



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101796416 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 11

(21) 申请号 200880105993. 1

(22) 申请日 2008. 09. 02

(30) 优先权数据

60/970, 617 2007. 09. 07 US

12/201, 190 2008. 08. 29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 03. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/010305 2008. 09. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/032236 EN 2009. 03. 12

(73) 专利权人 卡尔斯特里姆保健公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 R·帕皮内尼 J·W·哈德

W·E·麦克劳克林 D·L·维扎

T·纪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 段晓玲 付磊

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007/126834 A2, 2007. 11. 08, 全文.

WO 2007/120579 A2, 2007. 10. 25, 摘要, 第 1 页第 4-6 行, 第 27-28、40 页, 权利要求第 1-85 项.

WO 2008/036117 A2, 2008. 03. 27, 全文.

EP 0476545 A1, 1992. 03. 25, 全文.

ALGAR WR ET AL. Fluorescence resonance energy transfer and complex formation between thiazole orange and various dye-DNA conjugates: implications in signaling nucleic acid hybridization. 《JOURNAL OF FLUORESCENCE》. 2006, 第 16 卷 (第 4 期), 555-567.

审查员 朱宁

权利要求书1页 说明书18页 附图1页

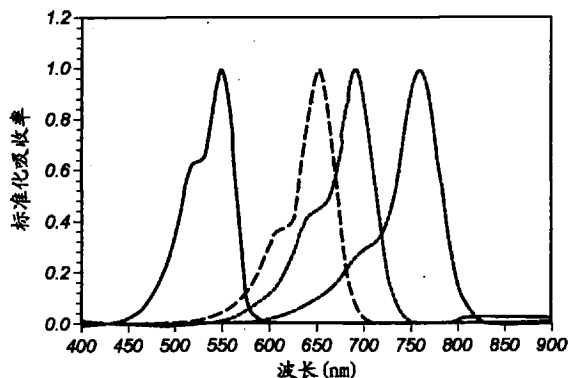
(54) 发明名称

采用纳米颗粒的荧光共振能量转移检测

(57) 摘要

公开了由胺官能化聚乙二醇组成的纳米颗粒的结合物, 其中一种颗粒含有具有第一种波长激发最大值的荧光给体染料和至少一种附加颗粒含有具有第二种更高波长激发最大值的第二种荧光染料, 这些颗粒具有连接于它们的外表面上的相同或不同的生物分子靶向用结构部分。

纳米颗粒的吸收特性



1. 可视化试样中生物分子的紧密接近度的方法,该方法包括以下步骤:

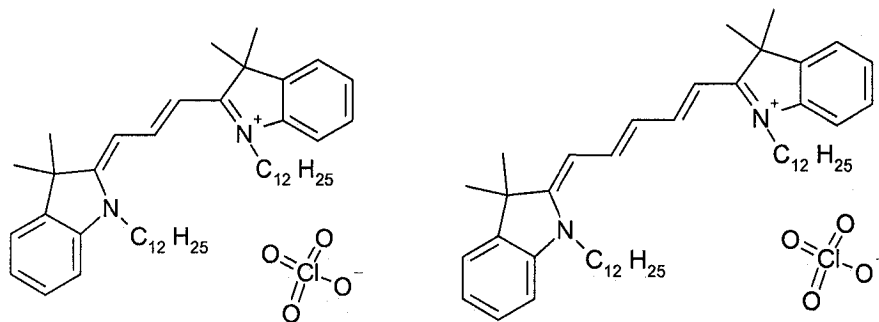
用 FRET 颗粒对处理该试样,该颗粒对包括:

两种或多种荧光颗粒,各自由甲基丙烯酸甲氧基乙基酯、二乙烯基苯、乙基苯乙烯和胺终端的聚乙二醇甲基丙烯酸酯盐酸盐组成,

FRET 颗粒对包括 650nm 和 690nm,690nm 和 760nm,或 650nm 和 760nm 的吸收最大值;

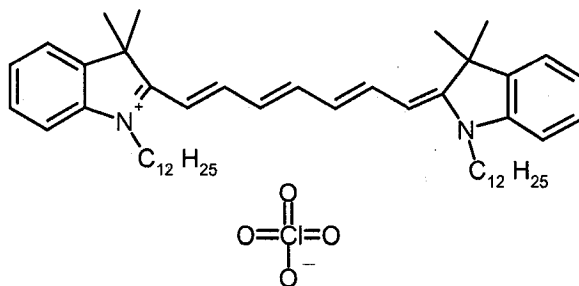
至少一种的荧光颗粒包括能量给体染料和至少一种其它的荧光颗粒包括能量受体染料,其中所述能量给体染料和能量受体染料分散于所述荧光颗粒内,和

各荧光颗粒包括以共价键连接于外表面的一种或多种靶向用结构部分,所述荧光颗粒具有 10-100nm 粒度且包括在 500 和 900nm 之间具有吸收最大值并且选自如下的染料:



染料 1

染料 2



染料 4;

和

将试样暴露于光源和用检测器记录发射的光,其中该光源包括激发滤光片和该检测器包括发射滤光片。

2. 权利要求 1 的方法,其中该光源包括单色仪和该检测器包括单色仪。

3. 权利要求 1 的方法,其中检测器是光电倍增管。

4. 权利要求 1 的方法,其中检测器是数字式摄像机。

采用纳米颗粒的荧光共振能量转移检测

[0001] 本发明的领域

[0002] 本发明一般性涉及在负载染料的不同纳米颗粒之间的荧光共振能量转移 (FRET)，该染料具有合适的激发和发射光谱以便用于 FRET 检测，尤其近红外线 FRET (NIRF) 检测。更具体地说，本发明涉及新型颗粒的制备以及利用此类颗粒之间的 FRET 来检测或可视化 (visualize) 生物相互作用 (biological interactions) 的方法，和生物分子靶向用结构部分用于测定生物分子的紧密接近度 (close proximity) 的用途。

[0003] 本发明的背景

[0004] 光学型生物分子分析技术如光学微量滴定板读数和光学分子成像方法，是研究特定生物分子的瞬间和空间动力学以及这些分子在体外和体内的实时相互作用的非常有效的手段。这些技术已经越来越多地用于探测蛋白质功能和基因表达。光学型技术显示出以下几个方面的巨大优点：在功能成像中显得重要的微微秒 (picosecond) 时间分辨率，对于体内显微镜检查来说显得重要的亚微米空间分辨率，单个分子敏感性，和最小限度的侵入。这些技术还提供了在分子成像中显得重要的多个和可识别的探针的同时使用的潜力。它们还提供因为排除电离辐射所带来的安全性。由于激光技术的快速发展，复杂的重建算法和最初为非光学的层析成像模式如 CT 和 MRI 所开发的成像软件，这些技术在过去的十年中有显著的发展。

[0005] 在迄今研究的各种光学成像技术中，近红外线荧光 (NIRF) 成像法对于非侵入的体内成像是特别重要的，这归因于相对低的组织吸收率，近红外线 (NIR) 光的最小限度的自身荧光，和高达 6–8 厘米的深度组织穿透 (能力)。在近红外线荧光成像中，激光或适当过滤的光用作激发荧光的光源。激发光穿过身体组织。当它遇到近红外线荧光分子 (“造影剂”或“探针”) 时，激发光被吸收。该荧光分子然后发射出具有更长波长的荧光形式的光，因此在光谱上可与激发光区分。尽管生物组织被近红外线光的良好穿透，但是普通的近红外线荧光探针会受到许多的为其它造影剂所遇到的相同限制，其中包括低信噪比。

[0006] 许多的 NIRF 对比度增强型光学成像探针已经开发出来并且在小型动物中进行评价。这些研究已经确定了近红外线光学成像法在诊断、分子表征和许多疾病模型的治疗响应的监测上的用途。纳米颗粒已经越来越多地用于各种各样的生物医学应用如药物载体和成像剂。它们是工程材料，具有典型地小于 100nm 的尺寸，足够小从而能够到达身体的几乎任何地方并且能够容易地用各种的目标配体、多模态成像法所用的多个成像结构部分来衍生化，或负载造影剂的多个分子，从而为不同的成像模态提供在信号强度上的显著提升。纳米颗粒型成像探针的 NIRF 成像法快速地作为非侵入式癌症检测、诊断和治疗应用的先进技术而出现。若考虑到小分子的内部清除和非免疫屏蔽的化合物的网状内皮系统清除，纳米颗粒型成像探针提供了与小分子或低分子量聚合物型探针相比的潜在优点，如对于有效的肿瘤给药 (delivery) 的长的循环时间，因为小探针在体内快速排泄。几篇文献报道具有特征性的量子点 (QD) (Warren, C. W. et al. Science 1998, 281, 2016–2018)，其由包封在新型的基于聚合物或类脂的层内的半导体芯组成，可用于在动物中癌症成像的 NIRF 光学成像中。然而，大部分的 QD 由毒性物质如镉组成，并且还没有确定 QD 是充分稳定的以避免在

身体内变成毒性的。巧妙的纳米探针的设计和合成使得 NIRF 成像得以成功。

[0007] 荧光共振能量转移 (FRET) 检测的原理是以从激发给体染料分子到空间接近的受体染料分子上的能量转移为基础的。FRET 可用于测定在大约 1 到 8nm 范围内的在分子水平上的距离, 因为能量转移的效率 E 对于在给体和受体之间的距离 R 是非常敏感的并且按比例地衰减到 $R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$, 其中 R_0 是物质特定的 **Förster** 半径, 后者被定义为当效率是 50% 时的距离并且典型地在几个纳米 (低于 10nm) 的范围内。取决于受体分子的荧光量子效率, 从给体分子转移至受体分子的能量能够通过内部转换进行非辐射的松弛, 因此导致给体能量的淬灭, 或能够利用受体分子的荧光而发射出来。在本说明书的下面部分中, (a) 能够用作 FRET 的给体和受体的不同分子的对被称作“FRET 染料配对 (dye pair)”, 和 (b) 由包括 FRET 能的给体分子的一种纳米颗粒和包括不同的 FRET 能的受体分子的第二种不同的纳米颗粒组成的不同纳米颗粒的对, 该不同纳米颗粒的对被称作“FRET 颗粒对”。

[0008] 在生物系统中, FRET 用来检测适当标记的生物分子的相互的空间接近性。FRET 能够用作检测蛋白质相互作用的方法, 例如作为检测抗原抗体反应、受体 - 配体相互作用、核酸杂化、激素 - 受体相互作用或蛋白质与核酸的结合的一种方法。该检测本身通过测量在给体荧光或受体荧光的强度变化或光谱变化, 或通过测量在给体荧光的衰减时间上的变化来进行的。在这方面许多的应用已描述在文献中, 如在免疫荧光分析中特定抗原的检测 (美国专利 No. 3, 996, 345 ; 美国专利 No. 4, 160, 016 ; 美国专利 No. 4, 174, 384 ; 美国专利 No. 4, 199, 559)。

[0009] 用作标记和附着于生物分子如荧光素、水溶性花青或若丹明上的有机染料分子例如是制造 FRET 染料对的传统商购材料。这些有机荧光染料的一般缺点是它们常常显示出的光稳定性对于许多应用来说是不够的。特别地在氧气或自由基存在下, 这些染料中的一些在仅仅几个百万光吸收 / 光发射周期之后不可逆地损坏或破坏。同时, 一些荧光染料能够对于它们邻近的生物材料具有毒害作用。此外, 用作标记的荧光染料常常具有非常短的血循环时间, 使得它们对于研究随着时间的推移所发生的生物相互作用是不够的。

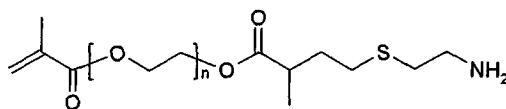
[0010] 美国专利 No. 5, 236, 692 ; 美国专利 No. 6, 238, 931 ; 和美国专利 No. 6, 251, 687 描述了使用在同一纳米颗粒中具有 FRET 染料对的纳米颗粒的方法。这些方法的目的是提供在激发波长和发射波长之间有大的净差异 (即, 大的净斯托克斯 (Stokes) 位移) 以改进荧光测量的信号与背景品质因数的颗粒, 其中该背景应归因于典型地具有相对小的斯托克斯位移的自身荧光。然而该 FRET 在相同颗粒中是恒定的并且无法提供在两种不同的颗粒之间接近度的指标, 例如一种颗粒连接 (attach) 于一个生物分子上和另一种颗粒连接于另一个生物分子上。因此这些参考文献描述了包括 FRET 染料对但不包括 FRET 颗粒对的颗粒。

[0011] 尽管此类方法已经在它们的特殊应用中实现一定程度的成功, 但是仍然需要一种方法, 其中包括 FRET 颗粒对的单独、不同的明亮的荧光纳米颗粒通过靶向生物分子以紧密接近地集合在一起并被检测到。

[0012] 本发明的概述

[0013] 本发明通过所附权利要求来定义。根据本发明的一个方面, 提供了可视化 (visualize) 在试样中生物分子的紧密接近度的方法。该试样用包括两种或多种荧光颗粒的那一类型的 FRET 颗粒对进行处理, 该颗粒各包括具有 30-50wt% 的通式 1 单体的交联聚合物:

[0014]



[0015] 通式 1,

[0016] 其中 n 是 10 到 200。荧光颗粒中的一种包括能量给体分子和荧光颗粒的另一种包括能量受体分子。各荧光颗粒包括以共价键连接于外表面的一种或多种靶向用结构部分。该试样暴露于光源并通过例如光电二极管、光电倍增管或数字式摄象机检测来自 FRET 颗粒对的发射光。

[0017] 附图简述

[0018] 本发明的上述和其它目的,特征和优点将从在附图中举例说明的本发明的实施方案的以下更具体叙述清楚地了解。

[0019] 附图的各元素相互之间不一定按比例。

[0020] 图 1 显示了负载染料的纳米颗粒的吸收曲线并且举例说明当这些颗粒的对用于形成选自于颗粒 A 和颗粒 B,颗粒 B 和颗粒 C,颗粒 B 和颗粒 D,颗粒 C 和颗粒 D 中的 FRET 颗粒对时在吸收上的重叠。

[0021] 发明的详细说明

[0022] 下面是本发明的优选实施方案的参考附图的详细说明,在附图中相同的参考编号表示在几个附图的每一个中的结构的相同单元。

[0023] 本发明涉及通过使用能够共同定位 (co-locate) 和进行 FRET 的明亮荧光纳米颗粒来可视化紧密接近的生物分子的新型方法,以及使用它们的诊断和药物筛选方法。这些分析对于活组织检查 (biopsy)、体液、血液分析和组织样品的医用诊断以及小分子、肽、蛋白质和 siRNA 的药物筛选是重要的。FRET 颗粒对能够根据本发明用于进行结合分析,抑制剂分析,受体-配体分析,细胞-相互作用物分析,激素相互作用分析,蛋白质-蛋白质相互作用分析,类脂 (lipid) 相互作用分析,糖蛋白相互作用分析,酶-底物相互作用分析,蛋白质组 (proteome) 分析,染色体组分析,蛋白酶作用分析,泛素 (ubiquitin) 分析,细胞器官分析,siRNA 分析, RNA 分析, DNA 分析,和用于分析以上任何一种的动力学。

[0024] 根据本发明的纳米颗粒可以呈现为生物学的货物装载型 (cargo-laden) 纳米颗粒的形式,该纳米颗粒已描述在悬而未决的、共同转让的美国专利申请序列号 No. 11/732,424 (2007 年 4 月 3 日申请) 中, Leon 等人,标题“LOADED LATEX OPTICAL MOLECULAR IMAGING PROBES”,它的公开内容被引入本说明书供参考,和描述在前面提及的 Harder 等人的申请序列号 No. 11/400,935 中。在此类纳米颗粒中,荧光猝灭 (fluorescence quenching) 可以通过近红外线荧光团的自猝灭或通过从近红外线荧光团到猝灭剂的能量转移来引起;和荧光活化可以通过在荧光活化位点上的酶分裂来诱导。

[0025] FRET 的检测或测量必然需要成像系统,该系统经过调节以提供所提纯或构造的样品物质的简单分析,或分辨复杂混合物的荧光组分,或两者。尽管荧光检测系统可以经过调节而具有足够的或最大的能力,但是支持检测和测量的特殊 FRET 颗粒对的选择则需要某些标准的考虑,就象本发明人所教导的。本领域中的那些技术人员将会理解,一些 FRET 分子可以支持一定水平的检测和测量,如果该对具有合适的谱、是稳固的荧光染料并且支持在溶液中的动态平衡 (它对于生产性 (productive) FRET 测量是重要的)。最低限度地生产

性的 (marginally productive) FRET 测量是超过荧光信号 / 背景的固有限制的那种。然而, 荧光颗粒不是可溶性分子, 并且它们的尺寸、成分和溶液动力学对于它们的 FRET 能力是关键的。本发明人已经发现了 FRET 颗粒对的质量评价标准, 包括:

[0026] 1. 荧光染料激发光谱必须是充分地不相重叠的。

[0027] 2. 荧光染料共振谱必须是充分地重叠。

[0028] 3. 荧光必须是充分明亮的。

[0029] 4. 在颗粒内的荧光染料浓度必须足够低以避免自淬灭。

[0030] 5. 颗粒必须是足够小的, 因此足够份的荧光分子是在最紧密颗粒靠近程度下的接近度之内。

[0031] 6. 荧光分子与颗粒的分布必须足以支持荧光染料接近度。

[0032] 7. 荧光染料的分子取向必须是定向排列的或无规的以确保偏振光的足够的共振吸收。

[0033] 8. 颗粒必须是足够小的以悬浮在溶液中, 充分地分散以参与溶液动力学, 支持为了确定“分子”接近度的量度所需要的碰撞、缔合和分裂的动态平衡的基本要素 (essential)。

[0034] 9. 颗粒必须在溶液中是充分独立的 (“可溶性” 和非聚集的) 以支持在溶液动力学中的定量参与。

[0035] 其它质量评价标准是本领域中的那些技术人员已知的。然而, 如果以上列出的质量评价标准中的任何一种是不够的、不知道的或最低限度的, 则 FRET 颗粒对的生产能力也许不符合为了检测或测量颗粒接近度所需要的信号 / 背景阈值。因此, 对 FRET 颗粒对的质量定性包括为候选颗粒对测量 FRET 的目前公开的本发明方法。

[0036] 当 FRET 颗粒对涉及用它们处理的试样或样品和用于检测它们的测量装置时, 下面描述它们的几个标准。首先, FRET 颗粒对的激发和发射波长应该不会如此紧密地对应于试样或样品的吸收或荧光以致于该试样或样品很大程度上混淆该 FRET 测量。其次, 该颗粒必须具有足够的光亮度和具有给体颗粒荧光和受体颗粒吸收的良好重叠, 以实现有效的 FRET 而产生 FRET 颗粒对。第三, 引入在颗粒中的染料必须分散在该颗粒内以使得粒度不会在颗粒之间产生对 FRET 的相当大的距离阻隔性。也就是说, 在颗粒中的染料必须随机地分布于颗粒之内, 使得对于 FRET 对来说, 一些染料处于与另一个颗粒中的染料之间相距的 **Förster** 距离之内以实现有效的 FRET。因此, 在 FRET 颗粒对的第一种颗粒内的染料必须至少部分地足够接近颗粒的表面或处在颗粒的表面上, 以便允许在该颗粒的染料与 FRET 颗粒对的第二种颗粒的染料之间足够小的分离, 从而实现有效的 FRET。第四, 该颗粒必须能够在表面上承载相同或不同的生物分子靶向用结构部分, 以便允许 FRET 颗粒对非常接近地结合于生物分子。第五, 用于检测荧光信号的仪器必须一般根据染料和所要可视化的试样或样品的参数来设计。

[0037] 这些点将更详细地讨论并且举例说明了在开发采用 FRET 颗粒对的可视化技术中的一些错综复杂的事情。通过使用现有方法, 已经在各染料之间实现 FRET, 据此典型地使用一种染料 / 每种生物分子靶向用结构部分。这些单独的染料对于染料消退 (dye fade) 是更敏感的, 这归因于对氧气、自由基和 pH 变化的不稳定性, 并且常常通过各种生物过程迅速地从血液中清除。通过在颗粒中引入染料, 多种染料分子可用于提高光亮度和稳定性。

纳米颗粒的使用允许多种生物分子靶向用结构部分连接于纳米颗粒表面上以改进对靶部位的结合和在试样的各种组织之中的生物分布。

[0038] 本发明可用的染料是在 400-1000nm 范围中发荧光的荧光、疏水性的染料。染料种类包括,但不必然地限于氧杂菁 (oxonol),吡喃鎓 (pyrylium),方酸型 (Squaric),克酮酸型 (croconic),玫瑰红酸 (rodizonic),聚偶氮吲丹烯 (polyazaindacenes) 或香豆素 (coumarin),闪烁染料 (scintillation) (通常噁唑和噁二唑),芳基-和杂芳基-取代的聚烯烃 (C_2-C_8 烯烃部分),部花菁,羰花菁,酞菁,噁嗪,羰基苯乙烯基,卟啉染料,二氟化硼络合二吡咯亚甲基染料 (dipyrrometheneboron difluoridedye),二氟化硼络合氮杂二吡咯亚甲基染料,和噁嗪染料。可用于本发明中的商购荧光染料列于表 1 中和具体的染料结构随后对于染料 1,染料 2,染料 3 和染料 4 显示在通式中。优选的染料是羰花菁,酞菁或二氟化硼络合氮杂二吡咯亚甲基。

[0039] 表 1. 商购的荧光染料。

[0040] 高氯酸 5-氨基-9-二乙基亚胺基苯并(a)吩噁嗪酮鎓盐

[0041] (5-Amino-9-diethyliminobenzo(a)phenoxazonium Perchlorate)

[0042] 7-氨基-4-甲基羰基苯乙烯基

[0043] 7-氨基-4-甲基香豆素

[0044] 7-氨基-4-三氟甲基香豆素

[0045] 3-(2'-苯并咪唑基)-7-N,N-二乙基氨基香豆素

[0046] 3-(2'-苯并噻唑基)-7-二乙基氨基香豆素

[0047] 2-(4-联苯基)-5-(4-叔丁基苯基)-1,3,4-噁二唑

[0048] 2-(4-联苯基)-5-苯基-1,3,4-噁二唑

[0049] 2-(4-联苯基)-6-苯基苯并噁唑-1,3

[0050] 2,5-双-(4-联苯基)-1,3,4-噁二唑

[0051] 2,5-双-(4-联苯基)-噁唑

[0052] 4,4'''-双-(2-丁基辛氧基)-对联四苯

[0053] 对-双(邻-甲基苯乙烯基)-苯

[0054] 高氯酸 5,9-二氨基苯并(a)吩噁嗪酮鎓盐

[0055] 4-二氰基亚甲基-2-甲基-6-(对-二甲基氨基苯乙烯基)-4H-吡喃

[0056] 1,1'-二乙基-2,2'-羰花菁碘化物

[0057] 1,1'-二乙基-4,4'-羰花菁碘化物

[0058] 3,3'-二乙基-4,4',5,5'-二苯并硫杂三羰花菁碘化物

[0059] (3,3'-Diethyl-4,4',5,5'-dibenzothiatricarbocyanine Iodide)

[0060] 1,1'-二乙基-4,4'-二羰花菁碘化物

[0061] 1,1'-二乙基-2,2'-二羰花菁碘化物

[0062] 3,3'-二乙基-9,11-亚新戊基硫杂三羰花菁碘化物

[0063] 1,3'-二乙基-4,2'-喹啉基噁羰花菁碘化物

[0064] 1,3'-二乙基-4,2'-喹啉基硫杂羰花菁碘化物

[0065] 高氯酸 3-二乙基氨基-7-二乙基亚胺基吩噁嗪酮鎓盐

[0066] 7-二乙基氨基-4-甲基香豆素

- [0067] 7-二乙基氨基-4-三氟甲基香豆素
- [0068] 7-二乙基氨基香豆素
- [0069] 3,3'-二乙基噁二羰花菁碘化物
- [0070] 3,3'-二乙基硫杂羰花菁碘化物
- [0071] 3,3'-二乙基硫杂二羰花菁碘化物
- [0072] 3,3'-二乙基硫杂三羰花菁碘化物
- [0073] 4,6-二甲基-7-乙基氨基香豆素
- [0074] 2,2'''-二甲基-对联四苯
- [0075] 2,2''-二甲基-对-三联苯
- [0076] 7-二甲基氨基-1-甲基-4-甲氧基-8-氮杂喹诺酮-2
- [0077] 7-二甲基氨基-4-甲基喹诺酮-2
- [0078] 7-二甲基氨基-4-三氟甲基香豆素
- [0079] 高氯酸 2-(4-(4-二甲氨基苯基)-1,3-丁二烯基)-3-乙基苯并噻唑鎓盐
- [0080] 高氯酸 2-(6-(对-二甲氨基苯基)-2,4-亚新戊基-1,3,5-己三烯基)-3-甲基苯并噻唑鎓盐
- [0081] 高氯酸 2-(4-(对-二甲氨基苯基)-1,3-丁二烯基)-1,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓盐
- [0082] 3,3'-二甲基噁三羰花菁碘化物
- [0083] 2,5-二苯基呋喃
- [0084] 2,5-二苯基噻唑
- [0085] 4,4'-二苯基均二苯乙烯
- [0086] 高氯酸 1-乙基-4-(4-(对-二甲氨基苯基)-1,3-丁二烯基)-吡啶鎓盐
- [0087] 高氯酸 1-乙基-2-(4-(对-二甲氨基苯基)-1,3-丁二烯基)-吡啶鎓盐
- [0088] 高氯酸 1-乙基-4-(4-(对-二甲氨基苯基)-1,3-丁二烯基)-噻啉鎓盐
- [0089] 高氯酸 3-乙胺基-7-乙基亚胺基-2,8-二甲基吩噻嗪-5-鎓盐
- [0090] 高氯酸 9-乙胺基-5-乙胺基-10-甲基-5H-苯并(a)吩噻嗪酮鎓盐
- [0091] 7-乙胺基-6-甲基-4-三氟甲基香豆素
- [0092] 7-乙胺基-4-三氟甲基香豆素
- [0093] 1,1',3,3,3',3'-六甲基-4,4',5,5'-二苯并-2,2'-吡啶三羰花菁碘化物
- [0094] 1,1',3,3,3',3'-六甲基吡啶二羰花菁碘化物
- [0095] 1,1',3,3,3',3'-六甲基吡啶三羰花菁碘化物
- [0096] 2-甲基-5-叔丁基-对联四苯
- [0097] 3-(2'-N-甲基苯并咪唑基)-7-N,N-二乙基氨基香豆素
- [0098] 2-(1-萘基)-5-苯基噻唑
- [0099] 2,2'-对-亚苯基-双(5-苯基噻唑)
- [0100] 3,5,3''',5''''-四-叔丁基-对-联六苯
- [0101] 3,5,3''',5''''-四-叔丁基-对-五联苯
- [0102] 2,3,5,6-1H,4H-四氢-9-乙酰基噻吩并<9,9a,1-gh>香豆素

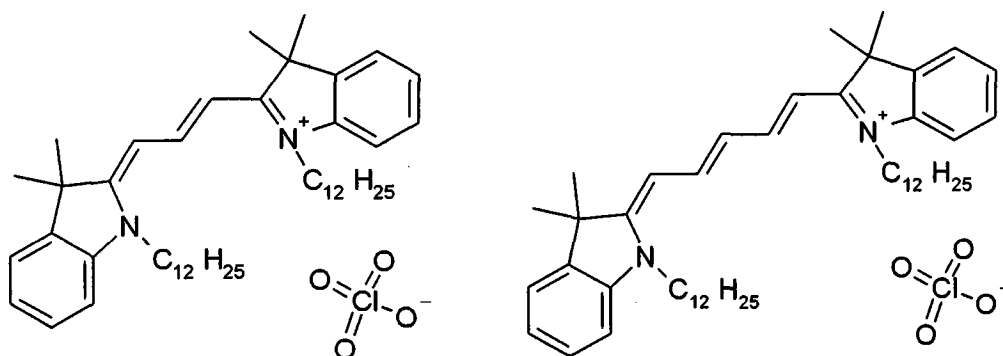
- [0103] 2,3,5,6-1H,4H- 四氢 -9- 羰基乙氧基喹啉并 -<9,9a,1-gh> 香豆素
- [0104] 2,3,5,6-1H,4H- 四氢 -8- 甲基喹啉并 -<9,9a,1-> 香豆素
- [0105] 2,3,5,6-1H,4H- 四氢 -9-(3- 吡啶基)- 喹啉并 -<9,9a,1-gh> 香豆素
- [0106] 2,3,5,6-1H,4H- 四氢 -8- 三氟甲基喹啉并 -<9,9a,1-gh> 香豆素
- [0107] 2,3,5,6-1H,4H- 四氢喹啉并 -<9,9a,1-gh> 香豆素
- [0108] 3,3',2'',3'' ' - 四甲基 - 对四联苯
- [0109] 2,5,2'' ',5'' '' - 四甲基 - 对 - 五联苯
- [0110] 对 - 三联苯
- [0111] 对联四苯
- [0112] 尼罗红
- [0113] 若丹明 700
- [0114] 噁嗪 750
- [0115] 若丹明 800
- [0116] IR 125
- [0117] IR 144
- [0118] IR 140
- [0119] IR 132
- [0120] IR 26
- [0121] IR 5
- [0122] 二苯基己三烯
- [0123] 二苯基丁二烯
- [0124] 四苯基丁二烯
- [0125] 蔡
- [0126] 蒽
- [0127] 芘 (Pyrene)
- [0128] 屈 (Chrysene)
- [0129] 红荧烯 (Rubrene)
- [0130] 六苯并苯 (Coronene)
- [0131] 菲
- [0132] 芴
- [0133] 铝酞菁
- [0134] 铂八乙基卟啉

[0135] 引入到颗粒中的染料的激发和发射波长应该进行选择,以使得 FRET 测量没有因为所要可视化的试样或样品而混淆 (confound)。例如,当样品是人血清时,给体颗粒应该不含有其最大吸收低于 500nm 的染料,其中人血清具有高吸收和一些荧光发射。荧光染料的光亮度是染料的消光系数和荧光量子产量 (fluorescence quantum yield) 的乘积。因此应该选择具有高的消光系数和高的荧光量子产量的染料。在含有相同或类似染料的多分子的光亮颗粒中看见了对于高的消光系数和荧光量子产量的相同希望。对于有机荧光染料,在吸收最大值和发射最大值之间的差异被称作“斯托克斯频移”。菁染料典型地具有 20-40nm,

和更典型在约 20nm 的斯托克斯频移,并且是具备高消光系数的具有红外或近红外线 (red or near-infrared) 吸收和发射最大值的有机染料的例子。为了获得有效的 FRET 颗粒对,必须小心地选择给体颗粒染料和受体颗粒染料的染料吸收和发射性能。给体颗粒染料的发射光谱应该与受体颗粒染料的吸收光谱重叠。因此该受体颗粒染料最大吸收将总是在能量上低于(即在波长上高于)该给体颗粒染料最大吸收。还希望给体颗粒染料吸收光谱和受体染料吸收光谱显示非常少的重叠,这样颗粒能够单独地检测以便也在其中 FRET 颗粒对没有处于紧密接近度的区域中可视化该试样。

[0136] FRET 颗粒对的所需光谱性能的例子在图 1 中给出。特别地,图 1 显示 KODAK X-SIGHT 549,650,691 和 761 成像剂或纳米颗粒的吸收特性。这些成像剂已经由 Eastman Kodak 公司在 2007 年 2 月 28 日至 3 月 2 日于加利福尼亚州旧金山市举行的 Molecular MedicineTri-Conference 进行了介绍。然而,本领域中的那些技术人员将会理解,本发明能够使用的具有类似的光谱性能的其他此类纳米颗粒。用于产生 FRET 颗粒对的优选染料的例子在下面给出。

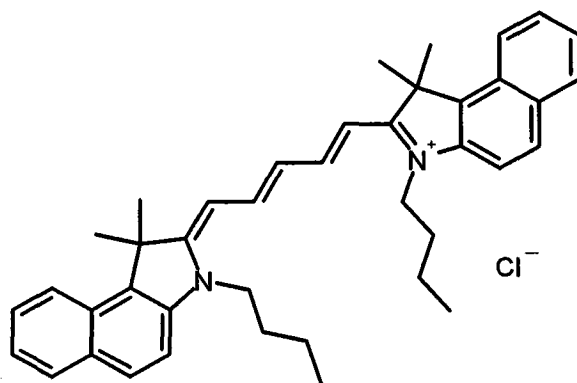
[0137]



[0138] 染料 1

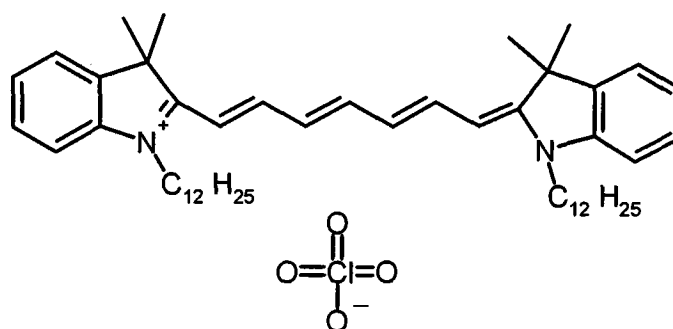
染料 2

[0139]



[0140] 染料 3

[0141]



[0142] 染料 4

[0143] 然后从表 II 中所示的这些染料的合适结合制备四种 FRET 颗粒对。

[0144] 表 II. FRET 颗粒负载用的染料的例子

[0145]

染料	FRET 给体颗粒	FRET 受体颗粒
染料 1	A	无
染料 2	B	B
染料 3	C	C
染料 4	无	D

[0146] FRET 颗粒给体 - 受体对的例子示于表 III 中。

[0147] 表 III. FRET 颗粒给体 - 受体对的例子

[0148]

FRET 颗粒对	FRET 颗粒
1	A 和 B
2	B 和 C
3	B 和 D
4	C 和 D

[0149] 因此通过使用 FRET 颗粒对,能够对于三种不同的光谱选择性检测事件进行可视化。也就是说,可以使用三种不同的光谱选择性生物分布图像,即光谱选择不参与 FRET 的给体颗粒的检测事件、光谱选择不参与 FRET 的受体颗粒的检测事件,和当 FRET 颗粒对处于紧密接近度时 FRET 的可视化。

[0150] 纳米颗粒组装体 (assembly) 的尺寸是在确定它们在生物学组合物中的用处的另一个主要参数。在身体内给药后,大的颗粒被网状内皮系统消除并且不能容易地输送到疾病位点。参见,例如, Volkheimer, Pathologie 14:247(1993); Kwon and Kataoka, Adv. Drug. Del. Rev. 16:295(1995); Moghimi et al., "Nanomedicine: Current Status and Future Prospects." FASEB Journal 2005, 19, 311-330。大于 100nm 的颗粒容易被间质巨

噬细胞清除,而 150nm 或更大的颗粒容易积聚在肝脏中。同时,大的颗粒在细胞中的输送和细胞内的输送是有限的或可忽略的。参见,例如,Labhasetwar et al., Adv. Drug Del. Res. 24 :63(1997)。已经表明,具有从 500nm 到超过 1 微米的尺寸的聚集阳离子物质在细胞转染 (transfection) 中是无效果的。大的颗粒,特别地,带阳电荷的那些大颗粒在身体内显示出高毒性,部分地归因于对肝脏的副作用和栓塞。参见,例如 Volkheimer, Pathologie 14 :247(1993);Khopade et al Pharmazie 51 :558(1996);Yamashita et al., Vet. Hum. Toxicol, 39 :71(1997)。

[0151] 具有疏水性组成的颗粒将改进染料光稳定性和光亮度。具有亲水性组成的颗粒将改进生物分布和血循环时间。已经尝试其它方法来满足具有核 / 壳结构的颗粒的水溶性和水不溶性的需要,其中中心核是水不溶性的,外围的壳是水溶性的,和该荧光分子包含在芯中。迄今已知的许多荧光纳米颗粒是水不溶性的由荧光金属如镧系元素和镉 / 硒组成的并且还显示出毒性和弱的生物分布。为了克服这些缺陷,已经使用一些方法在金属纳米颗粒或不溶性的芯周围产生水溶性聚合物壳。这些聚合物壳增大纳米颗粒的直径并且在给体颗粒和受体颗粒之间的间距变得太大,无法进行有效的 FRET。

[0152] 该 FRET 颗粒对在表面上具有官能团如胺,它可用于生物分子靶向用结构部分的连接。本发明的 FRET 颗粒能够用作承载生物学组分或药物组分的载体。具体地说,用作载体的 FRET 颗粒对不一定包封特定的治疗或成像组分,而是用作生物组分或药物组分的载体。生物组分或药物组分包括治疗剂,诊断剂,染料或辐射照相造影剂。该术语“诊断剂”包括能够用作造影剂和因此在宿主中产生可检测的指示信号的组分。可检测的指示信号可以是 γ 射线 - 发射信号,放射性信号,反射波信号,荧光检查信号,或生理信号,等等。在这里使用的术语生物医学剂 (biomedical agent) 包括有效治疗生理失调的生物体活性物质,药物,酶,激素,甾类,重组体产物,等等。示例性的治疗剂是抗生素,血栓溶解酶如尿激酶或链激酶,胰岛素,生长激素,化学治疗剂如阿霉素和抗病毒药如干扰素和无环鸟苷 (acyclovir)。在酶降解之后,如通过蛋白酶或水解酶,该治疗剂能够随着时间的推移被释放出来。

[0153] 包括在本发明内的是两种或多种组合物,该组合物包括本发明所使用的纳米颗粒的交联聚合物,和合适的靶向分子以及给体和受体染料对。在这里使用的术语“靶向用结构部分”指连接到本发明的聚合物网络上的任何分子、原子或离子,它们增强结合、输送、积聚、停留时间、生物利用率或改善本发明的聚合物网络或生物学活性组合物在体内或细胞中的生物活性。靶向用结构部分常常包括抗体,抗体的片段,或嵌合 (chimeric) 抗体分子,典型地对于某些细胞表面抗原具有特异性。靶向用结构部分也可以是,例如,与细胞表面受体有特定的相互作用的激素,或具有细胞表面受体的药物。例如,糖脂能够用于靶向多糖受体。靶向用结构部分也能够是,例如酶,外源凝集素,或多糖。低分子量靶向用结构部分,如叶酸和它们的衍生物,也可用于本发明中。该靶向用结构部分也可以是多核苷酸,多肽,肽模拟物 (peptidomimetic),碳水化合物 (包括多糖),它们的衍生物或通过组合化学法和生物学获得的其它化学物质。靶向用结构部分能够用于促进本发明的 FRET 颗粒对的细胞内输送 (例如输送至细胞核),通过使用例如融合肽作为靶向分子,由 Soukchareun et al., Bioconjugate Chem., 6, 43, (1995) 或 Arar et al., Bioconjugate Chem., 6, 43 (1995) 所述;染色体组型肽;或其它生物特异性基团提供位点导向的到细胞中的输送 (尤其,从核内

体腔室 (endosomal compartments) 离开而进入到细胞质中, 或输送到细胞核中)。

[0154] 所述组合物能够进一步包括生物学组分或药物组分, 这些组分包括识别特定靶细胞的靶向用结构部分。细胞表面受体通过与用作载体的 FRET 颗粒对的所述 FRET 颗粒缔合的靶向用结构部分所进行的识别和结合, 能够是所述组合物的特征。对于本发明, 被 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒携带的化合物可以被称作“承载的”化合物。例如, 包括识别如上所述的特定靶细胞的靶向用结构部分的生物学或药物组分是“承载的”化合物。这一特征利用了以下理解: 细胞表面结合事件常常是在导致一定范围的事件 (特别是受体媒介的 (receptor-mediated) 胞吞作用) 的细胞级联 (cellular cascade) 中的初始步骤。该术语“受体媒介的胞吞作用” (“RME”) 一般描述了一种机理, 根据该机理, 受到因为靶向用结构部分结合于位于细胞表面上的受体所催化, 结合了受体的靶向用结构部分进入细胞内部 (internalize)。许多蛋白质和其它结构经由受体媒介的胞吞作用进入细胞中, 其中包括胰岛素, 表皮生长因子, 生长激素, 促甲状腺激素, 神经生长因子, 降血钙素, 胰高血糖素, 和许多其它类似物。

[0155] 受体媒介的胞吞作用获得了将 FRET 颗粒对的所述 FRET 颗粒 (可能含有其它生物学组分或药物组分) 输送到细胞内部的适宜机理。在 RME 中, 靶向用结构部分被位于细胞表面上的受体的结合, 能够引发细胞内信号, 它包括胞吞响应。因此, 用作具有缔合的靶向用结构部分的载体的 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒, 能够结合于细胞表面上和随后内陷 (invaginate) 并进入到细胞内。能够用作本发明可利用的靶向剂的那些结构部分的代表性但非限制性的列表包括蛋白质, 肽, 核酸衍生物 (aptomers), 小的有机分子, 毒素, 白喉 (diphtheria) 毒素, 假单胞细菌属毒素, 霍乱菌毒素, 蓖麻毒, 刀豆素 A, 劳氏肉瘤病毒, 西门利克森林病毒, 水泡性口膜炎病毒, 腺病毒, 输铁蛋白, 低密度脂蛋白, 运钴胺素蛋白, 卵黄蛋白质, 表皮生长因子, 生长激素, 促甲状腺激素, 神经生长因子, 降血钙素, 胰高血糖素, 催乳激素, 促黄体生成激素, 甲状腺激素, 血小板衍生生长因子, 干扰素, 儿茶酚胺, 肽模拟物, 糖脂, 糖蛋白和多糖。现有这些结构部分的同系物或片段也能够使用。这些靶向用结构部分能够与 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒相缔合并用于将 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒导向靶细胞, 随后进入细胞内。没有要求整个结构部分用作靶向用结构部分。已知与特定的受体或其它结构相互作用的这些结构部分的较小片段也能够用作靶向用结构部分。

[0156] 抗体或抗体片段代表了一类的最普遍使用的靶向用结构部分, 后者能够被利用来增强 FRET 颗粒对到细胞中的摄入。抗体可以通过本领域中的普通技术人员已知的各种技术中的任何一种来制备。参见, 例如, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。抗体能够通过细胞培养技术来生产, 其中包括单克隆抗体的产生或经由抗体基因转染到合适的细菌或哺乳动物细胞宿主中, 以便让产生重组体抗体。在一种技术中, 包括多肽的免疫原最初被注射到各种哺乳动物 (例如, 小鼠, 大鼠, 兔, 绵羊, 或山羊) 的任何一种的体内。如果该多肽连接到载体蛋白质如牛血清清蛋白或钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin), 则可以引起优异的免疫响应。该免疫原被注射到动物宿主中, 优选根据引入一种或多种增效免疫 (剂) 的预定日程表, 并且该动物定期抽血。为该多肽特定的多克隆的抗体然后通过例如采用连接于合适固体载体上的多肽的亲亲和色谱法从此类抗血清中提纯。

[0157] 为所述的抗原性多肽特定的单克隆抗体可通过例如使用 Kohler and Milstein,

Eur. J. Immunol. 6 :511-519, 1976 的技术和该技术的改进形式来制备。单克隆抗体可以从正在生长的杂交瘤细胞集落 (hybridomacolonies) 的上层清液中分离。另外, 各种的技术可以利用来增强该产率, 如该杂交瘤细胞系注射到合适脊椎动物宿主如小鼠的腹膜腔中。然后从腹水流体或血液中收集单克隆抗体。通过普通技术如色谱法, 凝胶过滤, 沉淀和萃取法从抗体中除去污染物。本发明的多肽可用于在例如亲和色谱步骤中的净化过程。包括从非人免疫球蛋白衍生的抗原结合位点的许多“人类化 (humanized)”抗体分子已经有描述 (Winter et al. (1991) Nature 349 :293-299 ;Lobuglio et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :4220-4224)。这些“人类化”分子被设计以最小化对于啮齿类动物抗人类 (antihuman) 抗体分子的不希望有的免疫响应, 该抗体会限制这些结构部分在人受试者中治疗应用的持续时间和效率。

[0158] **Affibody®**亲和配体是研究试剂, 通过使用蛋白质工程设计技术所生产。它们是由以蛋白 A 的 IgG 结合畴当中的一个的支架为基础的三螺旋形束组成的小的、简单的蛋白质。蛋白 A 是来自细菌金黄色葡萄球菌的表面蛋白质。该支架具有作为亲和配体的优异特征, 并且能够被设计以高亲合性结合于任何给定的靶蛋白上。该畴由 58 种氨基酸组成, 其中的 13 种是随机化分布的以产生具有许多配体变型的**Affibody®**库。因此, 该库由具有相同骨架和不同表面结合性能的许多蛋白质配体组成。在功能上, **Affibody®**分子模拟单克隆抗体。与抗体相比, **Affibody®**分子的最明显的不同之点是尺寸。 **Affibody®**分子具有 6kDa 的分子量, 而抗体的分子量是 150kDa。尽管它的小尺寸, 但是**Affibody®**分子的结合部位与抗体的结合部位相似。与抗体相比**Affibody®**分子的优点包括它们的小尺寸、分子的简单结构、能够经受住宽范围的分析条件 (包括极端 pH 和升高的温度) 的它们的稳固的物理性能, 和它们在细胞内正确地折叠的能力。接合或直接偶联到本发明所使用的 FRET 颗粒上可通过 C-末端半胱氨酸来促进。 **Affibody®**分子具有为亲和纯化、样品制备和蛋白质检测中的应用所需要的有高度竞争性的性能。

[0159] 维生素类和其它主要矿物和营养物能够用作靶向用结构部分以增强 FRET 颗粒对被细胞的摄取。尤其, 维生素类靶向用结构部分能够选自于叶酸, 叶酸的叶酸受体结合用类似物, 和其它叶酸受体 - 结合靶向用结构部分, 生物素, 生物素的生物素受体 - 结合用类似物和其它生物素受体 - 结合靶向用结构部分, 核黄素, 核黄素的核黄素受体 - 结合类似物和其它核黄素受体 - 结合用配体, 和维生素 B1, 维生素 B1 的维生素 B1 受体 - 结合用类似物和其它维生素 B1 受体 - 结合靶向用结构部分。被认为触发受体媒介的胞吞作用和因此根据目前公开的方法也可使用的附加营养物, 是肉碱, 肌醇, 硫辛酸, 烟酸, 泛酸, 吡哆醛, 和抗坏血酸, 和类脂可溶性维生素 A, D, E 和 K。此外, 现有技术中描述的“免疫脂质体” (有抗体连接于脂质体表面上的脂质体) 中的任何一种适合用于所述组合物中。

[0160] 因为不是全部的自然细胞膜具有生物学活性的生物素或叶酸受体, 所以, 所述组合物针对特殊细胞系的体外使用, 能够包括首先改变或另外改性该细胞系以确保生物学活性的生物素或叶酸受体的存在。因此, 在细胞膜上生物素或叶酸受体的数量能够通过生物素或叶酸缺乏的底物上生长细胞系以促进生物素和叶酸受体产生, 或通过对生物素或叶酸受体有响应的蛋白质或脱辅基蛋白的所插入外源基因的表达来增加。

[0161] RME 不是唯一的方法, 利用该方法所述 FRET 颗粒对能够改变位置进入到细胞中。

通过让合适的实体物质 (entity) 连接于 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒上而能够利用的其它摄入方法,包括细胞膜孔隙的有利利用。细胞吞噬作用和胞饮机理也提供了理想的机理,利用该机理,FRET 颗粒对的 FRET 颗粒能够进入细胞之内。

[0162] 该识别结构部分能够进一步包括发生酶催或电化学分裂的序列。该识别结构部分能够因此包括序列,该序列容易发生被细胞内的各种位置上所存在的酶如蛋白酶类或限制核酸内切酶(例如脱氧核糖核酸酶或核糖核酸酶)引起的分裂。

[0163] 细胞表面识别序列不是要求的。因此,虽然细胞表面受体靶向用结构部分能够用于为给定的细胞类型进行靶向,或用于诱导 FRET 颗粒对的所述 FRET 颗粒与细胞表面的缔合,但是不要求细胞表面受体靶向用结构部分存在于 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒的表面上。

[0164] 为了将生物学组分或药物组分组装到用作载体的 FRET 颗粒对的所述 FRET 颗粒上,该组分能够通过连接键(linkage)与 FRET 颗粒载体缔合。“与...缔合”是指该组分被 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒所携带。该组分能够以非共价键方式溶解和引入在 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒中。

[0165] 一般,在所述的生物学组分或药物组分与用作载体的 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒之间形成连接键的任何方式都能够使用。这能够包括靶向用结构部分与外源的分子之间,直接或经由连接基团间接地,共价、离子或氢键链接。该连接键典型地通过在该复合物(complex)的各自组分上的酸、醛、羟基、氨基或胍基之间的酰胺、酯或亚胺基键的形成,由生物学组分或药物组分以共价键链接于用作载体的 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒上来形成。现有技术中公认的生物学上不稳定的共价键如亚胺基键和有连接基 $-COOCH_3$, $-O-O-$ 或 $-COOCH_3$ 的所谓“活性”酯是优选的。所述的生物学组分或药物组分可以连接于预先形成的 FRET 颗粒上,或另外所述组分可以预先连接于可聚合的单元上和然后在 FRET 颗粒制备过程中直接聚合到 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒上。氢键,例如,在核酸的互补链之间存在,也能够用于连接键形成。

[0166] 在本发明的优选的实施方案中,所述的生物学组分或药物组分通过与在高度亲水性大单体单元的末端的反应活性化学单元反应而连接于 FRET 颗粒对的 FRET 颗粒上。优选这一反应活性化学单元是胺。最优选,该连接是经由连接用聚合物(linking polymer)来实现的。所述的生物学组分或药物组分让 FRET 颗粒对结合于生物分子上以可视化它们的紧密接近度。

[0167] 用于可视化具有 FRET 颗粒对的试样的仪器应该能够通过给体颗粒、受体颗粒和 FRET 颗粒对的光谱选择性检测来产生至少三个检测事件。这就需要具有光源的仪器,该光源能够有选择地激发各个 FRET 颗粒给体染料和 FRET 颗粒受体染料。对于优选的 FRET 颗粒染料,分别有 550nm, 650nm, 691nm 和 761nm 的最大吸收值,这使得当总是有给定的 FRET 颗粒对的两种 FRET 颗粒存在时需要能够有选择地激发给定的 FRET 颗粒对的各个 FRET 颗粒的仪器。由成像所进行的 FRET 检测(即在多个的、空间分布的点上的检测)的合适系统是从 CarestreamHealth, Inc., Rochester, New York 商购的 Kodak Image Station 4000MMPPro。该 4000mm Pro 系统具有广谱(即白光)光源,如氙光源,还有一组的激发滤光器。优选的激发滤光器是传输在所选择的光谱带中的光的带通干涉滤光器,例如具有 520nm 中心波长的滤光器,它传输在 510nm 到 530nm 的光谱带内的光但阻断在这一光谱带之外的全部光到达试样或样品。为了测量发射,优选的仪器使用第二套的带通干涉滤光器,后者让

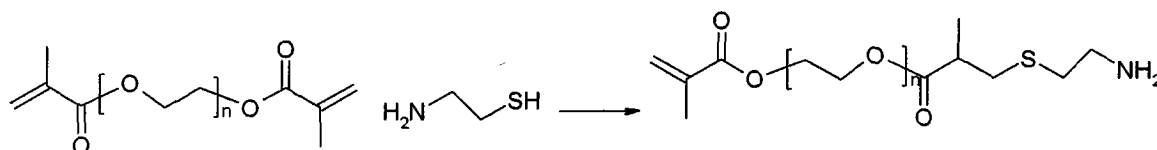
来自给定的 FRET 颗粒对的所选择 FRET 颗粒中的发射光通过但阻断激发光和其它荧光信号。优选的仪器具有在 500nm 和 900nm 之间有高敏感性的数字式摄象机, 优选包括冷却式 CCD 检测器, 以及计算机和显示所捕获图像的软件。优选的系统能够接收位于微量滴定板中的试样。所述的优选的系统能够用于可视化已经用可构成 FRET 颗粒对的至少两种 FRET 颗粒处理过的试样。该优选的系统使用合适的带通滤光器(激发和发射)以便在一个图像中可视化 FRET 给体颗粒, 和使用合适的滤光器(激发和发射)以便在第二个图像中可视化 FRET 受体颗粒, 和然后用于 FRET 给体颗粒的激发滤光器与用于 FRET 受体颗粒的发射滤光器一起用于在第三个图像中可视化处于紧密接近度的那些颗粒。优选的仪器能够比较三个图像并产生共同记录的重叠。另外地, 只有一个图像可以被捕获, 即这样一个图像, 依据它使得用于 FRET 给体颗粒的激发滤光器与用于 FRET 受体颗粒的发射滤光器一起用于可视化处于紧密接近度的那些颗粒。

[0168] 另一个合适的系统,如也可从 Carestream Health, Inc. 商购的 Kodak In-Vivo Imaging System FX Pro,能够通过将活的小动物如小鼠成像进行 FRET 检测。用于 FRET 检测的仍然另一个合适系统是微量滴定板读数器,如可从加利福尼亚州 Sunnyvale 市的 Molecular Devices 公司商购的 SpectraMax M5,它使用光电倍增管用于(微量滴定板)各个孔的顺序荧光检测。本领域中普通技术人员个人将会认识到使用微量滴定板读数器的顺序 FRET 检测和用数字式摄象机成像的 FRET 检测两者的等效性。该 SpectraMax M5 也将单色仪用于激发光源和检测器两者中。本领域中普通技术人员个人将认识到单色仪具有与干涉滤光器类似的光谱选择性的能力。FRET 检测的另一个合适系统是微流体系统(microfluidics system),如通过可从马萨诸塞州 Lexington 市的 RainDance Technologies, Inc. 商购的 RainStorm™ 液滴型微流体技术来实现。本领域中普通技术人员个人将会认识到从位于微流体液滴中的试样所进行的 FRET 检测与在位于微量滴定板中的试样中所进行的 FRET 检测的等效性。

[0169] 实验部分

[0170] 实施例 1. 胺终端的聚乙二醇甲基丙烯酸酯盐酸盐的制备

[0171]



[0172] 聚乙二醇二甲基丙烯酸酯 (Aldrich, Mn = 875, 335g) 与 100ml 的甲醇混合, 然后用半胱胺 (Aldrich, 5.8g) 和二异丙基乙胺 (许尼希碱) 处理, 然后在室温下搅拌 2 天并使用旋转蒸发器浓缩。将残留物溶解在 1L 的乙酸乙酯中, 然后用 10% HCl 水溶液萃取。收集水性层 (aqueous layer), 然后通过 50% 氢氧化钠水溶液的添加来调节至碱性, 随后用乙酸乙酯萃取。有机层在 $MgSO_4$ 上干燥, 过滤和浓缩。残留物溶解。这一物料用新鲜的二乙醚洗涤, 然后淬析。该残留物通过使用旋转蒸发器进行浓缩, 得到 37g 的盐酸盐形式的所需产物。该物质通过 NMR 谱表征, 如下: 1H -NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 1.18 (d, 3H), 1.93 (bs, 3H), 2.04 (bs, 2H), 2.43-2.77 (bm, 7H), 3.6-3.7 (vbs, $-CH_2CH_2O-$), 3.73 (bt, 2H), 3.29 (bt, 2H), 5.56 (bs, 1H), 6.12 (bs, 1H)。

[0173] 实施例 2. 由甲基丙烯酸甲氧基乙基酯 (45% w/w), 二乙烯基苯 (4%), 乙基苯乙

烯(1%),和实施例1的胺终端的聚乙二醇甲基丙烯酸酯盐酸盐(50%)组成的颗粒的制备

[0174] 500ml 三颈圆底烧瓶用 Ace#15 玻璃丝 (glass thread) 在底部和用一系列配合接头 (adapter) 加以改进,该接头允许 1/16 英寸 ID 特氟隆 (Teflon) 管的连接。该烧瓶(下面称作“头料(header)”烧瓶)装配机械搅拌器、带注射器针头氮气入口的橡胶隔片。该头料含有甲基丙烯酸甲氧基乙基酯(5.63g),二乙烯基苯(0.63g,异构体的混合物,80%纯度,剩余部分是乙基苯乙烯异构体),胺终端聚乙二醇醚甲基丙烯酸酯盐酸盐(6.25g, $M_n = 940$)。在装配机械搅拌器、回流冷凝器、氮气导入管、和橡胶隔片的 1L 三颈圆底烧瓶(下面称作“反应器”)中加入 2,2'-偶氮双(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸化物(0.06g),氯化十六烷基吡啶鎓(0.31),碳酸氢钠(0.06g)和蒸馏水(78.38g)。该反应器内容物由蒸馏水(159.13g)、2,2'-偶氮双(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸化物(0.06g)、碳酸氢钠(0.06g)和氯化十六烷基吡啶鎓(0.94g)组成。该头料和反应器内容物都搅拌至均匀为止,然后用氮气鼓泡脱空气 20 分钟。将反应器烧瓶置于 60℃ 的恒温水浴中,然后使用 QG6 型实验室泵 (Fluid Metering Inc. Syossett, NY) 经过 2 小时将头料烧瓶内容物加入到反应器中。反应混合物然后在 60℃ 下搅拌 16 小时。该胶乳用 100cc Dowex 88 离子交换树脂处理两次,然后使用 14K 截渗膜 (cutoff membrane) 渗析 48 小时,获得 312g 的 3.26% 固体的透明胶乳。由准弹性光散射法测得体积平均直径是 20.89nm,具有 0.24 的变化系数。

[0175] 实施例 3-染料 4 的制备。

[0176] 该染料是通过使用高氯酸 2,3,3-三甲基-1-十二烷基-3H-吡啶鎓盐(4.28g, 10mmol)和双苯胺(1.4g, 5mmol)在含有三乙胺(1.5g, 15mmol)的 40ml 的乙酸酐中制备的。反应时间是 5 分钟。反应被冷却到 25℃,然后被倾倒在 2 升的冰水中,同时进行剧烈搅拌。水相被萃取掉,然后将油相溶于 100mL 的 80/20 二氯甲烷-甲醇中。该物质在用 80/20 二氯甲烷-甲醇洗脱的硅胶柱上进行色层分离。进行溶剂的蒸发,在用无水硫酸镁干燥之后,获得纯染料(4g, 32% 产率),在甲醇中有最大吸收 747nm,有 220,020 的消光系数。

[0177] 实施例 4:染料 2 的制备

[0178] 该染料是通过使用高氯酸 2,3,3-三甲基-1-丁基-3H-吡啶鎓盐(12g, 38mmol)和双苯胺(5.4g, 19moles)在含有三丁基胺(10.5g, 57mmol)的 100ml 的乙酸酐中制备的。反应进行 15 分钟,冷却到 25℃,然后倾倒在 2000mL 的冰水中,同时进行剧烈搅拌。水相被萃取掉,油性产物在用 90/10 二氯甲烷-甲醇洗脱的硅胶柱上进行色层分离。进行溶剂的蒸发,在用无水硫酸镁干燥之后获得纯染料(8g, 71% 产率),在甲醇中具有最大吸收 637nm,具有 259,500 的消光系数。

[0179] 实施例 5:颗粒负载染料 4

[0180] 在弱光下,通过将 0.0296g 的染料 4 溶解在足够的四氢呋喃中获得 29.8012g 的最终溶液重量,来制备 0.0903% w/w 的染料储备溶液。将 1.9627g 份的染料溶液添加到玻璃管形瓶中,用四氢呋喃稀释到 10.0g 的最终重量。将 10.0185g 的实施例 2 的颗粒溶液添加到该管形瓶中,所得溶液在旋转蒸发器上抽提至约 40-50% 体积。残留四氢呋喃通过两次添加 3-5ml 蒸馏水和再次抽提掉挥发分的 $\sim 1/4$ 到 $1/3$ 而进一步被除去。9.4467g 的 3.45% 固体的荷载颗粒 (LP-4),该固体含有 4.97×10^{-3} mol 染料 / 每克的固体胶乳。

[0181] 实施例 6:颗粒负载染料 2

[0182] 在弱光下,通过将 0.0101g 的染料 2 溶解在足够的四氢呋喃中获得 25.1201g 的最

终溶液重量,来制备染料储备溶液 (0.0402% w/w)。将 3.9146g 份的染料溶液添加到玻璃管形瓶中,然后用四氢呋喃稀释到 10.0g 的最终重量。将 10.0451g 的实施例 2 的颗粒溶液添加到该管形瓶中,然后溶液在旋转蒸发器上被抽提至约 40-50 体积%。残留四氢呋喃通过两次添加 3-5ml 蒸馏水和再次抽提掉挥发分的 $\sim 1/4$ 到 $1/3$ 而进一步被除去。10.9030g 的 3.56%固体的荷载颗粒 (LP-2),该固体含有 4.99×10^{-3} mol 染料 / 每克的固体胶乳。

[0183] 实施例 7. 山羊抗兔 IgG 标记的 FRET 颗粒给体 D 的制备

[0184] 荷载胶乳 (LP-2) 的活化

[0185] 1. 将 400 μ L 荷载颗粒 (LP-2) 添加到在 5ml 有色管形瓶中所含的 500 μ L PBS (0.1M 磷酸钠, 0.15M NaCl, pH 7.5, 含有 EDTA (用 NaOH 调节 pH)) 缓冲液中。

[0186] 2. 将 2mg 磺基-SMCC (Pierce Biotechnology) 溶解在 152.7 μ L 干燥 DMSO 中。

[0187] 3. 将 X-SIGHT 溶液与 60.4 μ L 的磺基-SMCC 溶液掺混。

[0188] 4. 用搅拌棒在 340 的旋转速度下在室温下搅拌反应混合物 1 个小时。同时准备该柱。

[0189] 5. 使用两个 NAP 10 柱。用移液管从柱中分出缓冲液,然后流过 3 倍柱体积的含有 2 毫摩尔浓度 EDTA 的 10 毫摩尔浓度缓冲液以进行调理。将约 0.5mL 的来自步骤 4 的荷载胶乳反应混合物装入到各柱中,然后用 10 毫摩尔浓度的缓冲液洗脱以除去过量的连接剂 (linker)。在已称瓶重量 (tared) 的闪烁管中收集色带。最终溶液体积应该是大约 1ml。抗体的活化

[0190] 1. 用移液管将 2.08ml 的 2.4mg/ml 兔抗小鼠 (Jackson) 转移到 20ml 玻璃管形瓶中。暂搁置。

[0191] 2. 将 9.6 的 DTT 溶解在含有 10mM EDTA 的 62 μ L PBS 中。

[0192] 3. 将 2.08mL 抗体溶液与 50 μ L DTT 溶液掺混。

[0193] 4. 用搅拌棒在室温下搅拌 1 小时。

[0194] 5. 将来自步骤 4 的溶液添加到 2 个 Amicon 30 柱中。称量 2 个天平管,用水调节重量直至它们彼此之间相差在 1gm 之内。使用离心机在 3000rpm 下旋转 15 分钟,将每一个中的体积减少到约 500 μ L。

[0195] 6. 将 4.5 (9)mL 的含有 2mM EDTA 的 pH 7.2PBS 缓冲液加入到含有来自步骤 5 的 Ab 溶液的每一个管中。在 3000rpm 下旋转,将溶液体积减少到 500 μ L。

[0196] 7. 重复步骤 6 至 10 次。

[0197] 活化抗体到活化荷载胶乳的共价连接

[0198] 根据 Ab 与纳米颗粒的比率 = 4 : 1 来设置接合。假设 Ab 损失是 30%, 这导致 24.1×10^{-9} mol 的 Ab。为了达到 Ab/颗粒 = 4 : 1, 将全部的提纯 Ab 溶液与 56% 的提纯颗粒溶液掺混。测量混合物的体积,将含有 10mMEDTA 的 0.1M PBS 缓冲液添加进去,达到 4.5-7.5ml 的最终体积。用搅拌棒在室温下搅拌 2 小时。

[0199] 将接合溶液 (7.5ml) 加入到 Amicon 管中,在 3000rpm 下旋转柱,以便将体积减少至大约 500 μ L。

[0200] 在五个 10mL 柱中加入 Superdex 200 (9-10mL 悬浮液) 以达到 4cm 的最终凝胶床 (体积)。两个柱在 1 $\times$ PBS 中平衡三次。

[0201] 1. 将每批 100 μ L 接合溶液加入到一个 Superdex 柱中。

- [0202] 2. 用 1×PBS(10mM 磷酸钠, 0.15M NaCl, pH 7.2) 洗脱。
- [0203] 3. 对于各个柱收集约 1ml 的 IgG 标记的 FRET 颗粒给体 B 样品。
- [0204] 实施例 8. 山羊抗兔 IgG 标记的 FRET 颗粒受体 D 的制备
- [0205] 荷载胶乳 (LP-4) 的活化
- [0206] 1. 将 400 μ L 荷载颗粒 (LP-4) 添加到在 5ml 有色管形瓶中所含的 500 μ L PBS(0.1M 磷酸钠, 0.15M NaCl, pH 7.5, 含有 EDTA(用 NaOH 调节 pH)) 缓冲液中。
- [0207] 2. 将 2mg 磺基-SMCC(Pierce Biotechnology) 溶解在 152.7 μ L 干燥 DMSO 中。
- [0208] 3. 将 X-SIGHT 溶液与 60.4 μ L 的磺基-SMCC 溶液掺混。
- [0209] 4. 用搅拌棒在 340 的旋转速度下在室温下搅拌反应混合物 1 个小时。同时准备该柱。
- [0210] 5. 使用两个 NAP 10 柱。用移液管从柱中分出缓冲液, 然后流过 3 倍柱体积的含有 2 毫摩尔浓度 EDTA 的 10 毫摩尔浓度缓冲液, 以进行调理。将约 0.5mL 的来自步骤 4 的荷载胶乳反应混合物装入到各柱中, 然后用 10 毫摩尔浓度的缓冲液洗脱以除去过量的连接剂。在已称瓶重量的闪烁管中收集色带。最终溶液体积应该是大约 1ml。
- [0211] 抗体的活化
- [0212] 1. 用移液管将 2.08ml 的 2.4mg/ml 山羊-抗兔 (Jackson) 转移到 20ml 玻璃管形瓶中。暂搁置。
- [0213] 2. 将 9.6 的 DTT 溶解在含有 10mM EDTA 的 62 μ L PBS 中。
- [0214] 3. 将 2.08mL 抗体溶液与 50 μ L DTT 溶液掺混。
- [0215] 4. 用搅拌棒在室温下搅拌 1 小时。
- [0216] 5. 将来自步骤 4 的溶液添加到 2 个 Amicon 30 柱中。称量 2 个天平管, 用水调节重量直至它们彼此之间相差在 1gm 之内。使用离心机在 3000rpm 下旋转 15 分钟, 将每一个中的体积减少到约 500 μ L。
- [0217] 6. 将 4.5(9)mL 的含有 2mM EDTA 的 pH 7.2PBS 缓冲液加入到含有来自步骤 5 的 Ab 溶液的每一个管中。在 3000rpm 下旋转, 将溶液体积减少到 500 μ L。
- [0218] 7. 重复步骤 6 至 10 次。
- [0219] 活化抗体与活化荷载颗粒的共价连接
- [0220] 1. 根据 Ab 与纳米颗粒的比率 = 4 : 1 来设置接合。假设 Ab 损失是 30%, 这导致 24.1×10^{-9} mol 的 Ab。为了达到 Ab/颗粒 = 4 : 1, 将全部的提纯 Ab 溶液与 56% 的提纯颗粒溶液掺混。测量混合物的体积, 将含有 10mM EDTA 的 0.1M PBS 缓冲液添加进去, 达到 4.5-7.5ml 的最终体积。用搅拌棒在室温下搅拌 2 小时。
- [0221] 2. 将接合溶液 (7.5ml) 加入到 Amicon 管中, 在 3000rpm 下旋转柱, 以便将体积减少至大约 500 μ L。
- [0222] 3. 在五个 10mL 柱中加入 Superdex 200(9-10mL 悬浮液) 以达到 4cm 的最终凝胶床(体积)。
- [0223] 4. 两个柱在 1×PBS 中平衡三次。
- [0224] 5. 将每批 100 μ L 接合溶液加入到一个 Superdex 柱中。
- [0225] 6. 用 1×PBS(10mM 磷酸钠, 0.15M NaCl, pH 7.2) 洗脱。
- [0226] 7. 对于各个柱收集约 1000 μ L 的 FRET 颗粒受体样品。

[0227] 实施例 9. 使用 FRET 颗粒对的兔蛋白质的可视化

[0228] 在 96 孔板（黑色澄明底部）中，在一个孔中添加 5nM 的兔抗小鼠 IgG 标记的 FRET 颗粒给体 B，在第二个孔中添加 5nM 的山羊抗兔 IgG 标记的 FRET 颗粒受体 D，和向第三个孔中添加由 5nM 的兔抗小鼠 IgG 标记的 FRET 颗粒给体 B 和 5nM 的山羊抗兔 IgG 标记的 FRET 颗粒受体 D 组成的 FRET 颗粒对 B-D。

[0229] 通过将 96 孔板放入到 Kodak Image Station 4000MM Pro 中和用具有 20nm 带宽的 650nm 中心波长激发滤光片曝光和用具有 40nm 带宽的 790nm 发射滤光片记录荧光图像，来可视化该试样。FRET 颗粒给体 B 单独具有在 670nm 的发射峰，因此在以 790nm 为中心的 40nm 发射光谱带中观察到来自 FRET 颗粒给体 B 的非常少的荧光。FRET 颗粒受体 D 单独在以 650nm 为中心的 20nm 激发光谱带中具有非常少的吸收，因此在 790nm 观察到来自 FRET 颗粒受体 D 的非常少的荧光。但是 FRET 颗粒对 B-D 通过抗体的靶向而紧密接近，因此被给体颗粒吸收的激发能被转移到受体颗粒，导致分别与 FRET 颗粒给体 B 和 FRET 颗粒受体 D 相比，从 FRET 颗粒对 B-D 检测到的荧光有 54 倍 (fold) 和 142 倍提高。

[0230] 表 IV. 显示出兔抗小鼠 IgG 与山羊抗兔 IgG 的接近度的 FRET 颗粒对 B-D 的实例
[0231]

	FRET 给体颗粒 B	FRET 受体颗粒 D	FRET 颗粒对 B-D
检测的荧光（任意单位）	6.8×10^4	2.6×10^4	370×10^4

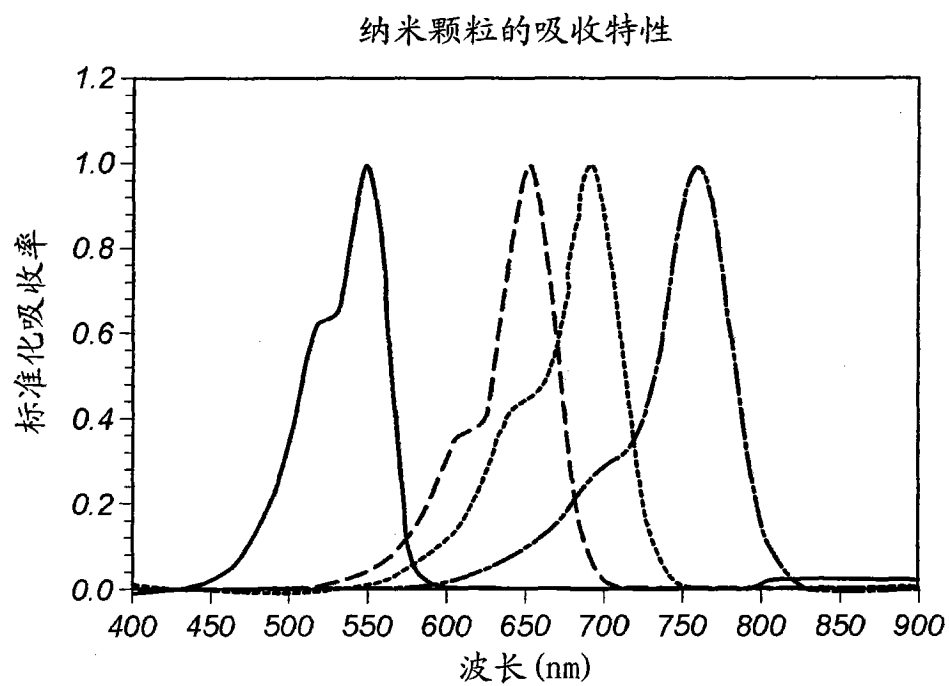


图 1