



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102274530 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201110231424. 5

审查员 陈玉平

(22) 申请日 2011. 08. 11

(73) 专利权人 华中科技大学同济医学院附属同
济医院

地址 430030 湖北省武汉市汉口解放大道
1095 号

(72) 发明人 张苏明 刘祖黎 褚倩 杜桂焕
张旻 夏星 李震 马铭 杨华静
王东 湛彦强 吴军 熊永洁
闵喆 李慧

(74) 专利代理机构 华中科技大学专利中心
42201

代理人 夏惠忠

(51) Int. Cl.

A61K 49/14 (2006. 01)

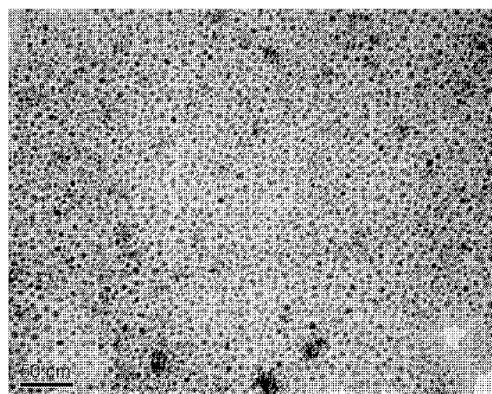
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

老年斑磁共振纳米诊断试剂及其制备方法

(57) 摘要

一种特异性活体标记老年斑的体内磁共振纳米诊断试剂的制备方法,属于生物诊断试剂的开发领域。该方法制得的磁共振纳米诊断试剂可以顺利地通过血脑屏障,既能与脑内老年斑特异性结合,又具有超顺磁性,可以进行核磁共振老年斑特异性成像。实验以核磁共振对比剂——超顺磁性纳米氧化铁颗粒 (USPIO) 为核心,在其表面连上氨基官能团,再通过交联剂的中介作用,连上具有功能的蛋白质。在这一系列的实验中,每一步实验的检测都是必要的。通过一些物理方法和化学方法的检测证实了这些实验过程,从而最终制得的磁共振纳米对比剂可以应用于生物医学中阿尔茨海默病磁共振分子影像学成像上。



1. 一种老年斑磁共振纳米诊断试剂的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、在超顺磁性纳米氧化铁颗粒表面连上氨基官能团,得到表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒;

步骤二、将 5-10 重量份的 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (SPDP) 溶于 1-2 体积份的二甲基亚砜中,得交联剂溶液,再将该交联剂溶液与浓度为 0.1-0.2mol / L、pH=7.4-8 的磷酸盐缓冲溶液混合,得到交联剂溶液与磷酸盐缓冲溶液的混合液,交联剂溶液与磷酸盐缓冲溶液的体积用量比为 1:1-2;

步骤三、将表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒加入到步骤二得到的混合液中,表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒与该混合液的重量 / 体积用量比为 3-5:2-3,在室温下放置 60 ~ 120 分钟,置于超滤管中,6000-8000 转 / 分离心 50-60 分钟,过滤去除杂质和未反应的交联剂溶液,得到经交联溶液处理过的表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒磷酸盐溶液;

步骤四、取经交联溶液处理过的表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒溶液 3-5 体积份,向其中加入 1-2 体积份的浓度为 0.02mol / L 的 N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液和 1-2 体积份的浓度为 0.2mol / L 的 3-二甲胺基丙基碳二亚胺 (EDC) 溶液,于 37℃ 下放置 30-90 分钟,然后再加入 35 重量份的人体免疫缺陷病毒 HIV1 的转录活化因子肽段和 3-5 重量份的 A β ₄₀ 肽段,混合后室温下放置 10-12 小时;置于超滤管中,6000-8000 转 / 分离心 40-60 分钟,过滤去除杂质和未反应的溶液,得到结合有人体免疫缺陷病毒 HIV-1 的转录活化因子肽段和 A β ₄₀ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒,即老年斑磁共振纳米诊断试剂;

步骤一所述的超顺磁性纳米氧化铁颗粒是按以下 a ~ d 中任一项所述的方法制备得到的产物:

a. 10 克分子量为 2 万的葡聚糖与 2.34 克氯化铁、0.86 克氯化亚铁混合,配成水溶液,在温度 5℃、机械搅拌速度 1500 转 / 分下逐步滴加 30 毫升 5℃浓度为 28%的氨水,氨水滴加完毕后,温度在 30 分钟内加热到 80℃,继续搅拌、控制温度 80℃ 1 小时;冷却后,加入稀盐酸调定 pH 至 7.4-7.6 后,加入磷酸盐缓冲液保持缓冲体系 pH 值;滤过除菌,加入 50%葡萄糖溶液,并 4℃下保存;

b. 15 克分子量为 2 万的葡聚糖与 2.34 克氯化铁、0.86 克氯化亚铁混合,配成水溶液,在温度 5℃、机械搅拌速度 1500 转 / 分下逐步滴加 30 毫升 5℃浓度为 28%的氨水,氨水滴加完毕后,温度在 30 分钟内加热到 80℃,继续搅拌、控制温度 80℃ 1 小时,冷却后,加入稀盐酸调定 pH 至 7.4-7.6 后,加入磷酸盐缓冲液保持缓冲体系 pH 值,滤过除菌,加入 50%葡萄糖溶液,并 10℃下保存;

c. 25 克分子量为 2 万的葡聚糖与 2.34 克氯化铁、0.86 克氯化亚铁混合,配成水溶液,在温度 5℃、机械搅拌速度 1500 转 / 分下逐步滴加 30 毫升 5℃浓度为 30%的氨水,氨水滴加完毕后,温度在 30 分钟内加热到 80℃,继续搅拌、控制温度 80℃ 1 小时,冷却后,加入稀盐酸调定 pH 至 7.4-7.6 后,加入磷酸盐缓冲液保持缓冲体系 pH 值,滤过除菌,加入 50%葡萄糖溶液,并 10℃下保存;

d. 15 克淀粉与 3.47 克硝酸铁、1.20 克硫酸亚铁混合,配成水溶液,在温度 5℃、机械搅拌速度 1500 转 / 分下逐步滴加 30 毫升 5℃浓度为 30%的氨水,氨水滴加完毕后,温度在 30 分钟内加热到 80℃,继续搅拌、控制温度 80℃ 1 小时;冷却后,加入稀盐酸调定 pH 至

7.4-7.6后,加入磷酸盐缓冲液保持缓冲体系pH值,滤过除菌,加入50%葡萄糖溶液,并4℃下保存;

步骤一所述的在超顺磁性纳米氧化铁颗粒表面连上氨基官能团,得到表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒的具体方法是:超顺磁性纳米氧化铁颗粒加入絮凝剂,于8000-9000转/分离心10-20分钟,弃上清,下部沉淀物均匀溶解于蒸馏水中;取2-4份体积份的该溶液与10-15体积份的 NaBH_4 的NaOH溶液,室温下均匀混合,于惰性气体环境下升温至60-70℃,边搅拌边加入3-5体积份的表氯醇,反应10-12小时后停止反应;加入絮凝剂,5000-7000转/分离心3-5分钟,均匀溶解于蒸馏水中,重复以上加入絮凝剂、离心、溶解于蒸馏水的操作三至五次;然后,于50-60℃惰性气体环境下,加入5-10体积份乙二胺,反应10-12小时后停止反应,加入絮凝剂,5000-7000转/分离心3-5分钟,均匀溶解于蒸馏水中,重复以上加入絮凝剂、离心、溶解于蒸馏水的操作三至五次,得到表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒,均匀溶解于pH值为7.4-8的磷酸缓冲溶液中保存,其中所述的 NaBH_4 的NaOH溶液的配制方法是:将1-3重量份的 NaBH_4 溶于浓度为1.8-2mol/L的NaOH溶液;所述的絮凝剂是乙醇、甲醇、丙醇、或丁醇;所述的惰性气体为氮气或氩气。

老年斑磁共振纳米诊断试剂及其制备方法

技术领域：

[0001] 本发明属于医学及诊断试剂领域，具体涉老年斑磁共振诊断试剂。

背景技术：

[0002] 长期以来，生物医学中阿尔茨海默病 (Alzheimer Disease, AD) 的诊断只有依靠病理活检或尸检来确诊，但病理学活检接受度不高，而利用脑脊液标志物来进行实验室诊断，则面临诊断准确性以及难以量化评估 AD 的严重程度等问题。如何在 AD 发病的早期阶段利用非创伤性方法来定性又定量的诊断 AD，一直是广大神经病学专家和研究者试图解决的难题，现代分子影像学的飞速发展早期诊断 AD 带来可能，利用磁性纳米颗粒对活体进行 AD 老年斑的特异性磁共振显像，是分子影像学与纳米技术交叉整合的热点和难点。将磁性纳米铁颗粒进行表面修饰，完成与生物肽段的连接，通过生物肽段 ($A\beta_{40}$ 肽段) 特异性能与老年斑相结合的特性达到其靶向性作用，此部分已经通过我们前期 863 工作完成，然而如何突破血脑屏障，将靶向性的纳米诊断试剂带入脑内，却成为另外一个难题。

[0003] 之前我们通过静脉注射高渗透甘露醇，以辅助打开血脑屏障，让连接了生物 $A\beta_{40}$ 肽段的磁性纳米颗粒进入大脑实质，从而对 AD 老年斑进行活体磁共振成像。然而甘露醇对血脑屏障具有破坏性的损伤，且所需的靶向纳米诊断试剂剂量明显增大，必定会带来副作用相应增大，因而注射甘露醇打开血脑屏障的方法应用受限。

发明内容

[0004] 本发明的任务是提供一种老年斑磁共振纳米诊断试剂，使其对 AD 老年斑具有特异靶向性，与现有的 AD 诊断方法相比具有安全无创性和能即时成像等特点。

[0005] 实现本发明的技术方案是：

[0006] 本发明提供的这种老年斑磁共振纳米诊断试剂，是结合有人体免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的转录活化因子肽段 (简称为 :HIV-1Tat 肽段) 和 $A\beta_{40}$ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒 (USPIO)，简称为 :Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 。将该结合有人体免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的转录活化因子肽段 (HIV-1Tat 肽段) 和 $A\beta_{40}$ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒 (USPIO) 用生理可接受的稀释剂稀释，即可作为老年斑磁共振诊断试剂使用，所述的稀释剂可以是 PBS 缓冲液或生理盐水。用稀释剂稀释后，以铁元素含量计量该诊断试剂中 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 的浓度，其铁元素含量为 0.01-20 摩尔 / 升。

[0007] 该老年斑磁共振纳米诊断试剂中所用的超顺磁性纳米氧化铁颗粒的粒径大小为 6-10 纳米。

[0008] 本发明提供的这种老年斑磁共振纳米诊断试剂的制备方法，包括以下步骤：

[0009] 步骤一、在超顺磁性纳米氧化铁颗粒表面连上氨基官能团，得到表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒；

[0010] 步骤二、将 5-10 重量份的 3-(2-吡啶二巯基) 丙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (SPDP) 溶于 1-2 体积份的二甲基亚砜中，得交联剂溶液，再将该交联剂溶液与浓度为 0.1-0.2mol/

L、PH = 7.4-8 的磷酸盐缓冲溶液，（如：PBS 溶液、D-Hanks 溶液等）混合，得到交联剂溶液与磷酸盐缓冲溶液的混合液，交联剂溶液与磷酸盐缓冲溶液的体积用量比为 1 : 1-2；

[0011] 步骤三、将表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒加入到步骤二得到的混合液中，表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒与该混合液的重量 / 体积用量比为 3-5 : 2-3，在室温下放置 60 ~ 120 分钟，置于超滤管中，6000-8000 转 / 分离心 50-60 分钟，过滤去除杂质和未反应的交联剂溶液，得到经交联溶液处理过的表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒（USPIO）磷酸盐溶液；

[0012] 步骤四、取经交联溶液处理过的表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒（USPIO）溶液 3-5 体积份，向其中加入 1-2 体积份的浓度为 0.02mol/L 的 N- 羟基琥珀酰亚胺（NHS）溶液和 1-2 体积份的浓度为 0.2mol/L 的 3- 二甲氨基丙基碳二亚胺（EDC）溶液，于 37℃ 下放置 30-90 分钟，然后再加入 3-5 重量份的人体免疫缺陷病毒 HIV-1 的转录活化因子肽段（HIV-1Tat 肽段）和 3-5 重量的份 A β ₄₀ 肽段，混合后室温下放置 10-12 小时；置于超滤管中，6000-8000 转 / 分离心 40-60 分钟，过滤去除杂质和未反应的溶液，得到结合有人体免疫缺陷病毒（HIV-1）的转录活化因子肽段（简称：HIV-1Tat 肽段）和 A β ₄₀ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒，即老年斑磁共振纳米诊断试剂。

[0013] 上述步骤一所述的在超顺磁性纳米氧化铁颗粒表面连上氨基官能团，得到表面官能化的超顺磁性纳米氧化铁颗粒的具体方法是：超顺磁性纳米氧化铁颗粒加入絮凝剂，于 8000-9000 转 / 分离心 10-20 分钟，弃上清，下部沉淀物均匀溶解于蒸馏水中，取 2-4 体积份的该溶液与 10-15 体积份的 NaBH₄ 的 NaOH 溶液中，室温下均匀混合，于惰性气体环境下降温至 60-70℃，边搅拌边加入 3-5 体积份的表氯醇，反应 10-12 小时后停止反应；加入絮凝剂，5000-7000 转 / 分离心 3-5 分钟，均匀溶解于蒸馏水中，重复以上加入絮凝剂、离心、溶解于蒸馏水的操作三至五次；然后，于 50-60℃ 惰性气体环境下，加入 5-10 体积份乙二胺，反应 10-12 小时后停止反应，加入絮凝剂，5000-8000 转 / 分离心 3-5 分钟，均匀溶解于蒸馏水中，重复以上加入絮凝剂、离心、溶解于蒸馏水的操作三至五次，得到表面官能化的 USPIO，该 USPIO 可均匀溶解于 PH 值为 7.4-8 的磷酸缓冲溶液（PBS）中保存，其中所述的 NaBH₄ 的 NaOH 溶液的配制方法是：将 1-3 重量份的 NaBH₄ 溶于浓度为 1.8-2mol/L 的 NaOH 溶液；所述的絮凝剂是乙醇、甲醇、丙醇、或丁醇；所述的惰性气体为氮气或氩气。

[0014] 上述方法中所述的超顺磁性氧化铁纳米粒可以是超顺磁性三氧化二铁纳米粒或超顺磁性四氧化三铁纳米粒。超顺磁性纳米氧化铁颗粒的具体制备方法，可参见专利申请号为 200410012883.4，名称为“一种制备超小型超顺磁性磁共振对比剂的方法”的中国专利申请文件。

[0015] 上述方法中所述的人免疫缺陷病毒 HIV-1 的转录活化因子肽段——HIV-1Tat 肽段，可来源于多肽合成，其氨基酸序列为：GRKKRRQRRRPPQ，[参见：1.Dennison SR, Baker RD, NicholliID, Phoenix DA. Interactions of cell penetrating peptide Tat with model membranes: a biophysical study Biochem Biophys Res Commun. 2007 Nov 9; 363(1):178-82. Epub 2007 Sep 4 (PMID:17854767); 2. Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms Adv Drug Deliv Rev. 2005 Feb 28; 57(4):547-58. Epub 2004 Dec 16 (PMID:15722163)]; 所述的 A β ₄₀ 肽段，可来源于多肽合成，氨基酸序列为：DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV。

[0016] 本发明通过 NHS 和 EDC 的作用,以及超滤纯化等方法,将 $A\beta_{40}$ 肽段、HIV-1Tat 肽段与官能化的 USPIO 进行连接,获得了具有超顺磁性的靶向磁性纳米材料 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 。HIV-Tat 蛋白转导域 (protein transduction domain,PTD) 是一种在蛋白转导过程中能高效穿过生物膜的结构域,能与其他分子共价结合,介导穿过组织和细胞,甚至血脑屏障,被认为是一种有效的运载工具。本发明利用 Tat PTD 与磁性纳米材料结合,增加磁性纳米材料对血脑屏障的渗透作用,使靶向纳米材料能够进入脑实质,并且具有对 AD 老年斑结合的特异性,以增强其在脑组织中对靶分子的显影效果,减少造影对比剂的用量,从而克服了在循环血液中注射高渗甘露醇辅助打开血脑屏障的不足。

附图说明

[0017] 图 1 为按照实施例 1、2 方法制备的 USPIO 的透射电子显微镜图,纳米氧化铁粒子均匀分散于基底中,总体来看其大小在 7nm 以下,呈球形。

[0018] 图 2 为按照实施例 2、4 方法制备的官能化的 USPIO 样品的水化半径分布图:官能化的 USPIO 样品,其水化半径主要分布在 50nm 左右。

[0019] 图 3 为按照实施例 3、6 方法制备的官能化的 USPIO 样品的电荷分布图。这种官能化的 USPIO 样品其表面带有负电荷,电荷大小为 -8.003mV。

[0020] 图 4 为按照实施例 4、9 方法制备的官能化的 USPIO 样品在进行弛豫性能检测时的磁共振仪屏幕截图。截图中,样品按照铁浓度 (mmol/L) 依次排列,从下至上,样品中铁浓度依次递增。

[0021] 图 5 为按照实施例 4、9 方法制备的官能化的 USPIO 样品其弛豫时间倒数 ($1/T_2$) 与样品中铁浓度 (mmol/L) 之间的曲线图。横坐标为样品中铁浓度 (mmol/L),纵坐标为样品的 T_2 弛豫时间的倒数 ($1/T_2$)。通过对该曲线的线性拟合计算可以得到样品的 R^2 值为 140 (mM-1sec-1)。

[0022] 图 6 为按照实施例 4、9 方法制备 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 的园二色谱对照。

[0023] 图 7Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 与神经干细胞孵育后铁染色验证:细胞内可见蓝色铁颗粒 (A:Per1's 染色) 与棕褐色铁颗粒 (B:DAB 复染),如箭头所示,细胞胞体内存在均匀分布的 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$,其中的铁元素使细胞染色呈蓝色 (左图) 和棕褐色 (右图)。

[0024] 图 8Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 与神经干细胞孵育后体外磁共振检测验证其弛豫性 (A, B),透射电镜证实细胞质内散在分布铁颗粒 (C, D):神经干细胞与 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 孵育后 1.5TMRI 成像结果 (EP 管 1、2、3、4 分别对应培养基, Tat-USPIO- $A\beta_{40}$, 与 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 共孵育后的神经干细胞,单纯的神经干细胞),从上述四个样品的 MR 图像上可以清楚看到,第 3 管的 T_2 信号强度介于第 2 管和第 4 管之间,即与 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 共孵育过的细胞的 T_2 信号强度介于单纯的 Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 与单纯的神经干细胞之间。

[0025] 图 9Tat-USPIO- $A\beta_{40}$ 静脉注射后磁共振活体成像 (A, B) 以及组织学验证 (C 为脑组织切片老年斑 Thioflavine 荧光染色, D 为脑组织切片铁染色),图中箭头 1、2、3、4、5 分别对应于相同部位的老年斑。

具体实施方式

[0026] 实施例 1

[0027] 向超顺磁性纳米铁颗粒中加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心 10 分钟,弃去上清液,收集下部黑色沉淀均匀溶解于 60ml 的蒸馏水中。取该溶液 20ml,在室温下加入 10ml 含 0.1g NaBH_4 的 NaOH 溶液 (NaOH 溶液浓度为 2mol/L),混合均匀后,再于惰性气体环境下升温至 60℃,磁力搅拌速度 200 转/分下,注入 3ml 表氯醇,反应 10 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀溶于 50ml 的蒸馏水中,然后在 50℃的惰性气体环境下,向其中加入 5ml 乙二胺,反应 10 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀 (即表面官能化的 USPIO) 溶于 PH 值为 7.4 的磷酸缓冲液 (PBS 溶液) 中。

[0028] 将 100uL 浓度为 0.02mol/L 的 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液与 100uL 浓度为 0.2mol/L 的 3- 二甲氨基丙基碳二亚胺 (EDC) 溶液混合,然后向其中加入 0.1ml 表面官能化的 USPIO 溶液,37℃下放置 30mins;再向其中加入 1mg 的 SPDP、和 0.128ml 二甲基亚砷,然后再加入 0.1ml 的 HIV-1 Tat (FITC) 溶液和 0.1ml 的 $\text{A}\beta_{40}$ 肽段溶液,混合后在室温下放置反应 10 小时;然后置于规格为 0.5ml、100k 的超滤管中,在离心机上离心,离心机的转速为 6000 转/分,离心时间为 50mins,超滤法过滤去除杂质和未反应的溶液,得到结合有人体免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的转录活化因子肽段 (简称:HIV-1Tat 肽段) 和 $\text{A}\beta_{40}$ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒老年斑磁共振纳米诊断试剂,于 4℃下保存。

[0029] 实施例 2

[0030] 向超顺磁性纳米铁颗粒中加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心 10 分钟,弃去上清液,收集下部黑色沉淀超声溶于 60ml 的蒸馏水中。取该溶液 25ml,在室温下加入 15ml 含 0.1g NaBH_4 的 NaOH 溶液 (NaOH 溶液浓度为 2mol/L),混合均匀后,再于惰性气体环境下升温至 60℃,磁力搅拌速度 300 转/分下,注入 4ml 表氯醇,反应 11 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀溶于 50ml 的蒸馏水中,然后在 50℃的惰性气体环境下,向其中加入 8ml 乙二胺,反应 11 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀 (即表面官能化的 USPIO) 溶于 PH 值为 7.8 的磷酸缓冲液 (PBS 溶液) 中。

[0031] 将 150uL 浓度为 0.02mol/L 的 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液与 150uL 浓度为 0.2mol/L 的 3- 二甲氨基丙基碳二亚胺 (EDC) 溶液混合,然后向其中加入 0.2ml 表面官能化的 USPIO 溶液,37℃下放置 50mins;再向其中加入 1mg 的 SPDP、和 0.128ml 二甲基亚砷,然后再加入 0.2ml 的 HIV-1 Tat (FITC) 溶液和 0.2ml 的 $\text{A}\beta_{40}$ 肽段溶液,混合后在室温下放置反应 11 小时,然后置于规格为 0.5ml、100k 的超滤管中,在离心机上离心,离心机的转速为 7000 转/分,离心时间为 40mins,过滤去除杂质和未反应的溶液,得到结合有人体免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的转录活化因子肽段 (简称:HIV-1 Tat 肽段) 和 $\text{A}\beta_{40}$ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒老年斑磁共振纳米诊断试剂,于 4℃下保存。

[0032] 实施例 3

[0033] 向超顺磁性纳米铁颗粒中加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转/分的速度离心 10 分钟,弃去上清液,收集下部黑色沉淀溶于 60ml 的蒸馏水中。取该溶液 30ml,在室温下加入 20ml 含 0.1g NaBH_4 的 NaOH 溶液 (NaOH 溶液浓度为 2mol/L),混合均匀

后,再于惰性气体环境下升温至 60℃,磁力搅拌速度 400 转 / 分下,注入 5ml 表氯醇,反应 12 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转 / 分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀溶于 50ml 的蒸馏水中,然后在 50℃的惰性气体环境下,向其中加入 10ml 乙二胺,反应 12 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转 / 分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀(即表面官能化的 USPIO)溶于 PH 值为 7.4 的磷酸缓冲液(PBS 溶液)中。

[0034] 将 200uL 浓度为 0.02mol/L 的 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液与 200uL 浓度为 0.2mol/L 的 3-二甲胺基丙基碳二亚胺(EDC)溶液混合,然后向其中加入 0.3ml 表面官能化的 USPIO 溶液,37℃下放置 60mins;再向其中加入 1mg 的 SPDP、和 0.128ml 二甲基亚砷,然后再加入 0.3ml 的 HIV-1Tat(FITC)溶液和 0.3ml 的 A β ₄₀ 肽段溶液,混合后在室温下放置反应 12 小时;然后置于规格为 0.5ml、100k 的超滤管中,在离心机上离心,离心机的转速为 8000 转 / 分,离心时间为 30mins,过滤去除杂质和未反应的溶液,得到结合有人体免疫缺陷病毒(HIV-1)的转录活化因子肽段(简称:HIV-1 Tat 肽段)和 A β ₄₀ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒老年斑磁共振纳米诊断试剂,于 4℃下保存。

[0035] 实施例 4

[0036] 向超顺磁性纳米铁颗粒中加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转 / 分的速度离心 10 分钟,弃去上清液,收集下部黑色沉淀溶于 60ml 的蒸馏水中。取该溶液 30ml,在室温下加入 10ml 含 0.1g NaBH₄ 的 NaOH 溶液(NaOH 溶液浓度为 2mol/L),混合均匀后,再于惰性气体环境下升温至 60℃,磁力搅拌速度 500 转 / 分下,注入 5ml 表氯醇,反应 12 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转 / 分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀溶于 50ml 的蒸馏水中,然后在 50℃的惰性气体环境下,向其中加入 10ml 乙二胺,反应 12 小时后停止反应,加入无水乙醇直至有黑色絮凝出现为止,通过 8000 转 / 分的速度离心,弃去上清液,收集下部黑色沉淀(即表面官能化的 USPIO)溶于 PH 值为 7.4 的磷酸缓冲液(PBS 溶液)中。

[0037] 将 100uL 浓度为 0.02mol/L 的 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液与 150uL 浓度为 0.2mol/L 的 3-二甲胺基丙基碳二亚胺(EDC)溶液混合,然后向其中加入 0.1ml 表面官能化的 USPIO 溶液,37℃下放置 30mins;再向其中加入 1mg 的 SPDP、和 0.128ml 二甲基亚砷,然后再加入 0.15ml 的 HIV-1 Tat(FITC)溶液和 0.15ml 的 A β ₄₀ 肽段溶液,混合后在室温下放置反应 12 小时;然后置于规格为 0.5ml、100k 的超滤管中,在离心机上离心,离心机的转速为 6000 转 / 分,离心时间为 60mins,过滤去除杂质和未反应的溶液,得到结合有人体免疫缺陷病毒(HIV-1)的转录活化因子肽段(简称:HIV-1 Tat 肽段)和 A β ₄₀ 肽段的超顺磁性纳米氧化铁颗粒老年斑磁共振纳米诊断试剂,于 4℃下保存。

[0038] 实施例 5-14:其成分及配比见下表,其制备过程同实例 1-4:

[0039]

	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9
含有 0.1g NaBH_4 的 NaOH 溶液 (毫升)	11	11	12	12	13
表氯醇 (毫升)	3	3.2	3.4	3.6	3.8
乙二胺 (毫升)	5	5.5	6	6.5	7
浓度为 0.02mol/L 的 NHS 溶液 (微升)	100	115	120	125	130
浓度为 0.2mol/L 的 EDC 溶液 (微升)	100	115	120	125	130
超滤管容量 (毫升)	0.5	1	0.5	1	0.5
超滤管的半透膜大小(k)	100	100	250	250	400
HIV-1 TAT 溶液 (毫升)	0.3	0.32	0.34	0.36	0.38
A β ₄₀ 肽段溶液 (毫升)	0.3	0.32	0.34	0.36	0.38

[0040]

	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13	实施例 14
含有 0.1g NaBH ₄ 的 NaOH 溶液 (毫升)	13	14	14	15	15
表氯醇 (毫升)	4.1	4.4	4.6	4.8	5
乙二胺 (毫升)	7.5	8.5	9	9.5	10
浓度为 0.02mol/L 的 NHS 溶液 (微升)	135	140	150	180	200
浓度为 0.2mol/L 的 EDC 溶液 (微升)	135	140	150	180	200
超滤管容量(毫升)、	1	0.5	1	0.5	1
超滤管的半透膜大小(k)	400	500	500	500	500
HIV-1 TAT 溶液 (毫升)	0.42	0.44	0.46	0.48	0.5
A β ₄₀ 肽段溶液 (毫升)	0.42	0.44	0.46	0.48	0.5

[0041] 效果评价 :Tat-USPIO-A β ₄₀

[0042] 检测 USPIO 的粒径在 6-10nm, 见图 1, 其水化半径在 50nm 左右, 见图 2, 且在水相中分散性能良好, 无团聚现象 ; 通过检测纳米颗粒表面其带有负电荷, 电荷大小为 -8.003mV, 见图 3。

[0043] 我们在 1.5T 磁共振仪下测量了官能化的 USPIO 的弛豫性能, 通过测量其 T2 弛豫时间, 获得其弛豫速率 R2 值为 140 (mM⁻¹sec⁻¹)。见图 4、图 5, 其中图 4 为官能化的 USPIO 进行弛豫性能检测的磁共振仪屏幕截图, 图 5 为 T2 弛豫时间倒数与样品中铁浓度之间的关系曲线, 通过对曲线的拟合计算可以得到样品的 R2 值为 140 (mM⁻¹sec⁻¹)。

[0044] 将本发明老年斑磁共振纳米诊断试剂在体外与神经细胞共孵育后, 普鲁士蓝染色显示 Tat-USPIO-A β ₄₀ 能够进入活体细胞内, 使细胞染色呈淡蓝色, 均匀分布于细胞质内, 见图 7。透射电镜显示 Tat-USPIO-A β ₄₀ 位于细胞质内, 细胞膜内侧居多, 呈直径约数十至数百纳米的致密电子沉积颗粒, 部分聚集成片状, 见图 8, 说明 Tat-USPIO-A β ₄₀ 能够穿透细胞膜进入细胞体内。

[0045] 利用 Tat-USPIO-A β ₄₀ 与神经细胞共孵育后所测得的细胞 T2 信号强度介于未孵育纯细胞与官能化的 USPIO 之间 (图 8), 说明 Tat-USPIO-A β ₄₀ 能够缩短 T2 弛豫时间, 改变

目标组织的 T2 信号强度,磁共振图像上能够对目标区域起负性强化作用。

[0046] 9 月龄阳性鼠在尾静脉注射 Tat-USPIO-A β_{40} (0.01-20M) 后 24h 可见到在皮层及海马区有散在分布的小点状低 T2 信号区 (图 9), 磁共振图像与脑组织切片染色的老年斑病灶相吻合良好, 说明 Tat-USPIO-A β_{40} 经静脉注射能够突破血脑屏障进入脑内, 进而特异性与老年斑结合, 最终改变老年斑的 T2 信号强度, 达到活体诊断 AD 脑内老年斑的目的, 见图 9B。所有阴性小鼠在注射 Tat-USPIO-A β_{40} 之前及之后不同的时间点后成像均没有发现特异性的点状低信号区, 所有月龄的阳性鼠在注射 Tat-USPIO-A β_{40} 之前扫描均没有明显的点状低信号改变。

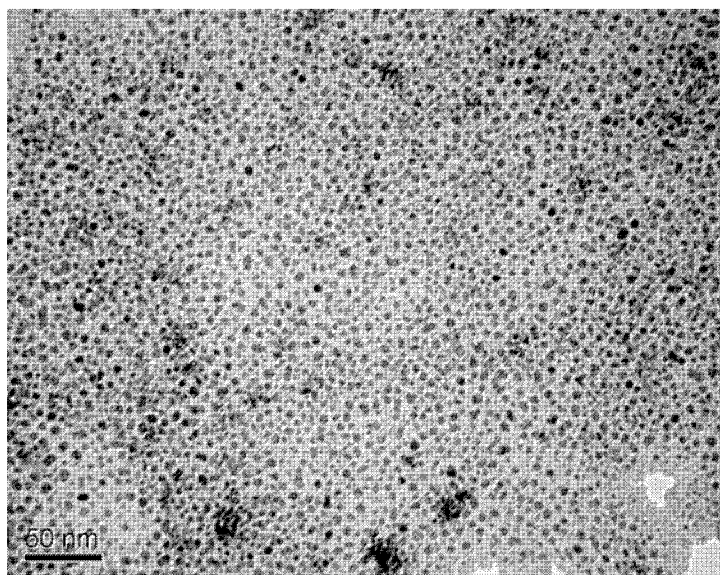


图 1

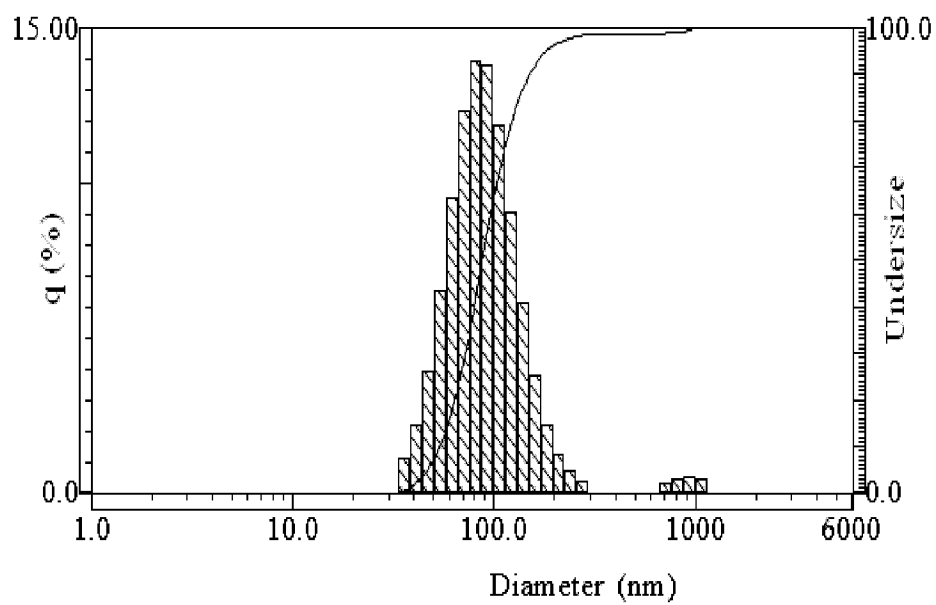


图 2

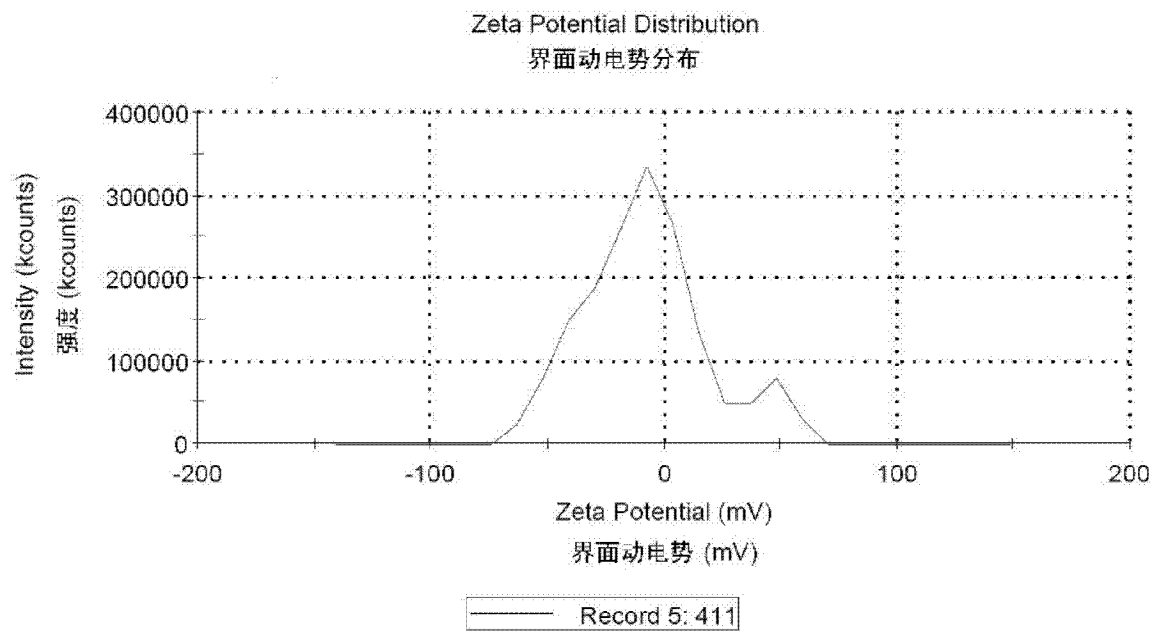


图 3

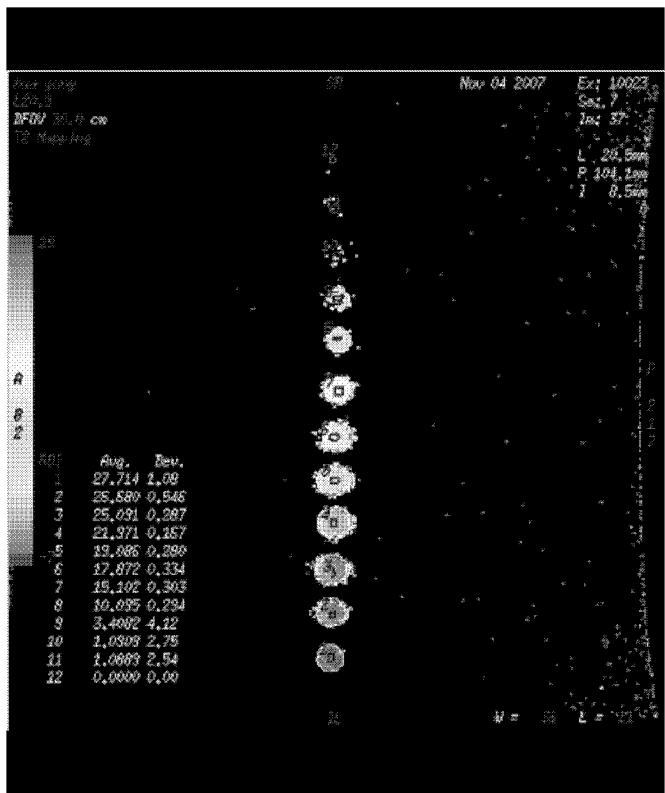


图 4

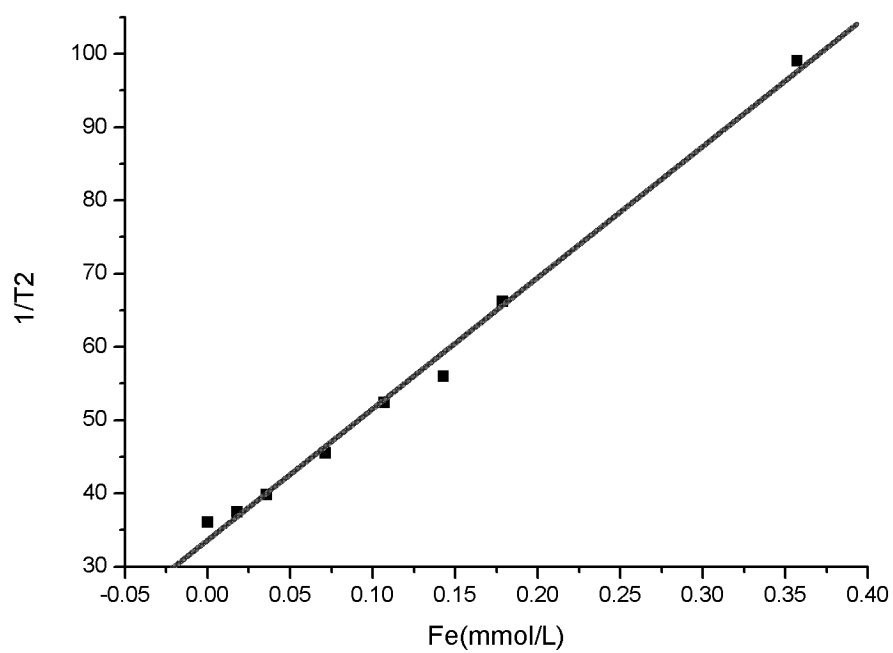


图 5

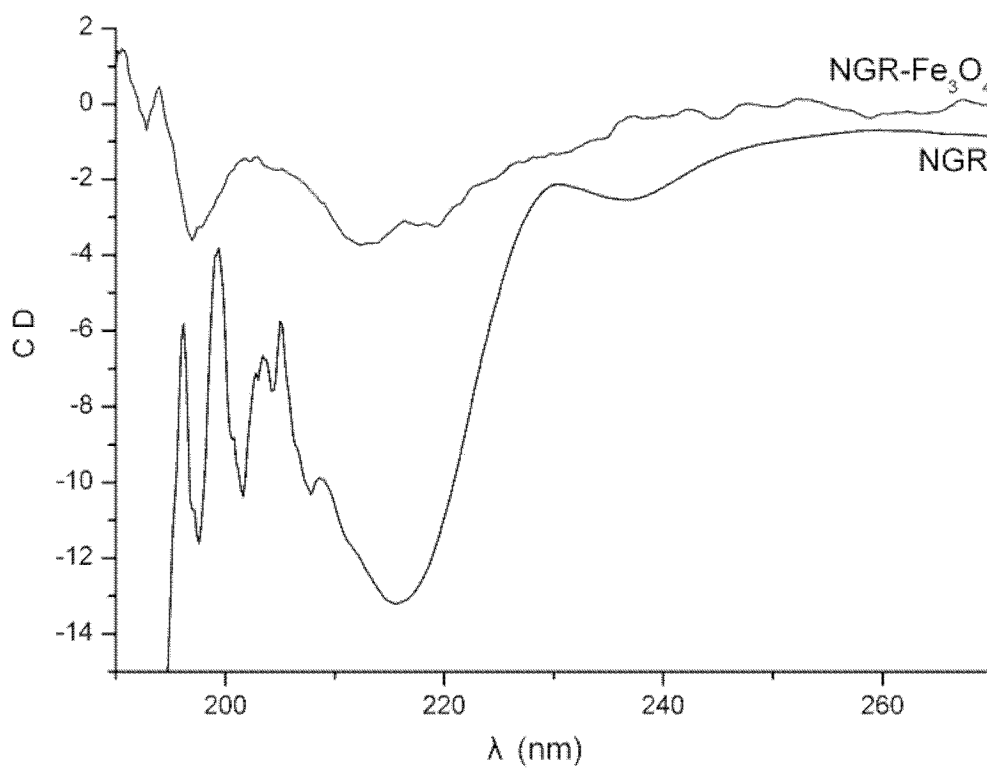


图 6

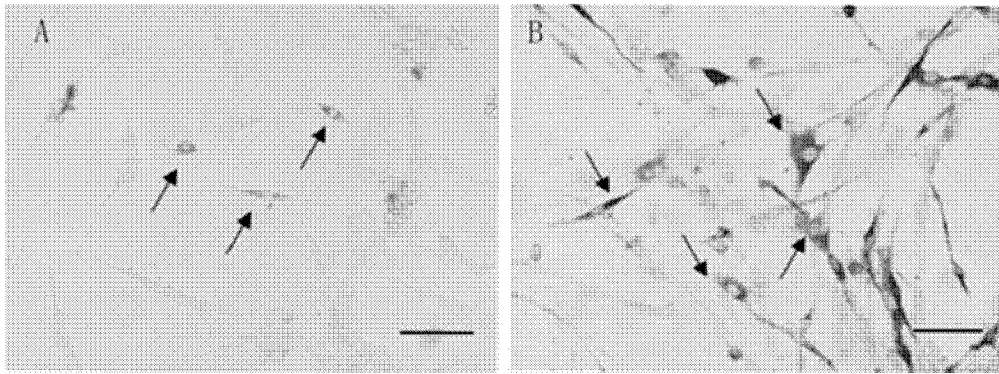


图 7

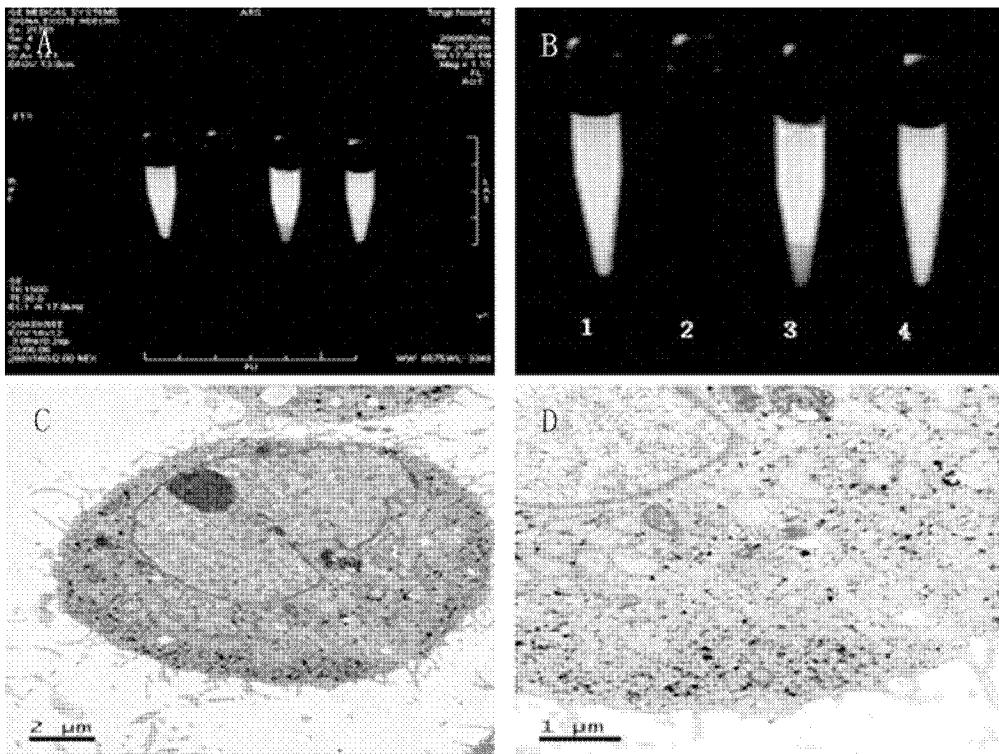


图 8

