

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

B08B 3/00

[12] 发明专利申请公开说明书

B08B 7/00 B05D 3/02

B05D 5/08 C11D 1/83

C11D 1/835 C11D 3/30

C11D 3/43

[21] 申请号 97199048.4

[43]公开日 1999年11月3日

[11]公开号 CN 1233981A

[22]申请日 97.10.3 [21]申请号 97199048.4

[30]优先权

[32]96.10.24 [33]US[31]60/029,009

[86]国际申请 PCT/US97/18021 97.10.3

[87]国际公布 WO98/17407 英 98.4.30

[85]进入国家阶段日期 99.4.22

[71]申请人 康宁股份有限公司

地址 美国纽约州

[72]发明人 D·C·布克班德 E·J·小富克斯

J·A·格里芬 F·M·史密斯

D·L·坦南特

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 白益华

权利要求书 5 页 说明书 31 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 产生弱结合表面的方法

[57]摘要

通过以下方法使疏水聚合物表面的蛋白质结合程度低于约 50-80 纳克/厘米², 所述方法是:(1)将由溶剂和 HLB 数小于 5 的非离子表面活性剂组成的涂覆溶液施涂到该表面上;和(2)干燥表面除去溶剂以使表面活性剂与疏水聚合物直接接触。发现,HLB 数低和干燥步骤的结合产生了弱结合表面,它能够经受水和/或含蛋白质溶液的多次洗涤。此外,弱结合表面还可如下制得:将非离子表面活性剂施涂到与熔融聚合物接触的模具表面上,使熔融聚合物成型为所需形状,如多孔板、移液管尖头等。另外,可在模塑制品前通过将 HLB 数小于或等于 10 的不溶性的非离子表面活性剂掺入聚合物共混物中来制备弱结合表面。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种对疏水表面进行处理以降低水溶液中的有机材料对该表面结合能力的方法，所述方法包括：

5 (a) 给疏水表面施用涂覆溶液，所述涂覆溶液包含溶于溶剂中的非离子表面活性剂，所述非离子表面活性剂具有(i)小于或等于 5 的亲水性-亲油性平衡数和(ii)至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分；以及

(b) 对步骤(a)的经涂覆疏水表面进行干燥，以除去涂覆溶液中的溶剂，从而使非离子表面活性剂结合在疏水表面上；

10 所述施涂步骤和干燥步骤中间不进行用有机溶剂洗涤的步骤。

2. 如权利要求 1 所述的方法，该方法包括在步骤(b)之后，将经过处理的表面与含有机材料的水溶液接触的附加步骤，与未经处理的表面相比，所述经过处理的表面降低了有机材料的结合。

15 3. 如权利要求 2 所述的方法，其中经过处理的表面对有机材料的结合程度不到未经处理表面所显示结合程度的 0.5 倍。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其中经过处理的表面对有机材料的结合程度不到未经处理表面所显示结合程度的 0.3 倍。

20 5. 如权利要求 1 所述的方法，该方法还包括在步骤(b)之后将经过处理的表面与含有机材料的水溶液接触一段时间的附加步骤，所述有机材料具有生物活性，并且当该水溶液与经过处理的表面接触后，显示其生物活性的保留程度比当该水溶液与未经处理的表面接触该段时间后要高。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述接触时间是 90 分钟，并且当所述水溶液与经过处理的表面接触时，所述有机材料显示其生物活性的保留程度是当所述水溶液与未经处理表面接触时其生物活性保留程度的至少 1.5 倍。

25 7. 如权利要求 1 所述的方法，其中非离子表面活性剂的亲水性-亲油性平衡数小于或等于 2.5。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中非离子表面活性剂包含环氧乙烷/环氧丙烷嵌段共聚物。

9. 如权利要求 7 所述的方法，其中非离子表面活性剂包含聚环氧丙烷。

30 10. 如权利要求 1 所述的方法，其中溶剂包含醇。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其中疏水表面是聚合物的表面。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中聚合物的表面包含聚苯乙烯。

13. 如权利要求 1 的方法, 其中有机材料是蛋白质、肽、核酸或细胞。
14. 如权利要求 1 所述的方法, 其中有机材料是酶或抗体。
15. 如权利要求 1 所述的方法, 其中有机材料在水溶液中显示至少有一些疏水性。
- 5 16. 包含按照权利要求 1 所述的方法进行处理的疏水表面的器具。
17. 如权利要求 16 所述的器具, 其中器具包含实验室器具。
18. 一种制品, 包含非离子表面活性剂干燥在上面的疏水表面, 所述非离子表面活性剂具有(i)小于或等于 5 的亲水性-亲油性平衡数和(ii)至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分。
- 10 19. 如权利要求 18 所述的制品, 其中非离子表面活性剂的亲水性-亲油性平衡数为小于或等于 2.5。
20. 如权利要求 18 所述的制品, 其中非离子表面活性剂包含环氧乙烷/环氧丙烷嵌段共聚物。
21. 如权利要求 18 所述的制品, 其中非离子表面活性剂包含聚环氧丙烷。
- 15 22. 如权利要求 18 所述的制品, 其中疏水表面是聚合物的表面。
23. 如权利要求 22 所述的制品, 其中聚合物的表面包含聚苯乙烯。
24. 一种制备由疏水聚合物组成的物体的方法, 所述方法包括:
- (a) 提供形成该物体的模具;
- (b) 向该模具的表面施涂非离子表面活性剂, 所述非离子表面活性剂具有(i)
- 20 小于或等于 5 的亲水性-亲油性平衡数和(ii)至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分; 以及
- (c) 使用模具来形成所述物体, 该物体形成时至少其一部分与涂有非离子表面活性剂的表面接触, 使得至少有一些非离子表面活性剂从所述表面转移至该物体的所述部分上。
- 25 25. 如权利要求 24 所述的方法, 该方法包括在步骤(c)之后将该物体与含有有机材料的水溶液接触的附加步骤, 与用不涂有步骤(b)非离子表面活性剂的模具所制成的物体相比, 该物体显示对有机材料的结合降低。
26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中所述物体显示对有机材料的结合程度不到用不涂有步骤(b)非离子表面活性剂的模具所制成的物体所显示的结合程度的
- 30 0.5 倍。
27. 如权利要求 25 所述的方法, 其中所述物体显示对有机材料的结合程度不到用不涂有步骤(b)非离子表面活性剂的模具所制成的物体所显示的结合程度的

0.3 倍。

28. 如权利要求 24 所述的方法，它包括在步骤(c)之后将所述物体与含有机材料的水溶液接触一段时间的附加步骤，所述有机材料具有生物活性，并且当该水溶液与所述物体接触，在该段时间内此有机材料显示其生物活性的保留程度比当该水溶液与用不涂有步骤(b)非离子表面活性剂的模具所制成的物体接触所保留的要高。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述接触时间是 90 分钟，并且当所述水溶液与所述物体接触时，所述有机材料显示其生物活性的保留程度是当所述水溶液与用不涂有步骤(b)非离子表面活性剂的模具所制成的物体接触时所显示的生物活性保留程度的至少 1.5 倍。

30. 如权利要求 24 所述的方法，其中非离子表面活性剂的亲水性-亲油性平衡数小于或等于 2.5。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中非离子表面活性剂包含环氧乙烷/环氧丙烷嵌段共聚物。

32. 如权利要求 30 所述的方法，其中非离子表面活性剂包含聚环氧丙烷。

33. 如权利要求 24 所述的方法，其中疏水聚合物包含聚苯乙烯。

34. 如权利要求 24 所述的方法，其中非离子表面活性剂是以该非离子表面活性剂和溶剂的溶液形式施涂到模具上的。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中溶剂包含醇。

36. 用权利要求 24 所述方法制得的物体。

37. 如权利要求 36 所述的物体，其中所述物体包含实验室器具。

38. 一种降低水溶液中有机分子由于与疏水表面接触而致生物活性损失的方法，该方法包括：

(a) 提供与水溶液接触的器具，所述器具含有非离子表面活性剂干燥在上面的疏水表面，所述非离子表面活性剂具有(i)小于或等于 5 的亲水性-亲油性平衡数和(ii)至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分；以及

(b) 使水溶液与所述器具接触。

39. 如权利要求 38 所述的方法，其中非离子表面活性剂的亲水性-亲油性平衡数小于或等于 2.5。

40. 如权利要求 39 所述的方法，其中非离子表面活性剂包含环氧乙烷/环氧丙烷嵌段共聚物。

41. 如权利要求 39 所述的方法，其中非离子表面活性剂包含聚环氧丙烷。

42. 如权利要求 38 所述的方法, 其中疏水表面是聚合物的表面。
43. 如权利要求 38 所述的方法, 其中器具是用来贮存水溶液的。
44. 如权利要求 38 所述的方法, 其中器具是用来分配水溶液的。
45. 一种降低水溶液中有机材料对疏水表面结合能力的方法, 所述方法包
5 括:
- (a) 给疏水表面施用涂覆溶液, 所述涂覆溶液包含溶于溶剂中的非离子表面活性剂, 所述非离子表面活性剂具有(i)小于或等于 5 的亲水性-亲油性平衡数和(ii)至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分; 以及
- (b) 使涂覆的表面与水溶液接触, 所述水溶液含有有机材料但不含步骤(a)所
10 用的非离子表面活性剂;
- 与未涂覆表面相比, 所述涂覆表面显示对有机材料的结合降低。
46. 一种由聚合物共混物制得的产品, 所述聚合物共混物包含:
- a) 非水溶性的非离子表面活性剂, 它具有小于或等于 10 的亲水性-亲油性平衡数, 并具有至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分; 以及
15 b) 母体聚合物,
- 其中所述产品能够降低水溶液中的有机材料对产品表面的结合能力。
47. 如权利要求 46 所述的产品, 其中所述非水溶性的非离子表面活性剂选自山梨醇单油酸酯、山梨醇三硬脂酸酯、山梨醇三油酸酯、山梨醇单硬脂酸酯、PEO 十八烷基醚、PEO 油烯基醚和 PEO/PPO 嵌段共聚物。
- 20 48. 如权利要求 46 所述的产品, 其中所述母体聚合物选自乙烯-乙酸乙烯酯、聚丙烯、聚烯烃、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚苯乙烯-丁二烯共聚物、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯、聚酰胺、及其共聚物、聚氨酯、聚酯及其共聚物, 以及含氟聚合物。
49. 如权利要求 46 所述的产品, 其中所述产品包括实验室器具。
50. 一种制造能够降低水溶液中有机材料对其表面结合能力的聚合物共混物
25 的方法, 它包括以下步骤:
- a) 将非水溶性的非离子表面活性剂与母体聚合物彻底混合成共混物;
- b) 熔融所述共混物; 以及
- c) 使该共混物处于剪切状态, 以使得所述非水溶性的非离子表面活性剂通过剪切作用移动到基体聚合物基材的表面上。
- 30 51. 如权利要求 49 所述的方法, 其中所述共混物通过挤压过程或注塑过程处于剪切状态。
52. 一种制品, 它包含按照权利要求 49 的方法制得的亲水表面。

53. 一种制品，它包含其上覆盖有非离子表面活性剂的表面，所述非离子表面活性剂具有(i)小于或等于10的亲水性-亲油性平衡数和(ii)至少一个能够伸展到水溶液中的亲水部分。

说明书

产生弱结合表面的方法

5

发明的领域

本发明涉及降低有机物质(如肽、蛋白质、核酸和细胞)对疏水表面(如聚合物表面)的结合的方法。本发明还涉及具有这种弱结合表面的制品(如实验室器具)。

发明的背景

10

生物物质(如肽、蛋白质、核酸和细胞)通常以容器贮存或转移,所述容器由塑料或其它疏水材料制得,如离心管和移液管。常见生物化合物吸附/结合在这些容器的表面上。对于在水溶液中呈现一定疏水性的有机材料(如吡啶鎓化合物、PCBs等)也是如此。

15

许多应用,不希望这种结合。例如,这种结合导致有价值物质(如酶和抗体)的损失,还可能导致有机物质分配的变化,尤其是涉及的容量不大时。在各种血液处理过程中也牵涉到蛋白质、细胞和血小板对疏水表面的结合。

20

由于这些原因,人们作了广泛的努力以得到降低蛋白质和其它有机化合物与疏水表面结合的方法。已经考虑到的方法可见例如 Caldwell 等的美国专利 No. 5,516,703; Ding 等的国际专利申请公开号 WO94/03544; Amiji 等的生物材料(Biomaterials), 13:682-692, 1992; J.Andrade 在生物医学聚合物的表面和界面方面(Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers)中的“蛋白质吸附原理”(“Principles of Protein Adsorption”), J. Andrade, 编辑, 卷 2, Plenum Press, New York, 1-80, 1985; Lee 等的聚合物材料科学与工程(Polymeric Mater. Sci Eng., 57:613-617, 1987; Lee 等的生物医学材料研究杂志(Journal of Biomedical Materials Research), 23:351-368, 1989; Lee 等的生物材料(Biomaterials), 11:455-464, 1990; Lee 等的聚合物科学进展(Prog. Polym. Sci.), 20:1043-1079, 1995; Merrill 等的ASAIO 杂志, 6:60-64, 1983; Okano 等的生物医学材料研究杂志, 20:1035-1047, 1986; Okkema 等的生物材料科学聚合物教育杂志(J. Biomater. Sci. Polymer. Edn., 1:43-62, 1989; Owens 等, 细胞科学杂志(Journal of Cell Science), 87:667-675, 1987; Rabinow 等的生物材料科学聚合物教育杂志, 6:91-109, 1994; Schroen 等的膜科学杂志(Journal of Membrane Science), 80: 265-274, 1993; Sheu 等的粘附科学技术杂志(J. Adhesion Sci. Technol.), 6:995-1009, 1992; Shimada 等

的聚合物杂志(Polymer Journal), 15:649-656, 1983 ; 以及 Thurow 等的 Diabetologia, 27:212-218, 1984 .

一个用来产生弱结合表面(low binding surface)的成功技术应该满足的标准包括: 1) 足够弱程度的结合; 2) 实际上的永久性; 3) 易于使用; 以及 4) 低成本。
5 本发明的目的是提供产生满足所有这些标准的弱结合表面的方法。

发明的概述

本发明通过特定的涂料和特定的工艺步骤相结合来达到以上标准, 这两者对于本技术的成功都是关键性的。

10 本发明所用的特定材料是非离子表面活性剂, 它具有能够伸展到水溶液中的亲水部分(如亲水端基), 该非离子表面活性剂的亲水性亲油性平衡数(HLB 数)小于或等于 5。本文所用的术语“非离子表面活性剂”是依据其传统定义指含有两个结构上不同、在水溶液中具有不同溶解度的基团的分子。参见 Kirk-Othmer 化学工艺大全(Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology), 第三版, 22 卷,
15 332 页, John Wiley & Sons, New York, New York, 1983 .

如以下所举实施例中所示, 已经发现, 小于或等于 5 的 HLB 数对于得到耐久的弱结合表面是关键性的。虽然早先人们也考虑到将非离子表面活性剂用于产生弱结合表面(参见以上引用的参考文献), 但是早先并未认识到小于或等于 5 的 HLB 数的关键性。正如本发明所证明的, HLB 数在该数值以上时, 蛋白质的结合
20 合或是不受显著抑制, 或只能暂时受抑制; 而等于或小于该数值时, 能够实现对蛋白质结合的长期抑制。

本发明所用的一种特定方法包括以下步骤: 将非离子表面活性剂溶于溶剂中施涂到表面(基材)上, 然后干燥此表面(基材)除去溶剂, 从而使表面活性剂与该表面直接接触而结合其上。较好的是该表面被完全干燥。所述施涂步骤和干燥步骤
25 必须是中间不进行用有机溶剂洗涤的步骤。

如实施例 7 和 8 所示, 干燥步骤对得到耐久的弱结合表面是关键性的。没有这一步骤, 非离子表面活性剂可被水溶液从疏水表面上除去, 因此使该表面丧失了弱结合性能。即使是使用 HLB 数小于或等于 5 的非离子表面活性剂, 也会发生这一除去现象。然而, 一旦涂料经过干燥结合在表面上, 它的效果就是永久的,
30 与水溶液接触基本上不会被除去。这是本发明一个重要的优点, 因为本领域需要的弱结合表面是与水溶液一起使用的。

考虑到本发明实践中所用非离子表面活性剂的低 HLB 数, 在干燥步骤之前

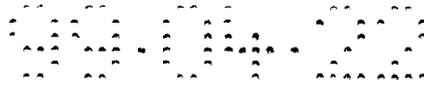
避免用有机溶剂洗涤很重要。那些低 HLB 数使非离子表面活性剂可基本上溶于有机溶剂，因此用这种溶剂洗涤会从表面上除去基本上所有的表面活性剂，从而使表面活性剂不能发挥其弱结合的功能。

5 那些使用 HLB 数小于或等于 5 的非离子表面活性剂的参考文献中，没有揭示、揭示或以任何方式认识到上述工艺步骤的关键性作用。具体而言，以上引用的 Thurow 等和 Schroeun 等的参考文献都使用了 HLB 数小于 5 的至少一种非离子表面活性剂。具体是 Thurow 等的较佳 Genapol PF-10 材料的 HLB 数小于 5，Schroeun 等的 L-92 材料的 HLB 数也小于 5。Thurow 等报道 Genapol PF-10 能够阻止胰岛素吸附在胶乳颗粒上，而 Schroeun 等却报道 L-92 不能阻止脂肪酶吸附在聚丙烯膜上。显然，两篇文献都未说明将非离子表面活性剂干燥在疏水表面上，因此两篇文献都不能产生实用产品所需的基本上永久的弱结合表面。

10 Sheu 等也使用了具有低 HLB 数的非离子表面活性剂(即 PLURONIC 121、122 和 127)，但是使用复杂的氩辉光放电工艺使这些表面活性剂结合到疏水表面(即低密度聚乙烯(LDPE))上。在某些实施方案中，他们省去了辉光放电处理，代之以仅仅是将表面活性剂施涂到 LDPE 上并用氯仿洗涤(参见其图 2)。在这些情况下，他们报道，与未经处理的 LDPE 相比，蛋白质的结合没有降低(参见他们的第 1006 页)。Sheu 等人得出这样的结论，显然他们没有认识到低 HLB 的表面活性剂可以成功地用来产生弱结合的表面而无需辉光放电处理，如同本发明所证明的那样。

20 本发明的工艺步骤(即施涂溶于溶剂中的表面活性剂，然后干燥除去溶剂)是简单易行的。该工艺还很便宜，因为得到弱结合表面只需浓度很低的表面活性剂。例如，一磅约 1 美元的表面活性剂可以在约 5,000 平方英尺(465 平方米)的疏水表面上得到一微米厚的涂层。因此，本发明满足了上述产生弱结合表面实用方法四条标准的每一条，也就是说，它提供了产生基本上永久的弱结合表面的低成本、容易使用的方法。

25 在某些实施方案中，本发明可更简单和更便宜地实施。在这些实施方案中，弱结合表面与具有该表面的部件同时形成。具体来说，根据这些实施方案，将具有上述特性(即 HLB 数小于或等于 5)和具有能够伸展到水溶液中的亲水成分的表面活性剂施涂到制造部件所用的模具中，例如将表面活性剂溶液喷在模具模制表面的至少一面上。根据本发明，已经发现，使用经过这样处理的模具来制造部件时，足量的表面活性剂从模具转移到部件的表面上，得以产生弱结合表面。虽然可以每制造一个部件向模具喷一次表面活性剂，但是如果需要的话可以喷得次数



少一些。用上述形成弱结合表面的程序制备部件的这些过程满足了产生弱结合表面实用方法的所有标准。

此外还发现，在某些实施方案中，在模制之前，HLB 数小于或等于 10 的表面活性剂可以与大量基体聚合物热塑性材料一起捣碎共混。在模制过程中有足够量的低 HLB 数表面活性剂分子迁移到表面产生弱结合表面，这一过程被称为“覆盖(blooming)”。

本实施方案中所用的方法包括以下步骤：将非水溶性的非离子表面活性剂与母体聚合物彻底混合成共混物，熔融该共混物，使该共混物处于剪切状态(shear conditions)，以使得非离子表面活性剂通过剪切作用(shear)移动到聚合物基材的表面上。例如，可以使用挤压机来对材料进行捣碎混合，可以使用注塑机来将聚合物共混物转变为成品部件。一旦非离子表面活性剂迁移到聚合物表面，表面活性剂分子的亲水部分就可以从聚合物表面伸展到水溶液中。所得产品显示与用表面活性剂涂覆的产品一样的非结合特性，使用共混工艺的一个优点在于省去了干燥步骤和涂覆步骤，从而有助于进一步降低成本。

Ding 等人公布了使用含有水溶性聚合物的聚合物共混物在基材聚合物上得到弱蛋白质结合的表面的资料。然而，Ding 等人未公开向聚合物共混物中加入 HLB 数小于或等于 10 的非离子非水溶性表面活性剂的资料。

本发明一个特别有利的用途是产生具有蛋白质排斥表面的实验室器具(labware)。能够根据本发明所提供的弱结合表面类产品的例子包括所有形状、尺寸和种类的容器、多孔板条(multiwell strips)、移液管、移液管尖头、膜、试剂贮存器、贮存容器、管线等。一旦具有弱结合表面后，这些产品还可用常规技术灭菌，如 γ 射线灭菌。

较佳实施方案的描述

如上所述，本发明涉及通过使用非离子表面活性剂在疏水基材上产生弱结合表面，所述非离子表面活性剂的 HLB 数小于或等于 5 (用于聚合体共混物小于或等于 10)，并具有能伸展到水溶液中的亲水部分。有关 HLB 数以及对于具体的表面活性剂如何确定其 HLB 数的探讨可以参见例如，题为 HLB 体系(The HLB System) 的 ICI 表面活性剂(ICI Surfactants)出版物，具体是在该出版物第 7 章题为“如何确定乳化剂的 HLB (How to Determine HLB of an Emulsifier)”的文章(ICI Americas, Inc., Wilmington, Delaware, 1992)中。

本发明实践中所用的非离子表面活性剂需要具备能够伸展到水溶液中的亲

水部分，以得到所需的弱结合表面。虽然不希望受任何具体操作理论所束缚，但还是认为，当该亲水部分被水化并从疏水表面伸展出去时，提供了一层水性边界层，具有疏水性部分的分子(如蛋白质)不能轻易地穿透该层，从而防止这些分子结合到疏水表面上。在许多例子中，本发明实践中所用的非离子表面活性剂分子具有中央疏水区，其两端连接有能够伸展到水溶液中的亲水部分。在其它例子中，此分子具有疏水区，它只有一端连接有亲水部分。如果需要的话，具有其它构型的表面活性剂分子当然也可以使用，只要他们至少具有一个能够伸展到水溶液中的亲水部分。应该注意到，在极限情况下，亲水部分可以简单到羟基，如用聚环氧丙烷得到弱结合所证实(参见以下实施例 6)的那样。

10 一个或多个亲水部分的存在意味着这些表面活性剂分子的 HLB 数通常大于 0，即这些表面活性剂分子具有一些亲水特性。(请注意，在聚环氧丙烷的例子中，HLB 数实际上接近 0(即小于 0.5)。)然而，由于 HLB 数必须小于或等于 5 以得到基本上永久的弱结合表面，因此该亲水特性大大地低于分子的亲油特性。一般来说，HLB 数小于约 2.5 的非离子表面活性剂对用于本发明实践是较好的。

15 多种现在已知或后续开发的非离子表面活性剂可用于本发明实践。合适的表面活性剂的例子包括乙氧基化烷基醇、乙氧基化烷基酯、山梨醇烷基酯、甘油烷基酯和环氧乙烷/环氧丙烷嵌段共聚物。如上所述，聚环氧丙烷可用于本发明的实践。较好的是，聚环氧丙烷的平均分子量约在 1,000-15,000 范围内。聚环氧丙烷的衍生物(如支化聚合物和星形聚合物)也可用于本发明的实践。

20 这些和其它合适的表面活性剂可得自多位供应商，包括 ICI Americas, Inc., Wilmington, Delaware; BASF Corp., Parsippany, New Jersey; Witco Corp., Greenwich, Connecticut; 以及 Henkel Corporation Ambler, Pennsylvania。如果需要的话，非离子表面活性剂的混合物可用于本发明实践，只要混合物中所用的每种表面活性剂的 HLB 数小于 5。多种市售非离子表面活性剂的名单表可见于
25 McCutchenon 的乳化剂和洗涤剂(McCutchenon's Emulsifiers and Detergents)，北美版本，The Manufacturing Confectioner Publishing Co., Glen Rock, New Jersey, 1995。用于本发明的较佳非离子表面活性剂是 Pluronic® L-121。

30 根据本发明，可以将多种疏水表面制成弱结合性的。正如本文所用的，如果处理前的蛋白质结合与处理后的蛋白质结合比值小于约 0.5(较好的是小于 0.3)，则认为该表面被制成弱结合性。同样地，如果经处理的表面在室温下水洗涤至少约 2 次(较好的是在室温下至少洗涤约 6 次)后仍能保持其低蛋白质结合性能的话，则认为表面处理基本上是永久性的，其中此处所用的水洗涤持续至少 60 秒

种。

5 可从本发明获益的这类聚合物表面的例子包括含有以下物质或者由以下物质组成的聚合物表面：聚苯乙烯、聚丙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚甲基戊烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚砜、聚苯乙烯共聚物(如 SAN 和 ABS)、聚丙烯共聚物、含氟聚合物、聚酰胺、聚硅氧烷，以及弹性体，包括硅氧烷弹性体、烃类弹性体和碳氟弹性体。其它材料也可以进行处理，假如他们具有表面活性剂能结合的疏水表面即可。

10 非离子表面活性剂以含有表面活性剂和溶剂的涂覆溶液形式施涂到疏水表面上。考虑到表面活性剂的低 HLB 数，溶剂通常为有机溶剂，有机溶剂的混合物，或者水和一种或多种能混溶有机溶剂的混合物(如水/醇混合物)。为了方便干燥步骤，溶剂应该是易于蒸发的。主要由水组成的溶剂不是很好，尽管需要时也能使用。这些溶剂蒸发较慢，由于表面活性剂的 HLB 数低而可能导致团聚问题。此外，当这些溶剂喷到模具上后，到关闭模具和注入熔融聚合物时未蒸发除去的任何水都可能导致成品部件中的缺陷。

15 涂覆溶液中表面活性剂的浓度可以随用途在非常宽的范围内进行变化。适宜的浓度约在单位体积 0.01%(重量)至 1.0%(重量)的范围内。用于实验室器具的后形成涂料的合适浓度约为单位体积的 0.1%(重量)。如果需要的话，当然也可以使用较高或较低的浓度。

20 可以使用多种技术将涂覆溶液施涂到疏水表面上，所述技术的例子包括喷涂、浸涂、刷涂等。少量的表面活性剂就可以用来处理大表面积。因此，每平方米毫米疏水表面所施涂的涂覆溶液的体积可以非常少，例如对于表面活性剂浓度约为单位体积 0.1%(重量)的涂覆溶液而言，每平方厘米约 2-20 微升。对于任何具体场合，可以通过观察疏水表面试样状况来确定结合是否达到了所要求的下降，由此容易地确定每单位面积的表面活性剂量、相应的涂覆溶液浓度和施涂速率。

25 涂覆溶液的干燥可以在室温和环境大气压力下进行。如果需要的话，可以使用较高或较低的温度。据发现，较高的温度(50-70 °C)有时能有助于表面涂层更均匀。如果需要快速干燥的话，可以使用减压。无论采用何种干燥过程，都需要充分除去溶剂使非离子表面活性剂与疏水表面直接接触以结合在该表面上。可以用水溶液反复洗涤涂覆表面来容易地检验这种结合是否发生。如果洗涤后表面仍保持其非结合性质，则达到了所要求的结合；反之，涂覆表面需要更彻底地干燥。

30 如上所述，本发明的非离子表面活性剂不用于成品部件，而是施用到用来形成部件的模具中。根据这些实施方案，用含有非离子表面活性剂的溶液喷在模具

的全部或一部分表面上，关闭模具，向模具中注入熔融聚合物并冷却，打开模具盖，从模具中推出模制部件。用来涂覆模具的溶液可以具有与上述涂覆溶液相同的组成。根据本发明，已经发现有足够的表面活性剂转移至聚合物表面产生了基本上永久的非结合表面。虽然喷涂是较好的方法，但是其它技术(如刷涂)也可以用来将表面活性剂施涂到模具上。一类用来将剥离剂施涂到模具上的设备可用来施涂表面活性剂。

模制之前向共混物中加入非离子表面活性剂来产生非结合表面的方法中，非离子表面活性剂分子以 5%共混入基体聚合物中。加入母体聚合物中的非离子表面活性剂的所需量随分子而变化，无论何种情况，较佳范围是 0.10-10.0%(重量/体积)，更好的是在 0.5-5.0%之间。必须注意到，可以向共混物中加入其它添加剂以得到具有某些所需特性的成品，这些添加剂如染料、颜料、稳定剂、冲击改性剂等。

本发明将通过以下实施例作更全面的描述，这些实施例不以任何方式限制本发明。各实施例共用的材料和方法如下。

15

材料和方法

表 14 列出了用于实施例的非离子表面活性剂及其 HLB 数和可适用的市售商品名。

除非另外指出，非离子表面活性剂以 0.1%(重量/体积)在异丙醇中的溶液施涂到待测疏水表面上。用足量的涂覆溶液使得待测表面上覆盖一薄层溶液(例如，对于标准的 24 孔板(24-well plate)，每个孔用 25 微升溶液)。在一些情况下，通过喷涂将溶液施涂到表面上；在其它情况下，将溶液倒在表面上(倒入孔内)。除非另外指出，经涂覆的样品或是在空气循环烘箱中 70 °C 干燥 30 分钟或是于室温干燥过夜以蒸发异丙醇。

25 在一些实施例中，用胶体金染色方法测定蛋白质结合。根据该方法，胶体金静电吸附在结合的蛋白质上，通过测量 550 纳米处的吸光度来检测。Bio-Rad Laboratories' Colloidal Gold Total Protein Stain(胶体金全蛋白质染色)可用于此目的，用剑桥技术板读数器(Cambridge Technologies Plate Reader)(No. 7520)来测量吸光度。

30 正如本领域通常所了解的那样，弱结合表面的上限约为 50-80 纳克/厘米² (ng/cm²)。用于比较，中结合在 200-400 纳克/厘米² 左右，如未经处理的聚苯乙烯或聚丙烯所表现的那样；而强结合在 400-800 纳克/厘米² 左右，如经过等离子氧

化和 γ 辐射灭菌的聚苯乙烯或聚丙烯表面所表现的那样。

一些表格中所用的标记"NA"和"ND"分别表示“不适用”或“未测定”，标记"PS"指聚苯乙烯，标记"M.W."指平均分子量。

5

实施例 1

降低蛋白质结合的放射性测定

本实施例通过放射性测定的读数表明，非离子表面活性剂能够降低蛋白质对疏水表面的结合。

10 所用疏水表面是由强结合聚苯乙烯(Corning Costar No. 2581)和中结合聚苯乙烯(Corning Costar No. 2587)组成的平底微量滴定板。试验在使用和不用钴 60 (1.5 Mrad) γ 辐射灭菌的情况下进行。

本实施例所用的非离子表面活性剂列于表 1 中。如材料和方法中所述将表面活性剂施涂到试验板上，接着在指明的试验中进行灭菌。

15 用购自 DuPont/NEN 的放射性标记蛋白质，即 ^{125}I -IgG(山羊抗小鼠)测定蛋白质结合的水平。将 ^{125}I -IgG 掺入碳酸钠缓冲液 pH 9.2 中的未标记 IgG，以使得试验溶液中标记 IgG 和冷 IgG(cold IgG)的最终浓度为 10 微克/毫升。

20 将等量的 0.1 毫升蛋白质溶液一式四份加入从试验微量滴定板中取下的 8 孔条的孔中。这些孔 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动培育过夜。除去孔中上层清液，接着用 0.2 毫升 PBS 洗涤三次。然后干燥这些孔，并单独计数以确定 IgG 结合“总”值。在确定了结合“总”值之后，将这些孔在 0.2 毫升 PBS-Tween (0.05%)中室温摇动培育 2 小时。除去孔中上层清液，接着用 0.2 毫升 PBS 洗涤三次。干燥这些孔，并单独计数以确定 IgG 结合“紧密(tight)”值。

25 将未处理的强结合和中结合板用作对照。同样进行比较试验，其中用 BSA 蛋白质涂覆代替表面活性剂涂覆。将 BSA 预先吸附在孔壁上，然后洗涤除去过量的材料。再用上述放射性标记 IgG 溶液进行测定。

放射性标记测量在生物分子分析(BioMolecular Assays)(Woburn, MA)室以双盲试验进行。每微孔的 IgG 结合值用 0.1 毫升体积为 0.94 厘米²的面积换算成纳克/厘米²值。

30 如表 1 所示，与两个对照和 BSA 试验相比，所测试的非离子表面活性剂都使得蛋白质结合显著下降。灭菌后大多数但不是全部表面该结合仍然比对照有明显下降。

实施例 2

降低蛋白质结合的酶法测定

本实施例通过酶法测定读数表明，非离子表面活性剂能够降低蛋白质对疏水表面的结合。

5 本实施例所用的非离子表面活性剂列于表 2 中。如材料和方法中所述将表面活性剂涂覆到中结合聚苯乙烯板(Corning Costar No. 2587)上。将中结合聚苯乙烯板(Corning Costar o. 2587)和强结合聚苯乙烯板(Corning Costar No. 2581)用作对照。

本实施例中所用试剂为：

10 (a) HRP-Goat A'Mouse IgG: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 分类号 074-1806。储备溶液：0.5 毫克/毫升；工作浓度：0.04 微克/毫升。每 25 毫升 PBS pH 7.4 中加入 11 微升储备溶液以得到工作储液(WS)，然后稀释 1:6 (即 10 毫升 WS + 50 毫升 PBS pH 7.4)，如此得到工作浓度。

(b) 磷酸盐缓冲盐水：Sigma 1000-3。缓冲液制备：每 2 升 H₂O 用 2 包 PBS。

15 (c) 20 倍浓缩洗液：Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 分类号 50-63-01。洗液浓度：1 M (3800 毫升水 + 200 毫升浓缩洗液)。

(d) ABTS 过氧化物本酶底物和过氧化物酶溶液 B：Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 分类号 50-64-02 和 50-65-02。

20 (e) 月桂基硫酸钠(SDS)：Sigma 分类号 L-4509。终止溶液：1% SDS (每 1 升 H₂O 含 10 克 SDS)。

所用的程序是：

(1) 向试验孔中每孔加入 100 微升的浓度为 0.04 微克/毫升的 HRP-Goat A'Mouse IgG，室温培育 1 小时。

25 (2) 然后，用 1M 洗液洗涤这些孔 5 次。每次洗涤包括 5 分钟浸泡，然后倒去洗液。

(3) 向试验孔中每孔加入 100 微升的底物液(30 毫升 ABTS + 30 毫升 H₂O₂)，在黑暗中室温培育 15 分钟。

(4) 向试验孔中每孔加入 100 微升的终止溶液(1% SDS)。

(5) 然后摇动这些板并于 405 纳米处读数。

30 (6) 比较步骤(5)中测得的吸光度和未用非离子表面活性剂处理但经历步骤(1)至(5)的强结合聚苯乙烯板测得的吸光度，确定结合的下降值。

如表 2 所示，非离子表面活性剂实现了结合的酶的显著下降，最大的降低大于 95%。

实施例 3

用胶体金染色对降低的蛋白质结合进行测定

本实施例通过胶体金测定读数表明，非离子表面活性剂能够降低蛋白质对疏水表面的结合。

5 本发明实施例所用的非离子表面活性剂列于表 3。按材料和方法中所述将表面活性剂涂覆到中结合的聚苯乙烯板(Corning Costar No. 2587)上。

将该板用 IgG 培育如下：每孔加入 0.1 毫升以 0.10M NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.4)配的工作浓度为 10 微克/毫升的 Horse IgG (Pierce Labs)，在摇台(rocker table)上培育 30 分钟，用 dI H₂O 进行淋洗。将这些板用金染色过夜(0.3 毫升/孔)，以 dI H₂O
10 淋洗、空气干燥、于 550 纳米处测定吸光度。

如表 3 所示，非离子表面活性剂明显地达到了弱蛋白质结合水平，即用胶体金染色方法(colloidal gold staining procedure)检测不到的程度。

实施例 4

15

蛋白质结合降低与 pH 值无关

本实施例说明了非离子表面活性剂能够在宽 pH 范围内阻止蛋白质结合。

本实施例所用的非离子表面活性剂列于表 4。按材料和方法中所述涂覆 24 孔聚苯乙烯板 (Corning Costar#9447)。

以 0.10 M 乙酸盐缓冲液(pH=4.6)、0.10 M PBS (pH=7.4)和 0.10 M NaHCO₃
20 缓冲液(pH=9.2)制备 10 微克/毫升浓度的 BSA 蛋白质(牛血清清蛋白，级分 V, Sigma)液。向每块涂覆板和未涂覆对照板的孔中加入等量 0.50 毫升蛋白质溶液。这些样品均作一式三份。

将这些板放在摇台上 23 °C 30 分钟。然后从板中倒净蛋白质溶液，用 dI H₂O 淋洗孔三次。此后，每孔加入 1.0 毫升胶体金染色剂(参见材料和方法)。将这些
25 板放在摇台上过夜，用 dI H₂O 淋洗三次，空气干燥。然后用剑桥技术板读数器对 550nm 处的吸光度。

如表 4 所示，非离子表面活性剂能够在宽 pH 值范围内有效地阻止蛋白质结合。

30

实施例 5

降低细胞吸附

本实施例表明，非离子表面活性剂能够降低细胞吸附(cell attachment)。

使用如下方法：按照材料和方法中所述程序用表 5 所列的非离子表面活性剂涂覆聚苯乙烯 24 孔板。未涂覆的板被用作对照。为了比较，也以具有共价连接的丙烯酰胺涂层(Corning Costar 种类#2500)的板和具有硬脂酸涂层的板进行试验。使用 0.1%(w/v)溶液以非离子表面活性剂相同的方式再一次用于硬脂酸涂层。

5 将这些板以 1.5 Mrad 进行 γ 辐照灭菌，然后以每孔 5.6×10^4 MDCK 接种此板诸孔，每孔 1 毫升含 5% FBS (胎牛血清, Fetal Bovine Serum)的完全培养液。在 5% CO₂ 气体中 37 °C 培育 2 天。固定这些板并染色，观察细胞吸附。此后，用胶体金技术染色这些孔检测结合的蛋白质。只进行肉眼观察。

10 如表 5 所示，本发明的多种非离子表面活性剂能够实现降低细胞吸附和/或降低蛋白质结合。

还用悬浮在血清中的细胞进行试验。用于这些实验的细胞是 MDCK 细胞。所用的表面活性剂与表 5 中所用的相同。再一次观察到降低了细胞对用非离子表面活性剂处理过的表面的结合。

15

实施例 6

对能够伸展到水溶液中的亲水部分的要求

本实施例表明，用来产生弱结合表面的非离子表面活性剂必须有能够伸展到水溶液中的亲水部分。

20 非离子表面活性剂可以有各种结构，包括尾尾相接的疏水链段和亲水链段，中央疏水链段两端接有亲水链段，或者中央亲水链段两端接有疏水链段。这三种分子形式可以具有相似的 HLB 数，但是前两种具有至少一个亲水端基，而第三种亲水链段在中央的结构具有的是疏水端基。

用材料和方法中所述技术测试表 6 中所列非离子表面活性剂产生弱结合表面的能力。用聚苯乙烯作为疏水试验的表面，用 IgG/Au 染色作为测量结果。

25 如表 6 所示，对于类似的 HLB 数，用含有至少一个亲水端基的表面活性剂涂覆的表面能够有效地阻止蛋白质的结合，而用不含亲水端基的表面活性剂涂覆的表面不能阻止蛋白质结合。从该数据可见需要能够伸展到水溶液中的亲水部分。

30 应该注意到，适用于本发明的表面活性剂无需具有亲水端基，但是需要在疏水主链上沿主链长度方向的某处连接有一个或多个亲水基团以使得该基团或这些基团能够伸展到水溶液中。

实施例 7

干燥涂覆表面活性剂的表面对其持久性是关键性的

本实施例表明，为了得到持久的弱结合表面，对涂覆表面活性剂的表面进行干燥是关键性的。更具体来说，本实施例试验的目的是确定非离子表面活性剂分子吸附在聚合物表面上以形成持久的涂层是在与水溶液接触期间完成的，还是只有在这些分子干燥在表面上之后才完成的。

双份 24 孔板按如下制备：各孔装满 3 毫升以 H₂O/异丙醇(90/10 重量/体积)配的 0.5%(重量/体积)非离子表面活性剂。所用的表面活性剂列于表 7。

将双份板室温摇台上培育 30 分钟，然后倒空。将一块板流干溶液，然后于室温在通风橱中干燥，再用 dI H₂O 淋洗 5 次。第二块板不干燥，而是立即用 H₂O 淋洗 5 次。然后如下对蛋白质结合进行试验：向两块板的每个孔中注入 0.5 毫升以 PBS 缓冲液配的 10 微克/毫升 IgG (马)，室温摇台上培育 30 分钟。再将这两块板用 dI H₂O 淋洗，用胶体 Au 染色过夜。

结果示于表 7 中。这些数据清楚地表明，必须对板上的表面活性剂分子进行干燥，以得到耐久涂层。这些数据还表明了使用 HLB 数低的表面活性剂的重要性。

实施例 8

对接触非离子表面活性剂水溶液的表面淋洗的效果

本实施例表明，虽然干燥步骤对于持久性是关键性的，但得到弱结合表面不需要此步骤。

Corning Costar 制造的中结合(分类#2587)和强结合(分类#2581)的聚苯乙烯 96 孔板(8 孔板条)的使用如下：向双份板条的每个孔中注入 0.3 毫升以 H₂O/异丙醇(95/5 体积/体积)配的 0.1%(重量/体积)非离子表面活性剂。待测表面活性剂列于表 8 中。将板条于室温在摇台上培育 30 分钟，然后使板条倒空并流干。

第一组板条(含一强结合板条和一中结合板条)不淋洗；第二组板条(同样也含一强结合板条和一中结合板条)用 dI H₂O 淋洗 5 次。紧接这一步骤，每孔中加入等量 0.10 毫升以 PBS 缓冲液(pH=7.4)配的 1.0 微克/毫升的 GAM-IgG-HRP(山羊抗小鼠-IgG-辣根过氧化物酶的酶标记抗体； Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD, 分类号#074-1806)。将这些板条于室温在摇台上培育 1 小时。然后用含 0.02% Tween-20 的 PBS 缓冲液淋洗 5 次，接着用 H₂O 淋洗。

使用 ABTS 底物试剂盒(Kirkegaard and Perry 分类#50-62-01)对结合的抗体进

行比色测定。每孔中加入 0.10 毫升 ABTS/H₂O₂ 溶液。通过结合的抗体上所携带的过氧化物酶随着 ABTS 与 H₂O₂ 反应，形成蓝色。用剑桥技术#7520 板读数器测量 405nm 处的吸光度。

5 表 8 列出了 ABTS/H₂O₂ 溶液加入板条后约 2 分钟测得的吸光度数据。该吸光度数据表明：(1)干燥之前的淋洗从板条上除去了非离子表面活性剂，从而阻止其提供弱结合表面，以及(2) 即使不干燥，表面活性剂也能得到弱结合表面，假如它们没有被淋洗除去。

10 实施例 9

用水洗涤确定涂层耐久性

本实施例表明，HLB 数对于聚苯乙烯上非离子表面活性剂涂层的耐久性的作用。

本实施例中所用的非离子表面活性剂列于表 9 中。如材料和方法中所述用这些表面活性剂涂覆 24 孔聚苯乙烯板(Corning Costar #9447)。

15 通过向试验板的孔中加入 dI H₂O (3.0 毫升/孔)来测定耐久性，接着将板放在摇台上。表 9 中列出了放置摇台的时间和温度，以及 dI H₂O 处理的重复次数。各种板的蛋白质结合性能如下测定：使用的蛋白质溶液，每孔为以 0.1 M NaHCO₃ pH 9.4 缓冲液配的 0.5 毫升 IgG (10 微克/毫升)。将蛋白质溶液与板 23 °C 在摇台上培育 30 分钟，然后将该板用 H₂O 淋洗 3 次(每次 3 毫升)。用上述胶体金染色方法来显示结合的蛋白质。该染色方法包括 23 °C 在摇台上培育过夜、用 dI H₂O 淋洗、
20 室温干燥，并在 550nm 处读数。

如表 9 所示，HLB 数为 1.0、1.8、2.0、4.3 和 4.7 的表面活性剂是耐久的，而 HLB 数为 6.7 及以上的表面活性剂是不耐久的。

25

实施例 10

用蛋白质溶液洗涤确定涂层耐久性

本实施例表明，HLB 数对于聚苯乙烯、聚丙烯、聚甲基丙烯酸甲酯和 PVDF 共聚物上非离子表面活性剂涂层耐久性的作用。

30 本实施例所用的非离子表面活性剂列于表 10。所用方法如下：由聚苯乙烯 (STYRON Dow 685D)、聚丙烯(Exxon 9374)、聚甲基丙烯酸甲酯(ATO HAAS)和 KYNAR FLEX 2800 PVDF 共聚物(ATO HAAS)制得注塑试验板(96 孔形式)。每孔加入等量 0.10 毫升以 0.01 M PBS 缓冲液(pH=7.4)配的 10 微克/毫升 IgG (Horse

Standard, Pierce), 于 23 °C 放在摇台上 30 分钟。然后倒去孔中蛋白质溶液, 每孔加入等量的新鲜蛋白质溶液, 整个过程重复 6 次。然后将这些板用 dI H₂O 淋洗 3 次(0.3 毫升/孔)。每孔加入胶体金染色剂(0.3 毫升/孔), 将这些板放在摇台上过夜。然后用 dI H₂O 淋洗这些板 3 次, 使其干燥, 使用剑桥技术板阅读器测量 550nm 处的吸光度。

5 如表 10 所示, 持久的弱结合表面其 HLB 数的临界值(cutoff)为 5。用 HLB 数远在 5 之上的非离子表面活性剂在多次洗涤过程后显示有明显的结合, HLB 数为 6 或恰低于 6 的表面活性剂显示有少量的结合, 低于 5(即 HLB 数为 1.0、2.0 和 4.3)的表面活性剂基本上显示无结合。对于那些确实吸附有蛋白质的表面, Au 染色用肉眼即可容易地观察到。此外, 不耐久的涂层常常产生“污迹”蛋白质结合, 直至反复淋洗除去了涂层。对于这些涂层, 即使在一个孔内也可观察到高度的不同性。

10 用 BSA 蛋白质反复淋洗或只用 dI H₂O 淋洗来代替 IgG 淋洗进行相同程序时, 得到与表 10 所报告相类似的结果。

15

实施例 11

在过量蛋白质存在下涂层的稳定性

本实施例表明, 接触大量蛋白质并不破坏用低 HLB 数非离子表面活性剂涂覆的亲水表面的弱结合性。

20 本实施例中使用以下方法: 按材料和方法中所述用 25 微升等量溶于异丙醇中的 0.10%(w/v)山梨醇单油酸酯涂覆 24 孔的聚苯乙烯板。计算得到山梨醇单油酸酯的覆盖量为 10 微克/厘米²。使板中每孔与 1.0 毫升以 PBS 缓冲液(pH=7.4)配的 2 毫克/毫升 BSA 蛋白质(Pierce)接触。将板置摇台上室温培育 30 分钟, 倒空这些孔, 这样与蛋白质接触重复总共 6 次。然后用 dI H₂O 淋洗这些板 3 次, 用胶体金染色剂染色过夜。然后将这些板用 dI H₂O 淋洗、干燥、并在 550nm 处在剑桥技术板阅读器上测量每个孔的吸光度。

25 如表 11 所示, 即使在大量过量蛋白质存在下, 弱结合涂层(据认为只是通过范德瓦耳斯力而物理吸附和保持)仍能保持耐久性。

30 使用 Pluronic L-121 和 L-122 进行类似的试验, 得到类似的弱蛋白质结合结果。

实施例 12

毒性

非离子表面活性剂除了能有效地提供弱结合表面之外，通常具有低毒性。

5 表 12 列出了多种非离子表面活性剂的 LD₅₀ 值(大鼠为克/千克重)。该表中还包括矿物油、NaCl 和 As₂O₃ 的 LD₅₀ 值以用于比较。由这些数据可见非离子表面活性剂的低毒性。

10 用 MDCK 细胞进行细胞毒性试验。待测非离子表面活性剂是 Pluronic L-121、L-122 和 P-123；Span 80 和 85；以及 Brij 30、72 和 93。这些分子溶于异丙醇中以 0.1%(w/v) 溶液施涂到 24 孔板(Corning Costar #9447)上。将未处理的聚苯乙烯和经过正常组织培养处理的聚苯乙烯(Corning Costar #25820)的 24 孔板用作对照。将所有的板用 2 毫升/孔含 10% 胎牛血清(FBS)的完全 DMEM 培养液 37 °C 培育 48 小时。进行这一培育是为了将任何潜在的毒性化合物从涂覆表面抽提到细胞生长血清中。然后将 FBS 溶液转移至经组织培养处理的聚苯乙烯上，每孔用 $\approx 2 \times 10^4$ 细胞/孔的 MDCK 细胞进行培育，然后在 5% CO₂ 气体中 37 °C 培育 15 72 小时。然后细胞用革兰结晶紫染色。所有的孔都铺满了具有正常细胞形态的细胞。

实施例 13

酶活性损失的下降

20 本实施例表明，贮存在非离子表面活性剂涂覆容器中的酶比贮存在未涂覆容器中的酶活性损失小。

本实施例中使用 Corning Costar 聚苯乙烯中结合(#2587)和强结合(#2581)的微量滴定板。使用材料和方法中所述技术以山梨醇单油酸酯和 PEO(2)单油酸酯涂覆中结合板，具体来说，是用 0.1%(w/v) 表面活性剂异丙醇溶液涂覆，随后在使用前干燥 24 小时。

辣根过氧化物酶(HRP)购自 Sigma，以 0.01 M PBS(pH=7.4)配成 20 纳克/毫升的 HRP 溶液。将等量 0.1 毫升酶溶液加入涂覆板、未涂覆中结合板和未涂覆强结合板的 8 孔板条中的 6 个孔中。

30 对样品进行预培育 0 或 90 分钟。每孔中加入等量 0.1 毫升的 N-四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶底物体系(Kirkegaard & Perry)，用 Cambridge Technologies Inc. #7520 的微板读数器按时间监测每个孔 405nm 处的吸光度。

结果是:

(1) 加入 TMB 溶液预培育 0 分钟时, 所有四种表面(即两块用表面活性剂涂覆的表面、未涂覆的中结合表面和未涂覆的强结合表面)的酶活性在试验误差范围内是相同的。

5 (2) 当酶在未涂覆的强结合和中结合板中预培育 90 分钟时, 酶分别损失其活性的~60%和~98%。

(3) 当酶在两块涂覆的板中预培育 90 分钟时, 其活性损失基本上为零。

使用聚丙烯板代替聚苯乙烯板也观察到类似的结果。

10 必须注意, 这是完全的溶液试验, 所以观察到的结果并不是蛋白质(酶)的直接物理损失, 而是其生物活性的损失。

实施例 14

本实施例说明用本发明的非离子表面活性剂产生了具有弱结合表面的膜。

15 该试验使用 0.45 微米的 PVDF 膜来进行。使用以下非离子表面活性剂以异丙醇配的 0.1%(重量/体积)溶液进行浸泡对膜涂覆 2 次。所述非离子表面活性剂是: 山梨醇单油酸酯、Pluronic® L-121、Pluronic® L-122 和 Pluronic® L-123。在两次浸涂的每一次之后都使膜于室温干燥。将涂覆的膜与溶解在 0.1 M PBS (pH 7.4) 中的 10 微克/毫升的 IgG 置定轨摇床上室温培育 30 分钟。然后将这些膜在清洁板上用水淋洗 3 次, 每次淋洗在摇台上进行 5 分钟。此后, 将这些膜再在摇床上用 20 Au 染色过夜。以未涂覆的 PVDF 膜作对照。

使用 Pluronic® 表面活性剂基本上未发现蛋白质结合。发现使用山梨醇单油酸酯表面活性剂所显示的蛋白质结合程度与未涂覆的 PVDF 基本相同。尽管不希望受到任何具体的操作理论的束缚, 但认为山梨醇单油酸酯所得结果与其分子亲水端的长度短(约 5 埃)有关。与它相比, Pluronic® L-121、Pluronic® L-122 和 25 Pluronic® L-123 表面活性剂亲水端的长度分别约为 16、36 和 61 埃。我们认为, 当涂覆含有小孔从而表面积较大的膜时, 表面活性剂亲水端的长度对于得到弱结合表面所起的作用比在本发明其它用途中所起作用要重要得多。

实施例 15

模具内涂层

30 本发明模具内涂层(in-mold coating)方面的试验是通过模制 24 孔聚苯乙烯板来进行。将溶于异丙醇的山梨醇单油酸酯以 0.01%(w/v)和 0.1%(w/v)浓度用作非

于实践本发明的该实施方案，弄清这一原因并不是必须的。

用于制备共混物的基体聚合物或母体聚合物选自乙烯-乙酸乙烯酯、聚丙烯、聚烯烃、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚苯乙烯-丁二烯共聚物、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯、聚酰胺，及其共聚物，聚氨酯、聚酯及其共聚物和含氟聚合物。

5 如表 13 所示，在聚丙烯或 EVA 中用 HLB 数小于 10 的非离子表面活性剂，如山梨醇单油酸酯(HLB=4.3)、 PEO 十八烷基醇(HLB=4.7)和 PEO 油烯基醚(HLB=4.9)结果检测不到的 BSA 或 FBS 蛋白质结合。相反地，共混物中不含表面活性剂的基体聚合物容易结合蛋白质。此外，使用 HLB 数大于 10 的表面活性剂的共混物显示显著的蛋白质结合，在一些情况下蛋白质结合比基体聚合物本身还
10 严重。

在区域设定于 200-240 °C 的 Leistritz 34 毫米双螺杆挤压机上，以 10-50 磅/小时的进料速率对共混物进行混合。在区域设定于 200-250 °C 的 25 吨(ton) Battenfeld 模塑机上，将共混物注塑成 35 毫米的培养皿。

15 虽然本说明书中描述了本发明的较佳实施方案和其它实施方案，但是本领域技术人员可能想到的其它实施方案都不会离开以下权利要求书所定义的本发明的范围。

表 1

涂层	HLB 数	未经灭菌		经过灭菌	
		总	紧密	总	紧密
强结合 PS (未经涂覆)	NA	NA	NA	847	768
中结合 PS (未经涂覆)	NA	861	356	NA	NA
BSA 蛋白质	NA	594	173	ND	ND
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-121	1	18	4	ND	ND
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-122	2	12	3	ND	ND
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] P-123	7	7	2	ND	ND
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] F-127	18	ND	2	ND	ND
PEO(2)十六烷基醚	5.3	18	11	54	25
PEO(4)月桂基醚	9.7	2	2	10	4
PEO(2)油烯基醚	4.9	7	5	22	4
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	4	2	5	3
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	37	18	130	80
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	5	2	7	4
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	6	3	15	9
PEO(2)十八烷基醚	4.9	83	28	36	17
山梨醇单油酸酯	4.3	31	7	33	5

涂层	HLB 数	蛋白质结合的降低%
强结合 PS-(未经涂覆)	NA	0.0
中结合 PS-(未经涂覆)	NA	50.0
单油酸甘油酯	3.4	92.4
PEO(2)十六烷基醚	5.3	99.9
PEO(4)月桂基醚	9.7	99.3
PEO(2)油烯基醚	4.9	99.9
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	99.8
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	99.5
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	99.7
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	99.1
PEO(2)十八烷基醚	4.9	97.9
山梨醇单油酸酯	4.3	92.7
山梨醇单棕榈酸酯	6.7	88.9*
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	83.1*

- * 山梨醇单棕榈酸酯和山梨醇单硬脂酸酯的降低百分数为 88.9%和 83.1%，
- 5 认为是涂层缺陷(针孔)导致板表面涂覆不完全的结果。在这些情况下在板表面上发现晶体。虽然未经分析，但是这些晶体被认为是由表面活性剂组成的。进行完全涂覆的话，这些表面活性剂可以得到更大的结合降低。

涂层	HLB 数	IgG 蛋白质结合 吸光度(550nm)
中结合 PS	NA	0.15
PEO(2)十六烷基醚	5.3	0.00
PEO(4)月桂基醚	9.7	0.00
PEO(2)油烯基醚	4.9	0.00
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	0.00
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	0.00
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	0.00
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	0.00
PEO(2)十八烷基醚	4.9	0.00
山梨醇单月桂酸酯	8.6	0.00
山梨醇单油酸酯	4.3	0.00
山梨醇单棕榈酸酯	6.7	0.00
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	0.00

表 4

涂层	HLB 数	吸光度 (550nm)		
		pH=4.6	pH=7.4	pH=9.2
PS (未经涂覆)	NA	0.08	0.10	0.12
PEO(2)十六烷基醚	5.3	0.00	0.00	0.00
PEO(4)月桂基醚	9.7	0.00	0.00	0.00
PEO(2)油烯基醚	4.9	0.00	0.00	0.00
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	0.00	0.00	0.00
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	0.00	0.00	0.00
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	0.00	0.00	0.00
PEO(2)十八烷基醚	4.9	0.00	0.00	0.00
山梨醇单月桂酸酯	8.6	0.00	0.00	0.00
山梨醇单油酸酯	4.3	0.00	0.00	0.00
山梨醇单棕榈酸酯	6.7	0.00	0.00	0.00
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	0.00	0.00	0.00

表 5

涂层	HLB 数	MDCK 附着	蛋白质染色时的可见颜色
PS (未经涂覆)	NA	许多附着和伸展的细胞	非常深
共价连接的光-丙烯酸胺涂层 (Corning Costar 种类#2500)	NA	无	ND, 因为 Au 染色剂结合在丙烯酸胺涂层上
硬脂酸		许多附着和伸展的细胞	非常深
PEO(2)十六烷基醚	5.3	ND	无
PEO(4)月桂基醚	9.7	无	无
PEO(2)油烯基醚	4.9	ND	无
PEO(20)山梨醇单月桂酸酯	16.6	无	无
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-121	1	无	无
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	无	无
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	无	无
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	涂层不均匀; 不能看见细胞	在大多数区域中 无; 有一些污迹区域
山梨醇单油酸酯	4.3	轻微; 涂层可能已经不均匀了	在大多数区域中 无; 有一些污迹区域
山梨醇单棕榈酸酯	6.7	无	无
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	涂层不均匀; 看来没有细胞附着	在大多数区域中 无; 有一些污迹区域

表 6

涂层	HLB 数	端基的种类	结合蛋白质在 550nm 处的吸光度
PS (未经涂覆)	NA	未经涂覆	0.10
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® L-121	1	亲(两端)	0.00
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® L-122	2	亲(两端)	0.00
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® P-123	7	亲(两端)	0.00
PEO(2)十六烷基醚	5.3	亲(一端)	0.00
PEO(200)二油酸酯	5.0	疏(两端)	0.15
PEO(400)二油酸酯	8.5	疏(两端)	0.15
PEO(400)二硬脂酸酯	8.8	疏(两端)	0.10
PEO(600)二硬脂酸酯	10.6	疏(两端)	0.10
PEO(2)油烯基醚	4.9	亲(一端)	0.00
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	亲(一端)	0.00
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	亲(一端)	0.00
聚环氧丙烷 (4,000 M.W.)	<0.5	亲(两端)	0.00
山梨醇单油酸酯	4.3	亲(一端)	0.00

表 7

涂层	HLB 数	吸光度 (550nm)	
		在 H ₂ O 淋洗之前干燥	在干燥之前 H ₂ O 淋洗
PS (未经涂覆)	NA	0.13-0.15	0.13-0.15
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-121	1	0.00	0.13-0.16
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-122	2	0.00	0.12-0.15
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] P-123	7	0.08-1.11	0.14-0.16
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] F-127	18	0.13-0.16	0.13-0.16
PEO(4)月桂基醚	9.7	0.08-0.10	0.13-0.16
PEO(2)油烯基醚	4.9	0.00	0.14-0.16
PEO(20)山梨醇单月桂酸酯	16.6	0.14-0.16	0.13-0.16

表 8

5

表面活性剂	HLB 数	吸光度(405nm)			
		强结合聚苯乙烯		中结合聚苯乙烯	
		未淋洗	经淋洗	未淋洗	经淋洗
无	NA	2.00	2.10	1.90	1.90
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-121	1	0.00	1.90	0.00	1.00
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] L-122	2	0.00	1.90	0.00	1.70
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] P-123	7	0.00	1.80	0.00	1.70
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic [®] F-127	18	0.00	1.00	0.00	1.40
PEO(4)月桂基醚	9.7	ND	2.10	ND	1.90
PEO(2)油烯基醚	4.9	ND	2.10	ND	1.90
PEO(20)山梨醇单月桂酸酯	16.6	0.00	2.00	0.00	1.90

表 9

涂层	HLB 数	吸光度 (550nm)					
		初始	1 次 1 hr 23 °C	1 次 24hr 23 °C	1 次 24hr 37 °C	1 次 24hr 70 °C	6 次 每次 30min 23 °C
PS (未经涂覆)	NA	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® L-121	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® L-122	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® P-123	7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00-0.03	0.02-0.06
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® F-127	18	0.00	0.05- 0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	0.00	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10
PEO(20)山梨醇单月桂酸酯	16.6	0.00	0.02	0.05	0.10	0.10	0.10
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	0.00	0.00	0.02	0.10	0.10	0.10
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	0.00	0.00	0.02	0.10	0.10	0.10
山梨醇单月桂酸酯	8.6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00-0.02	0.02-0.06
山梨醇单油酸酯	4.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
山梨醇单棕榈酸酯	6.7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02-0.06
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
山梨醇三油酸酯	1.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 10

涂层	HLB 数	吸光度 (550 nm)			
		聚苯乙烯	聚丙烯	聚甲基丙 烯酸甲酯	KYNAR [®] Flex 2800 PVDF 共聚物
模制得而未经涂覆	NA	0.10	0.08	0.15	0.15
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] L-31	6-7	0.0-0.2	0.04	0.02-0.04	0.04-0.12
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] L-62	5-6	ND	0.04	0.02	0.02-0.08
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] L-64	15	ND	0.08	0.02	0.02-0.08
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] L-121	1	0.00	0.00	0.00	0.00
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] L-122	2	0.00	0.00	0.00	0.00
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] P-123	7	0.02-0.04	0.03	0.01	0.02-0.08
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic [®] F-127	18	0.07-0.10	0.04-0.08	0.02-0.08	0.06
山梨醇单油酸酯	4.3	0.00	0.00	ND	ND

5

表 11

接触 编号	接触总时间 (分钟)	蛋白质重量与 涂层重量的比	550 nm 处 的吸光度	未经涂覆聚苯乙烯对照的 吸光度
1	30	80	0.0	0.10
2	60	160	0.0	0.10
3	90	240	0.0	0.10
4	120	320	0.0	0.10
5	150	400	0.0	0.10
6	180	480	0.0	0.10

表

12

分子	HLB 数	LD ₅₀ 克/千克 (大鼠)
PEO(4)月桂基醚	9.7	>5
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	>38
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	>39
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	>31
PEO(2)十八烷基醚	4.9	>25
山梨醇单油酸酯	4.3	>39
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	>15
山梨醇三硬脂酸酯	2.1	>15
矿物油	NA	22
NaCl	NA	4
As ₂ O ₃	NA	0.02

表 13

共混的分子	基体聚合物	HLB 数	结合蛋白质 吸光度 (550 nm)	
			BSA	FBS
无 (对照)	聚丙烯	N/A	0.092	0.140
PEO(2)油烯基醚	聚丙烯	4.9	0.000	0.000
PEO(2)十八烷基醚	聚丙烯	4.9	0.000	0.000
山梨醇单硬脂酸酯	聚丙烯	4.7	0.000	0.000
山梨醇单油酸酯	聚丙烯	4.3	0.000	0.000
山梨醇三油酸酯	聚丙烯	1.8	0.000	0.000
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® L-121	聚丙烯	1.0	0.029	0.144
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	聚丙烯	9.6	0.016	0.057
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	聚丙烯	13.3	0.060	0.056
PEO(20)山梨醇单月桂酸酯	聚丙烯	16.7	0.153	0.270
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® F-127	聚丙烯	18	0.202	0.250
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® F-68	聚丙烯	>24	0.094	0.358
无 (对照)	乙烯-乙酸乙烯酯	N/A	0.305	0.532
PEO(2)油烯基醚	乙烯-乙酸乙烯酯	4.9	0.000	0.000
1% PEO(2)油烯基醚	乙烯-乙酸乙烯酯	4.9	0.000	0.291
山梨醇单油酸酯	乙烯-乙酸乙烯酯	4.3	0.000	0.000
1% 山梨醇单油酸酯	乙烯-乙酸乙烯酯	4.3	0.147	0.371
PEO/PPO 嵌段共聚物 Pluronic® L-121	乙烯-乙酸乙烯酯	1	0.000	N/A
无	聚苯乙烯(对照)	N/A	0.215	0.138
PEO(2)油烯基醚	聚苯乙烯	4.9	0.007	0.015
PEO(2)十八烷基醚	聚苯乙烯	4.9	0.008	0.009
山梨醇三硬脂酸酯	聚苯乙烯	2.1	0.005	0.008
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic® F-127	聚苯乙烯	1.8	0.250	N/A
PEO/PPO 嵌段共聚物, Pluronic® F-68	聚苯乙烯	>24	0.094	0.358

表 14

分子	HLB 数	商品名
乙二醇单硬脂酸酯	3.0	Emerest [®] 2350
单油酸甘油酯	3.4	Emerest [®] 2421
甘油单硬脂酸酯	3.4	Emerest [®] 2400
PEO/PPO 嵌段共聚物	6-7	Pluronic [®] L-31
PEO/PPO 嵌段共聚物	4	Pluronic [®] L-61
PEO/PPO 嵌段共聚物	5	Pluronic [®] L-62
PEO/PPO 嵌段共聚物	15	Pluronic [®] L-64
PEO/PPO 嵌段共聚物	1	Pluronic [®] L-121
PEO/PPO 嵌段共聚物	2	Pluronic [®] L-122
PEO/PPO 嵌段共聚物	7	Pluronic [®] P-123
PEO/PPO 嵌段共聚物	18	Pluronic [®] F-127
PEO(2)十六烷基醚	5.3	Brij [®] 52
PEO(200)二油酸酯	5.0	Maypeg [®] 200 DO
PEO(400)二油酸酯	8.5	Maypeg [®] 400 DO
PEO(400)二硬脂酸酯	8.8	Maypeg [®] 400 DS
PEO(600)二硬脂酸酯	10.6	Maypeg [®] 400 DS
PEO(4)月桂基醚	9.7	Brij [®] 30
PEO(200)单油酸酯	8.3	Emerest [®] 2624
PEO(2)油烯基醚 (oleyl ether)	4.9	Brij [®] 93
PEO(4)山梨醇单月桂酸酯	13.3	Tween [®] 21
PEO(20)山梨醇单月桂酸酯	16.6	Tween [®] 20
PEO(4)山梨醇单硬脂酸酯	9.6	Tween [®] 61
PEO(20)山梨醇三硬脂酸酯	10.5	Tween [®] 65
PEO(8)硬脂酸酯	11.1	Myrj [®] 45
PEO(2)十八烷基醚(stearyl ether)	4.9	Brij [®] 72
聚环氧丙烷 (4,000 M.W.)	<0.5	购自 Aldrich, Milwaukee, WI
山梨醇单月桂酸酯	8.6	SPAN [®] 20
山梨醇单油酸酯	4.3	SPAN [®] 80
山梨醇单棕榈酸酯	6.7	SPAN [®] 40
山梨醇单硬脂酸酯	4.7	SPAN [®] 60
山梨醇三油酸酯	1.8	SPAN [®] 85
山梨醇三硬脂酸酯	2.1	SPAN [®] 65

- Brij[®]是 ICI Americas, Wilmington, DE 的注册商标.
- Emerest[®]是 Henkel Corp., Cincinnati, OH 的注册商标.
- Maypeg[®]是 PPG Industries, Gurnee, IL 的注册商标.
- Myrj[®]是 ICI Americas, Wilmington, DE 的注册商标.
- 5 Pluronic[®]是 BASF, Parsippan, NJ 的注册商标.
- Span[®]是 ICI Americas, Wilmington, DE 的注册商标.
- Tween[®]是 ICI Americas, Wilmington, DE 的注册商标.