



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689114 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780054108.0

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(22)申请日 2017.07.04

代理人 李新红 王旭

(30)优先权数据

62/358,326 2016.07.05 US

15/637,890 2017.06.29 US

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

B82Y 15/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2017/051968 2017.07.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/007800 EN 2018.01.11

(71)申请人 纳米技术有限公司

地址 英国曼彻斯特

(72)发明人 伊马德·纳萨尼

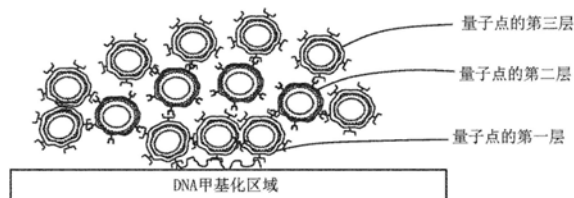
权利要求书2页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

配体偶联的量子点纳米颗粒和使用它们检测DNA甲基化的方法

(57)摘要

本公开涉及偶联量子点纳米颗粒、制备这种偶联量子点纳米颗粒的方法,以及使用这种偶联量子点纳米颗粒检测DNA甲基化的方法。在一个实施方案中,量子点与识别甲基化DNA碱基的抗体(例如抗5-甲基胞嘧啶抗体、抗5-羟甲基胞嘧啶抗体、抗5-甲酰基胞嘧啶抗体、抗5-羧基胞嘧啶抗体或抗N6-甲基腺嘌呤抗体)偶联。



1. 一种纳米颗粒偶联物,其特征在于纳米颗粒与DNA甲基化特异性结合配体连接。
2. 根据权利要求1所述的纳米颗粒偶联物,其特征在于所述纳米颗粒通过酰胺键与DNA甲基化特异性结合配体共价连接。
3. 一种纳米颗粒偶联物,其特征在于所述纳米颗粒是包含核半导体材料和外层的量子点,其中所述外层包含与甲基化特异性结合配体连接的官能化有机涂层。
4. 根据权利要求3所述的配体纳米颗粒偶联物,其特征在于所述甲基化特异性结合配体与5-甲基胞嘧啶和/或5-羟甲基胞嘧啶特异性结合。
5. 根据权利要求4所述的配体纳米颗粒偶联物,其特征在于所述甲基化特异性结合配体选自抗5-甲基胞嘧啶抗体、抗5-羟甲基胞嘧啶抗体、抗5-甲酰基胞嘧啶抗体、抗5-羧基胞嘧啶抗体、抗-N6-甲基腺嘌呤抗体及其任何组合。
6. 根据权利要求5所述的配体纳米颗粒偶联物,其特征在于所述甲基化特异性结合配体是抗5-甲基胞嘧啶抗体。
7. 根据权利要求6所述的配体纳米颗粒偶联物,其特征在于所述纳米颗粒包含II-VI族材料、III-V族材料,或I-III-VI族材料,或其任何合金。
8. 根据权利要求7所述的配体纳米颗粒偶联物,其特征在于还包含细胞摄取增强剂、组织渗透增强剂,或其组合。
9. 一种制备配体纳米颗粒偶联物的方法,其特征在于包括将纳米颗粒与DNA甲基化特异性结合配体偶联,其中所述纳米颗粒包含含有核半导体材料的量子点和外层,其中所述外层包含羧基。
10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于还包括纯化所述DNA甲基化特异性结合配体纳米颗粒偶联物。
11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于还包括分离所述DNA甲基化特异性结合配体纳米颗粒偶联物。
12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于所述偶联步骤在偶联剂存在下进行。
13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于所述偶联剂是1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。
14. 一种DNA甲基化的检测方法,包括
  - i) 使权利要求1所述的配体-纳米颗粒偶联物与甲基化DNA区域接触;
  - ii) 用光源激发所述配体-纳米颗粒偶联物;和
  - iii) 检测所述配体-纳米颗粒偶联物的光发射或光吸收。
15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于所述样品是固定的组织样品或在细胞培养物中培养的活细胞中的样品。
16. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于所述检测是实时执行的。
17. 根据权利要求16所述的方法,其特征在于所述检测信号被放大。
18. 根据权利要求1所述的配体纳米颗粒偶联物作为免疫测定试剂的用途,用于DNA样品的甲基化区域的检测。
19. 根据权利要求18所述的用途,其特征在于所述样品是固定的组织样品或在细胞培养物中培养的活细胞中的样品。

20. 根据权利要求18所述的用途,其特征在於所述检测是实时进行的。

## 配体偶联的量子点纳米颗粒和使用它们检测DNA甲基化的方法

### 技术领域

[0001] 本文公开的实施方案涉及与配体偶联的量子点纳米颗粒,特别是与甲基化特异性结合配体偶联的量子点纳米颗粒。实施方案还包括制备这种偶联的量子点纳米颗粒的方法,以及使用这种偶联的量子点纳米颗粒检测DNA甲基化的方法。

### 背景技术

[0002] DNA甲基化是细胞用于控制基因表达的表观遗传过程,并且在正常和疾病生物学中具有重要功能。通过例如衰老和疾病改变DNA甲基化可导致不规则甲基化,其可导致哺乳动物中的许多复杂疾病,例如心脏病、糖尿病、神经系统疾病,和癌症。参见,例如,Okhov-Mitsel et al.,*Cancer Medicine*,237-260,2012Review。例如,DNA甲基化通过沉默肿瘤抑制基因而促成致癌作用。参见,例如,Jones et al.,*Nat.Rev.Genet.*,3,415-428,2002。

[0003] 目前用于检测DNA甲基化的方法是耗时的并且需要多个耗时的步骤,包括进行聚合酶链反应(PCR)和测序。参见,例如,Okhov-Mitsel et al.,*Cancer Medicine*,237-260,2012Review。此外,由于常规荧光染料产生的弱信号和缺乏信号放大方法,特异性抗甲基化DNA抗体的可用性未能简化检测过程。此外,已知的分析方法缺乏可靠性,并且受探针设计和杂交效率和伪影所限制。参见,上述援引。其结果是,难以实现异常DNA甲基化的检测,这限制了对特定疾病,例如癌症,中DNA甲基化的作用和模式的理解。参见,Suzuki et al.,*Asian Pac.J.Cancer Prev.*,2006Apr-Jun;7(2):177-185。

[0004] 需要检测DNA甲基化的新方法,例如,用于体内和体外监测老化、致癌作用、衰老,和其它细胞活动。

### 发明内容

[0005] 所公开的实施方案包括通过酰胺、酯、硫酯或硫醇锚定基团直接在量子点纳米颗粒的无机表面上,或在用于使纳米颗粒具有水溶性和生物相容性的有机冠层上与配体,例如甲基化特异性结合配体,键合(例如,共价键合或物理键合(通过离子配对或范德瓦尔斯相互作用))的量子点纳米颗粒。这样的实施方案可用于例如实时检测DNA甲基化。

[0006] 在一个实施方案中,量子点纳米颗粒与甲基化特异性结合配体连接。量子点纳米颗粒可以与甲基化特异性结合配体共价连接。共价键可以通过酰胺、酯、硫酯或硫醇锚定基团直接在量子点纳米颗粒的无机表面上,或间接地在用于使纳米颗粒具有水溶性的有机冠层上。在一些实施方案中,水溶性量子点纳米颗粒包括一种半导体材料的核和在一些实施方案中的至少一层包含不同半导体材料的壳,而在其他实施方案中,水溶性量子点纳米颗粒包括合金半导体材料,其具有通过组分渐变合金化向外增加的带隙值。

[0007] 在某些实施方案中,所述光响应量子点(QD)包括具有配体相互作用剂和表面改性配体的水溶性QD纳米颗粒。可以通过在包含六甲氧基甲基三聚氰胺的溶液中将所述配体相互作用剂和所述表面修饰配体化学加成到所述QD来形成所述水溶性QD纳米颗粒。在特定实

实施方案中,所述配体相互作用剂是C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>脂肪酸及其酯,而所述表面改性配体是单甲氧基聚环氧乙烷。

[0008] 在某些实施方案中,所述水溶性纳米颗粒包括能够结合甲基化特异性结合配体的封端配体。在某些实施方案中,所述封端配体选自:硫醇、羧基、胺、磷化氢、氧化膦、膦酸、次膦酸、咪唑、OH、硫醚和杯芳烃基团。

[0009] 在一个实施方案中,所述纳米颗粒通过酰胺键与所述甲基化特异性结合配体共价连接。

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供一种配体纳米颗粒偶联物,其包含:包含核半导体材料、官能化有机涂层,和外层的量子点,其中所述外层包含甲基化特异性结合配体。

[0011] 在一个实施方案中,所述甲基化特异性结合配体是可以与甲基化的DNA碱基结合(例如,特异性结合)的配体(例如合成配体)。甲基化的DNA碱基包括甲基化的胞嘧啶,例如5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶,和/或5-羧基胞嘧啶。甲基化腺嘌呤包括N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤。

[0012] 所述甲基化特异性结合配体可以基于抗体、适体、肽或其他合成配体。合适的甲基化特异性结合配体包括,但不限于,抗5-甲基胞嘧啶抗体、抗5-羟甲基胞嘧啶抗体、抗5-甲酰基胞嘧啶抗体、抗5-羧基胞嘧啶抗体和/或抗-N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤。在一个实施方案中,所述甲基化特异性结合配体是抗5-甲基胞嘧啶抗体,例如,由diagenode销售的5-mC单克隆抗体33D3(目录号C1520)或其等同物。在一个实施方案中,所述甲基化特异性结合配体可包括抗5-羟甲基胞嘧啶抗体,例如,由ThermoFisher以目录号MA5-24695、MA5-23525、PA5-60876、PA5-40097,和/或PA5-24476销售的RM236、317和HMCES多克隆抗体。在另一个实施方案中,所述甲基化特异性结合配体可包括抗5-甲酰基胞嘧啶抗体,例如,由EMD Millipore公司以目录号MABE1092销售的EDL FC-5。在另一个实施方案中,所述甲基化特异性结合配体可包括抗5-羧基胞嘧啶抗体,例如,由GeneTex销售的5-caC抗体(目录号GTX60801)。

[0013] 另一方面,本发明提供了制备根据本文所述任何实施方案的配体纳米颗粒偶联物的方法。在一个实施方案中,方法包括:i)将量子点纳米颗粒与甲基化特异性结合配体偶联,得到配体-纳米颗粒偶联物,其中纳米颗粒包括由核半导体材料和外层组成的量子点,其中外层包含羧基。

[0014] 在一个实施方案中,偶联步骤在偶联剂存在下进行。在一个实施方案中,偶联步骤i)包括(a)使外层中的羧基与碳二亚胺接头反应以活化羧基,和b)使活化的羧基与甲基化特异性结合配体反应(例如,与配体上具有的胺末端)。优选地,偶联剂是1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。

[0015] 在另外的实施方案中,方法还包括:ii)纯化配体纳米颗粒偶联物。在另外的实施方案中,方法还包括:iii)分离配体纳米颗粒偶联物。在一个实施方案中,方法包括步骤i)、ii)和iii)。

[0016] 在本文所述的任何配体纳米颗粒偶联物的一个实施方案中,纳米颗粒包含II-VI族材料,III-V族材料,或I-III-IV族材料或其任何合金。

[0017] 在另外的实施方案中,本文描述的任何配体-纳米颗粒偶联物是荧光配体-纳米颗粒偶联物。

[0018] 在另外的实施方案中,本文所述的任何配体-纳米颗粒偶联物还包含细胞摄取增

强剂、组织渗透增强剂,或其组合。细胞摄取增强剂的例子包括反式激活转录激活因子(TAT)、Arg-Gly-Asp (RGD) 三肽,或聚精氨酸肽。配体-纳米颗粒偶联物可以进一步包含其他已知的试剂,例如皂苷、阳离子脂质体或链球菌溶血素O,其可以增强细胞摄取。

[0019] 在另一个实施方案中,提供了例如实时检测DNA甲基化的方法。在一个实施方案中,方法包括i)使根据本文所述任何实施方案的配体纳米颗粒偶联物与甲基化DNA区域接触(如人类或动物DNA样本),和ii)检测纳米颗粒偶联物的光发射或光吸收。在实施方案的另一个方面,量子点纳米颗粒用光源激发。

[0020] 在一个实施方案中,样品是固定的组织样品。在另一个实施方案中,样品处于细胞培养物中培养的活细胞中。在另一个实施方案中,将配体-纳米颗粒偶联物引入活组织。在另一个实施方案中,将配体-纳米颗粒偶联物引入哺乳动物中以实时监测DNA甲基化。

[0021] 另一方面,本发明提供了根据本文所述任何实施方案的配体-纳米颗粒偶联物作为免疫测定中的试剂用于检测DNA样品(例如固定的组织样品或在细胞培养物中培养的活细胞中的样品)的甲基化/甲基化区域的用途。

[0022] 在本文所述的任何方法和/或用途的一个实施方案中,检测信号被扩增,例如,通过将根据本文所述的任何实施方案的配体-纳米颗粒偶联物的一个或多个附加层添加至甲基化DNA区域。

[0023] 在本文所述的任何方法和/或用途的一个实施方案中,在体内监测DNA甲基化并用于实时成像。

## 附图说明

[0024] 图1描绘了根据一个实施方案使用三层量子点纳米颗粒的甲基化DNA区域的示例性检测示意图。

[0025] 图2描绘了水溶性量子点的产生的一个实施方案。

## 具体实施方式

[0026] 本文公开了与甲基化DNA特异性结合配体偶联的量子点(QD),其具有在通过QD导致光子发射的条件下刺激QD时被检测的能力。本文还公开了某些实施方案,其提供具有高安全性和生物相容性特征并且与DNA甲基化特异性配体偶联的量子点(QD)纳米颗粒。在某些实施方案中,QD被设计为生物相容的、无毒的、荧光量子点(QD)纳米颗粒的偶联物。

[0027] 缩写:在本申请中使用以下缩写:

[0028] DCC 二环己基碳二亚胺

[0029] DCM 二氯甲烷

[0030] DIC 二异丙基碳二亚胺

[0031] EDC 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐

[0032] HMMM 六甲氧基甲基三聚氰胺

[0033] In (MA)<sub>3</sub> 肉豆蔻酸铟

[0034] QD 量子点

[0035] sulfo-NHS N-羟基琥珀酰亚胺的磺基衍生物

[0036] SMCC 琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯

[0037] (TMS)<sub>3</sub>P 三(三甲基甲硅烷基)磷

[0038] 为了便于理解本发明,并且为了避免在解释本文的权利要求时存在疑问,下面定义了许多术语。本文定义的术语具有本领域普通技术人员在与本发明相关的领域中通常理解的含义。除非在权利要求中概述,否则用于描述本发明的特定实施例的术语不限制本发明。

[0039] 除非明确地如此定义,否则诸如一、一个和所述的术语目的不在指代单数实体,而是包括可以用于说明的特定示例的一般种类。当在权利要求和/或说明书中与包括结合使用时,术语一或一个的使用可以表示一个,但也可以与一个或多个、至少一个和/或一个或多个一致。

[0040] 权利要求中术语或的使用用于表示和/或,除非明确指出将替代方案视为相互排斥。因此,除非另有说明,否则一组备选中的术语或表示所述组成员中的任何一个或组合。此外,除非明确指出将备选方案视为相互排斥,否则短语A、B和/或C表示具有单独的元素A、单独的元素B、单独的元素C,或A、B和C的任何组合的实施方案。

[0041] 类似地,为避免疑问,除非另有明确说明将备选方案视为相互排斥,否则短语至少一个与项目列表相结合,意味着所述列表中的单个项目或所述项目的任何组合。例如,除非另有定义,否则短语A、B和C中的至少一个表示A、B、C中的至少一个,或A、B和C的任何组合。因此,除非另外定义,否则所述短语要求所列项目中的一个或多个,并且不一定不是全部。

[0042] 术语包括(及其任何形式,例如包括和包括),具有(及其任何形式,例如具有和具有),包括(及其任何形式,例如包括和包括)或包含(及其任何形式,例如包含和包含)是包容性的或开放式的,并且不排除另外的、未列举的元素或方法步骤。

[0043] 在说明书和权利要求书中使用的术语有效意味着足以提供或实现期望的、期待的,或预期的结果。

[0044] 术语约或近似被定义为接近本领域普通技术人员理解的,并且在一个非限制性实施方案中,所述术语定义为在10%内、5%内、1%内,并且在某些方面在0.5%以内。

[0045] 在某些实施方案中,甲基化DNA特异性结合配体是识别甲基化DNA碱基的抗体。如本文所用,术语抗体包括完整的免疫球蛋白分子及其部分、片段和衍生物,例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fsc、CDR区,或能够结合抗原或表位的抗体的任何部分,包括双特异性嵌合抗体或将源自抗体的抗原结合结构域与另一种多肽结合。术语抗体包括单克隆抗体(mAb)、嵌合抗体、人源化抗体,以及通过任何已知技术提供的其片段、部分、区域或衍生物,包括但不限于,酶促切割和重组技术。如本文所用的术语抗体还包括单结构域抗体(sdAb)及其片段,其具有重链抗体的单个单体可变抗体结构域(V<sub>H</sub>)。缺乏可变轻链(V<sub>L</sub>)和恒定轻链(C<sub>L</sub>)结构域的sdAb天然存在于骆驼科动物(V<sub>H</sub>H)和软骨鱼(V<sub>N</sub>AR)中,并且有时被制药公司Ablynx称为纳米抗体,该公司最初开发出在美洲驼中特异性抗原结合的sdAb。修饰语单克隆表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0046] 在其他实施方案中,甲基化DNA特异性结合配体是识别甲基化DNA碱基的适体。适体是结构上不同的RNA或DNA寡核苷酸(ODNs),其可以模拟蛋白质结合分子并且基于其独特的二级三维结构构象而不是通过成对核酸结合而表现出高(nM)结合亲和力。可通过高通量体外方法选择适体以结合靶分子。适体通常约为抗体分子量的1/10,并且提供复杂的三级

折叠结构,其具有足够的识别表面积以与抗体竞争。

[0047] QD是具有独特光学性质的荧光半导体纳米颗粒。QD表示特定的非常小尺寸形式的半导体材料,其中颗粒的尺寸和形状导致光激发的量子力学效应。通常,较大的QD(例如半径为56nm)将发出较长波长的橙色或红色发射颜色,较小的QD(例如半径为23nm)发出较短波长的蓝色和绿色,尽管具体的颜色和尺寸取决于所述QD的组成。量子点比任何常规荧光染料(如吲哚菁绿(ICG))的亮度提高约20倍,并且其光稳定性高出许多倍。重要的是,由于QD的化学性质和纳米尺寸,QD停留时间较长。QD可以吸收和发射更强的光强度。在某些实施方案中,QD可配备有多于一种的结合标签,形成双特异性或三特异性纳米装置。QD的所述独特属性使得几种医疗应用能够满足未被满足的需求。

[0048] 在本文提供的实施方案中,QD被官能化以呈现亲水外层或冠,其允许在水性环境中使用QD,例如在活细胞中的体内和体外应用。这种QD被称为水溶性QD。

[0049] 在一个实施方案中,QD可以是表面配备有能够偶联的功能(COOH、OH、NH<sub>2</sub>、SH、叠氮化物、炔烃)。在一个示例性实施方案中,水溶性无毒QD是羧基官能化的或变成羧基官能化的。例如,COOH-QD可以使用碳二亚胺连接技术使用水溶性1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)与靶向抗体的胺末端连接。将羧基官能化的QD与EDC混合以形成活性O-酰基异脲中间体,然后通过来自反应混合物中单克隆抗体上的伯氨基的亲核攻击而置换。如果需要,在与含伯胺抗体的反应过程中加入N-羟基琥珀酰亚胺的磺基衍生物(sulfo-NHS)。加入sulfo-NHS后,EDC将NHS与羧基偶联,形成比O-酰基异脲中间体更稳定的NHS酯,同时允许在生理pH下与伯胺有效结合。在任一情况下,结果是QD和抗体之间的共价键。也可以使用其他化学反应如Suzuki-Miyaura交叉偶联、(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)(SMCC),或基于醛的反应。

[0050] 合成核和核-壳纳米颗粒的方法公开在例如共同拥有的美国专利号7,867,556、7,867,557、7,803,423、7,588,828,和6,379,635中。每个上述专利的内容通过引用整体并入本文。美国专利号9,115,097、8,062,703、7,985,446、7,803,423,和7,588,828,以及美国公开号2010/0283005、2014/0264196、2014/0277297,和2014/0370690,其全部内容通过引用并入本文,描述生产大量高质量单分散量子点的方法。

[0051] 在一个实施方案中,利用核/壳颗粒,其具有至少一种半导体组合物的中心区域或核心,半导体组合物埋入或涂覆有明显不同的半导体组合物的一个或多个外层或壳。作为一个例子,核可以由In、P、Zn和S的合金组成,例如通过实施例1的描述形成,包括在ZnS分子簇上分子接种镉基QD,然后形成ZnS的壳。

[0052] 在其他实施方案中,所用的水溶性QD纳米颗粒包含具有带隙值或能量( $E_g$ )的合金半导体材料,其通过组分渐变合金化而向外增加,代替产生核/壳QD。带隙能量( $E_g$ )是将电子从基态价能带激发到空导带能带所需的最小能量。

[0053] 所述渐变合金QD组合物被认为在元素组成中从颗粒中心处或附近渐变到QD的最外表面,而不是形成为由离散壳层覆盖的离散核心。一个例子是In<sub>1-x</sub>P<sub>1-y</sub>Zn<sub>x</sub>S<sub>y</sub>,渐变合金QD,其中x和y从QD的中心到表面逐渐从0增加到1。在这样的示例中,QD的带隙将逐渐从纯InP朝向中心变化到表面上纯ZnS的较大带隙值的带隙。尽管所述带隙取决于粒径,但是ZnS的带隙比磷化镉的带隙宽,使得渐变合金的带隙将从QD的内部逐渐增加到表面。

[0054] 一锅合成方法可用作本文实施例1中的分子接种方法的改进。这可以通过逐渐减

少加入到反应溶液中的肉豆蔻酸铟和  $(\text{TMS})_3\text{P}$  的量来维持颗粒生长,同时在例如用于产生实施例1的核颗粒的方法中加入增量的锌和硫前体来实现。因此,在一个实施例中,将二丁基酯和饱和脂肪酸置于反应烧瓶中并加热脱气。引入氮气并升高温度。在搅拌下加入分子簇,例如  $\text{ZnS}$  分子簇  $[\text{Et}_3\text{NH}]_4[\text{Zn}_{10}\text{S}_4(\text{SPh})_{16}]$ 。随着渐变方案添加渐变合金前体溶液,温度增加,渐变方案包括添加逐渐降低浓度的第一半导体材料和逐渐增加浓度的第二半导体材料。例如,渐变方案可以开始添加肉豆蔻酸铟  $(\text{In}(\text{MA})_3)$  和溶解在二羧酸酯(例如二正丁基癸二酸酯)中的三甲基甲硅烷基膦  $(\text{TMS})_3\text{P}$ ,其中加入的  $\text{In}(\text{MA})_3$  和  $(\text{TMS})_3\text{P}$  的量,随着时间逐渐减少,用逐渐增加浓度的硫和锌化合物如  $(\text{TMS})_2\text{S}$  和乙酸锌代替。随着  $\text{In}(\text{MA})_3$  和  $(\text{TMS})_3\text{P}$  的添加量减少,逐渐增量的溶解在饱和脂肪酸(例如肉豆蔻酸或油酸)中的  $(\text{TMS})_2\text{S}$  和二羧酸酯(例如癸二酸二正丁酯)与乙酸锌一起加入。以下反应将导致  $\text{ZnS}$  化合物的产生增加。随着添加的继续,形成所需尺寸的 QD 颗粒,其发射最大值在波长上逐渐增加,其中  $\text{InP}$  和  $\text{ZnS}$  的浓度以最高浓度的  $\text{InP}$  朝向 QD 颗粒的中心和最高浓度的  $\text{ZnS}$  在 QD 颗粒的外部渐变。当获得所需的发射最大值时,停止进一步添加反应,并使得到的梯度合金颗粒退火,然后通过沉淀和洗涤分离颗粒。

[0055] 纳米颗粒与介质的相容性以及纳米颗粒对聚集、光氧化和/或猝灭的敏感性主要由纳米颗粒的表面组成介导。关于任何核、核-壳或核-多壳纳米颗粒中的最终无机表面原子的配位可能是不完全的,在表面上具有高度反应性的悬空键,这可导致颗粒聚集。通过使用保护性有机基团钝化(封端)裸表面原子来克服所述问题,有机基团在本文中称为封端配体或封端剂。颗粒的封端或钝化防止颗粒聚集发生,但也保护颗粒免受其周围化学环境的影响,并且在核材料的情况下为颗粒提供电子稳定化(钝化)。封端配体可以是但不限于与颗粒的最外层无机层的表面金属原子结合的路易斯碱。封端配体的性质很大程度上决定了纳米颗粒与特定介质的相容性。可根据所需特征选择封端配体。可以使用的封端配体的类型包括硫醇基、羧基、胺、膦、氧化膦、磷酸、次磷酸、咪唑、OH、硫醚和杯芳烃基团。除杯芳烃外,所有这些封端配体都具有头基,其可以形成颗粒表面上的封端配体的锚定中心。封端配体的主体可以是直链、环状或芳香族。封端配体本身可以是大的、小的、低聚的或多齿的。配体主体的性质和未结合到颗粒上的突出侧一起决定配体是亲水的、疏水的、两亲的、阳性的、阴性的还是两性离子的。

[0056] 在许多量子点材料中,封端配体是疏水的(例如,烷基硫醇、脂肪酸、烷基膦、烷基氧化膦等)。因此,在纳米颗粒的合成和分离之后,纳米颗粒通常分散在疏水性溶剂中,例如甲苯。这种封端的纳米颗粒通常不能在更具极性的介质中分散。如果需要对 QD 进行表面改性,则最广泛使用的方法称为配体交换。随后可以在核心合成和/或脱壳过程中与纳米颗粒表面配位的亲脂性配体分子与极性/带电配体化合物交换。另一种表面改性策略是将极性/带电分子或聚合物分子与已经与纳米颗粒表面配位的配体分子插入。然而,虽然某些配体交换和插入程序使纳米颗粒与水性介质更相容,但它们可导致比相应的未改性纳米颗粒具有更低量子产率(quantum yield, QY)和/或显著更大尺寸的材料。

[0057] 对于体内和体外目的,如果不需要,具有低毒性特征的 QD 是理想的。因此,出于某些目的,量子点纳米颗粒优选基本上不含有毒性重金属,例如镉、铅和砷(例如,含有小于 5 重量%、例如小于 4 重量%、小于 3 重量%、小于 2 重量%、小于 1 重量%、小于 0.5 重量%、小于 0.1 重量%、小于 0.05 重量%,或小于 0.01 重量%的重金属如镉、铅和砷)或不含重金属,如

镉、铅和砷。在一个实施方案中,提供了缺乏重金属如镉、铅和砷的降低的毒性QD。

[0058] QD的独特性质使得几种潜在的医学应用成为可能,包括活细胞中未被满足的体外和体内诊断。关于QD的医学应用的主要问题之一是大多数研究都集中在含有有毒重金属(如镉、铅或砷)的QD上。本文所述的生物相容性和水溶性无重金属QD可安全地用于体外和体内的医学应用。在某些实施方案中,提供体内相容的水分散性无镉QD,其具有10-20nm的流体动力学尺寸(在完整IgG2抗体的尺寸范围内)。在一个实施方案中,体内相容的水分散性无镉QD根据本文实施例1和2中所述的程序制备。在某些实施方案中,体内相容的水分散性无镉QD是羧基官能化的并且用配体结合部分进一步衍生化。

[0059] 不含镉、铅和砷的纳米颗粒的实例包括包含半导体材料的纳米颗粒,例如ZnS, ZnSe, ZnTe, InP, InSb, AlP, AlS, AlSb, GaN, GaP, GaSb, PbS, PbSe, AgInS<sub>2</sub>, CuInS<sub>2</sub>, Si, Ge及其合金和掺杂衍生物,特别是包含这些材料之一的核和这些材料中的另一种的一种或多种壳的纳米颗粒。

[0060] 在某些实施方案中,对无毒QD纳米颗粒进行表面改性以使其具有水溶性并具有允许通过将它们暴露于配体相互作用剂以实现配体相互作用剂与QD表面的关联而衍生化的表面部分。配体相互作用剂可包含链部分和对连接/交联剂具有特定亲和力或与其反应的官能团,如下所述。链部分可以是例如烷烃链。官能团的实例包括亲核试剂,例如硫代基团、羟基、甲酰胺基团、酯基团,和羧基。配体相互作用剂可以包含或不包含对QD表面具有亲和力的部分。这些部分的实例包括硫醇、胺、羧基,和膦。如果配体相互作用基团不包含这样的部分,则配体相互作用基团可以通过嵌入封端配体与纳米颗粒的表面关联。配体相互作用剂的实例包括C<sub>8-20</sub>脂肪酸及其酯,例如肉豆蔻酸异丙酯。

[0061] 应当注意,配体相互作用剂可以简单地因用于合成纳米颗粒的方法结合QD纳米颗粒,从而不需要将纳米颗粒暴露于额外量的配体相互作用剂。在这种情况下,可能不需要将其他配体相互作用剂与纳米颗粒结合。或者,或另外,在合成和分离纳米颗粒之后,可以将QD纳米颗粒暴露于配体相互作用剂。例如,可以将纳米颗粒在含有配体相互作用剂的溶液中温育一段时间。这种温育或一部分温育期可以处于升高的温度,以促进配体相互作用剂与纳米颗粒表面的结合。在配体相互作用剂与纳米颗粒表面结合后,QD纳米颗粒暴露于连接/交联剂和表面改性配体。连接/交联剂包括对配体相互作用剂的基团和表面改性配体具有特定亲和力的官能团。配体相互作用剂-纳米颗粒关联复合物可以依次暴露于连接/交联剂和表面改性配体。例如,纳米颗粒可以暴露于连接/交联剂一段时间以实现交联,然后暴露于表面改性配体以将其掺入纳米颗粒的配体壳中。或者,纳米颗粒可以暴露于连接/交联剂和表面改性配体的混合物,从而实现交联并在单个步骤中掺入表面改性配体。

[0062] 在一个实施方案中,在分子簇化合物存在下,在其中保持分子簇的完整性并充当明确定义的预制种子或模板以提供与化学前体反应的成核中心的条件下提供量子点前体,以生产供工业应用足够大规模的高质量纳米颗粒。

[0063] 然而,所公开的方法不限于分子簇方法。制备所述量子点的其他方法包括例如双注射方法、水基方法、热注射方法,和接种方法。

[0064] 适用于本发明的量子点纳米颗粒的类型包括,但不限于,包含以下类型的核心材料(包括其任何组合或合金):

[0065] IIA-VIB(2-16)材料,包含元素周期表第2族的第一元素和元素周期表第16族的第

二元素,还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于:MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, 和BaTe。

[0066] II-V族材料包含元素周期表第12族的第一元素和元素周期表第15族的第二元素,还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于: $Zn_3P_2$ ,  $Zn_3As_2$ ,  $Cd_3P_2$ ,  $Cd_3As_2$ ,  $Cd_3N_2$ , 和 $Zn_3N_2$ 。

[0067] II-VI族材料包含元素周期表第12族的第一元素和元素周期表第16族的第二元素,还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于:CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, ZnO, HgS, HgSe, HgTe, CdSeS, CdSeTe, CdSTe, ZnSeS, ZnSeTe, ZnSTe, HgSeS, HgSeTe, HgSTe, CdZnS, CdZnSe, CdZnTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, HgZnS, HgZnSe, HgZnTe, CdZnSeS, CdZnSeTe, CdHgSeS, CdHgSeTe, CdHgSTe, HgZnSeS, 和HgZnSeTe。

[0068] III-V族材料包含元素周期表第13族的第一元素和元素周期表第15族的第二元素,还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于:BP, AlP, AlAs, AlSb, GaN, GaP, GaAs, GaSb, InN, InP, InAs, InSb, AlN, 和BN。

[0069] III-IV族材料包含元素周期表第13族的第一元素和元素周期表第14族的第二元素,还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于: $B_4C$ ,  $Al_4C_3$ ,  $Ga_4C$ , Si, 和SiC。

[0070] III-VI族材料包含元素周期表第13族的第一元素和元素周期表第16族的第二元素,还包括三元和四元材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于: $Al_2S_3$ ,  $Al_2Se_3$ ,  $Al_2Te_3$ ,  $Ga_2S_3$ ,  $Ga_2Se_3$ , GeTe,  $In_2S_3$ ,  $In_2Se_3$ ,  $Ga_2Te_3$ ,  $In_2Te_3$ , 和InTe。

[0071] IV-VI族材料包含元素周期表第14族的第一元素和元素周期表第16族的第二元素,还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于:PbS, PbSe, PbTe,  $Sb_2Te_3$ , SnS, SnSe, 和SnTe。

[0072] 纳米颗粒材料包含来自元素周期表的过渡金属中的任何族的第一元素,和来自周期表的第16族的第二元素,并且还包括三元和四元材料和掺杂材料。合适的纳米颗粒材料包括,但不限于:NiS, CrS, AgS, 和I-III-VI族材料,例如,  $CuInS_2$ ,  $CuInSe_2$ ,  $CuGaS_2$ , 和  $AgInS_2$ 。

[0073] 在一个优选的实施方案中,纳米颗粒材料包含II-VI族材料、III-V族材料、I-III-VI族材料,以及其任何合金或掺杂衍生物。

[0074] 出于说明书和权利要求的目的,术语掺杂纳米颗粒是指上述纳米颗粒和包含一种或多种主要族或稀土元素的掺杂剂,其通常是过渡金属或稀土元素,例如但不限于锌硫化物与锰,如掺杂 $Mn^{2+}$ 的ZnS纳米颗粒。

[0075] 在一个实施方案中,量子点纳米颗粒基本上不含重金属,如镉(例如,含有小于5重量%,例如小于4重量%、小于3重量%、小于2重量%、小于1重量%、小于0.5重量%、小于0.1重量%、小于0.05重量%,或小于0.01重量%的重金属,如镉)或不含重金属,如镉。

[0076] 对于体内应用,优选不含重金属的半导体纳米颗粒,例如In基量子点,例如InP及其掺杂或合金衍生物。

[0077] 在一个实施方案中,本文所述的任何纳米颗粒包括第一层,第一层包括在纳米颗粒核上提供的第一半导体材料。可以在第一层上提供包括第二半导体材料的第二层。量子点纳米颗粒与甲基化特异性结合配体连接(例如,共价)。共价键可以通过酰胺、酯、硫酯、硫

酯,或硫醇锚定基团直接在量子点纳米颗粒的无机表面上。在一个实施方案中,纳米颗粒通过酰胺键与甲基化特异性结合配体共价连接。

[0078] 以下合成步骤可用于偶联。连接体可用于在纳米颗粒上的羧基官能团和甲基化特异性结合配体上的胺端基之间形成酰胺基团。可以使用已知的连接体,例如直接在量子点纳米颗粒的无机表面上的硫醇锚定基团。可以采用标准的耦合条件,并且对于本领域普通技术人员来说是已知的。例如,合适的偶联剂包括,但不限于,碳二亚胺,例如二环己基碳二亚胺(DCC),二异丙基碳二亚胺(DIC),和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)。在一个实施方案中,偶联剂是EDC。

[0079] 在一个例子中,带有羧基端基的量子点纳米颗粒和甲基化特异性结合配体可以在溶剂中混合。可以向混合物中加入偶联剂,例如EDC。可以温育反应混合物。粗甲基化特异性结合配体纳米颗粒偶联物可以进行纯化。

[0080] 可以使用标准固态纯化方法。可能需要进行几次过滤和用合适溶剂洗涤的循环以除去过量的未反应的甲基化特异性结合配体和/或EDC。

[0081] 在所述任何方法和/或用途的一个实施方案中,可以在亚硫酸氢盐改性和使用量子点荧光共振能量转移(MS-qFRET)的PCR扩增后检测DNA甲基化。参见,例如,Bailey et al.,*Genome Res.*,19,1455-1461,2009。

[0082] 为了公开的完整性,包括以下实施例,并说明制备本发明组合物和复合物的方法以及呈现组合物的某些特征。这些实施例绝对不是要限制本公开的范围或教导。

[0083] 实施例1

[0084] 无毒量子点的合成

[0085] 分子接种过程用于产生无毒的量子点(QD)。简言之,如下进行在500-700nm范围内发射的非官能化镉基量子点的制备:将二丁基酯(约100ml)和肉豆蔻酸(MA)(10.06g)置于三颈烧瓶,在约70°C下真空脱气1小时。此后,引入氮气并将温度升至约90°C。加入约4.7g的ZnS分子簇 $[Et_3NH]_4[Zn_{10}S_4(SPh)_{16}]$ ,并将混合物搅拌约45分钟。然后将温度升至约100°C,接着逐滴加入In(MA)<sub>3</sub>(1M,15ml),接着加入三甲基甲硅烷基膦(TMS)<sub>3</sub>P(1M,15ml)。搅拌反应混合物,同时将温度升至约140°C。在140°C下,进一步逐滴添加溶于二-正-丁基癸二酸酯的肉豆蔻酸镉(In(MA)<sub>3</sub>)(1M,35ml)(搅拌5分钟)和溶解于二-正-丁基癸二酸酯的(TMS)<sub>3</sub>P(1M,35ml)。然后将温度缓慢升至180°C,再滴加In(MA)<sub>3</sub>(1M,55ml),然后加入(TMS)<sub>3</sub>P(1M,40ml)。通过以这种方式添加前体,形成发射最大值从500nm逐渐增加到720nm的镉基颗粒。当获得所需的发射最大值时停止反应并在反应温度下搅拌半小时。在此期间之后,使混合物退火最多约4天(在比反应低约-20-40°C的温度下)。在此阶段还使用UV灯来辅助退火。

[0086] 通过套管技术加入干燥的脱气甲醇(约200ml)分离颗粒。使沉淀物沉降,然后借助滤棒通过套管除去甲醇。加入干燥的脱气氯仿(约10ml)以洗涤固体。将固体在真空下干燥1天。过程导致在ZnS分子簇上形成镉基纳米颗粒。在进一步的处理中,通过在稀氢氟酸(HF)中洗涤,进一步提高了所得镉基纳米颗粒的量子产率。镉基芯材料的量子效率范围为约25%-50%。此组合物被认为是包含In、P、Zn和S的合金结构。

[0087] ZnS壳的生长:将20ml部分的HF蚀刻的镉基核颗粒在三颈烧瓶中干燥。加入1.3g肉豆蔻酸和20ml癸二酸二正丁酯并脱气30分钟。将溶液加热至200°C,逐滴加入2ml 1M(TMS)<sub>2</sub>S(以7.93ml/h的速率)。加完后,将溶液静置2分钟,然后加入1.2g无水乙酸锌。将溶液在

200℃保持1小时,然后冷却至室温。通过加入40ml无水脱气甲醇分离所得颗粒并离心。弃去上清液,向剩余的固体中加入30ml无水脱气的己烷。使溶液静置5小时,然后再次离心。收集上清液,弃去剩余的固体。最终的非官能化镉基纳米颗粒材料的量子效率在有机溶剂中为约60%-90%。

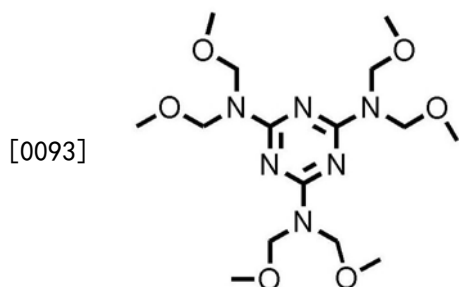
[0088] 实施例2

[0089] 水溶性表面改性QD

[0090] 本文提供了用于产生和使用三聚氰胺六甲氧基甲基三聚氰胺 (HMMM) 改性的荧光纳米颗粒作为药物递送载体的方法的一个实施方案。独特的三聚氰胺基涂料具有出色的生物相容性、低毒性和非常低的非特异性结合。这些独特的功能允许在体外和体内广泛的生物医学应用。

[0091] 制备合适的水溶性纳米颗粒的一个实例提供如下:200mg在608nm红色发射的无镉量子点纳米颗粒作为芯材料,将含有镉和磷的合金与实施例1中所述的含Zn壳一起分散在含有肉豆蔻酸异丙酯(100微升)的甲苯(1ml)中。包含肉豆蔻酸异丙酯作为配体相互作用剂。将混合物在50℃加热约1-2分钟,然后在室温下缓慢振荡15小时。将含有六甲氧基甲基三聚氰胺(HMMM)(CYMEL 303,购自Cytec Industries公司,西帕特森,新泽西州)(400mg)、单甲氧基聚环氧乙烷(CH<sub>3</sub>O-PEG<sub>2000</sub>-OH)(400mg)和水杨酸(50mg)的甲苯溶液(4ml)加入到纳米颗粒分散体中。包含在官能化反应中的水杨酸起到三种作用,即催化剂、交联剂,和COOH源。部分由于HMMM对OH基团的偏好,水杨酸提供的许多COOH基团在交联后仍可在QD上获得。

[0092] HMMM是基于三聚氰胺的连接/交联剂,具有以下结构:

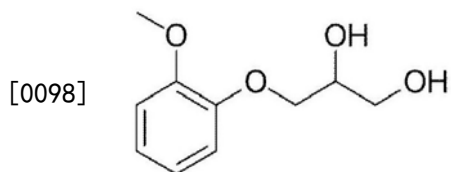


[0094] HMMM可以在酸催化反应中反应以交联各种官能团,例如酰胺、羧基、羟基,和硫醇。

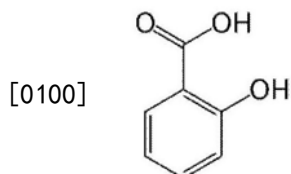
[0095] 将混合物脱气并在130℃下回流第一个小时,然后在140℃下回流3小时,同时用磁力搅拌器以300rpm搅拌。在第一个小时期间,使氮气流通过烧瓶以确保除去由HMMM与亲核试剂反应产生的挥发性副产物。将混合物冷却至室温并储存在惰性气体中。与未改性的纳米颗粒相比,表面改性的纳米颗粒显示出很少或没有荧光量子产率的损失,并且发射峰或半峰全宽(FWHM)值没有变化。将等分的表面改性的纳米颗粒在真空下干燥,并将去离子水加入到残余物中。表面改性的纳米颗粒在水性介质中很好地分散并且保持永久分散。相比之下,未改性的纳米颗粒不能悬浮在水性介质中。根据上述方法的表面改性的纳米颗粒的荧光量子产率为4050%。在典型的批次中,获得47%±5%的量子产率。

[0096] 在另一个实施方案中,将具有在608nm红色发射的无镉量子点纳米颗粒(200mg)分散在含有胆固醇(71.5mg)的甲苯(1ml)中。将混合物在50℃加热约1-2分钟,然后在室温下缓慢振荡15小时。将HMMM(Cymel 303)(400mg)、单甲氧基聚环氧乙烷(CH<sub>3</sub>O-PEG<sub>2000</sub>-OH)(400mg)、愈创甘油醚(100mg)、二氯甲烷(DCM)(2mL)和水杨酸(50mg)的甲苯溶液(4ml)加入到纳米颗粒分散体中。

[0097] 如本文所用,化合物愈创甘油醚具有以下化学结构:



[0099] 如本文所用,化合物水杨酸具有以下化学结构:



[0101] 将混合物脱气并在140°C下回流4小时,同时用磁力搅拌器以300rpm搅拌。与先前的方法一样,在第一个小时期间,氮气流通过烧瓶以确保除去由HMMM与亲核试剂反应产生的挥发性副产物。将混合物冷却至室温并储存在惰性气体中。将等分的表面改性的纳米颗粒在真空下干燥,并将去离子水加入到残余物中。使用100mM KOH溶液将溶液的pH调节至6.5,并使用Amicon过滤器(30kD)通过三次超滤循环除去过量的未反应物质。将最终的水溶液冷藏直至使用。图2描绘了产生过程和得到的表面改性的量子点(QDs)。

[0102] 值得注意的是,用于改性纳米颗粒以增加其水溶性的传统方法(例如,与巯基官能化的水溶性配体的配体交换)在温和条件下是无法使纳米颗粒具有水溶性的。在更加苛刻的条件下,例如加热和超声处理,变成水溶性的部分具有非常低的量子产率(QY<20%)。相比之下,本方法提供具有高量子产率的水溶性纳米颗粒。如本文所定义,高量子产率等于或大于40%。在某些实施方案中,获得等于或大于45%的高量子产率。如本实施例中制备的表面改性的纳米颗粒也很好分散并且保持永久地分散在其他极性溶剂中,包括乙醇、丙醇、丙酮、甲基乙基甲酮、丁醇、甲基丙烯酸三丙基甲酯,或甲基丙烯酸甲酯。

[0103] 实施例3

[0104] 包括靶向配体的水溶性QD

[0105] 在某些实施方案中,水溶性QD被改性以包括添加至QD的靶向配体。因此,在一个实施方案中,合成量子点纳米颗粒,其是无毒和水溶性的(生物相容的)并且表面配备有能够偶联的功能(COOH、OH、NH<sub>2</sub>、SH、叠氮化物、炔烃)。由于可以添加到QD中的官能团,例如本文实施例2中提供的COOH官能团,因此可以改性QD以包括靶向配体,其允许QD选择性地鉴定样品、细胞,和组织中的甲基化DNA。靶向配体改性的QD被照射并发射光用于检测。

[0106] 在一个示例性实施方案中,水溶性无毒QD是羧基官能化的或变成羧基官能化的。COOH-QD使用化学方法例如使用水溶性1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)的碳二亚胺连接技术与甲基化DNA靶向部分(例如特异性抗体)的胺末端连接。将羧基官能化的QD与EDC混合以形成活性O-酰基异脲中间体,然后通过来自反应混合物中单克隆抗体上的伯氨基的亲核攻击而置换。如果需要,在与含伯胺抗体的反应过程中加入N-羟基琥珀酰亚胺的磺基衍生物(sulfo-NHS)。加入sulfo-NHS后,EDC将NHS与羧基偶联,形成比O-酰基异脲中间体更稳定的NHS酯,同时允许在生理pH下与伯胺有效结合。在任一情况下,结果是QD和抗体之间的共价键。也可以替代地使用其他化学反应如Suzuki-Miyaura交叉偶联、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)或醛基反应。

[0107] 在一个实施方案中,无毒水溶性量子点化学连接至针对甲基化特异性结合位点(例如5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶和/或N<sup>6</sup>甲基腺嘌呤)的抗体。合适的甲基化特异性结合配体包括,但不限于,抗5-甲基胞嘧啶抗体、抗5-羟甲基胞嘧啶抗体、抗5-甲酰基胞嘧啶抗体、抗5-羧基胞嘧啶抗体,和/或抗-N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤抗体,及其任何组合。在一个实施方案中,甲基化特异性结合配体是抗5-甲基胞嘧啶抗体,例如,由diagenode销售的5-mC单克隆抗体33D3(目录号CI5200081)或其等同物。在一个实施方案中,甲基化特异性结合配体可包括抗5-羟甲基胞嘧啶抗体,例如,由ThermoFisher以目录号MA5-24695、MA5-23525、PA5-60876、PA5-40097,和/或PA5-24476销售的RM236、317和HMCES多克隆抗体。在另一个实施方案中,甲基化特异性结合配体可包括抗5-甲酰基胞嘧啶抗体,例如,由EMD Millipore公司以目录号MABE1092销售的EDL FC-5。在另一个实施方案中,甲基化特异性结合配体可包括抗5-羧基胞嘧啶抗体,例如,由GeneTex销售的5-caC抗体(目录号GTX60801)。

[0108] 体内相容的水分散性无镉QD与甲基化特异性结合配体的共价偶联:在艾本德离心管中,将1mg羧基官能化的水溶性量子点与100ul MES活化缓冲液(即25l的40mg/ml原液混合到100lMES中)混合。将MES缓冲液在去离子(DI)水,pH4.5中制备为25mM溶液(2-(N-吗啉代)乙磺酸半钠盐(MES) Sigma Aldrich)。向其中加入33ul新鲜EDC溶液(30mg/ml在DI水中的原液,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC),Fisher Scientific)并将溶液混合。加入41新鲜的sulfo-NHS(100mg/ml原液,ThermoFisher Scientific,在DI水中)并混合。NanoSep 300K过滤器(PALL NanoSep 300K Omega超滤器)在100l MES中预先润湿。将MES/EDC/sulfo-NHS/QD溶液添加到NanoSep 300K过滤器中,并用足够的MES加满。将过滤器以5000rpm/15分钟离心。将点重新分散在50ul活化缓冲液中,并转移至含有10l甲基化特异性配体的艾本德离心管中。将溶液充分混合并在室温下温育过夜(约16-18小时)。用16-6-氨基己酸(6AC)(19.7mg/100mM)淬灭溶液。注意,淬灭可以替代地用具有伯胺的其他化合物进行,但是对于所述实施方案选择6AC,因为它具有COOH并且可以保持产物的胶体稳定性。将溶液转移至预先润湿的Nanosep 300K过滤器(100l 1xPBS)中,并用1x PBS加满至500l。使用Nanosep 300K过滤器和1x PBS缓冲液通过三次超滤循环除去过量的SAV。离心的每个循环在5000rpm下运行20分钟,每次循环后用约400ul的1x PBS再分散。将最终浓缩物重新分散在100ul PBS中。

[0109] 实施例4

[0110] 使用配体-纳米颗粒偶联物原位检测细胞上的5-甲基胞嘧啶

[0111] 使用标准方案,玻璃载玻片用于制备染色体涂片。用合适的封闭剂处理载玻片,然后在潮湿室中与615发射QD偶联的小鼠单克隆抗5-甲基胞嘧啶(在PBS中1:1000稀释)在37℃温育1小时。根据需要,将载玻片用PBS洗涤一次或多次。

[0112] 用4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行反染色,然后安装在荧光显微镜或任何荧光检测器并进行观察,所述荧光检测器一旦用UV/蓝激发源激发就能检测615nm发射。

[0113] 或者,可以采用多重染色方法来扩增信号,包括进一步在潮湿室中将载玻片在与615发射QD偶联的小鼠单克隆抗5-甲基胞嘧啶(在PBS中1:1000稀释)中在37℃下温育1小时。洗涤后,在潮湿室中将所述载玻片在与615发射QD偶联的兔抗小鼠IgG(在PBS中1:500稀释)中在37℃下温育1小时。如果进一步需要,在用PBS洗涤后,在潮湿室中将所述载玻片在

与615发射QD偶联的小鼠抗兔IgG(在PBS中1:500稀释在37°C下温育1小时。在替代实施方案中,步骤的一种或多种抗体不与QD偶联。

[0114] 实施例5

[0115] 使用配体-纳米颗粒偶联物检测细胞中的DNA甲基化

[0116] 在另一个实施方案中,将配体-纳米颗粒偶联物引入在细胞培养物中培养的活组织样品或活细胞培养物中。配体-纳米颗粒偶联物的合适的甲基化特异性结合配体包括,但不限于,抗甲基化的碱特异性抗体。使配体-纳米颗粒偶联物接触甲基化DNA区域或活性DNA甲基化区域,呈现甲基化胞嘧啶或腺苷,例如5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶,和/或N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤。配体-纳米颗粒偶联物由光源激发。测量和量化配体-纳米颗粒偶联物的光发射或光吸收。检测可以实时进行。

[0117] 实施例6

[0118] 使用配体-纳米颗粒偶联物检测体内细胞中的DNA甲基化

[0119] 在另一个实施方案中,将配体-纳米颗粒偶联物体内引入生物体。此类生物可包括原核或真核生物,包括哺乳动物。配体-纳米颗粒偶联物的合适甲基化特异性结合配体包括,但不限于,抗5-甲基胞嘧啶抗体、抗5-羟甲基胞嘧啶抗体、抗5-甲酰基胞嘧啶抗体、抗5-羧基胞嘧啶抗体,和/或抗-N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤抗体。使配体-纳米颗粒偶联物接触甲基化DNA区域或活性DNA甲基化区域,呈现5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶和/或N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤。如果已经从生物体中取出组织样品用于检测,则配体-纳米颗粒偶联物在体内或离体被光源激发。测量和量化配体-纳米颗粒偶联物的光发射或光吸收。检测可以实时进行。

[0120] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用结合到本文中,如同在本文中完整阐述一样。根据前述说明书,本发明的这些和其它优点对于本领域技术人员而言是显而易见的。因此,本领域技术人员将认识到,在不脱离本发明的广泛发明构思的情况下,可以对上述实施例进行改变或修改。应当理解,本发明不限于本文所述的特定实施方案,而是旨在包括在本发明的范围和精神内的所有变化和修改。

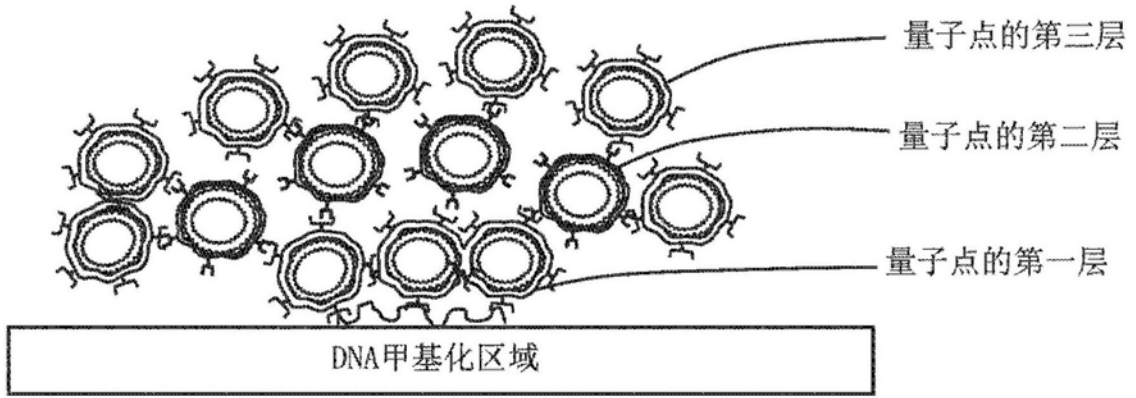


图1

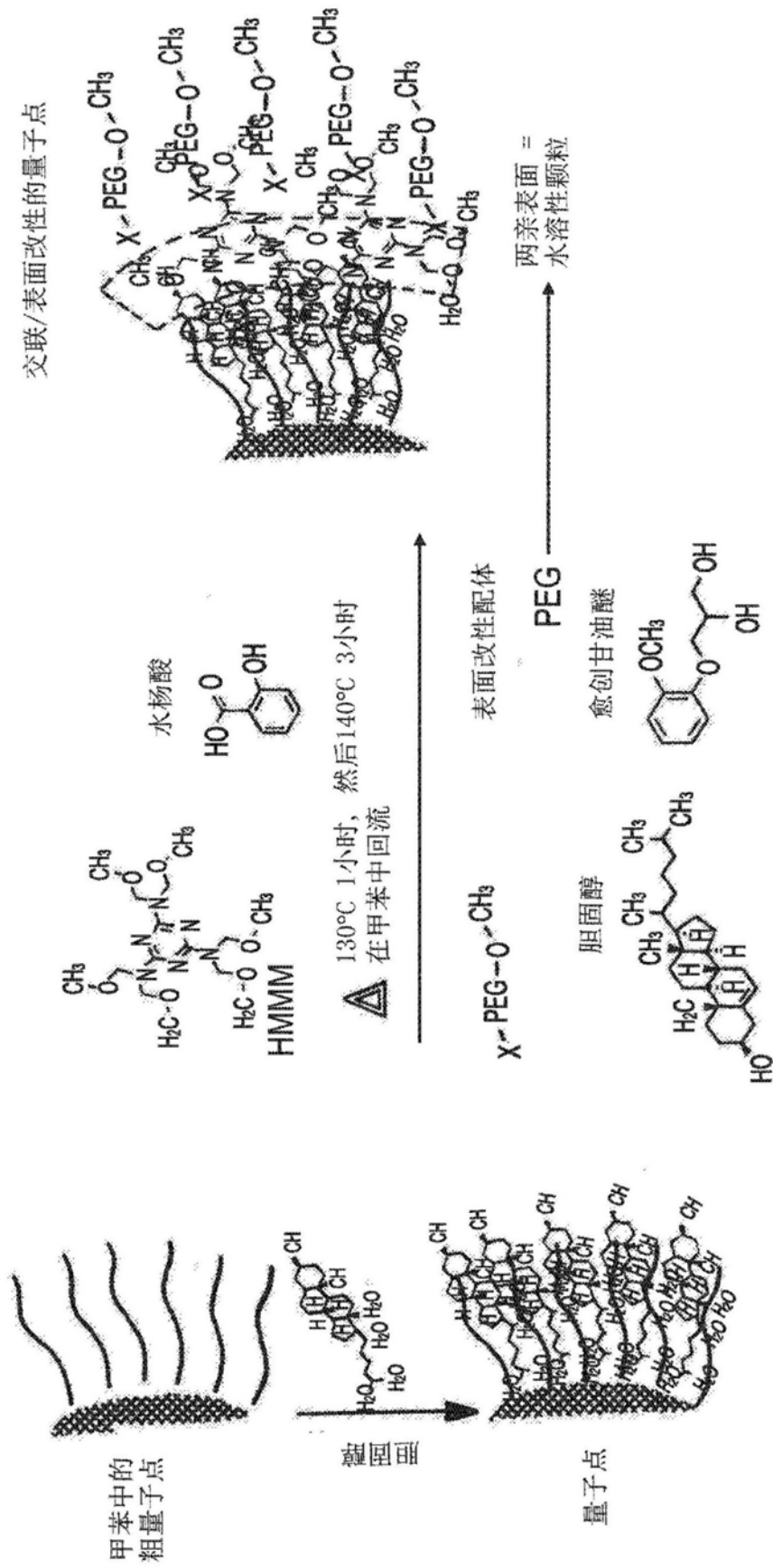


图2

专利名称(译)	配体偶联的量子点纳米颗粒和使用它们检测DNA甲基化的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109689114A</a>	公开(公告)日	2019-04-26
申请号	CN201780054108.0	申请日	2017-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	纳米技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	纳米技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	纳米技术有限公司		
[标]发明人	伊马德纳萨尼		
发明人	伊马德·纳萨尼		
IPC分类号	A61K49/00 G01N33/53 G01N33/58 B82Y15/00		
代理人(译)	李新红 王旭		
优先权	62/358326 2016-07-05 US 15/637890 2017-06-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本公开涉及偶联量子点纳米颗粒、制备这种偶联量子点纳米颗粒的方法，以及使用这种偶联量子点纳米颗粒检测DNA甲基化的方法。在一个实施方案中，量子点与识别甲基化DNA碱基的抗体(例如抗5-甲基胞嘧啶抗体、抗5-羟甲基胞嘧啶抗体、抗5-甲酰基胞嘧啶抗体、抗5-羧基胞嘧啶抗体或抗N6-甲基腺嘌呤抗体)偶联。

