



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103513025 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201210210733. 9

(22) 申请日 2012. 06. 21

(71) 申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200040 上海市乌鲁木齐中路 12 号

申请人 复旦大学

(72) 发明人 孙鹏 张云鹏 杨武利 张旭瑞

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所 (普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

胃癌靶向量子点及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属纳米生物材料领域, 涉及胃癌靶向量子点及其制备方法和在肿瘤检测中的应用, 本发明采用 CdTe 近红外量子点为显像材料, 与胃癌单克隆抗体 CC49 结合, 制成能够特异性结合胃癌细胞并荧光成像的免疫荧光探针。本发明利用量子点在生物体内具有良好的生物相容性, 能够随循环系统运行, 制得靶向量子点对胃癌细胞进行免疫荧光成像, 并将进一步检测在胃癌动物模型的肿瘤转移部位与肿瘤细胞结合, 激发后发射荧光, 使肿瘤细胞显像, 从而达到肿瘤检测的目的。本发明的靶向量子点基于其生物体毒性较小, 具有潜在的临床应用价值。

1. 一种胃癌细胞免疫荧光探针,其特征在于,由 CdTe 近红外量子点为显像材料,与胃癌单克隆抗体 CC49 接合,制成免疫荧光探针。

2. 按权利要求 1 所述的胃癌细胞免疫荧光探针,其特征在于,所述的胃癌细胞单克隆抗体 CC49 与 CdTe 近红外量子点按 4 : 1 的比例接合。

3. 按权利要求 1 所述的胃癌细胞免疫荧光探针制备方法,其特征是,通过下述方法和步骤:

1) 制备近红外 CdTe 量子点

首先制备 NaHTe 溶液:将  $\text{NaBH}_4$  溶于去离子水中,冰浴状态下通平稳氮气流 30min,除去溶液中的氧气,然后加入碲粉 (Te),继续通入氮气,制成淡紫色 NaHTe 溶液;

其次制备  $\text{CdCl}_2$ -MPA 溶液:2mmol  $\text{CdCl}_2$  加入去离子水中,加入 3.6mmol MPA,用 2mol/L NaOH 调溶液 pH 值至 9;

最后制备 CdTe 量子点:NaHTe 溶液与  $\text{CdCl}_2$ -MPA 溶液混合后搅拌,将此前躯体溶液加入到反应釜中,放入 185°C 烘箱中反应,粗产物用乙醇沉淀洗涤后,40°C 真空烘干备用;

2) 制备胃癌肿瘤细胞靶向量子点

在 CdTe 量子点水溶液中加入 EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的水溶液,室温反应,反应液中 CdTe : EDC : NHS = 1 : 100 : 100;半小时后加入抗体 IgG,反应液中 CdTe : 抗体 = 1 : 4,继续反应后停止,用超滤管 (100k) 离心分离,产物分散在 PBS, pH = 7.4 的溶液中,冰箱保存。

4. 权利要求 1 的胃癌细胞免疫荧光探针在制备胃癌细胞免疫荧光成像制剂中的应用。

5. 权利要求 1 的胃癌细胞免疫荧光探针在制备检测肿瘤试剂盒中的用途。

6. 按权利要求 5 所述的用途,所述的肿瘤是胃癌。

## 胃癌靶向量子点及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米生物材料领域,涉及胃癌靶向量子点及其制备方法和在肿瘤检测中的应用,尤其涉及一种胃癌免疫荧光探针及其制备方法和在胃癌细胞荧光成像中的应用。

### 背景技术

[0002] 据报道,近 50 年来全世界胃癌的发病率有了一定程度的下降,但其仍然是一种严重危害人类健康的疾病。在各种癌症中,胃癌发病率高居第四位,在日本、韩国、朝鲜、中国等亚洲国家甚至高达 0.080%;其死亡率则居第二位,仅次于肺癌,达 85%。目前,外科手术治疗是临床治疗胃癌的重要手段。但是临床实践胃癌手术中的肿瘤转移淋巴结的清扫均是“盲目”进行的,其中,不论是西方学者主张的 D1 淋巴清扫手术(即手术中切除原发病灶及周围足够范围的正常胃壁,并清扫第一站淋巴结),还是日本学者主张的 D2 淋巴清扫手术(即术中结扎血管后将相应区域的淋巴结彻底清除),或者 D3 淋巴结清扫术(清除包括肝十二指肠韧带、肠系膜上动脉、腹主动脉旁、甚至膈肌及纵膈淋巴结)都只是对规定区域的淋巴结进行清扫,并不能根据病人的个体化差异,明确地对肿瘤转移淋巴结进行清除,由此,淋巴结的过度清扫或残留时有发生。因而肿瘤细胞的追踪显像成为了胃癌手术中淋巴结清扫术的关键。鉴于上述临床实践中存在的问题,对探索一种能够在人体内追踪标记胃癌细胞的标记探针提出了迫切的需求。

[0003] 现有技术对胃癌细胞的显像研究中使用较多的显像材料有传统的有机染料和放射性同位素等,但是传统的生物活体染料(如 2% 专利蓝染料、1% 异硫蓝染料等)或放射性同位素(如 99m 钨标记的锡胶体或硫胶体等)在活体肿瘤显像应用中都存在着很大的缺陷,如在标记活体淋巴结时颜色很难辨别、一旦染料外渗则很难看清染色的淋巴结、有较高的假阴性率等;而放射性同位素因其存在穿透效应(shine-through effect),可导致发光淋巴结与同位素注射处组织互相混淆,且同位素对医生和病人均存在放射性损害。

[0004] 纳米晶体荧光标记材料量子点又称半导体量子点或半导体纳米微晶体,其具有独特的光学特性。斯托克位移(Stoke's shift)为激发波长和发射波长峰值的差值,斯托克位移较大可以避免发射谱与激发谱的重叠,从而提高在免疫荧光检测的灵敏度。有机荧光染料斯托克位移较小,检测时发射光易与激发光光谱范围发生重叠,导致检测假阳性率增高,而近红外量子点光谱范围窄(约为有机染料光谱 1/3),增加了其斯托克位移(约为 200-300nm),提高了在应用过程中的灵敏度。有机染料发射光谱通常位于 450-550 之间,在此范围内,生物医学标本如胶原蛋白、卟啉、黄素等通常有很强的自发荧光背景,所以标记荧光通常被强的组织自发荧光所淹没,在生物荧光成像的应用中有很多限制。有研究开始关注近红外量子点在动物体内的分布,将单纯的量子点注射后观察其动物体内循环系统中的移行和各器官中的分布,但迄今尚未见有关近红外量子点修饰后其对肿瘤细胞的追踪和显像的报道,尤其未涉及胃癌领域。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种胃癌靶向量子点及其制备方法,具体涉及一种能够与胃腺癌细胞发生特异性结合的靶向量子点及其制备方法。尤其涉及一种胃癌免疫荧光探针及其制备方法。

[0006] 本发明的进一步目的是提供所述的胃癌靶向量子点在肿瘤检测中的应用,尤其是用于胃癌动物模型中肿瘤细胞转移淋巴结的显像。

[0007] 本发明提供了能够与胃癌细胞发生特异性结合并对其免疫荧光成像的靶向量子点,对胃癌细胞在体外成像的能力进行了描述,结果显示其对胃癌细胞免疫荧光显像的效果良好,具有在胃癌动物模型中进行胃癌细胞转移淋巴结显像的前景。

[0008] 本发明利用量子点在生物体内具有良好的生物相容性,能够随循环系统运行的特点,采用近红外纳米量子点为载体,结合胃癌肿瘤细胞单克隆抗体 CC49,制成胃癌肿瘤细胞靶向量子点探针,在体外对肿瘤细胞进行荧光标记,确定该探针可以与胃癌细胞发生特异性结合。

[0009] 更具体的,本发明采用 CdTe 近红外量子点为显像材料,与胃癌单克隆抗体 CC49 结合,制成能够特异性结合胃癌细胞并荧光成像的免疫荧光探针。

[0010] 本发明中,胃癌细胞单克隆抗体 CC49 和 CdTe 近红外量子点按 4:1 的比例接合。

[0011] 本发明中,所述的 CC49 抗体是能够特异性识别胃癌细胞表面抗原 TAG-72 的单克隆抗体;胃癌细胞表面抗原 TAG-72 是一种高分子糖蛋白,分子量介于 220KD 和 400KD 之间,表达于多种恶性肿瘤细胞表面或胞内,如卵巢癌,肺癌,结肠癌,乳腺癌,在胃癌人群中的表达率高达 75%。

[0012] 本发明中的胃癌靶向量子点可通过抗原抗体反应,与胃癌细胞发生结合,通过量子点的激发荧光达到胃癌细胞免疫荧光成像的目的。

[0013] 更具体的,本发明提供了一种胃癌免疫荧光探针,其通过下述方法和步骤制备,

[0014] 1) 制备近红外 CdTe 量子点

[0015] 首先制备 NaHTe 溶液:将 NaBH<sub>4</sub> 溶于去离子水中,冰浴状态下通平稳氮气流 30min,除去溶液中的氧气,然后加入碲粉 (Te),继续通入氮气,制成淡紫色 NaHTe 溶液;

[0016] 其次制备 CdCl<sub>2</sub>-MPA 溶液:2mmol CdCl<sub>2</sub> 加入去离子水中,加入 3.6mmol MPA,用 2mol/L NaOH 调溶液 pH 值至 9;

[0017] 最后制备 CdTe 量子点:NaHTe 溶液与 CdCl<sub>2</sub>-MPA 溶液混合后搅拌,将此前躯体溶液加入到反应釜中,放入 185℃烘箱中反应,粗产物用乙醇沉淀洗涤后,40℃真空烘干备用;

[0018] (2) 制备胃癌肿瘤细胞靶向量子点

[0019] 在 CdTe 量子点水溶液中加入 EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的水溶液,室温反应,反应液中 CdTe : EDC : NHS = 1 : 100 : 100;半小时后加入抗体 IgG,反应液中 CdTe : 抗体 = 1 : 4,继续反应后停止,用超滤管 (100k) 离心分离,产物分散在 PBS (pH = 7.4) 溶液中,冰箱保存;

[0020] 本发明进行了量子点和靶向量子点的电镜下成像及光谱分析,

[0021] 将制得的量子点和靶向量子点去离子水稀释后滴于铜网支持的碳膜上,待溶剂挥发后,电镜调至工作电压 200kV 工作模式 stem mode 进行观察,获得量子点和靶向量子点的

电镜下图像。

[0022] 量子点和靶向量子点的稀释产物用 spectrofluorimeter 在激发波长 450nm 的激发光下,以 1nm 为最小间隔记录 550nm 到 800nm 的发射光光强度制作光谱曲线。

[0023] 本发明的进一步提供所述的胃癌靶向量子点在肿瘤检测中的应用,本发明的实施例中用于胃癌细胞免疫荧光成像,

[0024] MGC80-3 胃癌肿瘤细胞细胞传代于 4 块孔底带有玻片的六孔板中,标记为 1,2,3,4 号,1 号为空白组,作为阴性对照,2 号为靶向量子点组,3 号为纯量子点组,4 号为荧光二抗标记组,作为阳性对照组。四组均用 4% 的多聚甲醛固定,后用 10% 的小牛血清封闭 30min。后 1 号加入 1mlPBS 作为对照,2 号加入靶向量子点 1ml,3 号加入相同浓度量子点 1ml,4 号加入一抗 1ml。4 组均置于 37. C 温箱中孵育 2h,后 1,2,3 组加入 DAPI 对细胞核进行染色,荧光显微镜下对 1,2,3 组进行观察。4 组 PBS 清洗后,加入显示荧光二抗 1ml,PBS 1 : 500 稀释,37. C 温箱中孵育 1h,后 DAPI 染色,荧光显微镜下观察,获得四组免疫荧光图片,其结果显示 :场发射扫描透射电镜观察显示量子点直径为 2. 241-4. 914nm,平均为 3. 468nm,靶向单个量子点直径为 3. 304-5. 652nm,平均为 3. 716nm,二者直径差值为 0. 248nm。靶向量子点制作后会出现多个靶向量子点发生聚集,形成大小不一的量子点簇的现象,直径约为 7. 692-55. 769nm,平均 23. 763nm。

[0025] 光谱分析中,以光强度为纵坐标,发射光波长为横坐标将光谱分析数据进行分析并分别作出了量子点和靶向量子点的光谱曲线,结果显示量子点发射光波长位于 620-780nm 之间,波峰在 680nm 左右,而靶向量子点发射光波长位于 600-800nm 之间,波峰在 710nm 左右。

[0026] 实验结果显示,本发明制得的靶向量子点能够与胃癌细胞发生特异性结合,在荧光显微镜下可以看到清晰的细胞荧光图像,而单纯的近红外量子点并不能与肿瘤细胞结合,在荧光显微镜下不能对细胞进行荧光成像。

[0027] 本发明的胃癌细胞免疫荧光探针可用于制备胃癌细胞免疫荧光成像制剂。或进一步制备检测肿瘤的试剂盒,尤其是检测胃癌的试剂盒。

[0028] 本发明的胃癌肿瘤细胞靶向量子点探针毒性小,具有良好的生物相容性,可以与胃癌细胞发生特异性结合,并进行免疫荧光显像。本发明可以用于胃癌肿瘤细胞的免疫荧光成像,对通过淋巴循环对活体动物模型中的转移肿瘤细胞进行定位从而为标记肿瘤转移淋巴结提供了理论依据。

[0029] 本发明具备的优点有,

[0030] 1,本发明中的近红外量子点发射光波长位于近红外区 (650-900nm),不仅克服了有机荧光染料的缺点,而且在该光谱范围内,水和红细胞的吸光度最小,动物体内环境对发射光的吸收、减弱程度最小,量子点发射光的光强度大,荧光成像更加清晰。

[0031] 2,本发明采用水相合成法制作的量子点具有很好的水溶性,而且用于动物体内不会发生排斥反应,有利于其在肿瘤应该标记中的进一步应用。

[0032] 3,本发明的靶向量子点光强度强 (比有机染料强 1000 倍),散射少,在免疫荧光的应用中具有独特的优势。

附图说明 :

[0033] 图 1 为场发射扫描透射电镜下的量子点及靶向量子点图片,其中 A 为量子点图片, B、C 为靶向量子点图片。

[0034] 图 2 为量子点及靶向量子点的光谱分析曲线,蓝色为量子点光谱曲线,红色为靶向量子点光谱曲线。

[0035] 图 3 为量子点及靶向量子点荧光成像图,横行中,1 为空白对照组,2 为靶向量子点组,3 为阴性对照组,4 为阳性对照组,纵列中 A 为光学显微镜下成像, B 为荧光显微镜下成像, C 为细胞核成像, D 为 B、C 的合成图片。

### 具体实施方式:

[0036] 实施例 1

[0037] 制备近红外 CdTe 量子点

[0038] 首先制备 NaHTe 溶液:100mg NaBH<sub>4</sub> 溶于 20ml 去离子水中,冰浴状态下通平稳氮气流 30min,以除去溶液中的氧气,然后迅速加入 127mg 碲粉,继续通入氮气,制成淡紫色 NaHTe 溶液。其次制作 CdCl<sub>2</sub>-MPA 溶液:366.6mg(2mmol)CdCl<sub>2</sub> 加入 100ml 去离子水中,然后加入 382.1mg(3.6mmol)MPA,用 2mol/L NaOH 将溶液 pH 值调至 9。最后一步为制作 CdTe 量子点:1ml NaHTe 溶液与 20ml CdCl<sub>2</sub>-MPA 溶液混合后迅速搅拌,然后将此前躯体溶液 9ml 加入到反应釜中,放入 185℃烘箱中反应一段时间,粗产物用乙醇沉淀洗涤 3 次,放入 40℃真空烘箱中烘干备用。

[0039] 制备胃癌细胞靶向量子点

[0040] 13.5 μl EDC、13.5 μl NHS 和 50 μl 实施方式 1 中制作的量子点溶液混合,室温下摇床上摇动 30min,加入 594 μl CC49 胃癌单克隆抗体,反应液中 CdTe : antibody = 1 : 4,常温下反应 2h,用 100k 超滤管离心分离三次后,将产物重新分散在 PBS(pH = 7.4) 溶液中。放入冰箱保存。

[0041] 量子点和靶向量子点的场发射透射电镜下成像及光谱分析

[0042] 电镜成像:将制作的量子点和靶向量子点去离子水稀释后滴于铜网支持的碳膜上,待溶剂完全挥发后,电镜调至工作电压 200kV 工作模式 stem mode 进行观察,获得量子点和靶向量子点的电镜下图像。光谱分析:量子点和靶向量子点的稀释产物用 spectrofluorimeter 在激发波长 450nm 的激发光下激发,窄缝宽度为 1nm,以 1nm 为最小间隔记录 550nm 到 800nm 的发射光光强度制作光谱曲线。

[0043] 胃癌细胞免疫荧光成像

[0044] MGC80-3 胃癌肿瘤细胞细胞传代于 4 块孔底带有玻片的六孔板中,标记为 1,2,3,4 号,1 号为空白组,作为阴性对照,2 号为靶向量子点组,3 号为纯量子点组,4 号为荧光二抗标记组,作为阳性对照组,四组均在 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,细胞长满后,吸除培养基, PBS 清洗两次,4%的多聚甲醛固定 15min, PBS 清洗三次,每次 5min,10%的小牛血清封闭 30min, PBS 清洗三次,每次 5min。后 1 号每孔加入 1ml PBS,2 号加入靶向量子点 1ml,3 号加入相同浓度量子点 1ml,4 号加入一抗 1ml, PBS 1 : 500 稀释。4 组均置于 37. C 温箱中孵育 2h,后 1,2,3 组加入 DAPI 对细胞核进行染色 5min,后 PBS 清洗 3 次,每次,5min,荧光显微镜下对 1,2,3 组进行观察。4 组 PBS 清洗 3 次,每次 3 分钟,加入荧光二抗 1ml, PBS 1 : 500 稀释,37. C 温箱中孵育 1h,后 DAPI 染色, PBS 清洗三次,每次三分钟,荧光显微镜下观察。共

获得四组免疫荧光图片 (A 为光镜下成像, B 为荧光显微镜下成像, C 为细胞核荧光染色图像, D 为 B、C 的合成图像)。

[0045] 本发明分别在光镜下和荧光显微镜下对空白组 (1 号), 靶向量子点组 (2 号), 量子点组 (3 号) 和荧光二抗组 (4 号) 进行了观察。空白组光镜下细胞染色非常浅, 几乎不可辨, 荧光显微镜下无细胞影像, DAPI 染色后在紫外波长激发光激发下可见染色的细胞核。靶向量子点组光镜下即可见深染的细胞图像, 荧光显微镜下也可以看到高亮度的细胞荧光显像, DAPI 染色可以看见细胞核荧光显像, 两张图片合成后可见细胞核位置和高亮度的细胞位置重合。未嫁接抗体的单纯量子点组光镜下很难辨别细胞, 荧光显微镜下细胞影像略微可见, DAPI 染色可清楚分辨细胞核的位置, 合成后可见细胞核影像与模糊的细胞影像重合。

[0046] 本发明中采用的阳性对照组是发射光波长位于 FITC 区间的荧光二抗进行细胞标记, 光镜下可以看到模糊的细胞影像, 荧光显微镜 FITC 模式下可以看到高亮度的清晰的细胞影像, DAPI 染色可以看见清晰的细胞核染色图, 图片合成后可以看到细胞荧光成像和细胞核成像位置重合。实验结果显示, 本发明制得的靶向量子点能够与胃癌细胞发生特异性结合, 在荧光显微镜下可以看到清晰的细胞荧光图像, 而单纯的近红外量子点并不能与肿瘤细胞结合, 在荧光显微镜下不能对细胞进行荧光成像。

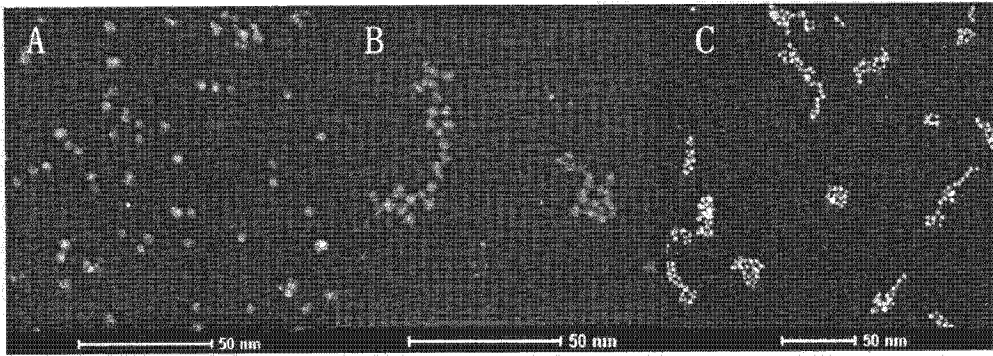


图 1

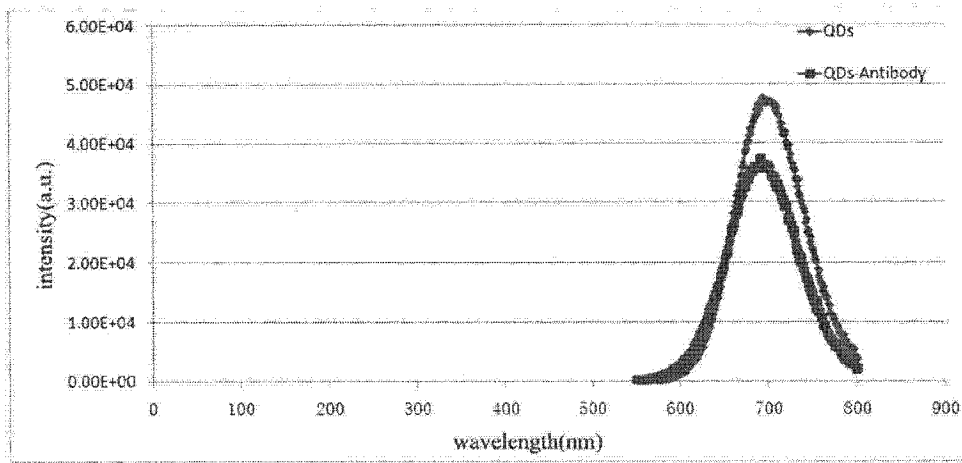


图 2

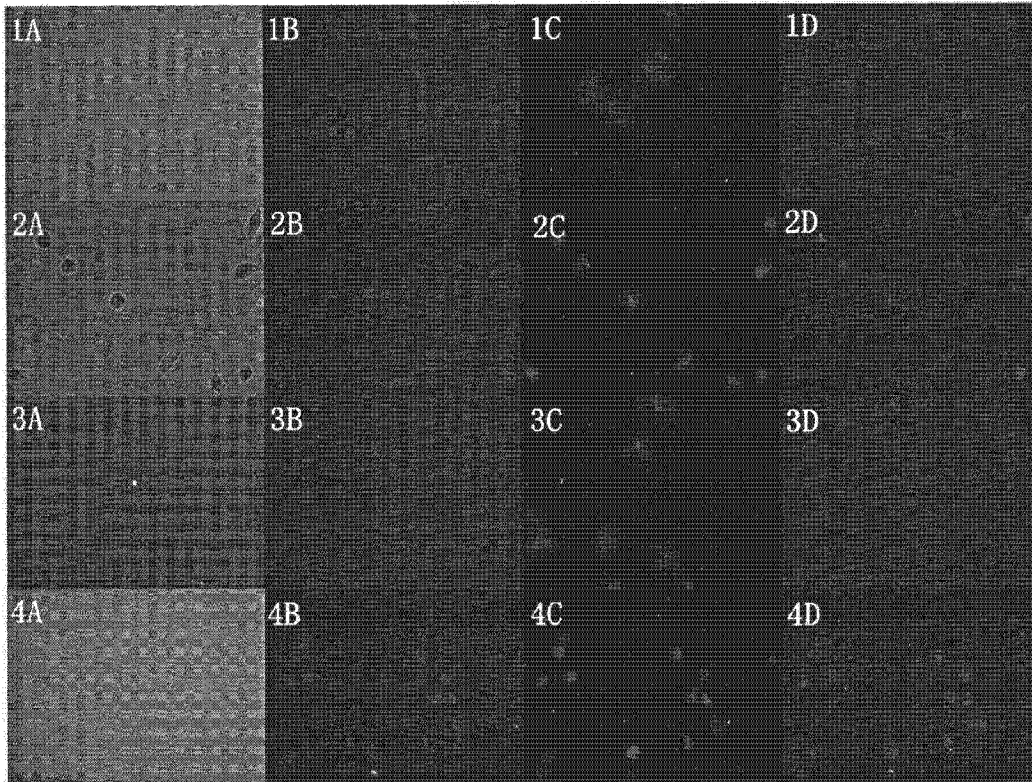


图 3

专利名称(译)	胃癌靶向量子点及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103513025A</a>	公开(公告)日	2014-01-15
申请号	CN201210210733.9	申请日	2012-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 复旦大学		
[标]发明人	孙鹏 张云鹏 杨武利 张旭瑞		
发明人	孙鹏 张云鹏 杨武利 张旭瑞		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57446 G01N33/588 G01N2800/7028		
代理人(译)	吴桂琴		
其他公开文献	CN103513025B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属纳米生物材料领域，涉及胃癌靶向量子点及其制备方法和在肿瘤检测中的应用，本发明采用CdTe近红外量子点为显像材料，与胃癌单克隆抗体CC49结合，制成能够特异性结合胃癌细胞并荧光成像的免疫荧光探针。本发明利用量子点在生物体内具有良好的生物相容性，能够随循环系统运行，制得靶向量子点对胃癌细胞进行免疫荧光成像，并将进一步检测在胃癌动物模型的肿瘤转移部位与肿瘤细胞结合，激发后发射荧光，使肿瘤细胞显像，从而达到肿瘤检测的目的。本发明的靶向量子点基于其生物体毒性较小，具有潜在的临床应用价值。

