(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110068677 A
(43)申请公布日 2019.07.30

(21)申请号 201910037871.3

(22)申请日 2014.03.14

(30)优先权数据
61/783,189 2013.03.14 US
13/938,055 2013.07.09 US

(62)分案原申请数据
201480025377.0 2014.03.14

(71)申请人 赛维德恩特有限公司
地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 艾米丽·斯坦 布鲁斯·菲尔普斯 罗伯特·普莱斯 迪娜·尤兹丽

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 王子晔 姚开丽

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
C12Q 1/6834(2018.01)

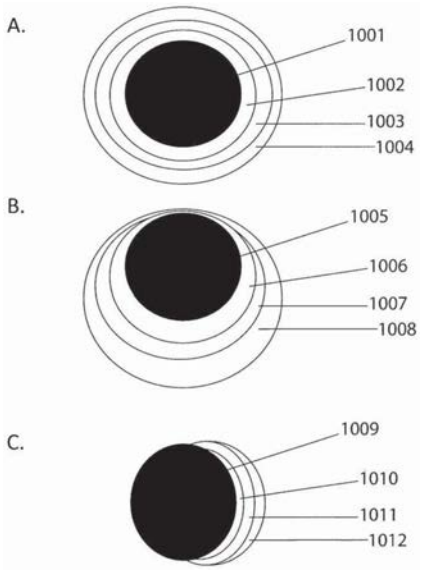
权利要求书1页 说明书21页 附图9页

(54)发明名称

固相上的分子网

(57)摘要

披露一种用于从样品中特异性且灵敏地捕获分析物的包括捕获分子、连接子及间隔子的共价连接的多层三维基体。还披露一种用于从样品中特异性且灵敏地捕获多于一种类型的分析物的分子网，其包括共价连接的多层三维基体，该基体包括多于一种类型的捕获分子和多于一种类型的连接子，且可以包括一个或多个间隔子。分子网可以包括伪随机性质。在分子网中使用不同的捕获分子、连接子及间隔子可以给予分子网独特的结合特性。分子网的孔隙率、结合亲和力、大小排除能力、过滤能力、浓缩能力及信号放大能力可以改变，并且取决于分子网制造中所使用的组分的性质。分子网的用途可包括分析物捕获、分析物富集、分析物纯化、分析物检测、分析物测量及分析物递送。



CN 110068677 A

1.一种用于捕获分析物的装置,该装置包括:

一个固相;以及

一个分子网,该分子网联接至该固相的表面的至少一部分上,该分子网包括至少一种类型的捕获分子,这些捕获分子通过多种类型的连接分子联接至彼此,以便形成一个共价连接的多层三维基体,这些捕获分子被配置用于结合该分析物。

2.如权利要求1所述的装置,其中该固相由塑料、聚合物、薄膜、胶态金属、二氧化硅、碳纳米管、蛋白质、碳水化合物、脂质、核酸、细胞以及组织中的一种或多种制成。

3.如权利要求1所述的装置,其中该固相包括纳米材料、修饰的金属表面、纳米球、微球、微量滴定板、载玻片、移液管、盒、筒、圆盘、探针、横流装置、微流体装置以及光学纤维中的一种或多种。

4.如权利要求1所述的装置,其中该分子网被预先制造并且吸附至该固相的该表面上。

5.如权利要求1所述的装置,其中该分子网被共价连接至该固相的该表面上。

6.如权利要求1所述的装置,其中该分子网被直接构建在该固相的该表面上。

7.如权利要求1所述的装置,其中这些捕获分子包括抗体、核酸探针、酶类、重组蛋白以及肽中的一种或多种。

8.如权利要求1所述的装置,其中这些捕获分子包括用于结合该分析物的多个表位的多种单克隆抗体。

9.如权利要求1所述的装置,其中这些捕获分子是针对多种相互确认的分析物。

10.如权利要求1所述的装置,其中这些连接分子包括同双功能的、异双功能的、三功能的以及多功能的类型中的一种或多种。

固相上的分子网

[0001] 本申请是申请日为2014年3月14日，申请号为201480025377.0，发明名称为“固相上的分子网”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年3月14日提交的美国临时申请序列号61/783,189的权益，并且是2012年3月22日提交的美国专利申请序列号13/511,364和2013年7月9日提交的美国专利申请序列号13/938,055的部分继续申请，以上申请的全部内容通过引用结合在此。

背景技术

[0004] 存在的用于固相分析物捕获、分析物检测以及分析物测量的当前策略使用吸附至或共价键结至表面上的单层捕获分子以用于直接实时感测，或者以间接检测模态与二次检测步骤结合使用，这些策略在本领域中是众所周知的。直接和间接方法都示出在灵敏度、特异性、信噪比和/或成本上的局限性。

[0005] 存在对用于固相表面或装置的分析物捕获技术的需要，该技术可以在很少或没有样品制备的情况下从复杂样品中选择性地捕获分析物并且将所述选择的分析物以最大化捕获分析物测量和/或检测的方式定位，其方式为与大部分技术兼容。

发明内容

[0006] 描述了用于捕获分析物的装置。在一个实施例中，一个装置可以包括一个固相和一个分子网，该分子网被联接至该固相的表面的至少一部分上。该分子网可以包括至少一种类型的多个捕获分子，这些捕获分子通过多种类型的多个连接分子彼此联接，以便形成一个共价连接的多层三维基体。这些捕获分子可以被配置用于结合该分析物。

[0007] 还描述了一种制造用于捕获分析物的装置的方法。在一个实施例中，一种方法可以包括提供一个固相，并且将一个分子网放置在该固相的表面的至少一部分上。该分子网可以包括至少一种类型的多个捕获分子，这些捕获分子通过多种类型的多个连接分子彼此联接，以便形成一个共价连接的多层三维基体。这些捕获分子可以被配置用于结合该分析物。

[0008] 还描述了测量样品中的分析物的量的方法。在一个实施例中，一种方法可以包括提供一个或多个装置，每个装置包括一个固相和一个分子网，该分子网覆盖该固相的表面的至少一部分。该分子网可以包括至少一种类型的多个捕获分子，这些捕获分子通过多种类型的多个连接分子彼此联接，以便形成一个共价连接的多层三维基体。这些捕获分子被配置用于结合该分析物。该方法还包括将这些装置暴露于该样品，并且允许该分析物的至少一部分结合这些装置的分子网的捕获分子。

附图说明

[0009] 图1示出在IgG纯化中传统轭合微颗粒与分子网微颗粒的比较；

[0010] 图2示出传统捕获分子与微颗粒的轭合以及相对应的分析物测量能力；

[0011] 图3示出分子网微颗粒在测量分析物中的有效性；

[0012] 图4示出具有拓扑结构的分子网在测量分析物中的有效性；

[0013] 图5示出在Tau ELISA中传统轭合微颗粒与分子网微颗粒的比较；

[0014] 图6示出在TSH Luminex夹心免疫测定中传统轭合微颗粒与分子网微颗粒的比较；

[0015] 图7示出颗粒上的示例性分子网；

[0016] 图8示出颗粒上的示例性分子网拓扑特征；

[0017] 图9示出用于分析物递送的示例性分子网；

[0018] 图10示出分子网在样品纯化中的使用；

[0019] 图11示出分子网在分析物测量工具或诊断工具中的使用。

具体实施方式

[0020] 美国专利序列号61/281,991、61/337,257、61/340,287、61/343,467、61/410,837、61/489,646以及61/489,648中已示出构造和使用一个共价连接的伪随机多层三维基体使得能够快速且特异性地捕获来自未处理样品的蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、细胞或者其他分析物，并且示出使用这种分子网可能是对常规分析物结合方法的明显改进，这些专利中的每一个通过引用结合在此。

[0021] 分子网的设计和制造

[0022] 分子网的特性可以通过以下赋予：选择以供使用的捕获分子(捕获分子的实例可以包括抗体、核酸探针、酶类、重组蛋白、肽以及其他)；所述捕获分子赋予的所得特异性；选择的捕获分子的大小和数量；捕获分子在该或这些分子网层中的放置和间隔；捕获分子的组合；可以使用捕获分子的顺序；以及使用的捕获分子与连接分子和间隔分子的比率。

[0023] 分子网的特性还可以通过以下赋予：选择以供使用的连接分子(连接分子的实例包括同双功能的、异双功能的、三功能的以及多功能的类型)；连接分子的化学特异性；连接分子的埃长度；连接分子的组合；可以使用连接分子的顺序；以及使用的捕获分子与连接分子和间隔分子的比率。

[0024] 分子网的特性还可以通过以下赋予：选择以供使用的间隔分子(间隔分子的实例包括PEG、聚合物、核酸、白蛋白、Fc区、肽以及其他)；间隔分子的化学特性；间隔分子的大小和数量；可以使用间隔分子的顺序；以及使用的间隔分子与连接分子和捕获分子的比率。

[0025] 捕获分子、连接分子以及间隔分子的放置和间隔可以：给予在分子网表面上的特征拓扑结构；给予在一个分子网的每个层中的特征密度；给予分子网的特征孔隙率；消除空间限制和由此的空间位阻；改进结合能力；减少非特异性结合；使得能够结合多种形式的分析物(例如，同时捕获降解的分析物、完整分析物以及复合的分析物)，以及其他。

[0026] 分子网中的孔隙可以是随机的、伪随机的、或者不规则散布的。分子网的孔隙可以用于过滤样品；可以用于通过大小排除来区分样品中的结合势分子；可以用于实现由于空间位阻减少，大分子或细胞的结合、或者其他。分子网的孔隙包含多个捕获分子、多个连接分子，并且可以包含多个间隔分子。在固相上产生孔隙的传统方法涉及对固相表面的机械修饰，并且采用如激光刻蚀、层压、平板印刷、激光打印或者其他的方法来在固体表面中产生孔隙、孔、或者其他结构。随后制备这种固体表面以用于接收轭合捕获分子。使用分子网消除了对表面的机械修饰的需要，并且因此是更有成本效益的。此外，传统方法仍受到高非

特异性结合的问题的妨碍，并且需要结合至机械修饰的固相上的捕获化学品，这不是一个改进。此外，与传统捕获形式相比，由于由分子网的每个层中建立的孔隙率给予的大小排除特性，柔性可赋予至分子网中。在一些层中，孔隙直径和深度可以是类似的或者可以根据应用而变化。在一些层中，孔隙大小可以改变，孔隙大小的变化可以取决于应用。

[0027] 可以被赋予在一个分子网上的孔隙可以包括但是不限于皮孔、纳米孔、微孔、滤孔、筛孔、袋或者其他。可以通过选择特异性捕获分子、连接分子以及间隔分子以及将它们并入分子网的每个层中的方法来将孔隙赋予到分子网中。还可以通过选择以及并入用于制造连续层的特异性捕获分子、连接分子以及间隔分子的方法来将孔隙赋予到分子网中。

[0028] 基于层中使用的捕获分子、连接子以及间隔子的性质，分子网孔隙的直径范围可以从约6埃至大于约1um。在一些情况下，分子网的孔隙可以包括一个孔隙直径范围。示例性直径范围可以是从约5nm至约50nm、从约10nm至约100nm、从约50nm至约200nm、从约250nm至约500nm、从约500nm至约1um以及从约800nm至约1.5um。

[0029] 在一些情况下，捕获分子可以用于在分子网中产生孔隙。在这些实例中，可在将捕获分子并入分子网层之前，将捕获分子预先连接至彼此。在一些情况下，可基于间隔臂的埃长度选择连接子。在一些实例中，可以使用增充剂将一个第一连接子连接至一个第二连接子上，以便产生一个长的多功能连接子。在一些情况下，间隔子可以用于在分子网中产生孔隙。也可在将间隔子并入分子网层之前，将间隔子预先连接至彼此。在其他实例中，惰性物理插栓可以用于构造孔隙，借此每个物理插栓可以被放置在一个先前构造的层上，同时构建一个新的层。在固化后，可以移除这些物理插栓，因此留下特定直径的孔隙。

[0030] 分子网的柔性性质使得能够使用多种类型的捕获分子。在一些实例中，分子网包括单一类型的捕获分子。在其他实例中，分子网包括多种类型的捕获分子。在一些实例中，在分子网的制造过程中使用多于一种单克隆抗体使得所述分子网能够结合分析物的多于一个表位。多于一种类型的表位特异性捕获分子的使用能够实现分子网分析物捕获的改进，并且与该分子网的性能相关。在一些实例中，多于一种核酸序列的使用可以在制造过程中用于产生能够结合分析物的多于一个表位的分子网。有益的实例取决于分子网的使用，并且可以包括当用于测试中时，在检测的最低水平、灵敏度、阳性预测值、阴性预测值、对降解样品起作用的能力、对各种不同群体起作用的能力以及其他方面的改进的性能；可以包括当用作纯化工具时，在结合能力、纯度、结合动力学、目标分析物耗尽以及其他方便的改进的性能；或者其他。

[0031] 在一些实例中，针对相互确认的分析物的捕获分子的使用可以被用在分子网中并且与该分子网的性能相关。分子网中相互确认的捕获分子的使用可以以一种确认的方式来使用，借此多于一种分析物的捕获可以提供统计上更显著的阳性结果；可以提供更稳定的测试结果；可以提供关于样品的另外的信息；以及其他。分子网中相互确认的捕获分子的使用还可以用于限定样品，或者可以在测试中用作对照物，或者可以用于测量有关疾病状态的多于一个相关分子变量，或者可以用于测量有关疾病治疗的多于一个相关分子变量。

[0032] 分子网可以被制造用于从样品同时捕获的相互确认分析物的实例可以包括：基因序列和相对应的蛋白质产物(例如，在BRCA1和BRCA1蛋白中的癌症相关SNP)；mRNA和相对应的蛋白质产物(例如，人类乳糖酶mRNA和乳糖酶蛋白)；基因序列和相对应的mRNA产物(例如，LMNA中的疾病相关SNP以及预剪接的或剪接的核纤层蛋白A/C mRNA)；miRNA和相关的

mRNA或者蛋白质产物(miR 9和REST、或者CoREST mRNA、或者miR 9和REST蛋白)；小分子药物和药物靶标(托法替尼和两面神激酶)；表位特异性生物制剂和对应的靶标(例如抗-TNF抗体和循环TNF细胞因子)；表位特异性抗体、表位特异性T细胞和/或表位特异性B细胞等(例如，抗-DNA自身抗体、抗-DNA $CD4^+$T细胞和/或抗-DNA B细胞)；或者其他。有益的实例取决于使用并且可以与在测试灵敏度、阳性预测值、阴性预测值、特异性、疾病的诊断、对经历遗传漂变的样品起作用的能力、响应于治疗的测量能力、测量治疗剂有效性的能力、或者其他方面的改进的性能相关。

[0033] 在一个实例中，分子网可以按捕获和定位结合分析物的方式来制造，其方式为增强可检测信号的强度或者可以增强对结合分析物的检测，如当在利用光学检测的测试中使用时。通过预先定位的分层捕获分子将捕获的分析物以分层的方式放置能够通过信号强化来快速检测分析物。通过分子网实现的信号强化的实例可以涉及荧光、荧光共振能量转移、吸光度、发光、光散射、表面等离子体共振、光外差检测、或者其他。

[0034] 可以设计和制造所述分子网来替代对用于超灵敏检测的昂贵又费时的方法的需求，这些方法如PCR、分支DNA、或信号放大所需的多步检测方法。还可以设计和制造所述分子网来替代对昂贵且复杂的分析装置的需求。

[0035] 通常，并入三维分子网基体中的捕获分子的数量小于或等于使用常规方法以二维方式轭合至表面上的捕获分子的数量。二维捕获分子表面轭合物可以依赖于使用单类型连接子或者可以依赖于连续使用2种连接子来将捕获分子轭合至固体表面上。在制造分子网的层的过程中，多种类型的连接子同时用于将捕获分子连接至一个新层的捕获分子上，并且将新层的连接的捕获分子连接至先前层的间隔子或捕获分子上。可以在放置到固体表面上之前在溶液中制造分子网。预先制造的分子网可以被吸附或共价连接至固体表面上。还可将分子网直接逐层制造到固体表面上。可以使用非共价(静电的、范德华力或者其他)或共价方法将所述分子网放置在固体表面上。在一些实例中，聚苯乙烯、聚氨酯、聚乙烯、或经处理的表面如聚左旋赖氨酸涂覆表面、包含-COOH、NHS、胺或其他的修饰表面可购自商业来源(供应商的实例可以包括赛默公司(Thermo)、密理博公司(Millipore)、路明克斯公司(Luminex)和其他公司)并且用作用于分子网放置的固相表面。在其他实例中，固相表面可以通过化学品(如酸)进行预处理，以便激活表面部分并且因此在固相表面与分子网的反应性部分之间产生附接点。在一些实例中，可以利用连接子对固相进行预处理，以便将固相表面共价连接至分子网。

[0036] 用于在固相表面上使用的分子网的设计和制造可以产生通过每个层中的共价连接体固定的捕获分子的一个共价连接的多层三维基体。设计和制造可以以顺序的方式发生，其中制造一个第一层并且以顺序的方式制造后续层，借此每个层可以按共价的方式互连，以便提升结构完整性、拓扑结构、孔隙率和/或稳定性。可选择单独捕获分子、连接子以及间隔子以促成分子网的一个或多个特性。特性可以包括分析物特异性、热稳定性、层厚度、孔隙直径、吸光度、光谱、发射光谱、固相相容性、或者其他。

[0037] 已知长度和宽度的捕获分子和连接分子以及间隔子的使用可以用于在分子网的表面上产生不同的拓扑结构。可以被赋予到分子网上的拓扑特征可以包括但不限于波纹、麻点、网点、孔隙、丘状隆起、分支、长丝、纤维、裂痕、凸起区段、或者其他，并且可以在分子网中以随机、伪随机、或者不规则的方式排列。

[0038] 分子网的拓扑特征可以通过使用捕获分子和连接子;捕获分子、连接子和间隔子;或者连接子和间隔子产生。在一些情况下,捕获分子可以用于产生分子网的拓扑特征。在这些实例中,可在将捕获分子共价并入分子网层之前,将捕获分子预先连接至彼此。在一些情况下,可基于间隔臂的埃长度选择连接子。在一些实例中,可以使用间隔子将一个第一连接子连接至一个第二连接子上,以便产生一个长的多功能连接子。在一些情况下,间隔子可以用于在分子网中产生拓扑结构。也可在将间隔子并入分子网层之前,将间隔子预先连接至彼此或者连接至捕获分子。

[0039] 可以设计和制造分子网以便将如亲和力、大小排除、过滤、荧光以及其他的特征赋予分子网的每个层中。可以基于大小、长度、直径、厚度、光学特性、化学特性或者其他来选择特异性捕获分子、连接分子以及间隔分子,以便在制造过程中将特征赋予分子网中。

[0040] 可以以一种方式来制造分子网,借此一个或多个捕获分子在共价连接多层三维基体中可以提供结构作用,可以提供结构作用和分析物捕获的作用两者。捕获分子的一些实例可以在分子网中用于结构和/或分析物捕获作用。

[0041] 通过针对每个层的制造过程中所使用的捕获分子、连接子和间隔子的直径、宽度和/或长度,可以部分地确定分子网的每个层中的捕获分子之间的距离,借此在每个连接-捕获-间隔分子之间的摩尔关系可以是类似的或者可以是不同的,并且所述分子的选择可以取决于待捕获的分析物的大小和/或形状、用于测量捕获的分析物的方法和/或所希望的用途。

[0042] 可以以一种方式设计和制造分子网,借此在所述分子网的一个层中每个捕获分子、连接子以及间隔子组分可以具有等效的或非等效的摩尔比。可以不时地改变所述组分之间的摩尔比以便在每个层中产生孔隙或其他拓扑特征。所述孔隙和拓扑特征可以具有一个直径范围并且可以具有一个相关联的深度范围。分子网组分之间的摩尔比的变化可能在分子网的单个层中发生,或者可能在分子网的多于一个层中发生,并且取决于分子网的预期用途。

[0043] 表1.具有分析物捕获能力的分子网结构组分的实例

[0044]

分子网结构/捕获组分的实例	近似直径（nm）	近似长度（nm）
IgG、IgE	约 9	16
IgM	37	37
IgA	约 9	约 32
链霉亲和素和重组变体	约 105(四聚物的)	N/A
蛋白 A 和重组变体	约 3.2-5.3	N/A
蛋白 G 和重组变体	约 3-5.4	N/A
MHC I	3.05	N/A

[0045]

MHC II	2.99	N/A
TCR	3.34	N/A
CD28	2.75	N/A
TLR 4	2.62	N/A
B7x	4.52	N/A
Taq 聚合酶	约 6.49	N/A
聚(Arg_9)肽	1.43	N/A
HSP70	3.46	N/A

[0046] 表2中提供了在设计和制造过程中可能考虑到的分析物尺寸的一些实例。分子网表面化学、孔隙直径、拓扑结构、分层、或者其他的设计和制造可以基于分析物形状;分析物结构、分析物亚型、分析物荷载、具有其他分子的分析物复合物形成以及其他形式。此外,分子网可以被设计和制造用于结合和捕获所述分析物,或者可以被设计和制造用于排除所述分析物。分析物和分析物大小的实例可以见于表2中。

[0047] 表2.分析物以及它们的尺寸的实例

[0048]

示例性分析物	近似直径（um）	近似长度（um）
大肠杆菌（E. coli）	0.5	1-2
克雷白氏杆菌属（Klebsiella spp）	0.3-1	0.6-6
假单胞菌属（Pseudomonas spp）	0.6	3
金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus）	1	1
金黄色葡萄球菌（簇）	>10	>10
肠毒素 K	约 4.29	N/A

[0049]

肽聚糖，革兰氏阴性菌	约 2-3，物种依赖性的	高度物种依赖性的
外膜，革兰氏阴性菌	约 7，物种依赖性的	物种依赖性的
IgG、IgE	0.009	0.016
IgA	0.009	0.032
IgM	0.037	0.037
B 细胞-细胞周期的 G0 期	4.5-5.5	N/A
B 细胞-细胞周期的 G1 期早期	5.5-7	N/A
B 细胞-细胞周期的 G1 期晚期和 S 期	7-10	N/A
B 细胞-细胞周期的 S 期晚期、G2 期以及 M 期	10-12	N/A
单核细胞	约 9-18	N/A
巨噬细胞	21，激活水平依赖性的	N/A
嗜中性细胞	7.17-9.3，激活水平依赖性的	N/A
IL6 单体	约 4.11	N/A
IL6 多聚体（可变的）	约 6.16	N/A
IL10 单体	约 3.88	N/A
IL10 多聚体（可变的）	约 7.7	N/A
微小 RNA-146a	约 3-6	约 7-9

[0050] 包含结构组分和捕获组分的分子网可以按共价连接的三维(3D)多层基体排列并且可以涉及捕获一种或多种分析物，该一种或多种分析物与以下特征中的一个或多个相关：表面化学；分析物形状；分析物结构；分析物亚型；分析物荷载；翻译后修饰；化学修饰；活性；或者其他。

[0051] 分子网可以包含结构组分，这些结构组分还以与分析物的捕获有关的方式起作用，并且可以通过共价连接子排列在分子网的互连3D多层基体中。分子网还可以包含间隔

子以将所述结构分子/捕获分子互连，其方式为最大化结构增强、稳定性和/或特异性分析物捕获能力。包含捕获组分/结构组分、连接子和间隔子的分子网实例在表3中呈现。

[0052] 分子网的制造是独特的，因为捕获分子通过共价连接分子固定在3D基体中。在大量的研究中，已证明分子网具有改进的热稳定性，并且延长保存期超过传统的捕获技术。

[0053] 表3.分子网以及它们的用途的实例

[0054]

待捕获的分析物	用于亲和力捕获的捕获分子	产生大小排除的方法	预期用途
大肠杆菌	针对表面抗原（例如，LPS、O-抗原、菌毛蛋白、其他）的抗体；针对染色体和/或质粒DNA的PNA探针	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子	诊断：食品安全、传染病、水安全；分子工具：多种微生物采样、微生物组采样、分子生物学
克雷白氏杆菌属	针对表面抗原的抗体（例如，LPS、其他）；针对染色体和/或质粒DNA的PNA探针	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子	诊断：食品安全、传染病、水安全；分子工具：多种微生物采样、微生物组采样、分子生物学
假单胞菌	针对表面抗原（例如，LPS、V抗原、其他）、分泌物质（例如，热休克蛋白、藻酸盐、其他）的抗体；针对染色体和/或质粒DNA的PNA探针	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子	诊断：食品安全、传染病、水安全；分子工具：多种微生物采样、微生物组采样、分子生物学
金黄色葡萄球菌	针对表面抗原（例如，蛋白A、肽聚糖、其他）	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子	诊断：食品安全、传染病、水安全；分子工具：多种微生物采样、微生物组采样、

[0055]

	、分泌物质（例如，热休克蛋白、外毒素、其他）的抗体；针对染色体和/或质粒 DNA 的 PNA 探针		分子生物学
金黄色葡萄球菌（簇）	针对表面抗原（例如，蛋白 A、肽聚糖、其他） 、分泌物质（例如，热休克蛋白、外毒素、其他）的抗体；针对染色体和/或质粒 DNA 的 PNA 探针	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、更长的间隔子	诊断：食品安全、传染病、水安全；分子工具：多种微生物采样、微生物组采样、分子生物学
IgG、IgE	针对 Fc IgG 或 IgE 的抗体；针对 Fab 的抗体；抗原	共价连接的抗体、抗原、共价连接子、间隔子	诊断：免疫应答分析、疫苗接种、抗体滴定；分子工具：免疫学研究、临床前研究
IgA	针对 Fc IgA 的抗体；针对 Fab IgA 的抗体；抗原	共价连接的抗体、抗原、共价连接子、间隔子	诊断：免疫应答分析、疫苗接种、抗体滴定；分子工具：免疫学研究、临床前研究
IgM	针对 IgM 的抗体；针对 5 IgM 的抗体；抗原	共价连接的抗体、抗原、共价连接子、间隔子	诊断：免疫应答分析、疫苗接种、抗体滴定；分子工具：免疫学研究、临床前研究
B 细胞-细胞周期的 G0 期	针对 PAX5、CD19、CD20、CD79a、其他的抗体；抗原；TCR:抗原；MHC I:抗原；MCH II:抗原；细胞因子（例如，IL10、IL6、TGFb、其他）	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子、MHC:抗原复合物、细胞因子	诊断：免疫应答分析、疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究

[0056]

B 细胞-细胞周期的 G1 期早期	针对 PAX5、CD19、CD20、CD79a、其他的抗体；抗原；TCR:抗原；MHC I:抗原；MCH II:抗原；细胞因子（例如，IL10、IL6、TGFb、其他）	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子、MHC:抗原复合物、细胞因子	诊断：免疫应答分析、疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究
B 细胞-细胞周期的 G1 期晚期和 S 期	针对 PAX5、CD19、CD20、CD79a、其他的抗体；抗原；TCR:抗原；MHC I:抗原；MCH II:抗原；细胞因子（例如，IL10、IL6、TGFb、其他）	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子、MHC:抗原复合物、细胞因子	诊断：免疫应答分析、疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究
B 细胞-细胞周期的 S 期晚期、G2 期以及 M 期	针对 PAX5、CD19、CD20、CD79a、其他的抗体；抗原；TCR:抗原；MHC I:抗原；MCH II:抗原；细胞因子（例如，IL10、IL6、TGFb、其他）	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子、MHC:抗原复合物、细胞因子	诊断：免疫应答分析、疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究
巨噬细胞	补体、针对甘露糖受体 Ab 的抗体、抗-Ly6C、或其他；针对 Ml、M2a、M2b、M2c 标志物的抗体；TLR 激动剂；细胞因子；DAMP；PAMP；警报素	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子、MHC:抗原复合物、细胞因子、TLR 激动剂、DAMP、PAMP、警报素	诊断：免疫应答分析、传染病监测；疫苗接种监测；慢性炎性疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究
嗜中性细胞	补体、针对 CD 15、Ly6G、或其他的抗体；针对嗜中性细胞标志物的抗体；TLR 激动剂；细胞因子；DAMP；PAMP；警报素	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子、MHC:抗原复合物、细胞因子、TLR 激动剂、DAMP、PAMP、	诊断：免疫应答分析、传染病监测；疫苗接种监测；慢性炎性疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究

[0057]

		警报素	
细胞因子	针对细胞因子的一个或多个表位的抗体；细胞因子受体的细胞因子结合结构域；针对细胞因子基因和/或细胞因子mRNA的PNA探针；或者其他	共价连接的抗体-IgG、IgM、共价连接子、间隔子，	诊断：免疫应答分析、传染病监测；疫苗接种监测；慢性炎性疾病监测；分子工具：免疫学研究、临床前研究

[0058] 在一些实例中，固相可以是直径范围从约2nm至约200mm的颗粒，并且分子网可以被附接至所述颗粒的表面上。颗粒可以包括：聚苯乙烯、聚乙烯、二氧化硅、复合材料、尼龙、PVDF、硝化纤维、纤维素材料、碳，或者可以是磁性的、顺磁性的、荧光的、条码化的或者其他。

[0059] 分子网可以被吸附或共价连接至颗粒的表面上，其方式为使得在所述分子王网的单层中或者所有层中产生伪随机或有序的孔隙。在最基本的形式中，颗粒可以最初涂覆有一个分子网层，该分子网层可以连接至一个第二层上，该第二层可以被联接至一个第三层上。分子网层可以在每个层中包括相同浓度或不同浓度的相同的捕获分子。与之前的多层相比，分子网颗粒在每个层中还可以包括不同的捕获分子，并且可以按并入相同或不同浓度的捕获分子的方式来制造。

[0060] 在一些实例中，分子网可以被附接至颗粒表面上，其方式为使得产生具有预先确定的极性的不对称颗粒。这种颗粒可以利用包括具有大直径、宽度和/或长度的结构分子的初始层来设计和制造，并且可以按不对称的方式连接至颗粒上以便产生极性。一个第二层可以被连接至一个第一层上，并且一个第三层可以被连接至一个第二层上，等等。分子网颗粒中的层的数量可以根据使用而变化。

[0061] 在一些实例中，分子网可以被附接至颗粒的一个区段上，以便产生具有预先确定的极性的不对称颗粒。这种颗粒被构建，借此该初始层被涂覆至颗粒的一个区段上，并且借此一个第二层被连接至该初始层在所述颗粒的相同区段上，并且借此一个第三层被连接至该第二层在所述颗粒的相同区段上，并且借此一个第四层被连接至该第三层在所述颗粒的相同区段上。

[0062] 在一些实例中，分子网可以被动吸附至一个非功能化的颗粒表面上。在其他实例中，颗粒表面可以被功能化并且在附接之前可能需要激活。在其他实例中，颗粒表面可以在功能化之前被激活，在功能化的时候分子网可以被附接。然而在其他实例中，分子网可以被直接构建在颗粒表面上。将分子网附接至颗粒上可以改变所述颗粒的物理和/或化学特征。在一些实例中，分子网可以包括置于颗粒表面上的多个伪随机拓扑特征。在一些实例中，分子网颗粒可以包括多个拓扑特征，这些拓扑特征包括捕获分子和连接子，并且还可以包括间隔子。不同的拓扑特征的实例可以包括：附件、尖峰、高地、平面、丘状隆起、裂痕、薄皮、网点、沟槽、孔隙以及其他，并且可以由直接连接在分子网的一个或多个层中和/或直接连接至分子网的一个或多个层上的捕获组分组成。

[0063] 拓扑特征的其他实例可以包括袋、柱、突起、分支、凸部、脊、裂缝、格子状结构、薄片、小球、球体、或者其他。拓扑特征可以在溶液中预先成形，并且被连接至分子网上，或者可以在构建每个层的时候形成。

[0064] 颗粒上的分子网可以在分子网的一个或多个层中包括非均匀的捕获分子。非均匀设计的益处可以与单一颗粒上具有多种表面化学物质的多种分析物的捕获有关。在制造过程中并入分子网的非均匀捕获分子可以遍及每个层随机分布；可以遍及每个层成层；或者其他，这取决于用途。

[0065] 分子网可以被附接至颗粒上，以便增加所述颗粒的表面面积。分子网还可以用于增加颗粒直径。除了分析物捕获能力之外，颗粒上的分子网的拓扑特征还可以与增加的颗粒大小有关。

[0066] 在一些实例中，一个第一分子网层可以被附接至颗粒表面上，以便改变颗粒的物理和/或化学特性。在许多商业颗粒中，“微珠效应”或“表面效应”可以妨碍结果并且仍未能很好地了解。产生2D轭合物和2D轭合表面的传统轭合技术经常受制于表面效应。分子网可以用于最小化或抵消微珠效应，以便在测定中最小化到微珠表面上的非特异性结合、微珠自身荧光、微珠干扰、或者其他。在一些实例中，分子网颗粒可以赋予增加的分析物结合能力，并且还可以赋予对不希望的分析物非特异性结合的阻断，以便增加测定中的信噪比、收率以及纯化分析物的纯度、或者其他。

[0067] 在一些实例中，在又一个方面，本发明特征是颗粒上的包含多于一个层的分子网，其中每个层包含针对分析物的捕获分子，其中每个层包含针对不同分析物的不同捕获分子，其中不同层可以针对不同分析物以便能够捕获一种分析物或多种分析物。

[0068] 在又一个方面，置于固相表面上的分子网可以用于增加从样品中回收的一种或多种分析物的纯度。与商业2D功能化表面相比，分子网涂覆的表面可以减少不希望的分析物的非特异性结合。

[0069] 在一些实例中，置于颗粒上的分子网可以明显增加颗粒的分析物捕获能力。分子网的另外分层可以进一步增加每个颗粒结合分析物的数量，并且可以用于提高样品的分析物的回收或收率，并且可以用于耗尽样品的一种或多种分析物。

[0070] 使用分子网的益处

[0071] 分子和细胞测试策略采用单重或多重免疫测定、PCR测定、下一代测序技术或者其他，以便识别样品中一种或多种分析物的存在或者测量该一种或多种分析物的量。

[0072] 在多重测定中，多个反应可以空间上分离，或者可以被结合至一个单一测试反应中，并且可以采用包括独特识别器的固相以提供信息。独特识别器的一些实例可以包括不同的条形码、不同的荧光发射、不同的化学物质、不同的有序核苷酸标签、或者其他的使用。

[0073] 固相可以在单重和多重测定中使用，可以依赖于目标分析物的特异性结合，以便产生可测量的信号或信号中可测量的变化，并且固相可以在直接测定中使用或者可以在间接测定中使用。可测量信号可以从阳性测试中产生，并且可以包括电、热、磁、光、振动、同位素、或其他可测量特征。

[0074] 使用当前策略来实现灵敏的且可再现的测量中的许多困难导致高的非特异性结合、较低的灵敏度、低信噪比，并且因此需要上游的样品处理步骤来从样品中去除尽可能多的非特异性组分，外加上使用为了从噪声中确定实信号所需要的高灵敏度读取技术和复杂

算法，这使得它们难以转变成几乎实时的、容易使用的分子诊断和分析物测量工具。

[0075] 分子网可以用于代替当前商业方法，并且可以实现从样品的特异性且灵敏的分析物捕获、检测和测量。用分子网代替当前方法用于分析物捕获所获得的结果的实例在图1-图6中呈现。通过用分子网代替当前2D方法用于分析物捕获和测量，可以实现测定灵敏度、分析物检测的最低水平以及其他特征的改进。背景噪声的减少可以通过用分子网代替当前2D方法来实现，并且可以用于改进分析物纯化、分析物纯度以及测定灵敏度。

[0076] 分子网的益处在表4中呈现，并且可以包括：对原始样品中一种、若干种或多种分子和细胞分析物的快速捕获；当在涉及间接和直接检测方法的测试中使用时产生灵敏且特异性的信号的能力；产生具有增强的荧光强度的信号的能力；使结合分析物浓缩的能力；以减少分析物之间和/或检测分子之间的空间位阻的方式空间上分离结合分析物的能力；增强的稳定性；减少的背景以及其他。

[0077] 表4.分子网的经证实的益处

[0078]

经证实的益处	预期效果
通过柳叶刀刺手指（约50 uL）	免除对静脉穿刺的需要
无样品制备-与原始、未处理的样品相容	免除对样品处理-离心分离和血清分离的需要（节省时间）
使用点测试	免除样品运输的需要和成本，具有在家或现场设置中测试的极限潜力
可移植性，没有复杂的资本设备	免除对非现场 CLIA 实验室的需要和成本
提供立即回应（<30 分钟）	能够进行护理点治疗和患者监测
多重（多分析物分析）	递送更多稳定回应并且消除必须对每个样品进行单独测试的成本
简单的测试程序	免除对高复杂性测试（蛋白质印迹法、Luminex、微珠阵列以及 PCR）的需要

[0079]

能够产生简单的可操作读出（二进制-否/是；半定量-低、中、高；全定量）	使健康护理提供者（和/或最终患者）能够更快地做出决定；灵活的数据输出使得能够进行许多应用
测试的稳定性（无酶）=更长的保存期	增长保存期，以及减少与储存问题相关联的成本
有成本效益	可处理盒具有一次用于多个测试的潜力
高信号、非常低的噪声（在多种测试类型中经证实的飞克范围）	比当前免疫测定明显更灵敏

[0080] 分子网以及它们的用途

[0081] 分子网可以用于其中分析物结合效率、分析物结合动力学、分析物结合能力、分析物检测、分析物测量、分析物富集、分析物纯化以及分析物递送可能是重要的多种应用。分子网可以在液相中使用或者可以被附接至固相上。

[0082] 分子网可以通过吸附或共价过程附接至一个接受表面上。固相的实例包括但不限于：纳米管、金属、颗粒、微量滴定板、载玻片、盒、探针、横流测试器皿、支架、导管、阀、血管、针、固相装置、或者其他。对于分子网附接可以相容的不同固相的化学物质的实例包括但不限于：塑料、其他聚合物、薄膜、胶态金属、二氧化硅、碳纳米管、蛋白质、碳水化合物、脂质、核酸、细胞、组织、或者其他。

[0083] 分子网可以被附接至固相装置表面上以便从样品中捕获、纯化、或耗尽一种或多种分析物。图1中呈现了使用分子网来从样品中捕获和/或纯化分析物的一个实例。可以用于从样品中捕获和纯化分析物的分子网的一些其他实例是：用于免疫球蛋白类捕获的蛋白A、蛋白G、或蛋白L网涂覆的微球；用于生物素捕获的链霉亲和素网涂覆的微球；用于抗-TNF生物捕获的TNF网涂覆的微球；用于抗-IL6生物捕获的IL6网涂覆的微球；用于RNA病毒捕获的IgM网涂覆的微球；用于补体捕获的Ig Fc网涂覆的微球；用于抗原特异性免疫球蛋白的抗原网涂覆的微球；抗原特异性免疫细胞捕获；以及其他。分子网可以在色谱法中使用，用于从样品中捕获和纯化一种或多种分析物。

[0084] 分子网可以用于从样品中捕获分析物，以用于通过独立的方法(在此称为样品制备)进行下游的分析物测量。独立的方法的实例可以包括：质谱分析、免疫测定、PCR、下一代测序、qRT-PCR、数字PCR、显微镜检查法、荧光、流式细胞术、微珠细胞术、或者其他。

[0085] 在另一个方面，本发明当用于测定时改进了信噪比。

[0086] 分子网可以被附接至固相装置表面上，以便测量一种或多种分析物的存在、缺失、修饰、或浓度。图3和图4中呈现了使用分子网用于分析物检测和/或测量的实例。在一些其他实例中，分子网可以用于以直接或间接的方式同时检测和测量2种或更多种特异性分析物。通过分子网的间接捕获可以涉及通过分子网的特异性捕获分子捕获主要分析物，这使得能够进行与捕获的主要分析物相关联的一种或多种相关次级分析物的检测。分子网可以用作从样品中捕获主要分析物的发现工具，并且使得能够识别、检测、或测量通过关联捕获

的次级分析物。分子网可以按此方式用于药物发现、途径作图，并且在蛋白质组学、转录组学、糖组学、脂质组学、代谢物组学、功能基因组学、食物组学、营养学、药理学、毒物学以及其他中使用。

[0087] 在一些实例中，分子网可以用于检测细胞中的抗药性。细胞可以是肿瘤细胞、免疫细胞、微生物细胞、或者其他细胞。用于这些应用的分子网可以包括针对一种细胞类型的一个或多个独特特征的捕获分子。分子网可另外以赋予与完整无损的细胞的捕获有关的表面拓扑结构的方式来制造。

[0088] 在其他实例中，分子网可以被制造且用于：免疫细胞反应性测量；免疫应答监测；免疫应答分类；免疫球蛋白滴定；生物素化分子捕获；多重免疫测定；单重免疫测定；下一代测序反应；PCR；微生物捕获；微生物发现；mRNA和编码蛋白测量；SNP(单核苷酸多态性)映射；SNP检测；疾病标志物样品制备；miRNA捕获和/或测量；翻译后修饰发现和/或捕获和/或测量；激酶活性测量；或者其他。

[0089] 分子网可以具有在制造过程中赋予的多个可测量特征，并且可以按直接或间接的方式用作传感器。可以使用商业方法来检测分子网传感器的一个或多个特征中的可测量变化，这些商业方法采用光学感测、电化学感测、电磁感测、电阻抗、或者其他。在一个实例中，分子网传感器可以用于捕获和结合分析物。分析物结合可以引起分子网传感器的特征中的可测量的变化。可以在一段时间内监测涉及有关分子网传感器的结合事件或修饰事件，并且可以通过装置检测、中继、和收集分子网传感器特征中的变化。将分子网用作传感器的其他实例可以包括分析物结合事件、酶促反应、分析物修饰事件、细胞分化、细胞-细胞相互作用、或者其他。

[0090] 可测量的特征的实例包括但是不限于：物理形状、高度、密度、荧光强度、波长位移(FRET或FRAP)、振动频率、吸光度、柔性、折射性、电导、阻抗、电阻、熔融温度、变性温度、冻结温度以及其他。

[0091] 对于与分子网传感器一起使用可以是相容的测量装置可以包括：光子多道分析器、分光计、磁共振成像仪、磁场检测器、光学纤维、玻璃移液管、电路、荧光计、光谱分析器、流式细胞仪、CCD摄像机、显微镜、声室、扩音器、光度计以及其他。这些测量装置可以用于测量以下的变化：厚度、拓扑结构、荷载、绝缘、电容、电压、颜色、音质、振动、磁性、酶活性、或者用作传感器的分子网的其他特征。

[0092] 此外，分子网可以在柔性电路中使用，借此捕获分子和/或结构分子可以被连接至导电分子上。分子网电路可以在单面柔性电路、双接触(背裸柔性电路)、雕刻柔性电路、双面柔性电路、多层柔性电路、脊形柔性电路、脊形柔性板、聚合物厚膜柔性电路、或者其他中使用。大多数柔性电路是用于将多个电子部件(如集成电路、电阻器、电容器等)互连的无源布线结构，然而一些柔性电路仅用于在其他电子组件之间直接地或借助于连接器制造互连。用于在电路中使用或者用于用作电路部件的分子网可以由合成组分组成，或者可以由生物化学捕获分子和/或细胞组成，或者可以按一种有待在柔性电路中使用的方式来制造。分子网电路还可以用作传感器。

[0093] 在一些实例中，分子网电路可以具有特定电化学特性，并且可以用于监测电化学电池/电解质电池中的不同参数，如pH、电流、电压、阻抗、或者其他。分子网可能发生的结合事件和修饰事件可以是可测量的，并且可以通过电导、电流、或电压的变化来反映。更确切

地，可以通过分子网的电化学特性和/或周围环境的改变来监测含有分析物的样品的引入，该分析物对分子网电路中的部件具有特异性结合亲和力或者对其有反应性。

[0094] 发生在电路中所用分子网上的结合事件的实例可以包括：抗体-抗原相互作用、核酸-核酸相互作用、酶-底物相互作用、药物-靶标相互作用、酶-辅因子相互作用、配体-细胞相互作用、或者任何其他特异性表面化学驱动的非共价相互作用。分子网的分析物捕获可以通过电化学电池/电解质电池中的pH、电流或电压的变化来确定。分子网特征的变化的测量还可以来源于发生于分子网中的一种或多种组分或发生于捕获分析物的一个或多个修饰事件、或大量修饰事件。修饰事件的实例可以包括：酶裂解；翻译后修饰(如磷酸化、磺化、糖基化、甲基化、或者其他)；翻译后修饰的去除(如去磷酸化)；或者其他类似修饰。修饰事件可以通过电化学电池/电解质电池中的pH、电流或电压的变化来确定，该变化归因于分子网特征中或周围缓冲系统中的变化。

[0095] 确定电路中所用分子网的电化学特性的改变的方法可以包括使用扫描离子电流显微镜、纳米流体二极管、显示电压门控离子电流的纳米孔或纳米通道、离子纳米门控、基于纳米孔的感测平台，以及用于通过介质测量电荷流动的流量或变化的其他方法。更确切地，当跨纳米孔施加偏压时，许多固态纳米孔传感器的固有灵敏度是电解质、或离子电流的选择透性。分子网可以被涂覆到纳米孔的表面上，并且可以监测电流、电压以及阻抗中的变化。

[0096] 分子网还可以被涂覆到碳纳米管的表面上，并且借此该分子网可以按一种方式构建以产生用于分析物感测的大小排除和亲和力需要。

[0097] 生物层干涉测量法(BLI)是用于测量生物分子相互作用的无标记技术。这是一种光学分析技术，该技术分析从以下两个表面反射的白光的干涉图案：生物传感器尖端上的一个固定化分子网层、和一个内反射层。结合至该生物传感器尖端上的分子的数量的任何变化引起干涉图案的位移，该位移可以被实时测量。固定在分子网涂覆生物传感器尖端上的配体与溶液中的分析物之间的结合导致该生物传感器尖端处的光学厚度增加，这产生了一个波长位移Δλ，该波长位移是生物层的厚度变化的直接量度。相互作用可以被实时测量，从而提供了精确地且准确地监测结合特异性、缔合及解离速率、或浓度的能力。仅结合至分子网生物传感器或从分子网生物传感器解离的分子可以使干涉图案移位并产生响应曲线。未结合分子可以改变周围介质的折射率，或者可以改变流速，但是将不影响干涉图案。这是BLI的一个独特特征，并且扩展了其在针对分析物-捕获分子结合、定量、亲和力以及动力学的应用中使用的粗样品中执行的能力。

[0098] 分子网颗粒还可以用于递送活性剂。活性剂可以被预先加载到位于分子网的一个或多个层中的捕获分子上。活性剂可以包括：药物、治疗剂、毒素、病毒、过敏原、疫苗组分、抗原、免疫调节剂、表面活性剂、微生物、寡核苷酸、营养素、或者其他。分子网颗粒可以用于药物或治疗剂递送、疫苗递送、生物发酵或者其他。分子网可以包括表面暴露层上的一种或多种靶向剂，以便促进在将所述分子网颗粒靶向特异性细胞类型、组织类型、器官类型或者其他中的特异性。靶向剂可以是分子网的捕获分子。靶向剂可以包括：抗体、受体、配体、抗-配体、或者其他。分子网中的靶向剂可以被共价连接至表面暴露层中的捕获分子、连接子以及间隔子上。靶向剂还可以有助于分子网的拓扑特征。

[0099] 实例

[0100] 实例1.用于分析物纯化的常规2D和3D分子网微颗粒的比较。

[0101] 在制造中使用由单体蛋白G和连接蛋白G以及交联剂BS^3、EMCS、EGS、BMPH和其他组成的分子网。在0.8-10um磁性聚苯乙烯微颗粒和45um硝化纤维微颗粒表面上实时地进行分子网制造。在一些实例中，使用捕获分子(蛋白G)作为仅有的结构支撑来源。在一些实例中，将预先连接的蛋白G和单体蛋白G混合以便用作用于制造分子网的一些层的另外的结构支撑。然而在一些其他实例中，包括蛋白G和Ig Fc区的分子网的一个第一层用作用于制造该分子网的附加层的结构支撑。在一些实例中，蛋白G分子网包括2个层，并且在其他实例中，蛋白G分子网包括3个层。分子网的最后一层包括多个拓扑特征，以便增强分析物(在这种情况下是IgG)的结合和从样品的回收。图1是与商业蛋白G微颗粒相比，使用蛋白G分子网微颗粒获得的数据的实例。简而言之，将IgG-Alexa 647加入人类血清中(1ug/管)。将未涂覆的微颗粒、商业蛋白G微颗粒以及蛋白G分子网颗粒与加料样品一起在室温下孵育15-60分钟(100,000个颗粒(未涂覆对照)，100,000个颗粒(商业)以及25,000个颗粒(分子网))。使用磁性分离将颗粒从样品中分离并且将颗粒在PBST中洗涤三次。将颗粒在2xLSB中悬浮、煮沸并加载到SDS-PAGE上。与输入对照相比，通过考马斯染色带光密度测定法测量回收的IgG。图1中描绘的是每个纯化类型的输入的回收率。使用优化分子网可以减少测定中的背景噪声并且增加可见信号。

[0102] 实例2.常规2D轭合物用于分析物检测的有效性。

[0103] 将捕获抗体共价连接至一个表面上的传统方法是二维方法(X和Y平面)，因为不存在被添加至一个表面上的连接抗体的表面上的附加层。用于将捕获抗体共价连接至一个表面上的传统方法涉及单一类型的连接子，例如EDC、NHS、磺基-NHS或者其他。偶尔地，使用一个第二连接子将捕获抗体固定至一个表面上，但是涉及第一连接子的移除并且不为抗体轭合表面添加另外的高度或分层。在一个实例中，按照制造商的指示，将抗-人类神经丝抑蛋白抗体通过连接子联接至Luminex颗粒(微珠区#54)上。随后将颗粒猝灭、封闭并洗涤，之后使用。将颗粒在预先清洁的血清+神经丝抑蛋白中以(0-1ng/mL)的浓度范围孵育15分钟。将结合颗粒洗涤并且与生物素-抗-神经丝抑蛋白(10ng/mL)一起孵育15分钟。通过抗生物素蛋白-PE(30ng/mL)持续15分钟将神经丝抑蛋白检测可视化。随后在Luminex 100上分析洗涤的颗粒，每个样品收集100个颗粒。图2中呈现的是每个稀释度下超过背景荧光强度的中值荧光强度(FI)。

[0104] 图3.分子网微颗粒在测量分析物中的效果有效性。

[0105] 制造由相同的抗-人类神经丝抑蛋白抗体(如图2)和连接子磺基-NHS、EMCS、EGS、BMPH以及其他组成的分子网，以便提供一个三维多层(X、Y以及Z平面)基体。可以随后将这些分子网共价连接至Luminex微颗粒(微珠区#54)上。图3中呈现了利用4层分子网的测定性能。使用三维多层分子网观察到改进的测定MFI。

[0106] 图4.具有拓扑结构的分子网在测量分析物中的有效性。

[0107] 制造由相同的抗-人类神经丝抑蛋白抗体(如图2和图3)和连接子磺基-NHS、EMCS、EGS、BMPH以及其他组成的分子网，以便提供一个三维多层(X、Y以及Z平面)基体。可以随后将这些分子网共价连接至Luminex微颗粒(微珠区#54)上。图4中呈现了利用5层分子网的测定性能。使用在外层中具有加强的拓扑结构的三维多层分子网观察到改进的测定MFI。

[0108] 图5.在ELISA中的传统轭合微颗粒与分子网微颗粒的比较。

[0109] 在制造中使用由针对人类-TauF的单克隆抗体和交联剂磺基-NHS、EMCS、EGS、BMPH和其他组成的分子网。在0.5um、6.3um和10um的磁性微颗粒表面上实时地进行分子网制造。在一些实例中，使用捕获分子、抗-Tau单克隆抗体作为仅有的结构支撑来源。在一些实例中，在一个第一层中将间隔子白蛋白与抗-Tau单克隆抗体以1.5:1.0的摩尔比(白蛋白:抗-Tau抗体)混合，以便用作用于制造该第一层的另外的结构支撑。在一些实例中，使用第二捕获分子即人类微管蛋白，其在分子网中提供结构支撑和捕获作用两者。图5是与商业Tau微颗粒(配偶体LV)ELISA(相同的测定条件、相同的抗体对等)相比，使用抗-Tau分子网(LV.P6Cap-TECH)获得的数据的实例。图5是使用分子网来减少测定中的背景噪声并且增加ELISA中的可见信号的实例。

[0110] 图6.使用Luminex的传统轭合微颗粒与分子网微颗粒的比较。

[0111] 在制造中使用由针对人类-促甲状腺激素的单克隆抗体和交联剂EDC、BS(PEG)$_9$、EMCS、EGS、BMPH和其他组成的分子网。在Luminex磁性微颗粒表面上实时地进行分子网制造。在一些实例中，使用捕获分子、抗-TSH单克隆抗体作为仅有的结构支撑来源。在一些实例中，在一个第一层中将间隔子(PEG、热变性溶菌酶以及其他)与抗-TSH单克隆抗体以1.0:2.0的摩尔比(间隔子:抗-TSH抗体)混合，以便用作用于制造该第一层的另外的结构支撑。在一些实例中，一个抗-TSH分子网包括4个层，并且在其他实例中，一个抗-TSH分子网包括6个层，其中最后一层包括多个拓扑结构以便增强在Luminex中的分析物结合和性能。图6A是在Luminex测定中使用分子网来增加总体MFI的实例。图6B是在Luminex测定中获得的示例性数据，用于增加Luminex测定中检测的最低水平。

[0112] 图7.颗粒上的示例性分子网。

[0113] 图7描绘了一些实例，其中分子网可以被放置在一个颗粒表面上。在一些实例中，分子网以周向的方式放置在一个颗粒表面上(图7A，1001)，借此具有X、Y和Z空间取向的分子网可以是相当对称的，并且其中每个层(3个层的实例，1002、1003以及1004)被添加至颗粒的Z平面上。在一些实例中，分子网可以按不对称的方式放置在一个颗粒表面上(图7B，1005)，借此具有X、Y和Z空间取向的分子网可以按产生颗粒的极性的方式放置在颗粒的表面上，并且其中每个层(3个层的实例，1006、1007以及1008)以层独立的方式(例如，一些层可以具有较小的高度并且其他层可以具有较高的高度)添加至颗粒的Z平面上。在其他实例中，分子网可以按不对称的方式放置在颗粒表面的一部分上(图7C，1009)，借此具有X、Y和Z空间取向的分子网可以按产生颗粒的极性的方式放置在颗粒的表面上，并且其中每个层(3个层的实例，1010、1011以及1012)以层独立的方式(例如，一些层可以具有针对一种分析物的特异性并且其它层可以具有针对其他分析物的特异性)添加至颗粒的Z平面上。

[0114] 图8.颗粒上的示例性分子网拓扑特征。

[0115] 图8描绘了一些实例，其中分子网可以被放置在一个颗粒表面上。在一些实例中，分子网以周向的方式放置在一个颗粒表面上(图8A，2001)，借此具有X、Y和Z空间取向的分子网在一个层(2002)中可以是相当对称的，并且其中每个层(3个层的实例，2002、2003以及2004)以不同且不对称的方式(例如，产生拓扑结构)添加至颗粒的Z平面上。在一些实例中，分子网可以按不对称的方式放置在一个颗粒表面上(图8B，2005)，借此具有X、Y和Z空间取向的分子网可以按在颗粒的整个层1(2006)、2(2007)以及3(2008)中产生结构特征(2008)的方式放置在颗粒的表面上，并且其中每个层以层独立的方式(例如，一些层可以具有较小

的高度并且其他层可以具有较高的高度)添加至颗粒的Z平面上。此外,每个层中的结构元件还可以在分子网中起到分析物捕获的作用。在其他实例中,分子网可以按不对称的方式放置在颗粒表面的一部分上(图8C,1009),借此具有X、Y和Z空间取向的分子网可以按产生颗粒的极性的方式放置在颗粒的表面上,并且其中每个层(4个层的实例,2010、2011、2012以及2013)以层独立的方式添加至颗粒的Z平面上,并且借此每个层可以起到结构和分析物捕获的作用。例如,一些层可以基于大小对一种分析物具有特异性(例如,图8C,2010),并且外层(例如,图8C,2013)可以对更大大小的分析物具有特异性。

[0116] 图9.用于分析物递送的示例性分子网。

[0117] 图9描绘了一些实例,其中分子网可以被放置在一个颗粒表面上,以用于分析物捕获或目标分析物递送。在一些实例中,分子网以周向的方式放置在一个颗粒表面上(图9A,3001),借此具有X、Y和Z空间取向的分子网在一个层(3002)中可以是相当对称的,并且其中每个层(3个层的实例,3002、3003以及3004)以不同且不对称的方式(例如,产生拓扑结构)添加至颗粒的Z平面上。在一些实例中,分析物货物(3003)可以被预先加载到分子网的一个或多个层中的捕获分子上。在外层中,不同的捕获分子可以被连接至一个分子网中,以便产生用于不同目标分析物的拓扑结构和/或亲和力。在一些实例中,预先加载的分析物可以包括药物、治疗剂、siRNA、miRNA、dsRNA、病毒、毒素、免疫原或者其他。预先加载的货物可以是与分子网的一个层中的一种或多种类型的捕获分子非共价缔合的。在一些实例中,分子网的不同捕获分子(3004)可以排列在分子网的外层中,并且可以起到拓扑结构和分析物捕获作用。不同的捕获分子可以具有针对一种或多种不同分析物的特异性,该分析物可以包括抗体、抗-配体、配体、受体、抗原或者其他,并且可以起到一种或多种结构和/或亲和力和/或靶向作用。

[0118] 在一些实例中,分子网可以按一种方式放置在颗粒表面上(图9B,3005),借此分析物货物(3006)可以被预先加载到分子网的所有层中。在一些层中,捕获分子可以用于产生起到颗粒靶向作用的拓扑特征(3008)。在一些实例中,分子网颗粒的外层可以使所述颗粒靶向特异性细胞、组织、器官或者其他。

[0119] 图10.用于从样品中纯化分析物的分子网

[0120] 分子网可以在样品纯化过程中使用(图10中提供实例)。在一些实例中,被设计和制造用于耗尽一种或多种分析物的分子网可以用于处理样品,以便进行分析物耗尽。示例性方法可以包括在间歇淤浆中或在色谱柱中将分子网与样品一起孵育约15分钟至约24小时。可以根据优选方法收集样品上清液或流经液。可以收集分子网并且使用不同方法分析捕获的分析物的存在和量。可以收集分子网处理的样品并且使用不同方法进行分析以便确定样品中分析物的残留存在,或者可以分析样品中的其他分析物。

[0121] 图11.用于从样品中检测和测量分析物的分子网

[0122] 分子网可以在分析物测量工具或诊断工具中使用(图11中提供实例)。在一些实例中,被设计和制造用于捕获一种或多种分析物的分子网可以用于处理样品,以便进行分析物检测和测量。示例性方法可以包括在间歇淤浆、盒、载玻片、微量滴定板或者其他中将分子网与样品一起孵育约15分钟至约2小时。可以根据优选方法收集样品上清液或流经液。可以收集分子网并且使用不同方法分析捕获的一种或多种分析物的存在和量。还可以收集分子网处理的样品并且使用不同方法进行分析以测量其他分析物。用于测量分子网特征的变

化的方法可以包括光学、电泳、电、磁、化学、热、或其他方法。

[0123] 虽然已经参考本发明的特定实施例描述了本发明，本领域的技术人员应当理解的是，在不脱离本发明范围的情况下可以作出不同的改变并且多种等效物可以被代替。此外，可以做出许多修改来适应特定情况、材料、物质组成、过程、过程步骤或步骤，以便在不脱离本发明范围的情况下实现由本发明提供的益处。所有这种修改均旨在处于所附权利要求的范围内。

[0124] 在此引用的全部出版物和专利文献通过引用结合在此，如同每一份这样的出版物或者文献都被具体地和分别地指出已通过引用结合在此。出版物和专利文献的引用并无意表明任何这样的文件均是相关的现有技术，也未构成对其内容或日期的任何承认。

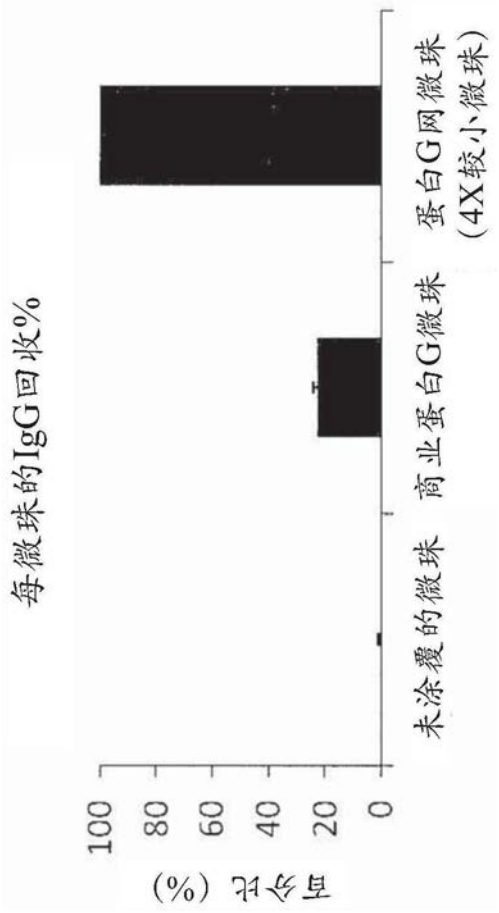

每微珠的IgG回收%
可分比（%）
100
80
60
40
20
0
未涂覆的微珠
商业蛋白G微珠
蛋白G网微珠
(4X较小微珠)

图1

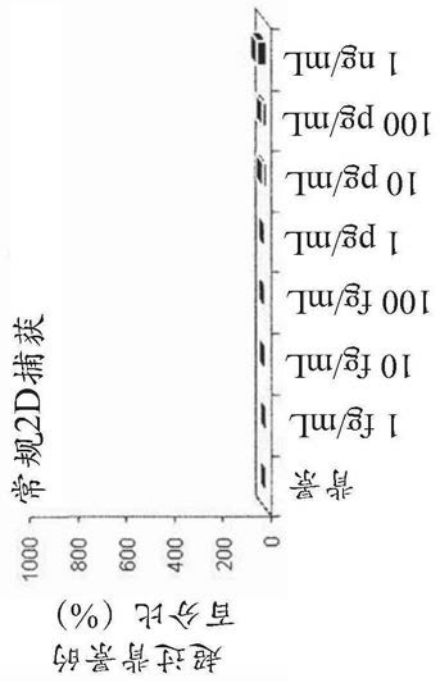

超过背景的
百分比（%）
1000
800
600
400
200
0
常规2D捕获
常规
1 fg/mL
10 fg/mL
100 fg/mL
1 pg/mL
10 pg/mL
100 pg/mL
1 ng/mL

图2

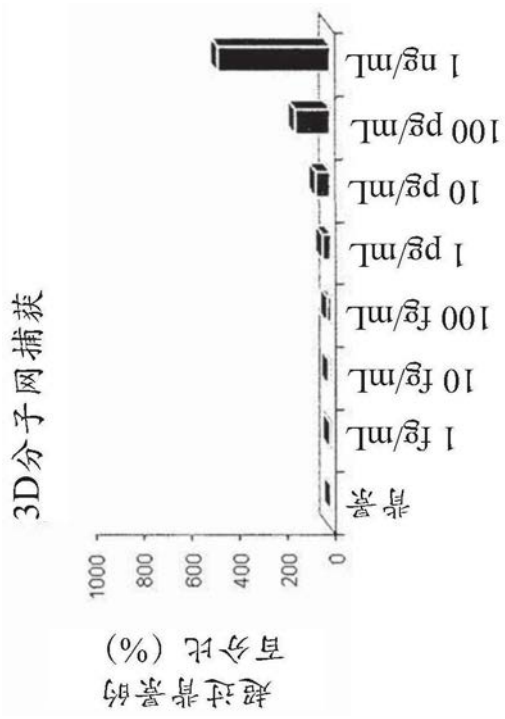

3D分子网捕获
超过背景的
百分比（%）
0
200
400
600
800
1000
背景
1 fg/mL
10 fg/mL
100 fg/mL
1 pg/mL
10 pg/mL
100 pg/mL
1 ng/mL

图3

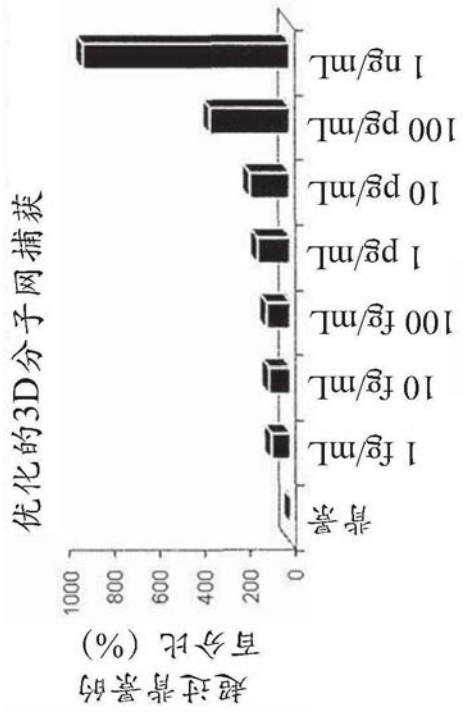

优化的3D分子网捕获
超过背景的
百分比（%）
0
200
400
600
800
1000
背景
1 fg/mL
10 fg/mL
100 fg/mL
1 pg/mL
10 pg/mL
100 pg/mL
1 ng/mL

图4

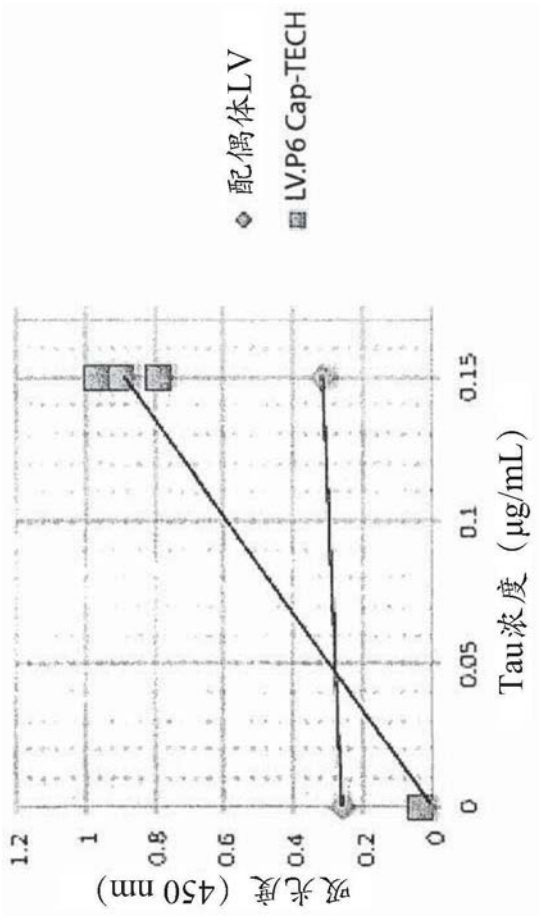

配偶体LV
LV.P6 Cap-TECH
吸光度（450 nm）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.05
0.1
0.15
Tau浓度（μg/mL）

图5

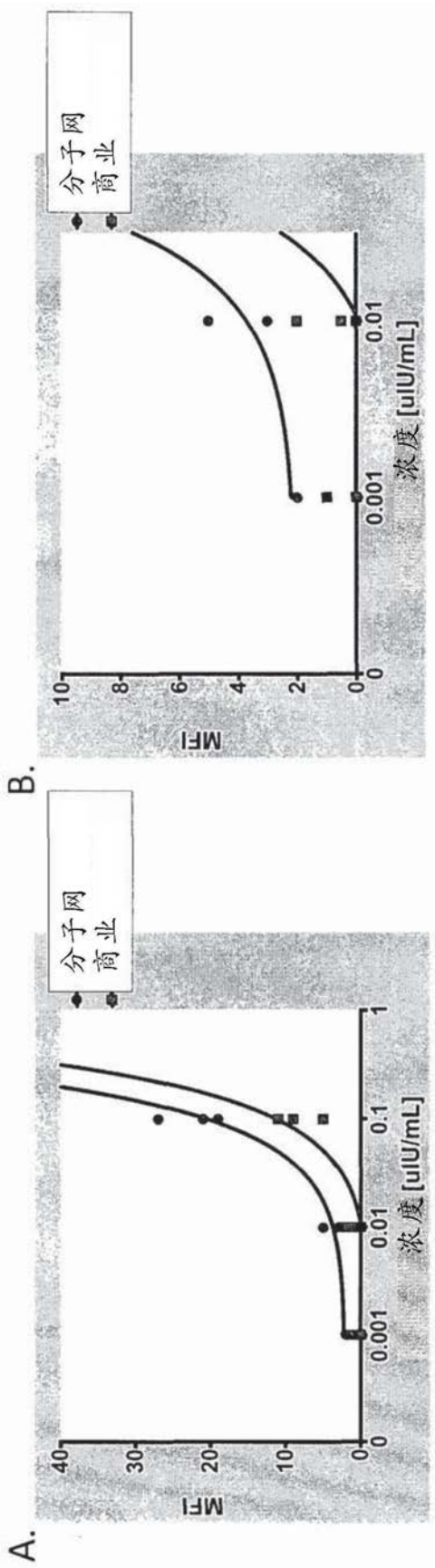

A.
分子网
商业
MFI
0
10
20
30
40
0
0.001
0.01
0.1
1
浓度 [uIU/mL]
B.
分子网
商业
MFI
0
2
4
6
8
10
0
0.001
0.01
浓度 [uIU/mL]

图6

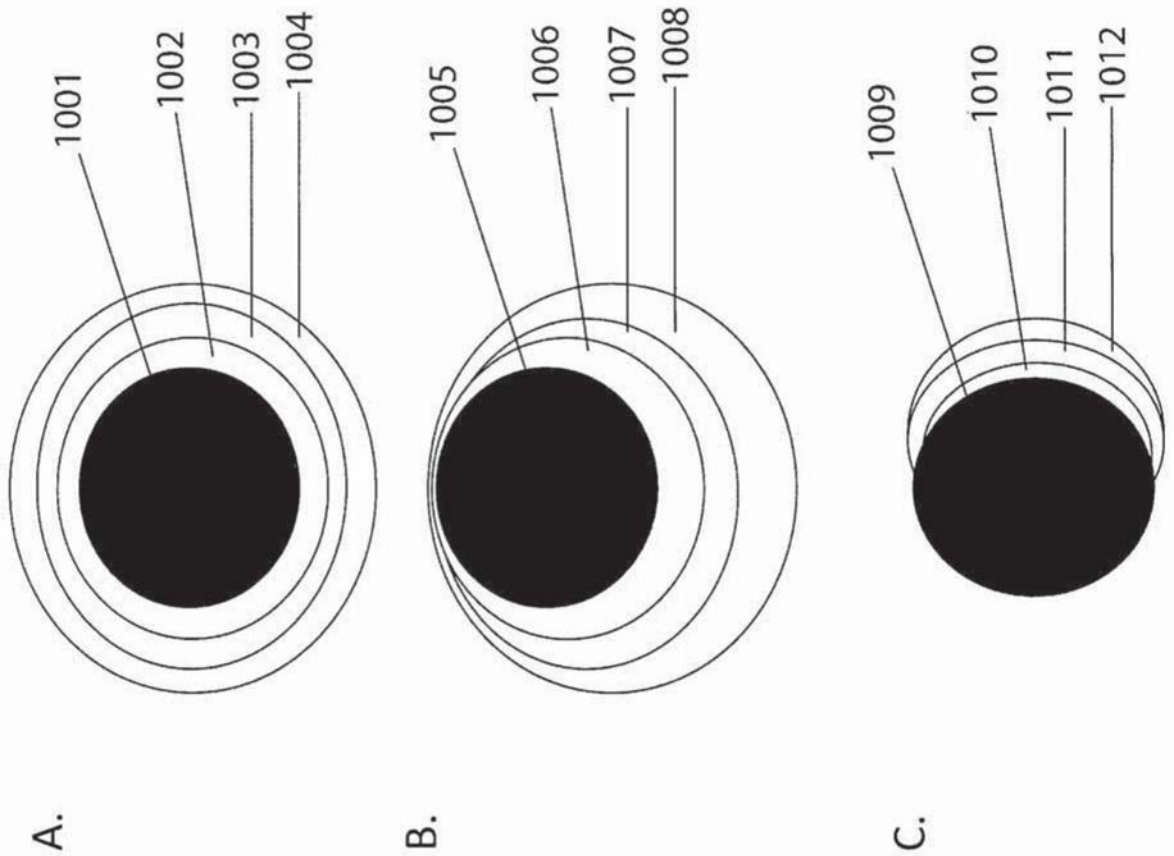

1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
A.
B.
C.

图7

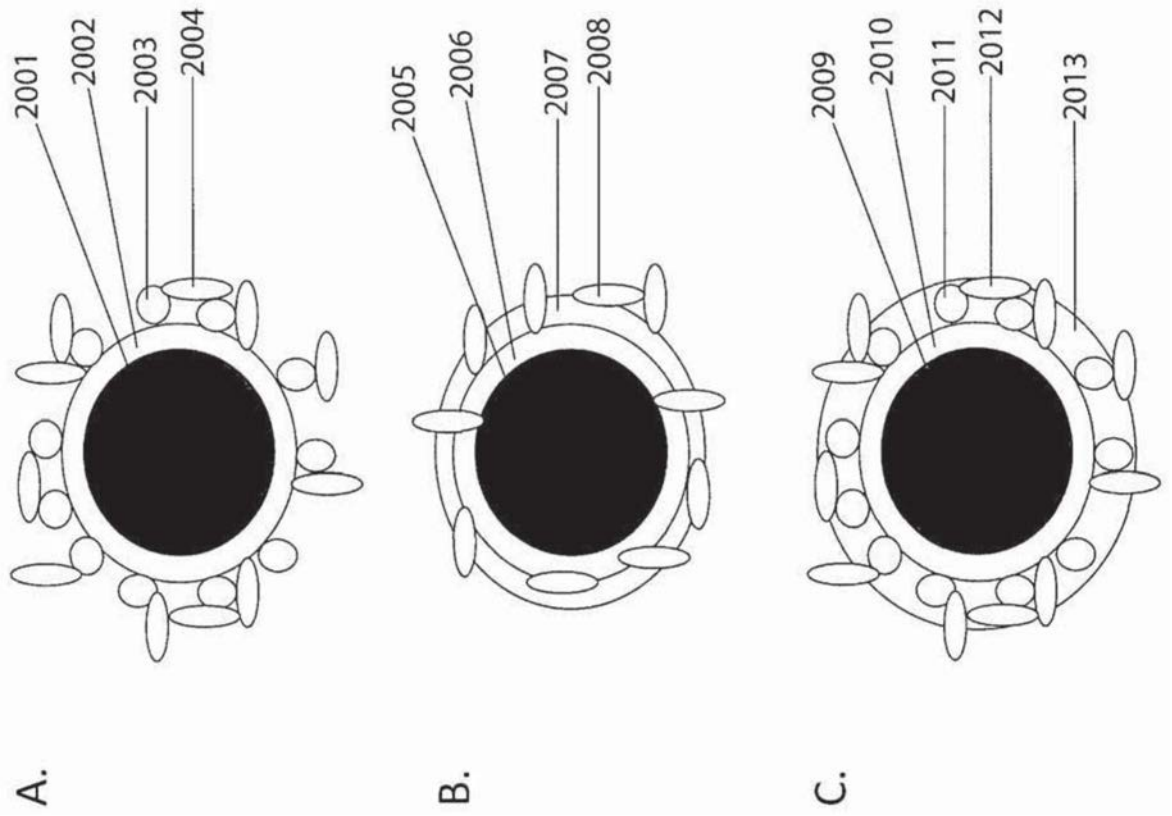

2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
A.
B.
C.

图8

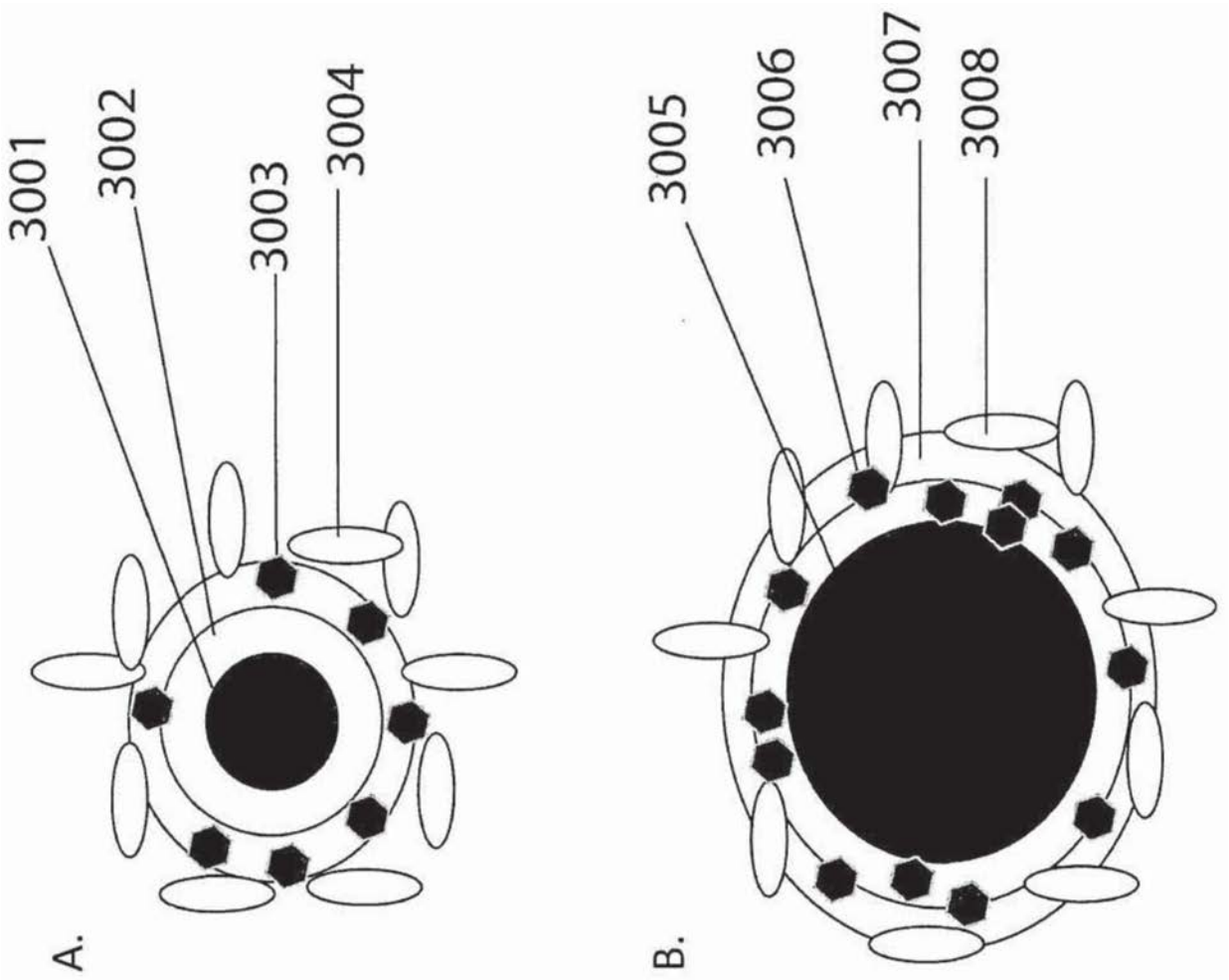


图9

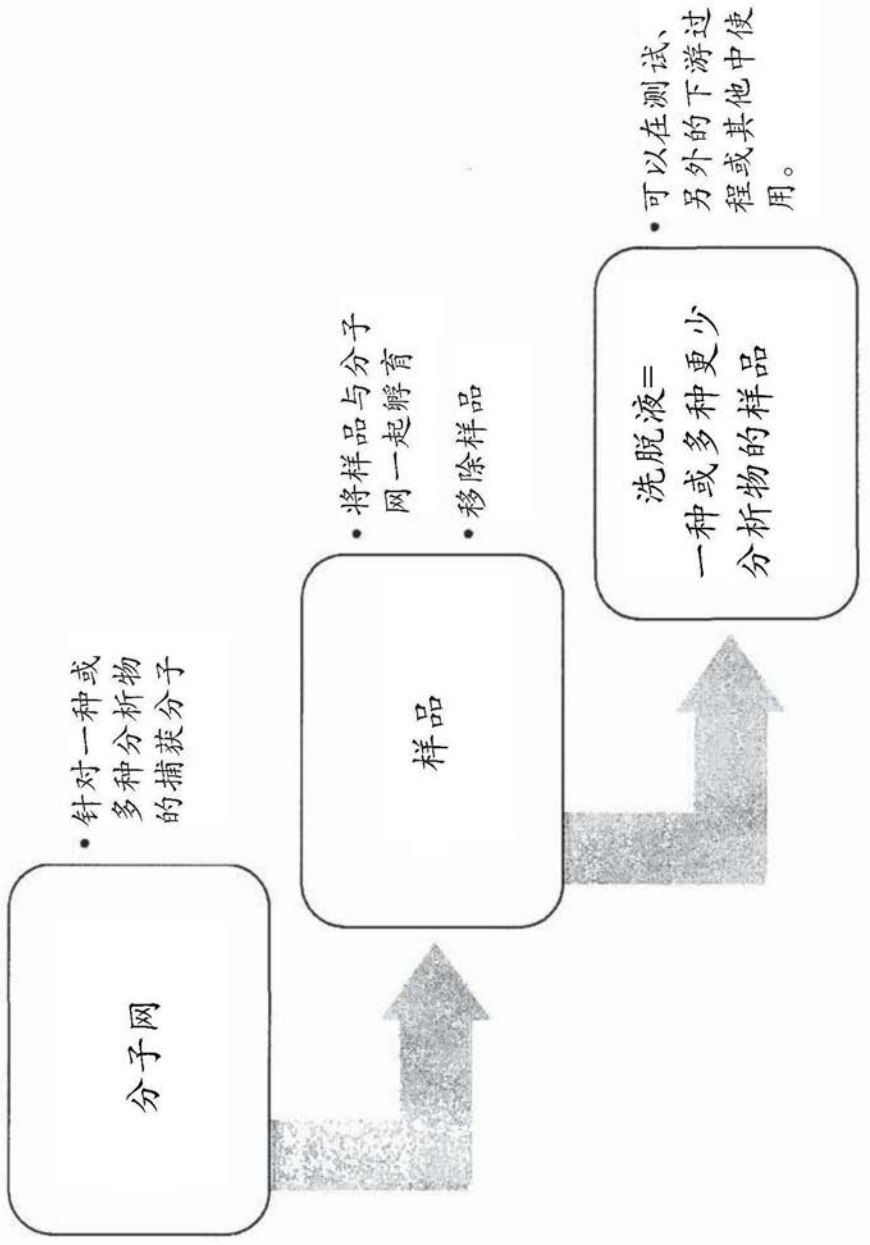

分子网
• 针对一种或多种分析物的捕获分子
样品
• 将样品与分子网一起孵育
• 移除样品
洗脱液=一种或多种更少分析物的样品
• 可以在测试、另外的下游过程或其他中使用。

图10

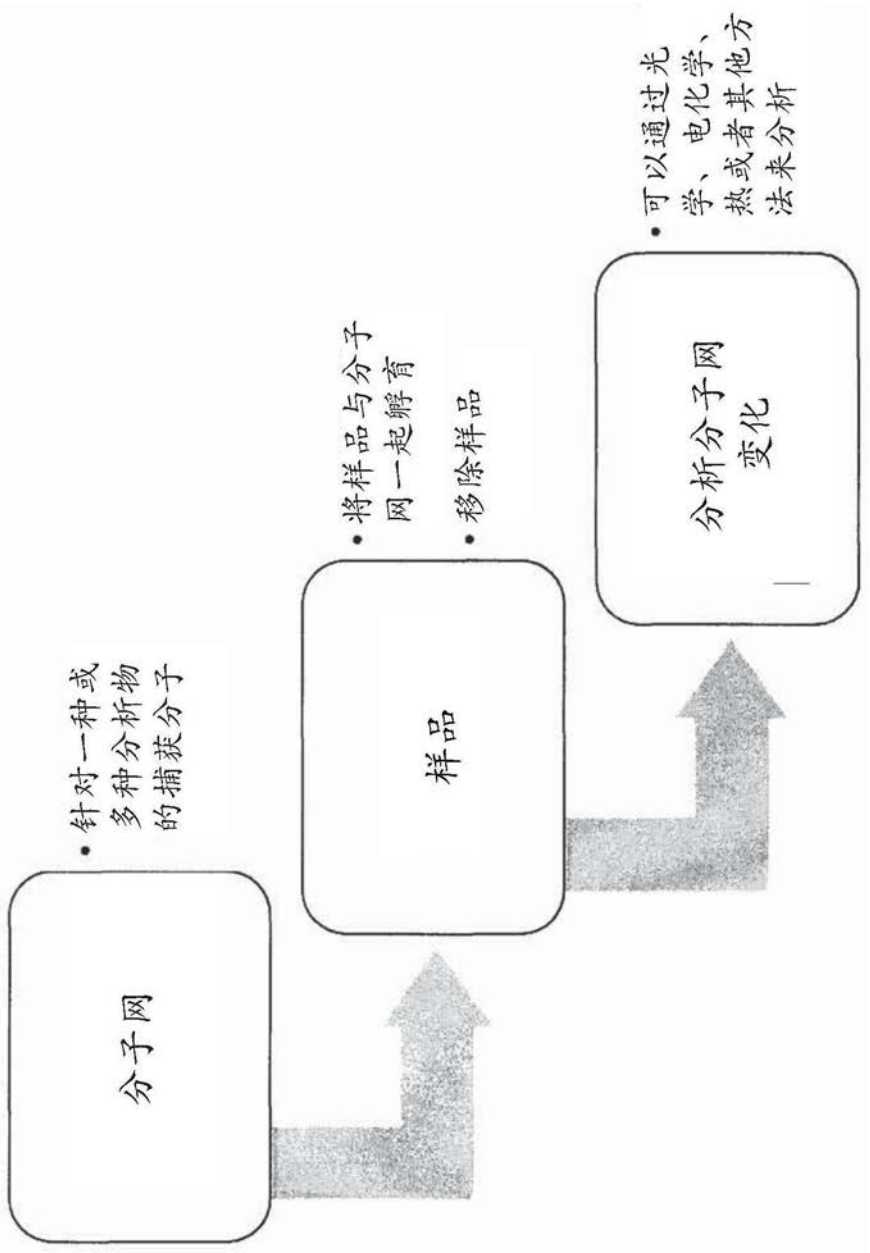

分子网
• 针对一种或多种分析物的捕获分子
样品
• 将样品与分子网一起孵育
• 移除样品
分析分子网变化
• 可以通过光学、电化学、热或者其他方法来分析

图11