

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

具主動標靶性之溫感性高分子微胞之製作及用於癌症之熱療法研究(第2年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2113-M-040-002-MY2
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：趙啟民

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：黃祈斌
大專生-兼任助理人員：蔡倫軒

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97年11月03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

具主動標靶性之溫感性高分子微胞之製作及用於癌症之熱
療法研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2113-M-040-002-MY2

執行期間：96年2月1日至97年7月31日

計畫主持人：趙啟民

共同主持人：

計畫參與人員：

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：中山醫學大學應用化學系

中 華 民 國 97 年 10 月 31 日

中文摘要

在癌症的治療上，溫熱療法是一個新興且頗具潛力的治療方法，以往在此方面的研究都是使用如熱水，電熱法及導熱法的方式，直到最近，原本被應用在磁流體的磁性奈米粒子被使用在此生物醫學研究上，尤其是被當作藥物釋放載體及溫熱療法的局部加熱源。在溫熱療法中，最重要的就是能正確的標的到腫瘤位置，並在殺害癌組織時不傷害正常組織，這跟材料的本身性質及附加特性有絕對的關係。針對於此，本計劃將開發可同時進行診斷及治療用之多功能奈米材料，用於癌症部位之治療及追蹤。因本計劃技術層次高，預計將分三年執行，執行期間將陸續建立多個關鍵技術，包括(一)高升溫效率及自控溫特性之磁性奈米微粒開發技術，(二)溫感性高分子聚合物載體之設計製作，及(三)標靶奈米微粒載體設計及製作技術與癌症治療評估。

第一年將設計合成以鐵氧化合物為基礎之具高升溫效率及自控溫特性之磁性奈米顆粒，並進行特性鑑定，目標為居禮溫度約 52°C，第二年將設計合成一具溫度感應性及生物相容性之高分子共聚合物，作為磁性顆粒及/或藥物之載體，第三年將進行載體之專一性修飾，使成標靶性之兼具診斷及治療之雙功能生醫用材料。

Abstract

Hyperthermia is a new and promising approach in cancer therapy. Various methods are employed in hyperthermia such as the use of hot water, capacitive heating, and induction heating among others. Until recently, magnetic nanoparticles which were typically used as ferrofluids have been directed to their biomedical applications, especially as targeting drug delivery devices and localized heating mediator agents for hyperthermia. In the hyperthermia, it is important that the cancer tissue is selectively targeted and heated without damaging the normal tissue. This is largely related to the material characteristics and the additive functions on it. Therefore, this project will develop a multifunctional nanomaterial which possesses both diagnostic and therapeutic properties, and will be used in cancer imaging and therapeutics. The project will have some technique difficulties so it is divided into three parts. Several key techniques will be established, including (1) Synthesis of magnetic nanoparticles with high-speed increasing temperature and self-controlled temperature characteristics, (2) Design and synthesis of thermosensitive polymer carriers, and (3) Targeting transporter design and manufacture for magnetic nanoparticles and cancer therapy appraisal.

The first year will focus on preparing iron oxide-based magnetic nanoparticles with high-speed increasing temperature and self-controlled temperature characteristics and have Curie temperature of about 52°C. The next year will design and synthesize a polymeric carrier which is thermosensitive and biocompatible and will release the magnetic nanoparticles and drug around the cancer tissue uniformly under the magnetic field treatment. The third year will concentrate on modifying the carrier as specific targeting, and carrying out the cancer cell therapy tests in vitro.

(1) 研究背景:

在臨床癌症的治療中，多年來除了直接切除、放射性治療及化學治療外，最近，有一新興的癌症治療想法-溫熱療法被提出，此方式的訴求為利用物理方式進行腫瘤的處理，可避免放射性治療帶來的全面性傷害，並可降低或免除化學治療所使用藥物產生之副作用，降低病患在治療過程的痛苦。

利用熱來治療腫瘤的基本觀念來自於：正常的人體組織中，當局部或全身的溫度提高時，會引起身體的一些正常生理反應，包括微血管擴張、呼吸加快、心跳加快、腎臟製造尿液增加等，這樣的作用是為要散熱。正常細胞因溫度的提高造成生理的改變，都可藉由上述的身體正常反應來解決，因此正常的人體組織中，因為體溫升高而受到的傷害就不明顯了。但是癌症組織在局部或全身的溫度提高時，造成的影響就明顯不同，腫瘤細胞都很密集的緊靠在一起，重要的是，癌症組織的血管分佈並不像正常人體組織中的微血管分佈，因此當溫度提高時，造成它內部血液循環的改變並不明顯，它的微血管散熱效率也很差，所以當受熱時，正常人體組織因為有效率的散熱作用，溫度並不會提高很多，但是癌組織的散熱效率不佳，因此癌組織內部的溫度會持續提升，造成癌細胞相繼死亡。

故倘若能找到一種方式，在不傷害正常組織，不花費太長時間等前提下，能夠局部的給予癌變組織熱量，造成腫瘤細胞因溫度升高而死亡，即是一種有效的腫瘤治療方式，若能再提供其他附加價值，如同步監控或搭配其他治療方式，使腫瘤的治療可以監測及更有效、快速，那對於患者更是一大福音；而如何使熱量集中於癌變組織是一大技術問題，雖說雷射可以達到此目的，但相對的它造成的是全面性的傷害，因此提出“具主動標靶性之溫感性高分子微胞之製作及用於癌症之熱療法研究”之計畫，希望利用高分子微胞，帶著藥物及加熱源，即磁性粒子，到達欲治療之組織，利用外部磁場作用加熱磁性粒子，並使藥物釋放出來，經由藥物及熱療的雙重治療，希望更有效殲滅癌細胞。

(2) 計劃目的:

本“具主動標靶性之溫感性高分子微胞之製作及用於癌症之熱療法研究”計劃，最終目的為開發可同時進行診斷及治療用之多功能奈米載體，用於癌症部位之治療及監控。我們將設計製作具溫度感應性之奈米微胞，裡面包埋藥物及磁性奈米微粒，並將微胞表面修飾可以辨認腫瘤組織區域的血管內皮細胞生長因子(VEGF)，賦予微胞主動標靶的功能，到達目標後將施以磁場，磁性粒子在受磁場作用下會產生熱，造成微胞相改變而釋放出藥物及磁性微粒，希望利用此種雙重治療的模式，達到有效清除腫瘤細胞的目的。

已有文獻報導利用溫熱療法來治療種植於老鼠身上之腫瘤，不過目前研究只限於很小的腫瘤，當腫瘤外型較大或不平坦時，由於受熱不均，故在治療過程中無法有效的一次破壞腫瘤，反而造成腫瘤持續的增長，所以本研究計劃將嘗試合成一具溫度敏感性之有機高分子材料，結合磁性微粒及藥物治療，應用於癌症之治療研究上，希望有效殲滅癌細胞並克服上述無法治療較大面積腫瘤之問題；因最終目的為應用到動物體內，故所有材料需先經過生物相容性的修飾，因此本計畫前兩年將設計及製備具生物相容性之溫感性高分子，並進行細胞毒性測試，找到不具細胞毒性或細胞毒性低之微胞載體，並進行磁性微粒及抗腫瘤藥物之包覆及釋放實驗，第三年將修飾此載體為腫瘤專一性，當此奈米載體在動物體內主動標靶到腫瘤位置時，將經由體外給予高頻電磁波，磁性粒子在受磁場感應而加熱之過程中會使得溫感性高分子收縮，迫使其內的磁性粒子及藥物釋放出來，進入腫瘤細胞，雙管齊下，希望更能有效的達到治療腫瘤之目的；並希望在治療的同時或術後，可藉由核磁共振造影的技術來監測腫瘤處理情形。

本計劃預計將分三年執行，執行期間將陸續建立多個關鍵技術，包括(1) 具生物相容性

之溫感性微胞載體之設計製作，(2) 微胞載體之生物相容性實驗及藥物與磁性微粒之包埋與釋放研究，及(3) 微胞載體之血管內皮細胞生長因子(VEGF)專一性修飾技術。

第一年將設計合成具生物相容性及溫感性之高分子，並進行微胞載體之製作，及進行特性鑑定，目標為LCST(lower critical solution temperature)約為40至45°C，第二年將進行微胞載體之生物相容性實驗，若符合預期則進行藥物及磁性微粒包埋效率及釋放效率研究，若具太大細胞毒性，則再改善polymer的組成，第三年將進行微胞載體之血管內皮細胞生長因子(VEGF)專一性修飾，使成標靶性之兼具診斷及治療的雙功能生醫用材料。

(3) 重要性:

磁性奈米微粒一般為材料上使用，近年來開始有研究將其應用於生醫領域上，尤其是在影像的檢測上，即當核磁共振造影劑使用，不過用於生物醫學之磁性微粒在性質及規格上的要求較嚴格許多，需要很仔細的設計、合成、鑑定及改良，不過它有一個特點，即在磁場作用下，其會因遲滯現象造成溫度升高，本計劃將利用此一特色，並結合藥物釋放治療的想法，發展一個可能更有效治療癌症的方式。本研究的特殊想法是，開發一個生物相容性或細胞毒性低之溫度敏感性聚合物，並製作成微胞，之後再賦予其辨認功能，使其能帶著藥物及磁性微粒到達腫瘤細胞附近的血管壁，施加磁場後使得磁性微粒產生熱，造成熱感性微胞相改變，而將藥物及磁性微粒釋出，利用專一性標的功能之微胞包覆藥物到達欲治療位置，不僅可以減少藥物使用量，且磁性微粒在磁場作用下產生熱，提供了另一個治療的方式，並很有可能可以處理較大面積的腫瘤，雙管齊下，希望有較好的治療效果。因此，若此研究進行順利，不僅可避免目前使用腫瘤藥物之毒性，也避免化學療法為病人所帶來的副作用，勢必將會對生物醫學產業、科技或人類健康產生深遠之影響。

(4) 國內外有關本計劃之研究情況:

I. 關於高升溫效率之磁性奈米微粒開發技術，目前大多還是採用 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 與 Fe_3O_4 為主，另有人以Co添加於 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 中，發現比 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 有更好的效果，不過其所使用的磁場強度較高($\sim 5 \times 10^8 \text{ A/m.s}$)且目前尚未有可同時兼具快速升溫與自控溫效果的材料之相關報導。

II. 在磁性奈米載體之專一性設計技術上，美國 Harvard Univ. & Mass. General Hospital 開發具有專一性且結合多種量測特性之奈米材料，在 CLIO上接上帶有 FITC (螢光染劑) 且對 mucin (腫瘤抗原) 具專一性標示之 peptide 及 Cy5.5 (NIR 染劑)，可於小鼠上偵測腫瘤 (MR Imaging 及 NIR Imaging)。但目前國外之奈米微粒生物相容性及專一性修飾，皆著重於個別的藥物輸送載體或腫瘤偵測上。

(5) 參考文獻:

1. Shinkai, M.; Yanase, M.; Honda, H.; Wakabayashi, T.; Yoshida, J.; Kobayashi, T. *Jpn. J. Cancer Res.* **1996**, *87*, 1179-1183.

2. Rudge, S.; Peterson, C.; Vessely, C.; Koda, J.; Stevens, S.; Catterall, L. *Journal of Controlled Release.* **2001**, *74*, 335-340.

3. Shimizu, T.; Matsui, M. *Science and Technology of Advanced Materials.* **2003**, *4*, 469-473.

4. Park, J.-H.; Im, K.-H.; Lee, S.-H.; Kim, D.-H.; Lee, D.-Y.; Lee, Y.-K.; Kim, K.-M.; Kim, K.-N. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 328-333.

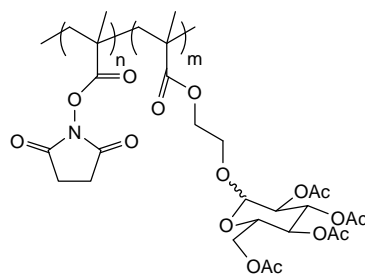
(6) 研究方法與結果討論

首先感謝國科會給予經費補助，使申請者的研究想法得以落實，因申請者是新人，實驗所需的儀器設備現階段並不足以支撐整個完整的研究所需，所以國科會給予的經費補助申請者充分分配，除了全力進行計畫所提之研究內容外，在一些性質量測的設備還沒到齊前，申請者亦使用計畫補助的費用，利用系上已有的 NMR 儀器進行一些有機合成的研究，底下將敘述申請者在這段期間的研究成果。

第一部份：溫感性高分子聚合物之設計及合成

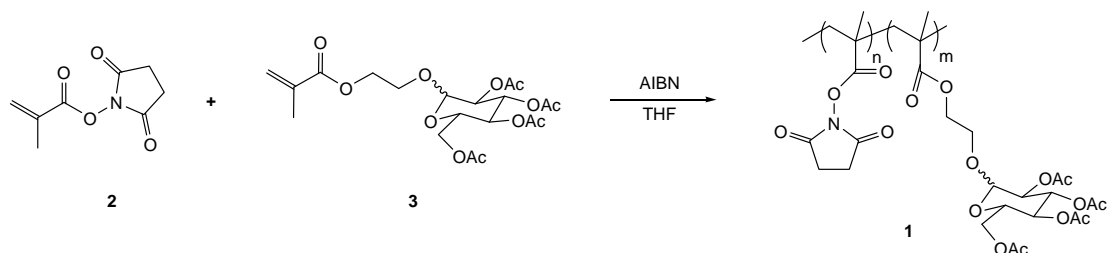
計畫進行期間發現一個更 versatile 的方法可以來合成一系列的 polymer，其中有一個 monomer 容易被具有胺基的分子所取代，而生物分子一般皆具有此官能基，藥物結構中亦常見胺基，亦即此高分子可以很容易鍵結生物分子或藥物，這在 diagnosis 或 drug release 上應該會有很大的應用。

首先，我們合成 polymer 1，合成方式如 scheme 1 所示：



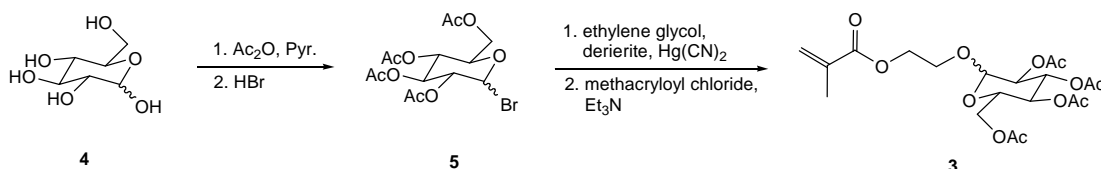
polymer 1

此 polymer 是由兩個 monomer 經由 radical polymerization 所得到，合成方式如下所示：



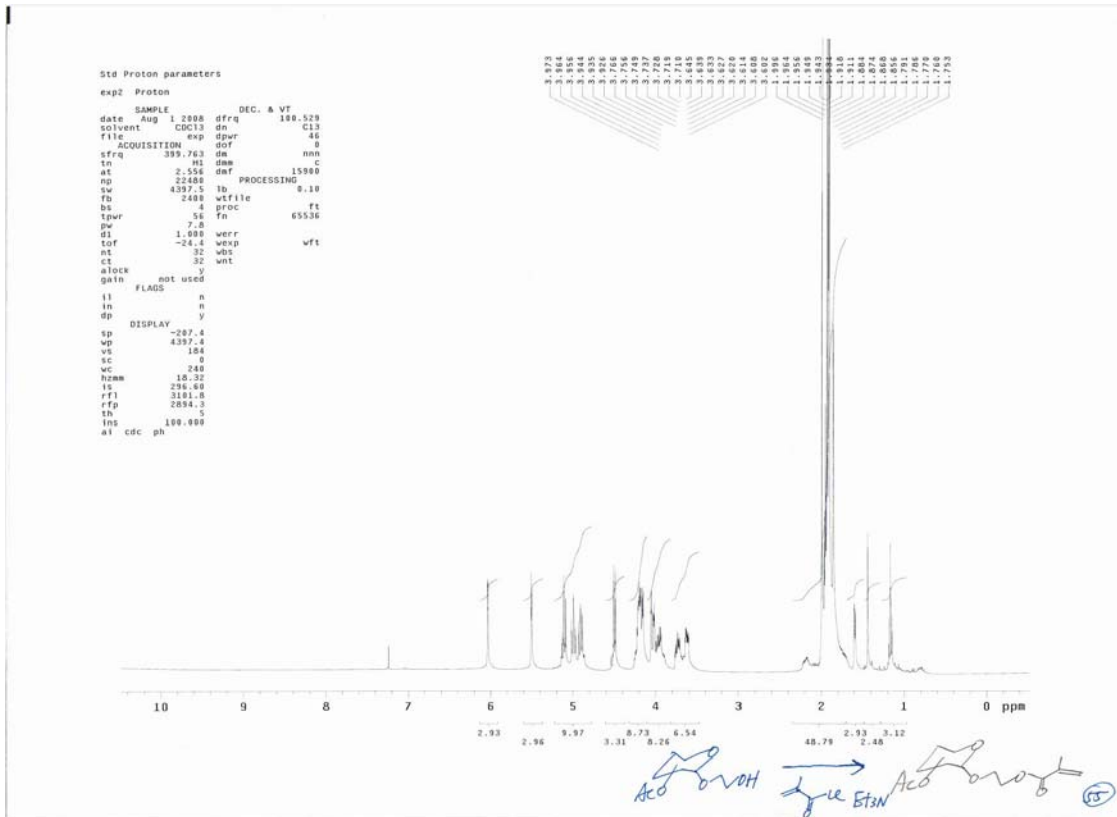
scheme 1

其中 monomer 3 的合成流程如下所示：



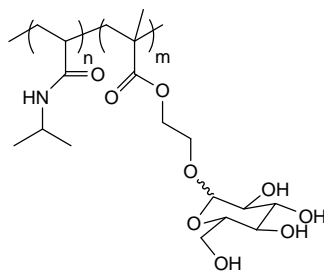
將 glucose 的所有 hydroxyl group 轉變為 acetate 後，再將 α 位置轉變為離去基得到 bromide compound **4**，引入 ethylene glycol 後接著與 methacryloyl chloride 進行 acyl substitution，經由純化後即可得到 monomer **3**。

Monomer **3** 的 $^1\text{H-NMR}$ 光譜如下



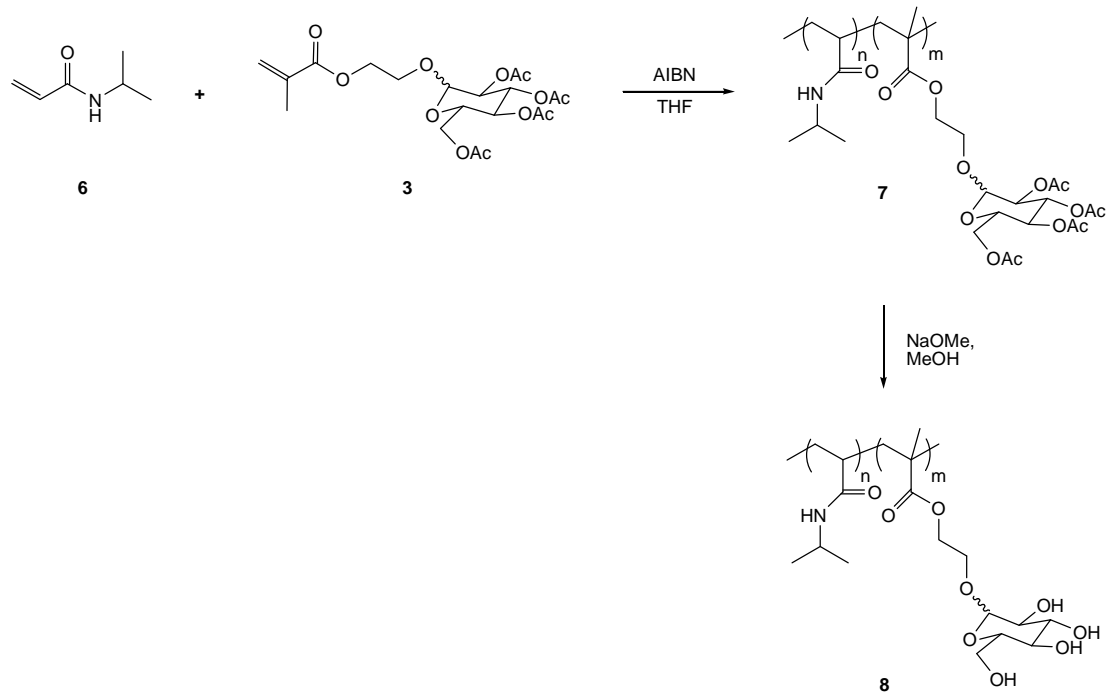
Monomer **3** 的 $^1\text{H-NMR}$ 光譜

另外我們也合成 polymer **5**



polymer **5**

合成方式如 scheme 2 所示

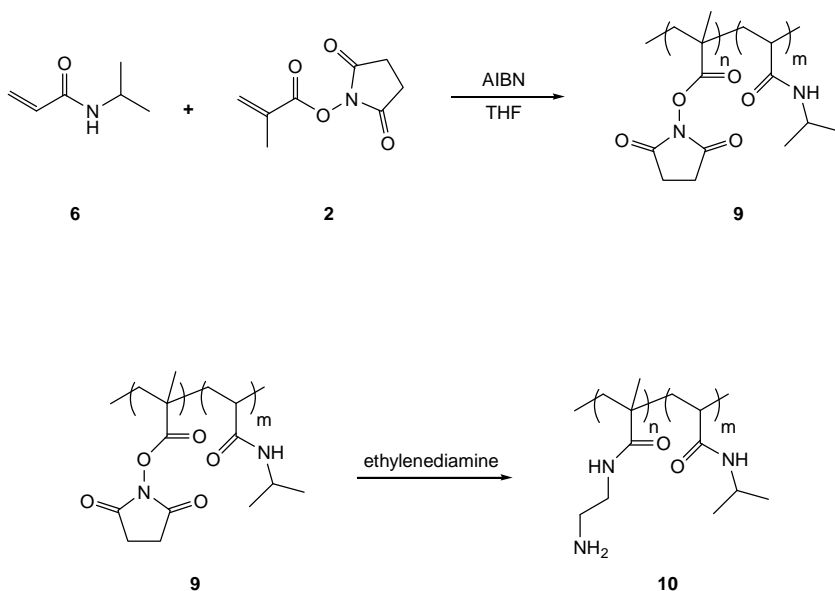


scheme 2

將 NIPAAm 與我們合成好的 monomer **3** 進行 free radical polymerization，經純化後可得 copolymer **7**，然後將其 acetate groups 水解得到 copolymer **8**，不過礙於實驗室尚無 GPC，現階段尚無法進行分子量的量測。

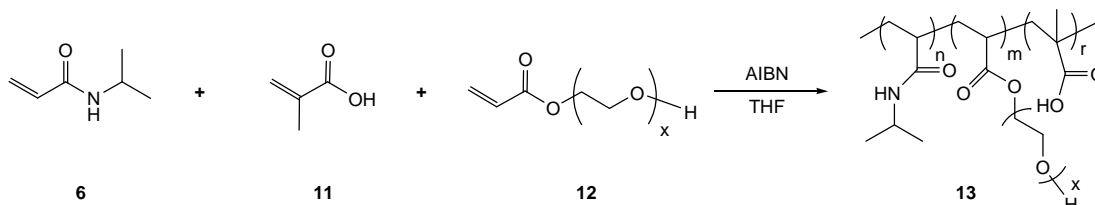
利用混濁度對溫度的測量，polymer **8** 粗步的 LCST 的量測為 55°C，這在實際用途上偏高，未來將降低醣類的當量比來降低 LCST。

另外，我們也合成 block copolymer **9**，目的為製備一個除了具有溫感性單元的 polymer 之外，之後可以依據需求引入不同的 functional moiety，比方說我們可以利用 ethylenediamine 進行取代反應，引入 amine group，後續就可以跟許多生物分子、藥物或是螢光探針鍵結，達到標的、藥物釋放、診斷的目的。



polymer **10** 中 amino group 的鑑定可以利用 Kaiser test 來定性量測，由深藍色可知確實有 primary amine 的存在，後續我們將接上螢光染劑及藥物來進行主動標的的測試。

此外，我們亦合成了 copolymer **13**，合成方式如下所示。目的為想要利用 carboxylate moiety 跟 iron oxide 接，ethylene glycol 提供生物相容性，NIPAAm 提供溫感性，添加此 polymer 在 iron oxide 的合成中，來製備功能性的 iron oxide nanoparticle。



這一部份的研究因為部分儀器缺乏所以某些性質的量測尚無法順利進行，如分子量、zeta potential 及之後 micelle formation 實驗中 particle size 的量測，不過基本的結構的鑑定，LCST 的測量，實驗室都已經可以做了，這都要感謝國科會經費的支持。

第二部份：天然物骨架之設計及合成研究

誠如之前所述，因為實驗第一部分所需的儀器設備現階段並不足以支撐整個完整的研究所需，所以執行者除了全力進行計畫所提之研究內容外，亦使用計畫補助的費用，利用系上已有的 NMR 儀器進行一些有機合成的研究，俾使經費的使用達到最佳的利用，亦使執行者的研究不因此而拖延。

此一部分跟劉冠妙老師實驗室一起合作進行，目的為由 fused enone **15** 合成 manzamine A 中的三環中心骨架 **23**，合成路徑如下所示，目前已經順利合成了化合物 **21**。

