



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103201629 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201180049390. 6

(22) 申请日 2011. 10. 13

(30) 优先权数据

1017251. 8 2010. 10. 13 GB

1104081. 3 2011. 03. 10 GB

61/392, 529 2010. 10. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 04. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/067894 2011. 10. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/049251 EN 2012. 04. 19

(73) 专利权人 药品诊断学公司

地址 比利时津海姆

(72) 发明人 安娜·范霍纳克尔 麦奇·罗斯坎普

帕特里克·恩格比恩尼

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 李新红

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6833275 B1, 2004. 12. 21, 权利要求 6-8, 说明书第 3-8 栏, 实施例 1-4.

US 5585278 A, 1996. 12. 17, 权利要求 1-5、9-19、25, 说明书第 3 栏第 26 行至第 4 栏第 6 行, 第 5 栏第 36-65 行, 实施例 1-6.

WO 2007/064297 A1, 2007. 06. 07, 全文.

WO 01/88540 A1, 2001. 11. 22, 全文.

US 5945293 A, 1999. 08. 31, 全文.

审查员 许珊萍

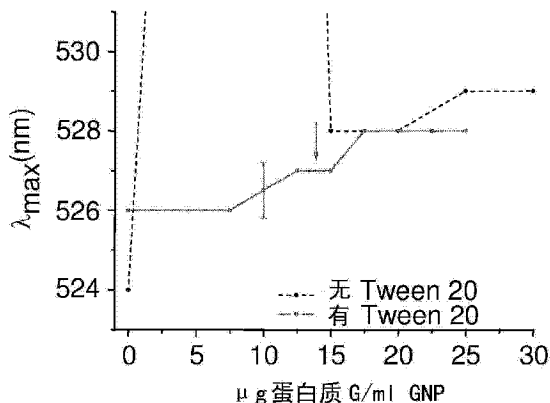
权利要求书1页 说明书13页 附图10页

(54) 发明名称

用于包覆纳米粒子的方法

(57) 摘要

本发明涉及用有限量的结合配偶体包覆纳米粒子的方法, 以及可通过所公开的方法获得的纳米粒子。尤其是, 当想要仅以有限量的蛋白质进行包覆时, 本发明是令人感兴趣的。



1. 一种用于在采用结合剂包覆金属纳米粒子的过程中最小化结合剂的量的方法, 其中, 所述方法包括下列步骤:

- 确定在存在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下获得稳定的纳米粒子所需的结合剂的最小量; 和

- 将包含所述纳米粒子的溶液与包含所述最小量的结合剂的溶液混合, 其中, 包含所述纳米粒子的所述溶液和 / 或包含所述结合剂的所述溶液包含非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 所述方法还是用单层的所述结合剂包覆纳米粒子的方法。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述非离子型洗涤剂选自由以下各项组成的组: 聚山梨醇酯、辛基酚乙氧基化物、葡糖胺、脂肪醇乙氧基加合物、Brij®、Nonidet®、Pluronic®、Genapol®和Igepal®。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述阳离子型洗涤剂选自溴化十六烷基三甲基铵 (CTAB) 或溴化三甲基 (十四烷基) 铵 (TTAB)。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述两性离子型洗涤剂选自由以下各项组成的组: 酰胺磺基甜菜碱、烷基甜菜碱和氨合丙磺酸盐。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂浓度范围在 0.0001 至 1 体积 / 体积%之间。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述纳米粒子包括选自由以下各项组成的组中的过渡金属: Au、Ag、Cu、Ta、Pt、Pd 和 Rh。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述过渡金属为金、银或铜。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 所述方法还包括: 活化在所述纳米粒子的表面上的官能团, 以确保所述结合剂在所述表面上的共价结合。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述结合剂是蛋白质。

11. 非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂用于在采用结合剂包覆金属纳米粒子的过程中最小化结合剂的量的用途, 所述用途包括将包含所述纳米粒子的溶液与包含所述结合剂的溶液混合的步骤, 其中, 包含所述纳米粒子的所述溶液和 / 或包含所述结合剂的所述溶液包含所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。

12. 根据权利要求 11 所述的用途, 所述用途还包括确定在存在所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下获得稳定的纳米粒子所需的结合剂的最小量的步骤。

13. 根据权利要求 12 所述的用途, 所述用途用于采用单层的所述结合剂最小化包覆金属纳米粒子的过程中的结合剂的量。

用于包覆纳米粒子的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及一种用结合配偶体包覆纳米粒子的方法,由此需要减少的量的结合配偶体。在具体实施方案中,提供了用单层结合配偶体如蛋白质包覆纳米粒子的方法。具体是,本发明涉及一种用单层蛋白质包覆纳米粒子的方法,其中仅需少量的蛋白质。

[0002] 发明背景

[0003] 现今,纳米粒子广泛地用于在医学和生物医学两大科学领域中的许多用途中,如,用于药物递送、用于治疗 and 用于诊断。对于这些用途中的许多而言,纳米粒子是被蛋白质包覆的。被蛋白质如对癌细胞的抗体所包覆的纳米粒子可以用于例如对体内的癌细胞定位。类似地,对于在生物体外的分析物检测,如抗体等之类的探针被结合在纳米粒子上,由此,检测被分析物与在纳米粒子上的抗体之间的结合。

[0004] 更特别的是,被蛋白质包覆的金属纳米粒子可以通过它们至少在可见光光谱中的吸收的改变,来转换结合情况。这种局域表面等离子体共振(LSPR)现象能够筛检生物分子的相互作用。因此,被蛋白质包覆的金属纳米粒子可用于探测抗体-配体相互作用、受体-配体相互作用、酶-配体结合和抗体-抗原缔合解离动力学。

[0005] 在本领域中,已经描述了被结合配偶体如蛋白质所包覆的纳米粒子,以及用于包覆纳米粒子的方法。例如,US 2010/0029902 描述了一种用于包覆纳米粒子的方法,所述方法包括将纳米粒子和一种以上蛋白质与分散溶液混合,其中,为了控制和防止纳米粒子的聚集,蛋白质被吸附在纳米粒子的整个表面。

[0006] 现有技术方法的缺点是需要大量结合配偶体,以完全包覆纳米粒子。通常,仅可得到少量受关注的结合配偶体。

[0007] 此外,因为这些现有技术方法中的一些导致纳米粒子被多层结合配偶体所包覆,所以被结合的蛋白质与其他化合物的相互作用发生在离纳米粒子表面更远的距离处,这影响探测方法中的信号强度。

[0008] 在本领域中,需要提供一种用结合配偶体如蛋白质包覆纳米粒子的方法,其中,仅需少量结合配偶体,并且对于特别的实施方案,其中可以达到用单层结合配偶体进行包覆。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的发明人已经找到了用于包覆纳米粒子的方法,其包括使用有限量的结合配偶体。此外,发明人已经找到了允许用单层结合配偶体对感兴趣的地方进行包覆的方法。因此,本发明的方法克服了一个或多个上述的现有技术的问题。

[0011] 在第一方面,本发明涉及用结合配偶体包覆纳米粒子的方法,其中,所述方法包括使结合配偶体集中在纳米粒子表面。在特别的实施方案中,该方法包括确保在纳米粒子附近的结合剂的集中。在本发明的特别的实施方案中,该方法包括确保在纳米粒子和结合剂之间的静电相互作用。

[0012] 在特别的实施方案中,本发明涉及用结合配偶体包覆纳米粒子的方法,其中该方法包括:在使纳米粒子与所述结合配偶体的溶液接触之前或之时,使所述纳米粒子与非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂接触。

[0013] 发明人已经发现,本文所述的方法能够用有限量的结合配偶体进行纳米粒子的包覆。此外,在特别的实施方案中,该方法可以用于使用少量结合剂获得单一的结合剂如蛋白质的层。因此,这些方法是有利的,因为通常例如仅可得到少量受关注的蛋白质。此外,在特别的实施方案中,本发明的方法允许控制纳米粒子上蛋白质层的厚度。例如,在特别的实施方案中,该方法能够制备仅被一层在纳米粒子表面上的蛋白质所包覆的稳定的纳米粒子。这在例如当意图用另一种分子进一步包覆纳米粒子时,是特别受关注的,因为该分子至纳米粒子表面的距离减小。此外,如果要研究被包覆的蛋白质和另一种化合物之间的相互作用,该相互作用与纳米粒子表面之间的距离减小,从而改善了该相互作用的光学探测。

[0014] 此外,在特别的实施方案中,本发明的方法在当需要在高 pH 值进行包覆时是有利的。在不存在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下,调节至高 pH 值可能导致纳米粒子的凝集。在当结合剂的溶液需要缓冲时,上述方法的特别的实施方案也可能是有利的。在不存在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下,即使是在溶液中很小的盐浓度也可能导致纳米粒子的凝集,更尤其是在结合剂是蛋白质的情况下。如果在包覆之前(和任选地在包覆期间),纳米粒子与非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂接触,则不发生凝集,即使是在中等盐浓度的存在下。本发明的方法的特别的实施方案还有另一个优点是,可以确保均匀的包覆,即使在蛋白质是少量的蛋白质或小肽的情况下。此外,当结合剂是在包覆前聚集的蛋白质时,上述方法的特别的实施方案也可以是有利的。在进行包覆前,将蛋白质与非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂一起保温,将有助于将蛋白质稳定在非聚集形式,从而改善包覆结果。

[0015] 在特别的实施方案中,本发明涉及包括以下步骤的方法:将包含纳米粒子的溶液与包含结合剂的溶液混合,其中,所述包含纳米粒子的溶液和 / 或所述包含结合剂的溶液含有所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。本发明的方法还包括使包含纳米粒子的溶液与包含结合剂的溶液彼此接触,以确保所述结合剂和所述纳米粒子之间的相互作用。在进一步的特别实施方案中,根据本发明的方法还包括确保使所述纳米粒子与所述结合剂结合的步骤。

[0016] 在特别的实施方案中,使包含纳米粒子的溶液与包含结合剂的溶液接触的步骤确保了所述纳米粒子与所述结合剂的结合。在特别的实施方案中,结合剂是蛋白质,且所述方法包括:在含有所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的包含纳米粒子的溶液和 / 或包含蛋白质的溶液的存在下,使所述纳米粒子与所述蛋白质接触,从而允许蛋白质在所述纳米粒子表面上形成单层。

[0017] 在特别的实施方案中,本发明提供了这样的方法:其还包括,在包覆所述纳米粒子之前,确定用于在所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的存在下获得稳定纳米粒子所需的蛋白质的最小量的步骤。

[0018] 在特别的实施方案中,本发明涉及如上所述的方法,其中,所述非离子型洗涤剂选自由以下各项组成的组:聚山梨醇酯、辛基酚乙氧基化物、葡糖胺、脂肪醇乙氧基加合物、**Brij®**、**Nonidet®**、**Pluronic®**、**Genapol®**和**Igepal®**。

[0019] 在特别的实施方案中,本发明提供如上所述的方法,其中,所述阳离子型洗涤剂选自溴化十六烷基三甲基铵 (CTAB) 或溴化三甲基(十四烷基)铵 (TTAB)。

[0020] 在特别的实施方案中,本发明涉及如上所述的方法,其中,所述两性离子型洗涤剂

选自以下各项组成的组：酰胺磺基甜菜碱、烷基甜菜碱和氨合丙磺酸盐。

[0021] 在特别的实施方案中，本发明提供如上所述的方法，其中，所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂浓度范围为在 0.0001 至 1 体积 / 体积% 之间。

[0022] 在特别的实施方案中，本发明涉及如上所述的方法，其中，在包覆中蛋白质的用量比用于获得稳定的纳米粒子所需的蛋白质的最小量高。

[0023] 在特别的实施方案中，本发明提供如上所述的方法，其中，所述纳米粒子包括导电聚合物胶体、贵金属胶体、金属 / 导电聚合物复合胶体、二氧化硅或乳胶。

[0024] 在特别的实施方案中，本发明涉及如上所述的方法，其中，所述纳米粒子包含选自以下各项组成的组的过渡金属：Au、Ag、Cu、Ta、Pt、Pd 和 Rh，且优选其中所述过渡金属为金、银或铜。

[0025] 在特别的实施方案中，本发明涉及包含可通过一种以上的如上所述的方法获得的纳米粒子的纳米粒子组合物。

[0026] 在特别的实施方案中，本发明涉及套件，其包括纳米粒子和用于用如上所述的任何方法包覆所述纳米粒子的说明书。

[0027] 在特别的实施方案中，本发明提供如上所述的套件，其还包括非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂或者含有非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的溶液。

[0028] 在特别的实施方案中，本发明提供了用于对化合物与结合在纳米粒子上的蛋白质的相互作用进行局域表面等离子体共振探测的方法，该方法包括：用结合剂，例如但不限于蛋白质，并用如上所述的任何方法，包覆所述纳米粒子。

[0029] 附图简述

[0030] 现在将描述本发明，其中参考附图，所述附图仅以实例的方式被提供，而不应认为限制本发明的范围。

[0031] 图 1 和 2 演示了根据本发明的一个特别的实施方案，非离子型洗涤剂 Tween20 对于使金纳米粒子 (GNP) 稳定所需的蛋白质 G 的量的影响。

[0032] 图 1 说明了在不存在 Tween20 的情况下，蛋白质 G 的浓度滴定的结果。箭头表明了使 GNP 稳定的蛋白质 G 的最小量。图 1A 表示 λ_{\max} 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 1B 表示 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 1C 表示 $OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。

[0033] 图 2 说明了在 Tween20 存在的情况下，蛋白质 G 的浓度滴定的结果。箭头表明了使 GNP 稳定的蛋白质 G 的最小量。图 2A 表示 λ_{\max} 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 2B 表示 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 2C 表示 $OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 2D 表示 GNP 的流体力学直径与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。

[0034] 图 3 和 4 演示了根据本发明的一个特别的实施方案，Tween20 对于稳定金纳米粒子 (GNP) 所需的链霉抗生物素蛋白的量的影响。

[0035] 图 3 说明了在不存在 Tween20 的情况下，链霉抗生物素蛋白的浓度滴定的结果。箭头表明了使 GNP 稳定的链霉抗生物素蛋白的最小量。图 3A 表示 λ_{\max} 与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的量的关系图。图 3B 表示 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的关系图。图 3C 表示 $OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的关系图。

[0036] 图 4 显示了在 Tween20 存在的情况下,链霉抗生物素蛋白的浓度滴定的结果。箭头表明了 Tween20 存在的情况下,使 GNP 稳定的链霉抗生物素蛋白的最小量。图 4A 表示 λ_{\max} 与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的量的关系图。图 4B 表示 OD(600)/OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的量的关系图。图 4C 表示 OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的量的关系图。图 4D 表示 GNP 的流体力学直径与每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的量的关系图。

[0037] 图 5 显示了根据本发明的一个特别的实施方案,用蛋白质 G 对被 Tween20 包裹的 GNP 浓度滴定的结果。箭头表明了使被 Tween20 包裹的 GNP 稳定的蛋白质 G 的最小量。图 5A 表示 λ_{\max} 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 5B 表示 OD(600)/OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。图 5C 表示 OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的蛋白质 G 的量的关系图。

[0038] 图 6 显示了根据本发明的一个特别的实施方案,用蛋白质 A 对被 Tween20 包裹的 GNP 浓度滴定的结果。箭头表明了使被 Tween20 包裹的 GNP 稳定的蛋白质 A 的最小量。图 6A 表示 λ_{\max} 与每 ml GNP 的蛋白质 A 的量的关系图。图 6B 表示 OD(600)/OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的蛋白质 A 的量的关系图。图 6C 表示 OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的蛋白质 A 的量的关系图。

[0039] 发明详述

[0040] 在以下段落中,更详细地描述本发明的不同方面。如此描述的各方面可以与任何其他一个或多个方面相结合,除非明确相反地指出。尤其是,所述任何优选或有利的特征可以与其他一个或多个优选或有利的特征相结合。

[0041] 在本发明的上下文中,按照以下定义解释所用的术语,除非在上下文中另作规定。

[0042] 除非在上下文另作规定,如本文所使用的单数形式“一个 (a)”、“一个 (an)”和“这个 (the)”包括单数的和复数的所指物这两种情况。

[0043] 本文所使用的术语“包含 (comprising)”、“包含 (comprises)”和“包含 (comprised of)”是“包括 (including)”、“包括 (includes)”、“含有 (containing)”、“含有 (contains)”的同义词,并且是包括在内的或开放式的,并且不排除额外的、未被提及的成员、要素或方法步骤。当实施方案被称为“包含”特别的特征、要素或步骤时,它意在具体地包括由列举的特征、要素或步骤构成的实施方案。

[0044] 通过端点提及的数字范围包括被包含在各自范围内的所有数字和分数,以及被提及的端点。

[0045] 当涉及可测量值如参数、量、持续时间等时,本文所使用的术语“约”意在包括具体值的或从具体值出发的 +/-10% 以下,优选 +/-5% 以下,更优选 +/-1% 以下且再更优选 +/-0.1% 以下的变动,只要这种变动适合于进行所公开的发明即可。应当理解,修饰语“约”所指的值本身也是具体的并且优选被公布的值。

[0046] 本发明涉及用结合剂包裹纳米粒子的方法,其中,所需要的结合剂的量减少。更具体地,本发明提供了方法,其中,在包裹步骤之前或期间,确保纳米粒子与结合剂之间的相互作用。在特别的实施方案中,该相互作用确保有效的对纳米粒子的包裹。在进一步的实施方案中,该方法可以包括:在纳米粒子表面集中结合剂之后,将结合剂共价结合至纳米粒子。

[0047] 本文中所使用的术语结合剂是指受关注的分子,这种分子将包覆到纳米粒子上,并且其本身可以确保结合至其他实体。典型的结合配偶体是特定的已知或设想的结合对或结合偶,如抗原-抗体、受体-配体、酶-配体、糖-凝集素、受体-受体结合剂、蛋白质-寡核苷酸、等等。在特别的实施方案中,结合配偶体是蛋白质或肽。在进一步的特别的实施方案中,结合配偶体包含至少 5 个氨基酸,更具体地,至少 10 个,至少 20 个,至少 50 个氨基酸或更多个。

[0048] 一方面,本发明提供了用于包覆纳米粒子的方法,其中仅需要少量蛋白质,并且涉及通过这些方法获得的单覆层的纳米粒子。

[0049] 根据这一方面,本发明涉及用蛋白质包覆纳米粒子的方法,其中,所述方法包括:在使纳米粒子与所述蛋白质的溶液接触之前或之时,使所述纳米粒子与非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂接触。

[0050] 本文所使用的术语“非离子型洗涤剂”是指不含有任何离子基团的洗涤剂。在本发明的方法的实施方案中,非离子型洗涤剂选自由以下各项组成的组:聚山梨醇酯、辛基酚乙氧基化物、葡糖胺、脂肪醇乙氧基加合物、Brij®、Nonidet®、Pluronic®、Genapol®和Igepal®。在特别的实施方案中,聚山梨醇酯选自由以下各项组成的组:聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 65、聚山梨醇酯 80 和聚山梨醇酯 85。在特别的实施方案中,辛基酚乙氧基化物选自由以下各项组成的组:TRITON® X-15、TRITON® X-35、TRITON® X-45、TRITON® X-100、TRITON® X-102、TRITON® X-114、TRITON X-165(70%)、TRITON® X-305(70%)、TRITON® X-405(70%)和TRITON® X-705(70%)。在特别的实施方案中,葡糖胺选自由以下各项组成的组:N-辛酰基-N-甲基葡糖胺(MEGA-8)、N-壬酰基-N-甲基葡糖胺(MEGA-9)和N-癸酰基-N-甲基葡糖胺(MEGA-10)。

[0051] 本文所使用的术语“阳离子型洗涤剂”是指具有正离子电荷的洗涤剂。在本发明的方法的实施方案中,阳离子型洗涤剂选自溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)或溴化三甲基(十四烷基)铵(TTAB)。

[0052] 本文所使用的术语“两性离子型洗涤剂”是指具有离子基团但不具有净电荷的洗涤剂。在本发明的方法的实施方案中,两性离子型洗涤剂选自由以下各项组成的组:酰胺磺基甜菜碱、烷基甜菜碱和氨合丙磺酸盐。在优选的实施方案中,两性离子型洗涤剂选自由以下各项组成的组:酰胺磺基甜菜碱-14、酰胺磺基甜菜碱-16、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐(CHAPS)、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸盐(CHAPS0)、3-(4-庚基)苯基-3-羟基丙基)二甲基氨基丙磺酸盐(C7Bz0)、EMPIGEN® BB、3-(N,N-二甲基辛基氨基)丙磺酸内盐、3-(癸基二甲基氨基)丙磺酸内盐、3-(十二烷基二甲基氨基)丙磺酸内盐、3-(N,N-二甲基肉豆蔻基氨基)丙磺酸内盐、3-(N,N-二甲基棕榈基氨基)丙磺酸内盐、3-(N,N-二甲基十八烷基氨基)丙磺酸内盐。

[0053] 技术人员将理解,本文提到使用非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂包括使用不同的非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂的组合。

[0054] 在本发明方法的特别的实施方案中,洗涤剂是非离子型洗涤剂。

[0055] 本发明的方法的特征在于,在被受关注的蛋白质进行包覆之前或期间,纳米粒子与非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂相接触。当然,在现有技术中,当处理被包

覆的纳米粒子时,非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂已被用于缓冲液中。然而,根据本发明的方法,在包覆过程之前或之时,使纳米粒子与非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂接触,以改善包覆过程。

[0056] 所用的非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的浓度不是关键性的,但典型在 0.0001 至 1 体积 / 体积%之间的范围内。尤其是,可以使用浓度范围在 0.005 至 0.5 体积 / 体积%之间的非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。优选地,可以使用浓度范围在 0.001 至 0.1 体积 / 体积%之间的非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。更优选,非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的浓度可以是 0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 或 0.1 体积 / 体积%,或者在任意两个前述值之间的范围内的值。

[0057] 在特别的实施方案中,结合剂是蛋白质,且本发明提供了允许用单层蛋白质包覆纳米粒子的方法,并提供了可以通过这些方法获得的纳米粒子。尤其是,在这些实施方案中,本发明提供了用于用单层蛋白质包覆纳米粒子的方法。在这些实施方案中,方法包括将包含纳米粒子的溶液与包含蛋白质的溶液混合的步骤,从而允许蛋白质在所述纳米粒子表面上形成单层,其中所述包含纳米粒子的溶液和 / 或所述包含蛋白质的溶液含有所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。

[0058] 在本发明的实施方案中,可想到的是,在使纳米粒子与蛋白质接触之前或同时地,可以使纳米粒子与非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂相接触。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一些方法,其中包含蛋白质的溶液包含非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。这在特别的实施方案中可能具有稳定蛋白质的优点。随后,使纳米粒子与包含蛋白质和非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的溶液或悬浮液接触。

[0059] 在另一些实施方案中,本发明的方法包括:制备包含纳米粒子的溶液并向其中加入非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂。在这些实施方案中,在使纳米粒子与蛋白质溶液接触之前,使它们与非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂接触。因而所述方法包括将包含蛋白质的溶液和包含纳米粒子的溶液与非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的溶液混合。

[0060] 可想到的是,本发明方法的这些实施方案一般地改善蛋白质对纳米粒子的包覆。对于本发明的这一方面而言,蛋白质的性质不是关键型的,并且因此其可以为任何尺寸,且包括但不限于:抗体或其片段、抗原、酶或底物、受体或配体等。因此术语蛋白质包括肽。

[0061] 发明人已经发现,在本发明的这一方面,对于用对疏水性相互作用敏感的蛋白质和 / 或在低离子强度下易于聚集的蛋白质来包覆纳米粒子而言,所述方法是特别受关注的。更具体地,对于在低于 10mM 的盐浓度时对疏水性相互作用敏感的蛋白质的包覆而言,或者对于不支持这样的低离子强度且必须在高离子强度接合以保持它们的活性和 / 或构造的蛋白质的包覆而言,本发明的方法是有利的。对疏水性相互作用敏感的蛋白质典型地包含与水和其他极性基团相互排斥的非极性基团,导致非极性基团彼此的净吸引。已知,包含在 ala、val、leu 和 ile 上的烷烷基的和 / 或在 phe 和 tyr 上的苯(芳族)环的蛋白质通常对疏水性相互作用敏感。这种蛋白质的实例是与细胞膜有关的蛋白质以及包含转运功能的蛋白质。本文用链霉抗生物素蛋白、蛋白质 G 和蛋白质 A 来说明本发明。因此,在特别的实施方案中,用于本发明的方法中的蛋白质是在低盐浓度对疏水性相互作用敏感的蛋白

质。因此,所述用蛋白质包覆纳米粒子的方法的特别的实施方案包括在较高的盐浓度存在的情况下的包覆步骤。尽管术语较高的盐浓度通常取决于受关注的蛋白质,但它通常包括大于 10mM 的盐浓度,更特别地,大于 50mM,最特别地,大于 100mM。在进一步的特别的实施方案中,本发明的方法包括具有 9 以上、优选 10 以上的 pI 的蛋白质的包覆。术语“pI”在此是指蛋白质的等电位点,即使得蛋白质或其表面不带有净电荷时的 pH。

[0062] 在特别的实施方案中,本发明的方法包括:在将包含纳米粒子的溶液与包含蛋白质的溶液混合之前,确定蛋白质的疏水性的步骤。可以通过计算作为蛋白质的氨基酸序列的函数的亲水性图,或者通过疏水相互作用色谱法或者反相色谱法,来确定蛋白质的疏水性。

[0063] 在备选的实施方案中,本发明的方法包括:在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂存在的情况下,使结合剂与纳米粒子接触,以确保在纳米粒子表面处的结合剂的集中的步骤,以及确保结合剂向纳米粒子表面结合的步骤。在进一步特别的实施方案中,确保结合剂向纳米粒子表面结合的步骤是通过以下方式进行的:使纳米粒子上的官能团(例如羧基)活化,从而使它们对结合配偶体(例如胺)成为反应性的。在特别的实施方案中,配体是含有胺的分子如蛋白质或肽,并且通过使纳米粒子上的羧基活化来确保向纳米粒子的结合。

[0064] 可想到的是,当结合剂是蛋白质时,本发明的方法是特别受关注的。这将在本文的上下文中说明。

[0065] 可想到的是,当需要在高 pH 值情况下进行蛋白质的包覆时,本发明的方法的特别实施方案是受关注的。在不存在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下,对高 pH 值的调节可能导致纳米粒子的凝集。根据特别的实施方案,本发明的方法包括在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂中,于高 pH 情况下包覆蛋白质,并且在包覆之后调节 pH。

[0066] 还可想到的是,当蛋白质溶液需要被缓冲但甚至在低盐浓度也对凝集敏感时,本发明方法的实施方案是特别受关注的。根据特别的实施方案,本发明的方法包括:在存在中等盐浓度以及非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下,使用纳米粒子与蛋白质溶液接触。

[0067] 为了确保在本发明的方法中最佳的包覆,使纳米粒子与特定量的所关注的蛋白质相接触,可能是受关注的。如上文指出的,本发明的方法特别有利之处在于,它们允许用最少量的蛋白质进行包覆。无论如何,在特别的实施方案中,可想到的是,为了包覆纳米粒子表面所需的蛋白质量将被确定。

[0068] 因此,在特别的实施方案中,本发明提供了用于包覆纳米粒子的方法,其中,所述方法还包括:在包覆所述纳米粒子之前,在存在所述非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下,对为了获得稳定的纳米粒子所需的蛋白质的最小量进行确定的步骤。对用于包覆纳米粒子表面的最佳的蛋白质的量的确定步骤通常通过浓度滴定进行。将纳米粒子与不同量的蛋白质混合,并记录吸收光谱。例如,在特别的实施方案中,纳米粒子与典型在从每 ml 纳米粒子为 0 至 1000 μ g 蛋白质的范围内渐增量的蛋白质混合。

[0069] 在特别的实施方案中,确定浓度滴定的步骤包括:在典型 10min 的保温时间之后添加盐(例如 NaCl, 1M),并且在另一个 10min 之后,记录这些样品在 350 至 900nm 之间的吸

收光谱。可以使用 λ_{\max} 、 $OD(\lambda_{\max})$ 和 / 或比率 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml 纳米粒子的蛋白质的量的关系图, 来确定使纳米粒子稳定所需的蛋白质的最小量。在所有的图均显示与空白对照的最高相似性处的最低的蛋白质量就是为了使粒子稳定所需的蛋白质的量。在备选的实施方法中, 步骤浓度滴定包括直接以不同的浓度向纳米粒子添加蛋白质 (不添加盐), 由此在例如 30min 之后读取光谱。

[0070] 在特别的实施方法中, 本发明的方法可以包括: 确定用于包覆纳米粒子的最佳的蛋白质量的步骤。通常, 用于包覆纳米粒子的最佳的蛋白质的量 (通常以蛋白质浓度表示, 例如 $\mu\text{g/ml}$) 取决于蛋白质的结构和分子量。对于较大的蛋白质, 蛋白质对粒子的相对重量将降低。在特别的实施方法中, 使用的蛋白质的量高于所述的为获得稳定的纳米粒子所需的蛋白质的最小量。在进一步的实施方法中, 使用的蛋白质的量高于可吸附到纳米粒子的全部表面的蛋白质的量。

[0071] 本发明的方法还允许通过不连续量的受关注的蛋白质 (即意图用于包覆的和用于其他用途的蛋白质, 所述其他用途例如用于与另一种化合物的相互作用, 见下文) 来控制包覆。尤其是, 这可以通过实施本发明的方法并使用组合物而实现, 所述组合物是仅包含受关注的蛋白质的组合物, 或是所述蛋白质与对于意图目的 (在被包覆的纳米粒子的其他用途中) 而言非反应性的蛋白质组合而成的组合物。

[0072] 在本申请中, 提到“蛋白质”或“多种蛋白质”通常意在指示受关注的蛋白质。然而, 在特别的实施方法中, 这是指受关注的蛋白质与非反应性的蛋白质的组合, 更具体地, 以明确的比例的组合。在这些实施方法中, 可以进一步降低并控制包覆在纳米粒子上的受关注的蛋白质的量。

[0073] 在特别的实施方法中, 本发明的方法还可以包括: 对蛋白质向纳米粒子吸附和 / 或结合进行控制的步骤。这可以通过不同的探测方法进行, 包括但不限于光学探测法。在特别的实施方法中, 通过探测局域表面等离子体共振 (LSPR) 波长中的位移来检查蛋白质向纳米粒子的结合。如本文所使用的术语“局域表面等离子体共振”或“LSPR”涉及探测由贵金属制成的纳米粒子的表面上的光学变化的方法。当纳米粒子的金属表面被电磁辐射激发时, 它们表现出它们的传导电子的集体振动, 被称为局域表面等离子体 (LSP)。当以这种方式激发时, 纳米粒子起到纳米量级的天线的的作用, 将电磁场集中到邻近纳米粒子的非常小的体积中。以此方式, 可以获得格外巨大的电磁强度的增强。在 LSPR 中使用的纳米粒子使共振振动产生。术语“吸光度”是指样品吸收光的程度。在 LSPR 中, 可以测量吸光度的变化, 条件是通过检测显示出在折射率方面有变化。对于 LSPR 的消光带, 可以探测最大吸光度的强度和波长。

[0074] 本发明的方法通常可用于包覆纳米粒子, 其可以为任何适当的材料或形状, 例如但不限于纳米颗粒、纳米珠、纳米球、纳米棱锥、纳米线、纳米棱柱、纳米立方体、纳米棒、网丝等。本领域技术人员将理解, 在本发明中也可以使用其他纳米结构。在特别的实施方法中, 纳米粒子是圆的纳米结构。在进一步特别的实施方法中, 纳米粒子的直径范围为 1 至 1000nm 之间, 尤其是在 25 至 750nm 之间, 更特别是, 在 50 至 500nm 之间。纳米粒子的直径可以为例如 50、75、100、150、200、250、300、350、400、450 或 500nm, 或者在任意两个前述值之间的范围内的值。在特别的实施方法中, 纳米粒子是纳米棒。在进一步的实施方法中, 纳米棒的纵横比 (即长度除以宽度) 的范围在 1.1 至 10 之间, 更具体地在 1.5 至 5 之间。在

某些实施方案中,纳米棒具有在 2 至 10nm 之间的宽度或直径。在特别的实施方案中,纳米棒具有在 4 至 45nm 之间的长度。

[0075] 可以用任何类型的能够通过静电相互作用而被包覆的胶体粒子来实施本发明的方法。在特别的实施方案中,在本发明的上下文中使用的纳米粒子包括金属、导电聚合物胶体、贵金属胶体、金属 / 导电聚合物复合胶体、二氧化硅或乳胶。

[0076] 如本文所使用的术语“胶体”是指悬浮在液体介质中的微观的纳米粒子的流体组合物。术语“导电聚合物”是指导电的聚合物材料。在一个实施方案中,导电聚合物是有机聚合物,或者是 π -共轭的有机聚合物。例如,导电聚合物可以是:聚吡咯类,如聚吡咯、聚(N-取代的吡咯)、聚(3-取代的吡咯)和聚(3,4-二取代的吡咯);聚噻吩类如聚噻吩、聚(3-取代的噻吩)、聚(3,4-二取代的噻吩)和聚苯并噻吩;聚异硫茛类,如聚异硫茛;聚亚噻吩基亚乙烯基类如聚亚噻吩基亚乙烯基;聚(对亚苯基亚乙烯基)类,如聚(对亚苯基亚乙烯基);聚苯胺类,如聚苯胺、聚(N-取代的苯胺)、聚(3-取代的苯胺)和聚(2,3-取代的苯胺);聚乙炔类,如聚乙炔;聚二乙炔类,如聚二乙炔;聚萸类,如聚萸;聚茈类,如聚茈;聚咪唑类,如聚咪唑和聚(N-取代的咪唑),聚噻吩类,如聚噻吩;聚呋喃类,如聚呋喃和聚苯并呋喃;聚(对亚苯基)类,如聚(对亚苯基);聚吡啶类,如聚吡啶;聚哒嗪类,如聚哒嗪;多并苯类如并四苯、并五苯、并六苯、并七苯、二苯并五苯、四苯并五苯、茈、二苯并茈、蒽、茈、六苯并苯、涤纶、卵苯、quaterylene 和循环葱;衍生物(如三苯二噻吩、三苯二噻吩、并六苯-6,15-醌),其通过用例如 N、S 和 O 的原子或例如羰基之类的官能团取代多并苯(polyacens)的一些碳原子来制备;聚合物,如聚乙烯咪唑、聚苯硫醚和聚乙烯硫醚。在特别的实施方案中,导电聚合物是聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺或它们的衍生物。

[0077] 如本领域中所公知,可以通过向聚合物中结合以下物质来对导电聚合物进行掺杂:具有例如二甲基氨基、氰基、羧基和硝基之类的官能团的材料,例如苯醌衍生物和四氰基乙烯以及四氰基醌二甲烷及其衍生物之类的材料,它们起到作为接受电子的受体的作用,或者,例如,具有例如氨基、烷基、羟基、烷氧基和苯基之类的官能团的材料;取代的胺类,如苯二胺;葱、苯并葱、取代的苯并葱、茈、取代的茈、咪唑和其衍生物,以及四硫富瓦烯及其衍生物,它们起到供体即电子供体的作用。如本文所使用的术语“掺杂”表示,接受电子的分子(受体)或提供电子的分子(供体)结合至聚合物的链内。当掺杂剂是对于用于合成聚合物的单体的取代基团时,使用术语自掺杂聚合物。在其他情况中,掺杂剂是外来的并且在合成之后被包含在聚合物的链(通常作为膜)中,如碘蒸气。在本发明中,受体和供体两者均可用作掺杂剂。

[0078] 如本文所使用的术语“金属胶体”是指其中悬浮的微观的纳米粒子是金属纳米粒子的胶体。术语“贵金属”是指周期表的第 VIII 族金属,包括但不限于:铂、铱、钯等,以及金、银等。

[0079] 如本文所使用的术语“金属 / 导电聚合物复合胶体”是指由在其表面上存在有导电聚合物的金属纳米粒子制成的胶体。

[0080] 在特别的实施方案中,在本发明的上下文中使用的纳米粒子包括一种以上的选自 Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Rh、Pd、Ag、Cd、La、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au 和 / 或 Ac 的金属。本领域技术人员将理解,上文所述的过渡金属可以各采用若干种不同的氧化态,它们均可用于本发明。在一些情况下,形成最稳定的氧化态,但其他

氧化态可用于本发明。此外,本发明的过渡金属可以是金属氧化物。在一个实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中所述纳米粒子包括选自以下各项组成的组中的过渡金属: Au、Ag、Cu、Ta、Pt、Pd 和 Rh,且优选地,其中所述过渡金属为金、银或铜。

[0081] 如上详述的,在特别的实施方案中,根据本发明的包覆方法依赖于结合剂(更具体地,蛋白质)和纳米粒子之间的静电相互作用。然而,对于某些用途而言,可能需要更稳定的蛋白质-纳米粒子的配对。这种稳定配对可以经由蛋白质分子和纳米粒子之间的共价偶联获得。为了确保这种共价偶联,例如通常在纳米粒子表面设置官能团,比如羧基或胺基或肽、或叠氮或烯烃等。在根据现有技术的用于共价连接的典型方案中,在共价偶联中第一步骤是使纳米粒子上的官能团例如羧基活化,由此使它们对于例如蛋白质的结合配偶体而言是反应性的。随后添加结合配偶体。典型地,需要过量的结合配偶体,以达到用结合配偶体对纳米材料的完全覆盖。在偶联反应完成之后,通过纯化,除去过量的结合配偶体。

[0082] 然而,根据本发明的特别的实施方案,提供了最优化的包覆方法,包括将蛋白质共价连接在纳米粒子上。实际上,在特别的实施方案中,根据本发明的包覆方法确保了在纳米粒子周围形成蛋白质单层,从而提供了在蛋白质与纳米粒子上任何(活化的)官能团之间的紧密接触,由此在纳米粒子表面集中了蛋白质并加速了共价键的形成。与使用本领域已知的用于共价连接的方法相反,使用根据本发明的方法,需要很少或不需要过量蛋白质。

[0083] 因此,在特别的实施方案中,纳米粒子的表面被一个以上官能团官能化。用于纳米粒子的官能化的方法是技术人员熟知的,并可以例如包括配体与纳米粒子表面的连接,其中所述配体包含至少一种具有第一部分和第二部分的连接剂,所述第一部分连接至纳米粒子,所述第二部分是能够连接至亲和分子如蛋白质的官能团。在特别的实施方案中,纳米粒子表面被选自以下各项组成的组中的一种以上官能团官能化:羧基、胺、聚乙二醇、肽、DNA 和 RNA。对于结合蛋白质而言,羧基是特别有用的,因为羧基可以与蛋白质的胺部分反应,从而形成酰胺键。因此,在具体实施方案中,官能团包括羧基。在特别的实施方案中,在使纳米粒子与包含蛋白质的溶液接触之前或之时,使官能团活化。官能团的活化对本领域技术人员而言是熟知的。如果官能团是羧基,则可以使用一种以上的羧基活化剂基团将羧基活化。有用的羧基活化基团的实例包括但不限于:碳二亚胺试剂、磷试剂如六氟合磷酸苯并三唑基氧基-三-(二甲基氨基)磷(BOP)等、脲鎓或碳鎓试剂如六氟磷酸 O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N'-四甲基脲鎓(HBTU)、N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)、六氟合磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷磷(PyBOP)等;1-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉(EEDQ);碘化 1-甲基-2-氯吡啶鎓(向山试剂)等。

[0084] 再另一方面,本发明涉及纳米粒子组合物,其包含可通过一种以上本发明的方法获得的纳米粒子。

[0085] 实际上,在特别的实施方案中,本发明的方法提供了独一无二的获得被单层蛋白质包覆的纳米粒子的方法。可以通过由动态光散射(DLS)测量法测量粒子的流体力学直径,来确定蛋白质层的厚度。流体力学直径的增加等价于蛋白质层厚度的增加。被单层蛋白质包覆的纳米粒子提供了许多益处。用另一种化合物对已被蛋白质包覆的纳米粒子进行的包覆得以改善,因为该化合物至纳米粒子表面的距离缩短了。此外,如果要研究包覆蛋白质和另一种化合物之间的相互作用,则到纳米粒子表面的距离减小,从而改善了采用 LSPR 对蛋白质相互作用的光学探测。根据特别的实施方案,本发明提供了纳米粒子组合物,其包

含被一种以上蛋白质包覆的纳米粒子,其中所述一种以上蛋白质作为单层包覆在纳米粒子上。

[0086] 再另一方面,本发明提供了套件,其包括纳米粒子和其他组分和/或用于根据一种以上本发明的方法用蛋白质包覆纳米粒子的说明书。在特别的实施方案中,根据本发明的套件包含处于溶液中的纳米粒子,其中所述溶液包含非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂。附加地或备选地,根据本发明的套件包含纳米粒子和单独的非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂或单独的包含非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂的溶液。在特别的实施方案中,该套件包含用于根据本发明的方法包覆纳米粒子的说明书。

[0087] 本发明的还一个方面涉及根据本发明获得的被包覆的纳米粒子在不同用途中的应用。实际上,通过本发明的包覆方法获得的纳米粒子可以用于所有已知的涉及被蛋白质包覆的纳米粒子的现有技术用途中,包括但不限于药物递送、治疗、诊断、被分析物探测方法、寻靶方法等。

[0088] 此外已经发现,通过本发明的方法的特别的实施方案获得的纳米粒子在具体用途中具有特别的益处。实际上已观察到,对于使用纳米粒子对第一蛋白质与第二化合物(包括第二蛋白质)的相互作用进行光学探测而言,相互作用在尽可能接近纳米粒子表面处发生是受关注的。因此,在纳米粒子表面上包覆单层的第一蛋白质确保了对所述蛋白质与另一种化合物或蛋白质的相互作用的光学探测。在特别的实施方案,本发明的被包覆的纳米粒子用于被分析物探测方法。在特别的实施方案中,包覆方法是光学探测方法,更具体是,包括对纳米粒子的光散射的探测的方法。在进一步特别的实施方案中,将通过本发明的方法可得的或得到的纳米粒子用于 LSPR 探测法中。

[0089] LSPR 探测法典型地用在测量第一化合物和第二化合物的相互作用的情景中,在测量所述化合物中一种或两种的具体性质或在两种化合物之间的相互作用的具体性质的情景中。在本发明的方法中,结合在纳米粒子上的第一化合物是蛋白质。在特别的实施方案中,第一和第二化合物是具体已知或可设想到的结合对或结合偶的一员。因此,第二化合物(或潜在的同源配体)是指潜在地可以与偶联在纳米粒子上的第一化合物相互作用的化合物。典型地,第一化合物和第二化合物均为敏感部分,所述敏感部分是结合偶的成员,所述结合偶比如是抗原-抗体、受体-配体、酶-配体、糖-凝集素、受体-受体结合剂等。在这些实施方案中,LSPR 探测法可以用于检测在结合对的两个成员之间的相互作用。

[0090] 通过以下非限定性实施例说明本发明。

实施例

[0091] 实施例 1:在用蛋白质 G 包覆纳米粒子时,使纳米粒子与非离子型洗涤剂接触

[0092] 首先,必须通过浓度滴定来确定在不存在任何非离子型、阳离子型和/或两性离子型洗涤剂的情况下,为了使一定体积的金纳米粒子(GNP)稳定所必需的蛋白质 G 的量。由在最大波长处 OD 为 4 且直径为 30nm 的 GNP 制成的溶液含有 6×10^{11} 个 GNP/ml。将该 GNP 与不同量的蛋白质混合,典型范围为 0 至 100 μ g 蛋白质/ml 的 GNP。在 10min 的保温时间之后,添加 NaCl (1M, 在 H₂O 中),并且再另一个 10min 之后,在 350 至 900nm 之间记录这些样品的吸收光谱。为了确定使纳米粒子稳定所需的蛋白质的最小量,作三张图:作 λ_{\max} 、OD(λ_{\max}) 和比率 OD(600)/OD(λ_{\max}) 与每 ml GNP 的蛋白质的量的关系图。在全部三张图与空白对照

显示最高相似性处的最低的蛋白质浓度是使纳米粒子稳定所需的蛋白质的最小量。尤其是,比率 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 应当尽可能地小。在用蛋白质包覆之后,可以预期 λ_{\max} 向更高波长的小幅移动以及由此的 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 的小幅上升。通常, $OD(\lambda_{\max})$ 也上升或下降一点。通过浓度滴定,每 ml GNP 为 25 μ g 蛋白质 G 的蛋白质的量被确定为使纳米粒子稳定的最小量(图 1)。

[0093] 在确定了在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下使纳米粒子稳定所需的蛋白质的最小量之后,在存在非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下进行浓度滴定。在本实施例中,以 0.05% 的最终浓度使用非离子型洗涤剂 Tween20。在 Tween20 滴定中被测的最高的蛋白质的量为在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下使纳米粒子稳定的蛋白质的最小量。除了蛋白质在添加 GNP 之前与固定量的 Tween20 混合之外,类似于在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下的浓度滴定,进行滴定。记录这些样品的吸收光谱,并再作以下三张图;作 λ_{\max} 、 $OD(\lambda_{\max})$ 和比率 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 与每 ml GNP 的蛋白质的量的关系图。

[0094] 由于 Tween20,所有样品在添加 NaCl(1M,在 H_2O 中)之后均是稳定的。可以通过 λ_{\max} 随着渐增的每 ml GNP 的蛋白质的量的发展来监测蛋白质在纳米粒子表面上的结合。结合在纳米粒子表面的蛋白质越多, λ_{\max} 向更高波长的移动就越大。这一发展也对 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 的图有影响。随着渐增的 λ_{\max} ,比率 $OD(600)/OD(\lambda_{\max})$ 也稍微增加。

[0095] 在存在 Tween20 的情况下的浓度滴定结果示于图 2 中。除了吸收光谱(图 2A、2B、2C)之外,对每个样品进行了动态光散射(DLS)测量(图 2D)。每 ml GNP 12.5 至 15 μ g 蛋白质 G 的量足以覆盖具有大约一层蛋白质 G 的纳米粒子(图 2,通过箭头表示)。可以清楚地识别分别对应于在纳米粒子上的第一和第二层蛋白质的两个平稳段(图 2D)。使用为了使纳米粒子在 Tween20 存在的情况下稳定所需的每 ml GNP 12.5 μ g 蛋白质 G,导致纳米粒子具有 5nm 的蛋白质层厚度。使用为了在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下获得稳定的纳米粒子所需的每 ml GNP 25 μ g 蛋白质 G,导致纳米粒子具有 12.5nm 的蛋白质层厚度,这比前述大小的两倍还大(图 2D)。因此,在包覆过程中使用 Tween20 能够制备稳定的被蛋白质 G 包覆的 GNP,其仅在纳米粒子表面上具有一层蛋白质。因此,它使每 ml GNP 所需的蛋白质 G 的量折半,并且如果意图进一步用另一种分子包覆该纳米粒子,此分子至纳米粒子表面的距离降低。

[0096] 随着渐增的蛋白质的量,将 λ_{\max} (图 2A)的发展与纳米粒子的流体力学直径作比较(图 2D),显示出也可以从 λ_{\max} 与每 ml GNP 的蛋白质的量的关系图推导出蛋白质层厚度随着渐增的蛋白质的量的发展。等价于蛋白质层厚度的增加的流体力学直径的增加导致了 λ_{\max} 的光学红移。由于 DLS 测量是消耗时间的,因而仅使用吸收光谱来获取关于蛋白质层厚度的信息这一良机明显降低了为确定最佳的用于包覆的蛋白质的量的所需的时间。

[0097] **实施例 2:**在用链霉抗生物素蛋白包覆纳米粒子时,使纳米粒子与非离子型洗涤剂接触

[0098] 通过浓度滴定,确定了每 ml GNP 25 μ g 链霉抗生物素蛋白的蛋白质的量是在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下仍然使纳米粒子稳定的最小量(图 3)。在图 4 中,示出了在 Tween20 存在的情况下,链霉抗生物素蛋白的相邻浓度滴定结果。用大约一层链霉抗生物素蛋白覆盖纳米粒子,需要每 ml GNP 为 12.5 μ g 链霉抗生物

素蛋白的量（图 4）。使用为了在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下获得稳定的纳米粒子所需的每 ml GNP25 μ g 链霉抗生物素蛋白, 导致纳米粒子具有前述大小两倍的层厚度（图 4D）。在图 4D 中出现的 DLS 测量清楚地显示了两个相继的蛋白质层的发展, 这证实了在图 4A、4B 和 4C 中显示的光谱数据。因此, 本发明的方法使每 ml GNP 的链霉抗生物素蛋白的量折半。

[0099] **实施例 3:**在用蛋白质 G 包覆纳米粒子之前, 使纳米粒子与非离子型洗涤剂接触

[0100] 实施例 3 类似于实施例 1, 除了在添加蛋白质之前向纳米粒子添加 Tween20 之外。

[0101] 首先必须确定在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下, 为了包覆一定体积的 GNP 所需的蛋白质的最小量。如在实施例 1 中所述, 每 ml GNP25 μ g 蛋白质 G 的蛋白质的量被确定为在不存在 Tween20 的情况下仍使纳米粒子稳定的最小量（图 1）。

[0102] 随后, 用被 Tween20 包覆的 GNP 进行浓度滴定。在此滴定中被测的最高的蛋白质的量再次为在不存在 Tween20 的情况下使纳米粒子稳定的蛋白质的最小量。与实施例 1 相反, 在滴定开始前, GNP 被 Tween20 包覆。除了使用被 Tween20 稳定的纳米粒子代替被柠檬酸盐包覆的 GNP 之外, 所述滴定类似于在不存在任何非离子型、阳离子型和 / 或两性离子型洗涤剂的情况下的浓度滴定进行。使用被 Tween20 稳定的纳米粒子允许了用蛋白质渐进地取代非离子型洗涤剂。当待包覆的蛋白质是小肽时或被缓冲时, 这是有利的。记录这些样品的吸收光谱, 并且用被 Tween20 包覆的 GNP 的浓度滴定结果示于图 5 中。为了用大约一层蛋白质 G 包覆纳米粒子, 需要每 ml GNP 为 7.5 至 15 μ g 的蛋白质 G 的量（图 5）。与在不存在 Tween20 的情况下合成稳定的被蛋白质 G 包覆的 GNP 所需的每 ml GNP25 μ g 蛋白质 G 相比, 这再次明显降低了每纳米粒子的蛋白质的量。考虑到该滴定中使用了另一批胶体, 这一结果可以与在实施例 1 中所得的结果相当。

[0103] **实施例 4:**在用蛋白质 A 包覆纳米粒子之前, 使纳米粒子与非离子型洗涤剂接触

[0104] 在图 6 中, 显示了用蛋白质 A 对被 Tween20 包覆的 GNP 浓度滴定的结果。用大约一层蛋白质 A 覆盖纳米粒子需要每 ml GNP 为 5 至 7.5 μ g 的蛋白质 A 的量。

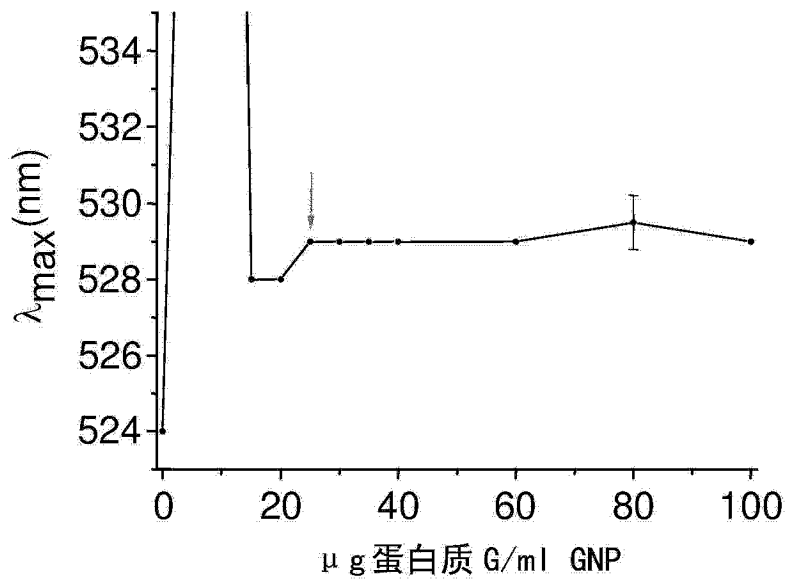


图 1A

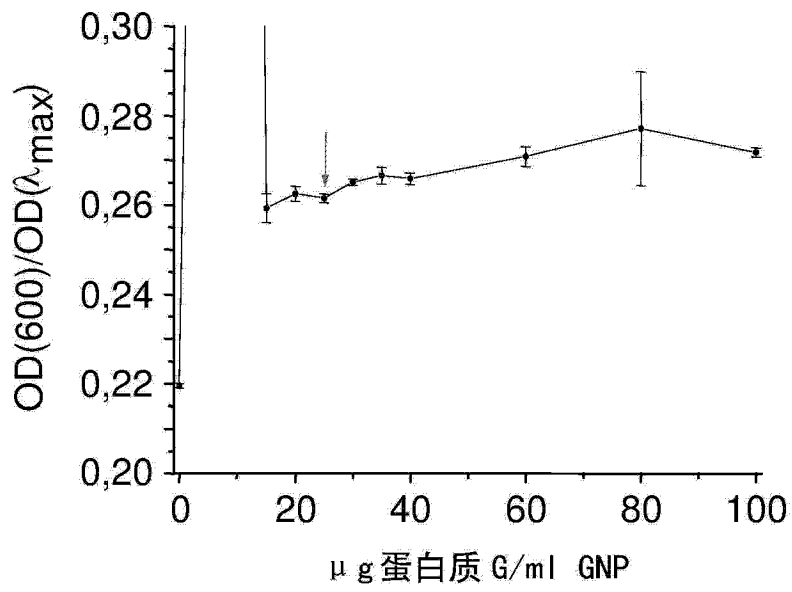


图 1B

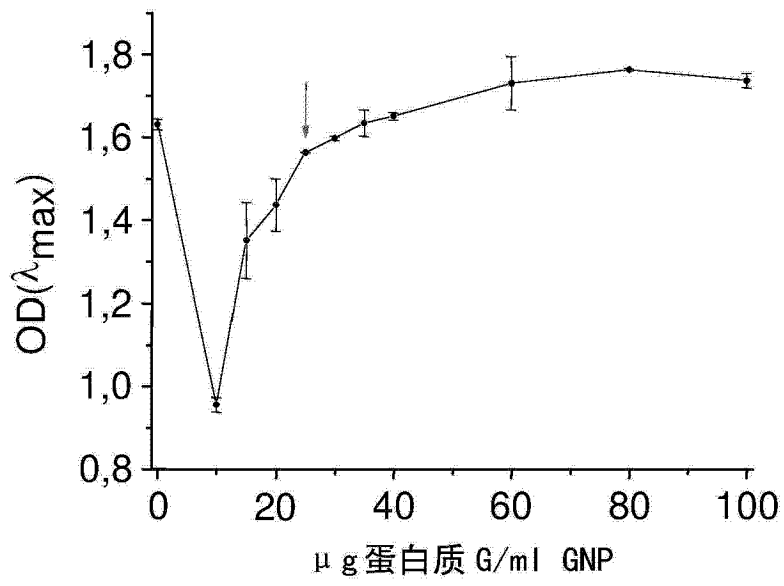


图 1C

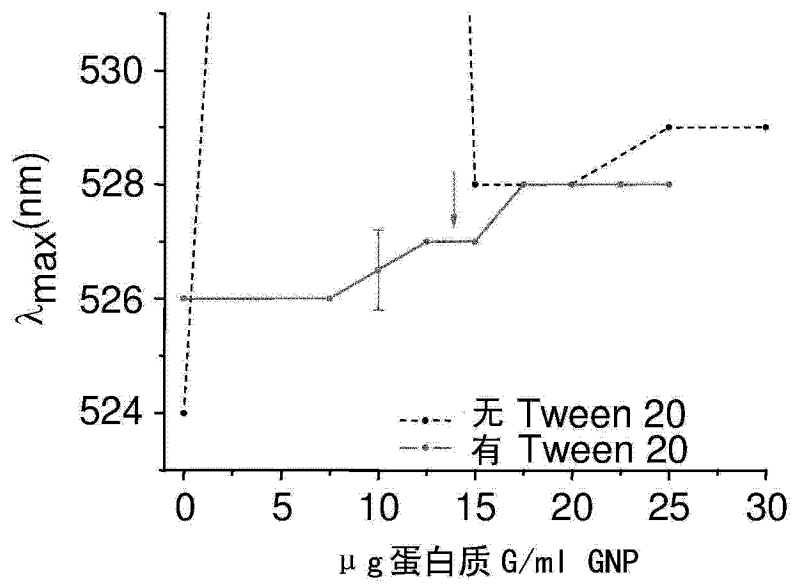


图 2A

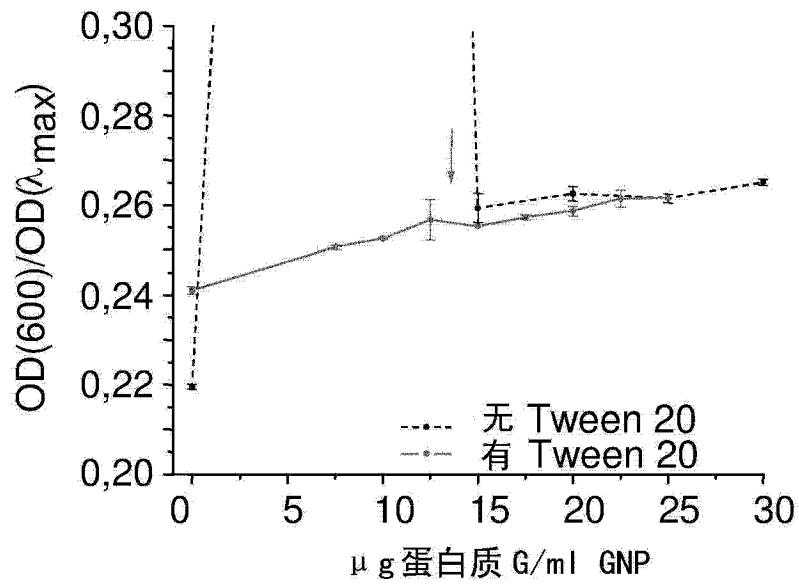


图 2B

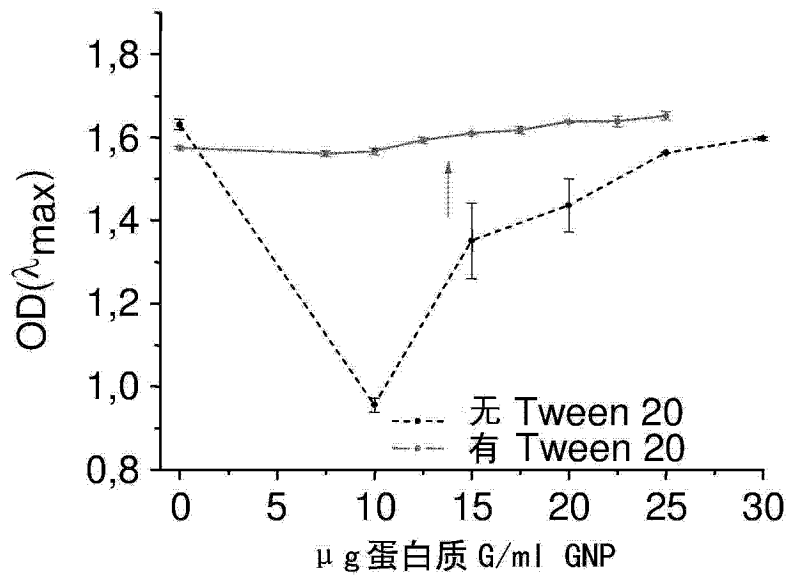


图 2C

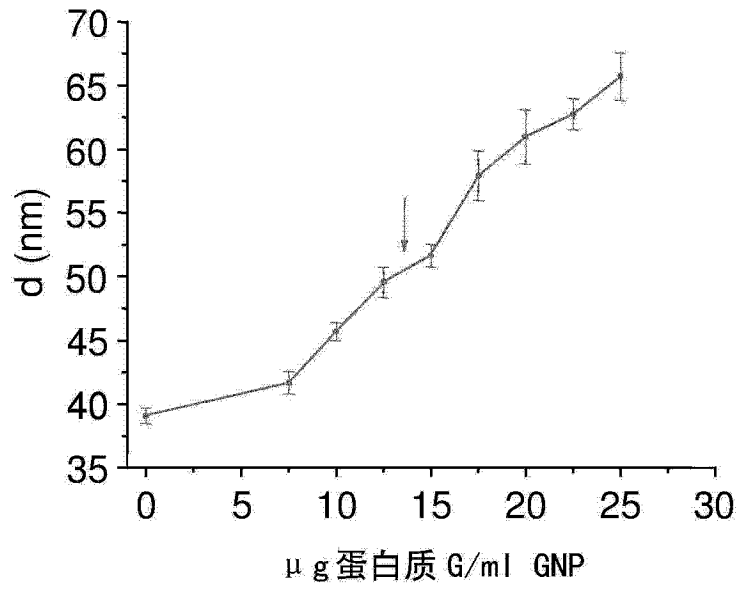


图 2D

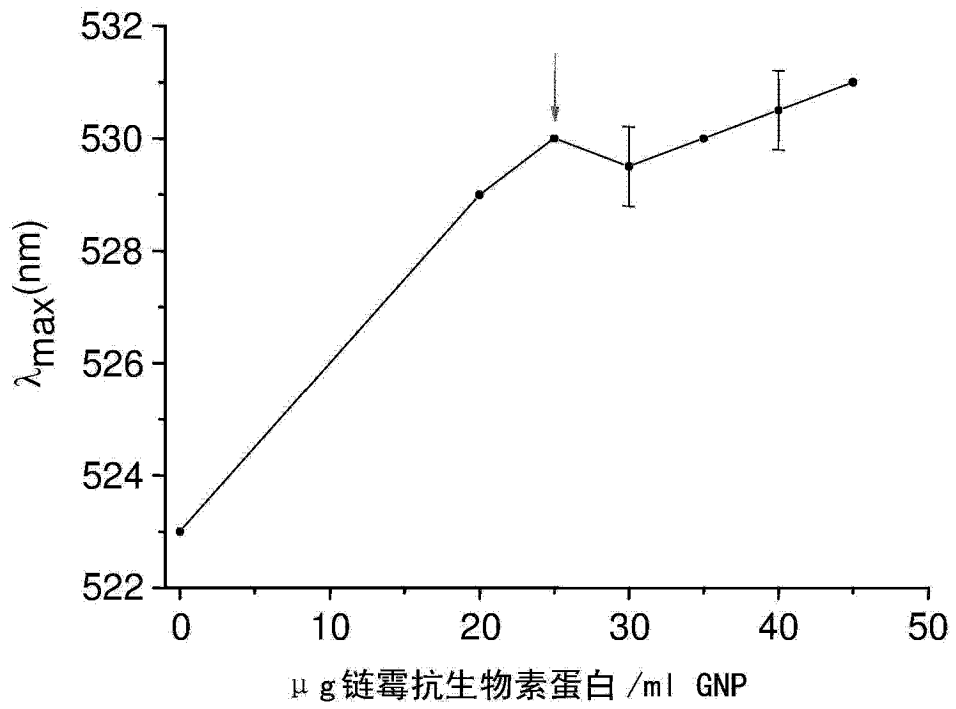


图 3A

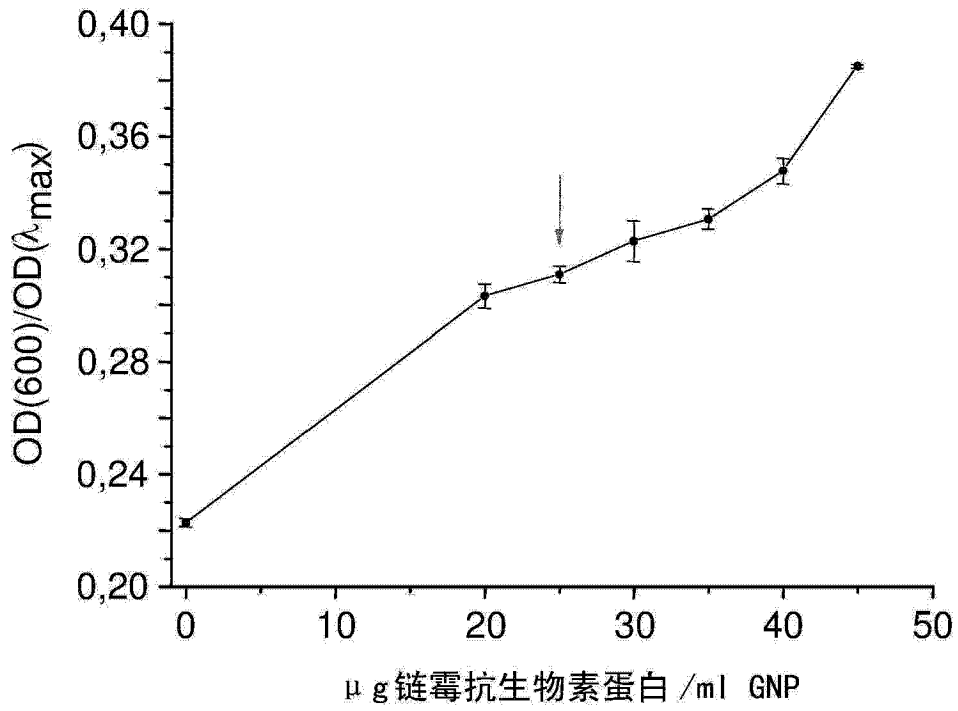


图 3B

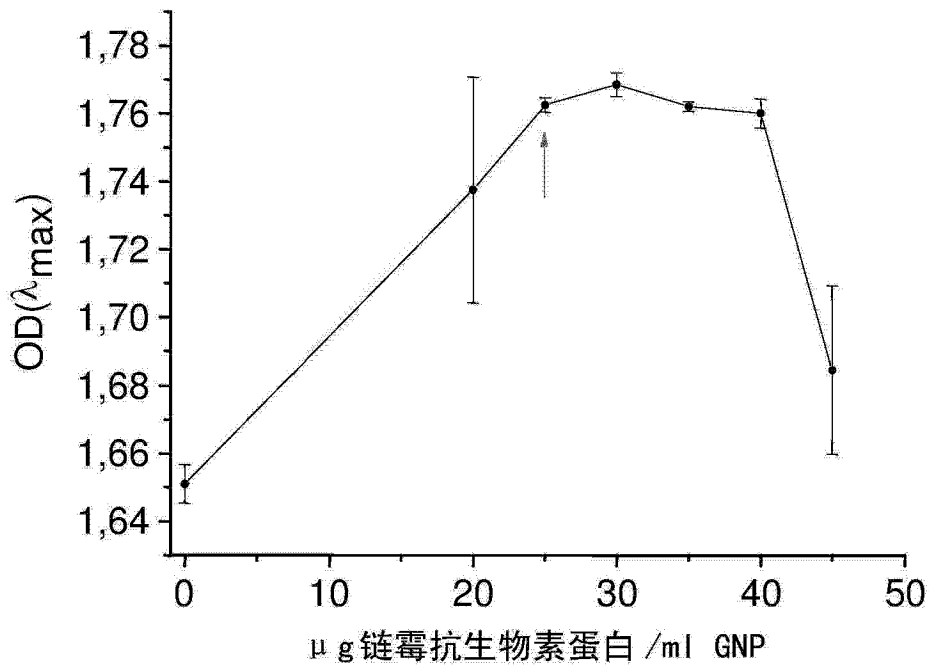


图 3C

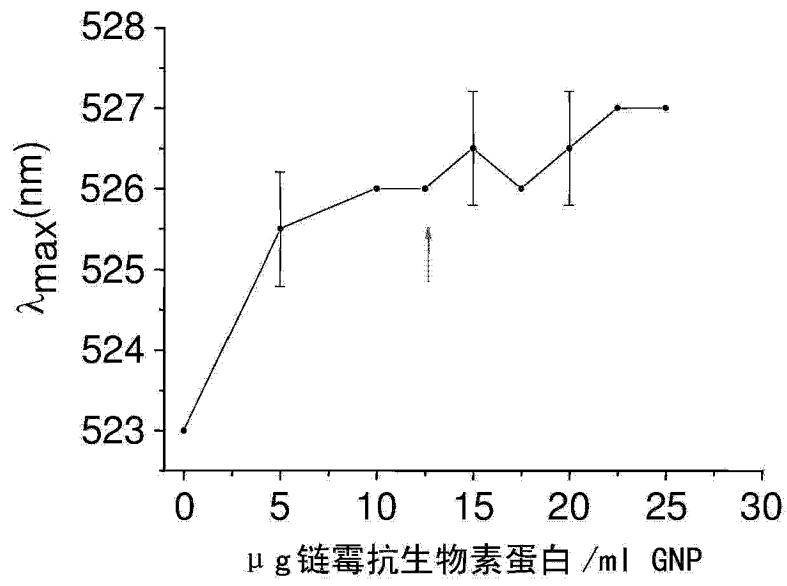


图 4A

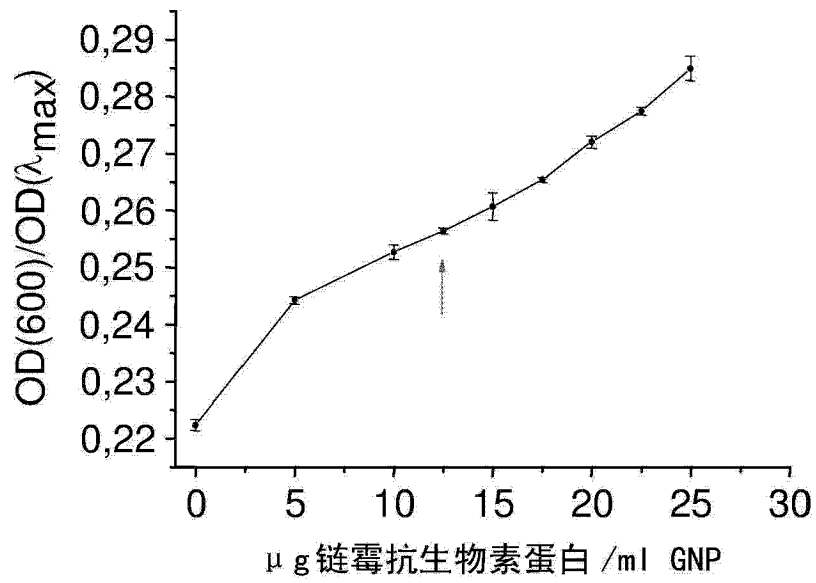


图 4B

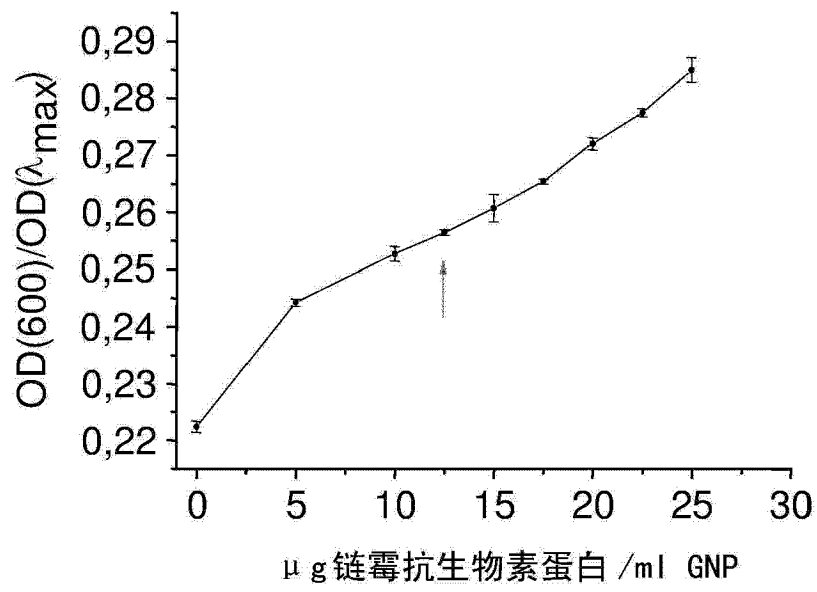


图 4C

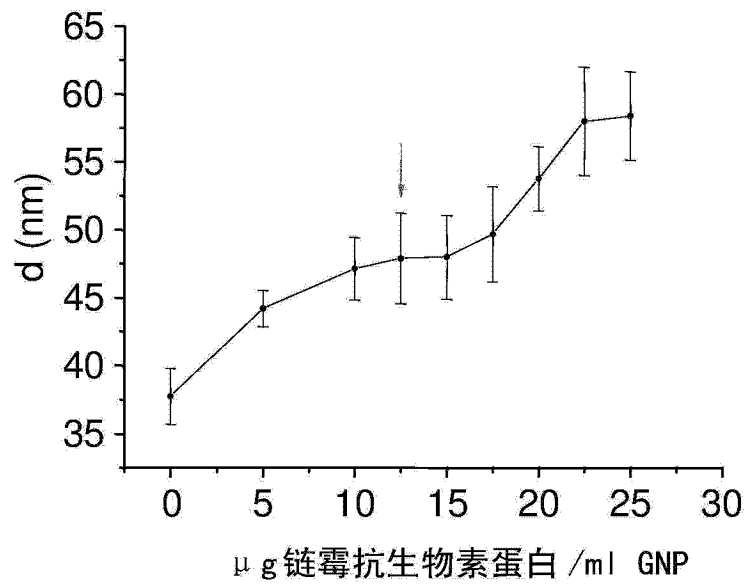


图 4D

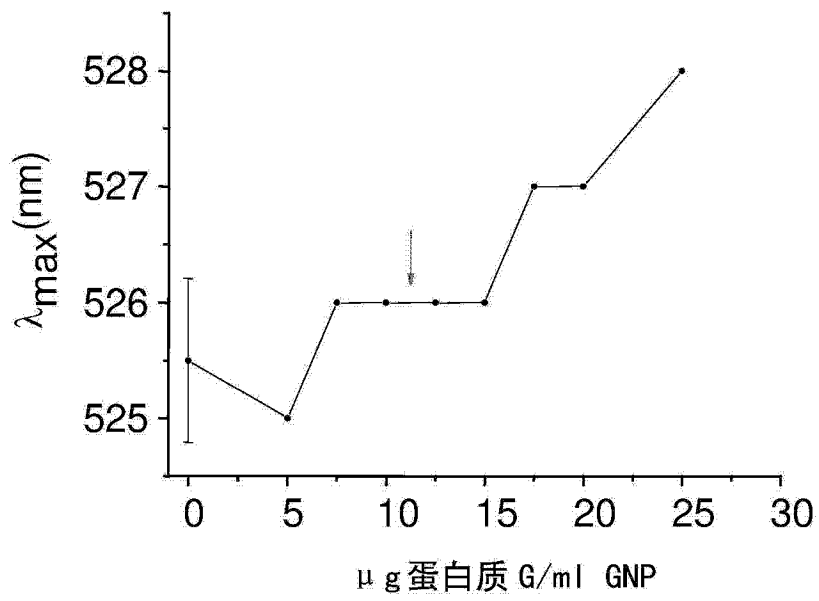


图 5A

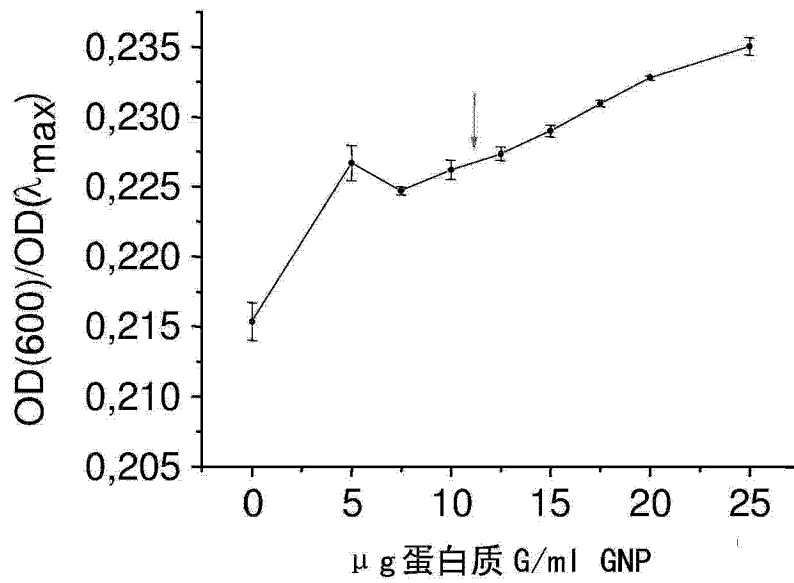


图 5B

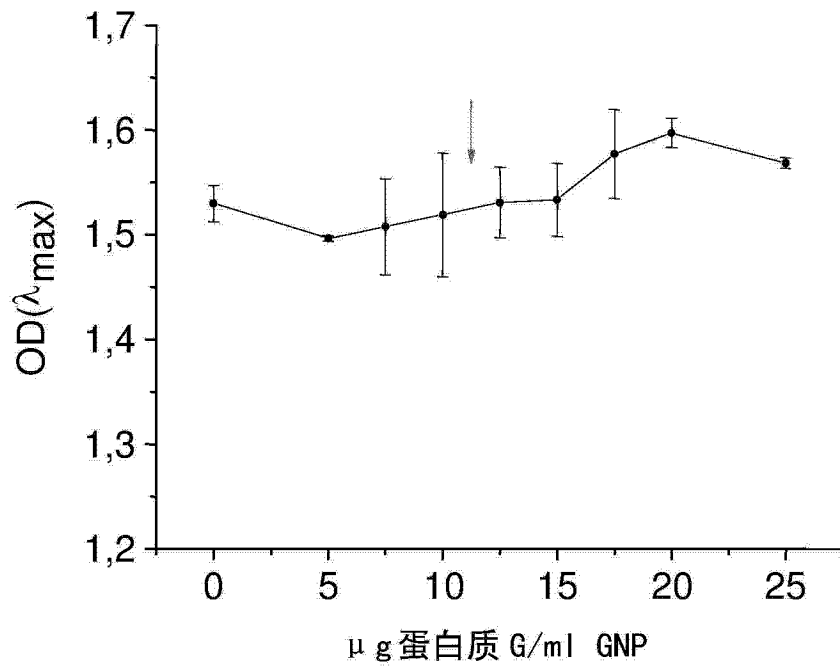


图 5C

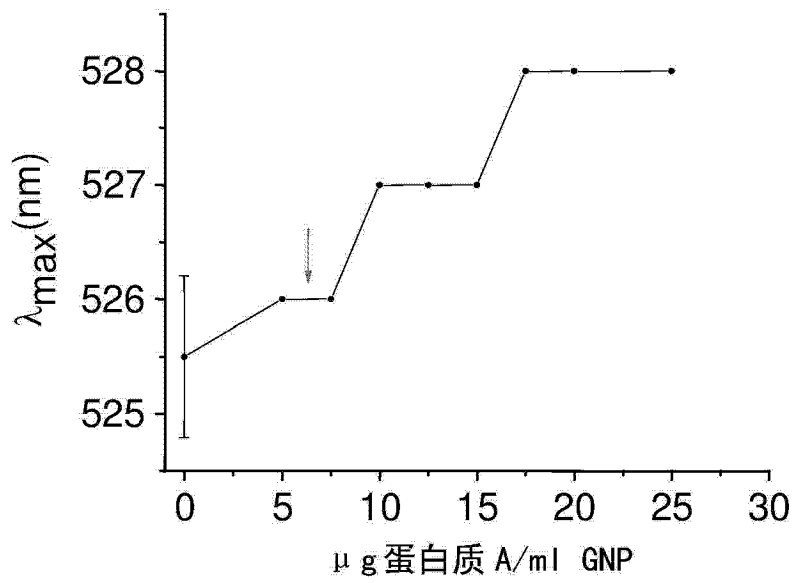


图 6A

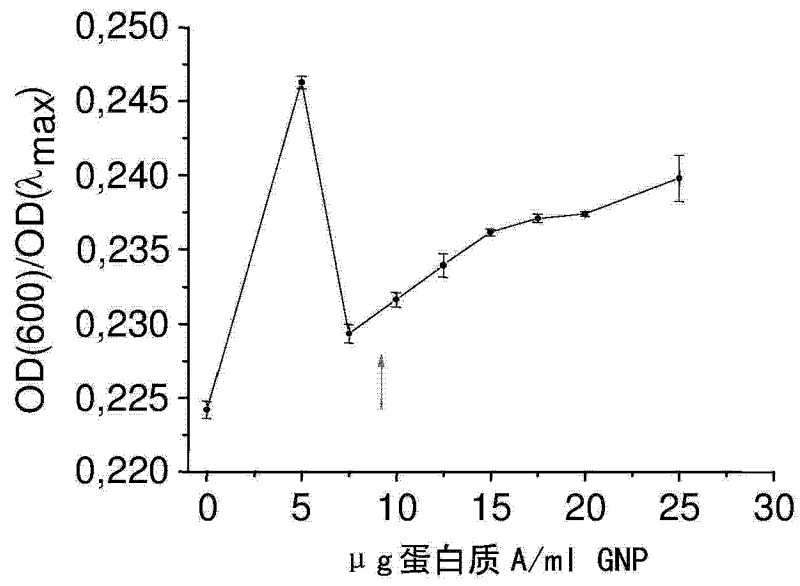


图 6B

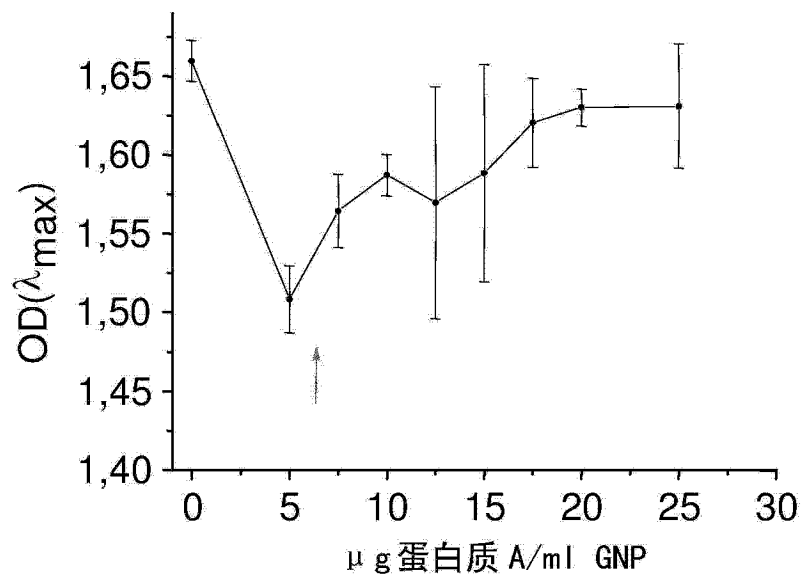


图 6C