

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

B82B 1/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880018403.1

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101679022A

[22] 申请日 2008.4.2

[21] 申请号 200880018403.1

[30] 优先权

[32] 2007.4.2 [33] US [31] 60/909,656

[86] 国际申请 PCT/US2008/059117 2008.4.2

[87] 国际公布 WO2008/122035 英 2008.10.9

[85] 进入国家阶段日期 2009.12.1

[71] 申请人 爱默雷大学

地址 美国佐治亚洲

[72] 发明人 奚美·钱 多米尼克·安萨里

书明·聂

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 杨淑媛 郑霞

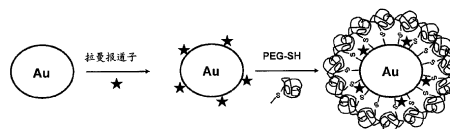
权利要求书 3 页 说明书 37 页 附图 23 页

[54] 发明名称

使用表面增强拉曼纳米粒子标记物的体内肿瘤靶向和光谱检测

[57] 摘要

公开了纳米结构、制备纳米结构的方法、检测受治疗者中靶的方法和检测受治疗者中疾病的方法。其中，纳米结构的实施方案包括金属金表面增强的拉曼散射纳米粒子、拉曼报道子和保护结构。所述保护结构可包括巯基聚乙二醇，并且靶特异性探针可连接到所述巯基聚乙二醇。



1. 一种表面增强拉曼光谱活性的复合纳米结构，其包括：
核心金属纳米粒子；
置于所述核心表面上的拉曼报道分子；和
置于所述核心和报道分子表面的封装保护层，其中被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。
2. 如权利要求 1 所述的纳米结构，其中所述拉曼报道分子选自异硫氰酸酯染料、多硫有机染料、多杂硫有机染料、苯并三唑染料或其组合。
3. 如权利要求 1 所述的纳米结构，其中所述报道分子选自噻菁染料、二噻菁染料、硫碳菁染料或二硫碳菁染料。
4. 如权利要求 1 所述的纳米结构，其中所述报道分子选自孔雀石绿异硫氰酸酯、四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-6-异硫氰酸酯或 3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物。
5. 如权利要求 3 所述的纳米结构，其中所述核心金属纳米粒子是金。
6. 如权利要求 1 所述的纳米结构，其中所述核心具有小于约 200 纳米的直径。
7. 如权利要求 1 所述的纳米结构，其中所述封装物质是巯基聚乙二醇。
8. 如权利要求 1 所述的纳米结构，其还包括选择性地结合细胞上的靶的靶特异性探针。
9. 如权利要求 8 所述的纳米结构，其中所述靶特异性探针选自由抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物及其组合组成的组，并且其中所述靶向探针具有对靶细胞表面上的标志物的亲和性。
10. 如权利要求 9 所述的纳米结构，其中所述靶特异性探针是免疫球蛋白或其片段。

11. 如权利要求 8 所述的纳米结构, 其中所述探针被置于疏水保护结构上。

12. 如权利要求 8 所述的纳米结构, 其中所述探针是靶向肿瘤的配体。

13. 一种制备纳米结构的方法, 其包括:

提供金属纳米粒子;

将所述金属纳米粒子引至拉曼报道子, 借此将所述拉曼报道子置于纳米粒子的表面而形成纳米粒子-报道子复合物; 并且

将保护结构层置于所述纳米粒子-报道子复合物表面上, 其中所述报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其还包括将细胞靶特异性探针置于保护结构层上, 其中所述探针选自抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物或其组合。

15. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述核心金属纳米粒子是胶体。

16. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述核心金属纳米粒子是金。

17. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述拉曼报道分子选自异硫氰酸酯染料、多硫有机染料、多杂硫有机染料、苯并三唑染料或其组合。

18. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述报道分子选自噻菁染料、二噻菁染料、硫碳菁染料或二硫碳菁染料。

19. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述报道分子选自孔雀石绿异硫氰酸酯、四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-6-异硫氰酸酯或 3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物。

20. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述封装物质是巯基聚乙二醇。

21. 一种生物样品成像的方法, 其包括:

将至少一种纳米结构递送到培养的细胞或动物或人受治疗者, 其中所述纳米结构包括核心金纳米粒子、置于所述核心表面上的拉曼报道分子和置于所述核心和报道分子上的封装保护层, 其中所述被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征;

允许所述纳米结构与被靶向的生物细胞或组织接触;

用放射源激发所述报道分子; 并且

测量对应于所述报道分子的纳米结构的表面增强拉曼光谱, 从而检测所述纳米结构在被靶向的细胞或组织中的存在。

22. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述纳米结构还包括靶特异性探针, 其中所述靶向探针选择性地与纳米粒子结合到被靶向的细胞, 从而允许被靶向的细胞的检测。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其中所述靶细胞是在动物或人受治疗者的组织中。

24. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述靶细胞是动物或人受治疗者的癌细胞。

25. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述靶特异性探针可选自由抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物或其组合组成的组, 并且其中所述靶向探针具有对靶细胞表面上的标志物的亲和性。

26. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述靶特异性探针是靶向肿瘤的配体。

使用表面增强拉曼纳米粒子标记物的体内肿瘤靶向和光谱检测

相关申请的交叉引用

本申请要求 2007 年 4 月 2 日提交的、标题为“A New Class of nanoparticle Tags Based on Surface Enhanced Raman Scattering for In Vitro and In Vivo Detection of Cancer Biomarkers”(用于体外和体内癌症生物标志物检测的、基于表面增强拉曼散射的一种新类型的纳米粒子标记物)的、序列号为 60/909,656 的美国临时专利申请的优先权,其整体特此通过引用并入本文。

关于联邦资助的研究或开发的声明

本发明是由政府支持在美国政府所属的美国国家卫生研究院授予的编号为 R01 CA108468 的 NIH 基金下完成的。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

本公开总体涉及表面增强拉曼光谱纳米粒子,及其细胞检测用途。

背景

用于体内分子成像和靶向治疗的生物相容的纳米粒子的开发是当前在许多科学、工程和生物医学学科中引起相当大兴趣的领域。基本原理是纳米尺寸的粒子具有离散分子或宏观材料所没有的功能和结构特性。当与生物分子靶向配体如单克隆抗体、肽或小分子偶合时,这些纳米粒子用来以高特异性和亲和性靶向恶性肿瘤。在直径为 10-nm 至 100-nm 的“介观”尺寸范围内,纳米粒子还具有大表面积以偶合至多种诊断的(例如,光学

的、放射性同位素的或磁性的)和治疗的(例如,抗癌的)剂。最近的进展已经导致用于药物递送的生物可降解纳米结构、用于磁共振成像的氧化铁纳米晶体、用于多重分子诊断和体内成像的量子点和用于短干扰 RNA (siRNA) 递送的纳米级载体的发展。

胶体金已经被安全地用来治疗类风湿性关节炎半个世纪,而且最近的研究表明,在全身注射后聚乙二醇化的金纳米粒子(用聚乙二醇或 PEG 保护层包被的胶体金)展现了优秀的体内生物分布和药物代谢动力学特性。与含镉的量子点及其他的毒性或免疫原性的纳米粒子相反,金胶体在体内有少量或没有长期毒性或其他有害作用。单个分子和单个纳米粒子的表面增强拉曼散射(SERS)的发现已经吸引了对于增强机理的基础研究和在超灵敏光检测和光谱学上的潜在应用二者的相当大的兴趣。许多研究人员已经证明,增强因子大到 10^{14} - 10^{15} , 其导致与荧光有机染料可比的或甚至更大的拉曼散射截面。在室温下,这种巨大的增强允许位于单个纳米粒子表面或两个粒子接合处的单个分子的光谱检测和鉴别。关于单个分子 SERS 的结构和机理方面已经取得进展,但仍不清楚的是,这种大的增强作用可如何用于分析化学、分子生物学或医学诊断的应用。一个主要问题是 SERS 所固有的界面性质,其要求分子吸附在粗糙金属表面上。对于生物分子如肽、蛋白质和核酸,表面增强拉曼数据特别地难获得,难解释并几乎不可能再现。

概述

开发了一种基于超灵敏的表面增强拉曼散射(SERS)光谱学的新的细胞成像技术的实施方案作为诊断和治疗工具。本公开的实施方案涉及自发地组装的 SERS 纳米标记物,其含有用于体外和体内应用的耐久和多用途的保护涂层。图像亮度测量可显示 SERS 纳米标记物比量子点标记物高至少两个数量级。双功能的聚乙二醇聚合物充当金纳米粒子核心与连接于纳米结构上的靶向或治疗剂之间的连接体。

公开了纳米粒子、其制备方法和使用所述纳米粒子的实施方案来检测靶分子的方法。其中,示范性的纳米粒子的一个实施方案包括表面增强拉

曼光谱活性的复合纳米结构。所述表面增强拉曼光谱活性的复合纳米结构包含核心、报道分子和封装物质。所述报道分子键合于所述核心。所述报道分子可选自但不限于异硫氰酸酯染料、多硫有机染料、多杂硫有机染料、苯并三唑染料及其组合。所述封装物质被置于所述核心和所述报道分子上。所述被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。

简短地描述，本公开的实施方案特别地涵盖纳米结构、制备纳米结构的方法、通过将本公开的纳米结构递送到细胞、组织或整个动物或人之上或之内的特定靶而成像的方法。本公开涵盖包括金属纳米粒子核心、拉曼报道子和置于其上的保护层的纳米结构。

因此，本公开的一方面涵盖表面增强拉曼光谱活性的复合纳米结构，其包括核心金属纳米粒子、置于所述核心表面上的拉曼报道分子和置于所述核心和报道分子表面的封装保护层，其中被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。

在本公开的实施方案中，拉曼报道分子可选自异硫氰酸酯染料、多硫有机染料、多杂硫有机染料、苯并三唑染料及其组合。

在本公开的实施方案中，报道分子选自噻菁（thiacyanine）染料、二噻菁（dithiacyanine）染料、硫碳菁（thiacarbocyanine）染料和二硫碳菁（dithiacarbocyanine）染料。在其他的实施方案中，报道分子选自孔雀石绿异硫氰酸酯、四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-6-异硫氰酸酯和 3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物（3,3'-diethylthiadibocyanine iodide）。

在本公开的一个实施方案中，所述核心是金，并可具有小于约 200 纳米的直径。

在本公开的纳米结构的实施方案中，封装物质可以是巯基聚乙二醇。

在本公开的其他实施方案中，纳米结构还可包括能够选择性地结合细胞上的靶的靶特异性探针。

在这些实施方案中，所述靶特异性探针可选自抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物及其组合组成的组，并且其中所述靶向探针

具有对靶细胞表面上至少一个标志物的亲和性。

在一个实施方案中，靶特异性探针是免疫球蛋白或其片段，而且在本公开的实施方案中所述探针可以被置于疏水保护结构上。在一个实施方案中，所述探针是靶向肿瘤的配体。

本公开的另一个方面涵盖制备根据本公开所述纳米结构的方法，其包括提供金纳米粒子，将所述金纳米粒子引至拉曼报道子以借此将拉曼报道分子置于纳米粒子的表面而形成纳米粒子-报道子复合物，以及将保护结构层置于所述纳米粒子-报道子复合物的表面上，其中所述报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。

在本公开此方面的一个实施方案中，所述方法还可包括将细胞靶特异性探针置于保护结构层上，其中所述探针选自抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物或其组合。

本公开的再一个方面涵盖生物样品成像的方法，其包括将至少一个纳米结构递送到被培养的细胞或动物或人受治疗者，其中所述纳米结构包括核心金属和金、纳米粒子、置于所述核心表面上的拉曼报道分子和置于所述核心和报道分子上的封装保护层，其中被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征，允许纳米结构接触靶生物细胞或组织，使用放射源激发报道分子，并测量对应于报道分子的纳米结构的表面增强拉曼光谱的谱，由此检测靶细胞或组织的纳米结构的存在。

在本公开此方面的一个实施方案中，纳米结构还可包括靶特异性探针，其中所述靶向探针可选择地将纳米粒子结合到靶向的细胞，从而允许靶向的细胞的检测。

在本公开的另一个实施方案中，所述靶细胞是在动物或人受治疗者的组织中。

在本公开此方面的实施方案中，所述靶细胞可以是动物或人受治疗者的癌细胞，并且所述靶特异性探针可选自由抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物及其组合组成的组，其中所述靶向探针具有对靶细胞表面上标志物的亲和性。

在本公开的一个实施方案中，所述靶特异性探针是靶向肿瘤的配体。

附图简述

在与附图一起查看下述本公开的各种实施方案的详细描述后，本公开进一步的方面将被更容易地理解。

图 1A 展示原始的金胶体、拉曼报道分子编码的粒子和使用巯基聚乙二醇（巯基 PEG）层稳定的粒子的制备顺序和图式结构。大约 $1.4-1.5 \times 10^4$ 个报道分子（例如孔雀石绿）被吸附在每个 60-nm 的金粒子上，其中所述金粒子进一步被 3.0×10^4 个巯基 PEG 分子所稳定。

图 1B 展示从图 1A 中所示原始的、拉曼编码的和 PEG 稳定的金纳米粒子获得的光吸收。

图 1C 展示从图 1A 中所示原始的、拉曼编码的和 PEG 稳定的金纳米粒子获得的透射电镜术（TEM）。

图 1D 展示从图 1A 中所示原始的、拉曼编码的和 PEG 稳定的金纳米粒子获得的动态光散射尺寸数据。

图 2A-2F 展示聚乙二醇化的 SERS 纳米粒子和近红外发射的量子点在 650-750 nm 光谱区内的对比。

图 2A 和 2B 显示在相同实验条件下 SERS 纳米粒子（图 2A）和 QD705（图 2B）的光吸收和发射谱。

图 2C 和图 2D 显示单个金纳米粒子（图 2C）和单个量子点（图 2D）的 SERS 和荧光图像，其被分散在载玻片上并在相同条件下（EM-CCD 相机， 633 ± 3 nm 激发和 655 nm 长通发射）被获得。显示在图 2D 中的斑点是光学干涉条纹，其在低亮度下变得可见。

图 2E 和图 2F 显示 SERS 纳米粒子和量子点之间的亮度区别的线绘图（图 2E）和统计分析（图 2F）。拉曼和量子点信号的标准偏差(S.D.)用误差棒指出。

图 3A 和 3B 展示使用抗体偶合的 SERS 纳米粒子进行的癌症细胞靶向

和光谱检测。

图 3A 显示使用 SH-PEG 和异功能 PEG (SH-PEG-COOH) 的混合物制备靶向的 SERS 纳米粒子。抗 EGFR 特异性的 scFv 抗体片段的共价偶合发生在异功能 PEG 的暴露末端。

图 3B 显示从 EGFR 阳性癌细胞 (Tu686) 和 EGFR 阴性癌细胞 (人类非小细胞肺癌 NCI-H520) 获得的 SERS 光谱, 连同对照数据和标准标记物光谱。所有光谱都来自 785-nm 激光激发的细胞悬液, 并通过从纳米标记物染色的细胞的光谱减去未处理细胞的光谱而被修正。拉曼报道分子是二乙基硫三碳菁 (diethylthiatricarbocyanine) (DTTC), 而且它的不同光谱特征由波数表示 (cm^{-1})。

图 4 展示从被注射至活体动物皮下和深层肌肉位点的聚乙二醇化的金纳米粒子获得的体内 SERS 光谱。注射位点和激光束位置由圆圈在动物上标明。

图 5A-5C 展示通过使用识别肿瘤生物标志物 EGFR 的 scFv 抗体偶合的金纳米粒子进行的体内癌症靶向和表面增强拉曼检测。

图 5A 和 5B 显示从肿瘤和肝脏位置使用被靶向的 (图 5A) 和未被靶向的 (图 5B) 纳米粒子获得的 SERS 光谱。携带人头颈鳞状上皮细胞癌 (Tu686) 异种移植肿瘤 (直径 3-mm) 的两只裸小鼠接受 90 μl 的 scFv EGFR 偶合的 SERS 标记物或聚乙二醇化的 SERS 标记物 (460 pM)。通过尾静脉单次注射施用所述粒子。注射 5 小时后获取 SERS 光谱。

图 5C 是显示聚焦于肿瘤位点或肝脏解剖位置的激光束的照片。用 2-s 信号整合和 785 nm 的激发从肿瘤位点和肝脏位点获得体内 SERS 光谱。所述光谱被扣除本底并移位以获得更好的视觉效果。拉曼报道分子是孔雀石绿, 其具有与图 5A 和 5B 中所标明的截然不同的光谱特征。所述激光功率是约 20 mW。

图 6 展示在主要器官中被靶向的和未被靶向的金纳米粒子的生物分布数据, 其中所述数据是在注射 5 个小时后通过电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 测量的。注意被靶向的和未被靶向的纳米粒子之间肿瘤堆积的

差别。基于每个研究组中的四只动物 ($n=4$) 计算 S.D. 误差棒。

图 7A 和 7B 展示未包被的(左栏)和 PEG-SH 包被的(右栏) Au-MGITC 复合物的稳定性对比。顶图是在水(实线)和 PBS(虚线)中未包被的(左)和包被的(右) Au-MGITC 的 UV-Vis 吸收光谱; 中图是在 PBS 中未包被的(左)和包被的(右) Au-MGITC 的 TEM 图像; 底图是在 PBS 中未包被的(左)和包被的(右) Au-MGITC 的 DLS 尺寸分布。MGITC 是孔雀石绿异硫氰酸酯 (ITC) 的缩写。

图 8 展示单个癌细胞的 SERS 光谱和相关的表面等离子体成像。上图: scFv 偶合的金纳米粒子标记的活的 Tu686 细胞 (EGFR 阳性) 和 H520 6 细胞 (EGFR 阴性) 的反射模式暗视野图像。所述图像由奥林巴斯 Q-Color 5 CCD 相机在 250 毫秒曝光时间下获得。下图: 从箭头所标明的单个细胞获得的 SERS 光谱。拉曼报道染料是二乙基硫三碳菁 (DTTC)。

图 9 展示普通的 PEG 包被的纳米粒子和与大小匹配的非特异性蛋白 (27-KD 重组 GFP) 偶合的 PEG 纳米标记物的体内分布和肿瘤摄取数据的比较。所述数据是在注射 5 个小时后使用对金元素的电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 分析而获得的。

图 10 展示透射电子显微照片, 其显示 EGFR 靶向的金纳米粒子的肿瘤摄取、它们在细胞内细胞器如内体中的聚集和定位。插图是细胞器内金纳米粒子的展开图。Nu 指的是细胞核。

图 11 展示显示肝脏 Kuffper 细胞对金纳米粒子的非特异性摄取的透射电子显微照片, 其主要显示位于早期和晚期内体 (如箭头所指) 的单个金纳米粒子。

图 12 显示参与主动和被动肿瘤靶向的聚乙二醇化的 SERS 纳米粒子的示意图。对照和被靶向的纳米粒子二者都能通过 EPR 作用 (增强的通透和保持作用) 在肿瘤中堆积, 但只有被靶向的纳米粒子能识别 EGFR 阳性癌细胞并由受体介导的胞吞作用快速进入这些细胞。

图 13 比较本公开的 SERS 纳米结构和量子点 QD705 的光稳定性。

图 14 展示 SERS 信号强度与连接于 60 nm 金表面的巯基聚乙二醇的数

量的关系曲线。

图 15 展示使用 PEG-SH 层封装金纳米粒子的“闭锁作用”(lock-out effect), 其中(i)不含 PEG-SH 包被;(ii)每个纳米粒子有 30,000 个 PEG-SH;(iii)每个纳米粒子有 300,000 个 PEG-SH; 以及(iv)在加入的报道染料被锁在纳米粒子外面前连接的 PEG-SH。

图 16 展示 PEG 包被防止连接在纳米粒子的报道分子和在 PEG 层外表面上的染料之间的相互干扰。(a)单独的 Au-MGITC;(b)单独的 Au-RBITC;(c) RBITC 被锁在外面; 和(d)共吸附于纳米粒子上的 2 种染料。

图 17 展示 PEG 包被的粒子的长期稳定性。

图 18 展示 Au-MGITC-PEG-SH 的 SERS 光谱, 其被再分散于(图 a)纯水、(图 b) 10×PBS、(图 c) pH 12 的水溶液、(图 d) pH 2 的水溶液、(图 e)乙醇、(图 f)甲醇、(图 g) DMSO 中, 然后被转回水中。报道染料是孔雀石绿异硫氰酸酯(MGITC), 其具有截然不同的光谱特征, 如所标记的。激发波长: 633 nm; 激光功率: 5 mW。

本公开的方法和系统的一些示范性实施方案的细节在下面的描述中被阐明。在检验如下的描述、附图、实施例和权利要求后, 本公开的其他特征、目的和优点对本领域技术人员将是明显的。所有这种额外的系统、方法、特性和优点都意于包含在此描述中、在本公开的范围, 并被随附的权利要求保护。

详细描述

在更详细地描述本公开之前, 应理解的是, 本公开不被所描述的特定的实施方案所限制, 并且当然同样可进行变化。还应理解的是, 本文所用术语仅是为了描述特定的实施方案, 且不是意图限制, 因为本公开的范围将只被所附权利要求限制。

当提供值的范围时, 应理解的是, 在该范围上限和下限之间的每个居间值(除非上下文有明确的相反说明, 所述居间值是到下限单位的十分之一)和在所述范围内的任何其他所述的或居间值, 都涵盖在本公开内。这

些更小范围的上限和下限可被独立地包含在该更小范围内并也涵盖于本公开内，所述范围内可有任何特别被排除的限值。当所述范围包括所述限值中的一个或二个的时候，排除了那些被包括的限值之一或全部两个的范围也被包括在本公开内。

除非另外定义，本文所用所有技术和科学术语具有与本公开所属的领域普通技术人员通常所理解的意义相同的意义。虽然与本文所描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料也可以用于本公开的实施或检验，但现在仍描述优选的方法和材料。

本说明书所引用的所有出版物和专利通过引用被并入本文，就如同特别地和单独地指出各单独的出版物或专利通过引用而被并入，以及为了公开和描述与该出版物所引用的相关的方法和/或材料而通过引用被并入。对任何出版物的引用是因为其在提交日期之前公开，并不应该解释为承认本公开由于在先公开而不可以早于此出版物的日期。进一步地，所提供的出版日期可能与实际的出版日期不同，这需要单独地确认。

对于阅读本公开的本领域技术人员明显的是，本文所描述和展示的每个单独的实施方案具有离散的组分和特性，其可以容易地与其他任何实施方案的特性分开或合并，而不违反本公开的范围或精神。可以以所述的事件顺序或其他任何逻辑上可能的顺序实施任何所述的方法。

除非另外指出，本公开的实施方案将使用在本领域技术内的医学、有机化学、生物化学、分子生物学、药理学以及类似学科的技术。这些技术在文献中得到充分的解释。

必须注意的是，如本说明书和所附权利要求所用，单数形式“一种(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包含复数的对象，除非上下文另外清楚地规定。因此，例如提到“一种支持物”包括多个支持物。在本说明书和随后的权利要求中，将提及许多术语，其将被定义为具有如下含义，除非有明显相矛盾的意愿。

如本文所用，除非另外说明，下面的术语具有赋予他们的意义。在本公开中，“包括(comprise)”、“包括(comprises)”、“包含(containing)”

和“具有 (having)”以及类似词具有在美国专利法中赋予它们的意义, 并且可以表示“包含 (includes)”、“包含 (including)”以及类似含义; 当应用于本公开所涵盖的方法和组合物时, “基本上由.....组成 (consisting essentially of)”或“基本组成为 (consists essentially)”以及类似表达指的是像本文所公开的那样的组合物, 但其可含有额外的结构基因、组合物组分或方法步骤 (或如上讨论的其类似物或衍生物)。然而, 与本文所公开的相应组合物或方法的结构基因、组合物组分或方法步骤等相比, 这种附加的结构基因、组合物组分或方法步骤等不显著地影响所述组合物或方法的基本的和新颖的特性。当应用于本公开所涵盖的方法和组合物时, “基本上由.....组成 (consisting essentially of)”或“基本组成为 (consists essentially)”以及类似表达具有在美国专利法中所赋予的意义, 而且此术语是开放式的, 其允许多于所列举的那些的存在, 只要所列举的那些的基本的和新颖的特性没有因多于所列举的那些的存在而改变, 但其不包括现有技术实施方案。

在描述各种实施方案之前, 提供并应使用如下定义, 除非另外指出。

定义

本文所用术语“拉曼光散射”指的是当某些分子被光照时, 阻留住光子的一小部分所述分子在释放被阻留的光子后不恢复到它们原始的振动能级, 而是降到基础电子状态的不同振动能级。因此, 从这些分子发射的射线将处于不同的能级并因此具有不同的波长。这被称为拉曼散射。

如果此分子降到基础电子状态的较高振动能级, 所发射出的光子具有比所吸收的光子更低的能量或更长的波长。这被称为斯托克斯 (Stokes) 位移拉曼散射。如果一个分子在吸收光子之前已经处于较高振动状态, 它可以将此多余的能量赋予发射的光子从而恢复到基态。在此情况下, 所发射的射线具有更高的能量 (和更短的波长) 并被称为反斯托克斯位移拉曼散射。在处于正常状态的分子的任何集合中, 处于基态的分子数量总比处于激发态的分子多得多, 因此入射光子与受激分子相互作用并在碰撞后以比其荷载的能量更多的能量被散射的几率非常小。因此, 以比入射光子频

率更高的频率（反斯托克斯频率）散射的光子相对于以比入射光子频率更低的频率（斯托克斯频率）散射的光子来说是微不足道的。因此，通常被分析的是斯托克斯频率。

本文所用术语“表面增强拉曼散射（SERS）”指的是当分子被带到极接近于（但不必接触于）特定的金属表面时，可观测到的拉曼光散射的强度的显著增加。所述金属表面需要被“粗糙化”或包被微小的金属粒子。

金属胶体也显示此种信号增强作用。强度的增加可以是几百万倍或更多的级别的。SERS 作用的原因尚未完全了解；然而，现在的想法设想至少两种单独的因素贡献于 SERS。首先，金属表面含有微小的不规则体。这些不规则体可被认为是球体（在胶体中，它们是类似球体的或几乎如此）。直径为入射光波长的约 1/10 的那些粒子被认为对所述作用贡献最大。入射光子诱发跨越粒子的场，其中所述粒子由于是金属而具有非常不稳定的电子。

在金属表面或粒子的某些构型中，可以使表面电子群以集体的方式振荡，以对施加的振荡电磁场作出响应。这种集体振荡的电子群被叫做“等离子体振子”。入射光子提供此振荡电磁场。入射光对分子中振荡的偶极矩的诱导是拉曼散射的来源。表面等离子体振子的共振振荡的作用是在金属表面附近导致电磁场强度的大幅度增强。这导致在散射分子中诱导的振荡偶极子的增强，并因此增加拉曼散射光的强度。所述作用是增加粒子附近的入射光的表观强度。

被认为贡献于 SERS 作用的第二个因素是分子成像。与金属表面极为贴近的含有偶极矩的分子将诱发其自身在具有相反极性的表面上的图像（即在等离子体振子上的“阴影”偶极子）。认为所述图像中的贴近增强分子散射光的功率。分子的这种偶联可具有对表面等离子体振子的感应或扭曲的偶极矩，并极大地提高了激发概率。这种结果是表面吸收的分子散射的拉曼光效率的非常大的增加。

SERS 作用可通过与共振拉曼作用组合而被提高。如果激发光频率与被光照的分子的主要吸收带共振，那么表面增强拉曼散射作用更强烈。所导致的表面增强共振拉曼散射（SERRS）作用能导致拉曼散射信号强度增

强七个数量级或更高。

本文所用术语“拉曼报道分子”可指小的有机化合物，例如以前用作拉曼光谱报道分子的苯硫酚、巯基苯甲酸和双吡啶。这些分子产生简单的拉曼光谱，但它难以或不可能在可见光激发波长实现共振拉曼增强。结果，被报道的 SERS 强度相对较低，即使在高（毫摩尔）的报道分子浓度下。含有异硫氰酸酯（-N=C=S）基团或多个硫原子的有机染料强烈地吸附在核心粒子上，并可以与封装作用相容。例如，强的 SERS 光谱已经获得自（b）孔雀石绿异硫氰酸酯（MGITC）、（c）四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯（TRITC）、（d）X-若丹明-5（和-6）-异硫氰酸酯（XRITC）和（a）3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物（DTDC）。这些分子中的三个含有异硫氰酸酯基团，而第四个在环结构上具有两个硫原子。

异硫氰酸酯基团或硫原子提供“亲和标记物”以结合至金表面，产生稳定的硫-金键。对于不含有这种亲和标记物的分子如结晶紫和若丹明 6G，可以观察到强的 SERS 光谱，但信号在用例如硅石包被后消失。此外，这些染料中的大多数在可见光谱中具有强的电子跃迁，因此共振拉曼增强可用来进一步增加信号强度。在严格意义上，这些分子应该被称作“共振拉曼报道分子”，以将它们同苯硫酚和其他非共振拉曼报道分子区别。在多数情况下，相对于表面增强自身，共振拉曼提供约 2-3 个数量级的额外增强。荧光和非荧光染料二者都能用作共振拉曼报道分子，因为荧光发射能被金粒子有效地猝灭，而不干扰拉曼测量。一系列苯并三唑染料对于表面增强共振拉曼散射是极好的；由于多个氮原子的存在，这些分子可以为光谱的编码和多重应用提供一类新的共振拉曼报道分子。

本文所用术语“保护层”指的是可以完全地或部分地封装纳米粒子从而防止粒子聚集的层。生物相容的层可包括但不限于巯基聚乙二醇聚合物，其中所述巯基将所述聚合物连接至下层的纳米粒子。所述聚合物的远端可具有与靶特异性的配体偶联的反应基团。所述保护层可被完整地或部分地置于，也就是定位于或沉积于金属纳米粒子和报道纳米结构的表面之上或外周。

本文所用术语“量子点”（QD）指的是半导体纳米晶体或人工原子，它

是含有 100 至 1,000 个之间的任何数量的电子并在约 2-10 nm 范围的半导体晶体。一些 QD 的直径可以在约 10-20 nm 之间。QD 具有高量子产率，这使它们对光学应用特别有用。QD 是通过形成激发子而发荧光的荧光团，其中所述激发子可被认为是通常的荧光团的激发态，但具有更长的达到 200 纳秒的寿命。此特性为 QD 提供低的光漂白。

本文所用术语“多肽”或“蛋白”旨在涵盖不论是从自然中分离的，具有病毒、细菌、植物或动物（例如哺乳动物，如人类）来源的还是合成的蛋白、糖蛋白、多肽、肽以及类似分子，以及其片段。优选的蛋白或其片段包含但不限于抗原、抗原表位、抗体或抗体的抗原反应性片段。

本文所用术语“核酸”指的是 DNA 和 RNA，其不论是从自然中分离的，具有病毒、细菌、植物或动物（例如哺乳动物，如人类）来源的，合成的，单链的，双链的，包括天然或非天然存在的核苷酸的，还是化学修饰的。

本文所用术语“癌症”将被赋予它的普通意义，并且是其中异常细胞失控地分裂的疾病的总称。癌症细胞可侵入附近的组织并能通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部位。

有几种主要癌症类型，例如，癌是开始于皮肤或界分或覆盖内部器官的组织的癌症。肉瘤是开始于骨骼、软骨、脂肪、肌肉、血管或其他结缔或支持组织的癌症。白血病是开始于造血组织例如骨髓并引起大量异常血细胞被生产和进入血流的癌症。淋巴瘤是开始于免疫系统细胞的癌症。

当正常细胞失去它们作为特定的、受控的和协调的单位的行能力时，就形成了肿瘤。一般地，实体瘤是异常的组织块，其通常不含有囊肿或液体区域（一些脑肿瘤具有囊肿和充满液体的中央坏死区）。单个肿瘤甚至可以在它内部具有不同细胞群，其具有错误的不同过程。实体瘤可以是良性的（非癌性的）或恶性的（癌性的）。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型来命名。实体瘤的例子是肉瘤、癌和淋巴瘤。白血病（血癌）一般不形成实体瘤。

代表性的癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、头颈癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、

前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、子宫颈癌。

本文所用的心血管疾病将被赋予它的普通意义，并包括但不限于高血压、糖尿病、冠状动脉病、瓣膜心脏病、先天性心脏病、心律不齐、心脏病、CHF、动脉粥样硬化、发炎的或不稳定的血小板相关的状况、再狭窄、梗塞、血栓形成、手术后凝血障碍以及中风。

本文所用炎性疾病将被赋予它的普通意义，并可包括但不限于自身免疫性疾病如关节炎、类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮，其他疾病例如哮喘、牛皮癣、炎性肠综合症，神经退行性疾病例如老年痴呆症、帕金森氏病、亨廷顿氏病、血管性痴呆以及其他病理状况例如癫痫、偏头痛、中风和外伤。

描述

与本公开的目的一致，如本文所实施的和大致描述的，本公开的实施方案涵盖表面增强拉曼光谱学（SERS）活性的复合纳米结构、制造这些纳米结构的方法和使用这些纳米结构的方法。所述 SERS 活性的复合纳米结构是可辨别的并能进行个体检测。在这点上，SERS 活性的复合纳米结构可被修改以使 SERS 活性的复合纳米结构与某些靶分子相互作用，其允许检出所述靶分子。此外，SERS 活性的复合纳米结构可用来编码系统并使系统多重化。SERS 活性的复合纳米结构可用在很多领域例如但不限于流式细胞术、化学阵列系统、生物分子阵列系统、生物感测、生物标记、高速筛选、基因表达研究、蛋白研究、医学诊断、诊断库和微观流体系统。

本公开所提供的 SERS 活性的复合纳米结构包括但不限于核心、置于其上的报道分子和封装保护物质或层。在一个实施方案中，所述核心物质是金属。在一个实施方案中，所述核心是金或银。在一个实施方案中，所述核心是金。所述报道分子可被置于（键合于）核心上，而所述封装物质覆盖并保护核心和报道分子。在根据本公开的 SERS 纳米结构的亲水保护表面上，可能有大量的官能团，其可被衍生并可允许诊断剂和治疗剂二者或靶特异性探针的连接。对于小分子配体例如合成的有机分子、短的寡核

苷酸和肽，相同配体的很多拷贝能被连接到单个纳米粒子上，导致多价的 SERS-纳米粒子-靶结合。

这种纳米粒子各自可包括 SES 活性金属纳米粒子，与金属表面极为贴近的亚单层、单层或多层的光谱活性种类，以及封装保护壳。这将光谱活性的分子（“报道分子”）放在金属纳米粒子和封装剂之间的界面上。在通常的和有利的实施方案中，SERS 纳米结构包括 (i) 金属纳米粒子核心（例如金或银），(ii) 具有独特振动特征的拉曼活性的报道分子，以及 (iii) 保护性封装剂，其将报道分子“锁”在适当位置并且还提供高度生物相容的表面。基本上是 SERS 无活性的保护性包被也稳定所述粒子以对抗聚集，并且防止不希望的核素的竞争性吸附。

虽然不期望被理论所限制，所述核心在光学上增强 SERS 光谱，而报道分子提供截然不同的光谱 SERS 特征。将封装物质置于核心和报道分子上实质上不对所述报道分子的光谱 SERS 特征产生影响，而同时保护核心和报道分子。不像其他 SERS 粒子，本公开所述 SERS 活性的复合纳米结构具有强的 SERS 强度（在约一秒内 1 mW 的激光功率下具有多于约 10,000 个计数）。在一些实施方案中，SERS 活性的复合纳米结构具有可测量的表面增强共振拉曼光谱特征。

对 SERS 高度有效的本文所公开的此类核心-壳胶体纳米粒子（例如 SERS 活性的复合纳米结构）适合于单粒子水平上的复合检测和光谱学。具有几乎最优化的金核心和保护壳，本公开的 SERS 活性的复合纳米结构在水性电解质和有机溶剂二者中都是稳定的，并产生强的单粒子 SERS 光谱。闪烁或强度波动仍被观测到，表明 SERS 信号可以由位于核心和壳之间界面的单个分子产生。一个令人吃惊的发现是，含有异硫氰酸酯（ $-N=C=S$ ）基团或多个硫原子的有机染料与封装步骤是相容的，并且是优秀的拉曼报道分子基团，这是由于它们丰富的振动光谱以及联合的表面增强和共振增强的可能性。

与多数以前的 SERS 研究相反，本文所述的表面增强拉曼信号不是来自靶分子，而是来自嵌入 SERS 活性的复合纳米结构的报道染料。尤其是这种设计避免了表面吸附、底物变化和不好的数据重复性的问题。此发展

开放了使用 SERS 在单个细胞和组织标本中的多个生物标志物进行光谱标记的新的可能性，其包括拉曼活化的流式细胞术和细胞分选。与其他生物标记例如荧光染料和半导体量子点相比，SERS 活性的复合纳米结构含有内在的信号增强机制，并在环境条件下提供丰富的光谱信息。此外，拉曼散射极短的寿命预防了光漂白、能量转移或激发态的猝灭。

纳米粒子核心可以是本领域已知的金属纳米粒子。如本文所用，术语“纳米粒子”、“纳米结构”、“纳米晶体”、“纳米标记物”和“纳米成分”可互换地用来指含有或不含额外的层例如封装保护层的金属粒子，所述粒子具有从约 1 nm 至 1000 nm 包括约 1 nm 至 1000 nm 之间任何整数值的尺寸。在一些实施方案中，金属纳米粒子核心可以是直径约为 20-200 nm 的球形或接近球形的粒子。在一些实施方案中范围是约 2 nm 至 50 nm，在一些实施方案中在约 20 nm 至 50 nm 的范围内。各向异性的纳米粒子可以具有长度和宽度。在一些实施方案中，各向异性的纳米粒子的长度是与产生纳米粒子的缝隙平行的尺寸。在各向异性的纳米粒子的情况下，在一些实施方案中，所述纳米粒子能具有约 350 nm 或更小的直径（宽度）。在一些实施方案中，所述纳米粒子能具有约 250 nm 或更小的直径，以及在一些实施方案中约 100 nm 或更小的直径。在一些实施方案中，宽度可以是约 15 nm 至 300 nm。在一些实施方案中，纳米粒子可以具有约 10-350 nm 的长度。

纳米粒子可以是各向同性的或各向异性的。纳米粒子包括胶体金属的中空或实心的纳米条，磁性、顺磁的、导电的或绝缘的纳米粒子，合成的粒子，水凝胶（胶体或条）以及类似粒子。本领域普通技术人员将理解的是，纳米粒子能以多种形状存在，其包括但不限于球形、棒状、圆盘状、锥体、立方体、圆柱体、纳米螺旋体、纳米弹簧体、纳米环形体、棒状纳米粒子、箭形纳米粒子、泪滴状纳米粒子、四脚状纳米粒子、棱柱状纳米粒子和多个其他的几何和非几何形状。

报道分子可包括以下分子，例如但不限于含有异硫氰酸酯基团的有机染料分子（下文中的“异硫氰酸酯染料”）、含有两个或多个硫原子的有机染料分子（下文中的“多硫有机染料”）、含有两个或多个各含硫原子的杂环的有机染料分子（下文中的“多杂硫有机染料”）和苯并三唑染料。此外，

报道分子可包括在可见光谱具有强的电子跃迁的共振拉曼报道分子，以使可用共振拉曼增强进一步放大信号强度。共振拉曼报道分子包括但不限于有机染料、生物分子、卟啉和金属卟啉。特别地，共振拉曼报道分子可包括但不限于孔雀石绿异硫氰酸酯、四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-6-异硫氰酸酯和 3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物及其组合。一种特别有利的报道分子是孔雀石绿。

进一步地，报道分子可包括但不限于噻菁染料、二噻菁染料、硫碳菁染料（例如，硫碳菁染料、硫二碳菁染料和硫三碳菁染料）和二硫碳菁染料（例如二硫碳菁染料、二硫二碳菁染料和二硫三碳菁染料）及其组合。

此外，所述报道分子可包括：3,3'-二乙基-9-甲基硫碳菁碘化物；1,1'-二乙基-2,2' 噻啉并三碳菁碘化物；3,3'-二乙基硫噻菁碘化物（diethylthiacyanine iodide）；4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸均二苯乙烯-2,2'-二磺酸（4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid），二钠盐；二苯甲酮-4-异硫氰酸酯；4,4'-二异硫氰酸二氢均二苯乙烯-2,2'-二磺酸，二钠盐；4,4'-二异硫氰酸均二苯乙烯-2,2'-二磺酸，二钠盐；异硫氰酸 N-(4-(6-二甲氨基-2-苯并咪唑基)苯酯)；7-二甲氨基-4-甲基香豆素-3-异硫氰酸酯；曙红-5-异硫氰酸酯；赤藓红-5-异硫氰酸酯；荧光素-5-异硫氰酸酯；(S)-1-对-异硫氰酸苄基二乙烯三胺五乙酸；Oregon Green® 488 异硫氰酸酯；四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯；四甲基若丹明-6-异硫氰酸酯；四甲基若丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯；X-若丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯及其组合。

苯并三唑染料可包括但不限于偶氮苯三唑-3,5-二甲氧基苯胺和二甲氧基-4-(6'-偶氮苯三唑)苯酚。

如上所述，所述报道分子可具有异硫氰酸酯基团或两个或多个硫原子（例如，异硫氰酸酯染料、多硫有机染料和多杂硫有机染料），其能够形成在偶联剂和封装物质的沉积作用中稳定的硫-金键。此外，这些报道分子在可见和近红外光谱（约 400-850 nm）中具有强的电子跃迁，以至于共振拉曼增强可用来增加信号强度。

SERS 活性的复合纳米结构可有利地具有直径小于约 250 纳米（nm）、约 10 至 150 nm 和约 30 至 90 nm 的球形直径或大致球形的直径。核心直

径可以是约 10 至 200 nm、约 20 至 100 nm 和约 40 至 80 nm。封装剂厚度可以是约 1 至 50 nm、约 2 至 50 nm 和约 5 至 10 nm。总之，封装剂直径越大，所提供的保护越好。但是，随着直径的增加，SERS 活性的复合纳米结构的总尺寸增加。可基于特殊应用来确定适当尺寸的选择。

一般来说，报道分子可覆盖约 1%至 75%的核心表面（例如，报道分子吸附在约 1%至 75%的核心粒子表面上）、约 15%至 50%的核心 12 表面、约 15%至 30%的核心 12 表面和约 20%至 25%的核心 12 表面。

在包括偶联剂的实施方案中，偶联剂可覆盖约 1%至 100%的核心表面、约 40%至 60%的核心 12 表面和约 45%至 50%的核心表面。在一个实施方案中，报道分子可覆盖约 1%至 75%的核心表面、约 15%至 50%的核心 12 表面、约 15%至 30%的核心 12 表面和约 20%至 25%的核心表面。

SERS 活性的复合纳米结构可通过一种或多种途径制备。例如，SERS 活性的复合纳米结构可通过将核心与报道分子在报道分子与核心键合的条件下混合而制备。特别地，核心可与具有约 $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$ 至 $1.25 \times 10^{-7} \text{M}$ 和约 $7.5 \times 10^{-8} \text{M}$ 的浓度的报道分子混合约 1 至 30 分钟。然后，在一个实施方案中，偶联剂与具有置于其上的报道分子的核心混合。特别地，偶联剂可被加至终浓度约 $2.5 \times 10^{-7} \text{M}$ 约 1 至 30 分钟。随后，具有置于其上的报道分子的核心（而且在一些实施方案中具有置于其上的偶联剂）可与封装物质在 pH 约 9 至 11 下混合约 24 至 96 小时。关于 SERS 活性的复合纳米结构的制备的更多细节描述于本文呈现的实施例中。

本公开涵盖置于核心拉曼报道复合物表面上的保护囊的用途。值得深思的是，许多物质可用来封装核心-报道分子。最有利地，保护层包括巯基聚乙二醇，借此所述聚合物借助于巯基偶合至下面的核心。聚合物的远端可包括活性基团例如但不限于羧基或胺基，其可与靶特异性实体例如但不限于免疫球蛋白或其片段形成偶联。

SERS 活性的复合纳米结构可被连接至探针分子。SERS 活性的复合纳米结构还可被连接至结构（例如，在测定中）或自由漂浮（例如，在微观流体系统或流式细胞术中）。探针分子可以是能够直接或通过连接子间接地连接到 SERS 活性的复合纳米结构的任何分子。例如，靶特异性探针可

被连接至保护性封装物质例如巯基聚乙二醇。探针分子可通过稳定的物理和/或化学缔合连接至 SERS 活性的复合纳米结构。

被考虑用于本公开的实施方案的有利的靶特异性探针分子可具有对期望进行检测的一种或多种靶分子的亲和性。例如，如果靶分子是核酸序列，那么所选的探针分子应该是基本上互补于所述靶分子序列的，以使靶和探针的杂交发生。术语“基本上互补”意思是，探针分子对靶序列是充分地互补的以在所选反应条件下杂交。

在一个实施方案中，探针分子具有对一种或多种靶分子（例如，癌细胞）的亲和性，其中所述靶分子的检测（例如，确定在血管（身体）中的存在和/或近似位置）是期望的。例如，如果靶分子是核酸序列，那么所选的探针分子应该是基本上互补于所述靶分子序列的，以使靶和探针的杂交发生。术语“基本上互补”意思是，探针分子对靶序列是充分地互补的以在所选反应条件下杂交。

探针分子和靶分子可包括但不限于多肽（例如，蛋白例如但不限于抗体（单克隆或多克隆）、核酸（单体和寡聚体二者）、多糖、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、药物（例如小的化合物药物）、配体或其组合。有利地，探针可以是相容于并能够结合于细胞表面上的靶分子的抗体或配体，其中所述细胞例如但不限于癌细胞。

本公开的纳米结构可包括至少两种不同类型的探针，其中每种都是例如靶向特定细胞的靶向探针。

本公开提供靶向样品或受治疗者（例如，哺乳动物、人、猫、狗、马等）中的一种或多种靶细胞的方法。例如，使用根据本公开的纳米结构，纳米结构可用来检测动物中的肿瘤细胞。

还应该注意的，纳米结构可以作为治疗的一部分（例如，药物递送）、作为递送到一种或多种靶（例如，癌症）的指示或其组合而用于状况和/或疾病的检测，其中所述状况和/或疾病例如但不限于癌症、肿瘤、肿瘤性疾病、自体免疫性疾病、炎症性疾病、代谢状况、神经性和神经退行性疾病、病毒性疾病、皮肤病、心血管疾病、传染性疾病的组合。

应注意的是，可以用纳米结构和/或微观结构预先标记细胞（例如，在体外和在体内）。例如，可使用纳米粒子-嵌段共聚物微观结构在体外通过免疫染色、吸附作用、微注射、细胞吸收以及类似方式对细胞进行标记。然后可在体外监视，或在体内追踪所述细胞，使用作为追踪物的纳米粒子、荧光、磁性及其组合以及类似方法，而可通过连接在 SERS 纳米结构外表面的探针来修饰基因的表达。

本公开提供在样品中检测一种或多种靶分子的方法。所述方法包括将靶分子（例如，通过靶特异性探针分子）连接在纳米结构上并测量所述纳米结构的 SERS 光谱，其中检测到对报道分子特异性的 SERS 光谱表明对探针分子具有特异性的靶分子的存在。SERS 活性的复合纳米结构可用来检测化学阵列系统和生物分子阵列系统中一种或多种靶分子的存在。此外，SERS 活性的复合纳米结构可用来提高各种类型系统中的编码和多重能力。

在一个实施方案中，流式细胞仪可用于多重测定过程，以使用一种或多种 SERS 活性的复合纳米结构检测一种或多种靶分子。流式细胞术是一种光学技术，其基于粒子的光学特性分析液体混合物中的特殊粒子（例如，SERS 活性的复合纳米结构）。流式细胞仪水动力地将 SERS 活性的复合纳米结构的液体悬浮液集中成细流以至于 SERS 活性的复合纳米结构基本上成一路纵队流动并穿过检验区。当它们流过检验区时，集中的光束例如激光光束照亮 SERS 活性的复合纳米结构。流式细胞仪中的光检测器在光与 SERS 活性的复合纳米结构相互作用时测量光的某些特性。常用的流式细胞仪可测量 SERS 活性的复合纳米结构在一种或多种波长的发射。

可以使用 SERS 活性的复合纳米结构和对一种或多种靶分子具有亲和性的一种或多种探针检测一种或多种所述靶分子。每种 SERS 活性的复合纳米结构具有对应于探针的报道分子。在被引入流式细胞仪之前，将对于特定靶分子具有特异性的 SERS 活性的复合纳米结构与可包括一种或多种靶分子的样品混合。SERS 活性的复合纳米结构与相应的靶分子相互作用（例如，键合或杂交），其中所述靶分子与所述探针具有亲和性。

接着，将 SERS 活性的复合纳米结构引入流式细胞仪。如上所述，流

式细胞仪在暴露于第一能量之后能够检测 SERS 活性的复合纳米结构。检测到对应于某种报道分子的某种拉曼光谱表明靶分子存在于样品中。

可以通过多种方法获得含有拉曼光谱信息的细胞图像。可以将显微镜偶连到 CCD 照相机以便可获得物体的完整图像。然后，在样品和照相机之间插入波数过滤设备，例如单色器或液晶可调滤波器。在任何一个时间，过滤设备只允许窄带宽的散射辐射到达照相机。采集多个图像，其中每个覆盖小光谱范围的散射辐射。在软件中将来自图像中每点的光谱组合。在另一个极端，可通过单色器分散来自图像中单个点的光，而该点的完整光谱可在阵列检测器获得。然后将物体扫描以使图像中每点被分别获得。然后在软件中将拉曼图像组合。在另一种方法中，可以构建一种线扫描设备，其使用线辐射激发样品。所述线在空间上沿着 CCD 照相机的一个轴成像，而其光谱同时沿着正交轴分散。照相机的每个读数获得线中每个空间像素的完整光谱。为了完成图像，越过样品扫描所述线。

因此，根据本公开，可以使用抗体偶合的 SERS 纳米结构鉴定细胞或细胞群，其中所述 SERS 纳米结构用可结合细胞亚群表达的细胞表面抗原受体的抗体制备。

本公开的 SERS 纳米结构还可用来检测细胞内的靶。可通过微注射、电穿孔、内吞作用介导的手段将 SERS 纳米结构引入细胞，其中所述内吞作用介导的手段包括使用两亲性肽例如 PEP-1，使用基于阳离子脂质的试剂例如 Lipofectamine (Invitrogen)，以及使用胶束和转染试剂例如转铁蛋白、甘露糖、半乳糖和 Arg-Gly-Asp (RGD) 和其他试剂例如基于树枝状大分子的试剂 SuperFect (Qiagen)。

可以使用细胞内间接方法来证明粒子结合到期望的靶上。证明探针特异性的最简单方法是使用免疫荧光来证实 SERS 纳米结构的位置。有多个商业上可得的荧光探针，其对于标记活细胞中的细胞结构（例如，线粒体、高尔基体和内质网）是有用的。通过偶合靶向相同结构的抗体，可以确定粒子中的哪部分主动标记它们的靶；以及多大比例是非特异性地结合的。证实 SERS 纳米结构的位置的另一种方法是使用荧光蛋白融合物例如 GFP 及其类似物。

因此,本公开涵盖针对在医学诊断中展示重要特性的成像剂的纳米结构。更特别地,本公开针对包括 SERS 纳米结构的成像剂。本公开所述成像剂在对患者总体成像时和/或特别地在诊断患者中病态组织的存在时是有用的。通过选择组成,SERS 纳米结构的激发和发射可被调节到在约 633 nm 至 1000 nm 发生,其在组织吸收和散射的最小区域中。成像过程可通过向患者施用本公开的成像剂,然后使用能进行光谱成像的任何系统扫描患者来进行,其中所述系统例如光点扫描共聚焦显微镜、线扫描系统和光学相干断层成像系统。本公开的 SERS 纳米结构还可通过只检测单个波段的任何成像系统、上面所列系统以及具有激发光源和过滤图像检测的任何荧光成像系统观察。还包括时域方法,例如动态光散射光谱学和断层成像、飞行时间成像、准弹性光散射光谱学、光子相关光谱学、多普勒光谱学和扩散波光谱学。所有这些技术允许基于光子的时间特征区别光子,和它们所在的位置。因为 SERS 纳米结构具有不同于荧光物质等的时间特征,所以它们能通过这些方法与组织和其他标记区分开来。有用的设备参数是调制的光源和时间敏感的检测器。调制可以是脉冲的或连续的。

扫描得到患者内部区域和/或该区域中任何病态组织的光谱或图像。患者的区域是指患者整体或患者的特殊区域或部分。成像剂可用于提供脉管系统、心、肝和脾的图像,也可用于胃肠区域或其他体腔的成像,或用于本领域技术人员容易了解的其他方法,例如组织表征、血池成像等。

本公开还提供诊断体内病理学异常的方法,其包括向接触病理学异常的体液中引入靶向参与病理学异常的分子的多个 SERS 纳米结构,其中所述 SERS 纳米结构与参与病理学异常的分子缔合,还包括在体内为缔合的 SERS 纳米结构成像。所述方法通常适用于探针可到达的任何器官:胃肠道、心、肺、肝、子宫颈、乳腺等。在一些实施方案中,SERS 纳米结构可通过内窥镜(如在结肠镜检查术的情况中)或针引入,或与一次性吸管或套管一起使用。在其他实施方案中,SERS 纳米结构可直接地通过成像探针本身被引入。例如,可将单条光纤或光线束引入活生物体用于成像,并已经在对神经、脑、微血管、细胞的成像以及对生物分布的表征中得到证明。凝胶包被的光纤在有关传感器的文献中是众所周知的。SERS 纳米

结构可以非共价地结合至凝胶，在引入后扩散进入相关组织中。可以预见将 SERS 纳米结构固定在纤维外表面上的各种其他方法，以使它们扩散进它们所接触的液相中。

本公开还提供用 SERS 纳米结构标记动物的方法，其包括将 SERS 纳米结构引入动物。可通过任何适合的方法例如皮下植入或静脉内将 SERS 纳米结构引入动物，并用适当的仪器检测。本公开还提供动物例如家畜或家养宠物的鉴定系统和相关方法，其使用植入皮或皮肤之下的 SERS 纳米结构来鉴定所述动物。

在体内条件下，根据本公开的纳米结构可通过被动靶向机制和主动靶向机制二者递送到肿瘤。在被动模式下，大分子和纳米尺寸的粒子通过增强的渗透和滞留（EPR）作用被优先地聚集在肿瘤部位。人们相信，该作用起因于两个因素：（a）产生血管内皮生长因子（VEGF）的血管生成性肿瘤，所述血管内皮生长因子使肿瘤相关的新血管系统具有超渗透性，并导致循环的大分子和小粒子的渗漏；和（b）缺乏有效的淋巴引流系统的肿瘤，其导致随后的大分子或纳米粒子的聚集。

因此，本公开的一个方面涵盖表面增强拉曼光谱活性的复合纳米结构，其包括金属核心（有利地为金）、纳米粒子、置于所述核心表面的拉曼报道分子和置于核心和报道分子表面的封装保护层，其中所述被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。

在本公开的实施方案中，所述拉曼报道分子可选自异硫氰酸酯染料、多硫有机染料、多杂硫有机染料、苯并三唑染料或其组合。

在本公开的实施方案中，所述报道分子可选自噻菁染料、二噻菁染料、硫碳菁染料或二硫碳菁染料。在其他的实施方案中，报道分子选自孔雀石绿异硫氰酸酯、四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-6-异硫氰酸酯或 3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物。

在本公开的一个实施方案中，所述核心是金，并可具有小于约 200 纳米的直径。

在本公开的纳米结构的实施方案中，封装物质是巯基聚乙二醇。

在本公开的其他实施方案中，纳米结构还可包括选择性地结合细胞上的靶的靶特异性探针。

在这些实施方案中，所述靶特异性探针可选自由抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物及其组合组成的组，其中所述靶向探针具有对靶细胞表面上标志物的亲和性。

在一个实施方案中，靶特异性探针是免疫球蛋白或其片段，而且在本公开的实施方案中所述探针可以被置于疏水保护结构上。在一个实施方案中，所述探针是靶向肿瘤的配体。

本公开的另一个方面涵盖制备根据本公开所述纳米结构的方法，其包括提供金纳米粒子，将所述金纳米粒子引至拉曼报道子，借此将拉曼报道子置于纳米粒子的表面而形成纳米粒子-报道子复合物，以及将保护结构层置于所述纳米粒子-报道子复合物上，其中所述报道子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征。

在本发明此方面的一个实施方案中，所述方法还可包括将细胞靶特异性探针沉积于保护结构层上，其中所述探针选自抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物或其组合。

在本公开此方面的方法的一个实施方案中，所述核心金属的纳米粒子是胶体。在一个有利的实施方案中，所述核心金属的纳米粒子是金。

在本公开此方面的实施方案中，所述拉曼报道分子可选自异硫氰酸酯染料、多硫有机染料、多杂硫有机染料、苯并三唑染料或其组合。在本公开的其他实施方案中，所述报道分子选自噻菁染料、二噻菁染料、硫碳菁染料或二硫碳菁染料。在本公开的此方法的其他实施方案中，报道分子选自孔雀石绿异硫氰酸酯、四甲基若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-5-异硫氰酸酯、X-若丹明-6-异硫氰酸酯或3,3'-二乙基硫二碳菁碘化物。

在本公开的一个实施方案中，封装物质是巯基聚乙二醇。

本公开又一个方面涵盖生物样品成像的方法，其包括将至少一种纳米结构递送到培养的细胞或动物或人受治疗者（其中所述纳米结构包括核心金纳米粒子、置于所述核心表面上的拉曼报道分子和置于所述核心和报道

分子上的封装保护层,其中所述被封装的报道分子具有可测量的表面增强拉曼光谱特征),允许所述纳米结构与被靶向的生物细胞或组织接触,用放射源激发报道分子并测量对应于所述报道分子的纳米结构的表面增强拉曼光谱,从而检测所述纳米结构在被靶向的细胞或组织中的存在。

在本公开此方面的一个实施方案中,纳米结构还可包括靶特异性探针,其中所述靶向探针选择性地使纳米粒子结合到被靶向的细胞,从而允许检测被靶向的细胞。

在本公开的另一个实施方案中,靶细胞是在动物或人受治疗者的组织中。

在本公开此方面的实施方案中,所述靶细胞可以是动物或人受治疗者的癌细胞,而且所述靶特异性探针可选自由抗体、多肽、多核苷酸、药物分子、抑制剂化合物及其组合组成的组,其中所述靶向探针具有对靶细胞表面上标志物的亲和性。

在本公开的一个实施方案中,所述靶特异性探针是靶向肿瘤的配体。

下面具体的实施例仅仅被理解为说明性的,并不以任何方式限制本公开的其余部分。无需进一步阐释,认为本领域技术人员能够基于本文的描述来最大限度地利用本公开。本文列举的所有出版物借此以其整体通过引用并入本文。

应该强调的是,本公开的实施方案,特别地任何“优选的”实施方案,只是实施的可能实例,其提出仅是为了清楚理解本公开的原理。在实质上不违反本公开精神和原理的基础上,可以对本公开上述实施方案进行很多变动和修改。所有这种修改和变动旨在包括于本文此公开的范围内,而且本公开受到如下权利要求的保护。

提出下面的实施例以便为本领域普通技术人员提供完整的公开和描述,其是关于如何实施本文所公开和要求保护的方法以及使用本文所公开和要求保护的组合物和化合物。已努力确保数字(例如,量、温度等)的准确性,但应该考虑一些误差和偏差。除非另外指出,部分是按重量计的部分,温度是 $^{\circ}\text{C}$,而且压力是大气压或者接近大气压。标准温度和压力被

定义为 20°C 和 1 个大气压。

实施例

实施例 1

试剂: 在整个研究中使用超纯水 ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$)。从商业来源获得下述化学品并不经进一步纯化而使用: 浓度为每毫升 2.6×10^{10} 个颗粒的 60-nm 柠檬酸盐稳定的金粒子 (Ted Pella Inc.)、近红外发射的量子点 (QD705, Invitrogen)、孔雀石绿异硫氰酸酯 (MGITC) (Invitrogen)、二乙基硫三碳菁碘化物 (DTTC) (Exciton)、mPEG-SH (分子量(MW)大约为 5 kDa) (Nektar Therapeutics)、HS-PEG-COOH (MW 大约为 3 kDa) (Rapp Polymers)。人癌细胞系 Tu686 是从舌底的原发性肿瘤建立的。人癌细胞系 NCI-H520 是从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 购入的。细胞培养基、胎牛血清、血细胞计数器和细胞培养物供给是从 Fisher Scientific 购入的。所有其他试剂是从 Sigma-Aldrich 获得的, 并具有可得最高纯度。

实施例 2

合成: 根据文献的步骤合成具有约 60 nm 靶直径的金胶体。在使用前将所有玻璃仪器严格地清洁并用水润洗。在 50 mL 玻璃烧瓶中将 30 mL 的 0.01% 的 HAuCl_4 水溶液在磁力搅拌下煮沸。煮沸后, 迅速注射 180 μL 的 1% 柠檬酸钠。在几分钟内, 浅黄色溶液转变成深紫色并快速发展成红色。将所述胶体煮沸约 15 分钟以保证完全还原, 允许其冷却到室温并在使用前重新组成至 30 mL。

为了使用嵌入的拉曼报道子 (即, 报道分子) 制备 SERS 活性的复合纳米结构, 将约 0.1 g 混合床离子交换树脂与新鲜配制的金胶体搅拌以除去过量的离子。通过过滤或小心的倾析将树脂除去, 并用等量的水稀释所述胶体。在快速搅拌中加入拉曼报道子至不超过约 $7.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 的浓度, 并允许平衡约 15 分钟。

测量: 使用扫描分光光度计 (Shimadzu, Columbia, MD) 获得 UV 可见吸收光谱。使用 Philips CM200 电子显微镜拍摄高倍放大的透射电子

显微照片，并记录在 TVIPS 2k×2k CCD 上。使用分散拉曼光谱系统 (Solution 633, Detection Limit, Laramie, WY) 记录大量的拉曼光谱。单粒子光谱使用倒置光学显微镜 (Diaphot 200, Nikon, Melville, NY) 获得，其装备有氩/氦混合气体离子激光器 (Lexel 3500, Fremont, CA) 以用于 647 nm 激发。

首先使用宽视野照明筛选感兴趣的区域，并使用安装在显微镜前口的视频速率强化的 CCD (ICCD, PTI, Inc., Lawrenceville, NJ) 对拉曼活性的粒子进行定位。然后使用共聚焦光学器件聚焦于单个 SERS 活性的复合纳米结构，并且通过显微镜物镜 (平场 100×, 油浸, NA = 1.25) 采集反向散射的拉曼信号。使用三重带通滤波器 (Chroma Tech, Brattleboro, VT) 阻挡激光线和外来信号。使用安装在单级分光计 (型号 270M, Spex, Edison, NJ) 上的 CCD 检测器 (TKB512, Princeton Instruments, Trenton, NJ) 获得光谱特征。

实施例 3

聚乙二醇化的 SERS 纳米粒子的制备: 将新鲜制备的报道子溶液 (3-4 μM) 以 1:6 的报道子溶液/胶体体积比率逐滴地加入迅速混合的金胶体中，其有助于所述报道分子在金粒子表面的均匀分布。优化报道分子对金粒子的摩尔比率以获得最大的 SERS 强度和最小的胶体聚集。例如，优化的表面覆盖值是每颗 60 nm 金粒子 14,000 个孔雀石绿异硫氰酸酯分子，以及每颗相同尺寸的金粒子约 15,300 个结晶紫分子。应该注意的是，上述参数 (即，储存报道子的浓度、储存报道子溶液对金纳米粒子溶液的体积比率以及将报道子加入金中的速率) 都影响所得的标记物的聚集状态。当把报道子溶液加入金胶体时，我们观察到比把金加入报道子时更高的 SERS 信号。

10 分钟后，将巯基-PEG 溶液 (10 μM) 逐滴地加入拉曼编码的胶体，其最低比率为每颗 60-nm 金粒子 30,000 个 PEG-SH 分子。该表面覆盖对应于金粒子表面上的完整的 PEG 单层，并对于在各种条件下稳定金胶体以避免聚集是必要的。简单的几何计算显示，每个巯基-PEG 分子占据了金表面上 0.35 nm^2 的足迹面积 (footprint area)，这与报道的刷状构象中的 PEG-SH

的文献数据一致。重要地，过量 10 至 20 倍的 PEG-SH 的加入没有导致胶体稳定性或聚合物包被层厚度的任何变化。

实施例 4

纳米粒子的表征: 使用一次性聚丙烯酸小杯将 UV-Vis 吸收光谱记录在 Shimadzu (UV-2401) 分光计上。使用 Hitachi H7500 高倍放大电子显微镜拍摄透射电子显微照片 (TEM)。将纳米粒子样品 (5 μl) 滴在铜制 200 目载网(grid)上, 其中所述载网被紫外线预处理以减少静电。30 分钟后, 用滤纸将溶剂吸干, 并应用磷钨酸染色溶液 (按重量计 1%, 调节至 pH 6) 30 秒。在 4°C 下将新鲜肿瘤组织标本在含有 2.5%戊二醛的 0.1 M 二甲胍酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中固定。在 0.1 M 二甲胍酸盐缓冲液中将所述组织润洗三次每次 15 分钟, 用 1%的 OsO_4 缓冲液进行后固定, 然后脱水并在树脂 (Epon) 中包埋。使用超薄切片机(ultratome machine)生产超薄切片 (大约 60 nm) 并放在铜制载网上进行 TEM 成像。

使用 Brookhaven 90Plus 粒子尺寸分析仪器获得 DLS 数据。连续地测量每种样品三次。使用 633 nm (3 mW) 或 785 nm (40 mW) 的激发将 SERS 光谱记录在紧凑型拉曼系统上 (Advantage Raman Series, DeltaNu)。使用 785-nm 激光激发将体内 SERS 光谱收集在手持式拉曼系统 (Inspector Series, DeltaNu) 上。焦点处的激光束直径为 35 μm , 所以据估计探针体积在 633 nm 激发下是约 23 nl 而在 785 nm 激发下是约 19 nl。SERS 强度被归一化至环己烷和聚苯乙烯的拉曼光谱以纠正光学准直和仪器响应中的变化。Advantage 和 Inspector 拉曼系统二者的光谱分辨率约为 5 cm^{-1} 。

对于单个 SERS 纳米粒子和量子点成像, 将窄带宽激光激发滤波器 ($633 \pm 3 \text{ nm}$) 和长通发射滤波器 (655LP, Chroma Tech) 应用于 Olympus IX71 倒置显微镜。使用连接至显微镜的电子倍增 (EM) CCD 照相机 (Hamamatsu, 型号 C9100-12), 以 750 ms 曝光时间拍摄图像, 并取 50 张图像的平均。长曝光时间和图像平均的使用消除了单个纳米粒子的任何信号波动。对于 SERS 和量子点信号强度的定量比较, 使用 CCD 照相机响应曲线校正波长依赖性因素。

实施例 5

与 scFv 配体的偶合: 对人 EGFR 具有特异性的抗体片段 scFv B10 是使用建立的固相生物淘选方法从 YUAN-FCCC 人原初噬菌体展示文库中分离的。在天然条件下使用 Ni^{2+} NTA-琼脂糖柱 (Qiagen) 从细菌提取物中纯化了大量 scFv。使用十二烷基硫酸钠 (SDS) -PAGE 确定蛋白纯度超过 95%。在快速混合下, 向聚丙烯管中的 2.2 ml Au-MGITC (或 Au-DTTCI) 溶液逐滴地加入异功能连接子 HS-PEG-COOH (430 μl 和 1 μM)。通过改变所用的连接子的量, 每颗金粒子的羧基数量被控制在大约 5,000。混合 15 分钟后, 将金纳米粒子暴露于大量的 PEG-SH (1.6 ml, 10 μM) 以填充未被异功能 PEG 覆盖的区域, 产生很好地屏蔽的和稳定的粒子表面。在羧基官能团上共价偶合配体之前, 通过三轮离心 (1,000g) 和在 PBS 中的重悬浮纯化金粒子。

为了活化粒子表面的 -COOH 基团以进行共价偶合, 将新配制的浓度为 40 mg/ml 的乙基二甲基氨基丙基碳二亚胺 (EDC) 溶液 (5 μl) 和硫代-NHS (5 μl , 110 mg/ml) 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈地混合 15 分钟。通过三轮离心 (1,000g) 和在 PBS 中的重悬浮, 使用 Nanosep 10K MWCO OMEGA 膜 (Pall Life Sciences) 将过量的 EDC 和硫代-NHS 与活化的纳米粒子分离。然后将含有活化羧基的纯化的金粒子与 scFv 抗体 (11.2 nmol) 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2h, 并将反应混合物储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。通过三轮离心和在 PBS 中的重悬浮, 使用 100K MWCO OMEGA 膜将过量的 scFv 配体除去。基于在 280 nm 的蛋白吸收测量, 我们估计, 每颗金粒子具有约 600 个 scFv 分子。通过使用荧光标记的 scFv 配体在更高灵敏度下确定偶合比率而进一步确认了此值。完全功能化的纳米粒子通过 UV-Vis、TEM 和 DLS 被表征, 而且它们的胶体稳定性和光学特性与对照纳米粒子标记物基本上相同。

实施例 6

细胞 SERS 研究: 将 Tu686 和 H520 细胞培养在分别补充有 10% 热灭活的胎牛血清和抗生素 (链霉素, 青霉素 G 和两性霉素 B) 的 DMEM/Ham 氏 F-12 (1:1) 和 RPMI-1640 中, 并维持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和含 5% CO_2 的加湿型培养箱中。细胞在 35-mm 盘中生长到连成一片。在桌面式结合培养箱中在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的无菌条件下进行细胞染色步骤。将活细胞与偶合 scFv 的 SERS 纳米

粒子 (15 pM, 于 PBS 中) 温和地混合 30 分钟, 然后通过轻轻的刮除进行收获。细胞经受四轮冰冷的 PBS 的洗涤, 并在 SERS 测量前重悬浮于 500 μ l PBS。将一部分细胞与聚乙二醇化的对照 SERS 标记物孵育以评估非特异性结合和内化作用。另一部分细胞既不接受对照 SERS 标记物也不接受 EGFR-SERS 标记物, 并用作对照以评估背景细胞散射。将 SERS 光谱归一化至由 Coulter 计数器所确定的细胞数量。

为了进行定量对比, 我们减去单纯的细胞散射光谱以生成图 3 中的示差谱。所有光谱都是在细胞悬浮液中取得的。基于 1×10^6 个细胞/ml 的细胞密度, 我们估计, 激光探测体积含有大约 20 至 30 个标记的细胞。在 3 天时间里重复检验未固定细胞样品时或当细胞被固定在甲醛溶液中时, 我们没有观察到光谱特征或强度的变化。这些细胞悬浮液的测量避免了纳米粒子标记和细胞异质性的问题, 并被发现是高度可重复的。

实施例 7

肿瘤异种移植和体内 SERS: 健康的裸小鼠接受了 50 飞摩尔的聚乙二醇化的 SERS 纳米粒子, 其被施用于两种位置: (i) 皮下注射 (皮下 1-2 mm); 和 (ii) 深度肌肉注射 (皮下 1 cm)。使用 NIR 拉曼分光计 (Inspector Series, DeltaNu) 检验了不同位置。获得 3 秒后的皮下 SERS 光谱, 21 秒后的肌肉光谱, 并也获得 21 秒后的对照光谱 (在远离注射位置的区域获得)。

将 Tu686 细胞 (5×10^6 个) 经皮下注射到约 6 至 8 周大的雌性裸小鼠 (NCr 无胸腺 (NC rathymic), nu/nu) 的背部两侧区域。将小鼠分成两组进行被动和主动靶向研究。当肿瘤尺寸达到 3 mm 直径时, 裸小鼠通过尾静脉注射分别接受 45 飞摩尔的 scFv EGFR 偶合的 SERS 标记物和聚乙二醇化的对照 SERS 标记物。5 小时后, 通过注射 70 μ l 的氯胺酮和甲苯噻嗪混合溶液将小鼠麻醉, 并使用 20 mW 激光功率使用拉曼分光计在 785 nm 进行检验。对于被靶向或未被靶向的 SERS 纳米粒子, 激光光束被聚焦在肿瘤或肝脏解剖区域。使用大约 9 mm 的焦距, 以完全无接触和非侵入性的方式获得 SERS 光谱。结果被显示在图 5A-5C 中。在光谱数据采集后, 将小鼠杀死以收集主要器官用于 ICP-MS 生物分布分析。每种新鲜组织样品的一小块还被立即固定于 0.1 M 的二甲胍酸盐缓冲液中以制备 TEM 薄

切片 (图 10 和 11)。

简短地, 用乙醇将主要器官组织润洗三次然后冻干并称取到清洁的小瓶中以进行酸消化。用强酸消化 2 天后, 将样品纯化并稀释 35 倍以进行 ICP-MS 分析 (电感耦合等离子体-质谱法)。将实验独立进行五次以进行统计分析。每次使用具有新配制的 SERS 标记物的两只小鼠, 其中一只用于主动靶向而另一只用于被动靶向。一组动物用于更长期的毒性研究。

实施例 8

聚乙二醇化的 SERS 纳米标记物的设计和表征: 图 1A-1D 显示含有嵌入的光谱标记物的聚乙二醇化的金纳米粒子的设计和制备以及它们的示意结构。还显示了它们的光吸收谱 (图 1B)、透射电子显微 (TEM) 结构 (图 1C) 和流体动力学尺寸数据 (图 1D)。原始的金粒子 (60-nm 直径) 是用拉曼报道子编码, 并由巯基-PEG 层稳定的。之前的实验显示, 具有约 60-80 nm 核心尺寸的金纳米粒子在红光 (630-650 nm) 和近红外 (785 nm) 激发下对于 SERS 是最有效的 (Krug 等, (1999) J. Am. Chem. Soc. 121: 9208-9214)。

此光谱区域被称作光学成像的“清晰窗 (clear window)”, 因为血红蛋白 (血液) 和水吸收光谱是最小的。除 SERS 作用以外, 我们还使用在 633 nm 或 785 nm 下具有电子跃迁的报道分子实现了共振拉曼增强。金等离子体共振光谱基本上保持不变 (<1-nm 红移), 即使在金粒子被大量分子 (约 $1.4-1.5 \times 10^4$) 包被并被 PEG 分子层稳定时 (图 1B)。我们注意到, 单分子 SERS 只发生在特定的活性位点或连接处, 而且它对肿瘤检测不是必需的。事实上, 因大量报道分子吸附在粒子表面, 所得的总信号强度超过了单分子 SERS 的信号强度。通过 TEM 阴性染色, 清楚地观察到作为大约 5 nm 白色薄层的 PEG 包被, 而粒子的“湿”流体动力学直径在聚乙二醇化之后增加了 20 nm, 如在缓冲盐水中流体动态光散射 (DLS) 所测量的。在 60 nm 的核心粒子尺寸下, 为了实现完全保护以避免盐诱导的胶体聚集, 每个金纳米粒子上最少 30,000 个巯基-PEG 分子 (MW = 5 kDa) 是必要的。此表面覆盖对应于每个 PEG 分子上约 0.35 nm^2 的足迹面积, 这与另一个研究组报道的吸附在刷状构象的胶体金上的巯基-PEG 的数据一致。在此屏蔽层被

完成之后,使用额外的多至 10 至 20 倍过量的巯基-PEG 对于包被厚度具有很小的作用,如 TEM 和 DLS 二者所测。

实施例 9

通过在各种条件下测量聚乙二醇化的金纳米粒子的 SERS 信号(频率和强度二者)研究了它们的稳定性,其中所述条件包括浓盐(1-2 M)、强酸(0.1 M HCl)、强碱(1 M NaOH)和有机溶剂(甲醇、乙醇和二甲基亚砷或 DMSO)图 A 和 B。在没有 PEG 保护下,金纳米粒子在这些苛刻的条件下迅速地“坠落”(即,聚集和沉降)。在有 PEG 保护下,金粒子和它们的 SERS 光谱完全稳定,只是在 pH 1-2 下有很小的相对强度变化(由于金表面上报道分子的质子化作用和相对方向的改变)。

巯基-PEG 包被的强烈 SERS 信号的观察结果是违反直觉的,因为预期粒子表面上的报道分子被巯基化合物取代(已知其自发地在金上形成单层)。还令人吃惊的是,即使不带锚固的异硫氰酸根(-N=C=S),一系列的拉曼报道子例如结晶紫、尼罗蓝、碱性品红和甲酚紫也不被巯基-PEG 取代。事实上,结晶紫和其他染料的 SERS 信号被巯基-PEG 强力地保护,并在 25°C 稳定 >11 个月。这些报道染料共同特性是,它们是正电性的,并含有离域 π 电子。相反,带负电荷的有机染料例如荧光素钠在本研究使用的柠檬酸盐稳定的金粒子(也是负电性的)上只发出微弱的和不稳定的 SERS 信号。因此,我们相信,静电相互作用和离域 π 电子二者对于强染料吸附都是重要的,很可能地在不与巯基-PEG 吸附进行竞争的金表面位点上。还可能的是,巯基-PEG 层通过立体屏蔽和电子相互作用来保护和稳定所吸附的报道染料。

对于细胞和体内成像应用,我们比较了聚乙二醇化的金纳米粒子和近红外量子点的激发和发射光谱特性。金纳米粒子提供了更丰富的光谱信息,而且它们的发射峰(半峰全宽 FWHM = 1-2 nm)比量子点的发射峰(FWHM = 40-60 nm)窄 20-30 倍(图 2A 和 2B)。在相同的实验条件下,聚乙二醇化的金粒子在 650-750 nm 光谱范围内比近红外发射量子点亮 >200 倍(在粒子对粒子的基础上)(参见图 2C 和 2D 中的单个粒子图像,以及图 2E 和 2F 中的统计数据)。聚乙二醇化的金纳米粒子具有约 80 nm

(直径)的流体动力学尺寸,并且在所测试的 3-6 天中对被培养的细胞完全无毒。在没有表面增强拉曼信号时,近红外金纳米壳最近在光学相干断层成像术以及光热肿瘤切除中用作对比度增强剂,但此方法不提供光谱编码或多重的分子特征。

实施例 10

癌细胞的光谱检测: 对于癌细胞检测,使用巯基-PEG (约 85%) 和异功能 PEG (SH-PEG-COOH) (约 15%) 的混合物制备被靶向的金纳米粒子。异功能 PEG 被共价地偶合至 scFv 抗体 (MW = 25 kDa), 即图 3A 中所图示的以高特异性和亲和性结合 EGFR 的配体。UV-Vis 吸收和荧光数据表明,约 600 拷贝的 scFv 配体被偶合至每颗金纳米粒子。图 3B 显示通过将 scFv 偶合的金纳米粒子与人癌症细胞一同孵育而获得的细胞结合和 SERS 光谱。人头颈癌细胞 (Tu686) 是 EGFR 阳性的 (每个细胞 10^4 - 10^5 个受体), 并被强 SERS 信号所检测。相反,人非小细胞肺癌 (NCI-H520) 未表达 EGFR, 其显示很少或没有 SERS 信号。为了确认靶向特异性,我们以十倍过量的游离 scFv EGFR 抗体对 Tu686 癌细胞进行预孵育,然后加入 EGFR 标记的 SERS 纳米粒子以进行竞争性结合研究。洗涤三轮后,细胞只显示可忽略的 SERS 信号。还测试和确认了以双位点夹心形式偶合到二抗的 SERS 纳米粒子的结合特异性。关于对照癌细胞 (EGFR 阴性) 和对照纳米粒子 (普通的 PEG 包被的纳米标记物和用非特异性 IgG 抗体功能化的 PEG 纳米标记物), 光谱显示了微弱但可重复的背景, 如图 3B 所示。低背景可能是由混合溶液中的在细胞分离中未被完全除去的残留 SERS 纳米粒子所致,但还可存在来自非特异性结合或纳米粒子内化的贡献。将红外染料 (二乙基硫三碳菁碘化物或 DTTC) 用作光谱报道子,并在 785-nm 激发下获得了表面增强共振拉曼散射 (SERRS)。此共振条件不导致光漂白,因为通过将能量有效地转移到金属粒子而保护所吸附的染料不被光降解。共振作用还可增加表面增强拉曼信号 10 至 100 倍,使之对于单个癌细胞的拉曼分子分布研究足够灵敏 (图 8)。此灵敏度对于研究通过手术去除的癌组织标本的异质特性以及循环捕获自外周血样品的肿瘤细胞是重要的。单细胞分布研究具有很大的临床重要性,因为 EGFR 是用于单克隆抗体和基于蛋

白激酶的疗法的被证实的蛋白靶。

实施例 11

体内肿瘤靶向和检测: 体内光成像和光谱学的主要挑战是有限的穿透深度, 这是由于动物组织中的光散射和吸收。为了确定是否可从被埋在动物组织中的聚乙二醇化的金纳米粒子获得 SERS 光谱, 我们向活体动物的皮下和深层肌肉部位注射了小剂量的纳米粒子。从皮下以及肌肉注射获得高分辨率的 SERS 信号, 如图 4 所示。

健康的裸小鼠通过皮下(皮肤下 1-2 mm)或肌肉(皮肤下大约 1 cm)注射接受了 50 μ l 的 SERS 纳米粒子标记物(1 nM)。在 3 秒后获得皮下光谱, 在 21 秒后获得肌肉光谱, 并也在 21 秒后获得对照光谱(在远离注射位置的区域获得)。在 0.1 秒后从 PBS 溶液中的 SERS 纳米粒子获得参考光谱。用所示因子($\times 1$ 、 $\times 30$ 或 $\times 210$)调节光谱强度以进行比较。拉曼报道分子是孔雀石绿, 其具有在 427、525、727、798、913、1,169、1,362、1,581 和 1,613 cm^{-1} 的光谱特征。这些特征与动物皮肤拉曼信号截然不同(参见皮肤光谱)。激发波长, 785 nm; 激光功率, 20 mW。

体内 SERS 光谱与体外(盐溶液)获得的相同, 虽然绝对强度被减弱 1-2 个数量级。基于高信噪比, 我们估计, 体内 SERS 肿瘤检测可实现的穿透深度是大约 1-2 cm (也通过深度组织注射研究而确认)。

对于体内肿瘤靶向和光谱学, 与 scFv 抗体偶合的金纳米粒子被注射(通过尾静脉)到含有人头颈肿瘤(Tu686)的裸小鼠全身。图 5A 和 5B 显示在纳米粒子注射后 5 小时通过将近红外的 785-nm 激光束聚焦在肿瘤位点或其他解剖部位(例如, 肝或腿)获得的 SERS 光谱。在被靶向的和未被靶向的纳米粒子之间观察到肿瘤信号强度相当大的区别, 而来自非特异性肝吸收的 SERS 信号是相似的。此结果表明, scFv 偶合的金纳米粒子能够在体内靶向 EGFR 阳性肿瘤。时间依赖性的 SERS 数据进一步表明, 纳米粒子逐渐地聚集在肿瘤中 4-6 小时, 而且多数聚集的粒子在肿瘤中停留 >24-48 小时。

实施例 12

体内的纳米粒子分布和细胞内定位: 使用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 的定量生物分布研究揭示, 被靶向的金纳米粒子在肿瘤中的聚集有效性比未被靶向的粒子的增加 10 倍, 如图 6 所示。ICP-MS 数据还证实了肝和脾的非特异性粒子吸收, 但脑、肌肉或其他主要器官中很少有或没有聚集, 这与所报道的被注射进健康小鼠 31 的金纳米壳的生物分布数据相似。超微结构 TEM 研究进一步揭示, SERS 纳米粒子被 EGFR 阳性肿瘤细胞吸收, 并被定位在细胞内的细胞器例如内体和溶酶体中, 如图 10 和 11 所示。在体内被内吞的纳米粒子具有晶体状的多面结构, 这与在体外和体内被编码的金纳米粒子上获得了几乎相同的 SERS 光谱的发现一致。聚乙二醇化的金粒子在体循环中以及在被细胞内的细胞器吸收后显示是完整的和稳定的。在注射金粒子 2-3 个月后未在动物体内观察到毒性或其他生理并发症。

实施例 13

在苛刻条件下聚乙二醇化的 SERS 纳米粒子的稳定性: 四种独立的技术证实了浓 PBS 溶液中 Au-MGITC-PEG-SH 的高度稳定性。通过 UV-Vis 吸收光谱法、TEM、DLS 和目视观察检验了 PEG-SH 包被的和未包被的 Au-MGITC 复合物, 如图 7A 和 7B 所示。将 PBS 加入未包被的 Au-MGITC 立即将胶体聚集并沉降, 如 UV-Vis 吸收光谱中的动态光谱变化、TEM 中的大型聚集物, 和具有 600-1000 nm 流体动力学直径的截然不同的粒子群的出现、以及从粉色到无色的明显的颜色变化所证明。相反, 用 PBS 处理的被 PEG-SH 包被的 Au-MGITC 显示了 60 nm 金的特征性等离子体共振峰的保存, TEM 中观察到大多数为单个粒子 (含有由于溶剂蒸发所致的一小群簇状物), DLS 中观察到的粒子的单峰、窄尺寸分布, 以及粉红色。研究了在生物偶合和细胞标记步骤中遇到的许多条件的作用以了解它们对被 PEG-SH 包被的 SERS 标记物的光谱特征的影响。

将 Au-MGITC-PEG-SH 通过离心沉淀, 再分散于新溶剂中, 并通过 SERS 光谱法被检验。当 Au-MGITC-PEG-SH 被再分散于 10 倍浓缩的 PBS (1.37 M NaCl)、碱性水 (pH 12)、酸性水 (pH 2)、乙醇和甲醇中时, 与水中的 Au-MGITC 的参考光谱相比没有显著的光谱变化 (图 18)。注意到

了在 pH 2 下在 1615、1365 和 1172 cm^{-1} 处的拉曼带的相对峰强度的微小变化，这可能是由于 MGITC 在金表面相对方向的改变，但在 5 cm^{-1} 的仪器分辨率下没有观察到振动频率的位移。

Au-MGITC-PEG-SH 在二甲基亚砜 (DMSO) 中的再分散掩盖了报道子的光谱特征，这是由于 DMSO 的强的拉曼截面。有趣地，在将 DMSO 溶剂化的标记物储存在环境条件下 60 天然后再分散于水中之后，原始的 MGITC 光谱特征得到恢复 (图 18, 图“g”)。虽然未包被的 Au-MGITC 在 5 次离心后聚结，但是 PEG-SH 包被的 SERS 标记物在上面所测试的任何条件下未形成聚集物。

实施例 14

单个癌细胞的 SERS 光谱和相关等离子体成像: Tu686 和 H520 细胞在 8 槽的载玻片上生长到连成一片。浓度为 15 pM 的 scFv 耦合的 SERS 标记物被引入 200 μL 细胞培养基中，然后轻轻混合 30 分钟。在孵育时间段之后，在成像前用 PBS 彻底洗涤细胞六次以除去游离的金纳米粒子。使用 ExamineR 显微镜 (DeltaNu, Laramie, Wyoming) 和 20 \times 物镜获得了反射模式暗视野图像。使用暗视野聚光镜把来自钨灯的窄束白光递送到样品上。以此模式，在细胞膜上用 SERS 纳米标记物染色的细胞展现了光亮的金色，这是由于金纳米粒子的高度散射特性。EGFR 阴性的 H520 细胞显示了大部分的暗背景。Tu686 EGFR 阳性的细胞展示了高水平的 EGFR 受体结合，而 H520 EGFR 阴性的细胞只具有有限的 EGFR 表达。通过将显微镜切换到以 785 nm 激光激发的拉曼模式获得单细胞 SERS 光谱。使用 20 \times 物镜在焦平面上所得的激光光斑的尺寸是 5 \times 10 μm 。图 8 分别显示了从箭头所指示的区域记录的 EGFR 阳性细胞和 EGFR 阴性细胞的 SERS 光谱。每个光谱都是在 10 秒的曝光时间下获得的。

实施例 15

未被靶向的 (对照) SERS 纳米粒子的生物分布研究: 为了研究 SERS 纳米结构靶特异性抗体耦合的探针在活体动物中的行为，进行了如下检验：它们的特异性吸收和滞留、背景或非特异性吸收、血液清除和器官分布。非特异性纳米结构吸收和滞留主要发生在肝和脾，而在脑、心、肾或

肺中有很少或没有 SERS 纳米结构的聚集，如图 9 所示。体内器官吸收和分布的此种形式与葡聚糖包被的磁性氧化铁纳米粒子的相似。对于含有过量 COOH 基团的聚合物封装的 SERS 纳米粒子，未观察到肿瘤靶向，这表明非特异性的器官吸收和快速的血液清除。对于含有表面 PEG 基团的聚合物封装的 SERS 纳米粒子，器官吸收的速率下降而血液循环的时间长度增加，这导致肿瘤中纳米粒子的缓慢聚集。对于 PEG 封装并与抗 EGFR 抗体生物偶合的纳米粒子，所述纳米粒子由肿瘤异物移植物递送和滞留，但非特异性的肝和脾吸收仍然是明显的，如图 6 所示。

实施例 16

通过透射电子显微术 (TEM) 的细胞内定位研究: 使用 TEM 检验肿瘤、肝、脾和肾以确定金纳米粒子在被细胞和组织吸收后沉积在何处。图 10 显示在将靶向 EGFR 的金纳米粒子注射到全身以实现体内肿瘤靶向时的肿瘤组织切片的代表性 TEM 图像。数据清楚地显示，金纳米粒子被内化到肿瘤细胞中（最大可能是通过受体介导的内吞作用），并被定位于细胞内的细胞器例如内体和溶酶体中。

为了检验纳米粒子的肝吸收，图 11 显示含有金纳米粒子的 Kupffer 细胞（覆盖肝窦状隙表面的巨噬细胞），其中所述金纳米粒子被捕获在早期和晚期的内体中。注意到被 Kupffer 细胞非特异性地吸收的纳米粒子通常是分离的结构，这与肿瘤细胞内的簇状结构相反。在脾巨噬细胞内也鉴定了显著数量的金纳米粒子。在所有其他器官中，发现金粒子只以很低的密度存在。总的来说，高倍放大的 TEM 研究揭示，聚乙二醇化的金纳米粒子在体内条件下被吸收进细胞内的细胞器中，但它们的形状和形态学保持完整。

实施例 17

SERS 纳米粒子标记物向肿瘤的被动聚集与主动靶向: 参见图 12。

应该强调的是，本公开的上述实施方案只是实施的可能实例，其提出仅是为了清楚理解此公开的原理。在实质上不违反本公开精神和原理的基础上，可以对本公开上述实施方案进行很多变动和修改。所有这种修改和变动旨在包括于本文此公开的范围内，而且受到如下权利要求的保护。

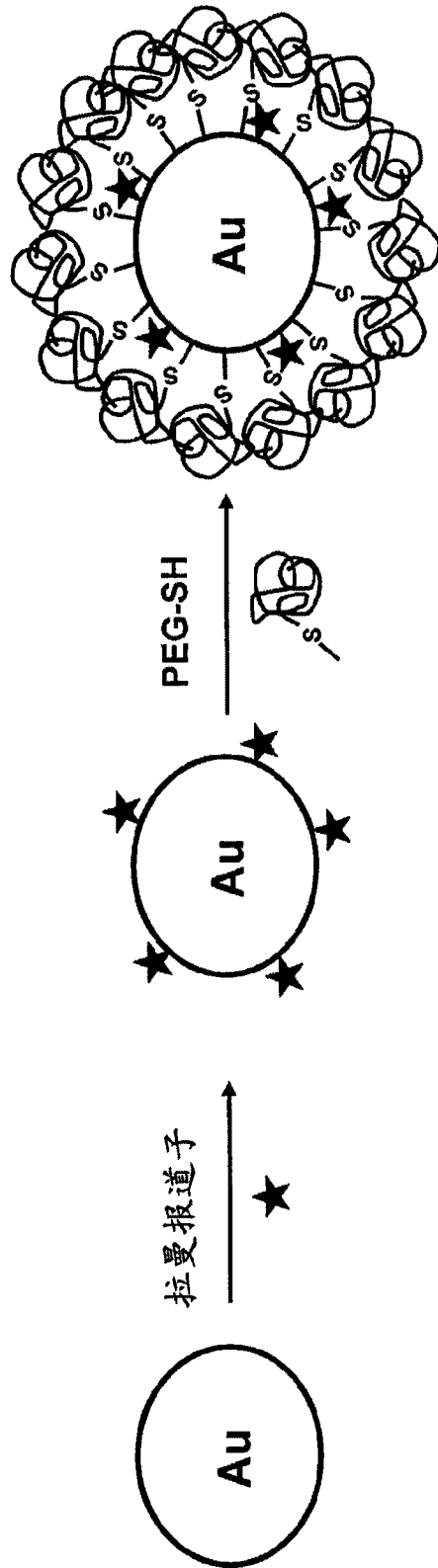


图1A

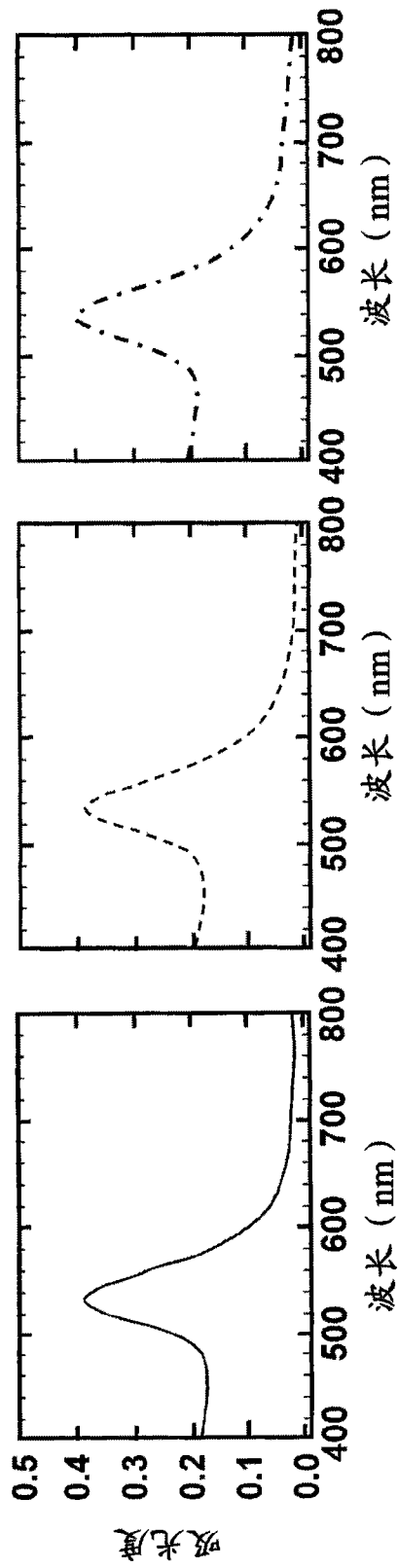


图1B

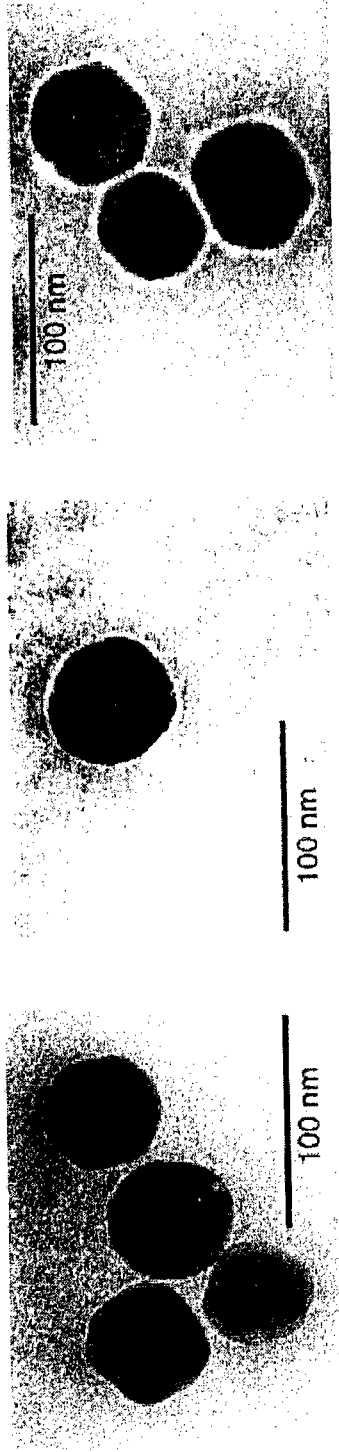


图1C

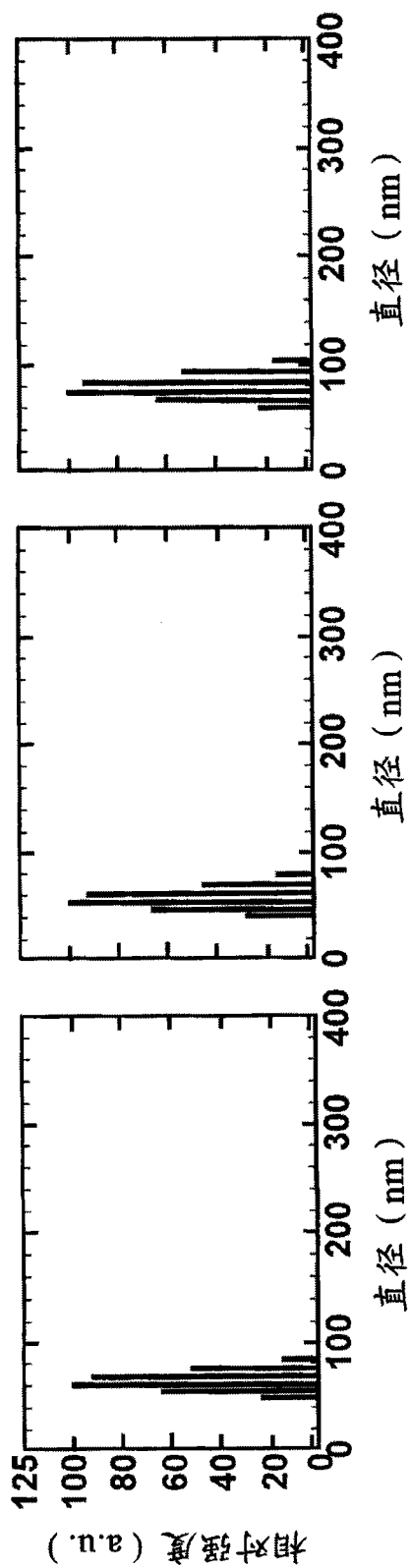


图1D

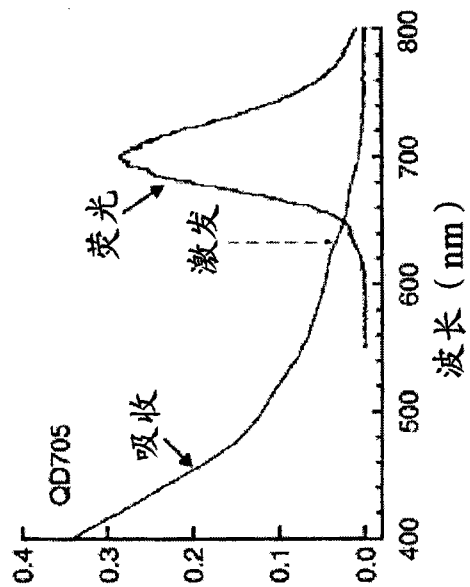


图2B

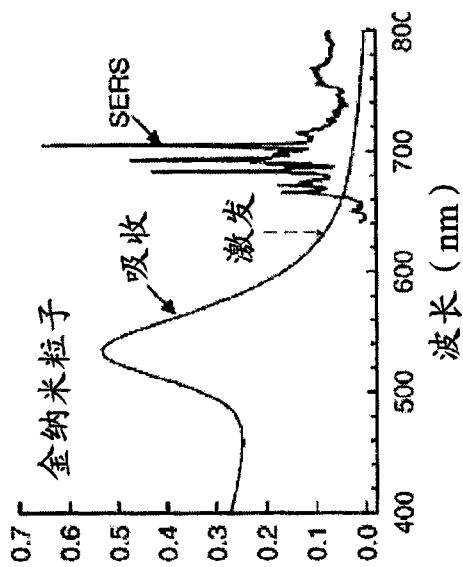


图2A

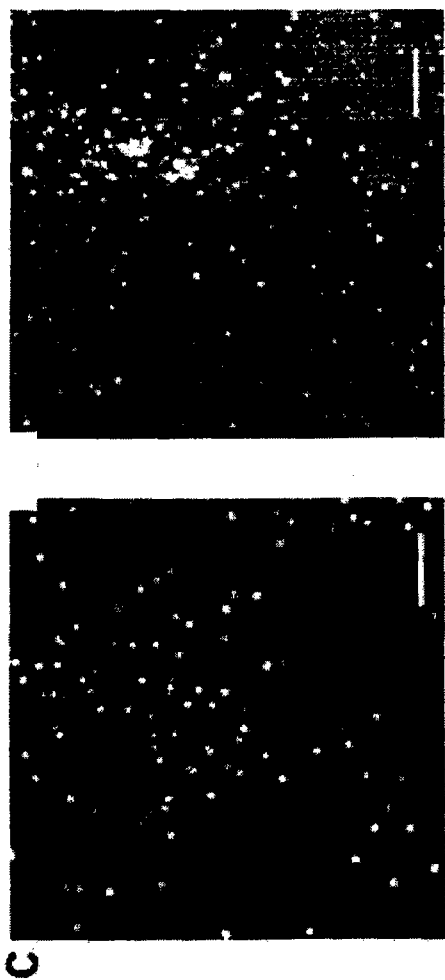


图2D

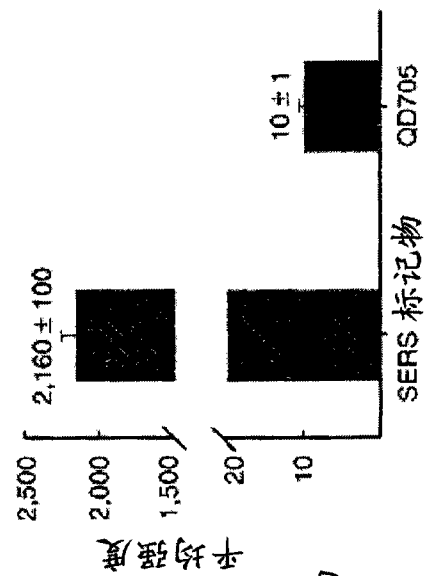


图2F

图2C

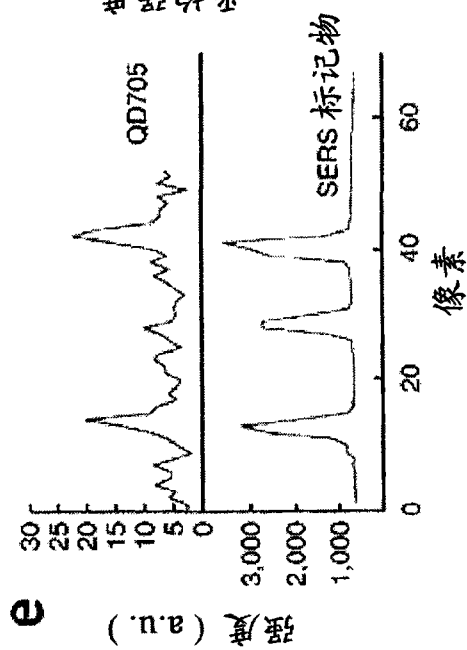


图2E

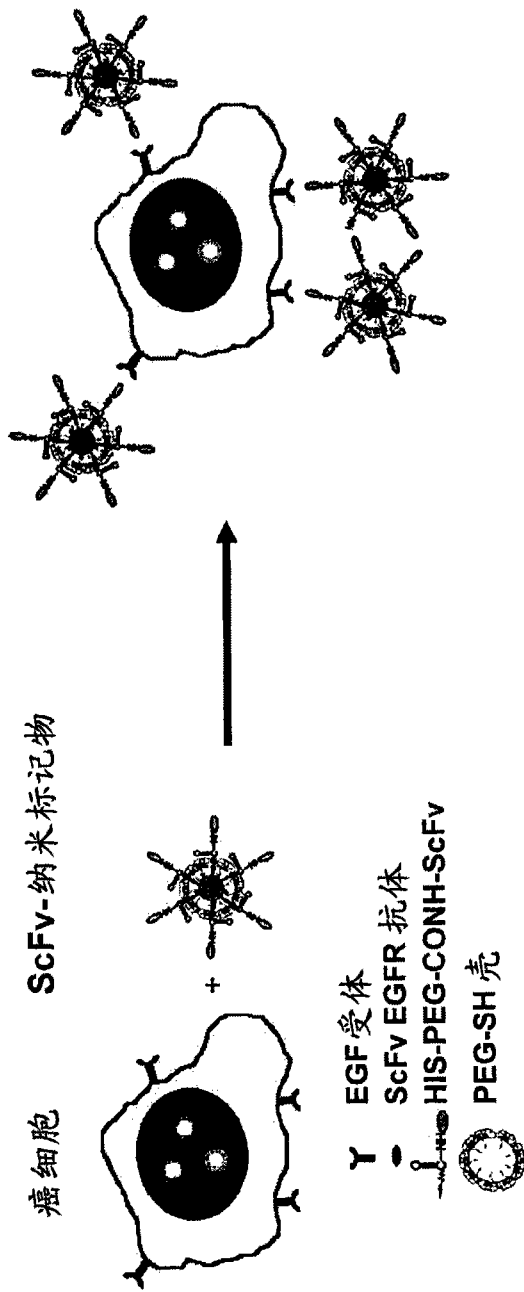


图 3A

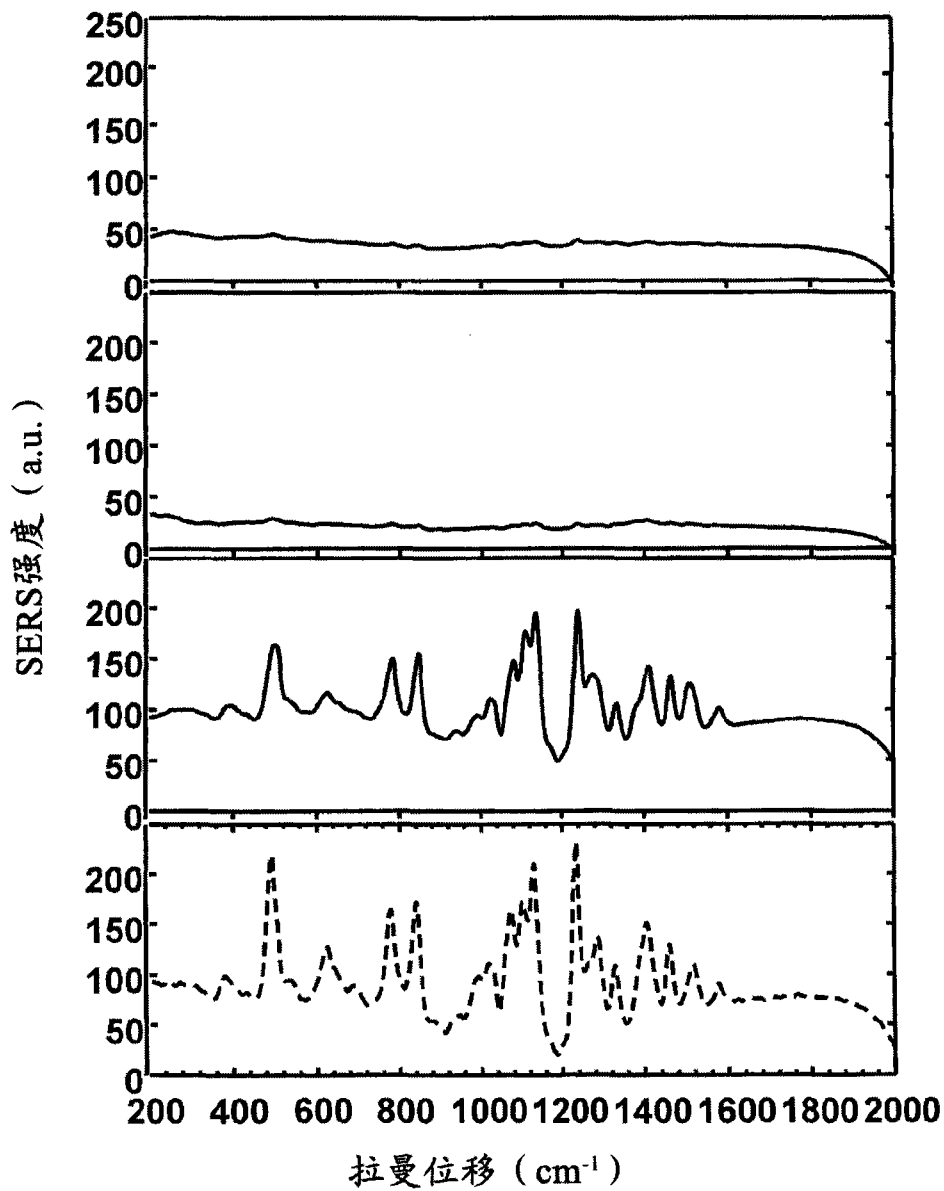


图 3B

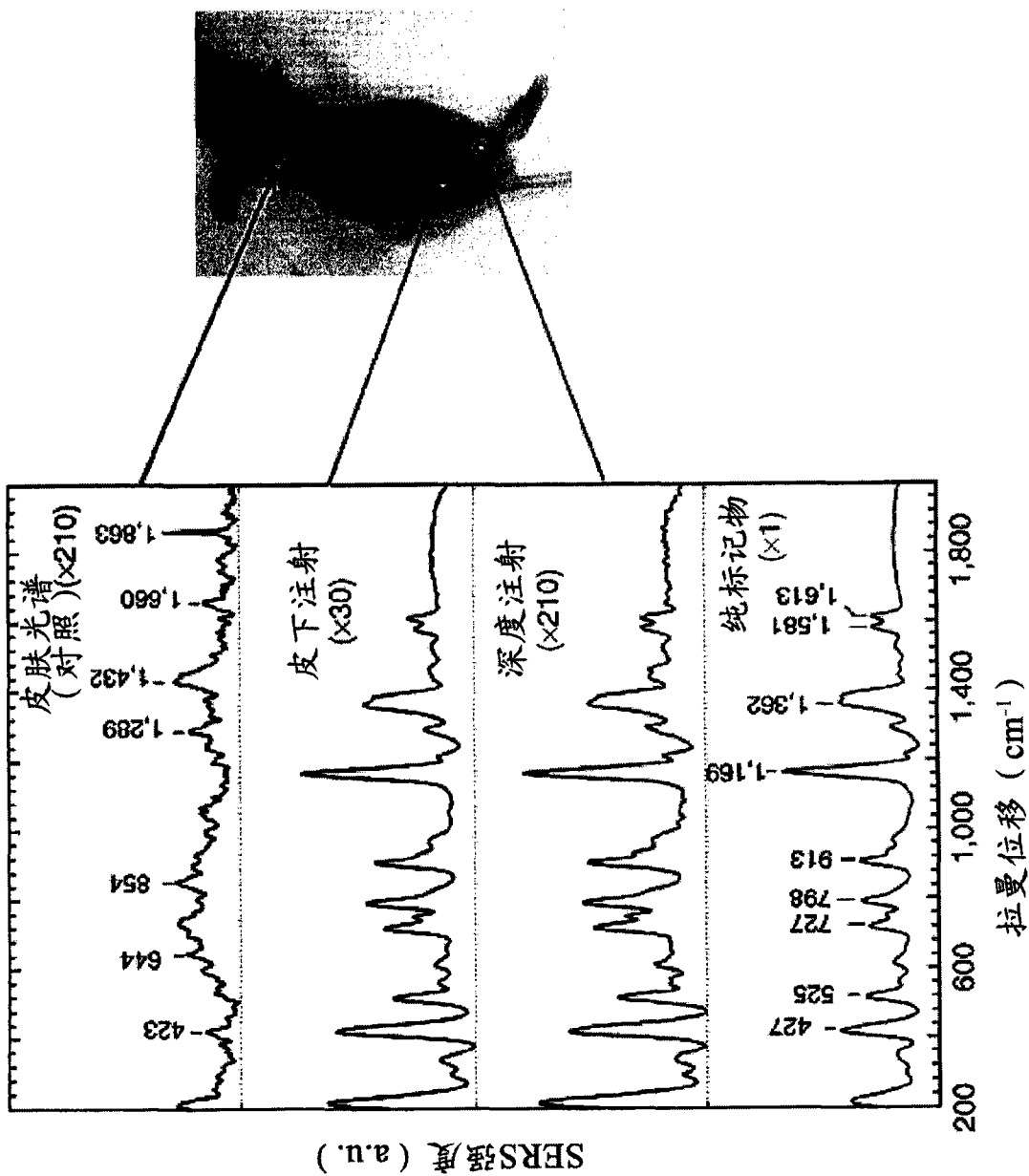


图4

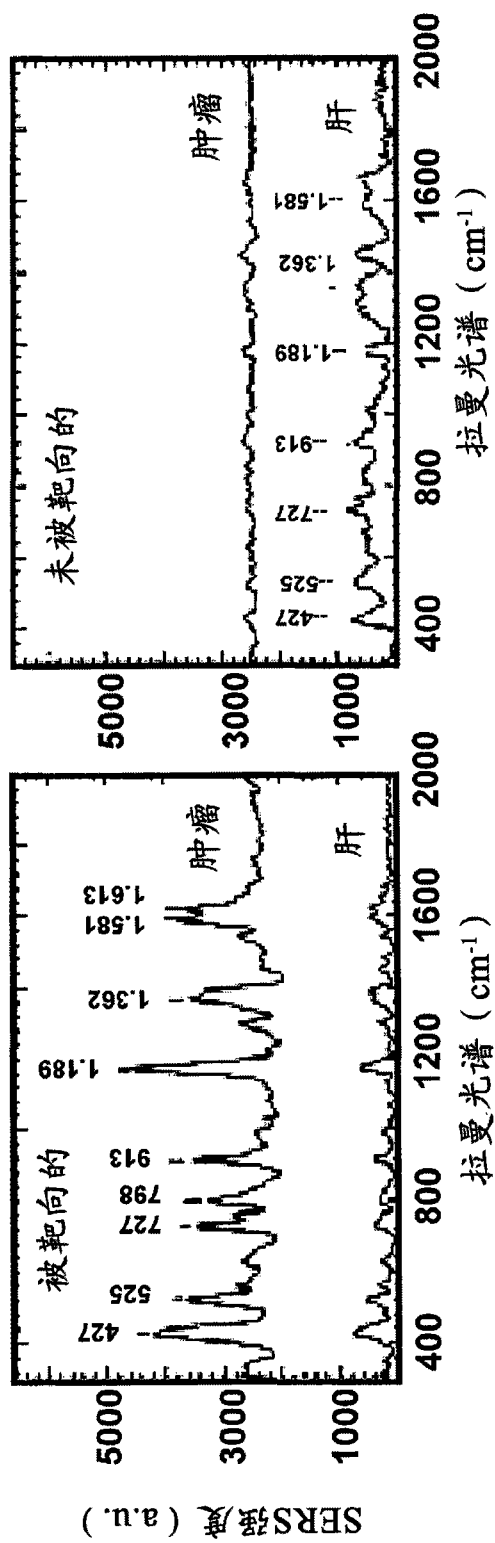


图5B

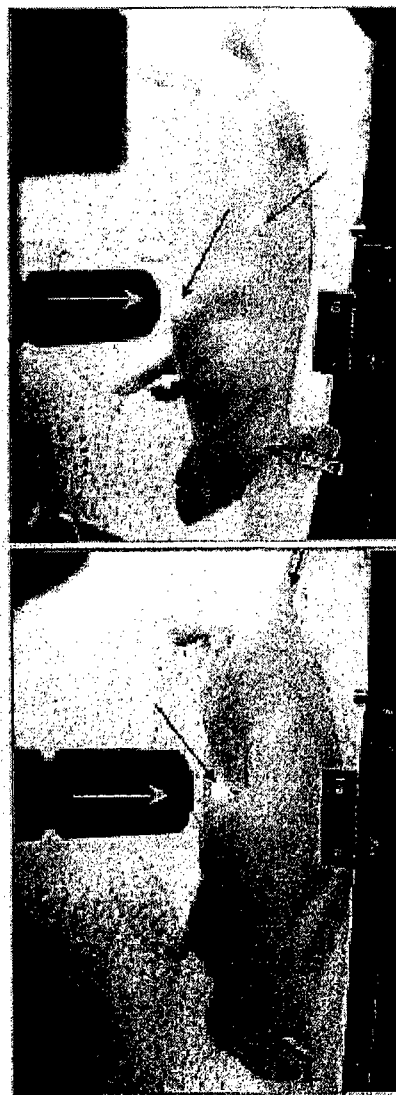


图5C

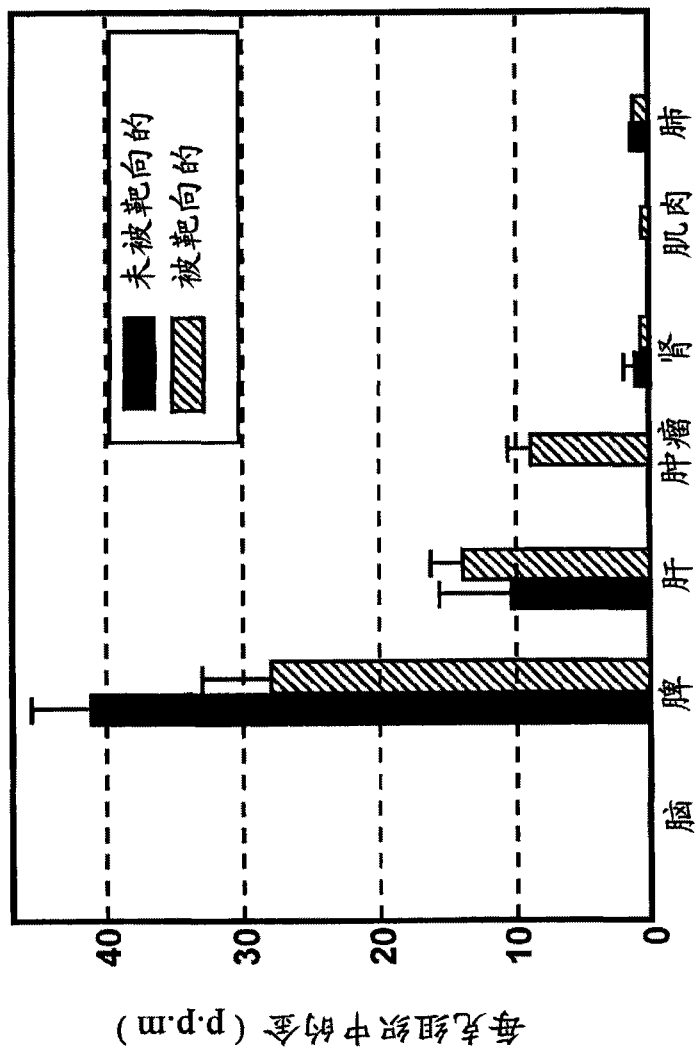


图6

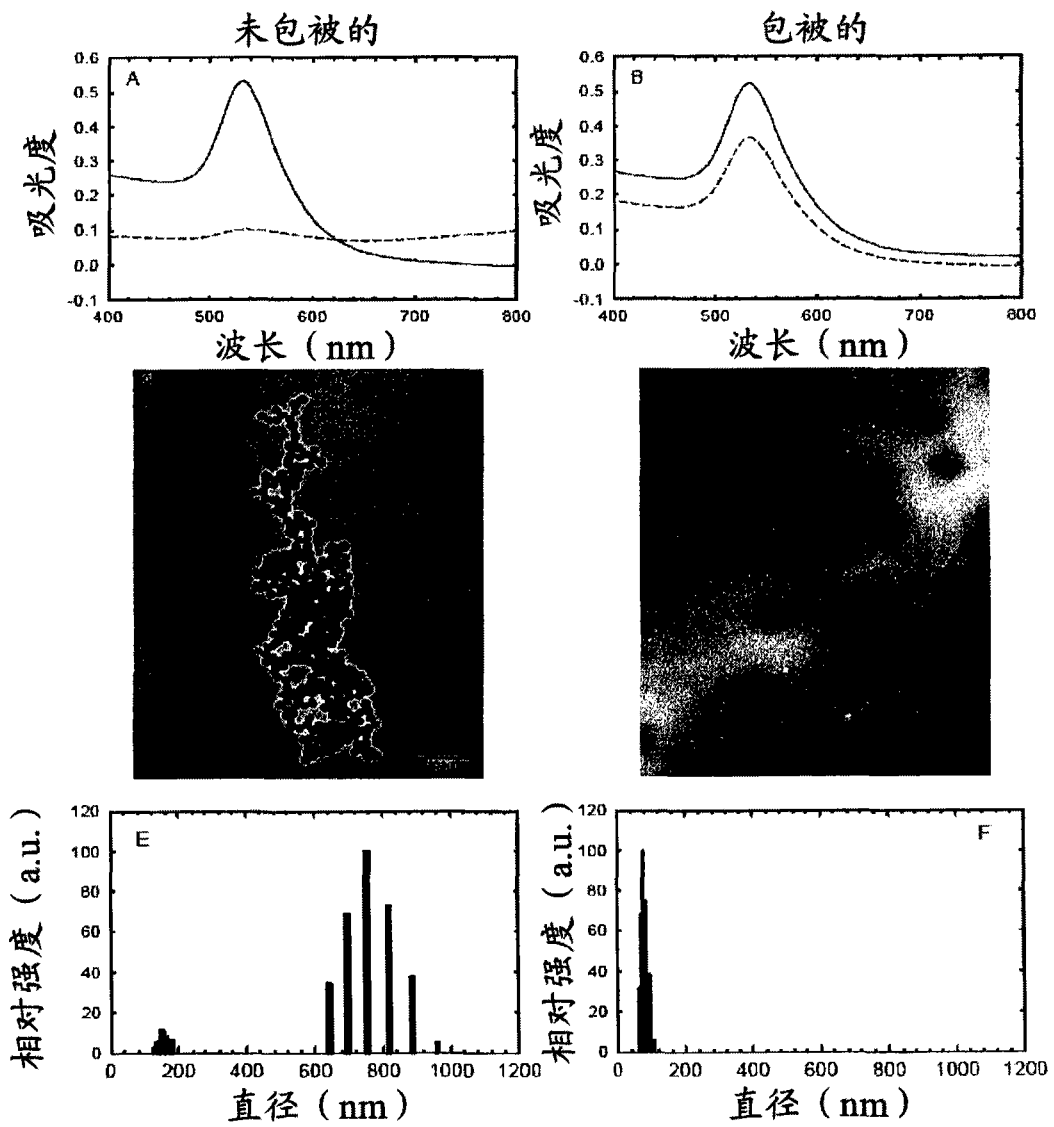


图7

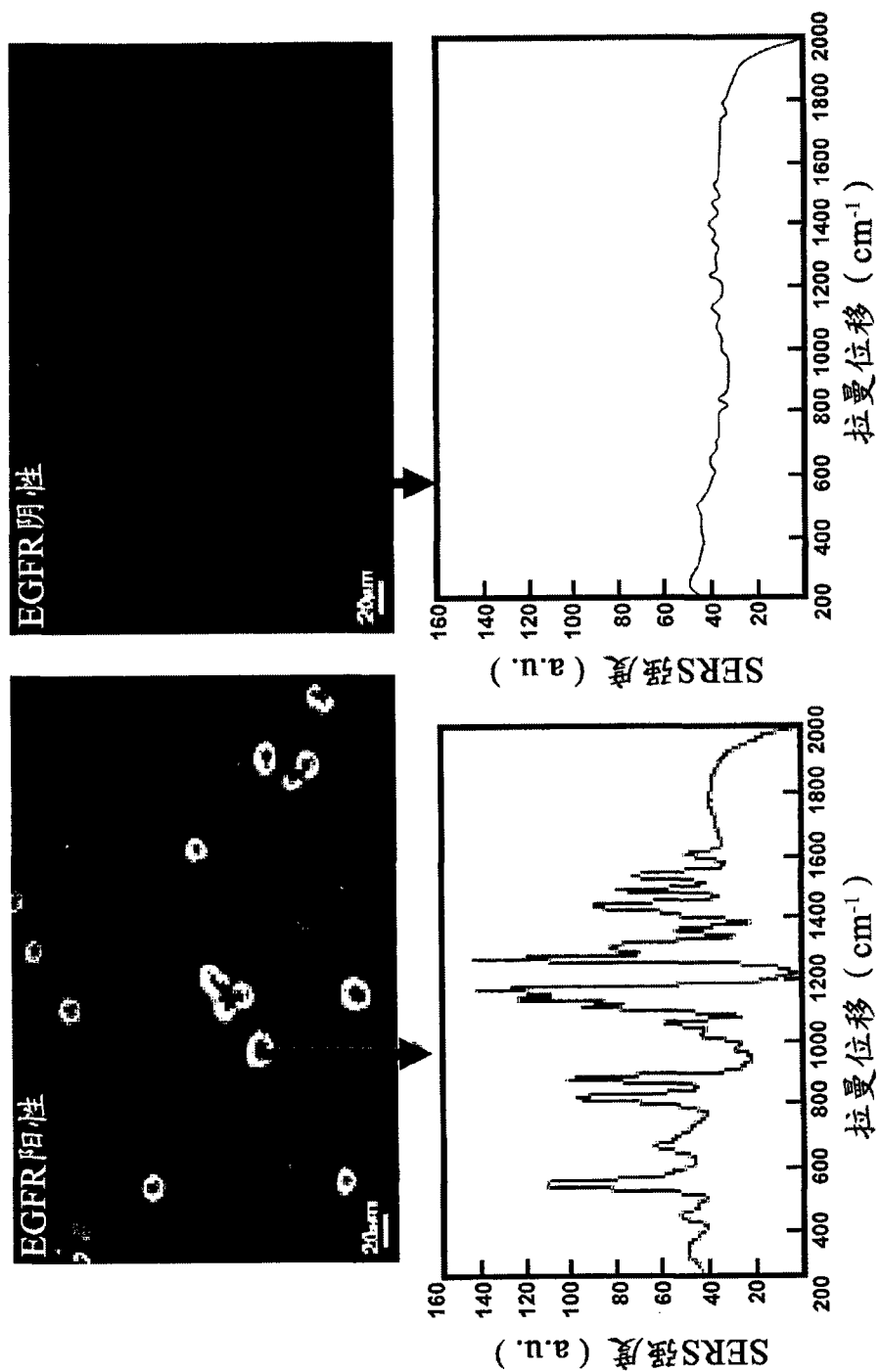


图8

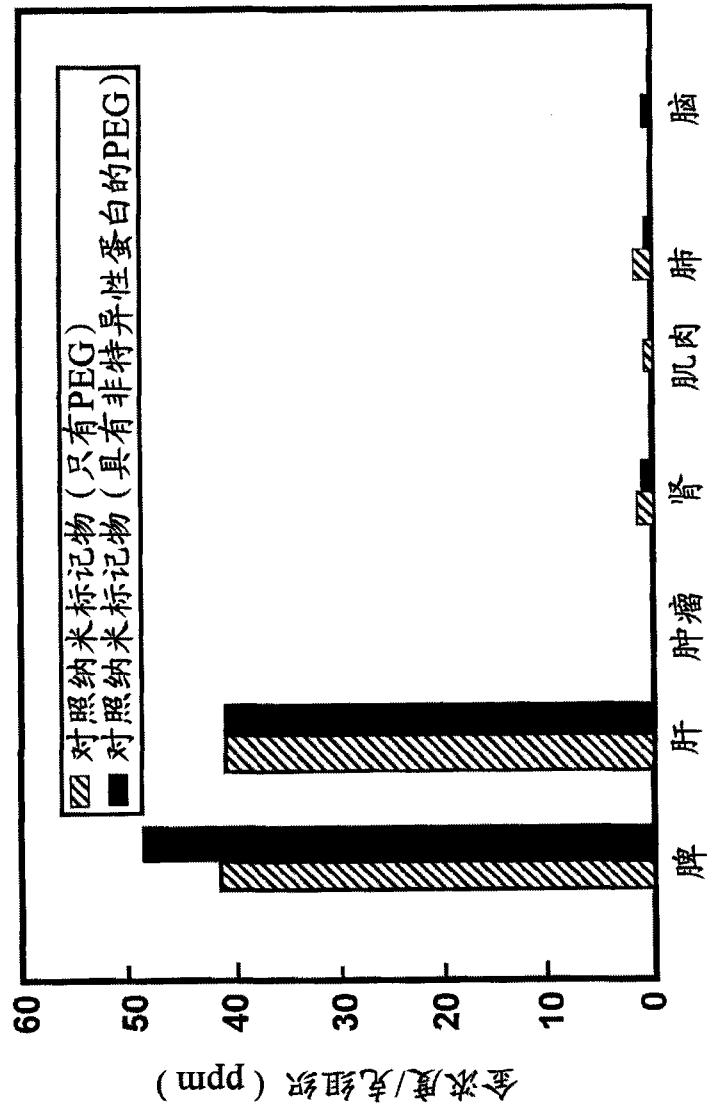


图9

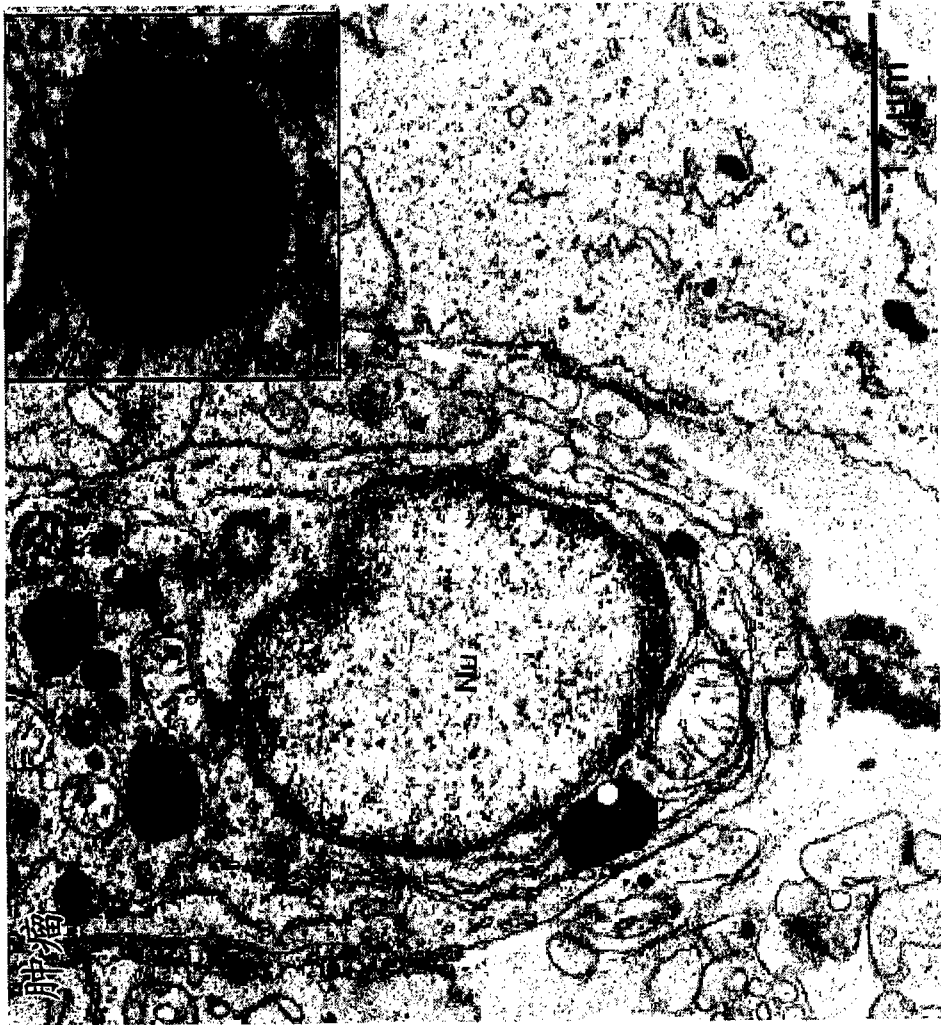


图10

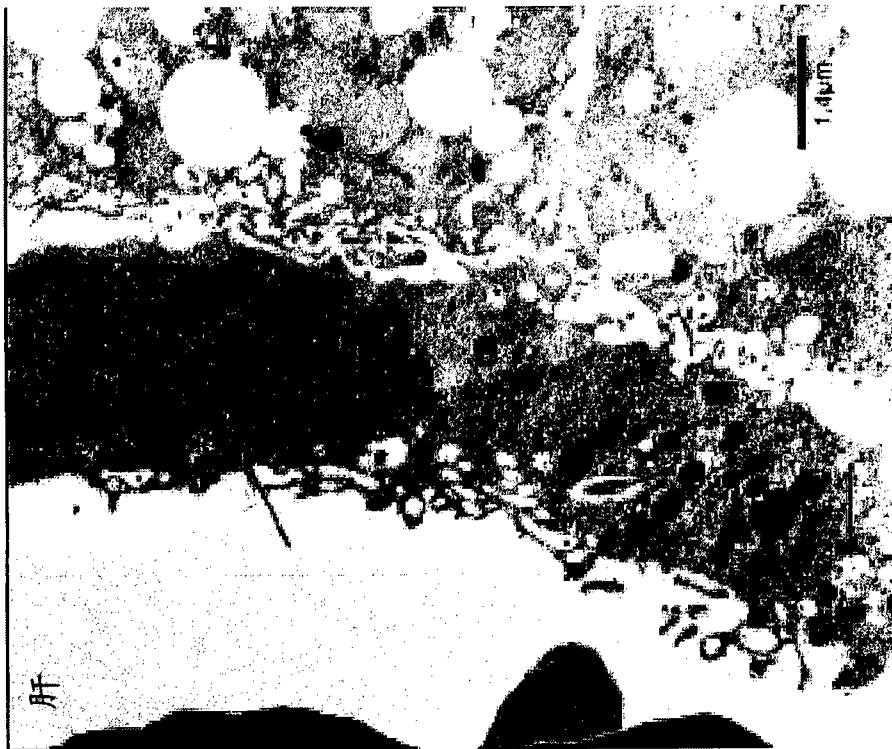


图11

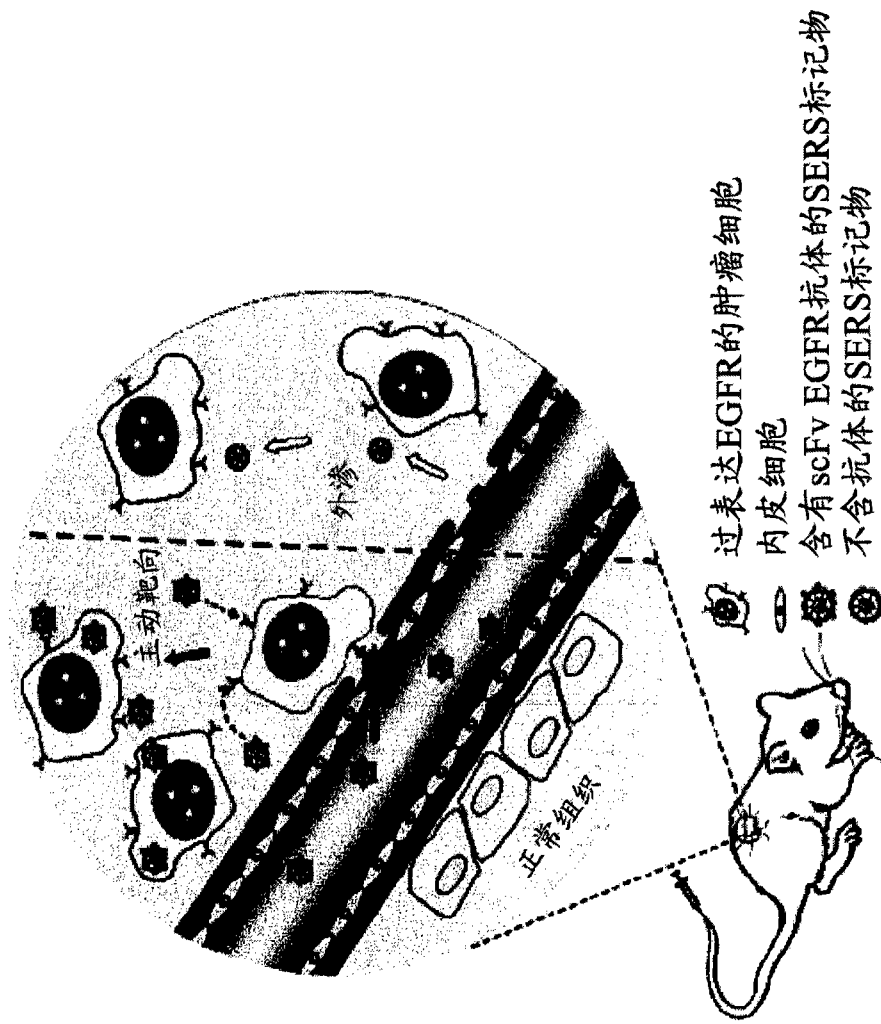


图12

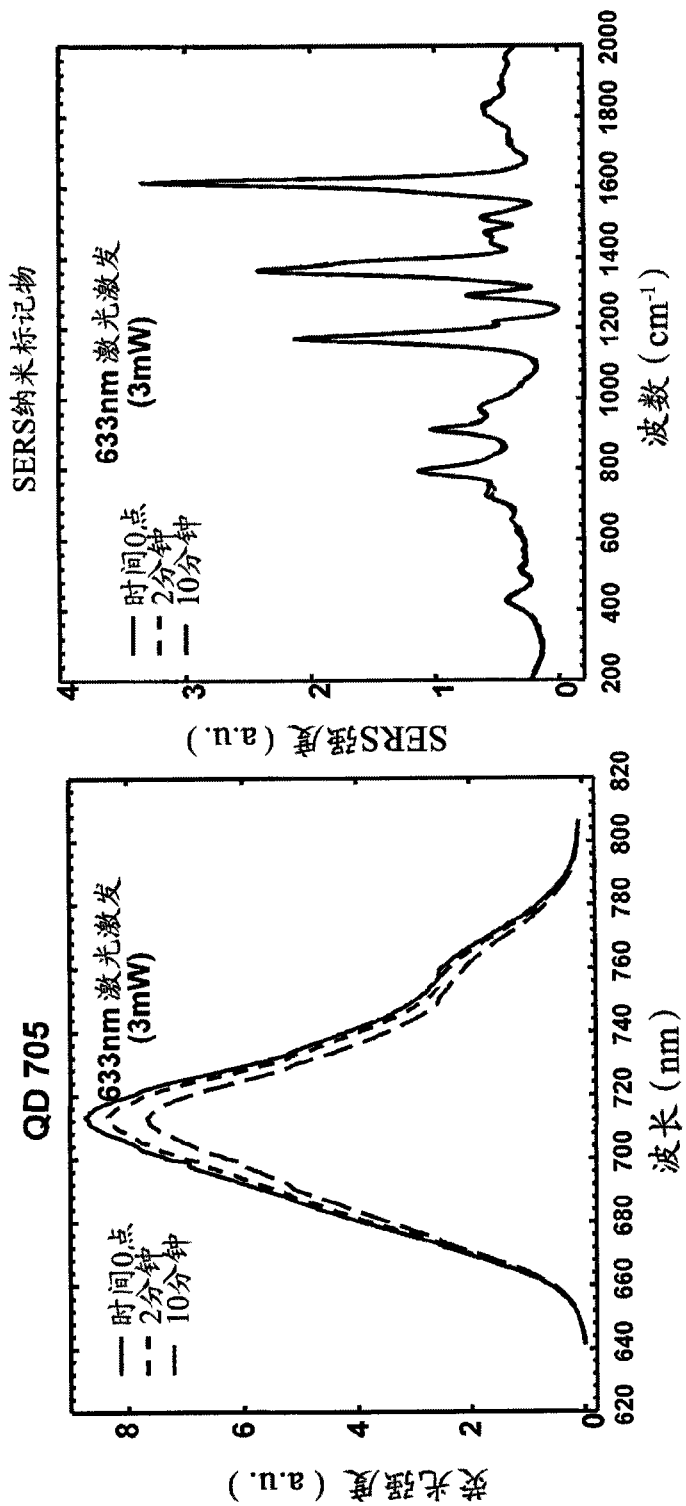


图13

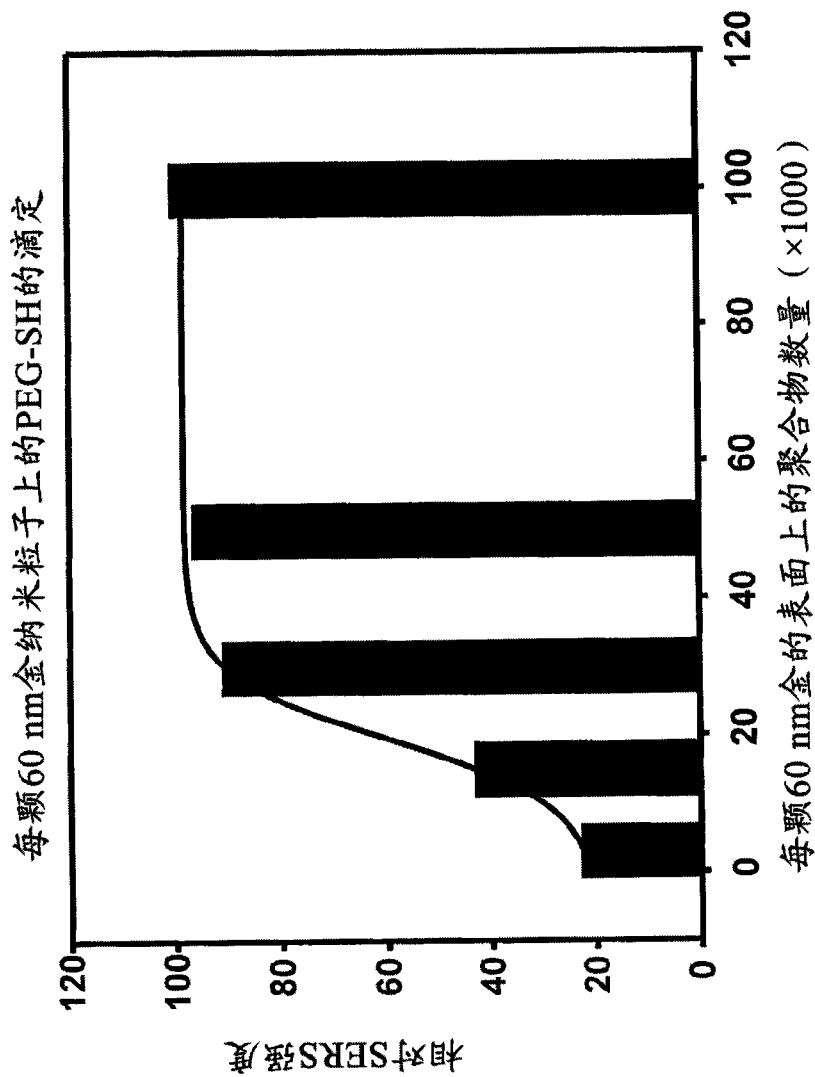


图14

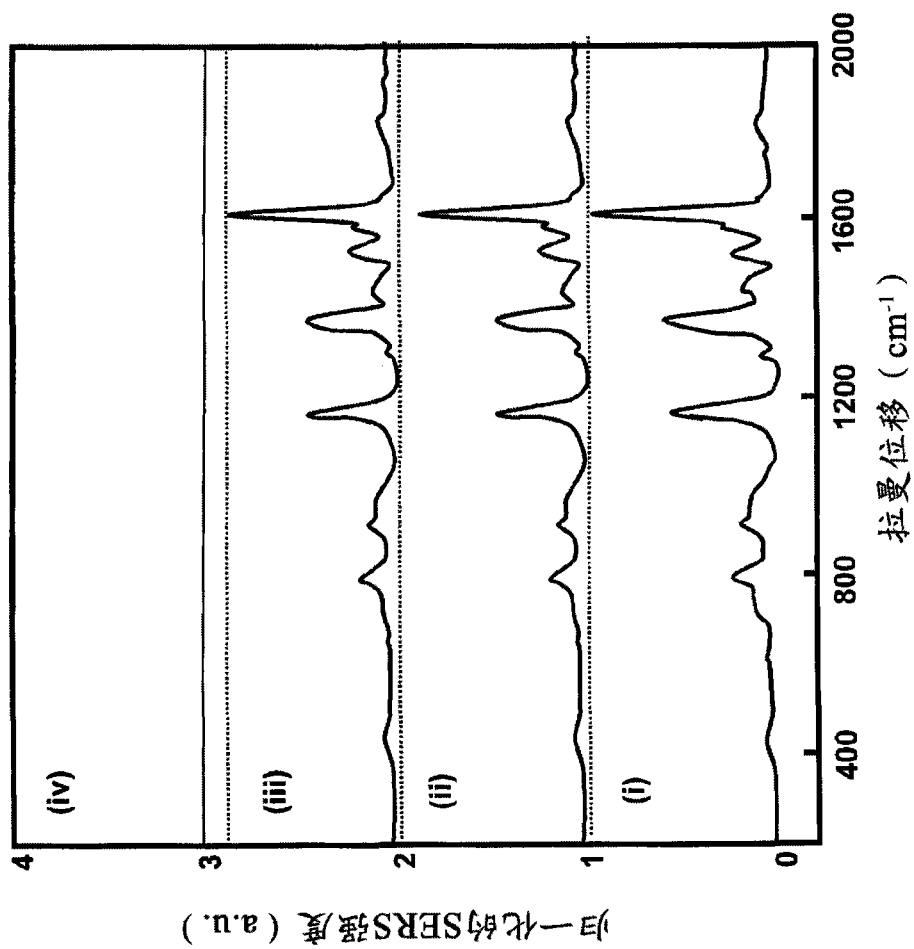


图15

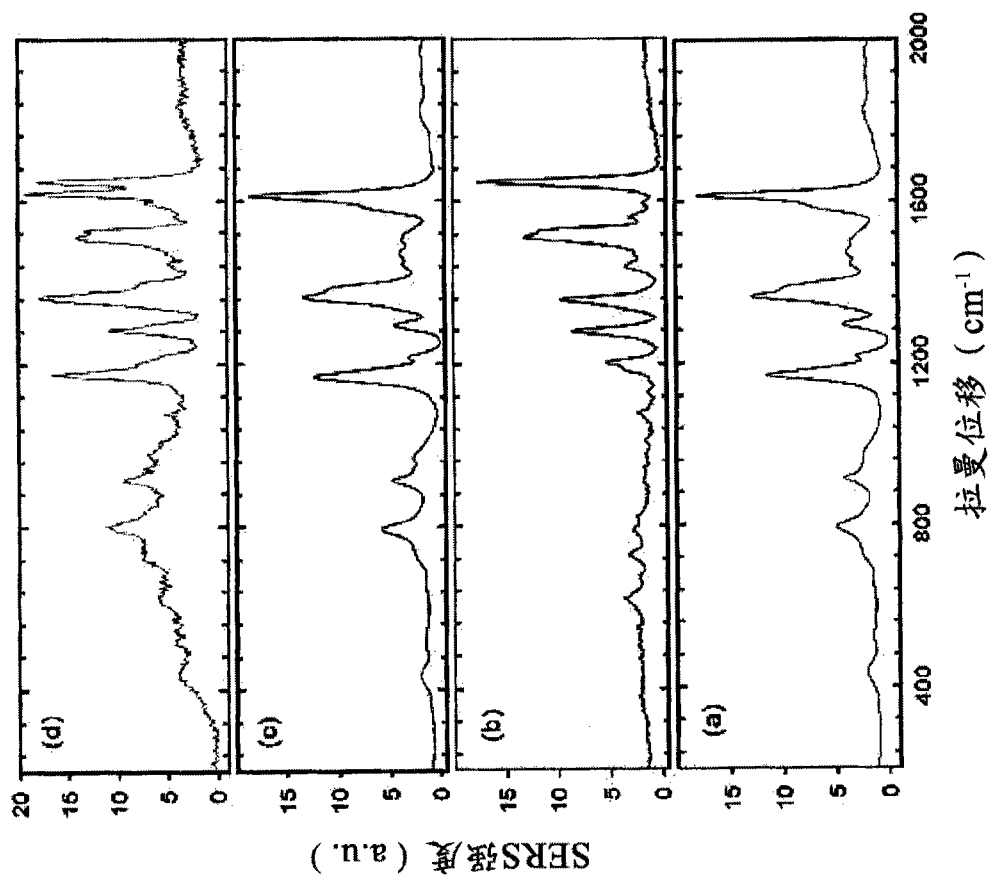


图16

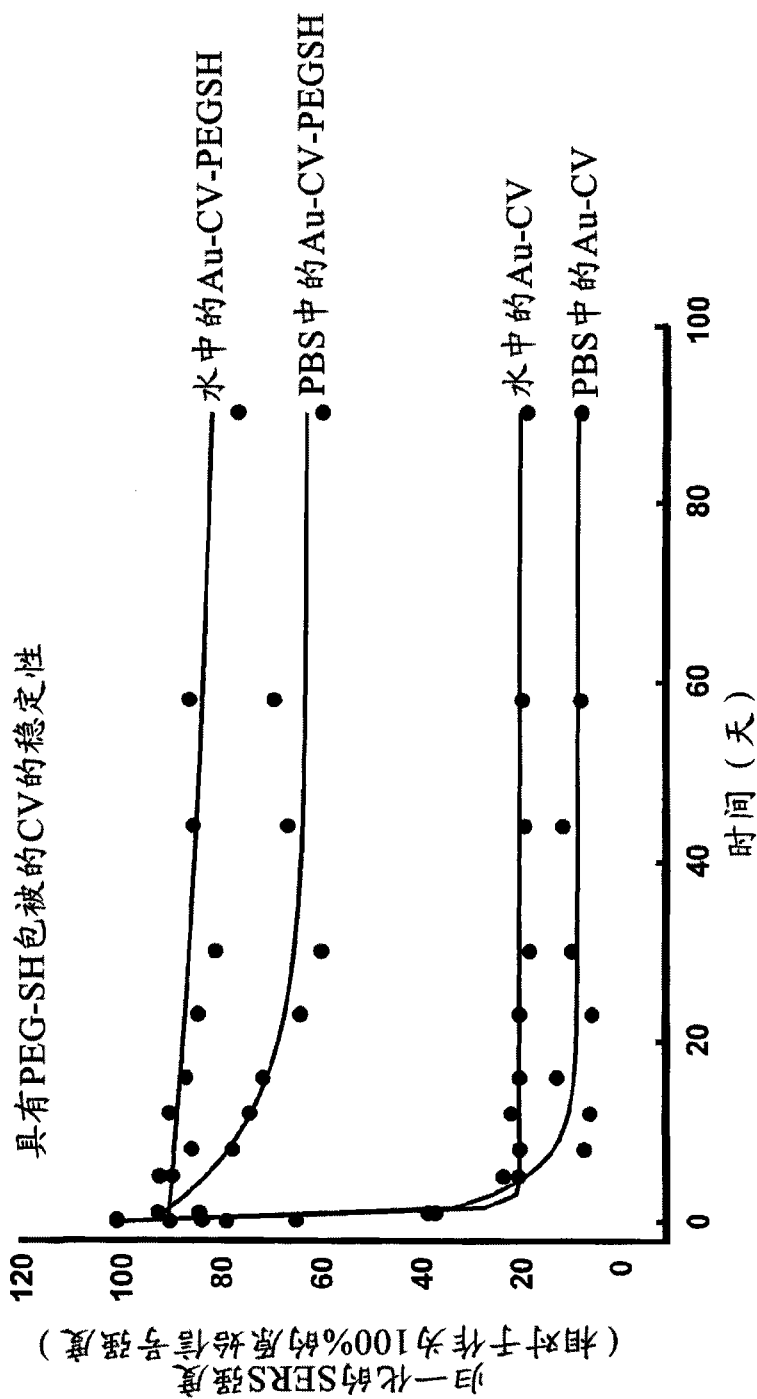


图17

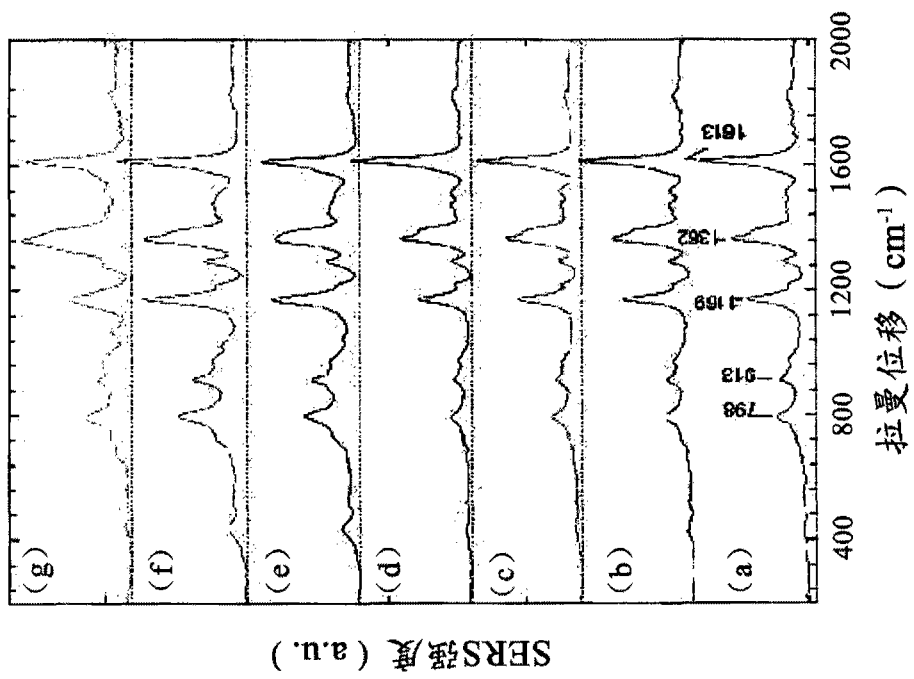


图18