



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102083471 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 28

(21) 申请号 200980108361. 5

(22) 申请日 2009. 03. 04

(30) 优先权数据

12/042, 701 2008. 03. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/052523 2009. 03. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02009/109588 EN 2009. 09. 11

(73) 专利权人 通用电气公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 B·格里蒙德 B·C·巴尔斯

T·恰基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 徐晶 林毅斌

(51) Int. Cl.

A61K 49/18 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2007112679 A, 2007. 05. 10, 摘要, 说明书

第 [0067] 段.

US 20060105052 A1, 2006. 03. 18, 权利要求
1-6, 表 1, 说明书第 [0050] 段.

WO 2004083902 A2, 2004. 09. 30, 权利要求
1, 图 3, 说明书第 [0081]\[0083]\[0098]\[0101]
段.

WO 2007070827 A2, 2007. 06. 21, 实施例
1-4, 说明书第 [0032]\[0033] 段.

US 20060093555 A1, 2006. 05. 04, 权利要求
1, 4, 6, 13, 说明书第 [0014]\[0055]\[0083]\[00
60]\[0111]\[0112]\[0131] 段.

Randy De Palma et. al.. 《Surface
modification of gamma-Fe2O3@SiO2
magnetic nanoparticles for the controlled
interaction with biomolecules》.《Journal of
Nanoscience and Nanotechnology》.2007, 第 7
卷(第 12 期), 第 4626-4641 页.

审查员 豆波建

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 4 页

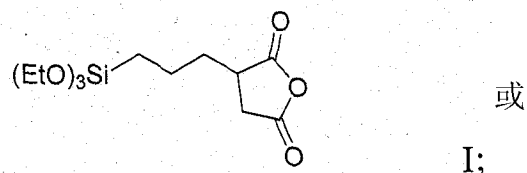
(54) 发明名称

用于炎症成像的混合配体核 / 壳氧化铁纳米
颗粒

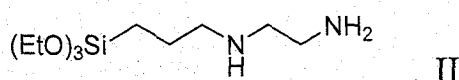
(57) 摘要

一种纳米结构, 所述纳米结构包括 (1) 无机
纳米颗粒核; (2) 与所述无机纳米颗粒核键合的
具有第一链长的第一配体, 所述第一配体带有电
荷; 和 (3) 与所述无机纳米颗粒核键合的具有第
二链长的第二配体, 所述第二配体为亲水性的。所
述第二链长比所述第一链长长, 使得改变第一配
体的摩尔百分比量实质上不改变所述纳米结构的
流体动力学直径。提供了制备这些纳米结构的方
法及其在磁共振成像和处理炎症病症中的用途。

1. 一种纳米结构,所述纳米结构包括:
 - 包含超顺磁性氧化铁的无机纳米颗粒核;
 - 与所述无机纳米颗粒核键合的具有第一链长的第一配体,
 - 其中所述第一配体为衍生自式 I 的结构的带负电荷的配体:



所述第一配体为衍生自式 II 的结构的带正电荷的配体:

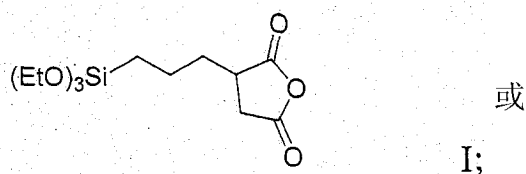


和

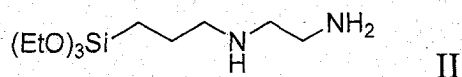
与所述无机纳米颗粒核键合的具有第二链长的第二配体,
其中所述第二配体为亲水性的;并且所述第二配体包含 PEG 聚合物;且

其中所述第二链长比所述第一链长长,使得改变第一配体的摩尔百分比量实质上不变所述纳米结构的流体动力学直径。

2. 权利要求 1 的纳米结构,所述纳米结构的流体动力学直径为 1nm 至 500nm。
3. 权利要求 2 的纳米结构,所述纳米结构的流体动力学直径为 1nm 至 100nm。
4. 权利要求 3 的纳米结构,所述纳米结构的流体动力学直径为 2nm 至 30nm。
5. 权利要求 1 的纳米结构,其中所述第一配体和第二配体通过选自羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和硅烷及其混合物的官能团与所述无机纳米颗粒核键合。
6. 一种制备权利要求 1 的纳米结构的方法,所述方法包括:
 - 使包含超顺磁性氧化铁的无机纳米颗粒核与带有电荷的第一配体反应;
 - 其中所述第一配体为衍生自式 I 的结构的带负电荷的配体:



所述第一配体为衍生自式 II 的结构的带正电荷的配体:



和

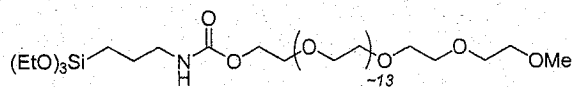
其中所述第一配体通过选自羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和三烷氧基硅烷的官能团与所述纳米颗粒核键合;和

使所述纳米颗粒核与亲水性的第二配体反应;并且所述第二配体包含 PEG 聚合物;且

其中所述第二配体通过选自羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和三烷氧基硅烷的官能团与所述纳米颗粒核键合;

其中所述第一配体加上所述第二配体与所述无机纳米颗粒核的摩尔比在 1 : 1 至 20 : 1 之间。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述第二配体衍生自式 III 的结构:



III.

8. 权利要求 1 的纳米结构在制造用于炎性病症的造影和处理的磁共振成像剂中的用途。

用于炎症成像的混合配体核 / 壳氧化铁纳米颗粒

[0001] 背景信息

[0002] 在开发用于磁共振成像的基于纳米颗粒的成像剂中重新提起的挑战为控制磁共振活性纳米颗粒的表面电荷,而不会显著影响整体纳米颗粒尺寸。纳米颗粒通常具有非常高的表面能,因此非常容易形成聚集体。在不存在表面稳定配体下制备的纳米颗粒容易在溶液中形成聚集体。通过使配体与纳米颗粒的表面结合可防止这种聚集。这些配体通过位阻或静电排斥而防止聚集。

[0003] 通常纳米颗粒的表面电荷可通过使用与纳米颗粒的表面结合的不同的稳定配体而改变。不同的带电荷的稳定配体的长度通常不同,因此,不同的配体影响纳米颗粒的整体尺寸。

[0004] 已知的基于纳米颗粒的试剂包括通过生物相容的涂层(例如葡聚糖、淀粉或碳水化合物)稳定的氧化铁核。通常,氧化铁核直径为约 3 至约 10nm,且核与涂层的总直径为约 10 至约 100nm。已知的纳米结构(例如 Feridex, RTM. 和 Resovist, RTM.) 带负电荷,并且血液停留时间短(人血液半衰期小于 1 小时),阻止了这些结构进入吸收差的组织。因此,具有短血液停留时间的试剂不适用于这些组织和内皮下空间(例如,血管内膜)的成像。现有的超顺磁性颗粒造影剂还具有多种缺点,例如尺寸分布宽、附聚、不稳定和毒性。

[0005] 已评价了具有葡聚糖涂层且直径为 15-30nm 的 Combidex, RTM. 在多种动物疾病模型以及人中的磁共振成像。由于其尺寸小,Combidex, RTM. 的血液停留时间长(人血液半衰期在 24-36 小时之间)。

[0006] 仍需要能通过炎症应答细胞有效内在化并运输至炎症部位以用于使发炎的组织成像的具有适当溶解度、生物相容性、尺寸、和涂层特性的纳米结构。假定设计用于体内使用的纳米颗粒的体内分解特性 受到整体纳米颗粒尺寸和表面电荷的严重影响,期望能改变纳米颗粒表面电荷而不改变纳米颗粒尺寸,这是由于具有不同表面电荷的相同尺寸纳米颗粒使得表面电荷对纳米颗粒体内分解的影响减弱了尺寸的影响。

[0007] 发明概述

[0008] 在一些方面,本文公开的实施方案提供了一种纳米结构,所述纳米结构包括:(1) 无机纳米颗粒核;(2) 与所述无机纳米颗粒核键合的具有第一链长的第一配体,所述第一配体带有电荷;和(3) 与所述无机纳米颗粒核键合的具有第二链长的第二配体,所述第二配体为亲水性的。所述第二链长比所述第一链长长,使得改变第一配体的摩尔百分比量实质上不改变所述纳米结构的流体动力学直径。

[0009] 在其他方面,本文公开的实施方案提供了一种制备这些纳米结构的方法。所述方法包括:(1) 使无机纳米颗粒核与带有电荷的第一配体反应,所述第一配体通过选自羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和三烷氧基硅烷的官能团与所述无机纳米颗粒核键合;和(2) 使所述无机纳米颗粒核与亲水性的第二配体反应,所述第二配体通过选自羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和三烷氧基硅烷的官能团与所述无机纳米颗粒核键合。所述第一配体加上所述第二配体与所述无机纳米颗粒核的摩尔比在约 1 : 1 至约 20 : 1 之间。

[0010] 再其他方面,本文公开的实施方案提供了一种使哺乳动物的炎性病症成像的方

法。所述方法包括：将上述纳米结构体内或先体外后体内引入哺乳动物的炎症细胞，让炎症细胞迁移至发炎的组织，并且使用磁共振使所述发炎的组织成像。

[0011] 有利的是，本文公开的纳米结构可用作可用于炎性病症的造影术和处理的磁共振成像剂。

[0012] 前面已相当宽泛地描述了本发明的特性，以便可以更好地理解随后的详细说明。后文中将描述另外的特征和优点，这些形成本发明的 权利要求的各个主题。

[0013] 发明详述

[0014] 在以下描述中，描述了具体的细节，例如具体的量、尺寸，等等，使得充分理解本发明的实施方案。但是，对于本领域技术人员显而易见的是，不使用这些具体的细节可实践本发明。在许多情况下，由于这些细节不是完全理解本发明所必要的并且在相关领域普通技术人员知识范围内，因此关于这些考虑等等的细节可省略。

[0015] 通常应理解的是，这些示例用于描述本发明的具体实施方案的目的，而不是要限制本发明。

[0016] 在一些实施方案中，本发明公开涉及可用作成像剂的纳米结构化材料。具有硅烷-连接的短的带电荷的配体 L1 和长的亲水性配体 L2 的磁共振 (MR) 成像剂的通用结构如下所述。用于该目的的纳米结构包括无机纳米颗粒核。所述无机纳米颗粒核通常为可用作磁共振 (MR) 活性实体 (即, MR 的信号源) 且可用作化学改性的平台以影响纳米结构的整体电荷 / 尺寸 / 极性的任何材料。纳米结构的电荷和尺寸通常受与无机纳米颗粒核键合的配体的影响。这些配体最低限度包括第一配体和第二配体。第一配体具有第一链长且可与无机纳米颗粒核共价键合。第一配体可带正电荷或带负电荷。第二配体具有第二链长且可与无机纳米颗粒核共价键合。第二配体可为亲水性的，且第二链长比第一链长长，使得改变第一配体的摩尔百分数实质上不改变纳米结构的流体动力学直径 (D_h)。因此，通过结合至少两种配体，其中一种配体与另一种配体相比具有足够不同的长度，人们可改变带电荷的配体的量而实质上不改变流体动力学直径。虽然第一配体和第二配体通过硅烷部分连接，但是与无机纳米颗粒核连接的硅烷键只是一个示例性实施方案，这点下文将进一步详述。

[0017] 虽然本文使用的大多数术语为本领域技术人员认可的，但是陈述以下定义以帮助理解本发明公开。但是，应理解的是，当未明确定义 时，各术语应理解为采用本领域技术人员目前可接受的含义。

[0018] 本文定义的“纳米级”通常是指低于 $1\ \mu\text{m}$ 的尺寸。

[0019] 本文定义的“纳米结构”通常是指在至少一维上为纳米级的结构。具体地讲，本文公开的纳米结构可用于磁共振成像。

[0020] 本文使用的术语“ ζ 电位”、“表面电位”和“表面电荷”及缩写“ ζ ”是指在接近颗粒表面的静电电位的度量。由于 ζ 电位受溶剂和溶剂的离子强度的影响，除非另外说明，否则本文报道的所有 ζ 电位值使用 10mM NaCl 水溶液作为溶剂进行测定。因此，本发明的阳离子纳米结构显示 ζ 电位大致为约 0 至约 +60mV 之间。

[0021] 本文使用的“链长”是指与无机纳米颗粒核键合的配体的各原子的最长链。

[0022] 本文使用的术语“流体动力学直径”、“流体动力学尺寸”及缩写“ D_h ”是指通过动态光散射 (DLS) 测得的扩散系数与所述纳米颗粒的扩散系数相等的球形颗粒的直径。 D_h 值可根据分散待测定试剂的介质而改变。因此，除非另外说明，否则本文所述的 D_h 值使用 DLS

测定,其中将试剂分散在 150mM NaCl 水溶液中

[0023] 无机纳米颗粒核可为提供磁共振信号且能化学改性以改变纳米结构的尺寸和电荷的任何材料。这种结构可包括顺磁性材料、超顺磁性材料,等等。超顺磁性无机纳米颗粒核可包括 (1) 氧化铁 (例如赤铁矿、铁素体和磁铁矿); (2) 具有通式 MFe_2O_4 的混合尖晶石铁素体,其中 M 为金属,包括但不限于锰、钴、铜、镍和镁; (3) 及其组合。在一些实施方案中,所述无机纳米颗粒核包含超顺磁性氧化铁 (SPIO) 试剂。纳米结构可包括具有通式 $[Fe_2^+O_3]_x[Fe_2^+O_3(M^{2+}O)]_{1-x}$ 的超顺磁性氧化铁晶体结构,其中 $1 \geq x \geq 0$ 。 M^{2+} 可为二价金属离子,例如铁、锰、镍、钴、镁、铜或其组合。当金属离子 (M^{2+}) 为亚铁离子 (Fe^{2+}) 且 $x = 0$ 时,所述纳米结构为磁铁矿 (Fe_3O_4),而当 $x = 1$ 时,所述纳米结构为磁赤铁矿 (Fe_2O_3 , γ - Fe_2O_3)。

[0024] 总的来说,当未成对的自旋体的含晶体的区域足够大使得可看做在热动力学上独立时,发生超顺磁性,单个畴颗粒称为磁畴。这些磁畴显示比单个未成对电子的总和大的净磁偶极子。在不存在施加的磁场时,所有的磁畴无规取向,没有净磁化。施加外部磁场引起所有磁畴的偶极矩再取向,产生净磁矩。在一些实施方案中,纳米结构显示尖晶石晶体结构,这点通过电子透射显微镜 (TEM) 分析显示。

[0025] 所述无机纳米颗粒核可大致为球形,在一个实施方案中,直径为约 1nm 至约 100nm,在另一实施方案中,直径为约 1nm 至约 10nm。本领域技术人员认识到,无机纳米颗粒核通常为偏离理想球形几何形状的不规则形状。

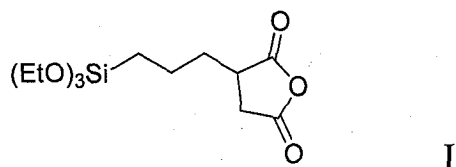
[0026] 根据各种实施方案,与无机纳米颗粒核键合的配体至少包括带有电荷的第一配体和不带电荷但通常为亲水性的第二配体。在一些实施方案中,这种亲水性配体应赋予整体结构生物相容性。可赋予生物相容性的化学结构的实例包括但不限于 PEG 衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、聚 L- 赖氨酸,等等。生物相容性包括溶解度 (通常是在水中的溶解度) 以及无毒性。

[0027] 亲水性第二配体应具有比带电荷的第一配体长的链长,使得改变带电荷的配体的量实质上不改变纳米结构的整体尺寸,本文中用流体动力学直径表示。期望能改变整体纳米结构的电荷而不会明显改变其尺寸,以便有效研究这些成像剂的体内分解。

[0028] 第一配体可通过多种官能团与所述无机纳米颗粒核键合,所述官能团包括例如羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和硅烷。与无机纳米颗粒核连接的硅烷键只是一个示例性实施方案。本领域普通技术人员将容易地认识到接合给定无机纳米颗粒核的官能团的其它共价键合主题。例如,当无机纳米颗粒核上含有侧基 OH 基时,亚磺酸酯、亚硫酸酯、次磷酸酯、亚磷酸酯、磷酸酯、硫代硫酸酯、甚至醚键都是可能的。与无机纳米颗粒核和配体的官能端连接的官能团,即,带电荷的基团或亲水性基团可通过连接两部分的中间 (interceding) 基团来连接。该中间基团的结构可显著变化,虽然本领域技术人员将理解这种连接基的最小尺寸的益处,使得不会不利地影响纳米结构的整体特性。

[0029] 根据一些实施方案,所述第一配体可带负电荷。例如,衍生自式 I 化合物的第一配体可用于产生具有带负电荷的配体的示例性纳米结构。

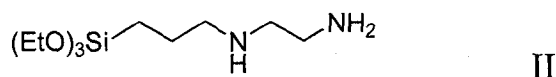
[0030]



[0031] 连接硅烷 I,接着水解酸酐部分,提供了带负电荷的第一配体的二羧酸酯结构。通过引入带有 PEG 部分的第二配体来完成纳米结构。配体的连接顺序是不重要的。例如,第一配体和第二配体可以任何顺序或甚至相伴地引入以与无机纳米颗粒核连接。

[0032] 第一配体还可带正电荷。例如,衍生自式 II 化合物的第一配体可用于产生具有带正电荷的配体的示例性纳米结构。

[0033]



[0034] 连接硅烷 II 并随后将氨基官能团质子化,提供了带正电荷的第一配体。引入带有 PEG 部分的第二配体以完成纳米结构。同样,配体的连接顺序是不重要的。例如,第一配体和第二配体可以任何顺序或甚至相伴地引入以与无机纳米颗粒核连接。

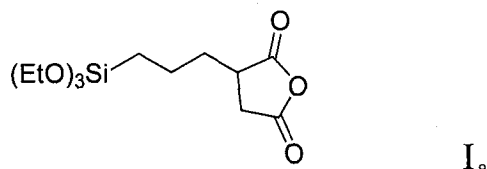
[0035] 在一些实施方案中,第二配体包括 PEG 聚合物。所述 PEG 聚合物的分子量通常在约 500 至约 5000 道尔顿之间。可证明用作第二配体的一部分的其它均聚物和共聚物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚 L- 赖氨酸等。

[0036] 通过改变第一配体的量和电荷类型,人们可在纳米结构上引入约 -50mV 至约 +50mV 的非零表面电荷。在一些实施方案中,所述表面电荷具有约 -25 至约 +25mV 的非零表面电荷。在其它实施方案中,所述表面电荷在约 -5mV 至约 -15mV 之间,又一实施方案中,所述表面电荷为 +5mV 至约 +15mV。本领域技术人员将认识到,可根据多种因素(例如靶向组织类型、血液半衰期、细胞吸收速率以及清除路径)来改变表面电荷的值。

[0037] 本发明公开提供了一种制备上述纳米结构的方法。所述方法通常涉及通过羧酸酯、磺酸酯、磷酸酯和三烷氧基硅烷连接基使无机纳米颗粒核与带有电荷的第一配体反应,随后通过类似的连接基(不必是相同的连接基)使所述纳米颗粒核与亲水性的第二配体反应。配体的引入顺序可能无关紧要,它们甚至可以标称同时引入。第一配体加上第二配体与无机纳米颗粒核的摩尔比可在约 1 : 1 至约 20 : 1 之间。摩尔比取决于靶向表面电位和最终纳米结构的应用。通常,所述无机纳米颗粒核为超顺磁性氧化铁。

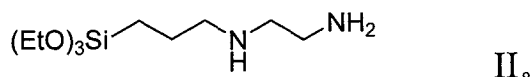
[0038] 当期望表面电荷为负电荷时,引入的第一配体可衍生自式 I 的结构:

[0039]



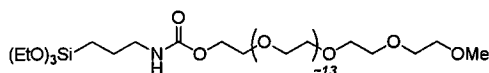
[0040] 当期望纳米结构的表面电荷为正电荷时,引入的第一配体可衍生自式 II 的结构:

[0041]



[0042] 可通过式 III 的结构引入带有亲水性基团的第二配体,例如:

[0043]



III.

[0044] 最后,本发明公开还提供了一种使哺乳动物的炎性病症成像的方法,所述方法包括将上文所述纳米结构体内或先体外后体内引入哺乳动物(所述哺乳动物可例如为人受治疗者)的炎症细胞。所述方法包括:让炎症细胞迁移至发炎的组织,并且使用磁共振使所述发炎的组织成像。结合造影方法,人们可综合处理炎性病症。

[0045] 本文所述纳米结构可分散在生理学上可接受的载体中,使得潜在的毒性最小。因此,可将所述纳米结构分散在 pH 为约 6 至约 8 的生物相容的溶液中。在一些实施方案中,可将所述纳米结构分散在 pH 为约 7 至约 7.4 的生物相容的溶液中。在其他实施方案,可将所述纳米结构分散在 pH 为约 7.4 的生物相容的溶液中。

[0046] 所述纳米结构可与常用于药物行业的添加剂结合使用,以将该化合物悬浮或溶解在含水介质中,随后可使用本领域已知的技术使该悬浮液或溶液灭菌。可将所述纳米结构或其药学上可接受的盐以适用于所选给药路径的形式给予受治疗者(包括人受治疗者)。因此,可局部(即,通过给予组织或粘膜)、静脉内、肌内、皮内和/或皮下引入所述纳米结构。适用于注射的形式包括用于制备无菌可注射溶液、分散体、脂质体或乳液制剂的无菌水溶液或分散体和无菌粉末。在所有情况下,该形式应为无菌的且具有足够的流动性以能够通过注射器给予。适用于吸入使用的形式包括分散在无菌气溶胶中的纳米结构。适用于局部给予的形式包括膏霜、洗剂、软膏等等。

[0047] 在一些实施方案中,将所述纳米结构浓缩以方便地将优选量的纳米结构递送给受治疗者,并以所需的形式包装在容器中。因此,在一些实施方案中,将分散在生理学上可接受的溶液中的纳米结构分配在容器中,以方便地利于给予浓度为约 0.1mg 试剂的 Fe 含量/kg 受治疗者的体重(即,0.1mg Fe/kg 体重)至约 50mg Fe/kg 体重的纳米结构。在其他实施方案,纳米结构的包装方式使得可方便地利于给予浓度为约 0.5mg Fe/kg 体重至约 2.5mg Fe/kg 体重的纳米结构。

[0048] 在一些实施方案中,可采用多种方式(包括局部、血管内、肌内或经间质)将所公开的纳米结构直接给予受治疗者。在一些实施方案中,将约 0.1mg Fe/kg 至约 50mg Fe/kg 的纳米结构给予受治疗者。在其他实施方案,将约 0.5mg Fe/kg 至约 2.5mg Fe/kg 的试剂给予受治疗者。类似的,可采用多种方式(包括局部、血管内、肌内或经间质)将含有所公开的纳米结构的炎症应答细胞给予受治疗者。

[0049] 在一些实施方案中,在给予所述纳米结构或含有所述纳米结构的炎症应答细胞小于 3 小时或近 3 小时之后使靶向组织成像。在供选的实施方案中,在给予受治疗者所述纳米结构或含有所述纳米结构的炎症应答细胞小于 24 小时或近 24 小时之后使靶向组织成像。在其他实施方案,在给予受治疗者所述纳米结构或含有所述纳米结构的炎症应答细胞小于 5 天或近 5 天之后使靶向组织成像。

[0050] 在另一系列实施方案中,本发明提供了使用所述纳米结构使与炎症应答细胞浸润和累积相关的病症成像的方法。可将纳米结构先体外后体内引入炎症应答细胞,随后引入受治疗者。因此,可将炎症应答细胞从受治疗者取出,将纳米结构引入炎症应答细胞,并在成像前将含有所述纳米结构的炎症应答细胞给予受治疗者。例如,将纳米结构引入炎症应

答细胞的步骤可任选包括使用磁珠、密度试剂和 / 或离心作用分离炎症应答细胞的步骤。在某些实施方案中,炎症应答细胞包括在血液中循环的单核细胞、在组织中的巨噬细胞、树突细胞 (DC)、多核单核细胞 (PNM)、嗜酸性粒细胞、嗜中性白细胞和 T 细胞。

[0051] 处理与炎症应答细胞浸润和累积相关的病症的方法可包括在治疗受治疗者以减少炎症之前、之后、或之前和之后使靶向组织成像。因此，所公开的处理与炎症应答细胞浸润和累积相关的病症的方法可包括 (a) 使靶向组织成像以获得关于炎性病症的基线或诊断信息，(b) 治疗受治疗者，并且 (c) 使受治疗者一次或多次成像以获得关于炎性病症的进一步信息。医学专业人士可选择在治疗之前和之后均不使受治疗者成像，依靠其它技术来初始表征发炎的组织或随后评价发炎的组织。因此，在一个供选的实施案中，处理与炎症应答细胞浸润和累积相关的病症的方法包括，治疗通过非磁共振技术确定的炎性病症和在治疗之后使靶向组织成像。类似地，在另一个供选的实施案中，所公开的处理与炎症应答细胞浸润和累积相关的病症的方法可包括使受治疗者或靶向组织成像以获得关于炎性病症的信息，接着治疗炎性病症，无需随后使靶向组织再成像。

[0052] 当疾病处理涉及确定治疗效力时,所述方法包括在给予治疗之前使感兴趣的组织成像以获得治疗前评价,接着给予治疗,并在治疗以后使感兴趣的组织一次或多次成像以获得对感兴趣组织的治疗后评价。可将治疗前评价和治疗后评价相比较,以确定是否减少了炎症或要不然改善与炎症应答细胞浸润和累积相关的病症的症状。确定治疗效力的方法可进一步包括基于治疗前评价和治疗后评价的比较来决定是否停止某一特定治疗以及决定是否增加治疗的频率、强度和 / 或剂量。

[0053] 当疾病处理包括定位到发炎的组织而不是整体或全身给予治疗（例如，外科手术或辐射介入）的治疗时，疾病处理方法可包括确定发炎的组织空间定位以限定待治疗（例如，切除或辐照）的特定区域。

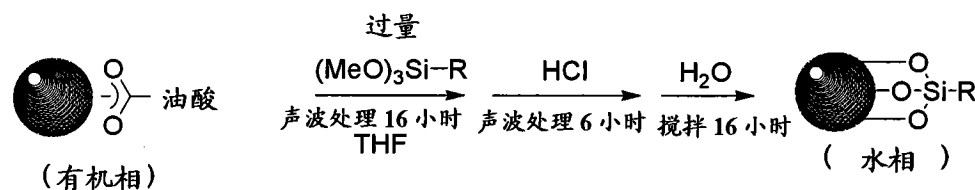
[0054] 上文所述的方法可用于治疗,以在使所述炎性病症成像之前、之后、或之前和之后减轻炎症。成像结果可用于处理炎性病症。特别感兴趣的炎性病症为与巨噬细胞累积相关的那些,包括但不限于自身免疫病症、血管病症、神经学病症及其组合。

[0055] 实验实施例

[0056] 提供以下实施例来更充分地说明上文公开的一些实施方案。本领域技术人员应理解的是,在随后的各实施例中所公开的技术代表构成其实践的示例性模式的技术。但是,根据本发明公开,本领域技术人员应理解,在不偏离本发明的精神和范围的情况下在所公开的具体实施方案中可进行许多变化,仍能得到同样的或类似的结果。

[0057] 制备

[0058]



[0059] 5nm SPIO 纳米颗粒的合成

[0060] 25ml 3 颈 Schlenk 烧瓶配备有冷凝器、堆叠在顶部的 130mmVigreux 柱和热电偶。冷凝器配备有氮气入口,并且氮气流动通过该体系。Schlenk 烧瓶和 Vigreux 柱用玻璃棉绝

热。将三甲基胺-N-氧化物 (Aldrich, 0.570g, 7.6mmol) 和油酸 (Aldrich :99+%, 0.565g, 2.0mmol) 在 10ml 二辛基醚 (Aldrich :99%) 中分散。以约 20℃ / 分钟的速率将分散体加热至 80℃。一旦混合物已达到约 80℃, 通过 Schlenk 接头将 265 μ l Fe(CO)₅ (Aldrich : 99.999%, 2.0mmol) 快速注入搅动的溶液。溶液即刻变为黑色, 急剧产生白色“云状物”。将溶液快速加热至约 120-140℃。在 6-8 分钟内, 将反应罐冷却至 100℃, 在该温度下保持并搅拌 75 分钟。于约 100℃下搅拌 75 分钟后, 以约 20℃ / 分钟的速率将温度升至约 280℃。将溶液搅拌 75 分钟后, 将加热套和玻璃棉移除, 使得反应返回到室温。

[0061] PEG-750 (单甲基醚) 三甲氧基硅烷氨基甲酸酯的合成

[0062] 向含有溶解于 CH₂Cl₂ (100ml) 中的 PEG-750 (单甲基醚) (50.49g, 66.0mmol) 的溶液中加入 3-异氰酸基丙基三甲氧基硅烷 (12.54g, 61.1mmol), 接着加入二月桂酸二丁基锡 (3.86g, 6.11mmol)。将所得到的溶液于室温下搅拌 16 小时, 真空除去溶剂。将所得到的残余物再悬浮于 MeOH (100ml) 中, 并用己烷 (4×100ml) 洗涤。将溶剂从 MeOH 层真空除去, 剩下 59.3g (100%) 灰白色蜡状固体状的产物。¹H NMR (CDCl₃) δ 3.58-3.53 (m, 68H), 3.47 (s, 9H), 3.37 (s, 3H), 3.16 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 0.62 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 156.4, 72.5, 71.7, 70.3, 69.4, 63.5, 61.3, 58.7, 50.0, 49.6, 43.1, 22.9, 6.0 ppm; IR (纯的, 盐圆片) 2871, 1719, 1533, 1456, 1348, 1273, 1249, 1108, 951, 821, 733, 701 cm⁻¹。

[0063] PEG-1900 (单甲基醚) 三甲氧基硅烷氨基甲酸酯的合成

[0064] 向含有溶解于 CH₂Cl₂ (50ml) 中的 PEG-1900 (单甲基醚) (20.0g, 10.5mmol) 的溶液中加入 3-异氰酸基丙基三甲氧基硅烷 (1.83ml, 9.55mmol), 接着加入二月桂酸二丁基锡 (0.603g, 0.955mmol), 将所得到的溶液于室温下搅拌 14 天。真空除去溶剂, 剩下灰白色固体, 将其溶解于 MeOH (150ml) 中, 并用己烷 (4×100ml) 洗涤。随后真空除去 MeOH, 得到 20.10g (100%) 灰白色固体状的产物。¹H NMR (CDCl₃) δ 4.21 (m, 2H), 3.54-3.82 (m, 166H), 3.49 (s, 9H), 3.31 (s, 3H), 3.16 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 0.64 (m, 2H); IR (纯的, 盐圆片) 2875, 1719, 1452, 1267, 1102, 737 cm⁻¹。

[0065] PEG-SA (PEG-SA ; 5 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0066] 将 SPIO/十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水 THF 稀释至 1mg Fe/ml, 并声波处理过夜。将 PEG-750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (10.69g, 10.74mmol) 溶解于 100ml 上述 SPIO 溶液 (100mg Fe, 1.79mmol) 中。将 3-(三乙氧基甲硅烷基) 丙基琥珀酸酐 (SA) (0.601ml, 2.11mmol) 加入到该暗色澄清的溶液中, 并声波处理过夜。搅拌下滴加 1M HCl (0.24ml), 将混合物再声波处理 6 小时。加入水 (2.0ml), 将反应物于室温下搅拌过夜。随后将 Tris/NaCl 缓冲液 (10mM Tris, 150mM NaCl, pH 为约 7) 加入到混合物 (100ml) 中。观察到所有颜色转移至水层, 水层用 THF (4×100ml) 洗涤。按需加入己烷 (约 5ml), 以促进相分离。温和加热下将剩余的有机挥发物真空除去。通过用 150mM 盐水 (4×7ml/管)、1 : 1 IPA/150mM 盐水 (5×7ml/管) 和 150mM NaCl (5×7ml/管) 洗涤, 使用 6 个 100kDa 分子量截留离心过滤器以 4000Xg 将所得到的暗色水溶液纯化。最后一次洗涤之后, 将暗褐色水溶液用 150mM NaCl 稀释至浓度为约 5mg Fe/ml。DLS (150mM NaCl) D_h = 19.0nm; ζ 电位 (10mM NaCl) ζ = -10.0mV。

[0067] PEG-SA (PEG-SA ; 2 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0068] 将 SPIO/十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水 THF 稀释至 1mg Fe/ml, 并声波处理过夜。

将 PEG-750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (8.52g, 8.78mmol) 溶解于 100ml 上述 SPIO 溶液 (100mg Fe, 1.79mmol) 中。将 3-(三乙氧基甲硅烷基) 丙基琥珀酸酐 (SA) (1.31ml, 4.33mmol) 加入到该暗色澄清的溶液中, 并声波处理过夜。搅拌下滴加 1M HCl (0.24ml), 将混合物再声波处理 6 小时。加入水 (2.0ml), 将反应物于室温下搅拌过夜。随后将磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) (154mM NaCl, 10mM 磷酸钠, pH = 7.4) 加入到混合物 (100ml) 中。观察到所有颜色转移至水层, 水层用 THF (4×100ml) 洗涤。按需加入己烷 (约 5ml), 以促进相分离。温和加热下将剩余的有机挥发物真空除去。通过用水 (1×7ml/管) 洗涤, 使用 6 个 100kDa 分子量截留离心过滤器以 4000Xg 将所得到的暗色水溶液纯化。使用 NH₄OH 将所得到的溶液调节至 pH 为 10, 并于室温下搅拌 3 天。通过用 1 : 1IPA/PBS (5×7ml/管) 和 PBS (5×7ml/管) 洗涤, 使用 6 个 100kDa 分子量截留离心过滤器以 4000Xg 将所得到的暗褐色水溶液纯化。最后一次洗涤之后, 用 PBS 将暗褐色水溶液稀释至浓度为约 5mg Fe/ml。DLS (PBS) $D_H = 20.1\text{nm}$; ζ 电位 (10mM NaCl) $\zeta = -10.6\text{mV}$ 。

[0069] PEG-SA (PEG-SA ; 1 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0070] 将 SPIO/ 十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水 THF 稀释至 1mg Fe/ml, 并声波处理过夜。将 PEG-750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (6.36g, 6.56mmol) 溶解于 100ml 上述 SPIO 溶液 (100mg Fe, 1.79mmol) 中。将 3-(三乙氧基甲硅烷基) 丙基琥珀酸酐 (SA) (2.00ml, 6.56mmol) 加入到该暗色澄清的溶液中, 并声波处理过夜。搅拌下滴加 1M HCl (0.24ml), 将混合物再声波处理 6 小时。加入水 (2.0ml), 将反应物于室温下搅拌过夜。随后将磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) (154mM NaCl, 10mM 磷酸钠, pH = 7.4) 加入到混合物 (100ml) 中。观察到所有颜色转移至水层, 水层用 THF (4×100ml) 洗涤。按需加入己烷 (约 5ml), 以促进相分离。温和加热下将剩余的有机挥发物真空除去。通过用水 (1×7ml/管) 洗涤, 使用 6 个 100kDa 分子量截留离心过滤器以 4000Xg 将所得到的暗色水溶液纯化。使用 NH₄OH 将所得到的溶液调节至 pH 为 10, 并于室温下搅拌 3 天。通过用 1 : 1IPA/PBS (5×7ml/管) 和 PBS (5×7ml/管) 洗涤, 使用 100kDa 分子量截留离心过滤器以 4000Xg 将所得到的暗褐色水溶液纯化。最后一次洗涤之后, 用 PBS 将暗褐色水溶液稀释至浓度为约 5mg Fe/ml。DLS (PBS) $D_H = 19.4\text{nm}$; ζ 电位 (10mM NaCl) $\zeta = -30.5\text{mV}$ 。

[0071] PEG-AEAPTES (PEG-AEAPTES ; 5 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0072] 将 SPIO/ 十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水四氢呋喃稀释至浓度为 1mg Fe/ml, 并将该溶液在 VWR 150T 型超声波器中声波处理过夜。将 PEG750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (15.9g, 16.1mmol) 溶解于 SPIO 溶液 (150ml, 2.68mmol) 中, 加入 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (0.86ml, 3.22mmol), 将该暗色混合物声波处理 17 小时。加入 1.2M HCl (0.3ml), 将混合物再声波处理 9 小时。加入水 (3ml, 2% (v/v)), 将反应混合物于室温下搅拌 15 小时, 随后用 10mM Tris/150mM NaCl 水溶液 (150ml) 淬灭。将各层分离, 暗色水层用 5% 己烷 / 四氢呋喃 (6×100ml) 萃取。将剩余的水性混合物于 30℃、减压下进一步浓缩 1 小时。通过用无菌 150mM NaCl (4 次)、1 : 1 异丙醇 : 150mM NaCl (4 次) 和无菌 150mM NaCl (5 次) 洗涤, 使用 100kDa 分子量截留过滤器以 4000Xg 将该 SPIO 溶液纯化。剩余的浓缩溶液用无菌 150mM NaCl (pH 为 3) 稀释, 使用 Per1 试剂 (K₄Fe(CN)₆ 水溶液 ; 50mg/ml) 通过 UV 吸收确定铁浓度。最终的浓度目标为 10mg Fe/ml : D_H (150mM NaCl, pH 为 3) = 18.2nm; ζ 电位 (10mM NaCl, pH 为 7) $\zeta = 10.6\text{mV}$ 。

[0073] PEG-AEAPTES (PEG-AEAPTES ;2.5 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0074] 将 SPIO/ 十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水四氢呋喃稀释至浓度为 1mg Fe/ml, 并在 VWR 150T 型超声波器中将该溶液声波处理 13 小时。将 PEG750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (10.6g, 10.7mmol) 溶解于 SPIO 溶液 (100ml, 1.79mmol) 中, 加入 N-(2- 氨基乙基)-3- 氨基丙基三乙氧基硅烷 (1.14ml, 4.30mmol), 将该暗色混合物声波处理 16 小时。加入 1.2M HCl (0.2ml), 将混合物再声波处理 24 小时。加入水 (2ml, 2% (v/v)), 将反应混合物于室温下搅拌 24 小时, 随后用 10mM Tris/150mM NaCl 水溶液 (100ml) 淬灭。将各层分离, 暗色水层用 5% 己烷 / 四氢呋喃 (5×100ml) 萃取。将剩余的水性混合物于 40℃、减压下进一步浓缩 15 分钟。通过用无菌 150mM NaCl (4 次)、1 : 1 异丙醇 : 150mM NaCl (4 次) 和无菌 150mM NaCl (5 次) 洗涤, 使用 100kDa 分子量截留过滤器以 4000Xg 将该 SPIO 溶液纯化。剩余的浓缩溶液用无菌 150mM NaCl (pH 为 3) 稀释, 使用 Perl 试剂 ($K_4Fe(CN)_6$ 水溶液 ; 50mg/ml) 通过 UV 吸收确定铁浓度。最终的浓度目标为 10mg Fe/ml : D_H (150mM NaCl, pH 为 3) = 21.9nm ; ζ 电位 (10mM NaCl, pH 为 7) ζ = 19.74mV。

[0075] PEG-AEAPTES (PEG-AEAPTES ;10 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0076] 将 SPIO/ 十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水四氢呋喃稀释至浓度为 1mg Fe/ml, 并在 VWR 150T 型超声波器中将该溶液声波处理 15 小时。将 PEG750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (11.2g, 11.4mmol) 溶解于 SPIO 溶液 (106ml, 1.90mmol) 中, 加入 N-(2- 氨基乙基)-3- 氨基丙基三乙氧基硅烷 (0.3ml, 1.14mmol), 将该暗色混合物声波处理 17 小时。加入 1.2M HCl (0.212ml), 将混合物再声波处理 8 小时。加入水 (2.1ml, 2% (v/v)), 将反应混合物于室温下搅拌 17 小时, 随后用 10mM Tris/150mM NaCl 水溶液 (100ml) 淬灭。将各层分离, 暗色水层用 5% 己烷 / 四氢呋喃 (5×100ml) 萃取。将剩余的水性混合物于 40℃、减压下进一步浓缩 15 分钟。通过用无菌 150mM NaCl (4 次)、1 : 1 异丙醇 : 150mM NaCl (4 次) 和无菌 150mM NaCl (5 次) 洗涤, 使用 100kDa 分子量截留过滤器以 4000Xg 将该 SPIO 溶液纯化。剩余的浓缩溶液用无菌 150mM NaCl (pH 为 3) 稀释, 使用 Perl 试剂 ($K_4Fe(CN)_6$ 水溶液 ; 50mg/ml) 通过 UV 吸收确定铁浓度。最终的浓度目标为 10mg Fe/ml : D_H (150mM NaCl, pH 为 3) = 21.8nm ; ζ 电位 (10mM NaCl, pH 为 7) ζ = 3.39mV。

[0077] PEG- 四甲基铵 (PEG- 铵 ;5 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0078] 将 SPIO/ 十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水四氢呋喃稀释至浓度为 1mg Fe/ml, 并在 VWR 150T 型超声波器中将该溶液声波处理 13 小时。将 PEG750 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (7.42g, 7.52mmol) 溶解于 SPIO 溶液 (70ml, 1.25mmol) 中, 加入 N- 三甲氧基甲硅烷基丙基 -N, N, N- 三甲基氯化铵 (50% 甲醇溶液, 0.83ml, 1.50mmol), 将该暗色混合物声波处理 16 小时。加入 1.2M HCl (0.14ml), 将混合物再声波处理 24 小时。加入水 (1.4ml, 2% (v/v)), 将反应混合物于室温下搅拌 24 小时, 随后用 10mM Tris/150mM NaCl 水溶液 (72ml) 淬灭。将各层分离, 暗色水层用 5% 己烷 / 四氢呋喃 (4×100ml) 萃取。将剩余的水性混合物于 40℃、减压下进一步浓缩 15 分钟。通过用无菌 150mM NaCl (4 次)、1 : 1 异丙醇 : 150mM NaCl (4 次) 和无菌 150mM NaCl (5 次) 洗涤, 使用 100kDa 分子量截留过滤器以 4000Xg 将该 SPIO 溶液纯化。剩余的浓缩溶液用无菌 150mM NaCl (pH 为 3) 稀释, 使用 Perl 试剂 ($K_4Fe(CN)_6$ 水溶液 ; 50mg/ml) 通过 UV 吸收确定铁浓度。最终的浓度目标为 10mg Fe/ml : D_H (150mM NaCl, pH 为 3) = 29.6nm ; ζ 电位 (10mM NaCl, pH 为 7) ζ = 18.41mV。

[0079] PEG₁₉₀₀-AEAPTES (PEG₁₉₀₀-AEAPTES ;5 : 1) 涂布的 SPIO 的合成

[0080] 将 SPIO/ 十六烷 (11.2mg Fe/ml) 用无水 THF 稀释至 1mg Fe/ml, 并声波处理过夜。将 PEG-1900 单甲基醚三甲氧基硅烷氨基甲酸酯 (2.31g, 1.10mmol) 溶解于 10ml 上述 SPIO 溶液 (10mg Fe, 0.179mmol) 中。将 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (AEAPTES) (0.057ml, 0.214mmol) 加入到该暗色澄清的溶液中, 并声波处理过夜。搅拌下滴加 1M HCl (0.024ml), 将混合物再声波处理 6 小时。加入水 (0.200ml), 将反应物于室温下搅拌过夜。随后将 Tris/NaCl 缓冲液 (10mM Tris, 150mM NaCl, pH 为约 7) 加入到混合物 (10ml) 中。观察到所有颜色转移至水层, 水层用 THF (4×10ml) 洗涤。按需加入己烷 (约 5ml), 以促进相分离。温和加热下将剩余的有机挥发物真空除去。通过用 150mM 盐水 (4×7ml/管)、1 : 1IPA/150mM 盐水 (5×7ml/管) 和 150mM NaCl (5×7ml/管) 洗涤, 使用 100kDa 分子量截留离心过滤器以 4000Xg 将所得到的暗色水溶液纯化。最后一次洗涤之后, 将该暗褐色水溶液用 150mM NaCl (pH 为 3) 稀释至浓度为约 5mg Fe/ml。DLS (150mM NaCl, pH 为 3) $D_H = 27.8\text{nm}$; ζ 电位 (10mM NaCl) $\zeta = 7.9\text{mV}$ 。

[0081] 表征

[0082] 使用 150mM NaCl 作为溶剂, 通过动态光散射测定流体动力学直径。将经纯化的 SPIO 溶液用 150mM NaCl 稀释, 并在使用 Brookhaven ZetaPALS 进行 DLS 分析之前通过 100nm 过滤器。在用水稀释 SPIO 溶液 14X (最终的溶液 (10mM NaCl)) 并将该稀释后的 SPIO 溶液通过 100nm 过滤器之后, 使用 Brookhaven ZetaPALS 测定 ζ 电位。结果示于下表 1。

[0083] 表 1

[0084]

实施例	带电荷的配体 *	mol % 带电荷的配体	尺寸 (D_H)	表面电荷 (ζ 电位)
1	AEAPTES	50%	18.6nm	+33mV
2	AEAPTES	29%	17.5nm	+26mV
3	AEAPTES	17%	19.4nm	+11mV
4	SA	20%	22.2nm	-10mV
5	SA	33%	20.1nm	-11mV
6	SA	50%	19.4nm	-30mV

[0085]



[0086] 体内实验

[0087] 通过皮下注射 0.1ml 悬浮于无菌生理磷酸盐缓冲盐水的 1% 角叉菜胶, 在雌性瑞士 Webster 小鼠中诱导肉芽肿。注射部位位于背侧高于尾底 (base of tail) 约 1cm。随后在诱导肉芽肿后 2-7 天之间将 SPIO 造影剂通过尾静脉静脉内注入活动受限的小鼠中。SPIO 试剂在生理盐水中的浓度为 5mg Fe/ml, 并且在注射前进行灭菌, 并测试是否存在内毒素。试剂的剂量为 20mg Fe/kg 体重。

[0088] 在注射 SPIO 造影剂之前使小鼠成像, 在注射试剂约 24 小时后再次成像。使用定制的 3.2cm 螺线管发射 / 接收射频线圈在临床用 1.5T GE Signa MR 扫描仪上使小鼠成像。使用为啮齿类动物设计的商品麻醉剂, 通过鼻用锥体使用 2% 异氟烷 / 氧将小鼠麻醉。对于

每个 2 脉冲序列,收集 13 个轴位 (transaxial) 1mm 图像层面以获得充分覆盖肉芽肿。脉冲序列参数如下所示:

[0089] T1- 加权 :2D 自旋回波,TE 13,TR 320,矩阵 256×192 ,FOV5,相位 FOV 0.75,厚度 1.0, NEX 3, BW 22.73。

[0090] T2*- 加权 :2D 梯度回波,TE1 9.8,TE2 25,TR 650,翻转角 45,矩阵 256×192 ,FOV 5,相位 FOV 0.75,层面厚度 1.0, NEX 2, BW15.63。

[0091] 获得在注射前 (A&B) 和注射 PEG-SA (C&D) 和 PEG-AEPTES (E&F) 试剂之后 24 小时的 T2*- 加权的 (A,C&E) 和 T1- 加权的 MR 成像。在图像中示出肉芽肿位置。在肉芽肿内观察到显著的 T2*(暗) 和 T1(明) 对比,表明 SPIO 试剂能提供炎症损害的对比。

[0092] 应理解的是,上述实施方案的某些上述结构、功能和操作在实践本发明时不是必要的,且包括在说明书中只是为了一个或多个示例性实施方案的完整性。此外,应理解的是,在上述参考的专利和出版物中所述的特定结构、功能和操作可结合本发明进行实践,但不是实践本发明时所必要的。因此,应理解的是,在实际上不偏离所附权利要求所定义的本发明的精神和范围的情况下可以另外的方式实践本发明。

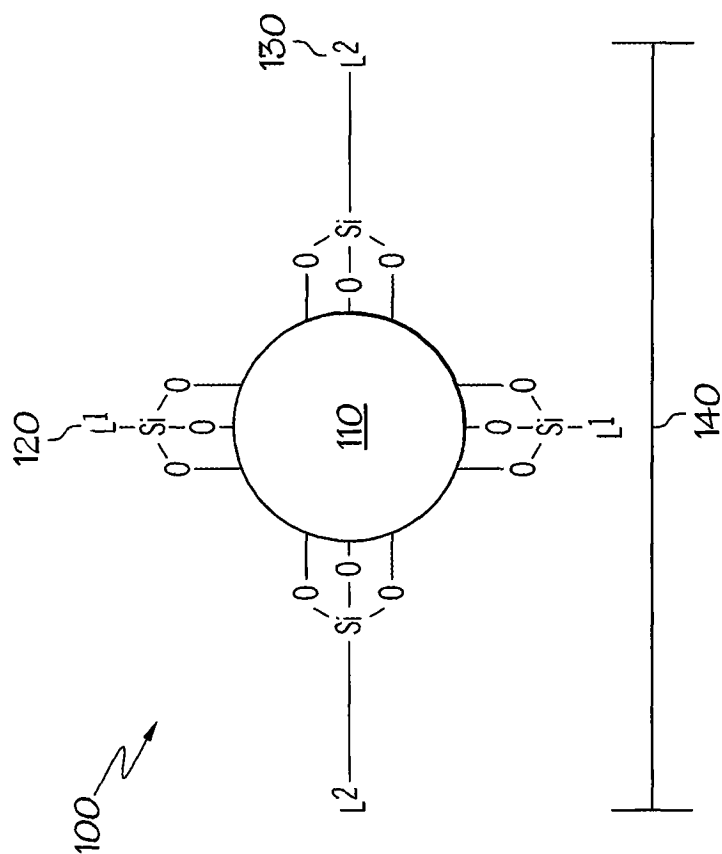


图 1

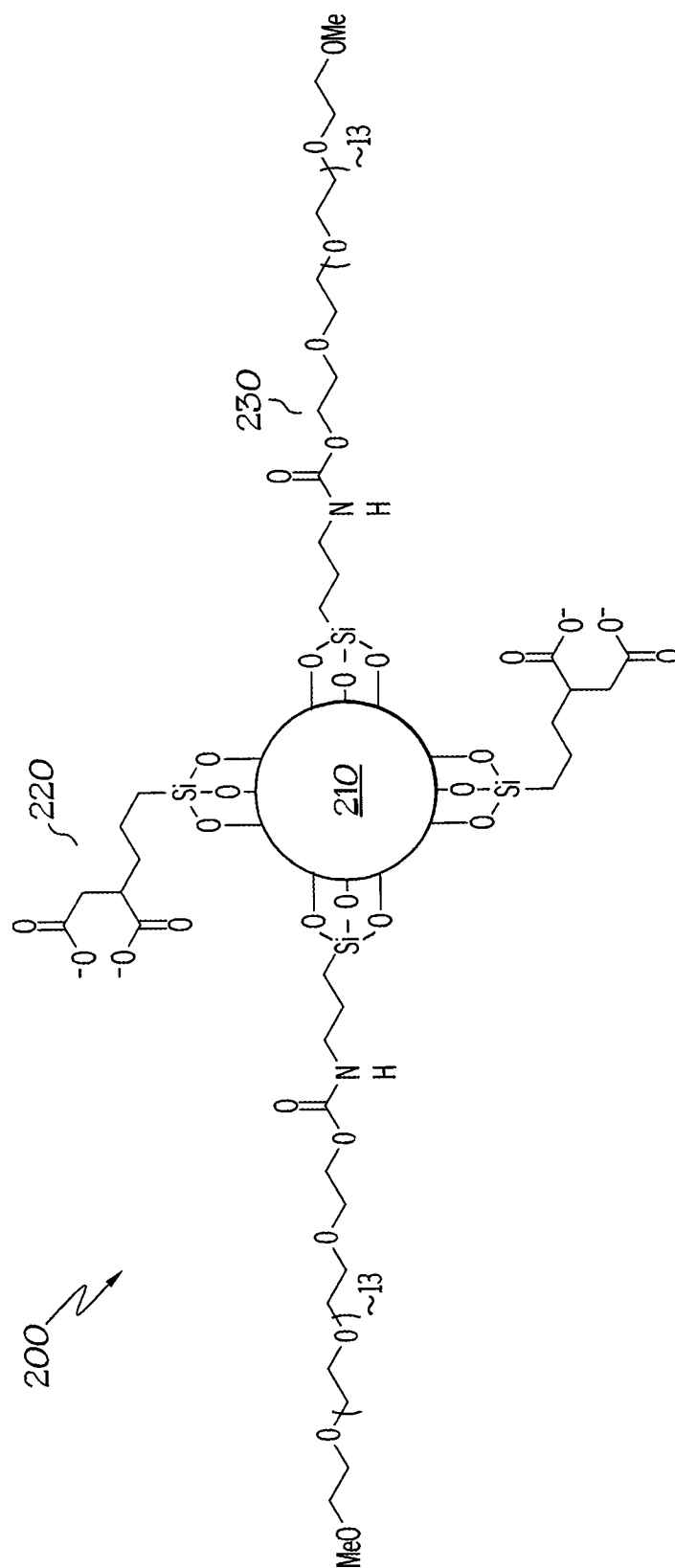


图 2

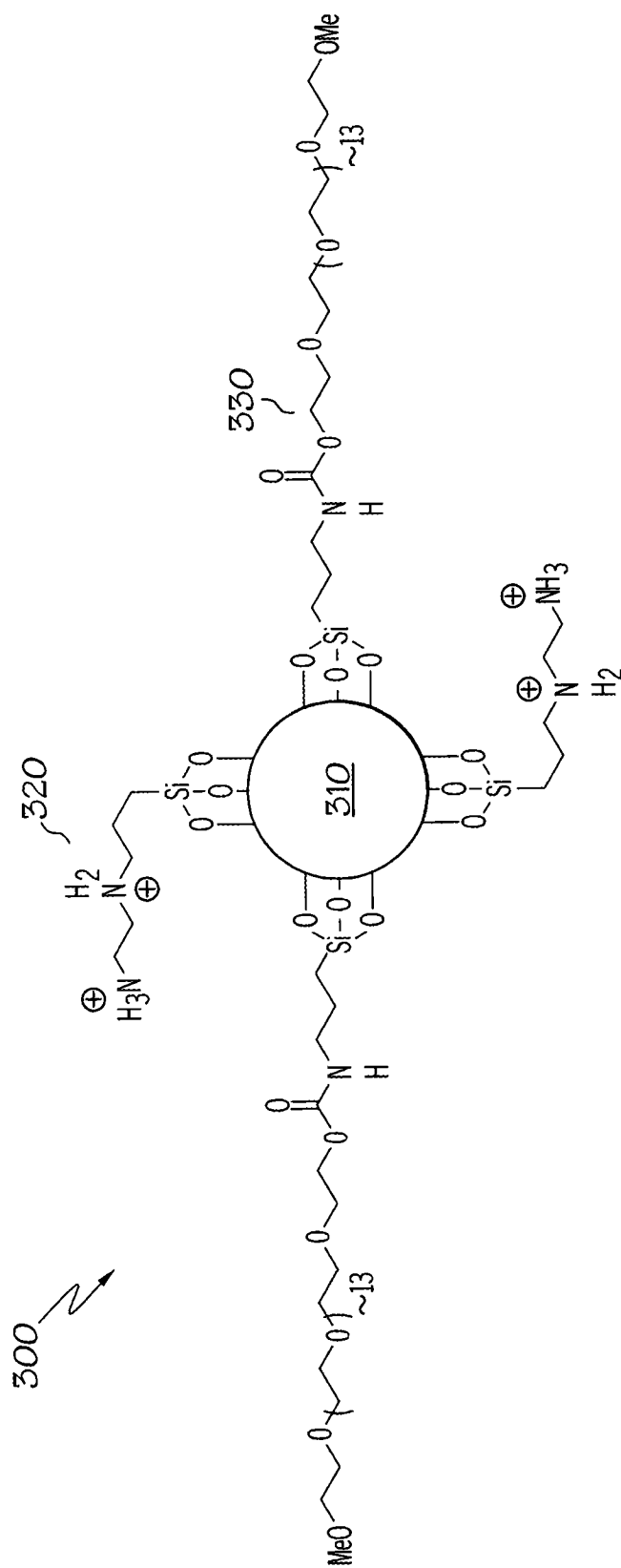


图 3



图 4A



图 4B



图 4C

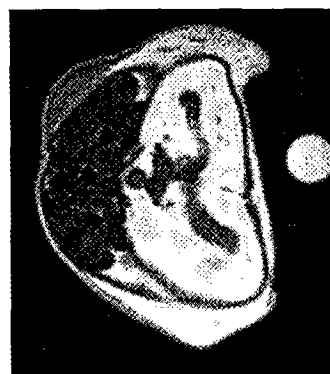


图 4D



图 4E

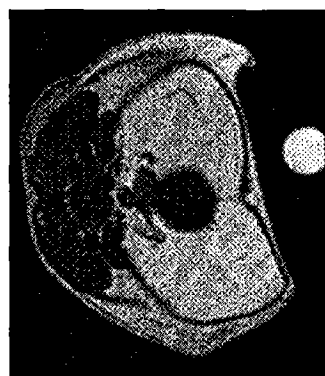


图 4F