



(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 I482782 B

(45) 公告日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 01 日

(21) 申請案號：102140127

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 05 日

(51) Int. Cl. : C07K17/06 (2006.01)

A61K9/107 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

(30) 優先權：2013/05/31

中華民國

102119370

(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：江智聖 CHIANG, CHIHSHENG (TW)；胡尚秀 HU, SHANGHSIU (TW)；陳三元 CHEN, SANYUAN (TW)

(74) 代理人：蔡坤財；李世章

(56) 參考文獻：

US 2013/137917A1

US 2010/0092384A1

US 2011/0159291A1

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：13 共 71 頁

(54) 名稱

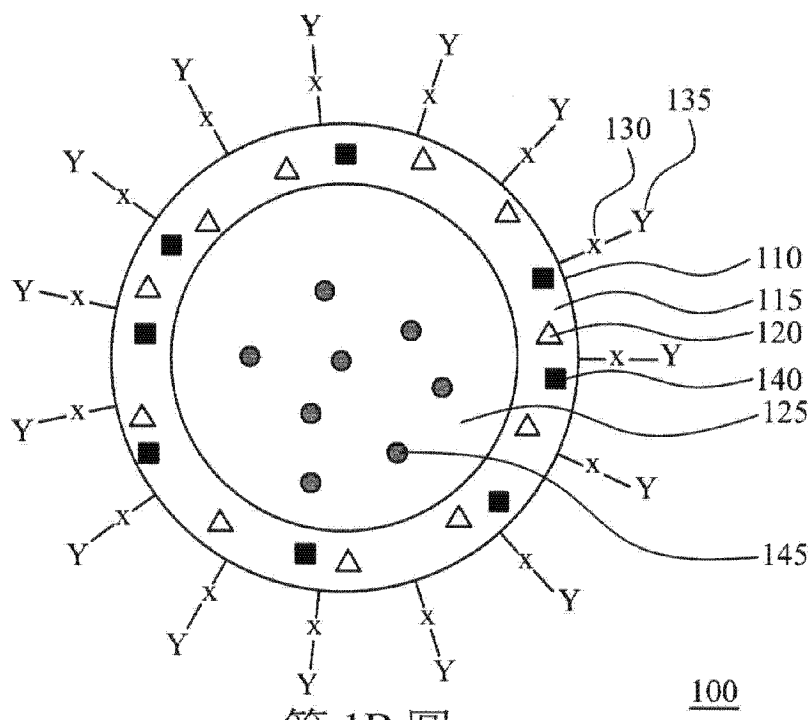
架接抗體之雙乳化核殼奈米結構

ANTIBODY-CONJUGATED DOUBLE EMULSION CORE-SHELL NANO STRUCTURE

(57) 摘要

本發明提供一種架接抗體之雙乳化核殼奈米結構。在油相殼包覆水相核而成之雙乳化核殼奈米結構的表面引進架橋基，以與抗體相接，形成架接抗體之雙乳化核殼奈米結構。

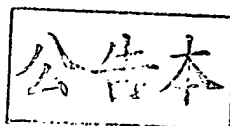
An antibody-conjugated double emulsion core-shell nano structure is provided. A reactive functional group is introduced on the surface of a double emulsion core-shell nano structure, which is made from an oil shell enclosing a water core, to conjugate with an antibody.



- 100 . . . 雙乳化核殼
奈米結構
- 110 . . . 油相殼
- 115 . . . 高分子
- 120 . . . 疏水性磁奈
米粒子
- 125 . . . 水相核
- 130 . . . 架橋基
- 135 . . . 抗體
- 140 . . . 疏水性藥物
- 145 . . . 親水性藥物

第 1B 圖

100



發明摘要

※ 申請案號：102140127

※ 申請日：102.11.5

※ IPC 分類：

C07K19/06 (2006.01)

A61K9/00 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

【發明名稱】

架接抗體之雙乳化核殼奈米結構

Antibody-Conjugated Double Emulsion Core-Shell Nano
Structure

【中文】

本發明提供一種架接抗體之雙乳化核殼奈米結構。在油相殼包覆水相核而成之雙乳化核殼奈米結構的表面引進架橋基，以與抗體相接，形成架接抗體之雙乳化核殼奈米結構。

【英文】

An antibody-conjugated double emulsion core-shell nano structure is provided. A reactive functional group is introduced on the surface of a double emulsion core-shell nano structure, which is made from an oil shell enclosing a water core, to conjugate with an antibody.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1B）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

100：雙乳化核殼奈米結構

110：油相殼

115：高分子

120：疏水性磁奈米粒子

125：水相核

130：架橋基

135：抗體

140：疏水性藥物

145：親水性藥物

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

【發明名稱】

架接抗體之雙乳化核殼奈米結構

Antibody-Conjugated Double Emulsion Core-Shell Nano Structure

【技術領域】

[0001] 本發明是有關於一種架接抗體之奈米結構，且特別是有關於一種架接抗體之雙乳化核殼奈米結構。

【先前技術】

[0002] 目前已有一些由有機材料所製得之核殼奈米結構被應用來攜帶藥物，做為藥物的載體。這些有機的核殼奈米結構，例如有由雙脂肪層所構成之微脂體(liposome)或由兩性高分子所構成之微胞(micelle)，但是這些有機的核殼奈米結構通常有結構不穩定，或製程繁雜及不易控制等問題。

【發明內容】

[0003] 因此，本發明之一方面是在提供一種架接抗體之雙乳化核殼奈米結構，其包括一水相核、一油相殼與一抗體。

[0004] 上述之油相殼包圍該水相核，該油相殼的組成包含一高分子與複數個疏水性磁奈米粒子，但不包含界面

活性劑。上述之高分子可為架橋聚乙炔醇或是聚乙炔醇與一架橋高分子的組合，且該架橋聚乙炔醇與該架橋高分子具有一架橋基。上述之抗體藉由一耦合劑鍵結於該架橋基上。

[0005] 依據本發明一實施例，其中該架橋基包括羧基、硫醇基、醛基、胺基或羥基。

[0006] 依據本發明另一實施例，其中該架橋聚乙炔醇為羧甲基化聚乙炔醇、硫醇化聚乙炔醇或聚乙炔醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物。

[0007] 依據本發明又一實施例，其中該架橋高分子為聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、羧甲基化聚乙炔醇、硫醇化聚乙炔醇、硫醇化聚甲基丙烯酸或聚乙炔醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物。

[0008] 依據本發明再一實施例，其中該些疏水性磁奈米粒子為表面有疏水性官能基修飾之 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 CoFe_2O_4 或 MnFe_2O_4 微粒。

[0009] 依據本發明又一實施例，其中該抗體包括乳癌抗體 Trastuzumab、大腸癌抗體 Cetuximab、表皮生長因子受體的抗體 Panitumumab 或抑制血管新生的抗體 Bevacizumab。

[0010] 依據本發明又一實施例，其中該相殼包含一疏水性藥物。

[0011] 依據本發明又一實施例，其中該水相核包含一親水性藥物。

[0012] 本發明之另一方面為提供上述之雙乳化核殼奈米結構的製備方法，此製備方法分為單乳化法與雙乳化法。

[0013] 上述之單乳化製備法包括下述製備步驟。先分別製備包括該架橋聚乙烯醇的水溶液與包括該些疏水性磁奈米粒子的有機溶液。接著，混合攪拌該水溶液與該有機溶液，以形成一乳液，並於該乳液中形成複數個雙乳化核殼奈米結構。去除有機溶液所用的有機溶劑後，分別製備包括該些雙乳化核殼奈米結構的第一分散液與包括與該耦合劑相接之該抗體的第二分散液。混合攪拌該第一分散液與該第二分散液，讓該架橋聚乙烯醇之該架橋基架接上與該耦合劑相接的該抗體。

[0014] 依照本發明一實施例，上述之親水性藥物可加入至該水溶液中。

[0015] 依照本發明另一實施例，上述之疏水性藥物可加入至該有機溶液中。

[0016] 上述之雙乳化製備法包括下述製備步驟。先製備包括該聚乙烯醇之第一水溶液，再製備包括該些疏水性磁奈米粒子的有機溶液。混合攪拌該第一水溶液與該有機溶液，以形成一油包水乳液。然後，製備包括該架橋高分子的第二水溶液。混合攪拌該油包水乳液與該第二水溶液，以形成一水包油乳液，並於該水包油乳液中形成複數個雙乳化核殼奈米結構。去除有機溶液所用的有機溶劑後，分別製備包括該些雙乳化核殼奈米結構的第一分散液

與包括與該耦合劑相接之該抗體的第二分散液。混合攪拌該第一分散液與該第二分散液，讓該架橋高分子之該架橋基架接上與該耦合劑相接的該抗體。

[0017] 依照本發明一實施例，上述之親水性藥物可加入至該第一水溶液中。

[0018] 依照本發明另一實施例，上述之疏水性藥物可加入至該有機溶液中。

[0019] 上述發明內容旨在提供本揭示內容的簡化摘要，以使閱讀者對本揭示內容具備基本的理解。此發明內容並非本揭示內容的完整概述，且其用意並非在指出本發明實施例的重要/關鍵元件或界定本發明的範圍。在參閱下文實施方式後，本發明所屬技術領域中具有通常知識者當可輕易瞭解本發明之基本精神及其他發明目的，以及本發明所採用之技術手段與實施方面。

【圖式簡單說明】

[0020] 為讓本發明之下述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附附圖之說明如下：

第 1A 圖係繪示依照本發明一態樣的一種雙乳化核殼奈米結構剖面結構示意圖。

第 1B 圖係繪示利用雙乳化核殼奈米結構來同時做為親水性藥物以及疏水性藥物載體的剖面結構示意圖。

第 2A 圖係繪示以單乳化法製備表面有架橋基之雙乳化核殼奈米結構的流程示意圖。

第 2B 圖係繪示以雙乳化法製備表面有架橋基之雙乳化核殼奈米結構的流程示意圖。

第 2C 圖係繪示表面有架橋基的雙乳化核殼奈米結構與抗體反應的流程示意圖。

第 3 圖顯示使用不同分子量 PVA 所合成出之載體的掃描式電子顯微鏡(SEM)圖。

第 4A-4B 圖分別為架接乳癌抗體前與架接乳癌抗體後的載體之掃描式電子顯微鏡(SEM)影像。

第 5A 圖為包覆紫杉醇(PTX)且於合成時添加不等量之 TPMAA 的載體在 pH 4 下的釋放行為。

第 5B 圖為包覆小紅莓(Dox)且於合成時添加不等量之 TPMAA 的載體在 pH 4 下的釋放行為。

第 5C 圖為同時包覆親水性小紅莓與疏水性紫杉醇雙藥並於 pH 7 以及 pH 4 下之載體的藥物釋放行為。

第 6A 圖與第 6B 圖為含 PVA/TPMAA 混合物(TPMAA 的添加量為 1 wt%)之架接抗體載體分別在 pH 7 與 pH 4 下的穿透電子顯微鏡(TEM)影像。

第 7A 圖顯示使用流式細胞儀檢測架接乳癌抗體 Trastuzumab 之載體與 SKBR3 細胞共培養後所測得之螢光量。

第 7B 圖顯示使用流式細胞儀檢測架接 IgG 之載體與 SKBR3 細胞共培養後所測得之螢光量。

第 8 圖為 SKBR3 細胞、未被包埋的小紅莓、架接 IgG 且包埋小紅莓的載體、架接乳癌抗體 Trastuzumab 且包埋小

紅莓的載體分別與 SKBR3 細胞共培養後之共軛聚焦顯微鏡的觀察結果。

第 9 圖為不同樣品與 SKBR3 細胞共培養後之細胞存活率。

第 10A-10B 圖分別為裸鼠實驗之第 1 天與第 3 天的非侵入式活體影像。

第 11 圖為以不同樣品治療裸鼠腫瘤後，在不同時間觀察所得之腫瘤體積變化圖。

第 12 圖為含有 PVA/PAA 混合物並以 EDC/Sulfo-NHS 架接乳癌抗體 Trastuzumab 後之雙乳化核殼奈米結構之外觀 SEM 影像。

第 13A-13C 圖分別為分子量 25,000、47,000 與 78,000 之含有 TPVA 載體外觀的 SEM 影像。

【實施方式】

[0021] 爲了使本揭示內容的敘述更加詳盡與完備，下文針對本發明的實施方面與具體實施例提出了說明性的描述；但這並非實施或運用本發明具體實施例的唯一形式。實施方式中涵蓋了多個具體實施例的特徵以及用以建構與操作這些具體實施例的方法步驟與其順序。然而，亦可利用其他具體實施例來達成相同或均等的功能與步驟順序。

表面架接抗體之雙乳化核殼奈米結構

[0022] 請參照第 1A 圖，其繪示依照本發明一態樣的一種雙乳化核殼奈米結構剖面結構示意圖。在第 1A 圖中，雙乳化核殼奈米結構 100 係由油相殼 110 包圍水相核 125 而成，而油相殼 110 的組成包含高分子 115 與疏水性磁奈米粒子 120。在油相殼 110 的表面具有架橋基 130 以及與其相接之抗體 135。

[0023] 上述之高分子 115 至少含有聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol; PVA)，或是至少含有聚乙烯醇經改質後而具有架橋基 130 的架橋聚乙烯醇。當高分子 115 中只含有聚乙烯醇時，還需要混合另一種具有架橋基 130 的架橋高分子。若使用的是架橋聚乙烯醇，則不需額外混合其他高分子。需強調的是油相殼 110 中不含有任何的界面活性劑。

[0024] 上述之聚乙烯醇或架橋聚乙烯醇本身可讓自己的親水官能基旋轉，讓其朝向水相核 125 內以及油相殼 110 外的水溶液，所以能在沒有任何界面活性劑的情況下，同時穩定兩個油水界面，形成雙乳化核殼奈米結構 100。

[0025] 上述之架橋基 130 例如可為羧基 (-COOH)、硫醇基 (-SH)、醛基、胺基或羥基。舉例來說，當高分子 115 含有架橋聚乙烯醇時，架橋聚乙烯醇可為羧甲基化聚乙烯醇 (carboxymethylated polyvinyl alcohol; CMPVA)、硫醇化聚乙烯醇 (thiolated polyvinyl alcohol; TPVA) 或聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物，而不需要混合其他高分子。

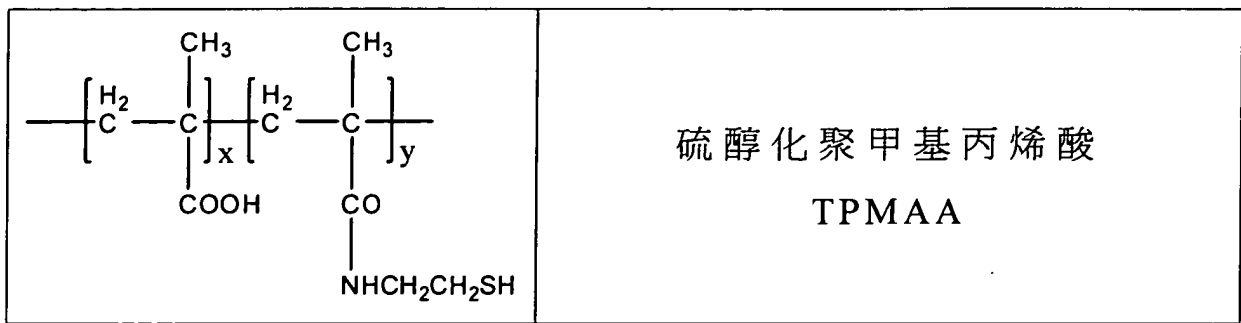
[0026] 當高分子 115 含有分子量 16,000 - 61,000 的聚

乙烯醇時，架橋高分子可以選用聚丙烯酸(polyacrylic acid; PAA)、聚甲基丙烯酸(polymethacrylic acid; PMAA)、羧甲基化聚乙烯醇、硫醇化聚乙烯醇、硫醇化聚甲基丙烯酸(thiolated polymethacrylic acid; TPMAA)或聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物。讓聚乙烯醇與架橋高分子混合後，形成油相殼 110 內之高分子 115。

[0027] 上述之聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、羧甲基化聚乙烯醇、硫醇化聚甲基丙烯酸與硫醇化聚乙烯醇的化學結構式列在下面之表一中。

表一：例示之架橋高分子

$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right]_n$	<p>聚丙烯酸 PAA</p>
$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right]_n$	<p>聚甲基丙烯酸 PMAA</p>
$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array} \right]_n$	<p>羧甲基化聚乙烯醇 CMPVA</p>
$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{COCH}_2\text{SH} \end{array} \right]_n$	<p>硫醇化聚乙烯醇 TPVA</p>



[0028] 上述之抗體 135 可為任何所需之抗體，其選擇視其欲結合的抗原而定。例如，抗體 135 可為抗乳癌 (breast cancer) 的抗體 Trastuzumab (商品名為 Herclon 或 Herceptin)，其所辨識的抗原為由致癌基因 HER2 所表現的 HER2 接受器。其他用來治療癌症的抗體例子還有抗大腸癌 (colorectal cancer) 的抗體 Cetuximab、表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor) 的抗體 Panitumumab 或抑制血管新生 (angiogenesis inhibitor) 的抗體 Bevacizumab 等。

[0029] 上述之疏水性磁奈米粒子 120 的材料例如可為表面有疏水性官能基修飾之 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 CoFe_2O_4 或 MnFe_2O_4 奈米粒子，上述之疏水性官能基例如可為長鏈烷基或長鏈烯基，例如可為油酸或油胺之類的分子。

[0030] 疏水性磁奈米粒子 120 具有穩定油相殼 110 結構的功能，使其不易坍塌。此外，除了可作為核磁共振顯影 (magnetic resonance imaging; MRI) 的顯影劑之外，還可在外加交流磁場 (alternative magnetic field; AMF) 下，利用磁流體過熱 (magnetic fluid hyperthermia; MFH) 現象來進行局部加熱，破壞油相殼 110 的結構。

[0031] 由於架接抗體之雙乳化核殼奈米結構 100 具有

油相殼 110 與水相核 125 的結構，兩者可以用來分別容納疏水性藥物與親水性藥物。因此，上述雙乳化核殼奈米結構 100 可應用來做為疏水性藥物、親水性藥物或其任意組合的載體，並利用控制外加交流磁場的強度與開關來控制活性藥物的釋放速率。

[0032] 請參考第 1B 圖，其係繪示利用雙乳化核殼奈米結構來同時做為親水性藥物以及疏水性藥物載體的剖面結構示意圖。在第 1B 圖中，親水性藥物 145 容納在雙乳化核殼奈米結構 100 的水相核 125 中，疏水性藥物 140 容納在雙乳化核殼奈米結構 100 的油相殼 110 中。舉例來說，親水性藥物 145 例如可為小紅莓(Doxorubicin; DOXO)或順鉑(cisplatin)，疏水性藥物 140 例如可為紫杉醇(Paclitaxel; PTX)、歐洲紫杉醇(Docetaxel)、喜樹鹼(Camptothecin; CPT)或薑黃素(Cururmine)。

表面架接雙乳化核殼奈米結構的製備方法

[0033] 表面架接有抗體之雙乳化核殼奈米結構的製備方法，是先以雙乳化法來製備表面有架橋基的雙乳化核殼奈米結構。之後，再與抗體反應，形成表面架接有抗體之雙乳化核殼奈米結構。

[0034] 第 2A 圖係繪示以單乳化法製備表面有架橋基之雙乳化核殼奈米結構的流程示意圖。在第 2A 圖中，先分別製備含有架橋聚乙烯醇的水溶液(步驟 202a)與含有疏水

性磁奈米粒子的有機溶液(步驟 202b)。然後，取多量的水溶液與少量的有機溶液，將兩者混合攪拌後(步驟 212)，形成含有雙乳化核殼奈米結構的乳液(步驟 222)。接著，去除乳液中的有機溶劑(步驟 230)，得到雙乳化核殼奈米結構(步驟 235)。

[0035] 在上述步驟 202a 之水溶液中，可選擇再添加至少一種的親水性藥物。在上述步驟 202b 之有機溶液中，可選擇再添加至少一種的疏水性藥物。

[0036] 當有機溶液只含有疏水性磁奈米粒子時，其所用之有機溶劑較佳為符合下述特性者：可有效地溶解或分散疏水性磁奈米粒子、與水不互溶及沸點較低。當有機溶液也含有疏水性藥物時，除了上述特性外，所用有機溶劑較佳為還可同時有效地溶解或分散疏水性藥物。

[0037] 上述選用沸點較低有機溶劑之因為可在不需加熱的情況下，輕易地去除有機溶劑，以免對雙乳化核殼奈米結構的外形造成不可控制之不良影響。例如可選擇沸點在 90°C 以下的有機溶劑，如三氯甲烷、二氯甲烷、三氯乙烷或乙腈。

[0038] 在上述步驟 212 中，混合攪拌方法例如可為超音波震盪法。在上述之步驟 230 中，去除有機溶劑的方法，例如可為室溫揮發法或減壓蒸餾法。

[0039] 第 2B 圖係繪示以雙乳法製備表面有架橋基之雙乳化核殼奈米結構的流程示意圖。在第 2A 圖中，先分別製備含有聚乙烷醇的第一水溶液(步驟 205a)與含有疏水

性磁奈米粒子的有機溶液(步驟 205b)。取少量的第一水溶液與多量的有機溶液，讓兩者進行第一混合攪拌後(步驟 210)，形成油包水的乳液(步驟 215a)。此為第一階段的乳化步驟。

[0040] 在上述步驟 205a 之第一水溶液中，可選擇再添加至少一種的親水性藥物。在上述步驟 205b 之有機溶液中，可選擇再添加至少一種的疏水性藥物。有機溶液的選擇方法如同第 2A 圖中步驟 202b 中所述，因此不再贅述之。

[0041] 接著，製備含有架橋高分子的第二水溶液(步驟 215b)。讓油包水乳液與第二水溶液進行第二混合攪拌步驟後(步驟 220)，形成含有表面有架橋基之雙乳化核殼奈米結構的水包油乳液(步驟 225)。此為第二階段的乳化步驟。

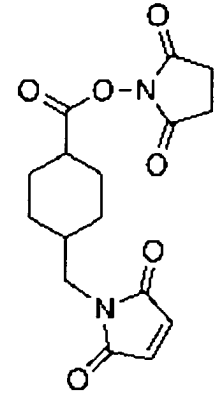
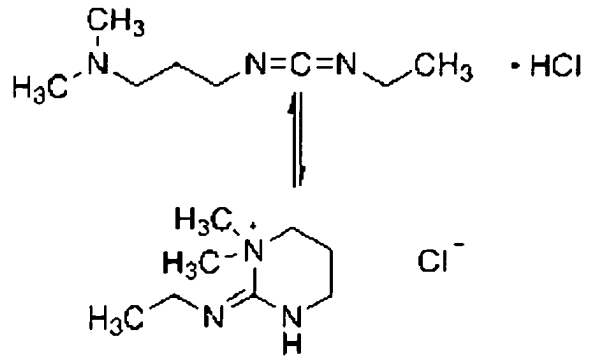
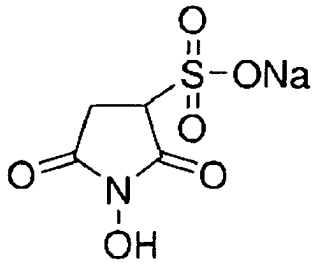
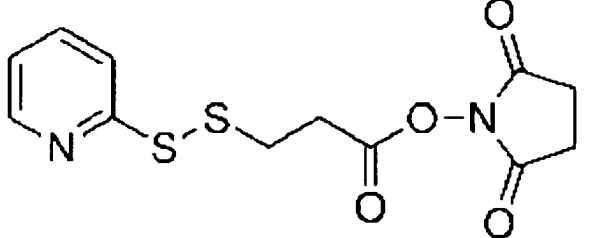
[0042] 上述步驟 210 的第一混合攪拌方法與步驟 220 的第二混合攪拌方法，例如可為超音波震盪法。在上述之步驟 230 中，去除有機溶劑的方法，例如可為室溫揮發法或減壓蒸餾法。

[0043] 第 2C 圖係繪示表面有架橋基的雙乳化核殼奈米結構與抗體反應的流程示意圖。在第 2C 圖中，先製備表面有架橋基的雙乳化核殼奈米結構的分散液(步驟 240a)。接著，製備與耦合劑相接之抗體的分散液(步驟 240b)，抗體通常是利用其自由一級胺基與耦合劑相接。

[0044] 上述與抗體相接的耦合劑例如可為列在下面表二中之各種耦合劑，其選擇視上述之架橋基為何來決定，以利於讓耦合劑與架橋基形成化學鍵結。例如當架橋

基為硫醇基時，耦合劑可以選用下面表二中之 SMCC 或 SPDP。而當架橋基為羧基時，耦合劑可以選用下面表二中之 EDC 與 Sulfo-NHS 來一起做為耦合劑。

表二：常見的一些耦合劑

	<p>SMCC</p> <p>4-(N-Maleimidomethyl) cyclohexane carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester</p>
	<p>EDC</p> <p>N-(3-Dimethylaminopropyl)- N-ethyl carbodiimide hydrochloride</p>
	<p>Sulfo-NHS</p> <p>N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt</p>
	<p>SPDP</p> <p>3-(2-Pyridyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester</p>

[0045] 在上述步驟 240a 中製備表面有架橋基的雙乳化核殼奈米結構的分散液與步驟 240b 中製備與耦合劑相接之抗體的分散液所用之溶劑，是以所選耦合劑來決定之。例如，若選用 SMCC 為耦合劑，則可選用 3 mL 的 PBS 緩衝液做為分散液的溶劑，其含有 0.1 M 的磷酸鈉與 0.15 M 的 NaCl，pH 值為 7.4。若選用 EDC 與 Sulfo-NHS 為耦合劑時，則可選用 MES 緩衝液做為分散液的溶劑，其含有 0.1 M 的 2-[嗎啉代]乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MES]以及 0.5M NaCl，pH 值為 6.0。

[0046] 然後讓上述兩種分散液混合後，一起反應(步驟 245)，製備出架接抗體的雙乳化核殼奈米結構。接著，以離心方法移除未鍵結之自由抗體分子(步驟 250)，得到架接抗體的雙乳化核殼奈米結構(步驟 255)。

[0047] 在下面的實施例中，為了簡化文字敘述起見，將「雙乳化核殼奈米結構」簡稱為「載體」。

實施例一：製備包覆有油酸的 Fe_3O_4 奈米微粒

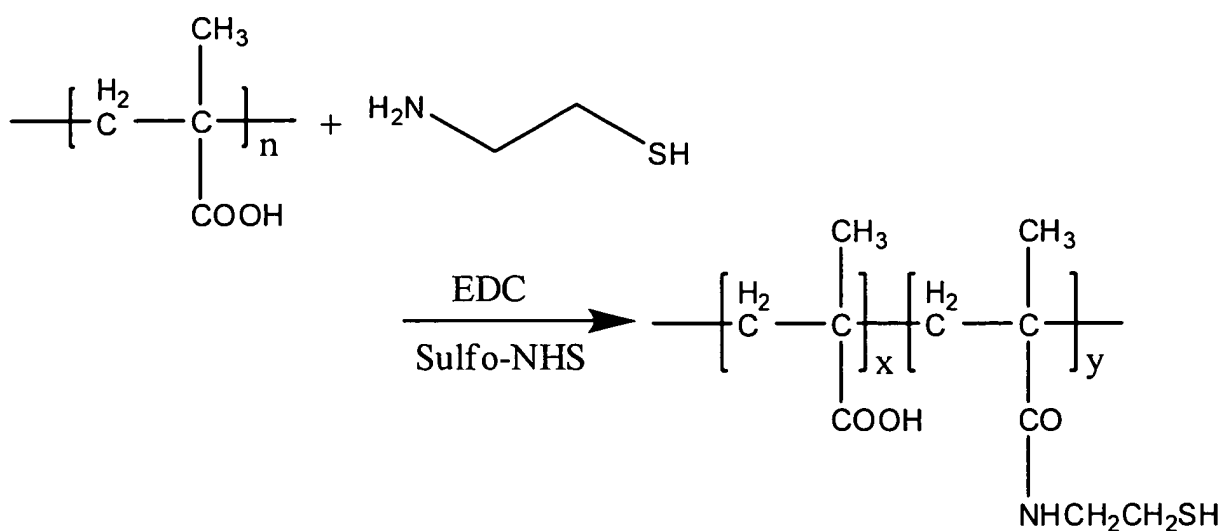
[0048] 在此實施例中，製備粒徑為約 5 nm 之包覆有油酸(Oleic acid)的 Fe_3O_4 奈米微粒(以下簡稱為 IO-OA 奈米微粒)，其例示之製備方法簡述如下。此外，製備方法的參考文獻為 Sun, S. H.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. X. Journal of the American

Chemical Society, 2004, 126(1), 273-279。

[0049] 於三頸瓶中加入 0.708 克 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 、2.58 克之 1,2-十六烷二醇(1,2-Hexadecanediol)、0.565 克油酸、0.535 克油胺(Oleylamine)、20 mL 苄醚(Benzyl Ether)。讓上述混合物在冷卻水迴流及氮氣環境下經過三步驟加熱(第一段為 100°C ，持溫 30 分鐘；第二段為 200°C ，持溫 60 分鐘；第三段為 285°C ，持溫 30 分鐘後，冷卻至室溫)，形成 IO-OA 奈米微粒。接著，讓 IO-OA 奈米微粒分散在乙醇中，再以 6000 rpm 離心，去除上面的溶液，重複數次後，讓 IO-OA 奈米微粒保存於乙醇中。

實施例二：製備硫醇化聚甲基丙烯酸

[0050] 在此實施例中，製備硫醇化聚甲基丙烯酸(thiolated polymethacrylic acid; TPMAA)，其例示之製備方法簡述如下，並亦請同時參考下面的合成方案一。



合成方案一

[0051] 取 250 mg 的 30 wt% 的 PMAA 水溶液，依序加入 5 mL 之 pH 8 的 PBS 緩衝液、75 mg 之催化劑 EDC 與 40 mg 之催化劑 Sulfo-NHS。混合攪拌 15 分鐘後，加入 5 毫克之半胱胺(Cysteamine)，並混合攪拌至隔日，讓半胱胺的一級胺基與 PMAA 的羧基反應形成醯胺鍵結，得到 TPMAA 的產物。接著，利用透析法去除催化劑 EDC 和 Sulfo-NHS 後，利用冷凍乾燥設備去除水分，得到 TPMAA 的結晶。

實施例三：製備聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物

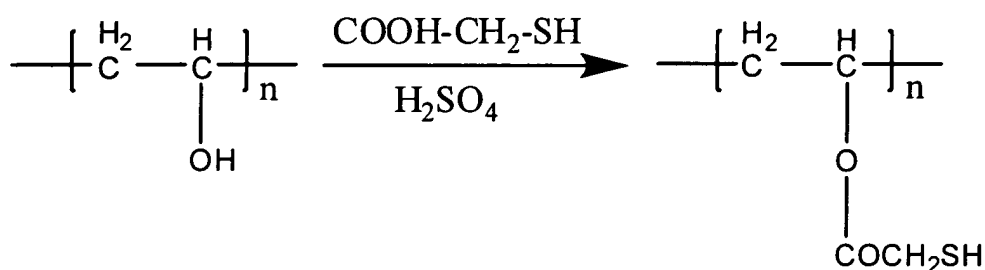
[0052] 在此實施例中，製備聚乙烯醇(PVA)-硫醇化聚甲基丙烯酸(TPMAA)的共聚物，其例示的製備方法簡述如下。

[0053] 將上述所得之 TPMAA 與 PVA 混合，加入濃硫酸，反應成 PVA-TPMAA 共聚物以及副產物水。接著，以飽和碳酸鈉溶液分離 PVA-TPMAA 共聚物以及反應物 TPMAA 和 PVA，得到 PVA-TPMAA 共聚物的產物。

實施例四：製備硫醇化聚乙烯醇

[0054] 在此實施例中，製備硫醇化聚乙烯醇(thiolated polyvinyl alcohol; TPVA)，其例示製備方法簡述如下，並亦請同時參考下面的合成方案二。製備方法的參考文獻為

Gupta B, Anjum S and Ikram S. Preparation of thiolated polyvinyl alcohol hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013; **129**: 815-21.



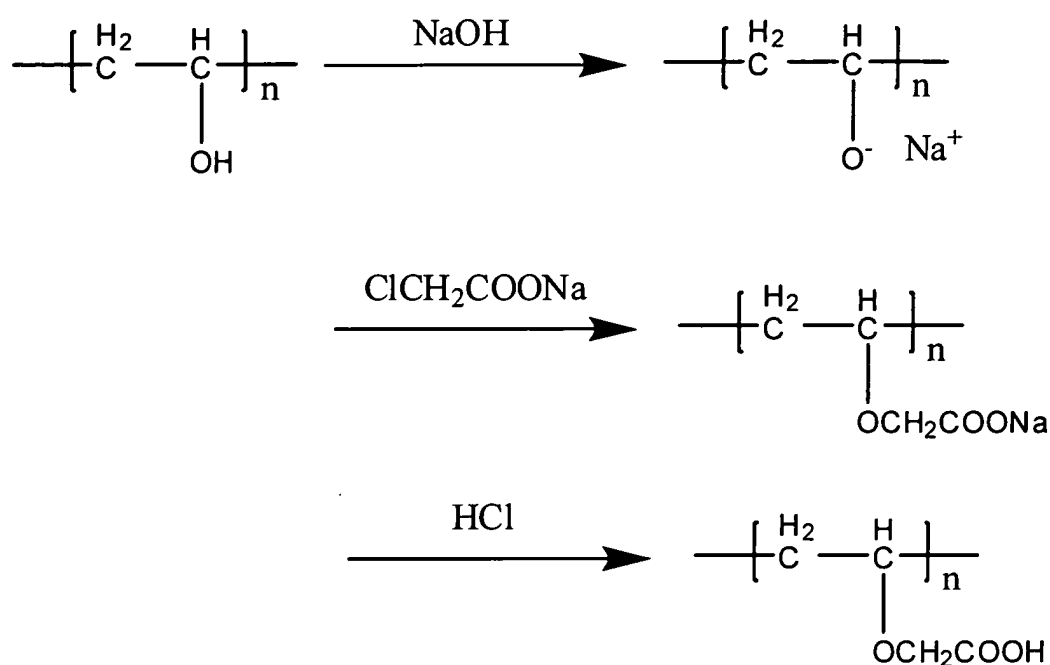
合成方案二

[0055] 讓 PVA 溶解於去離子水中，形成 2 wt% 的 PVA 水溶液。將 20-99 % (v/v) 的乙硫醇酸水溶液和 0.1-1 wt% 的硫酸水溶液緩慢的倒入 PVA 水溶液中，在油浴環境下加熱，以進行酯化反應。接著，再將甲醇緩緩倒入上述 PVA 酯化反應的溶液中，使其產生沉澱。收集此沉澱產物並重複以甲醇純化數次，得到粉體。然後，讓粉體進行冷凍乾燥，得到白色結晶粉體 TPVA。

實施例六：製備羧甲基化聚乙炔醇

[0056] 在此實施例中，製備羧甲基化聚乙炔醇 (carboxymethylated polyvinyl alcohol; CMPVA)，其例示製備方法簡述如下，並亦請同時參考下面的合成方案三。製備方法的參考文獻為 Yu C. and Li B. Preparation and characterization of carboxymethyl polyvinyl

alcohol-graphite nanosheet composites. *Polymer Composites*. 2008; 29: 998-1005.



合成方案三

[0057] 首先，將 PVA 配製成 2 wt% 的水溶液後，加入氫氧化鈉來活化 PVA 的醇基。再將氯乙酸 (ClCH₂COOH) 溶於乙醇後，以氫氧化鈉中和，形成氯乙酸鈉 (ClCH₂COONa) 的乙醇溶液。讓上述二溶液混合反應形成 CMPVA，五小時後，添加適量鹽酸以調整酸鹼值至 pH 為 6。接著，加入過量酒精使 CMPVA 析出，並重複以酒精純化產物數次。

實施例七：含 PVA/TPMAA 混合物之架接抗體的雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0058] 在此實施例中，利用第 2B 圖之雙乳化法製備含有 PVA/TPMAA 混合物之架接抗體的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與順鉑(Cisplatin)以及疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)與喜樹鹼(Camptothecin; CPT)為例，兩者皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA/TPMAA 混合物的載體殼層表面架接上抗體。

[0059] 先分別配製親水性藥物/PVA 水溶液、IO-OA 奈米微粒/疏水性藥物的 CHCl_3 溶液以及 PVA/TPMAA 水溶液。在親水性藥物/PVA 水溶液中，PVA 的濃度為 20 mg/mL，親水性藥物(小紅莓或順鉑)的濃度為 8 mg/mL。在 IO-OA 奈米微粒/疏水性藥物的 CHCl_3 溶液中，IO-OA 奈米微粒的濃度為 20 mg/mL，當疏水性藥物為紫杉醇時，紫杉醇濃度為 30 mg/mL，當疏水性藥物為喜樹鹼時，喜樹鹼濃度為 5 mg/mL。在 PVA/TPMAA 水溶液中，PVA 的濃度為 20 mg/mL，TPMAA 的濃度為 2 mg/mL。上述之 PVA 的平均分子量分別為 16,000、25,000、31,000 及 47,000。

[0060] 取 0.2 mL 之 DOXO/PVA 水溶液與 0.5 mL 之 IO-OA 奈米微粒/PTX 氯仿溶液，讓兩者混合，利用 20 kHz 超音波震盪器讓混合液乳化。當乳化完成，再加入 1.5 mL 之 PVA/TPMAA 的水溶液，再次以超音波震盪器乳化，得到含 PVA/TPMAA 混合物之載體。最後置於開放空間中，等待 CHCl_3 揮發完全。 CHCl_3 揮發時的溫度高低會影響載體的形貌。再讓含 PVA/TPMAA 混合物之載體分散於 3 mL 的 PBS

緩衝液(含 0.1 M 磷酸鈉與 0.15 M 的 NaCl)中。

[0061] 當以上述做法只包覆單一藥物時，上述四種測試藥物的包覆率及載體大小如下面表三所示。由下面表三可知，疏水性藥物的包覆率通常大於親水性藥物的包覆率，因此包覆疏水性藥物的載體尺寸也通常較大。此外，以目前的實驗數據看來，親水性藥物的包覆率在 75%以上，顯示以雙乳化法來合成包覆藥物的載體之包覆效率相當好。

表三：單一親水性藥物或疏水性藥物的包覆率

包埋藥物		包覆率(%)	載體大小(nm)
疏水性藥物	紫杉醇	95	138
	喜樹鹼	91	133
親水性藥物	順鉑	76	131
	小紅莓素	83	130

[0062] 取 1 毫克乳癌抗體 Trastuzumab 與 4.8 毫克之耦合劑 SMCC 分別各自溶於 2 mL 與 5 mL 的 PBS 緩衝液(含 0.1 M 磷酸鈉與 0.15 M 的 NaCl)中，然後讓兩者混合，於 4°C 下反應 2 小時，得到架接有 SMCC 之乳癌抗體 Trastuzumab。利用透析離心管於 8000 rpm 下，去除未反應之耦合劑 SMCC，並將架接有 SMCC 之乳癌抗體 Trastuzumab 重新分散於 1 mL 之 PBS 緩衝液(含 0.1 M 磷酸

鈉與 0.15 M 的 NaCl)中。

[0063] 混合含有上述之載體與架接有 SMCC 之乳癌抗體 Trastuzumab 的 PBS 分散液，於 4°C 下反應 2 小時。再離心，以去除未反應之乳癌抗體 Trastuzumab 分子，並將產物重新分散於 4 mL 之二次水中。

[0064] 上述之耦合劑 SMCC 成爲 TPMAA 的 -SH 架橋基以及乳癌抗體 Trastuzumab 上的 -NH₂ 官能基的架接橋樑，讓乳癌抗體 Trastuzumab 透過 SMCC 與 TPMAA 的 -SH 架橋基鍵結，接在載體殼層的外側。

[0065] 第 3 圖顯示使用不同分子量 PVA 所合成出之空載體的掃描式電子顯微鏡 (SEM) 圖。在第 3 圖中，含有分子量爲 16k、25k、31k 及 47k 之 PVA 的空載體 (即不含 DOXO 與 PTX) 的平均直徑分別爲 140、130、130、125 nm。顯示 PVA 的分子量越大，架接乳癌抗體的載體之平均直徑有減少的趨勢。

[0066] 第 4A-4B 圖分別爲架接乳癌抗體前與架接乳癌抗體後的載體之掃描式電子顯微鏡 (SEM) 影像，其中所用之 PVA 的分子量爲 16k。第 4A 圖顯示混合 TPMAA 與 PVA 後合成的載體在經由去離子水清洗並重新分散後，利用真空乾燥後所攝得之影像仍維持中空的球體結構。第 4B 圖顯示同一批載體在架接乳癌抗體後的形貌因爲經歷了表面改質，因此型態有些轉變。

實施例八：溶液酸鹼值對含 PVA/TPMAA 混合物之架接抗

體的雙乳化核殼奈米結構(載體)釋放藥物的影響

[0067] 在此實施例中，測試溶液酸鹼值對架接抗體之載體釋放藥物的影響。在此所用載體之殼層為分子量 16k 之 PVA 與 TPMAA 之混合物，其中 TPMAA 在製備時的添加量最多為 1 wt%。

[0068] TPMAA 是將高分子 PMAA 修飾後帶有硫醇官能機之高分子，而 PMAA 為一種酸鹼敏感性的高分子，其支鏈上的羧基和烷基為 PMAA 在不同酸鹼環境下展現不同外型的主要因素。當其在中性環境下時，高分子鏈呈現舒展的結構；然而，當環境轉變為酸性時，PMAA 將會轉變成扎實的疏水蜷曲結構。利用這種特性，將 PMAA 上的羧基部分取代為硫醇鍵，希望修飾成為 TPMAA 仍保有酸鹼敏感性的特質，且同時可以利用改質後的硫醇鍵來架接具有標靶作用的乳癌抗體 Trastuzumab 分子。為了要探討這種酸鹼敏感性的特質，將合成後同時包覆有雙藥之載體分別置於中性 pH 7 以及酸性 pH 4 的環境之中，以觀察其藥物釋放的變化。

[0069] 第 5A 圖為包覆紫杉醇(PTX)且於合成時添加不等量之 TPMAA 的載體在 pH 4 下的釋放行為。第 5B 圖為包覆小紅莓(Dox)且於合成時添加不等量之 TPMAA 的載體在 pH 4 下的釋放行為。由第 5A-5B 圖可知，在 pH 4 的酸性環境中，當增加 TPMAA 在合成時的添加量時，小紅莓以及紫杉醇的釋放量將明顯的增加，顯示 TPMAA 在酸性環境下有

加速藥物自載體內向外釋放的的能力。

[0070] 第 5C 圖為同時包覆親水性小紅莓與疏水性紫杉醇雙藥並於 pH 7 以及 pH 4 下之載體的藥物釋放行為，製備載體時 TPMAA 的添加量為 1 wt%。由第 5C 圖可知，載體在 pH 4 酸性環境中之釋放藥物量遠大於在 pH 7 中性環境下的藥物釋放量。而在 pH 4 酸性環境中，油溶性之紫杉醇的釋放率比水溶性小紅莓的釋放率還大。

[0071] 第 6A 圖與第 6B 圖為含 PVA/TPMAA 混合物 (TPMAA 的添加量為 1 wt%) 之架接抗體載體分別在 pH 7 與 pH 4 下的穿透電子顯微鏡 (TEM) 影像。第 6A 圖顯示，在中性環境下的載體，球狀的殼層結構相當明顯。第 6B 圖顯示，在酸性環境下的載體，殼層遭受擠壓而變形。

[0072] 這樣的藥物釋放特性，與上述 TPMAA 在酸性環境下會收縮並轉變成疏水性之性質相符合。當遭遇到環境有大量的氫離子時，位在載體的殼層處之與 PVA 混合交纏並與 PVA 互相形成氫鍵的 TPMAA 將會開始收縮，使得載體變形而擠壓殼層。因此在酸性環境下，處於殼層處之油相藥物的釋放量會較水相藥物的釋放量多。

實施例九：架接乳癌抗體之雙乳化核殼奈米結構(載體)對 HER2 過度表現細胞的識別效果

[0073] 在此實施例中，驗證架接乳癌抗體之載體對 HER2 過度表現的細胞是否具有標定的作用。在此所選用

HER2 過度表現的細胞株為 SKBR3。所用之載體之殼層為分子量 16k 之 PVA 與 TPMAA 之混合物，其中 TPMAA 的添加量為 1 wt%。

[0074] 首先，讓含有親水性藥物小紅莓的載體分別架接乳癌抗體 Trastuzumab 與對 SKBR3 細胞株不具有專一性的 IgG。接著，讓上述兩者與 SKBR3 細胞株共培養 30 分鐘。由於小紅莓具有螢光性質(激發光波長 488 nm，放光波長 580 nm)，所以可利用流式細胞儀(flow cytometer)來檢測經由抗體-抗原作用而貼附在細胞表面的螢光強度。

[0075] 第 7A 圖顯示使用流式細胞儀檢測架接乳癌抗體 Trastuzumab 之載體(以符號 T 代表)與 SKBR3 細胞共培養後所測得之螢光量。第 7B 圖顯示使用流式細胞儀檢測架接 IgG 之載體(以符號 IgG 代表)與 SKBR3 細胞共培養後所測得之螢光量。上述兩圖之控制組為沒有架接任何抗體，但有包埋小紅莓的載體。流式細胞儀的光激發波段為 480 nm，放光偵測波段為 580 nm。

[0076] 第 7A 圖顯示，當架接乳癌抗體之載體的添加量越多時，就有越多的細胞帶有越強的螢光，顯示架接有乳癌抗體 Trastuzumab 之載體對於 SKBR3 細胞株有明顯的標靶作用。但是，第 7B 圖顯示，不論架接 IgG 的載體的添加量為多少，帶有不同螢光強度的細胞數目皆差不多，顯示架接 IgG 的載體對於 SKBR3 細胞株沒有任何的標靶作用。

[0077] 為了更加確定這個結果，讓架接乳癌抗體

Trastuzumab 且包埋小紅莓的載體與架接 IgG 且包埋小紅莓的載體與 SKBR3 細胞共培養 30 分鐘後，以染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole; DAPI) 將細胞核染色，在共軛聚焦顯微鏡下觀察具有螢光特性之小紅莓與細胞的位置分佈圖。此外，還加入單純的 SKBR3 細胞以及未被包埋的小紅莓，也以共軛聚焦顯微鏡來進行觀察。所得的結果顯示在第 8 圖上。

[0078] 在第 8 圖中，每欄上方所標示之「細胞」、「Dox」、「IgG-Dox」與「T-Dox」分別代表 SKBR3 細胞、未被包埋的小紅莓、架接 IgG 且包埋小紅莓的載體、架接乳癌抗體 Trastuzumab 且包埋小紅莓的載體等樣品。第一列與第二列右方標示之「細胞核」與「Dox」分別代表細胞核與小紅莓所在位置的影像圖，而第三列之「影像重疊」則代表將第一列與第二列的影像重疊後所得的影像圖。

[0079] 第 8 圖的結果顯示，對 SKBR3 細胞具有專一性標定功用的乳癌抗體 Trastuzumab 載體，其細胞核與小紅莓的影像有多個重疊處，顯示架接乳癌抗體 Trastuzumab 載體可以清楚地辨識出 SKBR3 細胞。但是，其他樣品幾乎只有細胞核的影像，而沒有小紅莓的影像與其重疊。這表示，其他樣品幾乎都沒有附著在 SKBR3 細胞表面，也就是無法辨識出 SKBR3 細胞。

**實施例十：架接乳癌抗體之雙乳化核殼奈米結構(載體)對
HER2 過度表現細胞的毒殺效果**

[0080] 在此實施例中，將探討包覆藥物之架接乳癌抗體的載體對於 HER2 過度表現細胞的毒殺效果。在此所用之載體之殼層為分子量 16k 之 PVA 與 TPMAA 之混合物，其中 TPMAA 的含量為 1 wt%。

[0081] 因此，將上述載體分別以未經任何處理(控制組)、包覆紫杉醇(PTX)、包覆小紅莓(Dox)、架接乳癌抗體 Trastuzumab (T)、包覆紫杉醇後架接乳癌抗體 Trastuzumab (T-PTX)、包覆雙重藥物(PTX-Dox)以及包覆雙重藥物後架接乳癌抗體 Trastuzumab (T-PTX-Dox)各種不同方式處理後，加入至細胞培養液中，再加入至培養皿中，與培養皿內的 SKBR3 細胞株在 37°C 下，共培養 24 小時。接著，以 MTT 法檢測，以確定細胞毒殺效果。所得結果顯示在第 9 圖以及下面的表四中。

表四：各樣品對 SKBR3 細胞毒殺的效果。

載體的處理條件	細胞存活率(%)	架接乳癌抗體後細胞存活率的下降率
未包藥且未架接抗體 (控制組)	100.99 ± 1.01	75.36%
架接乳癌抗體(T)	75.36 ± 3.86	
包覆紫杉醇(PTX)	56.40 ± 4.40	47.73%

包覆紫杉醇後架接乳癌抗體 (T-PTX)	26.92 ± 3.50	
包覆小紅莓 (Dox)	34.80 ± 4.33	83.93%
包覆小紅莓後架接乳癌抗體 (T-Dox)	29.21 ± 3.34	
包覆小紅莓與紫杉醇 (PTX-Dox)	23.60 ± 3.25	59.11%
包覆小紅莓與紫杉醇後架接乳癌抗體 (T-PTX-DOX)	13.95 ± 2.89	

[0082] 由上述結果可知，控制組的載體對於細胞的存活率沒有太大的影響，代表其安全性足夠。但是，架接抗體後，存活率下降至 75% 左右。比較包覆小紅莓之架接乳癌抗體前後之兩者數據，其存活率亦從 35% 左右下降至 29% 左右，顯示架接抗體後，存活率下降至未接抗體前之 82%。比較包覆紫杉醇之架接乳癌抗體前後之兩者數據，其存活率亦從 56% 左右下降至 27% 左右，顯示架接抗體後，存活率下降至未接抗體前之 47.7%。再比較同時包覆小紅莓與紫杉醇之架接抗體前後的數據，可知架接抗體後之存活率為架接抗體前之存活率之 59.1%。由這些比較可知，不論是何種形式的載體，在架接乳癌抗體 Trastuzumab 後，對於 HER2 過度表現之 SKBR3 細胞的毒殺效果，都有增強作用之功效。

實施例十：架接乳癌抗體之雙乳化核殼奈米結構(載體)之動物實驗

[0083] 在此實施例中，使用患有腫瘤之裸鼠來進行架接乳癌抗體之載體的動物實驗。在此所用載體之殼層為分子量 16k 之 PVA 與 TPMAA 之混合物，其中 TPMAA 的添加量為 1 wt%，且殼層表面架接有生物染劑 Cyanine 5.5 (縮寫為 Cy5.5)。

[0084] 首先，先觀測載體在生物體內的分佈情形。在實驗過程中，以非侵入式活體影像系統(non invasion in vivo imaging system; IVIS)的探測器來觀測載體在裸鼠體內的分佈狀況。為了觀察外加磁場對帶有 IO-OA 奈米微粒之載體分布的影響，裸鼠左側的腫瘤黏貼磁力為 3700 G 的磁鐵，右側腫瘤則沒有貼附任何磁鐵。注射載體後之第 1 天與第 3 天的觀測結果顯示在第 10A-10B 圖中。

[0085] 在第 10A 圖第 1 天的影像中，可以觀察到裸鼠左右兩側腫瘤 110a、120a 皆累積了大量的載體。但是到了第 3 天，由第 10B 圖的影像可知，裸鼠左側腫瘤 110b 之載體的累積量遠多於右側腫瘤 120b 之載體的累積量，約為兩倍左右。由此可看出外加磁場的確可以影響磁敏感載體在生物體內的分佈狀況。

[0086] 接著，以裸鼠之異位腫瘤模型來檢驗各種載體的治療效果。在實驗過程中，先分別在第 1、5、9、13 天

對患有腫瘤之裸鼠以靜脈注射方式注入各種欲測試之載體，進行治療。再以 IVIS 的探測器來觀測注射後之第 1-30 天的腫瘤尺寸。所得結果顯示在第 11 圖中。

[0087] 在第 11 圖中之各實驗組，靜脈注射的內容物分別有鹽水、沒有包埋藥物與架接抗體之載體（在圖中記做空載體）、包覆紫杉醇之載體 (PTX)、包覆小紅莓之載體 (Dox)、包覆紫杉醇後架接乳癌抗體之載體 (T-PTX)、包覆小紅莓與紫杉醇後架接乳癌抗體之載體且沒有外加磁場 (T-PTX-DOX No MT)、包覆小紅莓與紫杉醇後架接乳癌抗體之載體 (T-PTX-DOX)。在上述各組實驗中，裸鼠的腫瘤處皆貼附有 2000 G 的磁鐵，只有其中一組實驗 (T-PTX-Dox No MT) 之裸鼠在腫瘤處沒有貼附磁鐵。

[0088] 由第 11 圖的結果可知，在裸鼠的腫瘤處貼附磁鐵，且注射了包覆小紅莓與紫杉醇後架接乳癌抗體之載體 (T-PTX-DOX) 的實驗組，其治療效果最佳，到注射藥物後之第 30 天，腫瘤的尺寸才增長為原來的約 1.96 倍而已。但是，注射鹽水者的腫瘤，到了第 30 天，已經為原來的約 17.6 倍。

實施例十一：含 PVA/PVA-TPMAA 共聚物的混合物之架接抗體雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0089] 在此實施例中，利用第 2B 圖之雙乳化法製備含有 PVA/PVA-TPMAA 共聚物之混合物的雙乳化核殼奈米結構，藥物分子則以親水性之小紅莓 (Dox) 與疏水性紫杉醇

(PTX)為例，兩種皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA/PVA-TPMAA 共聚物的載體殼層表面架接上抗體。

[0090] 含有 PVA/PVA-TPMAA 共聚物之混合物的載體製備方法與實施例七的含有 PVA/TPMAA 混合物之載體的製備方法類似。唯一不同處為在要進行第二次乳化步驟時，將 PVA/TPMAA 水溶液替換成 2 wt% 之 PVA-TPMAA 共聚物的水溶液。最後讓所得架接乳癌抗體 Trastuzumab 之含 PVA/PVA-TPMAA 共聚物之混合物的載體分散於二次水中。

[0091] 首先，先探討 PVA-TPMAA 共聚物中 TPMAA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。所得結果如下面表五所示。由表五數據可知，當 TPMAA 的含量越多時，抗體架接率就越高，因為抗體的架接需要 TPMAA 的硫醇基。而且，由於抗體的架接率越高，使得載體的粒徑也越大。至於疏水性紫杉醇與親水性小紅莓的包覆率，則與 TPMAA 含量多少的關係不大，顯示藥物包覆率不太會受到抗體架接的影響，可能是在進行抗體架接反應之前，藥物就已經包埋在載體內之故。

表五：PVA-TPMAA 共聚物之 TPMAA 含量對抗體架接率、載體粒徑及藥物包覆率的影響

共聚物中 PVA/TPMAA 莫耳數比	抗體架 接率 (%)	粒徑 (nm)	紫杉醇包 覆率 (%)	小紅莓包 覆率 (%)

6:1	50.92	156.43	96.20	82.12
5:1	64.29	167.21	99.10	80.67
4:1	77.47	175.23	96.61	81.30
3:1	84.26	198.20	98.45	78.21

[0092] 再來，探討在製備載體過程中，有機溶劑氯仿的揮發溫度與揮發時間對載體粒徑以及藥物包覆率的影響。在此，PVA-TPMAA 共聚物之 PVA/TPMAA 的莫耳數比例為 6:1。所得結果列在下面的表六中。由表六的數據可知，在 55°C 以下，有機溶劑氯仿的揮發溫度與揮發時間對載體粒徑以及藥物包覆率的影響並不明顯。

表六：有機溶劑氯仿的揮發溫度與揮發時間對載體粒徑以及藥物包覆率的影響。

揮發溫度 (°C)	揮發時間 (hr)	粒徑 (nm)	紫杉醇包覆率 (%)	小紅莓包覆率 (%)
25°C	4	164.3	95.50	79.32
	5	162.6	94.64	77.34
35°C	3	159.7	97.12	82.43
	4	158.1	96.67	81.30
	5	159.3	96.10	80.33
45°C	2.5	159.1	98.20	81.70
	3	157.5	98.00	81.46
	4	158.6	96.56	81.23

	5	155.3	94.40	80.67
55°C	1	164.9	98.87	83.43
	2	157.2	98.30	82.23
	3	160.5	97.62	81.78
	4	154.7	97.20	81.21

[0093] 接著，探討製備載體過程中，乳化時間對於所得載體之粒徑以及藥物包覆率的影響。在此，PVA-TPMAA 共聚物之 PVA/TPMAA 的莫耳數比例為 6:1。所得結果列在下面的表七中。由表七的數據可知，第一次與第二次乳化時間的長短對載體粒徑以及藥物包覆率的影響並不明顯。

表七：乳化時間對於所得載體之粒徑以及藥物包覆率的影響。

乳化時間(s)		粒徑大小(nm)	紫杉醇 包覆率(%)	小紅莓 包覆率(%)
第一次	第二次			
15	35	161.1	93.12	77.65
	45	158.5	95.14	78.54
	55	162.1	96.50	78.91
20	35	157.8	94.34	79.76
	45	158.1	96.05	80.45
	55	162.4	96.43	80.73

[0094] 再來，探討 PVA 分子量以及 PVA-TPMAA 共聚物中 TPMAA 含量對雙乳化法所得產物外型的影響。所得結果列在下面的表八中。由表八的數據可知，當 PVA 分子量由 25,000 增加至 61,000 時，隨著 PVA-TPMAA 共聚物中 TPMAA 的含量增加，具有核殼結構之載體粒徑也跟著增加。其中，使用分子量 47,000 之 PVA 來進行製備所得之產物，還約有半數具有核殼結構。到了使用分子量 61,000 之 PVA 來進行製備時，只剩下少數產物具有核殼結構。到了使用分子量 78,000 的 PVA 來進行合成時，就沒有觀察到任何具有核殼結構的產物了。顯示當 PVA 的分子量太大時，將不利於具有核殼結構的產物生成。

表八：PVA 分子量以及 PVA-TPMAA 共聚物中 TPMAA 的含量對雙乳化法所得產物外型的影響。

PVA 分子量	TPMAA 含量(mol%)	是否具核殼結構	粒徑大小 (nm)
25k	10	有	135.6
	20	有	143.4
	30	有	154.6
31k	10	有	131.6
	20	有	136.8
	30	有	142.3
47k	10	約半數	141.5
	20	約半數	145.3

	30	約半數	149.8
61k	10	少數	124.3
	20	少數	129.1
	30	少數	133.2
78k	10	無	116.5
	20	無	125.6
	30	無	134.4

實施例十二：含 PVA/TPVA 混合物之架接抗體的雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0095] 在此實施例中，利用第 2B 圖之雙乳化法製備含有 PVA/TPVA 之混合物的雙乳化核殼奈米結構，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)為例，兩種皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA/TPVA 混合物的載體殼層表面架接上抗體。

[0096] 含有 PVA/TPVA 混合物之載體製備方法與實施例七的含有 PVA/TPMAA 混合物之載體的製備方法類似。唯一不同處為在要進行第二次乳化步驟時，將 PVA/TPMAA 水溶液替換成 2 wt%之 TPVA 的水溶液。最後讓所得架接乳癌抗體 Trastuzumab 之含 PVA/TPVA 混合物的載體分散於二次水中。

[0097] 首先，先探討 TPVA 含量對所得載體之抗體架

接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。所得結果如下面表九所示。由表九數據可知，當 TPVA 的含量越多時，抗體架接率就越高，因為抗體的架接需要 TPVA 的硫醇基。而且，由於抗體的架接率越高，使得載體的粒徑也越大。至於疏水性紫杉醇與親水性小紅莓的包覆率，則與 TPVA 含量多少的關係不大，顯示藥物包覆率不太會受到抗體架接的影響，可能是在進行抗體架接反應之前，藥物就已經包埋在載體內之故。

表九：TPVA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。

TPVA 含量(mol%)	抗體架接率(%)	粒徑(nm)	紫杉醇包覆率(%)	小紅莓包覆率(%)
10	11.85	135.3	94.11	79.32
20	23.50	147.5	92.31	77.31
30	40.65	165.3	92.81	78.35
35	54.53	173.4	95.25	79.89

[0098] 接著，探討製備載體過程中，乳化時間對於所得載體之粒徑以及藥物包覆率的影響。在此，TPVA 的含量為 30 mol%，在此所用之 PVA 的分子量為 16,000。所得結果列在下面的表十中。由表十的數據可知，第一次與第二次乳化時間的長短對載體粒徑以及藥物包覆率的影響並不明顯。

表十：乳化時間對於所得載體之粒徑以及藥物包覆率的影響。

乳化時間(s)		粒徑 (nm)	紫杉醇包覆 率 (%)	小紅莓包覆 率 (%)
第一次	第二次			
15	35	131.4	92.1	77.2
	45	137.6	95.1	79.2
	55	134.1	92.6	78.4
20	35	133.4	90.5	80.3
	45	131.1	92.7	75.9
	55	136.6	93.1	78.3

[0099] 再來，探討 PVA 分子量以及 TPVA 含量對雙乳法所得產物外型的影響。所得結果列在下面的表十一中。由表十一的數據可知，當 PVA 分子量由 25,000 增加至 61,000 時，隨著 TPVA 含量增加，具有核殼結構之載體粒徑也跟著增加。其中，使用分子量 47,000 之 PVA 來進行製備所得之產物，還約有半數具有核殼結構。到了使用分子量 61,000 之 PVA 來進行製備時，只剩下少數產物具有核殼結構，而且還摻雜粒徑較小之實心球體的產物。到了使用分子量 78,000 的 PVA 來進行合成時，就沒有觀察到任何具有核殼結構的產物了。顯示當 PVA 的分子量太大時，將不利於具有核殼結構的產物生成。

表十一：PVA 分子量以及 TPVA 含量對雙乳化法所得產物外型的影響。

PVA 分子量	改質比例	是否具核殼結構	粒徑 (nm)
25k	10	有	126.4
	20	有	131.5
	30	有	137.6
31k	10	有	121.6
	20	有	135.8
	30	有	138.3
47k	10	有	137.5
	20	有	146.3
	30	有	151.8
61k	10	少數	108.4(實心)/ 141.6(核殼)
	20	少數	112.5(實心)/ 148.1(核殼)
	30	少數	119.4(實心)/ 153.4(核殼)
78k	10	無	116.5
	20	無	125.6
	30	無	134.4

實施例十三：含 PVA/PAA 混合物之架接抗體的雙乳化核殼

奈米結構(載體)

[0100] 在此實施例中，利用第 2B 圖之雙乳化法製備含有 PVA/PAA 混合物的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)為例，兩種皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA/PAA 混合物的載體殼層表面架接上抗體。

[0101] 含有 PVA/PAA 混合物之載體製備方法與實施例七的含有 PVA/TPMAA 混合物之載體的製備方法類似。第一個不同處為在要進行第二次乳化步驟時，將 PVA/TPMAA 混合物的水溶液替換成 PVA/PAA 混合物的水溶液。在 PVA/PAA 混合物的水溶液中，PVA 的濃度為 20 mg/mL，而 PAA 的濃度為 2 mg/mL。第二個不同處為乳癌抗體 Trastuzumab 所使用之耦合劑從 SMCC 替換成 EDC/sulfo-NHS，以連接 PAA 的羧基與乳癌抗體 Trastuzumab 上的 -NH₂ 基。在此所用之 PVA 的分子量為 16,000。

[0102] 在讓乳癌抗體 Trastuzumab 與耦合劑反應過程中，先配製 0.1 M 之 MES 緩衝液，其含有 0.1 M 的 MES 與 0.5 M 的 NaCl，pH 值為 6.0。然後在 3 mL 之 MES 緩衝液中，依序添加載體、50 μg 之 EDC 和 60 μg 之 Sulfo-NHS，於室溫下混合攪拌讓其反應 15 分鐘。接著，加入 1 μL 的 2-巰基乙醇(2-mercaptoethanol)至上述之 MES 緩衝液中，中止 EDC 的活化反應。然後，再加入高濃度的 PBS，將前述

MES 緩衝液的酸鹼值調整至大於 7 後，加入 500 μg 之乳癌抗體 Trastuzumab。在室溫下反應兩小時，完成架接反應，讓乳癌抗體 Trastuzumab 架接至載體上。

[0103] 讓所得之架接有乳癌抗體 Trastuzumab 的載體，加入二次水，再以 7000 rpm 離心後，移除未反應的試劑。重複上述步驟數次後，讓所得之架接有乳癌抗體 Trastuzumab 的載體再分散於溶劑中，例如食鹽水。

[0104] 第 12 圖為含有 PVA/PAA 混合物並以 EDC/Sulfo-NHS 架接乳癌抗體 Trastuzumab 後之載體結構之外觀 SEM 影像。從第 12 圖可知，架接了乳癌抗體 Trastuzumab 的載體外型會由一般常見的球體轉變為不規則的形狀，推測其因是抗體鍵結於載體的表面，使得載體不再是球體形狀。但是，仍可藉由其邊界之黑白對比看出其仍具有中空的結構。而且所得架接乳癌抗體之含有 PVA/PAA 混合物載體可均勻地分散在溶液中而沒有沉澱。因此，架接乳癌抗體之含有 PVA/PAA 混合物載體基本上與實驗例七架接乳癌抗體之含 PVA/TPMAA 混合物載體類似。

實施例十四：含 PVA/PMAA 混合物之架接抗體的雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0105] 在此實施例中，利用第 2B 圖之雙乳化法製備含有 PVA/PMAA 之混合物的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)

爲例，兩種皆爲常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA/PMAA 混合物的載體表面架接上抗體。

[0106] 含有 PVA/PMAA 混合物之載體製備方法與實施例十三的含有 PVA/PAA 混合物之載體的製備方法類似。唯一不同處爲在要進行第二次乳化步驟時，將 PVA/PAA 混合物的水溶液替換成 PVA/PMAA 混合物的水溶液。在此所用之 PVA 的分子量爲 16,000。

[0107] 所得架接乳癌抗體之含有 PVA/PMAA 混合物載體，在 SEM 下外型也是由球體轉變成不規則形狀，但是仍然保有中空結構。此外，架接乳癌抗體之含有 PVA/PMAA 混合物載體也可均勻地分散在溶液中而沒有沉澱。因此，架接乳癌抗體之含有 PVA/PMAA 混合物載體與實驗例七架接乳癌抗體之含 PVA/TPMAA 混合物載體類似。

實施例十五：含 PVA/CMPVA 混合物之架接抗體的雙乳核殼奈米結構(載體)

[0108] 在此實施例中，利用第 2B 圖之雙乳化法製備含有 PVA/CMPVA 之混合物的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)爲例，兩種皆爲常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA/CMPVA 混合物的載體表面架接上抗體。

[0109] 含有 PVA/CMPVA 混合物之載體製備方法與實施例十三的含有 PVA/PAA 混合物之載體的製備方法類似。

唯一不同處為在要進行第二次乳化步驟時，將 PVA/PAA 混合物的水溶液替換成 PVA/CMPVA 混合物的水溶液。在此所用之 PVA 的分子量為 16,000。

[0110] 首先，先探討 CMPVA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。所得結果如下面表十二所示。由表十二數據可知，當 CMPVA 的含量越多時，抗體架接率就越高，因為抗體的架接需要 CMPVA 的羧基。而且，由於抗體的架接率越高，使得載體的粒徑也越大。

[0111] 至於疏水性紫杉醇與親水性小紅莓的包覆率，則與 CMPVA 含量多少的關係不大，顯示藥物包覆率不太會受到抗體架接的影響，可能是在進行抗體架接反應之前，藥物就已經包埋在載體內之故。但是，與含 PVA/TPVA 混合物的載體相比(請同時參考表八與表十二)，由於 CMPVA 之羧基易解離出質子而帶有負電荷，因此使得帶正電荷之小紅莓包覆率提升了 5-10%。

表十二：CMPVA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。

CMPVA 含量(mol%)	抗體架接率(%)	粒徑 (nm)	紫杉醇 包覆率(%)	小紅莓 包覆率(%)
10	17.82	143.6	96.31	84.34
20	29.10	149.1	97.10	83.65
30	43.25	166.5	95.71	87.65

40	61.32	169.6	96.75	88.53
50	85.64	178.7	95.67	89.46

[0112] 接著，探討製備載體過程中，乳化時間對於所得載體之粒徑以及藥物包覆率的影響。在此，TPVA 的含量為 30 mol%，在此所用之 PVA 的分子量為 16,000，CMPVA 含量為 50 mol%。所得結果列在下面的表十三中。由表十三的數據可知，第一次與第二次乳化時間的長短對載體粒徑以及藥物包覆率的影響並不明顯。

表十三：乳化時間對於所得載體之粒徑以及藥物包覆率的影響。

乳化時間(s)		粒徑大小 (nm)	紫杉醇包覆 率 (%)	小紅莓包覆 率 (%)
第一次	第二次			
15	35	153.4	95.21	79.32
	45	148.2	96.70	77.31
	55	156.2	96.10	78.35
20	35	154.3	97.25	79.89
	45	156.3	94.67	79.32
	55	149.4	95.31	77.31

[0113] 再來，探討 PVA 分子量以及 CMPVA 含量對雙乳化法所得產物外型的影響。所得結果列在下面的表十四中。由表十四的數據可知，當 PVA 分子量由 25,000 增加至

61,000 時，隨著 CMPVA 含量增加，具有核殼結構之載體粒徑也跟著增加。其中，使用分子量 61,000 之 PVA 來進行製備時，只剩下少數產物具有核殼結構。到了使用分子量 78,000 的 PVA 來進行合成時，就沒有觀察到任何具有核殼結構的產物了。顯示當 PVA 的分子量太大時，將不利於具有核殼結構的產物生成。

表十四：PVA 分子量以及 CMPVA 含量對雙乳化法所得產物外型的影響。

PVA 分子量	CMPVA 含量 (mol%)	是否具核殼結構	粒徑 (nm)
25k	10	有	124.6
	30	有	131.4
	50	有	133.6
31k	10	有	121.5
	30	有	127.6
	50	有	131.5
47k	10	有	134.5
	30	有	139.5
	50	有	142.4
61k	10	少數	116.5
	30	少數	127.1
	50	少數	133.2
78k	10	無	91.5

	30	無	96.7
	50	無	109.3

實施例十六：含 PVA-TPMAA 共聚物之架接抗體的雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0114] 在此實施例中，以第 2A 圖之單乳化法製備含有 PVA-TPMAA 共聚物的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)為例，兩種皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 PVA-TPMAA 共聚物的載體架接上抗體。

[0115] 先分別配製 PVA-TPMAA 共聚物/Dox 水溶液與 IO-OA 奈米粒子/PTX 的 CHCl₃ 有機溶液。在 PVA-TPMAA 共聚物/Dox 水溶液中，PVA-TPMAA 共聚物的濃度為 20 mg/mL，Dox 的濃度為 8 mg/mL。在 IO-OA 奈米粒子/PTX 的 CHCl₃ 有機溶液中，IO-OA 奈米粒子的濃度為 20 mg/mL，PTX 的濃度為 30 mg/mL。

[0116] 取 2.5 mL 之 PVA-TPMAA 共聚物/Dox 水溶液與 1 mL 之 IO-OA 奈米微粒/PTX 的 CHCl₃ 有機溶液，讓兩者混合。利用 20 kHz 超音波震盪器讓混合液乳化，而後置於開放空間中，等待 CHCl₃ 揮發完全。CHCl₃ 揮發時的溫度高低會影響載體的形貌。再讓含 PVA-TPMAA 共聚物之載體於離心後重新分散於 3 mL 的 PBS 緩衝液(含 0.1M 磷酸鈉與 0.15M 的 NaCl)中。

[0117] 接著，以實施例七中之架接乳癌抗體的方法，讓抗乳癌體 Trastuzumab 架接至含 PVA-TPMAA 共聚物之載體的表面上。

[0118] 接著，探討在含 PVA-TPMAA 共聚物之載體中，TPMAA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響，所得結果如下面表十五所示。由表十五的數據可知，當共聚物中 TPMAA 的含量越多時，抗體架接率會因為架接所需硫醇基之增加而跟著增加。另外，載體的粒徑也因為分子量較大的 TPMAA 之量的提升和抗體的架接率越高，使得載體的粒徑也越大。至於疏水性紫杉醇與親水性小紅莓的包覆率，則與 TPMAA 含量多少的關係不大，顯示藥物包覆率不太會受到抗體架接的影響。這可能是在進行抗體架接反應之前，藥物就已經包埋在載體內之故。

表十五：PVA-TPMAA 共聚物之 TPMAA 含量對抗體架接率、載體粒徑及藥物包覆率的影響

共聚物中 PVA/TPMAA 莫耳數比	抗體架 接率(%)	粒徑 (nm)	紫杉醇包 覆率(%)	小紅莓包 覆率(%)
6:1	22.41	142.3	97.0	84.7
5:1	39.30	151.6	98.2	83.5
4:1	61.23	166.2	97.3	84.3
3:1	87.12	178.3	98.5	87.6

實施例十七：含 TPVA 之架接抗體的 雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0119] 在此實施例中，以第 2A 圖之單乳化法製備含有 TPVA 的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓(Doxorubicin; Dox)與疏水性紫杉醇(Paclitaxel; PTX)為例，兩種皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 TPVA 的載體殼層表面架接上抗體。

[0120] 架接抗體的含有 TPVA 載體的製備方法與實施例十六之含有 PVA-TPMAA 共聚物載體的方法類似，唯一不同處為 PVA-TPMAA 共聚物/Dox 水溶液換成 TPVA/Dox 水溶液。在 TPVA/Dox 水溶液中，TPVA 的濃度為 20 mg/mL，Dox 的濃度為 8 mg/mL。

[0121] 第 13A-13C 圖分別為分子量 25,000、47,000 與 78,000 之含有 TPVA 載體外觀的 SEM 影像。由第 13A-13C 圖可知，隨著分子量的提升，載體團聚的情況逐漸明顯。其可能因為 TPVA 分子量增加，使得載體的疏水性上升之故。尤其當分子量來到 78k 時，TPVA 分子量已經過高，因而無法形成空心的載體。

[0122] 接著，探討在含 TPVA 之載體中，TPVA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。以分子量 16,000 之 PVA 改質而得的為例，所得結果如下面表十六所示。由表十六的數據可知，當 PVA 的改質比

例越高時，抗體架接率會因為架接所需硫醇基之增加而跟著增加。另外，載體的粒徑也因為抗體的架接率越高，使得載體的粒徑也越大。至於疏水性紫杉醇與親水性小紅莓的包覆率，則與 TPVA 含量多少的關係不大，顯示藥物包覆率不太會受到抗體架接的影響。這可能是在進行抗體架接反應之前，藥物就已經包埋在載體內之故。

表十六：TPVA 含量對抗體架接率、載體粒徑及藥物包覆率的影響

PVA 的改質比例 (mol%)	抗體架接率 (%)	粒徑 (nm)	紫杉醇包覆率 (%)	小紅莓包覆率 (%)
10	8.54	121.3	95.65	74.58
20	13.55	133.4	98.25	76.80
30	29.97	141.6	94.60	78.80
35	50.88	155.3	98.50	77.41

實施例十八：含 CMPVA 之架接抗體的雙乳化核殼奈米結構(載體)

[0123] 在此實施例中，以第 2A 圖之單乳化法製備含有 CMPVA 的載體，藥物分子則以親水性之小紅莓 (Doxorubicin; Dox) 與疏水性紫杉醇 (Paclitaxel; PTX) 為例，兩種皆為常見的癌症化療藥物。然後再以第 2C 圖之方法，在含有 TPVA 的載體架接上抗體。

[0124] 前半段含有 TPVA 載體的製備方法與實施例十六之含有 PVA-TPMAA 共聚物載體的方法類似，唯一不同處為 PVA-TPMAA 共聚物/Dox 水溶液換成 CMPVA/Dox 水溶液。在 CMPVA/Dox 水溶液中，CMPVA 的濃度為 20 mg/mL，Dox 的濃度為 8 mg/mL。後半段架接抗體的部分，則與實施例十三之含有 PVA/PAA 混合物的載體類似，選擇 EDC/sulfo-NHS 為耦合劑，以連接 CMPVA 的羧基與乳癌抗體 Trastuzumab 上的 -NH₂ 基。

[0125] 接著，探討在含 CMPVA 之載體中，CMPVA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。以分子量 16,000 之 PVA 改質而得的為例，所得結果如下面表十七所示。由表十七的數據可知，當 PVA 的改質比例越高時，抗體架接率會因為架接所需羧基之增加而跟著增加。另外，載體的粒徑也因為抗體的架接率越高，使得載體的粒徑也越大。

[0126] 至於疏水性紫衫醇與親水性小紅莓的包覆率，則與 CMPVA 含量多少的關係不大，顯示藥物包覆率不太會受到抗體架接的影響。這可能是在進行抗體架接反應之前，藥物就已經包埋在載體內之故。但是，與實施例十五之架接抗體的含 PVA/CMPVA 混合物的載體相比，由於單乳化法只使用單一 CMPVA，因此在載體的內外表面上都會分佈有羧基。又，由於羧基容易解離出質子而帶負電，因此可增加水相核內的小紅莓包覆量，使小紅莓的包覆率提升了 1-5%。

表十七：CMPVA 含量對所得載體之抗體架接率、載體粒徑與藥物包覆率的影響。

PVA 的改質比例 (mol%)	抗體架接率 (%)	粒徑 (nm)	紫杉醇 包覆率 (%)	小紅莓 包覆率 (%)
10	14.50	133.5	94.58	87.41
20	26.12	141.2	96.40	86.73
30	38.40	149.5	93.25	89.43
40	55.68	156.3	94.87	91.44
50	71.58	164.8	96.55	93.20

[0127] 由上述可知，可以使用單乳化法直接讓架橋聚乙醇形成雙乳化核殼奈米結構，讓所得之雙乳化核殼奈米結構的殼層內外表面展現架橋基。也可以使用雙乳化法在原先的水溶性高分子中摻入架橋高分子，在所得之雙乳化核殼奈米結構的殼層外表面展現架橋基。再利用此架橋基與所需之抗體結合，則可讓抗體架接在雙乳化核殼奈米結構的殼層外表面。因此，包覆藥物與疏水性磁奈米粒子的雙乳化核殼奈米結構不但可以辨識特定細胞，進行標靶治療，而且還可以進一步利用外加磁場來增加治療標靶處之藥物累積量與其治療效果。

[0128] 雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，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。

【符號說明】

[0129]

100：雙乳化核殼奈米結構

110：油相殼

115：高分子

120：疏水性磁奈米粒子

125：水相核

130：架橋基

135：抗體

140：疏水性藥物

145：親水性藥物

202a、202b、212、222、230、235：步驟

205a、205b、210、215a、215b、220、225：步驟

240a、240b、245、250、255：步驟

申請專利範圍

1. 一種架接抗體之雙乳化核殼奈米結構，其包括：

一水相核；

一油相殼，其包圍該水相核，該油相殼的組成包含聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物或是聚乙烯醇與一架橋高分子的組合與複數個疏水性磁奈米粒子，但不包含界面活性劑，其中該架橋高分子為聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、羧甲基化聚乙烯醇、硫醇化聚乙烯醇、硫醇化聚甲基丙烯酸或聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物，且該聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物與該架橋高分子具有一架橋基；以及

至少一抗體，其藉由一耦合劑鍵結於該架橋基上。

2. 如請求項 1 所述之雙乳化核殼奈米結構，其中該架橋基包括羧基、硫醇基、醛基、胺基或羥基。

3. 如請求項 1 所述之雙乳化核殼奈米結構，其中該些疏水性磁奈米粒子為表面有疏水性官能基修飾之 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 CoFe_2O_4 或 MnFe_2O_4 微粒。

4. 如請求項 1 所述之雙乳化核殼奈米結構，其中該抗體包括乳癌抗體 Trastuzumab、大腸癌抗體 Cetuximab、表皮生長因子受體的抗體 Panitumumab 或抑制血管新生的抗

體 Bevacizumab。

5. 如請求項 1 所述之雙乳化核殼奈米結構，其中該油相殼包含一疏水性藥物。

6. 如請求項 1 所述之雙乳化核殼奈米結構，其中該水相核包含一親水性藥物。

7. 一種製備如請求項 1-4 任一項所述之雙乳化核殼奈米結構的方法，包括：

製備一水溶液，其包括聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物；

製備一有機溶液，其包括疏水性磁奈米粒子；

混合攪拌該水溶液與該有機溶液，以形成一乳液，並於該乳液中形成複數個雙乳化核殼奈米結構；

去除該有機溶液所用的有機溶劑，以得到該些雙乳化核殼奈米結構；

製備一第一分散液，其包括該些雙乳化核殼奈米結構；

製備一第二分散液，其包括與耦合劑相接的抗體；以及

混合攪拌該第一分散液與該第二分散液，讓該聚乙烯醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物之架橋基架接上與該耦合劑相接的該抗體。

8. 如請求項 7 所述之製備雙乳化核殼奈米結構的方法，其中於製備該水溶液時，包括加入一親水性藥物。

9. 如請求項 7 所述之製備雙乳化核殼奈米結構的方法，其中於製備該有機溶液時，包括加入一疏水性藥物。

10. 一種製備如請求項 1-4 任一項所述之雙乳化核殼奈米結構的方法，包括：

● 製備一第一水溶液，其包括聚乙炔醇；

製備一有機溶液，其包括疏水性磁奈米粒子；

混合攪拌該第一水溶液與該有機溶液，以形成一油包水乳液；

製備一第二水溶液，其包括架橋高分子，其中該架橋高分子為聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、羧甲基化聚乙炔醇、硫醇化聚乙炔醇、硫醇化聚甲基丙烯酸或聚乙炔醇-硫醇化聚甲基丙烯酸共聚物；

● 混合攪拌該油包水乳液與該第二水溶液，以形成一水包油乳液，並於該水包油乳液中形成複數個雙乳化核殼奈米結構；

去除該有機溶液所用的有機溶劑，以得到該些雙乳化核殼奈米結構；

製備一第一分散液，其包括該些雙乳化核殼奈米結構；

製備一第二分散液，其包括與耦合劑相接的抗體；以及

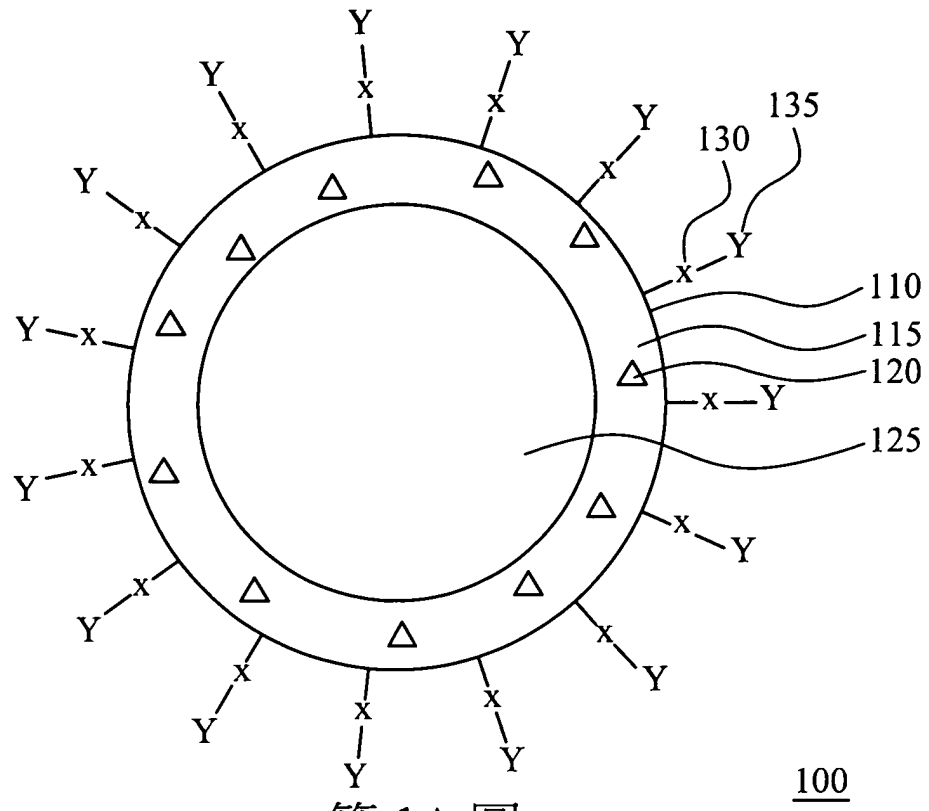


混合攪拌該第一分散液與該第二分散液，讓該架橋高分子之架橋基架接上與該耦合劑相接的該抗體。

11. 如請求項 10 所述之製備雙乳化核殼奈米結構的方法，其中於製備該第一水溶液時，包括加入一親水性藥物。

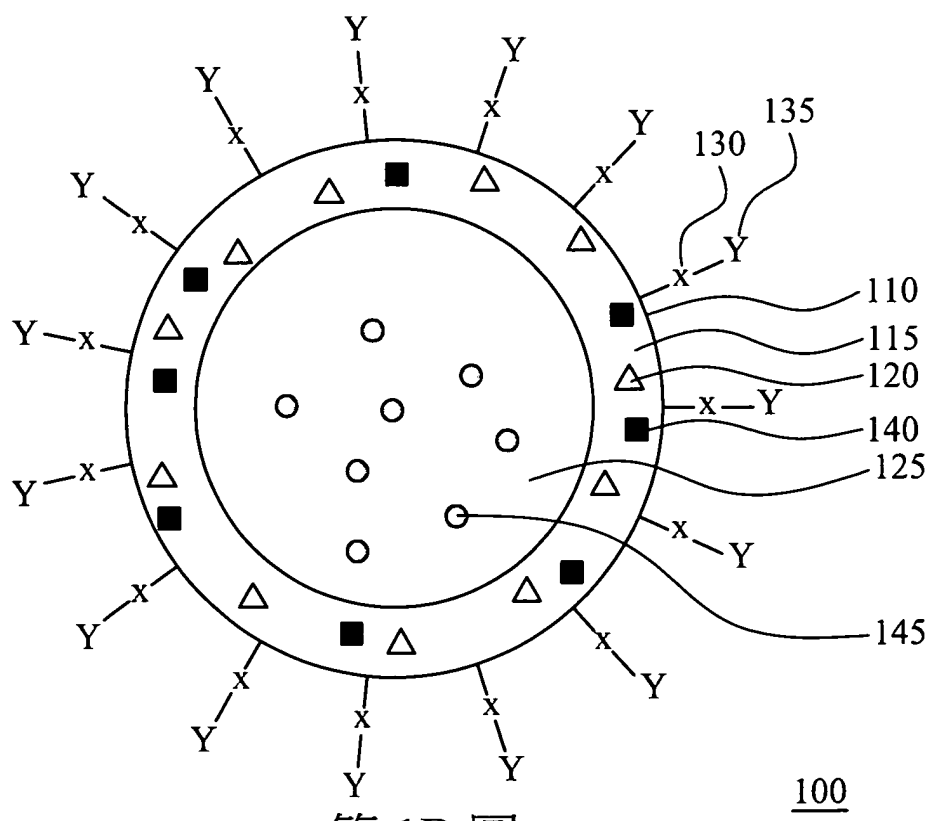
12. 如請求項 10 所述之製備雙乳化核殼奈米結構的方法，其中於製備該有機溶液時，包括加入一疏水性藥物。

圖式



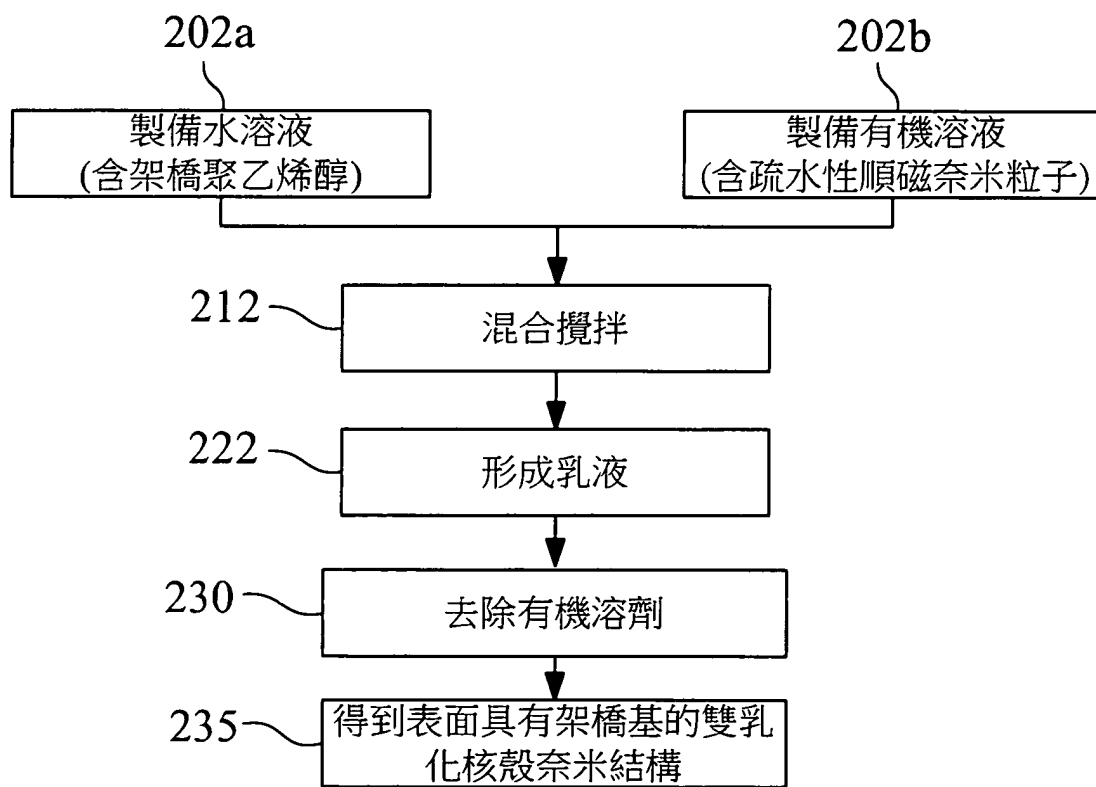
第 1A 圖

100

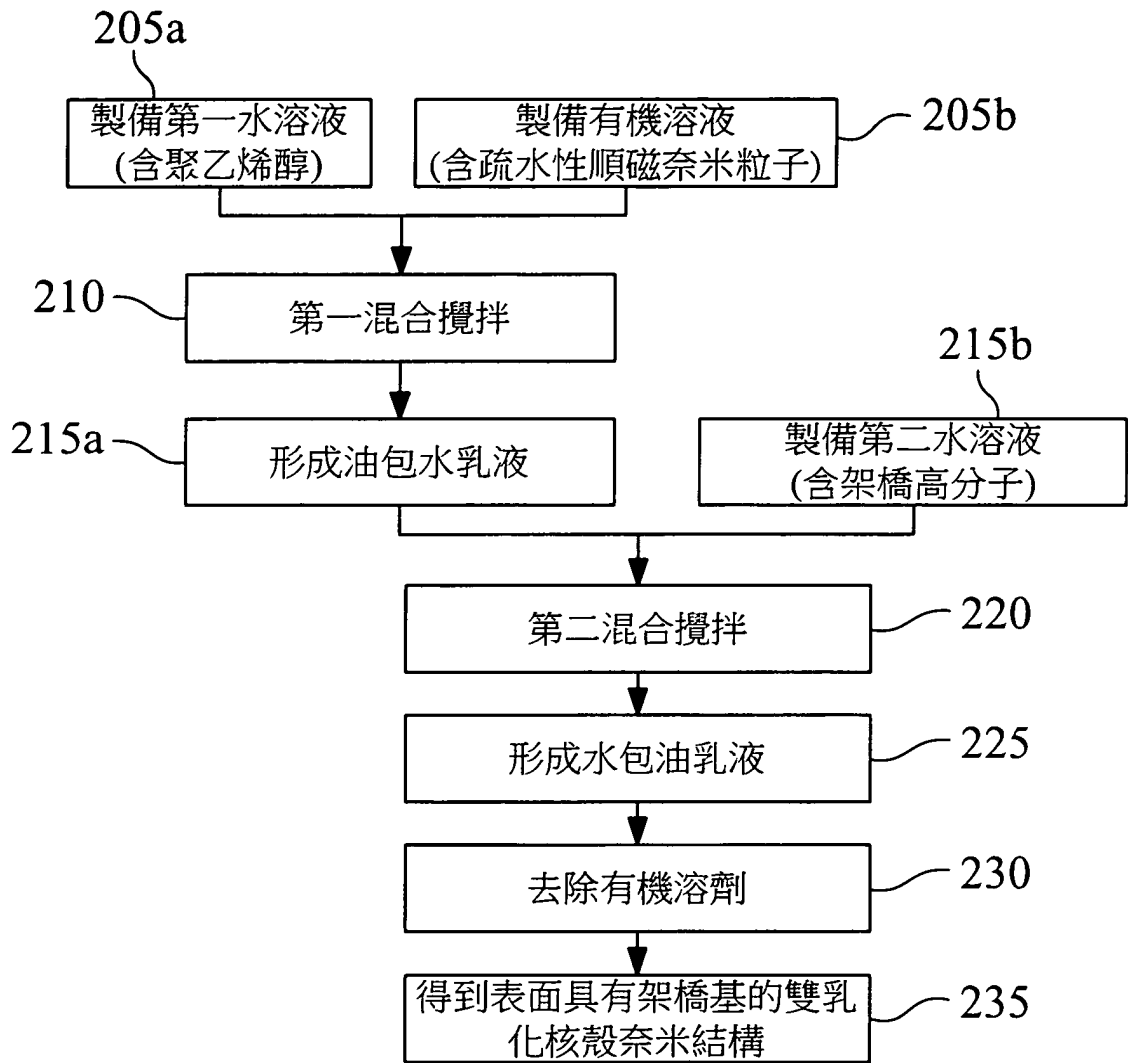


第 1B 圖

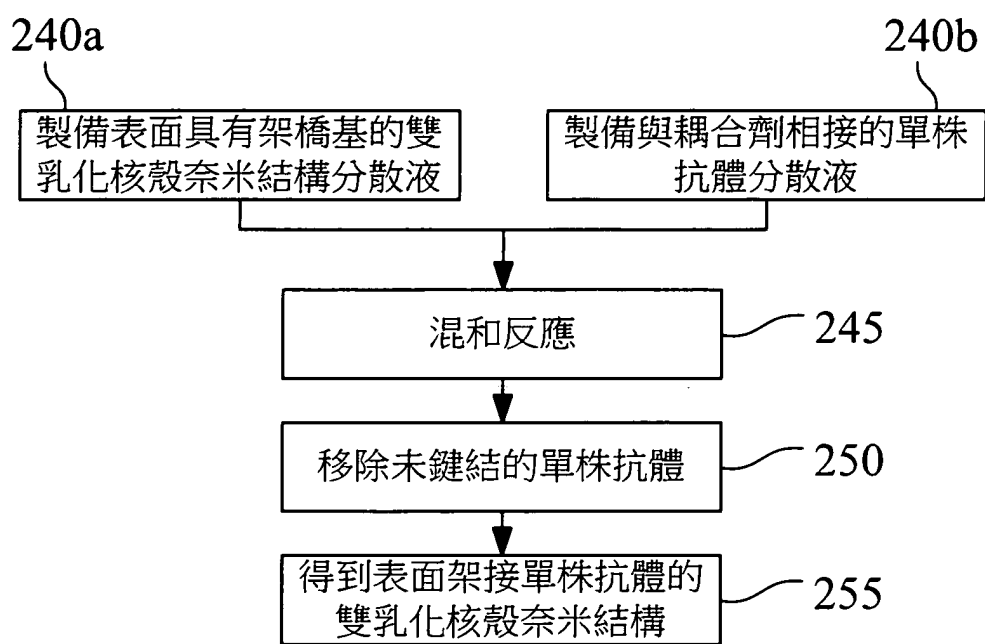
100



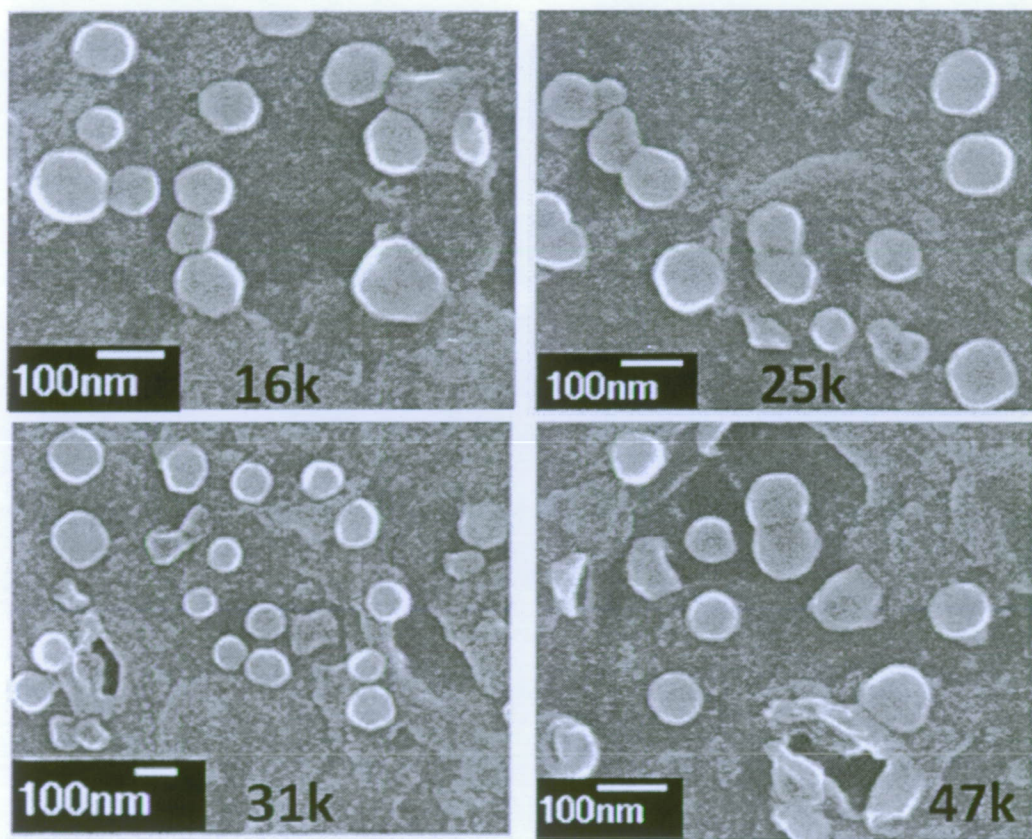
第 2A 圖



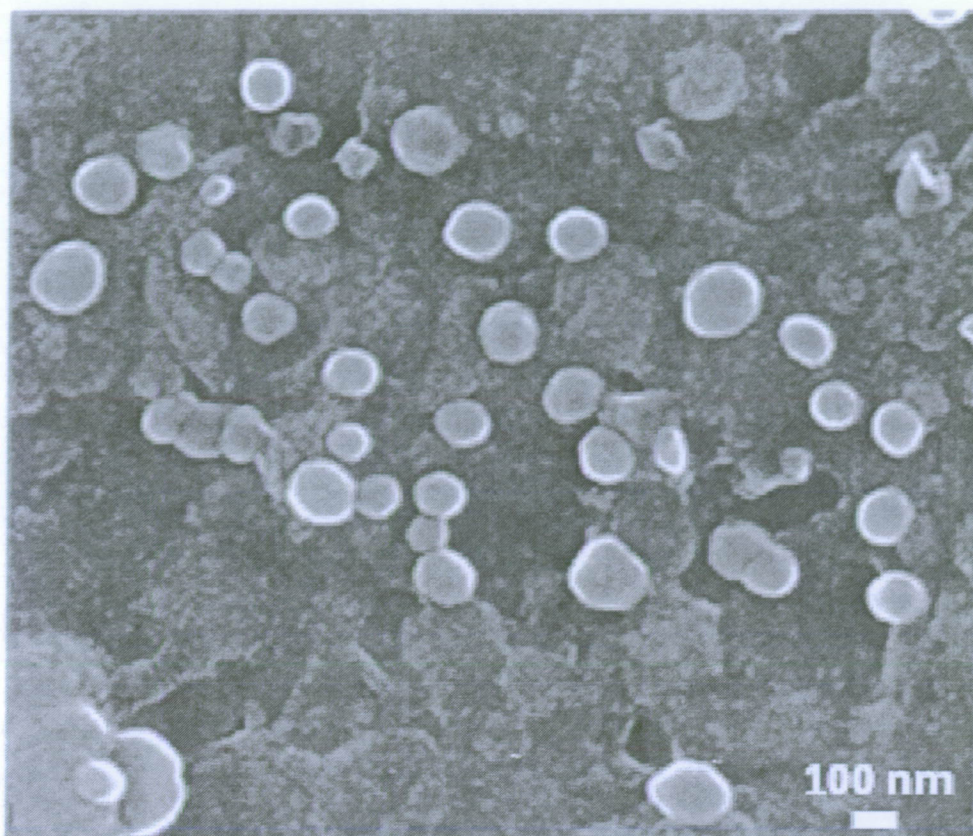
第 2B 圖



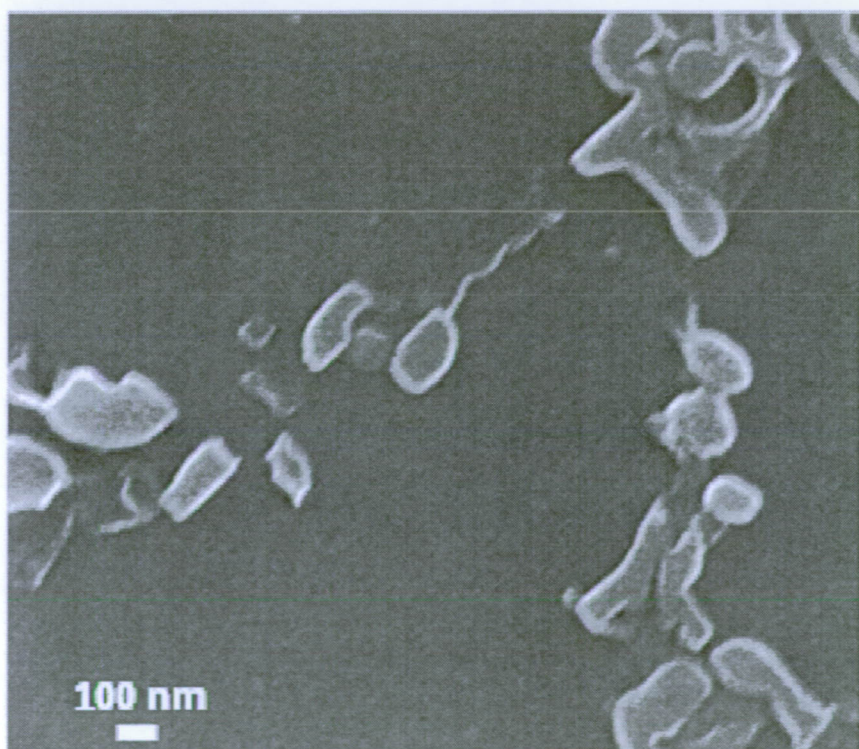
第 2C 圖



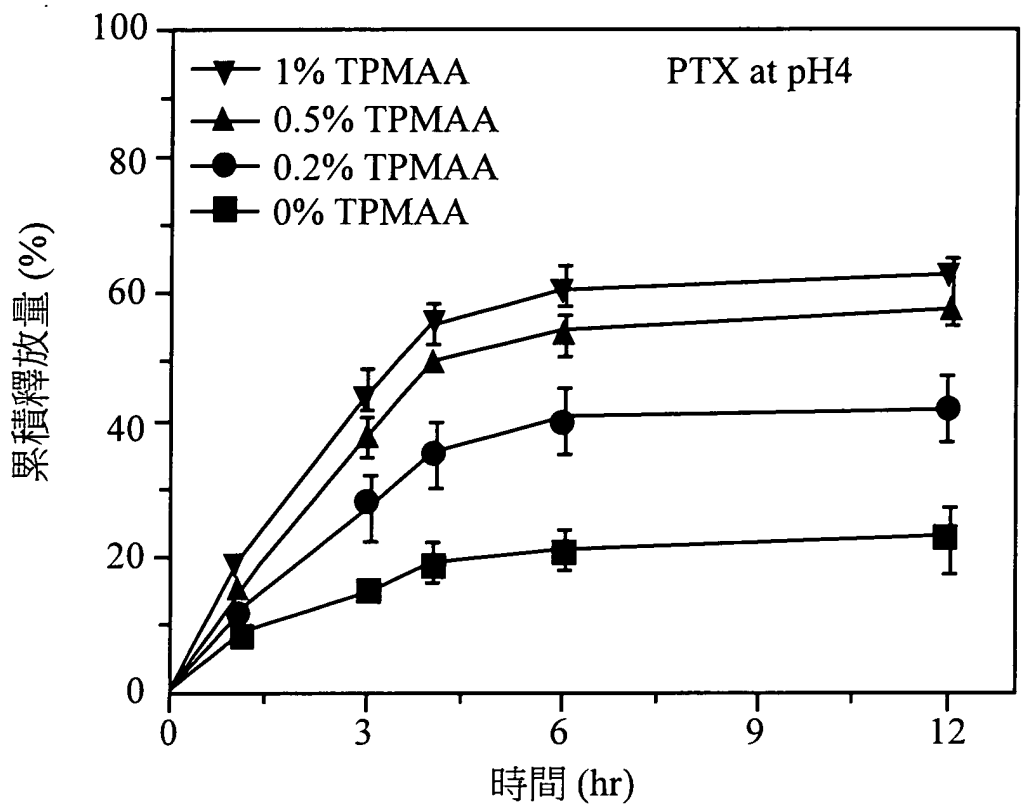
第3圖



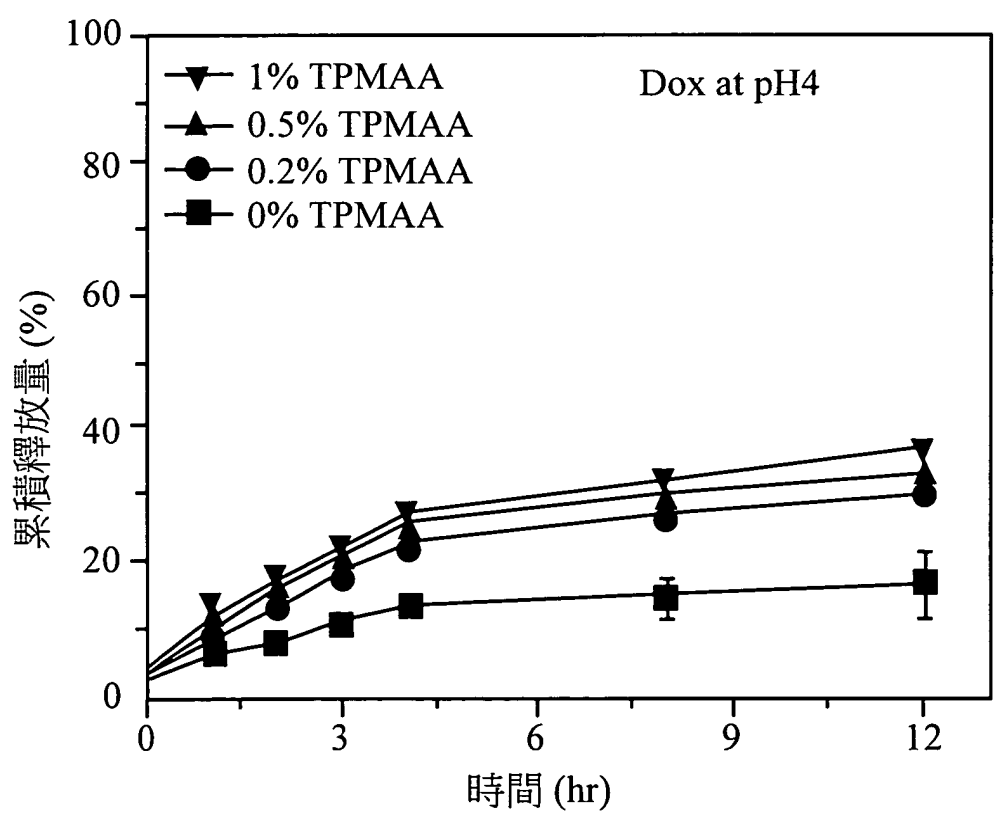
第4A圖



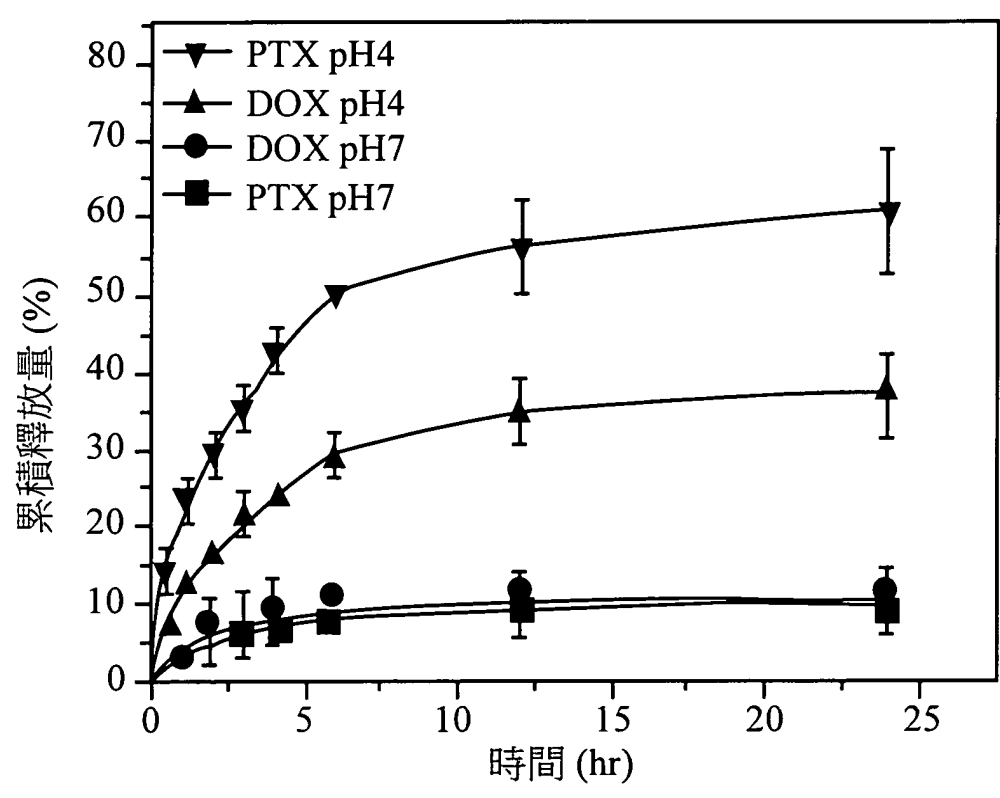
第4B圖



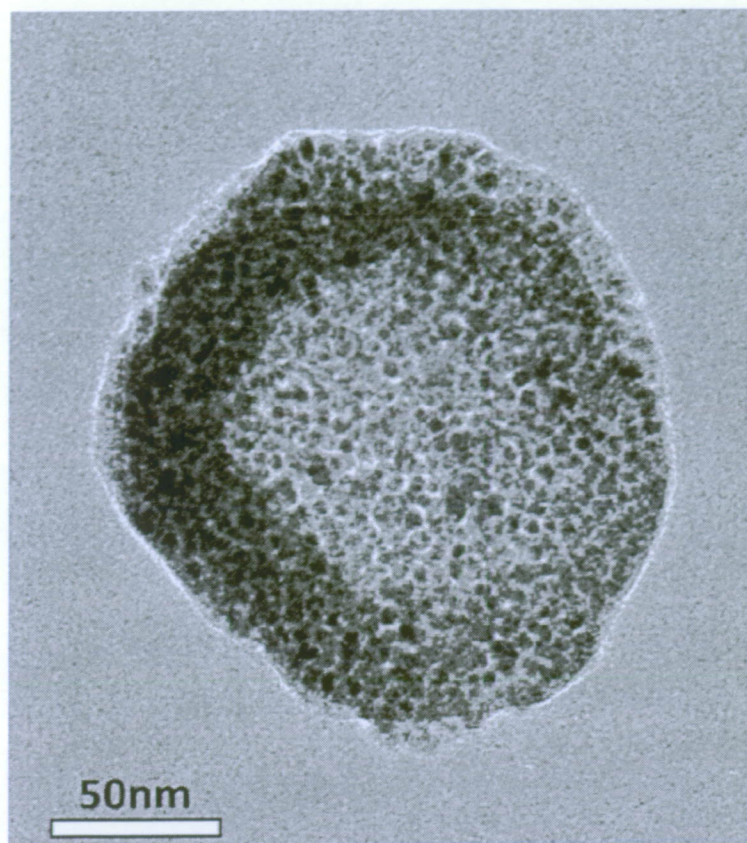
第 5A 圖



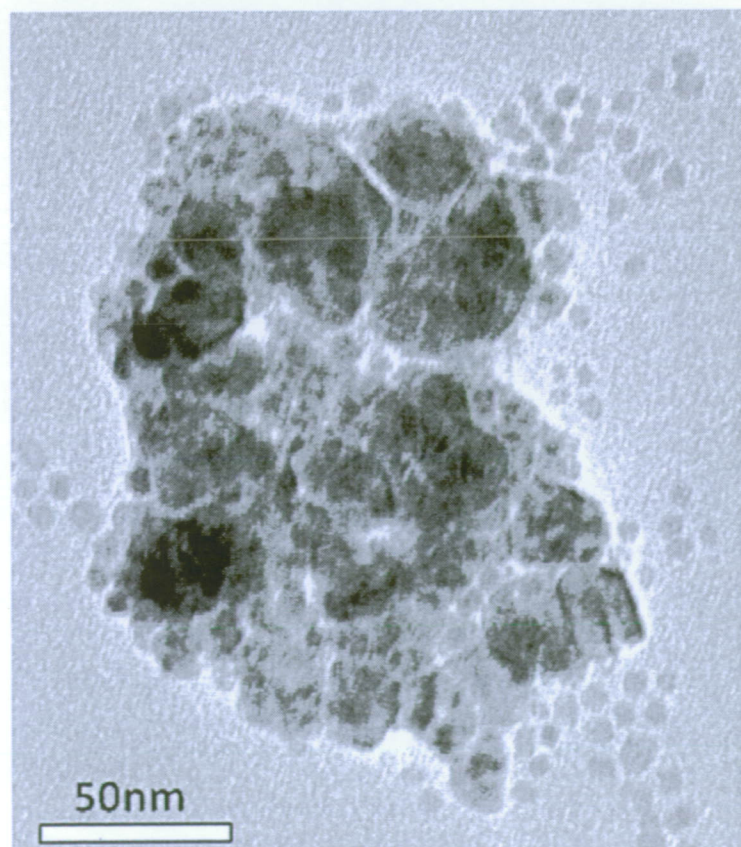
第 5B 圖



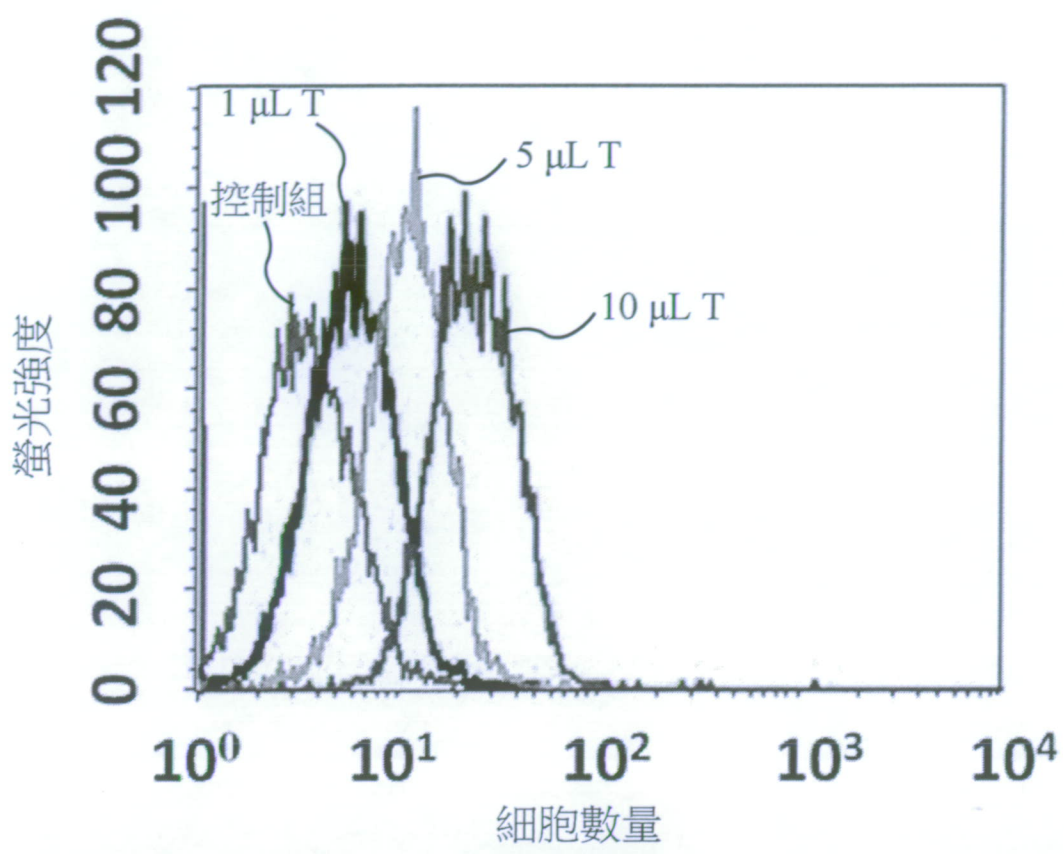
第 5C 圖



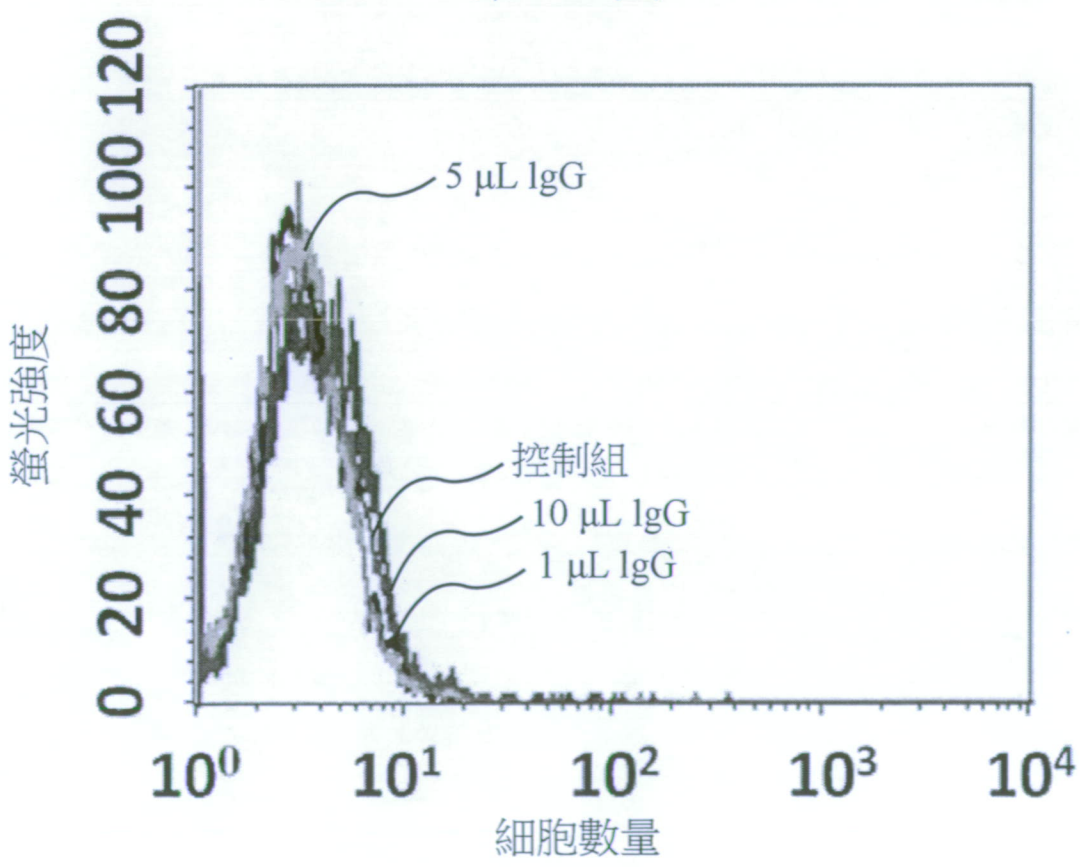
第 6A 圖



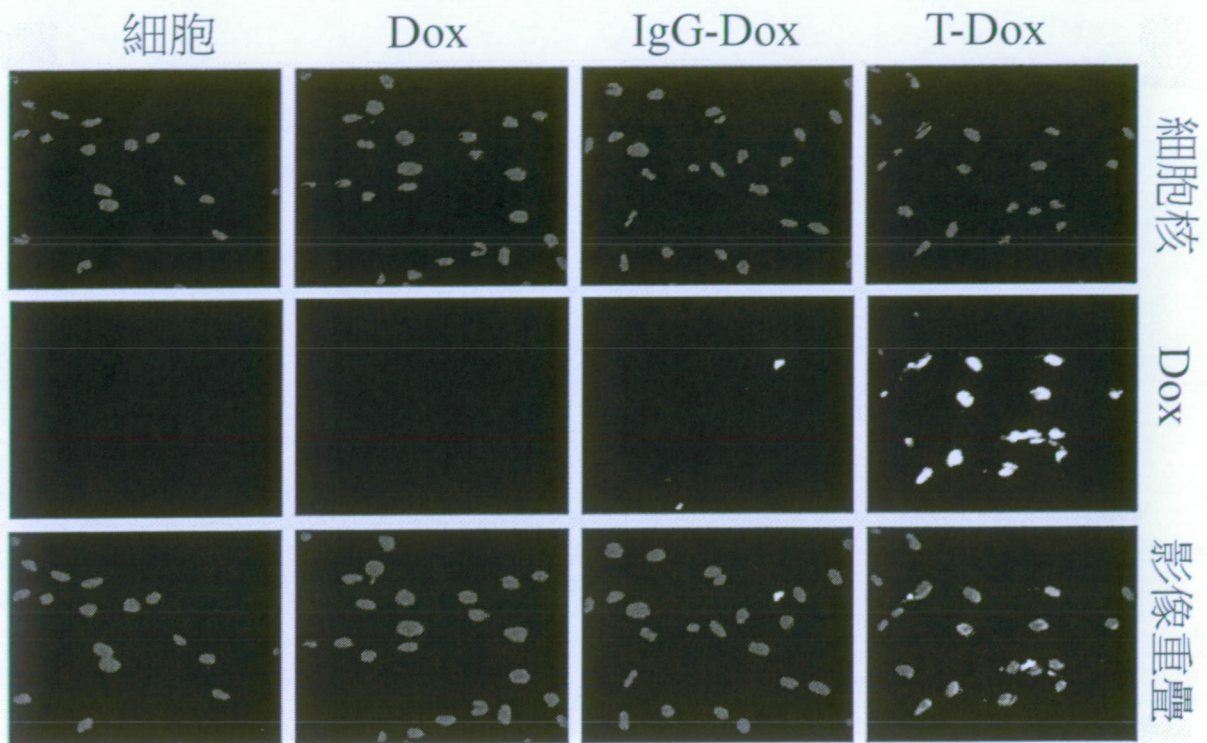
第 6B 圖



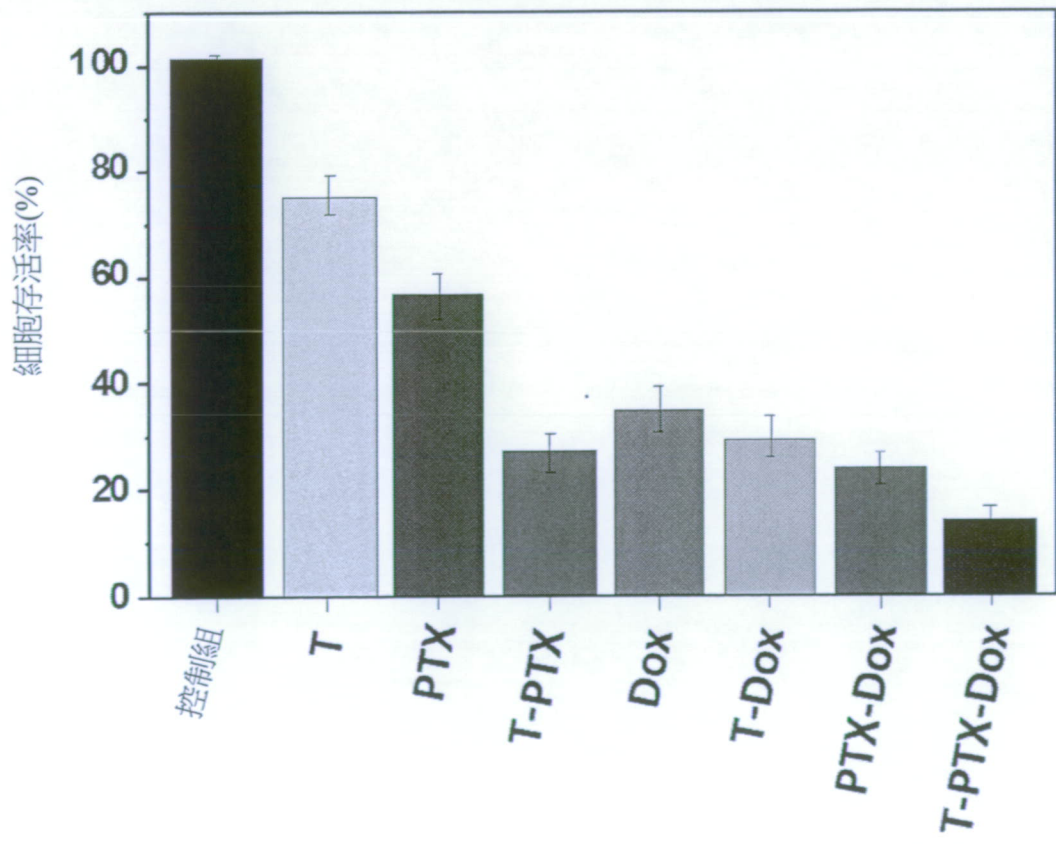
第 7A 圖



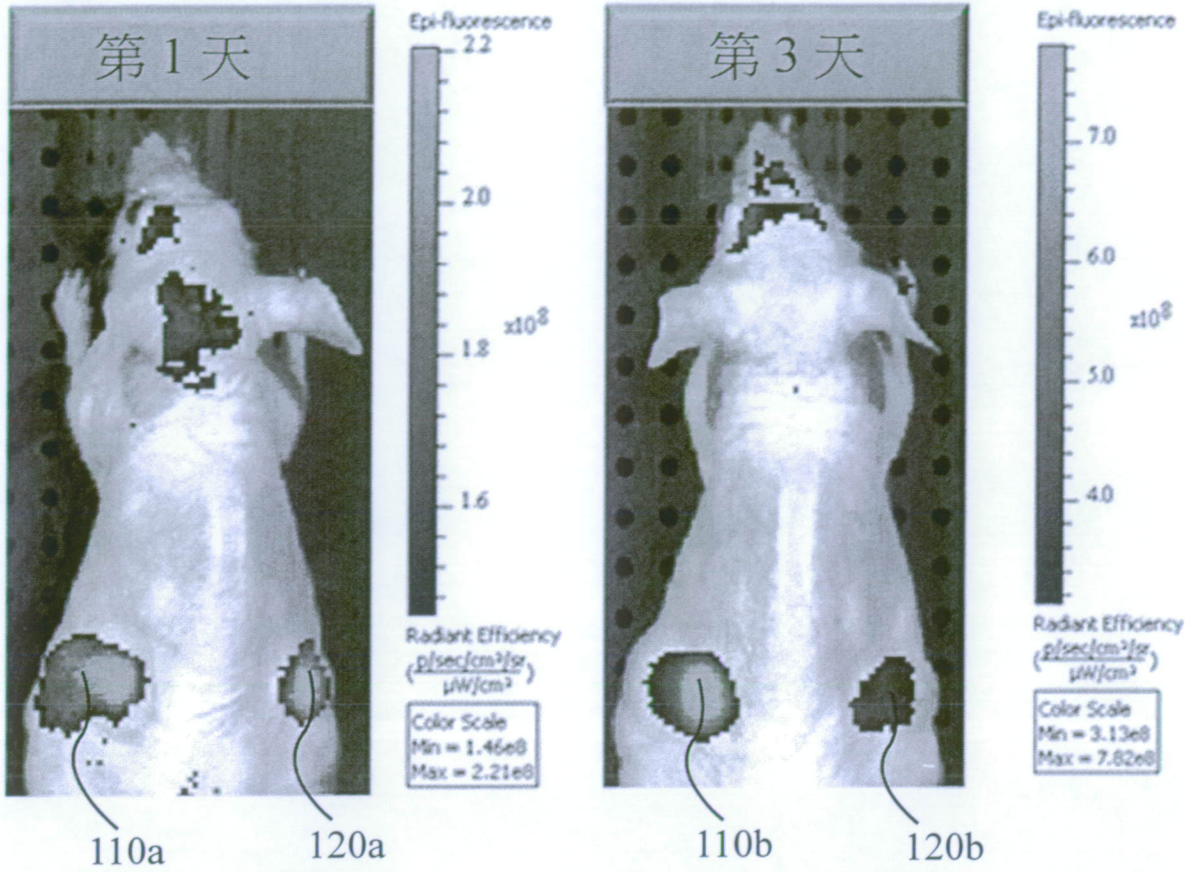
第 7B 圖



第 8 圖

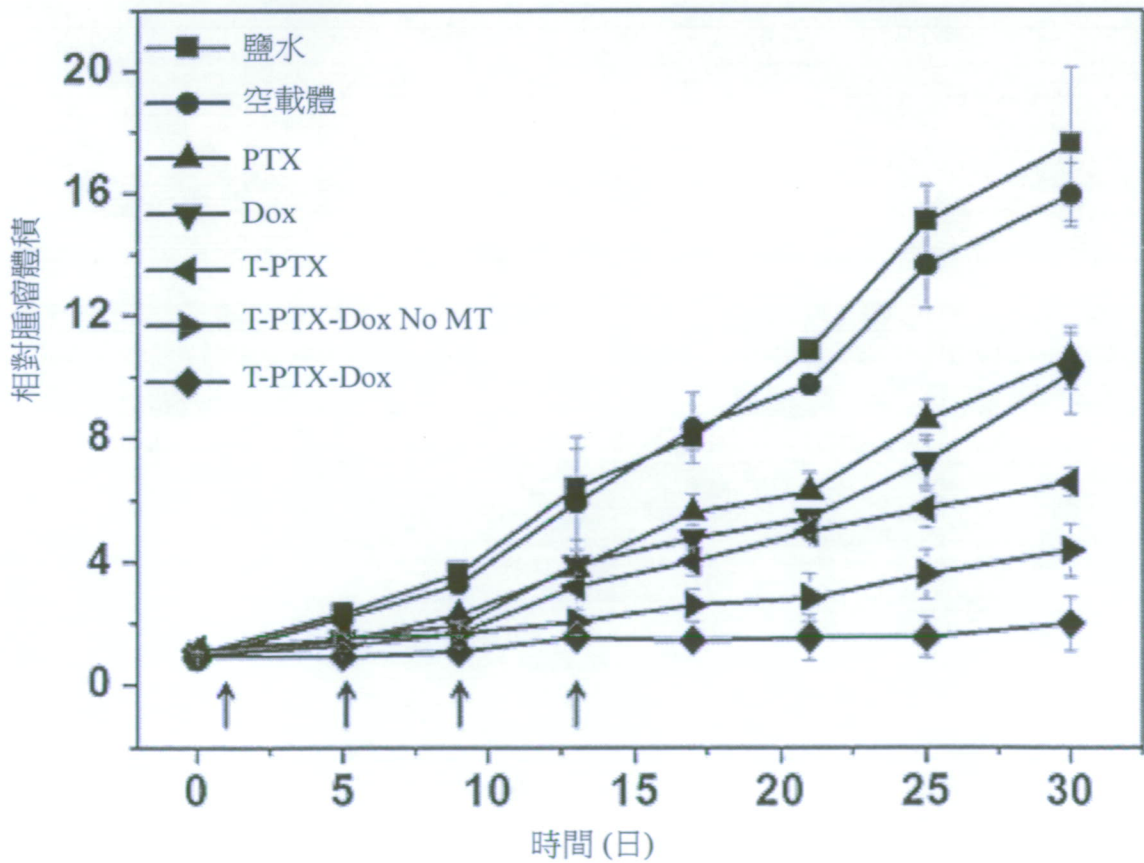


第 9 圖

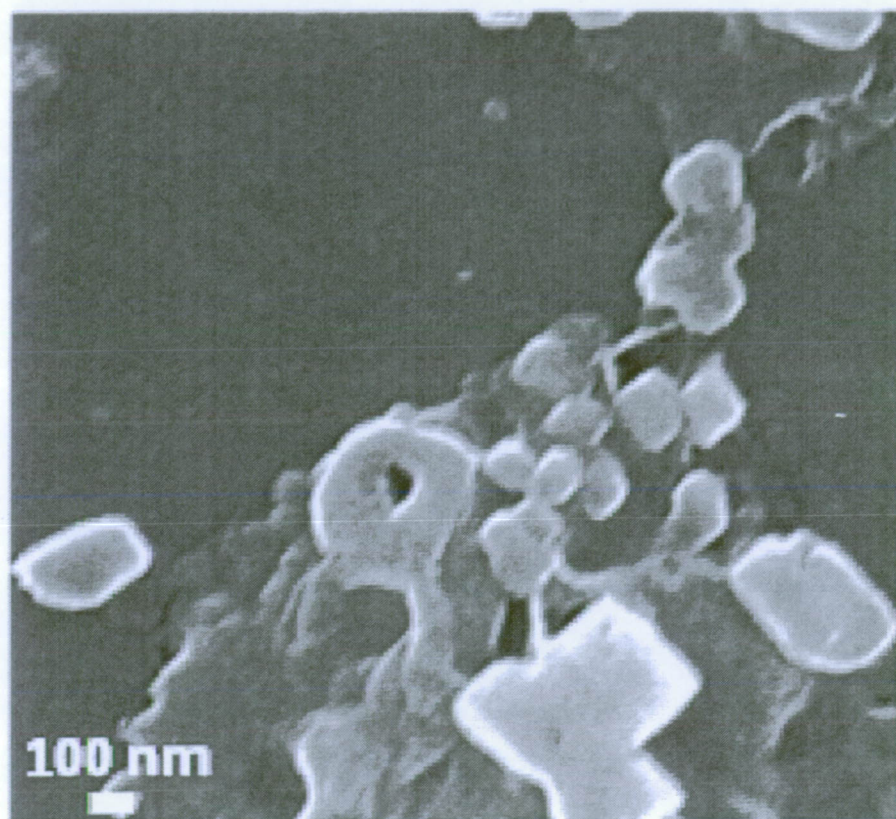


第 10A 圖

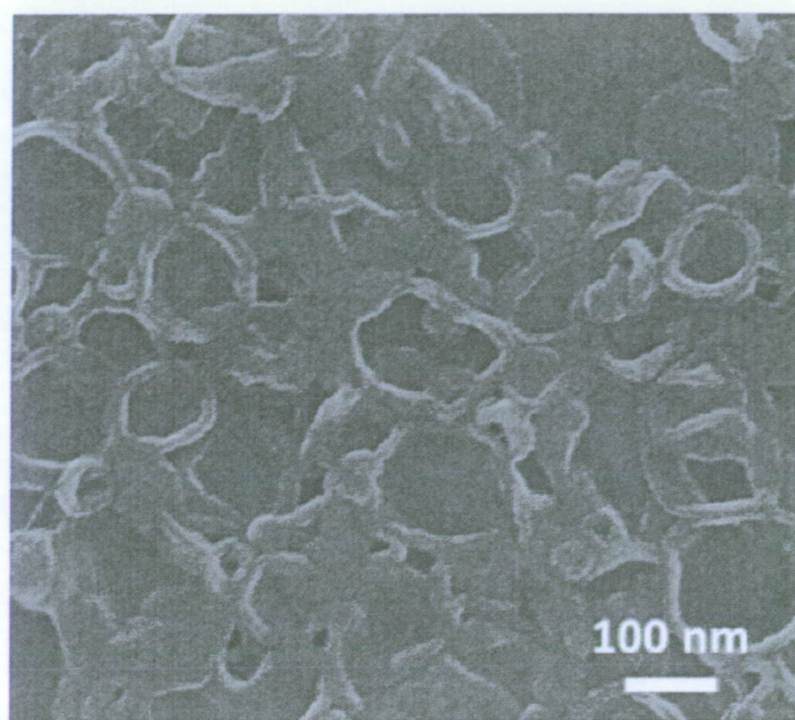
第 10B 圖



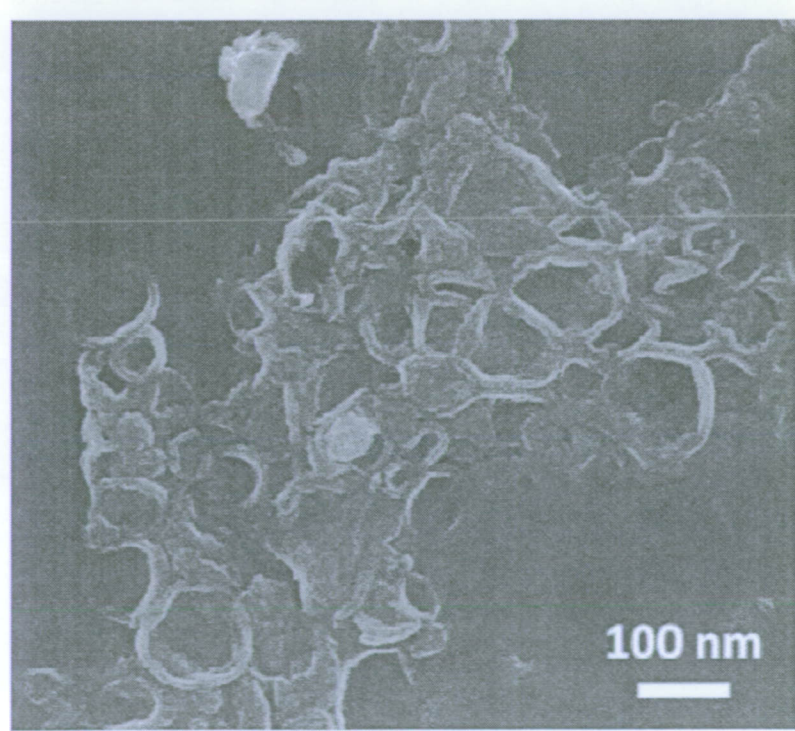
第 11 圖



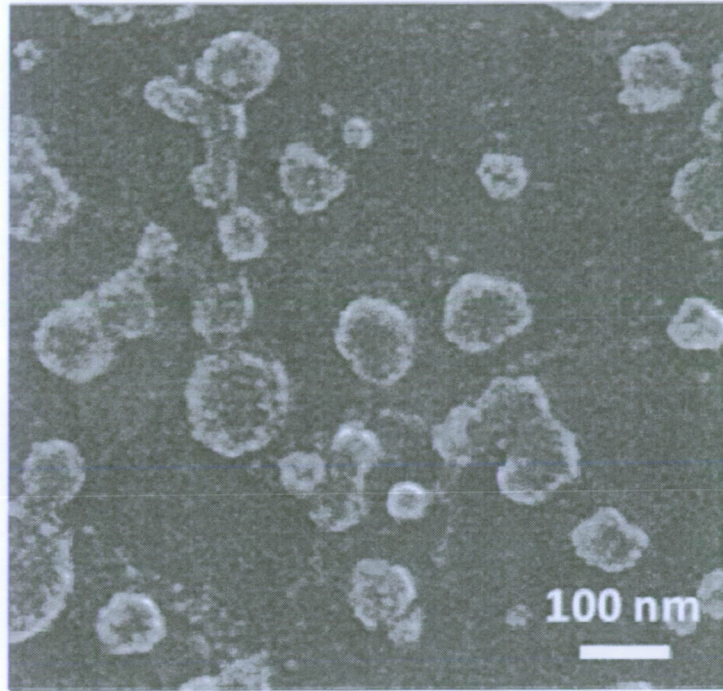
第 12 圖



第 13A 圖



第 13B 圖



第 13C 圖