



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201114437 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：098135414

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl.：

A61K49/08 (2006.01)

A61K49/14 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：王雲銘 WANG, YUN MING (TW)；陳亭蓉 CHEN, TING JUNG (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：8 共 37 頁

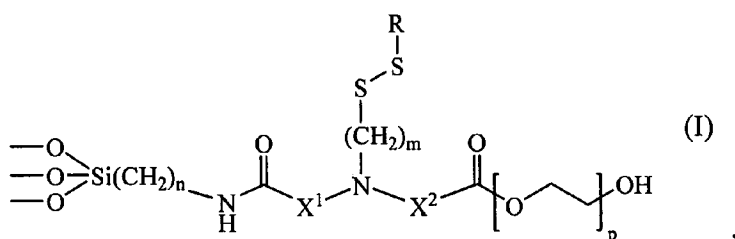
(54)名稱

用於磁振造影之磁性奈米粒子

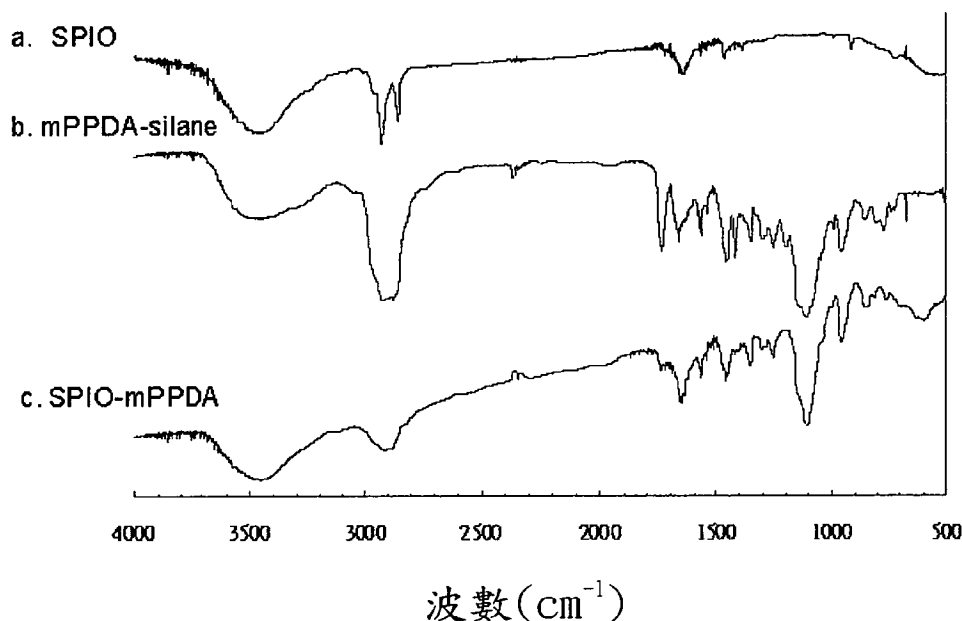
MAGNETIC NANOPARTICLES FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING

(57)摘要

本發明提供一種用於磁振造影之磁性奈米粒子，包含一個具有一表面且由超順磁性氧化鐵奈米粒子所構成之核，及多數個與核之表面共價偶合且由下式(I)所示之矽氧烷基團：



式(I)之各個取代基及 n、m 及 p 的意義如說明書及申請專利範圍所界定。本發明之磁性奈米粒子可用作為磁振造影對比劑。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 98135414

※ 申請日： 98. 10. 20

※IPC 分類：

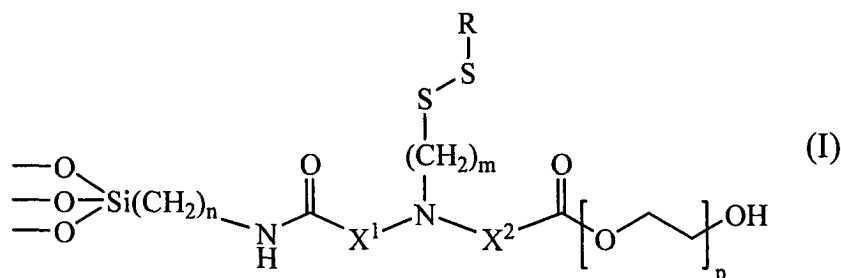
A61K 49/08 (2006.01)
A61K 49/14 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於磁振造影之磁性奈米粒子/MAGNETIC NANOPARTICLES FOR
MAGNETIC RESONANCE IMAGING

二、中文發明摘要：

本發明提供一種用於磁振造影之磁性奈米粒子，包含一個具有一表面且由超順磁性氧化鐵奈米粒子所構成之核，及多數個與核之表面共價偶合且由下式(I)所示之矽氧烷基團：

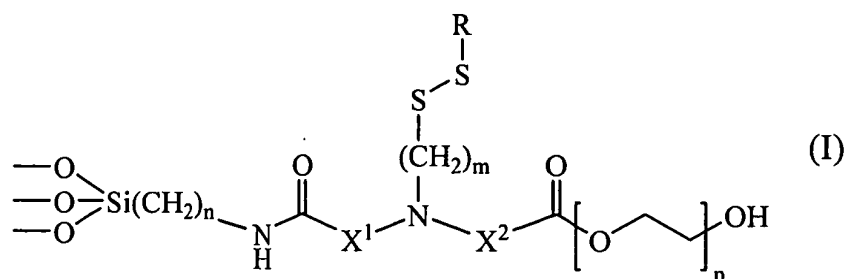


式(I)之各個取代基及 n 、 m 及 p 的意義如說明書及申請專利範圍所界定。本發明之磁性奈米粒子可用作為磁振造影對比劑。

三、英文發明摘要：

The present invention provides magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging comprising a core having a surface and consisting of superparamagnetic iron

oxide (SPIO) nanoparticles, and siloxanyl groups covalent-coupled with the surface of the core and represented by the Formula (I):



the definitions of the substituted groups, n, m and p are defined as set forth in the specification and claim. The magnetic nanoparticles of the present invention is useful as a magnetic resonance imaging contrast agent.

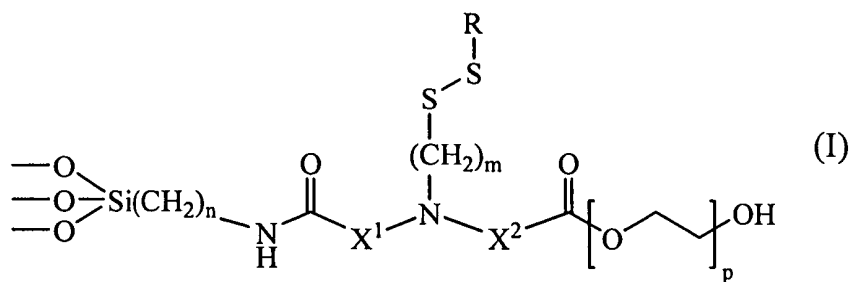
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 (1)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



[各個取代基及 n、m 及 p 的意義如說明書及申請專利範圍所界定]

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

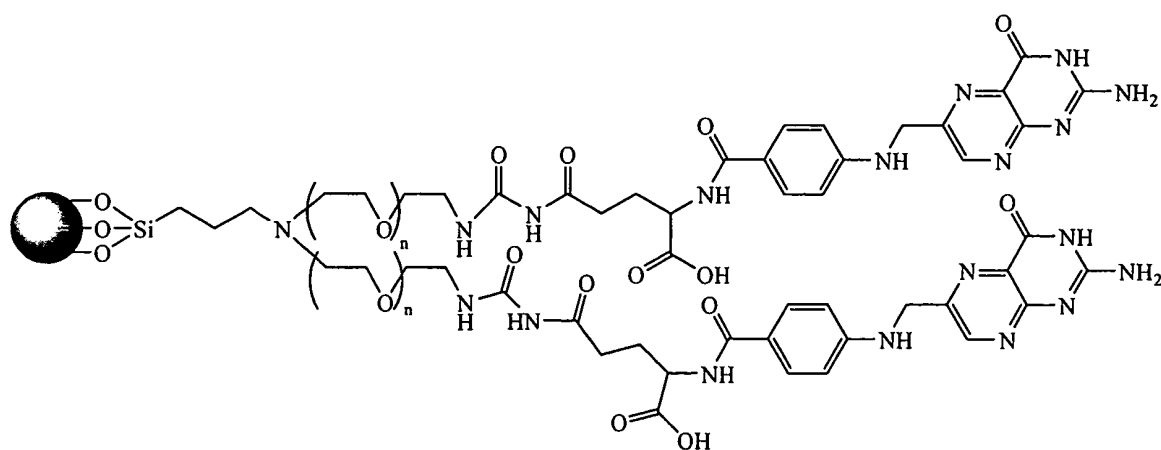
本發明是有關於一種磁性奈米粒子，特別是指一種以超順磁性氧化鐵為核之用於磁共振造影之磁性奈米粒子。

【先前技術】

T_2 對比劑是用來減少橫向弛緩時間 (spin-spin relaxation time, T_2)，其目的是減少組織訊號，以有效辨別組織之正常與否。目前常使用之 T_2 對比劑為超順磁氧化鐵奈米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles，以下簡稱為 SPIO)。

當異物(如細菌)侵入人體時，體內各處的巨噬細胞 (macrophages) 將吞噬及清除異物。當 SPIO 注射到人體後，由於 SPIO 具有較高的比表面積，容易產生聚集或吸附血漿蛋白，因而會迅速被巨噬細胞所吞噬，使得 SPIO 會自血液中快速排出，而無法到達欲偵測之組織細胞。為了解決上述問題，需就 SPIO 的結構進行設計及修飾，以增加 SPIO 在血液中的半生期，同時避免聚集及吸附情形產生，以順利到達組織細胞。

中華民國專利公開案第 200808815 號為本案發明人所擁有之專利，主要揭示一種由下式所示之磁共振造影對比劑，此對比劑主要是以葉酸受器 (receptor) 為標的，藉此用來偵測癌細胞之位置：

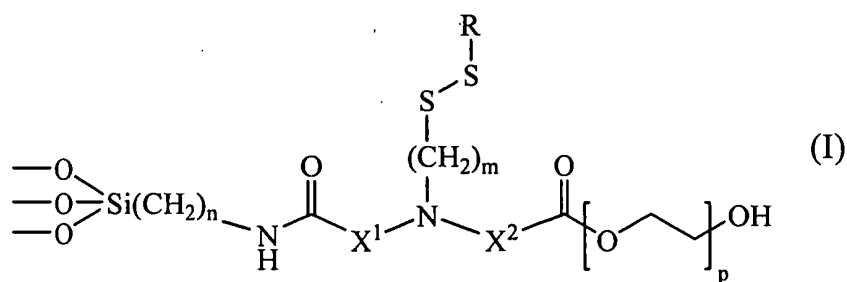


目前以 SPIO 為主之磁振造影對比劑的弛緩率較低，而需要施予較多劑量才可得到較佳之顯影效果；加上近年來，除了葉酸之外，更發現其他與癌細胞之間具有高度專一結合性(highly specific targeting)的生物相容性分子，因此，如何穩定結合此等生物相容性分子與 SPIO 以及提昇對比劑之弛緩率，仍為目前業界有待解決之問題。

【發明內容】

因此，本發明之目的，即在提供一種以 SPIO 為主且具有標的性及專一結合性之用於磁振造影之磁性奈米粒子。

於是，本發明之用於磁振造影之磁性奈米粒子包含一個具有一表面且由超順磁性氧化鐵奈米粒子所構成之核，以及多數個與該核之表面共價偶合且由下式(I)所示之矽氧烷基團：



式(I)之 X^1 及 X^2 分別表示伸甲基、伸乙基或伸丙基；

-S-R 之 R 表示經取代或未經取代之吡啶基，或-S-R 是衍生自具有生物相容性之分子的基團；

n 及 m 分別為介於 1~3 之間的整數；及

p 是介於 9~45 之間的整數。

本發明用於磁共振造影的磁性奈米粒子主要是藉由對矽氧烷基團進行特殊設計，使矽氧烷基團具備生物相容性及水溶性，可與氧化鐵奈米粒子產生穩定的共價偶合，並可再進一步連接多種具備高度專一結合性之生物相容性分子(例如胜肽序列)，因此，本發明之磁性奈米粒子具備高弛緩率、良好水溶性及高飽和磁化率，而可符合磁共振造影對比劑之要求。

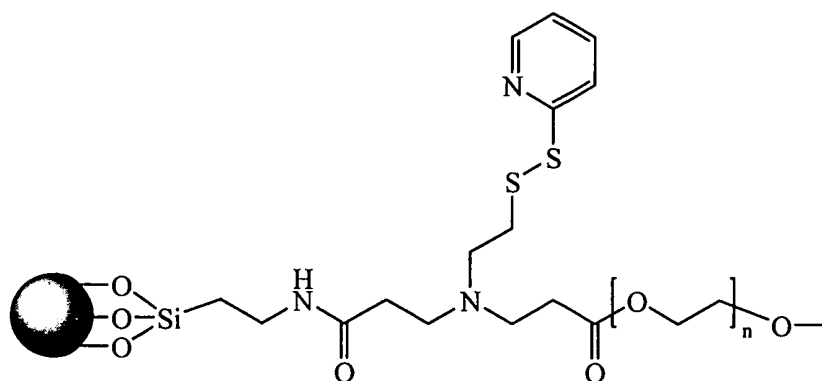
【實施方式】

於本發明之磁性奈米粒子的一態樣中，該式(I)之-S-R 之 R 表示經取代或未經取代之吡啶基，且較佳地，R 是選自於 2-吡啶基、4-吡啶基、5-甲基-2-吡啶基、3-甲基-2-吡啶基或 1-甲基-2-吡啶基。於本發明磁性奈米粒子之一具體例中，R 是 2-吡啶基。

於本發明之磁性奈米粒子的另一態樣中，該式(I)之-S-R 是衍生自目標化胜肽序列之基團。「目標化胜肽序列」可依據待偵測目標物進行設計及選擇，較佳地，該目標化胜肽序列是選自於介白素-11(interleukin 11，以下簡稱為「IL-11」)、鈴蟾素(bombesin，以下簡稱為「BN」)或環(半胱胺酸-離胺酸-甘胺酸-精胺酸-甘胺酸-天門冬胺酸

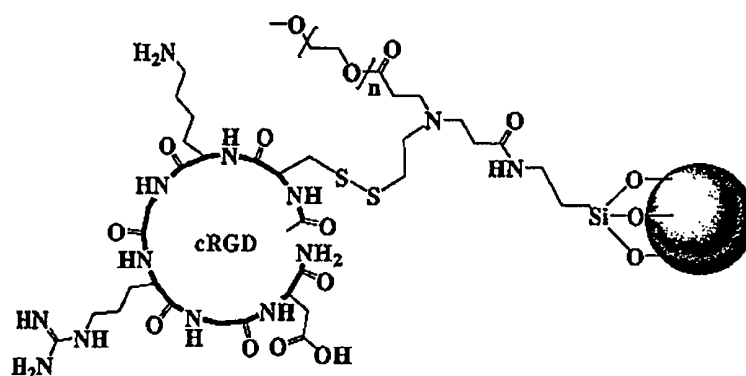
)[cyclo(Cys-Lys-Gly-Arg-Gly-Asp, 以下簡稱為「cRGD-Cys」)]。於本發明磁性奈米粒子之一具體例中，該目標化胜肽序列是 cRGD-Cys。

於本發明之一具體例中，式(I)之 X^1 及 X^2 分別表示伸乙基、R 為 2-吡啶基及 $n=m=2$ ，其結構如下：



(以下簡稱為 SPIO-mPPDA)

於本發明之另一具體例中，式(I)之 X^1 及 X^2 分別表示伸乙基、-S-R 是衍生自 cRGD-Cys 的基團及 $n=m=2$ ，其結構如下：



本發明用於磁振造影之磁性奈米粒子的製法可依據已知製法加以運用及變化。於本發明之一具體例中，磁性奈米粒子的製法是先分別合成 SPIO、經改質之矽氧烷、經改質之聚乙二醇及 2-(吡啶基二硫)-乙基胺[2-(pyridyldithio)-

ethylamine，以下簡稱為 PDA]，接著使經改質之矽氧烷、經改質之聚乙二醇及 PDA 進行反應而獲得一改質化合物，最後再使此改質化合物與 SPIO 進行反應，即製得 SPIO-mPPDA。於本發明之另一具體例中，將 SPIO-mPPDA 與 cRGD-Cys 進行反應，即製得 SPIO-mPEG-cRGD。

本發明磁性奈米粒子係用作為磁振造影對比劑，且可選擇地依據欲偵測物，進一步接上與欲偵測物可專一結合之生物相容性分子，使本發明之磁性奈米粒子的使用範圍更加寬廣。

本發明將就以下實施例來作進一步說明，但應瞭解的是，該實施例僅為例示說明之用，而不應被解釋為本發明實施之限制。

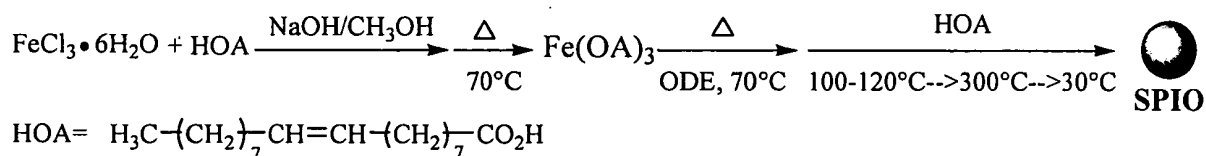
< 實施例 >

[實施例 1] SPIO-mPPDA 之製備

以下各步驟所製得之產物分別選用以下儀器進行結構分析：¹H-NMR(由 Varian unity plus 公司製造，型號為 400 proton/carbon FT NMR 系統)、傅立葉紅外線光譜儀(FT-IR，由 Perkin Elmer System 公司製造，型號為 2000 FT-IR)、穿透式電子顯微鏡(TEM，由 JEOL JEM 公司製造，型號為 2000EXII)、超導量子干涉磁量儀(superconducting quantum interference device，以下簡稱 SQUID，由 QUANTUM DESIGN 公司製造，型號為 MPMS5)、動態光散射儀(dynamic light scattering，以下簡稱 DLS，由 Malvern Instruments 公司製造，型號為 ZetaSizer 3000 HS_A)、紫外

線-可見光光譜儀(UV-VIS，由 Hitach 公司製造，型號為 U-3010 Spectrophotometer)。

1. 超順磁氧化鐵奈米粒子 (以下簡稱為 SPIO)的合成



將 5.4 克(20 mmol)之 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 與 17 mL(60 mmol)之油酸溶解於 100 mL 之甲醇中，以得到一琥珀色混合液。接著於混合液中緩慢滴入含 2.4 g(60 mmol)氫氧化鈉的甲醇溶液(200 mL)，直至混合液轉變成混濁溶液，進而產生蠟狀的黃色沉澱物即完成反應。將上述之混濁溶液進行過濾，以取得黃色沉澱物。以甲醇清洗沉澱物，接著加熱至 70°C 後並進行真空乾燥，以製得呈褐色蠟塊狀之三價油酸鐵 $[\text{Fe(OA)}_3]$ 。

於轉速 300 rpm 之攪拌下，將 3 克(3.3 mmol)之 Fe(OA)_3 與 15 克(60 mmol)之 1-十八烯(以下簡稱為 ODE)進行混合並加熱至 70°C ，接著加入 0.4 mL(1.6 mmol)之油酸，以獲得一混合液。使混合液加熱至 $100\sim 120^\circ\text{C}$ ，以去除混合液中之微量水分，待 30 分鐘後，將溫度降至室溫，再以 $3.3^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ 的加熱速率使混合液的溫度升高至 300°C ，升溫過程共歷時 90 分鐘。到達 300°C 後再持續反應 60 分鐘，然後將溫度以 $20^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ 之速率降低至 30°C ，即獲得 SPIO。

[結構分析]

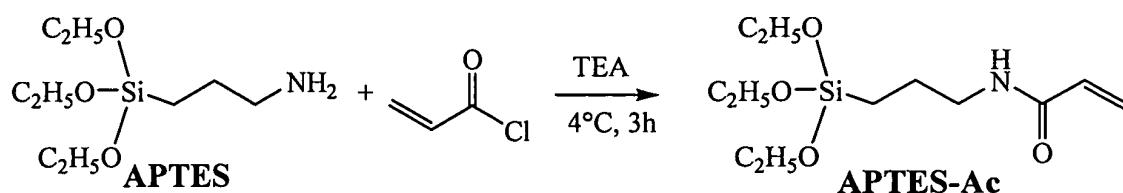
所測得之 FT-IR 光譜如圖 1 所示，其中， 1600 cm^{-1} 吸

收峰證明確實生成油酸鐵鹽結構。

利用 TEM 進行外觀分析，所得結果如圖 2(a)及(d)所示，其中(d)為放大圖，可發現粒徑為 12.8 nm 且外觀形狀多為圓形。將 SPIO 送測 SQUID，結果可發現 SPIO 所得到之磁滯曲線之矯頑場 (coercivity, H_C) 為~1 及飽和磁化率為 279 emu/g，其中 SPIO 之 H_C 趨近於零，證明 SPIO 具有超順磁性及無磁滯現象。

另外，在不同攪拌轉速(600 及 900 rpm)下進行 SPIO 之製備，所製得之 SPIO 再分別以 TEM 進行外觀分析，結果同樣如圖 2 所示，可發現 600 rpm 所製得之粒徑約為 9.3 nm[圖 2(b)及(e)，(e)為放大圖]，900 rpm 所製得之粒徑約為 5.8 nm[圖 2(c)及(f)，(f)為放大圖]，由此可發現攪拌轉速越高，所得到之 SPIO 粒徑越小。

2. 氮-丙烯醯基-(3-胺基丙基)三乙氧基矽烷 [N-acryl-(3-aminopropyl)triethoxy silane，以下簡稱為 APTES-Ac] 的合成



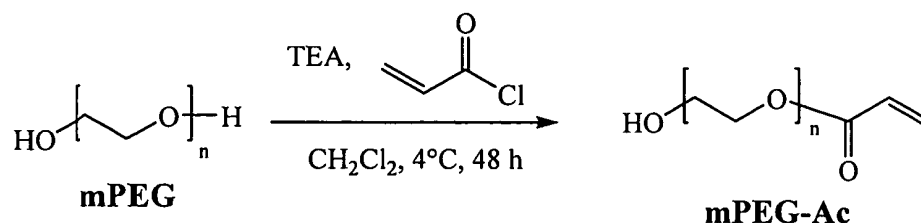
將 10.6 mL(45 mmol)之 3-胺基丙基三乙氧基矽烷 (APTES)溶解於 300 mL 之乾氯仿中，然後加入 12.9 mL(93 mmol)之三乙基胺，再於 4°C 下加入 3.6 mL(45 mmol)之丙烯醯氯，以獲得一反應液。使反應液於室溫下反應 3 小時，然後利用矽膠層析法(層析液為氯仿/乙醇=9/1)進行純化

，即製得 APTES-Ac。

[結構分析]

APTES-Ac 之結構分析：FT-IR 光譜如圖 3 所示。

3. 丙烯鹽基聚乙二醇(mPEG-acryl，以下簡稱為 mPEG-Ac)的合成

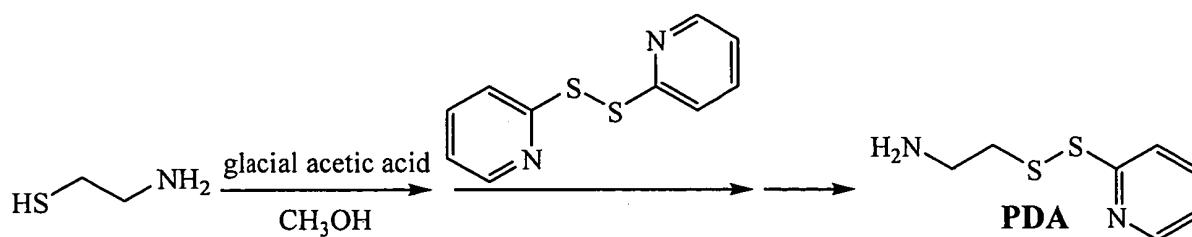


將 75 克(100 mmol)之聚乙二醇加熱至 90-100°C 並抽真空以去除水分。待 6 小時後，於聚乙二醇中加入 100 mL 之乾二氯甲烷及 27.7 mL(200 mmol)之三乙基胺，再於 4°C 下緩緩滴入 10.8 mL(135 mmol)之丙烯鹽基，以獲得一反應液。使反應液於室溫下反應 48 小時，然後使反應液加熱並抽真空，再加入己烷析出 PEG，再用四氫呋喃析出 mPEG-Ac，最後利用矽膠層析法(層析液為氯仿/乙醇=9/1)進行純化，可獲得 mPEG-Ac。

[結構分析]

mPEG-Ac 之結構分析：FT-IR 光譜如圖 3 所示。

4. 2-(吡啶基二硫)-乙基胺[2-(pyridyldithio)-ethylamine，以下簡稱為 PDA]之合成：

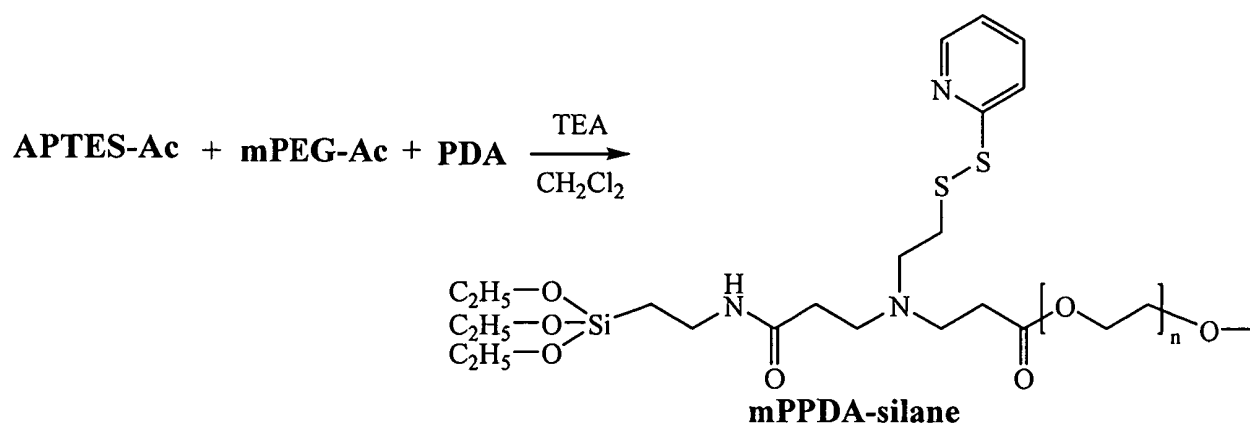


將 2.288 克 (20 mmol) 之 2-巰基乙基胺鹽酸鹽 (2-mercaptoethylamine) 溶解在 17.5 mL 之甲醇中，再加入 1.6 mL (26.7 mmol) 之冰醋酸，以獲得一反應液。使 8.815 克 (40 mmol) 之 2,2'-二吡啶基二硫化物溶解於 17.5 mL 之甲醇中，然後緩慢滴入上述之反應液中，並於氮氣下反應 48 小時。接著利用減壓濃縮機將反應液中之甲醇去除，此時可獲得一黃色膏狀物。加入 20 mL 之甲醇來溶解膏狀物，接著再加入 100 mL 之乙醚，可發現有沉澱物析出，重複加入乙醚 6 次，可析出 1.95 克 (8.8 mmol，產率 44%) 之白色粉狀晶體 PDA-HCl。將 PDA-HCl 加入 2 mL 水中，以獲得一混合液。將 384.7 克 (9.6 mmol) 之氫氧化鈉溶解在 1 mL 水中，再快速加入上述混合液並利用震盪器震盪 15 分鐘。待 15 分鐘後，再以離心機離心 15 分鐘並移除上層液，即可製得淡黃色油狀物 PDA。

[結構分析]

PDA 之結構分析： $^1\text{H-NMR}$ 光譜如圖 4 所示；FT-IR 光譜如圖 3 所示。

5. 氮,氮'-APTES-mPEG-PDA (以下簡稱為 mPPDA-silane) 之合成：

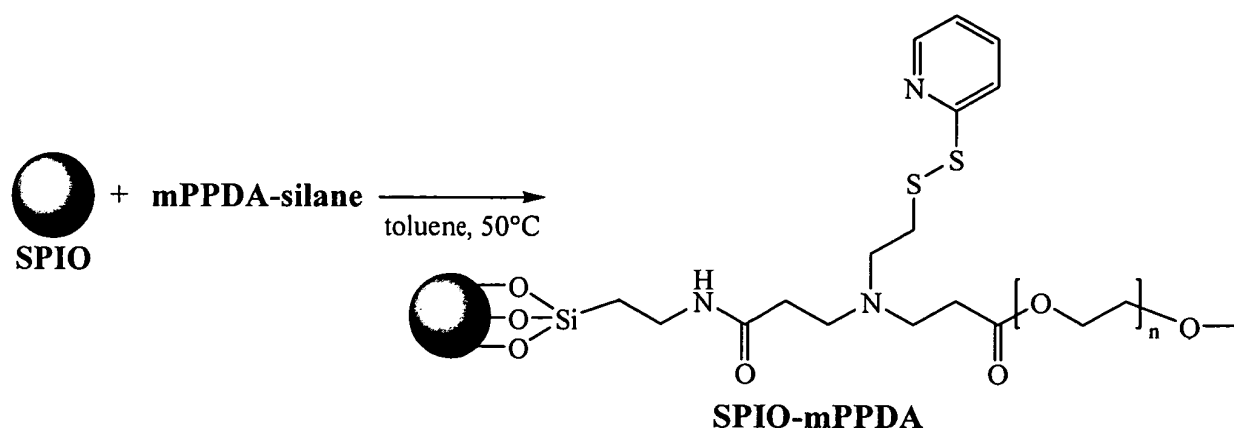


將 1.375 克(5 mmol)之 APTES-Ac、4 克(5 mmol)之 mPEG-Ac 與 0.93 克(5 mmol)之 PDA 溶解在 20 mL 之乾二氯甲烷中，再加入 0.693 mL(5 mmol)之三乙基胺，以獲得一反應液。使反應液於氮氣下反應 72 小時。反應完成後，於反應液中加入己烷，會發現有 mPPDA-silane 析出，最後利用矽膠層析法(層析液為氯仿/乙醇=9/1)進行純化，可獲得 mPPDA-silane。

[結構分析]

mPPDA-silane 之結構分析： $^1\text{H-NMR}$ 光譜如圖 5 所示；FT-IR 光譜如圖 3 所示。由上述光譜數據，可發現有 APTES 及 mPEG 之特性吸收峰，證明確實製得 mPPDA-silane。

6. SPIO-mPPDA 的合成：



將 1 mmol(含 56 mg 之鐵)之 SPIO 與 1.3 g(1 mmol)之 mPPDA-silane 溶解於 20 mL 甲苯中，以獲得一反應液。使反應液在氮氣環境下加熱至 50°C，然後以超音波震盪 6 小時，之後，再用己烷析出 SPIO-mPPDA，並使析出的沉澱物能分散在甲苯溶液中，最後用透析膜(Mn：12,000~14,000)於二次水中純化，即可製得 SPIO-mPPDA。

[結構分析]

SPIO-mPPDA 之 IR 結構如圖 1 所示。利用 DLS 測定 SPIO-mPPDA 之水合直徑，結果為 29.9 nm。

[實施例 2] SPIO-mPEG-cRGD 之製備

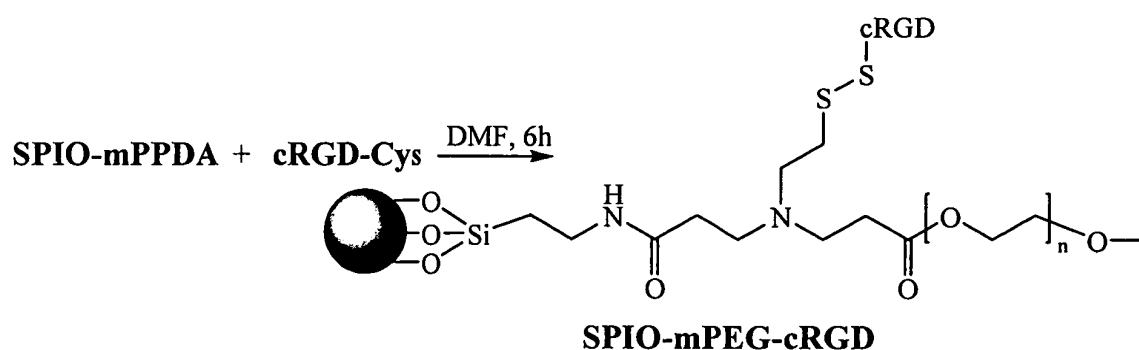
1. 環(半胱胺酸-離胺酸-甘胺酸-精胺酸-甘胺酸-天門冬胺酸)(以下簡稱為 cRGD-Cys)之合成：

利用固相胜肽合成儀(solid phase peptide synthesizer)，採用之樹脂為 N 端具有 Fmoc 保護基之 Rink Amide 樹脂。利用濃度 20% 且由二甲基甲醯胺(DMF)所配製之哌啶溶液作為去除 Fmoc 保護基之試劑，使樹脂進行去保護步驟。接著，以苯并三唑-1-基-氧-參-吡咯啶酮鎂六氟磷酸鹽(benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexa-

fluorophosphate, PyBOP) 及 1- 羥基苯并三唑 (1-hydroxybenzotriazole, HOBT) 作為偶合試劑，並溶解於活化試劑 0.4M 之氮-甲基嗎啉 (N-methyl morpholine, NMM) 中。再於樹脂接上 Fmoc-Asp(O-*t*Bu)-OH，每接一個胺基酸後，便取一些樹脂進行 Kaiser test 分析，已確定是否成功接上胺基酸。每當成功接上一個胺基酸後，利用醋酸酐 (Ac_2O) 與樹脂之未接上胺基酸的 N 端進行反應，使 N 端不再參與反應，依據胺基酸序列選取特定胺基酸，並反覆進行上述胺基酸接枝步驟。最後利用濃度 20% 且由二甲基甲醯胺 (DMF) 所配製之哌啶溶液去除末端 Fmoc 保護基，並以甲醇反覆清洗樹脂，再使樹脂進行過濾及真空乾燥。

取 5 mL 之混合溶劑 [三氟酸 / 水 / 三異丙基矽烷 (triisopropyl silane, TIS) / 1,2-乙烷二硫醇 (ethanedithiol, EDT) = 94.5/2.5/1/2.5] 作為切除樹脂及去除保護基的試劑。將上述混合溶劑加入樹脂後，利用震盪器震盪 2 小時。然後使用甲醇清洗樹脂，再進行過濾並收集濾液。使濾液濃縮至體積約剩 5 mL 後，再移至離心管，並加入乙醚，以析出胜肽，接著離心 5 分鐘後將上層液移出並重複上述清洗步驟 3~5 次。最後將沉澱物加入去離子水中進行溶解，然後進行冷凍乾燥，便可製得 cRGD-Cys。

2. SPIO-mPEG-cRGD 之合成：



將 1.1 mg(20 μmol)之 SPIO-mPPDA 與 13.5 mg(20 μmol)之 cRGD-Cys 溶解於 5 mL 之 DMF 中，以製得一反應液。使反應液於氮氣下反應 6 小時，最後用透析膜(Mn : 12,000~14,000)於二次水中純化，即可製得 SPIO-mPEG-cRGD。

[結構分析]

利用 DLS 測定 SPIO-mPPDA-cRGD 之水合直徑，結果為 36.5 nm。相較於 SPIO-mPPDA 之水合直徑 29.9 nm，可發現在與 cRGD 鍵結後，水合直徑多了 6.6 nm，如此驗證確實製得 SPIO-mPPDA-cRGD。

已知當 2,2'-二吡啶基二硫化物(DPDS)分解為 2-巰基吡啶(2-MP)時，在 UV-VIS 吸收光譜中可發現有 343 nm 吸收峰的形成，表示 343 nm 吸收峰的形成可證實產生 2-MP。在上述 SPIO-mPEG-cRGD 之合成中，取出小部份反應後之反應液進行 UV-VIS 分析，可發現有 343 nm 吸收峰的形成，代表 cRGD 取代而讓 2-MP 釋出，證實 SPIO-mPEG-cRGD 的生成。

[測試分析]

1. 分散性：

分別將 SPIO-mPEG-cRGD 放入不同 pH 值之溶液中，由 DLS 儀器觀察粒徑變化，所得結果如圖 6 所示。

測試時可發現 SPIO-mPEG-cRGD 在 pH 值 4~10 的容易內並未產生沉澱，可證明 SPIO-mPEG-cRGD 極穩定。而由圖 6 中可知，當 pH 值為 5~10 時，SPIO-mPEG-cRGD 的粒徑變化不大，證明 SPIO-mPEG-cRGD 在 pH 值為 5~10 時可維持穩定存在，並維持良好分散，藉以減少 SPIO-mPEG-cRGD 被巨噬細胞吞噬的機率，同時提昇到達目標組織位置之機率。

2. 表面電位：

以表面電位儀分別對 SPIO-mPEG、SPIO-mPPDA 及 SPIO-mPEG-cRGD 進行測試，所得結果如圖 7 所示。

在圖 7 中，SPIO-mPPDA 之表面電位為 4.3 mV，在接上 cRGD 後，由於胜肽具有末端胺基，使得 SPIO-mPEG-cRGD 之表面電位移動至 21.8 mV，證實 SPIO-mPEG-cRGD 確實生成。

3. 蛋白質檢驗：

分別依據各編號之成分製作編號 A~D 之溶液並將其放置在比色管中。

- A. BCA 蛋白質檢驗試劑(購自進階公司，品名 protein assay reagent)，用作為空白樣品，呈無色透明；
- B. BCA 蛋白質檢驗試劑+胎牛血清蛋白標準品，呈現紫色；
- C. BCA 蛋白質檢驗試劑+SPIO-mPEG-cRGD；

D. BCA 蛋白質檢驗試劑 + SPIO-mPPDA；

測試結果如附件 1 所示。在附件 1 中，編號 C 之溶液由茶色轉變為紫色，顯示編號 C 具有蛋白質，證明 cRGD 確實存在。而編號 D 之溶液的顏色未有任何變化，這是因為溶液中不含蛋白質或胜肽。

4. SPIO-mPEG-cRGD 之細胞毒性研究：

利用具有不同的組合蛋白受器表現量之細胞株來測試 SPIO-mPEG-cRGD 的細胞毒性。分別將 10^3 個細胞之五種不同細胞株[KB、MCF-7、HT-29、A549 及 HT-1080](皆取自台灣食品工業研究所)與配製成五種不同濃度(100、250、500、750 及 1000 μM)之 SPIO-mPEG-cRGD 溶液進行混合並放置在 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 下培養 1 小時，最後利用 MTT 方法檢測細胞存活率，結果如圖 8 所示。

在圖 8 中，可發現細胞存活率皆高於 90%，顯示 SPIO-mPEG-cRGD 不會對細胞產生毒性。

5. SPIO-mPEG-cRGD 之試管影像研究：

分別取用實施例之步驟 1 之具有不同粒徑(12.8、9.3 及 5.8 nm)之 SPIO 進行三種不同 SPIO-mPEG-cRGD 之製備。利用水溶劑，分別將三種不同 SPIO-mPEG-cRGD 配製為五種不同濃度(400、200、100、50 及 25 μM)之溶液，共可配製 15 個樣品。將 15 個樣品放在裝滿水的盒中，並以保麗龍固定樣品，再以 3.0T 之磁振造影掃描儀的 T_2 加權影像進行掃描並取得影像，所得影像如附件 2 所示(附件 2 之 A 部分為測試所得影像；B 部分為 A 部分套上色譜後之

影像)。

由附件 2 可發現 SPIO-mPEG-cRGD 在加權影像表現靈敏度極高，且在極低濃度下也有影像變化，顯示 SPIO-mPEG-cRGD 可用於作為磁振造影對比劑。

由粒徑 5.8 nm 之 SPIO 所製得之 SPIO-mPEG-cRGD 的結果中，當濃度降低至 50 mM 以下，影像便不會有變化。而在粒徑 9.3 nm 之結果中，濃度降低至 25 mM 以下，影像便不會有變化。在粒徑 12.8 nm 之結果中，濃度在 25 mM 也有輕微的訊號變化。由上述比較可知，若使用較大粒徑之 SPIO，可得到較佳之影像靈敏度。

6. SPIO-mPEG-cRGD 之體外細胞影像研究：

分別將五株細胞株[對照組細胞：KB；實驗組細胞(指過度表現之 integrin 受器細胞)：MCF-7、HT-29、A-549 及 HT-1080]與 SPIO-mPEG-cRGD 進行混合，接著放置在 $37.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 下培養 1 小時，再以 PBS 反覆清洗三次，即獲得 5 個樣品。然後使 5 個樣品及作為空白樣品之五株細胞株，分別利用 3.0T 之磁振造影掃描儀的 T2 加權影像進行掃描並取得影像，所得影像如附件 3 所示(A 列表示空白樣品；B 列表示 SPIO-mPEG-cRGD 與五株細胞株培養後之結果；C 列為 A 列影像套上色譜後之影像；D 列為 B 列影像套上色譜後之影像)。

在附件 3 中，經由比較 A 與 B 列，可發現 B 列之 MCF-7、HT-29、A-549 及 HT-1080 的影像訊號值有明顯變化，顯示加入 SPIO-mPEG-cRGD 進行細胞株培養，可有效

偵測過度表現之 integrin 受器細胞。此結果在 C 及 D 列亦可發現同樣結果。

經由比較 D 列之 MCF-7、HT-29、A-549 及 HT-1080 的影像，可發現 MCF-7 及 A-549 的訊號變化量較高、HT-29 的訊號變化量次之及 HT-1080 的訊號變化量最低，顯示 SPIO-mPEG-cRGD 對於不同 integrin 受器細胞的表現程度有所差異，證明本發明之對比劑可目標化至表現不同程度之 integrin 受器細胞上。

7. SPIO-mPEG-cRGD 之體內細胞影像研究：

分別將五株細胞株[對照組細胞：KB；實驗組細胞(指過度表現之 integrin 受器細胞)：MCF-7、HT-29、A-549 及 HT-1080]注射到 5 隻無特定病源之小鼠的左右後腿上方，待一星期後，分別對 5 隻小鼠的尾部靜脈注射 SPIO-mPEG-cRGD(劑量為 20 $\mu\text{mol/Kg}$)，最後再利用 3.0T 之磁共振造影掃描儀的 T_2 加權影像對注射前及注射半小時後之小鼠進行掃描並取得影像，所得影像如附件 4 所示(附件 4 之 A 部分為測試所得影像；B 部分為 A 部分套上色譜後之影像)。

在 MCF-7、A-549、HT-29 及 HT-1080 之結果中，可發現注射對比劑之前後訊號變化量分別下降 51%、44%、24%及 11%，此結果與體外實驗結果相吻合，同樣顯示 SPIO-mPEG-cRGD 對於不同 integrin 受器細胞的表現程度有所差異，證明本發明之對比劑可目標化至表現不同程度之 integrin 受器細胞上。

綜上所述，本發明用於磁振造影之磁性奈米粒子藉由特殊之矽氧烷基團的設計，於其中引入生物相容性基團或具有高度專一結合性之生物相容性分子，使得磁性奈米粒子具備高弛緩率、良好水溶性、高飽和磁化率以及廣泛的使用範圍。

惟以上所述者，僅為本發明之較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍，即大凡依本發明申請專利範圍及發明說明內容所作之簡單的等效變化與修飾，皆仍屬本發明專利涵蓋之範圍內。

【圖式簡單說明】

圖 1 是一 FT-IR 光譜圖，說明本發明之實施例 1 中所製得之 SPIO、mPPDA-silane 及 SPIO-mPPDA 之官能基結構；

圖 2 是一 TEM 照片，說明本發明之實施例 1 於不同攪拌轉速下所製備之 SPIO 的外觀，(a)、(b)及(c)分別為轉速 300、600 及 900 rpm 所製得之 SPIO 外觀，而(d)、(e)及(f)分別為(a)、(b)及(c)之放大圖；

圖 3 是一 FT-IR 光譜圖，說明本發明之實施例 1 中所製得之 mPEG-Ac、APTES-Ac、PDA 及 mPPDA-silane 之官能基結構，箭頭處表示吡啶之吸收峰；

圖 4 是一 ^1H -NMR 光譜圖，說明本發明之實施例 1 中所製得之 PDA 的結構；

圖 5 是一 ^1H -NMR 光譜圖，說明本發明之實施例 1 中所製得之 mPPDA-silane 的結構；

圖 6 是一分析曲線圖，說明本發明用於磁振造影之磁

性奈米粒子之一具體例 SPIO-mPEG-cRGD 於不同 pH 值溶液中之粒徑變化；

圖 7 是一分析曲線圖，說明本發明之實施例 1 所製備之 SPIO-mPEG 及 SPIO-mPPDA，以及實施例 2 所製備之 SPIO-mPEG-cRGD 的表面電位值；及

圖 8 是一分析長條圖，說明不同濃度之 SPIO-mPEG-cRGD 溶液的細胞毒性研究結果。

【主要元件符號說明】

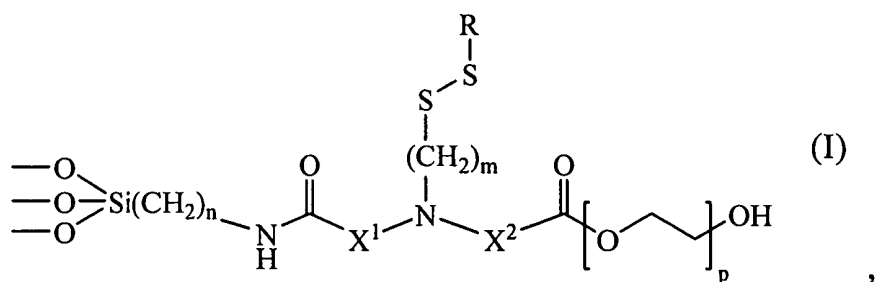
無

七、申請專利範圍：

1. 一種用於磁振造影之磁性奈米粒子，包含：

一個具有一表面且由超順磁性氧化鐵奈米粒子所構成之核；

多數個與該核之表面共價偶合且由下式(I)所示之矽氧烷基團：



式(I)之 X^1 及 X^2 分別表示伸甲基、伸乙基或伸丙基；

—S—R 之 R 表示經取代或未經取代之吡啶基，或—S—R 是衍生自具有生物相容性之分子的基團；

n 及 m 分別為介於 1~3 之間的整數；及

p 是介於 9~45 之間的整數。

2. 根據申請專利範圍第 1 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，其中，R 表示經取代或未經取代之吡啶基且選自於 2-吡啶基、4-吡啶基、5-甲基-2-吡啶基、3-甲基-2-吡啶基或 1-甲基-2-吡啶基。
3. 根據申請專利範圍第 2 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，其中，R 為 2-吡啶基。
4. 根據申請專利範圍第 1 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，其中，—S—R 是衍生自目標化胜肽序列之基團。

5. 根據申請專利範圍第 4 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，其中，該目標化胜肽序列是選自於介白素-11、鈴蟾素或環(半胱胺酸-離胺酸-甘胺酸-精胺酸-甘胺酸-天門冬胺酸)。
6. 根據申請專利範圍第 1 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，其中， X^1 及 X^2 分別表示伸乙基、R 為 2-吡啶基及 $n=m=2$ 。
7. 根據申請專利範圍第 5 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，其中， X^1 及 X^2 分別表示伸乙基、 $-S-R$ 是衍生自環(半胱胺酸-離胺酸-甘胺酸-精胺酸-甘胺酸-天門冬胺酸)的基團及 $n=m=2$ 。
8. 根據申請專利範圍第 1 項所述之用於磁振造影之磁性奈米粒子，係用作為磁振造影對比劑。

八、圖式

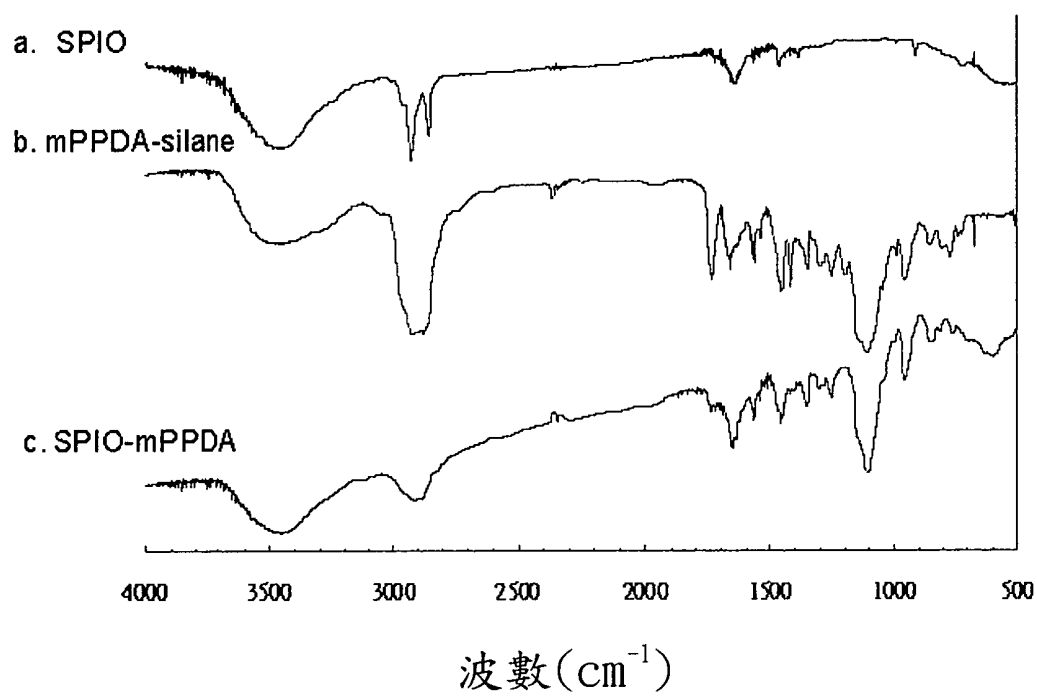


圖 1

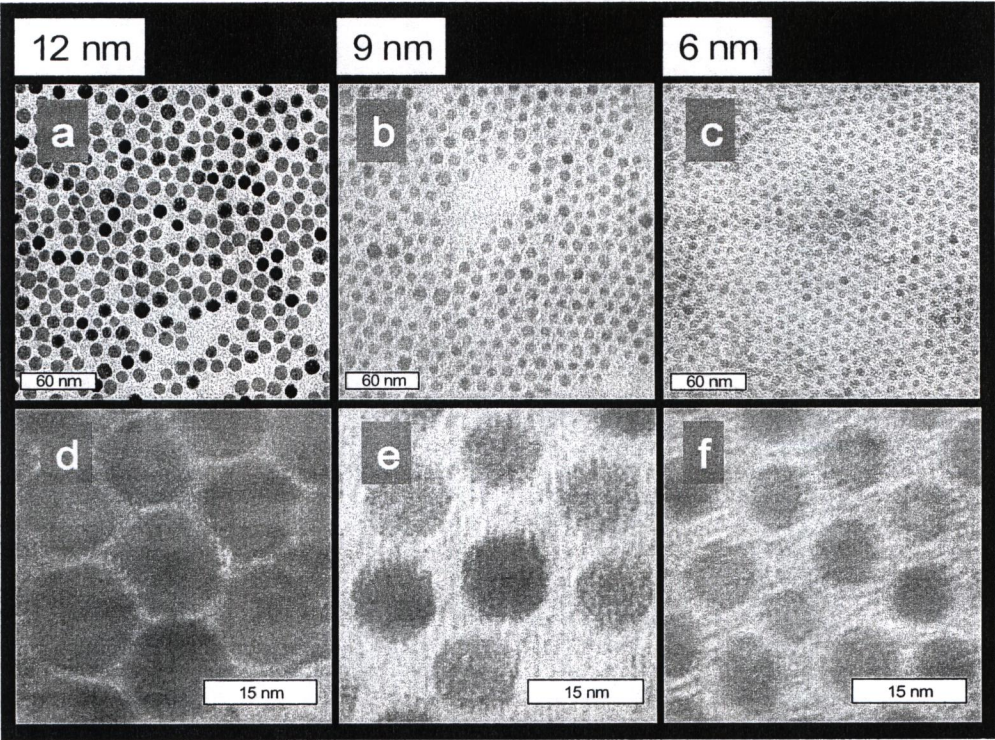


圖2

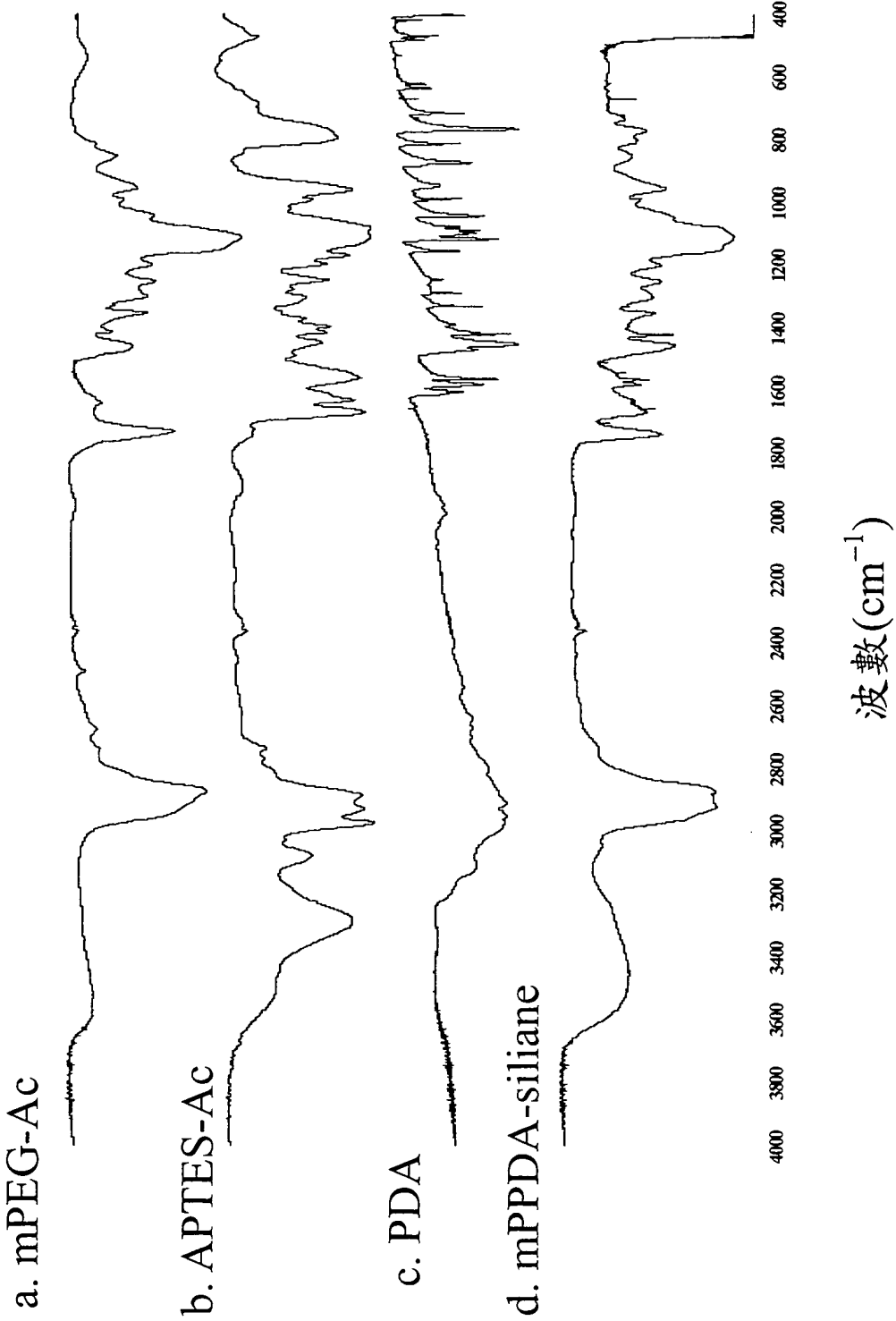


圖3

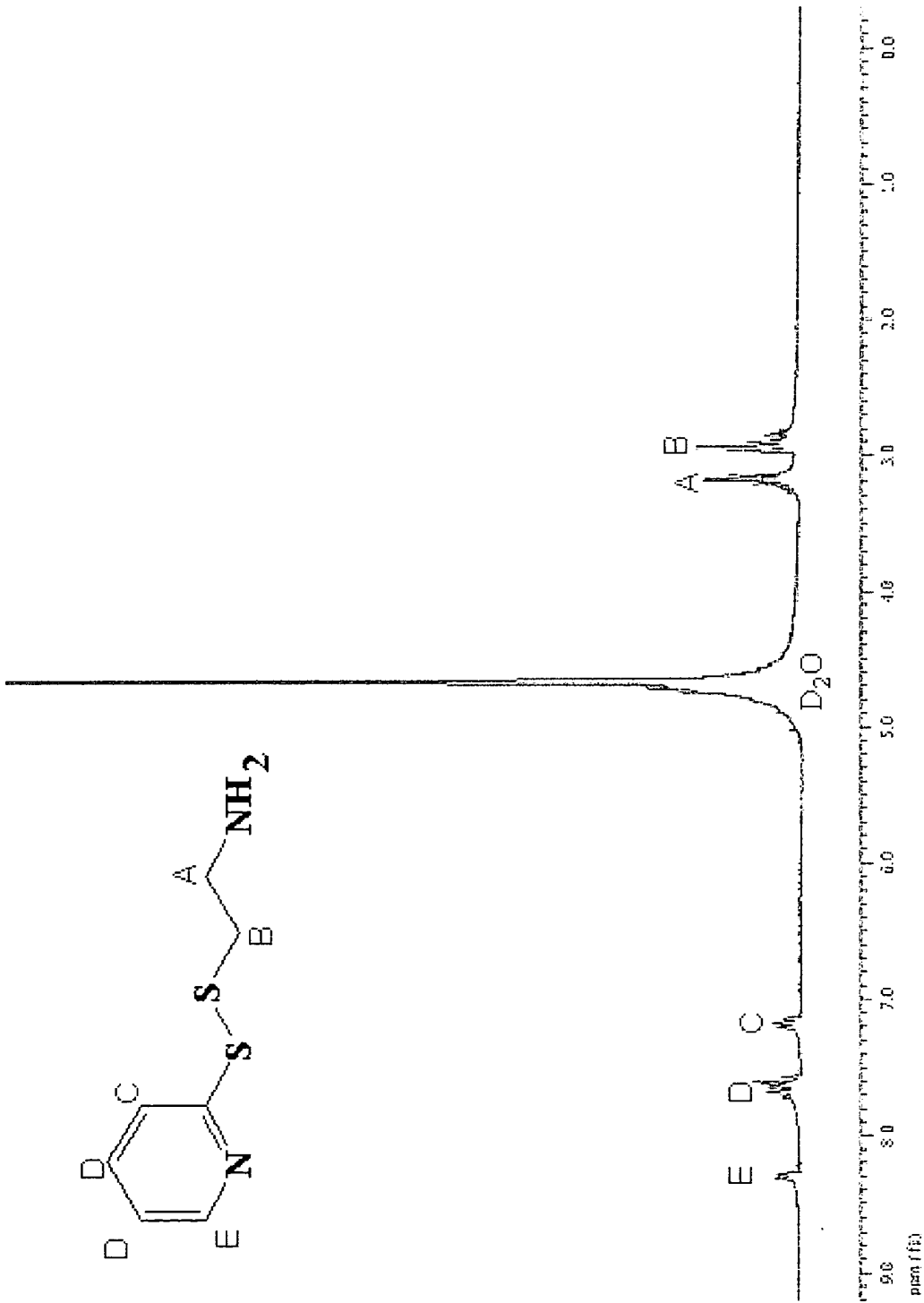


圖4

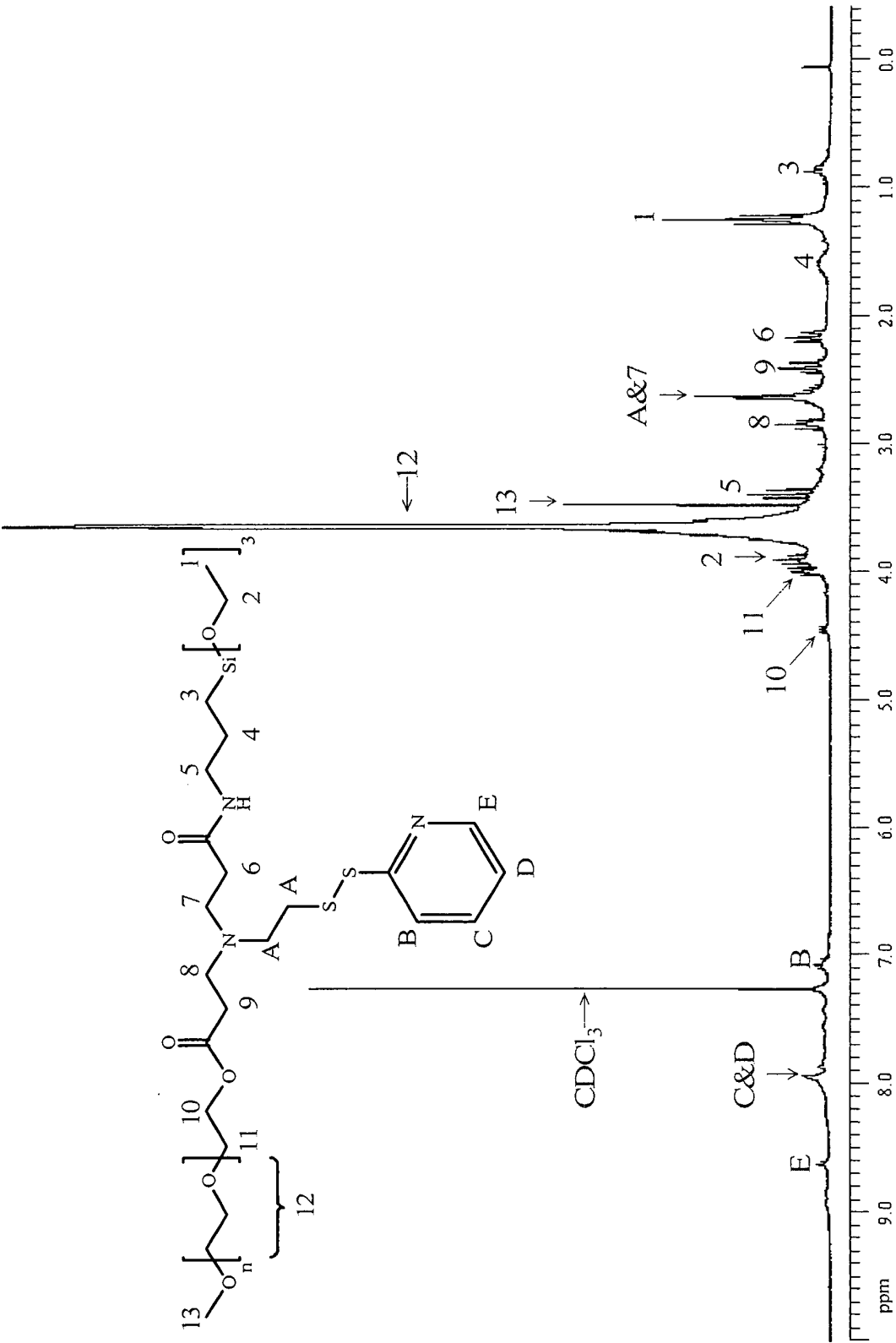


圖5

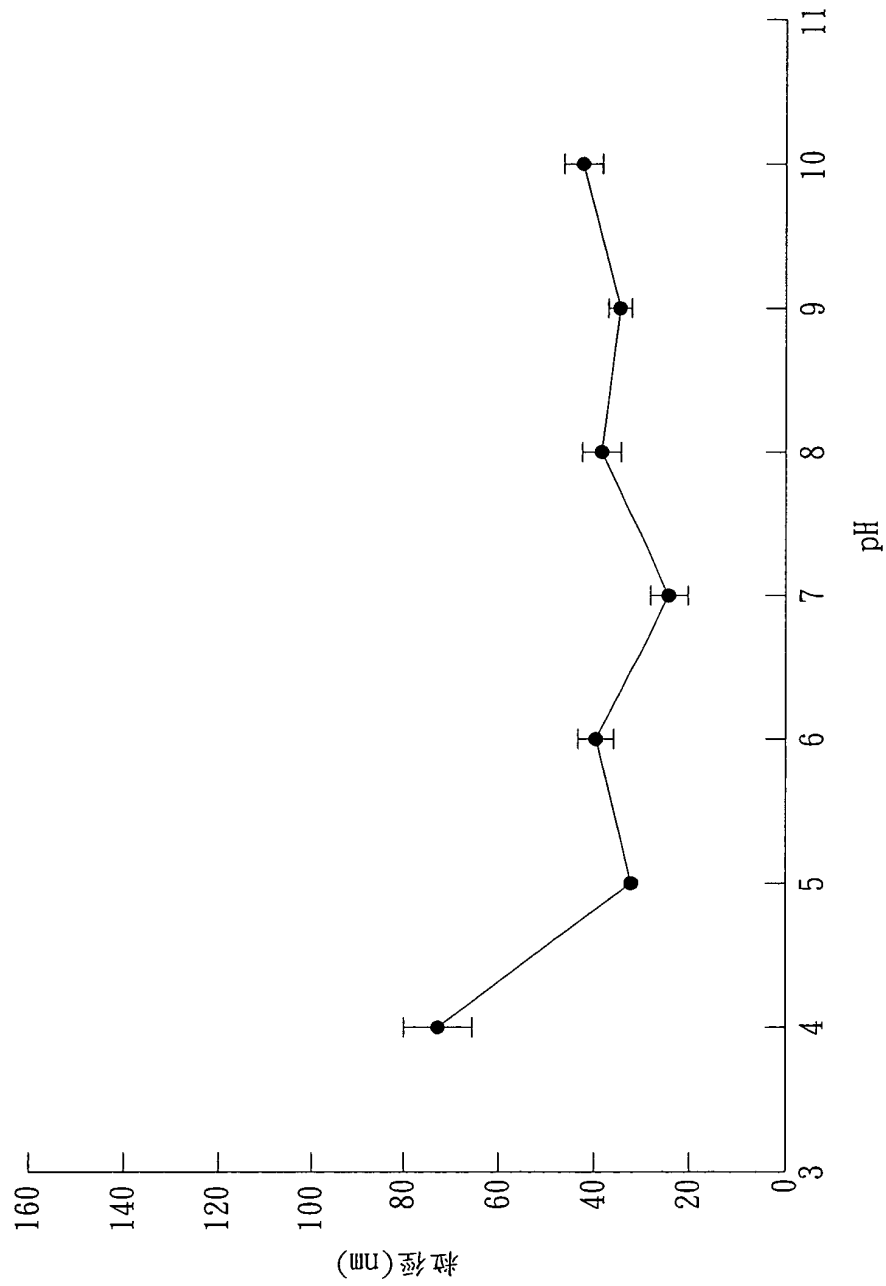


圖6

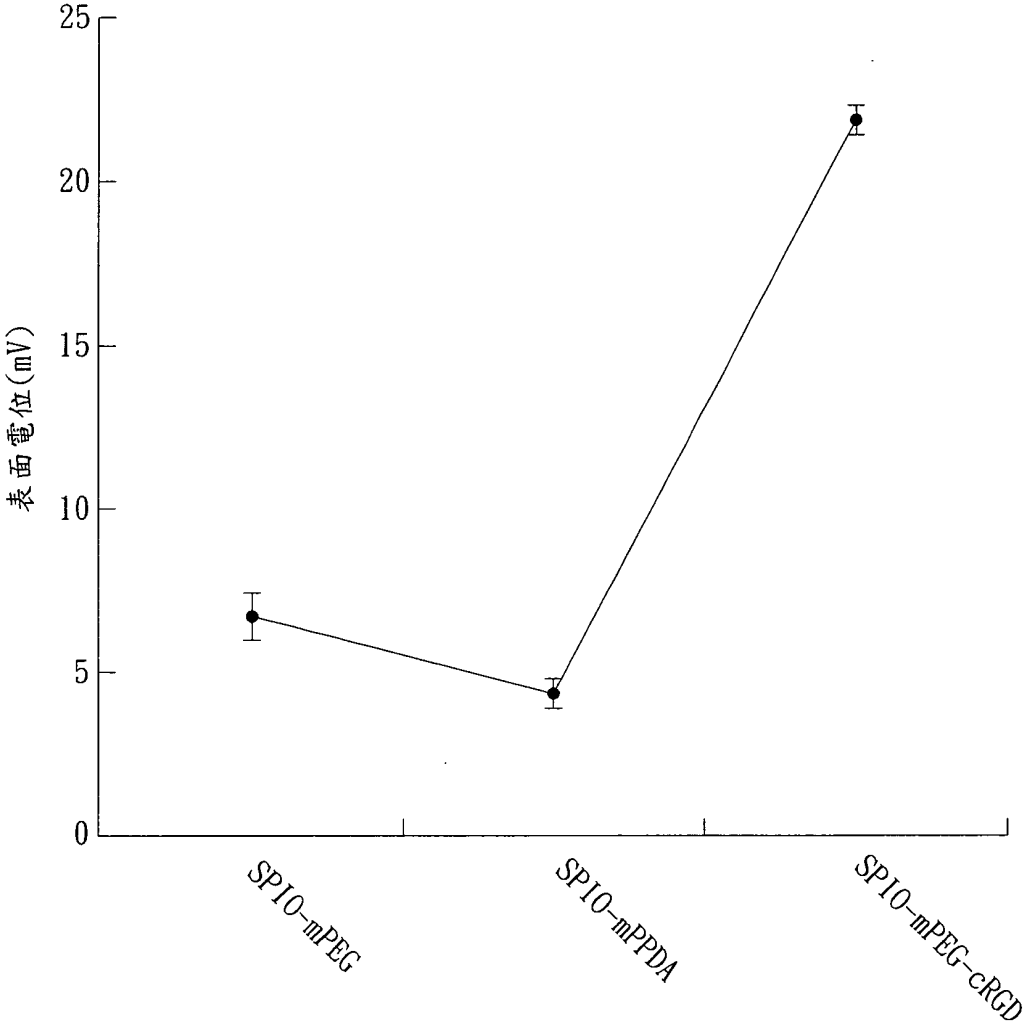


圖 7

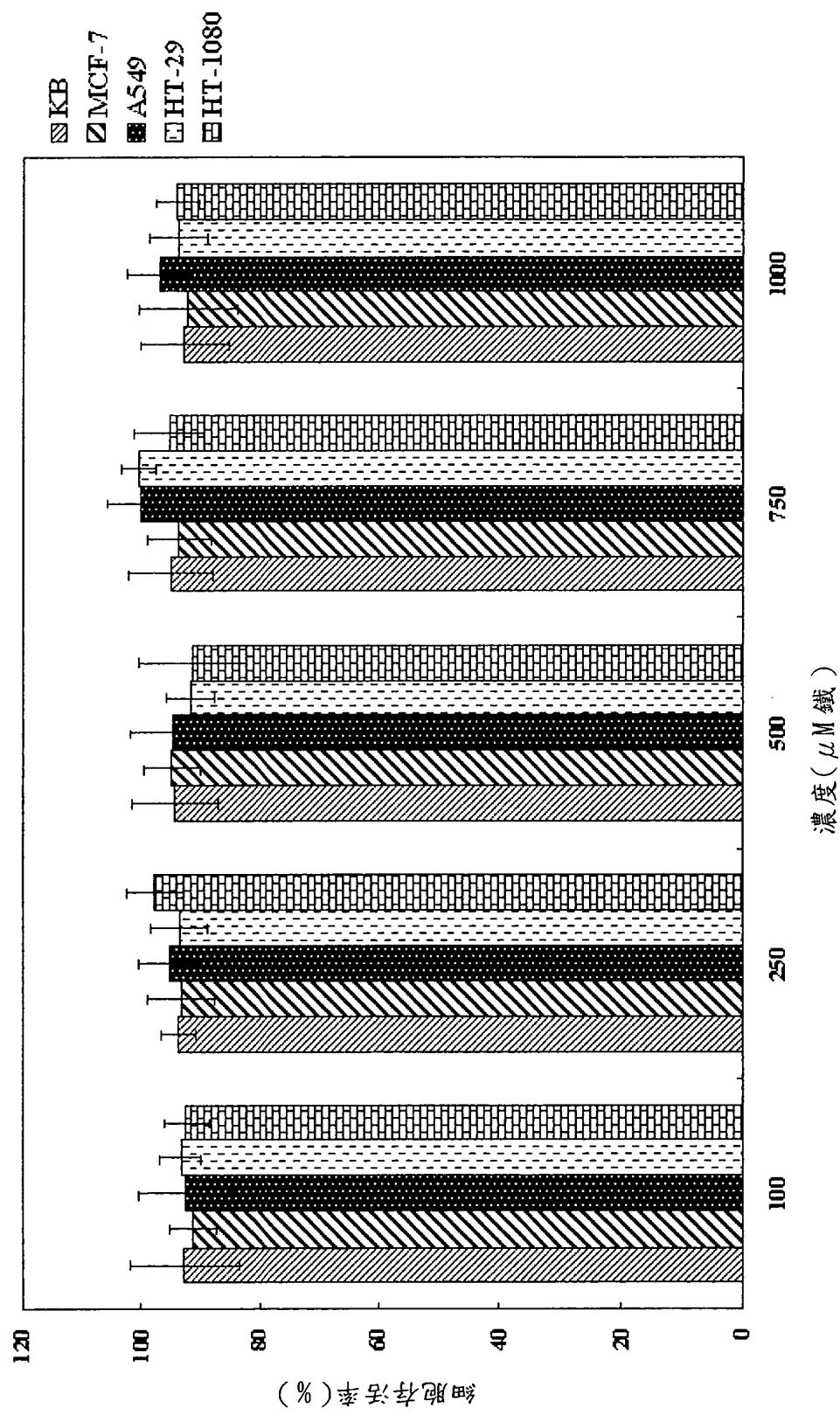
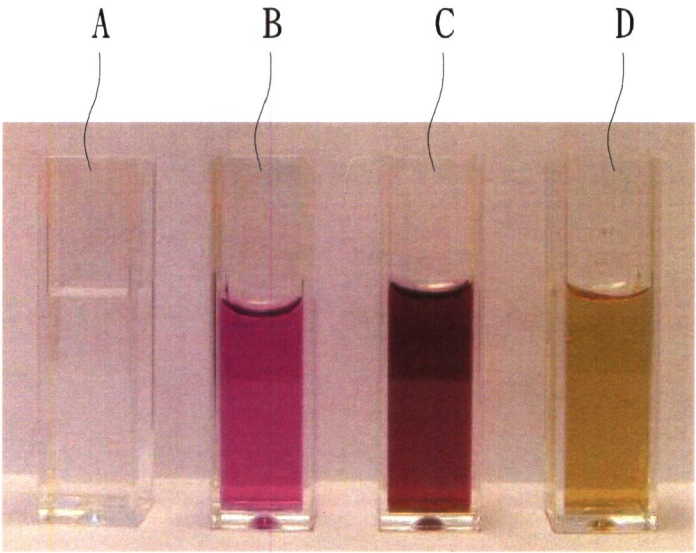
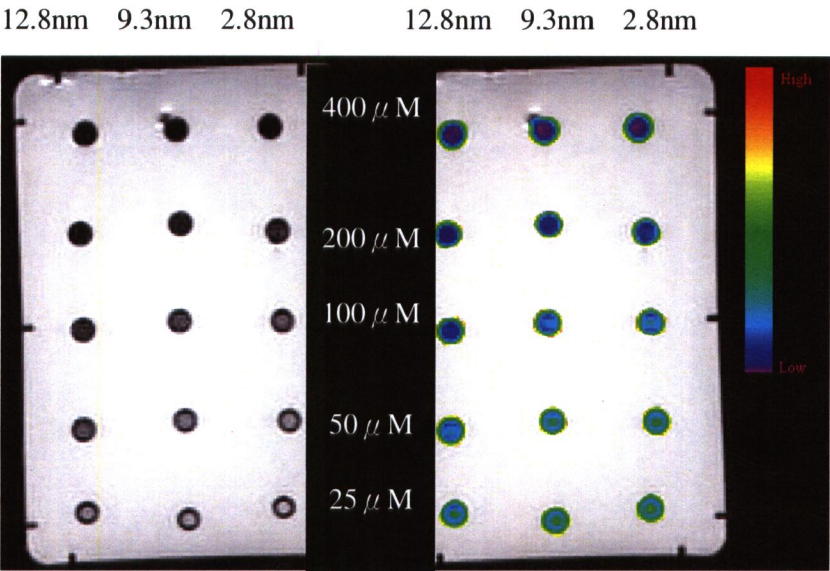


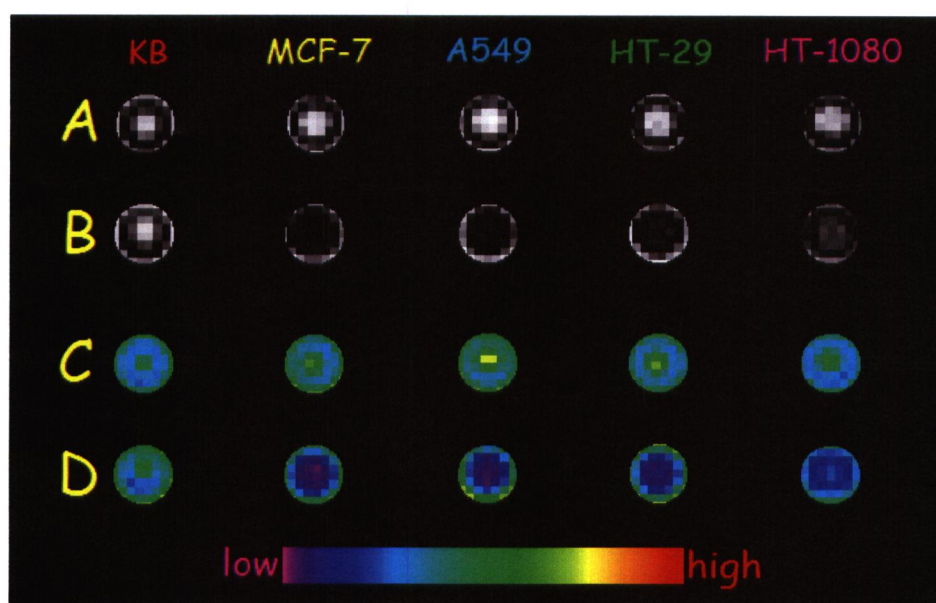
圖8



附件1

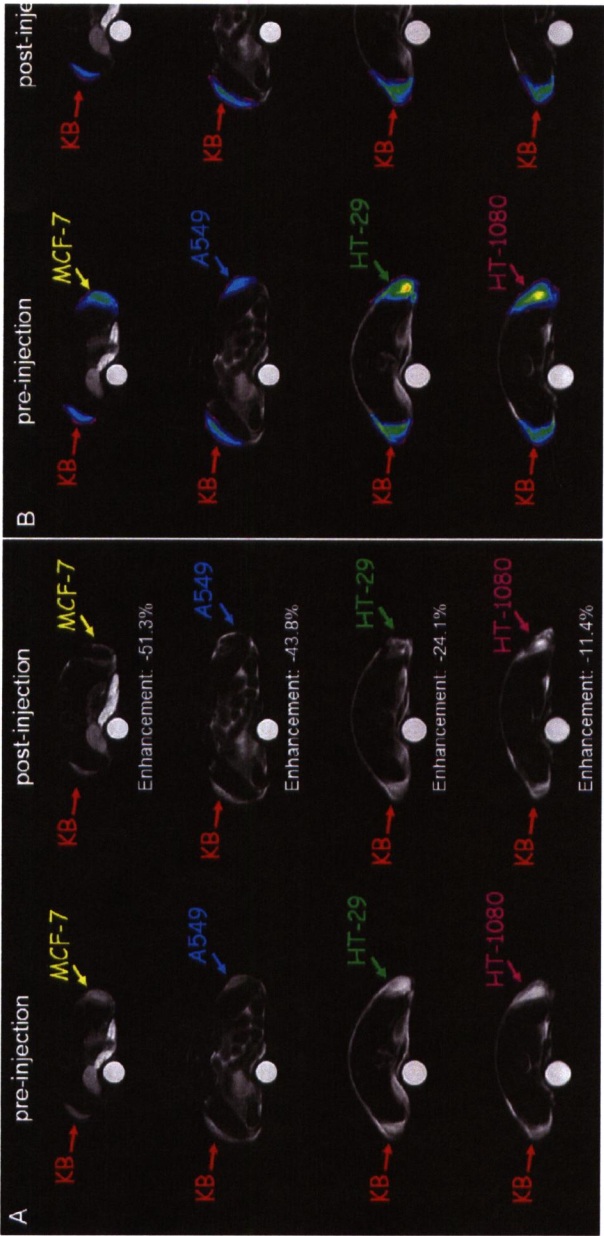


附件2



附件3

A 列表示空白樣品；B 列表示 SPIO-mPEG-cRGD 與五株細胞株培養後之結果；C 列為 A 列影像套上色譜後之影像；D 列為 B 列影像套上色譜後之影像



附件4