



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103168237 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 19

(21) 申请号 201180050457. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 10. 26

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/543 (2006. 01)

1018096. 6 2010. 10. 27 GB

A61K 9/20 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 04. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2011/052079 2011. 10. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02012/056233 EN 2012. 05. 03

(71) 申请人 结合点集团有限公司

地址 英国伯明翰

(72) 发明人 R·布德 D·泰勒

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王磊

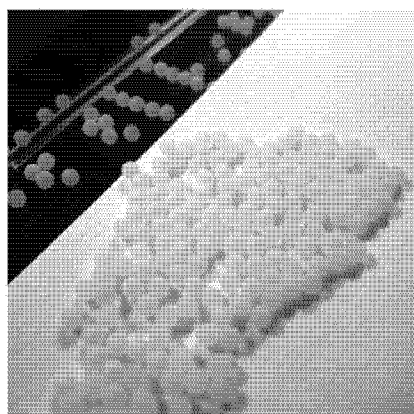
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

包被的珠

(57) 摘要

本发明涉及一种用生物学分子包被珠的方法,其包括:(i)用生物学分子包被多个珠;(ii)将所述包被的珠与液体稳定剂和/或封闭剂混合;(iii)使仍然基本上被包含所述液体稳定剂和/或封闭剂的液相包围的包被的珠分散在至少部分地液体可渗透的表面上;(iv)将所述表面上的珠干燥以基本上去除所述液相;以及(v)从所述表面移出所述干燥的珠。



1. 一种用生物学分子包被珠的方法,其包括:
 - (i) 用所述生物学分子包被多个珠;
 - (ii) 将所述包被的珠与液体稳定剂和 / 或封闭剂混合;
 - (iii) 使仍然基本上被包含所述液体稳定剂和 / 或封闭剂的液相包围的包被的珠分散在至少部分地液体可渗透的表面上;
 - (iv) 将所述表面上的珠干燥以基本上去除所述液相;以及
 - (v) 从所述表面移出所述干燥的珠。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述生物学分子是能够特异性结合抗原的抗体或其片段,或者抗体。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述至少部分地可渗透的表面为纸。
4. 前述权利要求中任一项的方法,其中在将所述包被的珠分散在所述至少部分地液体可渗透的表面上之前去除过量的液体稳定剂和 / 或封闭剂。
5. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述液体稳定剂和 / 或封闭剂包含选自糖、多元醇、表面活性剂、盐、聚乙二醇 (PEG)、聚合物、金属离子、蛋白和氨基酸的一种或多种化合物。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述稳定剂和 / 或封闭剂选自 Stabilcoat™、Stabilguard™、蔗糖和乳糖。
7. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述液体稳定剂和 / 或封闭剂包含牛血清白蛋白 (BSA)。
8. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述珠直径为 0.5mm-5mm,特别是 1-3mm,最优选直径为 2mm。
9. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述珠为聚苯乙烯珠以用于蛋白或其他配体的被动吸附。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述珠为聚苯乙烯珠,其具有用于共价偶联蛋白或其他配体的表面官能团如羧基或氨基。
11. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述珠为聚苯乙烯珠,其具有结合蛋白如 G 蛋白、链霉亲和素或生物素以用于连接蛋白或其他配体。
12. 前述权利要求中任一项的方法,其中在步骤 (iv) 中,将所述珠在真空下干燥。
13. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述干燥步骤 (iv) 在 -5° C 至 37° C 下进行。
14. 可通过前述权利要求中任一项的方法获得的珠。
15. 用生物学分子包被并包含稳定剂和 / 或封闭剂的多个珠,其特征在于所述珠基本上不聚集。
16. 权利要求 15 的多个珠,其直径为 0.5-5mm,优选直径为 1-3mm,最优选直径为 2mm。
17. 权利要求 15 或 16 的多个珠,其中所述珠为聚苯乙烯珠。
18. 权利要求 14-17 的多个珠,其中所述生物学分子是能够特异性结合抗原的抗体或其片段,或者抗原。
19. 权利要求 15-18 的多个包被的珠,其中所述液体稳定剂和 / 或封闭剂包含选自糖、多元醇、表面活性剂、盐、聚乙二醇 (PEG)、聚合物、金属离子、蛋白和氨基酸的一种或多种化

合物。

20. 权利要求 19 的多个包被的珠,其中所述稳定剂和 / 或封闭剂选自 Stabilcoat™、Stabilguard™、蔗糖和乳糖。

21. 权利要求 15-19 的多个包被的珠,其中所述液体稳定剂和 / 或封闭剂包含牛血清白蛋白 (BSA)。

22. 一种进行免疫测定的方法,其包括提供权利要求 14-19 的一个珠或多个珠。

23. 一种包含权利要求 14-19 的一个珠或多个珠的免疫诊断装置。

包被的珠

技术领域

[0001] 本发明涉及用生物学分子包被珠的方法以及用生物学分子包被的珠。

背景技术

[0002] 诊断性免疫测定如酶联免疫吸附测定 (ELISA)^{1,2} 广泛用于研究和工业, 并且是许多诊断、临床、生物化学、环境和遗传应用的重要和灵敏的分析技术^{3,4}。这些测定使用固定在固体支持物上的蛋白 (例如, 抗原和抗体) 以及用生色、荧光、放射性和化学发光分子标记和 / 或与包括酶在内的充当报道物质的增强剂或底物的其他生物分子缀合的检测蛋白。

[0003] 为了成功地制造具有大于几天 / 几周的延长保质期的免疫测定固体支持物, 必需保持固定的靶抗原或抗体的物理完整性。这受到许多外部因素的影响, 包括湿度、温度、pH、盐、金属离子和其他污染物。例如蛋白是具有功能性三维结构的大柔性分子⁵。催化和 / 或结合位点区中氨基酸的空间排列取决于氨基酸互相之间的相互作用以及氨基酸与其他周围分子的相互作用⁶⁻⁸。蛋白的独特结构以及局部环境条件决定蛋白稳定性。结合的性质以及这个系统中的其他分子影响免疫测定中非特异性结合的程度。因此, 在这个初始水平使用的所有组分必须严格评价以确保没有非特异性结合。此外, 测定中使用的其他组分, 包括样品稀释物、洗涤缓冲液和缀合的蛋白, 同样需要进行评价。添加某些蛋白和或去污剂可以显著减少不期望的非特异性结合。

[0004] 在某些条件下, 蛋白展开为非功能形式。暴露于高于一定限度的温度会使得热不稳定蛋白展开并变性。高浓度的溶质、极端的 pH、机械力和其他化学物质的存在是潜在的灭活剂。完全变性的蛋白缺少三级和二级结构, 因而丧失或减少其在免疫测定中结合相应的反应物或被相应的反应物结合的能力。

[0005] 一级蛋白结构由特定氨基酸的线性序列组成。复杂结构通过折叠以形成二级、三级和最终的四级结构而产生, 由此形成多肽链并相互作用⁹。氨基酸构件可以是亲水和疏水的, 更疏水的氨基酸聚集在球状分子的内部, 而亲水或极性氨基酸集中在外部, 这种排列导致在溶液中自发折叠^{10,11}。此外, 静电相互作用、氢键和范德华力均参与这个折叠过程。正确折叠确保适当的蛋白生物学活性, 并且天然状态的蛋白是最稳定的^{12,13}。

[0006] 因此, 逻辑上在稳定和保持蛋白的天然结构的环境中储存和使用的蛋白会保留它们的功能和活性。储存在溶液中的蛋白一般具有比干燥形式更短的保质期, 这是由于它们以水合状态持续与周围的分子相互作用。干燥和冷冻最小化或中止这种相互作用, 只要使用正确的稳定条件, 否则变性仍会发生。在溶液中, 通常蛋白在高浓度和低温下更稳定。在低温下, 蛋白相互作用具有较少的动能。在较高的蛋白浓度下, 较少的蛋白活性通过吸附至容器表面以及通过酶的作用和其他低水平污染物失活而丧失。通常去除蛋白来源中存在的任何蛋白水解酶 (例如, 水解酶和氧化酶), 因此用于包被和稳定溶液的水通常具有高质量。

[0007] 许多制造这种类型的免疫测定的公司具有它们自己的包被和稳定固体支持物的专利方法, 并且因为可能希望一些表现比其他好, 所以一般指导在出版的关于一般 ELISA

原理和应用的书中给出^{1,2}。抗体和抗原通常结合至微孔板的孔的内侧并在室温或 4° C 下温育约 12 小时,在这个阶段将过量的未结合原料吸出并加入封闭剂 / 稳定剂,结合通常通过但不限于静电力进行。需要时可以加入中间的洗涤步骤。名义上将封闭稳定剂在室温下温育 30 分钟以允许反应物结合至固体支持物上任何未被结合的位点,并且还结合的抗体或抗原整合。在下一步中,去除过量的封闭剂 / 稳定剂,从而试剂的物理膜覆盖结合的蛋白。下一步设计为干燥固体支持物上的反应物并保持它们的完整性。通常有两种方法用来实现这一点,第一种是在 37° C 下于常规实验室培养箱中温育 12-24 小时,或者真空干燥 1-24 小时,这取决于待干燥的材料的体积。在我们的经验中,后者提供活性的最小初始损失和较长期稳定性的显著优势。

[0008] 真空干燥是这样的方法,其中将材料在减压环境中干燥,从而减少快速干燥所需的热量,在真空干燥器中温度不升高并且干燥更快速。这种技术允许我们实现非常高水平的干燥,使得固体支持物能够于升高的温度 (37° C) 下在超过两年的时间中保持稳定。我们采用的真空干燥和稳定试剂的组合保持蛋白的完整性而不使用加热来损伤蛋白。

[0009] 在市场上有许多专利封闭和稳定溶液即用产品,已报道其有效地稳定固体支持物,包括 **SurModics Inc. StabilCoat®** 和 **StabilGuard®**¹⁴ 以及有或无牛血清白蛋白 (BSA) 的蔗糖和 / 或乳糖,此外通常使用其他蛋白封闭剂,包括明胶和复原脱脂奶粉 0.1-3%w/v。

[0010] 最近可以使用替代性固相支持物,其由大珠组成,如聚苯乙烯珠 (2mm),直径范围可以更大 0.5-5mm。将这些珠用抗体或抗原包被,封闭和稳定,干燥并插入由生物学惰性塑料如聚丙烯组成的微孔板孔,从而不需要为了非特异性结合额外地封闭这个组分。公知方法的最初应用导致珠的干燥的块,对于这种应用关键是获得均匀地包被的珠,不形成固体簇并且是自由流动的。

发明内容

[0011] 申请人已发现一种产生均匀地包被的珠的方法,所述珠不形成固体簇并且是自由流动的。

[0012] 因此,所述方法提供:

[0013] 一种用生物学模块包被珠的方法,其包括:

[0014] (i) 用生物学分子包被多个珠;

[0015] (ii) 将所述包被的珠与液体稳定剂和 / 或封闭剂混合;

[0016] (iii) 使仍然基本上被包含所述液体稳定剂和 / 或封闭剂的液相包围的包被的珠分散在至少部分地液体可渗透的表面上;

[0017] (iv) 将所述表面上的珠干燥以基本上去除所述液相;以及任选地从所述表面移出所述干燥的珠。

[0018] 所述生物学分子可以是例如核酸 (如 DNA 或 RNA)、脂多糖、多糖、蛋白或肽。通常,所述生物学分子为蛋白或肽。

[0019] 优选地,所述生物学分子是能够特异性结合抗原的抗体或其片段,或者抗体。抗原可以是生物学分子,如蛋白或肽、核酸、脂多糖或者糖。

[0020] 当与包被的珠混合时,所述稳定剂和 / 或封闭剂为液体。通常,去除过量的液体稳

定剂和 / 或封闭剂。然后包被的珠仍然基本上被包含液体稳定剂和 / 或封闭剂的液相包围。包被的珠周围保留的液体量通常是液体稳定剂和 / 或封闭剂的原始量的约 2-5%。这形成：

[0021] (a) 稳定剂的物理层以形成结合的生物学材料（如抗原或抗体）上的保护壳；以及

[0022] (b) 液相还确保在珠周围的多余液体与部分地液体可渗透的表面之间建立灯芯效应。

[0023] 所述至少部分地液体可渗透的表面通常使得液体被吸走或吸掉。如果存在不足的液体，过量的液体可能不会被吸掉，并且因为邻近珠周围的残余液体干掉，所以观察到它们在块中粘在一起。

[0024] 通常，所述至少部分地液体可渗透的表面是纸或其他纤维类型表面。纸的大小通常允许纸能够吸收液体。

[0025] 通常，所述纸为滤纸，如 Macherery-Nagel GmbH and Co. 制造的 CodeMN215。这样的纸具有相对高的流速 (85mm/10min) 和相对光滑的表面。

[0026] 通常这类材料不含可以干扰免疫测定的残余化学物质，特别是痕量金属离子、酶如蛋白酶或内切核酸酶、内毒素、去污剂以及叠氮化物。

[0027] 液体可渗透的表面的典型流速为 20mm/10 分钟 -100mm/10 分钟。表面的灯芯效应会将液体吸走，从而在干燥浓缩时稳定化学物质，不会使邻近的珠互相粘附。

[0028] 可以使用其他材料代替纸。

[0029] 通常，所述纸是基于纤维素的，如木浆。

[0030] 通常，所述珠在表面上干燥，例如在真空下。所用的温度可以例如在 -5° C 和 37° C 之间，例如 -5° C 至 30° C，并且典型为 0° C 至环境温度。

[0031] 申请人发现干燥不必在真空下进行。干燥可以在环境压力以及例如环境温度 (20° C) 至 37° C 下进行。

[0032] 干燥的珠可以从表面移出。然后将它们储存在例如 -40° C 或 4° C 下。例如，它们可以与硅胶干燥剂一起储存以去除来自周围空气的水分和保持稳定性，并且理想地储存于密闭容器中。

[0033] 所述珠还可以通过施加热来干燥，或者在低湿度环境中于环境温度下干燥。

[0034] 液体稳定剂和 / 或封闭剂可以是选自糖、多元醇、表面活性剂、盐、聚乙二醇 (PEG)、聚合物、金属离子、蛋白和氨基酸的一种或多种化合物。这类化合物一般描述于 Wang, W 的文章^{12, 13}。最典型地使用蛋白。

[0035] 其他封闭材料包括纯化的牛乳蛋白 Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co. Ltd, Japan)、甘油、Lipidure™、可获得自 NOF Corporation, Japan 的 2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的水溶性聚合物（参见 Park, J-W³）。其他稳定剂和 / 或封闭剂包括甘露醇、蔗糖、海藻糖、葡萄糖、山梨醇、环糊精、羟烷基纤维素和乳糖。优选地，所述稳定剂和 / 或封闭剂选自 Stabilcoat™ (包含牛蛋白的制剂，通常稀释入盐水溶液) 和 Stabilguard™ (不含蛋白的物质，通常稀释入盐水溶液)，这两者均可获得自 SurModics Inc, Eden Prairie, United States of America。还可以使用蔗糖和乳糖。

[0036] 通常使用 Stabilcoat™ 或 Stabilguard™ 的 50%v/v 溶液。

[0037] 通常，所述液体稳定剂和 / 或封闭剂包含 BSA。

[0038] 所述珠可以是聚合的或非聚合的。例如,所述珠可以是二氧化硅珠,或者最优选聚苯乙烯珠,它们可以是未衍生化的以用于被动吸附,或者可以包含特定的官能团以用于共价偶联,或包含特定的接头蛋白以结合期望的配体。这类衍生化方法是本领域公知的。典型地,所述珠的直径为 0.5mm-5mm, 1-3mm, 最典型地,直径为 2mm。

[0039] 所述珠可以是聚苯乙烯珠,其具有用于共价偶联蛋白或其他配体的表面官能团如羧基或氨基。

[0040] 所述珠可以是聚苯乙烯珠,其具有结合蛋白如 G 蛋白、链霉亲和素或生物素以用于连接蛋白或其他配体。

[0041] 本发明还提供可通过本发明的方法获得的珠。

[0042] 本发明的另一方面提供用生物学材料包被的多个珠,它们包含稳定剂和 / 或封闭剂,其特征在于所述珠基本上不聚集。即,所述珠基本上是自由流动的,并且基本上不附着至其他珠。

[0043] 生物学分子、稳定剂和 / 或封闭剂以及珠通常如上文所定义。

[0044] 本发明的另一方面提供一种进行免疫测定的方法,所述方法包括提供本发明的一个珠或多个珠。

[0045] 本发明还提供包含本发明的一个珠或多个珠的免疫诊断装置。

附图说明

[0046] 现在通过示例的方式仅参考以下的图描述本发明:

[0047] 图 1 示出在聚苯乙烯皿中干燥的珠,观察到这些珠聚集成块并粘附至皿和邻近的珠。

[0048] 图 2 示出在硅化纸上干燥的珠,其中珠聚集成块并粘附至纸和邻近的珠。

[0049] 图 3 示出在滤纸上干燥的珠,其中珠是游离的并且可移动。

具体实施方式

[0050] 珠的包被是常规和本领域公知的。即,将诸如聚苯乙烯珠的珠用适当的缓冲液包被,如 pH7.2 的磷酸盐缓冲盐水或碳酸盐 pH9.6,其包含典型浓度为 0.5-20ug/mL (取决于蛋白) 的所需抗原或抗体,并且在室温下温和混合 8-12 小时。缓冲液的体积等于 50 μ L/珠,因此对于 100,000 珠,这等于 5000mL。然后通常将过量的包被溶液吸出。随后加入通常包含 50%Stabilcoat™ 或 Stabilguard™ 的封闭 / 稳定缓冲液,并在室温下混合 30 分钟,再次使用 50 μ L/珠。然后将大部分残余的封闭 / 稳定缓冲液倒掉。然而,通常保留小百分比的液体,例如 2-5%。据发现这是必需的,以允许稳定剂的物理层在结合的抗原 / 抗体上形成保护壳。将珠以及剩余的液体铺在表面上,然后铺入浅的敞口盘,在这里通常将它们环境温度下真空干燥。当所述表面是聚苯乙烯皿时,观察到珠聚集成块并粘附至皿和邻近的珠 (图 1)。观察到在具有硅化包衣以从纸排斥水分的硅化纸上干燥的珠粘附至纸和邻近的珠 (图 2)。然而,发现在具有一定吸收性并允许从珠吸掉液体的滤纸上干燥的珠是游离的并且可移动 (图 3)。

[0051] 通常,将珠真空干燥 4-18 小时,这取决于批量大小。然后将干燥的珠倒入合适大小的容器用于立即使用,或者在插入例如微孔板之前储存在 -40° C 或 4° C 下,并用具有

硅胶干燥剂小袋的铝箔袋密封以最小化水分进入和保持稳定性。

[0052] 可选干燥方法如加热或低湿度环境中的环境温度干燥也是可行的,但是干燥时间延长。

[0053] 参考文献

[0054] 1. David Geoffrey Wild, The Immunoassay Handbook published by Elsevier ISBN:0-08-044526-8(2008)

[0055] 2. John R. Crowther, The ELISA Theory and Practice. Humana Press ISBN:0-89603-279-5(1995)

[0056] 3. Park, J-W et al., Sensors and Actuators B, 91:158-162(2003)

[0057] 4. Engvall, E. And P. Perlmann, Immunochemistry, 8:871-873(1971).

[0058] 5. Sali, A. et al., Nature, 369:248-251(1994)

[0059] 6. Klotz, I., Archives Biochemistry&Biophysics, 116:92-96(1966)

[0060] 7. Asakura, T. et al., J. Bio Chem., 253:6423-6425(1978)

[0061] 8. Torchilin, V., Enzyme and Microbiological Technology, 1:74-82(1979)

[0062] 9. Maish, M., <http://www.sparknotes.com/health/aminoacids> (2005)

[0063] 10. Kanehisa, M. and T. Tsong, Biopolymers, 19:1617-1628(1980)

[0064] 11. Burley, S. and G. Petsko, Science, 229:23-28(1985)

[0065] 12. Wang, W., Intl. Jour. of Pharmaceutics, 185:129-188(1999)

[0066] 13. Wang, W., Intl. Jour. of Pharmaceutics, 289:1-30(2005)

[0067] 14. Lueng, W. et al., Jour. of Immunological Methods, 281:109-118(2003).

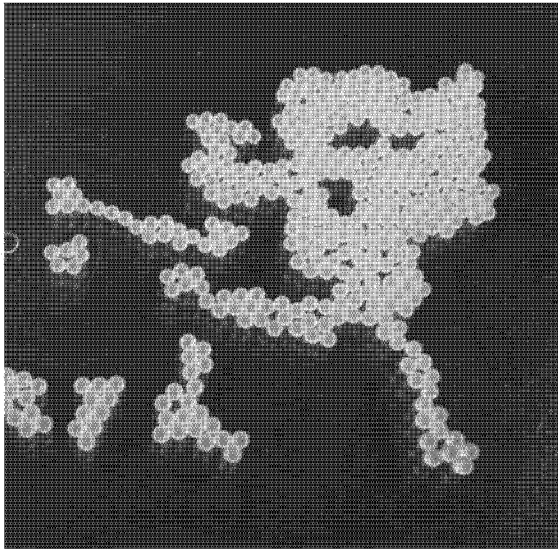


图 1

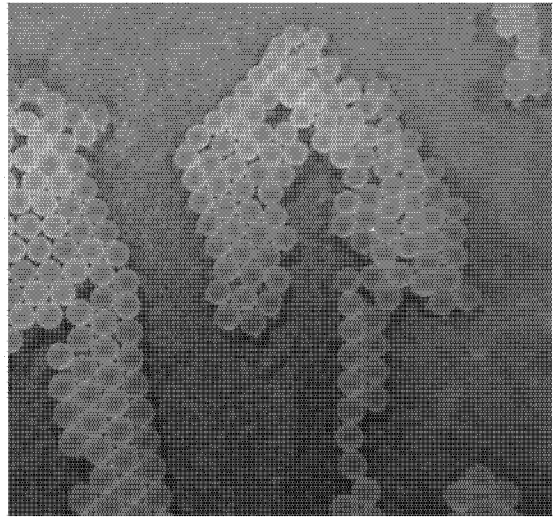


图 2

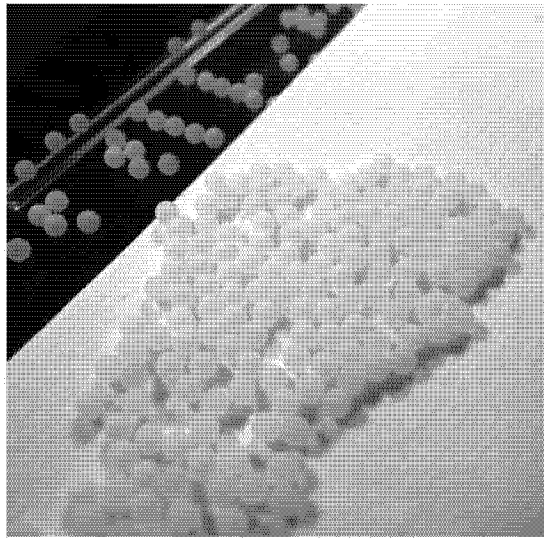


图 3

专利名称(译)	包被的珠		
公开(公告)号	CN103168237A	公开(公告)日	2013-06-19
申请号	CN201180050457.8	申请日	2011-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	结合点集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	结合点集团有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	结合点集团有限公司		
[标]发明人	R布德 D泰勒		
发明人	R·布德 D·泰勒		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61K9/20		
CPC分类号	A61K9/5078 G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/54313		
代理人(译)	王磊		
优先权	2010018096 2010-10-27 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用生物学分子包被珠的方法，其包括：(i)用生物学分子包被多个珠；(ii)将所述包被的珠与液体稳定剂和/或封闭剂混合；(iii)使仍然基本上被包含所述液体稳定剂和/或封闭剂的液相包围的包被的珠分散在至少部分地液体可渗透的表面上；(iv)将所述表面上的珠干燥以基本上去除所述液相；以及(v)从所述表面移出所述干燥的珠。

