

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 3 日 (03.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/238643 A1

- (51) 国际专利分类号:
C08G 81/00 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/090348
- (22) 国际申请日: 2020 年 5 月 14 日 (14.05.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910472850.4 2019年5月31日 (31.05.2019) CN
- (71) 申请人: 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。
- (72) 发明人: 段学欣 (DUAN, Xuexin); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 潘文尉 (PAN, Wenwei); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。
- (74) 代理人: 北京华夏正合知识产权代理事务所 (普通合伙) (CHINA ZHENGHE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY); 中国北京市西城区西直门外大街 1 号院西环广场 2 号楼 17 层 C7 室, Beijing 100044 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) **Title:** PETX POLYMER, PREPARATION METHOD THEREFOR AND THREE-DIMENSIONAL THORN-LIKE SENSOR INTERFACE

(54) 发明名称: PETx 聚合物、制备方法以及三维荆棘状传感器界面

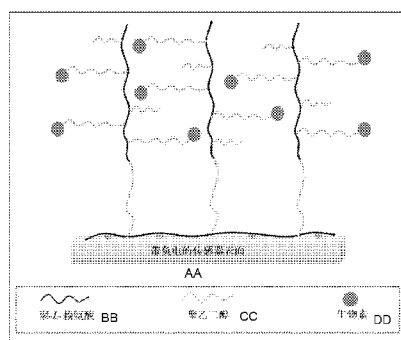


图 2

AA Negatively charged sensor surface
BB Poly-L-lysine
CC Polyethylene glycol
DD Biotin

(57) **Abstract:** Disclosed is a PETx polymer, characterized in that in the polymer, a first poly-L-lysine is the main skeleton; the side chains thereof are successively linked with a first polyethylene glycol and a second poly-L-lysine; the second poly-L-lysine is linked with a second polyethylene glycol and a third polyethylene glycol in a saturated manner without extra amino groups; and an end of the third polyethylene glycol is linked with a functional group, wherein the first poly-L-lysine and the second poly-L-lysine have the same or different chain length, and the first polyethylene glycol, the second polyethylene glycol and the third polyethylene glycol have the same or different chain length. Preferably, the PETx polymer is PLL-g-{PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-biological recognition group)_y%(PEG_i)_{1-y}%]}_x%, wherein i, j, k, m and n are all integers greater than or equal to 1, j is not equal to i, and both x and y are in the range of greater than 0 and less than 100. The present invention also relates to a method for preparing the PETx polymer and a three-dimensional thorn-like sensor interface based on the PETx polymer. According to the present invention, a three-dimensional functional interface can be formed on the surface of the sensor; in addition, the content of biological recognition groups and polyethylene glycol per unit of area of the sensor is greatly increased.

(57) 摘要：本发明公开了一种PETx聚合物，其特征在于，该聚合物以第一聚-L-赖氨酸为主骨架，侧链依次连接有第一聚乙二醇和第二聚-L-赖氨酸，在第二聚-L-赖氨酸上饱和地连接有第二聚乙二醇和第三聚乙二醇，而无多余的氨基，在所述第三聚乙二醇的末端连接有功能基团，其中，所述第一聚-L-赖氨酸和所述第二聚-L-赖氨酸具有相同或不同的链长，所述第一聚乙二醇、所述第二聚乙二醇和所述第三聚乙二醇具有相同或不同的链长；优选地，所述PETx聚合物为 $\text{PLL-g}\{(\text{PEG}_k\text{-PLL-g}\{(\text{PEG}_j\text{-生物识别基团})_{y\%}(\text{PEG}_i)_{1-y\%})\}_{x\%}$ ，其中，i、j、k、m和n均为大于等于1的整数，j不等于i，x,y均在大于0且小于100的范围内。本发明还涉及该PETx聚合物的制备方法以及基于该PETx聚合物的三维荆棘状传感器界面。本发明可以在传感器表面形成三维的功能化界面，同时使得生物识别基团和聚乙二醇在单位传感器面积上的含量大大增加。

PETx 聚合物、制备方法以及三维荆棘状传感器界面

技术领域

本发明涉及一种 PETx 聚合物、制备方法以及基于该 PETx 聚合物的三维荆棘状传感器界面。

背景技术

基于表面的生物传感器往往需要通过表面活化的方法,使得传感器的表面具有特定功能(如,抗非特异性吸附功能和特异性生物识别的功能)。这样的表面活化,根据传感器表面与功能化材料的连接方式来分主要包含两种:共价连接方法和非共价连接方法。

共价连接方法有很多的缺点,包括:1)共价结合(如氨基偶联)可能干扰蛋白质结构,影响其结合行为。2)蛋白的方向和表面密度难以控制。3)硅烷键的水解会破坏官能团的长期稳定性。4)共价键是不可逆的,传感器只能使用一次。

对于各种基于表面的生物传感器,大部分传感表面由 Au、Si/SiO₂ 等金属氧化物组成,其带微弱的负电(在生理 pH 值下)。多聚-L-赖氨酸 (PLL)是一种毒理学意义十分明确的多肽,在生理 pH 值下具有高度的阳离子性质,所以常被作为聚合物的骨架用于聚电解质的合成。这种以 PLL 为骨架的聚电解质,由于 PLL 上的氨基而带正电,从而可以通过静电作用的方式修饰到带负电的传感器表面,使得传感器的表面具有特定的功能。

生物素-链霉亲和素系统(Biotin-Streptavidin—System, BAS)是 70 年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统,几乎可与目前研究成功的各种标记物结合。所以在生物传感领域,生物素(Biotin)常被用做链霉亲和素蛋白(Streptavidin, SAv)的特异性吸附的功能基团。

PLL-g-PEG-Biotin 是一种已发明的功能化材料。它的结构示意图如图 1 所示, 是一种刷状的聚合物。该聚合物以 PLL 为骨架, 侧链的主体是 PEG(聚乙二醇), 在侧链的末端以 biotin 充当功能基团, 确切地说生物识别基团。它在生理 pH 值下带正电荷, 从而可以通过静电作用修饰到传感器表面。所形成的传感器界面, 由于功能基团处于同一平面, 所以又被称作为二维传感器界面 (2D 界面)。经过修饰的传感器表面同时具有了抗非特异性吸附和特异性识别和吸附链霉亲和素 (SAv) 的功能。另外, 通过调节 pH, 可以使得 PLL-g-PEG-Biotin 从传感器表面脱落, 从而实现传感器的再生。

PLL 骨架上的氨基, 一部分用于接入侧链, 另一部分用于产生正电荷。所以为了保证该聚电解质可以带有足够的正电荷用以静电修饰, 侧链的接枝率被控制在 40% 以下, 这就限制了生物识别基团 biotin 和侧链 PEG 在单位面积上的数目, 使得该生物传感器表面的特异性生物识别和抗非特异性吸附的能力受到限制, 从而限制了该生物传感器的传感效果。

发明内容

本发明旨在打破传统的 2D 界面的局限, 开发一种新型的聚电解材料, 可以在传感器表面形成三维的功能化界面 (3D 界面), 同时使得生物识别基团和聚乙二醇在单位面积上的数目大大增加。

本发明的技术方案是这样实现的:

根据本发明的一个方面, 提供了一种 PETx 聚合物, 该聚合物以第一聚-L-赖氨酸为主骨架, 侧链依次连接有第一聚乙二醇和第二聚-L-赖氨酸, 在第二聚-L-赖氨酸上饱和地连接有第二聚乙二醇和第三聚乙二醇, 而无多余的氨基, 在所述第三聚乙二醇的末端连接有功能基团, 其中, 所述第一聚-L-赖氨酸和所述第二聚-L-赖氨酸具有相同或不同的链长, 所述第一聚乙二醇、所述第二聚乙二醇和所述第三聚乙二醇具有相同或不同的链长; 优选地, 所述 PETx

聚合物为 $\text{PLL-g}\{-\text{PEG}_k\text{-PLL-g}\{[(\text{PEG}_j\text{-功能基团})_{y\%}(\text{PEG}_i)_{1-y\%}]\}_{x\%}\}$, 其中, i 、 j 、 k 均为大于等于 1 的整数, j 不等于 i , x 和 y 均在大于 0 且小于 100 的范围内。

本发明这里所述的 PETx 聚合物, 指的是一种新型用于聚电解质薄膜 (polyelectrolyte thin films) 的聚合物。

优选地, 所述 PETx 聚合物为 $\text{PLL-g}\{-\text{PEG}_k\text{-PLL-g}\{[(\text{PEG}_j\text{-生物识别基团})_{y\%}(\text{PEG}_i)_{1-y\%}]\}_{x\%}\}$ 。

优选地, 所述功能基团是生物识别基团 (或称生物检测基团); 所述生物识别基团选自生物素、Ni-NTA (Ni^{2+} 整合的次氨基三乙酸) 或单链 DNA, 用以实现特定的生物检测功能。

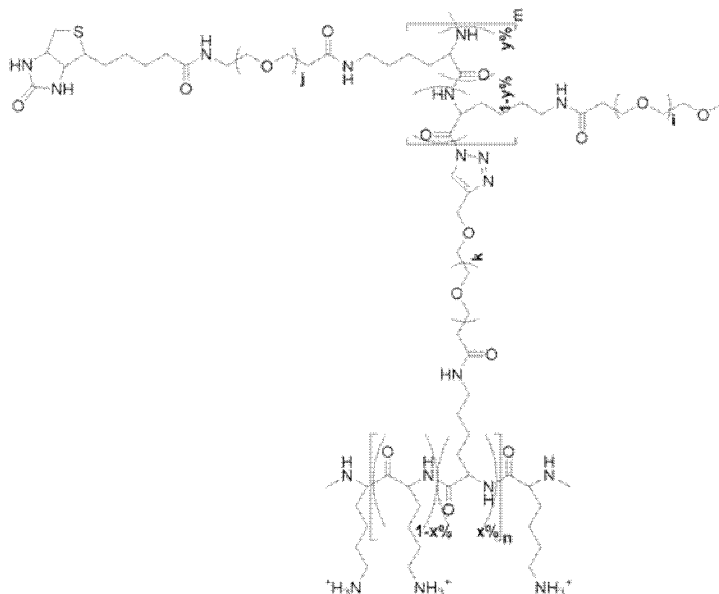
作为本发明的一种实施方式, 所述生物识别基团为生物素。

本方案中, PLL、PEG 的链长可以为任意。

作为本发明的一种实施方式, 所述第一聚-L-赖氨酸上的接枝率不超过 40%。

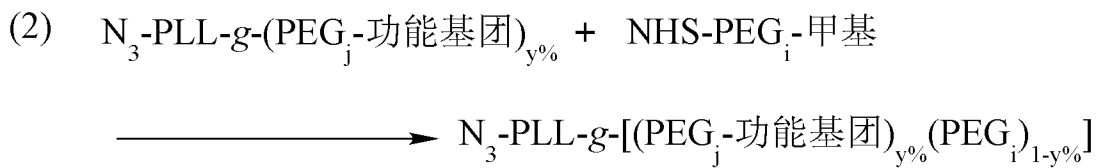
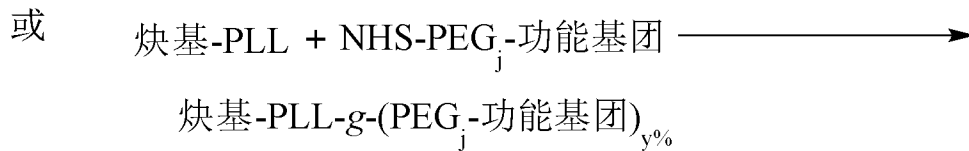
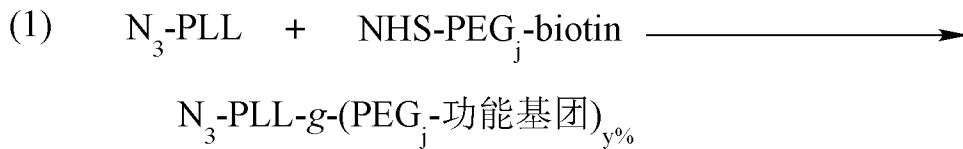
作为本发明的一种实施方式, 所述第一聚-L-赖氨酸的分子量为 15-30 kDa; 所述第二聚-L-赖氨酸的分子量为 3kDa。所述第一聚-L-赖氨酸和所述第二聚-L-赖氨酸的分子量根据所取的链长不同可有其它的选择。

作为本发明的一种实施方式, 所述的 PETx 聚合物的通式如下: 其中, i 、 j 、

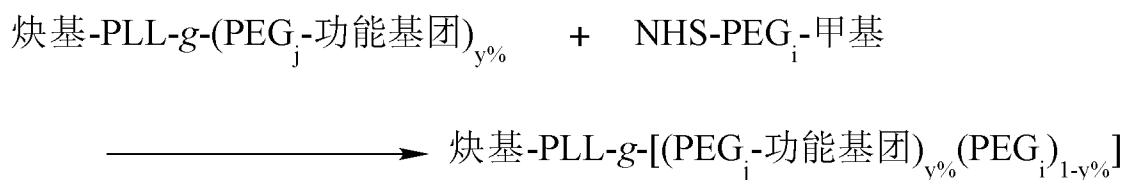


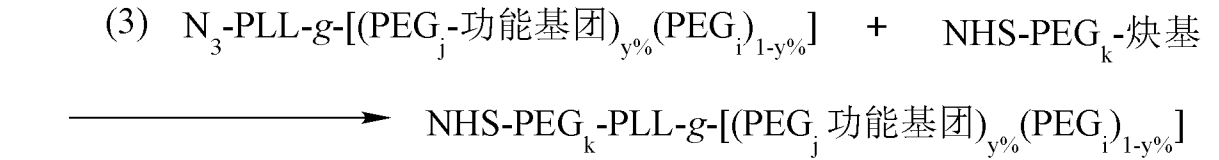
k、m 和 n 均为大于等于 1 的整数，x, y 均在大于 0 且小于 100 的范围内。

根据本发明的另一方面，提供了一种 PET_x 聚合物的制备方法，包括以下步骤： 1) 利用氨基和活性酯的反应，将活性酯-聚乙二醇-功能基团 (NHS-PEG-功能基团) 接枝到聚合物 1 (N₃-PLL 或炔基-PLL) 上得到聚合物 2 (N₃-PLL-g-(PEG_j-功能基团)_{y%} 或炔基-PLL-g-(PEG_j-功能基团)_{y%}) (反应式 1); 2) 过量的活性酯-聚乙二醇-甲基 (NHS-PEG-甲基) 被加入到反应中得到聚合物 3 (N₃-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}] 或炔基-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]) (反应式 2); 3) 通过叠氮基团和炔基的点击反应，将聚乙二醇-活性酯(PEG-NHS)接入聚合物中的聚-L-赖氨酸的末端得到聚合物 4 (NHS-PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]) (反应式 3); 4) 按照不超过 40% 的接枝率将聚合物 4 接枝到主骨架聚-L-赖氨酸上，得到聚合物 5 (PET_x，即 PLL-g-{PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]}_{x%}) (反应式 4)，

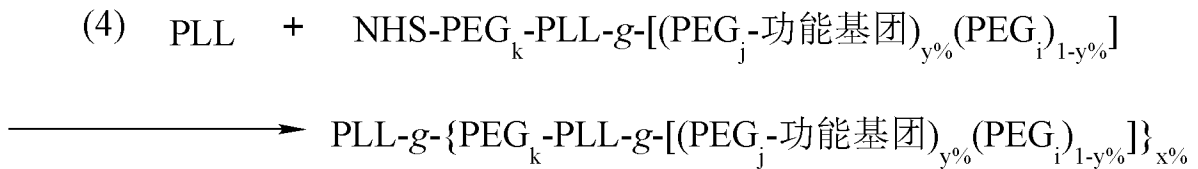
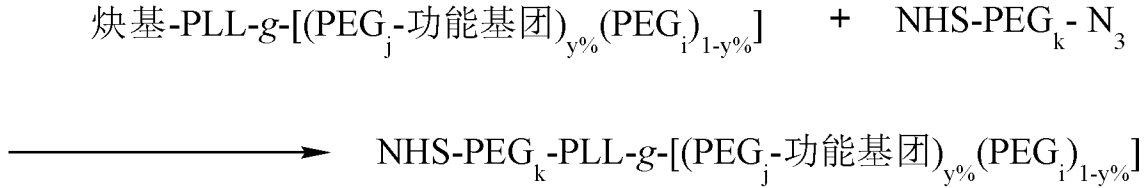


或





或



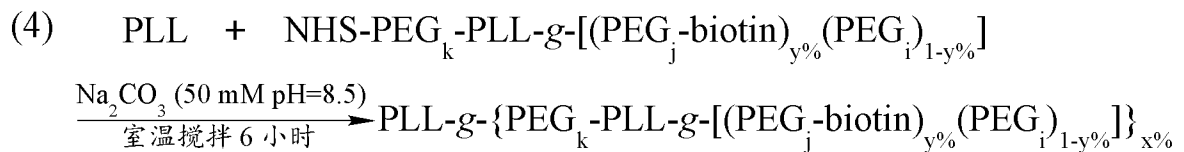
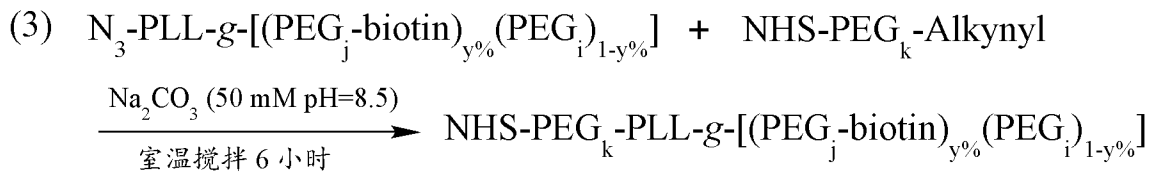
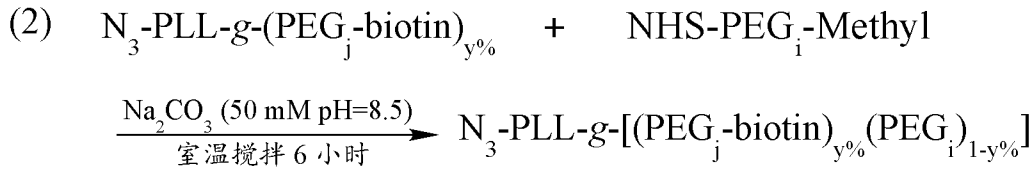
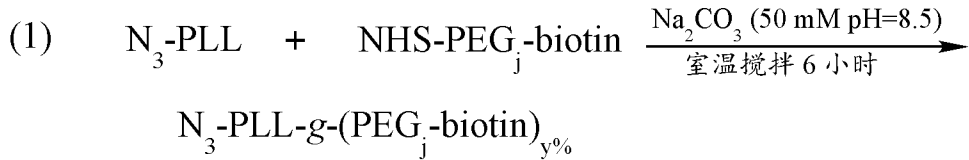
，其中，i、j、k、m 和 n 均为大于等于 1 的整数，x, y 均在大于 0 且小于 100 的范围内。

优选地，所述 PETx 聚合物的制备方法中，所述功能基团是生物识别基团，所述生物识别基团选自生物素、Ni-NTA 或单链 DNA。更优选地，所述生物识别基团为生物素。

优选地，所述 PETx 聚合物的制备方法中，步骤 3) 中的点击反应采用聚-L-赖氨酸-叠氮与炔基-聚乙二醇-活性酯之间的点击反应引入活性酯或者采用聚-L-赖氨酸-炔基与叠氮-聚乙二醇-活性酯之间的点击反应引入活性酯。

作为本发明的一种实施方式，所述 PETx 聚合物的制备方法，包括以下步骤：1) 利用聚合物 1 (N₃-PLL) 上的氨基和活性酯的反应，将活性酯-聚乙二醇-生物素(NHS-PEG-biotin)接枝到聚合物 1 上得到聚合物 2 (反应式 1)；2) 过量的活性酯-聚乙二醇-甲基 (NHS-PEG-Methyl) 被加入到反应中得到聚合物 3，用以确保聚-L-赖氨酸上没有剩余的氨基(反应式 2)；3) 通过叠氮基团和炔基的点击反应，将聚乙二醇-活性酯(PEG-NHS)接入聚合物 3 中的聚-L-赖氨酸的末端得到聚合物 4 (反应式 3)；4) 按照不超过 40%的

接枝率将聚合物 4 接枝到主骨架聚-L-赖氨酸上, 得到聚合物 5 (PET_x, 即 PLL-g-{PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-biotin)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]}_{x%}) (反应式 4),



。

根据本发明的又一方面, 提供了一种三维荆棘状传感器界面, 所述传感器界面包括带负电的传感器表面和 PET_x 聚合物, 所述 PET_x 聚合物通过静电作用的方式修饰到所述传感器表面, 从而形成三维的荆棘状的传感界面。

作为本发明的一种实施方式, 所述的传感器表面为光纤传感器表面、二氧化硅传感表面、金属传感表面或金属氧化物传感表面。

根据本发明的再一方面, 提供了本发明所述的 PET_x 聚合物或本发明所述的三维荆棘状传感器界面在生物检测和抗非特异性吸附方面的应用。

附图说明

图 1 是现有技术中已发明的功能化材料 PLL-g-PEG-Biotin 的结构示意图;

图 2 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 形成的 3D 传感界面的结构示意图；

图 3 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 的化学结构通式；

图 4 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 的合成方案；

图 5 是聚合物 3 的核磁氢谱；

图 6 是聚合物 4 的核磁氢谱；

图 7 是生物识别基团为生物素为例的聚合物 PETx 的核磁氢谱；

图 8 是二氧化硅表面上的 PETx 薄膜的 XPS 谱图；

图 9 是二氧化硅表面上的 PETx 薄膜的 XPS 高分辨率 C1s 光谱图；

图 10 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 的生物检测原理；

图 11 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和 2D 界面的实时生物检测对比图；

图 12 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和 2D 界面实时生物检测的浓度曲线对比图；

图 13 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在牛血清蛋白溶液中的抗非特异性吸附实验；

图 14 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在牛血清蛋白溶液中的抗非特异性吸附的效果对比图；

图 15 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 10%血清中的抗非特异性吸附实验；

图 16 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 50%血清中的抗非特异性吸附实验；

图 17 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 100%血清中的抗非特异性吸附实验；

图 18 是生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在不同稀

释条件下的血清中的抗非特异性吸附的效果对比图。

具体实施方式

下面结合将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

术语“非特异性吸附”是指蛋白等一些生物分子,由于静电等作用吸附到材料表面,对实验分析引起干扰的现象。

术语“特异性吸附”是指特定的蛋白(或其它生物分子)吸附到特定活性位点的现象。

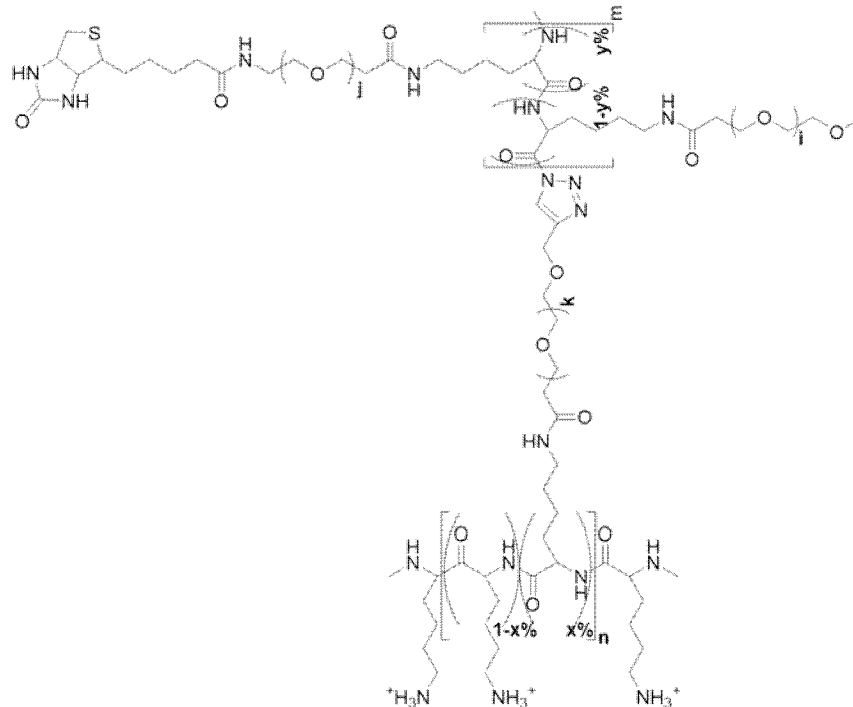
术语“聚乙二醇(PEG)”具有良好的亲水性和生物相容性,被广泛运用于抗蛋白的非特异性吸附的功能。

术语“点击化学”是 2001 年由美国化学家 Sharpless 提出的合成概念,其中以叠氮化物和炔烃的 1,3-偶极环加成反应生成 1,2,3-三唑最具有代表性。该反应条件温和,产率高,近年来在蛋白尤其是抗体的固定化中应用逐渐增多。在本发明的一种实施方式中采用 PLL-N₃ 与炔基-PEG-NHS 之间的点击反应引入 NHS,需要注意的是,利用 PLL-炔基与 N₃-PEG-NHS 之间的点击反应来引入 NHS,也是同样可行的。

以下实施方式以生物素为功能基团为例。然而本发明不限于此,所述功能基团还可包括用以实现特定的生物检测功能的其它基团,如 Ni-NTA (Ni²⁺螯合的次氨基三乙酸) 或单链 DNA 等。

实施例 1

图 2 是 PETx 形成的 3D 传感界面示意图。PETx 由三个部分组成：聚-L-赖氨酸、聚乙二醇和生物素。其化学结构如图 3 所示，其中，i、j、k、m 和 n 均为大于等于 1 的整数，x，y 均在大于 0 小于 100 的范围内。



接下来，以 $m=10$ 、 $n=75$ 、 $j=12$ 、 $i=4$ 、 $k=4$ 、 $x=40$ 、 $y=50$ 为例，介绍 PETx 的合成方案。

PETx 的合成: PETx 的合成方案如图 4 所示。该方案的思路是将传统的 2D 聚电解质整体当作侧链, 接枝到聚-L-赖氨酸的骨架上, 形成 3D 的聚电解质 PETx。为了便于引入能和氨基反应的活性酯 (NHS) 基团, 我们选择了末端接有叠氮基团的聚-L-赖氨酸 (聚合物 1, 分子量为 3 kDa) 作为侧链合成过程中的侧骨架。前三步为侧链的合成过程, 首先利用聚-L-赖氨酸上的氨基和活性酯的反应, 将活性酯-聚乙二醇-生物素按照 50% 的接枝率接枝到聚-L-赖氨酸上得到聚合物 2 (反应式 1)。之后, 过量的活性酯-聚乙二醇-甲基被加入到反应中得到聚合物 3 (反应式 2), 用以确保聚赖氨酸上没有剩余的氨基。接下来就是通过叠氮基团和炔基的反应 (点击化学), 将聚乙二醇-活性酯接入聚-L-赖氨酸的末端得到聚合物 4 (反应式 3)。化合物 4 因为引入了活性酯, 所以

可以很顺利地按照 40%的接枝率接枝到主骨架聚-L-赖氨酸(15-30 kDa)上, 得到化合物 5 (PETx) (反应式 4)。

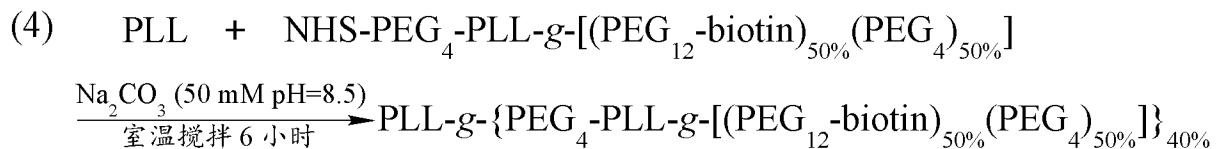
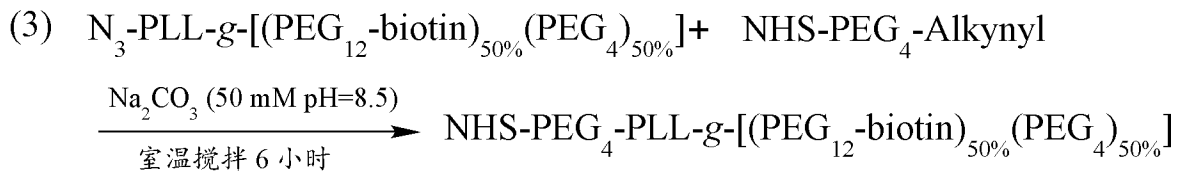
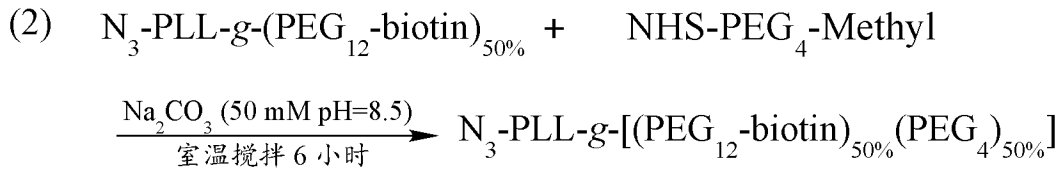
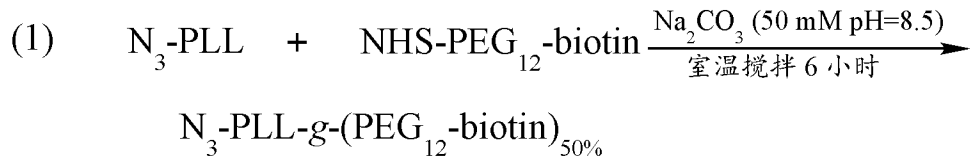


图 5 是聚合物 3 的核磁氢谱: (^1H NMR in D_2O , δ [ppm] = 1.34-1.43 (lysine γ - CH_2), (biotin, β - CH_2 -), 1.47-1.87 (lysine β , δ - CH_2), (biotin, γ - CH_2), 2.15 (biotin, $-\text{CH}_2$ C(O)NH-), 2.51 (coupled PEG, $-\text{CH}_2$ $-\text{C(O)-N}$), 2.68 (lysine, $(-\text{CH}_2\text{-C(O)-N})$), 2.82-2.89 (lysine, $-\text{CH}_2\text{-NH-C(O)}$), (PEG, $-\text{CH}_2\text{-NH-C(O)}$), 3.07 (biotin, $-\text{S-CH}_2$ -), 3.21 (biotin, $-\text{S-CH}$ -), 3.27 (free lysine, $-\text{N-CH}_2$), 3.38 (PEG, $-\text{O-CH}_3$), 3.56 (PEG, CH_2 $-\text{O-}$), 4.13 (lysine, N-CH-C(O)-), 4.27 and 4.45 (biotin, 2 bridge head CH)。

图 6 是聚合物 4 的核磁氢谱: (^1H NMR in D_2O , δ [ppm] = 1.32-1.41 (lysine γ - CH_2), (biotin, β - CH_2 -), 1.48-1.89 (lysine β , δ - CH_2), (biotin, γ - CH_2), 2.16 (biotin, $-\text{CH}_2$ C(O)NH-), 2.52 (coupled PEG, $-\text{CH}_2$ $-\text{C(O)-N}$), 2.69 (lysine, $(-\text{CH}_2\text{-C(O)-N})$), 2.83-2.91 (lysine, $-\text{CH}_2\text{-NH-C(O)}$), (PEG, $-\text{CH}_2\text{-NH-C(O)}$),

3.09 (biotin, -S-CH₂-), 3.23 (biotin, -S-CH-), 3.26(free lysine, -N-CH₂), 3.37 (PEG,-O-CH₃), 3.55 (PEG, CH₂ -O-), 4.15 (lysine, N-CH-C(O)-), 4.26 and 4.47 (biotin, 2 bridge head CH))。

图 7 是聚合物 **PETx** 的核磁氢谱：¹H NMR in D₂O, δ [ppm] = 1.34-1.42 (lysine γ -CH₂), (biotin, β -CH₂-), 1.44-1.89 (lysine β , δ -CH₂), (biotin, γ -CH₂), 2.13 (biotin, -CH₂ C(O)NH-), 2.54 (coupled PEG, -CH₂ -C(O)-N), 2.71 (lysine,(-CH₂-C(O)-N)), 2.84-2.92 (lysine, -CH₂-NH-C(O)), (PEG,-CH₂-NH-C(O)), 3.10 (biotin, -S-CH₂-), 3.23 (biotin, -S-CH-), 3.25(free lysine, -N-CH₂), 3.36 (PEG,-O-CH₃), 3.57 (PEG, CH₂ -O-), 4.13 (lysine, N-CH-C(O)-), 4.26 and 4.46 (biotin, 2 bridge head CH))。

图 8 是二氧化硅表面上的 PETx 薄膜的 XPS 谱图, 显示了 PETx 的各个元素组成。

图 9 是二氧化硅表面上的 PETx 薄膜的 XPS 高分辨率 C1s 光谱图, 表明了各个碳元素的价态类型。

实施例 2

我们利用光干涉法对比了 PETx 和 2D 的 PLL-g-PEG-biotin 的生物检测效果。本发明产品的工作原理如图 10 所示, 首先将 PETx 修饰到带负电的光纤端面上, 然后该 PETx 可以特异性吸附链霉亲和素, 之后链霉亲和素又可以特异性吸附生物素化的抗人 IgG 抗体 (biotinylated anti-human IgG, NNCrystal 公司), 最后抗体可以特异性对抗原进行特异性的检测。

图 11 展示了 PETx 和 PLL-g-PEG-Biotin 的蛋白实时检测效果, 纵坐标为该光纤端面上形成的薄膜的厚度。从图中我们发现, 当对过量的链霉亲和素 (200 nM) 进行检测时, PETx 可以结合更多的链霉亲和素。这得益于 PETx 中含有更多的生物识别基团 (生物素)。之后传感器又对不同浓度 (1-250 μ g /mL)

的抗原（人免疫球蛋白，human IgG，NNCrystal 公司）进行了检测。

图 12 是两种传感界面对抗原的检测的浓度曲线图，曲线的斜率反映了传感器的灵敏度。图中可以发现，经 PETx 修饰过的传感器的灵敏度要远高于传统的 2D 界面传感器（PLL-g-PEG-biotin）。

实施例 3

我们利用光干涉法对比了 PETx 和其他聚电解质（PLL-g-PEG-biotin 和 PLL）的抗非特异性吸附能力。我们先将 PETx 修饰到带负电的光纤端面上，然后检测该光纤端面在牛血清蛋白(BSA)溶液和不同稀释倍数的血清中的抗非特异性吸附能力。

图 13 展示了生物识别基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 BSA 溶液（15 μ M, 10 mM HEPES, pH 7.4）中的抗非特异性吸附实验，纵坐标为该光纤端面上形成的薄膜的厚度变化。从图中可以看出修饰了 PETx 的光纤端面在浸入 BSA 溶液后厚度没有增加。这表明 PETx 具有完美的抗非特异性吸附的能力。

图 14 直观的对比 PETx 和其他聚电解质在 BSA 溶液中的抗非特异性吸附的效果。

图 15 展示了功能基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 10%血清中的抗非特异性吸附实验。我们将修饰了 PETx 的光纤端面先浸入 HEPES 缓冲液中测得基线。之后，将该光纤端面浸入 10%血清中，5 分钟后取出。取出的光纤端面被重新浸入 HEPES 缓冲液，观察基线变化。如图所示，修饰了 PETx 的光纤端面基线并没有上升。这表明 PETx 具有完美的抗非特异性吸附的能力。

图 16 展示了功能基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 50%血清中的抗非特异性吸附实验。我们将修饰了 PETx 的光纤端面先浸入 HEPES 缓冲液中测得基线。之后，将该光纤端面浸入 50%血清中，5 分钟后取出。取

出的光纤端面被重新浸入 HEPES 缓冲液，观察基线变化。如图所示，修饰了 PETx 的光纤端面基线并没有上升。这表明 PETx 具有完美的抗非特异性吸附的能力。

图 17 展示了功能基团为生物素为例的 PETx 和其他聚电解质在 100%血清中的抗非特异性吸附实验。我们将修饰了 PETx 的光纤端面先浸入 HEPES 缓冲液中测得基线。之后，将该光纤端面浸入 100%血清中，5 分钟后取出。取出的光纤端面被重新浸入 HEPES 缓冲液，观察基线变化。如图所示，修饰了 PETx 的光纤端面基线并没有上升。这表明 PETx 具有完美的抗非特异性吸附的能力。

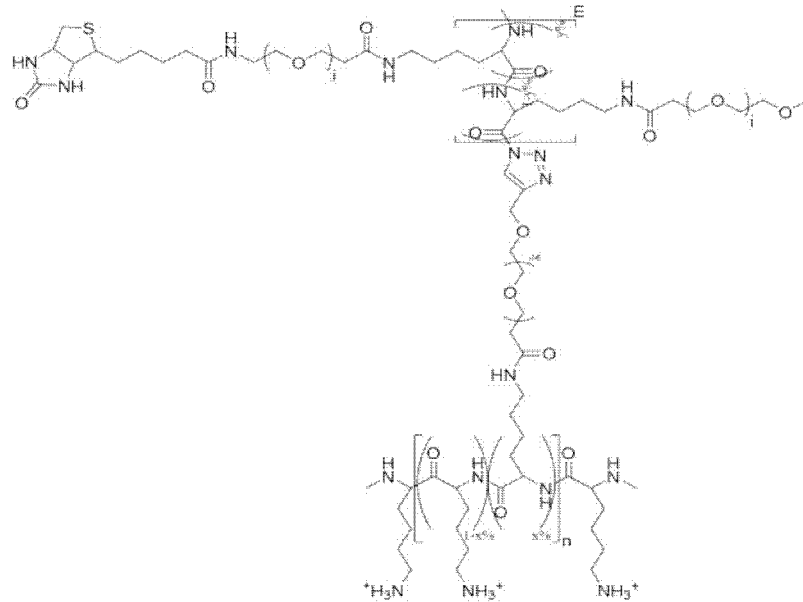
图 18 直观地对比 PETx 和其他聚电解质在不同稀释倍数的血清中的抗非特异性吸附的效果。图中显示，PETx 在不同稀释倍数的血清中均表现出了优异的抗非特异性吸附的能力。

该方案设计并合成了新型的聚电解质 PETx，能够形成 3D 的传感界面，并且相比于传统 2D 的 PLL-g-PEG-biotin 拥有更多的生物素功能基团和聚乙二醇含量，这使得 PETx 具有更好的传感效果和抗非特异性吸附的能力。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用于限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

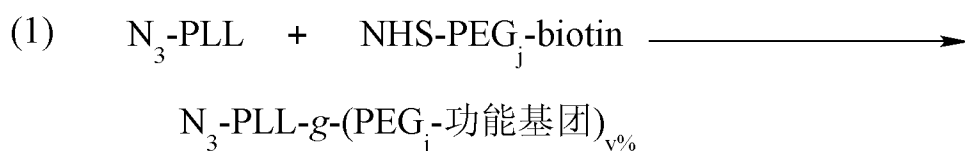
权 利 要 求 书

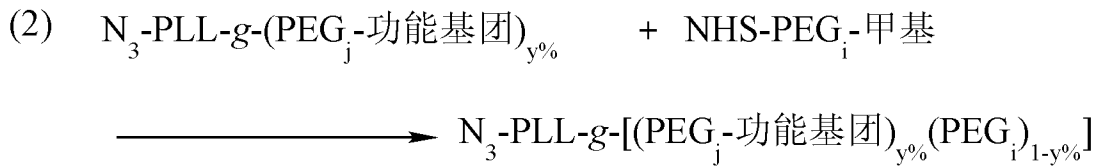
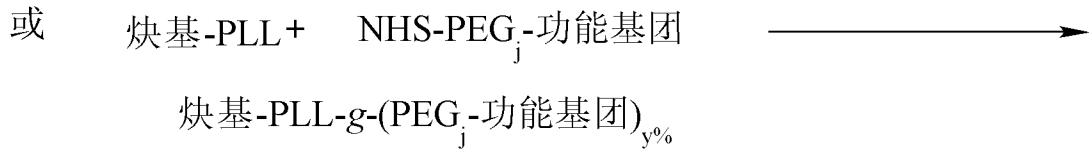
1. 一种 PETx 聚合物, 其特征在于, 该聚合物以第一聚-L-赖氨酸为主骨架, 侧链依次连接有第一聚乙二醇和第二聚-L-赖氨酸, 在第二聚-L-赖氨酸上饱和地连接有第二聚乙二醇和第三聚乙二醇, 而无多余的氨基, 在所述第三聚乙二醇的末端连接有功能基团, 其中, 所述第一聚-L-赖氨酸和所述第二聚-L-赖氨酸具有相同或不同的链长, 所述第一聚乙二醇、所述第二聚乙二醇和所述第三聚乙二醇具有相同或不同的链长; 优选地, 所述 PETx 聚合物为 $PLL-g-\{PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y\%}(PEG_i)_{1-y\%}]\}_{x\%}$, 其中, i 、 j 、 k 均为大于等于 1 的整数, j 不等于 i , x 和 y 均在大于 0 且小于 100 的范围内。
2. 根据权利要求 1 所述的 PETx 聚合物, 其特征在于, 所述功能基团是生物识别基团, 所述生物识别基团选自生物素、Ni-NTA 或单链 DNA。
3. 根据权利要求 1 所述的 PETx 聚合物, 其特征在于, 所述生物识别基团为生物素。
4. 根据权利要求 1 所述的 PETx 聚合物, 其特征在于, 所述第一聚-L-赖氨酸上的接枝率不超过 40%。
5. 根据权利要求 1 所述的 PETx 聚合物, 其特征在于, 所述第一聚-L-赖氨酸的分子量为 15-30 kDa; 所述第二聚-L-赖氨酸的分子量为 3 kDa。
6. 根据权利要求 1 所述的 PETx 聚合物, 其特征在于, 所述的 PETx 聚合物的通式如下:



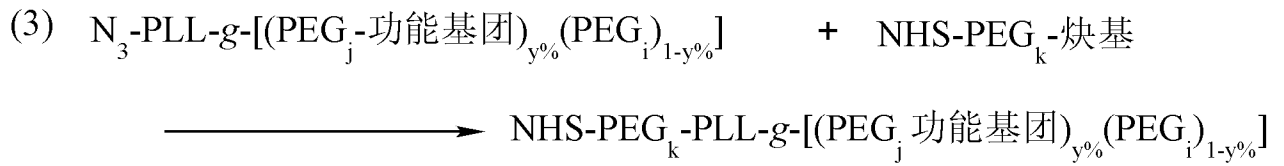
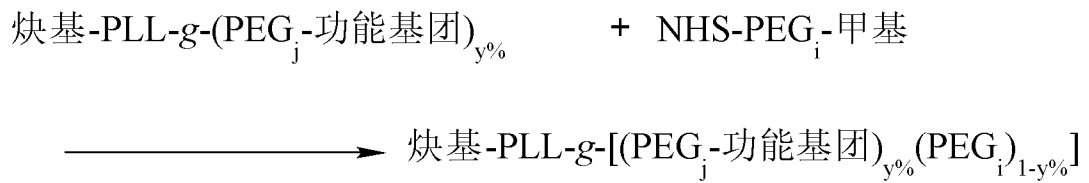
其中，i、j、k、m 和 n 均为大于等于 1 的整数，x 和 y 均在大于 0 且小于 100 的范围内。

7. 一种 PETx 聚合物的制备方法，其特征在于，1) 利用氨基和活性酯的反应，将活性酯-聚乙二醇-功能基团(NHS-PEG-功能基团)接枝到聚合物 1 (N_3 -PLL 或炔基-PLL) 上得到聚合物 2 (N_3 -PLL-g-(PEG_j-功能基团)_{y%} 或炔基-PLL-g-(PEG_j-功能基团)_{y%}) (反应式 1); 2) 过量的活性酯-聚乙二醇-甲基 (NHS-PEG-甲基) 被加入到反应中得到聚合物 3 (N_3 -PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}] 或炔基-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]) (反应式 2); 3) 通过叠氮基团和炔基的点击反应，将聚乙二醇-活性酯(PEG-NHS)接入聚合物 3 中的聚-L-赖氨酸的末端得到聚合物 4 (NHS-PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]) (反应式 3); 4) 按照不超过 40% 的接枝率将聚合物 4 接枝到主骨架聚-L-赖氨酸上，得到聚合物 5 (PETx, 即 PLL-g-{PEG_k-PLL-g-[(PEG_j-功能基团)_{y%}(PEG_i)_{1-y%}]}_{x%}) (反应式 4),

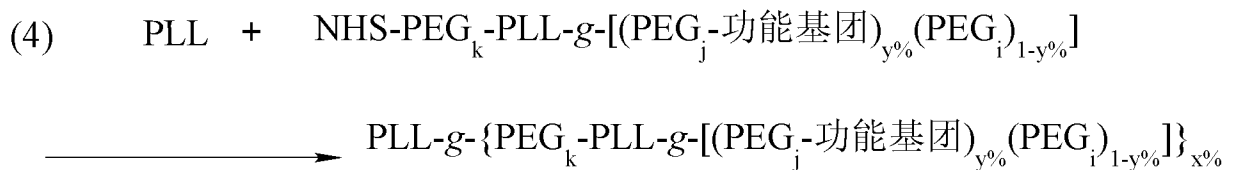
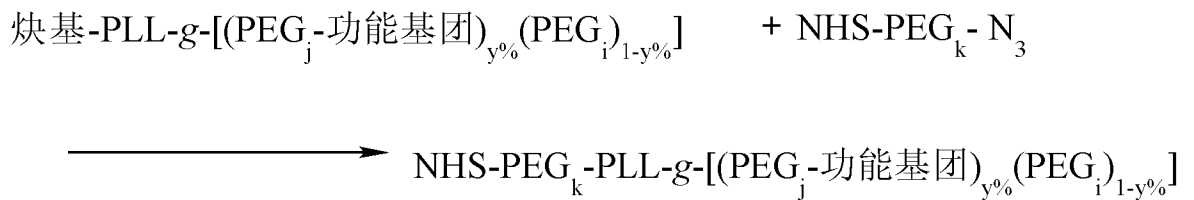




或



或



其中, i 、 j 、 k 、 m 和 n 均为大于等于 1 的整数, x 、 y 均在大于 0 且小于 100 的范围内;

优选地, 所述功能基团是生物识别基团。

8. 一种三维荆棘状传感器界面, 其特征在于, 所述传感器界面包括带负

电的传感器表面和权利要求 1-6 任一项所述的 PETx 聚合物, 所述 PETx 聚合物通过静电作用的方式修饰到所述传感器表面, 从而形成三维的荆棘状的传感界面。

9. 根据权利要求 8 所述的三维荆棘状传感器界面, 其特征在于, 所述的传感器表面为光纤传感器表面、二氧化硅传感表面、金属传感表面或金属氧化物传感表面。
10. 权利要求 1-6 任一项所述的 PETx 聚合物或权利要求 8-9 任一项所述的三维荆棘状传感器界面在制备生物传感器方面的应用。

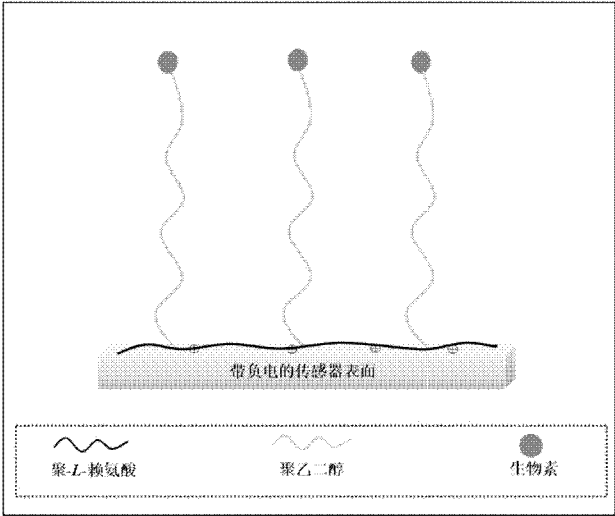


图1

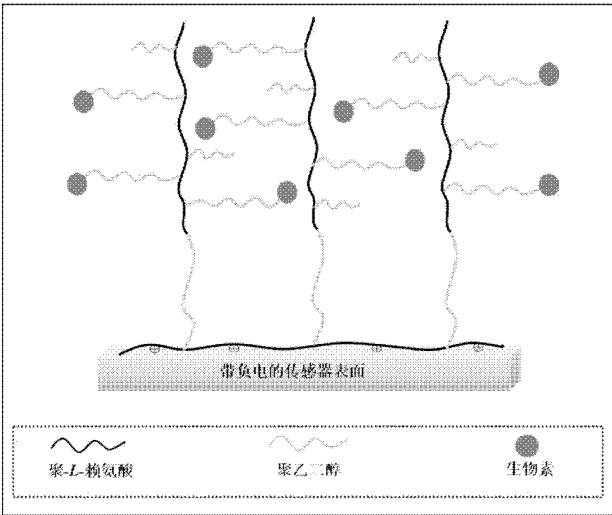


图2

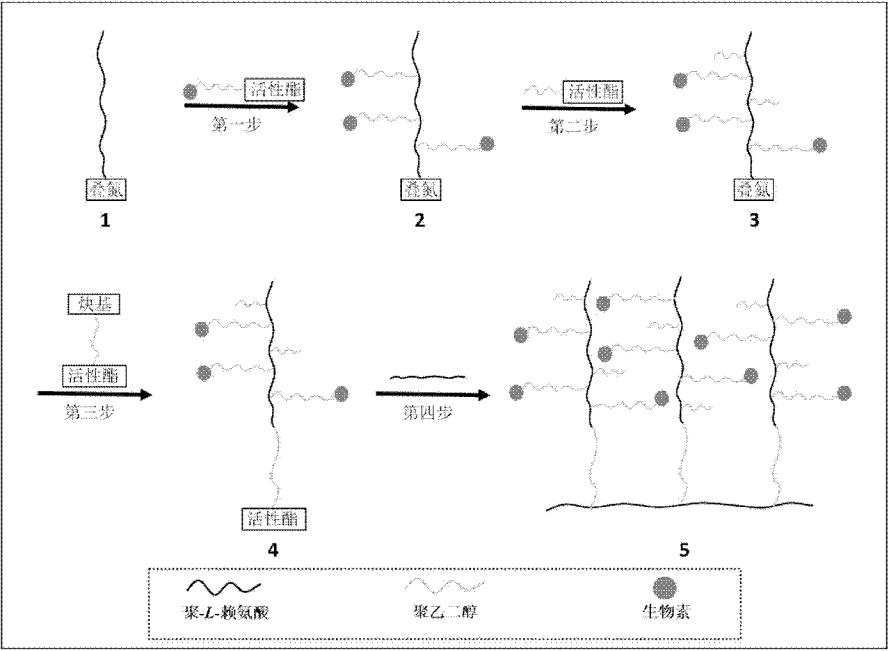


图3

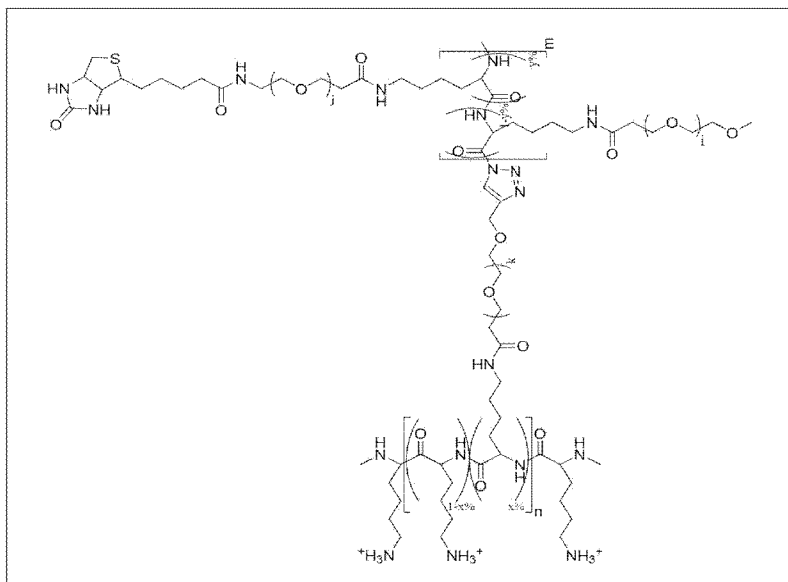


图4

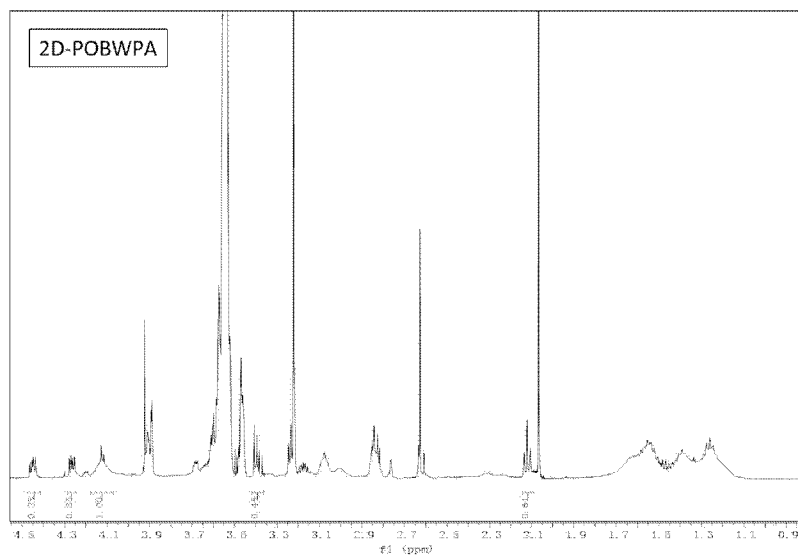


图5

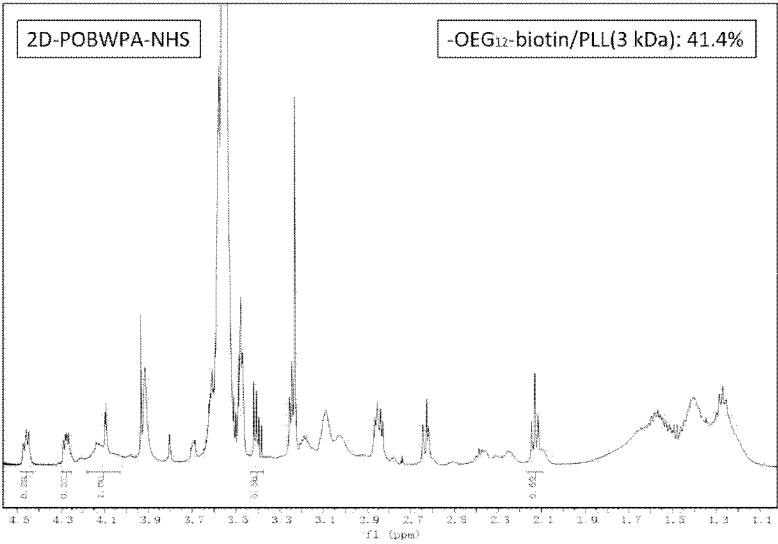


图6

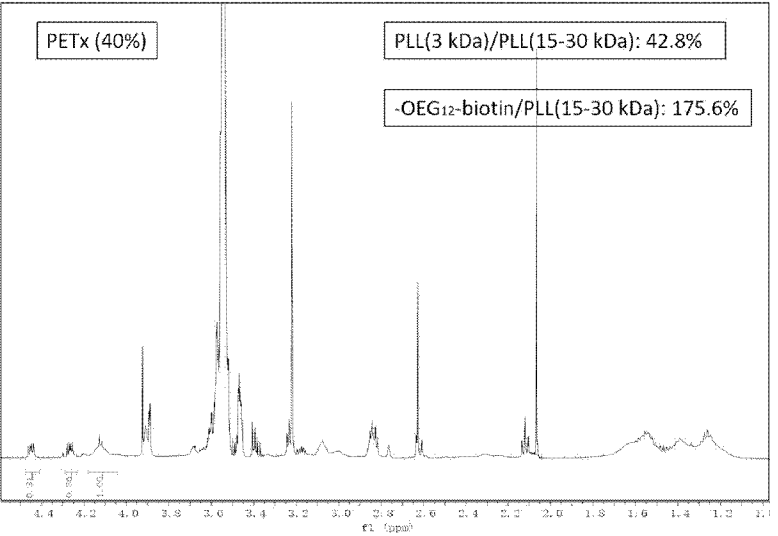


图7

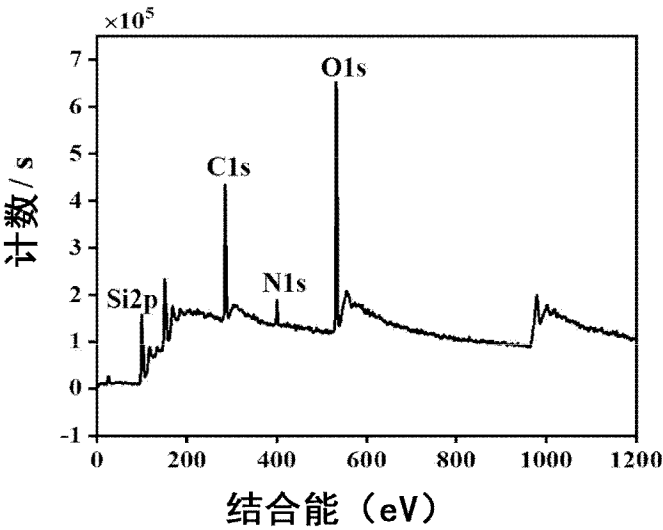


图 8

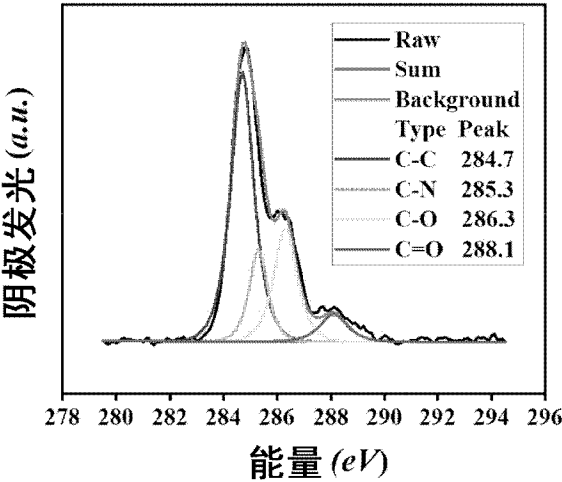


图 9

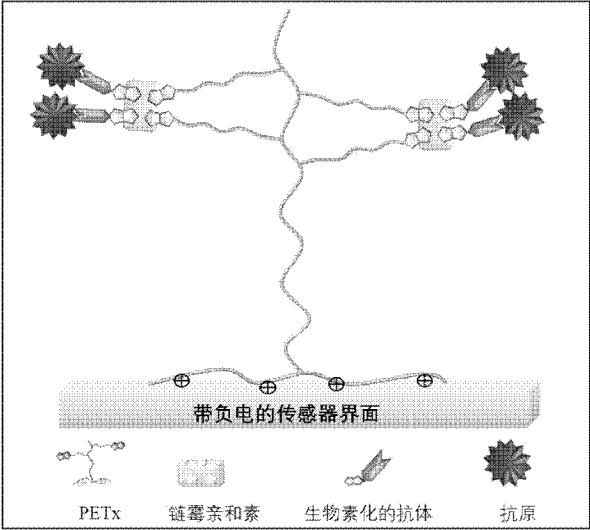


图10

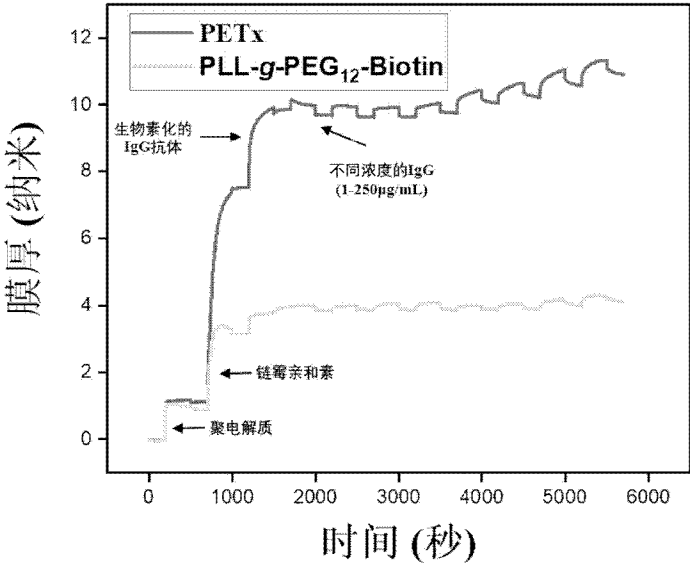


图11

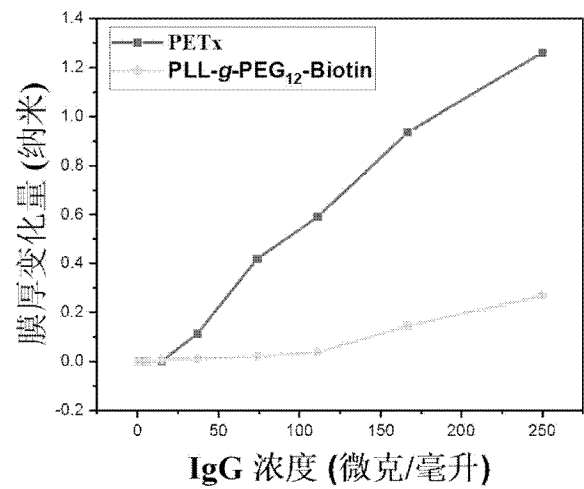


图12

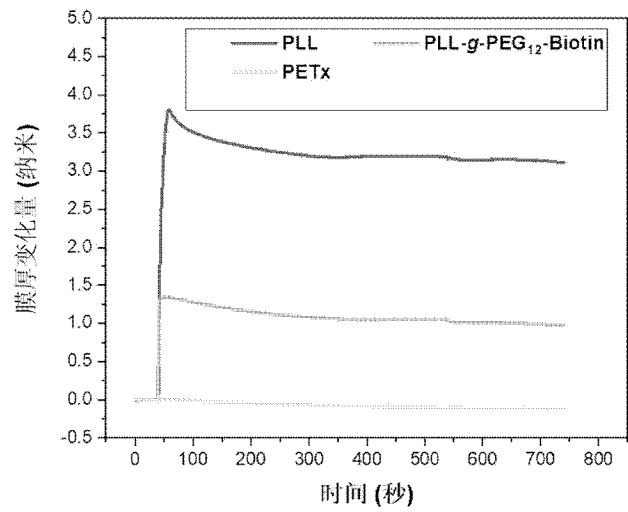


图13

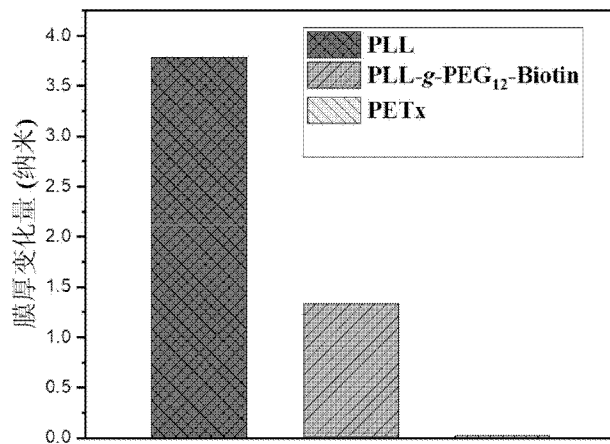


图 14

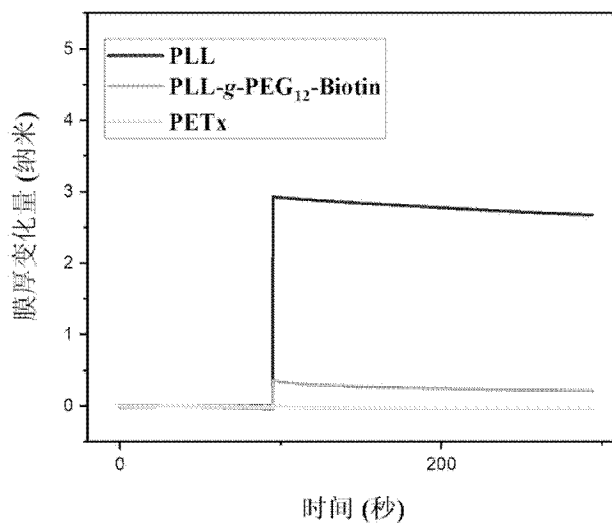


图 15

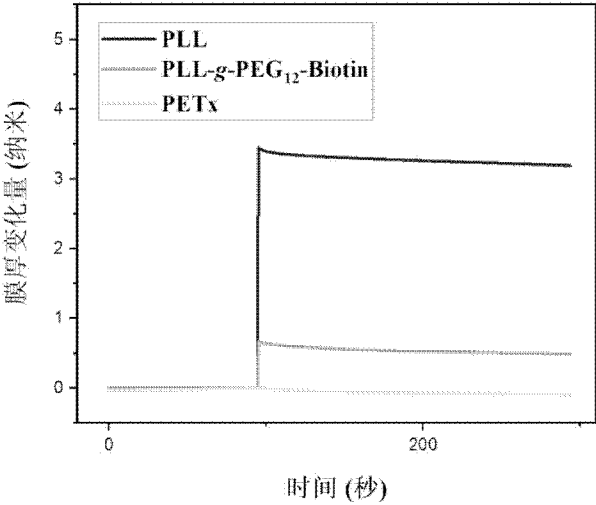


图 16

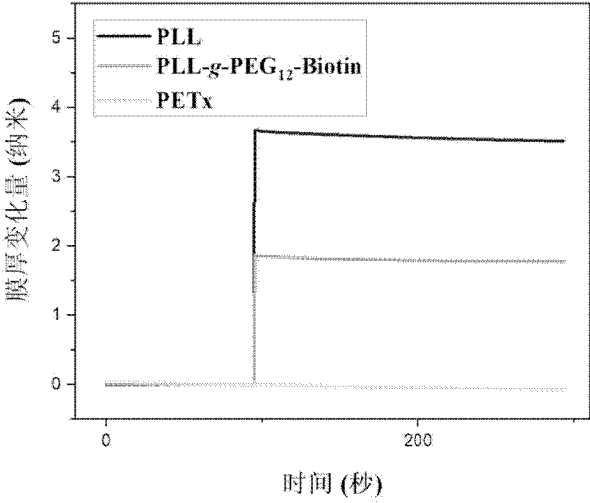


图 17

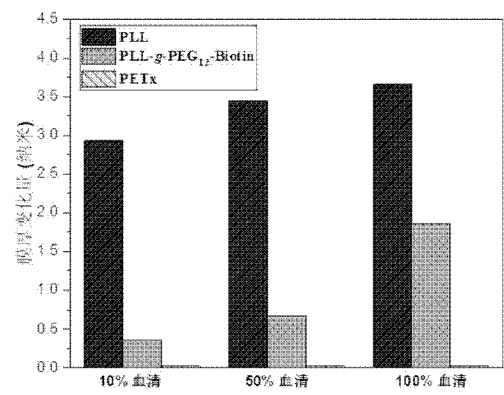


图18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G 81/00(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08G69,C08G81,G01N33,C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, ISI Web of Science: 天津大学, 段学欣, 潘文尉, 聚乙二醇, 赖氨酸, 氨基酸, 多肽, 聚合物, 骨架, 链, 生物素, 次氮基三乙酸, 单链DNA, 聚电解质, 传感器, 生物传感器, 叠氮, 炔, 点击, 聚乙二醇活性酯, biosensor?, sensor?, polyelectrolyte?, PEG, PEG S PLL, poly+ethylene+glycol, poly(ethylene glycol), PLL, poly(l-lysine?), poly+lysine?, +peptid?, DNA, biotin?, N3, +azide?, +alkyn+, click, graft+, modif+, +block+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chao Deng et al., "A biodegradable triblock copolymer poly(ethylene glycol)-b-poly(L-Lysine):Synthesis, self-assembly, and RGD peptide modification," <i>Polymer</i> , Vol. 48, No. 5, 28 November 2006 (2006-11-28), pp. 139-149	1-10
A	Xiufang Wen et al., "Specific antibody immobilization with biotin-poly (L-lysine)-g-poly (ethylene glycol) and protein A on microfluidic chips," <i>Journal of Immunological Methods</i> , Vol. 350, No. 1-2, 06 August 2009 (2009-08-06), pp. 97-105	1-10
PX	CN 110183672 A (TIANJIN UNIVERSITY) 30 August 2019 (2019-08-30) entire document	1-10
A	CN 1646912 A (JAPAN SCIENCE & TECH CORP.) 27 July 2005 (2005-07-27) entire document	1-10
A	WO 2004038040 A2 (SENSE THERAPEUTIC LTD, et al.) 06 May 2004 (2004-05-06) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2020

Date of mailing of the international search report

12 August 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090348**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018234564 A1 (PARIS SCIENCES LETTRES QUARTIER LATIN, et al.) 27 December 2018 (2018-12-27) entire document	1-10
A	EP 3329945 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIV) 06 June 2018 (2018-06-06) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/090348

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110183672	A	30 August 2019	None			
CN	1646912	A	27 July 2005	WO	03083478	A1	09 October 2003
				EP	1496363	A1	12 January 2005
				KR	20040105839	A	16 December 2004
				EP	1496363	A4	18 May 2005
				US	2005106570	A1	19 May 2005
				CA	2480770	A1	09 October 2003
WO	2004038040	A2	06 May 2004	EP	1576374	B1	06 August 2008
				US	2006275855	A1	07 December 2006
				AU	2003280177	A8	13 May 2004
				ES	2314258	T3	16 March 2009
				EP	1576374	A2	21 September 2005
				AU	2003280177	A1	13 May 2004
				DE	60322742	D1	18 September 2008
				WO	2004038040	A3	20 January 2005
				AT	403876	T	15 August 2008
WO	2018234564	A1	27 December 2018	EP	3642348	A1	29 April 2020
EP	3329945	A1	06 June 2018	US	2020140604	A1	07 May 2020
				WO	2018104324	A1	14 June 2018
				EP	3548107	A1	09 October 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/090348

A. 主题的分类

C08G 81/00 (2006.01) i; G01N 33/48 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C08G69, C08G81, G01N33, C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, ISI Web of Science: 天津大学, 段学欣, 潘文尉, 聚乙二醇, 赖氨酸, 氨基酸, 多肽, 聚合物, 骨架, 链, 生物素, 次氨基三乙酸, 单链DNA, 聚电解质, 传感器, 生物传感器, 叠氮, 炔, 点击, 聚乙二醇活性酯, biosensor?, sensor?, polyelectrolyte?, PEG, PEG S PLL, poly+ethylene+glycol, poly(ethylene glycol), PLL, poly(l-lysine?), poly+lysine?, +peptid?, DNA, biotin?, N3, +azide?, +alkyn+, click, graft+, modif+, +block+

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Chao Deng 等, . "A biodegradable triblock copolymer poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine): Synthesis, self-assembly, and RGD peptide modification, " 《Polymer》, , 第48卷, 第5期, 2006年 11月 28日 (2006 - 11 - 28), 第139-149页	1-10
A	Xiufang Wen等, . "Specific antibody immobilization with biotin-poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) and protein A on microfluidic chips, " 《Journal of Immunological Methods》, , 第350卷, 第1-2期, 2009年 8月 6日 (2009 - 08 - 06), 第97-105页	1-10
PX	CN 110183672 A (天津大学) 2019年 8月 30日 (2019 - 08 - 30) 全文	1-10
A	CN 1646912 A (JAPAN SCIENCE & TECH CORP) 2005年 7月 27日 (2005 - 07 - 27) 全文	1-10
A	WO 2004038040 A2 (SENSE THERAPEUTIC LTD, 等) 2004年 5月 6日 (2004 - 05 - 06) 全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
--	---

国际检索实际完成的日期

2020年 7月 16日

国际检索报告邮寄日期

2020年 8月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

孟帅

电话号码 010-62086176

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2018234564 A1 (PARIS SCIENCES LETTRES QUARTIER LATIN, 等) 2018年 12月 27日 (2018 - 12 - 27) 全文	1-10
A	EP 3329945 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIV) 2018年 6月 6日 (2018 - 06 - 06) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/090348

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110183672	A	2019年 8月 30日	无			
CN	1646912	A	2005年 7月 27日	WO	03083478	A1	2003年 10月 9日
				EP	1496363	A1	2005年 1月 12日
				KR	20040105839	A	2004年 12月 16日
				EP	1496363	A4	2005年 5月 18日
				US	2005106570	A1	2005年 5月 19日
				CA	2480770	A1	2003年 10月 9日
WO	2004038040	A2	2004年 5月 6日	EP	1576374	B1	2008年 8月 6日
				US	2006275855	A1	2006年 12月 7日
				AU	2003280177	A8	2004年 5月 13日
				ES	2314258	T3	2009年 3月 16日
				EP	1576374	A2	2005年 9月 21日
				AU	2003280177	A1	2004年 5月 13日
				DE	60322742	D1	2008年 9月 18日
				WO	2004038040	A3	2005年 1月 20日
				AT	403876	T	2008年 8月 15日
WO	2018234564	A1	2018年 12月 27日	EP	3642348	A1	2020年 4月 29日
EP	3329945	A1	2018年 6月 6日	US	2020140604	A1	2020年 5月 7日
				WO	2018104324	A1	2018年 6月 14日
				EP	3548107	A1	2019年 10月 9日