

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 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2221-E-041-014-
執行期間：95年08月01日至96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：碩士班研究生-兼任助理：簡正安



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 96 年 09 月 27 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

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 整合型計畫
計畫編號：NSC 95－ 2221 － E － 041 － 014 －
執行期間： 95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

計畫主持人：李佳芬
共同主持人：
計畫參與人員： 簡正安



成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

中 華 民 國 96 年 9 月 26 日

中文摘要

本論文以氮-異丙基丙烯醯胺(N-isopropylacrylamide, NIPAAm)和丙烯酸(acrylic acid, AA)的乳膠顆粒，在改變 AA/NIPAAm 比例、交聯劑濃度、PH 值、溫度及磁性粒子濃度下進行各項測試。

接著進行磁性乳膠顆粒的製備實驗，與傳統“氧化鐵/高分子”合成方法有所不同，本實驗先將高分子乳膠顆粒合成，利用乳膠顆粒的 AA 鏈段官能基(-COOH)與鐵離子先鍵結成-COOFe²⁺及-COOFe³⁺，當氨水參與反應時，Fe₃O₄ 會以 in-situ 的方式形成，於是磁性乳膠顆粒形成。

TEM 圖形下觀察粒徑大小及型態；利用紫外光-可見光分光光度計在改變溫度下測量 450nm 下的吸收值變化，得出 LCST 變化；利用紫外光-可見光分光光度計在 272nm，於不同時間下取樣測試咖啡因濃度—藥物包覆釋放實驗；利用紫外光-可見光分光光度計在 280nm 測試不同組別的 BSA 濃度，可反推鍵結上的 BSA 含量。

關鍵詞：氮-異丙基丙烯醯胺，丙烯酸，溫度感應性，磁性乳膠顆粒，
乳化聚合反應

英文摘要

In our study, we discuss the copolymer of NIPAAM (N-isopropylacrylamide) and AA (acrylic acid) in different ratio of AA/NIPAAM and in different concentration of crosslinking agent. We test this copolymer in some experiments including TEM, LCST, drug release and protein (BSA) bonding.

Then synthesizing the magnetic hydrogel, we use different method to synthesize “iron oxide/polymer” from the traditional method. In our work, we firstly synthesize the hydrogel. Second, using the functional group(-COOH) on the hydrogel surface to bond with Fe^{2+} and Fe^{3+} . Finally, we put ammonia into the latex, and we can get magnetic hydrogel.

According to each test about poly(NIPAAM-co-AA), we choose suitable group to synthesize magnetic hydrogel. Then we test all events described in the first paragraph. From all testing experiments, we can realize the properties of the (magnetic) hydrogel and the effect on experimental results from each parameter.

Key words : N-isopropylacrylamide , acrylic acid , thermo-sensitive , magnetic polymer latex , emulsion polymerization

1、前言

當磁性與溫度感應性，兩種相當便利的性質綜合在一起時，可想而知會是一個更為智慧的複合性質。傳統有機無機複合材料都是以機械揉混方式將有機材料與無機材料混合在一起，其均勻度不高造成每批材料的性質差異，本研究利用乳膠顆粒上的官能基與磁流鍵結，使得複合材料內的無機磁性材料可以均勻分布且可避免磁流聚集。以往的藥物控制釋放都是控制釋放速率，但對於一些毒性較強的藥物而言（如：惡性腫瘤的化療藥物），局部投藥就相當重要，此時利用磁性兼具溫度敏感性藥物載體就相當可行，首先利用磁場引導藥物載體至患部，由於體溫高於 LCST，因此藥物在引導過程中是被鎖在藥物載體內，接著在患處施以冰敷降低患部溫度，當低於 LCST 時藥物載體便膨潤開來，藥物便釋放出來，直接於患部作用，若使用特殊官能基接上抗體，當磁性乳膠顆粒遇標的物時會與疾病的抗原結合，乳膠顆粒停留在需要治療之處，使得藥物更能準確作用在標的物上。

2、實驗

2.1 藥品

四水合氯化亞鐵 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、六水合氯化鐵 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、聚丙烯酸 PAA oligomer(poly acrylic acid)分子量 2000、氨水(ammonia hydroxide)(28%)、氮-異丙基丙烯醯胺(*N*-isopropylacrylamide, NIPAAM)、丙烯酸(acrylic acid, AA)、交聯劑(*N,N'*-methylenebisacrylamide, MBA)、起始劑(ammonium persulfate, APS)無鈣鎂磷酸鹽緩衝液粉末(Phosphate Buffer Saline,PBS)、偶合劑 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide(EDC)、胎牛血清白蛋白 Bovine Serum Albumin(BSA)。

2.2 溫度敏感型乳膠微粒的合成方法

- (1) 在反應器中加入 NIPAAM、AA 單體、MBA 交聯劑、去離子水，在 70°C 的水浴槽中以 300rpm 攪拌 30 min 使達溫度平衡，期間連續通以高純度氮氣，避免轉化率過低。
- (2) 攪拌 30 min 使達溫度平衡後，加入起始劑 APS，反應兩小時。

2.3 磁性溫度敏感型乳膠微粒的製備

- (1) 在反應器中加入 300ml 的 Latex (2.2 合成的乳液)，在 25°C 300rpm 下平衡 10min，再加入 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ & $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 使離子擴散平衡 30min。
- (2) 平衡 30min 後，加入 NH_4OH ，反應 30min (本研究利用共沉法來合成 Fe_3O_4 奈米微粒)。

2.4 蛋白質的接枝

1. 先吸附(Pre-adsorption)方式

- (1) 將透析過之乳膠顆粒冷凍乾燥，取定量 (10mg) 乳膠微粒溶於緩衝液(pH=7.4 與 pH=9) 中，並使用超音波震盪 10 分鐘，讓共聚物顆粒懸浮於溶液中。
- (2) 取已知量 BSA(4mg) 溶於上述溶液，總體積約 10ml，進行吸附步驟約 2 小時。
- (3) 取偶合劑 E.D.C. 4mg 加入步驟(2)中，進行-COOH 的活化與化學鍵結反應約 4 小時。

2. 脫附(Desorption)

以超音波震盪約 10 分鐘後，再於高速離心機下以 12000rpm 進行離心約 20 分鐘，將離心後的上層液取出。

3. 蛋白質濃度的測定

在波長 280nm 時之吸收度決定蛋白質濃度。將已知濃度之蛋白質標準容易對其吸收度作圖，得一標準曲線。

4. Protein Balance

將過濾後的上層液置於紫外光-可見光分光光度計，在 280nm 的波長下測其吸收度以定量分析已鍵結 BSA 的濃度。

2.5 藥物包覆釋放測試及膨潤性測試

1. Caffeine calibration curve 之建立

配製不同濃度之 Caffeine solution，測定在波長 272nm 之吸收值，得 Caffeine 之 Calibration curve。

2. 試片之製作

將透析過的 Latex 凍乾，取 0.3g 的 sample 加入咖啡因溶液(0.024g 咖啡因/10g 去離子水)，接著利用超音波震盪 10 分鐘，置於 4°C 的環境下 3 小時達膨潤平衡，再利用凍乾得到含有咖啡因的共聚合 sample，取 0.05g 的 sample，倒入模具，利用 9 噸的壓力壓成錠狀，直徑約 1.3mm，厚度約 0.4mm。

3. 藥物釋放及膨潤測試

將錠片置入 50 c.c.的 37°C pH=7.4 緩衝

液中 3 小時，固定時間下取出 3 c.c. 的溶液，進行在波長 272nm 之吸收值測定，計算出之釋放百分率，做出釋放百分率 V.S. 時間圖。

2.6 蛋白質接枝後的藥物包覆釋放測試

1. BSA 鍵結

(1) 將合成之磁性乳膠顆粒冷凍乾燥，取定量(50mg)磁性乳膠微粒溶於 50ml, PH=7.4; PH=9 的緩衝液中，並使用超音波震盪 10 分鐘，讓共聚物顆粒懸浮於溶液中。

(2) 取已知量 BSA(20mg)溶於上述溶液，總體積約 50ml，進行吸附步驟約 2 小時。

(3) 取偶合劑 E.D.C. 20mg 加入步驟(2)中，進行-COOH 的活化與化學鍵結反應約 4 小時。

(4) 將上述溶液離心二十分鐘後取固體成份凍乾。

(5) 將凍乾物 0.3g 加入咖啡因溶液(0.024g 咖啡因/10g 去離子水)，接著利用超音波震盪 10 分鐘，置於 4⁰C 的環境下 3 小時達膨潤平衡，再利用凍乾得到含有咖啡因且已經鍵結 BSA 之磁性乳膠顆粒粉末。

(6) 將上述粉末取 0.005g 置入 50 c.c. 的 37⁰C pH=7.4 緩衝液中 3 小時，固定時間下取出 3 c.c. 的溶液，進行在波長 272nm 之吸收值測定，計算出之釋放百分率，做出釋放百分率 V.S. 時間圖。

3、結果與討論

3.1 蛋白質的化學鍵結

3.1.1 BSA(牛血清白蛋白) calibration curve 之建立

實驗所得之回歸曲線為：

$$y=0.6826x \text{ (at PH7.4)}$$

$$y=0.6301x \text{ (at PH9)}$$

其中，x：在 272nm 處之 UV 吸收值

y：對應之 BSA 濃度(g BSA/g water)

3.1.2 化學鍵結結果

(1) 不同含量的 AA 對 BSA 鍵結的影響

由圖 1 中各圖的比較可看出 AA 含量多的組別可以鍵結較多的 BSA，在 25 及 37⁰C 下均為同樣的結果。這是因為乳膠顆粒主要是以 AA 的酸基來合 BSA 做鍵結。

(2) 不同含量的磁性粒子對 BSA 鍵結的影響

由圖 1 中各圖的比較可看出大部份情況都是磁性粒子越多，鍵結率越低，這主要是因為磁性粒子會產生立體障礙而影響 BSA

的鍵結，加上磁性粒子也會搶走可以產生鍵結的 AA 的酸基；但是在 25⁰C 的部份組別我們發現有部份磁性粒子多反而鍵結情況較好的結果產生，猜測原因可能是當磁流量多時，溶液是比較鹼性的，PAA 會比較分散溶液中，且顆粒較澎潤，所以顆粒比較內層的酸基跟分散在溶液中的 PAA 酸基都可以利用到，但是當磁性粒子含量少時，溶液較酸性，PAA 會因為氫鍵而比較吸附在顆粒的殼層，使得顆粒較不澎潤，使 BSA 較難跟內部的酸基產生鍵結，因此可利用的酸基減少了，所以才會有部份磁性粒子少而鍵結量較少的情況。

(3) 不同 PH 值對 BSA 鍵結的影響

由圖 1 中各圖的比較可看出 PH 值越高鍵結量越低，因為 BSA 的等位點大約是 PH4.7，所以當 PH 值大於 4.7 時 BSA 分子團本身是帶些許負電的，所以 PH 值越高，酸基解離的越多，會變成 COO⁻，跟 BSA 會有靜電斥力，所以鍵結量會變低。

(4) 不同溫度對 BSA 鍵結的影響

由圖 1 中各圖的比較，我們並沒有辦法明確指出一個明顯趨勢，這是因為溫度擁有兩種對於 BSA 鍵結的功能，首先，溫度上升，乳膠顆粒因有溫度敏感性，會漸漸切斷乳膠顆粒與水分子的氫鍵，使得乳膠顆粒體積及表面積縮小，與 BSA 鍵結率下降；第二，溫度上升，鍵結活性上升，與 BSA 鍵結率上升。在競爭下，溫度本身含有的兩種因素互相消長，再加上磁性粒子影響粒徑大小的因素，所以並沒有一個比較明顯的趨勢。

3.2 藥物包覆釋放測試及膨潤性測試

3.2.1 Caffeine calibration curve 之建立

實驗所得之回歸曲線為：

$$y=2 \times 10^{-5}x - 9 \times 10^{-8}$$

其中，x：在 272nm 處之 UV 吸收值

y：對應之 Caffeine 濃度(g caffeine/g water)

3.2.2 磁性乳膠顆粒之藥物包覆釋放測試

(1) 不同 AA/NIPAAAM 比例對藥物包覆釋放的影響

由圖 3 發現 AA 含量少的組別，藥物釋放較快，原因是當 AA 含量少，其乳膠顆粒的 LCST 較低，所以在 37⁰C 下，乳膠顆粒的 PNIPAAAM 部份呈現較 rigid 的狀態，在乳膠顆粒表面的 AA 鏈段呈現較 soft 的部份，AA 含量較少的組別會呈現顆粒與顆粒間的空隙

較大，所以會讓原本就在顆粒間隙的藥物釋放較快；AA 含量較多的組別則相反；但是有時候會有 AA 含量多但是反而釋放比較快的情況，這主要是因為 AA 含量多的時候親水性比較好，所以錠片比較容易碎裂而容易裂成碎片而分散於溶液中，導致顆粒跟溶液的接觸面積上升，所以會釋放比較快。

(2) 不同磁性粒子含量對藥物包覆釋放的影響

從圖 4 看來，藥物釋放速率及藥物釋放量，在交聯劑添加量較少時，磁流比較分散在殼層， Fe_3O_4 : 4% > 2%，這可能是跟乳膠顆粒內的釋放路徑(孔隙連接而成的路徑)有關，由示意圖 2 可以更清楚理解，先從 2% Fe_3O_4 的組別來看，因為磁性粒子的大小很小，約數十 nm，要進入乳膠顆粒的間隙空間並不是難事，因此磁性粒子就會去阻擋藥物進入乳膠顆粒，成為藥物進入乳膠顆粒與藥物從乳膠顆粒釋放的阻力，而 2% Fe_3O_4 相對於 4% Fe_3O_4 來說是較少的，所以阻力上是較小的，因此可以進入較深層的乳膠顆粒，但反過來說，藥物釋放出來時，要經過較長的路徑且路徑上依然擁有阻力；反觀 4% Fe_3O_4 的組別來看，由於一開始的阻力就比較大，所以藥物就只能進入到較淺層的乳膠顆粒，而藥物釋放時，雖然路徑阻力較大，但藥物就在乳膠顆粒表面附近，釋放的速率及量當然就比 2% Fe_3O_4 組別來的快又多；相較之下，2% Fe_3O_4 組別在高交聯度時，因為此時磁流比較集中在核的部分，比較不會影響藥物進入，所以 2% Fe_3O_4 可以使較多的咖啡因進入乳膠顆粒，且藥物可以進入到較深層的部分，藥物釋放時又可在低阻力下進行，所以釋放的量與速度都會比 4% Fe_3O_4 還要來的多且快。

另外當溫度由 37°C 降低至 25°C 時交聯劑濃度較低的組別會釋放出較多的咖啡因，這是因為高溫時顆粒處於比較緊實的狀態，當溫度低於 LCST 後交聯度較低的組別因為顆粒比較鬆散所以會釋放出較多的咖啡因。

(3) 不同 PH 值對藥物包覆釋放的影響

由圖 4 來看可看出 PH9 的情況釋放速度跟量都比較好，這是因為 AA 在比較鹼性的環境下酸基會解離而且呈現比較澎潤的狀態，所以 PH9 的藥物釋放速度會比較快，且因為較澎潤所以釋放阻力也較少，因此最後釋放的量也比 PH7.4 多一些。

(4) 不同溫度對藥物包覆釋放的影響

由圖 4 可看出當溫度由 37°C 降低至 25°C 時會因為溫度低於 LCST 因此使顆粒呈現較澎潤的狀態所以可以再釋放出咖啡因。

3.3 已鍵結 BSA 之藥物釋放結果

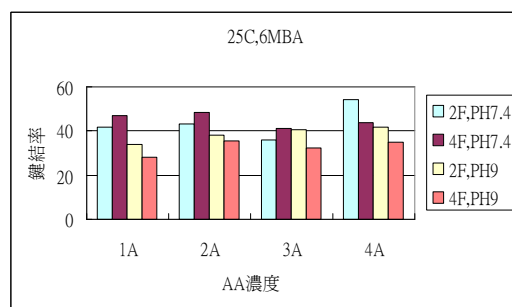
我們挑選交聯劑濃度 6%，PH=7.4 的組別，由圖 5 可看出釋放的量跟未鍵結 BSA 的磁性乳膠顆粒比較來有比較少，主要是因為 BSA 的鍵結也會產生立體障礙使得咖啡因較難進入顆粒，而且也會比較不好釋放。而釋放速度方面卻變的比較快，這是因為產物的量不夠多，所以我們並沒有進行壓錠此步驟，而是直接拿粉末做測量，因為粉末與溶液接觸面積比較大所以釋放的速度會較快。

4、結論

本實驗合成含有磁流之 poly(NIPAAm-co-AA) 的乳膠顆粒，分別改變 AA/NIPAAm 比例、交聯劑濃度、磁性粒子濃度及 PH 值，於藥物包覆釋放及蛋白質接枝方面進行測試實驗，測試項目同上述各個項目，從各項實驗可以了解本實驗所合成出的乳膠顆粒性質。

5、參考文獻

1. 黃耀輝，免疫乳膠顆粒的製備，台大化工碩士論文(1998)
2. 溫家貞，聚氮-異丙基丙烯醯胺與幾丁聚醣共聚乳膠顆粒之合成及其在藥物釋放上的應用，台大材料所碩士論文(2001)
3. 林佳龍，聚(氮-異丙基丙烯醯胺)衍生溫度感應型共聚微膠體：製備，性質及應用，台大材料所博士論文(2005)。
4. 周玉蕙，溫度感應型磁性乳膠顆粒之製造與研究，台大化工碩士論文(2004)
4. 林家正，磁性溫感型乳膠顆粒之製造與研究，台大化工碩士論文(2006)



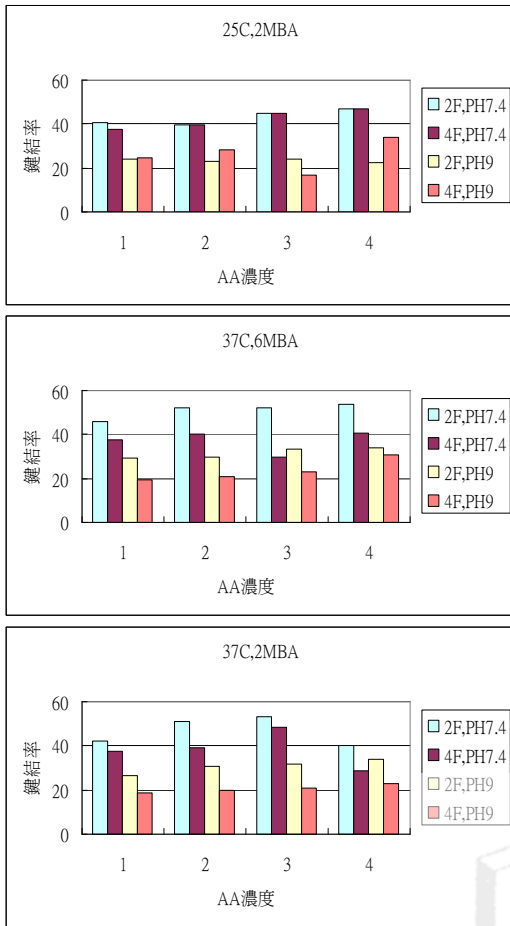


圖 1. 含磁流之乳膠顆粒 BSA 接枝測試(改變溫度、交聯劑濃度、磁性粒子濃度及 PH 值)

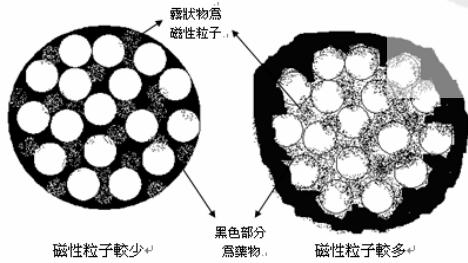


圖 2. 磁性粒子含量與藥物釋放示意圖

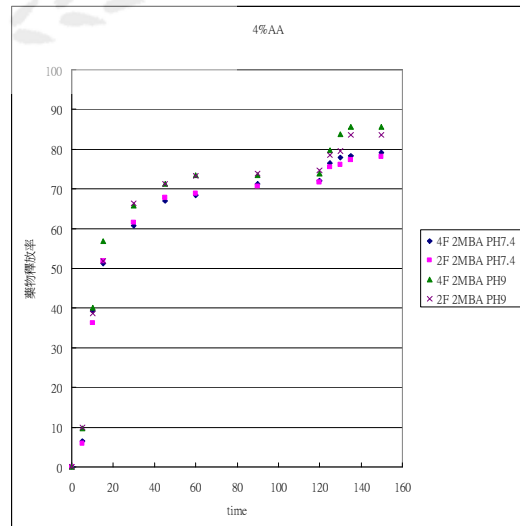
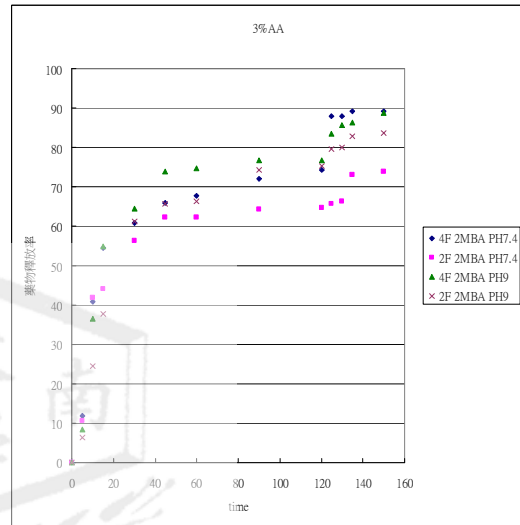
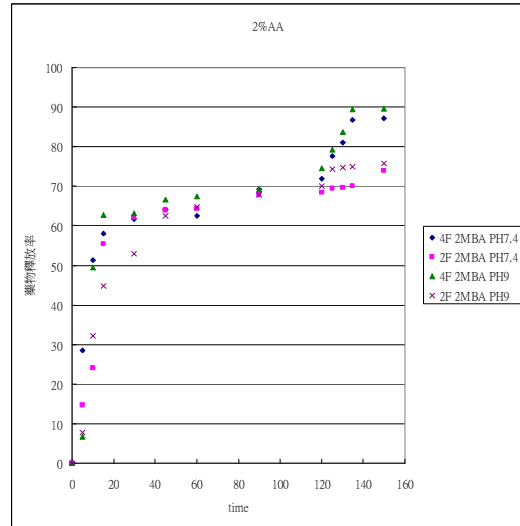
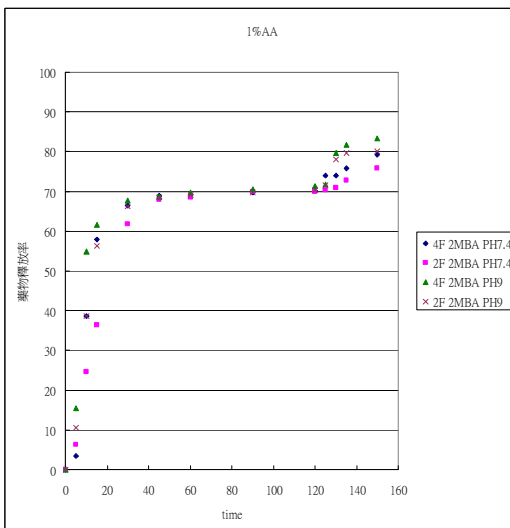


圖 3. AA 含量對於含磁流之乳膠顆粒藥物釋放測試

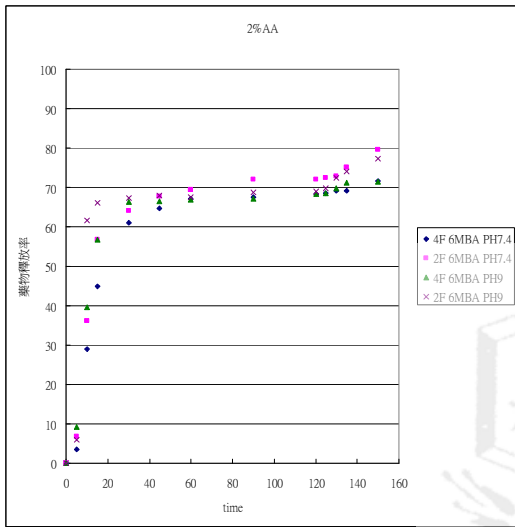
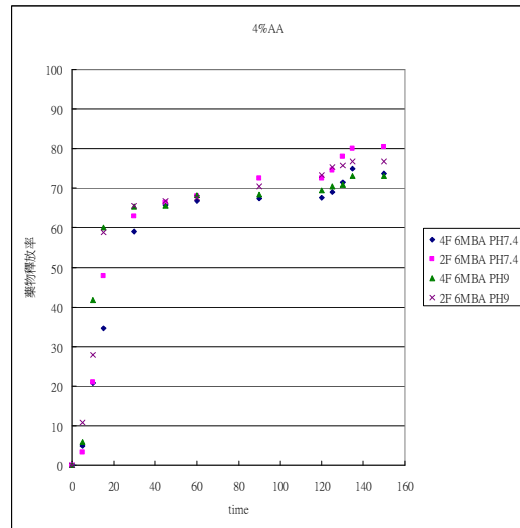
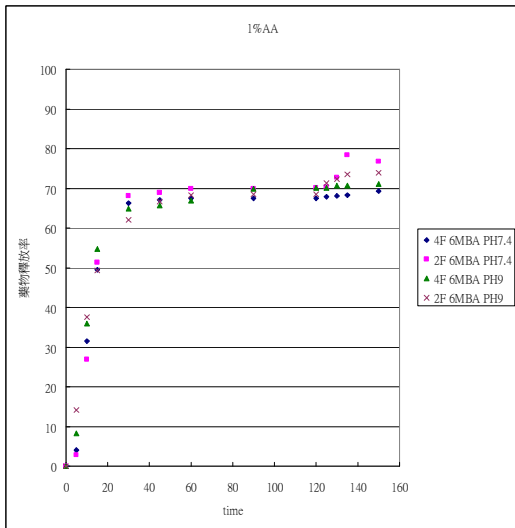


圖 4. 含磁流之乳膠顆粒藥物釋放測試(改變溫度、交聯劑濃度、磁性粒子濃度及 PH 值)

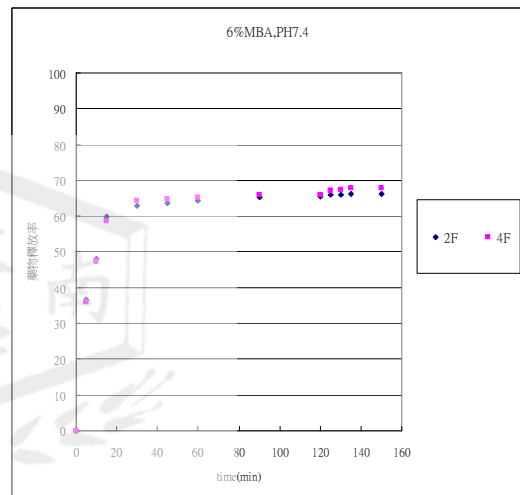
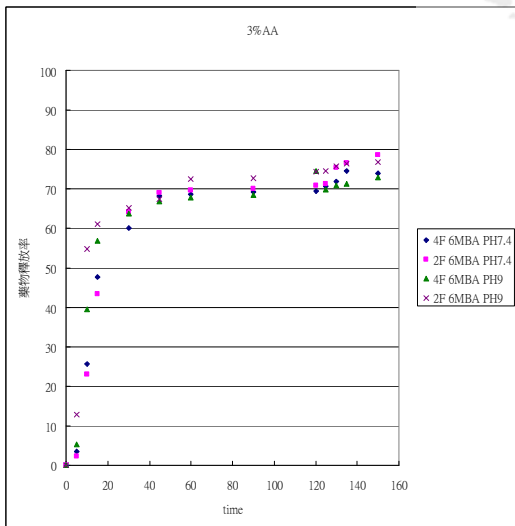


圖 5. 已鍵結 BSA 之磁性乳膠顆粒藥物釋放測試



可供推廣之研發成果資料表

 可申請專利 可技術移轉

日期：96年9月26日

國科會補助計畫	計畫名稱：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 計畫主持人：李佳芬 計畫編號：NSC 95－ 2221 － E － 041 － 014 學門領域：高分子
技術/創作名稱	標的導向型磁性免疫藥物載體
發明人/創作人	李佳芬
技術說明	<p>中文：本技術主要是以新穎的合成技術製造出”標的導向型磁性免疫藥物載體”，將藥物載入此載體後，將其輸入體內，藉由體外磁場將體內的磁性免疫藥物載體引導到病變組織上，再將內部之藥物釋放出來，如此達到標定藥物治療之目的。</p> <p>英文：A novel technology is used to manufacture “Immunization anchor magnetic drug carrier” The Immunization anchor magnetic drug carrier loads drug, and then input into the body. The Immunization anchor magnetic drug carrier will transport to the pathological tissue by way of magnetic field. Then the drug will diffuse out form the drug carrier and directly treat the pathological tissue.</p>
可利用之產業 及 可開發之產品	<p>可利用之產業：製藥業</p> <p>可開發之產品：標定式藥物載體</p>
技術特點	以新穎的技術製造出”標的導向型磁性免疫藥物載體”，以避免治病時所產生之副作用，更可增進藥物之治療效率。

推廣及運用的價值	可應用”標的導向型磁性免疫藥物載體”來載運容易引起副作用之藥物，使此藥物可針對病變組織直接做治療，如此不但可以避免藥物對於正常細胞之破壞而引起之副作用，更由於藥物直接對病變組織做治療，因此能增進藥物之治療效率。
----------	---

※ 1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。

※ 2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。

