



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102695473 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201080059742. 1

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22) 申请日 2010. 11. 05

代理人 申基成 杨淑媛

(30) 优先权数据

(51) Int. Cl.

61/259, 011 2009. 11. 06 US

A61F 2/02 (2006. 01)

61/308, 897 2010. 02. 27 US

61/310, 700 2010. 03. 04 US

61/314, 392 2010. 03. 16 US

61/331, 816 2010. 05. 05 US

61/361, 998 2010. 07. 07 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/055729 2010. 11. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02011/057146 EN 2011. 05. 12

(71) 申请人 纳米医学科学公司

地址 美国新墨西哥州

(72) 发明人 爱德华·R·弗莱恩

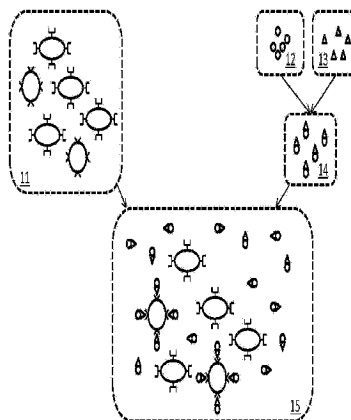
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 20 页

(54) 发明名称

使用靶向纳米粒子及其磁特性的细胞如癌细胞和其他生物物质的检测、测量和成像

(57) 摘要

本发明提供了使用靶向磁性纳米粒子和特殊磁系统的体内检测、测量或定位受试者中的以甚至非常低的浓度存在的细胞或物质的方法和装置。这些磁系统可以检测、测量或定位通过抗体结合到预定类型的细胞或物质上的粒子。示例磁系统能够检测这些纳米粒子的低于纳克的量。



1. 一种用于体内检测、测量或定位一种或多种预定类型的癌细胞或生物物质的装置，该装置包括：

a. 一个磁化子系统，其被配置成磁化结合到病人中的一种或多种预定类型的癌细胞或生物物质上的纳米粒子；和

b. 一个传感器子系统，其被配置成检测这些纳米粒子的残余磁化强度，并分析残余磁化强度从而检测、测量或定位病人中的一种或多种预定类型的癌细胞或生物物质。

2. 如权利要求 1 所述的装置，其中该磁化子系统包括多个亥姆霍兹线圈。

3. 如权利要求 1 所述的装置，其中该传感器子系统包括一个梯度仪阵列。

4. 如权利要求 1 所述的装置，其中该传感器子系统包括多个平面梯度仪。

5. 如权利要求 4 所述的装置，其中至少一个平面梯度仪具有大约 2cm 的基线。

6. 如权利要求 4 所述的装置，其中至少一个平面梯度仪是使用光刻工艺制造的。

7. 如权利要求 4 所述的装置，进一步包括与平面梯度仪连通的超导量子干涉仪 (SQUID)，其中所述 SQUID 在液氮温度左右的温度下是超导的。

8. 如权利要求 4 所述的装置，进一步包括多个 SQUID，每个 SQUID 与所述多个平面梯度仪中的一个连通，其中这些 SQUID 在液氮温度左右的温度下是超导的。

9. 如权利要求 1 所述的装置，其中该传感器子系统包括原子磁力仪。

10. 如权利要求 1 所述的装置，其中该传感器子系统被配置成求解电磁反问题。

11. 一种用于体内检测、测量或定位一种或多种预定类型的癌细胞或生物物质的方法，包括：

a. 提供如权利要求 1 所述的装置；

b. 将多个靶向纳米粒子置于病人中，其中靶向纳米粒子包含与靶向剂结合的顺磁性纳米粒子，该靶向剂优先与一种或多种预定类型的癌细胞或生物物质结合；

c. 使用该磁化子系统来磁化这些纳米粒子；

d. 使用该传感器子系统来检测、测量或定位一种或多种预定类型的癌细胞或生物物质。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述靶向纳米粒子用特异性结合到预定类型的癌细胞上的抗体标记。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其中这些抗体标记的磁性纳米粒子包含用生物相容性涂层包覆的磁芯，其上附连有至少一种特异性抗体。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中该磁芯包含铁磁性材料。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中该铁磁性材料包含氧化铁。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中该磁芯的直径小于 30 纳米。

17. 如权利要求 13 所述的方法，其中该生物相容性涂层包含葡聚糖、羧基、胺，或其组合。

18. 如权利要求 13 所述的方法，其中该至少一种特异性抗体包括下列的一种或多种：前列腺癌特异性抗体、乳腺癌特异性抗体、卵巢癌特异性抗体、霍奇金淋巴瘤特异性抗体、胰腺癌特异性抗体、特异性结合到与霍奇金淋巴瘤关联的李特斯顿伯格细胞 (Reed Sternberg cell) 上的抗体。

19. 如权利要求 13 所述的方法，该至少一种特异性抗体包括 CD15 或 CD30 抗体。

20. 如权利要求 13 所述的方法,其中该至少一种特异性抗体包括 CA-125。
21. 如权利要求 13 所述的方法,其中该至少一种特异性抗体包括 HER-2 抗体。
22. 如在此所述的方法和装置。

使用靶向纳米粒子及其磁特性的细胞如癌细胞和其他生物物质的检测、测量和成像

技术领域

[0001] 本发明涉及使用靶向纳米粒子和磁性弛豫测量的细胞或物质的体内检测和测量，特别有用于检测和测量人的癌细胞。

背景技术

[0002] 疾病的早期检测允许成功治疗和恢复的最大可能性。此外，疾病的早期检测和定位允许到疾病部位的导向治疗，从而使治疗效率最佳化。可以用适当的检测设备监测治疗，从而进一步增加所施用药物或其他形式的治疗的功效。靶向特定疾病的能力也可以改善治疗结果。癌症是美国人的第二大死亡原因，它的早期检测和定位可以改善病人的治疗结果。用于临床目的的癌症检测的最常见方法都是非特异性的，即，它们不能区分癌性肿瘤或良性肿瘤，都不能 100% 准确地检测。可用的方法都有缺点和不足，导致误诊率高，阳性诊断率太低，共同导致死亡率上升。目前可用的最常见的临床形式是：(1) 乳房 X 线摄影术、(2) 磁共振成像 (MRI)，和 (3) 超声波扫描，当可用时，以 (4) 正电子发射断层显像 (PET) 作为附加选项。

[0003] X 射线衰减测量提供关于干预介质密度的信息，是 FDA 批准的和用来检测各种形式的疾病尤其癌症的最常见设备。它也是许多假阴性和假阳性结果的原因。早期癌症肿瘤可被检测到，但在良性肿瘤或癌性肿瘤方面没有特异性。健康组织可以引起伪影，产生假阳性结果。一般而言，虽然剂量低，但人们对暴露于 X 射线和辐射越来越担忧。总的来说，癌症的 X 射线成像的假阳性数量仍然高，并且 X 射线方法不能检测早期肿瘤。

[0004] 超声波是用来使肿瘤成像的第二种方法。虽然超声波具有优良的对比度分辨率，但与 X 射线和其他成像技术相比，空间分辨率减小。超声波目前尚未被 FDA 批准作为癌症的初筛工具，但通常被用于跟踪常规检测到的任何异常。它是通常被用来证实乳腺癌和卵巢癌的 X 射线影像中的可疑区域的工具。

[0005] MRI 被用来跟踪在 X 射线扫描过程中看到的潜在问题区域；然而，MRI 扫描的费用经常妨碍了它的使用。MRI 可以检测组织中的小异常，并且在确定癌症是否已经转移方面也是有用的。动态对比增强 (DCE) MRI 有可能区分良性和癌性肿瘤，但产生许多假阳性。MRI 的费用限制了它作为筛选工具的应用。癌症的 MRI 成像经常使用磁性纳米粒子作为造影剂，并且是提供注射此种纳米粒子的标准的公认方案。已经使用 2mg/kg 剂量的纳米粒子重量的血管内 MRI 造影剂来检测转移病灶。

[0006] 因为疾病早期检测的重要性，所以目前正在研究用于成像的多种其他技术。这些技术包括使用 PET 或 SPECT 的核素乳腺闪烁显像 (Scintimammography)、阻抗断层成像、以及各种形式的 RF 成像。

[0007] 在病变仍然可被控制的时候早期检测到它们是至关重要的，因为早期检测到的许多癌症的治愈率接近 100%。现有成像方法往往不能识别病变，直到已经发生显著的生长。目前正在研究替代方法的研究，包括 MRI、PET、超声波、闪烁扫描术和其他方法。目前，这些

方法在肿瘤类型方面都没有特异性,都没有利用癌性组织和非癌性组织之间的组织性质差异。尤其是不依赖辐射或非常昂贵的程序并能够提供极早检测肿瘤的新途径是明确需要的。本发明提供了用于体内癌症检测的新性能。

[0008] 发明披露

[0009] 本申请与下列申请相关,每一个申请通过引用结合在此:2009年11月6日提交的 U.S. 61/259,011;2010年2月27日提交的 U.S. 61/308,897;2010年3月16日提交的 U.S. 61/314,392;2010年5月5日提交的 U.S. 61/331,816;和2010年7月7日提交的 U.S. 61/361,998;每一个申请通过引用结合在此。

[0010] 本发明提供了用于检测组织中的细胞或物质如癌细胞的装置和方法。该系统包括磁系统,所述磁系统包括磁场发生器,其将已知磁场施加在受试者组织上,从而磁化结合到感兴趣的细胞或物质上的靶向顺磁性纳米粒子;所述磁系统还包括灵敏磁传感器,其可检测残余磁场作为纳米粒子衰减的磁化强度。示例磁系统包括超导量子干涉仪传感器,其包括适配为向置于测量台上的病人癌组织施加均匀磁化脉冲场的磁脉冲发生器;和适配为检测由所施加的脉冲场产生的残余磁场并使其成像的剩余磁场检测器。磁脉冲发生器可以包括一对亥姆霍兹线圈。剩余磁场检测器可以包括梯度仪阵列。另一种示例磁系统包括原子磁力仪和原子梯度仪阵列——非常灵敏的磁场传感器,可以用来基于磁场中原子的拉莫尔旋进测量极其微弱的磁场。在本发明的一些实施方案中,原子磁力仪包括含有小空腔的芯片集,所述小空腔中含有原子蒸气室。这种蒸气室含有 Rb 原子,并由圆形偏振光束光抽运。这些原子经历拉莫尔旋进,并且这种旋进的频率导致蒸气的折射率响应于所施加的磁场而变化。第二激光可以用作这种折射变化的测量场,使用一组光栅测量干扰图案随着所施加的磁场变化的变化。这些蒸气室可以是单独的或者布置在梯度仪配置中来测量场的变化作为距离的函数。

[0011] 根据本发明的方法包括:提供磁系统;将用于特异性地结合到癌细胞或其他目的细胞或物质上的多个靶向(例如,标记有抗体)顺磁性纳米粒子注射到受试者中;施加已知(例如,均匀的)磁化脉冲场以磁化受试者组织中的纳米粒子;并且检测磁化纳米粒子的残余磁场,由此提供结合到病人癌组织上的纳米粒子的图像。该靶向顺磁性纳米粒子可以包含用生物相容性涂层包覆的磁芯,其上附连有至少一种特异性抗体。例如,该磁芯可包含铁磁性材料,例如氧化铁。适合的靶向试剂如抗体的实例描述在下文。

[0012] 附图简要说明

[0013] 结合在本说明书中并构成它的一部分的附图举例说明了本发明,并与说明书一起描述了本发明。在附图中,相似的元件用同样的数字表示。

[0014] 图1是根据本发明的示例的测量用受试者组织制备的示意图。

[0015] 图2(a、b、c、d)提供了根据本发明的示例测量的示意图。

[0016] 图3是来自结合图2描述的过程的测量的示意图。

[0017] 图4是适用于本发明的装置的示意图。

[0018] 图5是使用超导量子干涉仪(SQUID)磁传感器的示例性装置的示意图。

[0019] 图6是可以用于人癌症检查的示例性 SQUID 传感器装置的示意图。

[0020] 图7是用于弱场测量的原子磁力仪的示意图和照片。

[0021] 图8是具有生物相容性涂层和附连的用于靶向特定细胞的抗体的磁性纳米粒子

的示意图。

[0022] 图 9 描绘通过与具有已知结合能力的一系列微球比较而计算的 Her2 位点数目 / 细胞。

[0023] 图 10 是在与 HER2/neu 抗体和纳米粒子孵育之后,作为时间的函数测量的两种乳腺癌细胞系 MCF7/HER218 和 MDA-MB-231 的磁矩的图解。

[0024] 图 11 经过用移液器吹打细胞 2 次之后,测量为细胞数目的函数的细胞样品的磁矩的图解。

[0025] 图 12 是插有 MCF7 细胞小瓶的体模的图解,左侧 $2E+06$ 个细胞,右侧 $=1E+06$ 个细胞。

[0026] 图 13 是在 SQUID 系统下的裸鼠的照片。

[0027] 图 14 包含从小鼠肿瘤获得的位置置信图。

[0028] 图 15 是在 35 个不同测量位点观察到的磁等值线的图解。

[0029] 图 16 是对于两只小鼠和每只小鼠的两个肿瘤的测量的时间过程的图解。

[0030] 图 17 示出这些测量的结果,与活小鼠的体内测量有很好的一致性。

[0031] 图 18 是叠加在小鼠实际肿瘤上的两个肿瘤的定位的二维 95% 置信限的图解。

[0032] 图 19 是取出之后的肿瘤的组织学照片。

[0033] 图 20 是卵巢癌的图解,显示了在卵巢上的肿瘤的生长。

[0034] 图 21 是以典型的一位病人对象的距离置于 SQUID 传感器装置下的全尺寸卵巢体模的照片。

[0035] 图 22 是针对插入到图 21 所示体模中的活卵巢细胞的灵敏度研究的结果的图解。

[0036] 图 23 是使用流式细胞术针对这些细胞的抗体位点的证实的图解。

[0037] 图 24 是附连到活小鼠卵巢的人癌症肿瘤上的磁性纳米粒子(得自 Ocean Nanotech)的磁矩的图解。

[0038] 图 25 是用于验证 SQUID 传感器方法在体内运行的小鼠的照片,以及来自这只小鼠的磁等值线场图。

[0039] 图 26 是 SQUID 传感器系统中的磁矩测量作为用于使磁性纳米粒子附连到淋巴瘤细胞系上的孵育的时间的函数的曲线图。

[0040] 图 27 是在确定纳米粒子可用的位点数目中来自淋巴系统的 RS 细胞的流式细胞术测量以及通过 SQUID 传感器检测的结果的图解。

[0041] 图 28 是来自霍奇金病病人的组织学切片。

[0042] 进行本发明的方式和工业实用性

[0043] 在不同示例实施方案和应用的背景下描述了本发明。在说明书的一些部分中,术语“检测”是为了简洁起见而使用的,本发明可以提供细胞或物质的存在的检测、细胞数目或物质质量的测量、细胞或物质位置的确定、前述项的变化或变化速率的确定、以及类似的测定,所有这些都包括在术语“检测”中。

[0044] 首先描述了根据本发明的磁性弛豫测量的简化实例。图 1 是根据本发明的示例的测量用受试者组织制备的示意图。该图中的图解高度简化,这仅为了便于解释,而并不旨在代表所涉及的实际材料的实际形状、尺寸、比例或复杂性。组织 11 的一部分,例如待研究器官,或已知或可疑肿瘤部位,包含感兴趣的类型的一些细胞(在图中示为外围围绕着“V”形

结构的圆圈)和其他类型的一些细胞(在图中示为外围围绕着长方形结构的椭圆形)。提供了多个磁性纳米粒子 12,在图中示为小圆圈。还提供了多个靶向分子 13,在图中示为小三角形。纳米粒子与靶向分子结合(或缀合),形成靶向的纳米粒子 14。

[0045] 然后将靶向纳米粒子导入到组织 15 中。感兴趣的类型的细胞具有针对靶向分子的结合位点或者其他亲和力,在图中用围绕此类细胞外围的“V”形结构展示。靶向分子附连到感兴趣的类型的细胞上,在图中用位于“V”形结构内的三角形靶向分子展示。通常,每个细胞均具有大量此类结合或亲和位点。其他类型的细胞不具有此类结合位点或亲和力,在图中用没有靶向纳米粒子附连的椭圆形展示。没有结合到细胞上的靶向纳米粒子在所制备的样品中是游离的,在图中用附连有未与任何特定细胞连接的三角形的小圆圈展示。

[0046] 图 2 (a、b、c、d) 提供了根据本发明的示例测量的示意图。在图 2a 中,该组织如图 1 中所示的,但在每个纳米粒子附近添加了箭头。这些箭头代表每个纳米粒子的磁化,并表明在组织中的纳米粒子的磁化是随机的(在图中,示出四个方向之一的箭头仅仅为了便于解释,实际上磁化可以具有任何方向)。

[0047] 在图 2b 中,施加了外部磁场(在图中右下方用空心箭头表示)。响应于所施加的磁场,纳米粒子的磁化现在是均匀的,在图中表示为所有磁化箭头都指向相同方向。

[0048] 图 2c 展示在移除磁场不久之后的组织。未结合到细胞上的纳米粒子通过布朗运动自由地移动,它们的磁化迅速地恢复到随机状态,在图中表示为未结合纳米粒子的磁化箭头指向不同的方向。然而,结合到细胞上的纳米粒子受到这种物理运动的抑制,因此它们的磁化仍然基本上与所施加磁场存在时的磁化相同。

[0049] 图 2d 展示在移除所施加磁场较长时间之后的所制备的样品。结合的纳米粒子的磁化此时也已经恢复到随机状态。

[0050] 图 3 是来自结合图 2 描述的过程的测量的示意图。为了便于解释,仅以简化形式将磁场显示为时间的函数;在实际应用中,信号的单位、标度和形状可以是不同的和更复杂的。在该过程开始时,相应于图 2a 的状态,纳米粒子磁化是随机的,并且施加外部磁场。在此之后,纳米粒子的磁化是均匀的,相应于图 2b 的状态。当未结合纳米粒子恢复到随机磁化时的很短的一段时间可以忽略磁场,相应于图 2c 的状态。然后,磁化可以被测量为结合的纳米粒子从均匀磁化到随机磁化的过渡,相应于图 2d 的状态。从图 2c 的状态到图 2d 的状态的测量磁化特性与样品中结合的纳米粒子数目有关,因此与样品中感兴趣的类型的细胞数目有关。

[0051] 图 4 是适用于本发明的装置的示意图。受试者台 41 被配置成布置受试者,使其与该装置剩余部分处于有效的关系中。磁化系统 42,例如亥姆霍兹线圈相对于受试者台安装,这样磁化系统可以将磁场施加到样品上。磁传感器系统 43 相对于受试者台安装,这样它可以感测与已磁化纳米粒子相关联的小磁场。该系统由控制和分析系统 44 控制,并且传感器数据由控制和分析系统 44 分析;例如通过具有适当编程的计算机进行。

[0052] 图 5 是使用超导量子干涉仪(SQUID)磁传感器的示例性装置的示意图。该图顶部的液氮贮槽杜瓦瓶 51 维持 SQUID 传感器的温度。SQUID 二级轴向梯度仪被容纳在突出通过支撑架 53 的白色鼻状物(white snout)52 中。这个示例性鼻状物中容纳了数个梯度仪,一个在中心,六个在半径为 2.15cm 的圆圈内。每个梯度仪均电感耦合到低温 SQUID 上。两个

圆形线圈 54 形成可以为纳米粒子提供磁化脉冲场的亥姆霍兹线圈对。由这些线圈产生的均匀场可以改变,但典型地为 40 至 50 高斯并且脉冲长度典型地为 300-800 毫秒。在这个实例中,木质框架支撑 SQUID 和测量平台以及磁化线圈。非磁性支撑系统包含三维台 55,其可以不用金属组件构造,例如用塑料构造。上面两个黑色旋钮控制 x-y 台在 $\pm 10\text{cm}$ 范围内移动,下面的旋钮用于在 20cm 范围内升高和降低测量台。可以将样品夹持器插入到该台上,其可以容纳活受试者如小鼠或其他小动物。

[0053] 图 6 是可用于人癌症检查的示例性 SQUID 传感器装置的示意图。木质结构 63 可以类似于图 5 中所示的支撑架。测量台可被用于安置病人的床 65 代替。两个较大的亥姆霍兹线圈 64 包含位于该床上面和下面的木质圆形物。这些较大的线圈可用来产生均匀脉冲场并且磁化已经插入病人中的磁性纳米粒子。可以调整,例如增大图 5 中所示的装置中使用的电流,从而再次产生在 40 至 50 高斯范围的场。与图 5 中所示的装置类似,具有磁性梯度仪阵列的 SQUID 杜瓦瓶 61 可以用来测量由磁化纳米粒子产生的残余磁场变化。

[0054] 图 7 是用于弱场测量的原子磁力仪的示意图和照片。通过使用微芯片制造方法将这种设备微型化,并且多个单元可以并排安置从而形成传感器阵列。通过经由光学纤维施加激光束来操作该磁力仪。这种激光束将蒸气室中的热 Rb 气体抽运到特定原子态。该激光束首先被椭圆偏振化并准直地进入蒸气室。反射镜通过该蒸气室和透镜将这种激光束反射回偏振分析器中。垂直于磁力仪长度施加的磁场改变了蒸气室中气体的折射率,从而改变光通过该蒸气室的偏振。偏振的改变产生所施加的磁场的幅度。该抽运激光供应多个纤维光缆并因而用于多个磁力仪。用于弛豫测量的这些磁力仪的阵列可以包括 7 个蒸气室,一个安置在中心,另六个围绕在中心周围。从磁化线圈施加的场垂直于图 5 中所示的布置,以便在纳米粒子中诱导最大可观察的磁矩。在图 7 底部的照片示出应用于本发明的原子磁力仪的示例性物理布置和尺寸。与灵敏度为 $1.0\text{pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ ($1000\text{fT}/\sqrt{\text{Hz}}$) 的图 5 所示的示例性 SQUID 系统相比,所示设备的灵敏度为 $0.16\text{fT}/\sqrt{\text{Hz}}$ 。原子磁力仪不需要低温致冷剂,这使得它们对于其中此类制冷剂尤其液氦并不总是易于获得的临床应用是令人希望的。

[0055] 乳腺癌检测的示例应用

[0056] 对于乳腺癌,当前选择的用于筛选和检测方法是乳房 X 线摄影术。虽然乳房 X 线摄影术已经导致显著提高较早地检测乳腺癌的能力,但它仍然不能区分良性和恶性病变,难以检测致密和有疤痕的乳房组织中的肿瘤,而且不能检测到 10%-30% 的乳腺癌。使用结合到肿瘤特异性试剂上的磁性纳米粒子,并通过测量它们的弛豫场检测这些粒子,这是一种有前途的新技术,它具有提高较早地检测肿瘤的能力的潜能。此外,使用弱场传感器检测靶向磁性纳米粒子是快速的,而且可以比 MRI 检测更灵敏,因为仅检测结合到其靶细胞上的粒子。

[0057] 我们已开发出靶向到表达 HER2 抗原的乳腺癌细胞的结合磁性纳米粒子,所述 HER2 抗原在约 30% 人乳腺癌上过表达。我们表征了这些纳米粒子的磁特性并选出具有最佳尺寸和每毫克铁磁矩的那些。已经研究了对于 HER2 具有特异性的许多不同的细胞系,从而测定它们的位点密度和用于检测的传感器系统的灵敏度。使用由人细胞系生长的肿瘤探测 SCID 小鼠模型,使小鼠在传感器系统下成像,之后证实组织学研究。这些结果表明磁传感器途径对于乳腺癌灵敏检测的有效性。

[0058] 图 8 是带有生物相容性涂层和附连的用于靶向特定细胞的抗体的磁性纳米粒子

的示意图。在示范本发明示例实施方案时,我们使用对 30%-40% 乳腺癌有特异性的 HER2 抗体(Ab)。纳米粒子具有含羧基的涂层,并使用磺基 -NHS 方法使这些纳米粒子结合到抗体上。对乳腺癌细胞系 MCF7、MCF7/Her2-18 (用 Her2 稳定转染的 MCF7 克隆)、BT474、和 MDA-MB-231 进行流式细胞术分析。通过流式细胞术、结合到荧光探针 FITC 上的抗 -Her2 抗体确定 Her2 结合位点数目。图 9 描绘了通过与具有已知结合能力的一系列微球比较计算的 Her2 位点数目 / 细胞。工程化的过表达 Her2-18 的 MCF7 细胞具有 11×10^6 个 Her2 结合位点 / 细胞, BT-474 具有 2.8×10^6 个, MCF7 具有 0.18×10^6 个, MDA-MB-231 具有 0.11×10^6 个。非乳腺细胞系具有 <4000 个 Her2 结合位点 / 细胞。

[0059] 图 10 是 SQUID 传感器系统中的磁矩测量作为使磁性纳米粒子(来自 Ocean Nanotech) 附连到乳腺癌细胞系上的孵育时间的函数的曲线图。用羧基生物相容性涂层包覆磁性纳米粒子,然后使其结合到 Her2/neu 抗体上。这种抗体对于大约 30% 的人乳腺癌细胞是特异性的。将标记的磁性纳米粒子插入含有活癌细胞的小瓶中,然后在范围从 1 分钟至 16 分钟内的不同时间点测量该小瓶的磁矩。零时间点是具有加入细胞中之前的纳米粒子的小瓶的磁矩。未混合粒子没有磁矩,这证明未结合粒子在这种 SQUID 成像方法下没有产生磁信号。与细胞混合后,磁矩迅速增大并变得饱和,表明这些细胞的表面上可能在 1 至 2 分钟内聚集了最大数目的纳米粒子。顶部曲线为乳腺癌细胞系 MCF7/Her218, 已知 MCF7/Her218 对 Her2/neu 抗体有非常强的特异性,大幅度的磁信号验证了这一点。乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 对于 Her2/neu 也呈阳性,但是用于抗体靶向的纳米粒子附连的位点少得多。较小的幅度也指示这种趋势。CHO 细胞系对于 Her2/neu 是非特异性的,孵育之后产生的磁矩明显较小。磁矩的存在指示这些细胞的一定程度的吞噬,在这里纳米粒子进入细胞。无细胞的曲线对应于仅含有纳米粒子的小瓶,该曲线表明单独的粒子一直没有产生信号,因而这些粒子没有发生团聚。这些结果证明了该抗体对靶癌细胞有特异性,并证实了仅仅结合的粒子产生磁矩。对于其他方法如 MRI 则不能给出这种结果,它们看到所有粒子,不论是结合的或未结合的。

[0060] 图 11 是经过用移液器吹打细胞 2 次之后,被测量为细胞数目的函数的细胞样品的磁矩的图解。在细胞与传感器相距 3.5cm 时,所显示的灵敏度对于 MCF7 细胞和 Ocean 纳米粒子为 100,000 细胞。具有 2.5×10^6 np。线性度证明细胞 # 的磁矩产生;MRI 造影不是细胞数目的线性函数。典型的乳房 X 线照片需要 1000 万个细胞。

[0061] 使用标准的乳房 X 线照片校准体模作为模型构建乳房体模。该体模由粘土构造,非金属材料在这些场下是透明的。将含有活细胞的小瓶插入体模中。图 12 是插有 MCF7 细胞小瓶的体模的图解,左侧 $2E+06$ 个细胞,右侧 $1E+06$ 个细胞。细胞结合到得自 Ocean Nanotech 的 HER2 Ab. np 上。绘制在五个 7- 通道 SQUID 位置 =35 位点处的场。三维等值线图代表场分布。从反问题获得定位和磁矩幅度。根据上面所示的细胞数据,从磁矩确定小瓶中的细胞数目。

[0062] 建立适合于 SQUID 传感器测量的乳腺癌小鼠模型。将 SCID 裸鼠与人乳腺癌细胞系一起使用。图 13 是在 SQUID 系统下的裸鼠照片。为了通过 SQUID 技术研究体内过程,两周前在两个位置给小鼠注射人 MCF7 细胞。这些细胞然后在小鼠侧腹产生人肿瘤;一个这样的肿瘤在小鼠右耳之后可见。借管子通过小鼠的嘴麻醉小鼠。将标记的磁性纳米粒子注射到这个台子上的小鼠中,通过尾注射、腹膜间注射或肿瘤间注射进行。注射之后,将小鼠

置于所示传感器系统下,施加磁化脉冲并测量所注射粒子产生的磁矩。正如在活癌细胞情况下,除非粒子已附连到肿瘤内的细胞上,否则观察不到磁矩。在一些情况下,两个肿瘤都是 MCF7 型细胞,在其他情况下使用两种不同的细胞系在鼠中产生肿瘤。小鼠位于在图 5 中所示的台子上并且可以被移动到在传感器下的数个位置,以获得更多空间信息。作出测量作为时间的函数,以确定来自血流的粒子被吸收有多快以及粒子最后进入肝脏发生的吞噬有多快。典型地将小鼠置于 7-通道 SQUID 系统下的 5 个台位置处以便获得 35 个空间位置。然后将所有位置处的磁场用于特定代码,从而使用 Levenberg-Marquardt 原理求解电磁反问题,以确定在鼠中的磁性粒子的所有来源的位置。然后将这种信息与来自照片的鼠的已知几何形状进行比较,从而确定用于定位活动物中的乳腺癌肿瘤的准确度和灵敏度。图 14 包含从小鼠肿瘤获得的位置置信图。左侧球来自左侧肿瘤,它的磁矩是右侧肿瘤的约 2 倍(见下面)。通过双偶极最小二乘法计算位置从而求出磁矩和位置。从磁矩确定肿瘤中标记细胞的数目。

[0063] 对于两种不同的荷瘤动物,关于活动物的体内测量的 SQUID 系统结果显示于图 16、17、18 中。每只小鼠均长出两个不同细胞类型的肿瘤。这两个肿瘤中的每个所吸收的纳米粒子量不同。如所预期的,带有 MCF7 细胞的小鼠比荷有 MDA-MB-231 肿瘤的小鼠显示出更高的磁矩,因为前者的 HER2/neu 抗体的特异性位点数目较多。图 15 是在如图 13 中所描述的 35 个不同测量位点观察到的磁等值线的图解。这些磁场分析产生的肿瘤空间位置与这些位置的测量值一致;SQUID 结果给出高于大约 3mm 的物理测量的精确度。图 16 是对于这两只小鼠和每只小鼠的两个肿瘤的测量的时间过程的图解。粒子的吸收迅速发生,在第一小时内获得接近最大值的信号。纳米粒子在肿瘤中保留至少 5 小时,即实验持续时间。继这些测量之后,使小鼠安乐死,取出肿瘤和其他器官并置于传感器系统下,以确定所注射的纳米粒子在肿瘤中有多少。在图 17 中是这些测量的结果的图解,显示出与活小鼠的体内测量有很好的一致性。在左下图中,在肝脏中观察到磁矩,表明已经发生一定程度的吞噬,并且粒子被递送到肝脏中用于消除。随后的肿瘤组织学分析使用普鲁士蓝染色来突显磁性纳米粒子中的铁,也证明了粒子与肿瘤中细胞的显著附连。

[0064] 计算置信区域,以便确定对于小鼠的体内测量的肿瘤定位的准确度。图 18 是叠加在小鼠实际肿瘤上的两个肿瘤的位置的二维 95% 置信限的图解。在 x 和 y 方向获得大约 $\pm 3\text{mm}$ 的空间位置准确度。图 19 是取出之后的肿瘤的组织学照片。一个 MCF-7 肿瘤切片的显微图像。细胞的普鲁士蓝染色揭示铁存在于附连到细胞上的 np 中。箭头指向覆盖有 np 的细胞。

[0065] 已经通过检测结合到乳腺癌细胞系的抗体上的磁性纳米粒子证明灵敏磁场传感器系统用于乳腺癌的早期体内检测。100 万个以上纳米粒子附连到每个癌细胞上。在与乳腺肿瘤相当的距离下,方法对于 $<100,000$ 个细胞是灵敏的。典型地,标准的乳房 x 线摄影术需要具有 1000 万个细胞的细胞密度。所测得的磁矩与细胞数目呈线性关系,即测量磁矩产生所存在的癌细胞的数目。没有观察到未附连到细胞上的非常高对比度的纳米粒子。体模研究证明多个来源被准确定位并且每个来源的细胞数目被确定。使用人乳腺癌细胞系的多个肿瘤建立小鼠模型,并在注射纳米粒子之后进行体内测量从而确定这些肿瘤的位置和癌细胞计数。反问题的求解成功地将肿瘤定位和确定细胞数目。组织学证实 np 小鼠肿瘤的存在。

[0066] 卵巢癌检测的示例应用。

[0067] 卵巢癌的病因还不是很清楚,对于暗示优先筛选(preemptive screening)的危险因子几乎没有证据。如果存在可疑症状如腹部膨胀,通常的筛选试验为骨盆检查,结果典型地提示癌症晚期。妇女的例行筛选目前还没有进行,因为没有可靠的筛选试验。对于卵巢癌,现在最大的难点是待到它被检测到的时候它已经从卵巢转移到其他器官中。为此,常常进行子宫切除连同卵巢切除。如果卵巢癌的存在能在早期鉴定出并被控制在卵巢中,则五年存活率为 95%。然而,仅 29% 在这个阶段可以检测到。如果该疾病已经局部蔓延,则这个存活率将降低到 72%,而如果转移到远处部位,则存活率是 31%。因而,早期检测方法的开发势在必行。

[0068] 图 20 是卵巢癌的图解,显示在卵巢上的肿瘤的生长。这些肿瘤由具有高数量的抗体 CA-125 受体的细胞组成,并且可被用这种抗体标记的磁性纳米粒子靶向。图 21 是以典型的一位病人对象的距离置于 SQUID 传感器装置下的全尺寸卵巢体模的照片。该体模具有插入到其中的小瓶,该小瓶含有活卵巢癌细胞。将用抗体 CA-125 标记的磁性纳米粒子插入到这个小瓶中,因为这些抗体对这些卵巢癌细胞有高特异性,所以大量粒子变得附连到细胞表面上。然后通过 SQUID 传感器装置检测这些磁性纳米粒子,从而为动物和人体内模型提供体内测量的灵敏度校准。

[0069] 针对插入到图 21 中所示体模中的活卵巢细胞的灵敏度研究结果展示于图 22 中,其中使用了三种不同的卵巢癌细胞系,即, tov-112D、Ov-90,和 nihovcar-3。该图表明,通过这个装置对这三种不同细胞系检测了最低细胞数目,作为传感器到病人卵巢的距离的函数。已知癌细胞系 ov-90 是癌症中最具侵袭性的细胞系之一,这些结果表明该细胞表面上存在许多 CA-125 受体。每个细胞上的纳米粒子数目可以从这些测量结果估算出来,对于 tov-112D 相应于 20,000 粒子/细胞,对于 ov-90 为 3400 粒子/细胞,并且对于 ovcar-3 为 6700 粒子/细胞。

[0070] 图 23 是使用流式细胞术证实这些细胞上的抗体位点的图解。图 23a 和 23b 示出所检查的 4 个细胞系中的 2 个。仅仅来自细胞的信号被示出,并且在这些图上的右侧示出了随着位点数目逐渐增加的同种型(使用非特异性结合分子, Igg)、Her2/neu 抗体和 CA-125 抗体。这些图形显示, CA-125 抗体在这些细胞上具有大量位点,其中 SK-OV-3 是这两者中最大的。抗体 Her2/neu 还对 30% 的乳腺癌细胞有特异性。

[0071] 作出测量作为时间的函数,以确定来自血流的粒子被吸收有多快以及粒子最后进入肝脏发生的吞噬有多快。在 SQUID 传感器装置中的磁矩的测量作为对于来自附连到在活小鼠中的人卵巢癌肿瘤上的磁性纳米粒子(得自 Ocean Nanotech)的磁矩的时间的函数在图 24 中示出。该小鼠具有两种卵巢肿瘤,一个为 SK-OV-3,另一个为 NIH-OVCAR3。用羧基生物相容性涂层包覆磁性纳米粒子,然后使其结合到 CA-125 抗体上。这种抗体对于人卵巢癌细胞是特异性的。将标记的磁性纳米粒子注射到小鼠肿瘤中,然后在从 1 分钟至 300 分钟内的不同时间点测量该小鼠的磁矩。粒子的吸收迅速发生,在第一小时内获得接近最大值的信号。该时间过程表明纳米粒子在肿瘤中保留许多个小时。纳米粒子在肿瘤中至少保留 5 小时,即实验持续时间。这两种肿瘤各自吸收不同量的纳米粒子。如所预期的,带有 SK-OV-3 细胞的小鼠肿瘤比荷有 NIH-OVCAR-3 肿瘤的小鼠具有更高的磁矩,因为在前者上的 CA-125 抗体特异性位点数目更多。在注射之前纳米粒子不产生磁矩,仅在附连到某物质

如肿瘤中的细胞上时才产生磁信号。实验已经显示,在注射到肿瘤以外的部位中时这些粒子不产生信号,因为它们不能结合到正常细胞上。在一段时间之后,肝脏开始显示这些粒子累积的信号,因为这些粒子从该系统中被吞噬。继这些测量之后,使小鼠安乐死,取出肿瘤和其他器官并置于传感器装置下,以确定所注射的纳米粒子在肿瘤中有多少。这些测量与活小鼠的体内测量很一致。随后的肿瘤组织学分析使用普鲁士蓝染色来突显磁性纳米粒子中的铁,证明了粒子与肿瘤中细胞的显著附连。

[0072] 用来验证 SQUID 传感器方法在体内运行的小鼠的照片连同来自这只小鼠的磁等值线场显示于图 25 中。人肿瘤显示在小鼠侧腹上;这些肿瘤在图 25 中为尾部上面和尾部两侧的肿块。通过将活人卵巢癌细胞注射到这种严重损害的免疫缺陷小鼠中来形成这些肿瘤,允许它们生长几周,直至可以明显看出 6mm-10mm 的肿瘤。在所有 SQUID 传感器实验过程中,都借管子通过小鼠的嘴麻醉小鼠。通过尾部注射、腹膜间注射或肿瘤间注射将标记的磁性纳米粒子注射到这个阶段的小鼠中。注射之后,将小鼠置于图 1 所示的传感器下,施加磁化脉冲并测量所注射粒子产生的磁矩。如在活癌细胞的情况下,除非粒子已经附连到肿瘤内的细胞上,否则观察不到磁矩。在一些情况下,两个肿瘤都是 SK-OV-3 型细胞,在其他情况下使用两种不同的细胞系在小鼠中产生肿瘤。

[0073] 可将置于图 5 所示的台子上的小鼠移至传感器下的数个位置以便获得更多空间信息。通常将小鼠置于 7-通道 SQUID 系统下的 5 个台位置处以便获得 35 个空间位置。然后将所有位置处的磁场用于特定代码,从而使用 Levenberg-Marquardt 原理求解电磁反问题,以确定在小鼠中的磁性粒子的所有来源的位置。然后将这种信息与来自照片的小鼠的已知几何形状进行比较,从而确定用于定位活动物中的癌肿瘤的准确度和灵敏度。图 25 显示了对于 35 个不同测量观察到的磁等值线。这些磁场分析产生的肿瘤空间位置与这些位置的测量值一致;SQUID 结果给出高于大约 3mm 的物理测量的精确度。

[0074] 霍奇金氏淋巴瘤检测的示例应用

[0075] 霍奇金淋巴瘤(HL)占有所有淋巴瘤的 30%。HL 特征性地发生于淋巴结,优选颈部区域和胸腺;但是在晚期疾病中可能会涉及远处淋巴结、脾、和骨髓。大多数病例是在 15 和 34 岁之间的年轻成人,但第二个发病高峰出现在 55 岁以上的人群中。目前,活检评价对于诊断是需要的。手术活检具有并发症,如感染和出血,而且活检评价典型地需要 3-5 天。因此,对于其中肿块正阻止血液回流到心脏的 HL 病例(即上腔静脉综合征,10%的病例),在此等候期间可能会发生显著的发病率或死亡率。已经鉴定出几种靶向霍奇金淋巴瘤的抗体,即 CD15、CD30 和 CD25。然而,后者抗体靶向许多细胞,且特异性较小。本发明可以具有显著临床影响的另一个应用是检测在治疗之后的持久性 HL。如果经历复发的病人经受高剂量放射治疗,如果早期检测到复发,则有良好的预后。具有复发的病人的预后主要由首次缓解的持续时间决定。治疗之后,大纤维化结节,特别是纵隔中的大纤维化结节的持续性导致在确定是否存在持久性癌症中的不确定性,而且纤维化结节手术面临着难以控制出血问题和病人发病率。

[0076] 本发明的弛豫测量方法可以提供受累于霍奇金病的器官如胸腺和脾中存在的淋巴瘤细胞数目的定量估测。RS 细胞是巨细胞,其源自含有数以百万计的 CD30 和 CD15 受体的 B 淋巴细胞。利用靶向 T 细胞淋巴细胞的 SQUID 传感器的前述结果已经证明:对于较小的细胞,大约百万个粒子可以附连到每个 T 细胞上。空间位阻限制了附连到正常淋巴细胞

上的纳米粒子数目,但大得多的 RS 细胞可以具有高出 25 至 50 倍的结合纳米粒子。每个纳米粒子中的铁的量是 $4.4 \times 10^{-6} \text{ ng/np}$ 。由于 RS 细胞的尺寸大,每个细胞中可以存在几百万个纳米粒子,因此每个细胞可以具有多达 10ng 的铁。累积在脾或胸腺中的 100 个 RS 细胞可以含有 1 微克的铁。少于 1 微克的量对于 SQUID 检测而言是足够的,因此 100 个 RS 细胞的检测限是可能的。体内测得的抗体标记的纳米粒子的残余磁化强度振幅可以提供重要的淋巴癌诊断工具。信号强度取决于肿瘤细胞表面上抗原的密度,因而由纳米粒子产生的场强与淋巴瘤细胞上抗原位点的数量密度成比例。可以确定粒子数和密度从而提供所检测磁场的振幅。这种信息可以用于规划体内检测和帮助挑选待用纳米粒子。SQUID 传感器是对于霍奇金病理想的传感器系统,它对 RS 细胞有高灵敏性,可以体内检测该疾病而无需活检,并具有在化疗期间监测该疾病的治疗的能力。

[0077] 图 26 是 SQUID 传感器系统中的磁矩测量值作为用于使磁性纳米粒子(得自 Ocean Nanotech) 附连到淋巴瘤细胞系上的孵育时间的函数的曲线图。用羧基生物相容性涂层包覆磁性纳米粒子,然后使其结合到 CD34 抗体上。这种抗体对一种类型的淋巴瘤细胞,即人急性淋巴细胞性白血病是特异性的。将标记的磁性纳米粒子插入含有活癌细胞的小瓶中,然后在从 1 分钟至 16 分钟内的不同时间点测量该小瓶的磁矩。零时间点是具有加入到细胞中之前的纳米粒子的小瓶的磁矩。零时间点时的未混合粒子没有磁矩,这证明未结合粒子在这种 SQUID 成像方法下没有产生磁信号。与细胞混合后,磁矩迅速增大并变得饱和,表明在这些细胞的表面上可能在 1 至 2 分钟内已经聚集了最大数目的纳米粒子。顶部曲线为淋巴瘤细胞系 U937,已知 U937 对 U937 抗体有非常强的特异性,大幅度的磁信号验证了这一点。下部曲线为同一细胞系,但所用的标记是非特异性标记 BSA,并在孵育之后表现出显著较低的磁矩。对于 BSA 的磁矩的存在指示这些细胞发生一定程度的吞噬,在这里这些纳米粒子进入这些细胞。U937 是 T 淋巴细胞的淋巴瘤,RS 是 B 淋巴细胞的淋巴瘤。因为淋巴细胞的主要目的之一是吸收不属于它的粒子,这种非特异性的量是在意料中的。这些结果证明了该抗体对靶癌细胞有特异性,并验证了仅有结合的粒子才产生磁矩。其他方法如 MRI 不能给出这种结果,它们看到所有粒子,不论结合或未结合的。

[0078] RS 细胞样品获自新墨西哥大学(University of New Mexico)的 Tissue Bank facility,为细胞存库和样品定量的国家认可机构。将 SQUID 传感器系统检测 RS 细胞的效率与通过手动血细胞计数器计数确定的样品中的 RS 细胞的数目进行比较。在分离程序中,用特异性结合到 CD15 和 CD30 上的纳米粒子标记这些分离的 RS 细胞。通过在 1/10 至 1/100,000 细胞的范围内连续稀释进行灵敏度校准。恶性细胞上的纳米粒子密度范围超过 107 纳米粒子/细胞。使用量化受体/细胞的流式细胞术测定 CD15 的位点密度。使用定量免疫荧光染色技术证实 CD15 和 CD30 位点数目/细胞。

[0079] 图 27 是对来自淋巴系统的 RS 细胞进行的用以确定纳米粒子可用的位点数目的流式细胞术测量结果、和 SQUID 传感器的检测结果的图解。图 27A 是显示从淋巴结样本中分离的 RS 细胞的形态外观照片。图 27B 显示骨髓样品的流式细胞术分析结果,其中(B1)是在为了增强用于流式细胞术的样品中的 RS 细胞频率进行富集程序之前,(B2)是在进行所述富集程序之后。通常,RS 细胞以正常淋巴细胞的 1/104 或 1/105 的频率出现,并且必须在使用 CD15 和 CD30 染色之前通过流式细胞术增强以便能被检测到。SQUID 传感器系统检测出体内所有 RS 细胞,而且不需要取样,因而如流式细胞术测定法中所需的增强操作是没

有必要的。

[0080] 淋巴结是除胸腺以外的 RS 细胞累积的主要位点之一。图 28 是来自霍奇金病病人的组织学切片。这些 RS 细胞已经用免疫过氧化物酶染色法进行染色。抗体 CD15 在右侧示出, 抗体 CD30 在左侧示出。周围的细胞是淋巴结中的非恶性细胞。SQUID 传感器可以检测出在淋巴结中的数百个这些标记的 RS 细胞。

[0081] 前列腺癌检测的示例应用

[0082] 前列腺癌死亡率高, 因为缺乏具有标准筛选技术的早期检测。2009 年在美国的病例数量是在 192, 280 人之中有 27, 360 人死亡。前列腺癌占 9% 的男性死亡人数, 罹患前列腺癌的终生概率为 1/6。这种疾病通常未被检测出, 直到它已引起前列腺肥大、泌尿问题, 或已扩散到其他器官。该疾病的无症状检测通常通过指诊法、升高的 PSA 测试结果、或活检进行。PSA 测试目前被认为是不可靠的, 造成许多不必要的伴有感染危险的活检。指诊法也是非常主观的。对于前列腺癌的检测是非常有争议的。仅在美国的 PSA 测试成本就超过 30 亿美元, 在新英格兰医学杂志 (New England Journal of Medicine) 中报道的最近一项研究发现, 目前的筛选方法并不能降低超过 55 岁的男性的死亡率。本发明可以在这种癌症转移之前检测到它。

[0083] 用于检测组织中的前列腺癌的示例性方法包括: 将病人置于超导量子干涉仪传感器装置的测量台上; 将多个抗体标记的磁性纳米粒子注射到病人中用于特异性地结合到病人组织上; 施加均匀磁化脉冲场以磁化注射到病人中的纳米粒子; 并且检测磁化纳米粒子的残余磁场, 由此提供结合到病人组织上的纳米粒子的图像。该组织可以包含前列腺组织, 并且该抗体标记的磁性纳米粒子可以特异性地结合到前列腺癌细胞的抗原上。该抗体标记的磁性纳米粒子可包含用生物相容性涂层包覆的磁芯, 在其上附连有特异性抗体。例如, 该磁芯可包含铁磁性材料, 例如氧化铁。例如, 该生物相容性涂层可包含葡聚糖、羧基、或胺。对于前列腺癌的检测, 该特异性抗体可以是 PSMA 抗体。

[0084] 前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 是一种被大多数前列腺癌高度表达的跨膜糖蛋白。它也被称为 mAb 7E11。它表达于实体癌的肿瘤血管内皮表面上, 但不表达于正常前列腺细胞上。在前列腺癌中观察到的 PSMA 的量随着肿瘤严重性或级别而变化。流式细胞术已经显示, 这种抗体的大量受体位点存在于前列腺癌数个细胞系上, 包括 LNCaP 和 PC-3, 而 PSMA 阴性细胞系 DU-145 显示无表达。使磁性纳米粒子附连到这些阳性细胞系上的结果证明, 每个细胞具有 100 万或更多纳米粒子。就每个细胞的纳米粒子数和身体中肿瘤的深度而言, 这些结果与卵巢癌和乳腺癌相当, 并且使用 SQUID 传感器的生物磁性检测方法对前列腺癌的灵敏度与对卵巢癌 (如描述在上面通过引用结合的一种或多种有关应用中) 的灵敏度相同。有关卵巢癌的研究结果因而可以直接应用于前列腺癌检测和定位。与卵巢癌的 CA-125 抗体相比, PSMA 在体内前列腺特异性靶向策略中甚至是更具特异性的。

[0085] SQUID 传感器方法可以提供肿瘤中微血管结构的定量估测, 进而提供用于血管形成 (血管发生) 和单个肿瘤分级的新替代物。在使用纳米粒子的实验性前列腺癌模型中的肿瘤微血管表征的研究中已经显示, 肿瘤生长和侵袭性 / 级别与肿瘤新生血管形成有直接关系。其他研究估测肿瘤中磁性粒子的浓度为约 2.3mg 纳米粒子 / 克组织。在经由肝内动脉施用的放射性微球接受治疗的人肝癌病人的肿瘤中经常达到这个浓度; 这些纳米粒子倾向于集中在肿瘤血管生长环中。少于 1 纳克的量对于 SQUID 检测而言是足够的。体内测得的

抗体标记的纳米粒子的残余磁化强度振幅可以提供重要的前列腺癌诊断工具。信号强度取决于肿瘤细胞表面上抗原的密度,因而由纳米粒子产生的场强与前列腺肿瘤细胞上抗原位点的数量密度成比例。因而,粒子数和密度提供了所检测磁场的振幅。这种信息然后可以用于规划体内检测和帮助选择待用的纳米粒子。

[0086] 胶质母细胞瘤检测的示例应用

[0087] 脑癌尤其致命,并以多种形式出现。涉及胶质细胞的癌症是最普遍的形式,也是人类中最具侵袭性的脑肿瘤。不同的胶质细胞可以被涉及,导致少突神经胶质瘤(涉及少突神经胶质细胞)、星形细胞瘤(涉及星形细胞)和胶质母细胞瘤类型的癌症。后者是最经常发生的脑癌。这些类型的癌症通常会在非常短的时间内导致死亡。胶质母细胞瘤细胞可以被用来使这种类型的癌症成像的标记如 EGFR、81C6、和 PTN 抗体靶向。在人应用之前,小鼠模型和脑癌细胞系如 U-251 对于测试是可用的。

[0088] 靶向脑癌的一个重要考虑因素是递送附连有标记的纳米粒子穿过血脑屏障。这种屏障在与恶性肿瘤相关联的血管系统中稍微打开,但仍然是障碍物。用亲脂性表面包覆并然后结合到抗体或肽上的纳米粒子的使用增进了穿过该屏障的能力。另外,另一种途径是可以将带有标记的纳米粒子以胶束形式包封在具有脂质体表面的聚合物涂层中,一旦进入脑就立即轻微地施加热 RF 或超声脉冲使结合的纳米粒子从该聚合物释放出来。

[0089] 用于脑癌的示例性方法包括:将病人置于超导量子干涉仪传感器装置的测量台上;将多个抗体标记的磁性纳米粒子注射到病人中用于特异性地结合到病人脑肿瘤上;施加均匀磁化脉冲场以磁化注射到病人中的纳米粒子;并且检测磁化纳米粒子的残余磁场,由此提供结合到病人的组织上的纳米粒子的图像。靶标是脑肿瘤,该抗体标记的磁性纳米粒子可以特异性地结合到脑癌细胞的抗原上。该抗体标记的磁性纳米粒子可包含用生物相容性涂层包覆的磁芯,其上附连有特异性抗体。例如,该磁芯可以包含铁磁性材料,例如氧化铁。例如,该生物相容性涂层可包含葡聚糖、羧基、或胺。对于胶质母细胞瘤的检测,该特异性抗体可以为 EGFR 或类似抗体。

[0090] 血管发生 EGFR 具有数种形式,是被包括胶质母细胞瘤细胞在内的数种类型的癌细胞和不正常细胞过表达的表皮生长因子受体(EGFR)的变形形式。EGFR 目前正处在针对诊断有神经母细胞瘤的病人的免疫治疗临床试验中。它可以与适合于磁性弛豫检测并注射到身体中的磁性纳米粒子结合。这些磁性纳米粒子可以包含涂层,例如聚乙二醇(PEG),所述涂层将会增大靶向纳米粒子穿透血脑屏障的效力。在本发明的另一个示例实施方案中,附连有标记的磁性纳米粒子可以包含在能够穿透血脑屏障的聚合物涂层之内,并且然后在施加小 RF 加热脉冲或使用超声时释放出来。就每个细胞的纳米粒子数和身体中肿瘤的深度而言,使这些血管发生肽附连到磁性纳米粒子上和使这些纳米粒子附连到细胞上的结果与来自卵巢癌和乳腺癌的其他抗体使用结果相当。使用如 SQUID 传感器的系统的生物磁性检测方法对脑癌的灵敏度与对卵巢癌(如描述在上面通过引用结合的一种或多种有关应用中)的灵敏度相同。有关乳腺癌和卵巢癌的研究结果因而可以直接应用于脑癌检测和定位。

[0091] 胰腺癌检测的示例应用

[0092] 许多肿瘤标记存在于胰腺癌中。CA19-9 是一个标记实例,其在这种癌症中的水平升高,但是灵敏度(77%)和特异性(87%)不是非常高。M. D. Anderson Cancer Center 建议使用标记的组合,正在对这些标记的组合进行测试,用于筛选胰腺癌。这些标记是微 RNA,并

且包括 miR-21、MiR-210、miR-155 和 miR-196a。然而,这种组合也只达到低灵敏度(64%),但特异性(89%)高于 CA19-9。另外,已经鉴定出针对人胰腺癌的某些细胞系例如 FG 细胞系的许多抗体,这些包括 S3-15、S3-23、S3-41、S3-60、S3-110 和 S3-53。另一种鉴定标记是尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(uPAR),其在胰腺癌以及肿瘤基质细胞中高度表达。后者标记已经被用来将磁性纳米粒子递送到作为在裸鼠中的异种移植物而生长的胰腺癌中。当用作标记的造影剂时,这些标记已经使得小鼠中的肿瘤能够用 MRI 检测。该机制主要是将纳米粒子递送到肿瘤内皮细胞中。

[0093] 对于胰腺癌的诊断,目前没有可靠的成像途径。因而,开发出作为 MRI 用靶向成像剂的生物标记、或者允许更灵敏的磁性弛豫测量技术是个重大的进步。MRI 可以检测肿瘤中的小异常,并且在确定癌症是否已经转移方面是有用的。动态对比增强(DCE)MRI 有可能在良性与癌性肿瘤之间进行区分,但产生许多假阳性。MRI 的费用限制了它作为筛选用具的应用。肿瘤的 MRI 成像经常使用磁性纳米粒子作为如上所述的造影剂,是提供此种纳米粒子注射标准的公认方案。2mg 纳米粒子 /kg 体重剂量的血管内 MRI 造影剂已经用于检测转移病灶。然而,MRI 在胰腺癌中的使用受到严重限制。

[0094] 本发明可以提供肿瘤中微血管结构的定量估测,进而提供用于血管形成(血管发生)和单个肿瘤分级的新替代物。在使用纳米粒子的实验性胰腺癌模型中的肿瘤微血管表征的研究中已经显示,肿瘤生长和侵袭性 / 级别与肿瘤新生血管形成有直接关系。其他研究估测肿瘤中磁性粒子的浓度为约 2.3mg 纳米粒子 / 克组织在经由肝内动脉施用的放射性微球接受治疗的人肝癌病人的肿瘤中经常达到这个浓度;该纳米粒子倾向于集中在肿瘤血管生长环中。纳克对于本发明的检测而言是足够的。体内测得的抗体标记的纳米粒子的残余磁化强度振幅可以提供重要的胰腺癌诊断工具。信号强度取决于肿瘤细胞表面上抗原的密度,因而由纳米粒子产生的场强与胰腺肿瘤细胞上抗原位点的数量密度成比例。可以确定粒子数和密度从而提供所检测磁场的振幅。这种信息可以用于规划体内检测和帮助选择有待使用的纳米粒子。胰腺癌细胞系的实例包括已知对 uPAR 抗体有特异性的 FG 或 MIA PaCa-2。

[0095] 如在此所提出,本发明已经就不同的示例实施方案和设计考虑因素进行了描述。应当理解的是,以上描述对于本发明原理的应用仅仅是说明性的,本发明的范围由根据说明书解读的权利要求决定。本发明的其他变体和修改对于本领域技术人员而言是明显的。

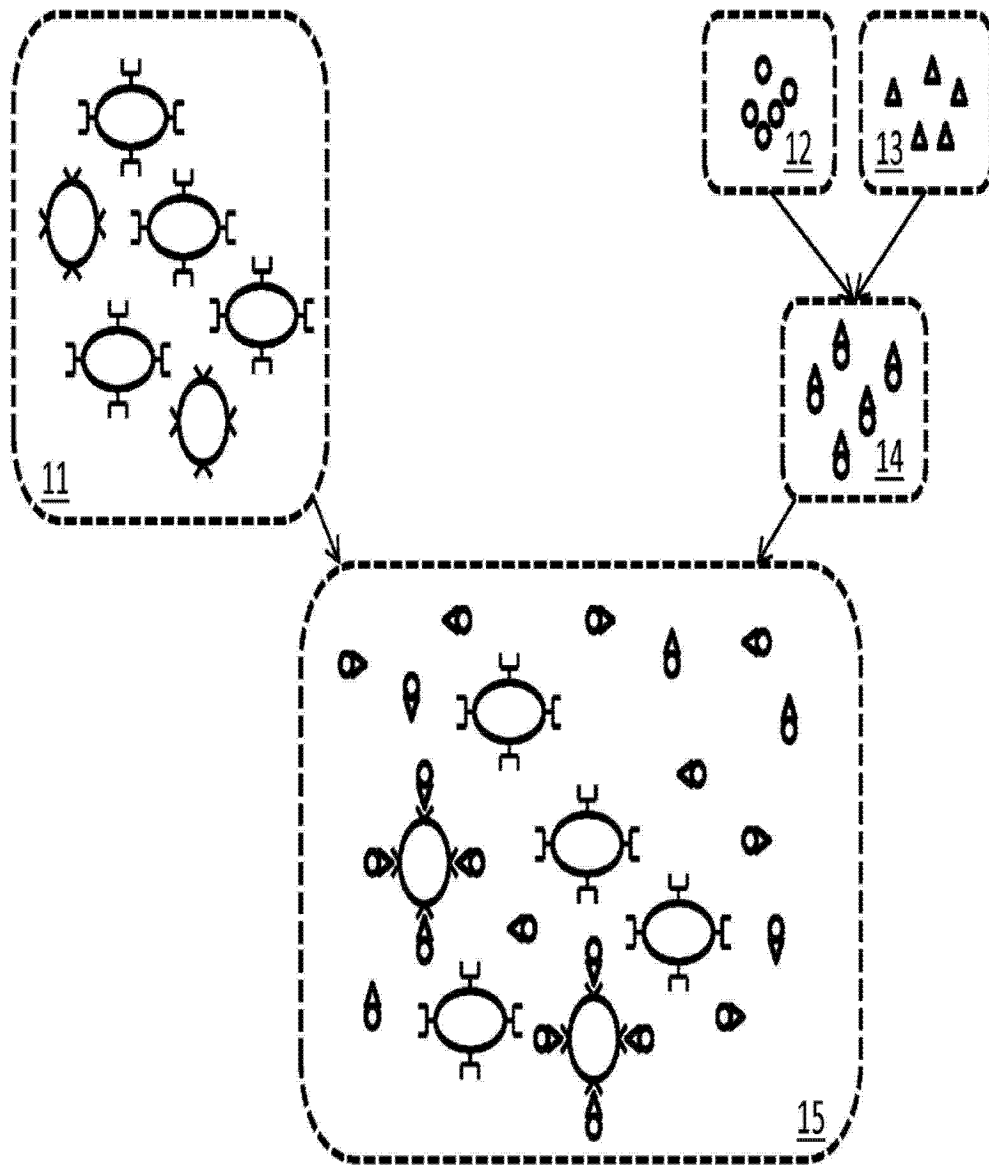


图 1

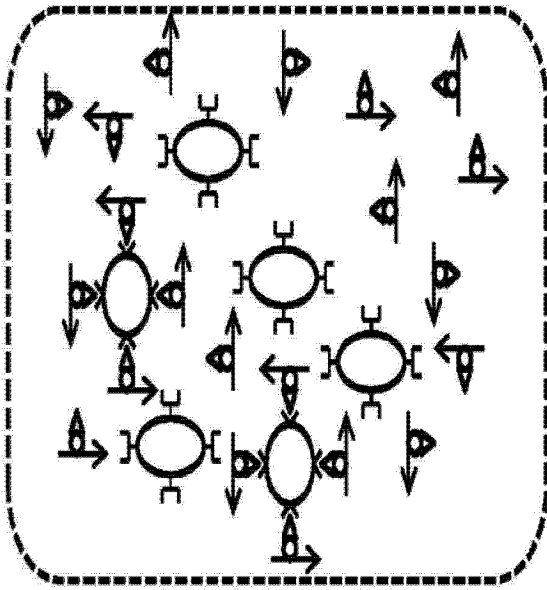


图 2a

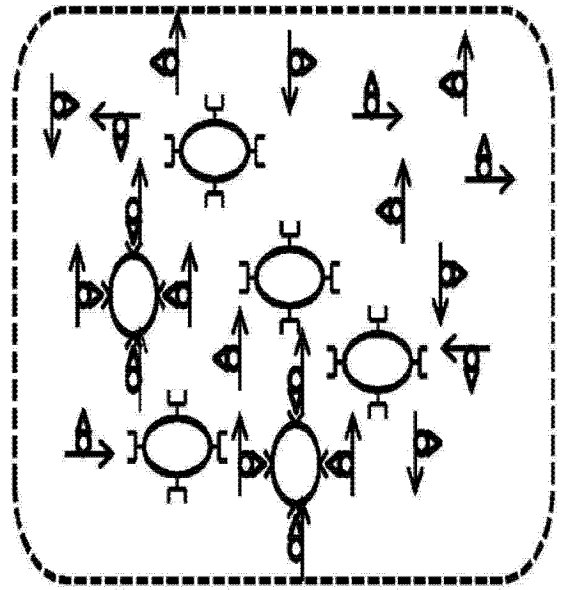


图 2c

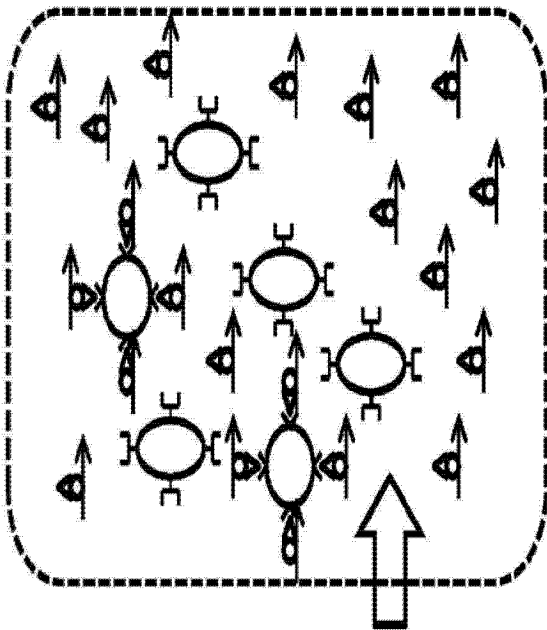


图 2b

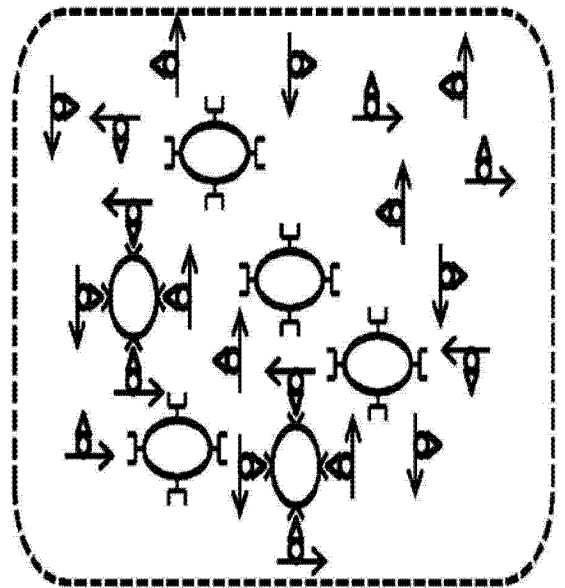


图 2d

图 2

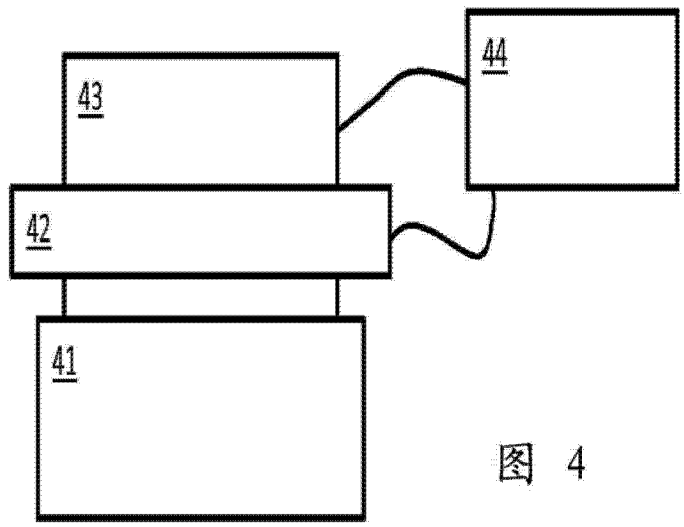
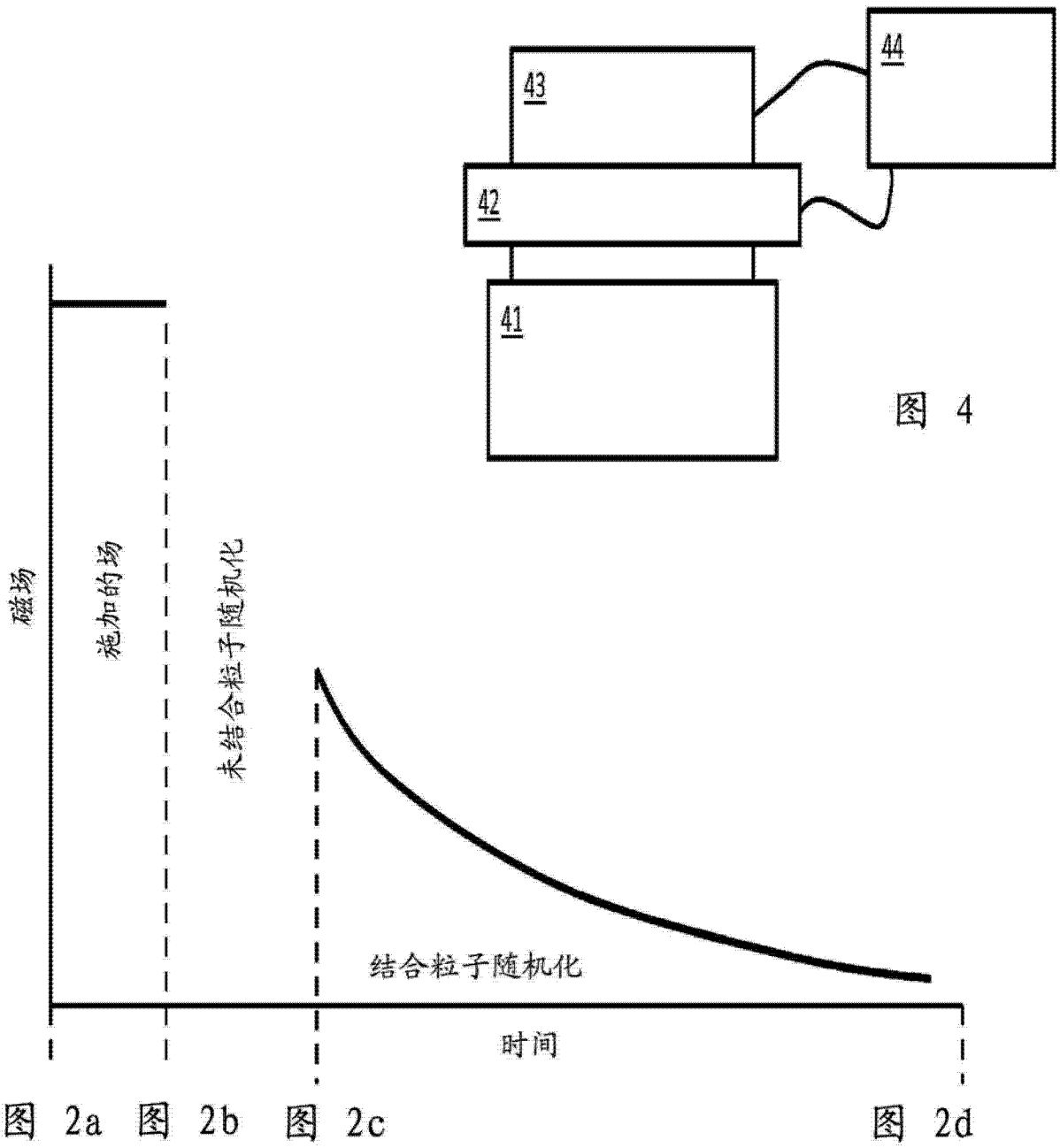


图 3

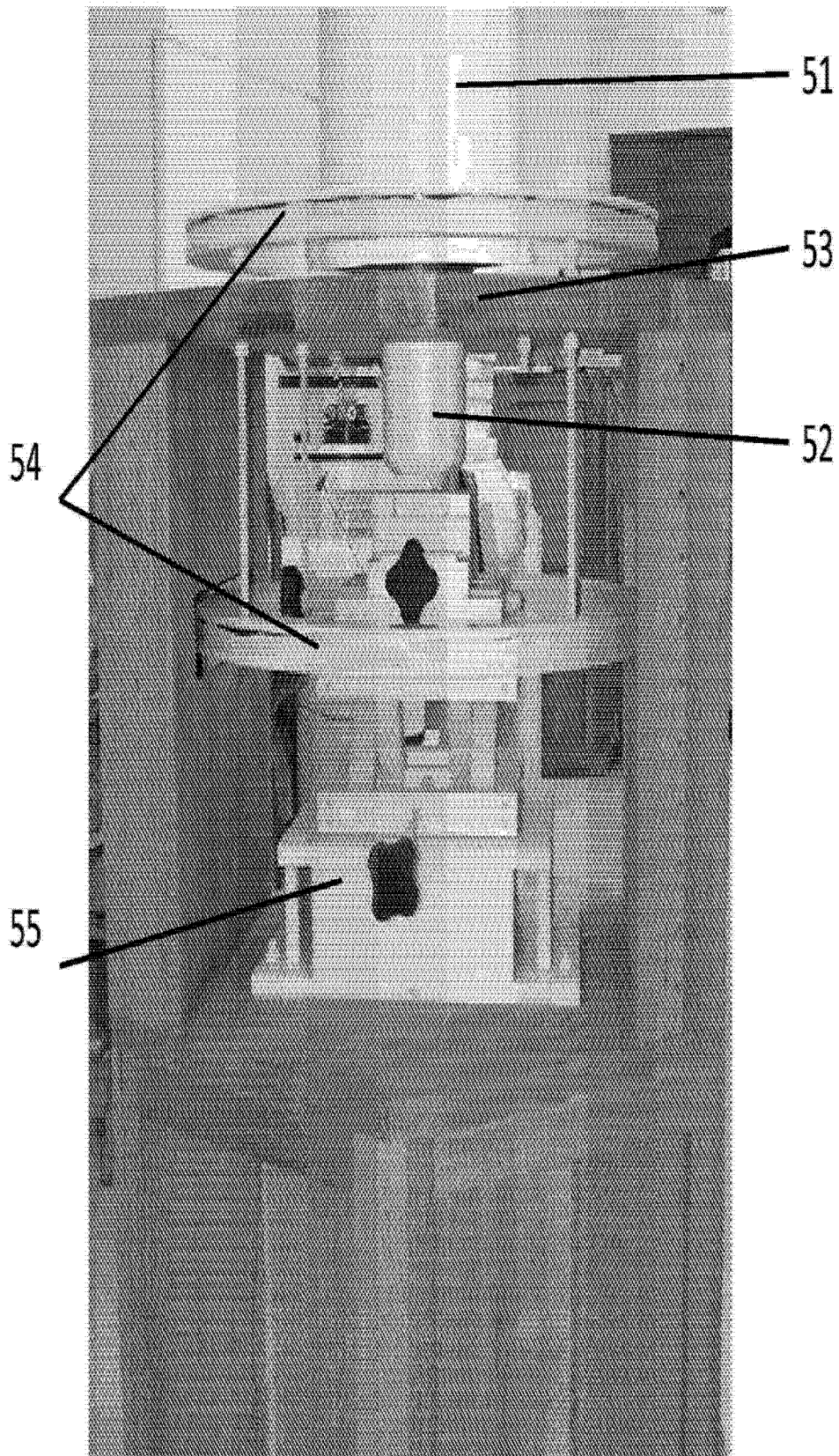


图 5

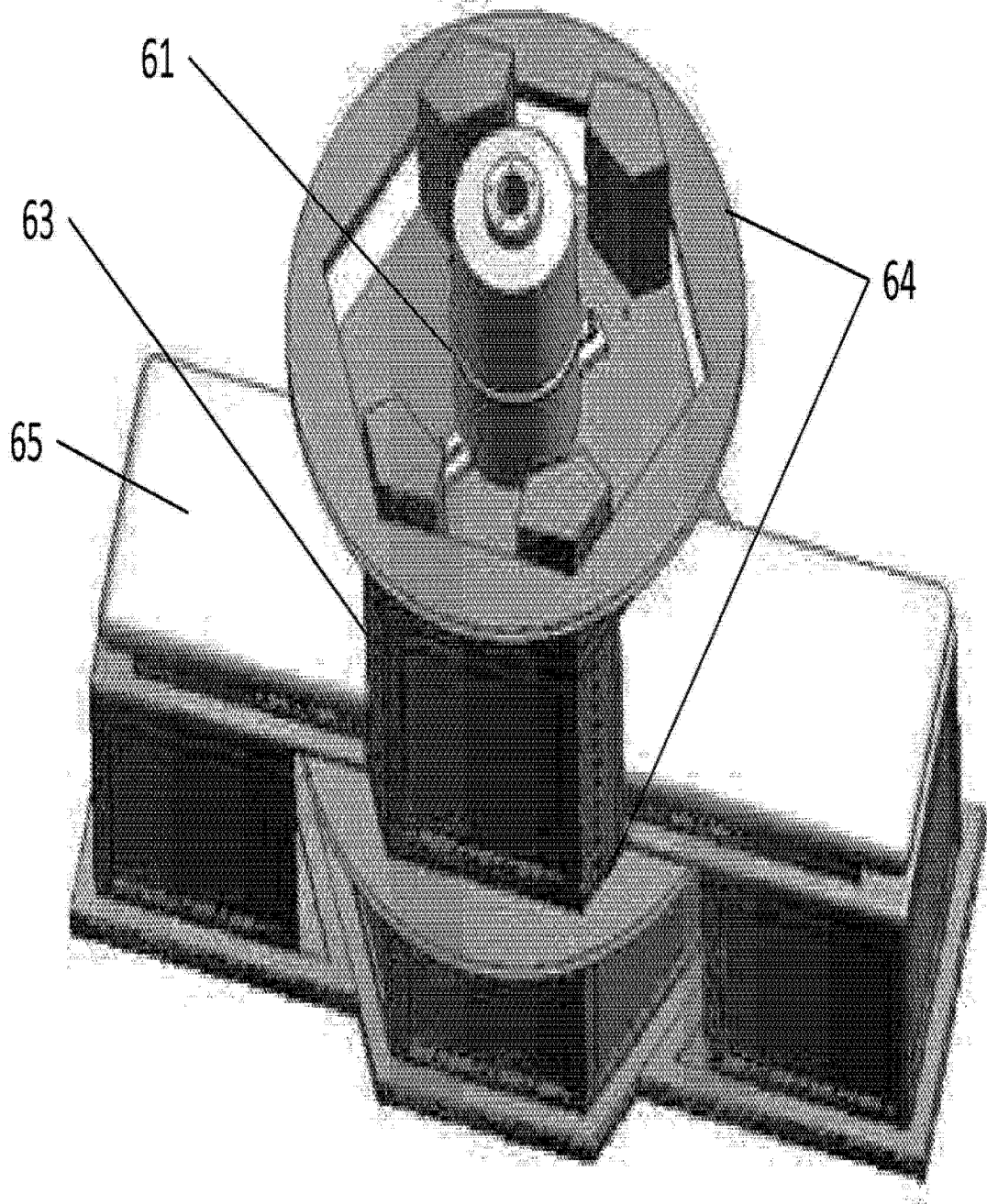
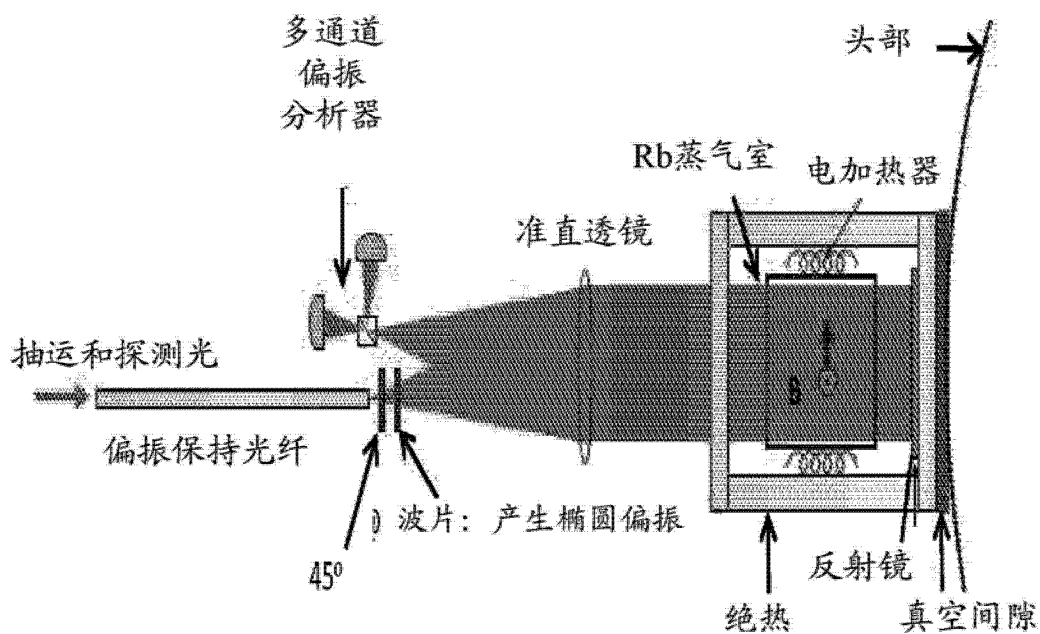


图 6



蒸气室与头部之间的距离约1 cm

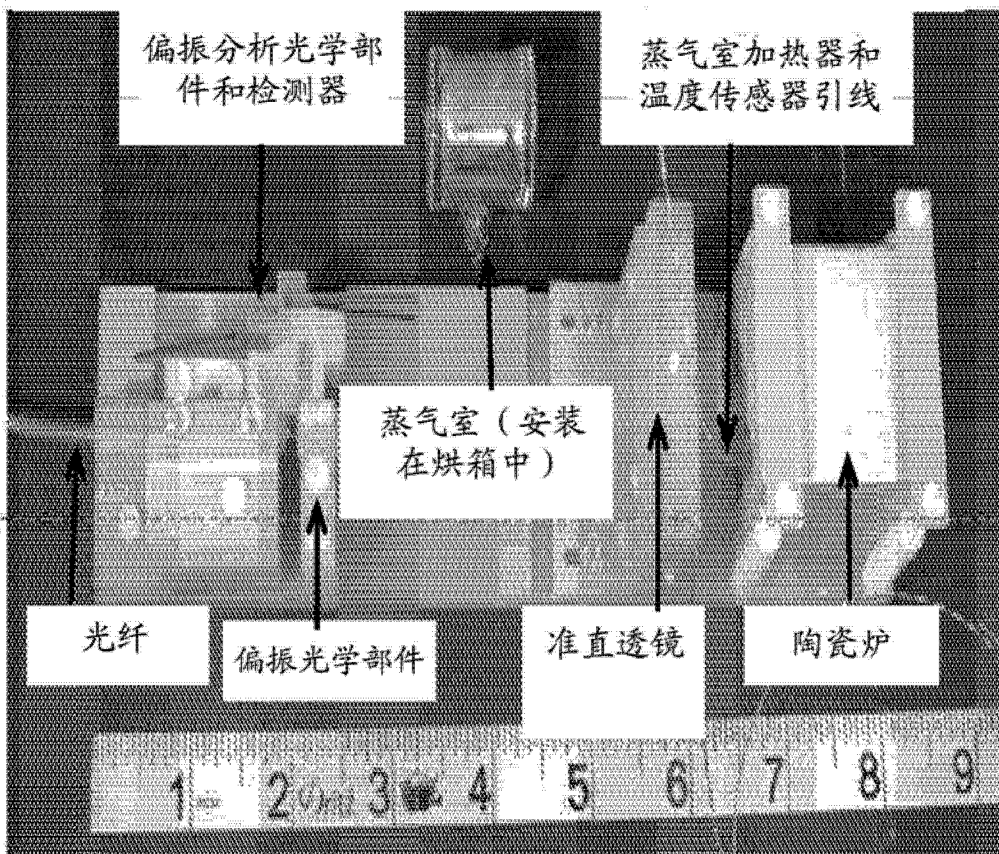


图 7

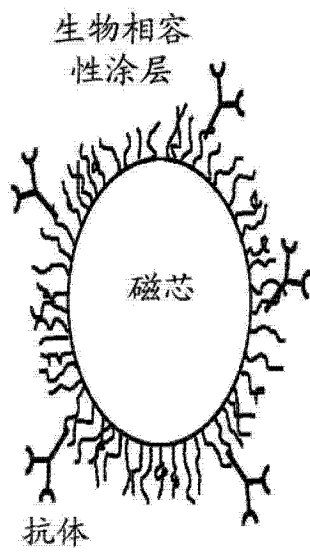


图 8

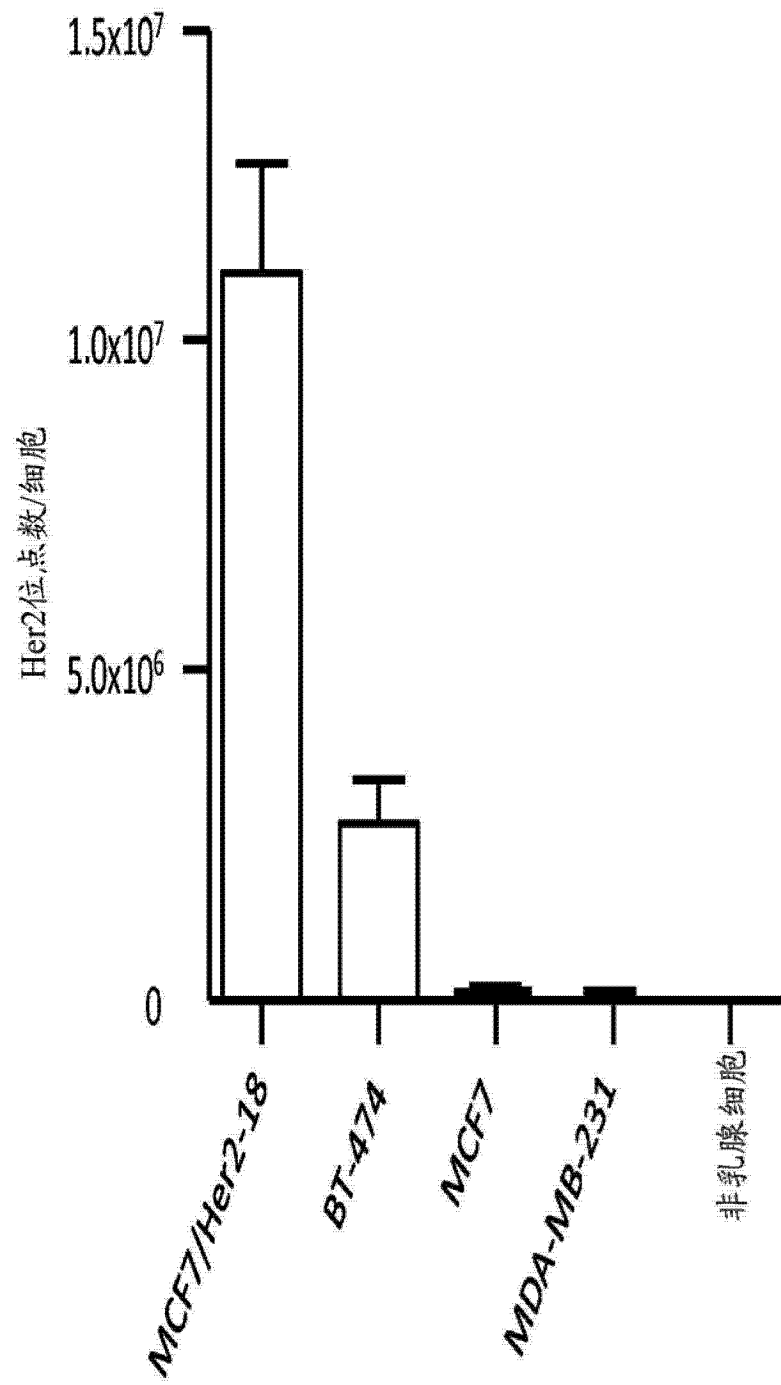


图 9

用于在RPMI中将Her2/neu标记的Ocean SAO5
纳米粒子附连到乳腺细胞系上的孵育曲线

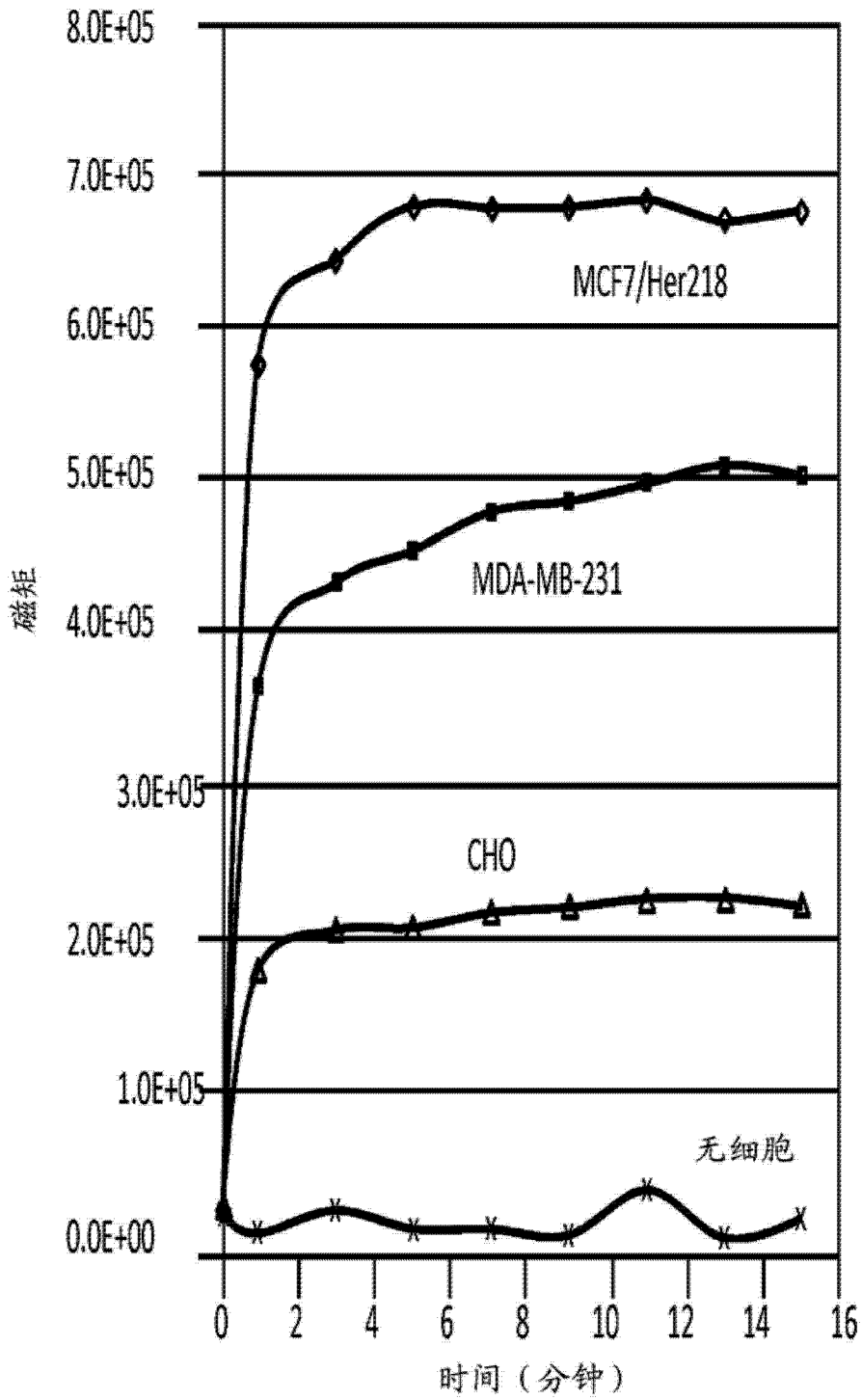


图 10

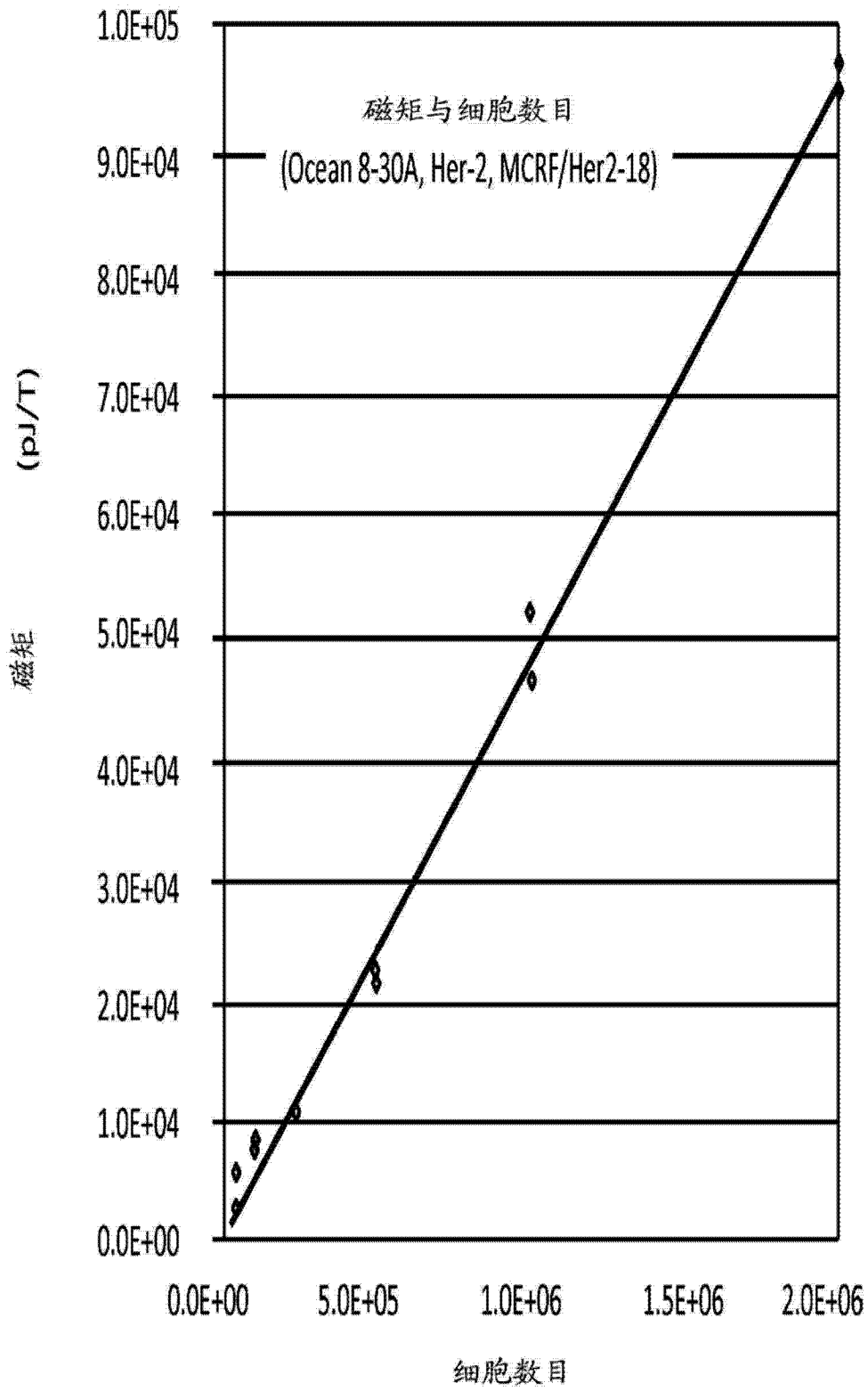


图 11

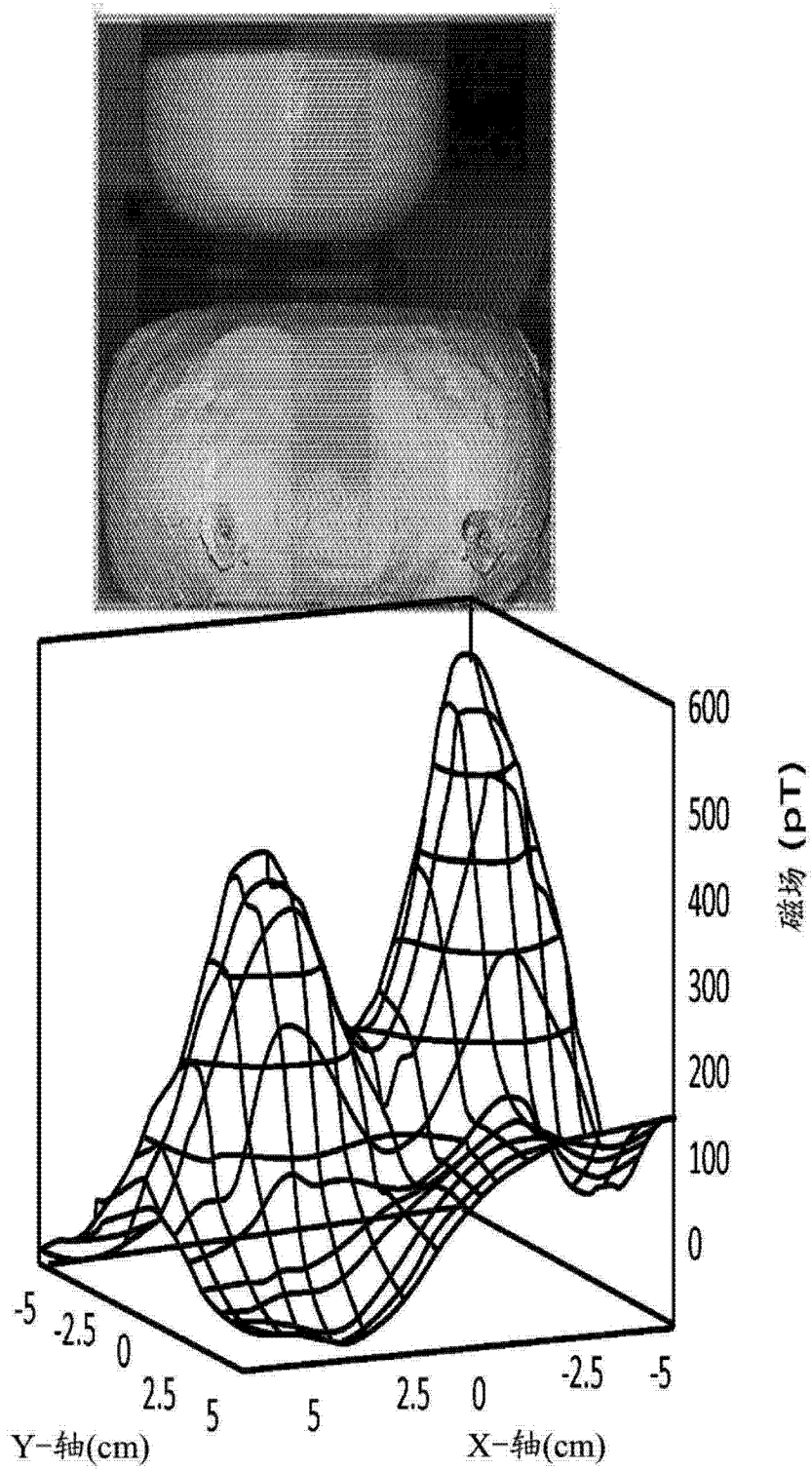


图 12

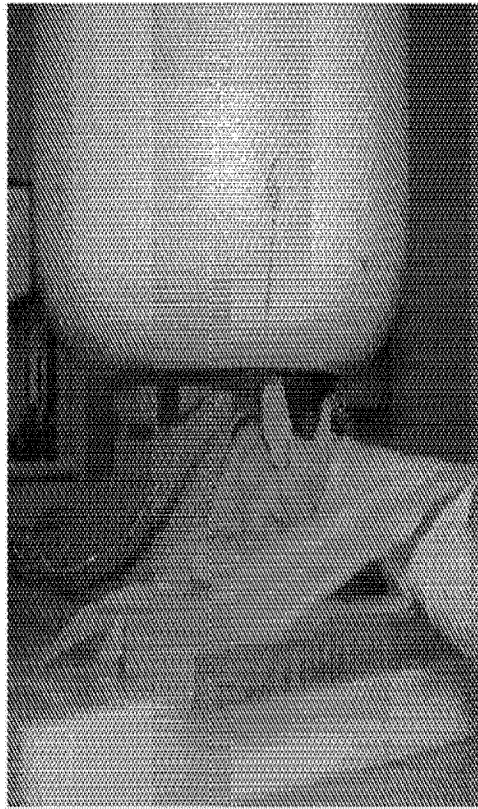


图 13

BR2-08-24-0025-cont-3D-置信-表面

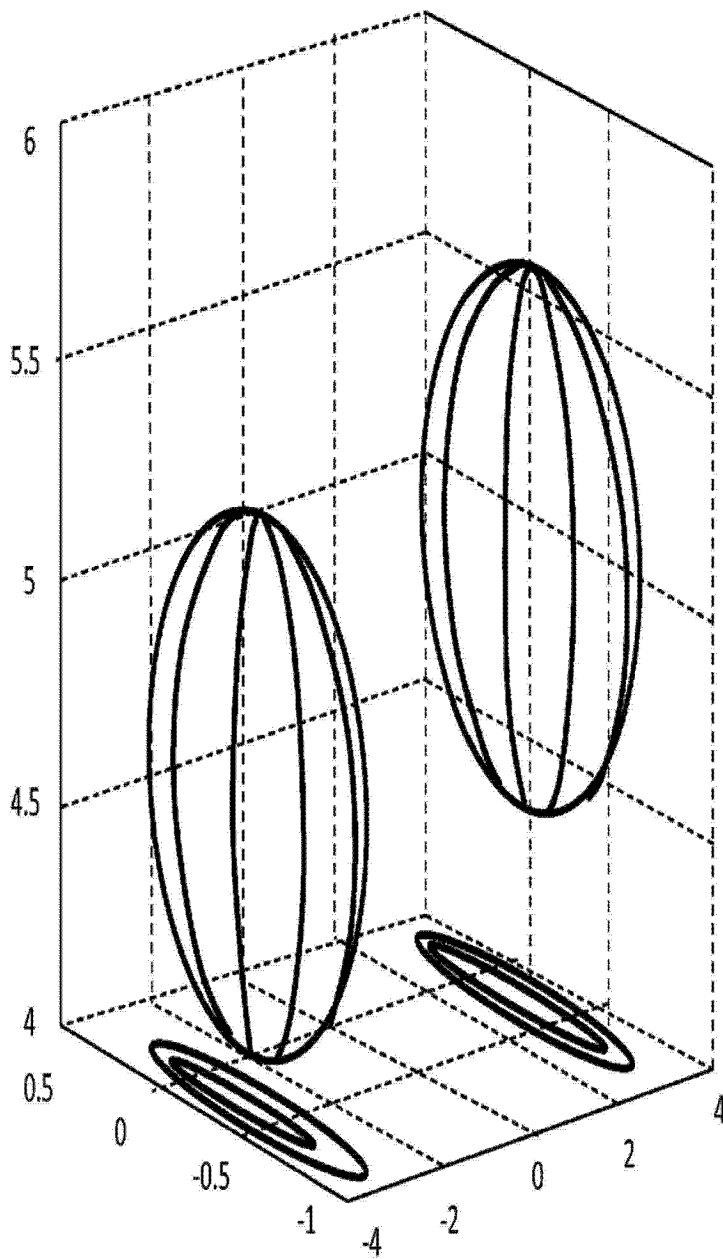


图 14



图 15

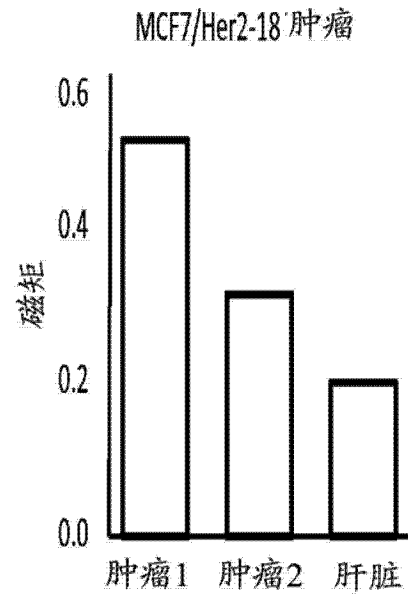
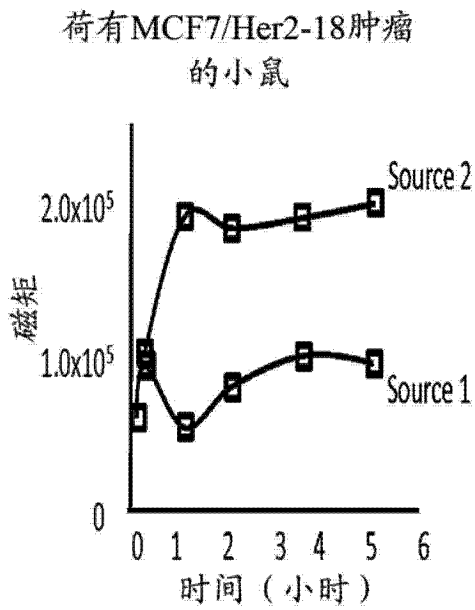
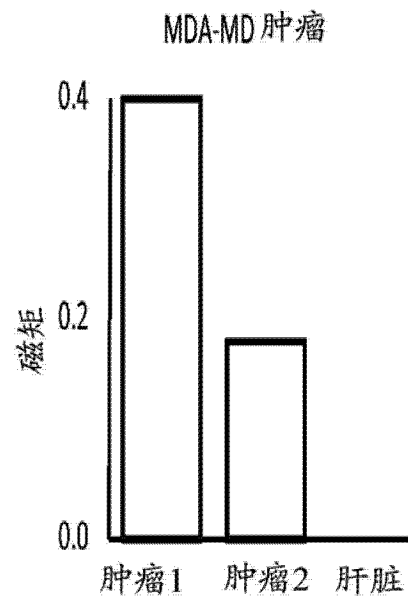
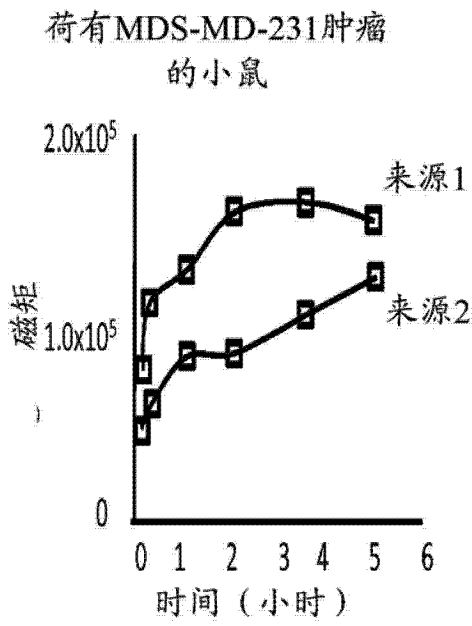


图 16

图 17

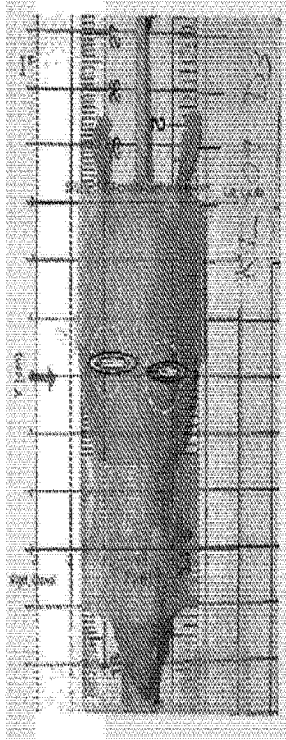


图 18

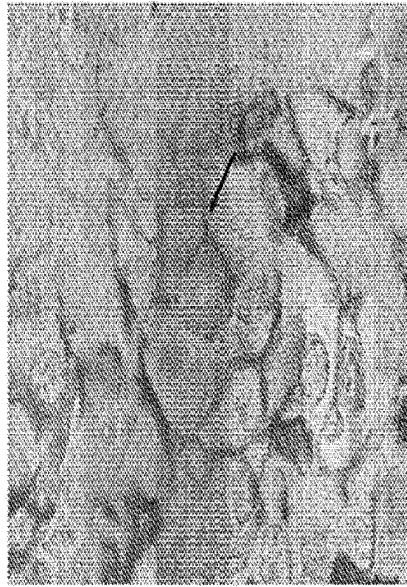


图 19

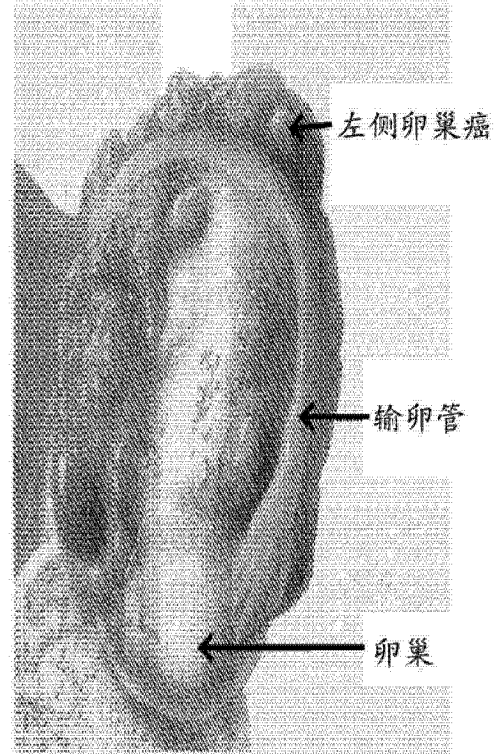


图 20

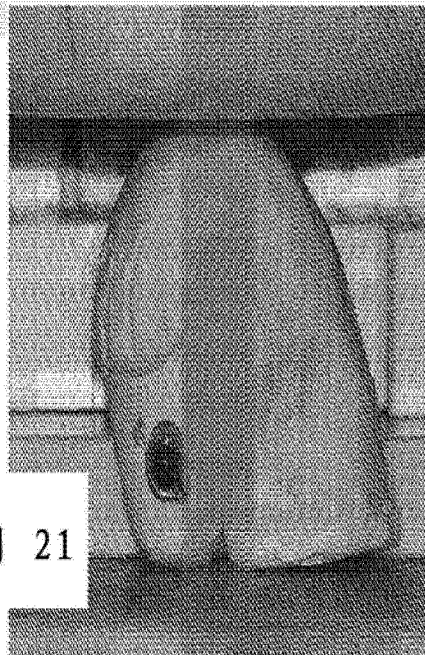


图 21

对于3种卵巢细胞系 (CA-125抗体) 的可检测到的最低细胞数目与深度

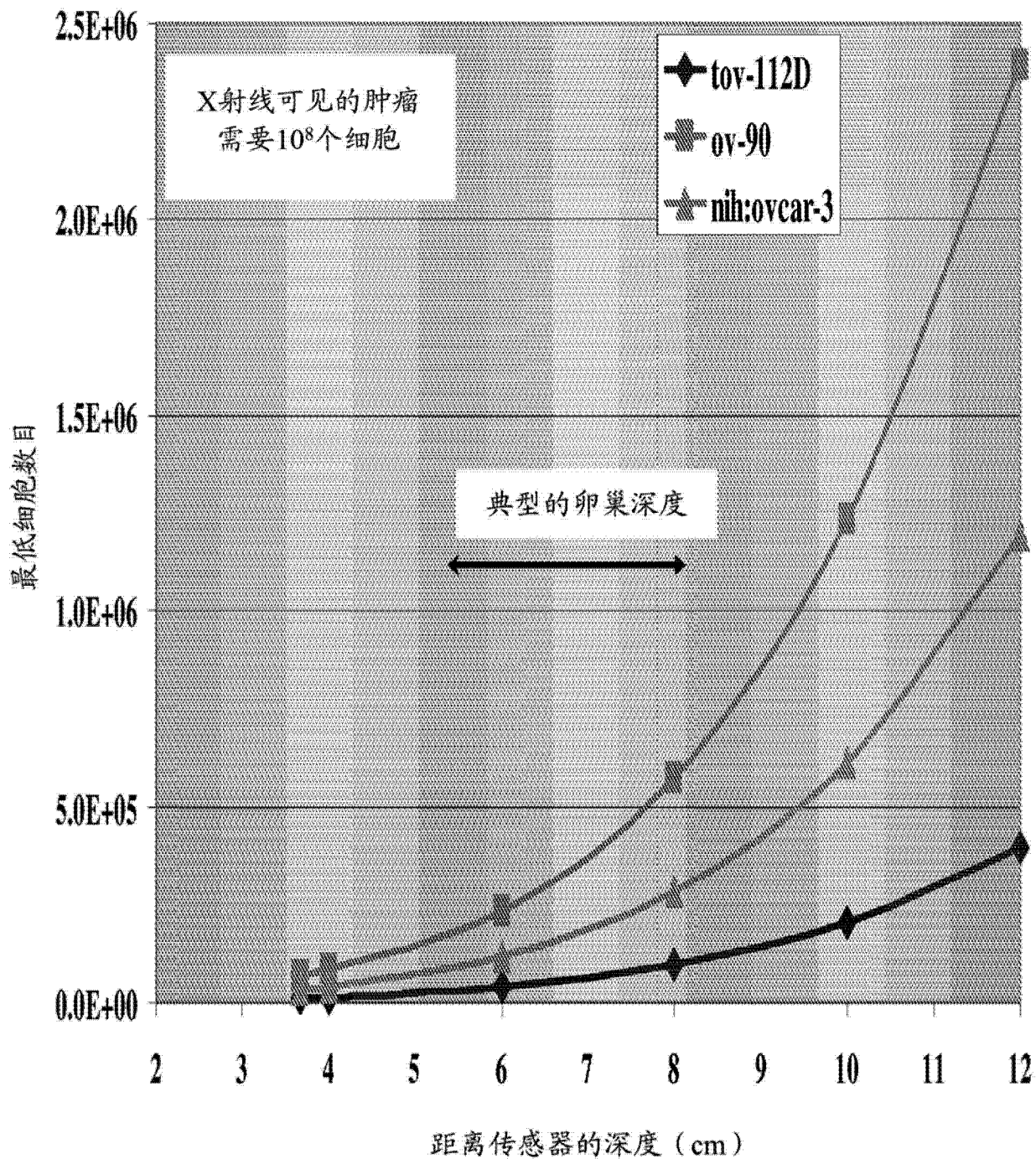


图 22

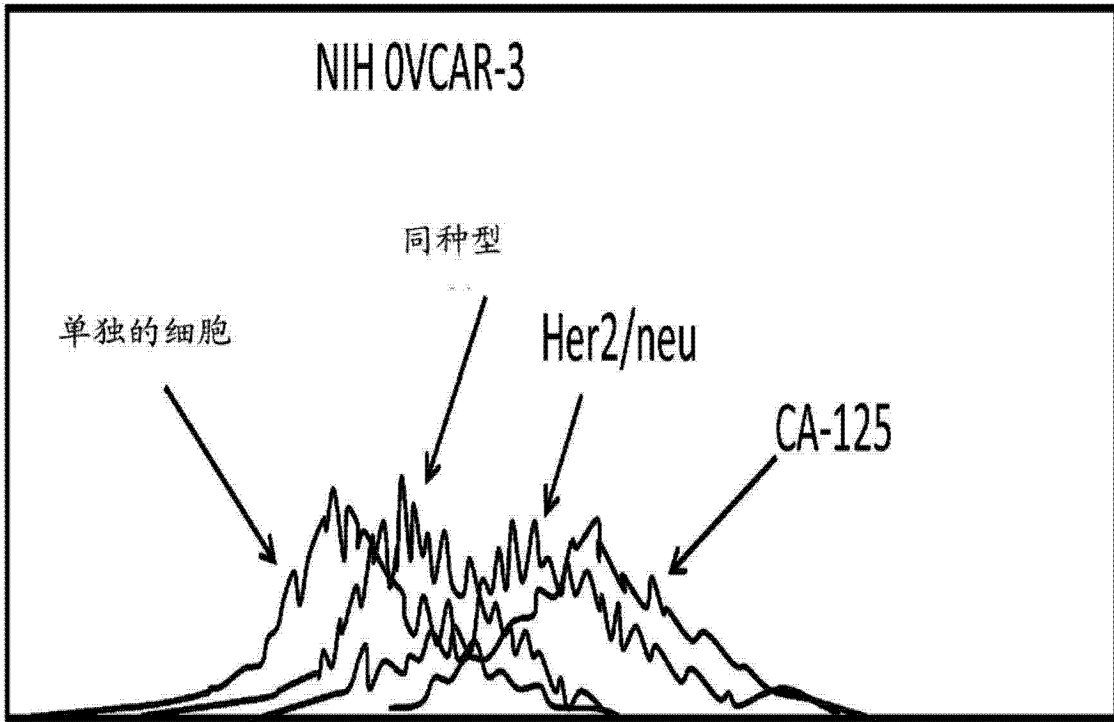


图 23a

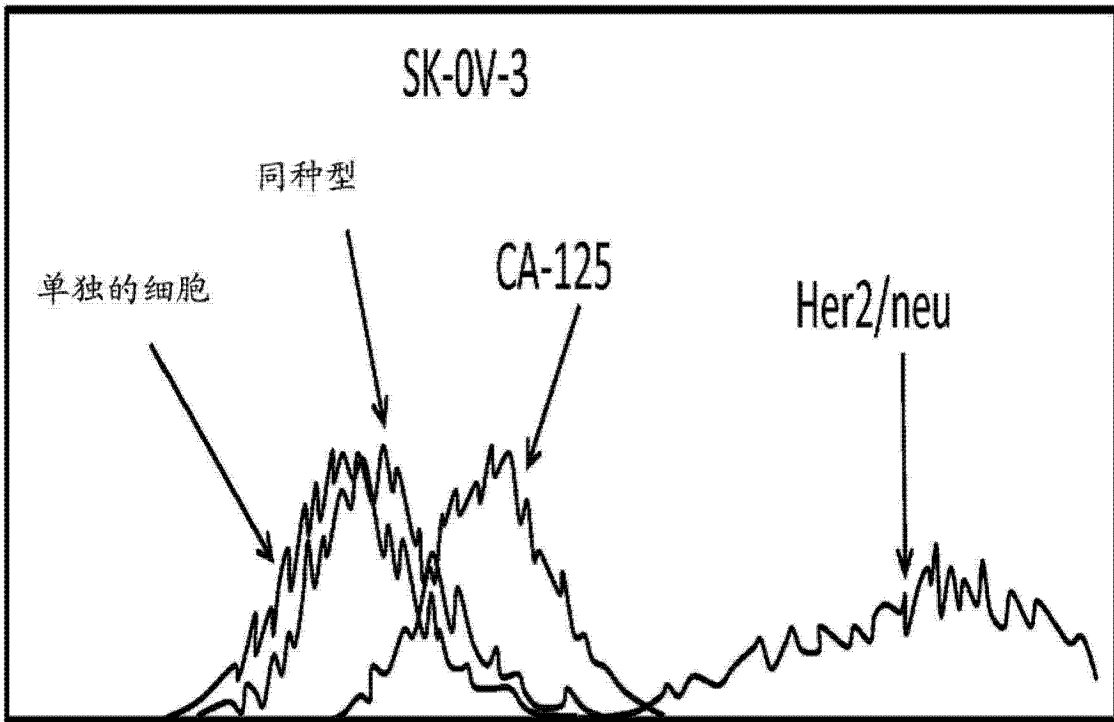


图 23b

卵巢的小鼠IT结果

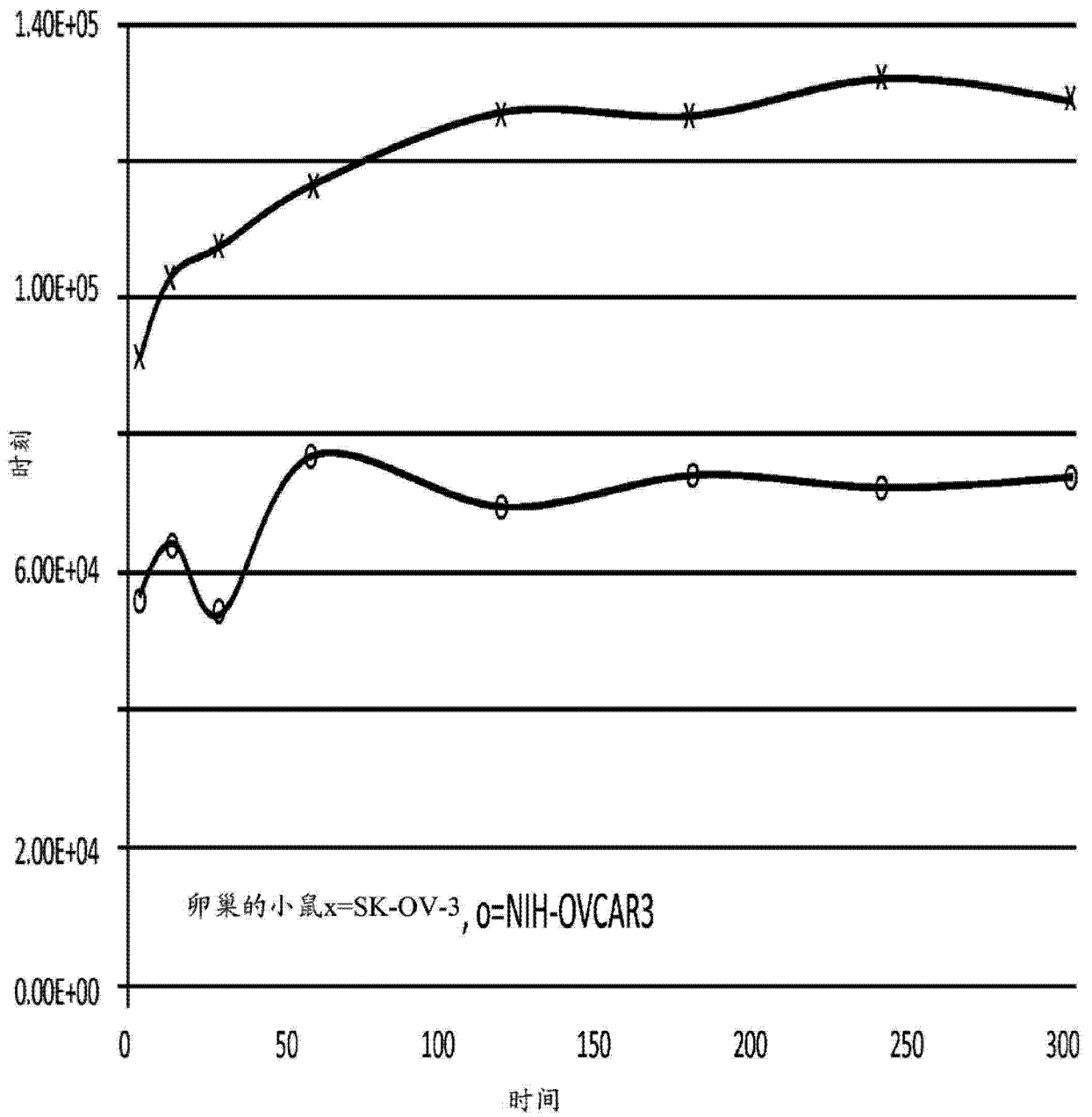


图 24

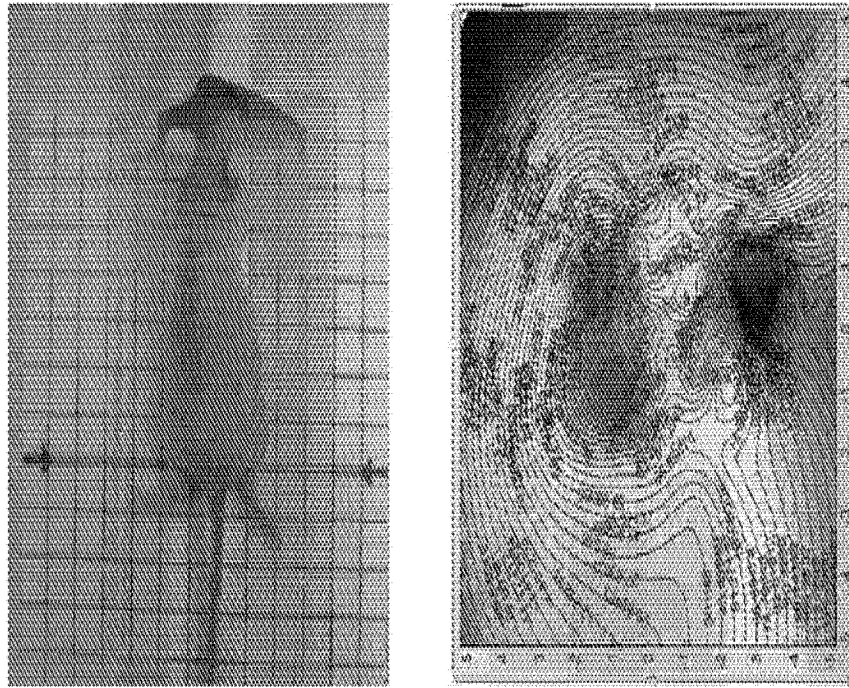


图 25

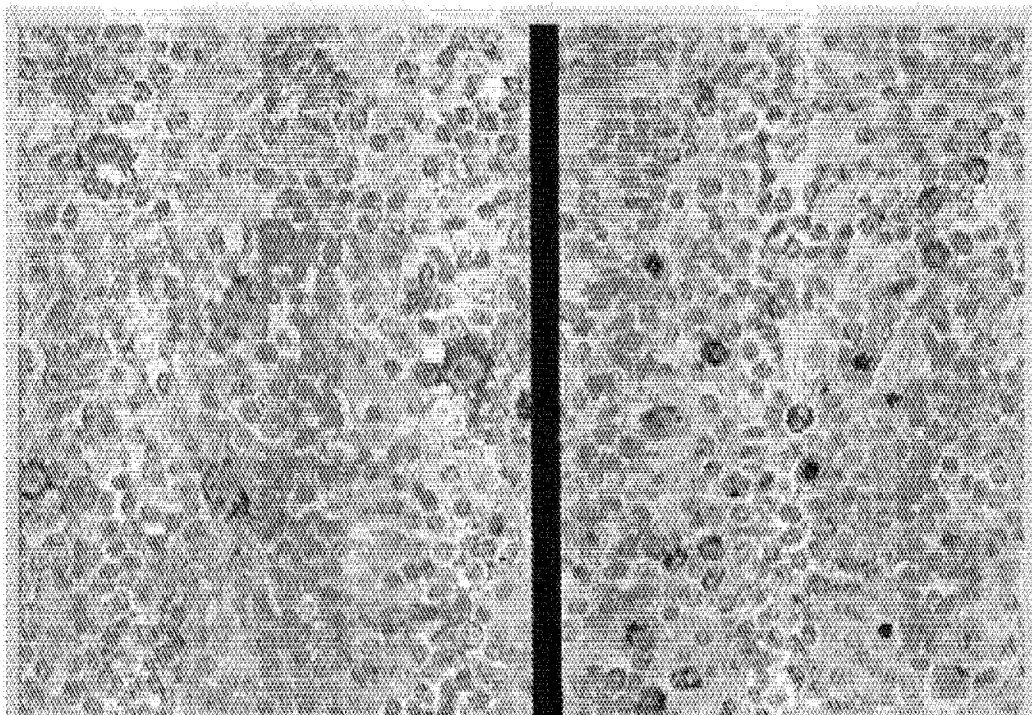


图 28

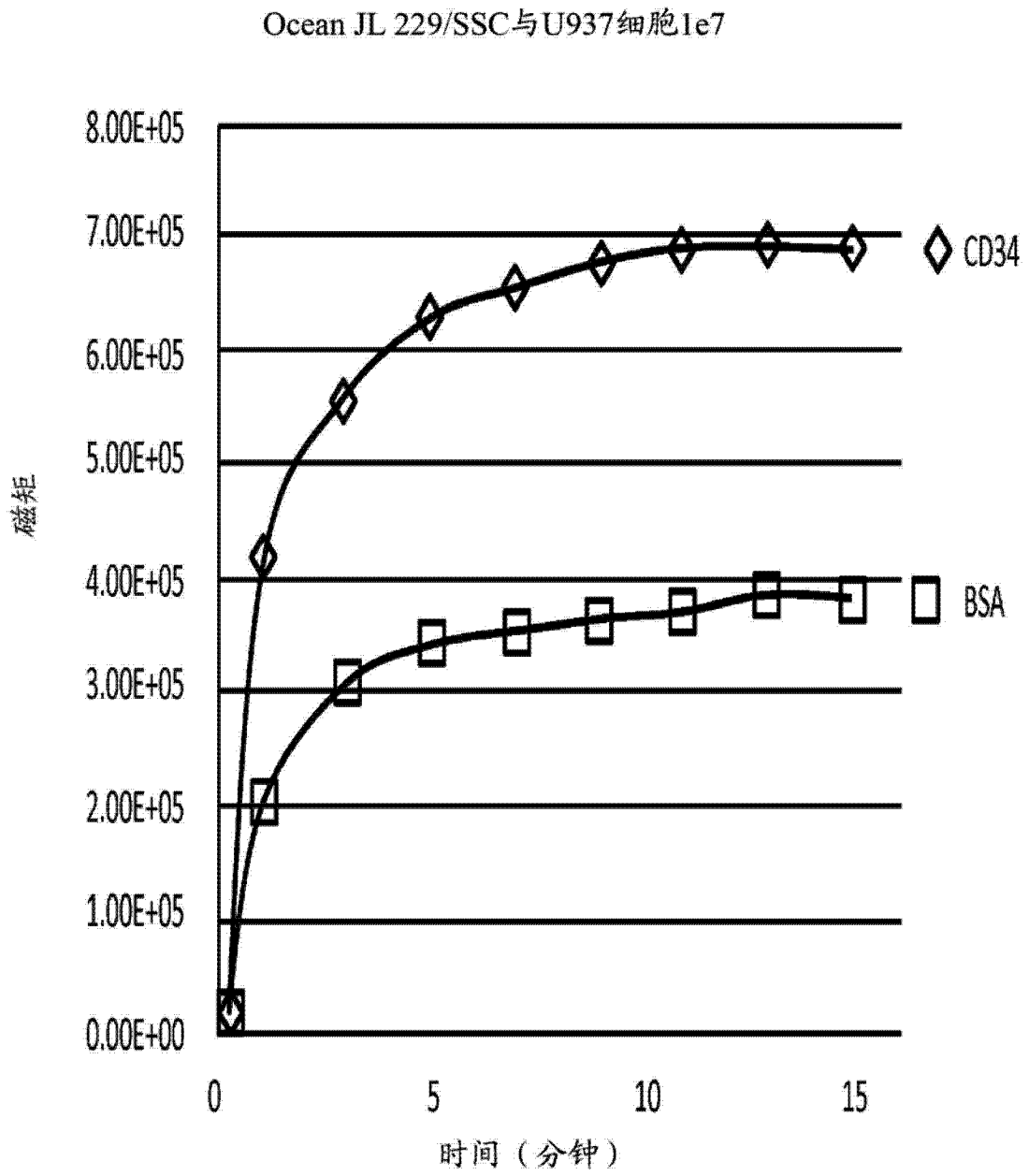


图 26

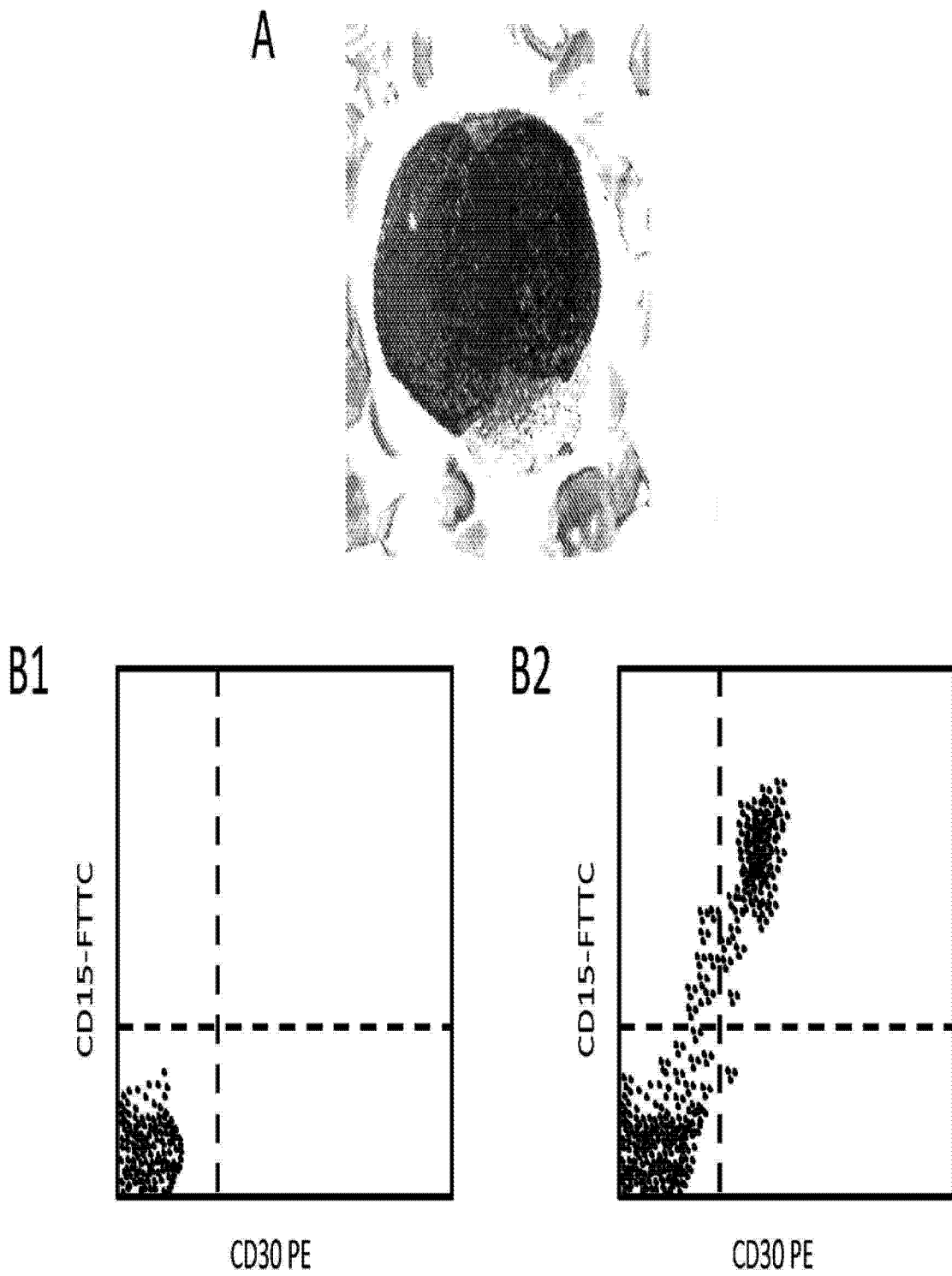


图 27