

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99/43530

※ 申請日期：99.11.11

※IPC 分類：B01J13/100, A61K9/127 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

微脂體及其製造方法 / LIPOSOME AND METHOD
FOR PRODUCING THE SAME

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立交通大學/NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY

代表人：(中文/英文) 吳妍華/LEE WU, YAN-HWA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

新竹市大學路 1001 號/NO. 1001, DASYUE RD., HSINCHU CITY, 300,
TAIWAN (R. O. C.)

國 籍：(中文/英文) 中華民國/TW

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 廖光文 / LIAO, KUANG-WEN

2. 劉彥谷 / LIU, YEN-KU

3. 林子鈴 / LIN, YU-LING

4. 林靜宜 / LIN, CHING-YI

國 籍：(中文/英文) 1-4 中華民國/TW

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

一種微脂體，其包括中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物。中性脂質膜形成中空球體結構，帶正電聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上，界面活性聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上。此微脂體可以非共價鍵結合的方式穩定地吸附大量生物物質。

六、英文發明摘要：

A liposome comprising natural lipid bilayer, positive charged polymer and surface active polymer is described. The natural lipid bilayer is formed as a hollow sphere, the positive charged polymer is dispersed on the natural lipid bilayer by non-covalent bonding, and the surface active polymer is dispersed on the natural lipid bilayer by non-covalent bonding. The liposome can stably adsorb a various amounts of biomaterials by non-covalent bond interaction.

七、指定代表圖：

(一) 本案之指定代表圖：圖 1

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

S110、S120、S130：步驟

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種微脂體，且特別是有關於一種可穩定吸附物質的微脂體。

【先前技術】

微脂體是由脂質雙層膜所組成的微小中空球體，其具有與細胞膜相似的結構。詳言之，微脂體的內層與外層由脂質的親水端所形成，為親水性之水相系統，而脂質的疏水端則聚集成親脂性基團，形成介於內層與外層之間的圍繞結構。

微脂體的結構與細胞膜相似，具有極佳的生物相容性以及生物可代謝性，被廣泛的應用於轉染、藥物傳遞、疫苗以及基因治療等生物技術中。換言之，將核酸、蛋白質以及藥物等物質包覆於微脂體中，使得這些物質隨著微脂體進入生物體，以達到轉染以及藥物傳遞等目的。一般來說，為了增加微脂體的轉染效率或是藥物傳遞的專一性，會以化學鍵結方式來修飾微脂體的脂質之親水端官能基或是疏水端官能基，以改變微脂體的特性或是使其攜帶導向分子(targeting molecule)。然而，以化學鍵結方式來修飾微脂體的脂質之官能基具有許多缺點，舉例來說，化學鍵結的形成需要較長的反應時間、化學鍵結可能會造成與微脂體結合的蛋白質有活性衰退(degradation)的情形以及具有化學鍵結的微脂體的純化步驟較為繁瑣。換句話說，以化

學鍵結方式來修飾微脂體的官能基或是使微脂體攜帶物質可能影響微脂體以及其所攜帶物質的特性。

【發明內容】

本發明提供一種微脂體，其中帶正電聚合物以及界面活性聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上。

本發明又提供一種微脂體的製造方法，其適於製造上述的微脂體。

本發明提出一種微脂體，其包括中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物。其中，中性脂質膜形成中空球體結構，帶正電聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上，界面活性聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上。

本發明另提出一種微脂體的製造方法，包括下列步驟。首先，於容器中形成多層中性脂質膜。接著，於容器中加入帶正電聚合物溶液以及界面活性聚合物溶液。而後，震盪容器。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物的比例範圍介於 10:1:1 至 60:1:1 之間。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物的比例範圍介於 10:3:3 至 30:1:1 之間。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物的比例為 3:1:1。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜選自 DLPC、DOPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、DMPE、DPPE、DOPE、DMPA、DPPA、DOPA、DMPG、DPPG、DOPG、DMPS、DPPS 以及 DOPS 所組成之族群。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜包括 DLPC 以及 DOPC。

在本發明之一實施例中，上述之帶正電聚合物選自聚胺、聚乙烯亞胺、聚乙烯吡咯烷酮以及多乳酸所組成之族群。

在本發明之一實施例中，上述之帶正電聚合物為聚乙烯亞胺。

在本發明之一實施例中，上述之界面活性聚合物選自交聯型聚丙烯酸鹽、皂素以及聚乙二醇所組成之族群。

在本發明之一實施例中，上述之界面活性聚合物為聚乙二醇。

在本發明之一實施例中，上述之非共價鍵結合的方式包括親水性與疏水性之作用力、靜電力、氫鍵以及凡得瓦力。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜具有螢光。

在本發明之一實施例中，上述之微脂體包覆有生物活性物質。

在本發明之一實施例中，上述之生物活性物質選自下列物質構成之族群：病毒、蛋白質、胜肽、核酸、多醣、碳水化合物、脂質、醣蛋白以及藥劑成分所組成之族群。

在本發明之一實施例中，上述之微脂體以非共價鍵結合的方式吸附物質，以形成微脂體組合物。

在本發明之一實施例中，上述之微脂體與該物質之間的作用力包括靜電力。

在本發明之一實施例中，上述之物質為蛋白質。

在本發明之一實施例中，上述之物質為核酸。

在本發明之一實施例中，上述之物質為去氧核糖核酸。

在本發明之一實施例中，上述之物質為核糖核酸。

在本發明之一實施例中，上述之物質為導向分子(targeting molecule)。

在本發明之一實施例中，上述之物質為抗體。

在本發明之一實施例中，上述之物質為細胞激素。

在本發明之一實施例中，上述之物質為胜肽。

在本發明之一實施例中，上述之震盪容器的步驟使得中性脂質膜形成中空球體結構，且帶正電聚合物以及界面活性聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上。

在本發明之一實施例中，上述之中性脂質膜的形成方法包括下列步驟。首先，於容器中加入中性脂質溶液。而後，去除中性脂質溶液中的溶劑，以於容器的底部形成多層中性脂質膜。

在本發明之一實施例中，上述之微脂體的製造方法更包括使所形成的微脂體通過孔徑膜。

在本發明之一實施例中，上述之孔徑膜的尺寸為 200 奈米。

本發明之微脂體的帶正電聚合物以及界面活性聚合物是以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上。且，微脂體可用非共價鍵結合的方式吸附物質，以形成微脂體組合物。

為讓本發明之上述特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下。

【實施方式】

圖 1 是依照本發明之一實施例之一種微脂體的製造方法。

請參照圖 1，首先，進行步驟 S110，於容器中形成中性脂質膜。詳言之，在本實施例中，先於梨形瓶中加入中性脂質溶液，而後以濃縮減壓的方式去除中性脂質溶液中的溶劑，以於梨形瓶的底部形成多層薄膜狀的中性脂質膜。其中，中性脂質膜選自 DLPC、DOPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、DMPE、DPPE、DOPE、DMPA、DPPA、DOPA、DMPG、DPPG、DOPG、DMPS、DPPS 以及 DOPS 所組成之族群。在本實施例中，中性脂質膜包括 DLPC 以及 DOPC。特別注意的是，在一實施例中，可以在中性脂質溶液中加入螢光染料，使得所形成的中性脂質膜具有螢光。如此一來，所形成的微脂體具有螢光。

接著，進行步驟 S120，於容器中加入帶正電聚合物水溶液以及界面活性聚合物水溶液。帶正電聚合物選自聚胺(polyamine)、聚乙烯亞胺(polyethylenimine, PEI)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)以及多乳酸(polylactic acid)

所組成之族群。界面活性聚合物選自交聯型聚丙烯酸鹽、皂素以及聚乙二醇所組成之族群。在本實施例中，帶正電聚合物為聚乙烯亞胺，界面活性聚合物為聚乙二醇。其中，微脂體的中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物的比例範圍介於 10:3:3 至 60:1:1 之間，較佳為介於 10:3:3 至 30:1:1 之間，更佳為 3:1:1。

而後，進行步驟 S130，震盪容器，以形成微脂體。詳言之，震盪容器會使得中性脂質膜因水合作用而形成 (swelling) 中空球體結構，而帶正電聚合物以及界面活性聚合物會因其具有疏水特性與親水特性，而以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上，以形成微脂體。非共價鍵結合的方式包括親水性與疏水性之作用力、靜電力、氫鍵以及凡得瓦力等作用力。值得注意的是，可用離心的方式來純化所形成的微脂體。此外，可以使所形成的微脂體通過孔徑膜，以獲得具有所需尺寸的微脂體。在一實施例中，孔徑膜的尺寸例如是 200 奈米。

承上述，中性脂質膜、帶正電聚合物以及界面活性聚合物在特定比例下會形成微脂體，且帶正電聚合物以及界面活性聚合物是以非共價鍵結合的方式分佈於中性脂質膜上。換句話說，帶正電聚合物以及界面活性聚合物是因其本身的物性而鑲嵌於中性脂質膜上，而不需要利用化學鍵結的方式來使聚合物與中性脂質膜結合。故，本實施例之微脂體的製造方法具有簡化製程步驟以及縮短製程時間等特點。

以上述製造方法所形成的微脂體具有可包覆生物活性

物質以及可吸附物質等特性。接下來將介紹微脂體的特性以及其所能應用的範疇。

本發明之微脂體與一般所熟知的微脂體相同，其可包覆生物活性物質。生物活性物質例如是選自病毒、蛋白質、胜肽、核酸、多醣、碳水化合物、脂質、醣蛋白以及藥劑成分所組成之族群。因此，本發明之微脂體可以應用於轉染、藥物傳遞、疫苗以及基因治療等生物技術中。

特別注意的是，本發明之微脂體可用非共價鍵結合的方式吸附物質，以形成微脂體組合物。詳言之，微脂體例如是藉由帶正電聚合物吸引物質的帶負電部分，使得微脂體與該物質因靜電力而吸附。值得一提的是，微脂體對吸附之物質具有高包含力(capacity)，且微脂體與物質之間具有結合反應時間極短以及吸附力穩定的特性。此外，微脂體組合物與微脂體同樣具有可被離心的特性，故可用離心的方式來分離微脂體組合物。

接下來將以實施例來詳述本發明以使此熟習該項技術者能夠據以實施，但並非用以限定本發明之範圍。

在一實施例中，被吸附物質可以是蛋白質，也就是微脂體吸附蛋白質以形成微脂體組合物。故，可將微脂體應用於蛋白質的定量以及蛋白質的純化與分離等實驗技術中。

在一實施例中，被吸附物質可以是核酸，例如是去氧核糖核酸、核糖核酸或其他核酸，也就是微脂體可以與核酸結合成微脂體組合物。因此，可將微脂體與核酸結合的特性應用於核酸的純化與分離等實驗技術中。

在一實施例中，被吸附物質可以是導向分子，例如是抗體、細胞激素、具有特殊序列的胜肽或是具有特殊序列的核酸，也就是微脂體可以與導向分子結合成微脂體組合物。如此一來，微脂體組合物可以作為探針(probe)，以偵測特定的蛋白質、核酸或是細胞的存在。此外，當微脂體組合物的微脂體具有螢光時，可以直接以微脂體組合物所發出的螢光強度來偵測且定量蛋白質、核酸或是細胞，而無需額外加入可以標記導向分子的螢光染料，故可簡化分析步驟。

在一實施例中，微脂體包覆有生物活性物質，例如是選自病毒、蛋白質、胜肽、核酸、多醣、碳水化合物、脂質、醣蛋白以及藥劑成分所組成之族群。且，被吸附物質例如是導向分子，例如是抗體、細胞激素、具有特殊序列的胜肽或是具有特殊序列的核酸。如此一來，微脂體組合物具有細胞專一性、組織專一性或是腫瘤專一性。換言之，微脂體組合物可以靶向特定的細胞位置或是待治療的細胞，以增加微脂體組合物的轉染效率或是治療效果。再者，微脂體組合物的專一性可以有效地降低正常組織或細胞受到傷害，故微脂體組合物為一卓越的藥物載體以及基因載體。

在上述的實施例中，微脂體是以非共價鍵結合的方式吸附物質，故能避免被吸附物質的活性或構型等特性被影響或破壞。此外，微脂體與被吸附物質之間具有反應時間極短以及吸附力穩定的特性，且微脂體對於被吸附物質具

有高包含力(capacity)，故，可將微脂體吸附被吸附物質的特性應用於純化、轉染、藥物傳遞、疫苗以及基因治療等生物技術中。

接下來將以實驗來證實本發明之微脂體能夠吸附物質以形成微脂體組合物，以及微脂體於生物偵測、細胞轉染以及藥物傳遞的實際應用。以下之說明是用來詳述本發明以使此熟習該項技術者能夠據以實施，但並非用以限定本發明之範圍。

在接下來的實驗例中，所使用的微脂體包括 DLPC 以及 DOPC、聚乙烯亞胺以及聚乙二醇帶正電聚合物，且在實驗例 1 至實驗例 6、實驗例 8 以及實驗例 9 中，DLPC 以及 DOPC、聚乙烯亞胺以及聚乙二醇的比例為 3:1:1；在實驗例 7 中，DLPC 以及 DOPC、聚乙烯亞胺以及聚乙二醇的比例為 10:3:3 以及 10:1:1。

【實驗例 1】

在本實驗中，是觀察微脂體是否能吸附蛋白質。首先，將帶有異硫氰酸螢光素的牛血清白蛋白(BSA-FITC)加入微脂體溶液中反應 30 分鐘，而後以 10,000 rpm 的速度離心微脂體溶液，去除上清液以得到微脂體組合物(LPPC+BSA-FITC)，並對微脂體組合物進行分析，實驗結果如圖 2 所示。請參照圖 2，圖 2 的橫軸表示微脂體組合物(LPPC+BSA-FITC)以及微脂體(LPPC)，而縱軸表示使用螢光光譜儀所量測到的螢光強度。如圖 2 所示，微脂體組合物(LPPC+BSA-FITC)的螢光強度顯著高於微脂體

(LPPC)，表示微脂體組合物包含帶有異硫氰酸螢光素的牛血清白蛋白(BSA-FITC)。因此，由本實驗可知，微脂體能夠吸附蛋白質，以形成微脂體組合物。

【實驗例 2】

在本實驗中，是觀察微脂體是否能吸附細胞激素。首先，將腫瘤壞死因子(TNF- α)加入微脂體溶液中反應，而後以 10,000 rpm 的速度離心微脂體溶液，收集被離心下之微脂體組合物(LPPC+TNF- α)並以帶有 HPR 分子的抗 TNF- α 的抗體與微脂體組合物反應 1 小時，而後對微脂體組合物(LPPC+TNF- α)進行分析，實驗結果如圖 3 所示。請參照圖 3，圖 3 的橫軸表示微脂體組合物(LPPC+TNF- α)以及微脂體(LPPC)，而縱軸表示使用分光光度計所量測到的吸光值。如圖 3 所示，微脂體組合物(LPPC+TNF- α)的吸光值顯著高於微脂體(LPPC)的吸光值，表示微脂體組合物包含腫瘤壞死因子。因此，由本實驗可知，微脂體能夠吸附細胞激素，以形成微脂體組合物。

【實驗例 3】

在本實驗中，是觀察微脂體是否能吸附抗體。首先，將帶有 HPR 分子的兔抗鼠 IgA 單株抗體(Ab-HRP)加入微脂體溶液中反應 1 小時，而後以過量的 BSA 中和掉多餘的正電荷，再以 10,000 rpm 的速度離心微脂體溶液，收集被離心下之微脂體組合物(LPPC+Ab-HRP+BSA)並對其進行分析，實驗結果如圖 4 所示。請參照圖 4，圖 4 的橫軸表示微脂體組合物(LPPC+Ab-HRP+BSA)、微脂體(LPPC+BSA)以及帶有 HPR 分子的兔抗鼠 IgA 單株抗體

(Ab-HRP+BSA)，而縱軸表示使用螢光光譜儀所量測到的吸光值。如圖 4 所示，微脂體組合物(LPPC+Ab-HRP+BSA)的吸光值顯著高於微脂體(LPPC+BSA)的吸光值，表示微脂體組合物包含兔抗鼠 IgA 單株抗體。因此，由本實驗可知，微脂體能夠吸附抗體，以形成微脂體組合物。

【實驗例 4】

在本實驗中，是觀察微脂體與牛血清白蛋白形成微脂體組合物所需的反應時間。首先，將帶有螢光染料異硫氰酸螢光素的牛血清白蛋白(BSA-FITC)加入微脂體溶液中反應，在不同反應時間後，以 10,000 rpm 的速度離心微脂體溶液，收集微脂體組合物(LPPC+BSA-FITC)並以分光光度計對其進行分析，實驗結果如圖 5 所示。請參照圖 5，圖 5 的橫軸表示在 5 秒、5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘、20 分鐘、25 分鐘的反應時間下所形成的微脂體組合物(LPPC+BSA-FITC)、正對照組為微脂體以及牛血清白蛋白未經離心的混合溶液、負對照組為微脂體，而縱軸表示微脂體對於牛血清白蛋白的吸附程度，其中微脂體對於牛血清白蛋白的吸附程度與所量測到的螢光強度成正比，且以正對照組所量測到的螢光強度作為微脂體的吸附程度為 100%。如圖 5 所示，微脂體溶液與牛血清白蛋白在混合約 5 秒後就已形成微脂體組合物，也就是說微脂體與牛血清白蛋白形成微脂體組合物所需的反應時間極短。因此，由本實驗可知，微脂體具有迅速吸附帶電物質的特性。

【實驗例 5】

在本實驗中，是觀察微脂體吸附牛血清白蛋白的能

力。首先，將不同量的牛血清白蛋白(BSA)加入微脂體溶液中反應，而後以 10,000 rpm 的速度離心微脂體溶液，收集微脂體組合物(LPPC+BSA)並定量微脂體組合物中的蛋白質量，實驗結果如圖 6 所示。請參照圖 6，圖 6 的橫軸表示加入於微脂體溶液中的牛血清白蛋白的量，而縱軸表示於 40 μ g 的微脂體上所偵測到的蛋白質量。如圖 6 所示，40 μ g 的微脂體可吸附約 140 μ g 的牛血清白蛋白，換言之，微脂體對於蛋白質具有高包含力(capacity)。因此，由本實驗可知，微脂體對於帶電物質具有高包含力。

【實驗例 6】

在本實驗中，是觀察微脂體與牛血清白蛋白之間的吸附力是否穩定。首先，將 42 μ g 的帶有螢光染料異硫氰酸螢光素的牛血清白蛋白(FITC-BSA)加入微脂體溶液中反應 20 分鐘，以形成微脂體組合物(LPPC+BSA-FITC)，而後額外加入不同量的牛血清白蛋白(BSA，不帶有螢光染料異硫氰酸螢光素)，再以 10,000 rpm 的速度離心微脂體溶液，收集微脂體組合物並以分光光度計對其進行分析，實驗結果如圖 7 所示。請參照圖 7，圖 7 的橫軸表示分別於微脂體組合物中額外加入 200 μ g、300 μ g、400 μ g、500 μ g 以及 600 μ g 的牛血清白蛋白(BSA)的實驗組以及未於微脂體組合物加入牛血清白蛋白的正對照組，而縱軸表示所偵測到的螢光指數。如圖 7 所示，相較於未加入牛血清白蛋白的微脂體組合物，在微脂體組合物中加入牛血清白蛋白對微脂體組合物的螢光指數影響不大，也就是說微脂體一旦吸附蛋白質後，其所吸附的蛋白質不容易被後續所加入

的蛋白質取代下來。換言之，微脂體與帶電物質之間具有穩定的吸附力。

【實驗例 7】

在本實驗中，是觀察微脂體對蛋白質的吸附能力是否能夠應用於偵測蛋白質的濃度。評估微脂體對蛋白質的吸附能力的實驗流程如下。首先，於 1 μ l 的微脂體溶液中加入不同量的 TNF- α 且於室溫下反應 20 分鐘。接著，加入 5 μ g 的 BSA 且於室溫下進行封阻(blocking)步驟 20 分鐘。而後，依序加入一次抗體反應 60 分鐘以及加入二次抗體反應 30 分鐘，再以細胞流式儀(flow cytometer)偵測微脂體的螢光強度，實驗結果如圖 8A 所示，圖 8A 的橫軸表示所加入的 TNF- α 的量，而縱軸表示所偵測到的螢光強度。對照實驗是以市售的螢光免疫偵測試劑組來偵測蛋白質的濃度，其實驗流程如下。首先，於偵測盤上塗布捕捉抗體(capture antibodies)一夜。接著，於室溫下進行封阻(blocking)步驟 60 分鐘。而後，加入 TNF- α 且於室溫下反應 60 分鐘。然後，依序加入一次抗體反應 120 分鐘以及加入二次抗體反應 20 分鐘，以及加入受質溶液反應 20 分鐘後，再以分光光度計偵測混合液的吸光值，實驗結果如圖 8B 所示，圖 8B 的橫軸表示所加入的 TNF- α 的量，而縱軸表示所偵測到的吸光值。如圖 8A 與圖 8B 所示，微脂體偵測蛋白濃度的能力與市售的螢光免疫偵測試劑組對蛋白質濃度的偵測能力相近。因此，由本實驗可知，微脂體對蛋白質的吸附能力可應用於蛋白質濃度的偵測。

【實驗例 8】

在本實驗中，是以細胞毒殺試驗(MTT assay)來觀察微脂體是否具有攜帶藥物的能力。首先，於細胞中加入不同濃度的薑黃素，以求出毒殺 50% 的細胞所需的薑黃素的濃度，實驗結果如表 1 所示。而後，分別將帶有不同濃度的薑黃素的微脂體(薑黃素-微脂體)送入相同類型的細胞中，以求出毒殺 50% 的細胞所需的薑黃素的濃度，實驗結果如表 1 所示。在表 1 中，所有濃度皆以平均值±標準差(n=6)來表示。

表 1

細胞株	癌症型態	薑黃素 ($\mu\text{mol/L}$)	薑黃素-微脂體 (10: 3: 3) ($\mu\text{mol/L}$)	薑黃素-微脂體 (10: 1: 1) ($\mu\text{mol/L}$)
老鼠				
B16/F10	黑色素細胞瘤	8.16 \pm 1.01	1.10 \pm 0.05	1.01 \pm 0.06
LL-2	肺癌	10.84 \pm 2.33	1.41 \pm 0.23	1.48 \pm 0.12
CT-26	大腸直腸癌	7.92 \pm 0.77	1.22 \pm 0.05	1.60 \pm 0.19
JC	乳癌	11.03 \pm 1.47	1.26 \pm 0.07	1.47 \pm 0.19
人類				
HepG2	肺癌	12.21 \pm 1.11	1.67 \pm 0.16	1.64 \pm 0.15
A549	肺癌	30.01 \pm 9.45	1.37 \pm 0.06	1.41 \pm 0.04
HT-29	大腸直腸癌	12.89 \pm 1.18	1.53 \pm 0.05	1.44 \pm 0.15
HeLa	子宮頸癌	17.66 \pm 6.95	1.19 \pm 0.17	1.18 \pm 0.13

其中，微脂體中的中性脂質膜、帶正電聚合物以及界

面活性聚合物的比例分別為 10:3:3 以及 10:1:1。由表 1 可知，經微脂體包覆的黃薑素在較低的濃度下對細胞具有毒殺作用，換言之，微脂體具有攜帶藥物以及釋放藥物的能力，且微脂體可有效增強所攜帶之藥性。

【實驗例 9】

在本實驗中，是觀察微脂體是否具有良好的轉染效率。詳言之，分別於轉染試劑中加入 50ug、100ug、200ug 的微脂體以及 PEI，使用上述轉染試劑將 AAV-MCS-hrGFP 轉染至 Balb/3T3 細胞內，而後以細胞流式儀分析被轉染的 Balb/3T3 細胞，實驗結果如圖 9 所示。另外，正對照組是以 Lipofectamine 轉染試劑將 AAV-MCS-hrGFP 轉染至 Balb/3T3 細胞內，負對照組是未經轉染的 Balb/3T3 細胞以及 AAV-MCS-hrGFP，分別以細胞流式儀分析 Balb/3T3 細胞，實驗結果如圖 9 所示。圖 9 的橫軸表示不同的轉染試劑，而縱軸表示使用流式細胞儀所量測到被轉染的 Balb/3T3 細胞表現綠螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 的百分比，其中表現 GFP 的細胞百分比是用來作為判斷轉染效率的指標。如圖 9 所示，微脂體具有良好的轉染效率，其轉染效率顯著的高於 PEI 載體的轉染效率，且與市售的 Lipofectamine 轉染試劑的轉染效率相近。因此，微脂體能應用於細胞轉染。

綜上所述，本發明之微脂體具有下列之特點：

1. 本發明之微脂體以中性脂質膜為主體，而帶正電聚合物以及界面活性聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於

中性脂質膜上。

2. 本發明之微脂體以非共價鍵結合的方式吸附物質，可避免被吸附物質的活性或構型等特性被影響或破壞。

3. 本發明之微脂體以及微脂體組合物具有可被離心的特性，以方便進行純化。

4. 本發明之微脂體具有可包覆藥物以及可進行細胞轉染的特性。

5. 本發明之微脂體可迅速地且穩定地吸附蛋白質、核酸以及導向分子(targeting molecule)等物質，以形成微脂體組合物，故可將微脂體組合物做為探針，以對蛋白質、核酸或是細胞進行專一性之辨認以及分析。

6. 本發明之微脂體可包覆生物活性物質且吸附導向分子，故所形成的微脂體組合物具有細胞專一性、組織專一性或是腫瘤專一性，能大幅提升微脂體組合物的轉染效率或藥物的治療效果。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

圖 1 是依照本發明之一實施例之微脂體的製造方法的步驟流程圖。

圖 2 是以微脂體吸附帶有異硫氰酸螢光素的牛血清白

蛋白的實驗結果。

圖 3 是以微脂體吸附腫瘤壞死因子的實驗結果。

圖 4 是以微脂體吸附帶有 HPR 分子的兔抗鼠 IgA 單株抗體的實驗結果。

圖 5 是微脂體以及帶有螢光染料異硫氰酸螢光素的牛血清白蛋白在不同反應時間下，微脂體對於牛血清白蛋白的吸附程度的實驗結果。

圖 6 是以微脂體吸附不同量的牛血清白蛋白的實驗結果。

圖 7 是在微脂體以及帶有螢光染料異硫氰酸螢光素的牛血清白蛋白形成微脂體組合物後，額外加入不同量的牛血清白蛋白的實驗結果。

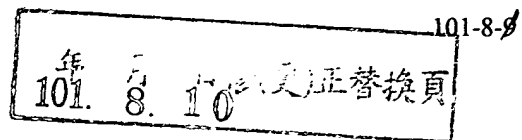
圖 8A 是以微脂體吸附不同量的 TNF- α 的實驗結果。

圖 8B 是以市售的螢光免疫偵測試劑組吸附不同量的 TNF- α 的實驗結果。

圖 9 是以不同的轉染試劑將 AAV-MCS-hrGFP 轉染至 Balb/3T3 細胞內的實驗結果。

【主要元件符號說明】

S110、S120、S130：步驟



十、申請專利範圍：

1. 一種微脂體，包括：
 - 一中性脂質膜，其形成中空球體結構；
 - 一帶正電聚合物，以非共價鍵結合的方式分佈於該中性脂質膜上；以及
 - 一界面活性聚合物，以非共價鍵結合的方式分佈於該中性脂質膜上，其中該帶正電聚合物與該界面活性聚合物的比例恆為 1:1。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜、該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物的比例範圍介於 10:3:3 至 60:1:1 之間。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜、該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物的比例範圍介於 10:3:3 至 30:1:1 之間。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜、該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物的比例為 3:1:1。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜選自 DLPC、DOPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、DMPE、DPPE、DOPE、DMPA、DPPA、DOPA、DMPG、DPPG、DOPG、DMPS、DPPS 以及 DOPS 所組成之族群。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜包括 DLPC 以及 DOPC。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該帶正電聚合物選自聚胺、聚乙烯亞胺、聚乙烯吡咯烷酮以及多乳酸所組成之族群。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之微脂體，其中該帶電正電聚合物為聚乙烯亞胺。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該界面活性聚合物選自交聯型聚丙烯酸鹽、皂素以及聚乙二醇所組成之族群。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之微脂體，其中該界面活性聚合物為聚乙二醇。

11. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該非共價鍵結合的方式包括親水性與疏水性之作用力、靜電力、氫鍵以及凡得瓦力。

12. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜具有螢光。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該微脂體包覆有一生物活性物質。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之微脂體，其中該生物活性物質選自病毒、蛋白質、胜肽、核酸、多醣、碳水化合物、脂質、醣蛋白以及藥劑成分所組成之族群。

15. 如申請專利範圍第 1 項所述之微脂體，其中該微脂體以非共價鍵結合的方式吸附一物質，以形成一微脂體組合物。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之微脂體，其中該微

脂體與該物質之間的作用力包括靜電力。

17. 如申請專利範圍第 15 項所述之微脂體，其中該物質為蛋白質。

18. 如申請專利範圍第 15 項所述之微脂體，其中該物質為核酸。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述之微脂體，其中該物質為去氧核糖核酸。

20. 如申請專利範圍第 18 項所述之微脂體，其中該物質為核糖核酸。

21. 如申請專利範圍第 15 項所述之微脂體，其中該物質為導向分子(targeting molecule)。

22. 如申請專利範圍第 21 項所述之微脂體，其中該物質為抗體。

23. 如申請專利範圍第 21 項所述之微脂體，其中該物質為細胞激素。

24. 如申請專利範圍第 21 項所述之微脂體，其中該物質為胜肽。

25. 如申請專利範圍第 15 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜具有螢光。

26. 如申請專利範圍第 15 項所述之微脂體，其中該中性脂質膜包覆有一生物活性物質。

27. 如申請專利範圍第 26 項所述之微脂體，其中該生物活性物質選自病毒、蛋白質、胜肽、核酸、多醣、碳水化合物、脂質、醣蛋白以及藥劑成分所組成之族群。

28. 一種微脂體的製造方法，包括：

於一容器中形成中性脂質膜，包括下列步驟：

於該容器中加入中性脂質溶液；以及

去除該中性脂質溶液中的溶劑，以於該容器的底部形成多層中性脂質膜；

於該容器中加入一帶正電聚合物溶液以及一界面活性聚合物溶液，其中該帶正電聚合物與該界面活性聚合物的比例恆為 1:1；以及

震盪該容器，使得該中性脂質膜形成中空球體結構，且該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物以非共價鍵結合的方式分佈於該中性脂質膜上。

29. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方法，其中該非共價鍵結合的方式包括親水性與疏水性之作用力、靜電力、氫鍵以及凡得瓦力。

30. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方法，其中該中性脂質膜、該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物的比例範圍介於 10:1:1 至 60:1:1 之間。

31. 如申請專利範圍第 30 項所述之微脂體的製造方法，其中該中性脂質膜、該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物的比例範圍介於 10:3:3 至 30:1:1 之間。

32. 如申請專利範圍第 31 項所述之微脂體的製造方法，其中該中性脂質膜、該帶正電聚合物以及該界面活性聚合物的比例為 3:1:1。

33. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方

法，其中該中性脂質膜選自 DLPC、DOPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、DMPE、DPPE、DOPE、DMPA、DPPA、DOPA、DMPG、DPPG、DOPG、DMPS、DPPS 以及 DOPS 所組成之族群。

34. 如申請專利範圍第 33 項所述之微脂體的製造方法，其中該中性脂質膜包括 DLPC 以及 DOPC。

35. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方法，其中該帶正電聚合物選自聚胺、聚乙烯亞胺、聚乙烯吡咯烷酮以及多乳酸所組成之族群。

36. 如申請專利範圍第 35 項所述之微脂體的製造方法，其中該帶電正電聚合物為聚乙烯亞胺。

37. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方法，其中該界面活性聚合物選自交聯型聚丙烯酸鹽、皂素以及聚乙二醇所組成之族群。

38. 如申請專利範圍第 37 項所述之微脂體的製造方法，其中該界面活性聚合物為聚乙二醇。

39. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方法，其中該中性脂質膜具有螢光。

40. 如申請專利範圍第 28 項所述之微脂體的製造方法，更包括使所形成的微脂體通過孔徑膜。

41. 如申請專利範圍第 40 項所述之微脂體的製造方法，其中該孔徑膜的尺寸為 200 奈米。

十一、圖式：

28538TW_W

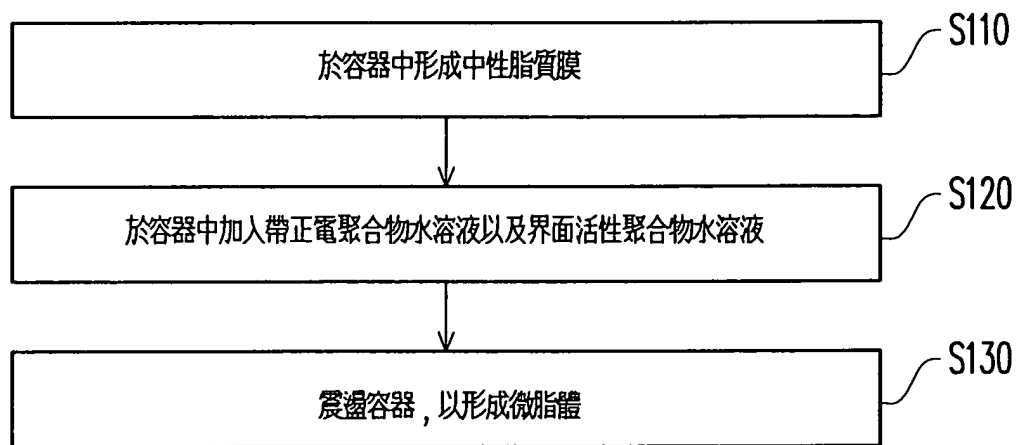


圖 1

28538TW_W

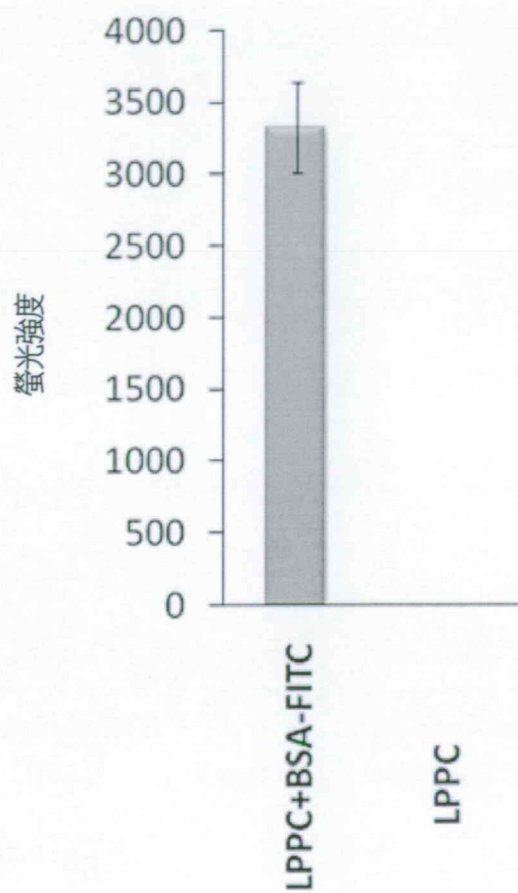


圖 2

28538TW_W

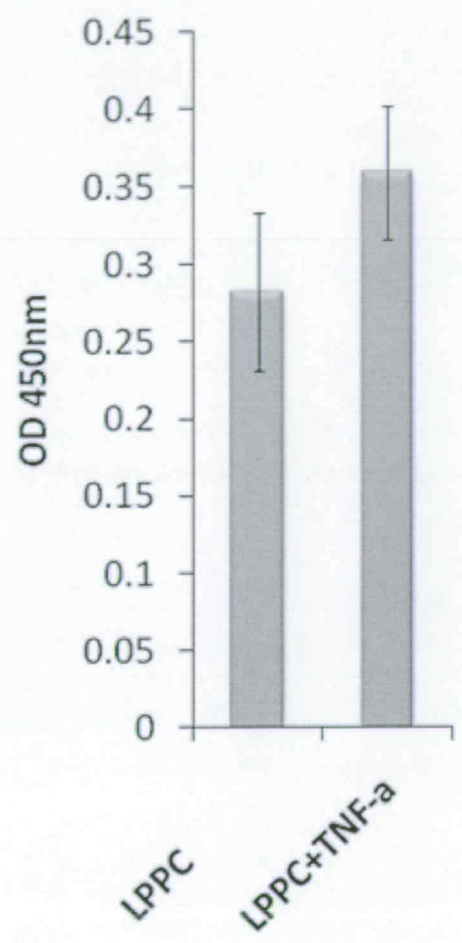


圖 3

28538TW_W

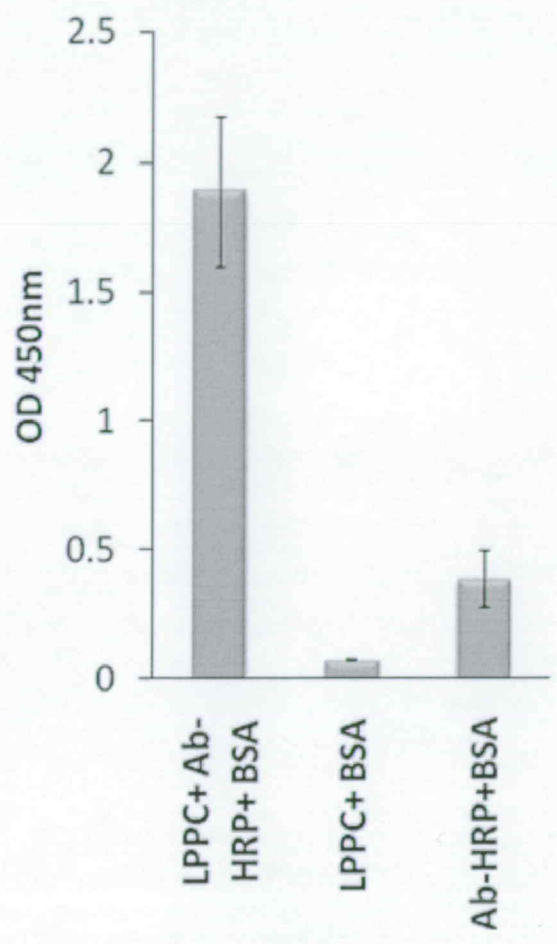


圖 4

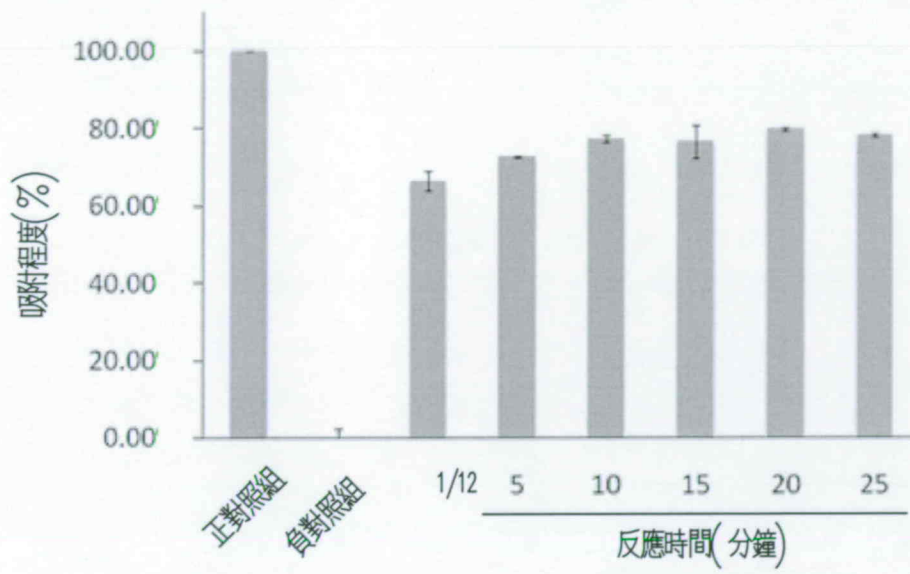


圖 5

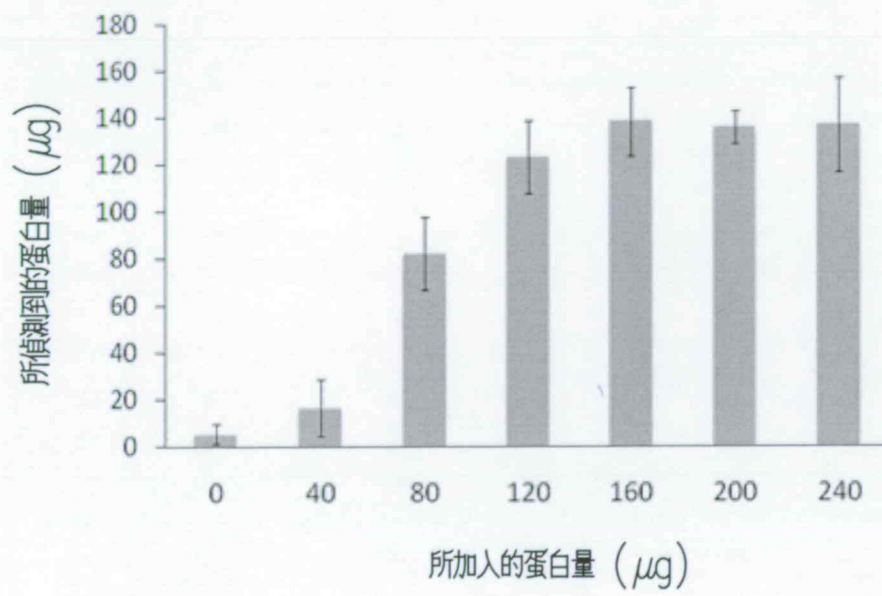


圖 6

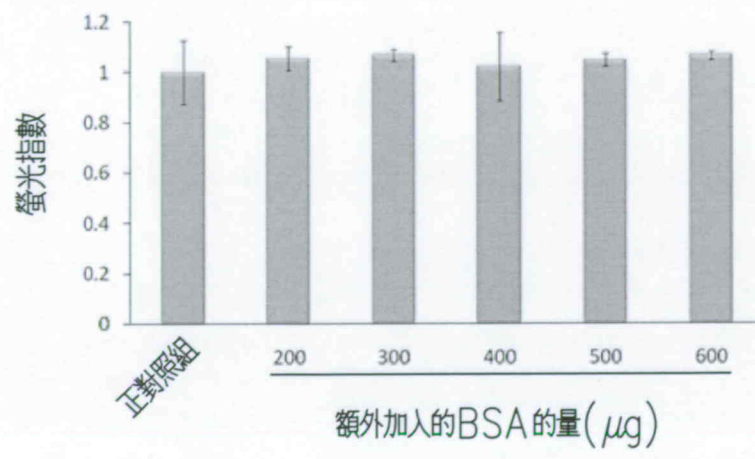


圖 7

28538TW_W

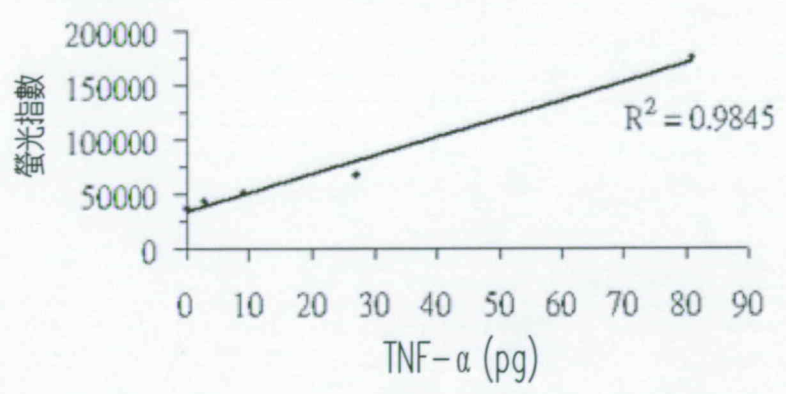


圖 8A

28538TW_W

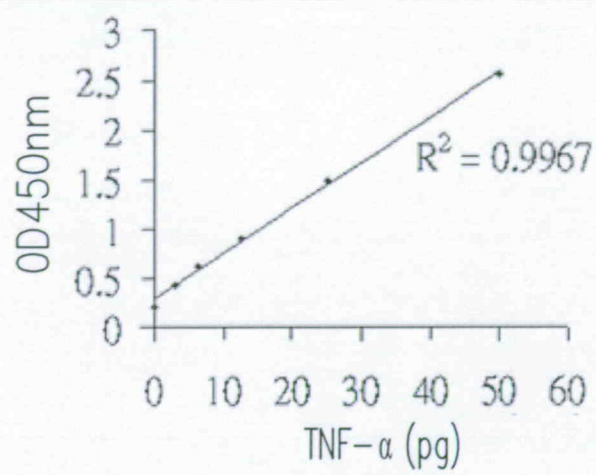


圖 8B

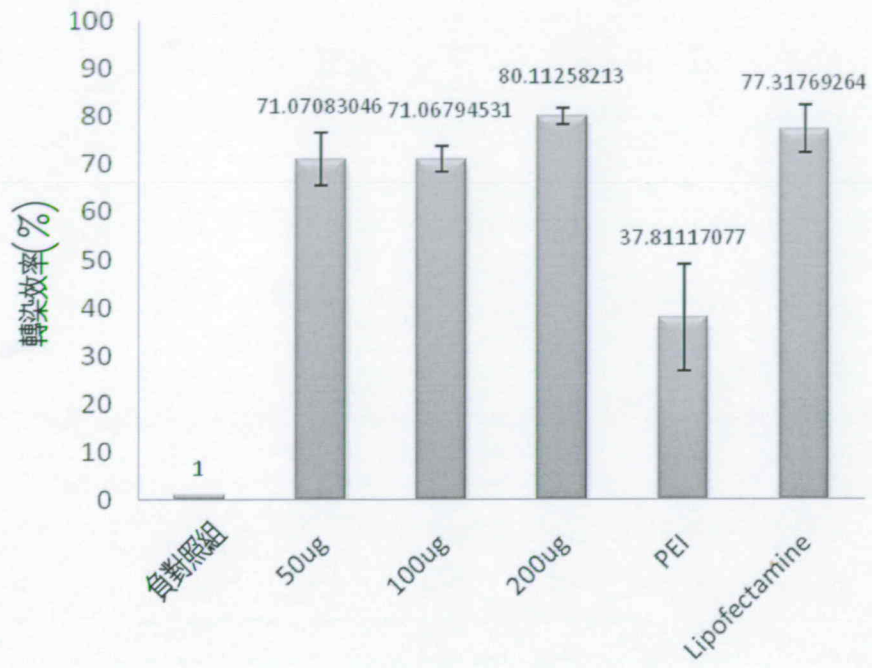


圖 9