 5338532 ; 5527524 ; 和 5714166 中以及专利的参考文献中所描述的那样。

[0004] 这些对称支化的树形分子也明显不同于先前制备的不对称支化的树形分子 (Denkewalter 的美国专利 4289872 ; 4360646 ; 和 4410688)。后者具有不对称 (不等同) 的支链结合点 (junctions)。

[0005] 两种类型的树形分子 (dendrimers) 都可以经由发散或收敛合成路径通过重复保护和去保护过程制备。由于对称和不对称树形分子都使用小分子作为核心和支链的分子构建单元, 所以这些树形分子的分子量通常可以精确限定。在低代数的情况下, 通常得到单分子量树形分子。

[0006] 与树形分子类似, 梳爆树形接枝分子也通过逐步合成方法由中心核分子和具有对称支链的同心层构建。与树形分子相反, 梳爆树形接枝分子或聚合物是用单分散线形聚合物构建单元制造的 (Tomalia 的美国专利 5773527 和 Yin 的美国专利 5631329 和 5919442)。此外, 支化方式也十分不同于树形分子的支化方式。例如, 梳爆树形接枝分子沿着聚合物骨架形成支链结合点 (链支化), 而星爆树形分子通常在末端支化 (末端支化)。由于活性聚合技术的使用, 这些聚合物构建单元 (中心核和支链) 的分子量分布 (M_w/M_n) 通常非常窄。结果, 通过接枝-接枝 (graft-upon-graft) 方法制备的梳爆树形接枝分子在分子量分布方面 (M_w/M_n) 控制的相当好, 通常小于 1.2。

[0007] 虽然具有控制良好的分子结构, 例如良好限定的尺寸、形状和表面官能团, 但是树形分子和树形接枝分子 (dendrigrafts) 都只能通过大量的重复步骤制备, 这使得它们只能用于小范围的学术研究, 不能用于大规模的商业应用。

[0008] 树形分子和树形接枝分子已经显示出对于生物活性分子具有独特的载体性能, 如在 Tomalia 的关于致密星形聚合物的美国专利 5338532、5527524 和 5714166 以及 Yin 的关

于超梳形支化聚合物的美国专利 5919442 中所描述的那样。这些独特的性能（即表面官能团和内部空隙空间）主要归因于具有可预测支化方式（对称末端或聚合物链支化）的良好控制的、对称的树枝形结构和分子量。

[0009] 根据这些教导，无规和有规不对称支化的聚合物（无规-ABP 和有规-ABP）长期以来被认为是差的载体材料。例如，无规-ABP 具有：a) 无中心核，b) 官能团在外部和内部都存在，c) 变化的支链长度和方式（即末端和链支链），和 d) 分布不均匀的内部空隙空间。虽然有规-ABP 具有中心核，但是官能团却在外部和内部都存在。因此，无规-ABP 和有规-ABP 通常都被认为不适合于运载生物活性分子。

[0010] 已经对由聚赖氨酸制备的有规-ABP 的制备进行了描述，如在美国专利 4289872、4360646 和 4410688 中所说明的。

[0011] 已经对例如由聚乙烯亚胺（PEI）制备的无规-ABP 的合成和机理进行了的大量研究（参见 GD Jones et al., J. Org. Chem. 9, 125 (1944), GD Jones et al., J. Org. Chem. 30, 1994 (1965), 和 CR Dicket al., J. Macromol. Sci. Chem., A4 (6), 1301-1314, (1970)）。

[0012] Litt (J. Macromol. Sci. Chem. A9 (5), pp. 703-727 (1975)) 和 Warakowski (J. Polym. Sci. Polym. Chem. 28, 3551 (1990)) 已经对例如由聚噁唑啉即聚(2-甲基噁唑啉)和/或聚(2-乙基噁唑啉)制备的无规不对称支化的聚合物的合成和表征进行了大量研究。

[0013] 大多数现有技术都涉及利用聚乙烯亚胺聚合物作为涂覆材料来改变固体表面的特性（即改变电荷、电荷密度和疏水性）。聚乙烯亚胺聚合物的涂覆方面描述于 J Ness 的美国专利 6150103 和 K Moynihan 的美国专利 6365349 中。聚乙烯亚胺也已经被测试以运载 DNA 分子用于基因转染研究。但是，发现该聚合物是细胞毒性的。

[0014] 也已经使用无规支化的聚(2-乙基噁唑啉)来物理地包裹蛋白质分子（美国专利 6716450）。但是，这样的路径并不是设计用于直接共价连接 ABP 与生物活性材料以用于生物检测和药物递送应用。

[0015] 目前为止，没有现有技术利用改性的无规-ABP 和有规-ABP 来运载生物活性材料以用于药物递送和目标识别目的，特别是用于与检测和微阵列相关的应用，其中从溶液输送、锚定和定向生物活性材料全部在同一时间进行。

[0016] 检测和微阵列

[0017] 自从完成人类基因组工程以后，越来越多的研究者已经认识到在蛋白质水平阐明生物路径和机理实际上远比在基因水平上重要。这是因为前者与不同疾病和疾病阶段的联系更密切。在这种强烈需求推动下，对于工业和理论研究者来说，称为蛋白质组学的新的论坛最近已经成为主要的研究焦点。

[0018] 目前，在蛋白质组学研究领域中使用三种主要的研究工具，主要用于发现、高处理量筛选和确认新蛋白质目标和药物先导化合物。这些工具包括二维（2-D）凝胶电泳、质谱和最近出现的蛋白质微阵列。与冗长的 2-D 凝胶方法和质谱分析中乏味的样品制备（主要是分离）不同，蛋白质微阵列提供了筛选大量蛋白质以及它们的功能的快速、简单和低成本的方法。因此，蛋白质组学研究者是高度希望使用微阵列的。

[0019] 然而，基于蛋白质的微阵列技术的发展远落后于基因微阵列的发展。蛋白质/抗体芯片的构建带来了在经典免疫阵列或 DNA 芯片的发展中没有遇到过的艰难挑战。概括来

说,与核酸相比蛋白质对于它们的环境更加敏感。很多膜、玻璃和塑料表面的疏水性可以导致蛋白质变性,造成捕获分子失活和导致低灵敏度和高噪信比。换句话说,为了构建蛋白质微阵列,必须能够克服至少三个主要问题,蛋白质变性、固定和定向。

[0020] 例如,在溶液中蛋白质分子通常折叠成三维结构为了以及以便保持生物活性。在与不同固体表面相互作用时,例如在将蛋白质固定到膜、载玻片或微米/纳米颗粒上期间,蛋白质分子的三维结构通常会坍塌,从而丧失生物活性。此外,蛋白质通常不具有粘附到不同表面上的能力。

[0021] 为了将蛋白质分子固定到表面上,通常必须使用直接共价连接反应或静电相互作用(物理吸附)。多相化学反应通常是不完全的,产生不希望的副产物(即未完全改性的表面),并且在一些情况下,在不同的反应阶段期间还产生部分变性的蛋白质。

[0022] 静电相互作用极大的依赖于蛋白质的等电点以及缓冲溶液的 pH。

[0023] 由于在这些过程中所涉及的复杂性,两种方法都倾向于产生不能重现的结果。因此,批对批的重现性非常差。结果,非常希望改性固体基质,而不是蛋白质本身。各种聚合物,包括聚乙烯亚胺聚合物,已经被用作涂覆材料来改变用于构建蛋白质阵列的固体表面的特性,如 P Wagner 等人在美国专利 6406921 中所描述的那样。

[0024] 目前为止,没有现有技术利用改性无规和有规不对称支化的聚合物作为生物活性材料的载体,特别是用于检测和微阵列的构建。

[0025] 发明概述

[0026] 一个方面,本发明涉及聚合物缀合物材料,该缀合物材料包括与期望的材料结合的不对称支化的聚合物(ABP)(此后称为 ABP 缀合物),制备这些聚合物和缀合物的方法,含有所述缀合物的组合物,和使用这些缀合物和组合物的方法。

[0027] 本发明还包括与多个单元的被运载材料(各自具有不同性能和活性)结合的不对称支化的聚合物。这些缀合物可以与可接受的载体、稀释剂和添加剂配制在一起以用于例如生物检测、诊断学、农业和药品中。

[0028] 所述不对称支化的聚合物缀合物适合用于各种其中希望进行生物材料的特定递送的应用中。在本发明的一个优选实施方案中,所述无规不对称支化的聚合物缀合物由与一种或多种生物活性材料结合的一种或多种不对称支化的聚合物组成。

[0029] 在本发明的另一个方面,所述不对称支化的聚合物具有无规或有规的不对称的支链结合点以及混合的末端和链支化方式。

[0030] 在本发明的另一个方面,所述不对称支化的聚合物在外部和内部都具有官能团。

[0031] 在本发明的另一个方面,所述不对称支化的聚合物具有分布不均匀的空隙空间。

[0032] 在本发明的另一个方面,所述不对称支化的聚合物在给定时间用至少一种能够形成额外支链的单体进行改性,从而能够得到新的材料性质,其中所述经改性的聚合物定义为经改性的不对称支化聚合物。

[0033] 所述经改性的不对称支化的聚合物可以通过在有规不对称支化的聚赖氨酸上的化学连接官能团或者通过无规不对称支化的聚乙烯亚胺(可从 Aldrich, Polysciences 或者以商品名 Luposal™ 从 BASF 商购)上的化学连接官能团得到。

[0034] 可以根据 M Litt(J. Macromol. Sci. Chem. A9(5), pp. 703-727(1975)) 描述的方法制备所述无规不对称支化的聚嘧啶聚合物。

[0035] 在本发明的另一个方面,所述不对称支化的聚合物进一步用官能团改性,所述官能团例如但不限于: $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{NR}_3^+$ 、 $-\text{COOR}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$ 基团,脂族基团(其可以是支链的,含有一个或多个双键和/或三键和/或可以是被取代的),芳族基团(其可以含有多个环,其可以是稠合的或分开的,所述环可以具有各种尺寸和/或可以含有取代基),全氟碳链,糖类(其可以具有不同的环尺寸,所述环可以含有杂原子例如硫或氮原子,和/或可以是被取代的),多糖(含有两个或多个单体,可以是支链的和/或可以是被取代的),和聚乙二醇,其中R可以是本文定义的任何脂族或芳香族基团,或它们的组合。

[0036] 这些未改性的和改性的不对称支化的聚合物的分子量可以是约500-超过5000000;优选约500-约1000000;更优选约1000-约500000;和最优选约2000-约100000。

[0037] 本发明的优选缀合物包括其中不对称支化的聚合物缀合物包含与至少一种生物活性(生物活性)材料的至少一个单元结合的至少一个未改性的和/或改性的不对称支化的聚合物的那些。生物活性材料的一些例子是白细胞介素、干扰素、T-辅助细胞CD4分子、 F_ϵ 受体、乙酰胆碱受体(AChR)、用于抗原的T细胞受体、胰岛素受体、肿瘤坏死因子、粒细胞集落刺激因子、激素受体、抗体、抗体片断、IgG分子、结合抗原的 F_{ab} 和其它抗体衍生物、重组蛋白质、多肽、噬菌体、噬菌体片段、DNA片段、RNA片段、激素,例如胰岛素和hCG、酶、唾液酸、卟啉、核苷酸、病毒、病毒片段等。

[0038] 本发明还涉及包含包裹至少一种生物活性分子的多种感兴趣聚合物的组合物。单独一种感兴趣的聚合物或者多种聚合物可以用于形成包裹层。

[0039] 在本发明的一个方面,所述未改性的和/或改性的不对称支化的聚合物-生物活性材料缀合物可以用于例如感兴趣目标分子的快速检测例如环境污染物、化学和生物战争试剂,用于筛选药物目标和先导化合物以及用于治疗药物和治疗效果监测。

[0040] 在本发明的另一个方面,所述未改性的和/或改性的不对称支化的聚合物-生物活性材料缀合物可以用于例如不同癌症、肿瘤、病理状态和疾病的快速诊断,以及用于在临床试验和治疗处理期间监控生物标记物变化和蛋白质曲线。

[0041] 在本发明的另一个方面,所述未改性的和/或改性的不对称支化的聚合物-生物活性材料缀合物可以用于例如构建直接夹层(direct sandwich)、间接夹层(indirect sandwich)、顺序和竞争生物检测。

[0042] 在本发明的另一个方面中,至少一种未改性的和/或改性的不对称支化的聚合物可以用于运载至少一种蛋白质分子到各种固体表面,几乎不产生所述至少一种蛋白质分子的变性。这些表面可以包括硝化纤维素、纸、其它膜、玻璃、金属、塑料等,可以以各种形式呈现,例如平坦表面,例如片材、条带等,球,例如颗粒和珠子,以及其它形式,并且可以用于例如基于空间排列的平板微阵列的形成,用于珠,微米或纳米阵列和检测的制造。所述珠微米/纳米阵列可以通过在相同微米/纳米颗粒上连接多种蛋白质构建,或者简单地通过混合多种珠子构建,其中每种珠子带有一种特定种类的蛋白质分子。除了探测以外,所述珠微米/纳米阵列也可以用于在用蛋白质平板微阵列、2D凝胶或质谱仪分析之前,快速、大规模、高处理量的分离生物活性材料。这种蛋白质阵列对于蛋白质目标的发现、确认、药物先导化合物筛选以及在治疗处理期间监控生物标记物和蛋白质曲线是理想的工具。

[0043] 所述不对称支化的聚合物缀合物可以进一步用于与农业、食品安全保证以及体外

和体内诊断学、治疗剂递送和靶定相关的应用中。因此,所述聚合物缀合物可以用作药物递送工具,其可以提供弹丸剂递送、延迟释放、定时释放、肠溶衣以及具有期望特性的各种其它药理学制剂。这些缀合物也可以用作各种传感器平台中的关键传感部件,包括但不限于光、电、压电装置,以及微流体和微米机电系统 (MEMS) 和纳米机电系统 (NEMS)。

[0044] 附图简述

[0045] 下列附图和相应图表的描述是说明例证本发明的各种实施方案的非限定性实例。

[0046] 图 1 描述具有不对称支链结合点和方式的无规 (A) 和有规 (B) 不对称支化的聚合物。

[0047] 图 2 描述无规不对称支化的聚乙烯亚胺聚合物的化学结构。

[0048] 图 3 描述无规不对称支化的聚乙烯亚胺聚合物的化学改性反应。

[0049] 图 4 描述用不对称支化的聚合物构建的蛋白质微阵列用于同时探测和定量多种抗原。

[0050] 图 5 描述基于横向流动的免疫检测构造。图 5A。没有塑料盖的免疫检测条的构造:(a) 吸附剂垫,(b) 缀合物释放垫,(c) 膜,(d) 含有捕获抗体的区域,(e) 含有对照抗体的区域,和(f) 接收垫。图 5B。在横向流动检测格式中在加入样品溶液时阳性和阴性免疫检测条的示意。所述纤维素试纸检测以类似的方式工作。(S) 样品池,(T) 测试线和 (C) 对照线。

[0051] 图 6 描述用于检测蓖麻毒蛋白类毒素的基于改性无规不对称支化的 PEI 聚合物-抗体的检测与基于抗体的横向流动测试的检测性能的对比。

[0052] 图 7 描述采用以及不采用无规不对称支化聚合物构建的间接检测的对比。使用基于 ABP 的检测得到高得多的灵敏度。

[0053] 发明详述

[0054] 具有不对称支链的不对称支化的聚合物描述于图 1 中,其中一些感兴趣的聚合物不具有中心核并且在整个聚合物中展示出由链支链和末端支链二者组成的不对称支链结合点。官能团既存在于外部,也存在于内部。

[0055] 这样的聚合物展示出一些独特的优点。首先,可以使用多种已知起始材料。这样的单体和聚合物是低成本的并且非常容易大量制造。例如可以用于合成感兴趣的聚合物的此类前体聚合物中的一种是聚乙烯亚胺 (PEI)。无规不对称支化的聚乙烯亚胺的合成早在 60 多年前就已被发现 (GD Jones et al., J. Org. Chem. 9, 125 (1944)), 并且这些前体聚合物的合成方法已经建立。具有不同分子量的聚乙烯亚胺可从不同来源例如 Aldrich, Polysciences 和 BASF (以商品名 Luposal™) 商购。所述无规不对称支化的聚乙烯亚胺主要通过具有环张力的环状亚胺单体的阳离子开环聚合制备,所述单体例如氮丙啶 (亚乙基亚胺) 和氮杂环丁烷 (亚丙基亚胺),使用 Lewis 或 Bronsted 酸作为引发剂。(OC Dermer et al., "Ethylenediamine and Other Aziridines", Academic Press, New York, (1969), 和 AS Pell, J. Chem. Soc. 71 (1959))。由于这是一锅法,所以可以容易地制造大量无规不对称支化的聚合物。(图 2)。

[0056] 所述无规支化的聚(2-取代的嘔唑啉)聚合物可以根据 MLitt (J. Macromol. Sci. Chem. A9 (5), pp. 703-727 (1975)) 描述的方法制备。

[0057] 其次,现有技术合成方法通常在大分子内产生各种支链结合点。换句话说,末端和

链支链结合点混合分布于整个分子结构中。与树形分子和树形接枝分子相比较,这些无规不对称支化的聚合物的支化密度较低,并且分子结构更加开放。虽然支化方式是无规的,但是伯胺、仲胺和叔胺基团的平均比例是相对一致的,比例为约 1 : 2 : 1,如 CR Dick et al., J. Macromol. Sci. Chem., A4(6), 1301-1314(1970) 和 GM Lukovkin, Eur. Polym. J. 9, 559(1973) 所述。

[0058] 由于这些支链结合点的存在,所述无规不对称支化的聚乙烯亚胺仍旧被认为是球形大分子。在球状结构内,在所述大分子的内部,存在各种尺寸的由不完美的支链结合点形成的口袋 (pocket)。不同于其中内部口袋总是位于分子的中心核周围的树形分子和树形接枝分子,无规不对称支化的聚合物的口袋不均匀的分布在分子中。结果,无规不对称支化的聚合物具有外部官能团和不均匀分布的内部官能团,所述官能团可以进一步与各种分子反应,从而形成新的大分子结构,定义为改性的无规不对称支化的聚合物 (图 3)。

[0059] 虽然具有中心核,但是所述有规不对称支化的聚合物的官能团也分布在外部和内部,这与无规 ABP 非常相似。同样,多种前体聚合物可以用于构建这类感兴趣的聚合物。这类前体聚合物的一种是聚赖氨酸。制造此类聚合物的最佳例子是有规不对称支化的聚赖氨酸聚合物,如美国专利 4289872、4360646 和 4410688 所述。结果,这类聚合物也可以以和无规 ABP 类似的方式进行改性。

[0060] 在本发明的一个实施方式中,所述不对称支化的聚合物 (例如,无规不对称支化的聚乙烯亚胺 (PEI) 或有规不对称支化的聚赖氨酸) 用不同种类的伯胺基团通过例如 Michael 加成或丙烯酸酯向聚合物的胺的加成进行改性。因此,例如,通过 Michael 加成反应,可以将丙烯酸甲酯引入到聚乙烯亚胺和聚赖氨酸聚合物的伯和 / 或仲氨基上。然后所述酯基团可以进一步衍生化,例如通过酰胺化反应。因此,例如,与例如乙二胺的酰胺化反应可以产生在新形成支链末端的氨基的加成。对所述聚合物的其它改性可以使用已知的化学知识进行,例如如在 Handbook of Polymer Synthesis (Part A) Edited by HRKricheldorf, New York, Marcel Dekker, 1994 中的 “Poly (amines) and Poly (ammonium salts)” 中提供的那样。

[0061] 一旦进行此类加成,就将形成改性的不对称支化的聚合物,例如改性 PEI 或聚赖氨酸聚合物。作为不对称支化聚合物例如 PEI 和聚赖氨酸的延伸,所得到的改性 ABP 也是不对称支化的。取决于溶剂环境 (即 pH 或极性),表面官能团可以带有不同的电荷和电荷密度。基于这些特征性质,从而可以进一步调节分子形状和官能团位置 (即官能团反折叠)。

[0062] 在本发明的另一个实施方案中,所述改性的不对称支化的聚合物可以使用各种合成方案中的任何一种制备,所述合成方案例如已知满足与聚合物上的合适位点反应。此外,各种反应试剂中的任何一种都可以用于所选择的合成方案中,以得到各种改性中的任何一种,或加成到聚合物骨架。因此,例如,在上述到胺的 Michael 加成反应的情况下,在与 C₁-C₂₂ 丙烯酸酯的烷基化反应阶段可以使用各种单体的任何一种进行加成。优选的反应物包括丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸戊酯、丙烯酸己酯、丙烯酸庚酯、丙烯酸辛酯、丙烯酸壬酯、丙烯酸癸酯、丙烯酸十一烷基酯、丙烯酸十二烷基酯和其混合物。类似地,在上述举例说明的实例的酰胺化阶段,可以使用各种胺中的任何一种。例如,可以使用乙二胺,单乙醇胺,三 (羟甲基) 氨基甲烷,烷基胺,烯丙基胺,或任何氨基改性的聚合物,包括聚乙二醇 (PEG),全氟聚合物,聚苯乙烯,聚乙烯,聚二甲基硅氧烷、聚丙烯酸

酯、聚甲基丙烯酸甲酯等,以及它们的混合物。

[0063] 这种合成策略将不但实现所述分子的不对称增长(其中可以容易地引入更多口袋),而且实现多种官能团在所述结构内部和外部的加入。显而易见,可以使用相同的或不同的合成方法连续改性前体聚合物,直到得到具有适当分子量和官能团的所期望的不对称支化的聚合物。此外,此类聚合物的疏水和亲水性能以及电荷密度,可以容易地通过使用构建该聚合物的合适单体和适当的改性反应进行修饰以适合特定的应用需要。

[0064] 在本发明的另一个实施方案中,无规不对称支化的聚噁唑啉的链端可以被另一种小分子封端或与其反应,以在聚合物链端产生各种官能团,包括伯胺、仲胺或叔胺和羧酸酯、羟基、烷基、氟代烷基、芳基、PEG、乙酸酯、酰胺和/或酯基团。或者,也可以使用各种起始物,从而在链端引入相同类型的官能团(J. Macromol. Sci. Chem. A9(5), pp. 703-727(1975))。因此,可以使用上述 M. Litt 的方法制备具有伯胺链端的烷基改性的、无规不对称支化的聚(2-乙基噁唑啉)。

[0065] 在本发明的另一个实施方案中,不对称支化的聚合物可以用于运载生物活性材料以用于体外和体内相关应用中。所述生物活性材料包括各种分子,特别是能够结合另一种分子的那些,例如生物聚合物,例如多肽,多聚核苷酸,脂质,多糖,酶,受体,抗体,维生素,外源凝集素等。所述目标可以是病原体,例如寄生虫,细菌,病毒,或毒素,例如毒液。所述生物活性材料可以用于各种用途,包括作为诊断剂、治疗剂等。“诊断剂”是指可以用作特定疾病、生理状态或阶段、病理状态或阶段等的标记物的分子。白蛋白、矿物水平、微生物、特定抗体、特定抗原、毒素等是诊断剂的例子。治疗剂是给予有益效果的那些,例如药物,营养物质,蛋白质等。对于特定目标来说,既是诊断剂又是治疗剂并不稀奇。

[0066] 由于产生不均匀分布的口袋大小和在内部或在外部产生各种官能团的能力,这些不对称支化的聚合物当进行适当改性后,能够运载各种材料,所述材料的范围从小分子例如金属离子和药物到其它大生物活性材料例如蛋白质和 DNA。

[0067] 感兴趣的聚合物可以用于包裹生物活性分子,特别是药品。

[0068] 所述微胶囊可以按本文的教导以及按本领域的已知技术制备,参见例如 Microencapsulation, Methods and Industrial Applications, Benita, ed., Dekker, 1996。所述微胶囊可以在干燥状态混合物或反应中制备,或可以在液体状态混合物或反应中制备。

[0069] 如在本领域中已知的,微胶囊可以以多种方式给予宿主,包括口服、IM、SC、IV、直肠、局部等等。

[0070] 本发明的微胶囊可以用于局部应用中,例如乳膏、软膏、洗剂、油膏、其它化妆品等等。可以包裹药品和其它生物活性或惰性化合物,例如软化剂、漂白剂、止汗药、药品、润湿剂、香味剂、着色剂、颜料、染料、抗氧化剂、油类、脂肪酸、脂质、无机盐、有机分子、遮光剂、维生素、药物、角质层分离剂、UV 阻断剂、皮肤增黑加速剂、脱色剂、除臭剂、香料、驱昆虫剂等等。

[0071] 可以通过感兴趣的聚合物运载的金属包括,但不限于,过渡金属以及其它金属,例如 Sc, Y, Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, Cr, Mo, W, Mn, Tc, Re, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Cd 和 Hg, 碱金属, 碱土金属, 镧系元素例如 Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb 和 Lu, 以及锕系元素例如 Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No 和 Lr。

[0072] 可以通过感兴趣的聚合物运载的药物包括,但不限于,麻醉剂、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、止痛剂、抗高血压药、消炎药、解毒剂、抗组胺剂、化学治疗剂、激素、抗抑郁剂、镇静剂、兴奋剂、安定药、泌尿抗感染剂、血管收缩剂、维生素、心脏药、免疫抑制剂、营养补充物等等。具体的例子是利多卡因、布比卡因、氢化可的松、氯苯那敏、曲普利啶、右美沙芬、可待因、methidizine、trimeprizine、阿托品、2-PAM 氯化物、后马托品、左旋多巴、赛克利嗪、氯苯甲嗪、东莨菪碱、对乙酰氨基酚、两性霉素 B、安非他明、甲基安非他明、右旋安非他明、普萘洛尔、普鲁卡因、disopyraminide、奎尼丁、恩卡尼、米力农、氨立农、多巴酚丁胺、依那普利、colnidine、胍苯吡嗪、胍那决尔、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、红霉素和喹诺酮药物。

[0073] 可被感兴趣的聚合物运载的大生物活性材料可以包括,但不限于,蛋白质、重组蛋白质、抗体、Fab 抗体片段、结合抗原的其它抗体片段、酶、DNA、重组 DNA、DNA 片段、RNA、RNAi、重组 RNA、RNA 片段、核苷酸、病毒、病毒片段等。

[0074] 在本发明的另一个实施方案中,这些不对称支化的聚合物可以用于在纳米尺度操纵生物传感事件。本发明的优选缀合物包括其中不对称支化的聚合物缀合物包含与至少一种生物活性材料或生物响应指示剂的至少一个单元结合的至少一个不对称支化的聚合物的那些。

[0075] 所述生物活性材料、生物响应指示剂或治疗分子通常是具有识别或结合能力的那些。对于本发明的目的,具有识别或结合能力的感兴趣的那些分子将被认定为结合对,或单独地被认定为结合对之一或一个成员。因此,结合对的例子包括,抗体和抗原;抗体的抗原结合部分和抗原;抗体的 F_c部分和 F_c受体;抗生物素蛋白、抗生物素蛋白链菌素、中性抗生物素蛋白、NeutraLite avidin 或其它抗生物素蛋白衍生物和类似物和生物素;激素受体和激素;核酸结合部分例如蛋白质和目标核酸例如限制酶;酶和底物;酶和辅因子;核酸的一条链和核酸的互补链;酶和核酸识别部位,如和限制酶;外源凝集素和同源糖类;等等。展示出特异结合反应的任何一组分子,其中它们之间的结合可以用于探测一个或另一个的存在,可以被用于本发明的实践中。

[0076] 这些生物活性材料的一些例子是白细胞介素、干扰素、T- 辅助细胞 CD4 分子、F_c受体、乙酰胆碱受体 (AChR)、用于抗原的 T 细胞受体、胰岛素受体、肿瘤坏死因子、粒细胞集落刺激因子、激素受体、抗体、抗体片断、IgG 分子、F_{ab}抗体片段分子、重组蛋白质、多肽、噬菌体、噬菌体片段、DNA 片段、RNA 片段、激素,例如胰岛素和 hCG、酶、唾液酸、卟啉、核苷酸、病毒、病毒片段等。

[0077] 通常,配体分子包括抗原(即细菌、病毒和毒素)、抗体(即 IgG 和 IgE 分子)、抗体片断、F_{ab}片段、多肽、激素(即胰岛素和 hCG)、神经递质(即乙酰胆碱)、DNA 片段、RNA 片段、酶(即有机磷酸 anhydrolase(OPAA) 和有机磷酸酯水解酶(OPH))、小分子(例如唾液酸、卟啉和核苷酸)、或其它本领域技术人员公知的受体分子。在本发明中优选的配体是 IgG、F_{ab}和免疫球蛋白的其它抗原结合部分,不论是否得自天然免疫球蛋白或重组制备的蛋白质。

[0078] 受体是通常存在于细胞表面的生物分子(即蛋白质或多糖),并且通常部分嵌入或横穿细胞质膜。所述受体能够识别病毒、抗原、神经递质、激素等等。例如,T 辅助细胞 CD4 分子是 HIV 的病毒特异受体,而 T 细胞受体识别特异抗原。乙酰胆碱受体 (AChR) 结合神经递质,乙酰胆碱,而激素受体例如肾上腺素能或胰岛素受体分别识别肾上腺素和胰岛素。其

它可以包括巨噬细胞上的 F_c 受体,其是免疫球蛋白的受体。这些受体或受体部分可以从生物体系分离或者通过生物或非生物途径合成。因此,这些新发展的受体分子或部分也可以用作配体用于纳米操作应用中。

[0079] 虽然通过使用来自于其抗原结合活性的抗体和其片段示例说明了上述检测格式,然而所述感兴趣的聚合物可以与其它具有抗原结合能力的分子一起使用。这些其它分子的例子包括核酸例如脱氧核糖核酸和核糖核酸,和受体例如从细胞分离的激素受体或重组制备的激素受体。

[0080] 感兴趣的聚合物和感兴趣的其它分子的结合,使用已知的方法进行,例如利用所述聚合物或改性聚合物的化学特性以及将要结合到其上的所述分子的化学特性的化学合成方法,其中所述感兴趣的其它分子例如是生物活性分子,例如蛋白质,例如抗体或抗原,核酸,生物素,抗生物素蛋白链菌素,胶体金等等。因此,所述聚合物可以进行改性以含有例如可以用作反应性位点的胺基团,通过共价键合可以向所述反应性位点结合感兴趣的分子。或者,可以仅仅通过混合所述聚合物和将要结合的分子经由它们之间的非共价键合实现结合。另一种实体向感兴趣的聚合物的结合也可以通过这两种情况的组合实现。例如,感兴趣的聚合物可以共价连接到配体,然后通过非共价键合物理吸附报告剂颗粒以形成配体-聚合物-报告剂颗粒缀合物,其可以容易地用于生物检测。

[0081] 当制备基于蛋白质的检测或基于这些免疫检测格式的探测系统时,通常遇到三个主要困难:蛋白质的变性、粘附/固定和定向。在溶液中蛋白质或抗体分子通常折叠成三维结构以保持生物活性。在与不同固体表面相互作用时,例如在固定到膜、载玻片或微米/纳米颗粒上期间,蛋白质分子的三维结构通常会坍塌,从而丧失生物活性。

[0082] 而且,一些蛋白质仅仅是不适于固定到固体相上。为了将某些蛋白质固定到固体相上,通常需要使用化学反应或静电相互作用干预。但是,如以上讨论的,这些反应可能影响感兴趣的生物分子的二级和三级结构。此外,多相化学反应通常可能是不完全的或者本质上不具有高度有利于希望的产物的反应动力学。这可以产生包括不希望的反应物和副产物的混合物。

[0083] 在一些情况下,不注意的话这些反应可能会部分或全部使要结合到固体表面的蛋白质变性。

[0084] 静电反应取决于感兴趣蛋白质的等电点和偶极距。此外,这些特性取决于蛋白质的环境,例如取决于 pH 和缓冲剂的组成。

[0085] 因此,这些路径可以并经常导致不希望的结果,例如差的期望产物产率和,一般来说,重现性。从商业的观点看,结果是导致差的批对批一致性。

[0086] 因此,物理沉积策略,虽然成本低,但是得到的是结合配体的完全无规的定向。另一方面,多步化学连接路线提供了改进的定向。但是,后者通常太过昂贵,并且由于不完全的化学反应也容易导致不可重现的结果。

[0087] 所述感兴趣的聚合物可以用于改进生物检测。存在多种检测格式并且任何一种都可以用感兴趣的聚合物进行改进。这些已知检测格式的例子在以下给出。

[0088] 基于抗体的“夹层”检测由三个组分组成:捕获抗体、抗原和与报告剂(即酶,荧光团,着色颗粒,染色颗粒或含有染料的颗粒,有色颗粒,放射性标记,量子点,纳米晶体,上转换磷光颗粒、荧光团或含有染料的聚合物,或视觉和/或在机械的帮助下可探测的乳胶珠

等)连接的检测剂抗体。这样的检测通常需要三个分开的实验步骤。第一步骤包括将所述捕获抗体固定到固体表面上,然后加入抗原溶液以形成抗体-抗原复合物。最后一个步骤是加入包含报告剂基团的标记的检测剂抗体以产生捕获抗体-抗原-检测剂抗体复合物。这种“夹层”检测的结果是,可以确认未知的抗原,以及该抗原的数量和浓度,其可以例如使用光阅读机定量。如果在样品溶液中不存在抗原,将不形成“夹层”复合物,并因此将观察不到信号。

[0089] “夹层”复合物的实际结构高度依赖于结合试剂和报告剂部分。可以使用胶体金作为报告剂分子来示例各种检测格式。在本领域中公开捕获抗体-抗原-检测剂抗体-金颗粒复合物的形成产生阳性测试。但是,在现实中,在合成金标记的检测剂抗体期间,发现由于例如不同蛋白质偶极距和等电点的变化导致所述抗体通常无规定向在金表面上。结果,即使在不存在抗原的情况下,也形成只由检测剂-金抗体聚集体组成的预交联的产物。这种预交联的产物非常显著的增加噪音和背景水平,并且在一些情况下,产生非常严重的错误阳性读数。

[0090] 另一方面,基于不对称支化的聚合物的检测,产生清洁的但非常不同的免疫复合物:捕获抗体-抗原-检测剂抗体-ABP-颗粒。在这种情况下,只形成清洁的免疫复合物并且完全消除预交联的产物。结果,检测敏感性被显著增强,错误阳性读数被显著减少。此外,当与不使用感兴趣的聚合物的基于抗体的标准检测相比较时,试剂的使用量少的多。而且,使用类似的固定策略,所述捕获抗体也可以通过ABP被连接到不同的固体表面上。这种路径不依赖于蛋白质的偶极距和等电点,从而在保持感兴趣的蛋白质处于天然构型或处于至少保持特定结合位点以及感兴趣的表位的构型的同时,极大的简化检测构建方法。

[0091] 第二检测构型基于用于检测未知样品中的抗体的顺序检测格式。在这种情况下,将带有表位的抗原或其片段施加到固体表面。在测试期间,所述抗原将与靶定的抗体结合,其接着与用胶体金标记的另一种一般抗物种(anti-species)抗体反应。因此,特征性红色表示阳性测试,没有颜色变化表示阴性测试。感兴趣的聚合物可以用于将抗原固定到固体相,以及如上所述用于标记感兴趣的抗体。

[0092] 第三检测构型是间接夹层检测格式。在这种情况下,将捕获抗体施加到膜表面。在测试期间,所述捕获抗体将与靶定抗原结合,所述靶定抗原预先与中间连接体分子例如生物素或荧光素连接,其接着与用胶体金标记的抗生物素蛋白链菌素或抗荧光素抗体反应。因此,红色表示阳性测试,没有颜色变化表示阴性测试。同样,感兴趣的聚合物被用于将感兴趣的蛋白质连接到固体相以及介导使用标记物标记蛋白质,所述标记物例如额外的反应物,例如生物素或抗生物素蛋白链菌素等。

[0093] 此外,一种或多种生物素或连接有荧光素的酶分子,例如HRP,也可以连接到抗生物素蛋白链菌素或抗荧光素抗体标记的胶体金颗粒。一旦加入底物分子,由于多种报告剂分子所以信号可以进一步增强。

[0094] 或者,所述捕获抗体可以结合一种复合物,该复合物由预先与中间连接体分子例如生物素或荧光素连接的抗原-检测剂抗体组成,接着与用胶体金标记的抗生物素蛋白链菌素或抗荧光素抗体反应。同样,红色表示阳性测试,没有颜色变化表示阴性测试。

[0095] 本发明的另一个方面是通过生物素-抗生物素蛋白链菌素-ABP或荧光素-抗荧光素-ABP键合将检测剂抗体连接到胶体金颗粒上。这将可以实现快速构建各种基于夹层

的检测和微阵列。

[0096] 本发明的另一个方面是首先用中间连接体例如生物素或荧光素标记抗原或抗原的混合物。所述捕获抗体可以结合抗原上的报告剂分子,例如缀合到抗原上的生物素/荧光素,或者抗原的表位,然后利用例如用抗生物素蛋白链菌素或抗荧光素标记的报告剂检测结合的抗原。阴性测试表现为没有颜色变化,而阳性测试通过颜色的变化表示。同样,感兴趣的聚合物被用于将抗生物素蛋白链菌素或抗荧光素-抗体连接到报告剂,即胶体金颗粒。

[0097] 第四检测构型是基于竞争格式。捕获抗体被固定到固体相上,抗原用例如胶体金颗粒标记。在没有靶定抗原的情况下,所述金标记的抗原将直接与所述捕获抗体反应,从而产生特征红色,这解释为阴性测试。与此相反,在靶定抗原存在的情况下,由于空间效应,所述靶定抗原将比所述金标记的抗原更快并且更牢固地结合所述捕获抗体,从而不产生颜色变化,这解释为阳性测试。与此颠倒,也可以使用相反的抗原/抗体构型。

[0098] 第五检测构型是使用上述四种检测格式的任何一种,或者使用直接或间接检测和/或定量感兴趣的目标的任何其它检测格式,来构建使用例如光阅读机来定量的用于检测和量化多种抗原的蛋白质微阵列(图4)。

[0099] 各种检测格式中的任何一种都可以本发明的实践中。本领域技术人员能够使用能够完成感兴趣的目标化合物确认的试剂来很好地配置检测。

[0100] 本发明的检测可以配置为定性检测,例如可商购的怀孕检测试剂盒,其产生“是/否”可见反应。通过提供分级数量的反应物、合适的对照物和一系列使用已知试剂的对照反应来提供用作对比的“标准曲线”,本发明的检测也可以产生定量结果。在可以从各种文本和出版物的任一种中得到的教导的指导下,配置提供定量结果的检测在本领域中是公知的。

[0101] 在本发明的一个方面,所述不对称支化的聚合物与生物活性分子(即IgG抗体、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素)共价连接。所得到的缀合物与胶体金颗粒反应。所得到的抗体-ABP-金缀合物可以被加入如图5A和5B所述的横向流动免疫检测中。

[0102] 所述不对称支化的聚合物提供三种独特的特征。第一,所述不对称支化的聚合物用作抗体和固体表面或颗粒表面之间的间隔物分子。第二,所述不对称支化的聚合物作为载体以运送生物活性分子以及作为固定物将这些分子从溶液粘合到固体表面,其中只有所述缀合物的该不对称支化的聚合物部分接触所述表面。第三,在该锚定过程期间,所述不对称支化聚合物-生物活性分子缀合物还在固体表面对复合物进行自我定向。

[0103] 图6说明了使用横向流动检测格式的改性无规不对称支化的PEI聚合物-抗体缀合物的检测性能对比结果。如前面所解释的,当抗体直接吸附到固体表面(即胶体金表面)上时,由于变性,抗体分子非常快的丧失活性。此外,抗体和胶体金之间的连接很大程度上依赖于抗体的等电点。在大多数情况下,抗体和金颗粒之间的静电相互作用并不足够强,从而产生各种由解离造成的不希望副产物,其通常导致严重的错误阳性反应和稳定性问题。因此,在灵敏性、稳定性和重现性方面,不对称支化的聚合物-抗体缀合物提供了好得多的检测结果。

[0104] 如图6所示,光密度测量(扫描器单位)表示的定量检测结果证明信号的增加正相关于抗原(蓖麻毒蛋白类毒素)浓度的增加。当将基于改性ABP-抗蓖麻毒蛋白缀合物

的检测与只基于抗体的检测条进行对比时,发现存在非常显著的灵敏度差异。如果 30 扫描器单位(未经训练的个人可以容易地确认测试线)被设定为阳性测试的最小值,那么基于 ABP 的检测的灵敏度是相应的基于抗体的检测的至少 60 倍。在更高的浓度,结果甚至更加显著,在基于 ABP-Ab 的检测中随着浓度增加光密度快速增加,而基于 Ab 的测试线最终形成平台,即使在浓度增加的情况下。

[0105] 这些数据再次证明,不使用 ABP,大部分抗体分子或者变性或者在固体相表面较差地定向。所述 ABP 不仅是作为载体,而且更重要的是当从溶液固定到固体表面上时作为抗体分子的锚定间隔物,从而完全消除了蛋白质变性问题。在各个浓度光密度响应的巨大差异也提供了测定未知样品浓度的定量方法。与此相反,在相同的浓度范围,基于抗体的检测对浓度变化的响应要低得多,因此不适合定量测量。

[0106] 除了灵敏度显著增强以外,所述基于 ABP-Ab 的横向流动检测也更加适合用于医疗诊断学、目标发现以及在临床试验和治疗处理期间监控生物标记物变化和蛋白质曲线。

[0107] 还以微阵列格式构建了“间接”夹层检测用于检测肉毒杆菌类毒素。如图 7 所示,当使用 ABP 将抗生物素蛋白链菌素连接到胶体金时,与非 ABP 检测比较,反应的强度得到显著改进,因此极大地增加了检测灵敏度。结果是增强阳性信号。使用相同的原理,可以容易地制造基于夹层、竞争或顺序检测格式的检测和微阵列。

[0108] 包括结合对中的一个、感兴趣的无规不对称支化的聚合物和报告剂分子的感兴趣的缀合物可以被配置成很多不同的检测格式,其中可以同时监控一种、两种、三种、四种或更多种目标。这种同时检测可以使用一个或多个装置进行,所述装置在本文描述的和本领域公知的合适的固体相上载有缀合物,所述合适的固体相例如塑料,例如微滴定板,或者膜,例如硝化纤维素。一个单独的装置可以包含多种缀合物以检测多种目标。这种多重装置可以检测两种、三种、四种或更多种目标。

[0109] 一旦连接到胶体金纳米颗粒(5-100nm)或乳胶珠(0.2-1 μm)上,所述 ABP-Ab 缀合物也可以用于制造基于微珠的纳米阵列或微米阵列。在两种情况下,每个微珠一种抗体或每个微珠多种抗体都可以合成。所述微珠纳米/微米阵列被发现对于从生物流体例如血清、血浆、全血、唾液和尿液分离和检测靶定蛋白质非常有效。

[0110] 一旦包括上述检测构型,可以看出在检测中或在装置上被检测的分子或标记物的数目可以是单独一种或多种。因此,也可以构建芯片微阵列(图 4)。使用相同的原理,也可以发展高密度微阵列用于同时确认多种目标,所述目标包括蛋白质、毒素、病毒、细菌、细菌芽孢、药物、化学试剂、污染物和/或任何其它感兴趣的目标。可以使用横向流动检测格式构建所产生的微阵列。另一种检测格式是珠阵列(如 BD Illumina and Luminex 所提供的)、平板微阵列、微珠微阵列或它们的组合。

[0111] 这种检测可以被配置成含有多种生物标记物,所述生物标记物是期望目的的诊断剂。因此,此类多重装置(其可以是纳米阵列或微米阵列),可以是病理状态的诊断工具,展示对刺激物例如食品或药物等的反应。使用的生物标记物的数目将取决于终点,并且通常是证明所述终点是否存在所需的标记物的最小数目。因此,如本领域已知的那样,确定宿主暴露于病原体可以依赖于结合所述病原体的单一诊断抗体。对药物的反应性可能需要更大数量的生物标记物,因为药物对宿主的影响可能引发很多细胞功能中的反应。此外,所使用的所述生物标记物可能需要被优化从而对大多数随机繁殖的群体都是可操作的,或者可能

需要多个检测并且在每个检测中使用不同系列的生物标记物。

[0112] 本发明的优选缀合物包括其中不对称支化的聚合物缀合物包含与至少一种生物活性材料或生物响应指示剂的至少一个单元结合的至少一个不对称支化的聚合物的那些。感兴趣的聚合物可以包括不含中心核的那些或含有中心核的那些,例如公开于 Denkwalter 等人的专利中的那些。本发明的优选不对称支化的聚合物包括其中不对称支化的聚合物含有至少一种通过至少一类能够形成额外支链的单体构建的无规或有规不对称支化聚合物的那些。如在本文中所述的,一些感兴趣的聚合物不含有中心核。无规和有规不对称支化的聚合物的一些例子是无规支化的聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺、聚酰胺胺,和有规支化的聚赖氨酸。

[0113] 所述不对称支化的聚合物缀合物可以结合的表面可以变化,并且可以包括玻璃、硝酸纤维素、纸、石英、塑料、金属、胶体颗粒(包括胶体金、胶体银、胶体铂)、聚合物或乳胶珠、无机颗粒、硅片、着色的乳胶颗粒、含有荧光或有色材料的颗粒、粘土、陶瓷、基于硅的或陶瓷的半导体颗粒、硅或陶瓷半导体芯片、纳米晶体、量子点和上转换(up-converting)磷光颗粒。量子点是无机纳米颗粒(直径通常小于5纳米),通过控制包含在所述颗粒中的材料的组成和大小能够发出不同颜色的光。上转换磷光体是亚微米陶瓷微颗粒,当其用近红外光激发时发出可见光。此类颗粒的大小为100nm-500nm,包含稀土例子例如镱,其能够吸收红外光的两个光子。由于在背景中没有自发荧光,所以这些微颗粒通常用作生物检测的标记部分。

[0114] 包含感兴趣的不对称支化的聚合物和具有药物结合能力的部分的所述检测可以用于在药物接受者中监控药物存在和水平。所述部分可以是例如抗体、抗体的抗原结合部分或配体。被监控的药物可以是任何药物,包括在本文中提及的那些,并进一步包括 cox-2 抑制剂、NSAIDs、抗有丝分裂药、抗生素、抗病毒药等,例如华法林、苯妥英、地高辛、卡马西平、甲氨蝶呤、苯巴比妥、普鲁卡因胺、丙戊酸钠、茶碱、环孢霉素、他克莫司、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星和万古霉素。

[0115] 本发明包括含有可存储、存储稳定的试剂的试剂盒,其包括检测,例如上面所述的那些。存储稳定性可以通过在室温、冰箱温度等温度下的存储时间衡量。所述试剂盒可以包括多个小瓶,所述小瓶含有液体试剂或将用合适的稀释剂例如无菌水或缓冲溶液重新构建的干燥试剂。所述试剂盒可以包含容纳各种试剂的装置,例如已知的怀孕测试试剂盒、横向流动免疫测试试剂盒等等。因此,所述试剂盒的检测格式可以是纤维素试纸(dipstick)、读数棒(wand)、载玻片等的形式或形状。通常此类装置包括具有适当固体相的塑料托架,所述固体相例如塑料、膜、纸等等。

[0116] 本发明检测的结果可以以定性的方式确定,例如在具有可视读数的纤维素试纸检测中。此类检测是已知的并且可由各种免疫检测作为例子,例如怀孕测试试剂盒等等。

[0117] 本发明检测的结果可以通过机械方式确定。所述机械方式可以是任何传感或探测报告剂分子或报告剂分子的产物的特定物理特征的物理装置。所述机械装置可以是位于实验室环境中的装置,或者可以是位于用于应用地点的可移动环境中的装置,例如手持式装置。所述装置可以制成更小的便携式格式以用于更多指定的应用地点,例如在医院的房间中、在医生办公室、在田野中等等。可以用于检测分光光度、发光、化学发光、荧光或比色报告剂分子的便携式装置和手持式装置的例子在例如美国专利 5083868、H1563、6480115、

6394952、5900379、6663833、6656745、6267722、6706539、5646735、6346984、6002488、5962838、4917495、6575368 和 6583880 中提供。

[0118] 此类机械装置是具有用于确定特别是报告剂分子的检测或传感设备的那些装置。检测设备是适合于判定特定报告剂分子的存在性的设备。放射性报告剂分子使用例如闪烁计数器或 Geiger-Muller 计数器是可检测的。光发射、荧光或发光报告剂分子使用例如包括例如光电倍增管、扫描器、电荷耦合器件 (CCD) 图像传感器、互补金属氧化物半导体 (CMOS) 图像传感器等的比色计、折射计、反射计、光感测装置是可检测的。

[0119] 所述装置还可以包括数据处理设备,从而处理检测到的信号并数字化。该处理设备通常称为中央处理器, CPU, 或微处理器, 例如半导体芯片, 在其中进行数据处理和分析。数字化的信息或者存储在自带的数据存储装置中 (例如磁带、磁盘、硬盘驱动器等), 或者通过数据传输设备传输到远程数据存储设备或其中对信息进行分析的数据处理设备, 所述数据传输设备例如有线计算机传输设备或者是使用恰当的设备例如红外、无线电波、微波等的无线设备。

[0120] 所述装置可以包括数据输入设备。例如, 所述装置可以包括键盘、扫描器等以提供命令供所述装置执行或将确认信息与数据联系起来。所述扫描器可以是获取并存储图像的扫描器, 或可以是翻译代码例如条形码的扫描器, 参见例如美国专利 5885530 和 6099469。

[0121] 因此, 远程检测装置可以包括具有软件以控制该装置操作的数据处理设备, 例如在其上具有集成电路的电路板, 参见例如美国专利 5494798 和 6480115。该远程装置可以包含数据存储设备, 该数据存储设备可以是可移动的, 例如磁盘、“记忆棒”和其它数据存储形式。如果是不可移动的, 存储的数据可以通过数据传输设备存取。此类传输设备可以是硬线以直接下载数据, 或者此类传输可以采取本领域已知的可选择的方式, 例如无线信号, 例如短波信号, 例如射频, 微波和红外。此类无线信号可以通过天线或通过卫星发送。

[0122] 例如, 可以分析所述信息以比较实验测试和对照测试。或者, 实验测试, 作为原始数字或作为经过对照校正过的数字, 与群体平均值进行对比。数据还原和分析可以使用各种可用算法中的任何一种进行, 或者可以对所述算法进行开发以得到软件工具以得到对数据的适当分析和结果的合适输出。

[0123] 所述装置可以含有显示设备, 例如 CRT 或液晶显示器, 其中所检测和 / 或所分析的数据被适当地处理 (例如与对照数据 (和预先得到的群体数据相关) 进行比较) 并且所述数据被提供给装置操作者。所述数据可以按照要求提供, 例如如上面所述的那样提供原始数据、用对照值校正过的相对数据或者两种数据都提供, 数据可以显示在远程装置上, 对于使用点的结果参见例如美国专利 5885530。

[0124] 或者, 数字化的信息可以传输到数据存储设备, 所述数据存储设备包含在该装置内或与该装置是分开的。数字化的信息可以使用已知的传输手段传输到外部存储设备。包含在存储设备中的数据然后可以与 CPU 进行传送以进行适当的数据分析。

[0125] 具有数据处理界面和设备的此类装置的例子包括美国专利 5543920、5589932 和 6362886。

[0126] 感兴趣的缀合物可以载有治疗生物活性分子并且可以加入到适合于给药的药物组合物中。例如感兴趣的聚合物可以被用于涂覆或包裹生物活性分子, 例如药理活性分子, 例如药物, 例如胰岛素。此类组合物典型地包含活性成分组合物和药学可接受的载体。如在

本文中所使用的,术语“药学可接受的载体”包括任何以及所有的和药物给药相容的溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。对于药物活性物质使用此类介质和试剂是本领域公知的。到目前为止,例外情况是与活性化合物不相容的任何常规介质或试剂,人们也期望在组合物中使用它们。补充性活性化合物也可以加入到组合物中。

[0127] 按照本发明的公开使用的本发明的药物组合物被配制与目标给药途径相容。给药途径的实例包括肠胃外给药,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括下面的组分:无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂例如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如EDTA;缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于张力调节的试剂例如氯化钠或葡萄糖。pH可以用酸或碱调节,例如HCl或NaOH。所述肠胃外制剂可以封装并存储在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量药瓶中。

[0128] 适合于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在可水溶的情况下)或分散体和用于以后制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、CremophorEL®(BASF; Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲的盐水(PBS)。在所有情况下,所述组合物必须是无菌的并且应该是达到存在注射性这种流动程度的流体。所述组合物在制造和存储条件下必须是稳定的并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及它们的适当混合物。适当的流动性可以例如通过使用涂层例如卵磷脂(在分散体的情况下通过保持所需的颗粒尺寸)和通过使用增稠剂或表面活性剂来保持。防止微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等等。在很多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖类,多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇,或氯化钠。可注射组合物的延长的吸收可以通过在组合物中包括能延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝或明胶来产生。

[0129] 无菌可注射溶液可以按照需要通过将所需量活性化合物以及上述列举成分中的一种或其组合加入合适的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。通常,分散体通过将活性化合物加入包含基础分散介质和其它所需的来自上述所列那些的成分的无菌赋形剂中制备。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从而从其预先灭菌过滤的溶液产生活性成分和任何额外期望成分的粉末。

[0130] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。对于口服治疗给药目的,活性化合物可以与赋形剂结合并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用流体载体制备,得到糖浆剂或液体制剂,或者对于用作漱口药,其中流体载体中的化合物口服施加并冲洗以及被吐出或吞掉。

[0131] 可以包括药物相容的粘合剂和/或辅助材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有任意下述具有类似性质的成分或化合物:粘合剂例如微晶纤维素、黄蓍树胶或明胶;赋形剂例如淀粉或乳糖;崩解剂例如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂例如胶体二氧化硅;甜味剂例如蔗糖或糖精;或者矫味剂例如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味品。

[0132] 对于吸入给药,化合物以例如气溶胶或烟雾的形式递送,所述气溶胶从含有合适

推进剂的加压容器或分配器喷射或从喷雾器喷射,所述合适的推进剂例如是气体,例如二氧化碳。

[0133] 全身给药也可以通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮给药,在制剂中使用适合于待穿透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域是已知的,包括例如,对于经粘膜给药,清洁剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂完成。对于经皮给药,如本领域通常已知的,活性化合物可以配制成软膏、油膏、凝胶或乳膏。另一种已知的渗透剂是二甲基亚砷。

[0134] 化合物也可以以栓剂(例如与常规栓剂基料例如可可脂和其它甘油酯)或用于直肠递送的滞留灌肠剂的形式制备。

[0135] 在一个实施方案中,活性化合物用将会保护该化合物防止从身体快速排出的载体制备,例如控制释放制剂,包括植入物、贮库、泵和微胶囊化的递送体系。可以使用生物可降解的生物相容的聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯共聚物、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。例如制剂可以是肠溶包衣的。

[0136] 制备这些制剂的方法对于本领域的技术人员来说是显而易见的。所述材料也可以从 Alza Corporation 和 NovaPharmaceuticals, Inc 商购。

[0137] 脂质体和 cochleate 悬浮液(包括用抗体或其它靶定部分靶定到被感染细胞的脂质体)也可以用作药学可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法制备,例如如美国专利 4522811 中所述的那样。

[0138] 特别有利的是以便于给药和剂量均匀的剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物。本文使用的剂量单位形式是指适合作为单元剂量用于被治疗的受试者的物理离散的单位;每个单位含有经计算产生期望的治疗效果的预定数量的活性化合物以及所需的药物载体。所述剂量,例如优选的给药途径和数量,是可以利用本领域已知的方法、基于从临床前和临床研究获得的经验数据得到的。对于在几天时间或更长时间内重复给药,取决于病情,维持治疗直到产生所期望的对疾病症状的抑制。但是,其它剂量方案也是有用的。通过常规技术和检测可以容易的监控治疗的进展。一个示例性的剂量方案公开于 W094/04188 中。本发明剂量单位形式的规格直接依赖于并由活性化合物的独特特性和将要取得的特定治疗效果以及本领域中复合这种活性化合物用于个体治疗的固有限制决定。

[0139] 所述药物组合物可以和使用说明一起包含在容器、包装物或分配器中。

[0140] 给药的另一种方法包括作为食物补充物或添加剂,或者作为与维生素类似的基于预防的剂型,将感兴趣的化合物加入食物或饮料或者与食物和饮料混合。感兴趣的缀合物可以被包裹成可以承受通过胃环境的剂型。此类剂型通常称为肠溶包衣的剂型。或者,如本领域中已知的那样,可以对感兴趣的缀合物进行改性(例如肽键的化学改性)以增加半衰期,以保证口服给药的稳定性。

[0141] 本发明提供治疗有癌症风险(或易患癌症)的对象的预防性和治疗性方法。特定的剂量,即每一剂的数量和给药模式,基于从单独使用活性剂、临床前研究、适应症、临床研究等得到的经验知识,结合已知的药理和药物范例,如本领域中已知的那样进行确定。

[0142] 现在将在下面的非限定性实施例中例证本发明。

[0143] 实施例

[0144] 材料:无规不对称支化的聚乙烯亚胺从 Aldrich and Polysciences 购买。有规不

对称支化的聚合物根据美国专利 4289872 中提供的方法制备。根据公开于文献 (G. Frens et al., Nature Physical Science, Vol. 241, Jan. 1, 1973, 20) 中的方法制备胶体金颗粒。所有的抗体都从 Sigma-Aldrich, Biodesign 或 Fitzgerald 购买。

[0145] 具有氨基官能团的改性无规不对称支化的 PEI

[0146] (m- 无规 -AB-PEI-NH₂-1.0) 的合成

[0147] 在该合成中使用如下包括无规不对称支化的聚乙烯亚胺 (无规 -AB-PEI, MW2000、25000 和 75000)、丙烯酸甲酯 (MA, FW = 86.09)、乙二胺 (EDA, FW = 60.10) 和甲醇的试剂。

[0148] 向圆底烧瓶中加入 1.0g PEI (MW 2000) 和 20ml 甲醇 (溶液 A)。向单独的圆底烧瓶中加入 3.0g 丙烯酸甲酯 (MA) 和 10ml 甲醇 (溶液 B)。然后在室温在搅拌下将溶液 A 缓慢滴加进溶液 B 中。得到的溶液在 40℃ 反应 2 小时。一旦反应完成, 旋转蒸发除去溶剂和未反应的 MA 单体, 然后将产物, MA 官能化的 PEI, 重新溶于 20ml 甲醇中。

[0149] 向圆底烧瓶中加入 80g EDA 和 50ml 甲醇, 然后在 0℃ 缓慢加入 MA 官能化的 PEI (1g MA 溶于 20ml 甲醇)。然后将溶液在 4℃ 反应 48 小时。通过旋转蒸发除去溶剂和过量的 EDA。然后从乙醚溶液沉淀出粗产物, 并通过渗析进一步纯化, 得到约 3.0g 伯胺官能化的无规不对称支化的 PEI (m- 无规 -AB-PEI-NH₂-1.0), 分子量为约 7300。通过 ¹H 和 ¹³C 核磁共振 (NMR) 和尺寸排阻色谱 (SEC) 对产物进行表征。

[0150] 以类似方式制备具有不同分子量的其它 MA 或伯胺改性的无规不对称支化的 PEI 和有规不对称支化的聚赖氨酸聚合物。

[0151] 具有混合的羟基和氨基官能团的改性无规不对称支化的 PEI (m- 无规 -AB-PEI-NH₂/OH-2) 的合成

[0152] 在该合成中使用如下包括氨基官能化的无规不对称支化的聚乙烯亚胺 (m- 无规 -AB-PEI-NH₂-1.0)、MA、EDA、单乙醇胺 (MEA, FW = 61.08) 和甲醇的试剂。

[0153] 向圆底烧瓶中加入 1.0g 由前述步骤制备的氨基改性的 PEI 或 m- 无规 -AB-PEI-NH₂-1.0 和 20ml 甲醇 (溶液 A)。向单独的圆底烧瓶中加入 3.0g MA 和 10ml 甲醇 (溶液 B)。然后在室温在搅拌下将溶液 A 缓慢滴加进溶液 B 中。得到的溶液在 40℃ 反应 2 小时。一旦反应完成, 旋转蒸发除去溶剂和未反应的 MA 单体, 然后将产物, MA 官能化的 m- 无规 -AB-PEI-MA-1.5, 重新溶于 20ml 甲醇中。

[0154] 向圆底烧瓶中加入 60g EDA、240g MEA 和 100ml 甲醇 (EDA:MEA 的摩尔比是 20 : 80), 然后在 0℃ 缓慢加入 m- 无规 -AB-PEI-MA-1.5 (1g MA 溶于 20ml 甲醇)。然后将溶液在 4℃ 反应 48 小时。通过旋转蒸发除去溶剂和过量的 EDA。然后从乙醚溶液沉淀出粗产物, 并通过渗析进一步纯化, 得到约 3.0g 混合的羟基和氨基官能化的无规 ABP (m- 无规 -AB-PEI-NH₂/OH-2.0, 平均具有 20% NH₂ 和 80% OH 基团, 分子量是约 18000)。

[0155] 以类似方式制备具有不同羟基和氨基比例以及不同分子量的其它改性的无规 AB-PEI 和有规 AB 聚赖氨酸聚合物。

[0156] 具有伯胺链端基团的烷基改性的无规不对称支化的聚 (2- 乙基噁唑啉) (PEOX) 的合成

[0157] CH₃-(CH₂)₁₇₈-PEOXABP100 (ABP100 是表示在起始反应中单体对引发剂比例的任意名称) 的合成是作为用于合成核-壳纳米胶囊的一般步骤提供的。在 500ml 甲苯中的 CH₃(CH₂)₁₇₈CH₂-Br (3.36g) 混合物在 N₂ 下用蒸馏头共沸蒸馏约 15 分钟以除去水。通入加料

漏斗滴加 2-乙基噁唑啉 (100g), 将混合物回流 24-48 小时。一旦聚合完成, 向反应性聚合物溶液 (A) 中加入 12.12g EDA 以引入胺官能团。聚噁唑啉链端与 EDA 的摩尔比是 1 : 20。

[0158] 也可以加入吗啉来终止反应。因此, 向反应性聚合物溶液 (A) 中加入吗啉来终止反应。粗产品重新溶于甲醇中, 然后从大量过量的乙醚中沉淀出来。底层重新溶于甲醇中并通过旋转蒸发和真空干燥, 得到不对称无规核-壳超支化的 PEOX 聚合物, 为白色固体 (101g)。以类似方式制备其它不对称超无规支化的聚合物例如 C_{12} -PEOXABP20、50、100、200、300、500、 C_{18} -PEOX ABP20、50、200、300、500、 C_{22} -PEOX ABP20、50、100、200、300、500 和聚苯乙烯-PEOX 等, 以及未改性的和改性的聚(2-取代的噁唑啉) 例如聚(2-甲基噁唑啉) 聚合物。所有的产物都通过 SEC 和 NMR 分析。

[0159] IgG- 不对称无规支化的聚合物缀合物的制备

[0160] 无规支化的混合表面 (OH/ NH_2 混合) m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2-IgG 缀合物的制备是作为用于制备聚合物-抗体和聚合物-抗生物素蛋白链菌素的一般步骤提供的。其它缀合物例如 PEI-IgG, m- 无规 -AB-PEI- NH_2 -1-IgG, m- 无规 -AB-PEI- NH_2 -2-IgG, m- 无规 -AB-PEI- NH_2 -3-IgG, m- 无规 -AB-PEI- NH_2 -4-IgG 以及 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-1 (OH/ NH_2 混合)-IgG, m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 (OH/ NH_2 混合)-IgG, m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-3 (OH/ NH_2 混合)-IgG, 有规聚赖氨酸聚合物, 具有伯胺链端的烷基改性的无规支化的聚(2-乙基噁唑啉) 都以类似的方式合成。也以类似的方式进行与不对称无规支化的 PEOX 聚合物形成的各种蛋白质缀合物的合成。按照 Bioconjugate Techniques (G. Hermanson, Academic Press, 1996) 中提供的方法合成生物素化 -IgG 缀合物。

[0161] LC-SPDP- 混合表面 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 : 向在 400ml 磷酸盐缓冲溶液 (20mM 磷酸盐和 0.1M NaCl, pH7.5) 中的混合表面无规支化的 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 (400×10^9 mol) 中加入在 400ml 水中的 4.0×10^6 mol 磺基-LC-SPDP (Pierce, IL)。漩涡混合并在 30°C 培养 30 分钟。通过凝胶过滤色谱纯化 LC-SPDP-m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 并用缓冲溶液 A (0.1M 磷酸盐, 0.1M NaCl 和 5mMEDTA, pH6.8) 平衡。进一步浓缩得到 465ml 溶液, 浓度约为 0.77nmol/ μ mol。

[0162] 从 LC-SPDP m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 制备硫醇化 (thiolated) 的 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 : 将 LC-SPDPm- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 (50nmol, 在 65ml 缓冲溶液 A 中) 与 100ml 二硫苏糖醇 (DTT) (在缓冲溶液 A 中, 50mM) 混合, 并在室温培养 15 分钟。通过用缓冲溶液 A 凝胶过滤除去过量的 DTT 和副产物。在 10KCentricon Concentrator 中浓缩, 得到 390ml 硫醇化的 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2, 其用于与活化的抗体缀合。

[0163] 马来酰亚胺 R (MAL-R) 活化的抗体 : 向在 PBS 中的抗体 (310 μ L, 5.1mg 或 34nmol) 加入 20.4ml MAL-R-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液 (10mM, 在水中)。混合物漩涡混合并在 30°C 培养 15 分钟。用缓冲溶液 A 通过凝胶过滤纯化。该马来酰亚胺-R 活化的抗体被用于与硫醇化的 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 缀合。

[0164] m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2- 抗体缀合物 : 向硫醇化的 m- 无规 -AB-PEI- NH_2 /OH-2 (310ml 或 35.7nmol) 中加入 MAL-R- 活化的抗体 (4.8mL 或 34nmol)。将反应混合物浓缩到约 800ml, 在 4°C 培养过夜, 并在室温培养约 1 小时。一旦完成, 用 100 μ L 乙基马来酰亚胺 (50 毫摩尔浓度的溶液) 淬灭反应, 然后缀合物在羧甲基纤维素柱 (5ml) 上使用在 pH6

的 20mM 磷酸盐缓冲溶液中的氯化钠阶段梯度进行分级。缀合物用氯化钠梯度洗脱,并通过阳离子交换色谱、UV 光谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳表征。

[0165] 通过还原偶联缀合

[0166] 抗体的还原:向在 160 μ L 缓冲溶液 B(含有 0.1M 磷酸钠、5mM EDTA 和 0.1M NaCl, pH6.0) 中的 2.1mg 或 14nmol 抗体中加入 40 μ L DTT(50mM, 在缓冲溶液 B 中)。将溶液在室温静置 30 分钟。在用缓冲溶液 B 平衡的 Sephadex G-25 柱中通过凝胶过滤纯化。将还原的抗体浓缩至 220 μ L 并用于下面的缀合之中。

[0167] MAL-R- 混合表面 ABP:向在 pH7.4 的 400 μ L (400×10^9 mol) 中的混合表面 ABP 中加入 400 μ L 的 MAL-R-NHS(10mM, 在水中)。混合并在 30°C 培养 15 分钟。一旦终止,在用缓冲溶液 B 平衡的 Sephadex G-25 柱中纯化。收集 MAL-R- 混合表面 ABP 并在 -40°C 在相同的缓冲溶液中等分存储。

[0168] 混合表面 ABP- 抗体缀合物:在搅拌下向还原的抗体 (14nmol, 220 μ L) 中加入 MAL-R- 混合表面 m- 无规 -AB-PEI-NH₂/OH-2 (154 μ L, 16.6nmol)。向该混合物中加入 12.5 μ L 碳酸钠溶液 (1.0M 溶液) 以将 pH 调节到 ~ 6.8。在室温下继续反应 1 小时。通过加入 100 μ L 的半胱胺溶液 (0.4mM 溶液) 终止反应。缀合混合物在 CM 纤维素柱上纯化,用氯化钠梯度洗脱。

[0169] 基于胶体金的免疫检测

[0170] 金 -Ab 缀合物的制备:

[0171] 向 125ml 烧瓶中加入 60ml 胶体金溶液 (20-80nm 直径,通过 TEM 测量,0. D. 1.078, 通过 UV 光谱法测量) (Frens et al., 如前面所述)。通过加入 0.2M 的碳酸钾溶液将所述溶液的 pH 调节到 8-11。在搅拌下向该溶液中加入 600ml 缀合的抗体溶液 (0. D. 0.1-1.5, 在硼酸钠缓冲溶液中),接着加入 600ml 牛血清白蛋白 (20%, 带有叠氮化钠稳定剂)。混合物进一步在 20°C 搅拌 20-60 分钟。溶液保持颜色为紫色,并观察到一定程度的起泡。完成之后,移去搅拌棒,将反应混合物转移到两个 50ml 的锥形试管中。对所述材料进行离心直到在上清液中观察到非常少的颜色。除去上清液并在每个试管中加入 400ml 的 25mM 硼酸钠缓冲溶液。充分混合内容物,合并两个试管的材料并通过 UV-Vis 表征。

[0172] 以类似方式制备金 -ABP- 抗生物素蛋白链菌素缀合物。通过接着向金 -ABP- 抗生物素蛋白链菌素缀合物中加入生物素化 Ab, 制备金 -ABP- 抗生物素蛋白链菌素 - 生物素 -Ab 缀合物。可以用作报告剂的其它生物活性分子,例如辣根过氧化物酶 (HRP) 或抗生物素蛋白以及其衍生物和类似物,也可以以类似方式连接到金上。但是,在测试期间,必须加入额外的底物以实现信号增强。

[0173] 横向流动或纤维素试纸 (dipstick) 免疫检测条实验

[0174] 免疫检测装置或“检测条”可以由在膜保持装置中的纤维素条带或其它膜 (c) (通常由惰性塑料组成)、在所述膜末端的吸附剂垫 (a) 和接收垫 (b) 组成 (图 5A)。在约 4mm 的距离内将两种不同的抗体 (捕获抗体 (d) 和对照抗体 (e)) 喷在膜上。捕获抗体用于捕获分析物分子,而对照抗体用于验证检测剂抗体的活性。检测剂抗体 (标记有报告剂,例如预先缀合到胶体金颗粒上) 存储在缀合物释放垫 (b) 上,并被放置在吸收剂垫下面。然后将条带 / 垫复合物放置于保持装置中 (图 5B), 主要目的是便于在田野或家庭环境中操作。该检测条的全重可以是大约 4.5g, 尺寸可以是大约 2cm (宽度) $\times$ 7cm (长度) $\times$ 0.5cm (厚

度)。

[0175] 一旦样品溶液被通过样品池或使用纤维素试纸施加到吸收剂垫(a)上,抗原将原位与检测剂抗体-ABP-金缀合物混合,并且所产生的抗原-检测剂抗体-ABP-金复合物将被预先喷在膜上的捕获抗体捕获。结果,形成由捕获抗体-抗原-检测剂抗体-ABP-金复合物组成的复合物,出现红色(T)(图5B)。

[0176] 该复合物显著不同于现有技术(即基于“夹层”的横向流动免疫检测),其中现有技术包括只由捕获抗体-抗原-检测剂抗体-金复合物组成的不同的复合物或产物。在这些复合物中,检测剂抗体直接与胶体金颗粒发生相互作用,从而造成此类抗体在金表面的无规定向。这种无规定向造成不希望的预交联的产物(即检测剂抗体-胶体金颗粒簇),显著增加背景噪音或错误阳性水平。与此相反,本发明的基于ABP的检测完全消除预交联的副产物。这种组成上的差异的结果就是,基于ABP的检测使用10-20分之一的试剂显示出增强至100倍的灵敏度(图6)。

[0177] 如图5B中所示,当施加未知溶液到样品池(S)时,如果捕获线(T)和对照线(C)都变红,那么纳米测试结果是阳性。如果只有对照线变红,那么测试是阴性。

[0178] 检测可以配置为是定性的,也就是说,对于该检测准备提供的用视觉可分辨的结果,将以产生阳性或阴性结果的确定形式和方式呈现。另一方面,检测格式是适合于产生可定量结果的。从而,可以用提供反应水平测量的装置扫描检测条(ticket)。

[0179] 制备抗原(即类毒素)浓度为1-250ng/ml(总体积100ml)的一系列样品用于测试。一旦样品溶液在5秒内被滴加到吸收剂垫(记录该时间),基于流体相的毛细运动该溶液将横向流动。一旦该溶液通过缀合物释放垫,金-Ab或金-ABP-Ab缀合物就将被释放。如果测试是阳性的,由于形成免疫复合物,那么对照线和测试线都将变红,红色来自胶体金颗粒。如果测试是阴性的,由于在测试线/捕获Ab位置没有“夹层”免疫复合物,所以只有对照线变红,在测试线上将不出现颜色。检测所需的时间大约是15分钟。

[0180] 根据相同的检测设计,基于微阵列的检测可以以类似方式构建。在这种情况下,通过可商购的微阵列自动机器,捕获抗体被点在固体表面上,在那里检测剂抗体-金缀合物混合在一起。一旦以直接、间接或顺序夹层检测格式加入未知样品,阳性测试在表面上预先确定的相应的捕获抗体位置显示出红色变化,而阴性测试不显示颜色变化。或者,在竞争检测格式中,正好相反。同样,感兴趣的聚合物被用于将抗体或抗原固定到固体表面上。

[0181] 所有本文引用的参考文献,包括要求优先权的两个临时申请,2003年11月21日提交的美国临时申请60/523692和2004年6月21日提交的60/580728,都全部引入本文作为参考。

[0182] 对本领域的技术人员来说,根据上述教导,是可以对本发明进行各种改变、改动和调整的。因此,可以理解,虽然说明书中已经利用一些具体实例描述了本发明,但是本发明并不限于本文中提供的具体实施方案。相反,本发明包括本发明的精神和范围内所有的备选方式、改动和等价方案。

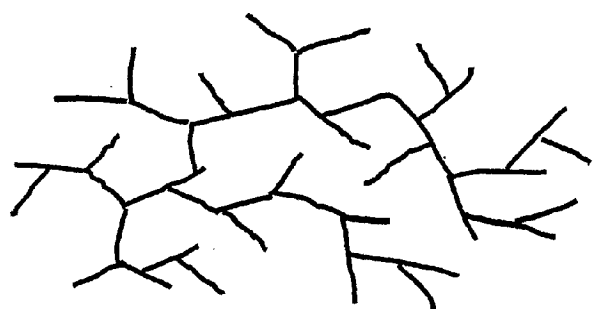
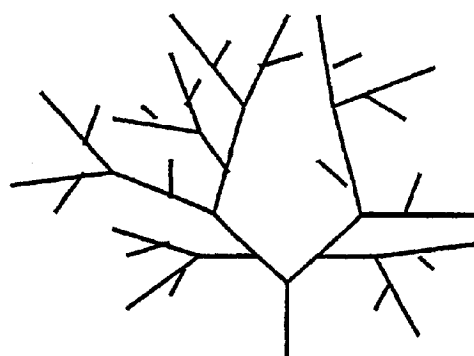
无规 **ABP****A**有规 **ABP****B**

图 1

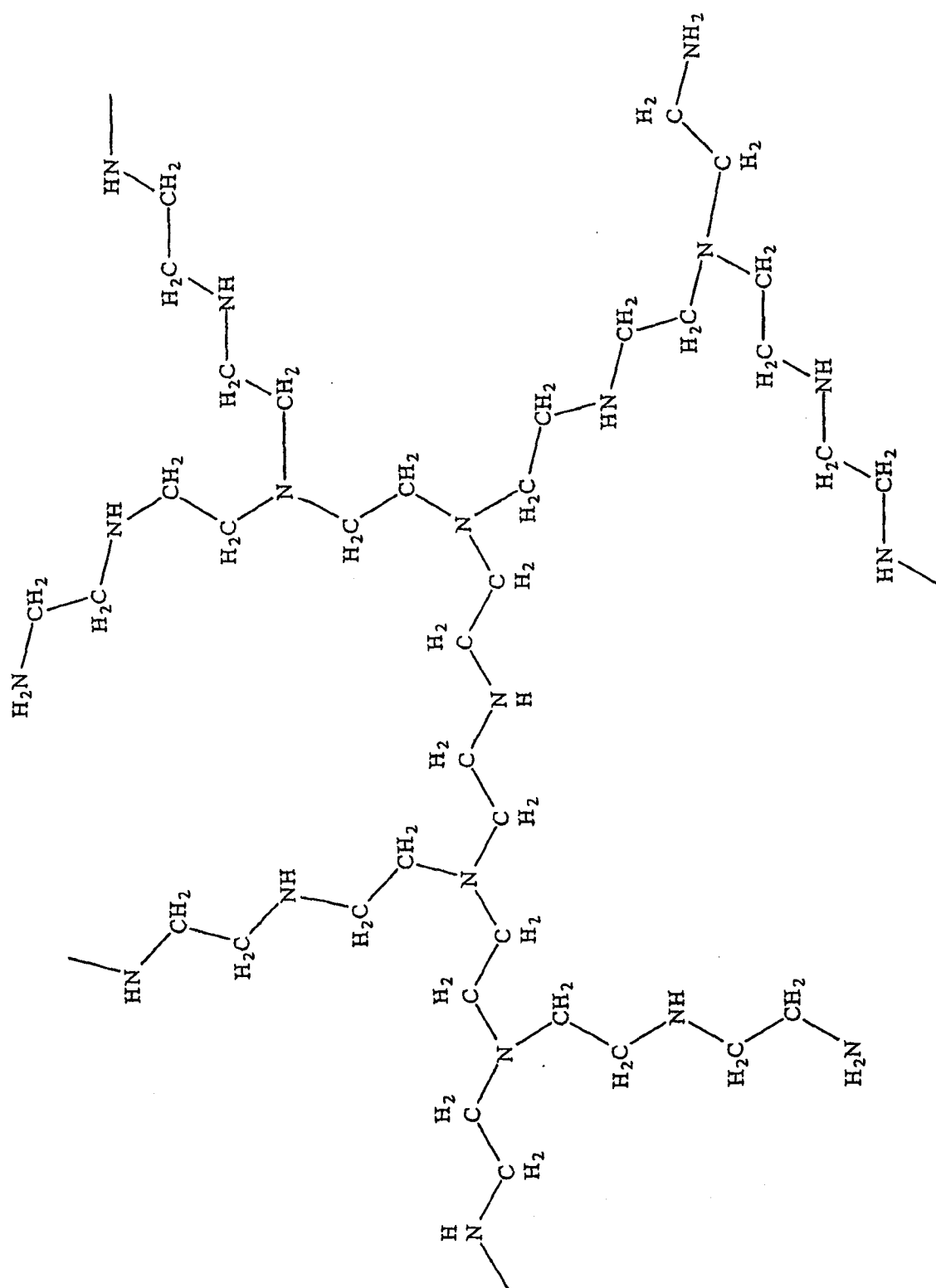


图 2

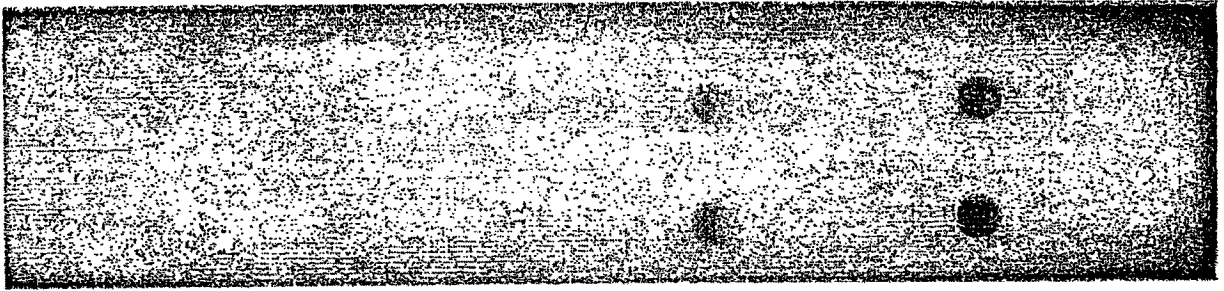


图 4

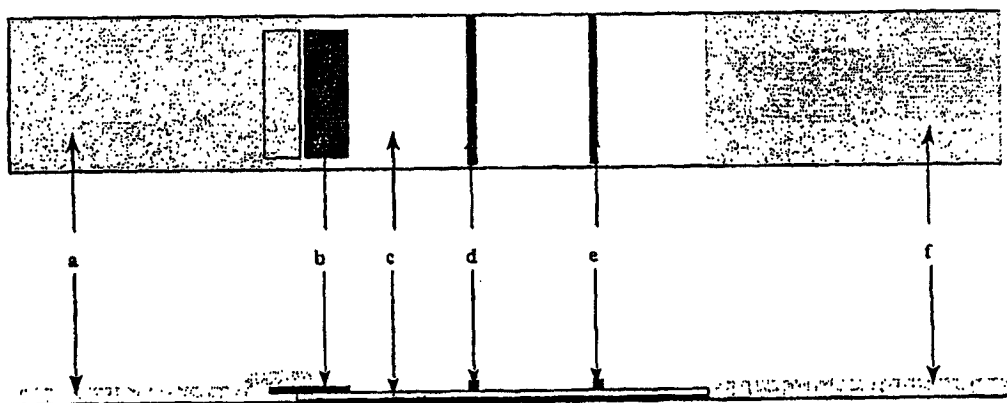


图 5A

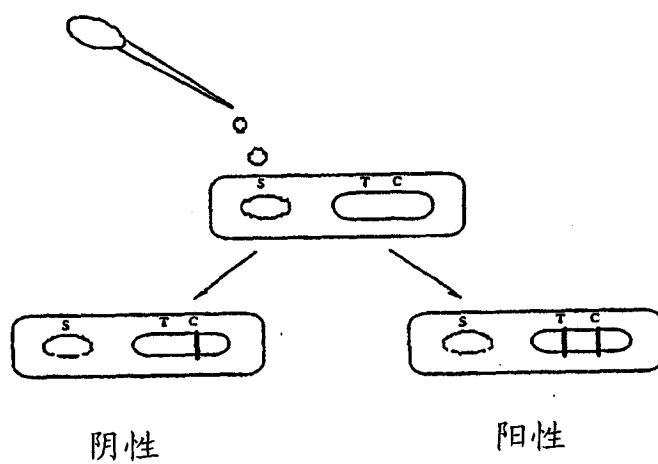


图 5B

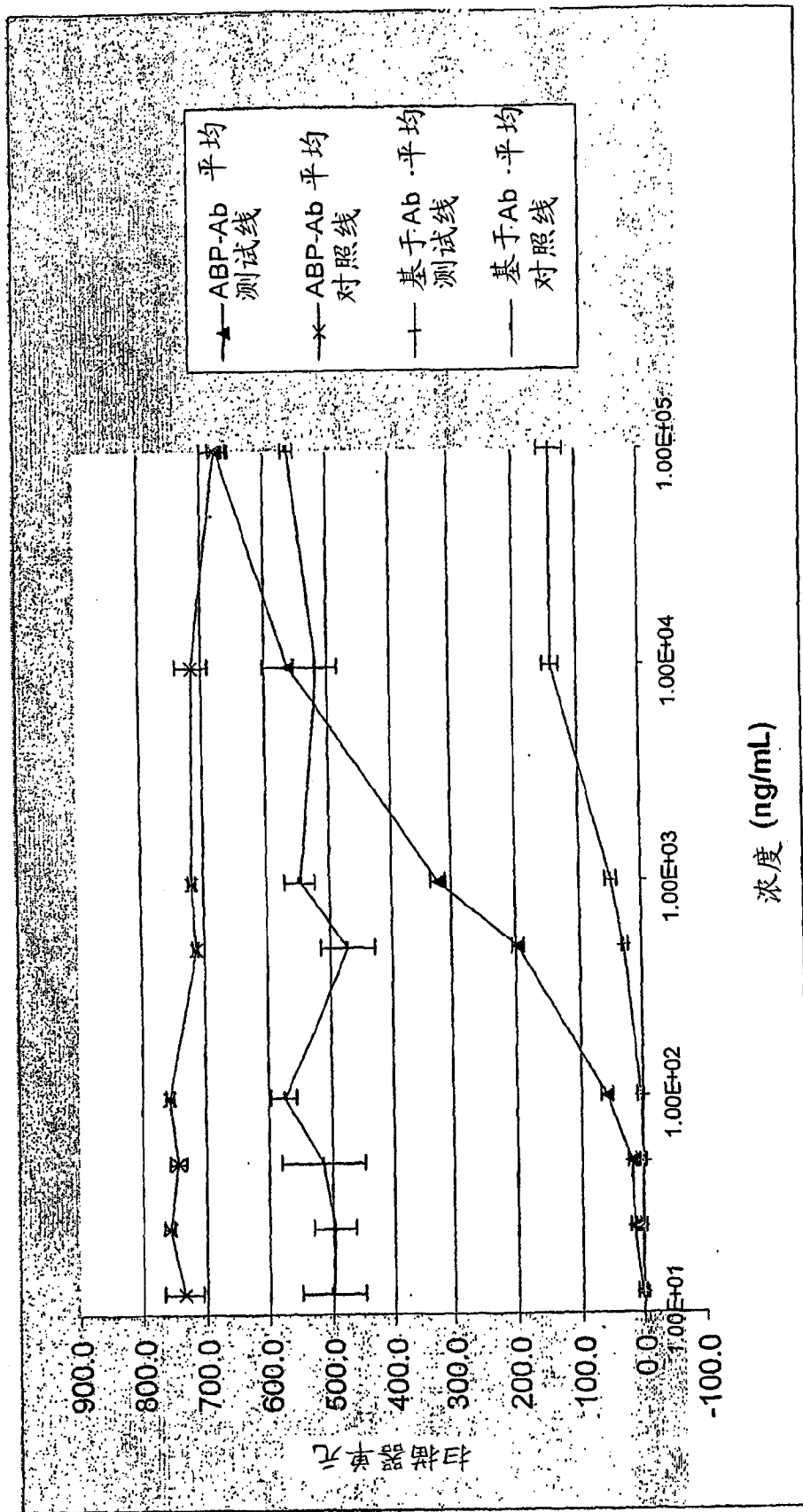
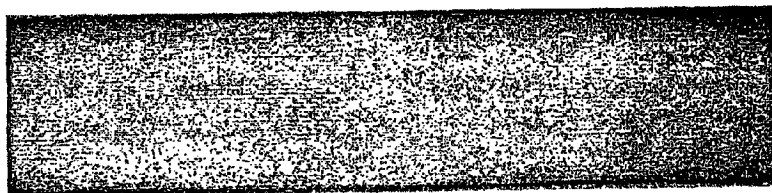
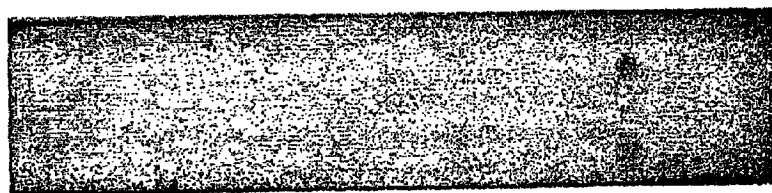


图 6

在100ng/ml点类毒素的情况



不使用ABP构建的阵列



使用ABP构建的阵列

图 7

专利名称(译)	不对称支化的聚合物缀合物和微阵列检测		
公开(公告)号	CN1930304B	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN200480040816.1	申请日	2004-11-22
[标]发明人	R·殷 D·秦 J·潘		
发明人	R·殷 D·秦 J·潘		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N9/96 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/553 A61K		
CPC分类号	G01N33/5308 A61K47/6949 A61K49/0002 B82Y5/00 B82Y10/00 B82Y30/00 Y10S435/975 Y10T436/11		
审查员(译)	田园		
优先权	60/523692 2003-11-21 US 60/580728 2004-06-21 US		
其他公开文献	CN1930304A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

不对称支化的聚合物缀合物和微阵列检测不对称支化的聚合物与生物活性剂结合以用于各种目的，包括药物递送以及与结合对的成员之一缀合用于检测。

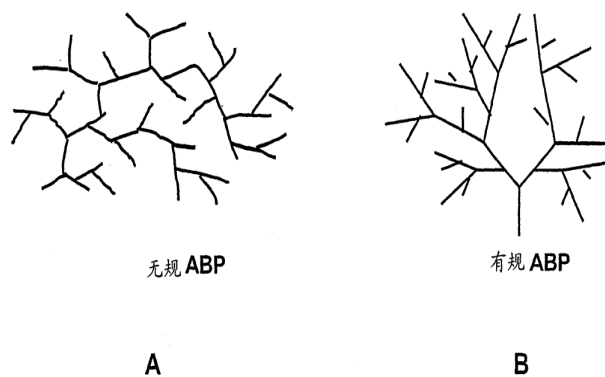


图 1