



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613231 A

(43)申请公布日 2019. 04. 12

(21)申请号 201811638072.3

(22)申请日 2018.12.29

(71)申请人 山东省立医院

地址 250021 山东省济南市经五纬七路324号

(72)发明人 刘英超 梅胜兰 许尚臣 兰川金

(74)专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务所有限公司 37108

代理人 张娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图7页

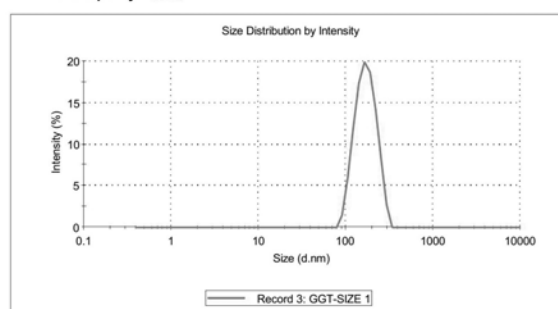
(54)发明名称

一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和用途,GGT抗体免疫纳米磁珠为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物;本申请将GGT抗体接在 Fe_3O_4 纳米磁珠上,通过绿色荧光GGT抗体结合在胶质瘤表面富集血液中的胶质瘤细胞,后续的检测流程同EpCAM试剂盒检测,通过胶质瘤细胞包面特意表达GGT蛋白表达来确定胶质瘤细胞,在临床上合理并且实用,通过CTC分析可以通过动态检测肿瘤细胞的变化,实时动态的反映患者的治疗状况及疾病进程,为目前的肿瘤治疗监测提供无创精准的补充。

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 156.4	Peak 1: 174.3	100.0	46.51
Pdi: 0.087	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.951	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



1. 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其特征在于:所述GGT抗体免疫纳米磁珠为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物。

2. 根据权利要求1所述的一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其特征在于:羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为15~20:12~16:36~48:1。

3. 根据权利要求2所述的一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其特征在于:羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为20:15:42:1。

4. 一种GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

①将羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇分别溶于二氯甲烷中,备用;

②将N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐分别溶于双蒸水中摇匀,备用;

③分别吸取步骤①中配制的羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于2~6℃的环境中备用;

将油溶性 Fe_3O_4 磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的N-N-羧基琥珀酰亚胺双蒸水和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水,混匀,然后向烧瓶中加入GGT抗体,在2~6℃下反应10~15小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠。

5. 根据权利要求4所述的一种GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,其特征在于:步骤①中羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇与二氯甲烷的质量体积比均为3~5mg:1mL。

6. 根据权利要求4所述的一种GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,其特征在于:步骤②中N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与双蒸水的质量体积比为1~3mg:1mL。

7. 根据权利要求4所述的一种GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

①将羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇分别溶于二氯甲烷中,备用;其中羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇与二氯甲烷的质量体积比均为3~5mg:1mL;

②将N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐分别溶于双蒸水中摇匀,备用;其中N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与双蒸水的质量体积比为1~3mg:1mL;

③分别吸取步骤①中配制的羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于2~6℃的环境中备用;

将油溶性 Fe_3O_4 磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的N-N-羧基琥珀酰亚胺双蒸水溶液和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水溶液,混匀,然后向烧瓶中加入GGT抗体,得到混合液,将混合液在2~6℃下反应10~15

小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠;

混合液中羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱、胆固醇、油溶性 Fe_3O_4 磁珠、N-N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和GGT抗体的质量比为15~20:12~16:12~16:36~48:140~200:240~320:1。

8.一种GGT抗体免疫纳米磁珠的应用,其特征在于:快速富集胶质细胞瘤循环肿瘤细胞。

一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫纳米磁珠技术领域,具体说是一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 脑胶质瘤是人体十大恶性肿瘤之一,也是最常见的中枢神经系统肿瘤,其中多发性胶质母细胞瘤GBM最常见,并且具有侵袭性强、致死率高、易复发等特点,目前临床上常见的问题是部分病人放化疗完成后出现的放化疗反应的假性进展和胶质瘤的真性复发难以鉴别,早期发现和诊断复发病灶及早再次手术或延长化疗周期是提高GBM病人生存期的关键技术,更是精准医疗的重大需求。

[0003] 循环肿瘤细胞CTCs是指自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞,是恶性肿瘤患者出现术后复发和远处转移的重要原因,也是导致肿瘤患者死亡的重要因素。CTCs检测被称为液体活检,虽然具有可重复检测、无创伤等优点,但是相当具有挑战性,价格昂贵,痛苦,存在潜在危险,外周血液中的循环肿瘤细胞检测作为一种可靠无创的方式,具有良好的前景,但是目前由美国FDA批准临床使用的商业化的CTC技术(Cell Search, Janssen Diagnostics)主要基于对EpCAM的检测。但是这些检测技术对于不表达表面标记物EpCAM的脑胶质瘤细胞是无效的,并且由于上皮间质化过程也会导致细胞表面标记物的蛋白表达变化,从而影响其准确性。

[0004] 另一方面,CTC在人体中的含量极其稀有,每千亿个血细胞中只有1~10个CTC,这为CTC的检测分析带来了巨大的挑战,从胶质瘤病人1ml血细胞中分辨出个位数的CTC其难度极大,因此CTC分析需要高灵敏度富集技术,最近的进展表明膜结合蛋白酶G-谷氨酰转肽酶(GGT)可作为可激活荧光探针的靶标。这种蛋白在胶质瘤细胞过度表达,而且和胶质瘤恶性程度呈正相关,但在正常脑组织中表达很低。因此,临床上亟需设计一种不依赖于上皮细胞癌细胞表面标记物的快速检测系统,满足临床对GBM CTC无创液体活检诊断和复发监测的需要。

发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明的目的是提供一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和应用。

[0006] 本发明为实现上述目的,通过以下技术方案实现:

[0007] 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,所述GGT抗体免疫纳米磁珠为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物。

[0008] 优选的,羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为15~20:12~16:36~48:1。

[0009] 优选的,GGT抗体免疫纳米磁珠的平均粒径为100~200nm。

[0010] 优选的,羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为20:15:42:1。

[0011] 本发明还包括一种GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0012] ①将羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐(HQCMC)、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)和胆固醇分别溶于二氯甲烷中,备用;

[0013] ②将N-N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)分别溶于双蒸水中摇匀,备用;

[0014] ③分别吸取步骤①中配制的羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于2~6℃的环境中备用;

[0015] 将油溶性 Fe_3O_4 磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的N-N-羧基琥珀酰亚胺双蒸水和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水,混匀,然后向烧瓶中加入GGT抗体,在2~6℃下反应10~15小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠。

[0016] 优选的,步骤①中羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇与二氯甲烷的质量体积比均为3~5mg:1mL。

[0017] 优选的,步骤②中N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与双蒸水的质量体积比为1~3mg:1mL。

[0018] 优选的GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法包括以下步骤:

[0019] ①将羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇分别溶于二氯甲烷中,备用;其中羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇与二氯甲烷的质量体积比均为3~5mg:1mL;

[0020] ②将N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐分别溶于双蒸水中摇匀,备用;其中N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与双蒸水的质量体积比为1~3mg:1mL;

[0021] ③分别吸取步骤①中配制的羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于2~6℃的环境中备用;

[0022] 将油溶性 Fe_3O_4 磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的N-N-羧基琥珀酰亚胺双蒸水溶液和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水溶液,混匀,然后向烧瓶中加入GGT抗体,得到混合液,将混合液在2~6℃下反应10~15小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠;

[0023] 混合液中羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱、胆固醇、油溶性 Fe_3O_4 磁珠、N-N-羧基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和GGT抗体的质量比为15~20:12~16:12~16:36~48:140~200:240~320:1。

[0024] 本发明还包括一种GGT抗体免疫纳米磁珠的应用,快速富集胶质细胞瘤循环肿瘤细胞。

[0025] 本发明相比现有技术具有以下优点:

[0026] 本发明的GGT抗体免疫纳米磁珠具有明显的核壳结构,油溶性磁颗粒包裹在高聚

物脂质体的内核中,高聚物脂质体的外层为GGT抗体,高聚物脂质体的厚度为2~7nm,其组成主要为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的共混物,含有氨基、羧基和季铵盐基团,具有较高的正电性,并且具有很好的生物相容性,通过与生物活性物质中的配基偶联,能识别并结合相应的胶质瘤细胞抗原,在外加磁场中实现胶质瘤细胞的快速富集,具有广阔的应用前景;

[0027] 本申请将GGT抗体接在 Fe_3O_4 纳米磁珠上,通过绿色荧光GGT抗体(替代EpCAM)结合在胶质瘤表面富集血液中的胶质瘤细胞(循环肿瘤细胞),后续的检测流程同EpCAM试剂盒检测,通过胶质瘤细胞包面特意表达GGT蛋白表达来确定胶质瘤细胞,在临床上合理并且实用,通过CTC分析可以通过动态检测肿瘤细胞的变化,实时动态的反映患者的治疗状况及疾病进程,为目前的肿瘤治疗监测提供无创精准的补充。

[0028] 本申请的GGT抗体免疫纳米磁珠,在检测胶质瘤细胞时不依赖于上皮细胞癌细胞表面标记物,能实现胶质瘤细胞的快速检测系统,满足临床对GBM CTC无创液体活检诊断和复发监测的需要。

附图说明

[0029] 图1为实施例5的GGT抗体免疫磁珠的粒径检测结果图;

[0030] 图2为实施例5的GGT抗体免疫磁珠的电位检测结果图;

[0031] 图3为实施例5的GGT抗体免疫磁珠的磁强度检测结果图;

[0032] 图4为实施例5的GGT抗体免疫磁珠的原子力显微镜图;

[0033] 图5为部分胶质细胞瘤病人血液典型的CTC表现示意图;

[0034] 图6为非配对t检测分布图;

[0035] 图7为ROC曲线分析法评估CTCs在鉴别GBM复发与未复发肿瘤的临床效能结果图。

具体实施方式

[0036] 本发明的目的是提供一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和应用,通过以下技术方案实现:

[0037] 市场上购买的油溶性 Fe_3O_4 磁珠溶液可经过以下预处理后使用:将油溶性 Fe_3O_4 磁珠溶液加入离心管中,于磁分离架上磁分离10~15分钟后吸弃溶剂,然后再向其中加入适量二氯甲烷,混匀后备用。

[0038] 本申请中GGT抗体免疫纳米磁珠的平均粒径一般为100~200nm。

[0039] 以下结合具体实施例来对本发明作进一步的描述。

[0040] 实施例1

[0041] 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物。

[0042] 实施例2

[0043] 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物;羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为

15:12:36:1。

[0044] 实施例3

[0045] 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物;羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为20:16:48:1。

[0046] 实施例4

[0047] 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物;羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为18:14:40:1。

[0048] 实施例5

[0049] 一种GGT抗体免疫纳米磁珠,其为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为高聚物脂质体,最外层为GGT抗体;所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物;羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、胆固醇、磁性材料 Fe_3O_4 和GGT抗体的质量比为20:15:42:1。

[0050] 实施例6

[0051] 实施例1的GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0052] ①将羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇分别溶于二氯甲烷中,备用;

[0053] ②将N-N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐分别溶于双蒸水中摇匀,备用;

[0054] ③分别吸取步骤①中配制的羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于2~6℃的环境中备用;

[0055] 将油性 Fe_3O_4 磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的N-N-羟基琥珀酰亚胺双蒸水和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水,混匀,然后向烧瓶中加入GGT抗体,在2~6℃下反应10~15小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠。

[0056] 实施例7

[0057] 实施例2的GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0058] ①取30mg羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐溶于10mL二氯甲烷,30mg1,2-二油酰基磷脂酰胆碱溶于10mL二氯甲烷,30mg胆固醇溶于10mL二氯甲烷中,配制成溶液备用;

[0059] ②将500mg N-N-羟基琥珀酰亚胺溶于500mL双蒸水中、500mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶于500mL双蒸水中摇匀,备用;

[0060] ③分别吸取步骤①中配制的5mL羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、4mL 1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和4mL胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于2℃的环境中备用;

[0061] 将36mg油性 Fe_3O_4 磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶

中加入步骤②配制的140mLN-N-羟基琥珀酰亚胺双蒸水和240mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水,混匀,然后向烧瓶中加入1mg GGT抗体,在2℃下反应10小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠。

[0062] 实施例8

[0063] 实施例3的GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0064] ①将50mg羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐溶于10mL二氯甲烷中、50mg1,2-二油酰基磷脂酰胆碱溶于10mL二氯甲烷中和50mg胆固醇溶于10mL二氯甲烷中,备用;

[0065] ②将480mg N-N-羟基琥珀酰亚胺溶于160mL双蒸水中、480mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶于160mL双蒸水中摇匀,备用;

[0066] ③分别吸取步骤①中配制的4mL羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、3mL 1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和3.2mL胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于6℃的环境中备用;

[0067] 将48mg油性Fe₃O₄磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的66.7mL N-N-羟基琥珀酰亚胺双蒸水溶液和106.7mL1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水溶液,混匀,然后向烧瓶中加入1mgGGT抗体,得到混合液,将混合液在6℃下反应15小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠;

[0068] 实施例9

[0069] 实施例4的GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0070] ①将40mg羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐溶于10mL二氯甲烷、40mg1,2-二油酰基磷脂酰胆碱溶于10mL二氯甲烷,40mg胆固醇溶于10mL二氯甲烷中,备用;

[0071] ②将200mg N-N-羟基琥珀酰亚胺溶于100m双蒸水中,300mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶于150mL双蒸水中,摇匀,备用;

[0072] ③分别吸取步骤①中配制的4.5mL羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、3.9mL 1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和3.5mL胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于3℃的环境中备用;

[0073] 将40mg油性Fe₃O₄磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶中加入步骤②配制的90mL N-N-羟基琥珀酰亚胺双蒸水溶液和130mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水溶液,混匀,然后向烧瓶中加入1mg GGT抗体,得到混合液,将混合液在3℃下反应12小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠;

[0074] 实施例10

[0075] 实施例5的GGT抗体免疫纳米磁珠的制备方法,包括以下步骤:

[0076] ①将50mg羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐溶于10mL二氯甲烷,40mg 1,2-二油酰基磷脂酰胆碱溶于10mL二氯甲烷,30mg胆固醇溶于10mL二氯甲烷中,备用;

[0077] ②将200mg N-N-羟基琥珀酰亚胺溶于100mL双蒸水中、400mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶于200mL双蒸水中摇匀,备用;

[0078] ③分别吸取步骤①中配制的4mL羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐、3.8mL 1,2-二油酰基磷脂酰胆碱和5mL胆固醇的二氯甲烷溶液,加入烧瓶中,置于4℃的环境中备用;

[0079] 将42mg油性Fe₃O₄磁珠加入至烧瓶中,然后向烧瓶中加入pH7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液,摇晃均匀,然后将烧瓶置于超声波细胞粉碎机中超声后,除去二氯甲烷,然后向烧瓶

中加入步骤②配制的75mLN-N-羟基琥珀酰亚胺双蒸水溶液和150mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐双蒸水溶液,混匀,然后向烧瓶中加入1mg GGT抗体,得到混合液,将混合液在4℃下反应12小时,得到GGT抗体免疫纳米磁珠;

[0080] 对实施例5的GGT抗体免疫纳米磁珠进行粒径、电位和磁强度检测,如图1可以看出,实施例5所得的GGT抗体免疫纳米磁珠的平均粒径为 $156.4 \pm 46.51\text{nm}$ 。

[0081] 如图2所示,电位为42.2mV。

[0082] 如图3所示,饱和磁化强度为 $19\text{Am}^2/\text{Kg}$,而Fe3O4的饱和磁化强度为 $47\text{Am}^2/\text{Kg}$,此参数便于在CTC检测时选择外加磁场的大小。

[0083] 如图4所示,图中A代表四氧化三铁的厚度约为40nm,B代表GGT抗体免疫纳米磁珠的厚度约为200nm,说明GGT抗体脂质体成功包覆在四氧化三铁表面。

[0084] 性能试验

[0085] 对实施例5的GGT抗体免疫纳米磁珠进行以下性能试验检测:

[0086] 1.细胞回收率试验

[0087] 各取GGT抗体免疫纳米磁珠和GFAP-FITC染色液100uL,进行U87细胞回收率试验,步骤如下:

[0088] 取质控品U87细胞在显微镜下计数,并转移至3mL血清中混匀,得到已知CTC数量的模拟样本,制备3支;在上述试管中加入GGT磁珠适量,孵育30min,边孵育边缓慢震荡;磁分离10min后去掉上清液;加PBS洗涤一次;加GFAP-FITC、DAPI、CD45-PE避光染色15min;加PBS洗涤两次;加双蒸水洗涤并转移至载玻片上,自然晾干;在荧光显微镜下观察计数CTC;计算回收率取均值,结果如表1所示。

[0089] 表1细胞回收率试验结果表

[0090]	投入细胞数	回收细胞数	回收率	平均值
	130 (GGT)	114	87.7%	85.3%
	151 (GFAP)	125	82.8%	

[0091] GGT抗体免疫纳米磁珠和GFAP-FITC染色液对U87细胞的回收率是产品性能最关键的性能指标,回收率 $\geq 80\%$ 的数据说明,本申请制备的GGT抗体免疫纳米磁珠和GFAP-FITC染色液对胶质瘤细胞CTC检测具有很好的特异性和有效性。

[0092] 2.胶质细胞瘤术后CTC监测

[0093] 部分胶质细胞瘤病人血液典型的CTC表现,如图5所示,可以验证本申请的GGT抗体免疫磁珠对胶质细胞瘤术后CTC监测的真实性和检测到的CTC结果,图5中Merge代表蓝绿红三色荧光叠加图,EGFR-FITC代表肿瘤标记物染料,为绿色荧光,DAPI为核酸染料,CD45-PE为白细胞标记物染料,WF为明场图。

[0094] GGT抗体免疫纳米磁珠检测循环肿瘤细胞的临床检验效能评估

[0095] 从临床收集29例GBM外周血患者的外周血标本,应用该方法检测循环肿瘤细胞,GBM外周血患者按复发有否分为复发组和非复发组,两组病人的CTCs原始数据如表2所示。首先,本研究用非配对t检验验证了复发组与未复发组之间CTCs数量存在明显的统计学差异,如图6所示;在此基础上,采用ROC曲线分析评估该方法计数的CTCs在鉴别GBM复发与未复发肿瘤的临床效能,以正确诊断复发的比率为特异性,以正确诊断非复发的比率为敏感

性,结果如图7所示,GGT抗体免疫纳米磁珠法的最大曲线下面积(AUC)为0.789(95%可信区间:0.617-0.961)。取cut-off值为6.5个/14ml时,诊断效能最高,此时敏感度为0.706,特异度为0.917,似然比为3.117。

[0096] 我们定义每4mL外周血中CTCs计数大于三个为阳性,小于等于三个为阴性,结合病例样本的临床信息,进一步分析CTCs检测出的阳性率和MRI灌注结果判断复发的相关性。结果显示发生高灌注判断复发的病例中,CTCs检测的阳性率为100%;中等灌注水平,CTCs检测的阳性率均大于80%;而局部病灶稳定,临床未观察到神经功能恶化病人CTCs检测的阳性率为20%。因此,可以得出基于本申请GGT抗体免疫磁珠原理的多色荧光CTC计数仪是临床早期预测胶质瘤复发的有力保证。

[0097] 表2复发组和非复发组两组病人的CTCs原始数据结果表

[0098]

分组	编号	CTCs 计数
复发组	1	21
复发组	2	18
复发组	3	18
复发组	4	19
复发组	5	9
复发组	6	12
复发组	7	9
复发组	8	13
复发组	9	9
复发组	10	10
复发组	11	9
复发组	12	5
复发组	13	3
复发组	14	4
复发组	15	3

[0099]

复发组	16	4
复发组	17	7
未复发组	1	14
未复发组	2	3
未复发组	3	3
未复发组	4	3
未复发组	5	4
未复发组	6	4
未复发组	7	1
未复发组	8	5
未复发组	9	6
未复发组	10	6
未复发组	11	3
未复发组	12	5

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 156.4	Peak 1: 174.3	100.0	46.51
Pdl: 0.087	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.951	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

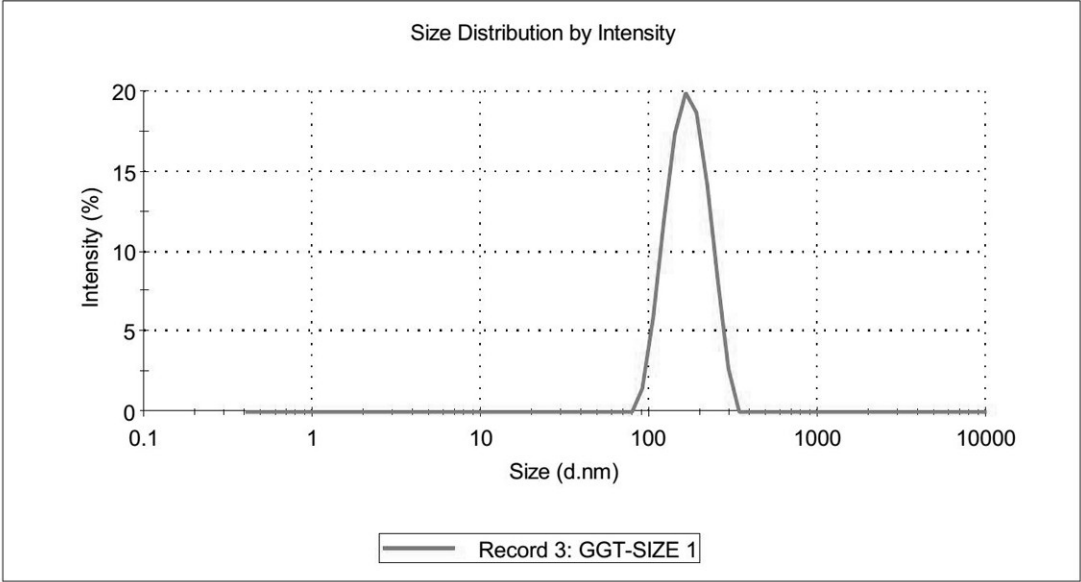


图1

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 42.2	Peak 1: 42.2	100.0	9.98
Zeta Deviation (mV): 9.98	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0940	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			

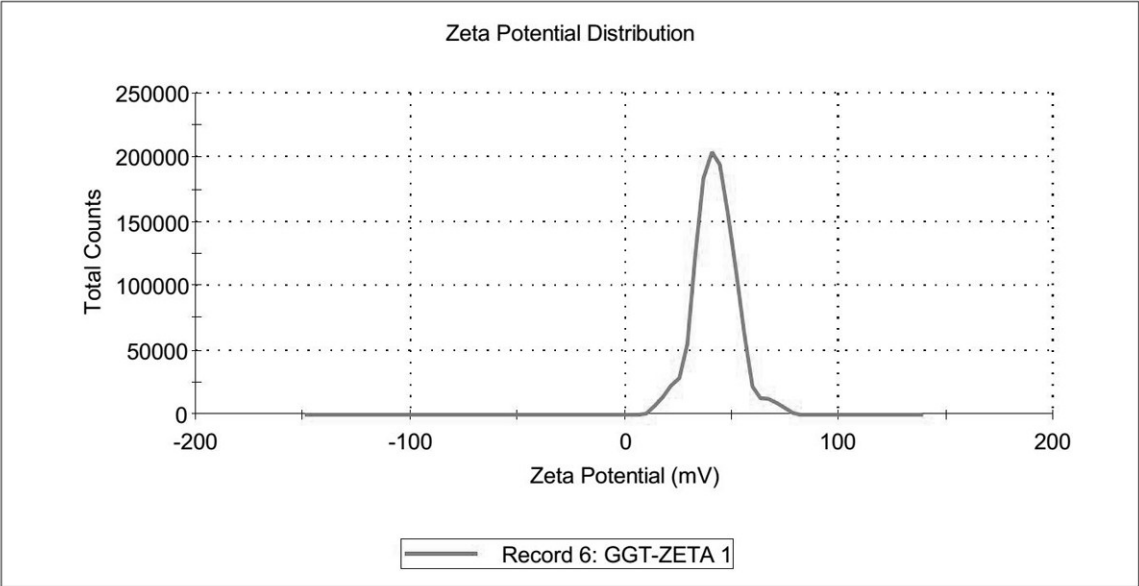


图2

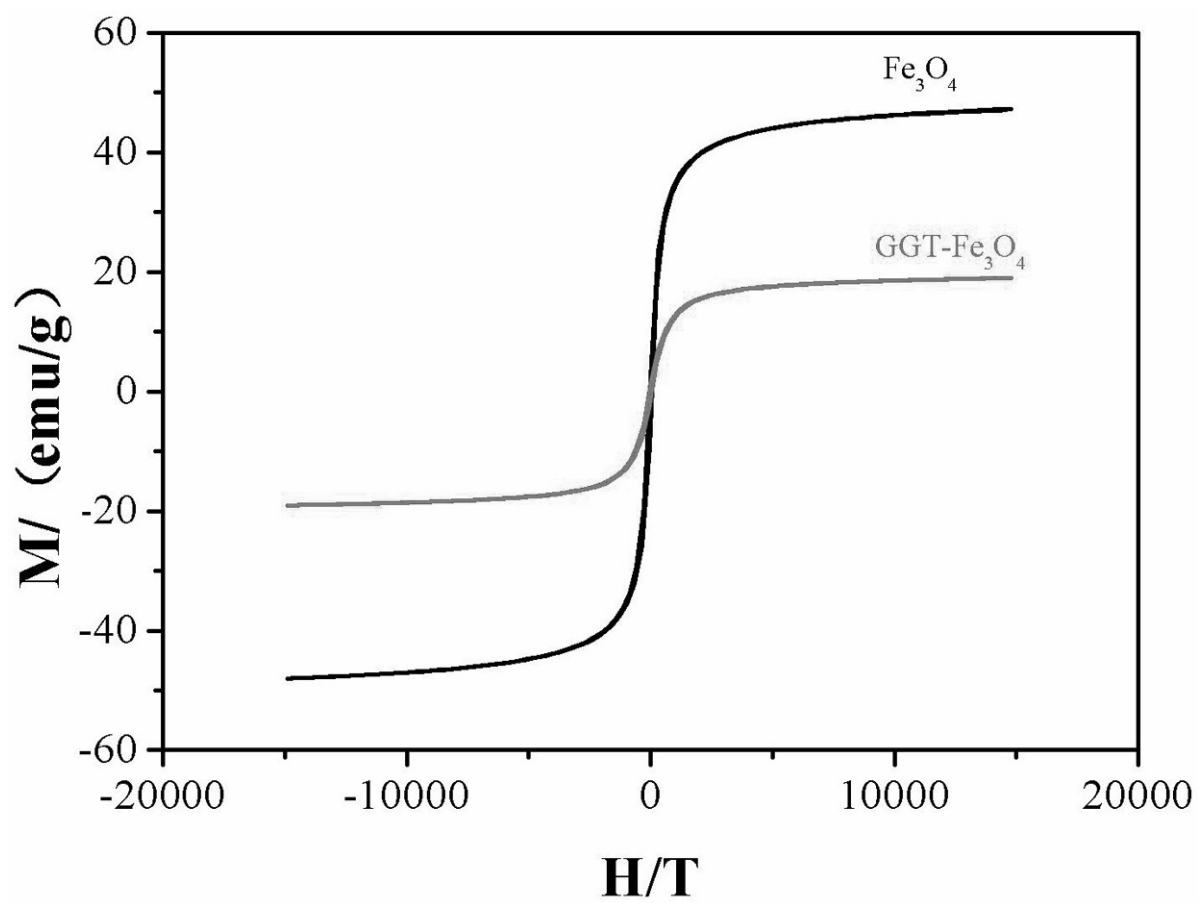


图3

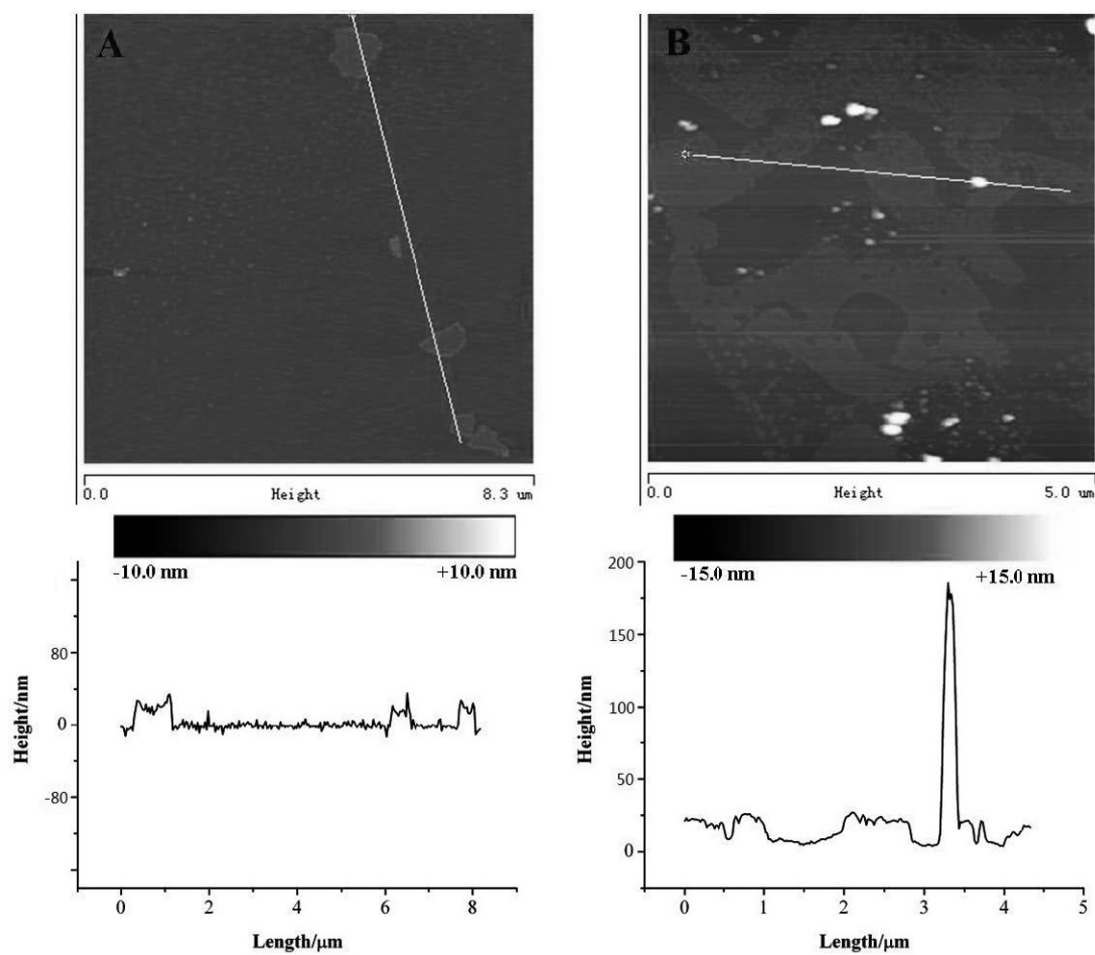


图4

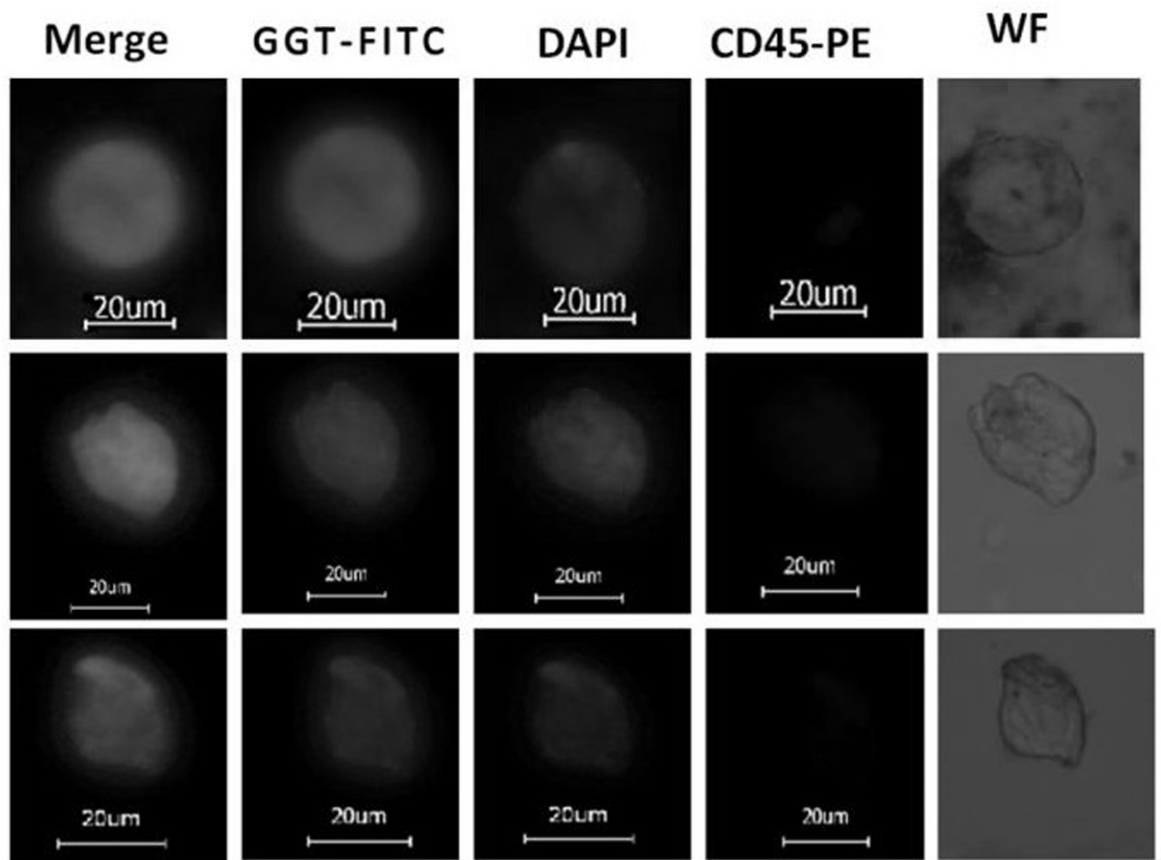


图5

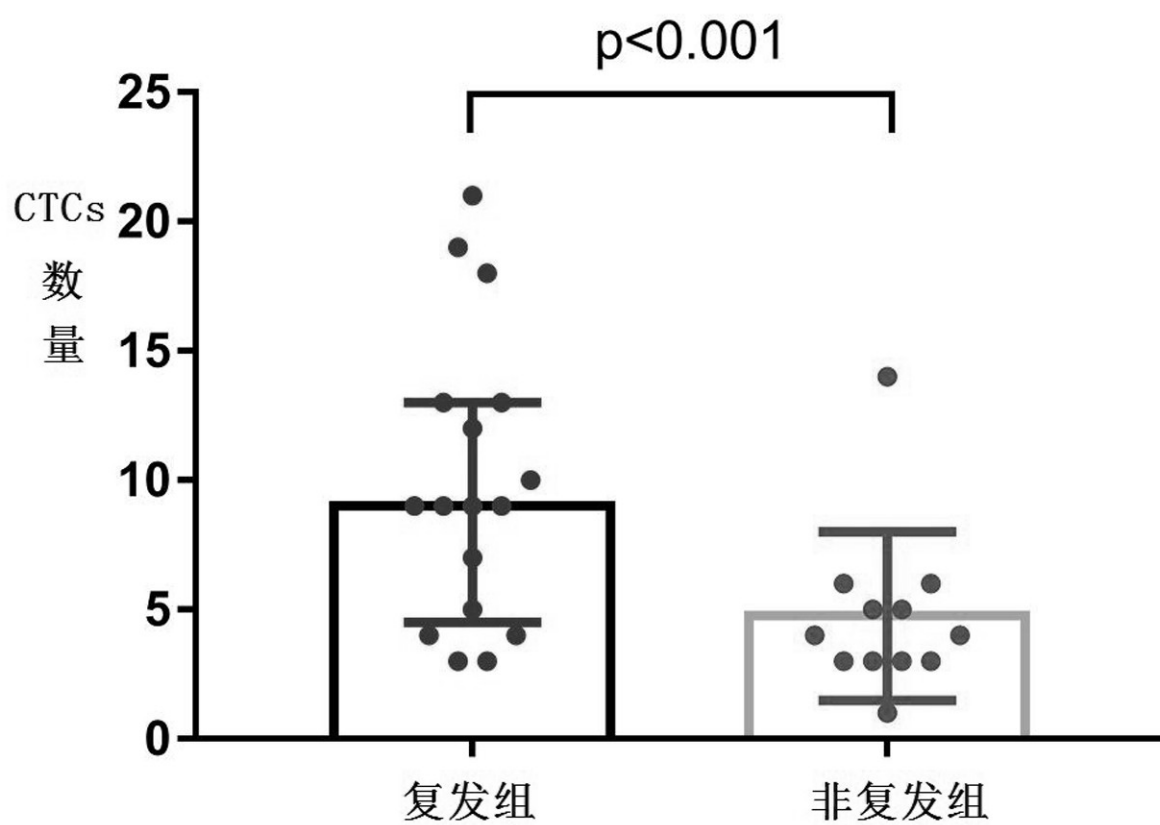


图6

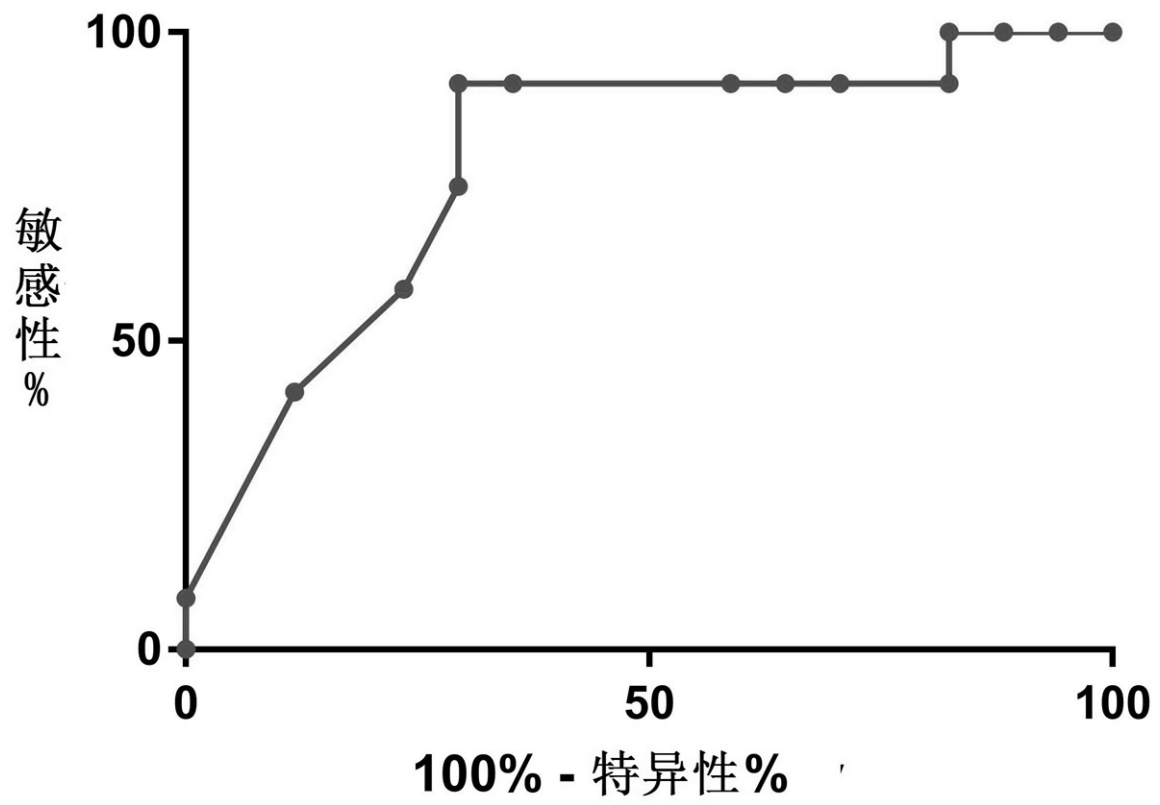


图7

专利名称(译)	一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109613231A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201811638072.3	申请日	2018-12-29
申请(专利权)人(译)	山东省立医院		
当前申请(专利权)人(译)	山东省立医院		
[标]发明人	刘英超 梅胜兰		
发明人	刘英超 梅胜兰 许尚臣 兰川金		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	张娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种GGT抗体免疫纳米磁珠及其制备方法和用途，GGT抗体免疫纳米磁珠为核壳型结构，内核为磁性材料Fe₃O₄，中间层为高聚物脂质体，最外层为GGT抗体；所述高聚物脂质体为羧甲基壳聚糖十六烷基季铵盐和胆固醇的混合物；本申请将GGT抗体接在Fe₃O₄纳米磁珠上，通过绿色荧光GGT抗体结合在胶质瘤表面富集血液中的胶质瘤细胞，后续的检测流程同EpCAM试剂盒检测，通过胶质瘤细胞包面特意表达GGT蛋白表达来确定胶质瘤细胞，在临床上合理并且实用，通过CTC分析可以通过动态检测肿瘤细胞的变化，实时动态的反映患者的治疗状况及疾病进程，为目前的肿瘤治疗监测提供无创精准的补充。

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 156.4	Peak 1: 174.3	100.0	46.51
Pdl: 0.087	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.951	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

