

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

標的導向型磁性免疫藥物載體之合成及其實際應用之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2216-E-041-005-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：李佳芬

計畫參與人員：林家正

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 18 日

標的導向型磁性免疫藥物載體之合成及其實際應用之研究 (I)

計劃編號：NSC 93-2216-E-041-005

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計劃主持人：李佳芬 嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計劃參與人員：林家正 國立台灣大學化學工程研究所

Abstract

The treatment of solid tumors using chemotherapy has been limited by systemic toxicity resulting in sub-optimal dosing, and by multiple other mechanisms (e.g. multiple drug resistance of the tumor cells, tumor architecture limiting access of drug to the tumor cells, volume of distribution for drug) resulting in limited efficacy. Regional therapy achieved through targeted drug delivery could improve efficacy by increasing the drug concentration at the tumor while limiting systemic drug concentration. Higher drug concentration at the tumor may be able to overcome the multiple drug-resistant phenotype. One type of regional therapy, magnetic particles carrying drug, may also achieve wide dispersion throughout the tumor through the action of the magnetic force on the particles. Regional drug delivery, however, will not be effective at treating distant sites of tumor metastases unless the drug is targeted to each known site. The use of magnetic targeted carriers (MTCs) for drug delivery aims to target drug to specific sites through the selective application of a magnetic field, and to achieve prolonged release of high, localized concentration of drug by retention of MTCs in the region of interest. The disadvantages of the conventional MTCs is unable to locate on the tumor for a long time, but disperse to all over the body once the magnetic field is removed away. In order to improve this disadvantages, the "magnetic targeted immunological carriers" are synthesized and investigated. This study is completed during three years; we will synthesis two kinds of "magnetic targeted immunological carriers" with the different structure. Moreover, we will study various factors, which influence the properties of the "magnetic targeted immunological carriers".

摘要

本計畫主要是進行"標的導向型磁性免疫藥物載體"的研發。主要的目的是改良目前一般"磁性標的導向藥物"的缺點,使得標的導向型藥物具有更好的功能。一般的藥劑大多藉著在體內的分佈移動而到達標的病灶部位進行治療,當藥物在體內傳送的期間由於廣泛的分佈在其他非標的之正常部位,因而導致副作用經常發生,另一方面,到達標的部位的藥物又由於被分解或代謝而造成濃度太低,因此不易達到明顯的藥效。特別是在腫瘤的治療過程中,因為抗癌藥物往往會對正常組織造成很大的傷害,因此在實際治療的過程中,常因副作用的關係而變更抗癌藥物的使用種類,甚至中斷或改變治療的時程,因而導致藥效不彰。為了解決這個問題,即有學者開始進行"標的導向型藥物"的研發,這種藥物主要是能夠經由引導而直接到達標的腫瘤的部位,使得抗癌藥物可以直接針對腫瘤組織進行治療,既不會對正常組織造成傷害,也可以使得有較高的藥物濃度集中在腫瘤組織上進行有效的治療。"標的導向型藥物"的藥物引導方式有許多種方法,"磁場引導方式"是其中一種,目前一般的"磁性標的導向藥物"有一些缺點極待改良: 1. 必須在磁場作用下才能穩定的標定在腫瘤細胞上,如果將磁場移開則"磁性標的導向藥物"就無法久留於標定的腫瘤組織上,而會擴散到體內其他的部位,造成副作用的產生, 2. 藥物的釋放速率很快,無法在腫瘤細胞增長的週期中持續釋放出藥物加以抑制腫瘤細胞的增長。為了改進這些缺點,本計畫預計研究開

發出"標的導向型磁性免疫藥物載體"其具有三種功能: 1. 可經由外在磁場的引導而標定在特定的組織上(例如: 腫瘤組織上), 2. 可藉由"標的導向型磁性免疫藥物載體"表面所接的特殊蛋白質(抗體)與腫瘤組織上的特殊抗原結合, 因此使得"標的導向型磁性免疫藥物載體"可以較長的時間停留在腫瘤組織上, 3. "標的導向型磁性免疫藥物載體"所包覆的藥物可以經由控制釋放的機制而緩慢適時的釋放出來, 使得藥物可以在整個腫瘤組織的增長週期中持續的釋放出來以有效的抑制腫瘤組織的增長。

1、前言

一般來說標的導向型藥物必須具有兩種功能: 1. 控制藥物標定導向: 藥物必須能夠停留在適當的病灶上, 而不會停留在正常的組織上, 2. 控制藥物釋放傳輸: 當在體內傳輸時藥物不會釋放出來, 而當藥物到達病灶上時, 才將藥物釋放出來。以下將對於"控制藥物標定導向"與"控制藥物釋放傳輸"分別加以詳細敘述其相關之背景與相關之研究情況。一、控制藥物標定導向藥物的標定導向性研究在很早以前就已開始進行, 最直接的方法就是在標的目標前直接將藥物送入, 或者在標的附近加以投藥。但是在許多治療的場合, 我們希望能夠防止藥物擴散到其他部位, 同時也希望藥物的濃度能夠長久維持在該病灶的部位, 而且增長停留的時間, 因此有各種標的導向性的方法被加以研究。二、控制藥物釋放傳輸在醫學的領域上, 為了人類的健康, 已不斷發展出各種新穎的醫療技術, 開發出許多具有高療效的新藥物。但是有些藥物在使用時, 會有一些問題產生, 例如: (一) 有些藥物在體內的崩解速率很快, 因此必需頻繁的服藥, 造成相當高的不便性, (二) 有些藥物服用後雖然對病情有所改善, 但是會對胃部造成刺激, 引起胃潰瘍等副作用, (三) 有些治療癌症的藥物在服用或注射後, 除了會抑制腫瘤細胞的生長之外, 也會對健康的細胞產生負面的影響。我們預計結合前幾年的研究經驗以及所研發出的技術, 合成"標的型磁性免疫藥物載體", 此種磁性藥物載體具有三種功能: 1. 可經由外在磁場的引導而標定在特定的組織上(例如: 腫瘤組織上), 2. 可藉由免疫乳膠顆粒表面所接的特殊蛋白質(抗體)與腫瘤組織上的特殊抗原結合, 因此使得免疫乳膠顆粒可以較長的時間停留在腫瘤組織上, 3. 免疫乳膠顆粒所包覆的藥物可以經由控制釋放的機制而緩慢釋放出來。如此即可改善前面所提到: 磁場移除之後, 磁性標的型抗癌藥物容易由腫瘤組織上脫離的問題。

2、實驗

2.1 藥品

氮-異丙基丙烯酸醯胺(*N*-isopropylacrylamide, NIPAAm)、交聯劑 N,N' -methylenebisacrylamide(MBA)、起始劑Ammonium persulfate(APS)、氨水(28%)、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、酒精(95%)($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)、3-Aminopropyl-triethoxysilane 99%、Triethoxyvinylsilane 97%、Tween[®]20、(3-Mercaptopropyl)-trimethoxysilane 95%、Acrylic acid 99.5%、Dodecyl sulfate sodium salt (SDS)。

2.2 Fe₃O₄/NIPAAm with crosslinker(MBA) and surfactant 乳膠顆粒之合成

首先以共沉澱法合成Fe₃O₄奈米微粒，稱為磁性流體。取FeCl₂·4H₂O 1.72g, FeCl₃·6H₂O 4.7g, 並加入 80ml 的去離子水溶解，於 60°C 水浴中通氮氣預熱 10 分鐘後，加入 10ml 的 28% 氨水，在 60°C、300rpm 轉速下攪拌 30 分鐘，室溫冷卻後置於冰箱下層收藏。取適量磁性流體先與 SDS 水溶液均勻混合攪拌，再與 2g NIPAAm、0.0546g MBA、80g H₂O 均勻混合，於 50°C 水浴中通氮氣預熱 10 分鐘後，加入 0.04g APS、20g H₂O，在 50°C、300rpm 轉速下攪拌 120 分鐘。其間改變 SDS 含量。

2.3 Fe₃O₄(經由 silane 表面處理)/NIPAAm with crosslinker(MBA) and surfactant 乳膠顆粒之合成

首先以共沉澱法合成Fe₃O₄奈米微粒，稱為磁性流體。取FeCl₂·4H₂O 1.72g, FeCl₃·6H₂O 4.7g, 並加入 80ml 的去離子水溶解，於 60°C 水浴中通氮氣預熱 10 分鐘後，加入 10ml 的 28% 氨水，在 60°C、300rpm 轉速下攪拌 30 分鐘，室溫冷卻後，利用磁板將Fe₃O₄與水溶液分離，再用去離子水清洗，重複數次，再用酒精取代去離子水重複前述步驟數次，最後變成以酒精為溶劑的溶液，再加入 silane 於 300rpm 下放置一天，用酒精洗滌數次，再用去離子水洗滌數次，置於冰箱下層收藏。取適量磁性流體先與 SDS 水溶液均勻混合攪拌，再與 2g NIPAAm、0.0546g MBA、80g H₂O 均勻混合，於 50°C 水浴中通氮氣預熱 10 分鐘後，加入 0.04g APS、20g H₂O，在 50°C、300rpm 轉速下攪拌 120 分鐘。其間改變 SDS 含量、silane 種類、反應起始條件、界面活性劑種類及添加 AA/MAA 的含量。

2.4 與前面實驗步驟相反的逆向超作實驗流程

也就是先合成 NIPAAm 與 AA 的 copolymer，將 Fe²⁺、Fe³⁺ 加入均勻擴散，再把氨水加入合成磁流，希望能在 copolymer 中嵌入磁流。首先將 2g NIPAAm、0.0546g MBA、0.13g AA、80g H₂O 混合均勻，於 50°C 水浴中通氮氣預熱 10 分鐘後，加入 0.04g APS、20g H₂O，在 50°C、300rpm 轉速下攪拌 120 分鐘，冷卻 30 分鐘加水 100ml 稀釋，將不同比例含量的 Fe²⁺ Fe³⁺ 溶於 100ml 水中，並將此水溶液加入前面合成的乳液中，攪拌 6 或 30 分鐘，最後將氨水加入使磁流生成。

2.5 複合膠體之型態粒徑觀察

以 JEOL JSM-1200 EX II Transmission Electron Microscope 穿透式電子顯微鏡觀察各實驗配方下所呈現的型態及粒徑大小。

3、結果與討論

3.1 Fe₃O₄/NIPAAm with crosslinker(MBA) and surfactant 乳膠顆粒之合成

在加入磁流之前，先將磁流與 SDS 均勻攪拌，利用 SDS 的特性將磁流原有的特性包覆其中，而外部呈現與 NIPAAm 相近的性質，可使磁流與 NIPAAm 和平共存，甚至有機會可以靠著彼此間的 interaction 而達成我們所期待的 coreshell 型態，內部為 Fe₃O₄ 外部為 NIPAAm 與 AA 的 copolymer，可以大幅增加以後應用在藥物儲存的空間上，且最外部可以再接枝蛋白質，加強其應用性，而合成出來的結果是呈現 micro 等級的 suspension particle，但只要沒有 SDS 幾乎一定發生相分離。

3.2 Fe₃O₄(經由 silane 表面處理)/NIPAAm with crosslinker(MBA) and surfactant 乳膠顆粒之合成

由圖 1.圖 2.圖 3. 發現 2.2 實驗，對於磁流的保護似乎不

強，為了加強磁流的分散性，所以在合成磁流及純化後，加入 silane 與磁流水合鍵結後，產生共價鍵擁有比較好的保護效果，不易被外在條件影響，因為化學鍵結的結構較穩定，而單純靠物理性的力量可能是不夠的，而由圖 4. 也可以證實此點，出現我們所要的 coreshell 型態，但出現的機率不高，也就是說 silane 與磁流的鍵結程度不高，因此改變了幾種 silane 類型，有 C=C 型態，Amino 官能基和 SH 官能基型態，分別為了與 NIPAAm 的鍵結力、親和力，嘗試了多組配方與組合，發現 C=C 的組別幾乎失敗，Amino 與 SH 官能基組別成功率較高，同樣出現 suspension particle 的狀態，而且若不加 SDS，反應幾乎都是失敗的，最後都是以 coagulation 收場，但有個發現當減少 NIPAAm 含量不使用 SDS 也不會出現相分離，另外還發現一個有趣的現象，AA 與氨水在某一特定比例下可以不靠 SDS 的狀況下，產生 mm 等級且均勻大小的巨大 particle。

3.3 與前面實驗步驟相反的逆向超作實驗流程

當 FeCl₃ 的量介於 0.2~0.25g FeCl₂ 的量約 0.075g 時開始出現 Fe₂O₃ 變成 Fe₃O₄ 的現象，Latex 的 pH 值對於少量的 FeCl₃ FeCl₂ 似乎無法造成影響，應該是少量的氨水與少量的 FeCl₃ FeCl₂ 剛好反應完了，即使後半段再加入氨水也無法使反應再進行，更何況 FeCl₃ FeCl₂ 溶液是成酸性的 (pH 約 2.7)，所以少量的 FeCl₃ FeCl₂ 與少量氨水的實驗組別，當然會出現 Fe₂O₃ 的現象，若執意大幅提升溶液的 pH 值，FeCl₃ FeCl₂ 一加入便直接變成 Fe₃O₄，這樣更是失敗中的失敗，Fe₃O₄ 完全沒進入 NIPAAm 中，因此此實驗方法還是取決於 FeCl₃ FeCl₂ 的量，另外若將 FeCl₂ 含量提升至 FeCl₃ 的 70-80weight%，這是少量 Fe²⁺ Fe³⁺ 出現 Fe₃O₄ 的另一種方法，可以從其他的小實驗中發現，形成 Fe₃O₄ 的條件並不是只有 pH 值而已，與 FeCl₂ 的量也是有相關。由圖 6. 可得到形態表現不錯的結果，但只出現在相近的配方，而其他的就如圖 7. 所表現的樣子，相當的不符合期待；由圖 8.9. 發現當攪拌時間較久，氨水量多一些，可以得到較好的實驗結果；由圖 10. 發現改變交聯劑含量，對於無磁流的 latex particle size 並無太大影響，但很明顯發現整個 particle 密度越來越高，導致磁流可能進去的量會減少，所以加入磁流後的 latex，其 TEM 圖片便沒有像圖 6. 那樣漂亮的結果，還有合成磁流前後，particle size 並無明顯改變，因此可以說只要控制好原使的 particle size，就能做出我們想要的大小的磁性乳膠顆粒。其實實驗 2.2~2.3 做了相當多組的實驗，多少都想要轉換個想法來檢視一下這個實驗，於是走向反向思考這條路，於是把整個反應步驟反了過來，而結果出現了變化，原本是希望做出 Fe₃O₄ 嵌在聚合物中，但因配方上的問題，做出來的是 Fe₂O₃ 嵌在聚合物中，Fe₃O₄ 出現的條件下，並沒有我們要的型態，但在某條件下，出現 Fe₂O₃ 時，會產生均勻的 coreshell 型態，外部是 NIPAAm-AA 的 copolymer，內部是嵌入的 Fe₂O₃，由於 Fe₂O₃ 也會出現磁滯效應，只是效果沒有 Fe₃O₄ 的好，但其所呈現的型態的確是比 Fe₃O₄ 存在的 sample 下好的太多太多了，因此目前是以形態為優先考量，以形態成功的範例再來改進缺失。

3.4 複合膠體之型態粒徑觀察

挑選巨觀上可以接受的 sample，使用 TEM 觀察其真實結構型態，發現實驗 2.4 部分 sample 出現我們想要的 coreshell 型態，而 2.4 之前的實驗很少出現理想中的型態。

表一. 實驗 2.2

SDS(mM)	$\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{g})$ (NH_2)	APS(g)	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5(\text{g})$	外觀
14	0.2	0.04	0	均勻
14	0.2	0.04	0	均勻
14	0.2	0.04	0	均勻
14	0.2	0.04	0.034	均勻
0	0.2	0.04	0.034	形成膠體

表二. 實驗 2.3-1 (NIPAAm 2g, MBA0.0546g)

AA(g)	$\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{g})(\text{NH}_2)$	APS(g)	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5(\text{g})$	$\text{NH}_4\text{OH}(\text{g})$
0	0.8	0.04	0.034	0
0	0.8	0.04	0.034	0
0.13	0.8	0.04	0	0
0.39	0.8	0.04	0	0
0.65	0.8	0.04	0	0
1.3	0.8	0.04	0	0
0.13	0.8	0.04	0	0.03
0.39	0.8	0.04	0	0.09
0.65	0.8	0.04	0	0.15
1.3	0.8	0.04	0	3

表三. 實驗 2.3-2 (NIPAAm2g, MBA0.0546g)

NIPAAm(g)	MBA(g)	SDS(mM)	$\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{g})$	APS(g)	外觀
2	0.0546	0	0.2	0.04	相分離
2	0.0546	0	0.4	0.04	相分離
2	0.0546	28	0.2	0.04	均勻
2	0.0546	14	0.2	0.04	均勻
2	0.0546	10	0.2	0.04	均勻
2	0.0546	7 (CMC)	0.2	0.04	均勻
2	0.0546	5	0.2	0.04	均勻

表四. 2.3-3 ($\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{SH})$)

NIPAAm (g)	SDS	APS	Redox	外觀結果
0.5		0.04		Fe_3O_4 沉澱上半部澄清
0.5			V	Fe_3O_4 沉澱上半部澄清
1			V	Fe_3O_4 沉澱上半部澄清
1		0.04		相分離
0.5	V	0.01		Fe_3O_4 沉澱上半部成茶色

表五. 2.3-4 (Fe_3O_4 (C=C : NH_3 = 1 : 1))

Fe_3O_4	MBA	APS	Redox	外觀結果
V		0.04	V	Fe_3O_4 沉澱上半部澄清
V		0.04		Fe_3O_4 沉澱上半部澄清
V		0.04		相分離
V	V	0.01		Fe_3O_4 沉澱上半部澄清
V		0.01		相分離

表六. 實驗 2.4-1 (NIPAAm 1g, AA 0.13g, MBA 0.0546g)

FeCl_3 (g)	FeCl_2 (g)	實驗觀察
0.1	0.037	Fe_2O_3 大部分懸浮, 溶液呈橘色
0.5	0.184	Fe_3O_4 全部沉澱(黑色), 溶液呈無色
0.2	0.074	Fe_2O_3 全部沉澱(橘色), 溶液呈無色
0.3	0.111	Fe_3O_4 全部沉澱(黑色), 溶液呈無色
0.25	0.925	Fe_3O_4 全部沉澱(黑色), 溶液呈無色

表七. 實驗 2.4-2 (NIPAAm 1g, AA 0.13g, MBA 0.0546g)

$\text{FeCl}_3(\text{g})$	$\text{FeCl}_2(\text{g})$	實驗觀察
0.1	0.037	Fe_2O_3 部分懸浮, 溶液呈橘色, 久置沉降
0.1	0.05	Fe_2O_3 部分懸浮, 溶液呈橘色, 久置沉降
0.1	0.06	Fe_2O_3 部分懸浮, 溶液呈橘色, 久置沉降
0.1	0.07	Fe_3O_4 部分懸浮, 溶液呈黑色, 緩慢沉降
0.1	0.08	Fe_3O_4 部分懸浮, 溶液呈黑色, 緩慢沉降

表八. 實驗 2.4-3 (NIPAAm 1g, AA 0.13g)

MBA(g)	$\text{FeCl}_3(\text{g})$	$\text{FeCl}_2(\text{g})$	實驗觀察
0.1092	0.1	0.07	溶液成橘褐色
0.1092	0.1	0.08	溶液成橘黑色
0.1092	0.1	0.09	溶液成黑色
0.1638	0.1	0.08	溶液成黑色
0.1638	0.1	0.09	溶液成黑色

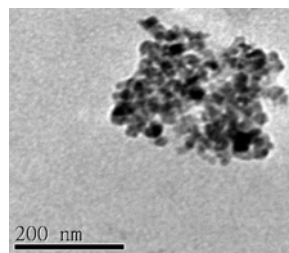


圖 1. 實驗 2.3 (實驗方式為將所有配方除起始劑, 一開始便一起加入, 再起使反應)

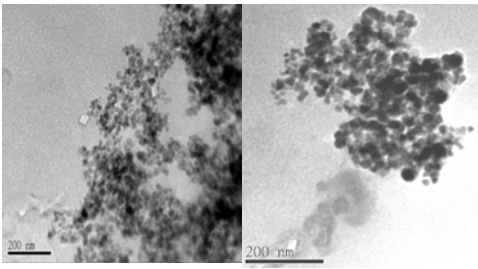


圖 2. 實驗 2.3 (實驗方式為磁流先與 SDS 均勻混合, 再與其他配方混合, 最後起始反應)

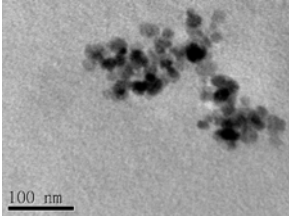


圖 3. 實驗 2.3 (與圖 2 作法相同, 只是換成在室溫下用 redox 起始反應)

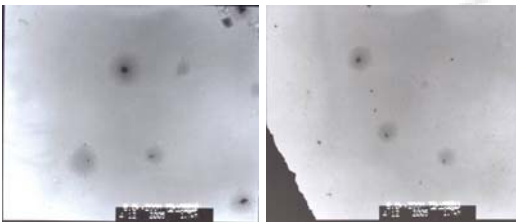


圖 4. 實驗 2.3 (silane 為 Amino group 的 AMEO, 高溫起始)



圖 5. 實驗 2.3 (silane 為 Amino group 的 AMEO, 室溫起始)

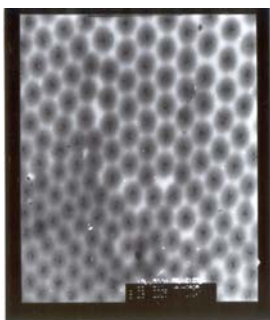


圖 6. 實驗 2.4 (FeCl_3 0.01g, FeCl_2 0.037g 組別)

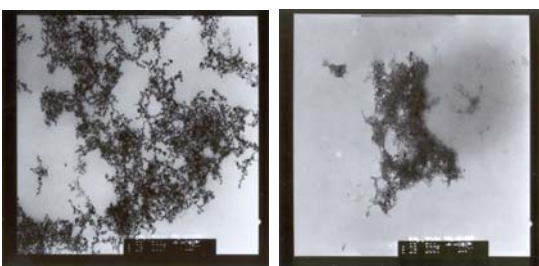


圖 7. 實驗 2.4 (大部分失敗的配方都長這樣)

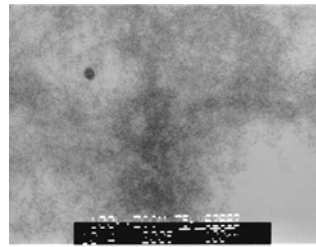


圖 8. 實驗 2.4 (攪拌 6 分鐘, 氨水 10ml, FeCl^{3+} 0.1g, FeCl^{2+} 0.037g)

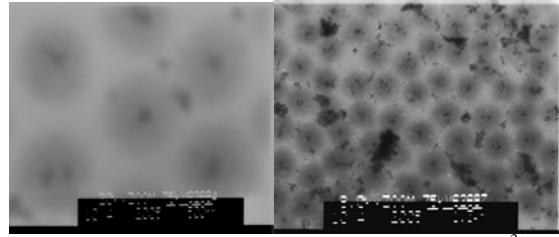


圖 9. 實驗 2.4 (攪拌 30 分鐘, 氨水 10/25ml, FeCl^{3+} 0.1g, FeCl^{2+} 0.037g)

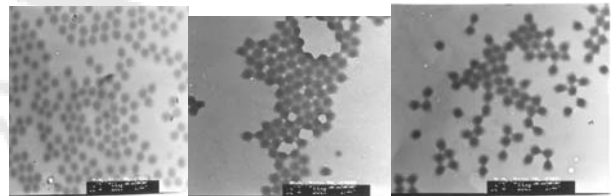


圖 10. 實驗 2.4 (依序為 MBA 0.0546g 0.1092g 0.1638g, 均無磁流)

4、結論

本研究以研究合成出磁流為core高分子為shell, 也就是 coreshell 型態的乳膠顆粒, 實驗方法從 2.2 到 2.4, 2.2 到 2.3 是一系列的補強步驟, 不過發現成功率不高, 因此才會衍生出 2.4 的實驗手法, 而結果也並沒有太令人失望, 不過要加強的是, 希望能找出一個能讓 Fe_3O_4 出現的配方, 且擁有我們所要的 coreshell 型態。

5、參考文獻

1. D. Yonghui, Y. Wuli and W. Changchun, Adv. Mater. 2003, 20, 1729-1732.
2. M. Ming, Z. Yu and Y. Wei, Colloid and Interfaces A, 2002, 219-226.
3. K. Hideki and M. Tadashi, J. of Colloid and Interface Science, Vol.141, No.2, 1991, 505-511.
4. M.K. Yoo, Y.K. Sung, Y.M. Lee and C.S. Cho, Polymer, 41, 2000, 5713-5719