



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104704370 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201380052528.7

(22)申请日 2013.10.07

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104704370 A

(43)申请公布日 2015.06.10

(30)优先权数据

61/710908 2012.10.08 US

61/710903 2012.10.08 US

61/710990 2012.10.08 US

61/710898 2012.10.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/063649 2013.10.07

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/058760 EN 2014.04.17

(73)专利权人 通用电气公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 R.D.戈德 P.C.梅兰森
M.K.斯通史密斯 H.徐 黄岩

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 徐晶 林森

(51)Int.Cl.

G01N 33/579(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101389960 A,2009.03.18,全文.

CN 101387647 A,2009.03.18,全文.

CN 101368967 A,2009.02.18,全文.

EP 0649021 A1,1995.04.19,全文.

审查员 周洋

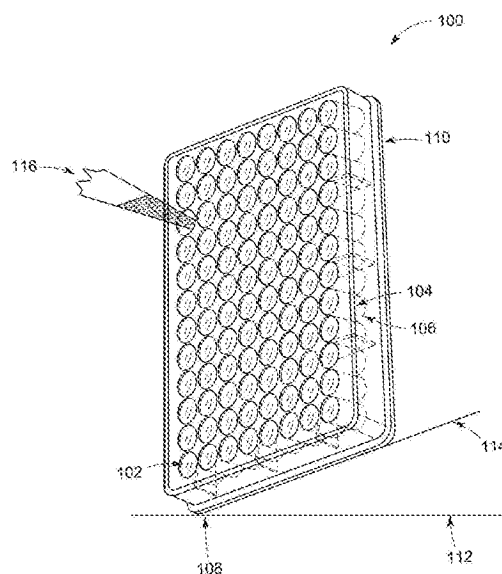
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

用于测试LAL反应物质的预装载的测试基
板、使用方法和制备方法

(57)摘要

本发明公开了用于检测LAL反应物质的测试
基板,其中所述测试基板的至少一部分已预装载
有至少一种LAL试剂和/或至少一种LAL反应标准
物。本发明公开了使用测试基板的方法。本发明
还公开了将测试试剂沉积到测试基板上的方法。



1. 一种用于检测LAL反应物质的预装载的测试基板,其中所述预装载的测试基板的至少一部分已预装载有至少一种LAL反应标准物、或者已预装载有至少一种检测试剂和至少一种LAL反应标准物,并且其中所述LAL反应标准物以多个浓度存在,并且其中每个浓度存在于所述预装载的测试基板的分开部分上。

2. 根据权利要求1所述的预装载的测试基板,其特征在于,所述预装载的测试基板的至少一部分具有经修饰的表面。

3. 根据权利要求2所述的预装载的测试基板,其特征在于,所述经修饰的表面使用等离子体刻蚀进行修饰。

4. 根据权利要求2所述的预装载的测试基板,其特征在于,所述经修饰的表面使用至少一个涂层进行修饰,其中所述涂层是静态涂层、动态涂层或其组合。

5. 根据权利要求4所述的预装载的测试基板,其特征在于,至少一个静态涂层选自由聚乙二醇(PEG)、胶原及其组合组成的组。

6. 根据权利要求4所述的预装载的测试基板,其特征在于,至少一个动态涂层选自由聚乙二醇(PEG)、脱氧胆酸钠及其组合组成的组。

7. 根据权利要求1所述的预装载的测试基板,其还包括在所述分开部分中的至少一个之间的至少一个机械阻隔件。

8. 根据权利要求7所述的预装载的测试基板,其特征在于,至少一个机械阻隔件是可溶的。

9. 根据权利要求1所述的预装载的测试基板,其特征在于,所述预装载的测试基板还包括部分标识机构。

10. 根据权利要求1所述的预装载的测试基板,其特征在于,所述预装载的测试基板是微板。

11. 根据权利要求1所述的预装载的测试基板,其特征在于,所述预装载的测试基板还包括阻隔材料,以保护所述预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

12. 一种用于测量样品中的LAL反应物质的方法,所述方法包括:

(a) 使所述样品与预装载的测试基板接触,其中所述预装载的测试基板的至少一部分已预装载有至少一种LAL反应标准物、或者已预装载有至少一种检测试剂和至少一种LAL反应标准物,并且其中所述LAL反应标准物以多个浓度存在,并且其中每个浓度存在于所述测试基板的分开部分上,由此形成制备样品;和

(b) 测量所述制备样品的吸光度。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,所述预装载的测试基板的至少一部分具有经修饰的表面。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述经修饰的表面使用等离子体刻蚀进行修饰。

15. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述经修饰的表面使用至少一个涂层进行修饰,其中所述涂层是静态涂层、动态涂层或其组合。

16. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,至少一个静态涂层选自由聚乙二醇(PEG)、胶原及其组合组成的组。

17. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,至少一个动态涂层选自由聚乙二醇

(PEG)、脱氧胆酸钠及其组合组成的组。

18. 根据权利要求12所述的方法, 其特征在于, 多个LAL反应标准物浓度用于生成标准曲线。

19. 根据权利要求12所述的方法, 其特征在于, 所述预装载的测试基板是微板。

20. 根据权利要求12所述的方法, 其特征在于, 所述预装载的测试基板还包括阻隔材料, 以保护所述预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

21. 一种用于将至少一种测试试剂沉积到测试基板上的方法, 所述方法包括:

(a) 获得具有包括多个孔的孔阵列的测试基板, 其中每个孔具有至少一个光学窗口表面和多个非光学窗口表面;

(b) 将在其中具有至少一种检测试剂的第一液体溶液置于至少一个孔的第一非光学窗口表面上;

(c) 使所述第一液体溶液在所述第一非光学窗口表面上干燥, 由此将所述检测试剂沉积到所述第一非光学窗口表面上且形成预装载的测试基板;

(d) 将在其中具有至少一种LAL反应标准物的第二液体溶液置于至少一个孔的第二非光学窗口表面上, 并且其中所述LAL反应标准物以多个浓度存在; 和

(e) 使所述第二液体溶液在所述第二非光学窗口表面上干燥, 由此将所述LAL反应标准物沉积到所述第二非光学窗口表面上。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述预装载的测试基板是微板。

23. 根据权利要求21所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括在干燥步骤后用阻隔材料覆盖所述预装载的测试基板, 以保护所述预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

用于测试LAL反应物质的预装载的测试基板、使用方法和制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及测定样品中的LAL反应物质浓度的领域。更具体而言,本发明涉及与美国、欧洲和日本药典细菌内毒素测试(“BET”)和全球等价药典BET标准相容的预装载的测试基板和新测量方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请享有下述专利申请的利益:于2012年10月8日提交并且名称为MICROFLUIDIC BACTERIA ENDOTOXIN TESTING METHOD AND APPARATUS的临时专利申请序列号61/710,908;于2012年10月8日提交并且名称为CENTRIPETAL MICROFLUIDIC PLATFORM FOR BACTERIAL ENDOTOXIN TESTING的临时专利申请序列号61/710,990;于2012年10月8日提交并且名称为SENSITIVE AND RAPID METHOD FOR DETECTION OF LOW LEVELS OF ENDOTOXINS USING LAL REAGENTS的临时专利申请序列号61/710,898;以及于2012年10月8日提交并且名称为MICROPLATES PRELOADED WITH ENDOTOXIN DETECTION REAGENTS WITH CALIBRATION MEANS的临时专利申请序列号61/710,903。所有上文列出的专利申请均以引用的方式并入本说明书。

背景技术

[0004] 微生物污染例如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母和真菌可在人中引起严重疾病,甚至死亡。当人们变得被革兰氏阴性菌感染时,该细菌可产生诱导发热的细菌内毒素。内毒素可为危险的且甚至对人是致命的。其为革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖组分的内毒素分子可存在于药物制剂和医疗装置的表面上,独立于微生物污染。即使系统通过无菌测试,也可发生内毒素污染,这是需要独立的内毒素测试的原因。

[0005] 目前,已开发使用来自鲎的血细胞裂解物的多种测定,用于检测被测试样品中或样品上的内毒素存在。当血细胞裂解物暴露于内毒素时,将发生凝固。血细胞裂解物是由多个鲎物种的血淋巴产生的变形细胞裂解物,所述多个鲎物种包括鲎属(Limulus)、东方鲎属(Tachyplesus)和褐鲎属(Carcinoscorpius)物种。常用的变形细胞裂解物由鲎属或东方鲎属物种的血淋巴产生,被称为鲎变形细胞裂解物(“LAL”)。使用LAL作为测试试剂的常规测试包括凝胶凝固测定、终末点浊度测定、动力学浊度测定、终末点生色测定和动力学生色测定。使用LAL试剂的测试还可用于测试葡聚糖,这是真菌污染的标记。

[0006] 关于LAL测定和所使用标准的更多信息可在美国药典(“USP”)第85章“Bacterial Endotoxins Test”(“BET”)、日本药典4.01“Bacterial Endotoxin Test”、欧洲药典2.6.14“Bacterial Endotoxins”及其他等价国家药典中找到。上文列出的药典中的许多已经被统一。另外的国际统一的药典信息可在ICH Q4B Annex 14“Bacterial Endotoxin Test General Chapter”中找到。关于医疗装置中的内毒素测试,信息可在USP第161章“Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices”和ANSI/AAMI ST72“Bacterial endotoxins-Test methods,routine monitoring,and alternatives to

batch testing”中找到。这些标准和程序一般可被称为正式纲要 (compendia)。

[0007] 制药行业、医疗装置行业和食品行业中的制造商必须满足某些标准,以确保它们的产品不含微生物或内毒素污染。这些行业需要关于内毒素存在的频繁、准确和灵敏的测试,以满足多种安全标准,例如由美国食品与药品管理局或环境保护局 (Environmental Protection Agency) 设定的安全标准。这些机构承认正式纲要程序标准中的许多。因此,如果制造商希望获得政府批准以使新产品上市,如果产品遵从上文列出的正式纲要中的方法和标准,则可满足FDA要求中的许多。这基本上可减少制造商获得FDA新产品批准的成本。

[0008] 多种正式纲要中的这些测定需要包含已知浓度的内毒素的水性溶液用作“标准物”。这些水性溶液通常是不稳定的;因此它们通常紧邻在测试前在测试场所由粉状毒素制备。LAL试剂通常还以粉末形式出现,并且必须在使用前在水性溶液中重构。

[0009] 通常,仅需要几毫克内毒素和LAL粉末,因此这些粉末的准确测量可能是繁琐的。由于其细小颗粒大小,这些粉末通常粘住容器和药匙表面,并且在测试程序期间难以局限于容器中,从而造成另外的处理问题。使用常规测试方法,熟练的操作者必须将内毒素和LAL粉末手动重构到无内毒素的水中,同时不使试剂溶液不会受实验室设备或通过环境接触污染。

[0010] 由于关键生物分子的缓慢溶剂化及其在混合期间粘住表面和其后在表面上凝结的倾向,内毒素和LAL粉末的制备是困难的。LAL试剂还在重构后缓慢开始反应,并且具有极短的贮存期限。虽然最佳实践是在紧邻使用前混合这些,但工作流通常需要在过程开始时混合它们。此外,制备过程易于被在环境中普遍存在的内毒素污染。

[0011] 这些机构还需要一系列校正测试以确保使用的设备和试剂是正常工作的。校正测试和样品测量还必须进行超过一次。遵从BET及其他正式纲要的目前实验室方法是非常详细的,并且需要流体体积的反复和高度精确测量以用于分配到微板等等的多个入口内,而不污染。

[0012] 最常见的执行LAL分析的方法是使用微孔板和阅读器。将在顶部开放且在底部具有透明窗口的反应孔矩阵置于用于多重同时测定的加热的分光光度计阅读器中。存在许多缺点,包括制备板花费的冗长时间、它的高成本、错误和污染的机会、以及该工作需要由为该任务专门训练且致力于该任务的技术员来完成。

[0013] 连续监控高度熟练的操作者以确保适当的测量和测试技术和准确度,并且操作者根据需要进行再训练,以便确保重复动作的准确度。通常方法可具有多达248个缓慢和耗时的移液步骤,使得它由于其复杂性成为易于出错的方法和由于其操作长度和数目成为易于污染的方法。

[0014] 已开发了方法和装置用于减少内毒素测试的步骤量或者使内毒素测试步骤中的一些或全部自动化。一些方法包括使一个或多个移液或等分步骤自动化,样品的自动化混合,或将试剂预装载到测试基板中,这仅允许非常有限数目的测试。

[0015] 其他自动化方法依赖机械手来测量和分配微板中的样品和试剂。一旦制备,板就手动或使用另一个机械手装载到阅读器中。机械手通常是基于移液管的分配系统,其将样品和试剂从小瓶支架准确转移到板,从而代替移液管头以防止交叉污染。这是需要其机械手操作的频繁验证的昂贵系统,并且可使用多重一次性使用的移液管、管头、多孔板、稀释管、移液管填充托盘、取样小瓶等,用于每次运行。它还按顺序制备孔,并且如同手动制备,

不能同时开始所有反应。污染仍是问题,因为过程通常是未被监控的,所以不存在拒绝被污染样品的合理方法。

[0016] 然而,所有开发的方法或装置均缺少下述方面中的一个或多个:设计到基板内的低成本自动化、确保清洁的一次性使用的清洁基板、在每个基板上的正式纲要测试顺应、内置的个别测试测量验证和测量操作的简单性。相应地,存在对更半自动化的测试方法或程序的需要,以用于测试和分析流体样品中的内毒素浓度,其减少或消除遵从正式纲要的潜在操作者错误的量。

发明内容

[0017] 相应地,本发明公开了其中步骤数目显著减少的测试基板和方法,由此使污染、时间延迟和错配降到最低,并且因此改善准确度。该方法适合于与FDA许可的LAL一起使用。公开的测试基板和测量方法适用于药剂和生物药剂制造,并且与美国、欧洲和日本药典细菌内毒素测试和全球等价药典BET标准相容。对于医疗装置制造,公开的实施例与国际药典以及共识的标准组织中见到的内毒素条例和标准以及国际等价标准相容。

[0018] 本发明通过制备具有检测试剂(可为预装载到测试基板上的内毒素检测试剂和/或LAL反应标准物)的专门测试基板来改善标准细菌内毒素测试(“BET”)。在一个实施例中,本发明公开了预装载的测试基板,其中所述预装载的测试基板已预装载有至少一种检测试剂和/或至少一种LAL反应标准物。这些预装载的测试基板可用于测定水性样品中的LAL反应物质浓度的测试中。如本说明书使用的,LAL反应物质意指与检测试剂反应的物质。LAL反应物质的例子包括内毒素或1,3-β-D-葡聚糖例如昆布多糖和凝胶多糖。LAL反应标准物在其中包含LAL反应物质。本发明还可与任何商业来源的检测试剂一起使用。合适的用于检测LAL反应物质的检测试剂包括变形细胞裂解物(美洲鲎(Limulus Polyphemus)或LAL和中国鲎(Tachyplesus Tridentatus)或TAL)、重组鲎因子C或rFc、单核细胞活化型热原试剂、重组因子C和LAL的混合物、和包括寿司肽、寿司肽片段、寿司肽二聚体以及其他特异性结合蛋白例如源自细菌噬菌体的抗体和受体结合蛋白的制剂、以及能够与脂质A反应以产生可测量响应的任何其他试剂。

[0019] 本发明可减少用户在制备和测量校正标准物和样品两者中必须执行的步骤数目。这可减少高技术水平、经验和训练的需要,并且减少成本、时间和人为失误的机会。另外,本发明可以遵从正式纲要要求和FDA条例的方式构建或利用。

[0020] 本发明还适合于与使反应进展与内毒素水平相关的所有定量正式纲要光度法一起使用,包括1) 动态生色,其中直到光吸收改变指定量的时间与浓度相关,2) 终末点生色,其中经过固定时间的光吸收变化与浓度相关,3) 动态浊度,其中直到浊度(通常通过光吸收测量)改变指定量的时间与浓度相关,和4) 终末点浊度,其中经过固定时间的浊度变化与浓度相关。

[0021] 在另一个实施例中,预装载的测试基板的至少一部分可具有经修饰的表面。该表面可使用等离子体刻蚀进行修饰。作为另外一种选择,该表面可使用至少一个涂层进行修饰。涂层可为静态涂层、动态涂层或其组合。合适的静态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、胶原及其组合。合适的动态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、脱氧胆酸钠及其组合。

[0022] 在另外一个实施例中,预装载的测试基板可具有在所述部分中的至少一个之间的

至少一个机械阻隔件。机械阻隔件可为可溶的。预装载的测试基板还可包括部分标识机构例如示踪剂。在另一个实施例中，预装载的测试基板可为微板。在另外一个实施例中，预装载的测试基板可具有阻隔材料，以保护预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

[0023] 在另一个实施例中，本发明公开了用于测量样品中的LAL反应物质的方法。该方法包括使样品与预装载的测试基板接触，其中所述预装载的测试基板的至少一部分已预装载有至少一种检测试剂和/或至少一种LAL反应标准物，由此形成制备样品。随后可测量样品的吸光度。

[0024] 在另一个方法实施例中，预装载的测试基板的至少一部分可具有经修饰的表面。该表面可使用等离子体刻蚀进行修饰。作为另外一种选择，该表面可使用至少一个涂层进行修饰。涂层可为静态涂层、动态涂层或其组合。合适的静态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、胶原及其组合。合适的动态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、脱氧胆酸钠及其组合。

[0025] 在另外一个实施例中，预装载的测试基板可为微板。在另外一个实施例中，预装载的测试基板可具有阻隔材料，以保护预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

[0026] 在另一个实施例中，本发明公开了用于将至少一种测试试剂沉积到微板上的方法。测试试剂可为帮助测试样品的任何试剂。合适的测试试剂包括但不限于检测试剂和LAL反应标准物。合适的检测试剂在上文描述，并且可包含变形细胞裂解物。LAL反应标准物也在上文描述，并且包括USP内毒素参考标准物(RSE)，其已针对目前世界卫生组织国际内毒素标准物进行校正。该方法可包括提供具有包括多个孔的孔阵列的测试基板，其中每个孔具有至少一个光学窗口表面和多个非光学窗口表面。可将在其中具有至少一种检测试剂的第一液体溶液置于至少一个孔的第一非光学窗口表面上。可使第一液体溶液在第一非光学窗口表面上干燥，由此将检测试剂沉积到第一非光学表面上，以形成预装载的测试基板。

[0027] 在另一个实施例中，用于将至少一种测试试剂沉积到测试基板上的方法还可包括将在其中具有至少一种LAL反应标准物的第二溶液置于第二非光学窗口表面上。可使第二液体溶液在第二非光学窗口表面上干燥，由此将LAL反应标准物沉积到第二非光学窗口表面上。

[0028] 在另一个实施例中，测试基板可为微板。在另外一个实施例中，该方法还可包括在干燥步骤后用阻隔材料覆盖预装载的测试基板，以保护预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

附图说明

[0029] 图1显示了本发明的一个实施例，其中测试试剂可沉积到微板的侧壁上。

具体实施方式

[0030] 在一个实施例中，本发明公开了预装载的测试基板，其中所述预装载的测试基板已预装载有至少一种检测试剂和/或至少一种LAL反应标准物。预装载的测试基板设计为测量样品中的BET。它还可用于提供来自使用LAL反应标准物的已知掺料的校正数据。预装载的测试基板可设计为满足所有目前的BET药剂条例要求，并且可与浊度、生色和凝胶凝固BET方法一起使用。LAL反应标准物可为已针对相关条例主内毒素(CSE)和条例主内毒素标

准物 (RSE) 进行校正的内毒素。当其他方法可接受或已验证为等价的且是管理机构可接受的时,可使用基于历史数据的贮存校正代替来自个别标准物的结果

[0031] 相应地,本发明公开了其中测试步骤数目显著减少的测试基板和方法,由此使污染、时间延迟和错配降到最低,并且因此改善准确度。该方法适合于与FDA许可的检测试剂一起使用。该方法可与具有内置热控制器的标准吸光度或微板阅读器、混合器和光阅读器一起使用,以测定BET结果。

[0032] 在另一个实施例中,LAL反应标准物可预装载在预装载的测试基板的至少三个不同部分中。这三个不同部分可形成校正部分。每个部分中的LAL反应标准物的浓度可为相同或不同的。如果使用内毒素,则第一部分可具有使得当水性样品(或空白水)存在于该部分中时,样品中的内毒素浓度范围为0.005至0.5EU/mL的量。类似地,第二部分可具有对应于范围为0.05至5.0EU/mL的浓度的量,并且第三部分可具有对应于范围为0.5至50EU/mL的浓度的量。

[0033] 在另一个实施例中,预装载的测试基板的至少两个部分可形成样品测量部分。两个部分可装载有LAL反应标准物,以形成掺料。

[0034] 检测试剂和/或LAL反应标准物可沉积到多种测试基板上,例如微板孔的侧壁上以允许样品空白测量,微板孔的光学窗口上,可溶性涂层上,或光学上半透明或反射性不溶性膜上。作为另外一种选择,测试试剂可作为干燥珠或粗糙颗粒加入,或沉积到加入测试基板中的载体介质内。

[0035] 在另一个实施例中,预装载的测试基板的至少一部分可具有经修饰的表面。该表面可使用等离子体刻蚀进行修饰。作为另外一种选择,该表面可使用至少一个涂层进行修饰。涂层可为静态涂层、动态涂层或其组合。合适的静态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、胶原及其组合。合适的动态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、脱氧胆酸钠及其组合。

[0036] 在另外一个实施例中,预装载的测试基板可具有在所述部分中的至少一个之间的至少一个机械阻隔件。机械阻隔件可为可溶的。

[0037] 具有预装载的试剂的测试基板可包装成使得它通过使用阻隔材料与环境密封,所述阻隔材料阻止水分、细菌和内毒素试剂污染预装载的试剂。相应地,在另外一个实施例中,预装载的测试基板可具有阻隔材料,以保护预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。在另一个实施例中,预装载的测试基板可为微板。

[0038] 样品引入错误还可通过在预装载的测试基板上或阅读器中的多个任选标识机构而减少,所述阅读器配置为阅读或测量测试基板中的样品。标识机构可为用户标识样品或通知用户是否需要另外的试剂。合适的标识方法可包括光学标记例如颜色标记、字母数字标记或发光二极管。在一个实施例中,标识机构可为示踪剂。示踪剂是加入流体中帮助测定体积、流体位置和移动(流体运动)的惰性化合物。示踪剂还可用于帮助验证测量数据。合适的示踪剂包括但不限于染料。

[0039] 在另一个实施例中,本发明公开了用于测量样品中的内毒素的方法。如本说明书中使用的,术语“样品”不仅可包括待分析的样品,还包括显示与以检测极限采用的检测试剂或裂解物不反应的水。非反应性的水的样品还可被称为“LAL试剂水”、“用于BET的水”或“注射用水”。

[0040] 该方法可包括使样品与预装载的测试基板接触,其中所述预装载的测试基板的至

少一部分已预装载有至少一种检测试剂和/或至少一种LAL反应标准物,由此形成制备样品。随后可测量样品的吸光度。

[0041] 样品可接触测试基板的超过一个部分。接触预装载的测试基板的制备样品可与测试试剂接触或不接触。例如,制备样品可为“空白”或阴性对照,其不接触任何测试试剂,或仅与检测试剂接触。在另一种方法中,基板的一部分还可预装载有至少一种LAL反应标准物。如果LAL反应标准物是内毒素标准物,则它可以多个浓度存在,其中如上所述每个浓度存在于基板的的不同部分上。内毒素可预装载到基板上,使得可如USP 85中要求的生成“标准曲线”。在另一个实施例中,多个内毒素标准物浓度可用于生成标准曲线。

[0042] 在另一个方法实施例中,预装载的测试基板的至少一部分可具有经修饰的表面。该表面可使用等离子体刻蚀进行修饰。作为另外一种选择,该表面可使用至少一个涂层进行修饰。涂层可为静态涂层、动态涂层或其组合。合适的静态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、胶原及其组合。合适的动态涂层包括但不限于聚乙二醇(PEG)、脱氧胆酸钠及其组合。

[0043] 在另外一个实施例中,预装载的测试基板可为微板。在另外一个实施例中,预装载的测试基板可具有阻隔材料,以保护预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。

[0044] 在另一个实施例中,本发明公开了用于将至少一种测试试剂沉积到微板上的方法。测试试剂可为帮助测试样品的任何试剂。合适的测试试剂包括但不限于检测试剂和LAL反应标准物。合适的检测试剂在上文描述,并且可包含变形细胞裂解物。LAL反应标准物也在上文描述,并且包括USP内毒素参考标准物(RSE),其已针对目前世界卫生组织国际内毒素标准物进行校正。该方法可包括提供具有包括多个孔的孔阵列的测试基板,其中每个孔具有至少一个光学窗口表面和多个非光学窗口表面。可将在其中具有至少一种检测试剂的第一液体溶液置于至少一个孔的第一非光学窗口表面上。可使第一液体溶液在第一非光学窗口表面上干燥,由此将检测试剂沉积到第一非光学表面上,以形成预装载的测试基板。LAL反应标准物可以多个浓度存在,其中每个浓度存在于测试基板的分开孔中。

[0045] 在另一个实施例中,用于将至少一种测试试剂沉积到测试基板上的方法还可包括将在其中具有至少一种LAL反应标准物的第二溶液置于第二非光学窗口表面上。可使第二液体溶液在第二非光学窗口表面上干燥,由此将LAL反应标准物沉积到第二非光学窗口表面上。

[0046] 在另一个实施例中,测试基板可为微板。在另外一个实施例中,该方法还可包括在干燥步骤后用阻隔材料覆盖预装载的测试基板,以保护预装载的测试基板不受环境暴露和表面污染。合适的测试基板包括帮助评估或测试样品的任何测试基板,例如可得自Sigma-Aldrich的微板,或微量滴定板。如图1中所示,微板(100)可具有以2乘3矩形矩阵排列的多个样品孔(102)。微板通常具有6、24、96、384或1536个孔。在一个实施例中,微板(100)可具有96个孔(102)。尽管在一块微板内的个别孔的容纳能力通常是相同的,但孔的容纳能力可在微板和微板之间变化。孔(102)的侧壁(104)和底部(106)可为弯曲或笔直的,使得壁在形状中是半球形、圆柱形或矩形。板还可包括基本上平面的底表面(108),使得微板平坦地位于工作表面上。工作表面可包括但不限于地面、实验室工作台顶部、微板阅读器和加热板,以及制造表面例如桌子、传送带和辊。微板完全不位于工作表面上也是可能的,而是经由悬浮工具例如钩子、夹子等悬浮于工作表面上方。微板可由多种材料制成,所述多种材料包括

聚苯乙烯和聚丙烯或聚碳酸酯。光学检测微板可由聚苯乙烯或其他合适聚合物制成,所述聚合物不干扰测试试剂与样品的化学表现。在一些实施例中,可加入二氧化钛,以使得聚苯乙烯变白,以帮助光学吸光度方法。

[0047] 测试基板的一个或多个部分可具有经修饰的表面。具有经修饰的表面的部分可包括但不限于侧壁和孔。表面可通过本领域普通技术人员已知的任何方法进行修饰,包括但不限于施加涂层、辐射、等离子体刻蚀、紫外线和臭氧、或可动态覆盖表面的溶解试剂,使得表面和试剂或样品的相互作用模拟标准微板分析的相互作用,使得制造商的规格或正式纲要分析得以满足。

[0048] 在一个实施例中,测试基板的表面可进行修饰,以控制生物化学LAL和LAL反应物质相互作用或者控制表面能。控制与反应化学的表面化学相互作用的水平可改善生物化学表现的可重复性和准确度。例如,适合于制造测试基板材料还可以生物化学方式抑制或增强LAL或LAL反应物质反应化学。施加涂层或通过表面的化学修饰,可控制或减少在材料表面和反应化学之间的该生物化学相互作用。另外,测试基板的未经修饰的表面可对于存在于测试基板上的微流体具有不期望的表面能。表面能还可通过化学修饰或添加涂层修饰至所需值,以使得表面能更亲水或更疏水,或实现这些状态之间的任何其他表面能。通过优化表面能,存在于测试基板上的微流体也可得到优化。

[0049] 修饰测试基板表面的另一种方法包括等离子体刻蚀,其中表面通过使其暴露于等离子体进行修饰,以影响特定最终表面化学结构。不同元素例如氧或氮可加入等离子体中,以修饰表面的化学。另外的方法包括使用永久的静态或动态表面涂层。可加入静态表面涂层以在测试基板表面上形成层来改变表面特征。静态表面涂层可作为具有溶剂的溶液施加并且干燥,或通过其中涂层与表面化学键合的表面接枝施加。可作为涂层接枝或施加的静态涂层的例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)和胶原。动态表面涂层可加入试剂、样品或标准物中,并且当流体在测试基板上或样品孔中移动时原位涂覆表面。动态涂层的例子包括但不限于PEG和表面活性剂如脱氧胆酸钠。

[0050] 在一个实施例中,该方法可包括提供具有包括多个孔的孔阵列的微板,其中每个孔具有至少一个光学窗口表面和多个非光学窗口表面;提供在其中具有至少一种测试试剂的液体溶液;将液体溶液置于至少一个孔的所述非光学窗口表面中的第一个上;和使所述液体溶液在所述第一非光学窗口表面上干燥,由此将所述检测试剂沉积到所述第一非光学窗口表面上。在另一个实施例中,沉积步骤可在后续非光学窗口表面上重复,使得另外的测试试剂沉积到后续侧壁部分上。

[0051] 测试试剂可加入孔的非光学窗口表面,以允许在测试试剂有机会混合之前样品的初始光学测量。这可用于测定光学零。另外,每种测试试剂具有在反应开始前,可用于检查加入的测试试剂的正确水平的光学标记。在另一个实施例中,每种测试试剂可用光学材料加上标签,所述光学材料对于内毒素测试反应是惰性的。如果用户在反应发生(反应滞后阶段时期)前发现预期水平的测试试剂的不正确水平,则用户可拒绝该样品的测量测试。这对药学用户具有极大价值,因为任何不规范(00S)测试均必须进行评估和说明。

[0052] 在另一个方法实施例中,该方法可包括提供在其中具有至少一种测试试剂的液体溶液;提供具有基本上平坦的底表面、多个边缘(110)和孔阵列的微板,其中底表面相对于水平工作表面(112)是基本上平行的,并且其中孔阵列包括具有多个侧壁的多个孔。多个边

缘(110)中的第一个可为倾斜的,使得第一边缘相对于水平工作表面以大致垂直方向倾斜(114),使得底表面不再相对于工作表面基本上平行,并且使得最接近于工作表面的侧壁部分处于相对于工作表面的大致平行方向。液体溶液可置于(116)侧壁部分上且随后干燥,由此将测试试剂沉积到侧壁部分上。适合于转移液体的任何工具均可为合适的,包括但不限于移液管或喷嘴。

[0053] 任何干燥过程均适合于本发明,只要干燥过程不改变测试试剂的反应性。这些干燥过程包括但不限于在环境温度下的真空干燥过程或冷冻干燥过程(冻干)。在另外一个实施例中,液体溶液可在环境温度下干燥或冷冻干燥。应当理解液体溶液无需完全干燥;它可部分干燥,尤其当使用非水性溶剂时。以下情况是足够的:测试试剂沉积使得它保留在原位之后,它被物理固定。如果使用甘油糊剂,将测试试剂固定后可仍存在一些液体,如在一些药剂和制备用于稳定贮存的其他材料中。相同过程可对于圆壁和平壁孔两者使用。微板的倾斜位置可在沉积步骤期间通过使用支持工具例如支架或支撑物得到维持。

[0054] 在另一个实施例中,微板可为旋转的并且沉积步骤可对于微板的后续边缘重复,使得另外的测试试剂沉积到后续侧壁部分上。在另一个方法实施例中,包含内毒素检测试剂的至少一种测试试剂可存在于每一个孔中。在另一个方法实施例中,至少一种测试试剂包含内毒素标准物。在另外一个方法实施例中,内毒素标准物可以多个浓度存在,其中每个浓度存在于不同孔中。在另外一个方法实施例中,微板还可包括孔标识机构。

[0055] 测试试剂沉积的许多方法可用于减少混合时间、气泡形成、再溶解时间、易于制造和检测灵敏度。该方法可包括化学和物理方法两者以产生所需结果。化学方法可包括使用化学添加剂。化学添加剂的例子包括溶解度增强剂,例如糖类蔗糖、葡萄糖和甘露醇,以及防剥落剂,例如包含聚(环氧乙烷)、羟丙基纤维素或羟丙基甲基纤维素的水性聚合物溶液或设计为防止降解的试剂(例如右旋糖和多种糖类例如乳糖和海藻糖)。物理方法可包括在沉积过程期间的多种涂覆、喷射或干燥技术。

[0056] 在一些实施例中,检测试剂可沉积在每一个孔中。作为另外一种选择,在孔的任一个中均不存在检测试剂,从而允许用户加入来自优选供应商的检测试剂。在一个实施例中,检测试剂可为变形细胞裂解物。还可利用LAL的天然吸收或者浊度或生色非LAL反应示踪剂对LAL和内毒素的添加来用于减少测试错误。

[0057] LAL反应标准物可沉积在孔的仅一部分中。另外,多个孔可预装载有或预沉积有在其中具有不同浓度的LAL反应物质的LAL反应标准物,使得用户仅需要将待测试的样品加入孔中。在一个实施例中,检测试剂和LAL反应物质可沉积到孔中,使得USP 85要求的全部测试和重复可通过添加样品来简单执行。在此类实施例中,每个孔包含分开的给定测试或给定测试的重复。在一个实施例中,最低浓度可在四个重复中加以证实,其中96孔中的4个各自包含一个重复。作为另外一种选择,孔可预装载有LAL反应标准物,使得可执行抑制/增强测试(或“掺料”),包括重复。作为另外一种选择,孔可预装载为使得可执行在其中定量给定样品中的细菌内毒素浓度的定量测试。在另外一个实施例中,孔可预装载为使得USP 85下要求的所有测试和重复,包括裂解物灵敏度、抑制/增强和定量测试可在相同微板上执行。相似概念可对于任何测试基板或测试基板的任何部分采用,并且并不限于具有孔的微板。

[0058] 在一个实施例中,孔可用密封工具例如粘合标签进行覆盖,所述粘合标签仅在孔开口外部的标签部分上具有粘合剂。密封工具可由阻隔材料制成,所述阻隔材料阻止水和

氧的通过,由此孔可保持干燥至小于约5%的湿度水平。

[0059] 公开的方法可用于将LAL试剂、生色试剂和内毒素预沉积到预清洁(不含内毒素)的96或384孔微板中。在液体溶液中的测试试剂可置于孔的壁上,或光学孔的光学窗口表面上。液体溶液还可包含化学添加剂例如溶解度增强剂和防剥落剂。公开的方法允许试剂沉积到标准96或384孔微板的壁上,而不干扰光学窗口或光路,由此允许初始样品吸收测量。

[0060] 在另一个实施例中,本发明公开了测试基板,其中测试基板的至少一部分已预装载有至少一种测试试剂。测试基板适合于液体的光学监控和用于执行内毒素或葡聚糖的LAL测定。

[0061] LAL测定的试剂可在测试基板的区段中隔离。测试基板可为一次性使用的。测试基板可具有多种形式、几何学和形状,包括典型的微板形状。其他合适形式包括但不限于卡、液筒或盘。测试基板还可配置为使得样品和流体可加入其中。测试基板还允许当测试基板振荡、涡旋、自旋或旋转时样品混合。测试基板还允许液体的光学监控。

[0062] 测试基板可用于执行分析功能,例如但不限于测量样品(伴随添加的其为内毒素或葡聚糖掺料的阳性产物对照),测量水空白(不含内毒素或LAL试剂),测量一系列至少三种校正溶液。此外,测试基板可用于执行以两个或更多个一式两份列出的全部分析功能。

[0063] 测试基板可与光学仪器或阅读器一起使用,所述光学仪器或阅读器测量在光学吸收状态之间的时间或在时间之间的光学吸收变化。预装载的测试基板还可用于证实试剂和分析器满足规范,对至样品中的内毒素或葡聚糖浓度的转换进行校正,验证性能或者满足正式纲要或光学仪器制造商的规范,以及测量被分析的样品。

[0064] 测试基板可由任何合适材料制成。在另一个实施例中,测试基板的一部分可涂覆有聚合物材料、表面处理或涂层,以满足正式纲要或测试试剂制造商的规范。在另外一个实施例中,测试基板的一部分可涂覆有静态涂层,以减少LAL试剂或标准物丧失。测试基板的另一个部分可涂覆有微板孔的动态涂层,以减少LAL试剂或标准物丧失。动态涂层还可与标准物或试剂混合。

[0065] 测试基板的一部分可涂覆有添加剂,以帮助或调节测试试剂或样品材料的适当分析和相互作用。示例性添加剂包括但不限于溶解度助剂、运输助剂和稳定剂。

[0066] 在另外一个实施例中,测试基板可包括机械阻隔件分开试剂,以阻止当它们在测试基板中隔离或长期贮存时的相互作用。阻隔件可为不溶性的,并且排列为使得它们不干扰光学测量。其他阻隔件可为一定程度可溶的,使得它们在测量期间溶解且不干扰测量。

[0067] 在另外一个实施例中,测试基板可预装载有标准物和由对照标准内毒素(CSE)或参考标准内毒素制备的掺料。掺料可作为干燥材料贮存,使得它们处于正确浓度,同时不稀释或干扰被掺料的样品。

[0068] 实例

[0069] 下述实例证实其中内毒素标准物预装载到测试基板上的实施例。内毒素标准物范围在表1中显示。然而,内毒素标准物范围在其他实施例中可不同。

[0070] 表1

[0071]

范围 (EU/mL)	最低 (EU/mL)	中间范围 (EU/mL)	最高 (EU/mL)
0.005-0.5	0.005	0.05	0.5

0.01-1	0.01	0.1	1
0.05-5	0.05	0.5	5
0.1-10	0.1	1	10
0.5-50	0.5	5	50

[0072] 表2是预装载的测试基板的描述,其中测试基板具有96个部分。第1列指示测试基板的部分。第2列指示操作者必须加入测试基板中的样品。测试基板的每个部分可预装载有如第3列中所示的不同内毒素标准物浓度。第4列是可在每个部分中完成的BET测试的描述。内毒素检测试剂在表2中未显示,因为所有96个部分均可预装载有相同量的内毒素检测试剂。作为另外一种选择,测试基板可不具有任何内毒素检测试剂,从而允许操作者加入来自优选供应商的内毒素检测试剂。

[0073] 表2

[0074]

第1列 基板部分	第2列 样品	第3列 内毒素标准物	第4列 描述
1	用于BET的水	0	阴性对照（空白）重复1
2	用于BET的水	0	阴性对照（空白）重复2
3	用于BET的水	0	阴性对照（空白）重复3
4	用于BET的水	最低	最低检测范围校正标准物重复1
5	用于BET的水	最低	最低检测范围校正标准物重复2
6	用于BET的水	最低	最低检测范围校正标准物重复3
7	用于BET的水	中间范围	中间范围校正标准物重复1
8	用于BET的水	中间范围	中间范围校正标准物重复2
9	用于BET的水	中间范围	中间范围校正标准物重复3
10	用于BET的水	最高	最高检测范围校正标准物重复1
11	用于BET的水	最高	最高检测范围校正标准物重复2
12	用于BET的水	最高	最高检测范围校正标准物重复3
13	样品A	0	样品A分析重复1
14	样品A	0	样品A分析重复2
15	样品A	中间范围	用于样品A重复1的阳性对照掺料
16	样品A	中间范围	用于样品A重复2的阳性对照掺料
17	样品B	0	样品B分析重复1
18	样品B	0	样品B分析重复2
19	样品B	中间范围	用于样品B重复1的阳性对照掺料
20	样品B	中间范围	用于样品B重复2的阳性对照掺料
21	样品C	0	样品C分析重复1
22	样品C	0	样品C分析重复2
23	样品C	中间范围	用于样品C重复1的阳性对照掺料
24	样品C	中间范围	用于样品C重复2的阳性对照掺料
25	样品D	0	样品D分析重复1
26	样品D	0	样品D分析重复2
27	样品D	中间范围	用于样品D重复1的阳性对照掺料

[0075]

第1列 基板部分	第2列 样品	第3列 内毒素标准	第4列 描述
28	样品D	中间范围	用于样品D重复2的阳性对照掺料
29	样品E	0	样品E分析重复1
30	样品E	0	样品E分析重复2
31	样品E	中间范围	用于样品E重复1的阳性对照掺料
32	样品E	中间范围	用于样品E重复2的阳性对照掺料
33	样品F	0	样品F分析重复1
34	样品F	0	样品F分析重复2
35	样品F	中间范围	用于样品F重复1的阳性对照掺料
36	样品F	中间范围	用于样品F重复2的阳性对照掺料
37	样品G	0	样品G分析重复1
38	样品G	0	样品G分析重复2
39	样品G	中间范围	用于样品G重复1的阳性对照掺料
40	样品G	中间范围	用于样品G重复2的阳性对照掺料
41	样品H	0	样品H分析重复1
42	样品H	0	样品H分析重复2
43	样品H	中间范围	用于样品H重复1的阳性对照掺料
44	样品H	中间范围	用于样品H重复2的阳性对照掺料
45	样品I	0	样品I分析重复1
46	样品I	0	样品I分析重复2
47	样品I	中间范围	用于样品I重复1的阳性对照掺料
48	样品I	中间范围	用于样品I重复2的阳性对照掺料
49	样品J	0	样品J分析重复1
50	样品J	0	样品J分析重复2
51	样品J	中间范围	用于样品J重复1的阳性对照掺料
52	样品J	中间范围	用于样品J重复2的阳性对照掺料
53	样品K	0	样品K分析重复1
54	样品K	0	样品K分析重复2
55	样品K	中间范围	用于样品K重复1的阳性对照掺料

[0076]

第1列 基板部分	第2列 样品	第3列 内毒素标准 物	第4列 描述
56	样品K	中间范围	用于样品K重复2的阳性对照掺料
57	样品L	0	样品L分析重复1
58	样品L	0	样品L分析重复2
59	样品L	中间范围	用于样品L重复1的阳性对照掺料
60	样品L	中间范围	用于样品L重复2的阳性对照掺料
61	样品M	0	样品M分析重复1
62	样品M	0	样品M分析重复2
63	样品M	中间范围	用于样品M重复1的阳性对照掺料
64	样品M	中间范围	用于样品M重复2的阳性对照掺料
65	样品N	0	样品N分析重复1
66	样品N	0	样品N分析重复2
67	样品N	中间范围	用于样品N重复1的阳性对照掺料
68	样品N	中间范围	用于样品N重复2的阳性对照掺料
69	样品O	0	样品O分析重复1
70	样品O	0	样品O分析重复2
71	样品O	中间范围	用于样品O重复1的阳性对照掺料
72	样品O	中间范围	用于样品O重复2的阳性对照掺料
73	样品P	0	样品P分析重复1
74	样品P	0	样品P分析重复2
75	样品P	中间范围	用于样品P重复1的阳性对照掺料
76	样品P	中间范围	用于样品P重复2的阳性对照掺料
77	样品Q	0	样品Q分析重复1
78	样品Q	0	样品Q分析重复2
79	样品Q	中间范围	用于样品Q重复1的阳性对照掺料
80	样品Q	中间范围	用于样品Q重复2的阳性对照掺料
81	样品R	0	样品R分析重复1
82	样品R	0	样品R分析重复2
83	样品R	中间范围	用于样品R重复1的阳性对照掺料

[0077]

第1列 基板部分	第2列 样品	第3列 内毒素标准物	第4列 描述
84	样品R	中间范围	用于样品R重复2的阳性对照掺料
85	样品S	0	样品S分析重复1
86	样品S	0	样品S分析重复2
87	样品S	中间范围	用于样品S重复1的阳性对照掺料
88	样品S	中间范围	用于样品S重复2的阳性对照掺料
89	样品T	0	样品T分析重复1
90	样品T	0	样品T分析重复2
91	样品T	中间范围	用于样品T重复1的阳性对照掺料
92	样品T	中间范围	用于样品T重复2的阳性对照掺料
93	样品U	0	样品U分析重复1
94	样品U	0	样品U分析重复2
95	样品U	中间范围	用于样品U重复1的阳性对照掺料
96	样品U	中间范围	用于样品U重复2的阳性对照掺料

[0078] 该书面说明书使用例子包括最佳模式来公开本发明,并且还允许本领域任何技术人员实施本发明,包括制备且使用任何装置或系统且执行任何引入的方法。本发明的专利范围通过权利要求限定,并且可包括本领域技术人员想到的其他例子。例如,存在沉积试剂而不混合LAL和内毒素且引起过早反应的许多其他方法。如果此类其他方法具有并非不同于权利要求的文字语言的结构元件,或如果它们包括与权利要求的文字语言具有非实质差异的等价结构元件,则它们预期在权利要求的范围内。

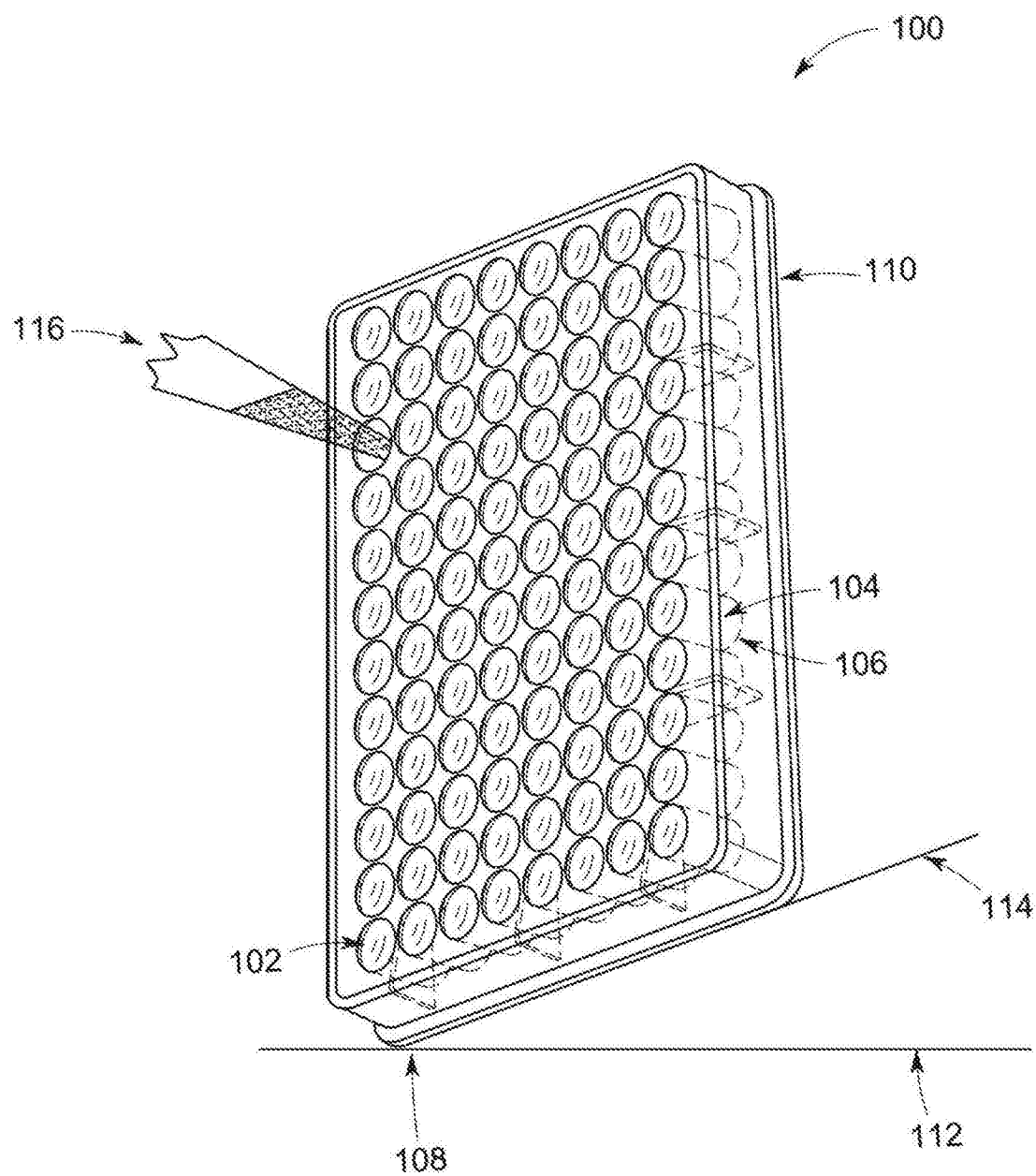


图1