



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111094391 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201880058415.0

(22)申请日 2018.08.28

(30)优先权数据

2017-173725 2017.09.11 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/031801 2018.08.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/049734 JA 2019.03.14

(71)申请人 日油株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 鹿取茜 松田将 野田朋澄

佐佐木崇 铃木裕贵 坂元伸行

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 张晶 谢顺星

(51)Int.Cl.

C08G 65/32(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

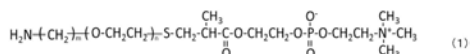
权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

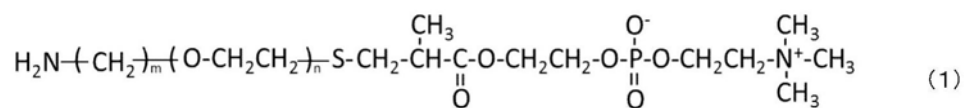
新型聚乙二醇衍生物及蛋白质吸附抑制剂

(57)摘要

本发明提供一种有效地吸附于免疫反应容器等基材的表面,防止蛋白质等的非特异性吸附的蛋白质吸附抑制效果极高,且在基材的清洗操作前后该效果不发生变化的耐清洗性优异的化合物。此外,还提供一种使用了该化合物的蛋白质吸附抑制剂、磷酸胆碱修饰基材、及蛋白质吸附抑制方法。该化合物为式(1)所示的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物。本发明的蛋白质吸附抑制方法具有在基材的表面形成该衍生物的吸附层的工序。



1. 一种式 (1) 所示的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物，
[化学式1]



式 (1) 中, m 为 1~10 的整数, n 为 20~200 的整数。

2. 一种蛋白质吸附抑制剂, 其含有权利要求 1 所述的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物作为有效成分。

3. 一种蛋白质吸附抑制剂溶液, 其含有 0.01~20 质量% 的权利要求 1 所述的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物。

4. 一种磷酸胆碱修饰基材, 其由基材与权利要求 1 所述的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物构成, 且所述含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物吸附于所述基材的表面。

5. 一种抑制蛋白质吸附于基材的方法, 其具有用权利要求 3 所述的蛋白质吸附抑制剂溶液处理基材表面, 形成权利要求 1 所述的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物的吸附层的工序。

新型聚乙二醇衍生物及蛋白质吸附抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可应用于天然或合成的材料(基材)的表面处理、及蛋白质的表面处理的新型化合物,特别是涉及一种可适宜地作用于抑制蛋白质非特异性地吸附于基材等的表面处理剂(蛋白质吸附抑制剂)的新型化合物。进一步,涉及一种将该化合物用作蛋白质吸附抑制剂的表面修饰材料。

[0002] 具体而言,涉及一种新型的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物、及被该衍生物覆盖表面的磷酸胆碱修饰基材,该衍生物在利用免疫反应的测定中,防止标记抗体、抗原或样本中的蛋白质非特异性地吸附于使用基材的表面。进一步,涉及一种使用该衍生物作为蛋白质吸附抑制剂的抑制蛋白质吸附在基材上的方法。

背景技术

[0003] 以往,广泛地提出了通过用具有磷酸胆碱基团的化合物对各种材料表面进行处理,可赋予磷酸胆碱基团所带来的生物相容性、抗血栓性、表面亲水性等的表面处理剂。作为其用途,可列举出用于使蛋白质亲水化的蛋白质表面处理、工业用过滤器表面的防污处理、用于抑制蛋白质或血细胞吸附于医用高分子材料的表面处理。特别是,近年来,在临床检验、诊断试剂的领域中,在利用免疫反应的测定体系中,利用有以含磷酸胆碱基团化合物为成分的蛋白质吸附抑制剂。已知在检测微量的生物活性成分的测定方法中,就防止作为测定对象的抗体或抗原非特异性地吸附于免疫反应容器等基材的表面的点而言,添加包含含磷酸胆碱基团化合物的蛋白质吸附抑制剂是重要的。

[0004] 专利文献1中公开了2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱聚合物的抑制蛋白质吸附于基材表面的效果。专利文献1的发明的特征在于,能够使用具有较强的防止蛋白质吸附的能力的该聚合物,在各种生物体相关物质的分析中以高精度分析目标物质。

[0005] 专利文献2及3中公开了具有可通过化学反应而键合于基材表面的氨基的磷酸胆碱化合物及新型聚合物。专利文献2的发明的特征在于,由于发明的化合物具有反应性高的氨基,因此能够用该化合物修饰基材表面,可赋予基材该化合物的功能。专利文献3的发明的特征在于,由于上述新型聚合物牢固地键合于基材表面,因此用于防止非特异性吸附的封闭效果高,能够以充分的灵敏度测定微量的生物活性成分。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开平07-083923号

[0009] 专利文献2:国际公开2012/086762号

[0010] 专利文献3:日本特开2015-117269号

发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题

[0012] 然而,专利文献1所公开的方法存在2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱聚合物因多次

清洗而从基材上脱落,清洗后的蛋白质吸附抑制效果可能会降低的问题。关于专利文献2所示的化合物,由于氨基与磷酸胆碱基团通过乙基而连接,因此存在蛋白质吸附抑制效果并不充分的问题。此外,专利文献3所示的化合物为聚合物,分子量高,存在由于与抗体或抗原的空间排斥,导致蛋白质吸附抑制剂的结合率不易变高,还有蛋白质吸附抑制效果不充分的情况的问题。特别是,现有技术很难抑制蛋白质吸附在以高灵敏度检测为目的的磁性微粒上。

[0013] 因此,本发明的技术问题在于提供一种有效地吸附于免疫反应容器等基材的表面,防止蛋白质等的非特异性吸附的蛋白质吸附抑制效果极高,且在基材清洗操作前后该效果不发生变化的耐清洗性优异的化合物,以及使用了该化合物的蛋白质吸附抑制剂。

[0014] 本发明的另一个技术问题在于提供一种使上述化合物吸附于基材表面而成的磷酸胆碱修饰基材。

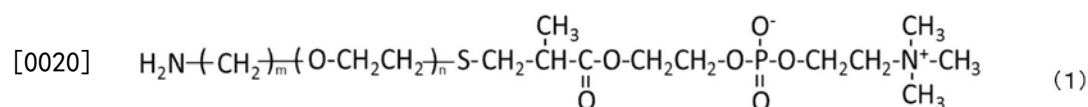
[0015] 本发明的又一个技术问题在于提供一种使用上述化合物抑制蛋白质吸附于基材的有效方法。

[0016] 解决技术问题的技术手段

[0017] 鉴于上述技术问题,本申请的发明人进行了认真研究,结果发现,在末端具有氨基与磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物对免疫反应容器等基材的表面的吸附特性高,且耐清洗性优异,从而完成了本发明。

[0018] 即,根据本发明,可提供一种式(1)所示的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物。

[0019] [化学式1]



[0021] 式(1)中,m为1~10的整数,n为20~200的整数。

[0022] 根据本发明的另一个角度的发明,可提供一种含有上述含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物作为有效成分的蛋白质吸附抑制剂。

[0023] 此外,根据另一个角度的发明,可提供一种含有0.01~20质量%的上述含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物的蛋白质吸附抑制剂溶液。

[0024] 进一步,根据另一个角度的发明,可提供一种由基材与上述含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物构成,且该衍生物吸附于基材表面的磷酸胆碱修饰基材。

[0025] 进一步,根据另一个角度的发明,可提供一种抑制蛋白质吸附于基材的方法,该方法具有用上述蛋白质吸附抑制剂溶液处理基材表面,形成上述含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物的吸附层的工序。

[0026] 发明效果

[0027] 本发明的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物由于自身有效地吸附于免疫反应容器等基材的表面,因此能够高度地抑制蛋白质非特异性地吸附于基材表面。即,发挥较高的抑制蛋白质吸附的能力。进一步,由于对基材的吸附力较强,因此对清洗具有较高的耐久性,极少会因清洗而导致从基材上脱离。即,由于耐清洗性极高,因此即使在每次测定中均进行反复清洗,也能够高度地维持抑制蛋白质吸附的能力。

[0028] 通过用本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液处理基材表面,能够使本发明的含磷酸胆

碱基团的聚乙二醇衍生物牢固地吸附于基材表面。

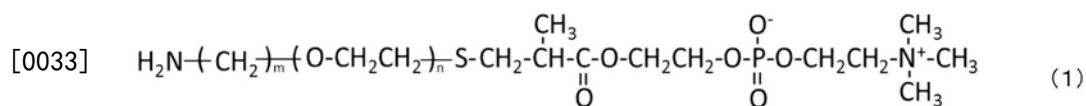
[0029] 使本发明的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物吸附于基材表面而得到的本发明的磷酸胆碱修饰基材,由于其抑制蛋白质吸附的能力高,且耐清洗性优异,因此能够将抑制蛋白质吸附的能力维持在较高水平。

[0030] 由于本发明的抑制蛋白质吸附于基材的方法能够使本发明的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物牢固地吸附于基材表面,因此能够高度地抑制蛋白质的非特异性吸附。

具体实施方式

[0031] 本发明的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物如下述式(1)所示。下文中,有时也将式(1)所示的化合物简称为本发明的衍生物。本发明的衍生物在分子内具有聚乙二醇部分与磷酸胆碱基团部分,具有可牢固地吸附于免疫反应容器或测定器具等各种基材的表面的特征。

[0032] [化学式2]

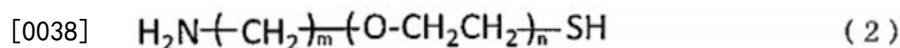


[0034] 式(1)中,m为1~10的整数,优选为2~5。n表示根据式(1)的分子量等计算的“-O-CH₂CH₂-”单元的数目,其为20~200的整数。n的数目优选为20~100,更优选为20~50,特别优选为40~50。这是由于,若n及m的值为该范围,则可有效地吸附于免疫反应容器等基材的表面,并高度地抑制蛋白质的非特异性吸附。另外,式(1)所示的化合物还能够以m或n的值等不同的两种以上的化合物的混合物的状态用于后述的蛋白质吸附抑制剂或蛋白质吸附抑制剂溶液。

[0035] 本发明的衍生物可以为胺盐的结构。即,可以为聚乙二醇侧末端的胺通过各种酸而形成了各种盐的结构。作为盐的具体例,例如可列举出盐酸盐、乙酸盐、硫酸盐、三氟乙酸盐、溴酸盐、甲磺酸盐等。

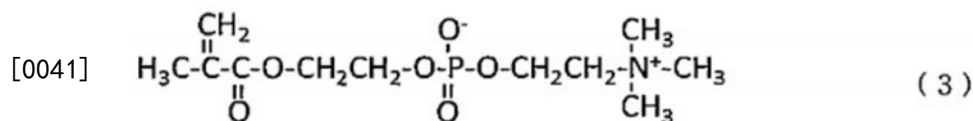
[0036] 接着,对本发明的衍生物的制备方法的一个实施方式进行说明。本发明的衍生物例如能够通过,在醇类溶剂中,使用二异丙胺等胺催化剂,使下述式(2)所示的化合物(α-氨基烷基-ω-巯基乙氧基-聚氧乙烯)或其胺盐与下述式(3)所示的2-甲基丙烯酰氧基乙基-2-三甲基氨基乙基磷酸酯(下文中,有时简写作MPC)进行反应而制备。下文中,当称作式(2)的化合物时,也包含其胺盐。作为形成该胺盐的酸,可列举出作为形成上述本发明的衍生物的胺盐的酸而例示的酸。

[0037] [化学式3]



[0039] 式(2)中,m为1~10的整数,n为20~200的整数。

[0040] [化学式4]



[0042] 在式(2)的化合物与式(3)的化合物的反应中,就其反应比例而言,相对于式(3)的

化合物1摩尔,式(2)的化合物优选为0.6~1.5摩尔。当式(2)的化合物小于0.6摩尔时,本发明的衍生物的制备产率可能会降低。此外,当式(2)的化合物超过1.5摩尔时,有引发式(3)的MPC的分解反应、或式(2)的化合物的氨基与双键进行迈克尔加成反应等发生副反应的可能,本发明的衍生物的制备产率仍有可能会降低。

[0043] 作为本发明的衍生物的制备中的溶剂,只要为溶解式(2)及式(3)的化合物且不与这些化合物进行反应的溶剂,则没有特别限制。具体而言,除了上述醇类溶剂以外,能够使用酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂及含氮类溶剂等。作为醇类溶剂,可列举出甲醇、乙醇、正丙醇、2-丙醇等;作为酮类溶剂,可列举出丙酮、甲基乙基酮等;作为酯类溶剂,可列举出乙酸乙酯、乙酸丁酯等;作为醚类溶剂,可列举出四氢呋喃、二乙醚、环戊基甲醚等;作为含氮类溶剂,可列举出乙腈、硝基甲烷、N-甲基吡咯烷酮等。特别优选醇类溶剂。

[0044] 作为溶剂的使用量,只要为能够溶解式(2)及式(3)的化合物等原料的量,则没有特别限制,只要同时考虑反应温度等其他条件而设定为适合制备本发明的衍生物的量即可。

[0045] 作为使式(2)及式(3)的化合物反应的催化剂,可使用有机碱或无机碱。特别是,从对溶剂的溶解性或反应性的角度出发,催化剂优选为胺化合物。具体而言,可列举出作为伯胺的甲胺、作为仲胺的二异丙胺、作为叔胺的三乙胺等,特别优选仲胺、叔胺。相对于式(2)的化合物或其盐100摩尔%,催化剂的量优选为5~20摩尔%。当小于5摩尔%时,反应速度可能会变得极慢。若超过20摩尔%,则式(3)的化合物(MPC)的酯部分可能会发生分解。

[0046] 作为式(2)及式(3)的化合物的反应中的反应温度,优选为10~60℃。小于10℃时,反应速度可能会变得非常慢。超过60℃时,有进行MPC的酯分解反应、或式(2)的化合物的氨基与双键进行迈克尔加成反应等发生副反应的可能,本发明的衍生物的制备产率可能会降低。

[0047] 式(2)及式(3)的化合物的反应中的反应时间虽取决于催化剂及反应温度,但优选为6~96小时。反应时间小于6小时时,反应可能无法到达终点。若反应时间超过96小时,则作为反应产物的本发明的衍生物可能会被氧化而劣化。

[0048] 此外,在式(2)及式(3)的化合物的反应中,优选将反应容器内设为氮气或氩气等非活性气体气氛。这是由于能够防止生成作为副产物的二硫化物化合物。

[0049] 接着,对本发明的蛋白质吸附抑制剂进行说明。本发明的蛋白质吸附抑制剂含有本发明的衍生物作为有效成分。本发明的蛋白质吸附抑制剂中的本发明的衍生物的含量优选为50~100质量%。这是由于能够表现出有效的抑制蛋白质吸附的能力。作为可包含在本发明的蛋白质吸附抑制剂中的、除了本发明的衍生物以外的物质,可列举出本领域中常用的试剂类。另外,本发明的蛋白质吸附抑制剂也可以含有两种以上的本发明的衍生物。此时,优选将两种以上的衍生物的合计含量调节至上述范围内。

[0050] 由于本发明的蛋白质吸附抑制剂含有50~100质量%的本发明的衍生物作为有效成分,因此能够用于如下用途,发挥优异的效果。

[0051] 除蛋白质吸附抑制剂以外,本发明的衍生物例如能够用于隐形眼镜或导管、导丝等各种医疗器械基材的表面处理、微通道等物理化学仪器的表面处理。

[0052] 特别是,本发明的蛋白质吸附抑制剂例如能够用于在蛋白质、多肽、类固醇、脂质、激素等的存在下,利用各种抗原、抗体、受体、酶等,并利用酶反应或抗原抗体反应而进行测

定的免疫学测定等。更具体而言,可适用于公知的放射免疫测定法(RIA)、酶免疫测定法(EIA)、荧光免疫测定法(FIA)、胶乳比浊法、免疫印迹法(western blotting)等。在这些免疫学测定方法中,例如使抗体或抗原结合在免疫反应容器等基材的表面,然后用本发明的蛋白质吸附抑制剂处理未结合抗体或抗原的基材表面部分,由此使本发明的衍生物牢固地吸附于基材表面,抑制蛋白质的吸附。

[0053] 接着,对本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液进行说明。本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液为在溶剂中溶解有0.01~20质量%的本发明的衍生物的溶液。本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液中的本发明的衍生物浓度更优选为0.1质量%以上,进一步优选为1.0质量%以上。此外,优选为10质量%以下,更优选为5.0质量%以下。若为该范围,则用本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液处理过基材表面时,本发明的衍生物有效地吸附于基材表面,可赋予基材良好的抑制蛋白质吸附的能力。另外,本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液也可以含有两种以上的本发明的衍生物。此时,优选将两种以上的衍生物的合计浓度调节至上述范围内。

[0054] 本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液可通过将本发明的衍生物或本发明的蛋白质吸附抑制剂溶解于溶剂或缓冲液等中而得到。作为溶剂,可使用纯净水、纯水、离子交换水、或者甲醇、乙醇、2-丙醇的醇等有机溶剂。作为溶剂,优选水、乙醇,更优选水。作为缓冲液,只要为磷酸缓冲液、乙酸缓冲液、碳酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、生理盐水等可用于免疫学测定法的缓冲液,则均可使用。

[0055] 除了本发明的衍生物以外,本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液还可以出于提高反应性或溶液稳定性的目的而含有本领域中常用的试剂等化合物。具体而言,可列举出甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、组氨酸等氨基酸及氨基酸盐,甘氨酰甘氨酸等肽类,磷酸盐、硼酸盐、硫酸盐、tris盐等无机盐类,黄素类,乙酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸、葡萄糖酸等有机酸及有机酸的盐等。

[0056] 关于本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液中的除了本发明的衍生物以外的这些化合物的含量,只要考虑该溶液的使用目的,在不阻碍由本发明的衍生物带来的蛋白质吸附抑制作用的范围内适当设定即可。

[0057] 接着,对使本发明的衍生物吸附于基材表面而成的磷酸胆碱修饰基材进行说明。作为本发明中所使用的基材,其材质没有特别限定,例如可列举出聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、丙烯酸树脂、聚甲基丙烯酸甲酯、玻璃、金属、陶瓷、硅橡胶、聚偏氟乙烯(下文中,简称为PVDF)、聚氨酯、尼龙、硝酸纤维素、蛋白质、多肽、多糖类等。其中,优选聚苯乙烯与PVDF,特别优选聚苯乙烯。

[0058] 本发明的衍生物对于抑制蛋白质吸附于磁性微粒也是有用的。即,本发明的磷酸胆碱修饰基材的基材也可以为磁性微粒。磁性微粒只要包含可通过磁感应而磁化的材料即可,没有特别限定。作为这种材料,可列举出四氧化三铁(Fe_3O_4)、三氧化二铁($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、各种铁素体、铁、锰、镍等金属、或钴、镍、锰等的合金等。从进一步发挥本发明的效果等的点出发,磁性微粒优选为在表面具有聚合物(树脂)层、极性基团或配体的颗粒,优选为在水性介质中稳定的不溶性颗粒。作为具有极性基团的磁性微粒,没有特别限制,例如更优选具有选自自由氨基、醛基、羧基、甲苯磺酰基、巯基及环氧基等组成的组中的至少一个极性基团的磁性微粒。

[0059] 此外,作为基材的形状,没有特别限定,具体而言,可例示出膜(film)状、板状、颗

粒状、多孔状、凝胶状,进一步可例示出试管形状、样品瓶(vial)形状、管形状及烧瓶形状等。

[0060] 作为本发明的衍生物吸附于基材并形成吸附层的机理,能够进行如下说明。本发明的衍生物可通过与存在于基材表面的反应性官能团发生化学反应而吸附于其表面并形成吸附层。具体而言,本发明的衍生物的氨基与基材表面的羧基、环氧基、乙烯基、异氰酸酯基等反应性官能团进行反应并键合,由此本发明的衍生物可吸附于基材表面。因此,优选在基材表面存在有这些官能团。

[0061] 当基材表面不存在这种官能团时,例如,当基材表面仅存在氨基、羟基等不与氨基进行反应的官能团时,例如,可使用二异氰酸酯、二羧酸、二环氧(diepoxy)等多官能度试剂,将可与氨基进行反应的官能团引入基材表面。将这种反应性官能团引入基材表面的方法没有特别限制,可根据基材的种类、基材的表面性质及反应性官能团的所需引入量而从公知的条件中适当选择。

[0062] 进一步,当基材表面仅具有疏水基团时,通过事先使本发明的衍生物与白蛋白或疏水性化合物进行反应,然后将其制成溶液或分散体而进行添加,能够使其物理性吸附于基材表面。

[0063] 作为在具有可与本发明的衍生物键合的官能团的基材表面上形成该衍生物的吸附层的具体操作方法,例如可列举出如下方法。即,将基材浸渍于本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液中,然后通过室温或升温而使其充分干燥,由此形成本发明的衍生物通过键合而吸附于基材表面的吸附层。

[0064] 接着,对使用了含有本发明的衍生物的本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液的、抑制蛋白质吸附于免疫反应容器等基材的方法的一个实施方式进行说明。能够将基材浸渍于本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液中,使本发明的衍生物通过反应而键合于基材表面进而形成该衍生物的吸附层。浸渍温度优选为4~37℃,当浸渍温度为4℃时,浸渍时间优选为12小时以上,当浸渍温度超过4℃且小于25℃时,浸渍时间优选为1~12小时,及当浸渍温度为25~37℃时,浸渍时间优选为0.5~2小时。作为本发明的蛋白质吸附抑制方法中所使用的基材的例子,可列举出与上述磷酸胆碱修饰基材中所使用的基材同样的基材。

[0065] 浸渍结束后,将基材从本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液中取出,通过室温或升温而使其充分干燥,制备形成有本发明的衍生物的吸附层的磷酸胆碱修饰基材。通过在利用了免疫反应的测定中使用该磷酸胆碱修饰基材,抑制抗体或抗原、或者样本中的蛋白质非特异性地吸附于基材。另外,在该干燥前也可以用水清洗基材。作为清洗水,可使用离子交换水、纯净水、纯水等。此外,基于室温或升温的干燥并非必需,也可以不加入干燥工序而进行目标的测定。

[0066] 作为利用本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液的抑制蛋白质吸附于基材的方法,可例示出上述浸渍法,作为该抑制方法,只要能够使该蛋白质吸附抑制剂溶液与基材表面接触,就可使用任意方法。例如,若基材为容器等,则也可以使用用该蛋白质吸附抑制剂溶液填充该容器的方法。

[0067] 作为本发明的蛋白质吸附抑制方法,如上所述,通过在基材的表面上形成本发明的衍生物的吸附层,从而在各种测定时抑制蛋白质吸附于基材的方法为一个实施方式。即,将本发明的衍生物作为吸附层覆盖在免疫反应容器或测定器具等基材的表面上,由此防止

蛋白质等接近基材表面,并抑制其吸附。

[0068] 作为本发明的蛋白质吸附抑制方法的另一个实施方式,可列举出向免疫反应等各种测定中使用的试剂中添加本发明的蛋白质吸附抑制剂的方法。即,是一种作为各种测定的一个工序,通过在基材表面上形成本发明的衍生物的吸附层来抑制蛋白质吸附于基材的方法。在该方法中,本发明的蛋白质吸附抑制剂还可添加于作为测定对象试样之外的物质而使用的试剂或溶液中的任意一种中。本实施方式中,相对于添加了本发明的蛋白质吸附抑制剂的试剂或溶液的总量,本发明的衍生物在该试剂或溶液中的浓度优选为0.0125~5.0质量%,更优选为0.1~1.0质量%。理所当然的,在本实施方式中,在作为测定对象的血清、标记抗体或标记抗原等含蛋白质试样与基材接触前,必须使该试剂或溶液与基材接触。

[0069] 进一步,作为又一个实施方式,可列举出下述方法:首先,使酶、标记抗体或标记抗原等包含在试样中的测定对象的蛋白质键合在上述免疫反应容器或测定器具等基材的表面上,然后用本发明的蛋白质吸附抑制剂处理基材。例如,使用聚苯乙烯制孔板时,使作为测定对象的蛋白质物理吸附或化学键合于该孔板,用合适的溶剂进行清洗,然后与本发明的蛋白质吸附抑制剂溶液接触。即,是一种使测定对象吸附于孔板表面,然后使本发明的衍生物吸附于未吸附测定对象的孔板表面部分,以抑制蛋白质吸附于未吸附测定对象的孔板表面部分,并由此抑制在后续的测定工序中,蛋白质非特异性地吸附于基材。

[0070] 实施例

[0071] 以下,基于实施例对本发明进行更详细的说明,但本发明并不限于此。在本实施例中,将式(1)的化合物简称为衍生物。

[0072] <合成例1:衍生物1 ($m=3, n=44$) 的合成>

[0073] 将2.16g (7.31mmol) 的MPC投入带温度计的三颈烧瓶中,添加34.32g 甲醇并搅拌至均匀,吹入氮气30分钟。添加15.00g (7.31mmol) 的 α -氨基丙基- ω -巯基乙氧基-聚氧乙烯盐酸盐(SUNBRIGHT SH-020PA ($m=3, n=44$), NOF CORPORATION. 制造) 与0.077mL (0.58mmol) 二异丙胺,于25℃搅拌48小时。将所得到的反应液滴加于经冷却的乙酸乙酯中,过滤生成的沉淀物,由此得到白色固体。

[0074] 对所得到的白色固体进行 ^1H -NMR分析、IR分析,结果如下所示。使用FT/IR-6100 (JASCO Corporation制造) 测定IR,使用JNM-AL400 (JEOL Ltd. 制造) 测定NMR。

[0075] <合成例1的白色固体的IR及 ^1H -NMR测定结果>

[0076] [IR]

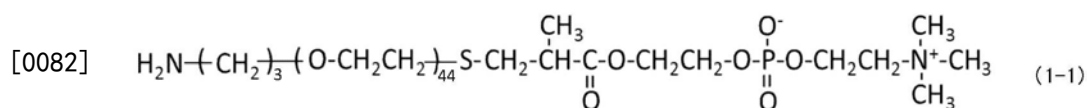
[0077] 3430cm^{-1} ($-\text{NH}_2$), 2875cm^{-1} ($-\text{CH}$), 1639cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1457cm^{-1} ($-\text{CH}$), 1249cm^{-1} ($\text{P}=\text{O}$), 1102cm^{-1} ($-\text{OPOCH}_2-$), 953cm^{-1} ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)

[0078] [^1H -NMR (D_2O 溶剂)]

[0079] 1.25ppm ($-\text{CH}_3$), 1.94-1.99ppm ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 2.77-2.89ppm ($-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.10-3.14ppm ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.22ppm ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 2.66-3.74ppm ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 3.84-3.90ppm ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 4.11-4.12ppm ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 4.31-4.36ppm ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OP}-$)

[0080] 根据上述测定结果,鉴定出所得到的白色固体为下述式(1-1)所示的衍生物1。

[0081] [化学式5]



[0083] <比较合成例1:共聚物1 (MPC/BMA共聚物)的合成>

[0084] 将17.85g (60.45mmol)的MPC与2.15g (15.12mmol) 甲基丙烯酸丁酯(以下,记作BMA)溶解于30g乙醇、30g蒸馏水的混合溶剂中,并投入带温度计与冷凝管的500mL的四颈烧瓶中,吹入氮气30分钟。然后,于40℃添加0.328g偶氮二异丁腈(AIBN),聚合4小时,然后升温至70℃,进一步反应3小时而得到聚合物。将聚合液滴加于丙酮中,过滤沉淀物,由此得到共聚物1的白色固体。

[0085] 利用HLC-8320GPC (TOSOH CORPORATION制造)对所得到的共聚物1进行GPC分析,其结果,其分子量以聚乙二醇换算计为1,210,000。

[0086] (实施例1)

[0087] <蛋白质吸附抑制剂溶液1的制备>

[0088] 将合成例1中得到的衍生物1以使其浓度成为1.0质量%的方式溶解于碳酸缓冲液(0.1mol/L,pH9.8)中,制备蛋白质吸附抑制剂溶液1。

[0089] <抑制蛋白质吸附于基材(氨基孔板)的方法的实施、衍生物1吸附于基材表面的磷酸胆碱修饰基材的制造及蛋白质吸附抑制效果的评价>

[0090] 以以下方式进行免疫反应测定,在该测定中,实施抑制蛋白质吸附于氨基孔板的方法,制造衍生物1吸附于基材表面的磷酸胆碱修饰基材,评价蛋白质吸附抑制效果。

[0091] 以100μL/孔,向氨基孔板(Sumitomo Bakelite Co.,Ltd.制造)中添加5mM的辛二亚氨酸二甲酯二盐酸盐(Dimethyl suberimide • 2HCl)(Thermo Fisher Scientific Inc.制造,以下,记作DMS)溶液(溶剂为0.2M的三乙醇胺水溶液),在室温下静置30分钟。去除DMS溶液后,以100μL/孔添加蛋白质吸附抑制剂溶液1,在室温下静置1小时,然后去除蛋白质吸附抑制剂溶液1。以100μL/孔添加用杜氏磷酸盐缓冲液(DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE)(-) (以下,记作PBS)稀释至72000倍的HRP标记IgG(Bio-Rad Laboratories,Inc.制造),在室温下静置1小时。去除孔内的HRP标记IgG溶液,重复四次以200μL/孔添加含有0.05%Tween20的PBS后进行去除的清洗工序。清洗后,以100μL/孔添加HRP用显色液(KPL社制造),在室温下反应7分钟,7分钟后通过以50μL/孔添加2N硫酸来终止反应,通过使用酶标仪(Molecular Devices,LLC.制造)测定450nm处的吸光度从而检测出吸附于孔内的蛋白质。吸光度使用三次测定的平均值。吸光度越小,则表示蛋白质的吸附越被抑制。

[0092] 通过利用下述式并根据实施例1的吸光度与下述比较例1的吸光度而计算的相对的蛋白质吸附率来评价蛋白质吸附抑制效果。即,用将比较例1的氨基孔板上的蛋白质吸附率设为100%时的相对吸附率来评价实施例1的氨基孔板上的蛋白质吸附率。将结果示于表1。

[0093] 实施例1的蛋白质吸附率=(实施例1的吸光度/比较例1的吸光度)×100

[0094] (比较例1)

[0095] 除了使用未溶解衍生物1的碳酸缓冲液来代替蛋白质吸附抑制剂溶液1以外,以与实施例1同样的方式进行免疫反应测定,并以与实施例1同样的方式测定吸光度。将结果示

于表1。将比较例1的蛋白质吸附率设为100%。

[0096] [表1]

[0097]		吸光度 (450nm)	蛋白质吸附率 (%)
	实施例1	0.448	46.3
	比较例1	0.968	100

[0098] 根据表1可知,与未实施蛋白质吸附抑制方法的比较例1相比,使用衍生物1实施了本发明的抑制蛋白质吸附于基材的方法的实施例1的吸光度为比较例1的一半以下,作为基材的氨基孔板上的蛋白质吸附率为比较例1的一半以下。因此,可知有效防止了蛋白质对氨基孔板的非特异性吸附。

[0099] (实施例2)

[0100] <耐清洗性(耐解吸性)>

[0101] 通过以下所示的方法比较合成例1中得到的衍生物1与共聚物1的耐清洗性并进行评价。即,比较基材表面吸附有衍生物1的衍生物1修饰材料在有无清洗的情况下的吸光度的差异、与基材表面吸附有共聚物1的共聚物1修饰材料在有无清洗的情况下的吸光度的差异,对衍生物1及共聚物1的耐清洗性进行评价。具体而言,利用下述式并根据有清洗时的吸光度与无清洗时的吸光度而计算出耐清洗性来进行评价。

[0102] 耐清洗性 (%) = (无清洗时的吸光度/有清洗时的吸光度) × 100

[0103] 耐清洗性的数值越大、即有无清洗的情况下的吸光度的差越小,则表示清洗所导致的吸附于基材的吸附物质的解吸越少(解吸率越小),耐清洗性越良好。

[0104] (实施例2-1)

[0105] 使用蛋白质吸附抑制剂溶液1,以与实施例1同样的方式进行免疫反应测定,并以同样的方式测定吸光度。

[0106] (实施例2-2)

[0107] 除了在去除蛋白质吸附抑制剂溶液1后,重复三次以200μL/孔添加PBS后进行去除的清洗工序以外,以与实施例1同样的方式进行免疫反应测定,并以同样的方式测定吸光度。

[0108] 利用上述式并根据实施例2-1的吸光度与实施例2-2的吸光度而计算出耐清洗性。将结果示于表2。

[0109] (比较例2-1)

[0110] 使用将共聚物1以成为1.0质量%的方式溶解于PBS而成的共聚物1的PBS溶液来代替蛋白质吸附抑制剂溶液1。进一步,使用Nunc maxisoap孔板(Thermo Fisher Scientific Inc.制造),未添加DMS。除了这些点以外,以与实施例1同样的方式进行免疫反应测定,并以同样的方式测定吸光度。

[0111] (比较例2-2)

[0112] 除了在去除共聚物1的PBS溶液后,重复三次以200μL/孔添加PBS后进行去除的清洗工序以外,以与比较例2-1同样的方式进行免疫反应测定,并以同样的方式测定吸光度。

[0113] 利用上述式并根据比较例2-1的吸光度与比较例2-2的吸光度而计算出耐清洗性。将结果示于表2。

[0114] (比较例2-3)

[0115] 除了使用将共聚物1以成为1.0质量%的方式溶解于PBS而成的共聚物1的PBS溶液来代替蛋白质吸附抑制剂溶液1以外,以与实施例1同样的方式进行免疫反应测定,并以同样的方式测定吸光度。

[0116] (比较例2-4)

[0117] 除了在去除共聚物1的PBS溶液后,重复三次以200 μ L/孔添加PBS后进行去除的清洗工序以外,以与比较例2-3同样的方式进行免疫反应测定,并以同样的方式测定吸光度。

[0118] 利用上述式并根据比较例2-3的吸光度与比较例2-4的吸光度而计算出耐清洗性。将结果示于表2。

[0119] [表2]

[0120]		吸光度(450nm)	耐清洗性(%)
	实施例2-1	0.448	95.5
	实施例2-2	0.468	
	比较例2-1	0.471	43.1
	比较例2-2	1.094	
	比较例2-3	0.317	24.8
	比较例2-4	1.281	

[0121] 根据表2可知,与共聚物1的清洗所导致的解吸率相比,清洗所导致的衍生物1从基材上的解吸率非常小,耐清洗性优异。

[0122] (实施例3-1)

[0123] 以以下方式进行免疫反应测定,在该测定中实施抑制蛋白质吸附于磁性微粒的方法,制备颗粒表面吸附有衍生物1的衍生物1键合磁性微粒,并评价蛋白质吸附抑制效果。

[0124] <与磁性微粒的反应>

[0125] 在聚丙烯制的微管中取16 μ L的磁性微粒(Thermo Fisher Scientific, Inc.制造, Dynabeads (商标) MyOne (商标) Carboxylic Acid),实施两次添加32 μ L的MES/NaOH缓冲液(10mM、pH5.0,以下记作MES缓冲液)后进行去除的清洗工序。向其中添加2 μ L的水溶性碳二亚胺溶液(以成为20mg/mL的方式溶解于MES缓冲液)与2 μ L的N-羟基琥珀酰亚胺溶液(以成为12mg/mL的方式溶解于MES缓冲液),在室温下反应30分钟。反应后,实施添加32 μ L的MES缓冲液后进行去除的清洗,添加8 μ L的将合成例1中得到的衍生物1以成为1wt%的方式溶解于25mM的CAPS/NaOH缓冲液(pH10.0,以下记作CAPS缓冲液)而成的溶液,进行搅拌后于37℃反应2小时。将其回收,作为衍生物1键合磁性微粒。另外,磁性微粒的清洗及回收中使用钕磁铁。

[0126] <衍生物1键合磁性微粒的蛋白质吸附试验>

[0127] 向衍生物1键合磁性微粒中添加784 μ L的含有0.05%Tween20的HEPES缓冲液(以下,记作HEPES-T缓冲液),进行搅拌后,以100 μ L/孔分装在V形底96孔板中,去除上清。以100 μ L/孔向其中添加用HEPES缓冲液稀释至10000倍的HRP标记IgG,在室温下静置1小时。然后,重复四次以100 μ L/孔添加HEPES-T缓冲液后进行去除的清洗工序。清洗后,以100 μ L/孔添加HRP用显色液(KPL公司制造),在室温下反应7分钟,7分钟后通过以50 μ L/孔添加2N硫酸来终止反应。将反应液以100 μ L/孔转移至平底96孔板,通过使用酶标仪(Molecular Devices, LLC.制造)测定450nm处的吸光度从而检测出吸附于孔内的蛋白质。将结果示于表3。吸光度

越小,表示蛋白质的吸附越被抑制。

[0128] 通过利用下述式并根据实施例3-1的吸光度与下述比较例3-1的吸光度计算的相对的蛋白质吸附率来评价蛋白质吸附抑制效果。即,用将比较例3-1的磁性微粒上的蛋白质吸附率设为100%时的相对吸附率来评价实施例3-1的磁性微粒上的蛋白质吸附率。将结果示于表3。

[0129] 实施例3-1的蛋白质吸附率 = (实施例3-1的吸光度/比较例3-1的吸光度) × 100

[0130] (实施例3-2)

[0131] 除了使衍生物1于37℃反应2小时,然后重复两次添加16μL的50mM HEPES/NaOH缓冲液(pH7.4,以下记作HEPES缓冲液)后进行去除的清洗工序以外,以与实施例3-1同样的方式进行免疫反应测定,根据所得到的吸光度计算出蛋白质吸附率。将结果示于表3。

[0132] (实施例3-3)

[0133] 除了将衍生物1的浓度设为4wt%以外,以与实施例3-1同样的方式进行免疫反应测定,根据所得到的吸光度计算出蛋白质吸附率。将结果示于表3。

[0134] (比较例3-1)

[0135] 除了使用未溶解衍生物1的碳酸缓冲液以外,以与实施例3-1同样的方式进行免疫反应测定,根据所得到的吸光度计算出蛋白质吸附率。将结果示于表3。

[0136] (比较例3-2)

[0137] 除了使用共聚物1来代替衍生物1以外,以与实施例3-1同样的方式进行免疫反应测定,根据所得到的吸光度计算出蛋白质吸附率。将结果示于表3。

[0138] (比较例3-3)

[0139] 除了使用共聚物1来代替衍生物1以外,以与实施例3-2同样的方式进行免疫反应测定,根据所得到的吸光度计算出蛋白质吸附率。将结果示于表3。

[0140] [表3]

[0141]

	吸光度 (450nm)	吸附率 (%)
实施例3-1	0.113	4.0
实施例3-2	0.128	4.5
实施例3-3	0.070	2.5
比较例3-1	2.835	100
比较例3-2	0.31	10.9
比较例3-3	0.63	22.2

[0142] 根据表3可知,使用磁性微粒作为基材时,本发明的衍生物显示特别优异的蛋白质吸附抑制效果。此外,根据实施例3-1及3-2与比较例3-2及3-3的比较可知,即使在使用磁性微粒作为基材的情况下,本发明的衍生物也显示优异的耐清洗性。

专利名称(译)	新型聚乙二醇衍生物及蛋白质吸附抑制剂		
公开(公告)号	CN111094391A	公开(公告)日	2020-05-01
申请号	CN201880058415.0	申请日	2018-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	日本油脂株式会社		
申请(专利权)人(译)	日油株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日油株式会社		
[标]发明人	松田将 野田朋澄 佐佐木崇 铃木裕贵 坂元伸行		
发明人	鹿取茜 松田将 野田朋澄 佐佐木崇 铃木裕贵 坂元伸行		
IPC分类号	C08G65/32 G01N33/531		
CPC分类号	C08G65/32 G01N33/531		
代理人(译)	张晶		
优先权	2017173725 2017-09-11 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种有效地吸附于免疫反应容器等基材的表面，防止蛋白质等的非特异性吸附的蛋白质吸附抑制效果极高，且在基材的清洗操作前后该效果不发生变化的耐清洗性优异的化合物。此外，还提供一种使用了该化合物的蛋白质吸附抑制剂、磷酸胆碱修饰基材、及蛋白质吸附抑制方法。该化合物为式(1)所示的含磷酸胆碱基团的聚乙二醇衍生物。本发明的蛋白质吸附抑制方法具有在基材的表面形成该衍生物的吸附层的工序。

