



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103380376 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201280010246. 6

(22) 申请日 2012. 02. 24

(30) 优先权数据

1103256. 2 2011. 02. 25 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/053170 2012. 02. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/113911 EN 2012. 08. 30

(73) 专利权人 通用电气医疗集团英国有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 J. K. 霍尔顿 P. J. 塔特内尔

S. L. J. 斯图布斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 徐晶 林森

(51) Int. Cl.

G01N 33/52(2006. 01)

B01L 3/00(2006. 01)

A61B 10/00(2006. 01)

A61B 5/14(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1550872 A2, 2005. 07. 06, 说明书实施例

4.

US 2004/0096914 A1, 2004. 05. 20, 说明书第 [0007]-[0009]、[0013]-[0014]、[0017]、[0032]-[0034]、[0039]-[0040] 段.

US 2006/0278537 A1, 2006. 12. 14, 权利要求 8、9、19、22, 说明书第 [0018]-[0019]、[0024]-[0025] 段.

US 2009/0166560 A1, 2009. 07. 02, 说明书第 [0018]、[0046]-[0047] 段.

US 6086748 A, 2000. 07. 11, 说明书第 10 栏第 40 行至第 12 行第 51 行, 第 27-28 栏的实施例 1.

G. S. Z. Ssenyonga 等. 用滤纸干血和血清样品对边虫病血清学诊断的比较. 《广东畜牧兽医科技》. 1993, (第 02 期), 49.

Keith Henderson and Jeffrey Stewart. Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. 《Journal of immunological methods》. 2002, 第 270 卷 (第 1 期),

审查员 许珊萍

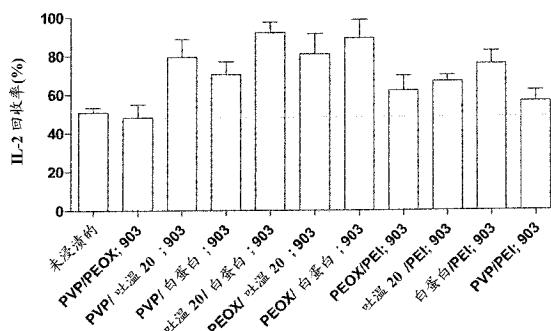
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

固体支持物和从其中回收生物材料的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于生物材料的储存和进一步加工的固体支持物。本发明具体涉及具有至少一个涂有化学混合物的表面的固体支持物, 该化学混合物促进生物材料自支持物的回收。也描述了制备和使用固体支持物的方法。



1. 一种从固体支持物回收生物材料的方法,所述固体支持物具有至少一个表面,该表面涂布有促进生物材料从所述表面回收的化学混合物,其中所述化学混合物是选自聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PEOX) 或聚乙烯亚胺 (PEI) 和非离子型去污剂或白蛋白的混合物或者非离子型去污剂和白蛋白的混合物的混合物,该方法包括以下步骤

- i) 使所述固体支持物的表面与含生物材料的样品接触;
- ii) 在所述固体支持物的所述表面上使所述样品干燥;
- iii) 储存所述固体支持物;和
- iv) 从表面提取生物材料;

其中所述固体支持物是纸,以及其中所述非离子型去污剂是吐温 20。

2. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和吐温 20。

3. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和白蛋白。

4. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是吐温 20 和白蛋白。

5. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PEOX) 和吐温 20。

6. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PEOX) 和白蛋白。

7. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是聚乙烯亚胺 (PEI) 和吐温 20。

8. 权利要求 1 的方法,其中的化学混合物是聚乙烯亚胺 (PEI) 和白蛋白。

9. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述纸是纤维素纸。

10. 权利要求 9 的方法,其中的纤维素纸是 903 Neonatal STD 纸卡。

11. 依据权利要求 1 的方法,其中步骤 iii) 包括在 15 至 40°C 范围的温度储存纸质支持物。

12. 权利要求 1、2 或 11 的任一项的方法,其中所述样品选自组织、细胞、血液、血浆、唾液和尿。

13. 权利要求 1、2 或 11 的任一项的方法,其中所述生物材料选自生物分子、细胞成分和经生物制药的药物。

14. 权利要求 1、2 或 11 的任一项的方法,其中所述生物材料是源于合成的生物分子。

15. 固体支持物在促进生物材料从其表面回收中的应用,所述固体支持物具有至少一个表面,该表面涂布有促进生物材料从所述表面回收的化学混合物,其中所述化学混合物是选自聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PEOX) 或聚乙烯亚胺 (PEI) 和非离子型去污剂或白蛋白的混合物或者非离子型去污剂和白蛋白的混合物的混合物,其中所述固体支持物是纸,以及其中所述非离子型去污剂是吐温 20。

16. 依据权利要求 15 的应用,其中所述生物材料是经生物制药的药物。

17. 权利要求 15-16 中任一项的应用,其中的化学混合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和吐温 20。

18. 权利要求 15-16 中任一项的应用,其中的化学混合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和白蛋白。

19. 权利要求 15-16 中任一项的应用,其中的化学混合物是吐温 20 和白蛋白。

20. 权利要求 15-16 中任一项的应用,其中的化学混合物是聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PEOX) 和吐温 20。

21. 权利要求 15-16 中任一项的应用,其中的化学混合物是聚-2-乙基-2-噁唑啉

(PEOX) 和白蛋白。

22. 权利要求 15-16 中任一项的应用, 其中的化学混合物是聚乙烯亚胺 (PEI) 和吐温 20。

23. 权利要求 15-16 中任一项的应用, 其中的化学混合物是聚乙烯亚胺 (PEI) 和白蛋白。

24. 权利要求 15-16 中任一项的应用, 其中所述纸是纤维素纸。

25. 权利要求 24 的应用, 其中的纤维素纸是 903 Neonatal STD 纸卡。

固体支持物和从其中回收生物材料的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及固体支持物,且具体涉及可用于生物材料,诸如经生物制药的药物的储存、回收和进一步加工的固体支持物。

[0002] 发明背景

[0003] 固体支持物,诸如用于收集和分析人血液资料的滤纸的应用回溯到二十世纪六十年代早期,当时罗伯特·古瑟瑞博士(Dr. Robert Guthrie)采用干血斑点(dried blood spot, DBS)标本检测新生儿的苯丙氨酸以探测苯丙酮酸尿症(Mei, J., 等,2001; Journal of Nutrition, 131:1631S-1636S)。该项收集血液的新应用导致新生儿人群筛查,用于探测可治疗的、遗传性代谢疾病。现在DBS已经应用超过40年以大规模筛查新生儿代谢性障碍。

[0004] 通过在固体支持物,诸如膜、玻璃纤维或纸上面点上或者自静脉血或者直接从手指或足跟穿刺采集的全血,收集DBS标本,使得该方法特别适宜于标本从外围的诊所装运至中心实验室。此外,可将封装在带有干燥剂的自封拉锁(zip-lock)塑料袋中的DBS于室温下储存和运输,因而避免需要 i) 冷链储存和 ii) 快速的专业化运输。通过将血滴施用于能吸收的材料,诸如Whatman 903 Neonatal STD 纸上所收集的DBS不能承受国际航空运输协会危险品运输规则(IATA Dangerous Goods Regulations)(附录II,2005年五月)。

[0005] 用于新生儿和初生儿筛查目的而收集、运输和储存DBS和其他体液的另外的固体纸质支持物包括 -

[0006] 1. Ahlstrom 226

[0007] 2. Munktell TFN (CE 标志)

[0008] 3. Toyo Roshi 级 545 Advantec Toyo, Tokyo (参见 Elvers L 等 2007; J. Inherit Medtab Dis 30, 4, 609)。

[0009] 所有这些纸如同Whatman 903 Neonatal STD 纸一样由棉短绒构成。Whatman 903 Neonatal STD 和 Ahlstrom 226 纸被分类为第 II 类医疗器械。具有潜在的开发为用于新生儿和初生儿筛查目的的固体纸质支持物包括那些由Macherey Nagel (如MN818)、Reeve Angel (如双环)和Hahnemuhle Grade 2292 制造的产品。

[0010] DBS的可消费的成本低于每测试US\$1,而运输费用与血浆相比明显地减低,血浆需要液体格式和专门的运输条件(Johannessen, A., 等,2009; J Antimicrobial Chemotherapy, 64, 1126 - 1129)。尽管实际的化验成本保持未变化,而从DBS提取分析物涉及在中央实验室的一些额外的动手(hands-on time)时间,DBS和特别的固体纸质支持物的应用日益增加,用于生物材料,诸如核酸、蛋白质等的储存和/或分析。另外,还已经在药物发明过程期间利用DBS,其中已经将候选的低分子量药物化合物导入试验动物中并且监测血液中的浓度水平。

[0011] 近年来,源于生物技术的重组蛋白质、肽和基于抗体的药物,以及用于基因疗法的反义寡核苷酸和DNA,已经被开发成主流的治疗剂,并且现在构成临床开发下的化合物的基本部分。这些治疗剂一般被称作“生物技术药物”或“经生物制药的药物”以使它们与低分

子量药物化合物区分开。

[0012] 生物技术药物和低分子量药物化合物的药物代谢和药物动力学 (DMPK) 分析是重要的, 因为 DMPK 分析对于药物发明是至关重要的, 因为它提供洞察候选药物如何可被肌体吸收、代谢和排泄。在药物发明阶段常规进行分析并且涉及将关注的化合物定量给予动物, 和检测生物液中作为时间函数的药物 (或代谢物) 浓度。此产生有价值的信息, 诸如药物清除率、生物利用度等, 但是需要大量的时间和资源 (Beaudette, P., 等, 2004; J. of Chromatography B 809, 153-158)。

[0013] 与 DMPK 分析相关联的, 典型地在药物筛选程序中实施的主要问题是显著缺乏适宜的储存媒介以在分析之前维持血液样品的稳定性和完整性。现行的方法采用在指定的时间从给药动物收集到的血浆或全血。然而, 这种方法具有许多缺点, 包括涉及耗时过程, 这样造成分析过程的瓶颈。此外, 各个动物对时程实验的多次抽血受限。此限制了处理量并增加了对动物的使用, 结果是更少的先导化合物可被推出。

[0014] DBS 所需的小的血量使得从一头动物的连续的采血成为可能, 胜过从多头动物混合采血, 此显著改善 DMPK 和毒物动力学数据的质量和评估。对 DBS 所需的、关于“3Rs” (减少、纯化和替代) 的减少血液量 (典型地为每个斑点 15 -20 μ l) 的伦理学利益, 是在临床前药物开发中显而易见的。可显著减少测试动物的数量。此外, 在当局日益要求的、作为儿科应用的药物安全评价的一部分的幼儿毒性研究中, 非末端血液取样是可能的。管制动物毒理研究的另一个优势是数据质量提高。

[0015] 因此, 由于对在药物动力学研究中大量的血液样品的快速分析增长的需求, DBS 已经变为吸引人的选项。对于用纸作为 DBS 的固体支持物, 期望纸兼具满意的机械特性和能够承载得住关注的生物材料处于稳定状态, 这样其可经历进一步加工和 / 或储存后的分析。用于 DMPK 分析的这样的纸的实例是已知为 903 Neonatal 标本收集纸和也已知为 FTA 和 FTA Elute 的纸, 例如在美国专利号 5, 75, 126 和 5, 939, 259 中描述的那样。

[0016] 用于 DMPK 分析的另外的固体纸质支持物包括以下的 -

[0017] 1. Ahlstrom 级 226 纸:

[0018] 干血浆斑点在临床研究中药物动力学的测定中的应用: 定量生物分析方法的验证。

[0019] Barfield, M., 等, (2011), Anal., Chem., 83, 118 - 124。

[0020] 2. 标准化的滤纸:

[0021] 妊娠过程中对拉莫三嗪和奥卡西平联合的药物监测

[0022] Wegner, I., 等, (2010), Epilepsia, 51, 2500-2502。

[0023] 3. Whatman 903, FTA (DMPK-A) 和 FTA Elute (DMPK-B) 物质:

[0024] 储存条件对多种纤维素 - 基物质上的干血斑点样品的重量和外观的影响。

[0025] Denniff, P., 等, (2010), Bioanalysis, 2, 11, 1817-22。

[0026] 4. Whatman DMPK-A, -B, -C:

[0027] DBS 对肽 Exendin-4 (毒蜥外泌肽 -4) 的定量评估的应用; 通过 UHPLC - MS/MS 比较血浆和 DBS 方法。

[0028] Kehler, R., 等, (2010), Bioanalysis, 2, 8, 1461-1468。

[0029] 5. Ahlstrom 级 237 纸:

- [0030] 液体提取基密封型表面取样探针在 DBS & 小鼠全肌体薄组织切片的质谱分析中的应用
- [0031] Van Berkel, G., 等, (2009), *Anal., Chem.*, 2009, 81, 21, 9146 - 9152。
- [0032] 6. Whatman FTA 血液斑点纸卡 (blood spot cards) :
- [0033] 作为样品收集技术的干血斑点在临床研究中的药物动力学测定 : 考虑定量生物分析方法的验证。
- [0034] Spooner, N., 等, (2009), *Anal Chem.* 81, 1557-63。
- [0035] 7. Whatman FTA Elute Micro 纸卡 :
- [0036] 通过 LC-MS/MS 测定人全血中右甲吗南及其代谢物右啡烷的干血斑点技术的研究。
- [0037] Liang, X., 等, (2009), *J. Chrom B, Anal. Tech Biomed & Life Sci*, 877, 799 - 806。
- [0038] 8. Whatman 滤纸卡片 :
- [0039] 液相色谱 / 串联质谱法用于测定干血斑点中的 25- 羟基维生素 D2 和 25- 羟基维生素 D3 : 一种糖尿病和心血管代谢风险筛查的潜在附属物 (adjunct)。
- [0040] Newman, M., 等, (2009), *J Diabetes Sci and Tech.* 3, 156 - 162。
- [0041] 9. Toyo Roshi No. 545 滤纸 (Advantec Toyo, Tokyo) :
- [0042] 采用 LC-MS/MS 同时测定低体重出生婴儿的 DBS 中的 17α - 羟基孕甾烯醇酮和 17α - 羟孕酮。
- [0043] Higashi, T., 等, (2008), *J. Pharm and Biomedical analysis*, 48, 1, 177 - 182。
- [0044] 10. Whatman 标本收集纸 BFC 180 :
- [0045] 采用干血斑点测定血液中吗啡和 6- 乙酰吗啡。
- [0046] Garcia-Boy, R., 等, (2008), *Therapeutic Drug Monitoring*, 30, 6, 733 - 739。
- [0047] 11. Whatman 滤纸 (目录号 10535097) :
- [0048] 采用偶联串连质谱仪的阳离子交换色谱法定量不同的人生物基质中的阳离子抗疟剂亚甲蓝。
- [0049] Burhenne, J., 等, (2008), *J. Chrom B, Anal. Tech Biomed & Life Sci*, 863, 273 - 282。
- [0050] 12. Whatman 3MM :
- [0051] 类固醇药理学中的样品收集和运输的滤纸的应用。
- [0052] Howe, C., 等, (1997), *Clin Chem.* 43, 1408-15。
- [0053] 13. Whatman FTA, FTA Elute, DMPK-A, B, C, Ahlstrom 226 -
- [0054] 采用 SCAPTTM DBS 系统和柱切换 LC-MS/MS 测定干血斑点中 Tamiflu[®] 和活性代谢物。
- [0055] Heinig, K., 等, F. Hoffmann-La Roche, 巴塞尔, 瑞士。
- [0056] (参见 : <http://www.presearch.co.uk/> 页数 / 产品 / 应用程序 / 1725/ 测定 %20 的 %20 Tamiflu %20 和 %20 活性 %20 代谢物 %20 在 %20 干燥 %20 血液 %20 斑

点 %20 使用 %20 的所述 %20SCAPTM%20DBS%20 系统 pdf (<http://www.presearch.co.uk/pages/products/applications/1725/Determination%20of%20Tamiflu%C2%AE%20and%20active%20metabolite%20in%20dried%20blood%20spots%20using%20the%20SCAPTM%20DBS%20system.pdf>)

[0057] 具有潜在被开发为 DMPK 目的的装置的固体纸质支持物包括 Munktell TFN 级、Toyo Roshi 级 545、Macherey Nagel (如 MN818)、Reeve Angel (如双环) 和 Hahnemuhle Grade 2292)。

[0058] 为了使下游加工和分析有效,必须采用服从高通量的、相对简单的技术,将关注的被分析物(诸如内源性蛋白质或生物技术药物)易于从固体纸质支持物提取出来。

[0059] 已经在科学文献中描述了 DBS 和内源性蛋白质的探测的组合。例如,囊性纤维化(CF)免疫反应性胰蛋白酶(IT)的生物标记,来自 DBS 的内源性 IT 在 CF 筛查中的首次报告的应用由 Ryley 等,于 1981 (J. Clin. Pathol. 34, 906-910) 发表。从那时起,IT 已经被常规用作采用自初生儿的 DBS 的 CF 的指示剂。许多商业组织提供 FDA 批准的为了该应用的免疫分析试剂盒。许多方法简单使用“纸-内(paper-in)”途径,其中将含 DBS 的打孔器直接应用于免疫分析并且关注的被分析物在原位被提取。近期(Lindau-Shepard & Pass, 2010, Clinical Chem. 56, 445-450) 证明,IT 以两种不同的同工型存在。这些作者报告用于采用 IT 的两种不同的同工型诊断 CF 的、基于悬浮(或纸-内)阵列的免疫分析的进展。所有这些基于蛋白质的研究在没有涂布的古瑟瑞纸卡(Guthrie cards) (Whatman 903 纸) 上进行。

[0060] 自从匿名的人类免疫缺陷(HIV) 筛查开始,已经实施超过 120 万份 DBS 测试,进行采自孕妇血液的内源性抗-HIV 抗体的血清学检查。

[0061] 这些研究已经证实 i) 关于血液的长期储存和任何相关的感兴趣蛋白的关注已经被证实尚无事实根据,和 ii) 在 DBS 中血红素的存在不妨碍分析性能。

[0062] 因此,生产提供简单、稳定的储存生物材料的介质的固体支持物是合乎需要的,包括 i) 内源性部分,和 ii) 经生物制药的药物或生物技术药物,其产生高的得率或回收进一步加工的生物材料。本发明专注于这些需求并提供提高从在固体支持物,特别是固体纸质支持物上作为 DBS 储存的生物样品回收生物材料,诸如经生物制药的药物的水平的方法。

[0063] 定义

[0064] 如在本文使用的术语“生物材料”应意指如下定义的任何“生物分子”、“源于合成的生物分子”、“经生物制药的药物”或“细胞成分”:

[0065] i) 生物分子是由活的有机物产生的任何有机分子,包括大的聚合物分子,诸如蛋白质、多糖和核酸,以及小的低分子量分子,诸如初级代谢产物、次级代谢产物和天然产物。

[0066] ii) 源于合成的生物分子是如在以上的 i) 中定义的“生物分子”,其采用重组 DNA 技术或通过其他无生命的体外方法化学合成产生。

[0067] iii) 经生物制药的药物(或“生物技术药物”)是源于生物技术的重组蛋白质、肽或抗体-基药物,或用于基因疗法的反义寡核苷酸、蛋白质核酸(PNA) 或脱氧核糖核酸(DNA)。

[0068] iv) 细胞成分是细胞的独特的、高度有组织的物质,并因此组成活体有机物。实例

包括膜、细胞器官、蛋白质和核酸。同时大多数细胞成分位于细胞本身内部,某些可存在于有机体的细胞外区域。

[0069] 发明简述

[0070] 依据本发明的第一方面,本文提供具有至少一个涂有促进从表面回收生物材料的化学混合物的表面的固体支持物,其中的化学混合物是选自乙烯基聚合物和非离子型去污剂、乙烯基聚合物和蛋白质、非离子型合成聚合物和非离子型去污剂、非离子型合成聚合物和蛋白质、聚乙烯亚胺 (PEI) 和非离子型去污剂、非离子型去污剂和蛋白质,以及聚乙烯亚胺 (PEI) 和蛋白质的混合物。

[0071] 在一个方面,固体支持物选自纸、玻璃微纤维和膜。

[0072] 优选地,支持物是纸,更优选是纤维素纸。

[0073] 在又一个方面,固体支持物是选自聚酯、聚醚砜 (PES)、聚酰胺 (尼龙 (Nylon))、聚丙烯、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚碳酸酯、硝酸纤维素、乙酸纤维素和氧化铝的膜。

[0074] 在另一个方面,乙烯基聚合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。

[0075] 在再一个方面,非离子型去污剂是吐温 20。

[0076] 在再一个方面,蛋白质是白蛋白。

[0077] 在一个方面,非离子型合成聚合物是聚 -2- 乙基 -2- 噁唑啉 (PEOX)。

[0078] 在另一个方面,化学混合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和吐温 20。

[0079] 在再一个方面,化学混合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和白蛋白。

[0080] 在一个方面,化学混合物是吐温 20 和白蛋白。

[0081] 在另一个方面,化学混合物是聚 -2- 乙基 -2- 噁唑啉 (PEOX) 和吐温 20。

[0082] 在再一个方面,化学混合物是聚 -2- 乙基 -2- 噁唑啉 PEOX 和白蛋白。

[0083] 在一个方面,化学混合物是聚乙烯亚胺 (PEI) 和吐温 20。

[0084] 在另一个方面,化学混合物是聚乙烯亚胺 (PEI) 和白蛋白。

[0085] 在再一个方面,支持物是纸,例如纤维素纸。纤维素纸的实例包括 903 Neonatal STD 纸卡。

[0086] 依据本发明的第二个方面,提供从固体支持物回收生物材料的方法,该方法包括以下步骤:

[0087] i) 使上文描述的固体支持物的表面与含生物材料的样品接触;

[0088] ii) 使样品在固体支持物的表面上干燥;

[0089] iii) 储存固体支持物;和

[0090] iv) 从表面提取生物材料。

[0091] 在一个方面,步骤 iii) 包括在 15 至 40°C 范围的温度下储存纸质支持物。优选地,温度范围在 20 至 30°C。在另一个方面,在较低温度下储存纸质支持物,这取决于生物材料的热稳定性。

[0092] 样品的性质将取决于生物材料的来源。例如,来源可来自广泛的生物有机体,包括,但不限于病毒、细菌、植物和动物。优选地,来源将为哺乳动物或人。对于哺乳动物和人的来源而言,样品可选自组织、细胞、血液、血浆、唾液和尿。

[0093] 在另一个方面,生物材料选自生物分子、源于合成的生物分子、细胞成分和经生物制药的药物。

[0094] 依据本发明的第三方面,提供制备如上文描述的固体支持物的方法,该方法包括用促进从表面回收生物材料的化学混合物溶液涂布支持物的至少一个表面,其中的化学混合物是选自聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和吐温 20、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和白蛋白、吐温 20 和白蛋白、聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PEOX) 和吐温 20、聚-2-乙基-2-噁唑啉 PEOX 和白蛋白、聚乙烯亚胺 (PEI) 和吐温 20,以及聚乙烯亚胺 (PEI) 和白蛋白的混合物。

[0095] 在一个方面,固体支持物是纸,优选是纤维素纸,诸如 903 Neonatal STD 纸。

[0096] 依据本发明的第三方面,提供如上文描述的固体支持物用于促进从其表面回收生物材料的应用。

[0097] 在一个方面,生物材料是经生物制药的药物。

[0098] 图的简述

[0099] 图 1 表示从施用于各种纸基质的干血斑点回收外源性添加的 IL-2。

[0100] 图 2 表示从施用于涂有多种化学品的 903 Neonatal STD 纸的干血斑点回收外源性添加的 IL-2。

[0101] 图 3 表示从施用于涂有成对化学品的组合的 903 Neonatal STD 纸的干血斑点回收外源性添加的 IL-2。

[0102] 发明详述

[0103] 将重组 IL-2 载体 (R & D Systems; 分别为 Cat. 202-IL-CF-10 μ g; lot AE4309112 和 Cat. 202-IL-10 μ g; lot AE4309081) 以 50 pg 或 100 pg/ μ l 溶解于没有钙和镁的 Dulbecco's PBS (PAA; Cat. H15-002, lot H00208-0673)、EDTA-抗-凝结的人、兔或马血液 (TCS Biosciences) 的任一种中。

[0104] 将等分试样 (1 μ l, 含 0, 50 或 100 pg 的 IL-2) 施用于以下的 GE Healthcare 滤纸; 903 Neonatal STD 纸卡, Cat. 10538069, lot 6833909 W082; DMPK-A 纸卡, Cat. WB129241, lot FT6847509; DMPK-B 纸卡, Cat. WB129242, lot FE6847609 和 DMPK-C 纸卡, Cat. WB129243, lot FE6847009。使样品于环境温度和湿度下干燥过夜。

[0105] 采用适当尺寸的 Harris 单一-芯打孔器 (Uni-core punch) (Sigma, Cat. Z708860-25ea, lot 3110) 从每片纸型 (paper type) 压出穿孔片 (3 mm 直径)。将单片的孔片置于得自人 IL-2 Quantikine ELISA (R & D Systems, Cat. D0250, lot 273275) 的 IL-2 微量滴定板的各孔中。这些板涂有小鼠抗 IL-2 的单克隆抗体。用补充了 Quantikine 试剂盒的分析缓冲液 (100 μ l) 从穿孔纸片洗提 IL-2 蛋白质。依据 Quantikine 试剂盒提供的说明书,采用“纸内”方法 (将穿孔纸片直接置于分析缓冲液中并在原位直接洗提被分析物),进行所有后续步骤。在完成分析时,采用 Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent 于 450 nm 监测微量滴定板的光密度。通过将监测值与已知 IL-2 浓度的标准曲线比较来测定 IL-2 的回收。针对每次单个实验制备新的 IL-2 标准曲线。

[0106] 额外的实验包括在纸卡已经饱和浸渍于数种化学品溶液 (如下所述) 之后,将掺加 (spiked) IL-2 的血液添加至 903 Neonatal STD 纸卡。在某些情况下,也将纸饱和浸渍于含数种这些化学品的混合溶液中,以测定化学品对自干血斑点回收 IL-2 是否表现出任何相加或协同效应。

[0107] 所用的化学品

[0108] 以下给出化学品及它们的来源的目录。

- [0109] 聚-乙烯基-醇 (Sigma ;Cat. P8136, lot 039k0147)。
- [0110] 聚-乙烯亚胺,50%的水溶液 (Fluka ;Cat. P3143, lot 29k1492)。
- [0111] 聚-乙烯基-吡咯烷酮,1%的水溶液 (Sigma ;Cat. PVP40-100 mg,lot 11pk0097)。
- [0112] 菊粉,1%的水溶液 (Sigma ;Cat. I2255-100 g, lot 079F7110)。
- [0113] 聚-2-乙基-2-噁唑啉,1 %的水溶液 (Aldrich Cat. 372846,lot 30498PJ)。
- [0114] 吐温 20,1%的水溶液 (Sigma, Cat. P7949-100 ml, lot. 109k01021)。
- [0115] α - β -海藻糖,10 mg/ml (Sigma, Cat. T0299-50 mg, lot 128k1337)。
- [0116] 白蛋白,1%的水溶液 (Sigma, Cat A2153-10 g, lot 049k1586)。
- [0117] 来自牛奶的酪蛋白,1%的水溶液 (Sigma, Cat. C5890-500 g, lot 089k0179)。
- [0118] 聚-乙二醇 1000,1%的水溶液 (Biochemika, Cat. 81189, lot 1198969)。
- [0119] 聚-乙二醇 200,1%的水溶液 (Fluka, Cat. 81150, lot 1384550)。

[0120] 实验结果

[0121] 当将 IL-2 溶解于 EDTA-抗-凝血液时,903 和 DMPK-C 纸卡利于 45 - 55% 的细胞因子回收,而仅从 DMPK-A 和 B 纸卡回收 2 -3 % (参见表 1 和图 1)。903 和 DMPK-C 纸卡为基础原纸 (basic base papers) 并未浸渍或涂有任何化学品,而 DMPK-A 和 B 纸卡涂有专有的化学品的混合物,其分别利于蛋白质、微生物和细胞的变性和失活。已经将 DMPK-A 和 B 纸卡设计为利于核酸的储存。因此,在使用 DMPK-A 和 B 纸卡时所观察到的低 IL-2 回收水平,可真实地反映所使用的这些变性剂和 ELISA-基抗体检测系统的存在。ELISA 检测系统需要洗提的 IL-2,以表现出完整的原生结构。

[0122] 表 1 - 从施予各种纸型的干血斑点回收外源性添加的 IL-2。对每一种纸型 ± 载体比较 p- 值。载体的存在对 IL-2 的回收没有显著的作用 (p- 值 > 0.05)。

[0123]

纸型	IL-2 回收(%)	p-值
903; 减载体	46.9 ± 13.3	> 0.05
903; 加载体	50.7 ± 5.8	
DMPK A; 减载体	2.0 ± 0.0	> 0.05
DMPK A; 加载体	2.0 ± 0.0	
DMPK B; 减载体	2.0 ± 0.0	> 0.05
DMPK B; 加载体	2.0 ± 0.0	
DMPK C; 减载体	53.9 ± 4.8	> 0.05
DMPK C; 加载体	45.2 ± 5.4	

[0124] 当将细胞因子溶解于无关所用的纸型的磷酸盐缓冲盐液 (PBS) 中时,没有观察到 IL-2 的回收 (数据未显示)。在缺乏添加的 IL-2 时观察到的 IL-2 回收水平基本上相当于背景水平,表明 EDTA-抗-凝血液含可以忽略量的内源性 IL-2 (数据未显示)。

[0125] 数种化学品被用于饱和浸渍 903 Neonatal STD 纸卡,与未浸渍的纸相比,其中一些表现出利于提高的 IL-2 水平的回收 (p- 值 < 0.05)。对于 903 Neonatal STD 纸卡 (表

2 和图 2) 而言, 化学品, 诸如聚-乙烯基-醇、聚-乙烯基-吡咯烷酮、聚-2-乙基-2-噁唑啉、吐温 20、 α - β -海藻糖、白蛋白和酪蛋白利于 IL-2 增多的平均回收率 > 55 %, 与之相比的是, 在相应的未浸渍的纸中观察到平均回收率为 ~ 45%。

[0126] 表 2 - 从施予涂有各种化学品的 903 Neonatal STD 纸的干血斑点回收外源性添加的 IL-2。该表源于 2 个独立的实验 ($n = 6$)。p- 值比较源于浸渍的纸的值与那些源于未浸渍的 903 纸的值。

[0127]

化学品	IL-2回收 (%)	p-值
未浸渍的	44.9 \pm 6.5	n/a
聚-乙烯基-醇 (PVA)	62.6 \pm 11.2	< 0.05
聚-乙烯亚胺 (PEI)	41.8 \pm 6.0	> 0.05
聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP)	62.0 \pm 10.9	< 0.05
菊粉	50.4 \pm 7.6	> 0.05
聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX)	66.1 \pm 12.6	< 0.05
吐温 20	67.1 \pm 9.0	< 0.05
α - β -海藻糖	54.8 \pm 8.6	< 0.05
白蛋白	73.8 \pm 13.6	< 0.05
酪蛋白	55.0 \pm 7.8	< 0.05
聚-乙二醇 1000 (PEG 1000)	42.5 \pm 9.1	> 0.05
聚-乙二醇 200 (PEG 200)	43.3 \pm 11.0	> 0.05

[0128] 用两种不同的化学品的组合饱和浸渍 903 Neonatal STD 纸, 指示对 IL-2 回收水平的相加效应。例如, 表 2 证明, 涂有吐温 20 和白蛋白的 903 Neonatal STD 纸的回收率分别为 67 % 和 74 %。这些数字分别比相同的未浸渍的 903 纸高 22% 和 29%。表 3 显示当将含有外源性添加的 IL-2 的干血斑点施加于用两种化学品共同浸渍的 903 Neonatal STD 纸时的细胞因子回收。涂有吐温 20/ 白蛋白的纸的回收值是 92 %, 其表明与相应的未浸渍的纸比较时增加 ~ 40%。

[0129] 当 903 纸用以下化学品的组合共同浸渍时, 观察到显著增加的 IL-2 回收率 (p - 值 < 0.05): 聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP) 和吐温 20; 聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP) 和白蛋白; 吐温 20 和白蛋白; 聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX) 和吐温 20; 聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX) 和白蛋白; 聚-乙烯亚胺 (PEI) 和吐温 20 以及聚-乙烯亚胺 (PEI) 和白蛋白。

[0130]

化学品	IL-2回收 (%)	p-值
未浸渍的	50.7 ± 4.9	n/a
聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP) 和聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX)	48.1 ± 13.4	> 0.05
聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP) 和吐温 20	79.4 ± 18.8	< 0.05
聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP) 和白蛋白	70.5 ± 13.2	< 0.05
吐温 20 和白蛋白	92.0 ± 11.0	< 0.05
聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX) 和吐温 20	80.9 ± 21.1	< 0.05
聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX) 和白蛋白	89.3 ± 18.9	< 0.05
聚-2-乙基-2-噁唑啉 (PeOX) 和聚-乙烯亚胺 (PEI)	61.8 ± 15.8	> 0.05
聚-乙烯亚胺 (PEI) 和吐温 20	66.8 ± 6.2	< 0.05
聚-乙烯亚胺 (PEI) 和白蛋白	75.8 ± 13.1	< 0.05
聚-乙烯基-吡咯烷酮 (PVP) 和聚-乙烯亚胺 (PEI)	56.4 ± 11.0	> 0.05

[0131] 表 3 - 从施予涂有成对的化学品组合的 903 Neonatal STD 纸的干血斑点回收外源性添加的 IL-2 (n = 4)。

[0132] 在描述本发明优选的示例性实施方案时,本领域技术人员将会明白,可通过不同于所描述的实施方案实践本发明,所述不同的实施方案的呈现仅为了举例说明的目的,而并非限制。本发明仅受限于以下的权利要求书。

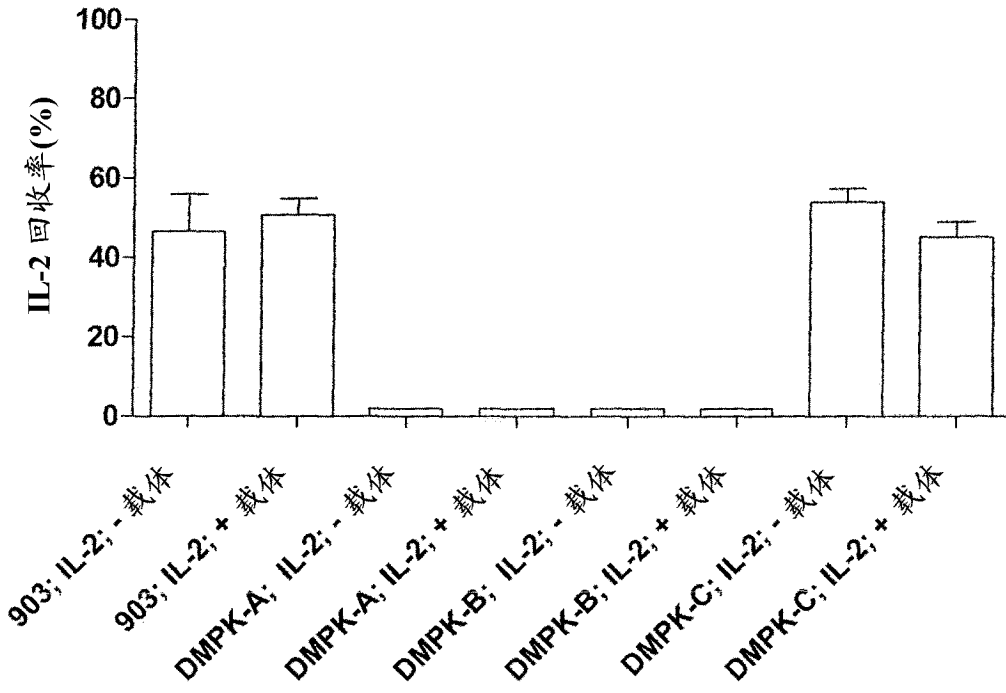


图 1

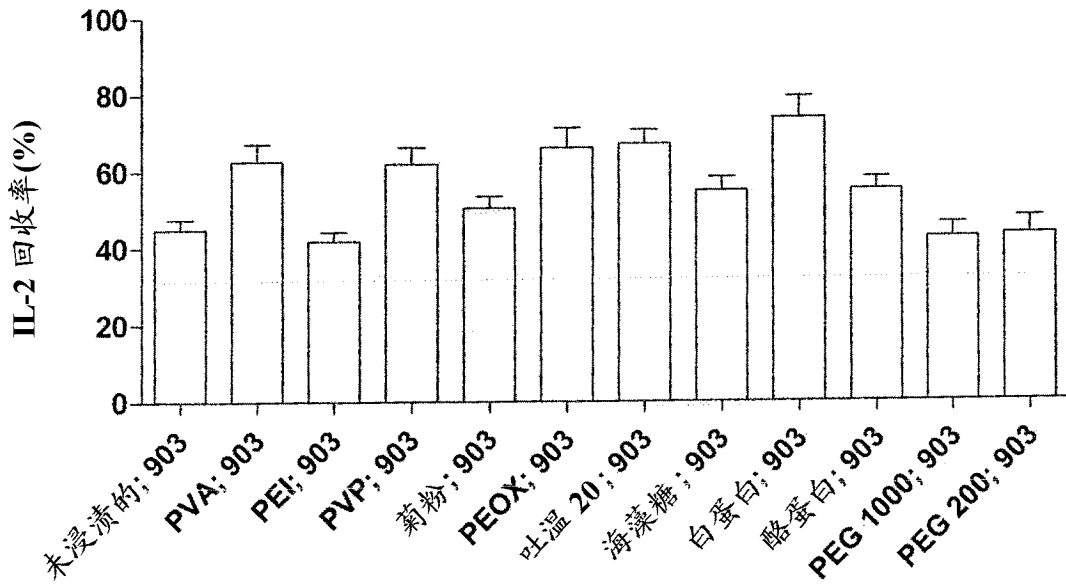


图 2

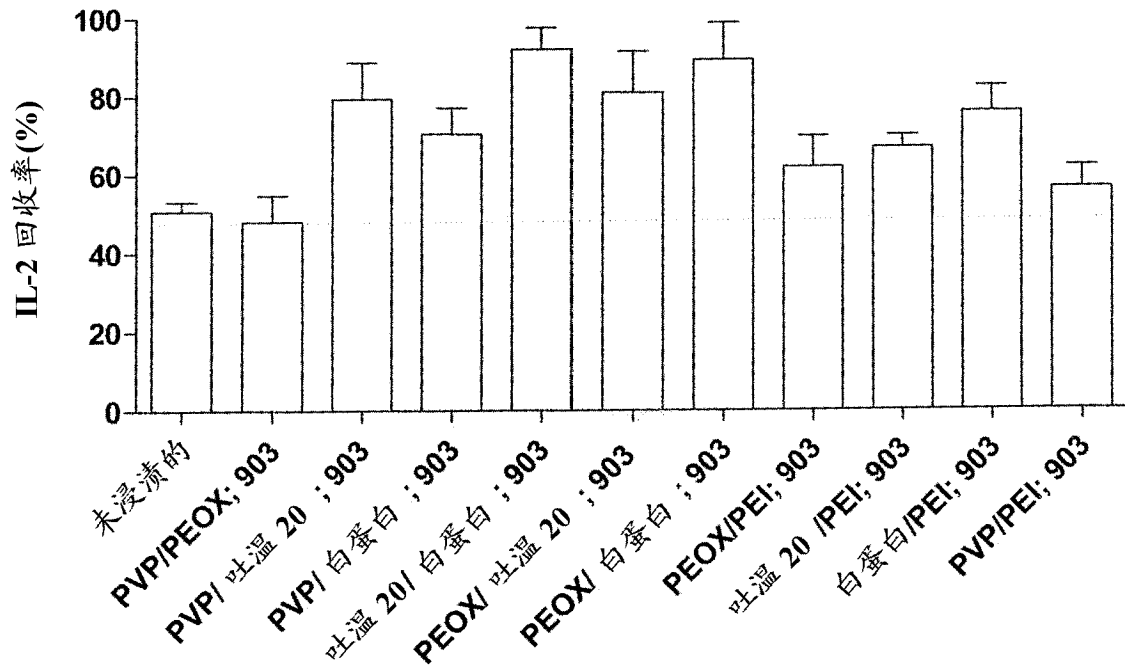


图 3