



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103961703 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201410164928.3

C12N 5/09(2010.01)

(22) 申请日 2014.04.23

(56) 对比文件

(73) 专利权人 上海裕隆医学检验所股份有限公司

CN 102475683 A, 2012.05.30, 权利要求1-4.

地址 200233 上海市徐汇区钦州北路1001号7幢3层

田惠. 多功能壳聚糖季铵盐载药微球的制备. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库. 工程技术I辑》. 2009, 摘要, 第4.2.2节.

(72) 发明人 穆海东 汪宁梅 梁晓飞

审查员 蔡放

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公司 37205

代理人 宋玉霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 47/38(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种免疫纳米纤维素磁性脂质体及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物学用纳米磁性材料的技术领域,涉及一种纳米磁性颗粒,具体为一种免疫纳米纤维素磁性脂质体及其制备方法。为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe₃O₄,中间层为脂质体和纳米纤维素的混合材料,最外层为包被在中间层上的抗体;其中纳米纤维素的质量含量为0.1%~50.0%,脂质体成分的质量含量0.5%~90.0%,磁性材料的质量含量0.1%~50.0%,本发明免疫纳米纤维素磁性脂质体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,能够识别并结合相应的抗原、抗体或核酸等在外加磁场中分离富集迅速,可用于生物材料检测和分离纯化,在细胞分离、固定化酶、靶向药物和免疫检测等生物学领域有着广泛的应用前景。

1. 一种免疫纳米纤维素磁性脂质体, 为核壳型结构, 内核为磁性材料 Fe_3O_4 , 中间层为脂质体和纳米纤维素的混合材料, 最外层为包被在中间层上的抗体; 其中纳米纤维素的质量含量为 0.1%~50.0%, 脂质体成分的质量含量 0.5%~90.0%, 磁性材料的质量含量 0.1%~50.0%; 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的粒径为 50nm~500nm; 所述的脂质体的成分包括下述质量百分比的组分: 卵磷脂 0.1%~50.0%、胆固醇 0.1%~50.0%、DSPE-PEG 0.1%~40.0%、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐 0.0%~40.0%。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体, 其特征在于, 所述的抗体为单克隆抗体; 所述的纳米纤维素包含羧甲基纤维素、氨基化纳米纤维素和羧基化纳米纤维素。

3. 如权利要求 1 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法, 包括以下步骤:

a. 使用含有氨基或羧基的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (DSPE-PEG) 与抗体反应制备抗体前体物 DSPE-PEG-抗体;

b. 用薄膜分散法制备免疫磁性脂质体: 具体为将卵磷脂、胆固醇、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐和油溶性磁性纳米颗粒混合溶于油相氯仿中, 孵育 20~40 分钟, 放入茄形瓶中, 旋转蒸发成脂质体;

c. 将形成的脂质体与含有纳米纤维素和抗体前体物 DSPE-PEG-抗体的水溶液混合水化, 并超声, 即可得免疫纳米纤维素磁性脂质体, 即免疫纳米纤维素/脂质体复合磁性微球。

4. 根据权利要求 3 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法, 其特征在于, 步骤 a 是将含有氨基或羧基的 DSPE-PEG 与单克隆抗体混合, 加入缩合剂反应 0.5 至 48 小时, 透析除去未反应的缩合剂。

5. 根据权利要求 4 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法, 其特征在于, 所述 DSPE-PEG 与缩合剂的质量比是 1:0.01~10; 所述的 DSPE-PEG 与所用抗体的质量比是 1:0.01~2。

6. 根据权利要求 4 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法, 其特征在于, 所述缩合剂是 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N'-羰基二咪唑、二环己基碳二亚胺、4-二甲氨基吡啶、N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或两种。

7. 如权利要求 1 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法,

为如下步骤: 先用薄膜分散法制备纳米纤维素磁性脂质体; 然后将表面带氨基活性基团的纳米纤维素磁性脂质体与抗体通过缩合剂连接。

8. 如权利要求 1-2 任一项所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体在生物材料检测和分离纯化中的应用。

一种免疫纳米纤维素磁性脂质体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物学用纳米磁性材料的技术领域,涉及一种纳米磁性颗粒,具体为一种免疫纳米纤维素磁性脂质体及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫微球技术 (Immunomicrospheres) 是以免疫学为基础利用包被有免疫活性物质的各种微球进行免疫学或其他生物学分析分离等方面应用的一项技术。自 1956 年 Singer 将人 IgG 吸附存聚苯乙烯胶乳颗粒上,首次建立检测类风湿因子的胶乳凝集试验以来,免疫微球技术就以其简便,高效,实用的特点,在免疫学,微生物学,生物化学,分子遗传学及分子生物学等各个领域崭露头角。

[0003] 免疫磁性微球 (Immunomagnetic Microspheres, IMMS) 或叫做免疫磁性微珠简称免疫磁珠,作为新型的功能材料近年来已被广泛研究,其在生物医学及临床诊断等领域的应用引起了各国研究者的高度重视。免疫磁性微球是免疫微球的一种,是指连有抗体或抗原的磁性微球,它通过表面的抗体或抗原特异地与靶物质结合,从而赋予其磁响应性,在特定磁场的作用下,通过免疫磁性微球可以发生定向移动,从而实现其免疫学检测,分离纯化,药物导向等方面的目的。理想的免疫磁性微球应具有灵敏性高,特异性强,重复性好以及分离检测速度快等优点。

[0004] 免疫磁性微球是磁性微球与抗体或抗原结合的产物。磁性微球的范围广泛,包括常用的磁性高分子微球、磁性脂质体、磁性胶束等;而磁性脂质微球是通过适当的方法使脂质体与无机物结合起来形成具有一定磁性及特殊结构的微球,其表面可比较容易的赋予多种反应性功能基团,如 -OH, -COOH 和 -NH₂ 等,使其具有良好的生物相容性,通过与生物活性物质中的配基偶联,能够识别并结合相应的抗原、抗体或核酸等,然后可在外加磁场中进行分离富集。因此,磁性脂质微球(刘信等,磁性脂质体的制备及应用)在细胞分离、固定化酶、靶向药物和免疫检测等生物学领域有着广泛的应用前景。

[0005] 但是,目前存在的免疫磁性微球还存在许多问题,如卵磷脂 / 胆固醇磁性脂质体、免疫海藻酸钠磁性脂质体、PLGA 磁性脂质体等。首先,免疫磁性微球中抗体接枝率较低、活性较难维持。主要原因为,利用磁性微球表面存在的活性基团进行改性,温度较高,时间较长,容易降低抗体的活性。再次,所制备的免疫磁性微球普遍稳定性不足,容易发生团聚;样品存放半年后,均容易发生结块。如,博士论文(华中科技大学,李青,2007 年)中的免疫磁性海藻酸钠微球使用的是反相微乳 - 包埋的方法,所用的材料包含磁粉,海藻酸钠和表面活性剂琥珀酸二异辛脂磺酸钠。

发明内容

[0006] 本发明在于提出一种免疫纳米纤维素磁性脂质体,以及该免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法。

[0007] 本发明的技术方案是:

[0008] 一种免疫纳米纤维素磁性脂质体,为核壳型结构,内核为磁性材料 Fe_3O_4 ,中间层为脂质体和纳米纤维素的混合材料,最外层为包被在中间层上的抗体;其中纳米纤维素的质量含量为 0.1%~50.0%,脂质体成分的质量含量 0.5%~90.0%,磁性材料的质量含量 0.1%~50.0%。

[0009] 所述的免疫纳米纤维素磁性脂质体的粒径为 10nm 至 10000nm,优选为 50nm~500nm。

[0010] 所述的抗体为单克隆抗体;所述的纳米纤维素包含羧甲基纤维素、氨基化纳米纤维素和羧基化纳米纤维素。

[0011] 所述的脂质体的成分包括下述质量百分比的组分:卵磷脂 0.1%~50.0%、胆固醇 0.1%~50.0%、DSPE-PEG 0.1%~40.0%、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐 0.0%~40.0%。

[0012] 本发明免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法,包括以下步骤:

[0013] a. 使用含有氨基或羧基的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)与抗体反应制备抗体前体物 DSPE-PEG-抗体;

[0014] b. 用薄膜分散法制备纳米纤维素磁性脂质体:具体为将卵磷脂、胆固醇、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐和油性磁性纳米颗粒混合溶于油相氯仿中,孵育 20~40 分钟,放入茄形瓶中,旋转蒸发成脂质体;

[0015] c. 将形成的脂质体与含有纳米纤维素和抗体前体物 DSPE-PEG-抗体的水溶液混合水化,并超声,即可得免疫纳米纤维素磁性脂质体,即免疫纳米纤维素/脂质体复合磁性微球。

[0016] 上述步骤 a 是将含有氨基或羧基的 DSPE-PEG 与单克隆抗体混合,加入缩合剂反应 0.5 至 48 小时,透析除去未反应的缩合剂。

[0017] 所述 DSPE-PEG 与缩合剂的质量比是 1:0.01~10;所述的 DSPE-PEG 与所用抗体的质量比是 1:0.01~2。

[0018] 所述缩合剂是 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N'-羰基二咪唑、二环己基碳二亚胺、4-二甲氨基吡啶、N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或两种。

[0019] 本发明的免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备方法,还包含如下:先用薄膜分散法制备纳米纤维素磁性脂质体;然后将表面带氨基活性基团的纳米纤维素磁性脂质体与抗体通过缩合剂连接。

[0020] 本发明的有益效果为:

[0021] 本专利的免疫纳米纤维素磁性脂质体,含有 Fe_3O_4 超顺磁性纳米颗粒,纳米纤维素,脂质体成分(卵磷脂、胆固醇、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐、DSPE-PEG-抗体)。采用脂质体的薄膜分散法制备。

[0022] 将磁性脂质体与纳米纤维素复合制备免疫磁珠,纳米纤维素的加入可提高磁性脂质体的稳定性,同时可提供反应的官能团羧基。在纳米纤维素/脂质体免疫磁珠中加入高分子表面活性剂羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐,羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐的使用可减少磁球的团聚,降低磁球的粒径。在纳米纤维素/脂质体免疫磁珠的抗体修饰过程中,采用先制备抗体前体物 DSPE-PEG-抗体,再与脂质成分复合的方法,前体物的使用可较高的维持抗体的活性。

[0023] 该免疫纳米纤维素磁性脂质体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,能够识别并结合相应的抗原、抗体或核酸等,在外加磁场中分离富集迅速,可用于生物材料检测和分离纯化,在细胞分离、固定化酶、靶向药物和免疫检测等生物学领域有着广泛的应用前景。如制备的抗 -EpCAM 抗体修饰的免疫纳米纤维素磁性脂质体可进行外周血中肿瘤(乳腺癌)细胞的抓捕和富集,然后将富集的肿瘤细胞进行免疫染色分析计数,就可以指导临床进行个体化用药方案的评估。

具体实施方式

[0024] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细的说明。

[0025] 实施例 1 采用抗体前体物制备免疫纳米纤维素磁性脂质体

[0026] (1) 将 5.0mg DSPE - PEG-NH₂ 与 1.0mg 抗 -EpCAM 单克隆抗体混合,加入浓度为 1.0mg/mL 的 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC. HCL) 5.0mL 中反应 24 小时,8000-10000 分子量透析袋透析除去未反应的缩合剂;冻干后得抗体前体物 DSPE - PEG - EpCAM。

[0027] (2) 用薄膜分散法制备免疫纳米纤维素磁性脂质体。将卵磷脂 10.0mg、胆固醇 6.0mg、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐 2.0mg 和油溶性磁性纳米颗粒 3.0mg 混合溶于 10.0mL 油相氯仿中,孵育 20 分钟以上,放入茄形瓶中,旋转蒸发成脂质膜;

[0028] (3) 将形成的脂质膜与含有 2.0mg 纳米纤维素(棒状)和 2.0mg DSPE - PEG- EpCAM 的水溶液混合水化,并超声,即可得免疫抗 -EpCAM 单克隆抗体纳米纤维素 / 脂质体复合磁性微球。

[0029] 实施例 2 纳米纤维素磁性脂质体的制备

[0030] 将卵磷脂 5.0mg、胆固醇 2.0mg、DSPE-PEG-NH₂ 1.0mg 和油溶性磁性纳米颗粒 1.0mg 共溶于二氯甲烷中;混匀作为有机相,除去有机溶剂使成薄膜,然后加入含有羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐(浓度 0.3mg/mL) 和羧甲基纤维素的水相 5.0mL(纳米纤维素浓度 0.5mg/mL) 使脂质膜水化,水相为 0.9% 的生理盐水或 pH=5 至 9 的缓冲溶液,水化时超声 30min 以上,然后磁分离 3 次以上备用。

[0031] 实施例 3 免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备

[0032] 取固含量为 20%, 粒径 50~100nm 的氨基化纳米纤维素磁性脂质体(卵磷脂 / 胆固醇 / 纳米纤维素 / DSPE-PEG-NH₂) 溶液 1.0mL 与含有 2.0mg 抗人表皮生长因子受体 2(HER2) 单克隆抗体的溶液 1mL 混合,加入 5mg 的 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐,混合均匀,室温搅拌反应 48 小时后,磁分离洗涤后备用,所制备的免疫磁性脂质体当中磁珠与所含的单克隆抗体的重量百分比为 25 :1,其可放置在水与乙醇的混合溶液(乙醇的重量为 20%) 中保存。本实施例可扩展为固含量为 0.5%-30% 的氨基或羧基化磁珠。

[0033] 实施例 4 免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备

[0034] 取固含量为 20%, 粒径 300~500nm 的羧基化纳米纤维素磁性脂质体(卵磷脂 / 胆固醇 / 纳米纤维素 / DSPE-PEG-COOH) 溶液 1.0mL 与含有 2.0mg 抗表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 单克隆抗体的溶液 1.0mL 混合,加入 5.0mg 的二环己基碳二亚胺,混合均匀,室温搅拌反应 24 小时后,磁分离洗涤后备用,所制备的免疫磁性脂质体当中磁珠与所含的单克隆抗体的重量百分比为 50 :1,其可放置在水与乙醇的混合溶液(乙醇的重量为 10%) 中保存。本实施例可扩展为使用 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐、

N, N' - 羰基二咪唑、二环己基碳二亚胺、4- 二甲氨基吡啶或 N- 羟基琥珀酰亚胺中的一种或两种缩合剂。

[0035] 实施例 5 免疫纳米纤维素磁性脂质体的制备

[0036] 取固含量为 20%, 粒径 1000nm 的不含有氨基或羧基化纳米纤维素磁性脂质体 (卵磷脂 / 胆固醇 / 纳米纤维素) 溶液 1.0mL 与含有 2.0mg 抗表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 单克隆抗体的溶液 1.0mL 混合, 充分振荡混合均匀, 室温孵化 48 小时后, 磁分离洗涤后备用, 所制备的 EGFR 单克隆抗体修饰的磁珠当中磁珠与所含的 EGFR 单克隆抗体的重量百分比为 200 :1。本实施例可扩展为使用其它种类的抗体或抗原来制备免疫磁性脂质体。

[0037] 实施例 6 提供抗 -EpCAM 免疫纳米纤维素磁性脂质体的应用

[0038] 取浓度为 2.0mg/mL 的抗 -EpCAM 免疫纳米纤维素磁性脂质体 40 微升, 与乳腺癌患者穿刺液 300 微升混合, 加入 1.0mLPBS (0.1mol/L) 混合振荡孵育 30 分钟 ; 孵育后磁分离, 并水洗 3 次, 收集穿刺液中的乳腺癌细胞 ; 最后, 可将收集到的乳腺癌细胞进行免疫荧光染色, 并计数分析, 同时可进行基因及细胞水平的分析。

[0039] 上述实施例仅是为清楚地说明本发明所作的举例, 而并非是对本发明的实施方式限定。对于所属领域的普通技术人员来说, 在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而这些属于本发明的精神所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种免疫纳米纤维素磁性脂质体及其制备方法		
公开(公告)号	CN103961703B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201410164928.3	申请日	2014-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	上海裕隆医学检验所股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海裕隆医学检验所股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海裕隆医学检验所股份有限公司		
[标]发明人	穆海东 汪宁梅 梁晓飞		
发明人	穆海东 汪宁梅 梁晓飞		
IPC分类号	A61K39/395 A61K47/48 A61K47/38 A61K47/02 A61K47/36 G01N33/53 C12N5/09		
代理人(译)	宋玉霞		
审查员(译)	蔡放		
其他公开文献	CN103961703A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物学用纳米磁性材料的技术领域，涉及一种纳米磁性颗粒，具体为一种免疫纳米纤维素磁性脂质体及其制备方法。为核壳型结构，内核为磁性材料Fe₃O₄，中间层为脂质体和纳米纤维素的混合材料，最外层为包被在中间层上的抗体；其中纳米纤维素的质量含量为0.1%~50.0%，脂质体成分的质量含量0.5%~90.0%，磁性材料的质量含量0.1%~50.0%，本发明免疫纳米纤维素磁性脂质体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，能够识别并结合相应的抗原、抗体或核酸等在外加磁场中分离富集迅速，可用于生物材料检测和分离纯化，在细胞分离、固定化酶、靶向药物和免疫检测等生物学领域有着广泛的应用前景。