



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101511892 B

(45) 授权公告日 2012. 02. 29

(21) 申请号 200780032263. 9

(22) 申请日 2007. 06. 29

(30) 优先权数据

60/806, 138 2006. 06. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 02. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/072604 2007. 06. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/003099 EN 2008. 01. 03

(73) 专利权人 英维特罗根戴内尔公司

地址 挪威奥斯陆

(72) 发明人 盖尔·方纳姆 莱斯·利尔杰罗思

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 宋莉

(51) Int. Cl.

C08F 293/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0430371 A2, 1991. 06. 05, 说明书全文.

CN 1732386 A, 2006. 02. 08, 说明书全文.

US 20050014001 A1, 2005. 01. 20, 说明书全

文.

W0 9912577 A1, 1999. 03. 18, 说明书全文.

Vicki L. Conway et al.. Morphology and porosity of poly(vinylbenzyl chloride) beads containing styrene-ethylene, butylene-styrene triblock copolymer.

《Sensors and Actuators B:chemical》. 1997, 第45卷 11-17.

Richard J. Ansell et al.. Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay. 《Analyst》. 1998, 第123卷(第7期), 1611-1616.

审查员 石浩

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 4 页

(54) 发明名称

含有多嵌段聚合物的颗粒

(57) 摘要

公开了聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物。该颗粒可以用于各种纯化和检测方法中。

1. 聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物,

其中:

所述多嵌段乙烯基聚合物包括多个嵌段聚合物,所述多个嵌段聚合物包括第一嵌段聚合物和第二嵌段聚合物;

所述第一嵌段聚合物是最接近颗粒表面的嵌段,并且是亲水和在 3 到 12 的 pH 值下不带电荷的;和

所述第二嵌段聚合物包含一个或多个能够与结合配偶体形成共价键的官能团,并且所述第二嵌段聚合物是在 3 到 12 的 pH 值下带电荷的或能够带电荷,

其中所述聚合物颗粒是磁性的。

2. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,进一步包含第三嵌段聚合物。

3. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物有二嵌段聚合物、三嵌段聚合物或四嵌段聚合物。

4. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物具有二嵌段聚合物。

5. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述第一嵌段聚合物由至少三个相同的单体单元形成。

6. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述第二嵌段聚合物由至少三个相同的单体单元形成。

7. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述第一嵌段聚合物由第一单体单元形成,并且所述第二嵌段聚合物由第二单体单元形成。

8. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物的每个嵌段具有 500 道尔顿到 10,000 道尔顿的分子量。

9. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物包括乙烯、苯乙烯、丙烯酸酯、丙烯酸、丙烯酰胺、羟甲基丙烯酰胺、N-三(羟甲基)丙烯酰胺、氯乙烯、四氟乙烯、乙烯基吡内酯、乙烯基苄基氯或其组合的聚合物。

10. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物包括甲基丙烯酸酯、乙基丙烯酸酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙氧基乙酯、丙烯酸乙基己酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟甲酯、丙烯酸羟丙酯、具有 PEG 官能团的丙烯酸酯、丙烯酸乙酯、乙基醚丙烯酸酯、乙二醇甲醚丙烯酸酯、荧光素 o-丙烯酸酯、或其组合的聚合物。

11. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物包括甲基丙烯酸酯的聚合物。

12. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述第一嵌段聚合物是苯乙烯聚合物并且所述第二嵌段聚合物是甲基丙烯酸酯聚合物。

13. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中终端嵌段聚合物包括选自以下的至少一个官能团:氨基、羧酸、活化的羧酸、酯、酰基氯、卤化物、活化的氢氧化物、醇化物、羟基、硫醇、活化的硫醇、碳酸酯、马来酰亚胺和环氧化物。

14. 如权利要求 13 所述的聚合物颗粒,其中所述终端嵌段聚合物包括选自以下的至少一个官能团:琥珀酰亚胺酯、甲苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯和甲磺酸酯。

15. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述聚合物颗粒进一步包含超顺磁性晶体。

16. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述聚合物颗粒是多孔的。
17. 如权利要求 10 所述的聚合物颗粒,其中所述甲基丙烯酸酯为甲基丙烯酸甲酯或 N- 羟基琥珀酰亚胺甲基丙烯酸酯。
18. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其具有 0.1 μm 到 500 μm 的直径。
19. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其特征在于形状为球形。
20. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其特征在于为单分散的。
21. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其特征在于为单分散的且具有小于 20% 的变异系数,其中所述变异系数为将颗粒尺寸的标准偏差乘以 100 并除以平均颗粒直径确定的百分比。
22. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到结合配偶体上。
23. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到抗体、氨基酸、蛋白质、激素、代谢物、毒素、毒物、碳水化合物、糖脂、核酸、受体、细菌、病毒组分、细胞、细胞组分、天然脂囊泡、合成脂囊泡或聚合物膜上。
24. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到肽、淋巴因子、抗原、半抗原、凝集素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、生物素、寡糖、多糖、糖蛋白、核苷酸、DNA、RNA 或病毒颗粒上。
25. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到酶上。
26. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到多肽或寡核苷酸上。
27. 如权利要求 1 所述的聚合物颗粒,进一步包括涂覆层。
28. 如权利要求 10 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物包括丙烯酸叔丁酯、丙烯酸 2- 羟丙酯或其组合的聚合物。
29. 从样品纯化靶物质的方法,所述方法包括:
 - 提供含有靶物质的样品;
 - 提供聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物;
 - 将所述样品和聚合物颗粒在适于将所述靶物质结合到所述聚合物颗粒上的条件下接触;和
 - 从所述样品分离所述聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物包括多个嵌段聚合物,所述多个嵌段聚合物包括第一嵌段聚合物和第二嵌段聚合物;
- 所述第一嵌段聚合物是最接近颗粒表面的嵌段,并且是亲水和在 3 到 12 的 pH 值下不带电荷的;和
- 所述第二嵌段聚合物包含一个或多个能够与结合配偶体形成共价键的官能团。
30. 如权利要求 29 所述的方法,进一步包括在所述分离步骤之后检测所述靶物质。
31. 如权利要求 29 所述的方法,进一步包括在所述分离步骤之后从所述聚合物颗粒分离所述靶物质。
32. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述靶物质是蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸、适体、核苷、脂囊泡、病毒或细胞。

33. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述靶物质是肽、糖蛋白、脂蛋白、DNA、RNA、PNA、核苷酸或多糖。

34. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述靶物质是细胞因子、激素、维生素、表面受体、半抗原、抗原、抗体、酶、重组蛋白质或毒素。

35. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述靶物质是生长因子。

36. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述样品是生物发酵介质、细胞溶胞产物、原核细胞、真核细胞、病毒颗粒的悬浮体、组织、生物流体、细胞提取物、粘液、大便、以及生理或细胞分泌物。

37. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述样品是尿、脑脊髓液、血液、淋巴液、组织液、唾液或痰。

38. 如权利要求 29 所述的方法,其中将所述多嵌段乙烯基聚合物结合到抗体、氨基酸、蛋白质、激素、代谢物、毒素、毒物、碳水化合物、糖脂、核酸、受体、细菌、病毒组分、细胞、细胞组分、天然脂囊泡、合成脂囊泡或聚合物膜上。

39. 如权利要求 29 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到肽、淋巴因子、抗原、半抗原、凝集素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、生物素、寡糖、多糖、糖蛋白、核苷酸、DNA、RNA 或病毒颗粒上。

40. 如权利要求 29 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到酶上。

41. 如权利要求 29 所述的聚合物颗粒,其中所述多嵌段乙烯基聚合物结合到多肽或寡核苷酸上。

含有多嵌段聚合物的颗粒

[0001] 本申请主张 2006 年 6 月 29 日提交的美国临时专利申请第 60/806,138 号的优先权,在此并入其内容以供参考。

技术领域

[0002] 本发明公开了多嵌段乙烯基聚合物 (vinylic polymer) 官能化的固体载体,例如聚合物微粒,其适合用于体外诊断测定。具体地,本发明提出了带有多嵌段乙烯基聚合物的磁性聚合物颗粒,该多嵌段乙烯基聚合物在结合配偶体 (binding partner) 和该聚合物颗粒表面之间提供间隔物。

背景技术

[0003] 在多种医学和生物化学领域,聚合物颗粒通常是有用的,例如作为运输载体用于输送药剂,用于诊断目的,用于分离和用于合成目的。然而,这些颗粒在诊断测定方面特别有用并且它们的用途是广泛且熟知的。

[0004] 用于诊断测定或用作运输载体等的聚合物颗粒需要具备某些有用的性质。这样,它们完美地显示最小的非特异性结合以确保例如在测定期间基本上仅期望的靶结合到颗粒上。此外,低的颗粒聚集也是高度期望的。在成功的测定或运输过程中优选避免颗粒的絮凝或团聚。而且,还高度期望聚合物颗粒能以尽可能强的相互作用结合靶物质。

[0005] 用于诊断测定的聚合物颗粒带有结合配偶体,该结合配偶体在测定过程中把感兴趣的特定物质作为目标。用于运输和分离的聚合物颗粒也结合到生物分子上。这些生物分子通常在聚合物颗粒形成之后结合到颗粒表面上。然而,据信在把期望的物质作为目标的结合配偶体太紧密地结合到载体表面上的情况下,位阻的考虑因素发挥作用且可能引起例如对结合配偶体的限制:靶结合强度。因此,已知使用间隔臂使结合配偶体与载体表面隔开。目前这使用基于聚乙二醇的间隔臂或简单地使用碳链实现。

[0006] 各种固体载体先前已用多嵌段乙烯基聚合物涂覆,然而主要在聚合物刷领域,其中固体载体是硅石。例如,在 *Macromolecules* 2000,33,1492-3 中,Brittan 等报道了在硅酸盐基底上形成聚苯乙烯嵌段/聚(甲基丙烯酸甲酯)嵌段共聚物刷。因此,这些聚合物刷允许接枝聚合物悬垂在溶剂中,一端连接在不溶性表面上。

[0007] 在 *Macromol. Rapid Commun.* 2003,24,1043-1059 中,Pyun 等报道了在纳米颗粒载体上利用原子转移自由基聚合形成聚合物刷。这样的载体包括平坦表面和纳米颗粒。然而,非常高密度的嵌段共聚物侧链使得这些结构仅仅适合用于非常特定的最终用途。因此,虽然许多研究由此花费在制备聚合物刷上,但这些材料的应用是在材料科学领域内,例如,作为保护涂层等。这些材料不适合用在诊断测定过程中。

[0008] 这些聚合物刷通常使用原子转移自由基聚合 (ATRP) 制备。然而,最近,一些评论员建议,原子转移自由基聚合可能用于形成具有生物医学应用的无载体型聚合物(参见 *European Polym Journal* 40,2004,37-45) 并且 ATRP 聚合物涂覆的磁性纳米颗粒可应用于铁磁流体、NMR、生物分离和矿物分离的多种领域。

[0009] 因此,尽管迄今为止作了努力,但是仍然需要改进的用于生物测定的结合配偶体。

发明内容

[0010] 本发明公开了聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物。该颗粒可以具有连接的 2、3、4 或更多嵌段聚合物、以及任选的至少一个结合配偶体。该结合配偶体有助于该聚合物颗粒在各种纯化和检测方法中的应用。

附图说明

[0011] 下面的图形成本说明书的一部分且被包括以进一步解释本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个,结合本文提供的具体实施方式的详细描述,可更好地理解本发明。

[0012] 图 1 显示将本文描述的颗粒与三种不含多嵌段聚合物的商品化颗粒相比较,由它们利用对抗体进行的竞争性测定得到的亲和常数。示出了在缓冲剂中(斜线填充柱)和在血清中(点填充柱)的结果。恒定量的标记抗体和增加量的未标记抗体在缓冲剂或稀释的血清中遭遇(was subjected to)珠子。基于得到的 Langmuir 图计算珠子上的活性雌二醇的浓度和亲和常数。

[0013] 图 2 显示将本文描述的颗粒与三种不含多嵌段聚合物的商品化颗粒相比较,由它们利用对雌二醇进行的竞争性测定得到的亲和常数。示出了在血清中的结果。恒定量的标记抗体和增加量的游离雌二醇抗原在稀释的血清中遭遇珠子。基于得到的 Langmuir 图计算珠子上的活性雌二醇的浓度和亲和常数。

[0014] 图 3 将本文描述的颗粒与三种不含多嵌段聚合物的商品化颗粒相比较,由它们利用对抗体进行的竞争性测定得到的亲和常数。示出了在缓冲剂中(斜线填充柱)和在血清中(点填充柱)中的结果。恒定量的标记抗体和增加量的未标记抗体在缓冲剂或稀释的血清中遭遇珠子。基于得到的 Langmuir 图计算珠子上的活性胰岛素的浓度和亲和常数。

[0015] 图 4 显示将本文中描述的颗粒与三种不含多嵌段聚合物的商品化颗粒相比较,由它们利用对胰岛素进行的竞争性测定得到的亲和常数。示出了在缓冲剂中(斜线填充柱)和在血清中(点填充柱)的结果。恒定量的标记抗体和增加量的游离胰岛素抗原在缓冲剂或稀释的血清中遭遇珠子。基于得到的 Langmuir 图计算珠子上的活性雌二醇的浓度和亲和常数。

具体实施方式

[0016] 本发明人现已惊奇地发现,如果应用的间隔臂由多嵌段乙烯基聚合物例如嵌段共聚物形成,则在结合配偶(binding partners)(即,结合配偶体和靶)之间的相互作用可以进一步提高。还惊奇地发现,对颗粒这样的改性使两者的非特异性结合最小化且防止了颗粒的聚集,使它通常在结合配偶的结合方面有价值。

[0017] 本发明人现已认识到,多嵌段乙烯基聚合物可以接枝到聚合物颗粒上并且随后用于携带用以选择靶的结合配偶体,由此提供用于例如诊断测定中的理想颗粒。如上面所提到的,这减少了非特异性结合,减少了团聚且提高了结合配偶之间的结合亲和力。之前人们从来没有意识到这样的聚合物与聚合物颗粒一起使用的益处。而且,相信使用多嵌段乙烯

基聚合物间隔臂以将结合配偶体与载体表面隔离是新的,且其形成了本发明的另一方面。本发明人还创造出特定的嵌段结构,其在亲和常数和可以用在任何载体表面上的非特异性结合方面提供了显著的改进。

[0018] 虽然组合物和方法用“包括”各种成分或步骤(解释为“包括,但不限于”的意思)进行描述,但组合物和方法也可以“基本由”或者“由”各种成分和步骤“组成”,这样的术语应该解释为限定基本封闭的成员组。

[0019] 因此,从第一方面看,本发明提供了聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物。

[0020] 从进一步的方面看,本发明提供了固体载体,例如,聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物,其中该多嵌段聚合物进一步结合到结合配偶体上。

[0021] 从另一方面看,本发明提供了固体载体,例如,聚合物颗粒,其具有结合到其表面上的多嵌段聚合物,优选多嵌段乙烯基聚合物,其中第一嵌段是亲水的但不带电荷,且第二嵌段带有能够与结合配偶体形成共价键的侧官能团。

[0022] 从再进一步的方面看,本发明提供了固体载体,例如如上文中定义的聚合物颗粒在测定,例如诊断测定诸如免疫测定或核酸测定、或结合结合配偶体中的用途。

[0023] 从另一方面看,本发明提供了使用原子转移自由基聚合制备具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物的聚合物颗粒的方法。

[0024] 组合物

[0025] 在本发明中使用的固体载体可以是通常用在生物技术中用于固定的任何固体基质。这样的载体可以是颗粒、片、膜、凝胶、过滤器、微量滴定带、管或板。感兴趣的具体载体包括硅石、玻璃、无机载体例如金属纳米颗粒或氧化铝、有机载体例如聚合物载体(例如聚苯乙烯)。优选地,固体载体是聚合物颗粒,特别是聚合物微粒。

[0026] 颗粒的直径可为 50nm 到 1000 μm ,例如 100nm 到 100 μm 。然而优选地,颗粒是微粒。

[0027] 微粒指直径基本在微米范围内(即 10^{-6}m)的颗粒。因此,根据本发明的聚合物微粒通常具有大体在微米范围内的尺寸(即直径),例如,约 0.1 μm 到约 500 μm ,特别是约 0.2 μm 到约 50 μm ,更特别是约 0.5 μm 到约 8 μm ,例如约 0.8 μm 到约 5 μm 。直径的具体实例包括约 0.1 μm ,约 0.2 μm ,约 0.3 μm ,约 0.4 μm ,约 0.5 μm ,约 0.6 μm ,约 0.7 μm ,约 0.8 μm ,约 0.9 μm ,约 1 μm ,约 2 μm ,约 3 μm ,约 4 μm ,约 5 μm ,以及在这些值的任意两个之间的范围。

[0028] 本发明的颗粒优选是聚合物颗粒,即它们通过单体聚合而形成。颗粒优选由乙烯聚合物(例如苯乙烯)、丙烯酸酯和/或甲基丙烯酸酯的组合制备。该聚合材料可任选地进行交联,例如通过引入交联剂例如作为共聚单体的交联剂(例如二乙烯基苯(DVB)或乙二醇二甲基丙烯酸酯)任选地进行交联。需要的交联剂(如共聚单体)的适当量对技术人员来说是熟知的。优选地,聚合物是交联的苯乙烯类聚合物(例如苯乙烯-二乙烯基苯聚合物,其通过使用含有硝基的共聚单体例如硝基苯乙烯和随后的还原反应进行了表面官能化)、或交联的(甲基)丙烯酸酯聚合物(其通过使用含有环氧基团的共聚单体(例如,甲基丙烯酸缩水甘油酯)和随后的胺化(例如,通过与乙二胺反应)进行了表面官能化)。优选地,使用的聚合物颗粒如美国专利 No. 4,654,267(1987 年 3 月 31 日授权)中所述。

[0029] 优选聚合物颗粒是多孔的。典型地,当被换算为 $2.7\ \mu\text{m}$ 的平均颗粒直径时(即用 $2.7/\text{MD}$ 乘以表面积,其中 MD 是以微米为单位的平均直径),使用的多孔颗粒具有至少 $15\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积(通过 BET 氮吸附法测定),以及更优选地至少 $30\text{m}^2/\text{g}$,例如最高达 $700\text{m}^2/\text{g}$ 。类似地依比例,颗粒孔体积优选是至少 $0.1\text{mL}/\text{g}$ 。

[0030] 因此,还优选聚合物颗粒是磁性的。本文中磁性意味着聚合物颗粒含有超顺磁性晶体。因此,磁性聚合物颗粒是可磁移位的,但不是可永久磁化的。已知许多用于制备磁性聚合物颗粒的方法,其中的很多包括从预先形成的磁性铁氧化物例如磁铁矿制备含有磁赤铁矿或磁铁矿的聚合物颗粒。所包括的一些方法描述于美国专利 No 4,654,267(1987 年 3 月 31 日授权)中。

[0031] 本发明的聚合物颗粒优选是磁性的。本文中磁性意味着聚合物颗粒能够被磁场吸引。本发明的聚合物颗粒优选包括顺磁性、非超顺磁性或超顺磁性晶体。顺磁性颗粒将展示轻微的磁剩余性质。非超顺磁性晶体在以下意义上是剩磁的:在暴露于磁场后,在磁场不存在时,该材料必须具有剩余的磁化强度。超顺磁性聚合物颗粒是可磁移位的,但不是可永久磁化的。这意味着在暴露于磁体之后,颗粒仍可悬浮或分散在溶液中,而不聚集或凝块。超顺磁性晶体可为能够以超顺磁性晶体形式沉积在聚合物颗粒中和/或聚合物颗粒上的任何材料。磁性铁氧化物,例如,磁铁矿或磁赤铁矿是优选的;然而,如果需要,晶体可为混合金属氧化物或其它磁性材料。超顺磁性晶体的直径典型地是 $5\text{--}15\text{nm}$,例如约 7nm ,而非超顺磁性(热阻挡的)铁氧化物晶体则典型地略大一些。

[0032] 这样的颗粒依靠它们的磁性性质发挥它们的功能。在诊断测定应用中,例如,将磁场施加到含有分析物的样品上,分析物结合到磁性聚合物颗粒上,使得分析物分离,而不使用离心或过滤。

[0033] 在聚合物颗粒中引入磁性颗粒是熟知的且是技术人员容易实施的。具体地,这可以使用如上面所描述的多孔聚合物颗粒实现。因此,在非常优选的实施方式中,聚合物微粒既是磁性的又是多孔的。在最高度优选的实施方式中,聚合物颗粒是多孔的磁性聚合物微粒。

[0034] 在本发明的方法中使用的聚合物微粒中的超顺磁性晶体可为能够以超顺磁性晶体形式沉积在多孔聚合物颗粒中的任何材料。磁性铁氧化物,例如,磁铁矿或磁赤铁矿是优选的;然而,如果需要,晶体可为混合金属氧化物或其它磁性材料。存在的晶体磁性材料的总量按重量计通常大于 1% ,优选大于 3% ,合意地大于或等于 5% ,例如最高达 60% 重量%。该百分比以 Fe(或者在磁性材料不同于铁氧化物的情况下的等价金属)的重量为基础,基于颗粒的总干重进行计算。

[0035] 通过在负载有超顺磁性晶体的聚合物颗粒上形成聚合物涂层,或更具体地通过用聚合物涂层至少部分填充颗粒的孔,可抑制超顺磁性晶体从多孔聚合物颗粒析出(leaching)。这样的涂覆聚合物可典型地由可与下面颗粒的聚合物表面上的侧官能团反应的单体形成。

[0036] 对聚合物颗粒进行涂覆还提供了具有可以用于结合感兴趣的分子的官能团的聚合物颗粒表面。在本申请中,这提供了可以允许多嵌段聚合物的形成的官能度。载体可官能化以带有任何已知的表面结构,例如羧基、甲苯磺酰基、氨基、环氧基团、马来酰胺基团、硫醇基团等。其实现方法在本领域中是熟知的。

[0037] 官能化可在颗粒形成之后进行,通过例如硝化和随后将由此形成的硝基还原为侧胺基;或直接胺化,例如通过用氨基乙醇处理直接胺化。作为进一步的替换物,可使用通过在 WO 00/61647 (2000 年 10 月 19 日公布) 中公开的熟知的 Ugelstad 两步溶胀法及其改进制备的聚合物颗粒。根据在该出版物中描述的方法生产的多孔聚合物颗粒可具有通过标准技术沉积在它们孔中的磁性颗粒。

[0038] WO 05/015216 (2005 年 2 月 17 日公布) 还描述了在颗粒上形成聚氨酯型涂层或基于环氧化物的涂层的方法,所有这些可以是在本发明中使用的聚合物颗粒表面上的适合官能团。引入乙烯基还可以通过使涂层表面与化合物例如甲基丙烯酸酐反应而实现。例如,经洗涤(例如,在 NaOH 中)而暴露出羟基官能团的、包括由两种环氧化物的反应形成的涂层的经涂覆的颗粒容易与甲基丙烯酸酐反应,以允许将乙烯基引入到聚合物表面。

[0039] 典型地,聚合物微粒在它们被涂覆之前是球形的且基本上是单分散的,且特别优选在它们被涂覆后保持球形且基本上是单分散的。

[0040] 基本上单分散意味着对于大多数颗粒(例如,至少 100 个,更优选至少 1000 个),颗粒具有少于 20%,例如少于 15%,优选少于 12%,更优选少于 11%,仍然更优选少于 10%,以及最优选不大于约 8%,例如 2%到 5%的变异系数(CV)。CV 以百分比确定为: $CV = (100 \times \text{标准偏差}) / \text{平均值}$ 。“平均值”是平均颗粒直径,标准偏差是颗粒尺寸的标准偏差。CV 优选以主模式进行计算,即通过将单峰分布曲线与测得的颗粒尺寸分布拟合。因此,一些在模式尺寸之下或之上的颗粒可能在计算中未考虑,该计算可能例如是基于总颗粒数量(即可检测的颗粒)的约 90%。这样的 CV 测定在 Coulter LS 130 颗粒尺寸分析仪上是可行的。

[0041] 满足这些要求和具有期望涂层的颗粒可从供应商例如 Invitrogen (Dyna1) 处商购获得。以商标名 Dynabeads 销售的超顺磁性聚合物珠是特别优选的。Dynabeads 特别具有优势,因为它们保持悬浮且没有表现出其它磁珠经常发生的磁性颗粒沉降。与其它存在高含量的铁的磁性颗粒相比, Dynabeads 还显示出优异的磁移动性。Dynabeads 展现出有利的动力学,允许更短的反应时间和更高的产量。它们的非特异性结合比其它磁珠低且它们的适当使用导致产生期望材料的浓度,从而导致更容易和更有效的洗涤过程。最后, Dynabeads 容易自动操纵且是单分散的。

[0042] 在本发明中使用的具体 Dynabeads 包括 Dynabeads MyOne、Dynabeads M-270、M-280 或 M-450,如果需要,可购买其胺化的、甲苯磺酰基活化的或羧酸活化的形式。

[0043] 固体载体(优选聚合物颗粒)带有多嵌段聚合物(优选结合到它表面上的多嵌段乙烯基聚合物)。因为多嵌段聚合物结合到载体表面上,例如聚合物微粒表面上,因此它与可用于制造载体(例如聚合物颗粒)本身或其涂层的任何嵌段聚合物区分开来。聚合物颗粒通常被涂覆,例如以防止磁性颗粒的析出以及提供官能化的表面,但连接在载体表面上的多嵌段聚合物不被认为是涂覆聚合物。多嵌段聚合物因此在颗粒以及涂层(如果有的话)形成后结合到聚合物颗粒表面上,因此不是在聚合物颗粒制造或其涂覆期间形成。

[0044] 本发明要求固体载体例如聚合物颗粒具有至少一个连接在其表面上的多嵌段聚合物。然而应意识到,载体可能包含多个这样的聚合物。

[0045] 多嵌段聚合物指由至少两种不同的聚合物嵌段形成的聚合物。多嵌段乙烯基聚合物指由至少两种不同的通过乙烯基单体的聚合制成的聚合物嵌段形成的聚合物。因此,在

该实施方式中,单体包含乙烯基键($C=C$),因此,嵌段不是由重复单元例如 $-OCH_2CH_2-$ 制成。

[0046] 聚合物的嵌段由至少 3 个相同的重复单元的组合形成。更优选地,该聚合物由至少 10 个,特别地至少 20 个相同的重复单元的组合形成。具体的实例包括 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 和 20 个相同的重复单元。因此,第一嵌段可由多个苯乙烯单元形成以及第二嵌段可由多个相同的丙烯酸酯单元形成。

[0047] 多嵌段聚合物包括至少 2 个不同的嵌段。因此,多嵌段聚合物可包括两个嵌段,三个嵌段,四个嵌段,或多于四个嵌段。优选地,多嵌段聚合物包含三个嵌段或两个嵌段,特别是两个嵌段。这样的聚合物典型地称作二嵌段聚合物或嵌段共聚物。

[0048] 任意适合的单体可以用于形成聚合物嵌段,尤其是具有乙烯基的单体或基于乙二醇重复单元的单体。适合的乙烯基单体包括链烯烃(乙烯)、乙烯基芳基化合物(例如苯乙烯)、丙烯酸酯、丙烯酸、丙烯酰胺类(例如丙烯酰胺、羟甲基丙烯酰胺或 N-三(羟甲基)丙烯酰胺)、氯乙烯、四氟乙烯、乙烯基吡内酯或乙烯基苄基氯。

[0049] 最优选地,单体是丙烯酸酯,例如甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、乙基丙烯酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺甲基丙烯酸酯、丙烯酸叔丁酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙氧基乙酯、丙烯酸乙基己酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟甲酯、丙烯酸羟丙酯、具有 PEG 官能团的丙烯酸酯、丙烯酸羟甲酯、丙烯酸乙酯、乙基醚丙烯酸酯、乙二醇甲醚丙烯酸酯、荧光素 o-丙烯酸酯(fluoresceino-acrylate)或丙烯酸 2-羟丙酯。在高度优选的实施方式中,使用的丙烯酸酯是甲基丙烯酸酯。

[0050] 然而,按照定义,至少两个嵌段形成自不同的聚合物,例如苯乙烯聚合物形成一个嵌段和丙烯酸酯聚合物形成另一个嵌段,或形成自两种不同的(甲基)丙烯酸酯或两种不同的(甲基)丙烯酰胺。本发明的实施方式还包括包含三个或更多个嵌段的多嵌段聚合物,其中两个嵌段相同,只要有二个嵌段还是不同的即可,例如包括诸如嵌段 A,嵌段 B,嵌段 A,嵌段 B 的结构。

[0051] 一种单体可以用于形成聚合物,该聚合物此后进行处理以形成期望的两个或多个嵌段。因此,可以形成这样的丙烯酸酯聚合物,其可以部分水解以形成酯聚合物的嵌段和酸聚合物的嵌段。

[0052] 然而优选地,使用两种不同的乙烯基单体形成本发明的多嵌段聚合物。

[0053] 最接近载体表面的嵌段称为第一嵌段。第一嵌段聚合物优选是亲水但不带电荷的聚合物。不带电荷意味着该嵌段不含有例如氨基、磷酸根、磺酸或羧酸基团的基团,其在生理环境中变得容易带电。然而,为了是亲水的,该嵌段典型地包含例如氢氧化物、硫醇、酰胺、卤化物等的官能团,这些官能团是极性的并因此是亲水的。虽然意识到这些基团可以带电荷,但带电荷需要严格的酸性或碱性条件,因此这样的基团典型地不带电荷。因此,为了清楚起见,不带电荷的基团指在 3 到 12 的 pH 值下不带电荷的基团。理想地,该亲水性嵌段聚合物将是在水中可溶解的聚合物。

[0054] 优选地,第一嵌段不结合到结合配偶体上。在进一步优选的实施方式中,该第一嵌段不含可以与结合配偶体反应的侧链官能团。

[0055] 优选地,比第一嵌段更加远离载体表面的嵌段,优选最远离聚合物颗粒表面的嵌段(在下文中称为终端嵌段)将是含有能够容易地结合到结合配偶体上的侧官能团的嵌段。侧官能团指该官能团在该聚合物的侧链上而不是在聚合物的主链部分上。

[0056] 能够结合到结合配偶体上意味着,在侧链中的基团将是与结合配偶体容易进行(或可以通过简单的活化而容易使其进行)偶联反应的基团,其中将结合配偶体共价结合到嵌段聚合物侧链上。能够以这种方式反应的基团对于技术人员来说是熟知的。还应意识到,可以存在多于一个的活性基团。

[0057] 与结合配偶体进行反应以及容易被活化用于与结合配偶体反应的合适基团包括氨基、羧酸、活化的羧酸(例如琥珀酰亚胺酯、酯、酰基氯)、卤化物、活化的氢氧化物(例如醇化物、甲苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯、甲磺酸酯等)、羟基、硫醇、活化的硫醇(即活化的氢氧化物的硫代等价物)、碳酸酯、马来酰亚胺和环氧化物。

[0058] 在优选的实施方式中,在终端嵌段上的侧官能团可带电荷或将含有能够容易地携带电荷的官能团,例如氨基、磷酸根、磺酸或羧酸基团。而且,本领域技术人员应意识到,这些基团是否带电荷取决于它们存在于其中的体系的 pH 值,但是也应意识到使这些基团带电是无关重要的。因此说明,能够携带电荷的基团意味着在 3 到 12 的 pH 值下变得带电荷的基团。

[0059] 在嵌段共聚物中的亲水/活性官能团可以在该嵌段共聚物形成之后引入,但是优选地,在嵌段聚合物形成期间,它们被引入或它们的前体被引入。因此,适合在第一嵌段的制备中使用的单体为上面列出的那些。特别优选的是甲基丙烯酸酯、具有 PEG 官能团的(甲基)丙烯酸酯、丙烯酰胺、二甲基丙烯酰胺、羟甲基丙烯酰胺、N-三(羟甲基)丙烯酰胺、乙烯基吡内酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸乙氧基乙酯、丙烯酸乙基己酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟甲酯、丙烯酸羟丙酯、丙烯酸羟甲酯、丙烯酸乙酯、二(乙二醇)乙基醚丙烯酸酯、乙二醇甲醚丙烯酸酯、荧光素 o-丙烯酸酯、丙烯酸 2-羟丙酯和丙烯酰氧基琥珀酰亚胺。优选地,用于形成第一嵌段的单体是丙烯酸酯,特别是甲基丙烯酸酯。

[0060] 在终端嵌段形成中使用的优选单体是上面列出的那些。感兴趣的具体单体包括乙烯基吡内酯、苯乙烯-4-羧酸(酯)、苯乙烯-4-磺酸、官能化丙烯酰胺(例如与二胺或氨基酸偶联的丙烯酸)、丙烯酰胺或丙烯酸酯,例如具有活化的羟基的丙烯酸酯,以及醛例如 acrylrolein。

[0061] 优选地,用于形成第一嵌段的单体是丙烯酸酯,特别是不同于用于形成第一嵌段的甲基丙烯酸酯。

[0062] 在又一优选的实施方式中,第一嵌段是丙烯酰胺嵌段以及终端嵌段是丙烯酸嵌段。

[0063] 当然,可为合意的是在聚合期间保护单体上的官能团,这在本领域中是熟知的。具体地,羧酸基团可例如使用酯进行保护。然而,如果需要,这样的基团可以在聚合物形成之后容易地去保护,产生期望的带电物种。可选择地,可以使用亲核试剂除去酯以在聚合物上提供可选择的官能团。

[0064] 令人惊奇地发现,亲水和带电荷的嵌段的这种优选安排特别有利,因为第一嵌段提供了高的空间稳定性并且终端嵌段提供了电荷稳定性。而且,与完全由带电荷的单体形成的嵌段聚合物相比,该嵌段聚合物的电荷是低的,这通过防止该嵌段聚合物表现得像离子交换树脂那样而降低了非特异性结合。该组合还导致了高的亲和常数。

[0065] 每个嵌段优选具有约 500 道尔顿到约 10,000 道尔顿,优选约 1000 道尔顿到约 5000 道尔顿的分子量。它可以由例如 3 到 150 个重复单元,优选 10 到 50 个重复单元构成。

[0066] 优选地,各嵌段均构成多嵌段聚合物的不少于 5 重量%。因此,两个嵌段(例如第一嵌段和终端嵌段)的重量比可在 1 : 10 到 10 : 1 的范围内,例如,1 : 5 到 5 : 1,特别是 1 : 3 到 3 : 1。

[0067] 制备方法

[0068] 多嵌段聚合物在载体上的形成可以以各种方式实现。预形成的多嵌段聚合物可以使用常规的化学方法结合到载体上。因此,聚合物可以在溶液中形成且结合到适当官能化的固体表面上。嵌段共聚物可以通过常规的自由基化学方法形成于颗粒表面上。然而优选地,通过在载体表面上实施表面引发活性聚合而在载体表面上产生聚合物,所述活性聚合特别是活性自由基聚合,例如稳定自由基聚合(SFRP)诸如氮氧基(nitroxide)调控聚合(NMP)、可逆加成断裂链转移(RAFT)、或原子转移自由基聚合(ATRP)。ATRP 是特别优选的。

[0069] 活性聚合的特征在于随时间线性地成长的链生长。为了随时间线性地生长,这些离子聚合通过链机理进行,其中后续的单体分子加成到单一活性位置上。而且,在活性位置的整个寿命期间,没有中断地发生加成反应。IUPAC 提供了活性聚合的定义,其为可包括缓慢引发、具有各种活性和寿命的物种的可逆形成、无活性物种的可逆形成和/或可逆转移的聚合。活性聚合不包括不可逆的失活和不可逆的转移。

[0070] 在 SFRP 中,烷氧基引发剂或氮氧基持久自由基用于形成聚合物,例如苯乙烯和丙烯酸酯。通常使用的氮氧基是 2,2,6,6-四甲基哌啶 1-氧基。

[0071] RAFT 通过在二硫代化合物(dithio compounds)的存在下进行自由基聚合而实现,二硫代化合物作为有效的可逆加成-断裂链转移试剂。在休眠和活性链末端之间的快速转换机理提供了活性聚合特征。

[0072] 这些技术的全面描述可以在文献中发现,例如对于 SFRP,参见 G. Moad, E. Rizzardo, D. H. Solomon, "A product study of the nitroxide inhibited thermal polymerization of styrene", Polym. Bull., 1982, V. 6, s. 589; 例如,对于 RAFT,参见 Chiefari. J, Chong. Y. K, Ercole. F, Krstina. J, Jeffery. J, Le. T, Mayadunne. R, Meijs. G. F, Rizzardo. E, Thang. S, "Living Free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process", Macromolecules, 1998, 31, 5559-5562。

[0073] 这些技术的综述还可以在 Matyjaszewski. K, "Comparison and classification of Controlled/Living Radical Polymerizations", American Chemical Society, Symposium Series 768, 2000, D. C., 20-24 中发现。

[0074] 因此,从进一步的方面看,本发明提供了使用活性自由基聚合制备具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物的聚合物颗粒的方法。

[0075] 在优选的实施方式中,多嵌段聚合物通过原子转移自由基聚合(ATRP)引入到固体载体例如聚合物颗粒上。这种聚合形式是相当新的且其特征在于随时间线性地成长的链生长。该方法包括使用催化量的铜(I),其从聚合物链端可逆地提取(abstract)卤素,由此在休眠态和活性增长态之间提供转换机理。发现该方法允许容易地形成第一嵌段以及仅仅通过改变所加入的单体的性质而容易地形成后续的不同嵌段。

[0076] 表面引发聚合技术的使用在最近的文献中被广泛地报道且是技术人员容易实现的。然而,之前从没有人意识到结合聚合物颗粒、尤其是磁性聚合物颗粒使用这样的反应以

形成在诊断测定中具有多种潜在用途的官能化颗粒的潜在益处。

[0077] 为了实施 ATRP, 载体表面需要带有卤素离子。这典型地通过将载体与引发剂反应而进行, 并且聚合物从载体朝外生长。引发剂是提供表面卤素离子的化合物, 卤素离子可以被 Cu(I) 催化剂提取。可以使用任何适合的引发剂, 并且还可从载体开始聚合, 该载体例如聚合物颗粒, 其已经带有卤化物表面官能团, 例如作为其涂层的一部分。

[0078] 优选的引发剂是卤代硅烷、卤代丁酸酯、磺酰氯、卤代烷基基团 (例如氯仿) 或溴乙酸。优选的引发剂是 α -溴代异丁酸酯 ($\text{BrC}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{O})\text{Br}$)。

[0079] 一旦引发剂已经结合到载体表面上, 聚合反应便可以通过加入期望的第一嵌段单体和 Cu(I) 催化剂 (典型地为 CuBr) 而开始。嵌段聚合物以高度可控的方式生长, 且一旦所有的第一单体已被使用 (或一旦已经制造出适合尺寸的第一嵌段且除去了该第一单体), 则同样在催化剂的存在下加入第二单体。

[0080] 因此, 从进一步的方面看, 本发明提供了制备具有结合到其表面上的多嵌段乙烯基聚合物的聚合物颗粒的方法, 包括:

[0081] (I) 将聚合物颗粒与含有卤化物的原子转移自由基聚合引发剂混合;

[0082] (II) 将步骤 (I) 的产物与 Cu(I) 化合物和第一乙烯基单体混合; 和

[0083] (III) 将步骤 (II) 的产物与第二乙烯基单体混合。

[0084] 可选择地看, 本发明提供了制备具有结合在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物的固体载体的方法, 包括:

[0085] (I) 将聚合物颗粒与含有卤化物的原子转移自由基聚合引发剂混合;

[0086] (II) 将步骤 (I) 的产物与 Cu(I) 化合物和第一乙烯基单体混合以形成第一嵌段聚合物; 和

[0087] (III) 将步骤 (II) 的产物与第二乙烯基单体混合以形成第二 (优选为末端) 嵌段聚合物; 和

[0088] (IV) 使结合配偶体与第一或优选第二嵌段聚合物结合。

[0089] ATRP 反应的条件是熟知的且描述于文献中。除去水是非常重要的且在惰性气氛下进行某些反应可为有益的。实际 ATRP 可以在 0 到 150°C 例如 50 到 100°C 的温度下发生。反应典型地在惰性溶剂例如甲苯、DMSO、THF 或 DMF 中发生。

[0090] 使用的催化剂优选是 CuBr。或者可以使用其它催化剂, 例如 CuI 或 CuCl。

[0091] 一旦多嵌段聚合物形成, 其便可以使用标准的化学方法进行处理。可能有必要例如在聚合期间保护单体中的官能团。这些保护基团可以在 ATRP 反应完成之后除去。而且, 在官能团存在于所形成的多嵌段聚合物中的情况下, 当然可使用常规的化学方法使该官能团反应。因此, 在例如多嵌段聚合物带有羧酸酯侧链的情况下, 通过公知的与氨基化合物的反应 / 水解, 这可以转化成酰胺或酸。

[0092] 因此, 在期望的嵌段聚合物由例如亲水和带电荷的嵌段形成的情况下, 这进一步允许引入特定的官能团到多嵌段聚合物上。因此, 通过亲电子官能团例如酯和乙醇胺反应, 可以将羟基引入到嵌段聚合物上。这样的反应还会引入酰胺。酯可以被去保护以形成酸, 且酸可以被还原成醛。游离的酸还可以与标准的活化剂例如 N-羟基琥珀酰亚胺结合以在嵌段共聚物上提供高度反应的侧链。因此, 聚合物上的官能团的处理容易实现。

[0093] 而且, 由于 ATRP 反应, 所得多嵌段聚合物在最终嵌段的末端处通常带有卤离子,

聚合就是这样增长的。当然,这样的亲电子基团的存在允许容易地使多嵌段聚合物与靶的结合配偶体结合。因此,亲核结合配偶体可以直接结合,而亲电子的结合配偶体可以在卤离子的转化之后与例如胺结合。当然,结合配偶体还可以与第一或优选终端嵌段聚合物上的侧链官能团直接结合。

[0094] 在进一步的实施方式中,在将多嵌段聚合物接枝到聚合物颗粒上之前,在溶液中制备多嵌段聚合物。使用使聚合开始的基于卤化物的引发剂,可以用与上面相似的方式进行多嵌段聚合物的合成。

[0095] 一旦聚合物形成,其便还可以在溶液中或在聚合物颗粒上操控(如在上文中所描述的),以提供亲水或带电荷的嵌段等。优选地,在多嵌段聚合物形成之后,它直接与颗粒表面结合。

[0096] 将形成的多嵌段聚合物与颗粒结合也是技术人员容易实现的,且可以依赖于例如存在于多嵌段聚合物上的侧链,使用熟知的化学方法,可以使侧链与颗粒表面上的活性基团结合。由于颗粒表面与多嵌段聚合物的反应在聚合物内的随意单元处发生,因此获得具有两个拖尾的侧悬(pendant)多嵌段聚合物,其在一些点处结合到颗粒表面上。

[0097] 因为各拖尾在它们的末端处可以包含不同的官能团,所以这是本发明的另一个有利的特征。这提高了与结合配偶体的结合效率。

[0098] 在本发明的进一步方面中,固体载体带有至少一个嵌段聚合物(实际上是均聚物)和至少一个与之结合的无规共聚物、以及任选的结合配偶体。无规共聚物指聚合物包含至少2个随机交替的重复单元,这与相同重复单元的嵌段相反。嵌段聚合物和无规共聚物连接在一起,即,它们不是分别结合到载体上,而是形成了一个侧悬的总体聚合物。

[0099] 因此,从另一方面看,本发明提供了固体载体,例如聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的结合到无规共聚物上的嵌段乙烯基聚合物,其中该嵌段乙烯基聚合物或无规共聚物任选地进一步结合到结合配偶体上。优选地,嵌段聚合物距离载体表面最近而无规共聚物代替终端嵌段而形成。

[0100] 无规共聚物可以这样形成:通过自由基聚合、通过活性聚合(例如通过 ATRP)、或通过将预形成的无规共聚物接枝到固体载体上或接枝到形成于载体上的嵌段聚合物上。因此,本文中详细描述活性自由基聚合技术例如 ATRP 技术还可以用于单体的混合物以形成与嵌段聚合物相反的无规聚合物。

[0101] 因此,从进一步的方面看,本发明提供了制备具有结合到其表面上的乙烯基聚合物的固体载体的方法,包括:

[0102] (I) 将聚合物颗粒与含有卤化物的原子转移自由基聚合引发剂混合;

[0103] (II) 将步骤(I)的产物与 Cu(I) 化合物和第一乙烯基单体混合以形成第一嵌段聚合物;和

[0104] (III) 将步骤(II)的产物与第二和第三乙烯基单体混合以形成无规聚合物;和任选地

[0105] (IV) 使结合配偶体与所形成的聚合物结合。

[0106] 用于形成无规共聚物的乙烯基单体与在嵌段聚合物的形成中使用的那些相同。应意识到,第二/第三单体之一可与第一单体相同。当然,形成的无规共聚物将不同于在第一阶段中形成的嵌段聚合物(即,均聚物)。

[0107] 然而优选地,无规共聚物通过嵌段聚合物例如由 ATRP 形成的嵌段聚合物的操控而形成。因此,可以使用上文中所描述的技术形成多嵌段聚合物,并且可以对第二嵌段进行操控以形成无规聚合物。

[0108] 因此,如果嵌段聚合物最初是带有许多酯侧链的丙烯酸酯嵌段聚合物,这可以同时与两种亲核体例如两个氨基化合物反应,所述亲核体随意地取代丙烯酸酯基团,留下具有变化的侧链的无规共聚物。丙烯酸酯嵌段聚合物可以经历部分水解,以形成具有一些酸和一些酯侧链等的无规聚合物。技术人员可以设计操控嵌段聚合物例如丙烯酸酯成为无规共聚物的所有方式。

[0109] 因此,从进一步的方面形成,本发明提供了固体载体,例如聚合物颗粒,其具有连接在其表面上的聚合物,所述聚合物包括嵌段聚合物和无规共聚物。

[0110] 这样的结构可以连同带有多嵌段聚合物的载体结合到所述结合配偶体上。结合配偶体优选结合到该结构的无规聚合物区。

[0111] 再一次优选的是,无规共聚物含有能够与结合配偶体反应的侧链官能团,尤其是带电荷的或能够变成带电荷的官能团。这样的基团在上面已经详细讨论且还可应用到本发明的该方面。

[0112] 应意识到,如果多嵌段聚合物的一个嵌段以上面的方式操控,则如果需要的话,对其它的嵌段进行保护,以防止任何不想要的化学反应发生。

[0113] 各无规聚合物优选具有约 500 道尔顿到约 10,000 道尔顿,优选约 1000 道尔顿到约 5000 道尔顿的分子量。它可由例如 3 到 150 个重复单元,优选 10 到 50 个重复单元构成。

[0114] 优选地,各无规聚合物均构成多嵌段聚合物的不少于 5 重量%。因此,嵌段与无规聚合物的重量比可在 1 : 10 到 10 : 1,例如 15 到 5 : 1,特别是 1 : 3 到 3 : 1 的范围内。

[0115] 具有多嵌段聚合物的固体载体可以与本领域中熟知的任何结合配偶体结合。例如,通过还原性胺化或通过使结合配偶体上的亲核基团与嵌段聚合物上的活化酯侧链例如 N- 羟基琥珀酰亚胺活化酯反应,可以实现直接结合。结合配偶体 / 嵌段聚合物上的胺基团和羧酸基团可以通过常规的肽形成化学方法,例如使用碳二亚胺连接。因此,这些成分的结合容易实现。

[0116] 术语“结合配偶体”定义为能够与另一生物分子进行特异性或非特异性结合或相互作用的任何生物分子或其它有机分子,这种结合或相互作用可称为“配体”结合或相互作用,例如,但不限于,抗体 / 抗原、抗体 / 半抗原、酶 / 底物、酶 / 抑制剂、酶 / 辅因子、结合蛋白 / 底物、载体蛋白 / 底物、凝集素 / 碳水化合物 (carbohydrate)、受体 / 激素、受体 / 效应物、或阻抑物 / 诱导物结合或相互作用。根据本发明的载体的所需用途选择适合的配体。这些配体的类型列在下面。相信固体载体、多嵌段乙烯基聚合物和结合配偶体的组合是新的且其形成本发明的另一个方面。

[0117] 因此,结合配偶体可为抗体、氨基酸、蛋白质、肽、多肽、酶、激素、淋巴因子、代谢物、抗原、半抗原、凝集素、抗生物素蛋白、链霉亲和素蛋白、生物素、毒素、毒物、碳水化合物、寡糖、多糖、糖蛋白、糖脂、核苷酸、寡核苷酸、核酸或衍生的核酸、DNA、RNA、受体、病毒颗粒、细菌、病毒组分、细胞、细胞组分、天然脂囊泡、合成脂囊泡或聚合物膜。

[0118] 使用方法

[0119] 所得载体随后可以用在分离中或作为运输载体使用。优选地,本发明的颗粒用在

测定例如竞争性测定中,并因此带有用于感兴趣的靶的结合配偶体。与颗粒结合的结合配偶体的性质可基于它结合到具体靶物质上的能力进行选择。各种各样的适合的测定是熟知的,例如免疫测定或核酸检测。

[0120] 上面所描述的聚合物颗粒可以用在多种纯化和检测方法中。从样品提纯靶物质的方法可以包括:提供含有靶物质的样品;提供具有连接在其表面上的多嵌段乙烯基聚合物的聚合物颗粒;将样品和聚合物颗粒在适于使靶物质结合到聚合物颗粒上的条件下接触;以及从样品中分离聚合物颗粒。在分离步骤之后,该方法可以进一步包括检测靶物质。在分离步骤之后,该方法可以进一步包括使聚合物颗粒与靶物质分离。

[0121] 在最优选的实施方式中,本发明提供了具有多嵌段乙烯基聚合物的磁性多孔聚合物微粒,该多嵌段乙烯基聚合物包含第一亲水嵌段和任选地带有结合配偶体的终端嵌段。

[0122] 选择的靶物质可为与较大生物实体例如细胞的表面有关联的特定结构的分子,例如肽、蛋白质、糖蛋白、脂质或碳水化合物等。其它的靶物质可为生物物质,包括肽、多肽、蛋白质、脂蛋白、糖蛋白、核酸(DNA、RNA、PNA、适体)以及核酸前体(核苷和核苷酸)、多糖、脂质例如脂囊泡。可在常规的链霉亲和素/生物素系统中检测且可用于本文中的典型蛋白质包括细胞因子、激素、维生素、表面受体、半抗原、抗原、抗体、酶、生长因子、重组蛋白质、毒素、以及其片段和组合。或者,靶物质可以是细胞。

[0123] 在本文中术语“细胞”用于包括所有的原核细胞(包括古细菌和支原体)和真核细胞(包括所有类型的哺乳和非哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、真菌细胞、酵母细胞、原生动物)和其它实体,例如病毒和亚细胞组分,例如细胞器(例如线粒体和细胞核)或原生质体。

[0124] 因此,靶物质包括抗体、氨基酸、蛋白质、肽、多肽、酶、酶底物、激素、淋巴因子、代谢物、抗原、半抗原、凝集素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、毒素、毒物、环境污染物、碳水化合物、寡糖、多糖、糖蛋白、糖脂、核苷酸、寡核苷酸、核酸和衍生的核酸、DNA、RNA、天然或合成药物、受体、病毒颗粒、噬菌体、细胞、细胞组分、天然或合成脂囊泡、聚合物膜、以及颗粒和玻璃及塑料表面。

[0125] 术语“生物素化物质”或“部分”理解为经修饰的生物素或生物素类似物与其它部分例如生物分子的缀合物(conjugates),所述生物分子例如核酸分子(包括单链或双链DNA、RNA、DNA/RNA 嵌合分子、核酸类似物和包含或引入了核酸序列的任何分子例如肽核酸(PNA),或其任何变体)、蛋白质(包括糖蛋白、酶、肽文库或增殖产物(display product)以及抗体或其衍生物)、肽、碳水化合物或多糖、脂质等,其中所述其它部分共价连接到经修饰的生物素或生物素类似物上。许多生物素化的配体是可商购获得的或可以通过标准方法制备。用于使生物分子例如核酸分子或蛋白质分子与生物素结合的方法在本领域中是熟知的。

[0126] 本文所用的术语“生物素”旨在指生物素(顺式-六氢-2-氧-1H-噻吩并[3,4]咪唑-4-戊酸)以及任意的生物素衍生物和类似物。这样的衍生物和类似物是与天然或经修饰的链霉亲和素或抗生物素蛋白的生物素结合凹处(pocket)形成复合物的物质。这样的化合物包括,例如,亚氨基生物素、脱硫生物素和链霉亲和素亲和肽,且还包括生物素- ϵ -N-赖氨酸、生物胞素酰肼、2-亚氨基生物素和生物素- ϵ -氨基己酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯的氨基或巯基衍生物、磺基琥珀酰亚胺-亚氨基生物素、生物素溴代乙酰肼、对-重

氨基苯甲酰生物胞素、3-(N-马来酰亚胺基丙酰)生物胞素。在本发明中使用的优选的生物素衍生物是脱硫生物素或它的衍生物DSB-X Biotin,其可从Molecular Probes,Eugene,OR,USA(产品编号D20658)商购获得。

[0127] 本文中使用的术语“抗生物素蛋白”指天然的蛋清糖蛋白抗生物素蛋白以及其衍生物或等价物,例如抗生物素蛋白的去糖基的或重组的形式,例如N-酰基抗生物素蛋白,如N-乙酰基、N-邻苯二甲酰基和N-琥珀酰基抗生物素蛋白,以及商业产品 ExtrAvidin、Neutralite Avidin 和 CaptAvidin。

[0128] 本文中使用的术语“链霉亲和素”指由选定株系的链霉菌(*Streptomyces*)例如阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)产生的细菌链霉亲和素、以及其衍生物或等价物,例如重组的和截短的链霉亲和素,例如,“核(core)”链霉亲和素。

[0129] 一些抗生物素蛋白/链霉亲和素物质可以商购获得,例如,天然的抗生物素蛋白和链霉亲和素、非糖基化的抗生物素蛋白、N-酰基抗生物素蛋白和截短的链霉亲和素,或者可以通过熟知的方法制备(参见Avidin-biotin technology, Methods of Enzymology, Vol. 184:1-671, 1990。在该参考文献中,Green描述了抗生物素蛋白和链霉亲和素的制备;Hiller等描述了非糖基化抗生物素蛋白的制备;Bayer等描述了链霉亲和素和截短的链霉亲和素的制备;Chandra & Gray描述了重组的抗生物素蛋白)。天然和重组形式的链霉亲和素和抗生物素蛋白均可用在本文描述的方法中,只要它们可以如在US-A-5,973,124中描述的那样进行修饰。在本发明中使用的链霉亲和素的优选衍生物是硝基-链霉亲和素。用作起始物质的优选衍生物是重组的核-链霉亲和素。

[0130] 其它具体的亲和和吸附部分例如麦胚凝集素、抗独特型抗体和染料配体也可与经修饰的生物素结合,以分离糖基化的蛋白质(例如SPI转录因子、染料结合蛋白例如丙酮酸激酶和肝脏醇脱氢酶)和其它抗体。

[0131] 优选的测定是检测核酸的测定。核酸检测通常包括使用含有核酸序列的核酸探针探测认为含有靶核酸的样品,该核酸序列特异性地识别靶核酸序列,例如与靶核酸序列杂交,使得核酸结合配偶体与靶核酸组合产生杂交层。本发明的适当官能化的载体,例如涂覆了链霉亲和素的载体理想地适合用于核酸检测。

[0132] 结合到链霉亲和素载体上的生物素化的单链寡核苷酸探针可以用于分离序列特异性DNA。通过将适量的载体与过量的生物素化探针混合而使该生物素化探针结合到载体上。该载体/探针随后与DNA样品一起在杂交缓冲剂例如SSPE或SSC中、在适合于探针和DNA的长度和序列的条件下进行温育。利用载体的磁性洗掉过量的和不需要的DNA。可以通过PCR等对俘获的DNA进行检测/量化。

[0133] 结合到链霉亲和素载体的生物素化的双链DNA片段可以用于分离特异性结合DNA序列的蛋白质。通过将适量的载体与过量的生物素化DNA片段混合而使该生物素化的DNA结合到载体上。该载体/DNA随后与蛋白质样品一起在杂交缓冲剂中、在适合于所研究的蛋白质的条件下进行温育。例如利用载体的磁性将过量的和不需要的蛋白质洗掉。俘获的蛋白质可以从探针中洗脱(通过高盐度、低盐度、加热、低pH值等)以用于下游应用和检测。

[0134] 样品通常可以是怀疑含有靶物质的任何样品。样品的实例包括生物发酵介质、病毒颗粒的悬浮体、细胞溶胞产物、原核细胞、真核细胞、病毒颗粒、组织和生物流体。适合的生物流体包括尿、脑脊髓液、血液、淋巴液、组织液、细胞提取物、粘液、唾液、痰、大便、生理

或细胞分泌物或其它类似流体。

[0135] 下列实施例被包括以解释本发明的优选实施方式。本领域技术人员应理解,在后面的实施例中公开的技术代表本发明人发现在本发明的实践中良好起作用的技术,并且因此可以被认为组成其实践的优选方式。然而,本领域技术人员根据本公开内容应理解,可以在不脱离本发明的范围的情形下对所公开的具体实施方式进行许多改变且仍得到相同的或相似的结果。

[0136] 实施例

[0137] 实施例 1: 聚合物颗粒上的多嵌段聚合物的制备

[0138] 用 THF 洗涤 5 克 (干物质重量, 简称 DS) 磁珠 (Dynabeads® M-270amine) (5 次, 每次 15 毫升 / 克 DS)。将 DS 重量调整到 30% (通过除去上清液减小溶剂和珠子的混合物的体积, 直至达到溶剂混合物中有 30 重量%的珠子), 且用氩气 (14 毫升 / 分钟) 处理 30 分钟。使所得聚合物颗粒与 0.19 毫摩尔 / 克 (DS) 的 α -溴代异丁酸酯溴化物 ($\text{BrC}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{O})\text{Br}$) 接触。

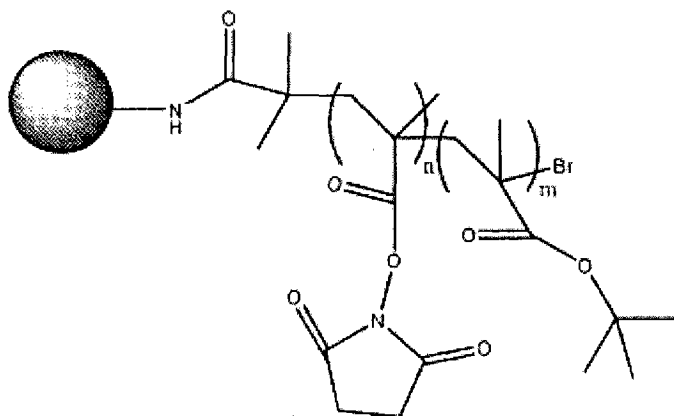
[0139] 将反应混合物用 14 毫升 / 分钟的氩气处理 30 分钟, 且将其加入到圆底反应烧瓶中。将其以 250rpm 搅拌 120 分钟, 在此期间, 保持在 0°C , 并且在悬浮液中有 14 毫升 / 分钟的氩气流。将该混合物放置在磁体上且除去上清液以形成颗粒悬浮液。

[0140] 将 1.8 克 DMSO、0.19 毫摩尔 / 克 (DS) CuBr 和 3.43 毫摩尔 / 克 (DS) N-羟基琥珀酰亚胺甲基丙烯酸酯 (NHSMA) 混合, 且在将该溶液加入到上述颗粒悬浮液中的几秒钟之前向该溶液中加入 0.19 毫摩尔 / 克 (DS) 1,1,4,7,10,10-六甲基三亚乙基四胺 (HMTETA)。

[0141] 将反应混合物在 70°C 下以 250rpm 进行搅拌, 其中伴有 14 毫升 / 分钟的氩气流。100 分钟后, 将 1.3 毫摩尔 / 克 (DS) 已在氩气中进行了预处理 (14 毫升 / 分钟, 30 分钟) 的甲基丙烯酸叔丁酯 (tBMA) 加入到该溶液中。

[0142] 在 65 分钟之后, 允许空气进入到系统中且将该悬浮液冷却到室温。将该反应混合物放在磁体上并除去上清液。将该颗粒悬浮液以 10 毫升 THF / 克 DS 洗涤 3 次。形成的聚合物如下所示。

[0143]



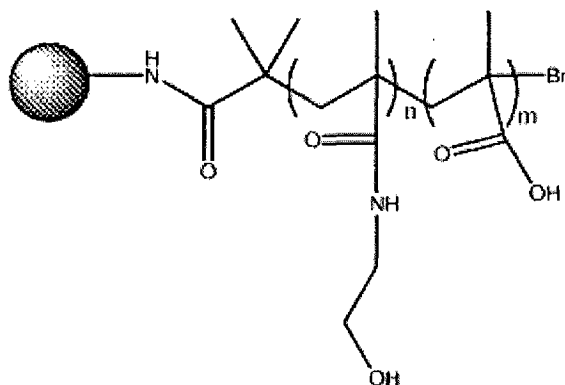
[0144] 其中, $n = 33$; $m = 12$; n 是理论上彼此连接以形成该聚合物的 NHSMA 单体单元的 (数均) 数目; 且 m 是理论上彼此连接以形成该聚合物的 tBMA 单体单元的 (数均) 数目。

[0145] 实施例 2: 亲水和带电荷的嵌段的形成

[0146] 使带有多嵌段聚合物的实施例 1 的聚合物颗粒与 12 克 / 克 DS 乙醇胺反应, 且将

悬浮液加热到 60℃ 2.5 小时。将该溶液用 1M 的 NaOH 洗涤 4 次,且以 200rpm 搅拌一夜。随后将该溶液用 0.01M 的 NaOH 洗涤。得到的聚合物如下所示。

[0147]

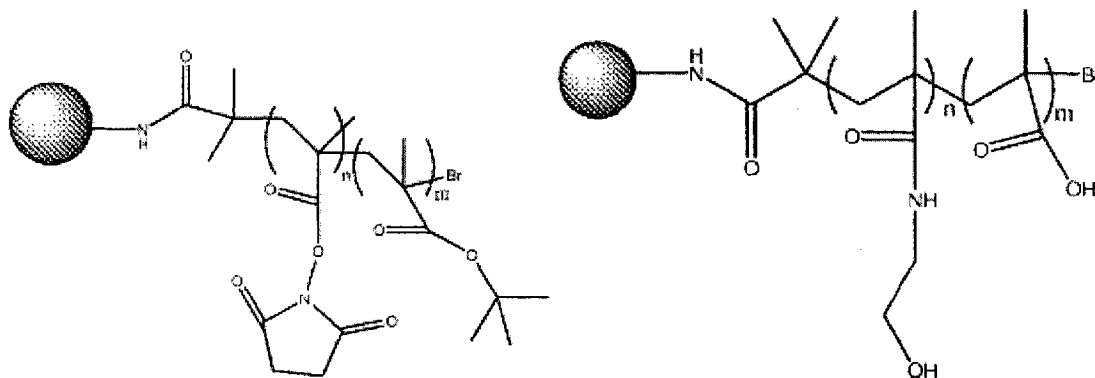


[0148] 通过滴定法测量外部嵌段中的羧酸基团以确定颗粒上的羧基的数量。测量的在实施例 1 的 G133 上的酸基:0.011 毫摩尔酸基 /g DS。

[0149] 实施例 3:聚合物颗粒上的多嵌段聚合物的制备

[0150] 重复实施例 1 和 2 的过程,除了使用 1.04mm/g DS 的 NHSMA 和 0.67 毫摩尔 / 克 (DS) 甲基丙烯酸叔丁酯之外。形成的聚合物如下所示:

[0151]



[0152] 酸基测定为 0.09 毫摩尔酸基 / 克 DS。在所述聚合物结构中: $n = 10$; $m = 7$; n 是理论上彼此连接以形成所述聚合物的 NHSMA 单体单元的 (数均) 数目;且 m 是理论上彼此连接以形成所述聚合物的 tBMA 单体单元的 (数均) 数目。

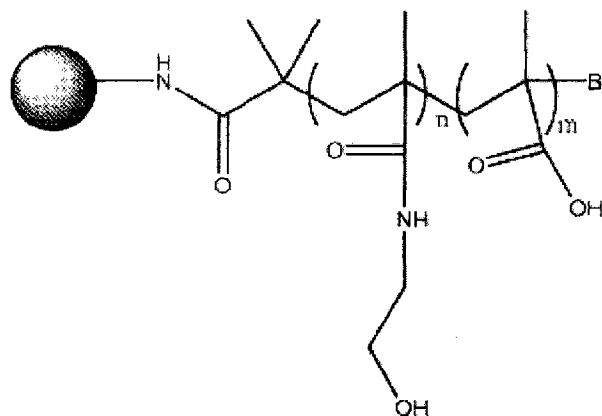
[0153] 实施例 4:聚合物颗粒上的多嵌段聚合物的制备

[0154] 使用 0.25 毫摩尔 / 克 (DS) α -溴代异丁酸酯溴化物仿效实施例 1 的过程。将 2.45 克 DMSO、0.25 毫摩尔 / 克 (DS) CuBr 和 4.58 毫摩尔 / 克 (DS) NHSMA 加入到 0.25 毫摩尔 / 克 (DS) HMTETA 中。100 分钟之后,使用 1.8 毫摩尔 / 克 (DS) 甲基丙烯酸叔丁酯。

[0155] 随后,使形成的多嵌段聚合物与 3.06 克 (8.4 毫摩尔 / 克 (DS)) 乙醇胺在 36.9 克无水 DMF 中反应且将该悬浮液加热到 60℃ 2.5 小时。将该溶液冷却且用 1M 的 NaOH 洗涤 4 次,且以 200rpm 搅拌一夜。随后用 0.01M 的 NaOH 洗涤该溶液。

[0156] 形成的聚合物如下所示:

[0157]



[0158] 通过滴定法测量外部嵌段中的羧酸基团,以确定颗粒上的羧基数量。羧基测定为: 0.14 毫摩尔酸基/克 DS。在所述聚合物结构中: $n = 33$; $m = 12$; n 是理论上彼此连接以形成所述聚合物的 NHSMA 单体单元的(数均)数目;且 m 是理论上彼此连接以形成所述聚合物的 tBMA 单体单元的(数均)数目。

[0159] 实施例 5: 卤化的官能颗粒

[0160] 用 THF 洗涤 5 克(干物质重量, DS) 磁珠(Dynabeads® M-270 amine) (5 次, 每次 15 毫升/克 DS)。将 DS 重量调整到 30% (通过除去上清液减小溶剂和珠子的混合物的体积, 直至达到溶剂混合物中有 30 重量%的珠子), 且用氩气(14 毫升/分钟)处理 30 分钟。使所得聚合物颗粒与 0.25 毫摩尔/克(DS)的 α -溴代异丁酸酯溴化物接触。

[0161] 将反应混合物用 14 毫升/分钟的氩气处理 30 分钟, 且将其加入到圆底反应烧瓶中。将其以 250rpm 搅拌 120 分钟, 在此期间, 保持在 0°C, 并且在悬浮液中有 14 毫升/分钟的氩气流。将该混合物放置在磁体上且除去上清液以形成颗粒悬浮液。

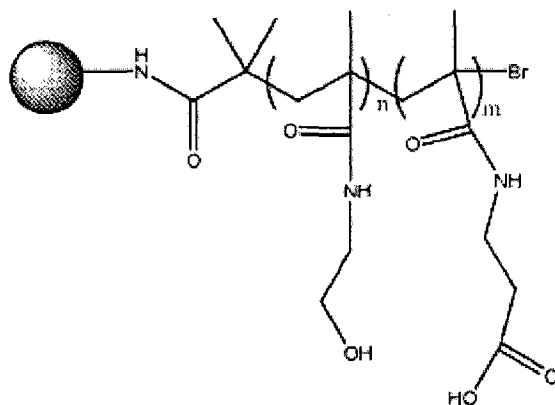
[0162] 将 1.8 克 DMSO、0.25 毫摩尔/克(DS) CuBr 和 6.00 毫摩尔/克(DS) N-羟基琥珀酰亚胺甲基丙烯酸酯混合, 且在将该溶液加入到上述颗粒悬浮液中的几秒钟之前向该溶液中加入 1,1,4,7,10,10-六甲基三亚乙基四胺(HMTETA)。

[0163] 将反应混合物在 70°C 下以 250rpm 进行搅拌, 其中伴有 14 毫升/分钟的氩气流。100 分钟后, 将 2.0 毫摩尔/克(DS) 已在氩气中进行了预处理(14 毫升/分钟, 30 分钟)的甲基丙烯酸叔丁酯加入到该溶液中。

[0164] 在 65 分钟之后, 将空气加入到体系中且将该悬浮液冷却到室温。将该反应混合物放在磁体上并除去上清液。将颗粒悬浮液以 12 毫升 DMSO/克 DS 洗涤 3 次。

[0165] 接下来, 亲水和带电荷的嵌段得以形成。使带有多嵌段聚合物的实施例 5 的聚合物颗粒与混合有 3.33 克 DMSO 的 0.37 克(6.0 毫摩尔(DS)) 乙醇胺反应, 且用氩气(14 毫升/分钟)处理 30 分钟。将该混合物在 60°C、250rpm 下加热 2.5 小时。在 60°C、250rpm 下操作 2.5 小时之后, 加入混合有 1.9 克 DMSO 的 4-氨基丁酸 0.21 克(2.04 毫摩尔/克 DS), 且将该悬浮液冷却到室温。将该反应混合物放在磁体上且除去上清液。将该颗粒悬浮液用 50 毫升的 DMSO 洗涤 3 次。得到的聚合物如下所示:

[0166]



[0167] 其中 $n = 24$; $m = 8$; n 是理论上彼此连接以形成所述聚合物的 NHSMA 单体单元的 (数均) 数目 ; 且 m 是理论上彼此连接以形成所述聚合物的 tBMA 单体单元的 (数均) 数目。

[0168] 实施例 6 : 三嵌段聚合物

[0169] 用 THF 洗涤 5 克 (干物质重量, DS) 磁珠 (Dynabeads® M-270 amine) (5 次, 每次 15 毫升 / 克 DS)。将 DS 重量调整到 30% (通过除去上清液减小溶剂和珠子的混合物的体积, 直至达到溶剂混合物中有 30 重量%的珠子), 且用氩气 (14 毫升 / 分钟) 处理 30 分钟。使所得聚合物颗粒与 0.25 毫摩尔 / 克 (DS) 的 α -溴代异丁酸酯溴化物接触。

[0170] 将反应混合物用 14 毫升 / 分钟的氩气处理 30 分钟, 且将其加入到圆底反应烧瓶中。将其以 250rpm 搅拌 120 分钟, 在此期间, 保持在 0°C, 并且在悬浮液中有 14 毫升 / 分钟的氩气流。将该混合物放置在磁体上且除去上清液以形成颗粒悬浮液。

[0171] 将 DMSO 与 0.25 毫摩尔 / 克 (DS) CuBr 和 1.80 毫摩尔 / 克 (DS) 已在氩气中进行了预处理 (14 毫升 / 分钟, 30 分钟) 的甲基丙烯酸叔丁酯混合, 且在将该溶液加入到上述颗粒悬浮液中的几秒钟之前向该溶液中加入 0.25 毫摩尔 / 克 (DS) 六甲基三亚乙基四胺 (HMTETA)。

[0172] 将反应混合物在 70°C 下以 130rpm 搅拌 60 分钟, 其中伴有 14 毫升 / 分钟的氩气流。60 分钟后, 将 4.6 毫摩尔 / 克 (DS) 已在氩气中进行了预处理 (14 毫升 / 分钟, 30 分钟) 的 NHSMA 加入到该溶液中。将反应混合物在 70°C 下以 130rpm 搅拌 100 分钟, 其中伴有 14 毫升 / 分钟的氩气流。100 分钟后, 加入 1.80 毫摩尔 / 克 (DS) 已在氩气中进行了预处理 (14 毫升 / 分钟, 30 分钟) 的甲基丙烯酸叔丁酯, 并将反应混合物在 70°C 下以 130rpm 搅拌 100 分钟, 其中伴有 14 毫升 / 分钟的氩气流。

[0173] 在 65 分钟之后, 允许空气进入到系统中且将该悬浮液冷却到室温。

[0174] 实施例 7 : 用于接枝到聚合物颗粒上的聚合物在溶液中的制备

[0175] 用 DMSO 洗涤 5 克 (干物质重量, DS) 磁珠 (Dynabeads® M-270 amine) (5 次, 每次 50 毫升 / 克 DS), 并用氩气 (14 毫升 / 分钟) 处理 30 分钟。除去上清液且将该颗粒悬浮液保持在氩气流 (14 毫升 / 分钟) 下。

[0176] 将 15 克经氩气处理的 DMSO (14 毫升 / 分钟, 30 分钟) 与 0.22 克 (0.25 毫摩尔 / 克 DS) CuBr、0.84 克 (4.6 毫摩尔 / 克 (DS)) NHSMA、0.35 克 (0.25 毫摩尔 / 克 (DS)) HMTETA、0.039 克 (0.20 毫摩尔 / 克 (DS)) α -溴代异丁酸乙酯 ((CH₃)₂C(Br)CO₂CH₂CH₃) 混合, 并通过隔膜 (septum) 转移到另一个 100 毫升的圆瓶中, 且伴随 14 毫升 / 分钟的氩气流在 70°C 下以 130rpm 搅拌。在 100 分钟后, 加入 0.26 克 (1.8 毫摩尔 / 克 (DS)) tBMA 且将该悬浮液另

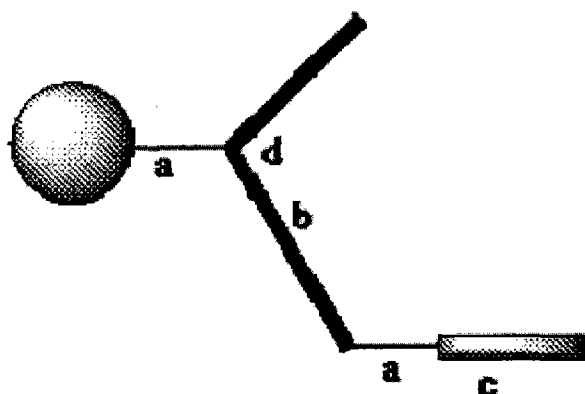
外搅拌 100 分钟。

[0177] 停掉氩气流并允许空气进入且将该溶液冷却到室温。

[0178] 在室温下 30 分钟之后,将该溶液加入到颗粒悬浮液中并加热到 50℃ 且以 250rpm 搅拌 3 小时。

[0179] 所形成的带有共聚物的聚合物颗粒可以进一步与官能分子例如乙醇胺反应,且用 1.0M 的 NaOH 水解,在室温下以 200rpm 搅拌一夜。形成的聚合物如下图所示,该图说明可能的结构:

[0180]



[0181] a. 共价结合

[0182] b. 聚合物嵌段,间隔物

[0183] c. 具有官能度的聚合物嵌段

[0184] d. 随机连接在聚合物链上的颗粒

[0185] 用乙醇胺后处理的聚 (NHSMA) 形成亲水性间隔物,聚 (tBMA) 水解形成酸基官能度。

[0186] 实施例 8:用于接枝到聚合物颗粒上的三嵌段聚合物在溶液中的制备

[0187] 用 DMSO 洗涤 5 克 (干物质重量,DS) 磁珠 (Dynabeads® M-270 amine) (5 次,每次 50 毫升 / 克 DS),并用氩气 (14 毫升 / 分钟) 处理 30 分钟。除去上清液且将该颗粒悬浮液保持在氩气流 (14 毫升 / 分钟) 下。

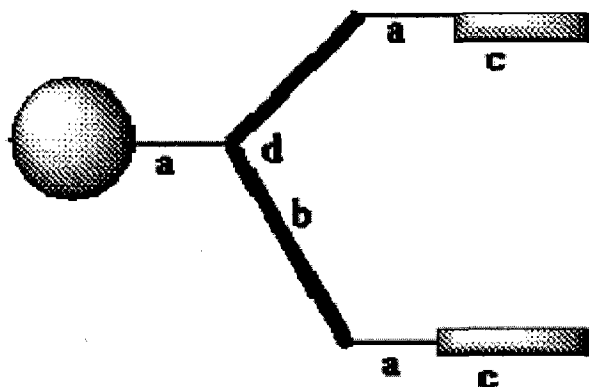
[0188] 将 15 克经氩气处理过的 DMSO (14 毫升 / 分钟,30 分钟) 与 0.22 克 (0.25 毫摩尔 / 克 DS) CuBr、0.26 克 (1.8 毫摩尔 / 克 (DS)) tBMA、0.35 克 (0.25 毫摩尔 / 克 (DS)) HMTETA、0.039 克 (0.20 毫摩尔 / 克 (DS)) α -溴代异丁酸乙酯混合,且通过隔膜转移到另一个 100 毫升的圆瓶中,且伴随着 14 毫升 / 分钟的氩气流在 70℃ 下以 130rpm 进行搅拌。在 60 分钟后,将 0.84 克 (4.6 毫摩尔 / 克 (DS)) NHSMA 加入到悬浮液中。在 100 分钟后,加入 0.26 克 (1.8 毫摩尔 / 克 (DS)) tBMA 且另外搅拌 60 分钟。

[0189] 停止氩气流且允许空气进入并将该溶液冷却到室温。

[0190] 在室温下 30 分钟之后,将该溶液加入到颗粒悬浮液中并加热到 50℃ 且以 250rpm 搅拌 3 小时。

[0191] 形成的带有多嵌段聚合物的聚合物颗粒可以进一步与官能分子例如乙醇胺反应,且用 1.0M 的 NaOH 水解,在室温下以 200rpm 搅拌一夜。形成的聚合物如下图所示,该图说明可能的结构:

[0192]



[0193] a. 共价结合

[0194] b. 聚合物嵌段, 间隔物

[0195] c. 具有官能度的聚合物嵌段

[0196] d. 随机连接在聚合物链上的颗粒

[0197] 用乙醇胺后处理的聚 (NHSMA) 形成亲水性间隔物, 聚 (tBMA) 水解形成酸基官能度。

[0198] 实施例 9: 雌二醇 -6-CMO 与珠子上的羧酸基团的结合

[0199] 大体方案如下。

[0200] 1. 1. 将珠子 (例如源自实施例 2 的 5 毫克 $2.8\mu\text{m}$ 的珠子) 用 $200\mu\text{l}$ 的 MES (50mM 的 MES, pH 值为 5.5) 洗涤且重悬浮在 MES ($90\mu\text{l}$) 中。

[0201] 1. 2. 加入 $10\mu\text{l}$ 的 10% v/v 的 2,2'-(亚乙基二氧)二乙胺 Fluka#03739 在 50mM 的 MES 中的溶液, pH 值为 5.0。

[0202] 1. 3. 加入 EDC (N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐) ($15\mu\text{l}$, 在 MES 中 20 毫克/毫升)。

[0203] 1. 4. 在室温下温育至少 3 小时。

[0204] 1. 5. 用磷酸缓冲盐溶液 (PBST) (0.1% 的在 PBS 中的 Tween-20) 洗涤 ($3\times 500\mu\text{l}$)。

[0205] 1. 6. 在 PBST 中重悬浮到 10 毫克/毫升。

[0206] 2. 雌二醇的活化 (用于 20 个反应)。

[0207] 2. 1. 将雌二醇 -6-CMO (Fluka#03739) (2 毫克) 溶解在无水 DMF ($100\mu\text{l}$) 中。

[0208] 2. 2. 加入 DCC (N,N'-二环己基碳二亚胺) (2.4 毫克, 在 $50\mu\text{l}$ 无水 DMF 中)。

[0209] 2. 3. 加入 NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) (1.2 毫克, 在 $50\mu\text{l}$ 无水 DMF 中)。

[0210] 2. 4. 在室温下至少温育 2 小时。

[0211] 3. 结合

[0212] 3. 1. 在水 ($200\mu\text{l}$) 中洗涤源自步骤 1.6 的珠子 (2 毫克 $2.8\mu\text{m}$ 的珠子) 且将其用无水 DMF ($200\mu\text{l}$) 洗涤三次。

[0213] 3. 2. 重悬浮在无水 DMF ($90\mu\text{l}$) 中。

[0214] 3. 3. 加入源自步骤 2.4 的雌二醇 -NHS ($10\mu\text{l}$)。

[0215] 3. 4. 在 37°C 下温育一夜。

[0216] 3. 5. 在 DMF $3\times (200\mu\text{l})$ 、水以及 $2\times$ PBST ($200\mu\text{l}$) 中洗涤。

[0217] 3. 6. 在 PBST 中重悬浮到 10 毫克/毫升。

[0218] 实施例 10 :胰岛素与珠子上的羧酸基团的结合

[0219] 大体方案如下。

[0220] 1. 将 25 毫克羧酸珠子用 MES 缓冲剂 (1 毫升) 洗涤一次且重悬浮在 MES 缓冲剂 (500 μ l) 中。

[0221] 2. 加入 125 μ l 的 EDC (10 毫克 / 毫升), 混合。

[0222] 3. 加入 125 μ l NHS (10 毫克 / 毫升), 混合。

[0223] 4. 在 15-20°C 下温育 15 分钟。

[0224] 5. 加入 50 μ l 的抗原 (2 毫克 / 毫升)。

[0225] 6. 在 15-20°C 下温育 3-4 小时或一夜。

[0226] 7. 洗涤 3 次, 每次在具有 0.1% Tween-20 的 PBS (1 毫升) 中温育至少 10 分钟。

[0227] 8. 将珠子重悬浮在具有 0.01% Tween-20 的 PBS 中至 10 毫克 / 毫升。

[0228] 实施例 11 :使用对抗体进行的竞争性测定确定亲和常数

[0229] 下面是大体的测定方法。

[0230] 将在测定缓冲剂 (10mM PBS+0.5% BSA+0.1% Tween) 中的 100 μ l ABEI 标记的抗体 (恒定量) 加入到补充有未标记的抗体的血清样品 (25 μ l) 中。然后加入在测定缓冲剂 (20 μ l) 中的抗原标记的珠子 (25 μ g 的 2.8 μ m 尺寸或 10 μ g 的 1.0 μ m 尺寸), 且将该混合物在环境温度下温育 30 分钟。

[0231] 通过磁性分离将该珠子从液体中分离, 丢弃上清液且通过相同方法在洗涤缓冲剂 (Liaison®洗涤 / 体系液体) 中洗涤该珠子。

[0232] 加入起子试剂, 使用光电倍增管测量 ABEI (氨基丁基乙基 4-氨基邻苯二甲酰肼) 产生的闪光化学发光 (RLU) 3 秒钟。

[0233] 实施例 12 :抗雌二醇测定, 以确定活性抗原的 K 和浓度

[0234] 对在不含类固醇的人血清中的雌二醇涂覆的颗粒、ABEI 标记的抗雌二醇 mAb 和未标记的抗雌二醇 mAb (0-1600ng/ 试验) 如上面所描述进行竞争性测定。

[0235] 从测得的 RLU 计算结合抗体的量, 且通过从总投入抗体的量减去结合抗体的量计算溶液中游离抗体的量。

[0236] 在图中, 将 y 轴上的 1/ 结合抗体对 x 轴上的 1/ 游离抗体作图, 抗原的浓度是 1/ 截距 (x = 0) 且 K = 截距 / 斜率。类似地进行胰岛素测定。结果示于图 1 到 4 中。G133 为本发明。

[0237] 本文所公开和要求保护的所有组合物和 / 或方法可以依据本公开内容进行制备和执行而无需过度的实验。虽然已经就优选的实施方式描述了本发明的组合物和方法, 但本领域的技术人员应明白, 可对本文所描述的组合物和 / 或方法以及方法的步骤或步骤顺序进行改变而不脱离本发明的概念和范围。更具体地, 应明白, 某些化学相关试剂可代替本文所描述的试剂并获得相同或相似的结果。本领域的技术人员明白的所有这样的相似取代物和改动被认为是在本发明的范围和概念之内。

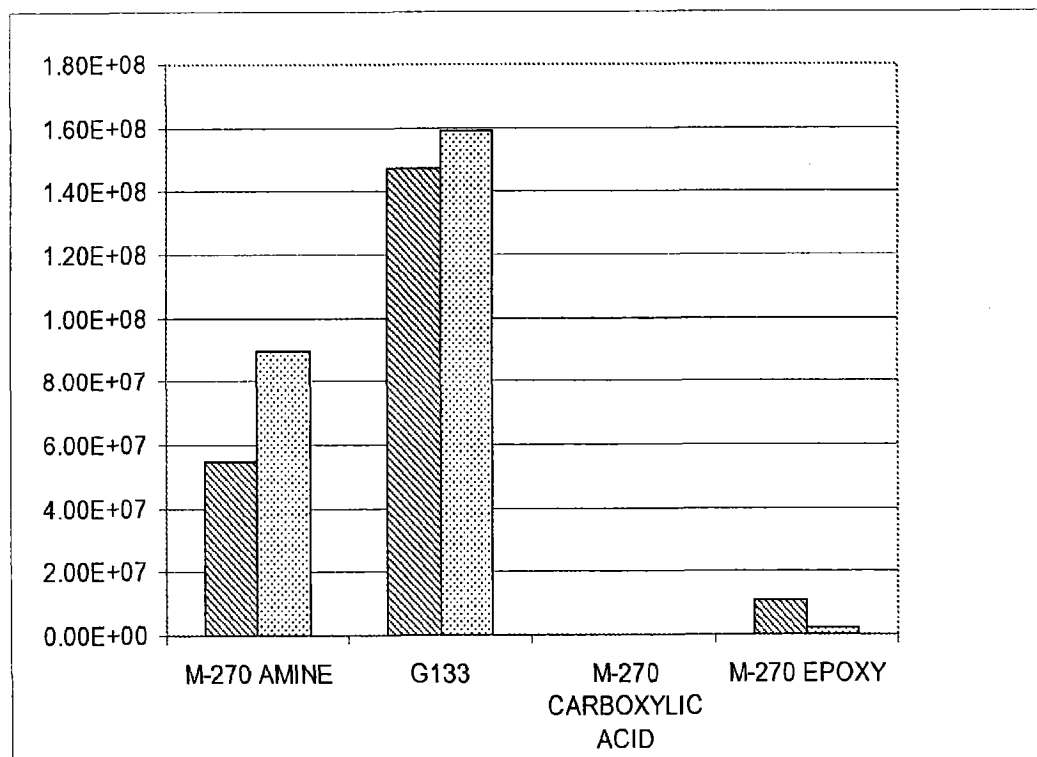


图 1

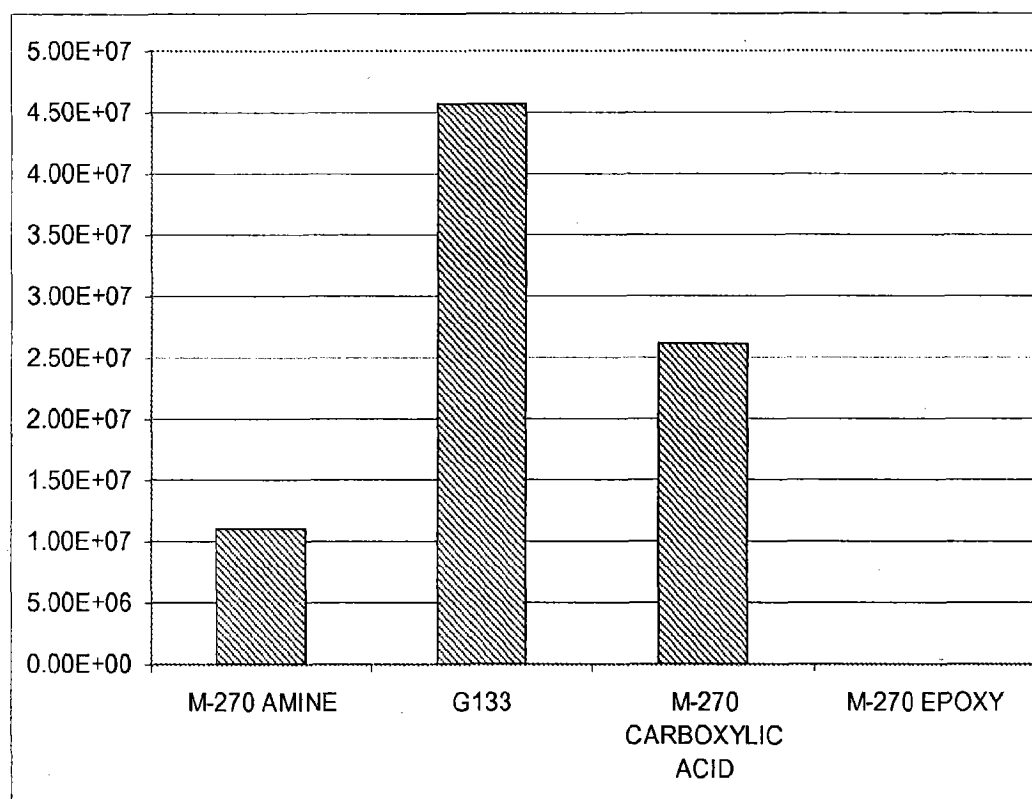


图 2

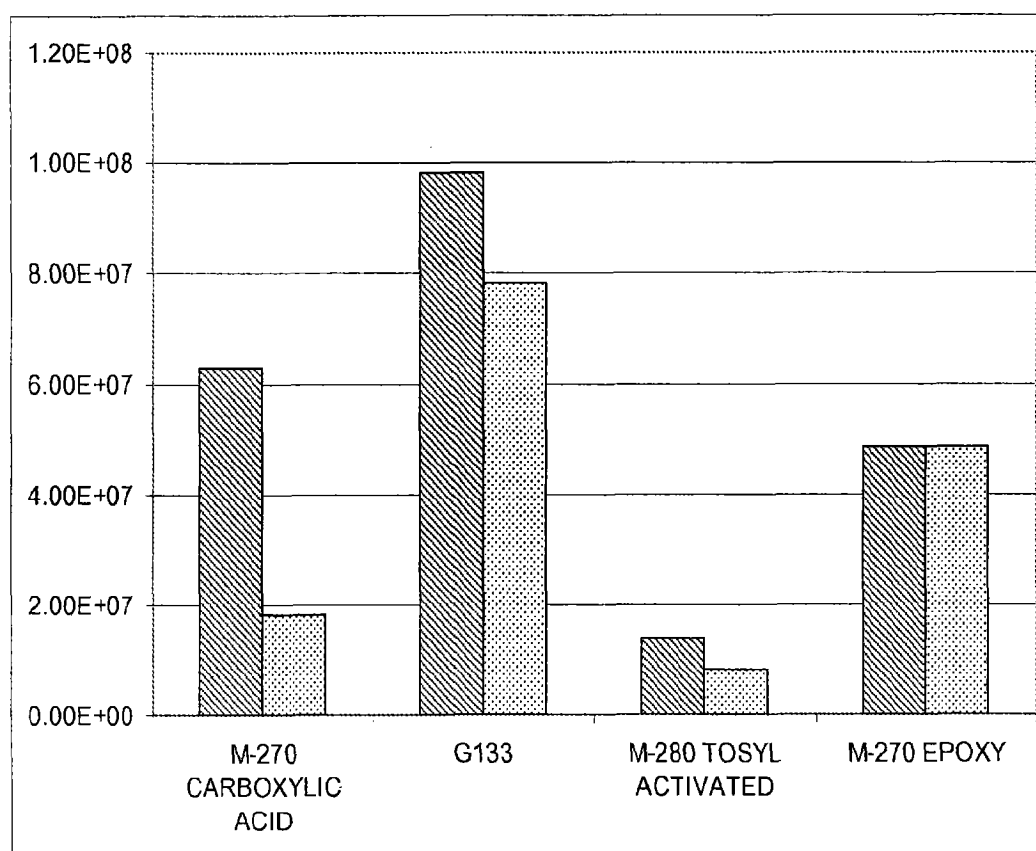


图 3

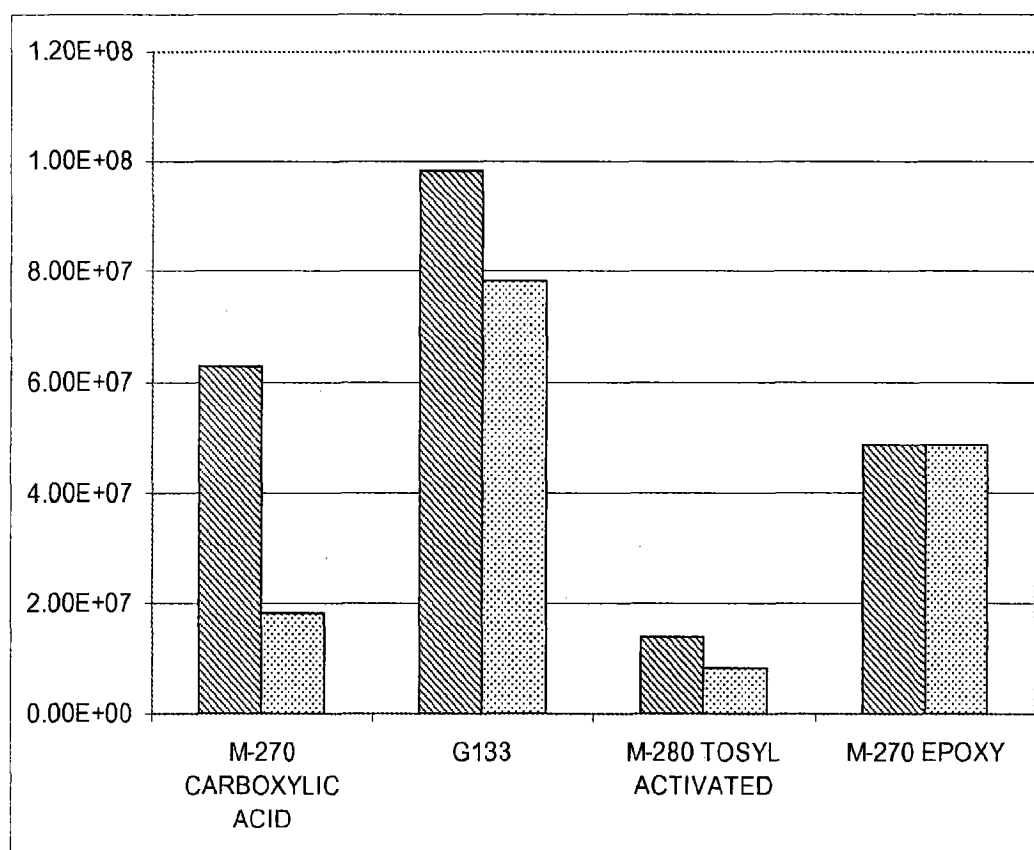


图 4