



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I414309 B

(45) 公告日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 11 日

(21) 申請案號：098123574

(22) 申請日：中華民國 98 (2009) 年 07 月 13 日

(51) Int. Cl. : A61K47/02 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61K31/337 (2006.01)

A61P35/00 (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：趙瑞益 CHAO, JUI I (TW)；陳清漂 CHEN, CHINPIAO (TW)；鄭嘉良 CHENG, CHIA LIANG (TW)

(74) 代理人：陳昭誠

(56) 參考文獻：

96 學年度, 鄭文璋之研究論文「奈米鑽石之官能化與應用」

96 學年度, 朱啟東之研究論文「傅利葉紅外光譜儀研究奈米鑽石表面的官能基之溫度效應與奈米鑽石在生物方面的應用」

Anal. Chem. 2008, 80, 4659-4665

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：32 共 0 頁

(54) 名稱

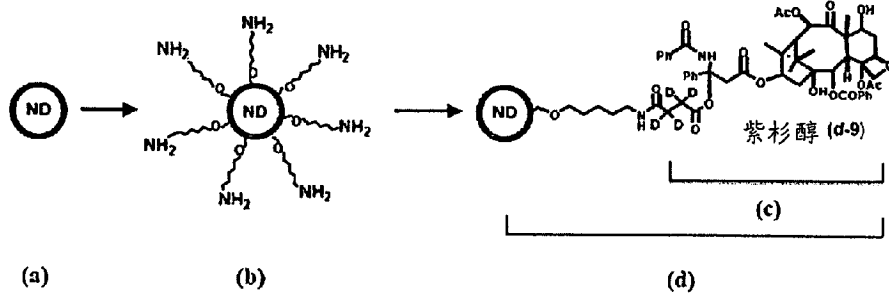
包括奈米鑽石的載體、藥物及其製備的方法和用途

MEDICINE AND CARRIER COMPRISING NANODIAMOND, METHOD FOR PREPARING THE SAME AND USE THEREOF

(57) 摘要

本發明提供一種包含奈米鑽石(ND)顆粒以及連接子的載體，其中，該奈米鑽石和該連接子係彼此共價鍵結，且該連接子係如式 $-R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q-$ 所示。此外，本發明進一步提供具有活性單元以共價鍵結的方式與該連接子結合的載體，其中，該活性單元為藥物、維生素或生物分子。

The present invention provides a carrier including a nanodiamond (ND) particle and a linker bound to each other in a manner of covalent binding, in which the linker is shown by the formula:  $-R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q-$ . In addition, the present invention further provides a carrier having an active unit covalently bound to the linker, in which the active unit is a drug, a vitamin or a biological molecule.



第8A圖

公告本
-----

102年8月30日 修正 補正 P1-35
--------------------------------

第 098123574 號專利申請案 102 年 8 月 30 日修正替換頁
---

# 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：98123574

※ 申請日：98.7.13

※IPC 分類：A61K 47/02, 47/48, 31/337,

A61P 35/00

## 一、發明名稱：(中文/英文)

包括奈米鑽石的載體、藥物及其製備的方法和用途  
 MEDICINE AND CARRIER COMPRISING NANODIAMOND,  
 METHOD FOR PREPARING THE SAME AND USE THEREOF

## 二、中文發明摘要：

本發明提供一種包含奈米鑽石(ND)顆粒以及連接子的載體，其中，該奈米鑽石和該連接子係彼此共價鍵結，且該連接子係如式 $-R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q-$ 所示。此外，本發明進一步提供具有活性單元以共價鍵結的方式與該連接子結合的載體，其中，該活性單元為藥物、維生素或生物分子。

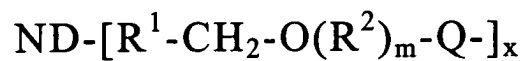
## 三、英文發明摘要：

The present invention provides a carrier including a nanodiamond (ND) particle and a linker bound to each other in a manner of covalent binding, in which the linker is shown by the formula:  $-R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q-$ . In addition, the present invention further provides a carrier having an active unit covalently bound to the linker, in which the active unit is a drug, a vitamin or a biological molecule.

## 四、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：第 ( 8A ) 圖。
- (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：



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種包括奈米鑽石顆粒的載體，尤有關於一種包括奈米鑽石顆粒以及連接子的載體。此外，本發明進一步係關於一種包括奈米鑽石顆粒、連接子以及活性單元的載體。

### 【先前技術】

癌症目前已成為人類最主要的死亡原因之一，在現今已知的諸多癌症治療方法中，包括有外科手術、放射性治療以及化療等，尤其對於癌症末期的病患而言，通常必須先進行化療，再輔以其他的療程。然而，在身體中循環的藥物，往往有穩定性不佳以及細胞不易攝入的缺點，且抗癌藥物對正常細胞所造成的損害以及對健康組織的非專一性毒性，也總是造成藥物的治療效果因而大大減低的原因。有鑑於此，新穎的癌症治療方法仍然不斷如火如荼地進行研究當中。

已有報導指出，可藉由奈米顆粒與化學藥物或生物分子的結合，來改善抗癌藥物的穩定性，藉以提供較佳的癌症治療方法。在奈米顆粒的相關研究當中，已有報導顯示奈米碳管和碳 60 具有較高的生物毒性，然而，同屬奈米顆粒的奈米鑽石(nanodiamond，以下亦簡稱為 ND)，卻已經證實在人類肺細胞(K. K. Liu, C. L. Cheng, C. C. Chang, and J. I. Chao, *Nanotechnology*, 2007, 18, 325102)、神經元細胞(A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E.

Omacr Sawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 2-7)、腎細胞(S. J. Yu, M. W. Kang, H. C. Chang, K. M. Chen, Y. C. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17604-17605; T. Lechleitner, F. Klauser, T. Seppi, J. Lechner, P. Jennings, P. Perco, B. Mayer, D. Steinmuller-Nethl, J. Preiner, P. Hinterdorfer, M. Hermann, E. Bertel, K. Pfaller, W. Pfaller, *Biomaterials* **2008**, 29, 4275-4284)以及子宮頸細胞(I. P. Chang, K. C. Hwang, C. S. Chiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15476-15481)中並不會明顯誘發細胞毒性。由於奈米鑽石本身不具有毒性，且相較於其他的碳奈米顆粒亦具有較佳的生物相容性，因此，更適合應用於生物醫學的相關領域中。再者，奈米鑽石本身具有螢光特性，因此，當連接藥物或生物分子後，可用於生物標定、檢測以及追蹤，因此，奈米鑽石在生物醫學的相關應用當中，確實具有極佳的發展潛力。

奈米鑽石在生物醫學相關領域的其中一項應用，是以適當的方式將藥物分子結合至奈米鑽石的表面，其中，奈米級的鑽石粉末通常是藉由爆炸合成(detonation synthesis)的方式產生，經由此爆炸合成的方式所產生的奈米鑽石顆粒通常包括有奈米尺寸的鑽石芯，此鑽石芯並經由 1 個或多個石墨碳以及非晶形碳外套所覆蓋，且奈米鑽石顆粒的表面通常由許多的官能基所包覆，此等官能基包括羧基、內酯、酮基、羥基以及烷基等。此外，由於奈米鑽石顆粒的表面具有羥基及/或羧基，因此，使得這些奈米鑽石顆粒

尤其適於作為製造官能化奈米材料的基材。

由於在奈米鑽石顆粒的表面易於進行修飾，因此，近年來奈米鑽石顆粒已經成為有價值的奈米材料。於奈米鑽石的表面進行修飾大致上有兩種方式，一種為以共價鍵結的方式進行修飾，另一種則為以非共價鍵結的方式進行。Chao 等人(J. I. Chao, E. Perevedentseva, P. H. Chung, K. K. Liu, C. Y. Cheng, C. C. Chang, C. L. Cheng, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2199-2208)以及 Liu 等人(K. K. Liu, M. F. Chen, P. Y. Chen, T. J. F. Lee, C. L. Cheng, C. C. Chang, Y. P. Ho, J. I. Chao, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 205102)已揭示以非共價鍵結的方式將溶菌酶以及  $\alpha$ -兩傘節毒素(alpha-bungarotoxin)以吸附的方式結合至羧化的奈米鑽石表面，並且仍然能夠維持其蛋白質的活性，以進行相關的生物反應。Huang 等人(H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3305-3314)亦以非共價鍵結的方式吸附小紅莓素(doxorubicin)，並且發展出奈米鑽石顆粒的水凝膠，藉以應用於癌症化療藥物的遞送。Huang 等人(L. C. Huang, H. C. Chang, *Langmuir* **2004**, *20*, 5879-5884)同樣揭示以非共價鍵結的方式將細胞色素 c 吸附到奈米鑽石的表面，然而，上述以非共價鍵結吸附藥物的方式，其最大的缺點便是當藥物在體內運送時，可能發生解離的情形，導致藥物在人體循環中的不穩定性。

再者，美國專利申請公開案第 2006/0269467 號以及美國專利申請公開案第 2005/0158549 號則揭示以氣態鹵素

或氫鹵酸製造官能化奈米鑽石的方法。然而，此等鹵素材料在處理上有安全的顧慮。例如，在製造衍生於奈米鑽石上的官能基團時，可能產生如鹵素的有毒氣體。此外，Ushizawa 等人(Koichi Ushizawa et al., *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 351, 105-108)已揭示利用共價鍵結的方式將 DNA 與奈米鑽石表面的 COCl 反應。然而，奈米鑽石與生物分子相比為體積相對龐大的奈米顆粒。在進行化學反應時，經常會因為立體空間的障礙而造成化學反應不易進行，因而導致生物分子的衍生率不易提升。Ushizawa 等人所製造的官能化奈米鑽石由於-COCl 基與奈米鑽石緊接，使得其與 DNA 不易進行有效的反應，以致於 DNA 無法有效地衍生於奈米鑽石顆粒的表面。

有鑑於此，對於如何以有效的方式使藥物或生物分子與奈米鑽石顆粒形成共價鍵結，使藥物或生物分子在身體的循環當中仍然能夠維持相當的穩定性以及活性，以更有利於生物醫學領域的相關應用，實已成為目前所亟待解決的課題。

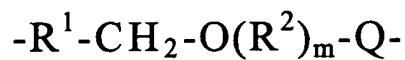
### 【發明內容】

為了解決上述的問題，本發明利用化學上相對安定的共價鍵結，使奈米鑽石與活性單元能夠穩定的結合。此共價鍵結的方式避免活性單元可能因單純的物理方法(例如水洗)而發生解離的情形。再者，透過本發明所提供的連接子，更可提高奈米鑽石因立體空間障礙所造成的低衍生率，使奈米鑽石更加有利於應用於生物醫學的相關領域中。



本發明之一態樣係提供包括奈米鑽石顆粒（以下或簡稱為 ND）以及結合至奈米鑽石顆粒之連接子(linker)的載體，其中，連接子係以共價鍵結的方式結合至奈米鑽石顆粒。

根據本發明，連接子係結合至奈米鑽石顆粒之表面，且連接子係如下式所示：



式中， $R^1$  及  $R^2$  為鍵結、視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷基、視需要經取代之  $C_{2-20}$  烯基、視需要經取代之  $C_{2-20}$  炔基、視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷氧基、視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷硫基或視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷基胺基，其中，視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷基、視需要經取代之  $C_{2-20}$  烯基、視需要經取代之  $C_{2-20}$  炔基、視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷氧基、視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷硫基或視需要經取代之  $C_{1-20}$  烷基胺基係經至少一個選自由下列取代基所組成之群組的取代基所取代：羥基、鹵素、氰基、硝基、羧基、 $C_{1-20}$  烷基、 $C_{2-20}$  烯基、 $C_{2-20}$  炔基、 $C_{1-20}$  烷氧基、 $C_{2-20}$  烷基醚、 $C_{3-20}$  烷基酮基、 $C_{1-20}$  烷硫基、胺基、單- $(C_{1-20}$  烷基)胺基、二- $(C_{1-20}$  烷基)胺基、鹵  $C_{1-20}$  烷基、鹵  $C_{1-20}$  烷氧基、 $C_{1-20}$  烷醯基、 $C_{2-20}$  烷醯氧基、 $C_{1-20}$  烷氧羰基、醯胺基(-CONH<sub>2</sub>)、單- $(C_{1-20}$  烷基)醯胺基、二- $(C_{1-8}$  烷基)醯胺基、亞磺醯胺基(-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、單- $(C_{1-20}$  烷基)亞磺醯胺基以及二- $(C_{1-20}$  烷基)亞磺醯胺基；Q 為羥基、胺基、羧基、醯基、酮基、羧基、鹵素、氰基、硫基、 $C_{1-20}$  烷基、 $C_{1-20}$  烷氧基、 $C_{2-20}$  烯基、 $C_{2-20}$  炔基、 $C_{6-16}$  芳

香基、疊氮基、醛基、硫氰基、 $\text{CO}_2(\text{R}^3)_n$ 、 $\text{CO}(\text{R}^4)_n$ 、 $\text{NHR}^5$ 、 $\text{N}(\text{R}^6)_n$ 、 $\text{SR}^7$  或  $\text{O}(\text{R}^8)_n$ ，其中， $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$  及  $\text{R}^8$  於每次出現時各獨立地為鹵素、胺基、羰基、醯基、酮基、羧基、甲苯磺醯基、磺醯基、 $\text{C}_{1-20}$  烷基、 $\text{C}_{2-20}$  烯基、 $\text{C}_{2-20}$  炔基、 $\text{C}_{1-20}$  烷氧基或  $\text{C}_{6-16}$  芳香基，且  $n$  於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數，較佳為 1 至 16 的整數，更佳為 1 至 12 的整數；以及  $m$  於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數，較佳為 1 至 16 的整數，更佳為 1 至 12 的整數。

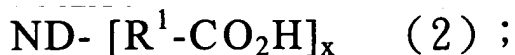
根據本發明，連接子中的  $\text{R}^1$  及  $\text{R}^2$  為視需要經取代之甲基，並且與奈米鑽石顆粒結合的連接子可為 1 個或多個。

本發明的另一態樣為提供進一步包括以共價鍵結的方式結合至連接子之活性單元(A)的奈米載體藥物。因此，本發明具有活性單元的奈米載體藥物係如下式所示： $\text{ND}-[\text{R}^1-\text{CH}_2-\text{O}(\text{R}^2)_m-\text{Q}-\text{A}]_x$ ，其中， $x$  為 1 或大於 1 的整數。

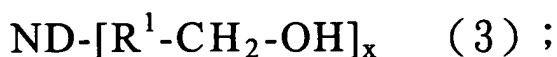
根據本發明，活性單元的例子包括藥物、維生素以及生物分子，其中，藥物的例子包括抗癌藥物，較佳包括有絲分裂微小管抑制劑(Anti-microtubule agents)，且更佳包括紫衫醇、艾瑞莎(Iressa)以及紓癌特(Sutent)；維生素的例子包括維生素 K3、維生素 C、維生素 D、維生素 E、維生素 H 及維生素 B7；以及生物分子的例子包括核酸、胜肽、蛋白質及其衍生物，且核酸為 DNA 或 RNA。根據本發明的一實施態樣，活性單元可為光學異構物。

本發明的又一態樣係提供製備如上所述載體的方

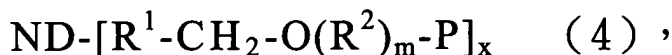
法，至少包括下列步驟：提供奈米鑽石顆粒；將該奈米鑽石顆粒進行酸化及氧化，以產生具有式(2)結構之第一中間產物，



將該第一中間產物進行還原，以產生具有式(3)結構之第二中間產物，



將該第二中間產物進行烷基化，以產生具有式(4)結構之第三中間產物，



其中，P 為保護基；以及

以離去基取代該第三中間產物之保護基，再將該離去基轉換為 Q，

其中，Q 為羥基、胺基、醯基、羧基、鹵素、氰基、硫基、C<sub>6-16</sub> 芳香基、疊氮基、硫氰基、CO<sub>2</sub>(R<sup>3</sup>)<sub>n</sub>、或 O(R<sup>8</sup>)<sub>n</sub>，其中，R<sup>3</sup> 及 R<sup>8</sup> 於每次出現時各獨立地為胺基、羧基、酮基、羧基、C<sub>1-20</sub> 烷基或 C<sub>6-16</sub> 芳香基，且 n 於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數。該方法中，酸化包括以一種或一種以上之無機酸進行處理，無機酸的例子包括鹽酸、硝酸及硫酸，且較佳的例子包括鹽酸和硝酸的混合溶液以及硝酸和硫酸的混合溶液；還原包括以還原劑處理，還原劑的例子包括氫化鋁及氫化硼試劑，且較佳的例子包括氫化鋁鋰(LAH)及硼氫化鈉(NaBH<sub>4</sub>)；而烷基化處理包括以 C<sub>1-20</sub> 烷基取代第二中間產物上之任

何官能基。

根據本發明，活性單元的例子包括藥物、維生素以及生物分子，其中，藥物的例子包括抗癌藥物，較佳包括有絲分裂微小管抑制劑(Anti-microtubule agents)，且更佳包括紫衫醇、艾瑞莎(Iressa)以及紓癌特(Sutent)；維生素的例子包括維生素 K3、維生素 C、維生素 D、維生素 E、維生素 H 以及維生素 B7；以及生物分子的例子包括核酸、胜肽、蛋白質及其衍生物，且核酸為 DNA 或 RNA。根據本發明的一實施態樣，活性單元可為光學異構物。

本發明另一態樣係提供套組，包括：上述之載體或奈米載體藥物、及其所需要的試劑，其中，試劑的例子包含進行聚合酶鏈鎖反應所需的試劑、進行凝膠電泳所需的試劑以及進行免疫活性反應所需的試劑。

本發明的再一態樣係提供於活體外使用上述載體或奈米載體藥物檢測生物分子的方法，其中，生物分子包括核酸、胜肽、蛋白質及其衍生物。

本發明的復一態樣係提供上述載體在製備治療癌症之藥物的用途，且所治療之癌症的例子包括肺癌、乳癌、大腸癌、子宮頸癌、直腸結腸癌、膀胱癌及其他癌症。

### 【實施方式】

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方式，熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容瞭解本發明之其他優點與功效。

### 術語說明

本文中通常採用標準命名法說明化學基團。應了解的是，本文中之連接子係以包括代號的通式說明(例如： $R^1$  至  $R^8$  以及  $Q$  等)，除非另有說明，否則這些化學式中各代號的定義分別與其它代號獨立，且化學式中任何出現一次以上的代號，於每次出現時的定義亦分別獨立。

本文所採用的術語「烷基」係指直鏈、支鏈或環狀的飽和脂煙。烷基可利用任何化學上合適的部份鍵結所需分子中的原子。烷基包括具有 1 至 20 個碳原子( $C_{1-20}$  烷基)、1 至 16 個碳原子( $C_{1-16}$  烷基)或 1 至 12 個碳原子( $C_{1-12}$  烷基)的基團，如甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、2-戊基、異戊基、新戊基、己基、2-己基、3-己基、3-甲基戊基、環丙基、環丙基甲基、環戊基、環戊基甲基、環己基與環庚基。在某些具體實施例中，較佳的烷基為直鏈或分支鏈。在本文的一些實施例中，烷基的取代基有明確說明，例如「 $C_{1-20}$  烷硫基」，係指具有硫基取代基的  $C_{1-20}$  烷基。

同樣地，「烯基」係指直鏈或分支鏈的烯基或環烯基，其中含有至少一個不飽和的碳-碳雙鍵。烯基包括  $C_{2-20}$  烯基，其分別為含有 2 至 20 個碳原子( $C_{2-20}$  烯基)、2 至 16 個碳原子( $C_{2-16}$  烯基)或 2 至 12 個碳原子( $C_{2-12}$  烯基)的基團，如乙烯基、丙烯基或異丙烯基。「炔基」係指直鏈或分支鏈的炔基，其包含有一個或多個不飽和的碳-碳鍵，其中至少一個為三鍵。炔基包括  $C_{2-20}$  炔基、 $C_{2-16}$  炔基與  $C_{2-12}$  炔基，其分別含有 2 至 20 個、2 至 16 個及 2 至 12 個碳原

子。在某些具體實施例中，較佳的烯基與炔基為直鏈或分支鏈。

本文所採用的術語「烷氧基」係指如上所述的烷基、烯基或炔基利用氧橋連接。烷氧基包括  $C_{1-20}$  烷氧基、 $C_{1-16}$  烷氧基與  $C_{1-12}$  烷氧基，其分別含有 1 至 20 個、1 至 16 個及 1 至 12 個碳原子。烷氧基的例子包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基、正戊氧基、2-戊氧基、3-戊氧基、異戊氧基、新戊氧基、己氧基、2-己氧基、3-己氧基與 3-甲基戊氧基。同樣地，「烷硫基」係指如上所述的烷基、烯基或炔基透過硫橋連接。較佳的烷氧基與烷硫基為烷基透過雜原子橋連接。

術語「烷醯基」係指呈線性、分支或環狀排列的醯基（例如： $-(C=O)-$ 烷基）。烷醯基包括  $C_{2-20}$  烷醯基、 $C_{2-16}$  烷醯基與  $C_{2-12}$  烷醯基，其分別含有 2 至 20 個、2 至 16 個及 2 至 12 個碳原子。「 $C_1$  烷醯基」係指  $-(C=O)-H$ ，其亦包括在術語「 $C_{1-20}$  烷醯基」的範圍內。

術語「烷基酮基」係其中的碳原子呈線性、分支或環狀排列的酮基。 $C_{3-20}$  烷基酮基、 $C_{3-16}$  烷基酮基與  $C_{3-12}$  烷基酮基係分別指具有 3 至 20 個、3 至 16 個及 3 至 12 個碳原子的烷基酮基。例如： $C_3$  烷基酮基的化學式為  $-CH_2-(C=O)-CH_2-$ 。

同樣地，術語「烷基醚」係指利用碳-碳鍵連結的線性或分支的醚取代基。烷基醚包括  $C_{2-20}$  烷基醚、 $C_{2-16}$  烷基醚與  $C_{2-12}$  烷基醚，其分別具有 2 至 20 個、2 至 16 個及 2

至 12 個碳原子。例如： $C_2$  烷基醚的化學式為  $-CH_2-O-CH_2-$ 。代表性的分支烷基的醚取代基例如為  $-C(CH_3)_2CH_2-O-CH_3$ 。

術語「烷氧羰基」係指利用羰基連結的烷氧基(亦即化學式通式為  $-C(=O)-O-$  烷基的基團)。烷氧羰基包括  $C_{2-20}$  烷氧羰基、 $C_{2-16}$  烷氧羰基與  $C_{2-12}$  烷氧羰基，其具有 2 至 20 個、2 至 16 個及 2 至 12 個碳原子。「 $C_1$  烷氧羰基」係指  $-C(=O)-OH$ ，其亦包括在術語「 $C_{1-20}$  烷氧羰基」的範圍內。

本文所採用的術語「烷醯氧基」係指利用氧橋連結的烷醯基(亦即通式化學式為  $-O-C(=O)-$  烷基的基團)。烷醯氧基包括  $C_{2-20}$  烷醯氧基、 $C_{2-16}$  烷醯氧基與  $C_{2-12}$  烷醯氧基，其分別具有 2 至 20 個、2 至 16 個及 2 至 12 個碳原子。

術語「烷基胺基」係指通式化學式為  $NH-$  烷基或  $-N$ (烷基)(烷基)的二級或三級胺，其中各烷基可為相同或相異。這些基團包括例如：單-和二- $(C_{1-20}$  烷基)胺基，其中各烷基可為相同或相異，且可包含 1 至 20 個碳原子。

術語「胺基羰基」係指醯胺基(亦即  $-(C=O)NH_2$ )。單-或二- $(C_{1-20}$  烷基)胺基羰基為胺基羰基中一個或兩個氫原子經  $C_{1-20}$  烷基置換，若兩個氫原子均經置換時， $C_{1-20}$  烷基可為相同或相異。

術語「鹵素」係指氟、氯、溴與碘。「鹵烷基」為分支、直鏈或環狀烷基經一個或多個鹵原子取代(例如：鹵  $C_{1-8}$  烷基具有 1 至 8 個碳原子；鹵  $C_{1-6}$  烷基具有 1 至 6 個

碳原子)。鹵烷基的實例包括，單-、二-或三氟甲基；單-、二-或三氯甲基；單-、二-、三-、四-或五-氟乙基；單-、二-、三-、四-或五-氯乙基；與 1,2,2,2-四氟-1-三氟甲基-乙基。典型的鹵烷基為三氟甲基與二氯甲基，但不以此為限。術語「鹵烷氧基」係指利用氧橋連接的如上所述定義的鹵烷基。鹵 C<sub>1-8</sub> 烷氧基具有 1 至 8 個碳原子。

術語「芳香基」為碳環，亦即，包含至少一個芳香環的碳環。除了芳香環以外，芳香基中可出現額外的非芳香環。「C<sub>6-16</sub> 芳香基」具有 6 至 16 個碳原子。代表性的芳香基包括苯基、萘基(例如，1-萘基及 2-萘基)、聯苯基、四氫萘基以及茚基。

位於兩個字母或代號之間的短折線(「-」)用於表示取代基的附接點。例如，-CONH<sub>2</sub> 係指利用碳原子連接。

本文所採用的術語「取代基」係指以共價鍵結的方式結合所需分子中之原子的分子部份。例如，環取代基可為鹵素、烷基、鹵烷基部份或如本文中所討論，與作為環組成員的原子(較佳為碳或氮原子)所共價鍵結的其它基團。術語「取代」係指利用如上所述之取代基置換化學分子中的氫原子，但不超過所指定原子的價數，並可藉由此取代法所得到化學上穩定的化合物(亦即可經單離並測試其生物活性)。

術語「視需要經取代」的基團為未經取代或經氫以外的一個或多個合適的基團(其可為相同或相異)在一個或多個可利用的位置上所取代，典型為 1、2、3、4 或 5 個位置。



這些視需要選用的取代基例如包括：羥基、鹵素、氰基、硝基、羧基、 $C_{1-20}$  烷基、 $C_{2-20}$  烯基、 $C_{2-20}$  炔基、 $C_{1-20}$  烷氧基、 $C_{2-20}$  烷基醚、 $C_{3-20}$  烷基酮基、 $C_{1-20}$  烷硫基、胺基、單- $(C_{1-20}$  烷基)胺基、二- $(C_{1-20}$  烷基)胺基、鹵  $C_{1-20}$  烷基、鹵  $C_{1-20}$  烷氧基、 $C_{1-20}$  烷醯基、 $C_{2-20}$  烷醯氧基、 $C_{1-20}$  烷氧羰基、醯胺基(-CONH<sub>2</sub>)、單- $(C_{1-20}$  烷基)胺基羰基、二- $(C_{1-20}$  烷基)胺基羰基、亞磺醯胺基(-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、單- $(C_{1-20}$  烷基)亞磺醯胺基及二- $(C_{1-20}$  烷基)亞磺醯胺基。視需要的取代法亦以「經 0 至 Z 個取代基取代」的語法表示，其中 Z 為可使用的取代基的最高數目。某些視需要經取代的基團經 0 至 2 個、0 至 3 個或 0 至 4 個分別獨立選出的取代基所取代(亦即未經取代或經至多達所出示的最高取代基數目所取代)。

術語「異構物」係指具有相同分子式，但具有不同的結構式之化合物。異構物依其原子排列次序或三度空間所佔位置不同，可區分為結構異構物(structural isomer)及立體異構物(stereoisomer)。立體異構物又可分為幾何異構物(geometric isomer)、鏡像異構物(enantiomer)及非對映異構物(diastereomer)。鏡像異構物因能旋轉平面偏極光，所以具有光學活性，稱其為光學活性物質，故鏡像異構物又稱為光學異構物。立體異構物中，表示原子的特定排列方式稱為組態(configuration)，互為鏡像異構物之兩化合物之組態相反，但其命名相同，為了加以區別兩者，所以用 R-S 系統來表示其組態。

術語「酸化」係指奈米鑽石以無機酸處理，其中，以

無機酸處理包括以鹽酸、硝酸或硫酸單獨處理或以其組合的混合溶液處理，或反應時先以鹼性試劑處理，酸化時再水洗至洗液呈弱酸性。

術語「還原」係指使用諸如氫化鋁或氫化硼試劑的還原劑處理奈米鑽石上之羧酸、內酯或酮基，使之還原為醇基，其中，氫化鋁或氫化硼試劑係分別包括氫化鋁鋰(LAH)或硼氫化鈉( $\text{NaBH}_4$ )。

術語「烷基化」係將上述所定義之烷基取代上述所定義之基團上的任何官能基。

微小管(microtubule)為觀察癌症化療的重要標的。紫杉醇(paclitaxel 或 taxol)為臨床上常用的抗癌藥物，尤其是針對肺癌、乳癌、大腸癌、子宮頸癌、直腸結腸癌或膀胱癌等。紫杉醇的分子作用機制係藉由穩定微小管以阻止癌細胞的有絲分裂，進而誘發癌細胞的細胞凋亡。

艾瑞莎(Iressa)是一種非小細胞肺癌的標靶治療藥物。肺癌細胞常會產生過量的上皮生長因子受體，造成癌細胞快速的生長、轉移與抗藥性。而艾瑞莎是上皮生長因子受體的抑制劑，它抑制癌細胞生長及轉移，而達到治療效果。

舒癌特(Sutent)主要係抑制血小板衍生生長因子受體(PDGF-R)和血管內皮生長因子受體(VEGF-R)，同時具有抑制癌細胞增生(proliferation)及血管新生(angiogenesis)的作用，進而抑制癌細胞的生長及轉移。

以下參照實施例具體說明本發明，然而，必須說明的

是該等實施例僅例示性地說明本發明，並非用於限制本發明。

## 實施例

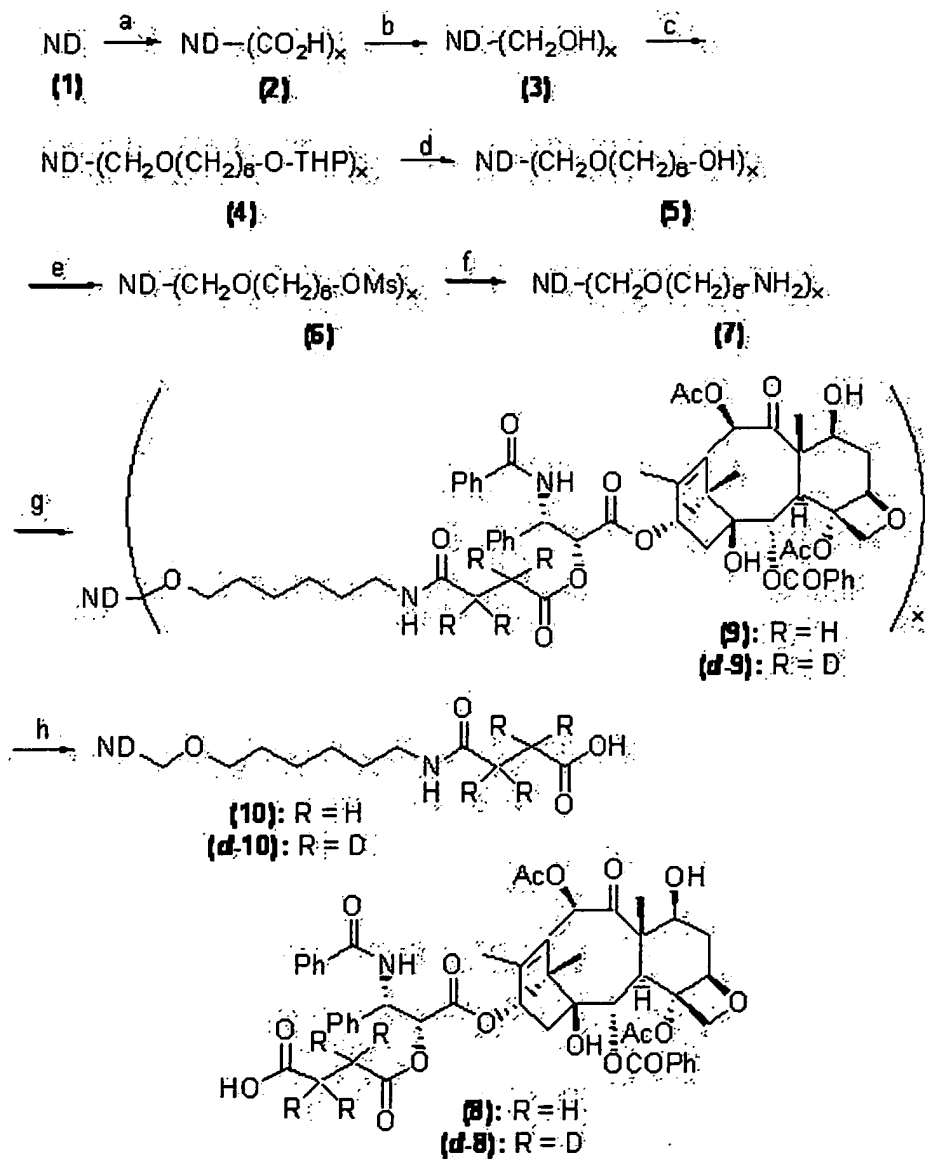
於下列實施例中所使用的紫杉醇係購自 Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Japan。丁二酸酐係購自 Acros Organics (Geel, Belgium)。直徑為 3 至 5 nm 之奈米鑽石係購自 Nanostructured and Amorphous Materials Inc. (Houston, TX)。溴化 3-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎗 (MTT) 及 Cy3-標記小鼠抗- $\beta$ -微管素(c-4585)係購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 為 Perkin Elmer Paragon 1000 FTIR 光譜儀。

### 實施例 1：以具連接子之奈米鑽石連結紫杉醇

合成 ND 以及連接子並進一步與紫杉醇鍵結的步驟分別如下反應圖 1 所示：**a.**將奈米鑽石(1)先以 HCl/HNO<sub>3</sub> 進行酸化及氧化處理以生成(2)；**b.**再以 LAH 進行還原以產生(3)；**c.**接著以一個烷基鏈將(3)取代衍生形成(4)，所延伸出的長鏈用以進一步衍生；**d.**將末端之 THP(四氫吡喃基(tetrahydropyranyl))保護基切除以產生(5)；**e.**使(5)之末端轉換成離去基，如甲烷磺酸酯(methanesulfonate)以形成(6)；**f.**將(6)之末端轉換成-NH<sub>2</sub> 官能基以形成(7)。隨後，將(7)與活性單元反應，使活性單元得以掛載於奈米鑽石上。以奈米鑽石連結紫杉醇為例：**g.**先將紫杉醇(8)與丁二酸酐(succinic anhydride)反應，再將反應後所得到的產物與

(7)反應，即可得到以共價鍵結連接有紫杉醇的奈米鑽石顆粒(9)。所得到的(9)進一步進行以下反應：h.以 1 M NaOH 處理(9)，以得到去除紫杉醇作用的(10)。本實施例另以 D(氘)取代 H (如 *d-8*、*d-9* 及 *d-10*)，以藉此進一步分析包括紫杉醇的載體的光譜鑑定。

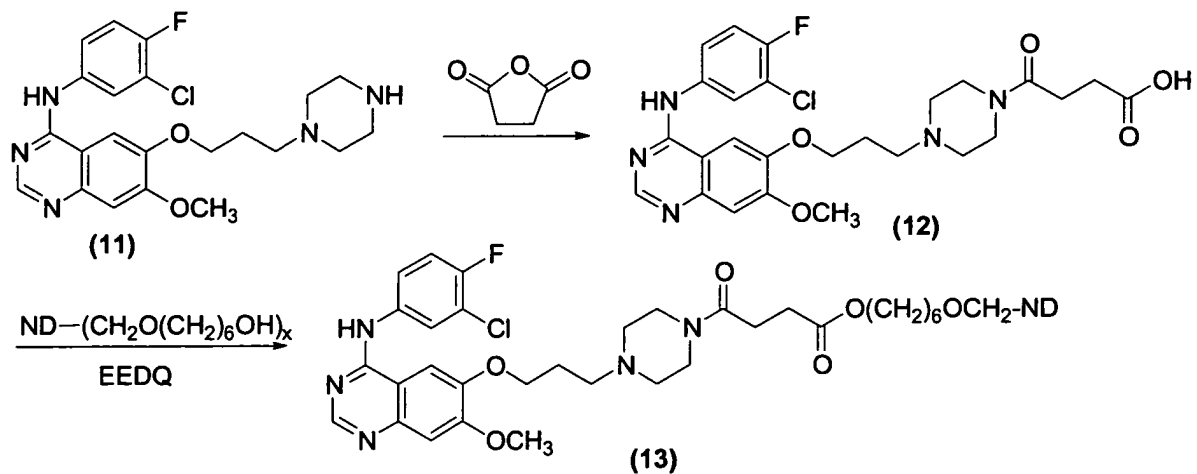
關於反應圖 1 中的(5)及(7)之 FTIR 光譜係分別如第 1 圖及第 2 圖所示。



反應圖 1

實施例 2：以具連接子之奈米鑽石連結艾瑞莎 (Iressa; ZD1839)

奈米鑽石連接抗癌藥物艾瑞莎 (Iressa) 的化學合成步驟如下反應圖 2 所示。先將艾瑞莎 (11) 與丁二酸酐 (succinic anhydride) 反應以生成艾瑞莎的衍生物 (12)，再將 (12) 與具有連接子之奈米鑽石在 EEDQ (2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline) 之水溶液中反應，使艾瑞莎的衍生物 (12) 與具有連接子的奈米鑽石形成 (13)。

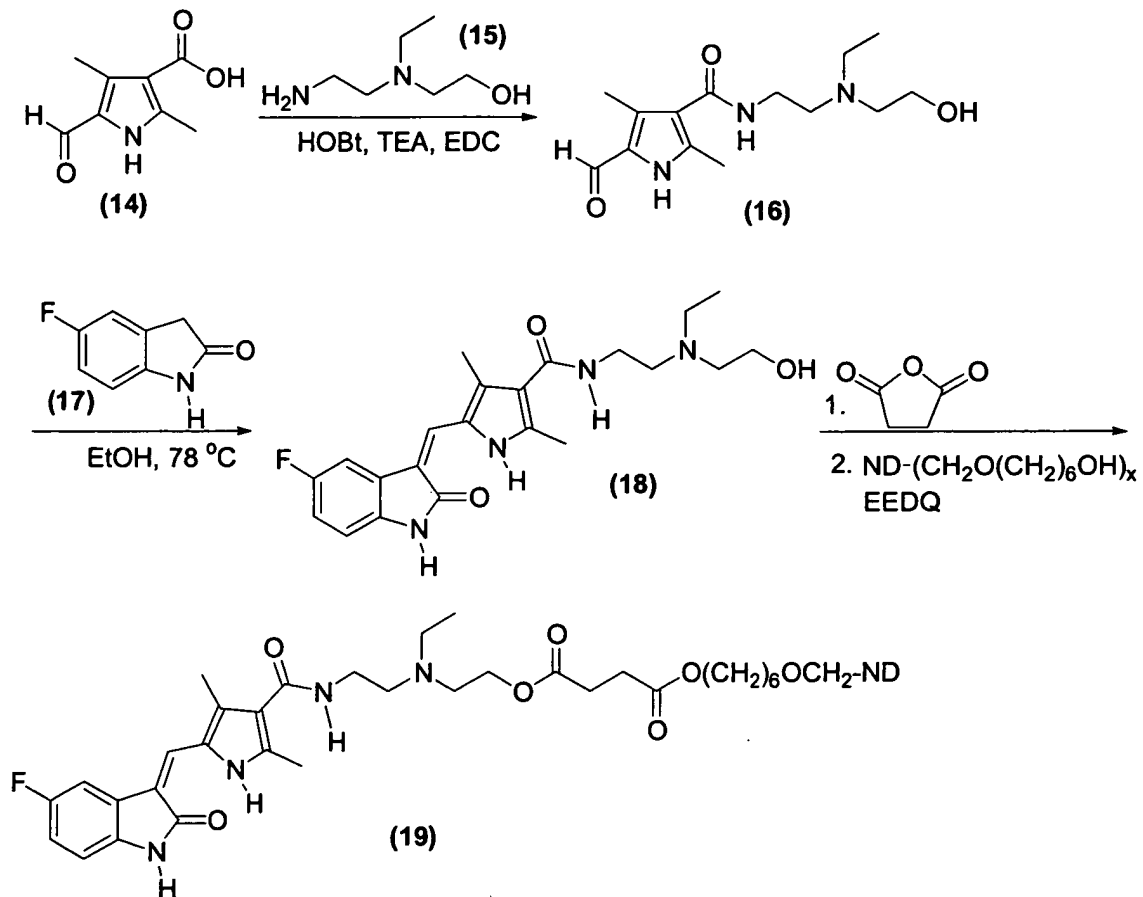


反應圖 2

實施例 3：以具連接子之奈米鑽石連結舒癌特 (Sutent; Sunitinib)

奈米鑽石連接抗癌藥物舒癌特 (Sutent) 的化學合成步驟如下反應圖 3 所示。先將化合物 (14) 與化合物 (15) 反應生成化合物 (16)，再將化合物 (16) 與化合物 (17) 結合生成化合

物(18)，隨後將化合物(18)與丁二酸酐反應生成紓癌特的衍生物，接著再與(5)反應生成連接有紓癌特之衍生物的奈米鑽石(19)。

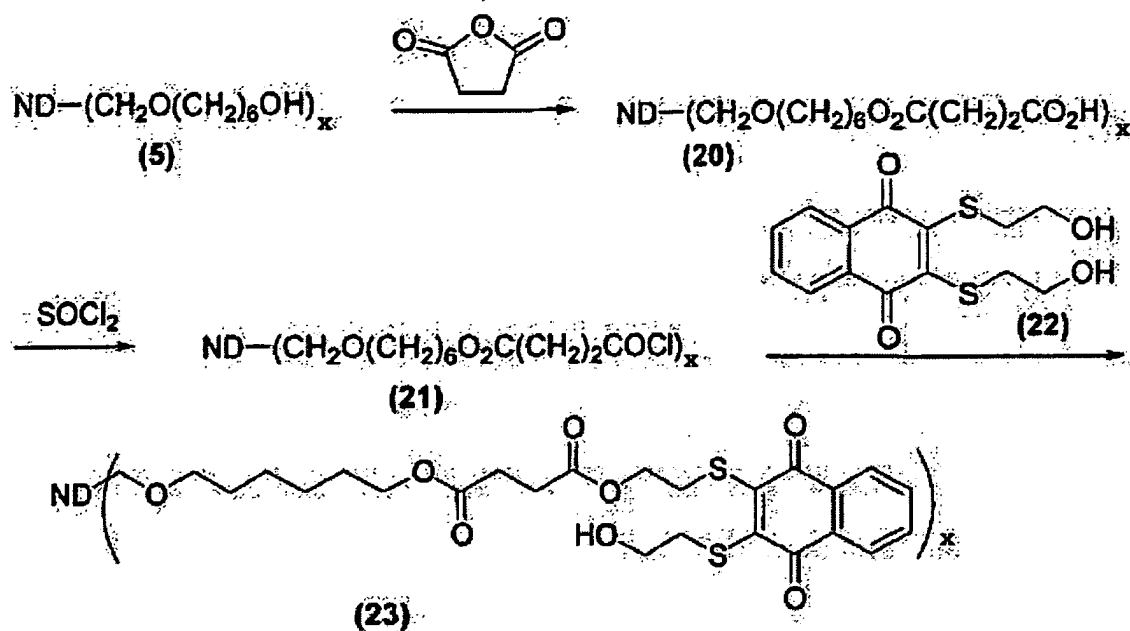


反應圖 3

實施例 4：以具連接子之奈米鑽石連結維生素 K3 衍生物

奈米鑽石連接維生素 K3 衍生物的化學合成步驟如下反應圖 4 所示。將具有連接子之奈米鑽石(5)與丁二酸酐(succinic anhydride)反應以生成奈米鑽石的衍生物(20)，再將(20)以 SOCl<sub>2</sub> 處理以進一步轉變成醯氯(21)，接著將(21)與維生素 K3 的衍生物(22)反應，即可生成連接維生素 K3 衍生物之奈米鑽石(23)。

關於反應圖 4 中的(21)及(23)之 FTIR 光譜係分別如第 3 圖及第 4 圖所示。



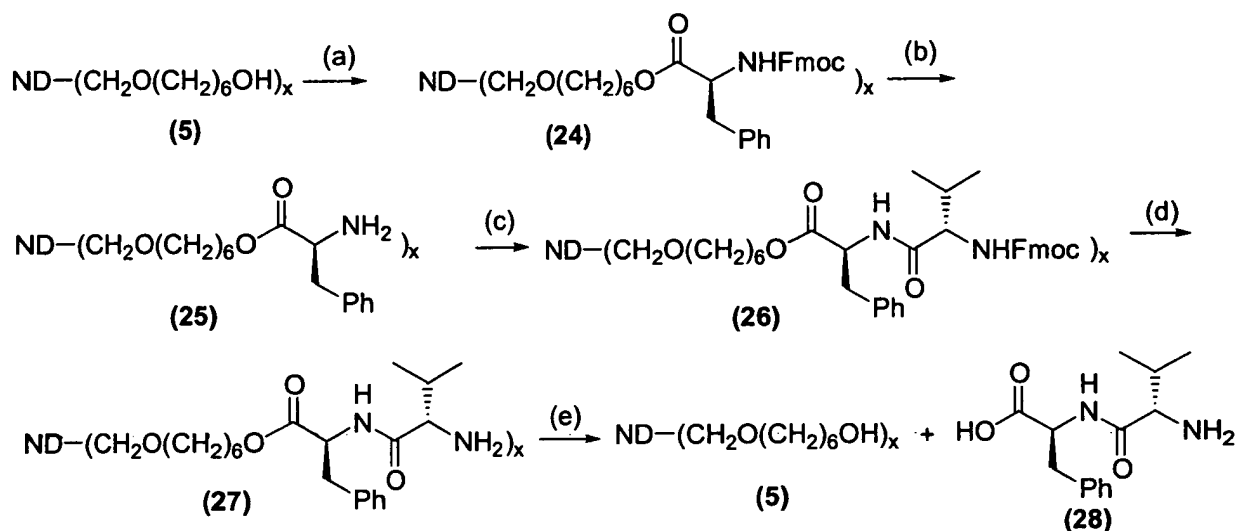
反應圖 4

實施例 5：以具連接子之奈米鑽石連結胜肽(peptide)

奈米鑽石連接胜肽的化學合成步驟如下反應圖 5 所示。先將具連接子之奈米鑽石(5)和 N-(9-芴基甲氧基羰基)-L-苯基丙胺酸在 DCC、DMAP 以及  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的混合溶液中反應以生成(24)。(24)上的 fmoc 保護基則以 20%的哌啶(piperidine)在 DMF 的溶液中切除以生成(25)，接著再與 N-(9-芴基甲氧基羰基)-L-纈胺酸在 DCC、DMAP 以及  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的混合溶液中反應以生成(26)。(26)上的 fmoc 保護

基再以 20% 的哌啶在 DMF 的溶液中切除以生成(27)。最終以 1 M NaOH 處理(27)，即可生成二胜肽(28)。

關於反應圖 5 中的(27)之 FTIR 光譜係如第 5 圖所示。



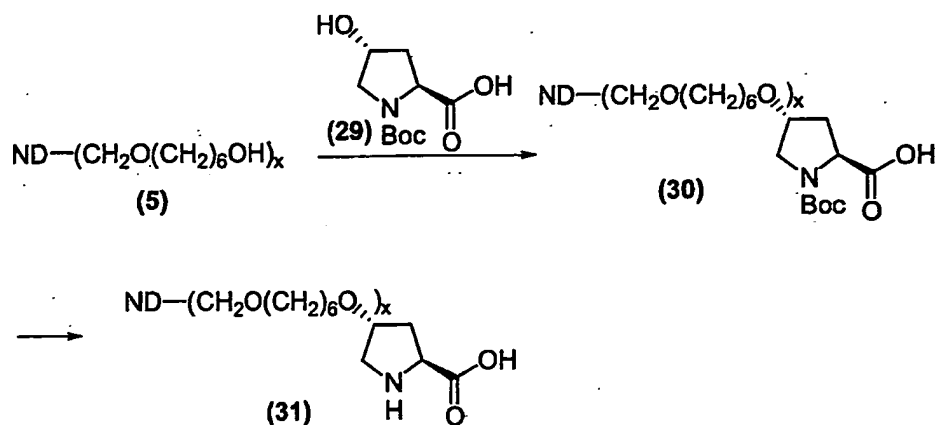
反應圖 5

實施例 6：將具連接子之奈米鑽石應用於不對稱反應中

奈米鑽石應用於不對稱反應的化學合成步驟如下反應圖 6 所示。先將具連接子之奈米鑽石(5)與羥脯胺酸(29)反應生成(30)，再以三氟醋酸處理將保護基 Boc 切除，即可生成(31)。所形成具有旋光性的(31)可應用於後續的不對稱反應中。

關於反應圖 6 中的(31)之 FTIR 光譜係如第 6 圖所示。

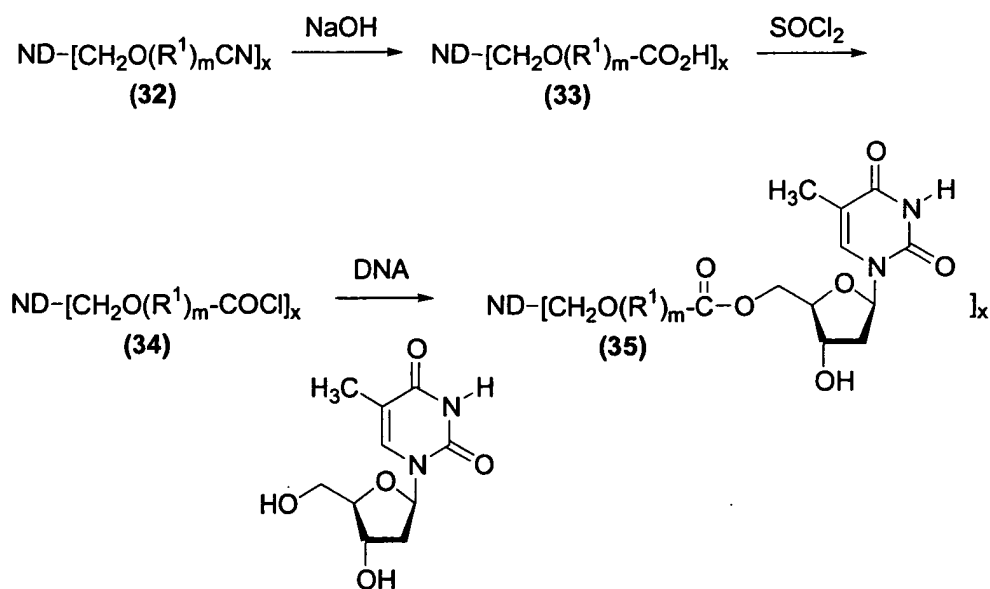




反應圖 6

### 實施例 7：以具連接子之奈米鑽石連結 DNA

奈米鑽石連結 DNA 的化學合成步驟如下反應圖 7 所示。先以 NaOH 處理 (32) 以生成 (33)，再將 (33) 以 SOCl<sub>2</sub> 處理以轉變成醯氯 (34)，接著將 (34) 與 DNA 反應即可生成连接有 DNA 之奈米鑽石 (35)。



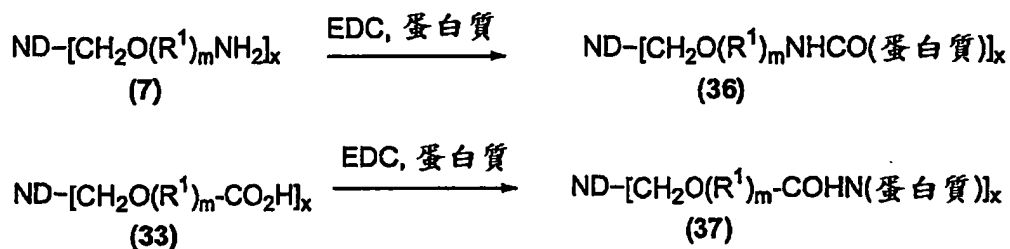
反應圖 7

### 實施例 8：以具連接子之奈米鑽石連結蛋白質

奈米鑽石連接蛋白質的化學合成步驟如下反應圖 8 所示。

1. 以具連接子之奈米鑽石連接蛋白質之酸端：將(7)與蛋白質在 EDC 的水溶液中反應，使蛋白質連接奈米鑽石而形成(36)。

2. 以具連接子之奈米鑽石連接蛋白質之鹼端：將(33)與蛋白質在 EDC 之水溶液中反應，使蛋白質連接奈米鑽石而形成(37)。

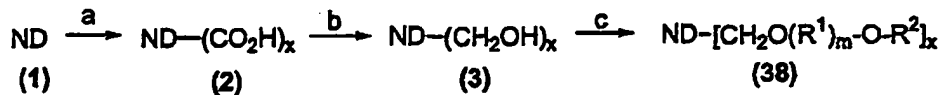


反應圖 8

實施例 9：以具連接子之奈米鑽石連結其他化學合成衍生物

奈米鑽石連接其他化學合成衍生物的化學合成步驟如下反應圖 9 所示。各種新式奈米鑽石的化學衍生物( $\text{R}^1$  至  $\text{R}^{12}$ )，可與其他各式藥物或生物分子連接。

關於反應圖 9 中的(41)及(42)之 FTIR 光譜係分別如第 7A 至 7H 圖所示。

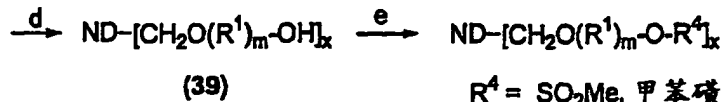


(1)

(2)

(3)

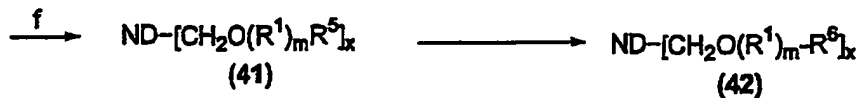
(38)

 $\text{R}^1 = -\text{CH}_2-, -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  $\text{R}^2 = \text{THP}, \text{CH}(\text{OR}^3)_2,$  $\text{R}^3 = \text{烷基}$ 

(39)

 $\text{R}^4 = \text{SO}_2\text{Me}, \text{甲苯磺醯基}$ 

(40)



(41)

(42)

 $\text{R}^5 = \text{NH}_2, \text{SH}, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{CN}, \text{N}_3, \text{SCN},$   
烷基, 烯基, 炔基, 芳基 $\text{R}^6 = \text{CO}_2(\text{R}^7)_n, \text{CHO}, \text{CO}(\text{R}^8)_n, \text{NHR}^9, \text{N}(\text{R}^{10})_n, \text{R}^{11}, \text{SR}^{12},$   
 $\text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9, \text{R}^{10}, \text{R}^{11}, \text{R}^{12} = \text{烷基}, \text{烯基}, \text{炔基}, \text{芳基}, \text{胺基}$ 

## 反應圖 9

## 實施例 10：包括紫杉醇的載體的特徵化

經過實施例 1 的步驟所獲得之包括紫杉醇的載體的鍵結可藉由使用傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 來確定。奈米鑽石鍵結至紫杉醇後的型態及尺寸大小亦可藉由原子力顯微鏡 (AFM) 與掃描式電子顯微鏡 (TEM) 進行分析。

參照反應圖 1，在各步驟中的 ND 樣本經 FTIR (直接吸收法) 確認其已成功官能化，並清楚觀察到在後續步驟中的中間產物的特定官能性之延伸與移除。對  $\text{SO}_2$  的吸光值分別為  $1203 \text{ cm}^{-1}$  及  $1315 \text{ cm}^{-1}$ ，對  $\text{NH}_2$  的吸光值為  $3390 \text{ cm}^{-1}$  (參見第 8B 圖中的 (b) 與 (II) 所示之處)，而對 CONH 的吸光值為  $1700 \text{ cm}^{-1}$ 。為了進一步証實紫杉醇鍵結於 ND 的表面，以類似的方法合成氘化紫杉醇-2'-琥珀酸酯 (d-8)，並使之接附於 ND 的表面 (d-9)。d-9 在約  $2131 \text{ cm}^{-1}$  及  $2219$

$\text{cm}^{-1}$  呈現密集的波帶(參見第 8B 圖中的(b)、(c)、(d)及(III)所示之處)。d-9 的皂化則將紫杉醇在酯的部分從 ND 的表面切離，因而留下 d-10 (參見第 8B 圖中的(e)及(III)所示之處)。

第 9 圖所示係藉由 AFM 及 TEM 觀察原始 ND 及包括紫杉醇的載體(9)的粒度及表面型態。AFM 影像顯示原始 ND 顆粒的平均粒度為約 5 nm (參見第 9A 圖中之左圖)。一如所預測的，包括紫杉醇的載體的粒度增加至約 10 nm (參見第 9A 圖中之右圖)。ND 及包括紫杉醇的載體的 TEM 影像分別顯示於第 9B 圖的左圖(星號所示處)及右圖(箭頭所示處)。包括紫杉醇的載體的粒度與單獨的 ND 相比明顯地增加(參見第 9B 圖)。

實施例 11：包括紫杉醇的載體穩定微小管及阻止有絲分裂進行

紫杉醇可穩定微小管且誘導不正常之微小管束的形成，以阻止有絲分裂的進行。為檢驗包括紫杉醇的載體是否影響微小管，先使用包括紫杉醇的載體(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，24 小時)處理 A549 細胞(ATCC 編號：CCL-185)，之後將 A549 細胞進行細胞骨架及細胞核染色，其結果如第 10 圖所示。來自 ND 顆粒的綠色螢光係由波長 488 nm 激發而在 510 至 530 nm 的範圍檢測螢光。紅色螢光(Cy3)係由 A549 細胞的微小管表現。而細胞核係以 Hoechst 33258 染色，因此呈現藍色螢光。以包括紫杉醇的載體(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，24 小

時)或紫杉醇(50 nM, 24 小時)處理的細胞, 顯著地增加細胞所進行的有絲分裂(參見第 10A 圖, 星號所示處)。包括紫杉醇的載體或紫杉醇誘發微小管聚合、阻止紡錘體形成以及抑制染色體分離(參見第 10B 圖, 箭頭所示處)。箭頭所示處顯示經包括紫杉醇的載體或紫杉醇處理後的細胞, 其染色體擾亂(參見第 10B 圖)。相對地, ND (100  $\mu$ g/mL, 24 小時)本身則並未誘導微小管的改變(參見第 10A 圖及第 10B 圖)。未鍵結至 ND 的紫杉醇在 A549 細胞中可抑制微小管, 並且未發出 ND 的綠色螢光(參見第 10A 圖及第 10B 圖)。此外, 進一步藉由雷射掃瞄共軛焦顯微鏡的 Z-軸影像檢測包括紫杉醇的載體被攝入至細胞中的能力, 以包括紫杉醇的載體(100  $\mu$ g/mL, 48 小時)處理後的 A549 細胞之截面影像係以共軛焦顯微鏡捕捉, 經由從底部至頂部的 Z-軸剖面圖顯示包括紫杉醇的載體顆粒位於細胞內部(參見第 11 圖)。黃色則代表包括紫杉醇的載體位於微小管。

進一步以流式細胞儀及有絲分裂指數分析 A549 細胞, 以檢測包括紫杉醇的載體對細胞週期進行以及有絲分裂終止的影響。與未經處理的樣本相比, 包括紫杉醇的載體或未鍵結之紫杉醇顯著地減少 A549 細胞中 G1/G0 的細胞比例, 然而卻增加 G2/M 的細胞比例( $p < 0.01$ )(參見第 12A 圖)。在以紫杉醇及包括紫杉醇的載體處理後的 G2/M 的細胞比例所增加的平均數分別為 76.2%及 83.4%。為了測定包括紫杉醇的載體所誘發之 G2 或 M 期, 進一步以有絲分裂指數分析細胞。經包括紫杉醇的載體(100  $\mu$ g/mL,

24 小時)或紫杉醇(50 nM, 24 小時)處理後進行有絲分裂的細胞增加約 40%，然而，單獨的 ND 則並未誘發 A549 細胞的有絲分裂終止(參見第 12B 圖)。

為了進一步證實在 ND 上之紫杉醇的活性，以 1 M NaOH 處理包括紫杉醇的載體以去除紫杉醇的生物活性。經 NaOH 處理之包括紫杉醇的載體顆粒並未改變 A549 細胞中的有絲分裂指數(參見第 12B 圖)。

實施例 12：包括紫杉醇的載體誘發癌細胞死亡及細胞凋亡

除了抑制微小管以外，紫杉醇也是細胞凋亡的誘導藥物。從三次實驗中得知，包括紫杉醇的載體所誘導的次-G1 比例(細胞凋亡比例)平均為 13.4%(參見第 12A 圖)，然而，未經處理的樣本及單獨的 ND 的次-G1 比例則約為 2 至 4%。相較之下，包括紫杉醇的載體與未經處理的樣本或單獨的 ND 之間存在有顯著的統計學差異( $p < 0.01$ )(參見第 12A 圖)。上述的結果係得自 3 個個別的實驗，且條狀圖顯示平均值 $\pm$ SE。 $**P < 0.01$  顯示控制組及包括紫杉醇的載體或紫杉醇之間存在有顯著的差異。

再者，進一步藉由核及細胞骨架染色，於螢光顯微鏡下計算細胞凋亡之細胞核的比例。同樣地，包括紫杉醇的載體顯著地增加 A549 細胞的細胞凋亡比例(~12%)(參見第 13 圖)。經 NaOH 處理之包括紫杉醇的載體顆粒則失去誘導 A549 細胞細胞凋亡的活性(參見第 13 圖)。上述的結果係得自 3 個個別的實驗，且條狀圖顯示平均值 $\pm$ SE。 $**P < 0.01$  顯示控制組及紫杉醇或包括紫杉醇的載體處理樣本之

間存在有顯著的差異。

在以 ND、包括紫杉醇的載體以及經 NaOH 處理之包括紫杉醇的載體處理後，進一步以 MTT 檢驗法分析細胞存活率。結果顯示，ND 顆粒(0.1 至 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，48 小時)並未顯著減少 A549 細胞的細胞存活率(參見第 14 圖)，此結果表示 ND 為相當安全的碳奈米顆粒。上述的結果係得自 4 個個別的實驗，且條狀圖顯示平均值 $\pm$ S.E.。

相反地，包括紫杉醇的載體則以濃度依賴的方式顯著地減少各種細胞株的細胞存活率，包括：A549 肺癌細胞(參見第 15A 圖)、RKO 細胞(結腸直腸癌細胞)(參見第 15B 圖)、HCT116 細胞(大腸癌細胞)(參見第 15C 圖)、BFTC905 細胞(膀胱癌細胞)(參見第 15D 圖)以及 HeLa 細胞(子宮頸癌細胞)(參見第 15E 圖)。上述的結果係得自 3 至 4 個個別的實驗，且條狀圖顯示平均值 $\pm$ SE。 $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$  及  $^{***}P < 0.001$  顯示控制組及包括紫杉醇的載體處理樣本之間存在有顯著的差異。

然而，經 NaOH 處理之包括紫杉醇的載體卻失去誘發癌細胞死亡的活性(參見第 16A 圖)。此結果係得自 8 個個別的實驗，且條狀圖顯示平均值 $\pm$ SE。以從底部至頂部之 Z-軸共軛焦掃描的剖面圖顯示，經 NaOH 處理之包括紫杉醇的載體顆粒被攝入至細胞中，但並未誘發微小管及細胞核的損害(參見第 16B 圖)。

由此可知，本發明提供在癌細胞中具有抗癌活性之包括紫杉醇的載體，為可用於發展癌症治療的新策略。

上述的實施例僅例示性說明本發明，而非用於限制本發明。任何熟習此項技藝之人士均可在不違背本發明之精神及範疇下，對上述的實施例進行修飾與改變。因此，本發明之權利保護範圍將如後述申請專利範圍所載。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖係顯示反應圖 1 中 ND-連接子(5)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 2 圖係顯示反應圖 1 中 ND-連接子(7)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 3 圖係顯示反應圖 4 中 ND-連接子(21)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 4 圖係顯示反應圖 4 中 ND-連接子-維生素 K3(23)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 5 圖係顯示反應圖 5 中 ND-連接子-胜肽(27)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 6 圖係顯示反應圖 6 中(31)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 7A 至 7H 圖係分別顯示反應圖 9 中 ND-連接子(41)及(42)的 FTIR 光譜鑑定分析；

第 8A 及 8B 圖係分別顯示包括紫杉醇的載體的示意圖及其光譜鑑定分析的結果，其中，光譜鑑定分析是藉由氙化的 CD 獨特紅外光譜，確認所有步驟的衍生物共價鍵結合至奈米鑽石上；

第 9A 及 9B 圖係分別顯示以原子力顯微鏡與掃瞄式電子顯微鏡分析奈米鑽石與包括紫杉醇的載體的型態以及



尺寸大小；

第 10A 及 10B 圖係顯示以共軛焦顯微鏡檢測發出螢光之包括紫杉醇的載體抑制人類 A549 肺癌細胞的有絲分裂；

第 11 圖係顯示以共軛焦顯微鏡檢測 ND-連接子-紫杉醇穩定人類 A549 肺癌細胞的微小管骨架蛋白的聚合，使染色體無法分離；

第 12A 及 12B 圖係顯示包括紫杉醇的載體誘發人類 A549 肺癌細胞的細胞凋亡和抑制癌細胞的有絲分裂；

第 13 圖係顯示以 1 M NaOH 處理 ND-連接子-紫杉醇後，會使紫杉醇失去活性，無法抑制癌細胞的存活，證明紫杉醇連接在奈米鑽石上時確實具有抗癌活性；

第 14 圖係顯示奈米鑽石顆粒本身不會造成細胞毒性；

第 15A、15B、15C、15D 及 15E 圖係分別顯示隨著包括紫杉醇的載體處理濃度增高，增加誘發人類 A549 肺癌細胞、RKO 細胞(結腸直腸癌細胞)、HCT116 細胞(大腸癌細胞)、BFTC905(膀胱癌細胞)以及 HeLa 細胞(子宮頸癌細胞)的死亡率；以及

第 16A 及 16B 圖係分別顯示肺癌細胞以經過 NaOH 處理之 ND-紫杉醇處理後之細胞存活率與其以共軛焦顯微鏡掃瞄後之 Z-軸掃瞄影像。

#### 【主要元件符號說明】

無。

## 七、申請專利範圍：

102年8月30日修正  
補正

## 1. 一種載體，包括：

奈米鑽石顆粒；以及

連接子(linker)，係與該奈米鑽石顆粒結合，其中，該連接子係以共價鍵結的方式結合至該奈米鑽石顆粒，

其中，該載體係以式  $ND-[R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q]_x$  表示，式中，

ND 表示該奈米鑽石顆粒，

$-R^1-O(R^2)_m-Q-$  表示該連接子，

$R^1$  為  $C_{1-19}$  伸烷基及  $R^2$  為  $C_{1-20}$  伸烷基，

Q 為羥基、胺基、醯基、羧基、鹵素、氰基、硫基、 $C_{6-16}$  芳香基、疊氮基、硫氰基、 $CO_2(R^3)_n$ 、或  $O(R^8)_n$ ，其中， $R^3$  及  $R^8$  於每次出現時各獨立地為胺基、羧基、酮基、羧基、 $C_{1-20}$  烷基或  $C_{6-16}$  芳香基，且 n 於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數，

x 為 1 或大於 1 的整數；以及

m 於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數。

2. 如申請專利範圍第 1 項之載體，其中，該連接子係結合至該奈米鑽石顆粒之表面。
3. 如申請專利範圍第 1 項之載體，其中， $R^1$  及  $R^2$  為甲基。
4. 如申請專利範圍第 1 項之載體，其中，該連接子

為 1 個或多個。

5. 一種奈米載體藥物，包括

奈米鑽石顆粒；

連接子(linker)，係與該奈米鑽石顆粒結合，  
其中，該連接子係以共價鍵結的方式結合至該奈  
米鑽石顆粒之表面；以及

活性單元，係以共價鍵結的方式結合至該連  
接子，

其中，該奈米載體藥物係以式

$ND-[R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q-A]_x$  表示，

式中，ND 表示該奈米鑽石顆粒，

$-R^1-CH_2-O(R^2)_m-Q-$  表示該連接子，

A 表示該活性單元，

$R^1$  為  $C_{1-19}$  伸烷基及  $R^2$  為  $C_{1-20}$  伸烷基，

Q 為羥基、胺基、醯基、羧基、鹵素、氰基、  
硫基、 $C_{6-16}$  芳香基、疊氮基、硫氰基、 $CO_2(R^3)_n$ 、  
或  $O(R^8)_n$ ，其中， $R^3$  及  $R^8$  於每次出現時各獨立  
地為胺基、羧基、酮基、羧基、 $C_{1-20}$  烷基或  $C_{6-16}$   
芳香基，且 n 於每次出現時獨立地為 1 至 20 的  
整數；

m 於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數，以  
及

x 為 1 或大於 1 的整數。

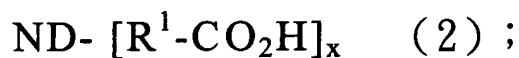
6. 如申請專利範圍第 5 項之奈米載體藥物，其中，

$R^1$  及  $R^2$  為甲基。

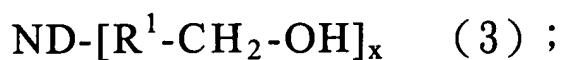
7. 如申請專利範圍第 5 項之奈米載體藥物，其中，該連接子為 1 個或多個。
8. 如申請專利範圍第 5 項之奈米載體藥物，其中，該活性單元包括紫杉醇、艾瑞莎 (Iressa)、紓癌特 (Sutent)、維生素 K3、DNA、胜肽、蛋白質或其衍生物。
9. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之載體之方法，包括：

提供奈米鑽石顆粒；

將該奈米鑽石顆粒進行酸化及氧化，以產生具有式 (2) 結構之第一中間產物，



將該第一中間產物進行還原，以產生具有式 (3) 結構之第二中間產物，



將該第二中間產物進行烷基化，以產生具有式 (4) 結構之第三中間產物，



其中，P 為保護基；以及

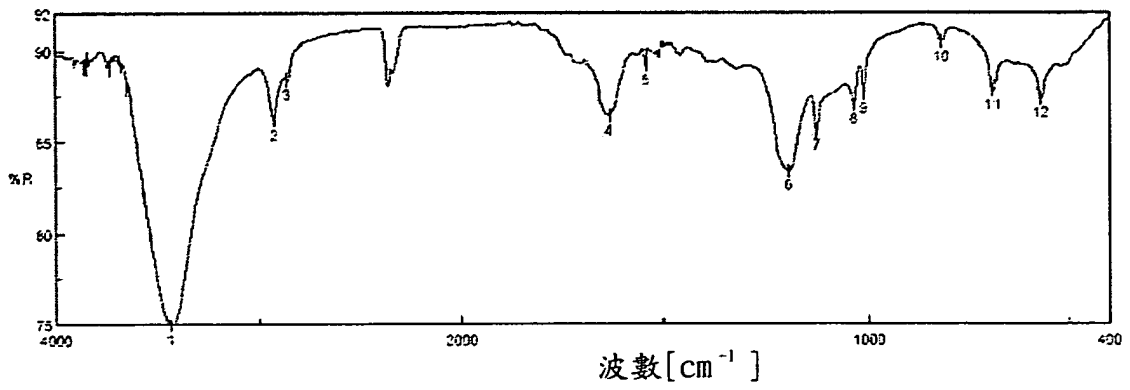
以離去基取代該第三中間產物之保護基，再將該離去基轉換為 Q，

其中，Q 為羥基、胺基、醯基、羧基、鹵素、氰基、硫基、 $\text{C}_{6-16}$  芳香基、疊氮基、硫氰基、

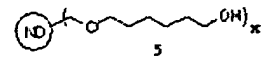
$\text{CO}_2(\text{R}^3)_n$ 、或  $\text{O}(\text{R}^8)_n$ ，其中， $\text{R}^3$  及  $\text{R}^8$  於每次出現時各獨立地為胺基、羰基、酮基、羧基、 $\text{C}_{1-20}$  烷基或  $\text{C}_{6-16}$  芳香基，且  $n$  於每次出現時獨立地為 1 至 20 的整數。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中，該酸化包括以無機酸處理。
11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中，該無機酸包括鹽酸、硝酸、硫酸或其混合溶液。
12. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中，該還原包括以氫化鋁或氫化硼試劑處理。
13. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中，該烷基化包括以  $\text{C}_{1-20}$  烷基取代該第二產物上之任何官能基。
14. 一種如申請專利範圍第 1 項之載體在製備治療癌症之藥物的用途。

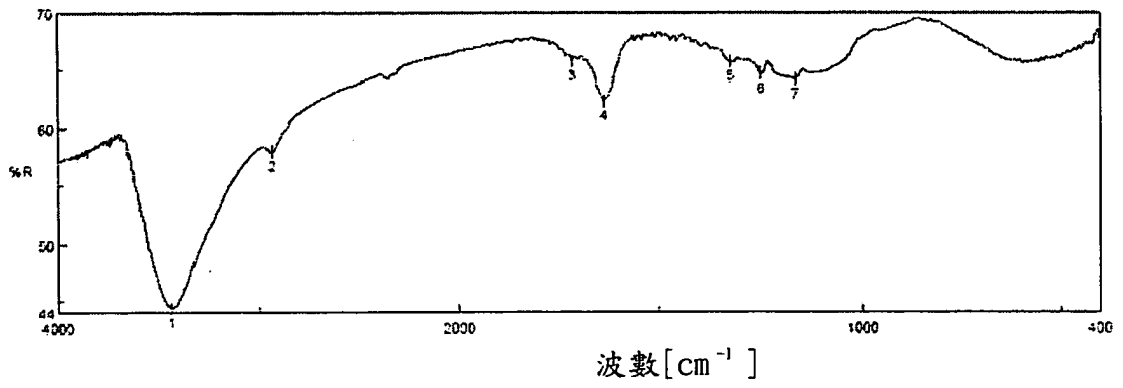
公告本



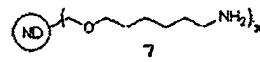
1: 3437.45, 75.03	2: 2923.56, 88.17	3: 2856.72, 88.29	4: 1731.42, 85.32
5: 1640.25, 85.17	6: 1193.72, 83.37	7: 1128.25, 82.00	8: 1031.25, 85.86
9: 1011.42, 87.22	10: 915.62, 90.44	11: 832.40, 87.77	12: 509.86, 87.32



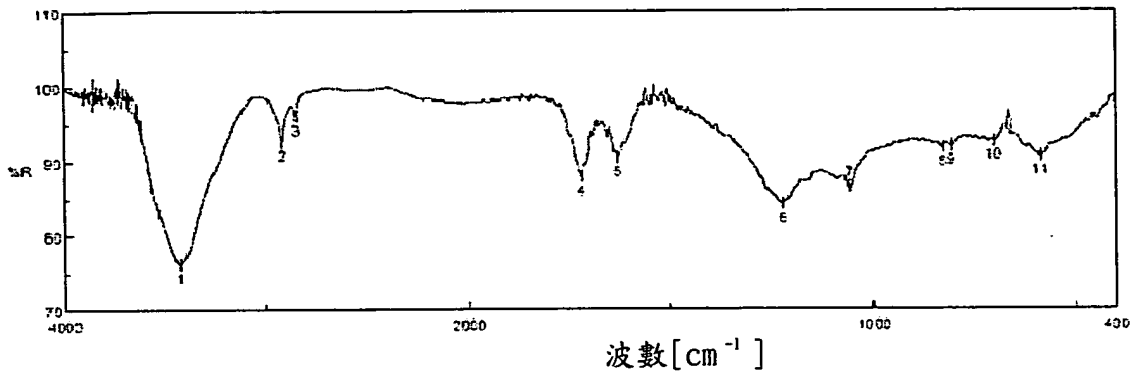
第1圖



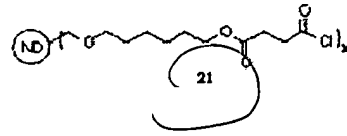
1: 3435.74, 66.44	2: 3320.34, 58.05	3: 1714.41, 55.76	4: 1533.41, 62.37
5: 1522.62, 65.74	6: 1547.72, 64.69	7: 1180.94, 64.54	



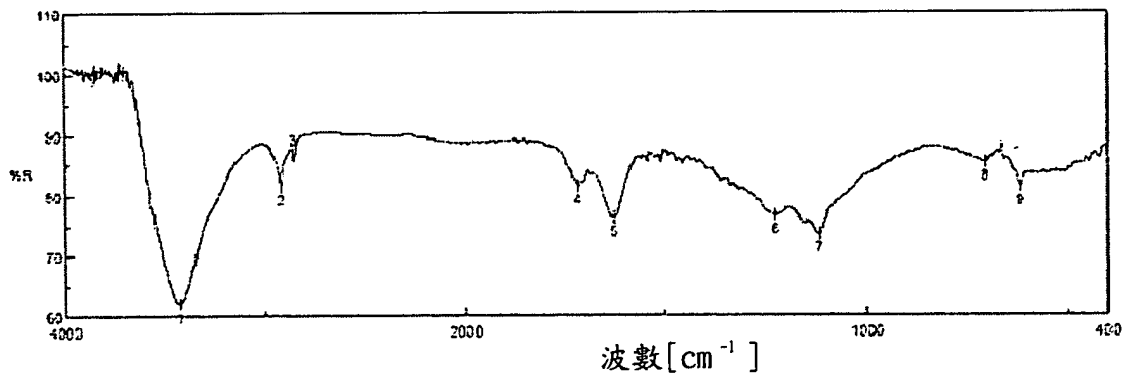
第2圖



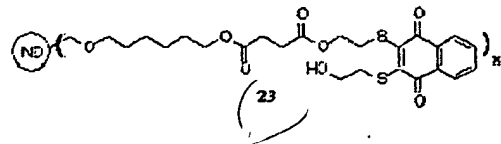
1: 3423.03, 75.22	2: 2915.70, 67.56	3: 2840.31, 95.07	4: 1720.19, 87.96
5: 1623.50, 55.50	6: 1518.79, 92.51	7: 1250.00, 32.54	8: 832.12, 61.84
9: 609.06, 97.98	10: 708.71, 92.82	11: 502.04, 92.68	



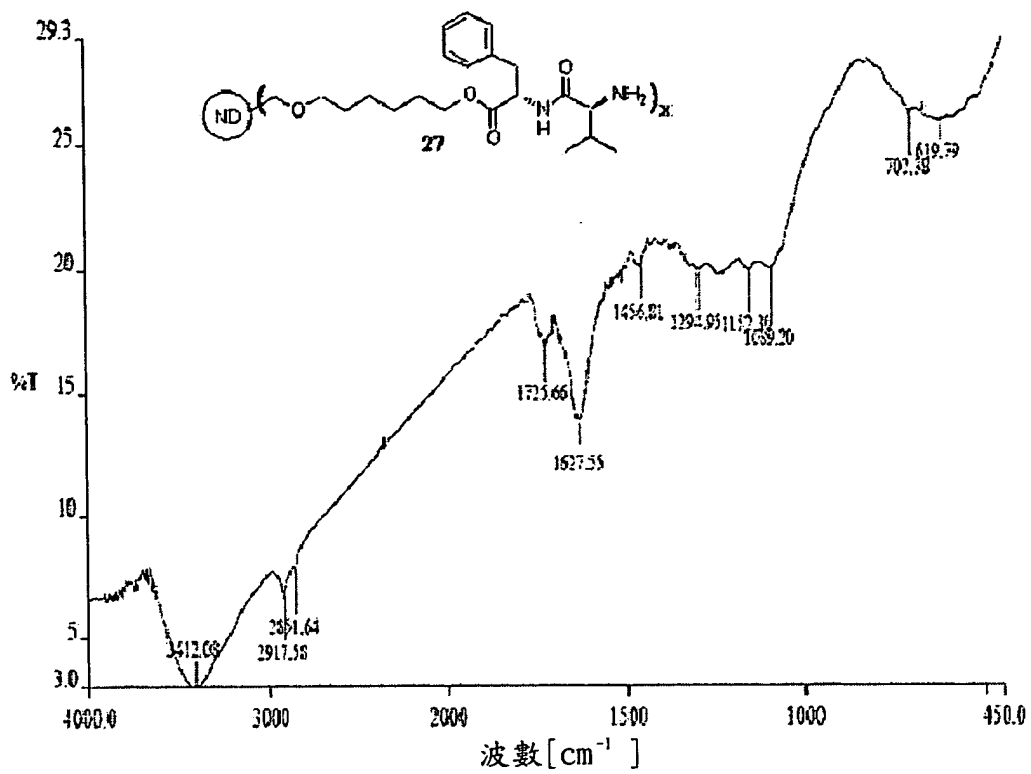
第3圖



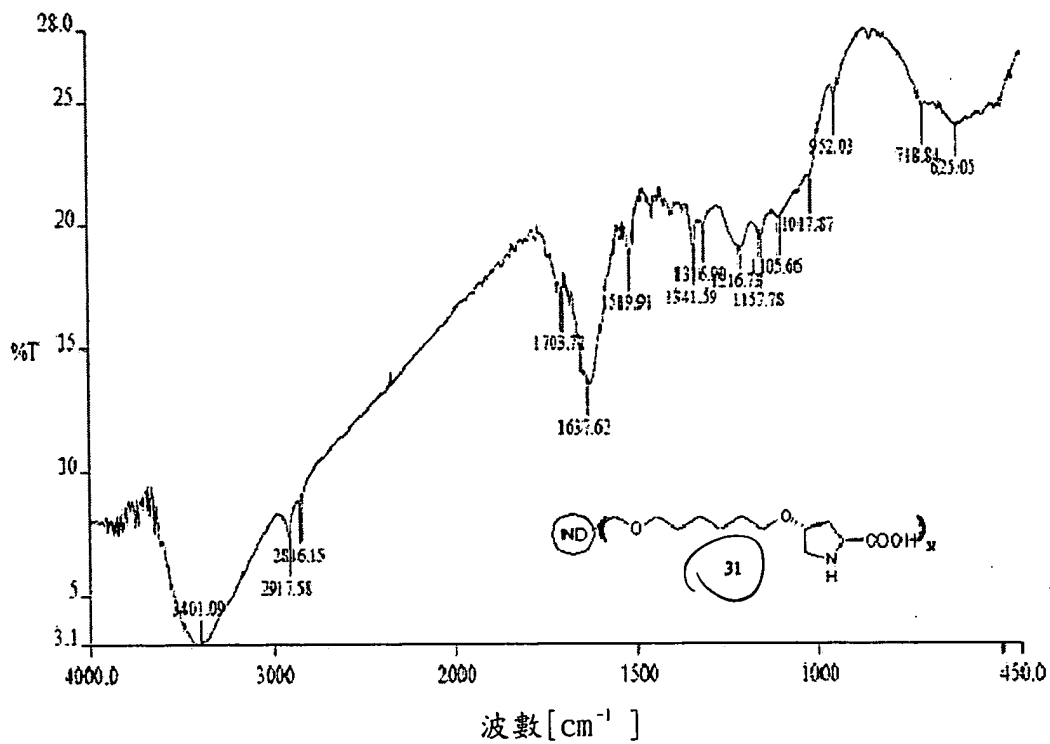
1: 3423.06, 62.17	2: 2912.73, 61.48	3: 2858.08, 92.73	4: 1719.28, 82.24
5: 1628.28, 74.37	6: 1255.64, 78.59	7: 1116.51, 79.48	8: 701.21, 85.42
9: 612.08, 61.29			



第4圖

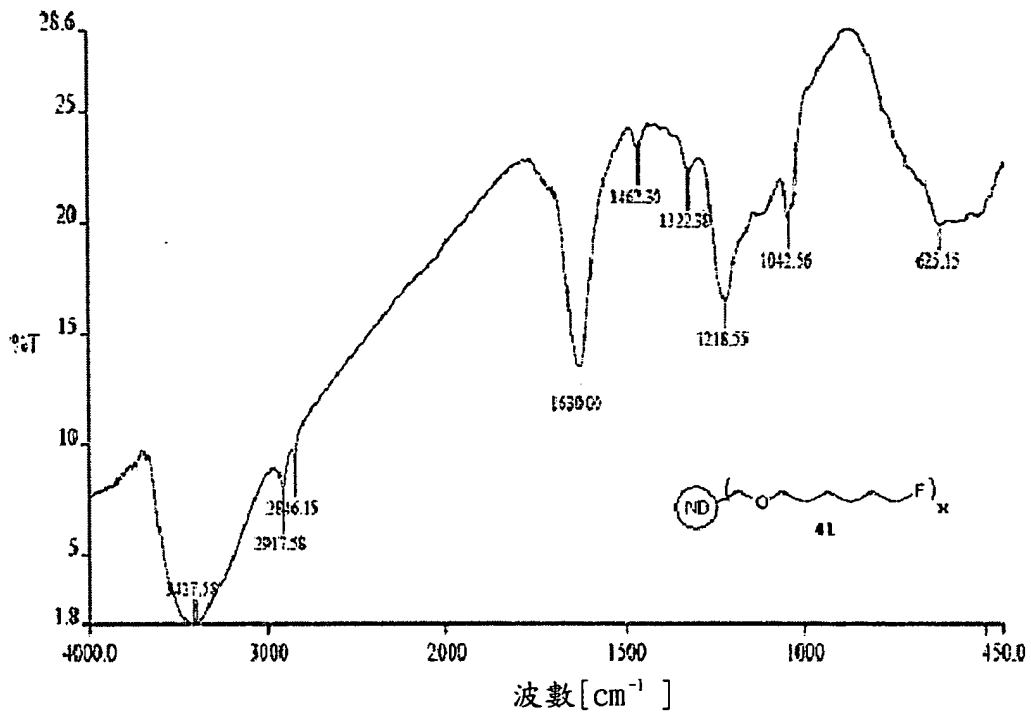


第5圖

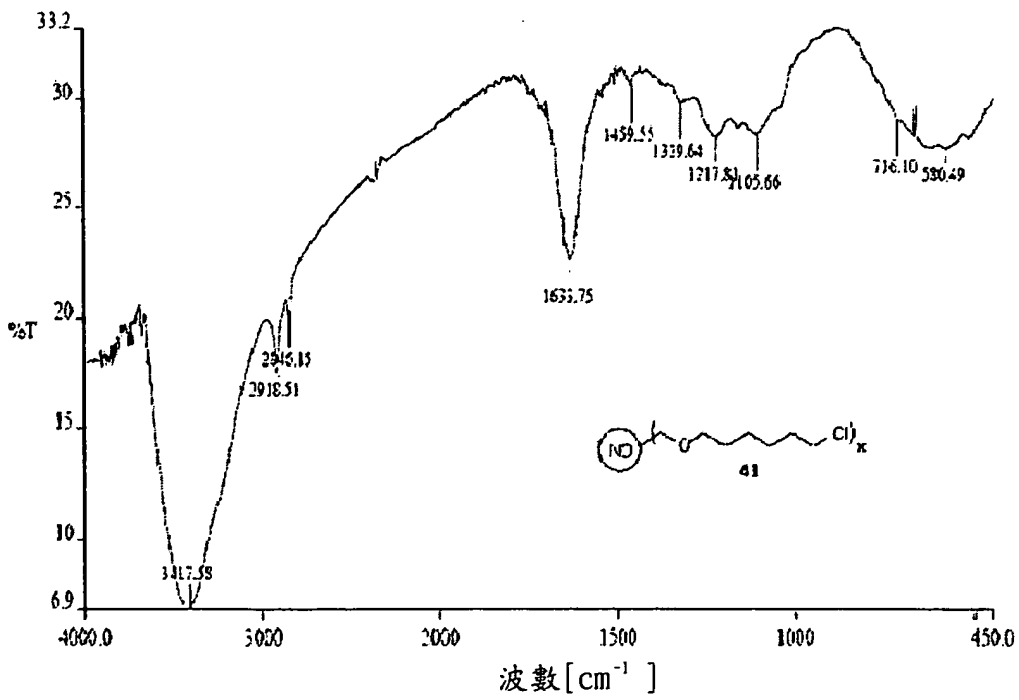


第6圖

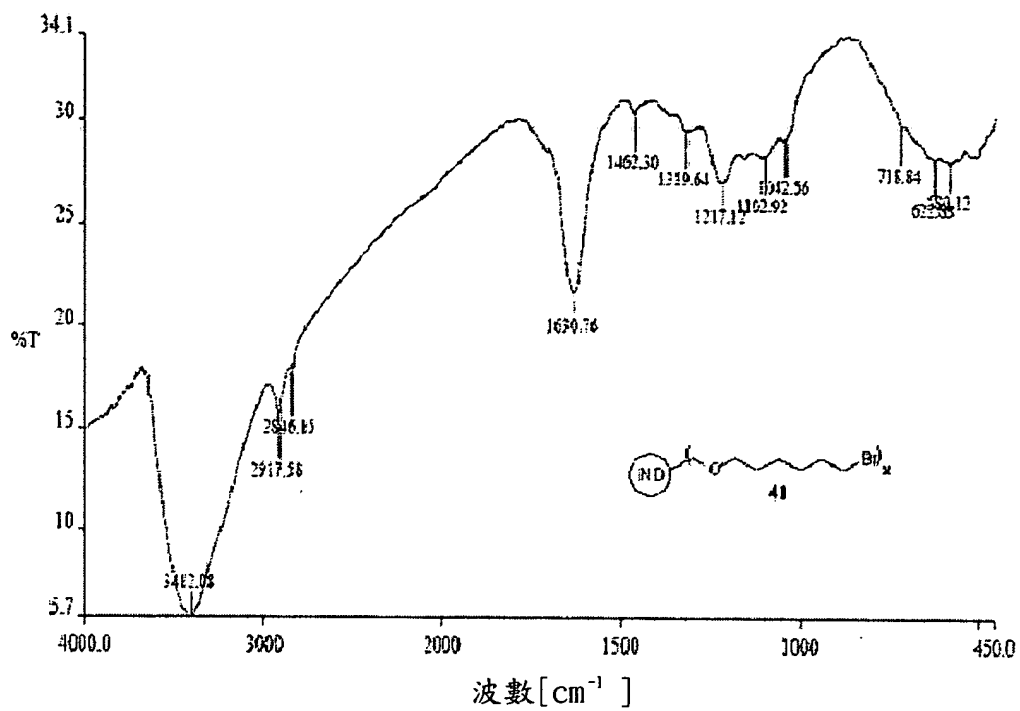




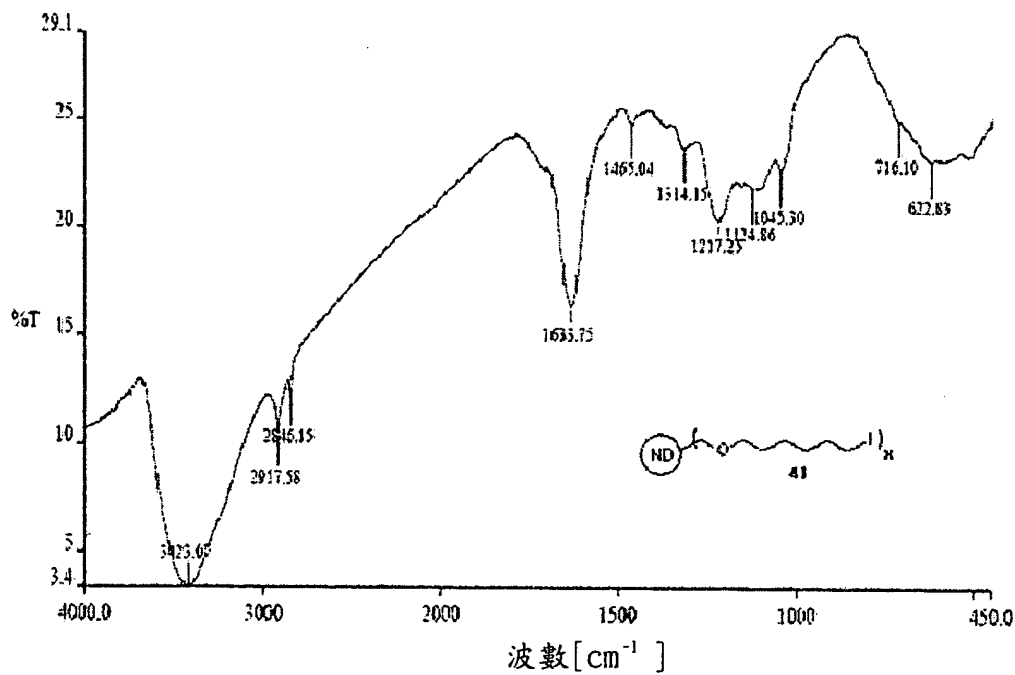
第7A圖



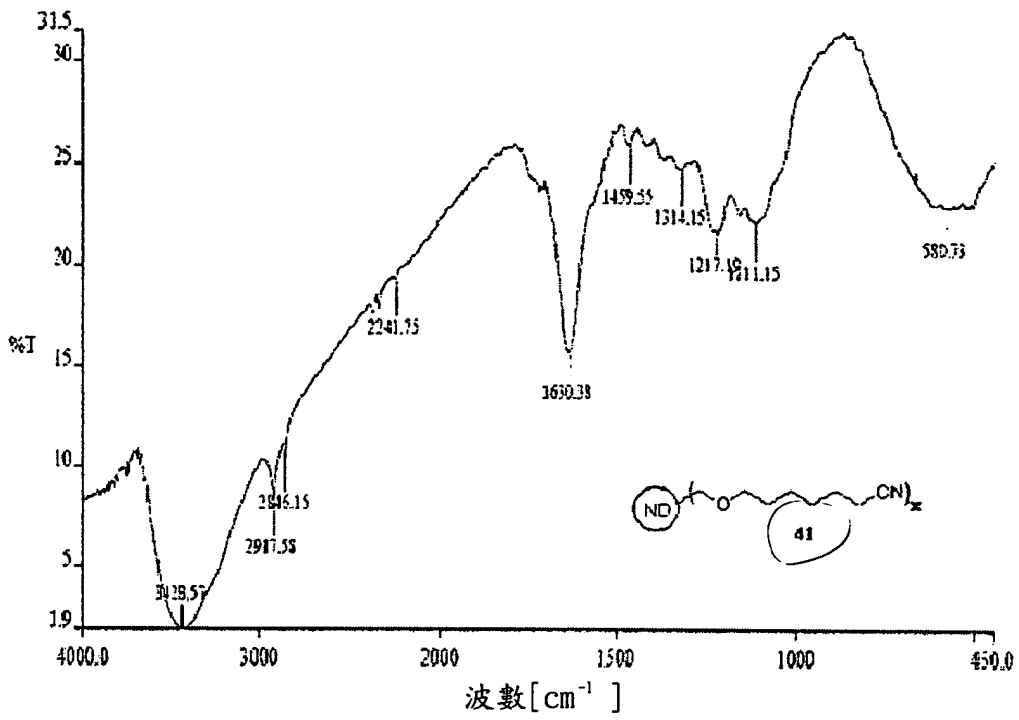
第7B圖



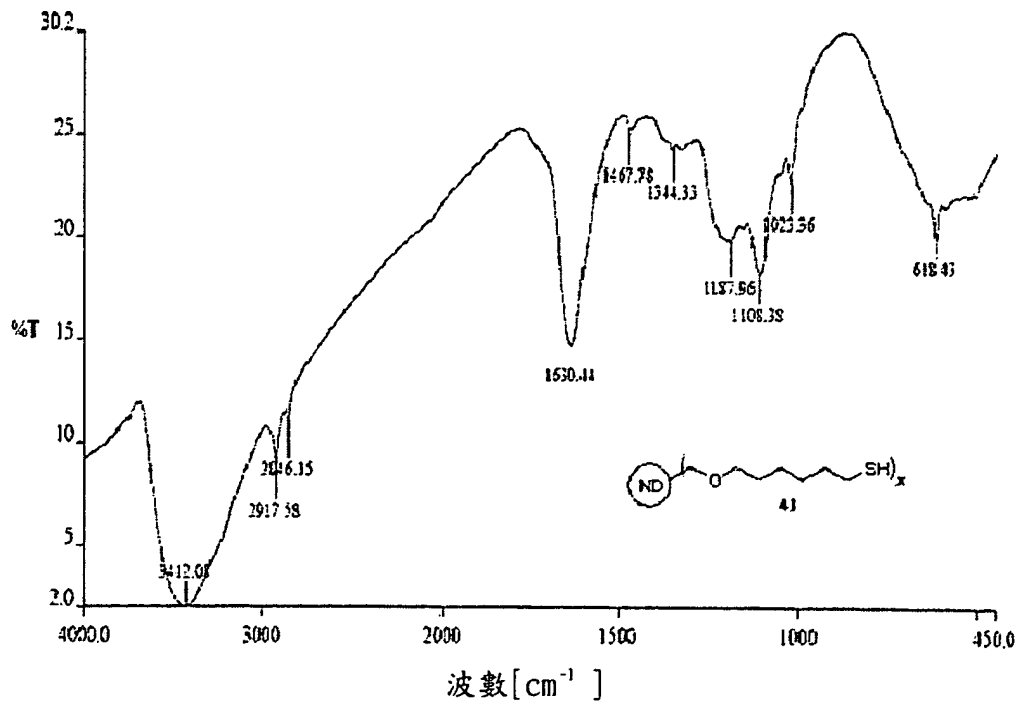
第7C圖



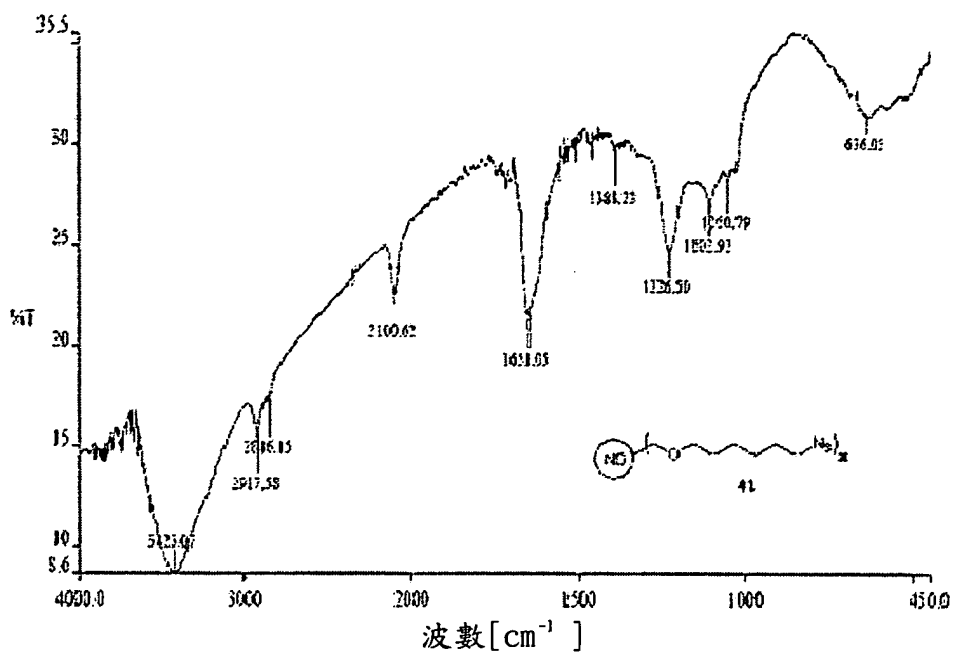
第7D圖



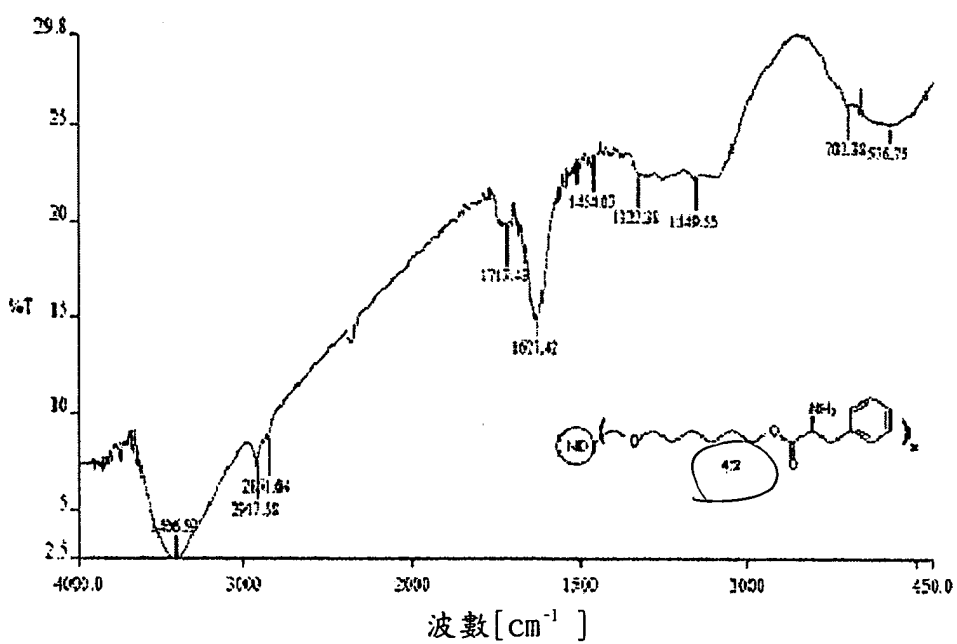
第7E圖



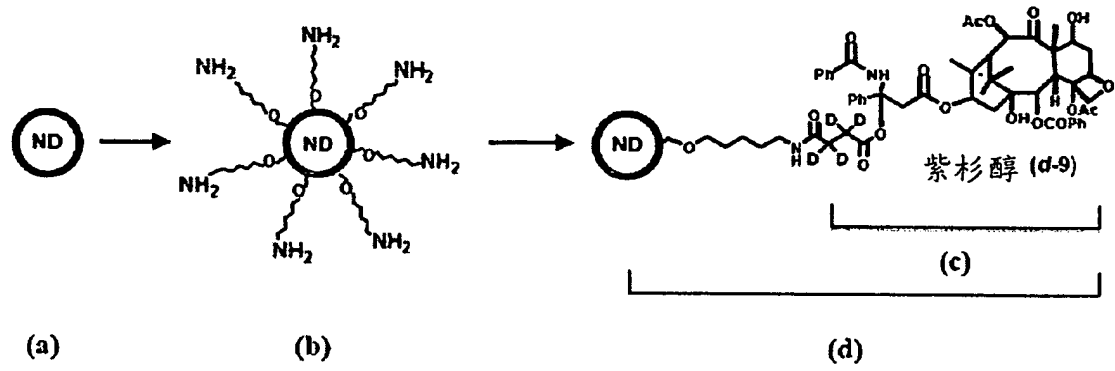
第7F圖



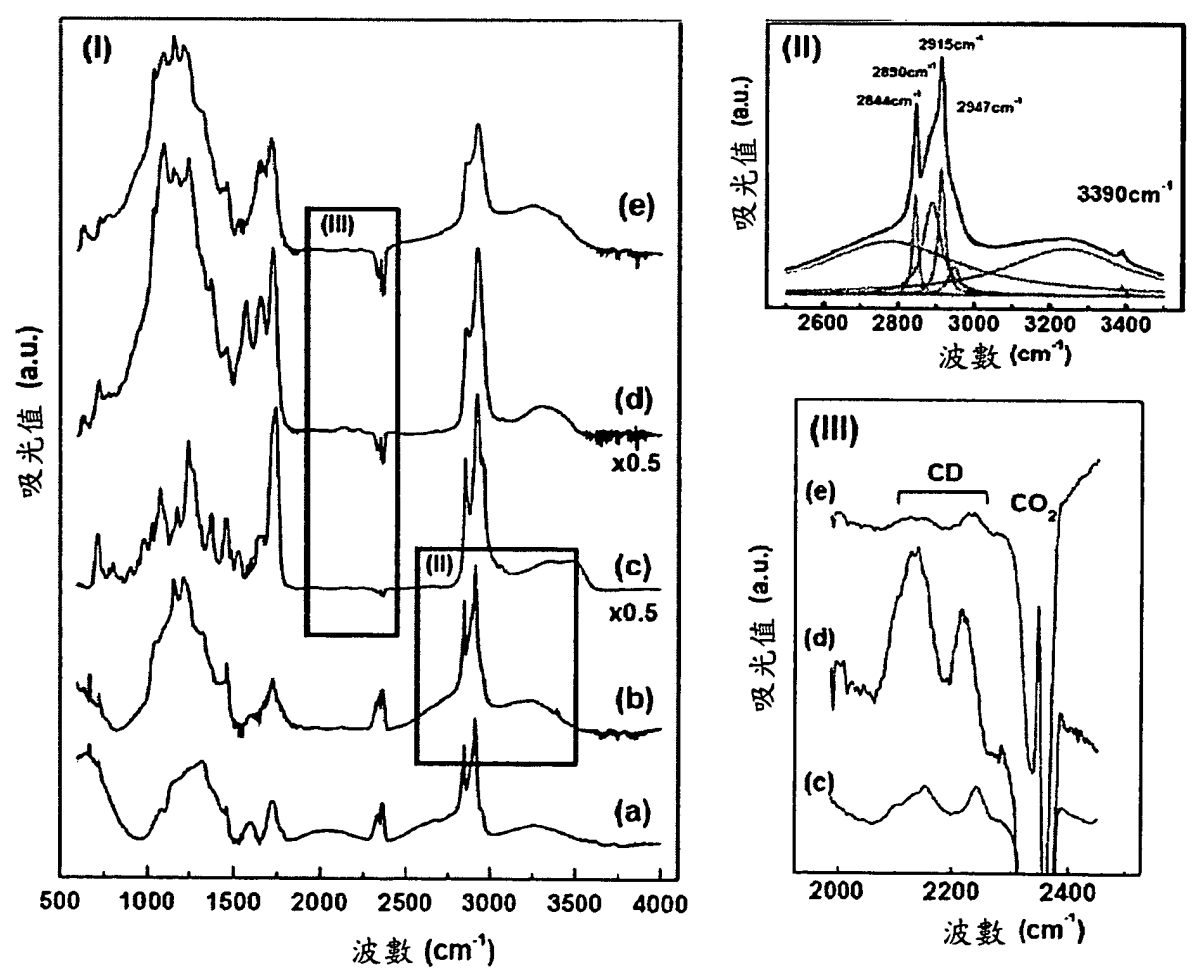
第7G圖



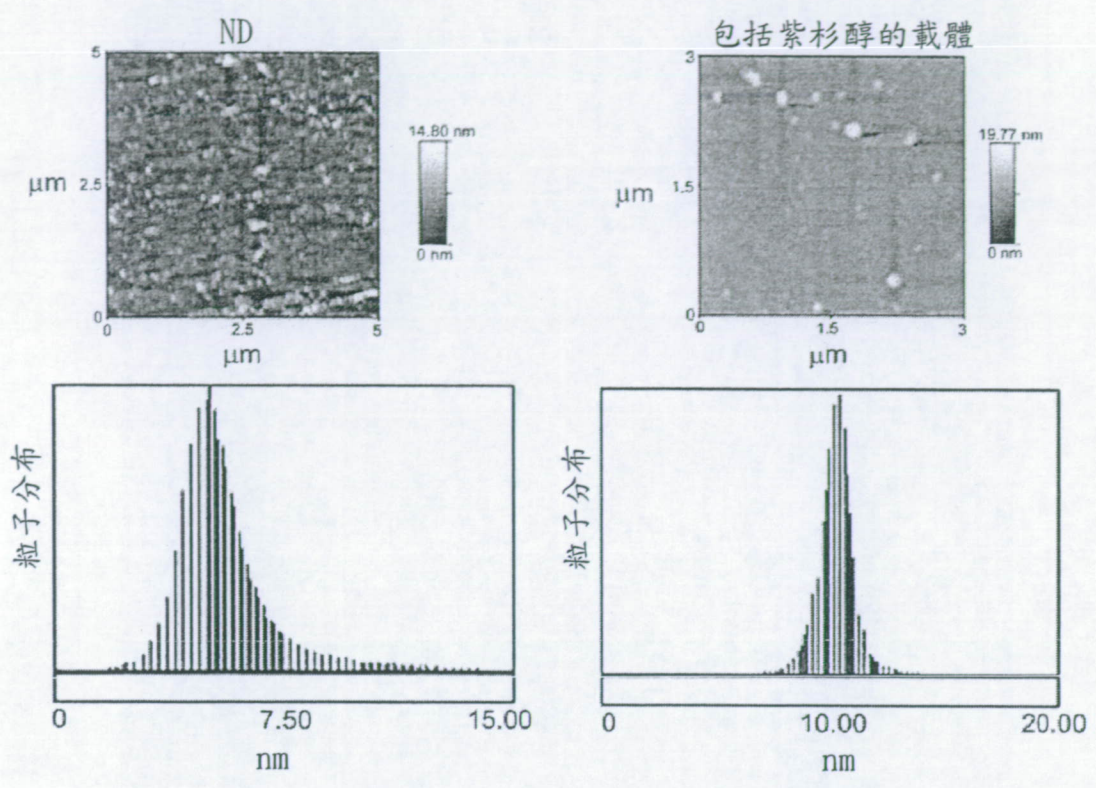
第7H圖



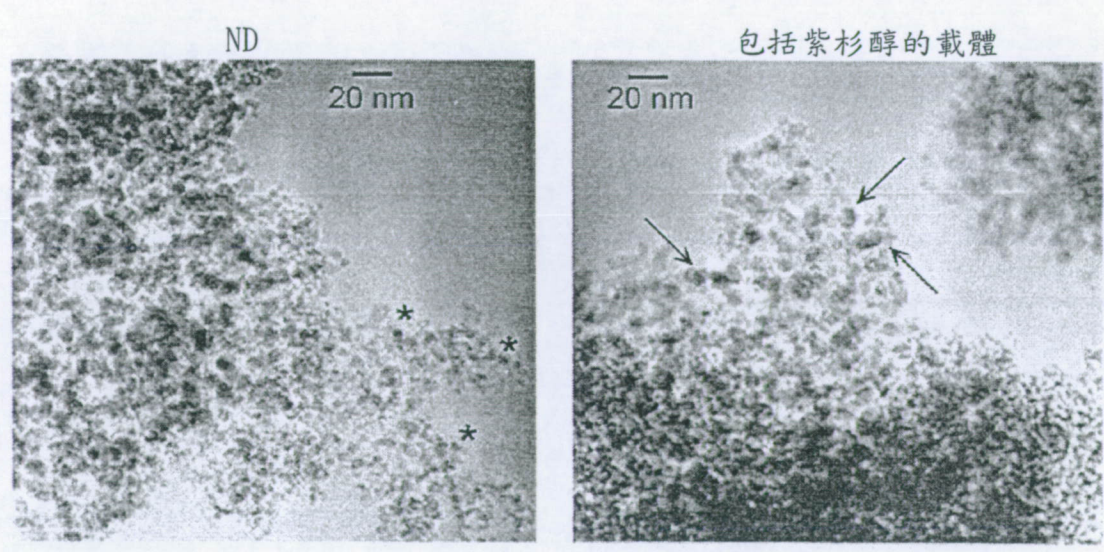
第8A圖



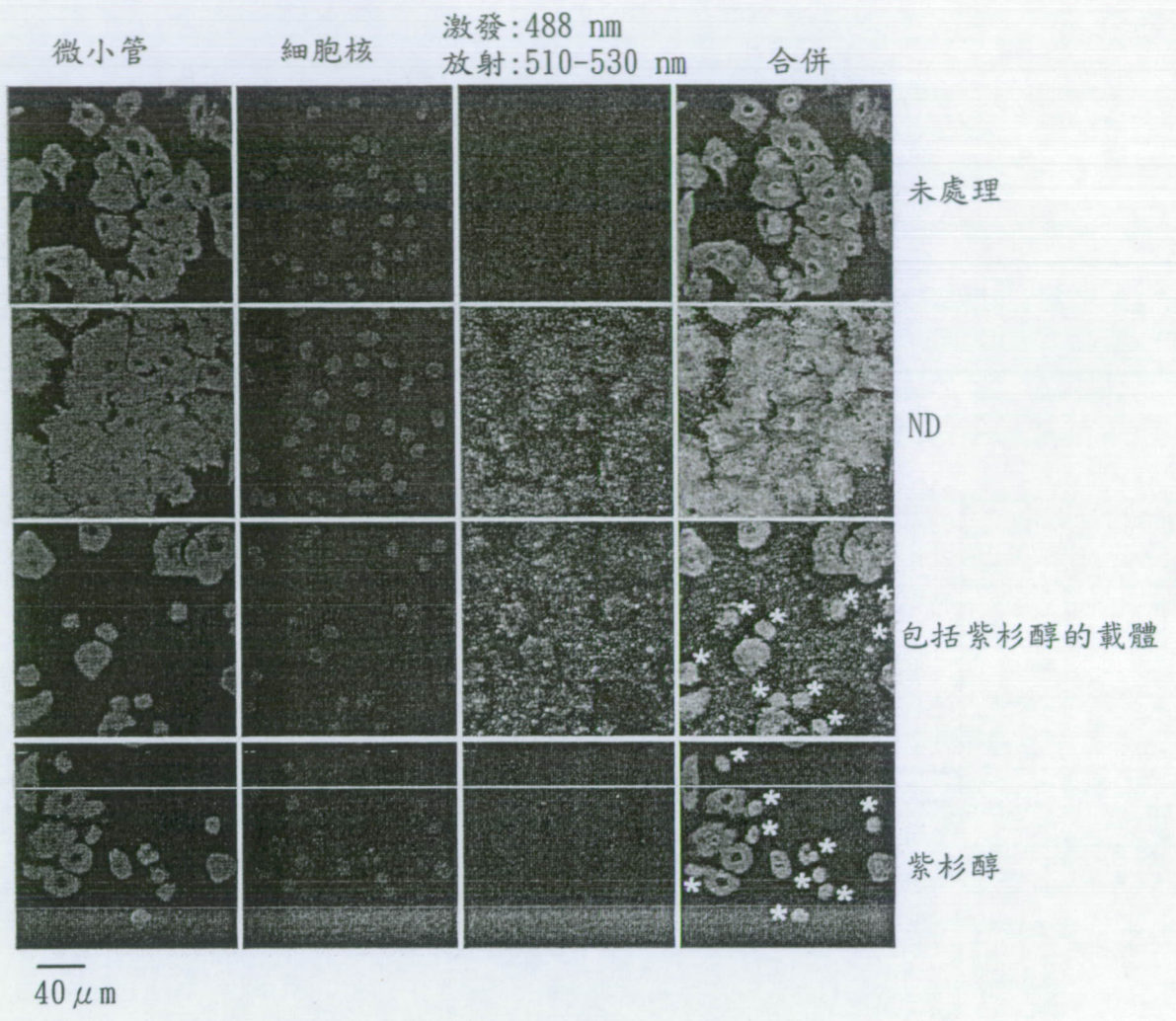
第8B圖



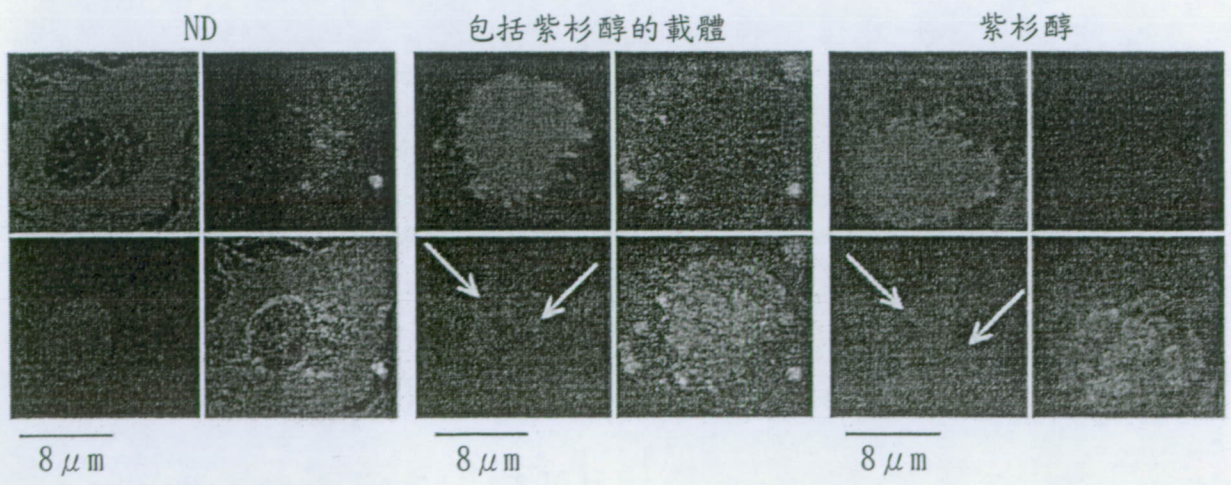
第9A圖



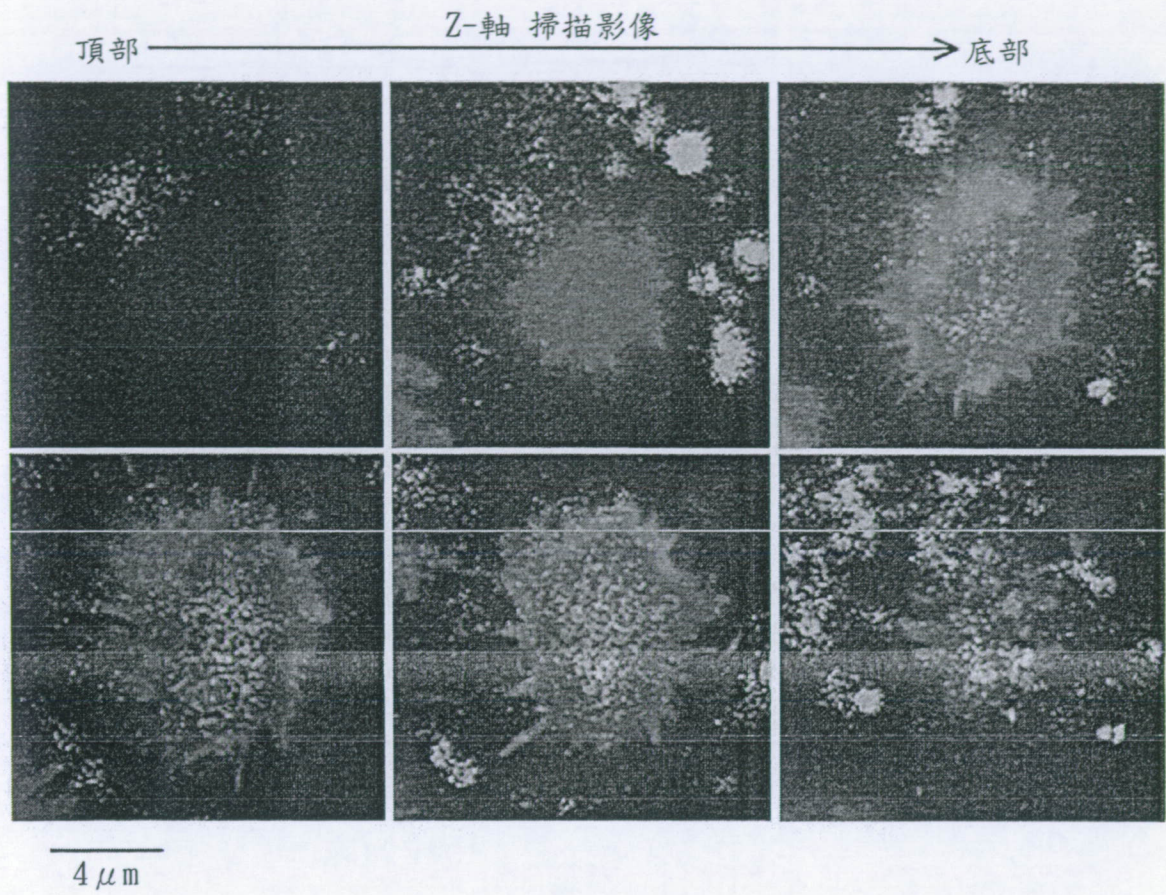
第9B圖



第10A圖

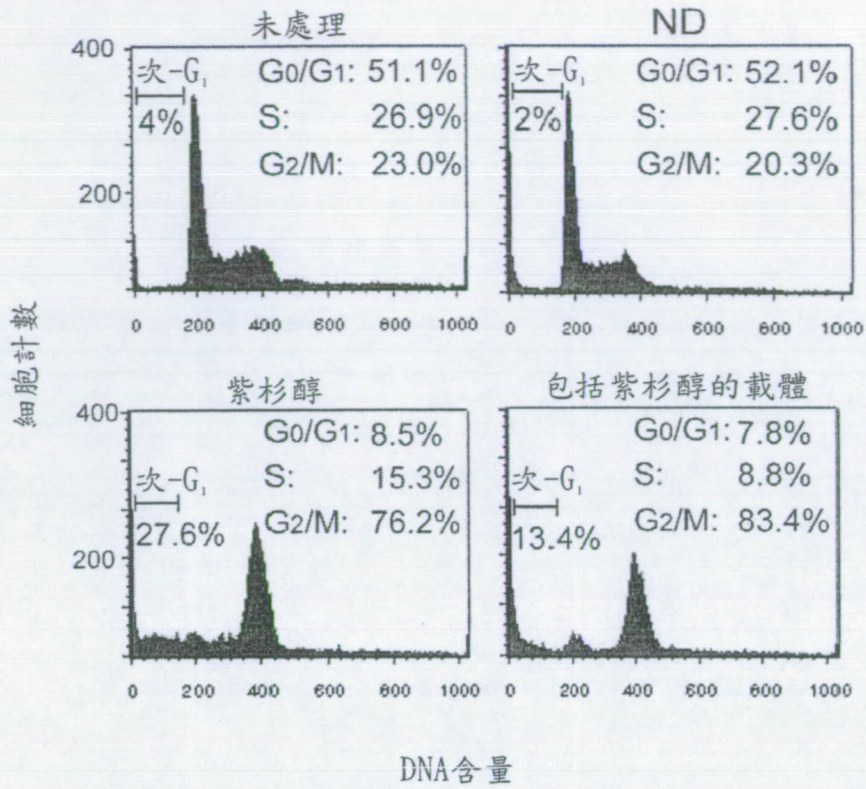


第10B圖

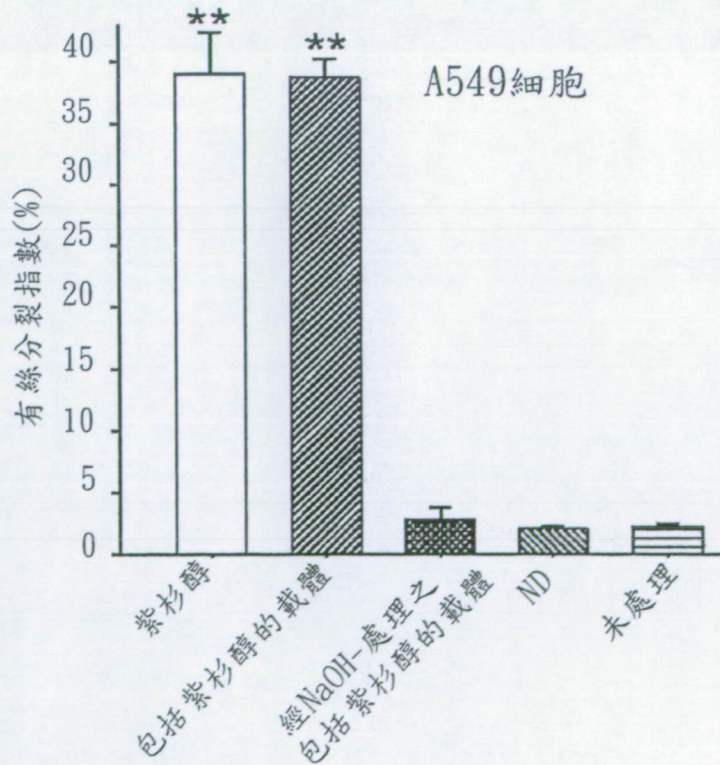


第11圖

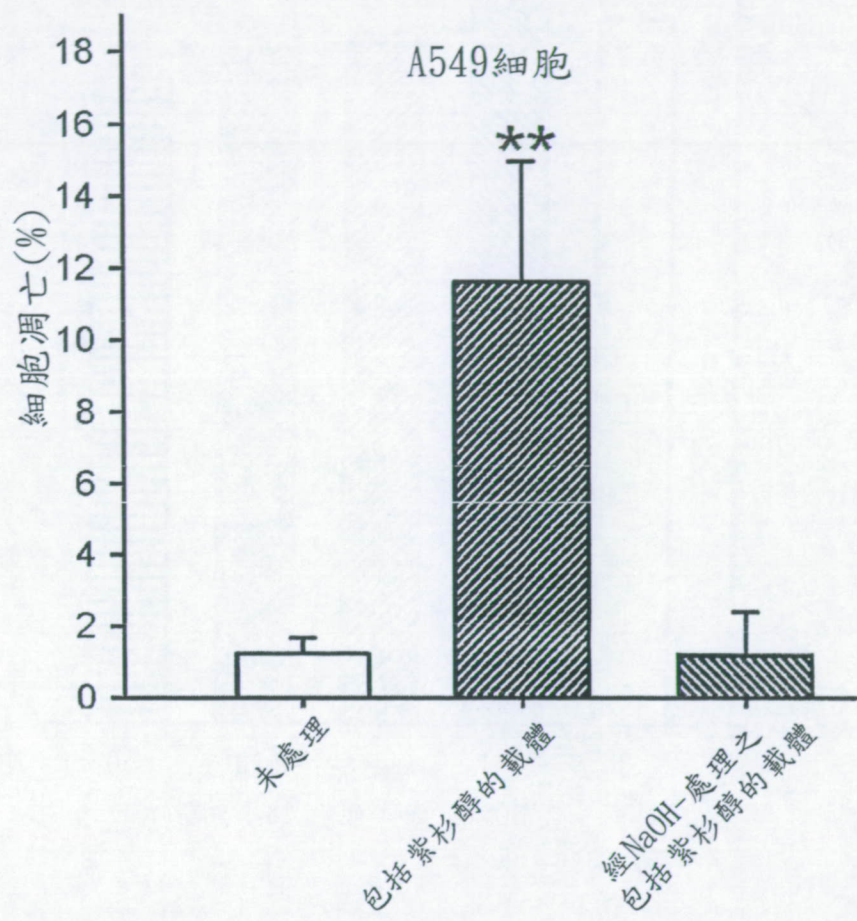




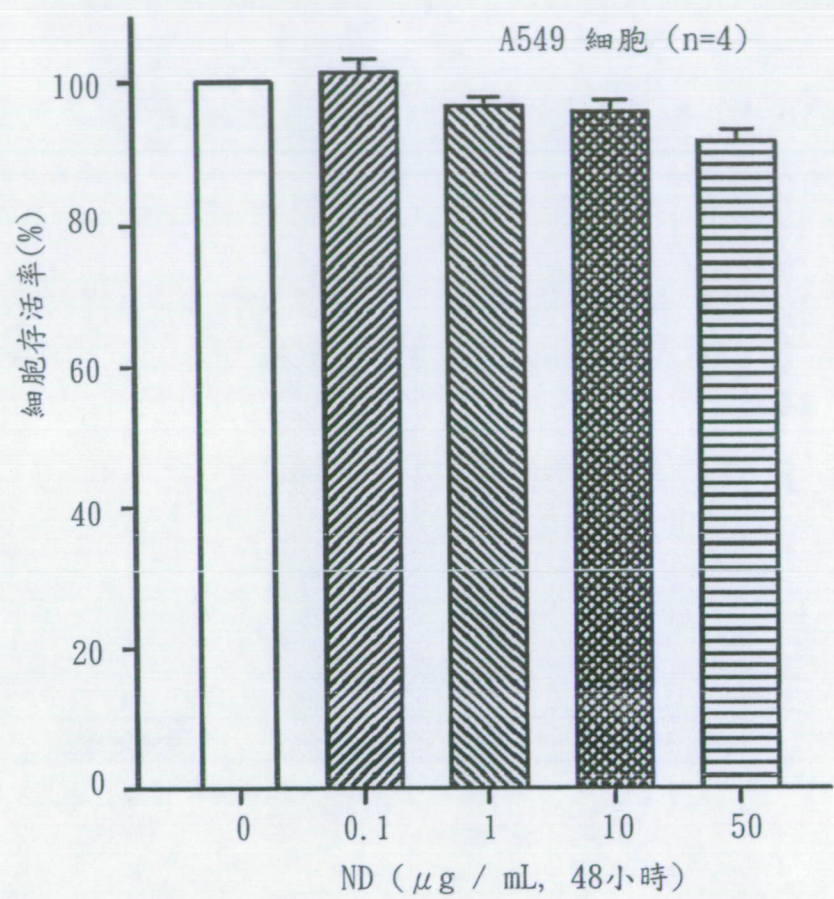
第12A圖



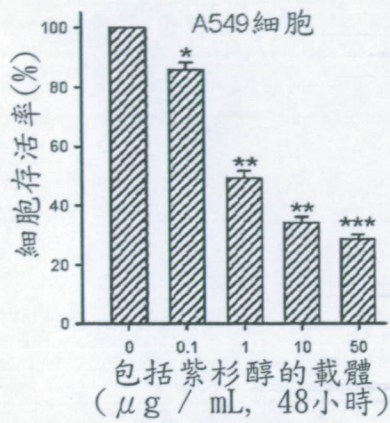
第12B圖



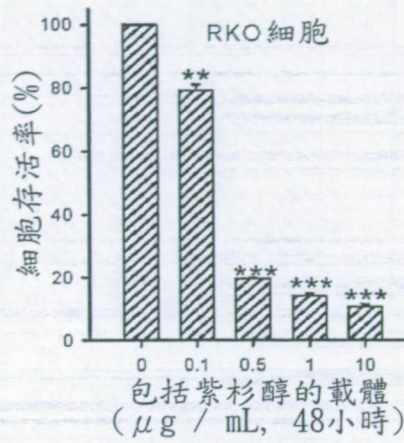
第13圖



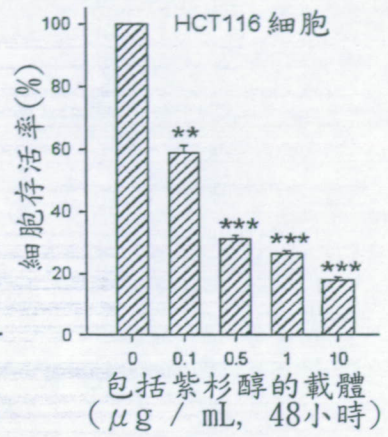
第14圖



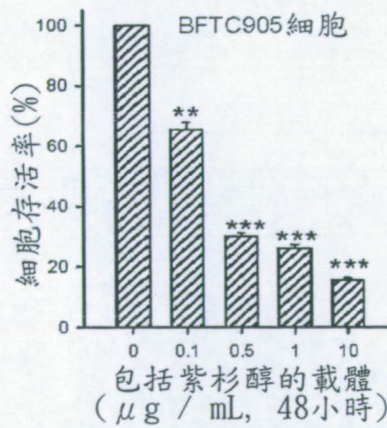
第15A圖



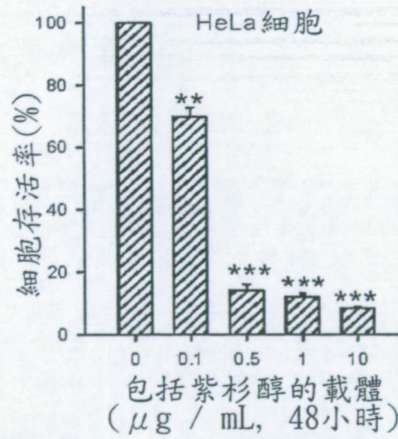
第15B圖



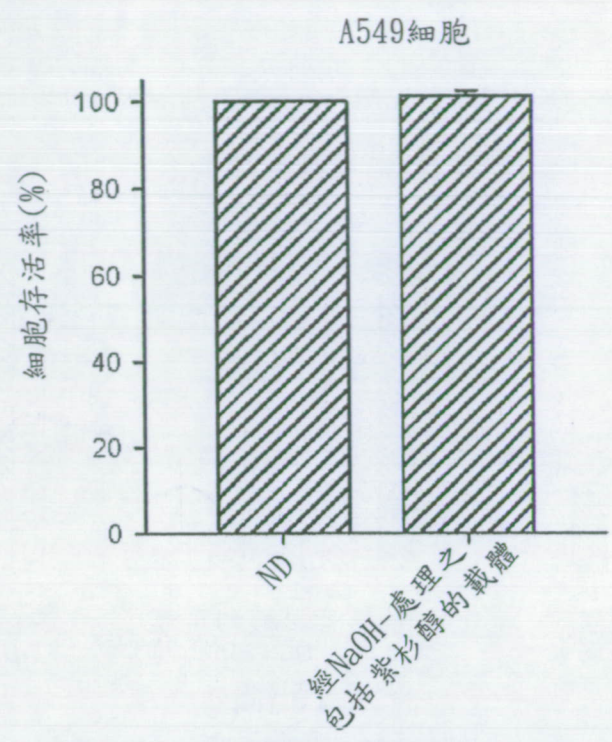
第15C圖



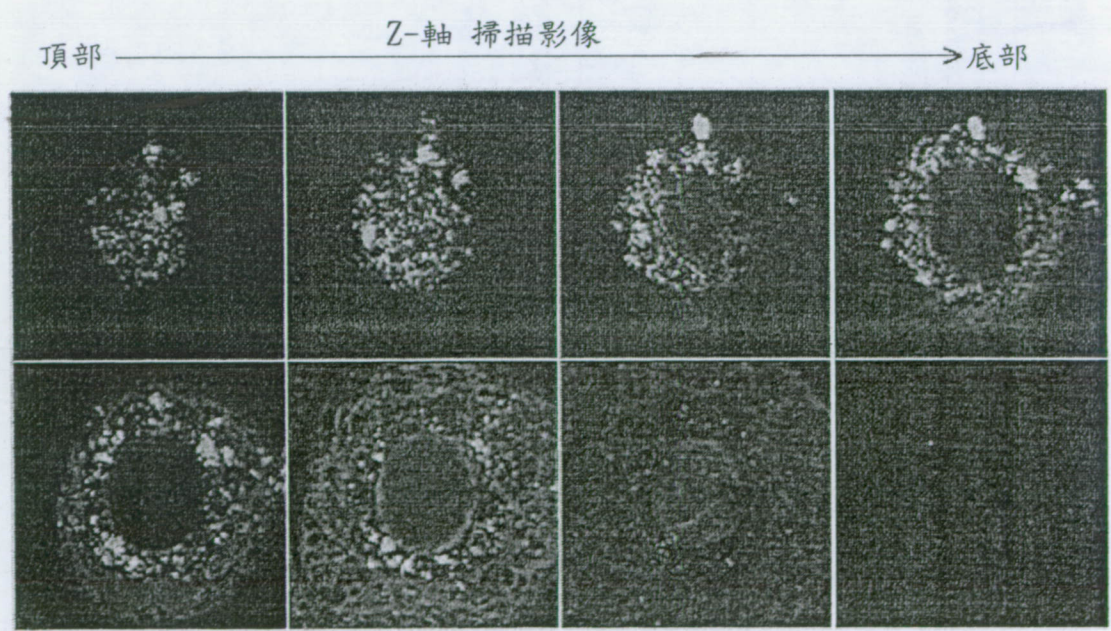
第15D圖



第15E圖



第16A圖



8  $\mu$ m

第16B圖