



(21)申請案號：107101583 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 01 月 16 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/24 (2006.01)* *A61K31/721 (2006.01)*
A61K31/729 (2006.01) *A61K33/26 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/05/01 美國 62/492,525

(71)申請人：中國醫藥大學(中華民國) CHINA MEDICAL UNIVERSITY (TW)
 臺中市北區學士路 91 號
 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：徐偉成 SHYU, WOEI CHERNG (TW)；陳三元 CHEN, SAN YUAN (TW)；江智聖 CHIANG, CHIH SHENG (TW)；謝佳宏 HSIEH, CHIA HUNG (TW)；林佑融 LIN, YU JUNG (TW)；蔡長海 TSAI, CHANG HAI (TW)

(74)代理人：李世章；秦建譜

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：20 共 81 頁

(54)名稱

免疫磁性組成物、其製備方法、其用途以及治療癌症之套組

IMMUNOMAGNETIC NANOCOMPOSITE, METHOD FOR FABRICATING THE SAME, USES THEREOF AND TEST KIT FOR CANCER TREATMENT

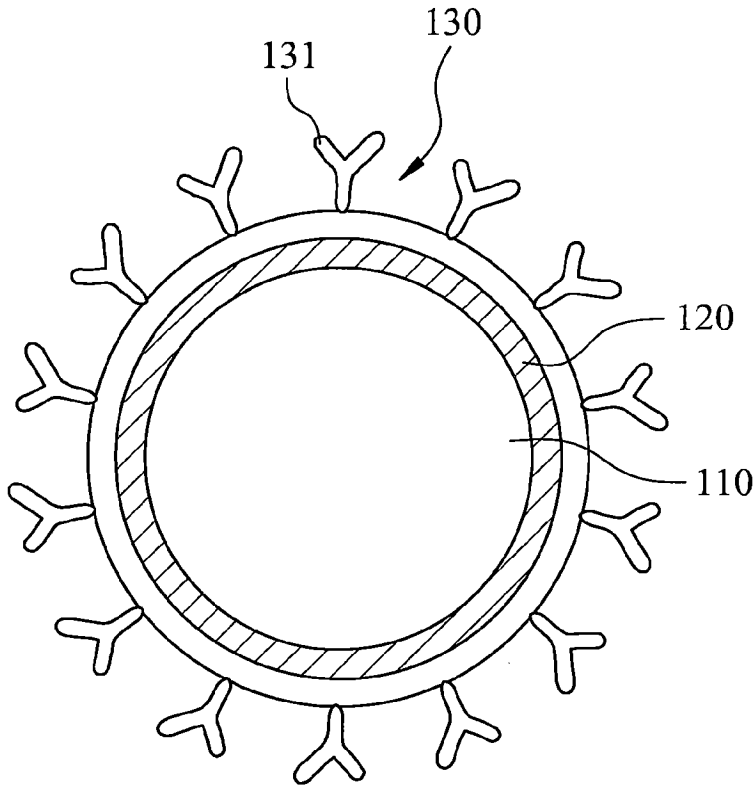
(57)摘要

本發明提供一種免疫磁性組成物，其包含一核心層、一殼層、以及一外層。所述殼層係由一複合物所構成，且所述殼層包覆所述核心層。所述複合物係由褐藻多醣、氧化右旋糖酐及超順磁性氧化鐵奈米粒子經疏水性作用力結合而形成。所述外層包含至少一抗體，且所述抗體嫁接於殼層外構成所述外層。藉此，前述免疫磁性組成物可用於製備抗癌的藥物。

The invention relates to an immunomagnetic nanocomposite fabricated via hydrophobic interaction. The immunomagnetic nanocomposite comprises a core, a shell, and an outer layer. The core is encapsulated in the shell formed by a complex, wherein the complex is composed of fucoidan, oxidized dextran, and a plurality of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. The outer layer contains at least one antibody, which is immobilized to outside of the shell to form the outer layer. Thus, the immunomagnetic nanocomposite can be used to prepare anticancer drugs.

指定代表圖：

100



符號簡單說明：

100 . . . 免疫磁性組成物

110 . . . 核心層

120 . . . 殼層

130 . . . 外層

131 . . . 抗體

第 1 圖

201841624

【發明摘要】

【中文發明名稱】 免疫磁性組成物、其製備方法、其用途以及治療癌症之套組

【英文發明名稱】 IMMUNOMAGNETIC NANOCOMPOSITE, METHOD FOR FABRICATING THE SAME, USES THEREOF AND TEST KIT FOR CANCER TREATMENT

【中文】

本發明提供一種免疫磁性組成物，其包含一核心層、一殼層、以及一外層。所述殼層係由一複合物所構成，且所述殼層包覆所述核心層。所述複合物係由褐藻多醣、氧化右旋糖酐及超順磁性氧化鐵奈米粒子經疏水性作用力結合而形成。所述外層包含至少一抗體，且所述抗體嫁接於殼層外構成所述外層。藉此，前述免疫磁性組成物可用於製備抗癌的藥物。

【英文】

The invention relates to an immunomagnetic nanocomposite fabricated *via* hydrophobic interaction. The immunomagnetic nanocomposite comprises a core, a shell, and an outer layer. The core is encapsulated in the shell formed by a complex, wherein the complex is composed of fucoidan, oxidized dextran, and a plurality of

superparamagnetic iron oxide nanoparticles. The outer layer contains at least one antibody, which is immobilized to outside of the shell to form the outer layer. Thus, the immunomagnetic nanocomposite can be used to prepare anticancer drugs.

【指定代表圖】 第1圖

【代表圖之符號簡單說明】

100：免疫磁性組成物

110：核心層

120：殼層

130：外層

131：抗體

【發明說明書】

【中文發明名稱】 免疫磁性組成物、其製備方法、其用途以及治療癌症之套組

【英文發明名稱】 IMMUNOMAGNETIC NANOCOMPOSITE, METHOD FOR FABRICATING THE SAME, USES THEREOF AND TEST KIT FOR CANCER TREATMENT

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種組成物及其製備方法，特別是一種以特殊物理形態為特徵之醫藥組成物及其製備方法。

【先前技術】

【0002】 癌症又名為惡性腫瘤，是一種細胞不正常增生的狀態，且這些增生的細胞可能侵犯身體的其他部分，為由控制細胞分裂增殖機制失常而引起的疾病。全世界罹患癌症的人口有不斷增加的趨勢，癌症係國人十大死因之一，且已連續二十七年為居十大死因之榜首。

【0003】 常規的癌症治療方法包括手術治療、放射線治療及化療等。免疫療法為上述治療方法以外的另一種治療癌症的方法，係透過激活患者自身免疫系統，利用腫瘤細胞或腫瘤抗原物質誘導機體的特異性細胞免疫和體液免疫反應，增強機體的抗癌能力，阻止腫瘤的生長、擴散和復發，以達到清除或控制腫瘤的目的。而免疫檢查哨(immune checkpoint)為幾種免疫治療中最受重視的一種，從2015年至今，已經有超過50項

利用免疫檢查哨抑制劑(immune checkpoint inhibitor)的複方療法展開了臨床試驗。但免疫檢查哨抑制劑會關閉人類的免疫系統的回饋機制，使細胞毒性T細胞(CD8⁺ T細胞)於攻擊癌細胞之餘，也會產生皮膚潰爛、腸胃潰瘍等自體免疫反應。

【0004】 增加體內對於腫瘤具有專一性的免疫細胞也被視為癌症治療中相當具有希望的一環。目前的技術大多從患者身上取得腫瘤中的免疫細胞，並於體外進行培養，利用微米尺寸的結構體(例如微珠microbead)來模仿抗原呈現細胞(antigen presenting cell, APCs)，進行T細胞的增生和訓練，最後回輸至患者體內用以獵殺癌細胞。但這樣的方式耗時且耗材，且患者體內的癌細胞容易產生變異，使回輸的免疫細胞失去本來應該發揮的效果。另一方面，用來進行增生的微珠由於尺寸過大只能用於體外培養，無法經由人體血液循環進入目標區域。此外，此類載體除了表面嫁接的抗體或是包覆的有效成分外，形成載體的材料通常為賦形劑，對於治療本身並沒有太大的幫助，且會限制施打時的劑量，成為此類材料天生的缺陷。

【發明內容】

【0005】 有鑑於此，本發明之一態樣是在提供一種免疫磁性組成物，其包含核心層、殼層和外層。前述殼層係於由複合物構成，所述殼層包覆所述核心層，其中複合物係由褐藻多醣(fucoidan)、氧化右旋糖酐(dextran)及超順磁性氧化鐵奈米粒子經疏水性作用力(hydrophobic interaction)

結合而形成。前述外層包含至少一抗體，且前述抗體嫁接於殼層外構成所述外層，其中所述抗體為一免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑。

【0006】 依據前述之免疫磁性組成物，其中前述免疫磁性組成物可為球體，且球體之粒徑介於80 nm至350 nm之間。

【0007】 依據前述之免疫磁性組成物，其中前述褐藻多醣可萃取自裙帶菜 (*Undaria pinnatifida*)、梨形囊巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)或墨角藻 (*Fucus vesiculosus*)。

【0008】 依據前述之免疫磁性組成物，其中所述氧化右旋糖酐可具有醛基，所述氧化右旋糖酐可由分子質量介於5 kDa至270 kDa之間的右旋糖酐製備而得。

【0009】 依據前述之免疫磁性組成物，其中前述免疫檢查哨抑制劑可選自PD-L1抗體、PD-1抗體、CTLA-4抗體及TIM-3抗體所組成之群組，前述殺手T細胞增生劑可選自CD3抗體、CD28抗體及4-1BB抗體所組成之群組。

【0010】 依據前述之免疫磁性組成物，其中前述核心層可另含有活性物質。

【0011】 藉此，本發明之免疫磁性組成物利用具有抗癌活性的褐藻多醣、氧化右旋糖酐以及超順磁性氧化鐵奈米粒子作為載體組成，進而形成外層具有抗體且可於核心層包覆活性物質於的一奈米等級結構；其大小及表面電荷合適，可增長體內循環時間，並滲透進入腫瘤，增強褐藻多醣對於腫瘤的作用。而外層的抗體可為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T

細胞增生劑，使本發明之免疫磁性組成物除了本身材料的抗癌功能外，還可以同時為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑，大幅改善腫瘤的微環境，且本發明之免疫磁性組成物可大幅改善單獨以相同的抗體進行免疫治療的抗癌效果，可以更少的抗體用量達到更佳的腫瘤抑制能力。另外，製造完成的免疫磁性組成物可利用凍乾形成粉狀晶體於無菌下長期保存，在有需要時以溶劑回溶即可使用，顯示其方便和穩定性佳的特性。

【0012】 本發明之另一態樣是在提供一種免疫磁性組成物之製備方法，前述方法包含提供水相溶液、提供油相溶液、進行乳化反應、移除乳液中的有機溶劑和進行抗體嫁接等步驟。在提供水相溶液的步驟中，前述水相溶液包含褐藻多醣和氧化右旋糖酐。在提供油相溶液的步驟中，前述油相溶液包含有機溶劑和超順磁性氧化鐵奈米粒子。在進行乳化反應的步驟中，其係混合前述水相溶液和前述油相溶液以形成乳液。再移除乳液中的有機溶劑，以形成磁性褐藻多醣載體。在進行抗體嫁接的步驟，係混合磁性褐藻多醣載體和至少一抗體，以形成免疫磁性組成物，其中所述抗體可為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑。

【0013】 依據前述之免疫磁性組成物之製備方法，其中前述免疫檢查哨抑制劑可選自PD-L1抗體、PD-1抗體、CTLA-4抗體及TIM-3抗體所組成之群組，前述殺手T細胞增生劑可選自CD3抗體、CD28抗體及4-1BB抗體所組成之群組。

【0014】 依據前述之免疫磁性組成物之製備方法，其中褐藻多醣和氧化右旋糖酐之一重量比例可為1：0.1至1：4。

【0015】 依據前述之免疫磁性組成物之製備方法，其中所述氧化右旋糖酐可具有醛基，所述氧化右旋糖酐可由分子質量可介於5kDa至270 kDa之間的右旋糖酐製備而得。

【0016】 依據前述之免疫磁性組成物之製備方法，其中所述有機溶劑可為甲醇(methane)、二氯甲烷(dichloromethane)或三氯甲烷(chloroform)。

【0017】 藉此，本發明之免疫磁性組成物之製備方法，不同於他種標靶載體的複雜製造過程，也不需要利用多餘的界面活性劑來穩固結構，材料的取得與製作也相當容易。

【0018】 本發明之再一態樣是在提供一種如前述免疫磁性組成物之用途，其係用於製備抗癌的藥物。

【0019】 依據前述之免疫磁性組成物之用途，其中前述抗癌的藥物可為抑制癌症細胞增生的藥物、抑制癌症轉移的藥物或引發腫瘤免疫反應的藥物。

【0020】 本發明之又一態樣是在提供一種用於治療癌症之套組，其包含如前述免疫磁性組成物和磁場產生裝置。

【0021】 藉此，本發明之用於治療癌症之套組包含本發明之免疫磁性組成物和磁場產生裝置，可透過磁場產生裝置作為磁導引的輔助工具，將本發明之免疫磁性組成物集中累積於患部，達到局部放大治療的效果，避免全身性的免疫反應。是以本發明之用於治療癌症之套組同時具有物理性的標靶和生物性的標靶作用，是以此僅需使用習知施打純抗體劑

量的百分之一，卻得以展現更優異的腫瘤抑制能力，並增長2倍以上的半生存期。

【0022】 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。

【圖式簡單說明】

【0023】 為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第1圖繪示本發明之免疫磁性組成物之結構示意圖；

第2圖繪示本發明之免疫磁性組成物之製備方法之步驟流程圖；

第3A圖至第3F圖為磁性褐藻多醣載體之結構分析圖；

第4A圖至第4C圖為磁性載體IO@Fu之結構分析圖；

第5A圖和第5B圖為磁性載體IO@Dex之結構分析圖；

第6A圖至第6C圖為磁性褐藻多醣載體之穩定性分析結果圖；

第7A圖和第7B圖為磁性褐藻多醣載體凍乾前後的穿透式電子顯微鏡照片圖；

第8圖為本發明之免疫磁性組成物之一實施方式之結構分析圖；

第9圖為本發明之免疫磁性組成物之一實施方式之X射線光電子能譜學(XPS)分析結果圖；

第10A圖和第10B圖為本發明之免疫磁性組成物之另一實施方式之結構分析圖；

第11A圖至第11F圖為本發明之免疫磁性組成物之標靶能力和細胞結合能力的分析結果圖；

第12A圖至第12D圖為本發明之免疫磁性組成物之細胞結合能力的分析結果圖；

第13A圖至第13C圖為本發明之用於治療癌症的套組集中累積至腫瘤之分析結果圖；

第13D圖為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組治療效果的蘇木素-伊紅染色搭配普魯士藍染色結果圖；

第14A圖至第14E圖為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組於乳腺癌肺轉移小鼠模型中抑制癌症細胞增生和癌症轉移之分析結果圖；

第15A圖至第15C圖為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組於大腸癌小鼠模型中抑制癌症細胞增生之分析結果圖；

第16A圖至第16I圖為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後，腫瘤微環境中腫瘤浸潤淋巴細胞數量變化和細胞因子含量變化之分析結果圖；

第17A圖和第17B圖為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組的反應位點之分析結果圖；

第17C圖和第17D圖為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組的TUNEL檢測結果圖；

第18A圖至第18E圖為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後小鼠CD4⁺ T細胞和CD8⁺ T細胞浸潤程度分析圖；

第19A圖至第19D圖為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後小鼠血液生化分析結果圖；以及

第20圖為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後小鼠的病理切片圖。

【實施方式】

【0024】 本說明書揭露內容提出一種新穎的免疫磁性組成物，其係將褐藻多醣和氧化右旋糖酐以疏水性作用力與超順磁性氧化鐵奈米粒子結合後，再嫁接抗體而得，所製得的免疫磁性組成物可大幅改善單獨以相同的抗體進行免疫治療的抗癌效果，可以更少的抗體用量達到更佳的腫瘤抑制能力。此外，本說明書亦揭露一種新穎用於治療癌症的套組，其係包含本案之免疫磁性組成物和磁場產生裝置，可進一步提升本發明之免疫磁性組成物的抗癌效果。說明書中以乳腺癌肺轉移和大腸癌之小鼠動物模型，來驗證本案之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組在免疫治療上的功效和機制。

【0025】 以下為本說明書中所用特定名詞的說明：

【0026】 說明書中前述之「褐藻多醣 (fucoidan)」是一種水溶性食物纖維，萃取自褐色海藻表面獨有的黏滑成分。褐藻多醣富含岩藻糖，為一種生物安全性高，且抗氧化、抗凝血、抗血栓、抗病毒及抗癌等多種生物活性的天然多醣。

【0027】說明書中前述之「右旋糖酐(dextran)」是一種複合且支鏈的葡聚糖(由許多葡萄糖分子構成的多醣)，其構成的分子質量可從3 Da至2000 kDa不等。右旋糖酐中的直鏈部分由經 α -1,6糖苷鍵相連在一起的葡萄糖分子組成，而支鏈由 α -1,3糖苷鍵引出。而說明書中前述之「氧化右旋糖酐(oxidized dextran)」係將右旋糖酐進行表面修飾，使右旋糖酐上的羥基氧化成醛基，得到後續可進一步嫁接抗體的氧化右旋糖酐。

【0028】請參照第1圖，其繪示本發明之免疫磁性組成物100之示意圖。免疫磁性組成物100包含核心層110、殼層120和外層130。

【0029】核心層110可含有活性物質，而活性物質可為細胞因子或抗癌藥物。

【0030】殼層120係於由複合物構成，殼層120包覆核心層110，其中複合物係由褐藻多醣、氧化右旋糖酐及超順磁性氧化鐵奈米粒子經疏水性作用力結合而形成。進一步地說，構成殼層120的複合物所使用的褐藻多醣可萃取自裙帶菜 (*Undaria pinnatifida*)、梨形囊巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)或墨角藻 (*Fucus vesiculosus*)，所使用的氧化右旋糖酐可具有醛基，且其可由分子質量介於5 kDa至270 kDa之間的右旋糖酐製備而得。而褐藻多醣、氧化右旋糖酐及超順磁性氧化鐵奈米粒子之間的疏水性作用力可經由乳化作用或奈米沉澱法等方法形成，但本發明並不欲以此為限。

【0031】 外層130包含至少一抗體131，且抗體131嫁接於殼層120外構成外層130。其中抗體131可為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑，而免疫檢查哨抑制劑可選自PD-L1抗體、PD-1抗體、CTLA-4抗體及TIM-3抗體所組成之群組，殺手T細胞增生劑可選自CD3抗體、CD28抗體及4-1BB抗體所組成之群組。

【0032】 進一步地說，前述免疫磁性組成物100可為球體，且球體之粒徑介於80 nm至350 nm之間。此外，前述免疫磁性組成物呈空心狀。

【0033】 請參照第2圖，其繪示本發明之免疫磁性組成物之製備方法300之步驟流程圖。在第2圖中，免疫磁性組成物之製備方法300包含步驟310、步驟320、步驟330、步驟340和步驟350。

【0034】 步驟310是提供水相溶液，水相溶液包含褐藻多醣和氧化右旋糖酐，其中所使用的褐藻多醣可萃取自裙帶菜 (*Undaria pinnatifida*)、梨形囊巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)或墨角藻 (*Fucus vesiculosus*)，所使用的氧化右旋糖酐可具有醛基，其可由分子質量介於5 kDa至270 kDa之間的右旋糖酐製備而得。褐藻多醣和氧化右旋糖酐以1：0.1至1：4的重量比例混合。

【0035】 步驟320是提供油相溶液，油相溶液包含有機溶劑和超順磁性氧化鐵奈米粒子，其中有機溶劑可為甲醇 (methane)、二氯甲烷 (dichloromethane) 或三氯甲烷 (chloroform)。

【0036】 步驟330是進行乳化反應，將步驟310所提供的水相溶液和步驟320所提供的油相溶液混合形成一乳液。

【0037】 在步驟340中，可藉由減壓蒸發等方法移除乳液中的有機溶劑，以形成磁性褐藻多醣載體。

【0038】 步驟350是進行抗體嫁接，將磁性褐藻多醣載體和至少一抗體嫁接，以形成免疫磁性組成物。所使用的抗體可為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑，其中免疫檢查哨抑制劑可選自PD-L1抗體、PD-1抗體、CTLA-4抗體及TIM-3抗體所組成之群組，殺手T細胞增生劑可選自CD3抗體、CD28抗體及4-1BB抗體所組成之群組。

【0039】 據此，經由前述方法製備而得的免疫磁性組成物可於後續用作為抗癌的藥物，例如可作為抑制癌症細胞增生的藥物、抑制癌症轉移的藥物和引發腫瘤免疫反應的藥物。且經由前述方法製備而得的免疫磁性組成物呈空心狀，因此可進一步包覆活性物質於核心層，以增強免疫磁性組成物之抗癌效果。

【0040】 此外，經由前述方法製備而得的免疫磁性組成物可搭配磁場產生裝置構成用於治療癌症的套組，所述磁場產生裝置可為磁鐵、三維場磁鐵或磁振造影儀等可以產生磁場的裝置，透過磁場產生裝置產生的磁場作為磁導引的輔助工具，將本發明之免疫磁性組成物集中累積於患部，達到局部放大治療的效果，使本發明之用於治療癌症的套組僅需使用習知施打純抗體劑量的百分之一，卻得以展現更優異的腫瘤抑制能力，並增長2倍以上的半生存期。

【0041】 茲以下列具體試驗例進一步示範說明本發明，用以有利於本發明所屬技術領域通常知識者，可在不需過度解讀的情形下完整利用並實踐本發明，而不應將這些試驗例視為對本發明範圍的限制，但用於說明如何實施本發明的材料及方法。

<試驗例>

一、本發明之免疫磁性組成物及其製備方法

1.1 磁性褐藻多醣載體之結構和穩定性分析

【0042】 於本試驗例中，先製備未嫁接抗體的磁性褐藻多醣載體，以測試最佳製備條件，並利用掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscopy; SEM) 和穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy; TEM) 觀察磁性褐藻多醣載體的形態。利用奈米粒徑及介面電位分析儀 (Delsa Nano C particle analyzer, BECKMAN COULTER) 分析磁性褐藻多醣載體的介面電位 (zeta potential)、粒徑和磁性褐藻多醣載體在二次蒸餾 (DDW) 和磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 中的穩定性。

【0043】 在製備磁性褐藻多醣載體前，先分別製備超順磁性氧化鐵奈米粒子和氧化右旋糖酐，於本試驗例中所使用的氧化右旋糖酐具有醛基，以利後續嫁接抗體。超順磁性氧化鐵奈米粒子(下文中將以「IO」表示)的設計合成參考自2004年由Shouheng Sun團隊所發表的文獻(Shouheng Sun *et al.*, Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126(1): 273-279)，製備條件為將2 mmol的 $Fe(acac)_3$ 、10 mmol的1,2-十六烷二醇、6 mmol

的油酸和6 mmol的乙酰胺在20 ml的苄基醚20ml中混合後，在氮氣環境下於100℃回流30分鐘。再將前述反應物加熱至200℃1小時後，再加熱至285℃30分鐘以完成IO的成核和生長。將反應物冷卻至室溫後，以6000 rpm離心10分鐘收集IO，並以乙醇純化3次，以完成IO的製備。

【0044】 具有醛基的氧化右旋糖酐(下文中將以「Dex」表示)的製備方法如下：將右旋糖酐(分子量為5 kDa至270 kDa)在室溫下避光溶解於含有過碘酸鈉溶液(10 mM)的含水氧化緩衝液(0.5-10 mg ml⁻¹, pH = 5.5)中氧化30分鐘。利用Amicon(分子量為3 kDa)透析修飾後Dex以除去過碘酸鈉。並利用冷凍乾燥機(FreeZone 1L Benchtop Freeze Dry Systems, Labconco, Kansas)再分散和凍乾前述Dex。所製得Dex利用核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance; NMR)分析結構，並利用比色法醛基測定試劑盒(MAK140, sigma)分析其修飾的程度。

【0045】 於本試驗例中，磁性褐藻多醣載體的製備條件如下：將0.5 mg/ml的褐藻多醣(萃取自墨角藻)和0.5 mg/ml的Dex混合作為水相溶液。將2 mg的IO溶於0.2 ml的二氯甲烷中作為油相溶液。將前述水相溶液和油相溶液混合後，以均質機(Double Eagle Enterprise Co, Ltd)以120W的功率乳化50秒，以得到乳液。使用旋轉蒸發器除去二氯甲烷後，利用磁選設備(MagniSort, eBioscience)純化所製得的磁性褐藻多醣載體(下文中將以「IO@FuDex」表示)，並將IO@FuDex以DDW或0.1M的

PBS (pH=6)重新懸浮以進一步進行抗體嫁接。此外，本試驗例中另分別以0.5 mg/ml的褐藻多醣或0.5 mg/ml的Dex作為水相溶液，以溶於二氯甲烷的IO作為油相溶液，利用相同製備方法製備磁性載體IO@Fu(水相溶液為褐藻多醣)或IO@Dex(水相溶液為具有醛基的氧化右旋糖酐)。所製備好的IO@FuDex、IO@Fu和IO@Dex利用掃描式電子顯微鏡和穿透式電子顯微鏡分析的形態；利用奈米粒徑及介面電位分析儀分析介面電位和粒徑；以及利用超導量子干涉磁量儀來進行磁性分析。

【0046】 請參照第3A圖至第6C圖，第3A圖至第3F圖為磁性褐藻多醣載體之結構分析圖，其中第3A圖為IO@FuDex的掃描式電子顯微鏡照片圖，第3B圖至第3F圖為IO@FuDex的穿透式電子顯微鏡照片圖。第4A圖至第4C圖為磁性載體IO@Fu之結構分析圖，其中第4A圖和第4B圖為IO@Fu的掃描式電子顯微鏡照片圖，第4C圖為IO@Fu的穿透式電子顯微鏡照片圖。第5A圖和第5B圖為磁性載體IO@Dex之結構分析圖，其中第5A圖為IO@Dex的掃描式電子顯微鏡照片圖，第5B圖為IO@Dex的穿透式電子顯微鏡照片圖。第6A圖至第6C圖為磁性褐藻多醣載體之穩定性分析結果圖，其中第6A圖為IO@FuDex、IO@Fu和IO@Dex的流體力學尺寸分布圖，第6B圖為IO@FuDex、IO@Fu和IO@Dex的介面電位分析圖，第6C圖為IO@FuDex和IO的磁性分析圖。

【0047】 第3A圖的結果顯示，藉由掃描式電子顯微鏡的觀察，可以看出IO@FuDex為一球狀結構，並因為電子顯

微鏡的中空環境而有塌陷的現象，代表其為一中空結構。由第3B圖的結果顯示，藉由穿透式電子顯微鏡可觀察到IO@FuDex因塌陷而重疊的殼層所造成的暗對比。第3C圖為將殼層處放大的穿透式電子顯微鏡照片圖，也可以見到許多大小約為5 nm的超順磁性氧化鐵奈米粒子，證明其為殼層的組成的結構。而在第3D圖的暗場觀測以及第3E圖和第3F圖的元素分布探測下，則可再次看出明顯的中空結構以及氧化鐵分布於載體中的狀況。

【0048】 第4A圖至第5B圖的結果顯示，IO@Fu和IO@FuDex一樣具有均勻的結構，而IO@Dex則不穩定，在蒸發的過程趨於聚集在一起，導致可觀察到廣泛的粒徑分佈和隨機形態外觀。

【0049】 而第6A圖和第6C圖的結果顯示，IO@FuDex在流體中呈現均一粒徑，粒徑大小介於80 nm至350 nm之間，且平均粒徑為141.5 nm，其小於IO@Fu的平均粒徑(241 nm)。而IO@FuDex和IO@Fu因主體由褐藻多醣所組成，其中所含的硫酸鹽使IO@FuDex和IO@Fu具有強的負介面電位，但因IO@FuDex的主體中另具有Dex，使得IO@FuDex的負介面電位(-32.8 mV)低於IO@Fu的負介面電位(-58.4 mV)，因此IO@FuDex之間強力的排斥力可保持膠體的穩定性和良好的分散性。而由第6C圖的結果顯示，超順磁性氧化鐵奈米粒子(IO)具有相當高的單位重量之飽和磁化強度，而IO@FuDex因包含超順磁性氧化鐵奈米粒子、褐藻多醣以及氧化右旋糖酐，其數值略為下降，但仍

保有 57.5 emu g^{-1} 的高數值，顯示其磁性的強度並不因為形成一複合載體結構而下降，有利於使用磁選設備進行磁性純化，以獲得高產量的IO@FuDex。

【0050】 本試驗例中另以不同分子量的氧化右旋糖酐製備磁性褐藻多醣載體，其係於如第2圖中步驟310提供水相溶液中，使用分子量為5 kDa至270 kDa的右旋糖酐來製備氧化右旋糖酐，再將氧化右旋糖酐與褐藻多醣以1:0.2的重量比例混合，其餘步驟320至步驟340的細節與試驗例1.1所述大致上相同，在此不再贅述。再以奈米粒徑及介面電位分析儀分析所製得的磁性褐藻多醣載體的粒徑大小，其結果如下表一所示：

表一、以不同分子量的右旋糖酐所製成之磁性褐藻多醣載體

之平均粒徑

| 右旋糖酐分子量 (kDa) | 平均粒徑 (nm) |
|---------------|----------------|
| 5 | 132 ± 14.5 |
| 12 | 130 ± 9.8 |
| 25 | 141 ± 16.2 |
| 50 | 162 ± 23.6 |
| 80 | 176 ± 26.8 |
| 150 | 203 ± 48.6 |
| 270 | 264 ± 32.6 |

【0051】 此外，本試驗例中以不同的褐藻多醣和氧化右旋糖酐混合比例製備磁性褐藻多醣載體，其係於如第2圖中步驟310提供水相溶液中，將褐藻多醣和右旋糖酐以1:0.1至1:4的重量比例混合，其餘步驟320至步驟340的細節與試驗例1.1所述大致上相同，在此不再贅述。再以奈米粒徑

及介面電位分析儀分析所製得的磁性褐藻多醣載體的粒徑大小，其結果如下表二所示：

表二、以不同重量比之褐藻多醣和氧化右旋糖酐所製成之磁性褐藻多醣載體之平均粒徑

| 褐藻多醣：右旋糖酐(重量比) | 平均粒徑 (nm) |
|----------------|------------|
| 1:0.1 | 145 ± 6.9 |
| 1:0.2 | 153 ± 11.6 |
| 1:1 | 130 ± 9.8 |
| 1:2 | 141 ± 16.2 |
| 1:3 | 162 ± 23.6 |
| 1:4 | 176 ± 26.8 |

【0052】 為測試凍乾後再回溶的IO@FuDex是否仍具有相同的結構，本試驗例進一步利用冷凍乾燥機將製備完成的IO@FuDex凍乾形成粉狀晶體，再將凍乾後的晶體回溶於水溶液中，並利用穿透式電子顯微鏡觀察IO@FuDex凍乾前和凍乾後的結構。

【0053】 請參照第7A圖和第7B圖，第7A圖為IO@FuDex凍乾前的穿透式電子顯微鏡照片圖，第7B圖為IO@FuDex凍乾後再回溶的穿透式電子顯微鏡照片圖。結果顯示，IO@FuDex凍乾前的結構為中空之球型，大小約為80 nm至350 nm之間。而凍乾後的晶體，可以快速的回溶於水溶液中，且再回溶的IO@FuDex結構於穿透式電子顯微鏡下，仍保持為中空、且大小與凍乾前載體相符的球體。顯示IO@FuDex的穩定性極佳。

1.2 實施例1-3之製備

【0054】 以前述最佳製備IO@FuDex的條件進一步製備本發明之免疫磁性組成物。將製備好的IO@FuDex分別與含有不同抗體且含有氰基硼氫化鈉(5 μ M)的緩衝溶液(0.1 M, pH=6)在4 $^{\circ}$ C下進行抗體嫁接4-6小時，Dex中的醛基與抗體上的一級胺會形成席夫鹼，在使用氰基硼氫化鈉進行還原胺化反應後，會使抗體嫁接達到化學穩定狀態。最後使用磁選設備純化所製得的免疫磁性組成物。請參照下表三，為本發明之實施例1-3所使用之抗體，其中實施例1所使用的抗體為CD3抗體和CD8抗體，實施例2所使用的抗體為PD-L1抗體，實施例3所使用的抗體為PD-L1抗體、CD3抗體和CD8抗體。

表三

| | PD-L1抗體 | CD3抗體 | CD8抗體 |
|----------|---------|-------|-------|
| IO@FuDex | - | - | - |
| 實施例1 | - | + | + |
| 實施例2 | + | - | - |
| 實施例3 | + | + | + |

【0055】 所製備好的實施例利用穿透式電子顯微鏡分析的形態和元素分析，以及X射線光電子能譜學(XPS)測定實施例3中的元素構成。

【0056】 請參照第8圖，為實施例3之結構分析圖。結果顯示，實施例3的結構為尺寸約為80-350nm之球形中空結構。並可透過電子顯微鏡的元素分析，看到實施例3外層因為有抗體的存在，而均勻的出現清晰的氮訊號(N)。在未嫁接抗體前，載體成分只有醣類以及氧化鐵，並無帶有氮的材料；然而，嫁接抗體後，因為抗體具有許多的胺基以及肽鍵，

而帶有大量的氮，可證明本發明之免疫磁性組成物帶有抗體。

【0057】 請再參照第9圖，為本發明之實施例3之X射線光電子能譜學分析結果圖。結果顯示，可以看出實施例3相對應於IO@FuDex多出了鍵結能位於399 eV的一根訊號，而此訊號即為氮訊號，代表在實施例3中，抗體成功的嫁接於載體上。

1.3 實施例5之製備和結構確認

【0058】 本發明之免疫磁性組成物因呈空心狀，因此可進一步於核心層中包覆如細胞因子或抗癌藥物等活性物質。於本試驗例中的活性物質以介白素-2(Interleukin-2, IL-2)為例，進一步製備包覆IL-2的實施例5。

【0059】 於本試驗例中，實施例5的製備條件如下：將0.5 mg/ml的褐藻多醣、0.5 mg/ml的Dex和50 μ g的IL-2混合作為水相溶液。將2 mg的IO溶於0.2 ml的二氯甲烷中作為油相溶液。將前述水相溶液和油相溶液混合後，以均質機以120 W的功率乳化50秒，以得到乳液。使用旋轉蒸發器除去二氯甲烷後，利用磁選設備純化所製得的實施例5。所製備好的實施例利用掃描式電子顯微鏡分析的形態，並利用奈米粒徑及介面電位分析儀分析其粒徑。

【0060】 請參照第10A圖和第10B圖，為實施例5之結構分析圖，其中第10A圖為實施例5的掃描式電子顯微鏡照片圖，第10B圖為實施例5的流體力學尺寸分布圖。結果顯示，實施例5的IL-2包覆率高達99.93%。而因為IL-2填滿核心

層，使實施例5的平均粒徑大小由純載體的161.2 nm增加至356.2 nm，證明本發明之免疫磁性組成物可進一步地於核心層中包覆活性物質，例如小紅莓藥物(Doxorubicin)、紫杉醇藥物(Docetaxel 或 Paclitaxel) 以及蝦紅素(Astaxanthin; ASTX)等活性物質，也可利用相同的方式包覆於本發明之免疫磁性組成物中。

1.4 本發明之免疫磁性組成物之標靶能力分析

【0061】 本試驗例將製備完成的實施例1-3進行標靶能力分析和細胞結合能力分析，以驗證本發明之免疫磁性組成物是否能逆轉T細胞免疫力下降的現象，並促進小鼠的腫瘤衰退。試驗上選擇具有轉移能力、侵襲性和表達PD-L1的三陰性乳腺癌細胞株(4T1)作為實驗模型。為了方便於螢光顯微鏡下觀察，在螢光顯微鏡分析組別的實施例1-3分別接上量子點。

【0062】 為評估標靶效率，試驗上分別將實施例1-3和4T1細胞株(4×10^5)在含牛血清白蛋白(BSA)的培養基於4℃下培育30分鐘，再利用流式細胞儀(Novocyte Flow Cytometer, ACEA Biosciences)進行分析。而為評估細胞結合能力，將接有量子點的IO@FuDex和實施例2分別與4T1細胞株培育1、4、12和24小時，再利用流式細胞儀或螢光顯微鏡(Carl Zeiss, Thornwood)進行分析。

【0063】 請參照第11A圖至第11F圖，為本發明之免疫磁性組成物之標靶能力和細胞結合能力的分析結果圖。其中第11A圖為嫁接濃度為1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (低濃度; L)、7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (中

濃度; M)和35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (高濃度; H)的PD-L1抗體的實施例2於體外標靶能力的測試結果。第11B圖為實施例2和嫁接IgG的IO@FuDex於體外標靶能力的測試結果。第11C圖為IO@FuDex在第1、4、12和24小時與4T1細胞株結合能力的分析結果圖。第11D圖為實施例2在第1、4、12和24小時與4T1細胞株結合能力的分析結果圖。第11E圖為嫁接濃度為1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (低濃度; L)、7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (中濃度; M)和35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (高濃度; H)的CD3抗體/CD28抗體的實施例3於體外標靶能力的測試結果。第11F圖為實施例2和實施例3在第1和24小時與4T1細胞株結合能力的分析結果圖。

【0064】 第11A圖的結果顯示，經過1小時的培育後，實施例2(H)的組別具有最高的平均螢光強度(median fluorescence index, MDI)顯示實施例2與4T1細胞株(其表達PD-L1)結合的量與其表面抗體密度密切相關，因此後續試驗實施例2所嫁接的PD-L1濃度為高濃度(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。而在第11B圖的結果顯示，接有IgG的IO@FuDex沒有觀察到MDI移位，顯示實施例2對4T1細胞株的親和力來自PD-L1抗體，而非與IO@FuDex的任何非特異性相互作用。

【0065】 而第11C圖和第11D圖的結果顯示，IO@FuDex與細胞結合的量具有時間依賴性，其在培育後第12小時後有明顯的細胞吸收。相比之下，實施例2在培育後第1小時中即具有細胞結合的現象，隨後MDI呈現緩慢移位，顯示隨著培育時間的增加，實施例2與細胞的結合量增

加，此結果顯示將PD-L1抗體嫁接於IO@FuDex後，會改變原本IO@FuDex和4T1細胞株的結合能力。

【0066】 為了使本發明之免疫磁性組成物可同時為免疫檢查哨抑制劑和殺手T細胞增生劑，實施例3為同時嫁接PD-L1抗體、CD3抗體和CD28抗體於IO@FuDex所得之免疫磁性組成物。請參照第11E圖，為嫁接不同濃度的CD3抗體/CD28抗體的實施例3的標靶能力分析，第11E圖的結果顯示，於體外經過1小時的培育後，實施例3(H)的組別具有最高的MDI，顯示實施例3(H)組別與CD8⁺T細胞具有強親和力。而第11F圖的結果顯示，實施例3與4T1細胞株之間具有和實施例2相似的結合力，顯示於IO@FuDex上嫁接多個抗體不會影響其對於4T1細胞株的親和力。

【0067】 請參照第12A圖至第12D圖，為實施例3與CD8⁺T細胞結合能力的分析結果圖。試驗上將接有量子點的實施例3與CD8⁺T細胞培育30分鐘，使用Alexa Fluor 488 Phalloidin和DAPI對CD8⁺T細胞進行固定染色，並使用共軛焦顯微鏡確認實施例3位於CD8⁺T細胞的亞細胞位置。其中第12A圖表明細胞核的位置，第12B圖表明實施例3的位置，第12C圖為明視野下的顯微照片圖，第12D圖為合併後的顯微照片圖，其中比例尺表示5 μm的長度。結果顯示，在CD8⁺T細胞中可見多個實施例3，證明實施例3確實能與CD8⁺T細胞結合。

二、免疫磁性組成物之用途

2.1 本發明之免疫磁性組成物之治療癌症之療效

【0068】 本試驗例以乳腺癌肺轉移和大腸癌的小鼠模型進一步測試本發明之免疫磁性組成物是否具有治療癌症的功效，以及其是否可經由磁導引累積於患部。

2.1.1 本發明之免疫磁性組成物治療乳腺癌肺轉移之療效

【0069】 本試驗例使用帶有穩定表達生物性冷光酵素的 luciferase 基因的 4T1-Luc 腫瘤小鼠為乳腺癌肺轉移的動物模型(其係由中國醫藥大學附設醫院分子醫學中心所提供)，將含有標記¹²⁵I的實施例1-3的製劑經由右股靜脈施用於4T1-Luc腫瘤小鼠中，而試驗上另有一實施例4(本發明之用於治療癌症的套組)，實施例4為施用含有標記¹²⁵I的實施例3製劑，並搭配利用表面圓形的磁體(直徑為0.5 cm, 0.5 Tesla)進行磁導引。後續使用單一光子發射電腦斷層掃描(SPECT)監測實施例3和實施例4的在腫瘤組織中的動態累積。

【0070】 請參照第13A圖至第13C圖，為本發明之用於治療癌症的套組集中累積至腫瘤之分析結果圖。第13A圖為標記有¹²⁵I的實施例3或實施例4在4T1-Luc腫瘤小鼠中第0、4、6、12和24小時的時間活性曲線，其中n=4。第13B圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用標記有¹²⁵I的實施例3或實施例4後，第24小時的全身單一光子發射電腦斷層掃描圖。第13C圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用標記有¹²⁵I的實施例3或實施例4後，第24小時的生物分佈定量圖，其中n=4，*表示具有統計上的顯著差異($p < 0.05$)。

【0071】 第13A圖的結果顯示，實施例3的在腫瘤的累積在施用後第6小時達到每克組織注射劑量的最大濃度(5.08 % ID/g)。相較之下，實施例4藉由磁導引可以促進其在腫瘤的劑量區域性，可見實施例4在24小時內於腫瘤中持續累積，在第24小時，實施例4在腫瘤中的累積量為實施例3的3.6倍。而由第13B圖的結果顯示，在施用實施例3或實施例4後24小時，實施例3和實施例4之間的放射性同位素具有不同的生物分佈模式。第13C圖的生物分佈定量圖顯示，實施例3和實施例4主要在腫瘤、肝臟、脾臟和膀胱中累積，而肌肉、腦、心臟、肺臟、胃、腎臟、結腸和血液中積累較少(小於5 % ID/g)。其中實施例3和實施例4相比，可見實施例4不僅增加了在腫瘤的累積，更顯著降低其在肝臟和脾臟的系統累積，顯示實施例4可以有效地集中到作用部位。

【0072】 本試驗例進一步分別經由右股靜脈施用IgG(對照組)、IO@FuDex、實施例1-4至4T1-Luc腫瘤小鼠中，施用方式為腫瘤接種後8天，每4天連續施用3次(q4dx3)。請參照第13D圖，為4T1-Luc腫瘤小鼠施用實施例1-4後4周的蘇木素-伊紅染色搭配普魯士藍染色結果圖，其中比例尺表示50 μ m的長度。第13D圖的結果顯示，其他組別相較，實施例4在腫瘤組織中可觀察到分散的普魯士藍染色結果。

【0073】 為了確認本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組對於4T1-Luc腫瘤小鼠具有治療效果，本試驗例進一步分別經由右股靜脈施用IgG(對照組)、IO@FuDex、

實施例1-4至4T1-Luc腫瘤小鼠中，施用方式為腫瘤接種後8天，每4天連續施用3次(q4dx3)。而腫瘤體積為每2-3天使用數字卡尺(mitutoyo)進行監測，並以下述公式I計算腫瘤體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \frac{(\text{寬度})^2 \times \text{長度}}{2} \dots\dots\dots\text{公式I;}$$

並以非侵入式活體分子影像系統(Non Invasion In Vivo Imaging System, IVIS, Xenogen)進行生物冷光評估。4T1-Luc腫瘤小鼠的存活率以Kaplan-Meier法進行分析。

【0074】 請參照第14A圖至第14E圖，為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組於乳腺癌肺轉移小鼠模型中抑制癌症細胞增生和癌症轉移之分析結果圖。第14A圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用實施例1-4後24小時的非侵入式活體分子影像系統掃描結果圖。第14B圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用實施例1-4後的腫瘤體積統計圖。第14C圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用實施例1-4後的生存曲線。第14D圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用實施例1-4後的腫瘤和肺臟的照片圖。第14E圖為4T1-Luc腫瘤小鼠在施用實施例1-4後肺轉移的統計圖。

【0075】 第14A圖和第14B圖的結果顯示，和對照組相比，IO@FuDex可以抑制腫瘤生長，但不具統計上的顯著差異。而實施例1-4不但具抗腫瘤效果，且具有統計上顯著的差異(*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$)，特別是實施例4在30天內幾乎抑制腫瘤生長。第14C圖的結果顯示，施用對照組、IO@FuDex、實施例1、實施例2、實施例3和實施例4

的4T1-Luc腫瘤小鼠的中位數存活期分別為24天、34天、34天、43天和44天。而施用實施例4的4T1-Luc腫瘤小鼠的中位數存活期則可顯著延長到63天。實施例4中的PD-L1抗體劑量雖然只有一般施打純抗體劑量的百分之一，卻得以展現更優異的腫瘤抑制能力，以及增長2倍以上的半生存期。此外，第14D圖的結果顯示，實施例1-4皆具有抗腫瘤轉移能力。在第14D圖中，與其他組別相比，施用實施例3和實施例4顯著地抑制肺部腫瘤轉移，另由第14E圖的結果顯示，對照組4T1-Luc腫瘤小鼠的肺部有超過20個結節的肺轉移，而施用實施例4的4T1-Luc腫瘤小鼠的肺部平均發現少於5個結節的肺轉移。因此，上述的結果顯示，本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組具有顯著的抑制腫瘤和抗腫瘤轉移作用。而與對照組相比，IO@FuDex未顯著的降低腫瘤的轉移，推測本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組所具有抗腫瘤轉移作用，除了褐藻多醣的抑制作用外，可能也與腫瘤微環境的動態反應有關。

2.1.2 本發明之免疫磁性組成物治療大腸癌之療效

【0076】 本試驗例使用帶有穩定表達生物性冷光酵素的luciferase基因的CT-26細胞株來建立大腸癌的動物模型(其係由中國醫藥大學附設醫院分子醫學中心所提供)，將IgG(對照組)、IO@FuDex和實施例3分別經由右股靜脈施用於CT-26腫瘤小鼠中，而試驗上另有施用實施例3並搭配利用表面圓形的磁體(直徑為0.5 cm, 0.5 Tesla)進行磁導引的實施例4(本發明之用於治療癌症的套組)；以及施用

IO@FuDex並搭配利用表面圓形的磁體進行磁導引的比較例1。施用方式為腫瘤接種後8天，每4天連續施用3次(q4dx3)。每2-3天使用數字卡尺進行腫瘤體積監測，並以前述的公式I計算腫瘤體積，並以非侵入式活體分子影像系統進行生物冷光評估。CT-26腫瘤小鼠的存活率以Kaplan-Meier法進行分析。

【0077】 請參照第15A圖至第15C圖，為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組於大腸癌小鼠模型中抑制癌症細胞增生之分析結果圖。第15A圖為CT-26腫瘤小鼠在施用實施例3-4後24小時的非侵入式活體分子影像系統掃描結果圖。第15B圖為CT-26腫瘤小鼠在施用實施例3-4後的腫瘤體積統計圖。第15C圖為CT-26腫瘤小鼠在施用實施例3-4後的生存曲線。

【0078】 第15A圖和第15B圖的結果顯示，和對照組相比，IO@FuDex可以抑制腫瘤生長，但不具統計上的顯著差異。施用IO@FuDex並搭配磁引導的比較例1可以提高IO@FuDex的治療效果。而本發明之實施例3-4不但具抗腫瘤效果，且具有統計上顯著的差異(*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$)，特別是實施例4在30天內幾乎抑制腫瘤生長。第15C圖的結果顯示，施用實施例3和實施例4顯著地延長了小鼠的生存時間，再次證明本發明之免疫磁性組成物具有抑制腫瘤生長和轉移的效果。

2.2 施用本發明之免疫磁性組成物後之免疫作用分析

【0079】 本試驗例進一步以4T1腫瘤模型，探討本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組在腫瘤內微環境的免疫作用。試驗上監測早期腫瘤(10天)到晚期(30天)4T1-Luc腫瘤小鼠的腫瘤、血液、腹水和脾臟中淋巴球數量的變化。

【0080】 請參照第16A圖至第16I圖，為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後，腫瘤微環境中腫瘤浸潤淋巴細胞數量變化和細胞因子含量變化之分析結果圖。第16A圖和第16B圖的結果顯示，施用實施例1-4的組別可以顯著地增加抗腫瘤淋巴細胞，如 $CD8^+$ T細胞和 $CD4^+$ T細胞的數量，特別是施用實施例4的組別($p < 0.01$)。而第16C圖和第16D圖的結果顯示，施用實施例1-4的組別可以顯著地降低前腫瘤抗腫瘤淋巴細胞，如 $CD4^+CD225^+Foxp3^+Treg$ (調節性T細胞)和 $CD11b^+CD206^+F4/80^+TAM$ (腫瘤相關巨噬細胞)的數量，特別是施用實施例4的組別可大幅降低調節性T細胞(Treg)數量($p < 0.01$)。而在第16E圖至第16G圖中，收集不同組別的4T1-Luc腫瘤小鼠血清，分析由TAM分泌的TNF- α 、VEGF和TGF- β 的含量，可發現施用實施例1-4的組別可以顯著地降低TNF- α 、VEGF和TGF- β 等促炎細胞因子的含量，特別是施用實施例4的組別($p < 0.01$)。而在第16H圖和第16I圖中，藉由細胞內顆粒酶B (GrB^+)和Ki67的表現的水平評估 $CD8^+$ T細胞的活化程度，可見施用實施

例1-4的組別可以有效地激活 $CD8^+$ 腫瘤浸潤淋巴細胞的功能，特別是施用實施例4的組別($p < 0.01$)。

【0081】 於前述試驗例證實施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組可以改變腫瘤微環境後，本試驗例進一步探討本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組對於腫瘤特異性免疫反應和全身效應的變化。試驗上，收集不同組別的4T1-Luc腫瘤小鼠的腫瘤、血清、脾臟，監測 $INF-\gamma^+CD44^+$ T細胞和 $CD8^+CD3^+$ T細胞的變化，以及利用TUNEL檢測觀察不同組別4T1-Luc腫瘤小鼠的皮膚組織的細胞凋亡狀況。

【0082】 請參照第17A圖和第17B圖，為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組的反應位點之分析結果圖。第17A圖為不同組別的4T1-Luc腫瘤小鼠的 $INF-\gamma^+CD44^+$ T細胞的變化結果圖。第17B圖為不同組別的4T1-Luc腫瘤小鼠的 $CD8^+CD3^+$ T細胞的變化結果圖。

【0083】 第17A圖的結果顯示， $INF-\gamma^+CD44^+$ T細胞在施用實施例1-4後增值的數量提高，特別是施用實施例4的組別高度增殖。而第17B圖的結果顯示，施用實施例1-3後， $CD8^+CD3^+$ T細胞在血清和脾臟中均有擴增，但施用實施例4的組別和施用實施例3的組別相比，磁導引會降低 $CD8^+CD3^+$ T細胞在血清和脾臟中的擴增。

【0084】 皮膚毒性所引起的搔癢症和白斑症是免疫檢查哨抑制劑治療中的副作用之一，由於免疫相關的不良事件往往出現在長期的情況下，本試驗例在腫瘤接種後4周，對

4T1-Luc 腫瘤小鼠的皮膚組織進行TUNEL檢測，以評估浸潤的T細胞是否誘導免疫應答並引起皮膚組織損傷。

【0085】 請參照第17C圖和第17D圖，為本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組的TUNEL檢測結果圖。第17C圖為TUNEL檢測不同組別4T1-Luc 腫瘤小鼠的皮膚組織凋亡指數統計結果圖，其中凋亡指數係以TUNEL⁺ 凋亡細胞核的比例除以細胞核總數(隨機選擇的鏡檢範圍)，並藉由二因子的變異數分析和Newman-Keuls事後比較檢驗評估不同組之間的差異。第17D圖為TUNEL檢測不同組別的4T1-Luc 腫瘤小鼠的螢光顯微照片圖，其中比例尺表示50 μm的長度。

【0086】 第17C圖和第17D圖的結果顯示，施用實施例1-3後，會增加可被TUNEL標記(綠色)的凋亡細胞，其中施用實施例3的組別誘導凋亡指數與對照組相比增加了3.3倍。但施用實施例4的組別和施用實施例3的組別相比，磁導引可以有效降低皮膚組織中凋亡細胞的數量。

2.3 本發明之免疫磁性組成物之免疫相關不良事件測試

【0087】 本試驗例進一步以施用本發明之免疫磁性組成物或用於治療癌症的套組的4T1腫瘤模型，試驗上將實施例3或實施例4施用於4T1腫瘤小鼠，並在腫瘤接種後4周，對4T1腫瘤小鼠進行免疫相關不良事件(Immune-related adverse events, irAEs)測試，分析本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組的安全性。

【0088】 本試驗例藉由觀察經由實施例3以及實施例4治療後四周的小鼠，其 $CD4^+$ T細胞以及 $CD8^+$ T於主要器官的浸潤程度來判斷副作用的影響。請參照第18A圖至第18E圖，為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後小鼠 $CD4^+$ T細胞和 $CD8^+$ T細胞浸潤程度分析圖，其中第18A圖為肝臟的分析結果圖，第18B圖為肺臟的分析結果圖，第18C圖為脾臟的分析結果圖，第18D圖為腎臟的分析結果圖，第18E圖為大腸的分析結果圖。結果顯示，實施例3於肝臟、肺臟、脾臟、腎臟和大腸的T細胞浸潤程度低於對照組，而實施例4因為具有磁鐵的吸引作用，更能顯著地減少於周邊的累積(肝臟、肺臟、脾臟、腎臟和大腸)，進而減低T細胞的浸潤。

【0089】 本試驗例進一步藉由血液生化分析，分析肝功能指數(AST和ALT)、腎功能指數(肌酸酐)以及血糖來判斷副作用的影響。請參照第19A圖至第19D圖，為施用本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組後小鼠血液生化分析結果圖，其中第19A圖為AST值分析圖，第19B圖為ALT值分析圖，第19C圖為肌酸酐值分析圖，第19D圖為血糖值分析圖。由圖可知，施用實施例3或實施例4的治療組別與對照組的生化值仍保持於正常值的範圍之中，顯示本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組具有一定程度的安全性。

【0090】 此外，小鼠腫瘤接種後四周進行病理切片分析，請參照第20圖，為施用實施例3和實施例4後小鼠的病

理切片圖。結果顯示，施用實施例3或實施例4的治療組別在肝臟、肺臟、脾臟、腎臟、和大腸中相對於對照組沒有明顯的組織損傷，顯示本發明之免疫磁性組成物和用於治療癌症的套組具有一定程度的安全性。

【0091】 綜合上述，本發明之免疫磁性組成物之製備方法的製程簡單，利用具有抗癌活性的褐藻多醣作為載體組成，並結合超順磁性氧化鐵奈米粒子，形成外層可嫁接抗體並可包覆活性物質於核心層的免疫磁性組成物，所製備出之免疫磁性組成物為一奈米等級結構，其大小合適可滲透進入腫瘤，增強褐藻多醣對於腫瘤的作用。而外層的抗體可為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑，使本發明之免疫磁性組成物除了本身材料的抗癌功能外，還可以同時為免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑，大幅改善腫瘤的微環境，且本發明之免疫磁性組成物可大幅改善單獨以相同的抗體進行免疫治療的抗癌效果，可以更少的抗體用量達到最佳的腫瘤抑制能力。另外，製造完成的免疫磁性組成物可利用凍乾形成粉狀晶體於無菌下長期保存，在有需要時以溶劑回溶即可使用，顯示其方便和穩定性佳的特性。

【0092】 本發明之用於治療癌症之套組包含本發明之免疫磁性組成物和磁場產生裝置，可透過磁場產生裝置產生磁場，作為磁導引的輔助工具，將本發明之免疫磁性組成物集中累積於患部，在腫瘤中具有旺盛的免疫細胞增生，且可降低體循環的免疫反應，可進一步提升本發明之免疫磁性組成物的抗癌效果。由前述試驗數據確認其具有針對局部進行治

療的能力，是以本發明之用於治療癌症之套組同時具有物理性的標靶和生物性的標靶作用，有助於免疫治療以及搭配化療，或免疫治療的複方治療，避免過強的免疫反應造成嚴重副作用。

【0093】 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，在不脫離本發明的精神和範圍內，當可作各種的更動與潤飾，因此本發明的保護範圍當視後附的申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0094】

- 100：免疫磁性組成物
- 110：核心層
- 120：殼層
- 130：外層
- 131：抗體
- 300：免疫磁性組成物之製備方法
- 310、320、330、340、350：步驟

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種免疫磁性組成物，包含：

一核心層；

一殼層，係於由一複合物構成，該殼層包覆該核心層，其中該複合物係由一褐藻多醣(fucoidan)、一氧化右旋糖酐(dextran)及複數個超順磁性氧化鐵奈米粒子經疏水性作用力(hydrophobic interaction)結合而形成；以及

一外層，包含至少一抗體，且該抗體嫁接於該殼層外構成該外層，其中該抗體為一免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之免疫磁性組成物，其中該免疫磁性組成物係為一球體，且該球體之粒徑介於80 nm至350 nm之間。

【第3項】如申請專利範圍第1項所述之免疫磁性組成物，其中該褐藻多醣係萃取自裙帶菜 (*Undaria pinnatifida*)、梨形囊巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)或墨角藻 (*Fucus vesiculosus*)。

【第4項】如申請專利範圍第1項所述之免疫磁性組成物，其中該氧化右旋糖酐具有醛基。

【第5項】如申請專利範圍第4項所述之免疫磁性組成物，其中該氧化右旋糖酐係由分子質量係介於5 kDa至270 kDa之間的一右旋糖酐製備而得。

【第6項】如申請專利範圍第1項所述之免疫磁性組成物，其中該免疫檢查哨抑制劑係選自PD-L1抗體、PD-1抗體、CTLA-4抗體及TIM-3抗體所組成之群組。

【第7項】如申請專利範圍第1項所述之免疫磁性組成物，其中該殺手T細胞增生劑係選自CD3抗體、CD28抗體及4-1BB抗體所組成之群組。

【第8項】如申請專利範圍第1項所述之免疫磁性組成物，其中該核心層中另含有一活性物質。

【第9項】一種免疫磁性組成物之製備方法，包含：
提供一水相溶液，該水相溶液包含一褐藻多醣和一氧化右旋糖酐；

提供一油相溶液，該油相溶液包含一有機溶劑和一超順磁性氧化鐵奈米粒子；

進行一乳化反應，係混合該水相溶液和該油相溶液以形成一乳液；

移除該乳液中的該有機溶劑，以形成一磁性褐藻多醣

載體；以及

進行一抗體嫁接，係混合該磁性褐藻多醣載體和至少一抗體，以形成該免疫磁性組成物，其中該抗體為一免疫檢查哨抑制劑及/或殺手T細胞增生劑。

【第10項】如申請專利範圍第9項所述之免疫磁性組成物之製備方法，其中該免疫檢查哨抑制劑係選自PD-L1抗體、PD-1抗體、CTLA-4抗體及TIM-3抗體所組成之群組。

【第11項】如申請專利範圍第9項所述之免疫磁性組成物之製備方法，其中該殺手T細胞增生劑係選自CD3抗體、CD28抗體及4-1BB抗體所組成之群組。

【第12項】如申請專利範圍第9項所述之免疫磁性組成物之製備方法，其中該褐藻多醣和該氧化右旋糖酐之一重量比例係1：0.1至1：4。

【第13項】如申請專利範圍第9項所述之免疫磁性組成物之製備方法，其中該氧化右旋糖酐具有醛基。

【第14項】如申請專利範圍第9項所述之免疫磁性組成物之製備方法，其中該氧化右旋糖酐係由分子質量係介於5 kDa至270 kDa之間的一右旋糖酐製備而得。

【第15項】如申請專利範圍第9項所述之免疫磁性組成物之製備方法，其中該有機溶劑為甲醇(methane)、二氯甲烷(dichloromethane)或三氯甲烷(chloroform)。

【第16項】一種如申請專利範圍第1項至第8項任一項所述之免疫磁性組成物之用途，其係用於製備抗癌的藥物。

【第17項】如申請專利範圍第16項所述之免疫磁性組成物之用途，其中該抗癌的藥物為抑制癌症細胞增生的藥物。

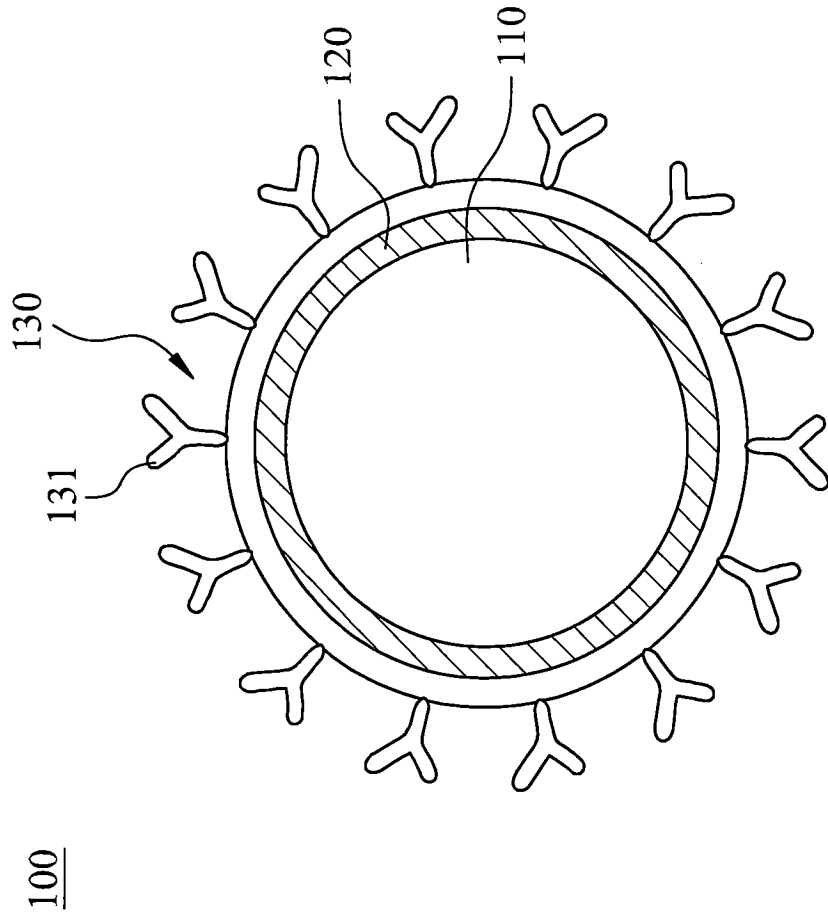
【第18項】如申請專利範圍第16項所述之免疫磁性組成物之用途，其中該抗癌的藥物為抑制癌症轉移的藥物。

【第19項】如申請專利範圍第16項所述之免疫磁性組成物之用途，其中該抗癌的藥物為引發腫瘤免疫反應的藥物。

【第 20 項】一種用於治療癌症之套組，包含：

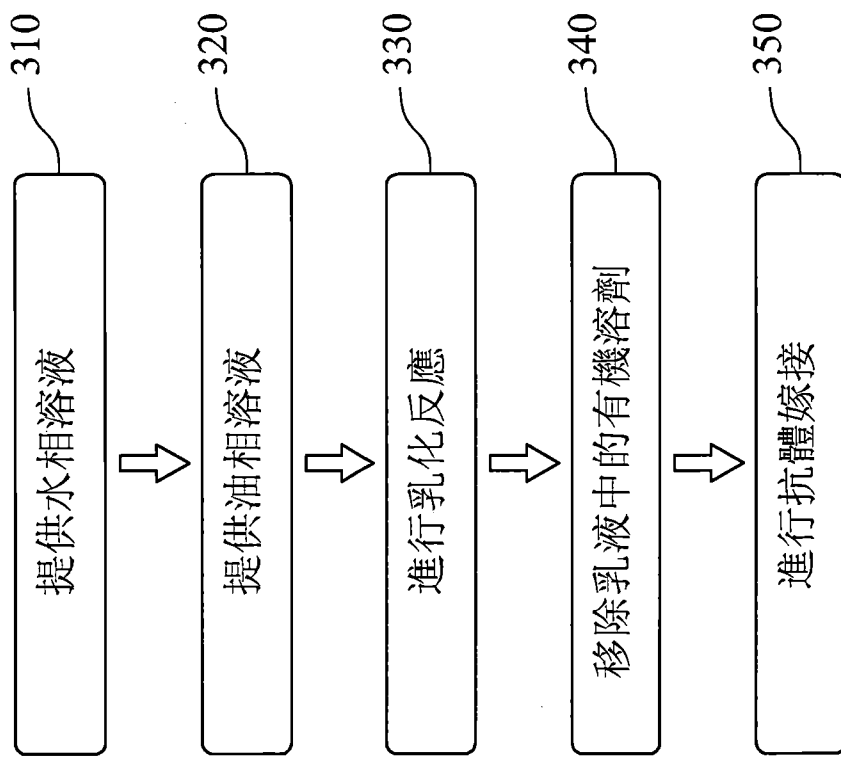
一如申請專利範圍第 1 項至第 8 項任一項所述之免疫
磁性組成物；以及
一磁場產生裝置。

圖式

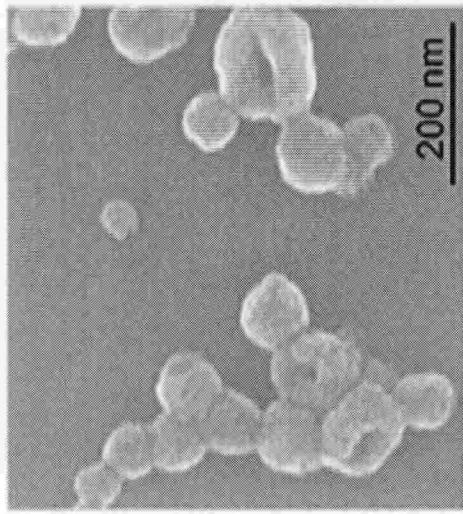


第 1 圖

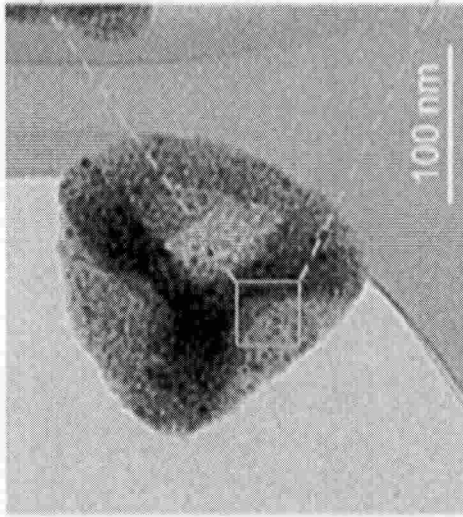
300



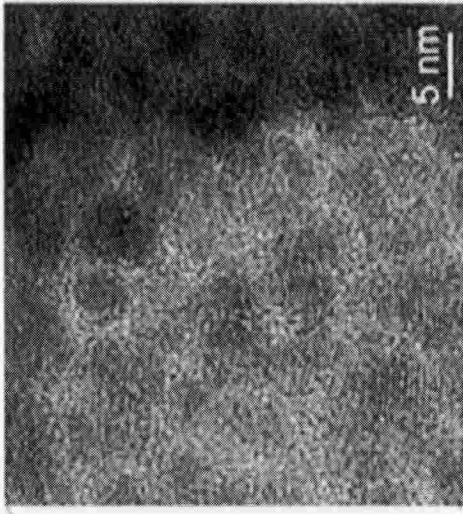
第 2 圖



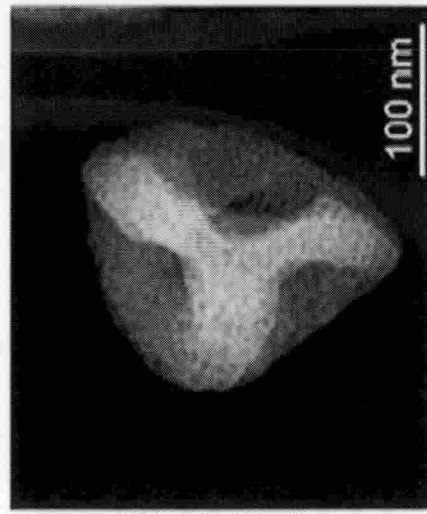
第3A圖



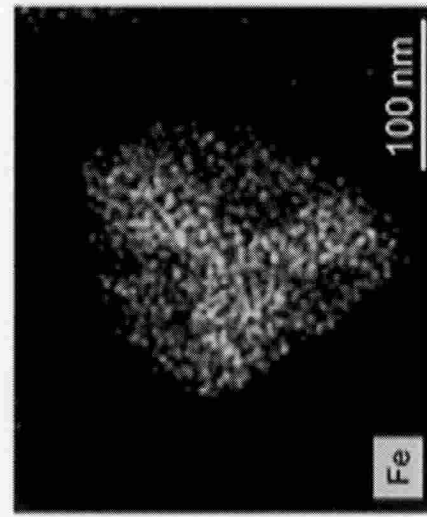
第3B圖



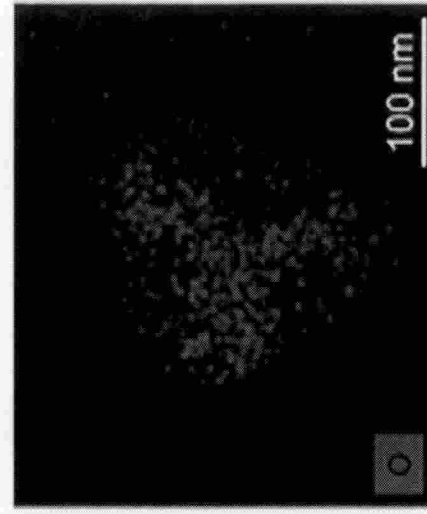
第3C圖



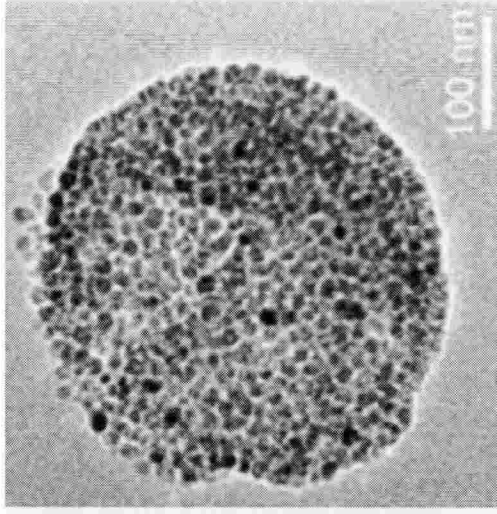
第3D圖



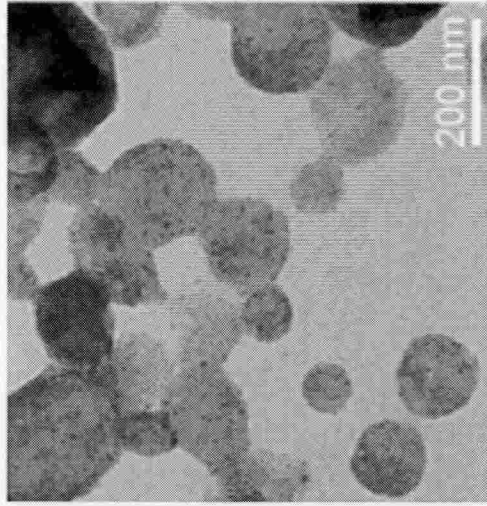
第3E圖



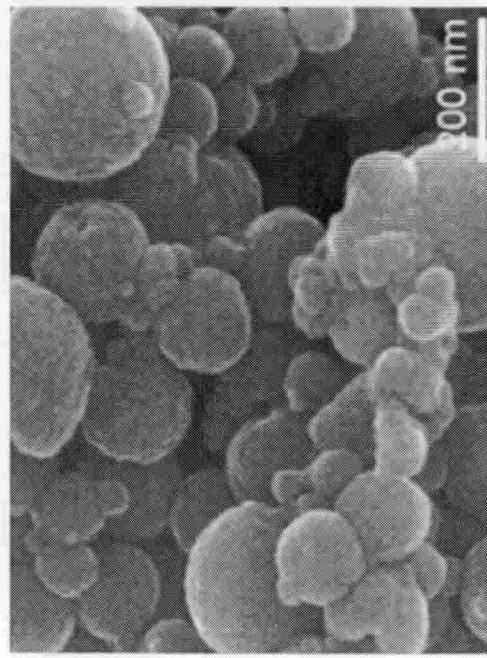
第3F圖



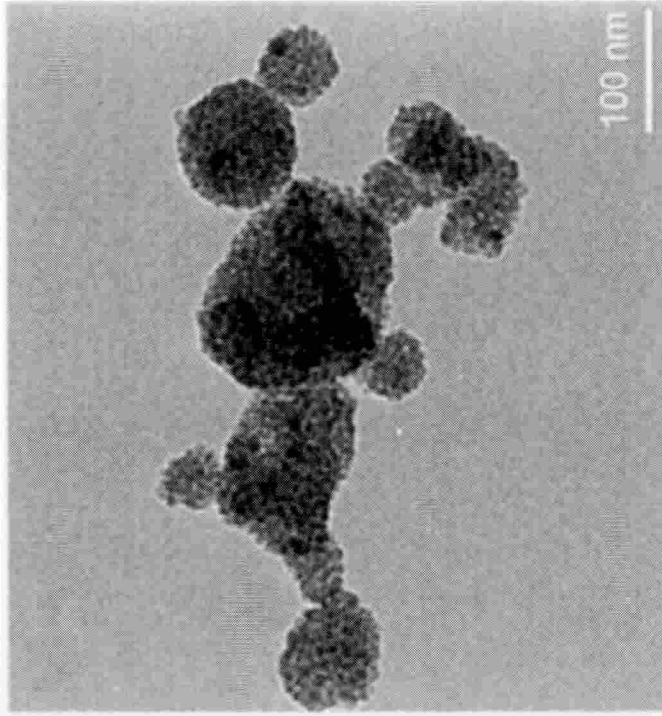
第 4C 圖



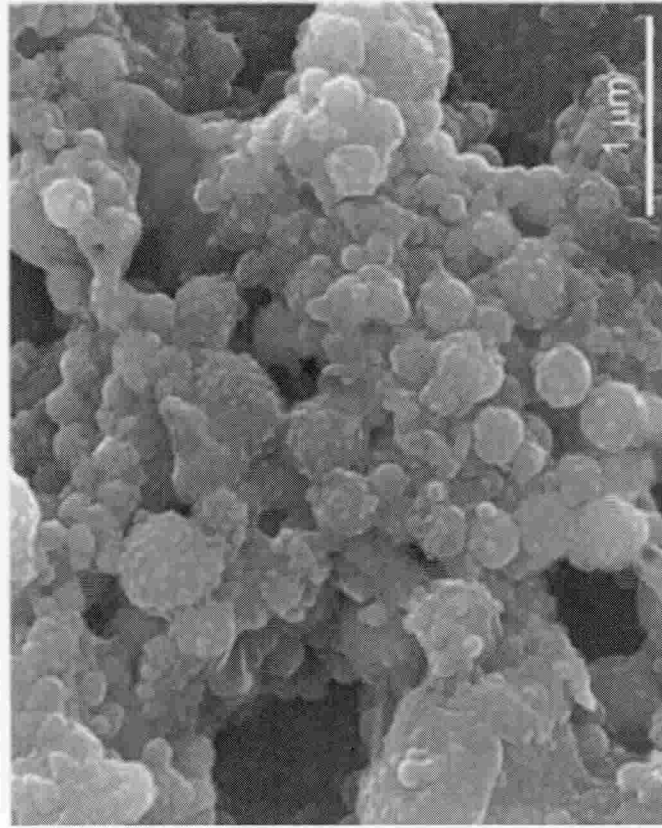
第 4B 圖



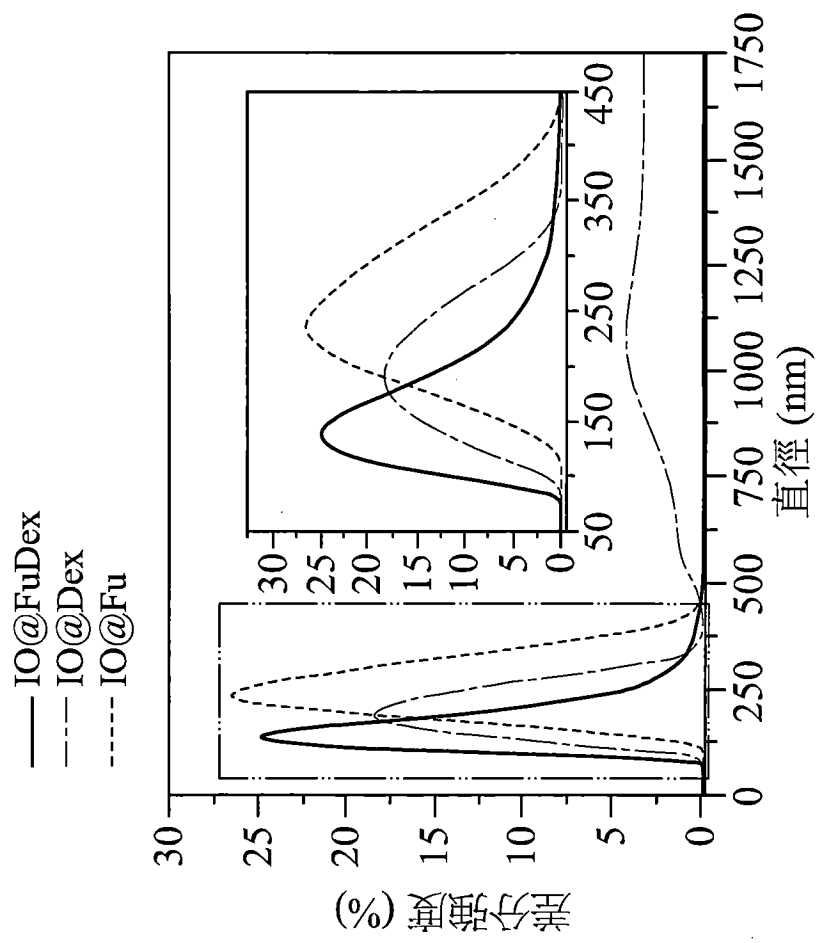
第 4A 圖



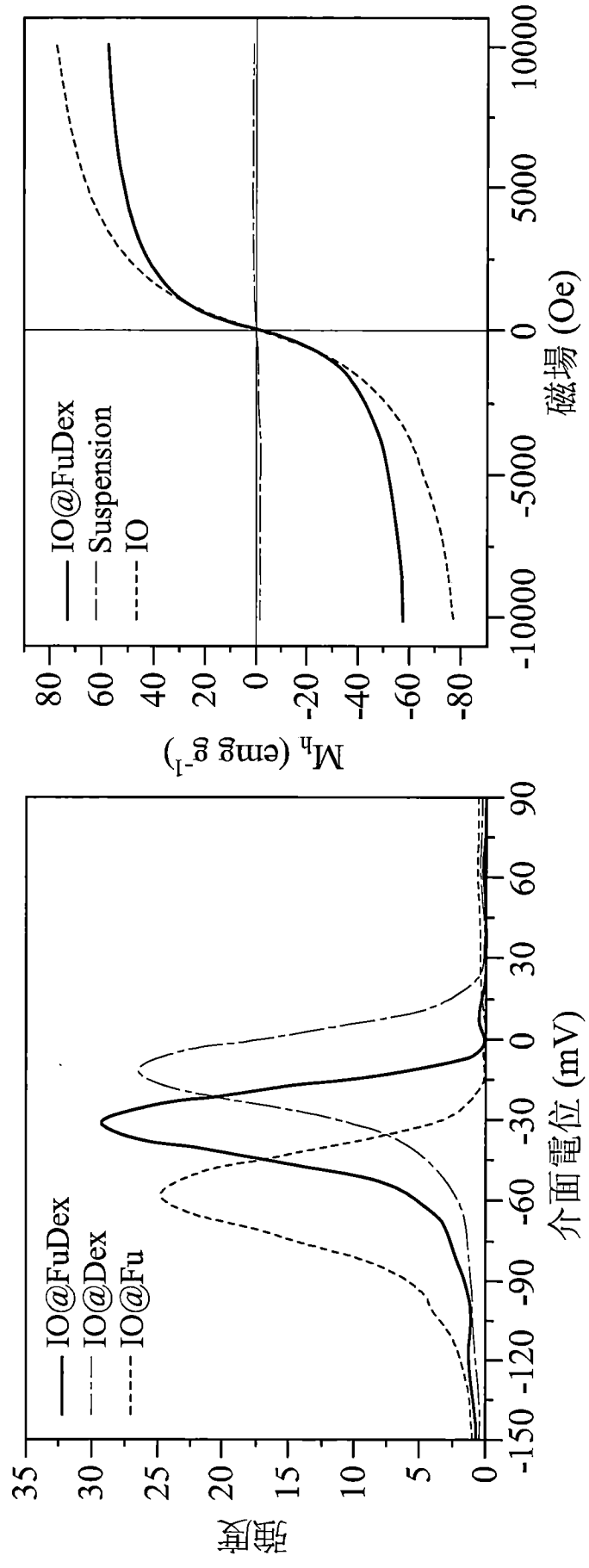
第 5B 圖



第 5A 圖

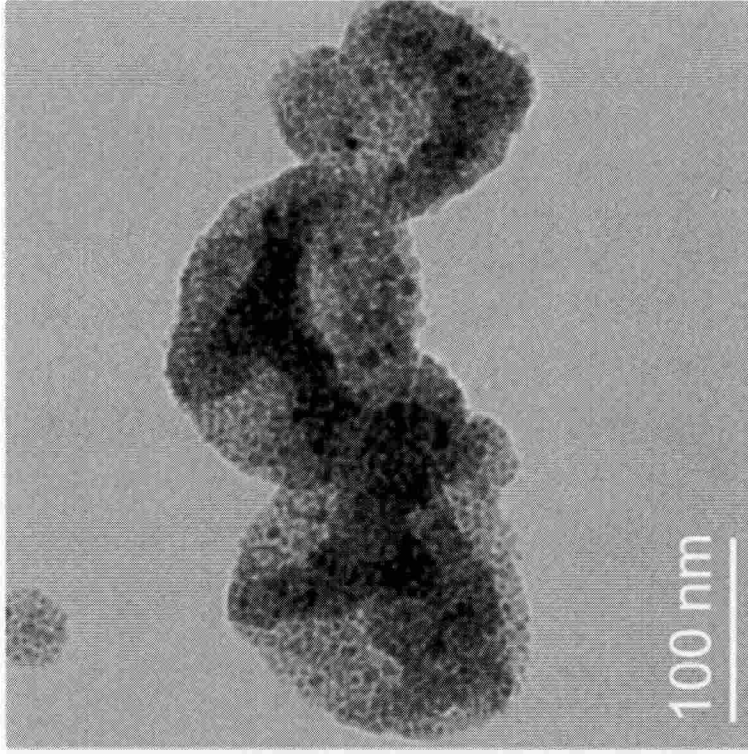


第6A圖

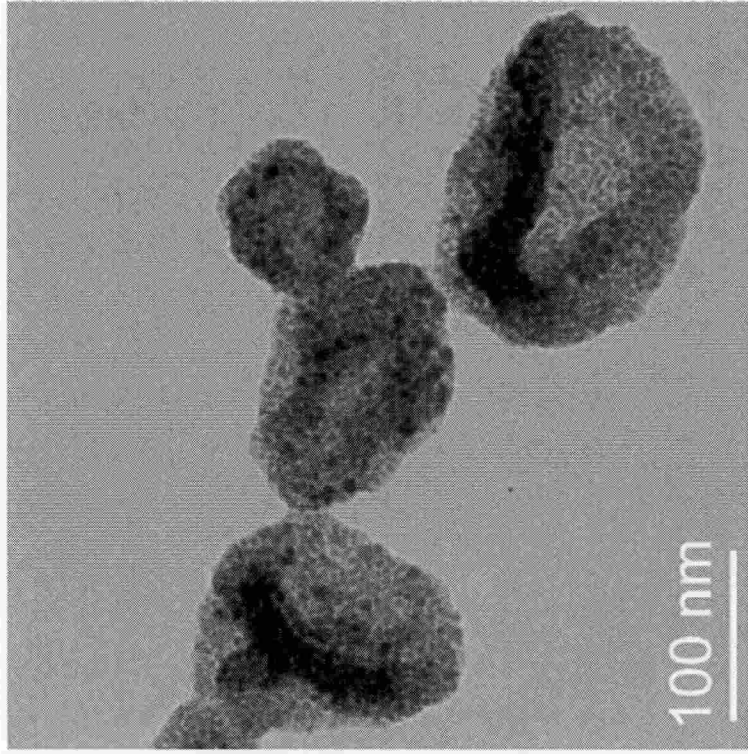


第 6B 圖

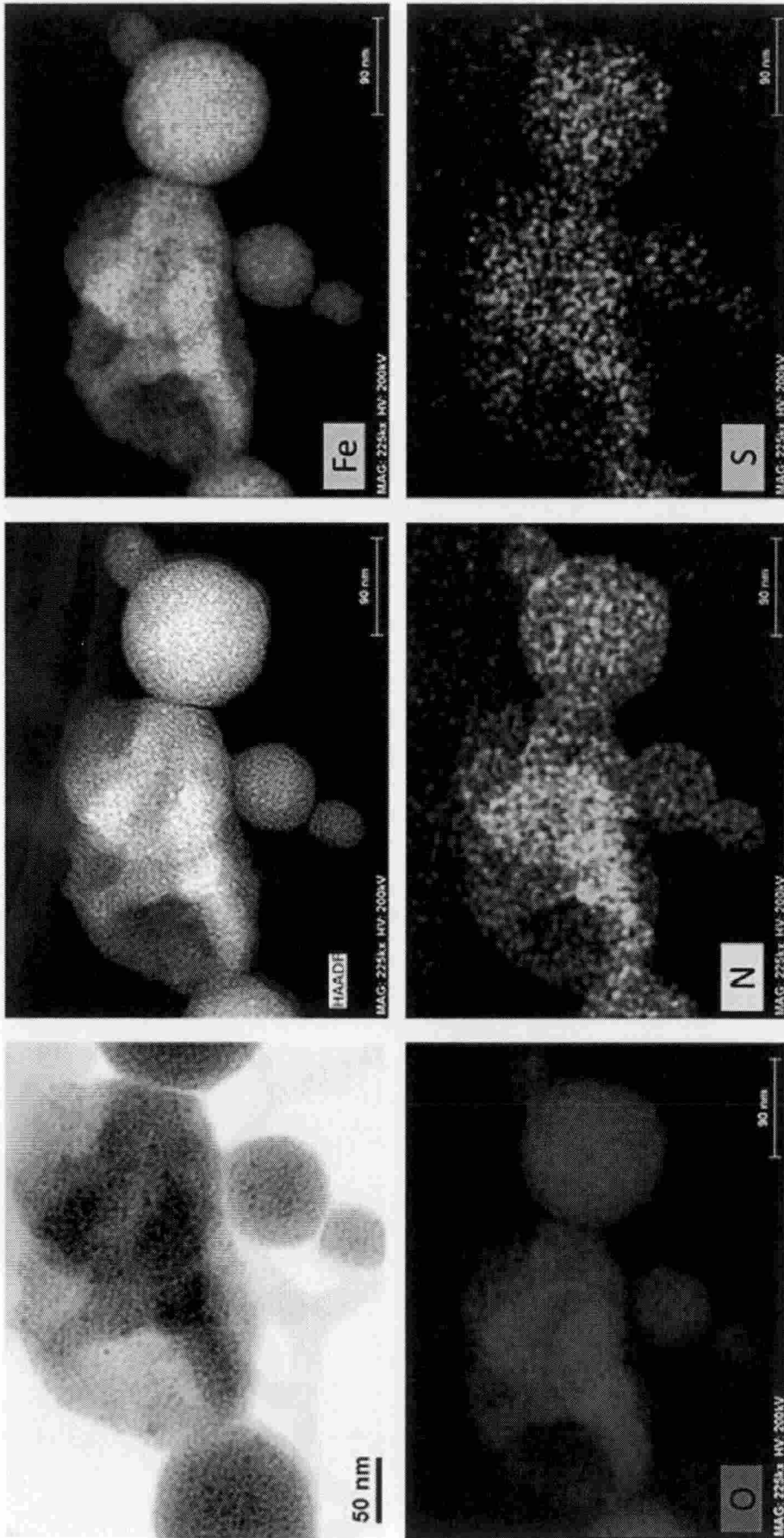
第 6C 圖



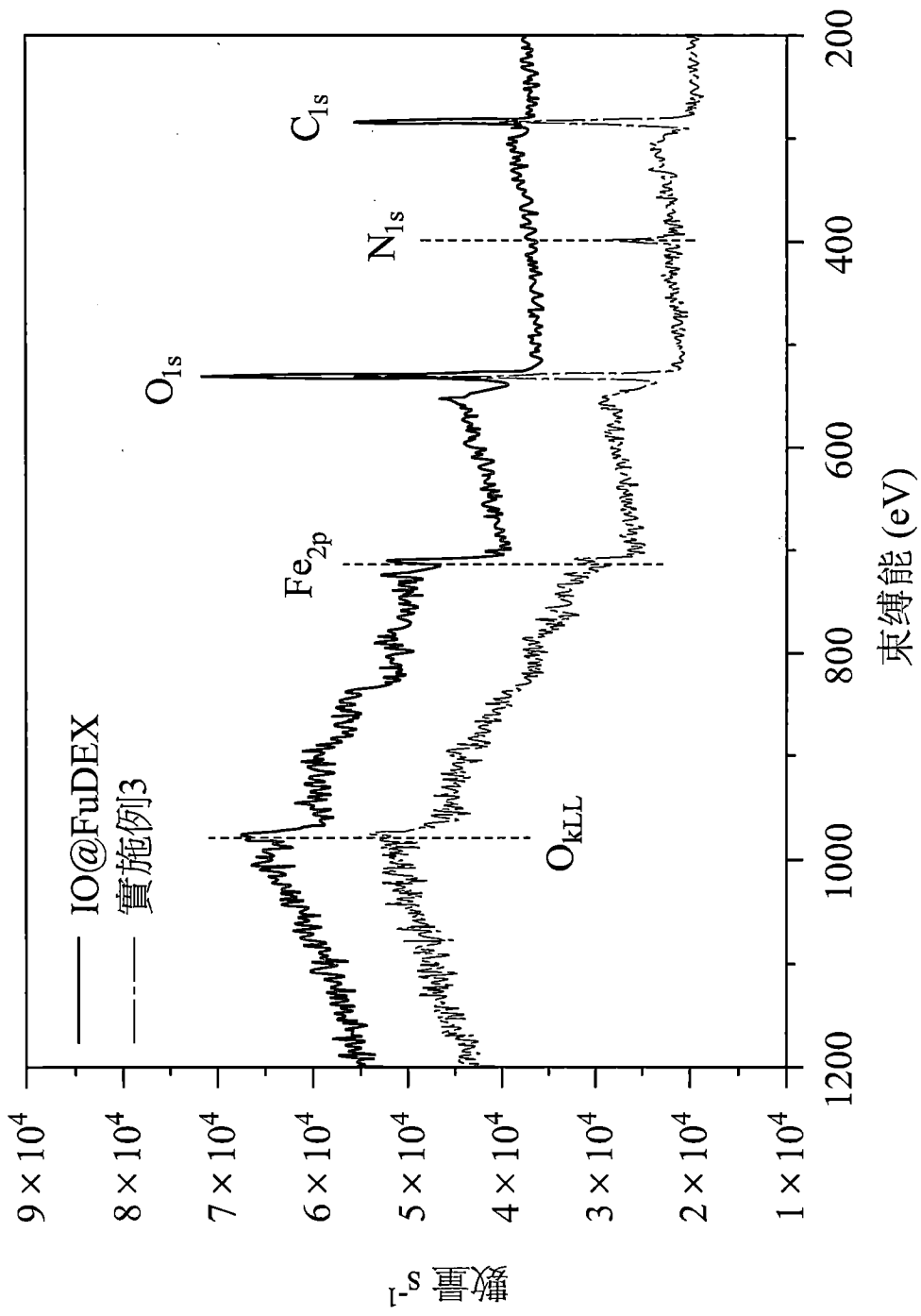
第 7B 圖



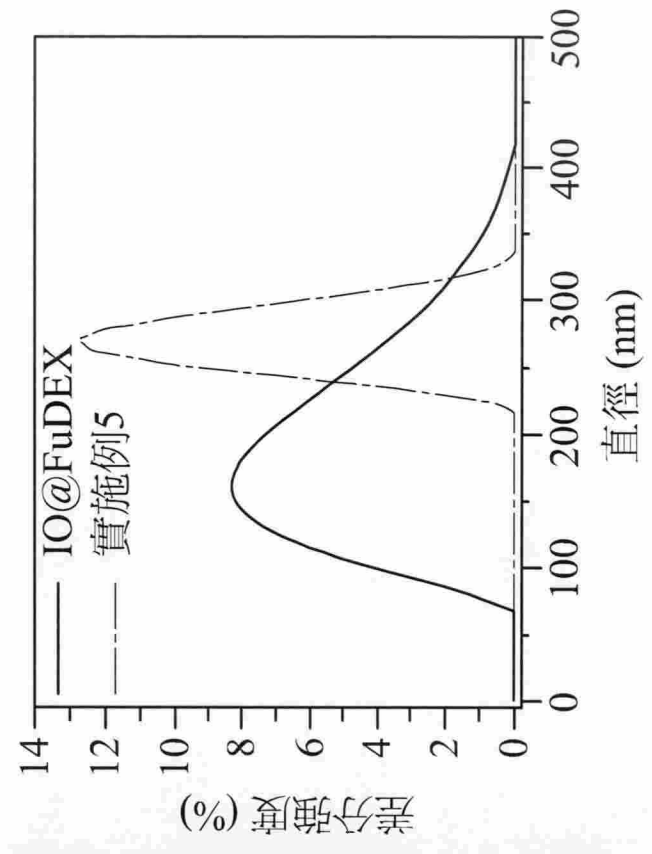
第 7A 圖



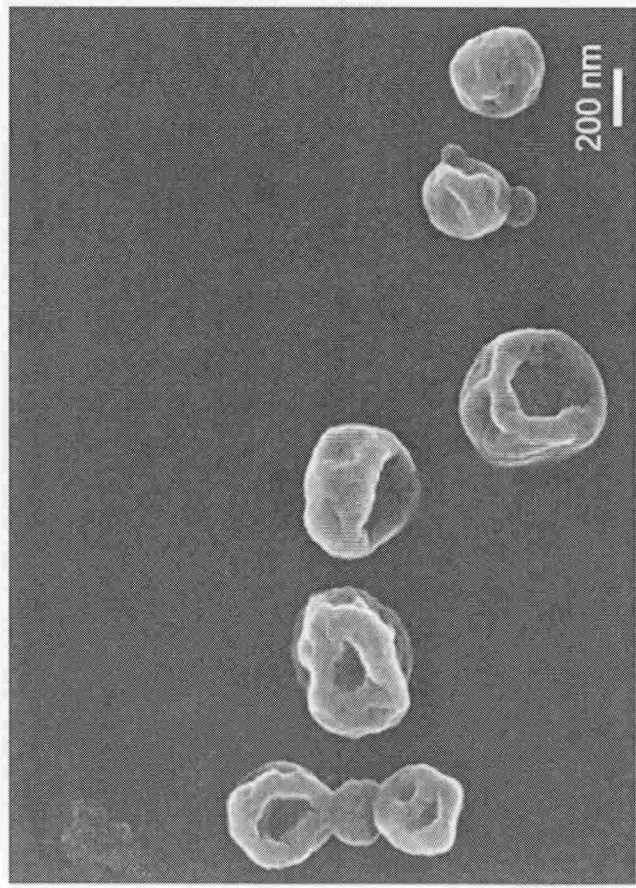
第 8 圖



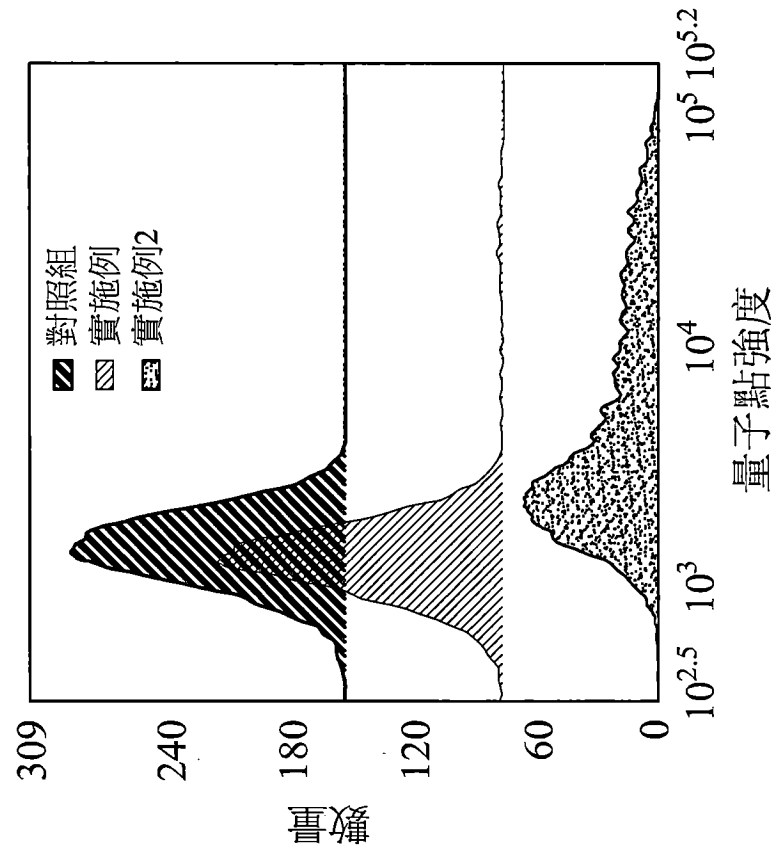
第9圖



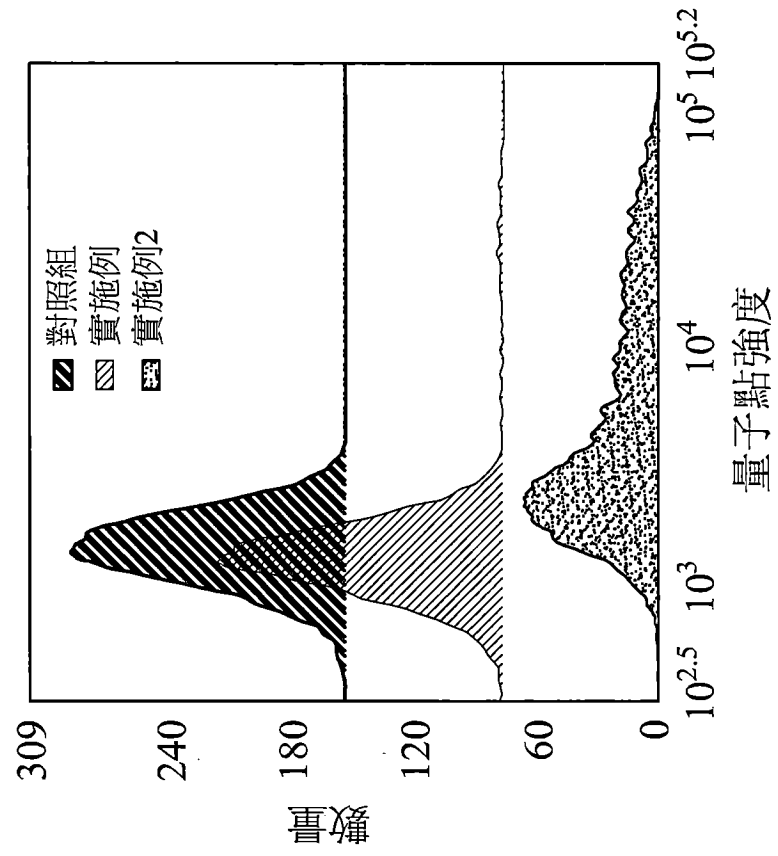
第 10B 圖



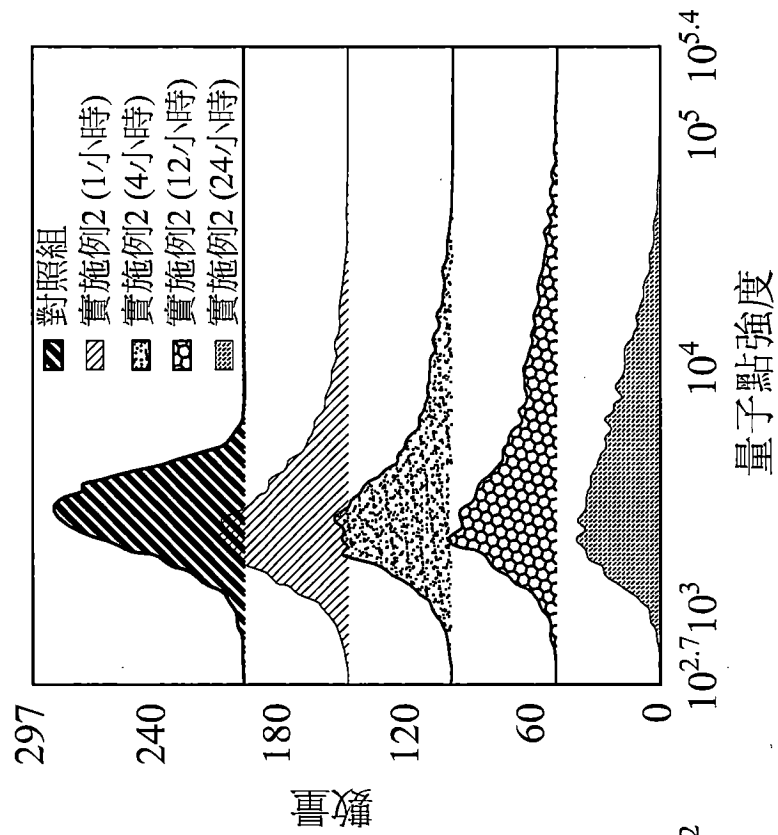
第 10A 圖



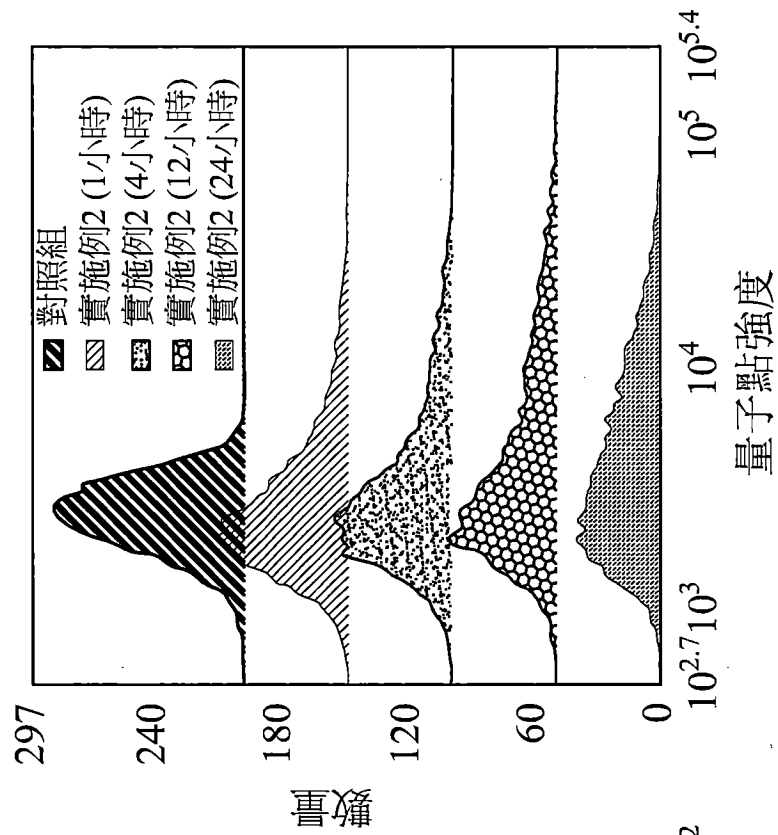
第 11A 圖



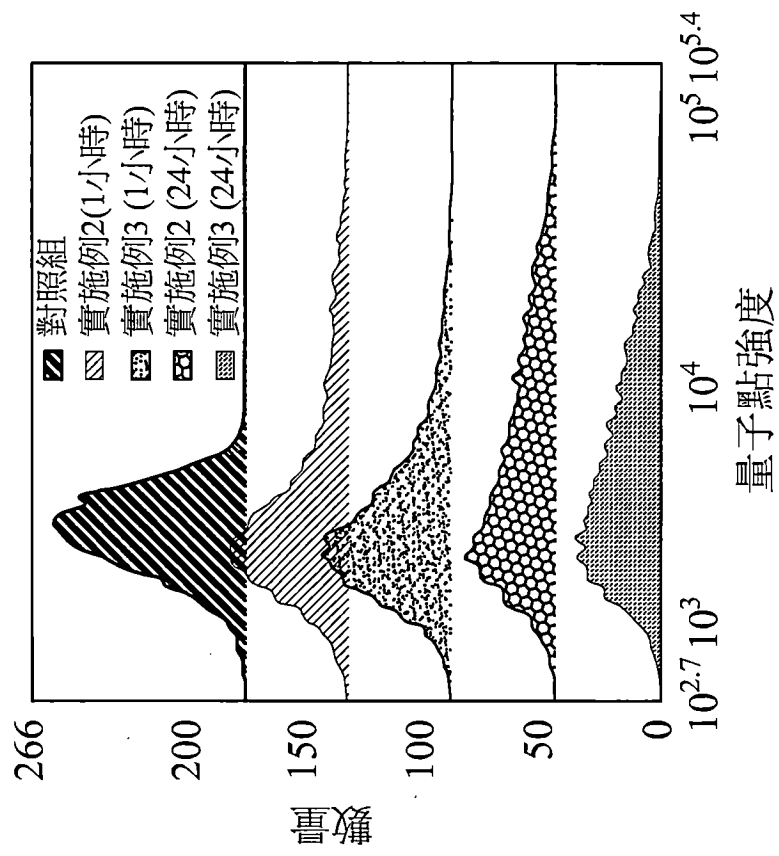
第 11B 圖



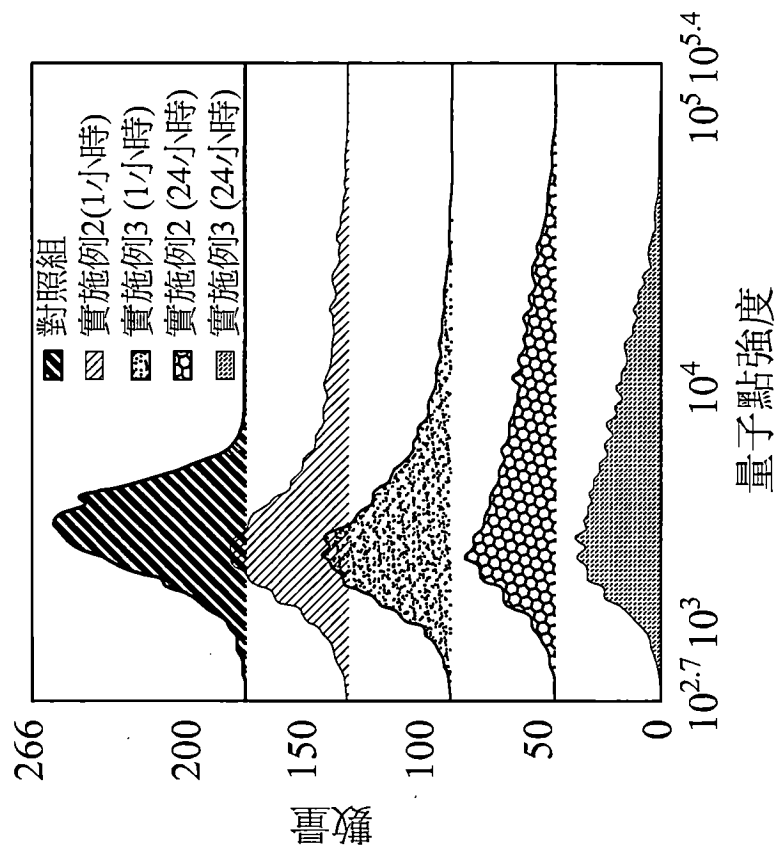
第 11C 圖



第 11D 圖



第 11E 圖



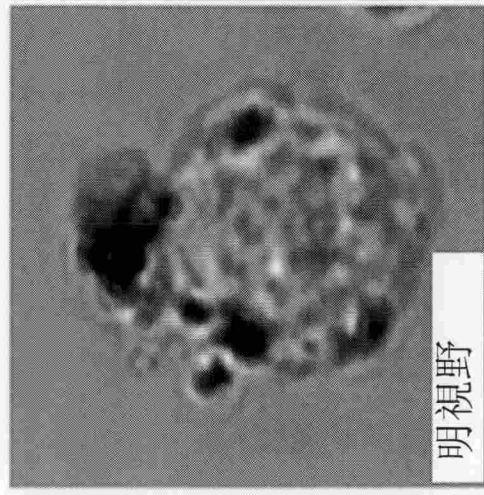
第 11F 圖



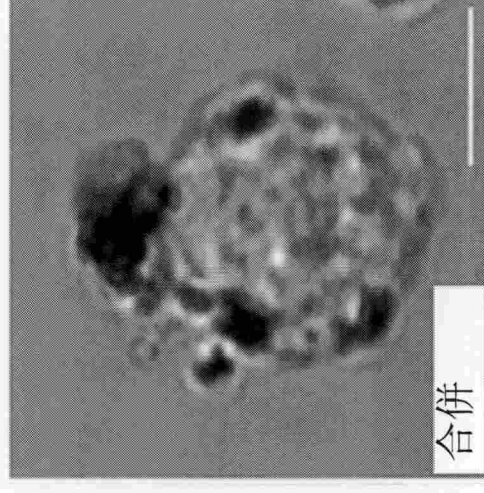
第 12A 圖



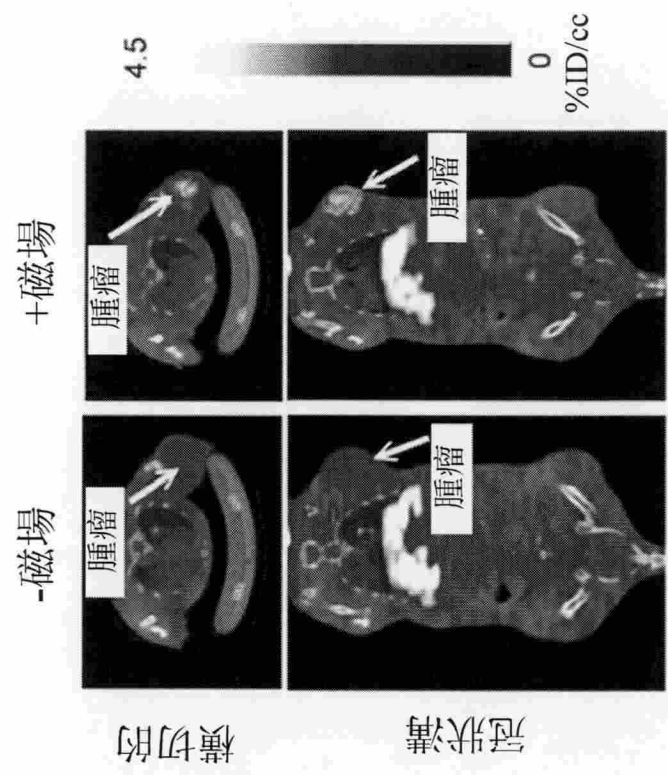
第 12B 圖



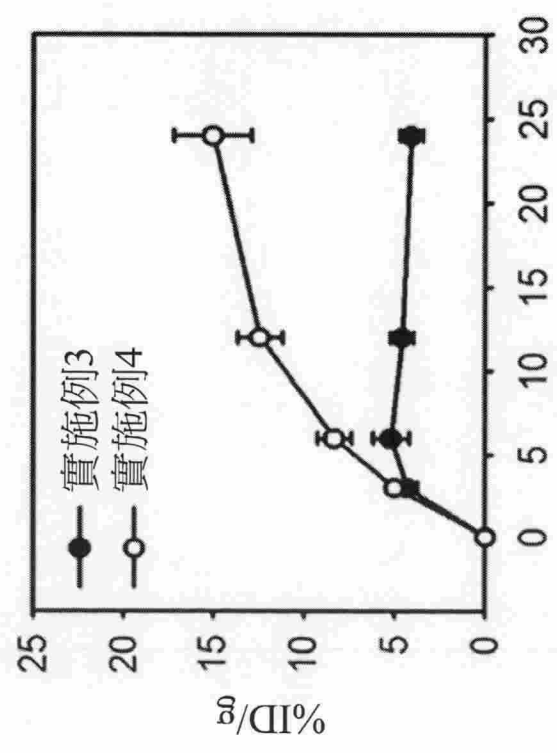
第 12C 圖



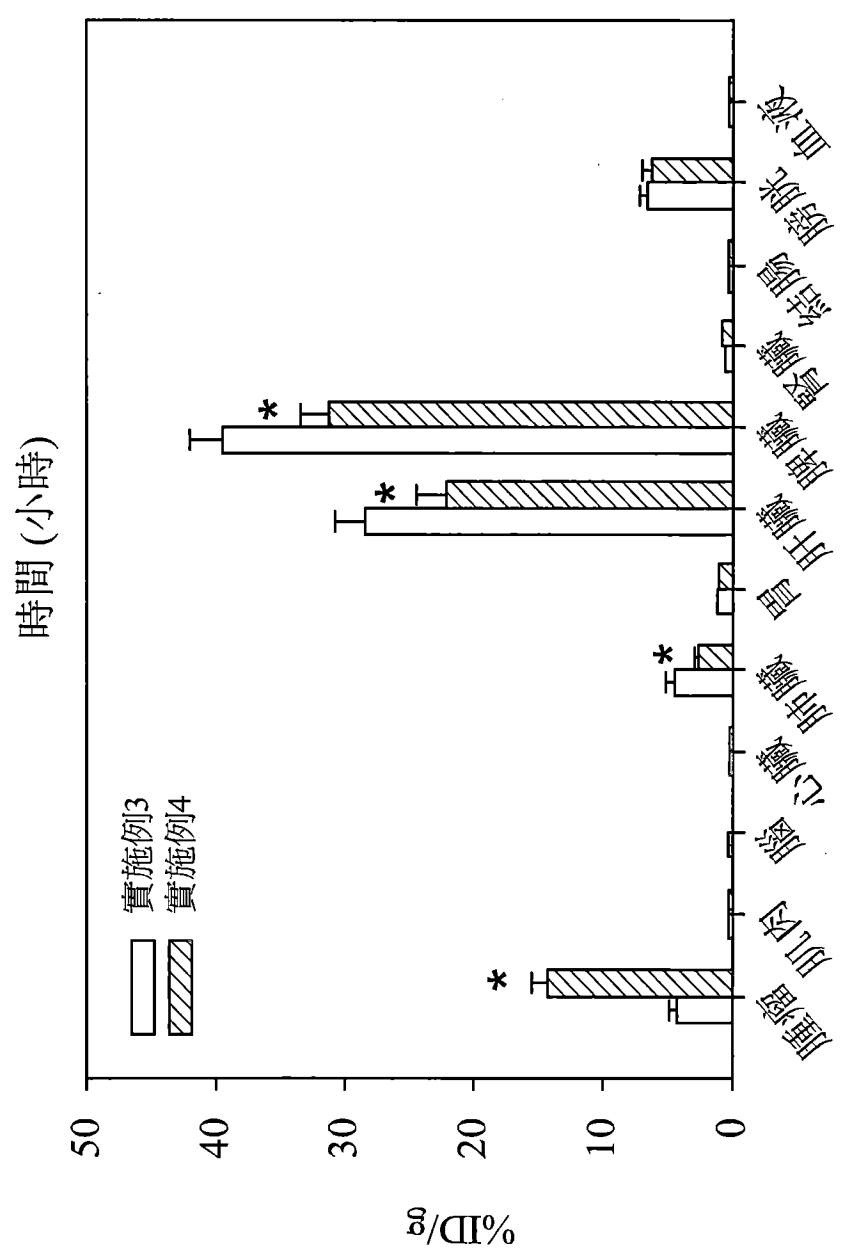
第 12D 圖



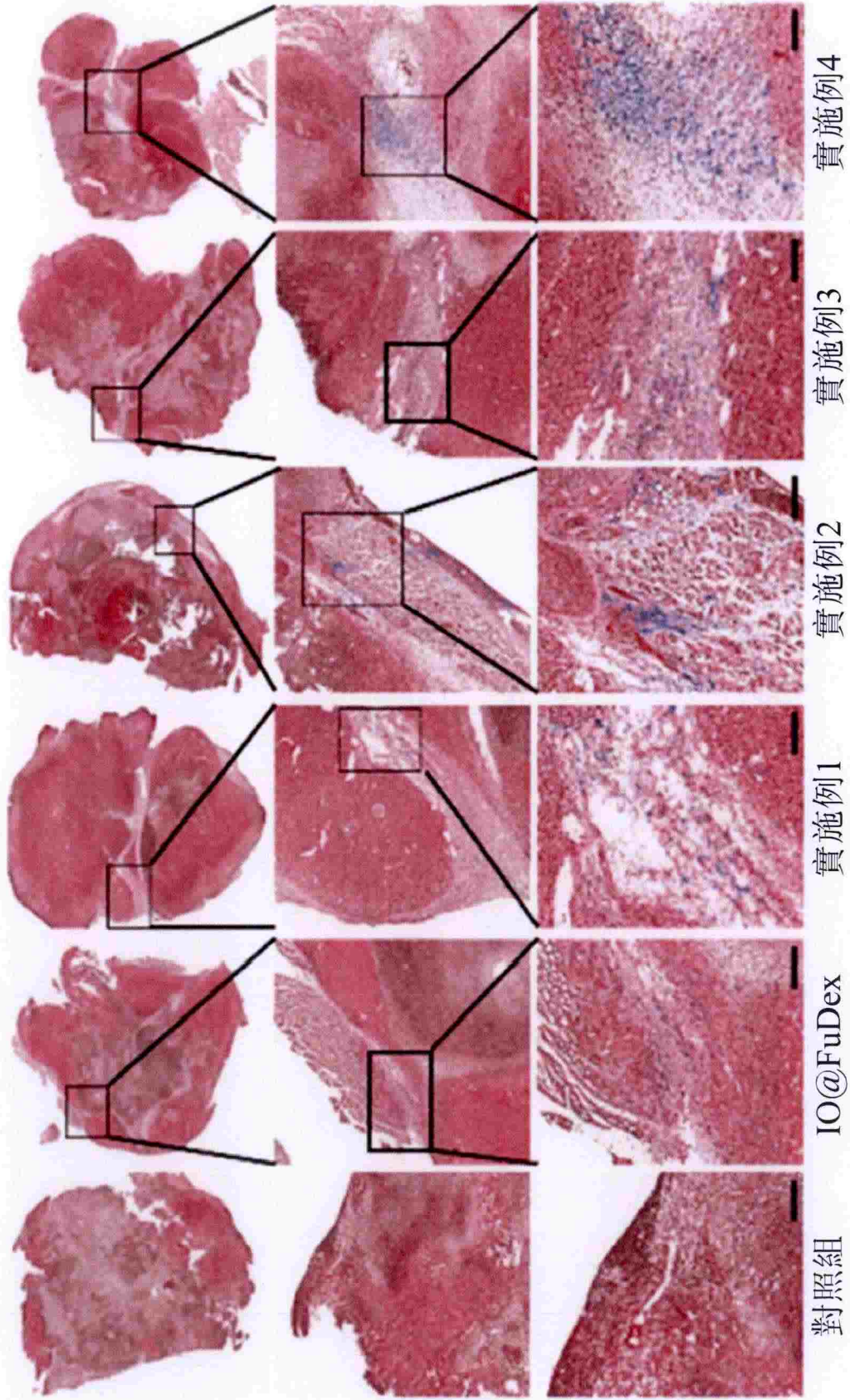
第 13B 圖



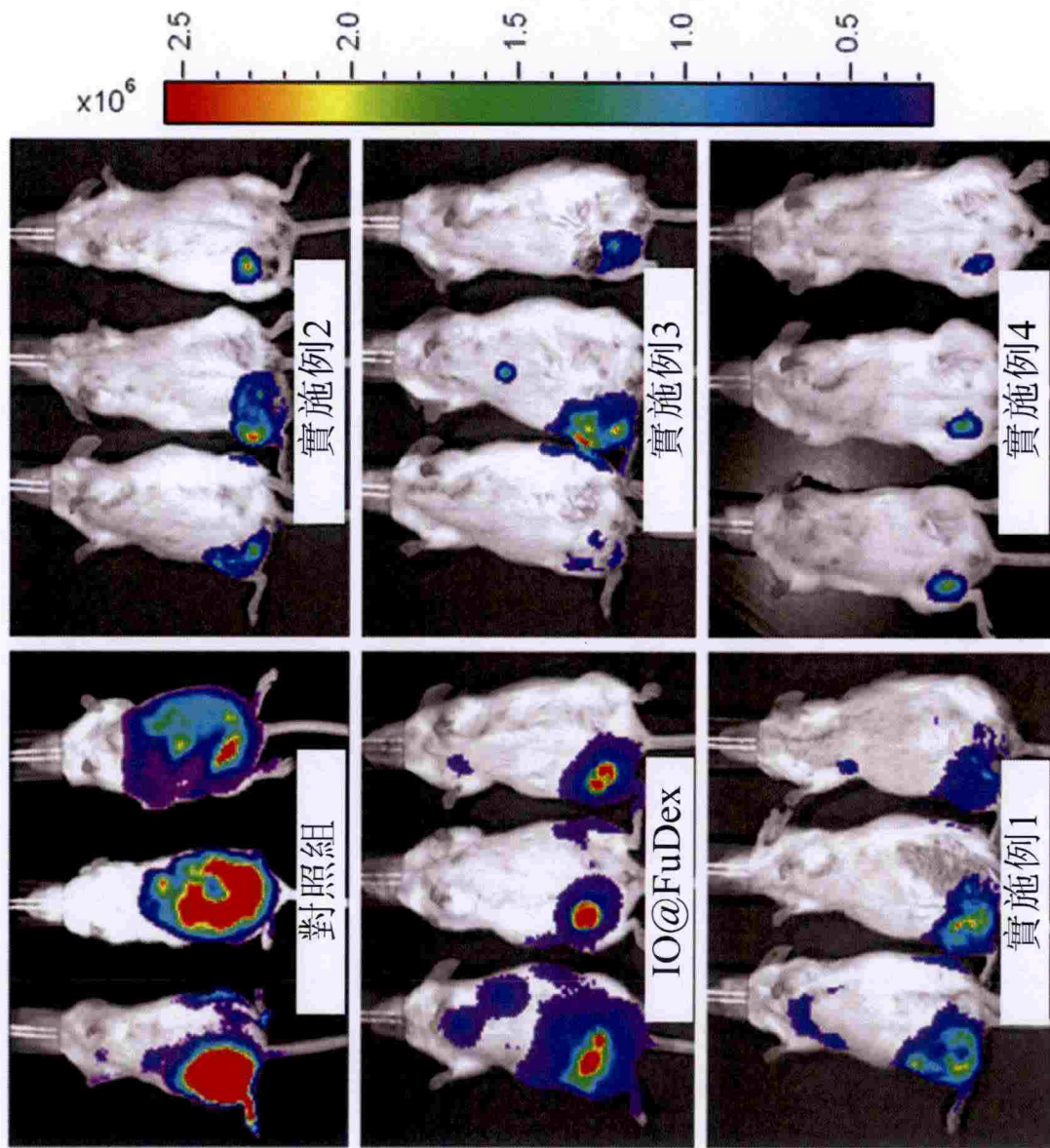
第 13A 圖



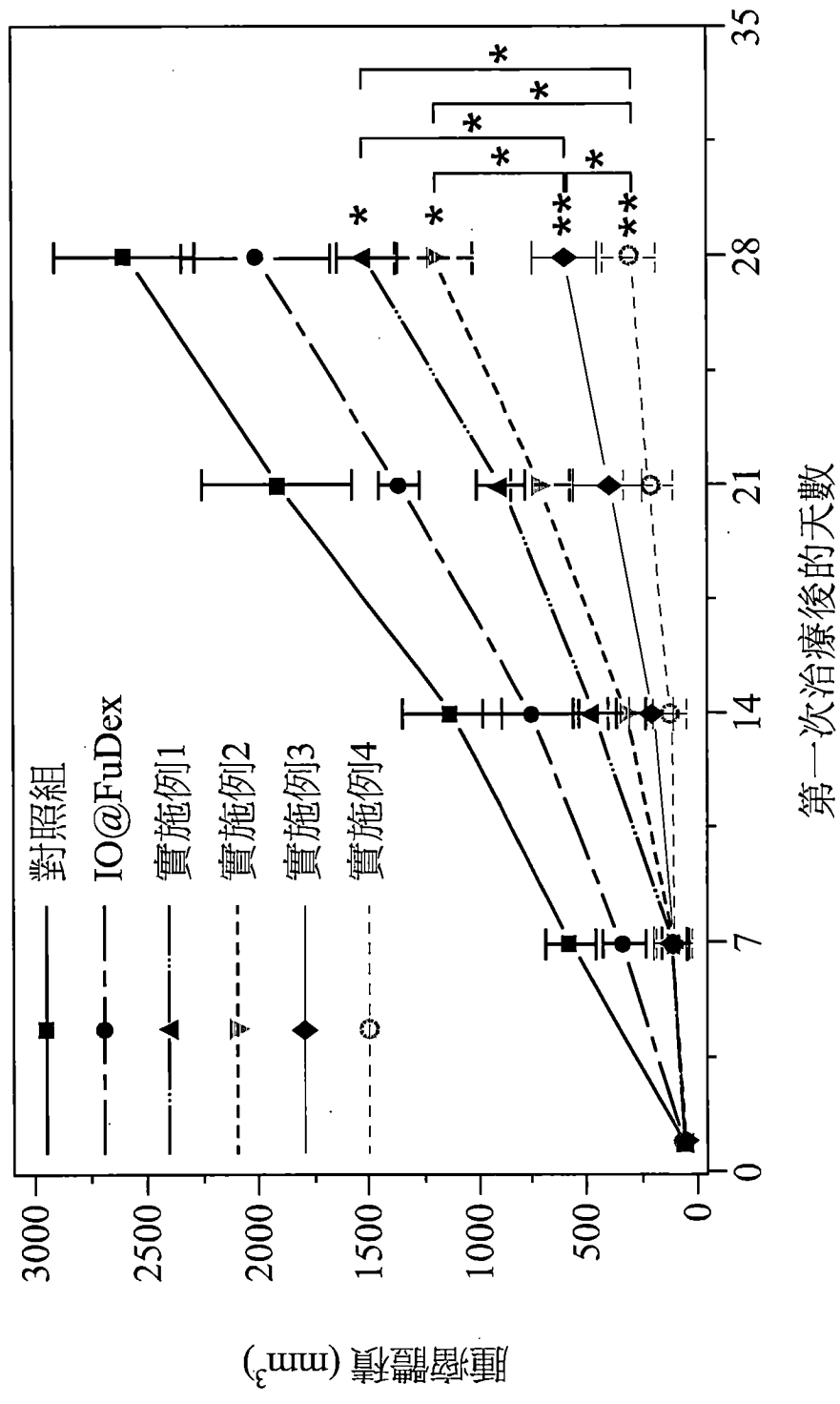
第 13C 圖



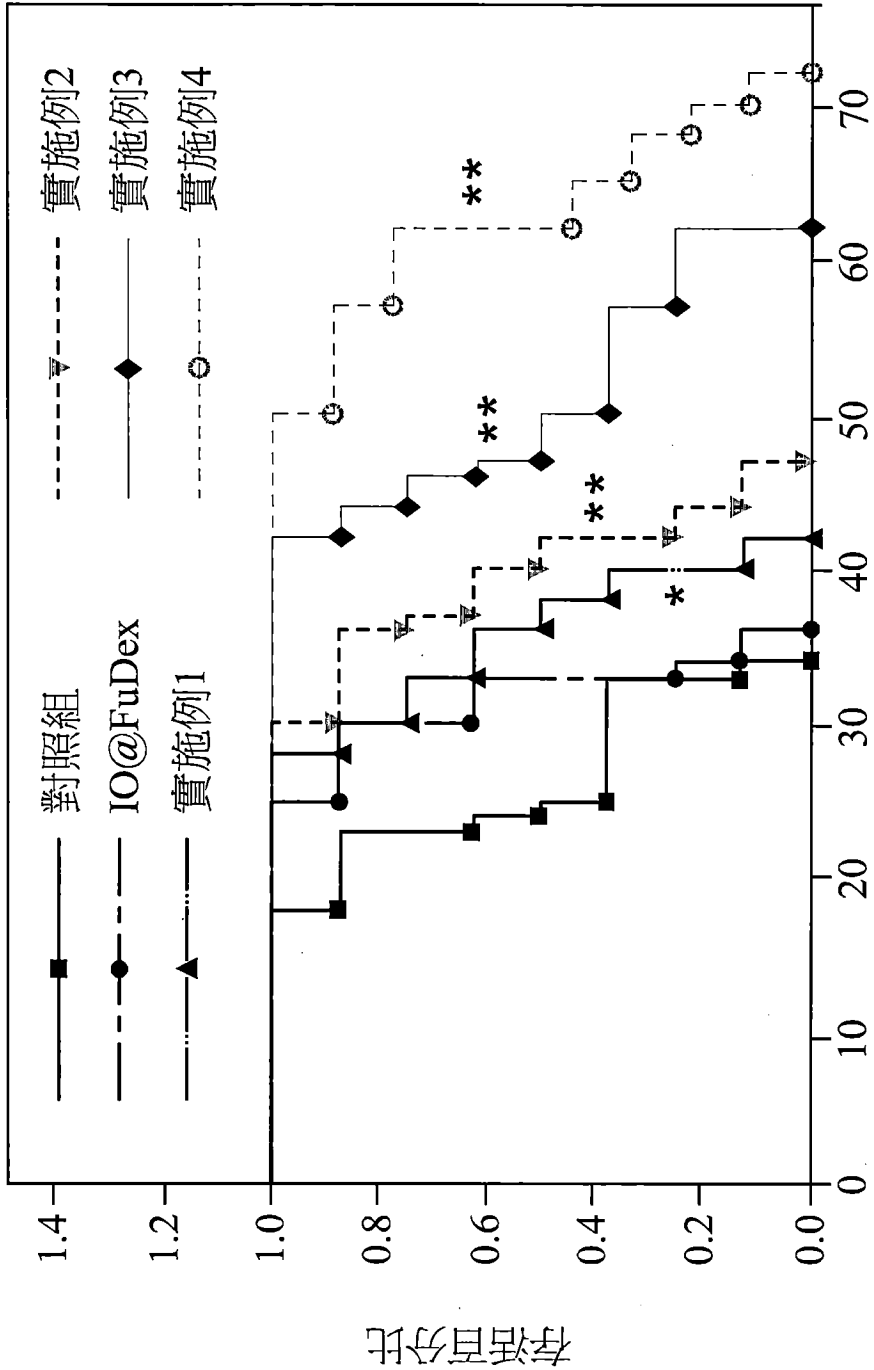
第 13D 圖



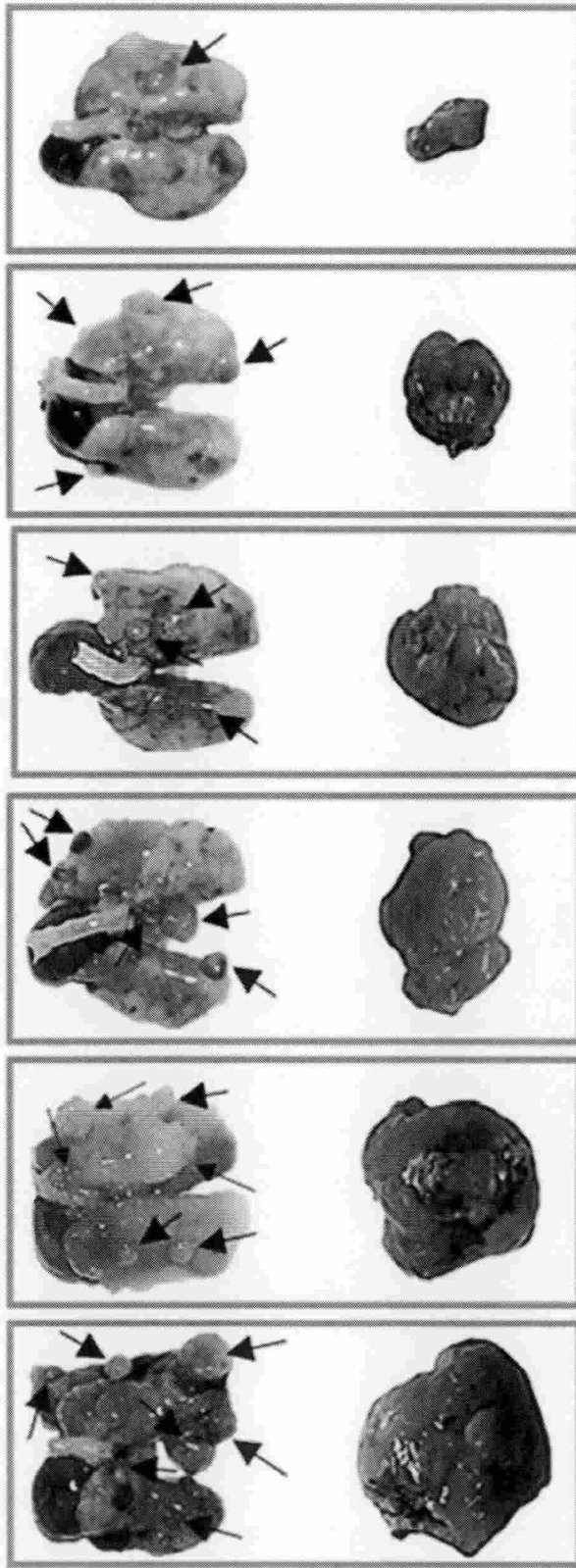
第 14A 圖



第 14B 圖



第 14C 圖



實施例4

實施例3

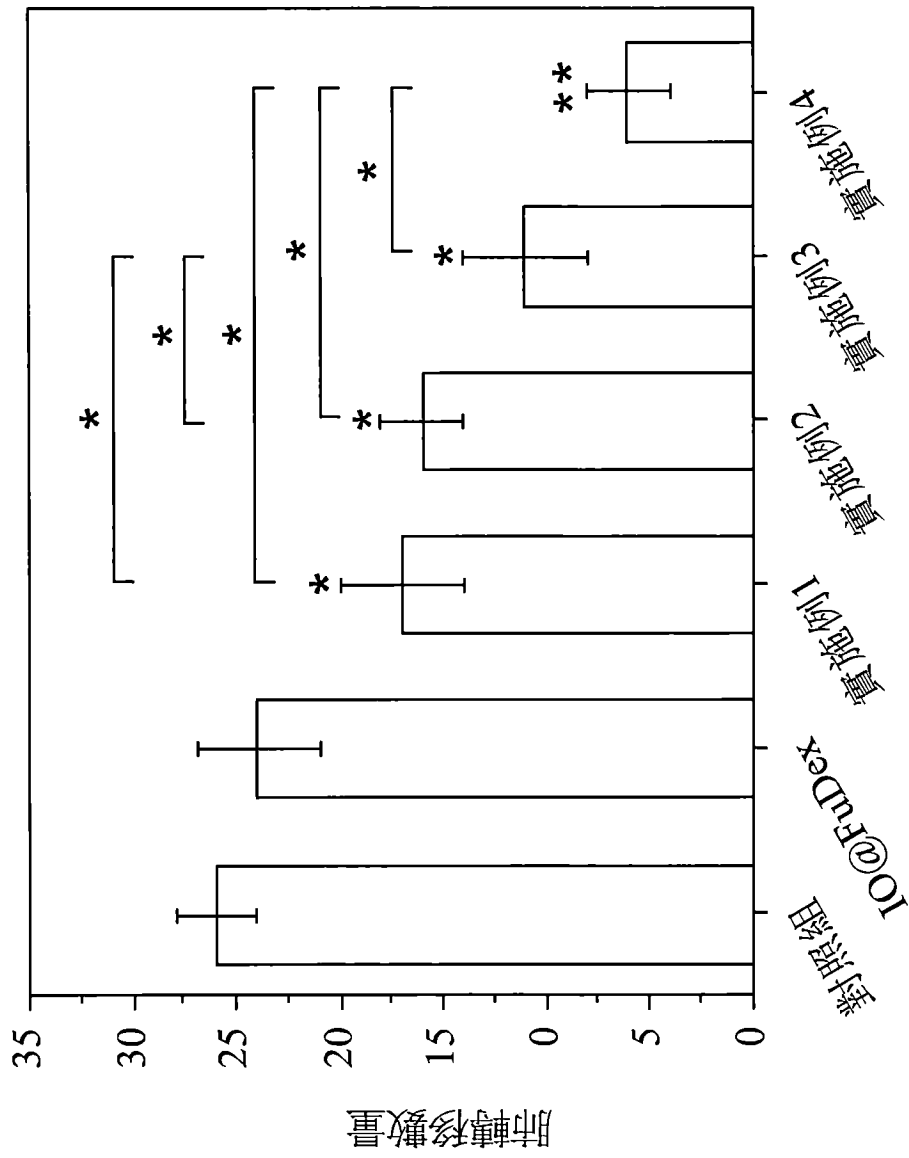
實施例2

實施例1

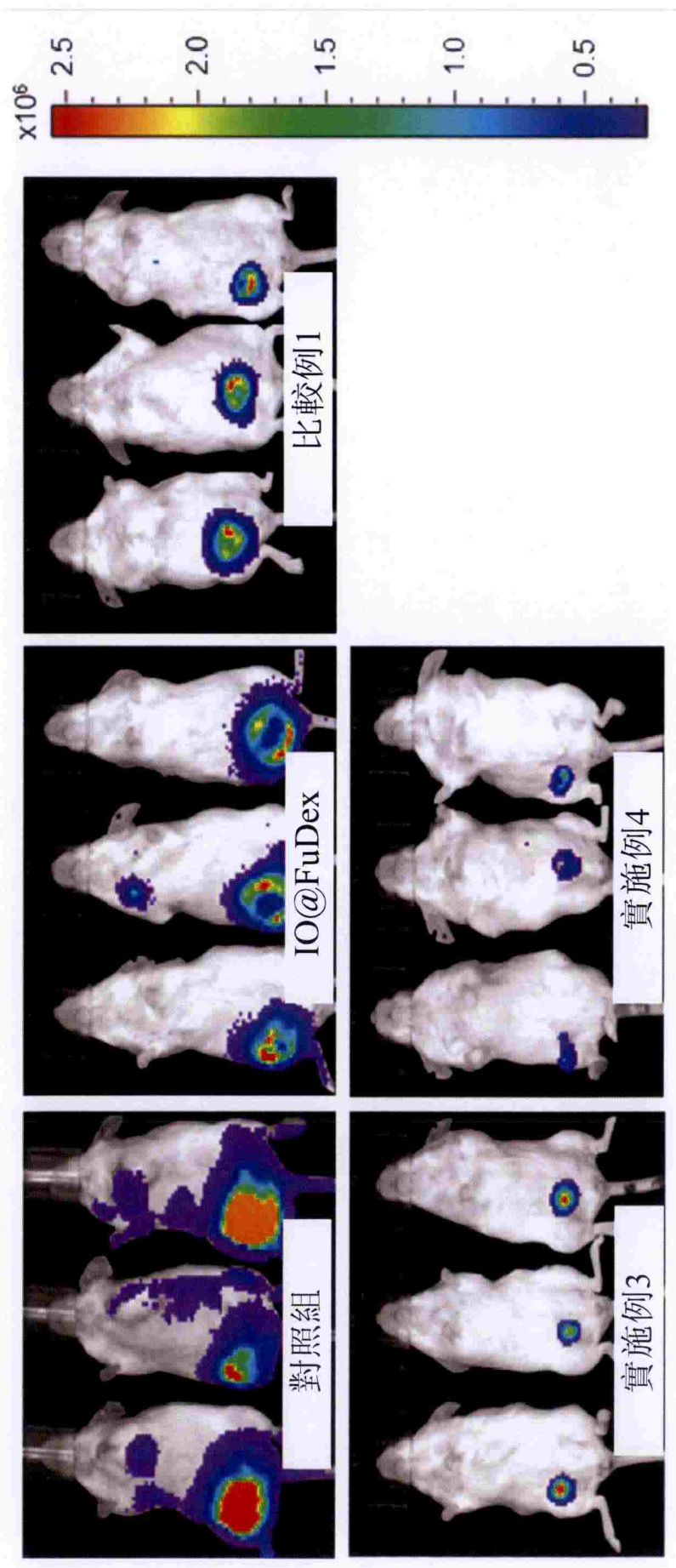
IO@FuDex

對照組

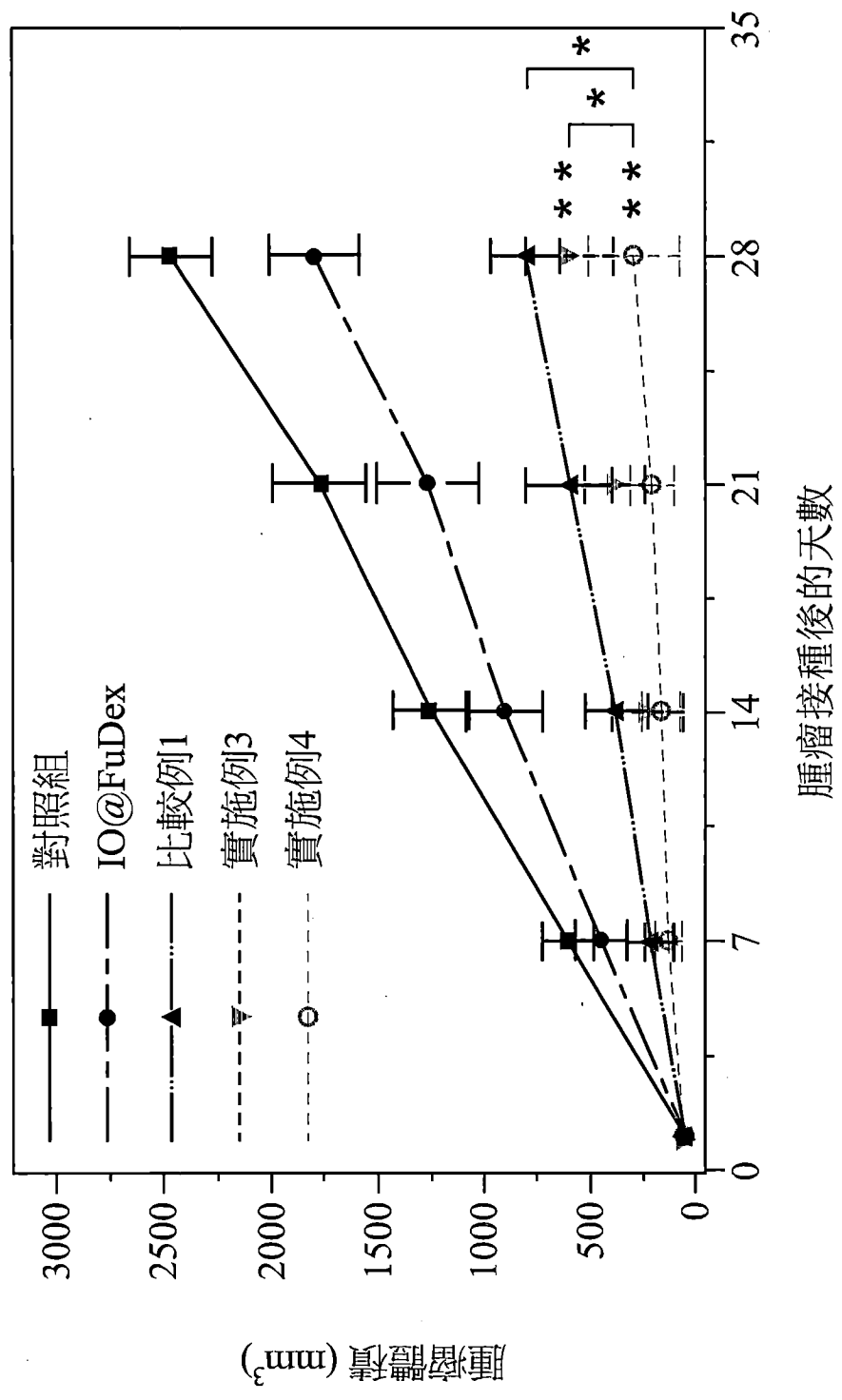
第 14D 圖



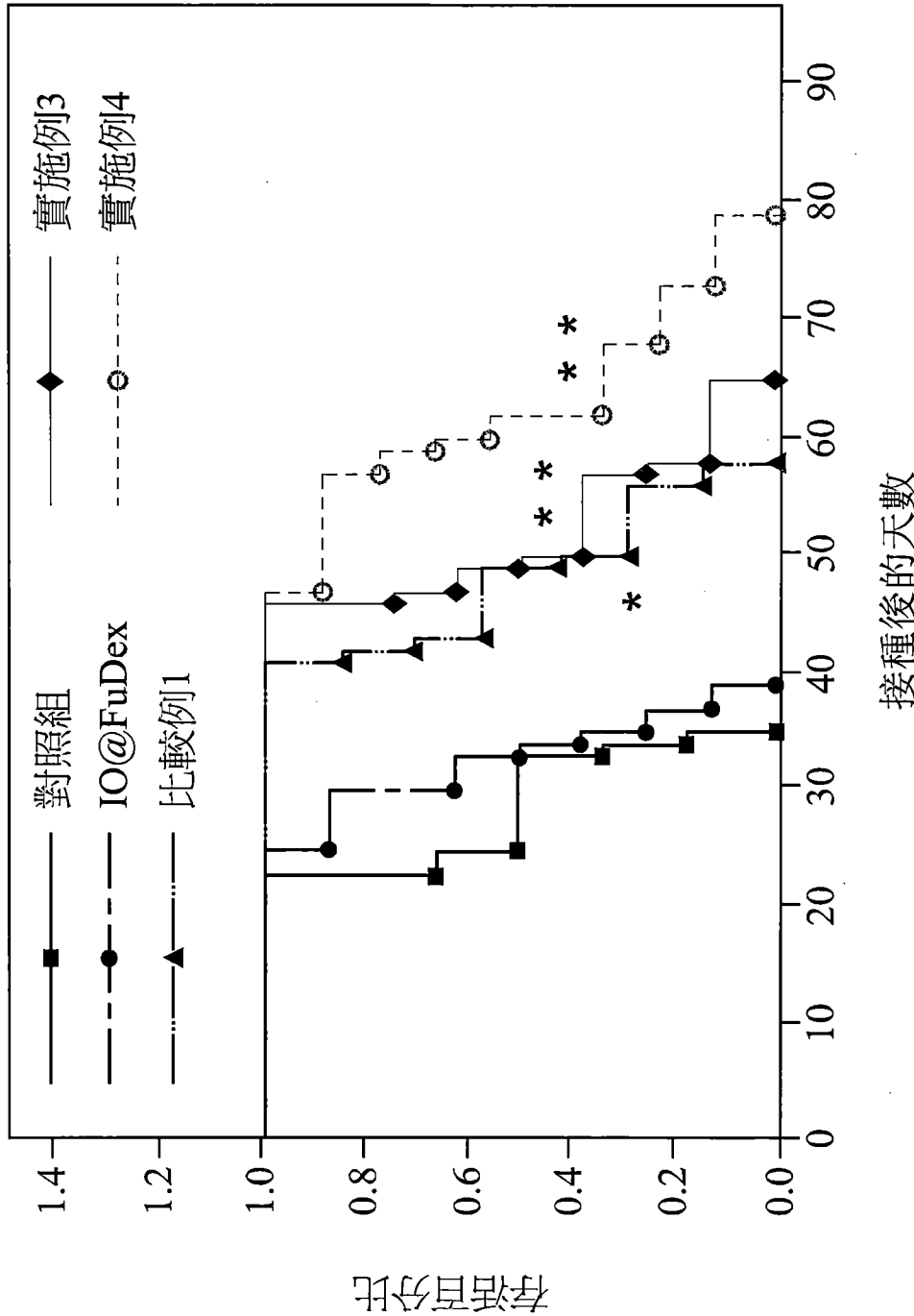
第14E圖



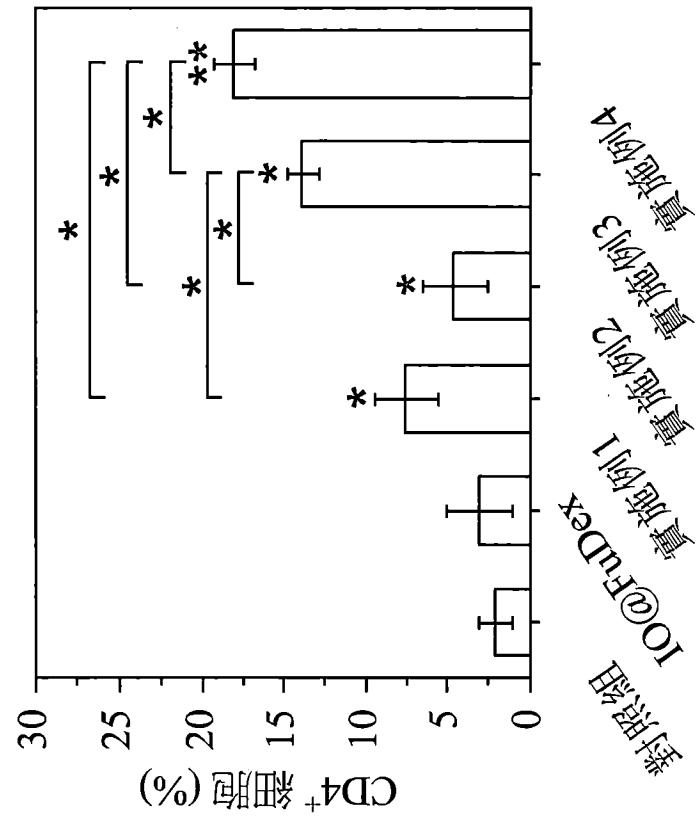
第 15A 圖



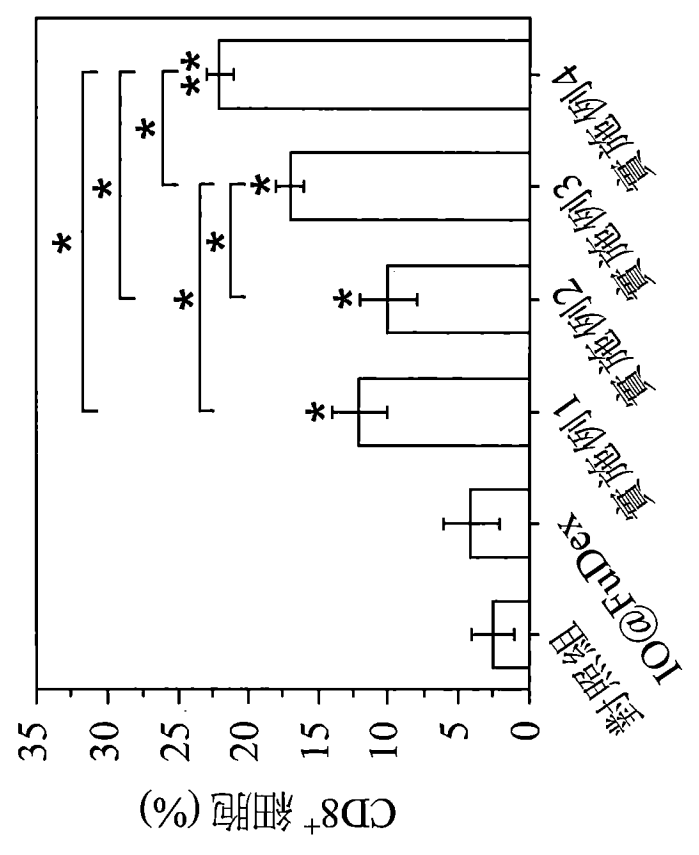
第 15B 圖



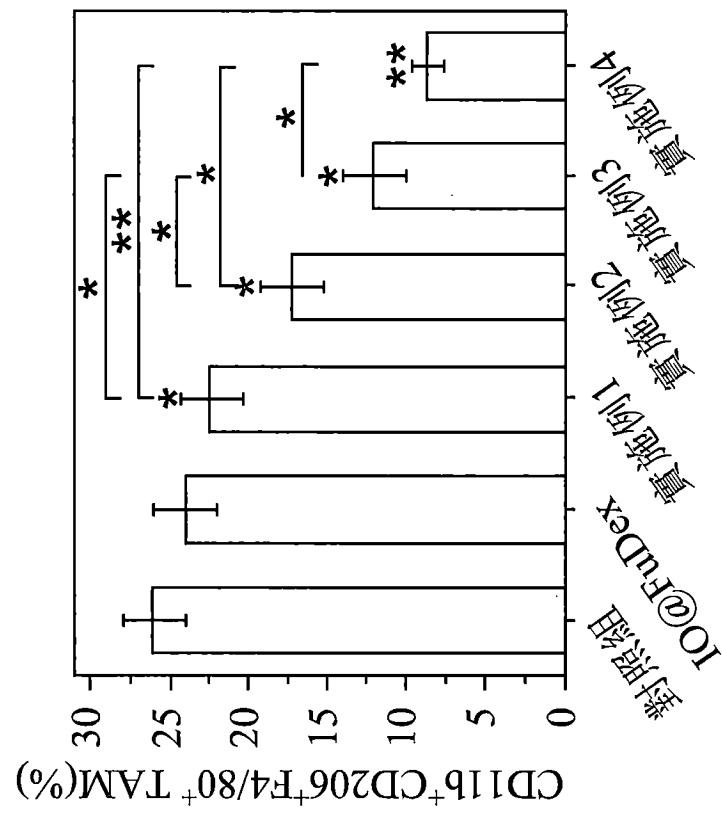
第 15C 圖



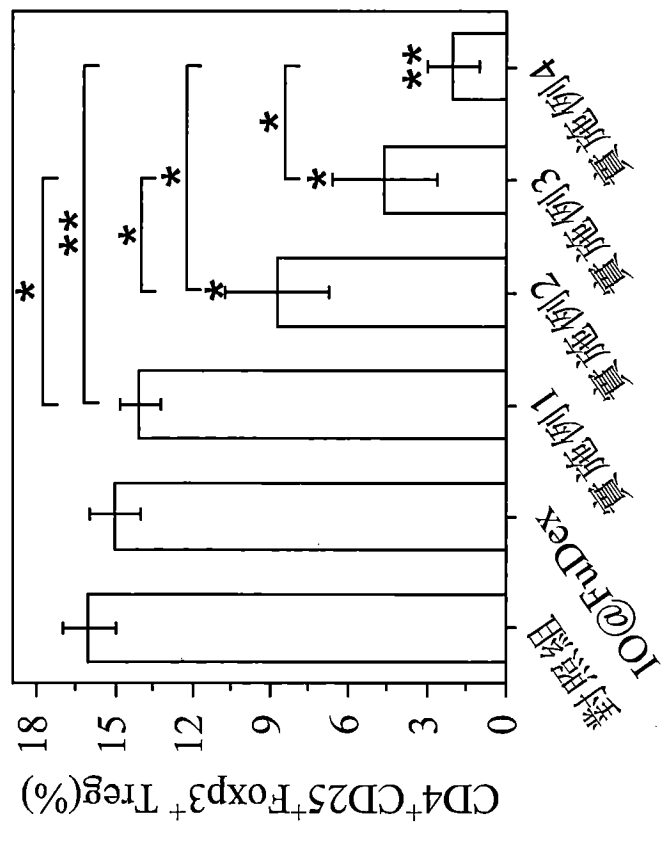
第 16B 圖



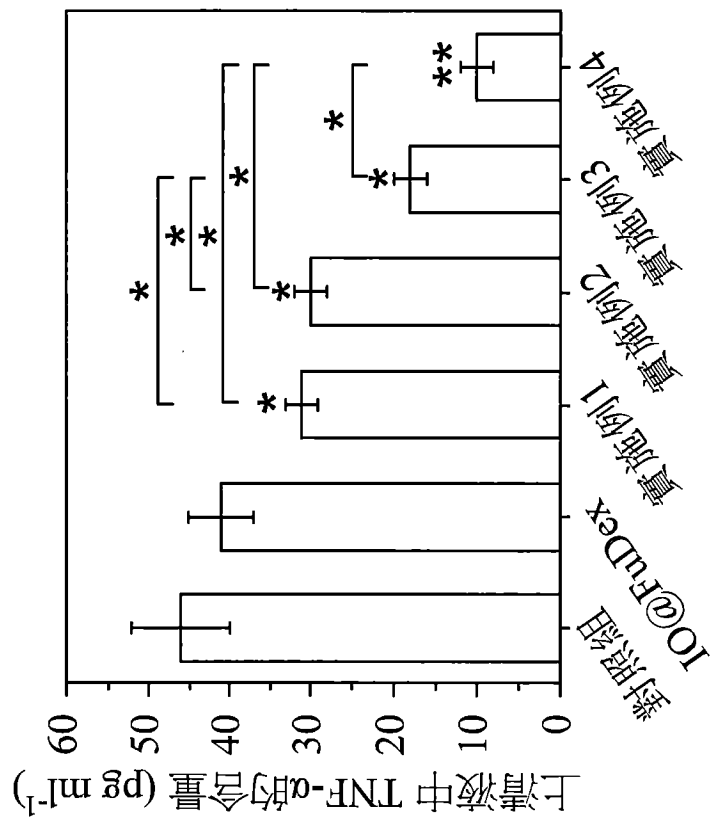
第 16A 圖



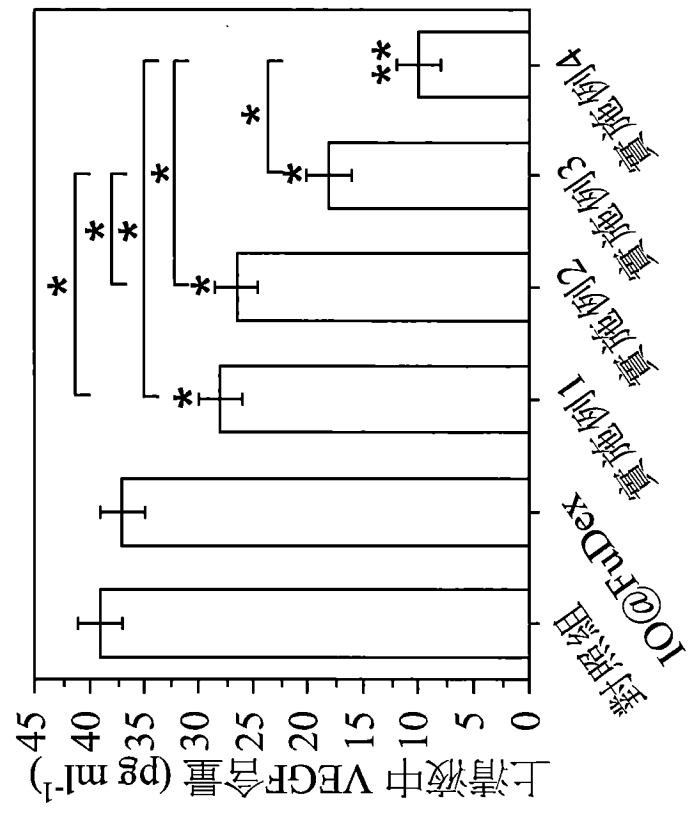
第 16D 圖



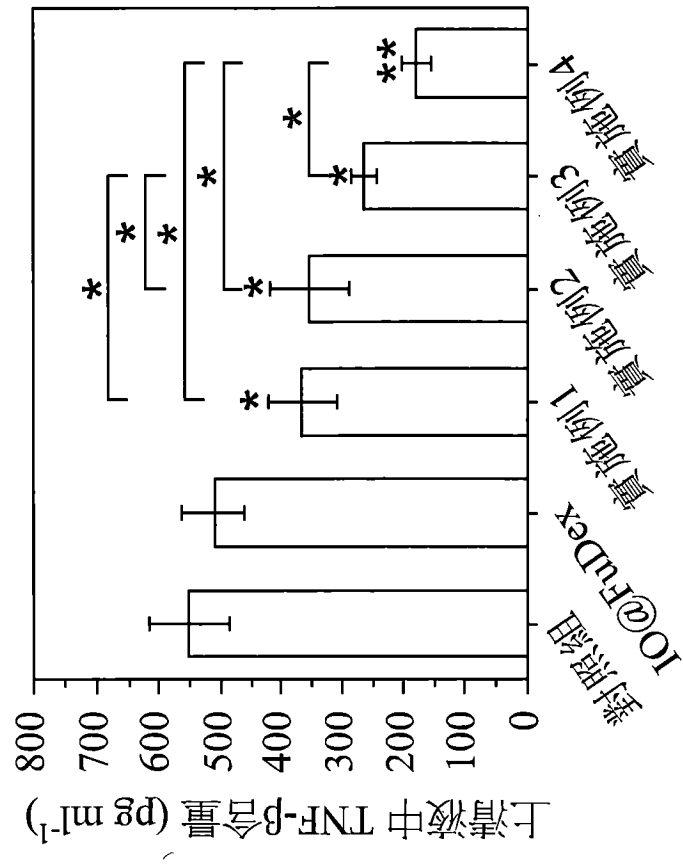
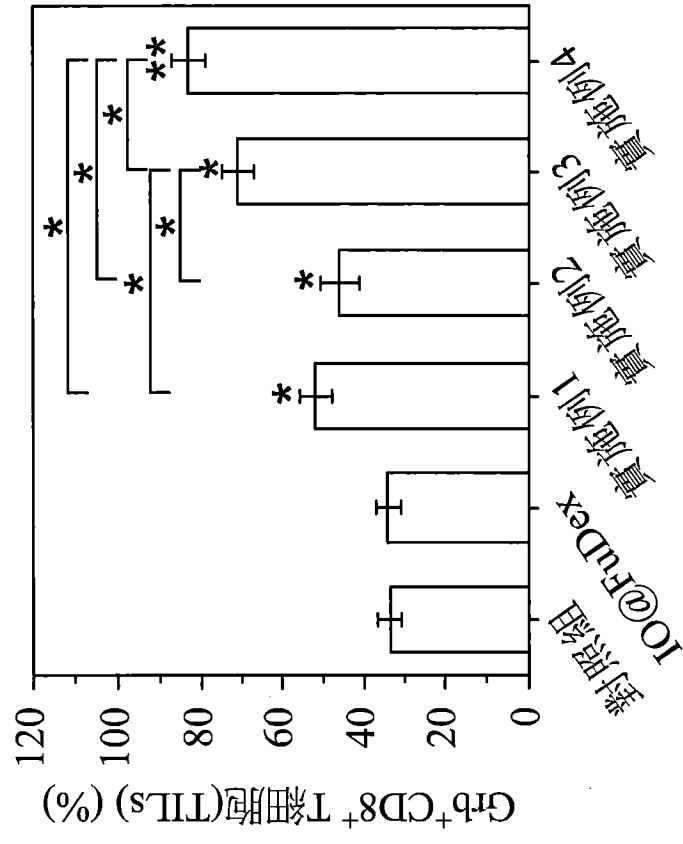
第 16C 圖



第 16E 圖

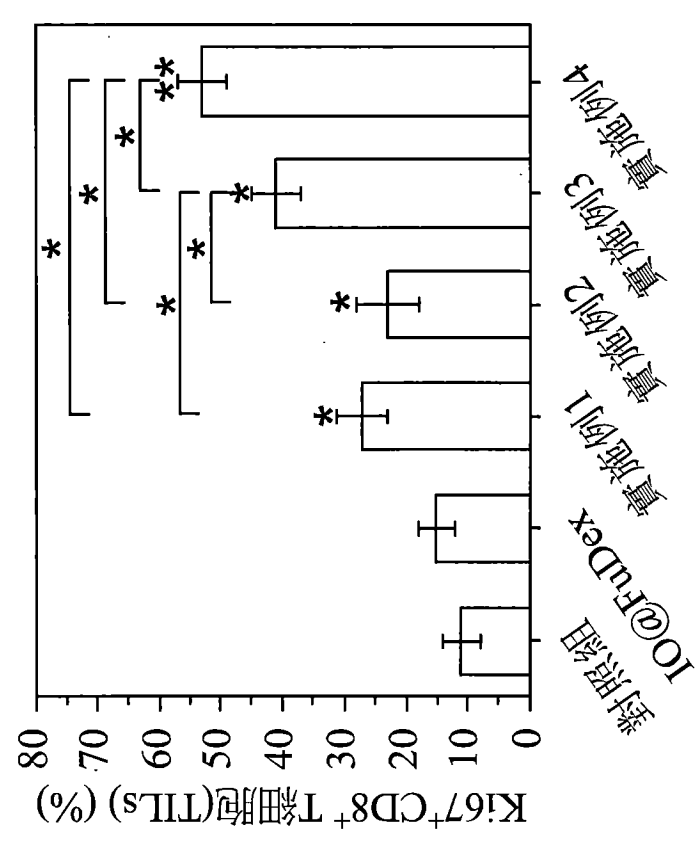


第 16F 圖

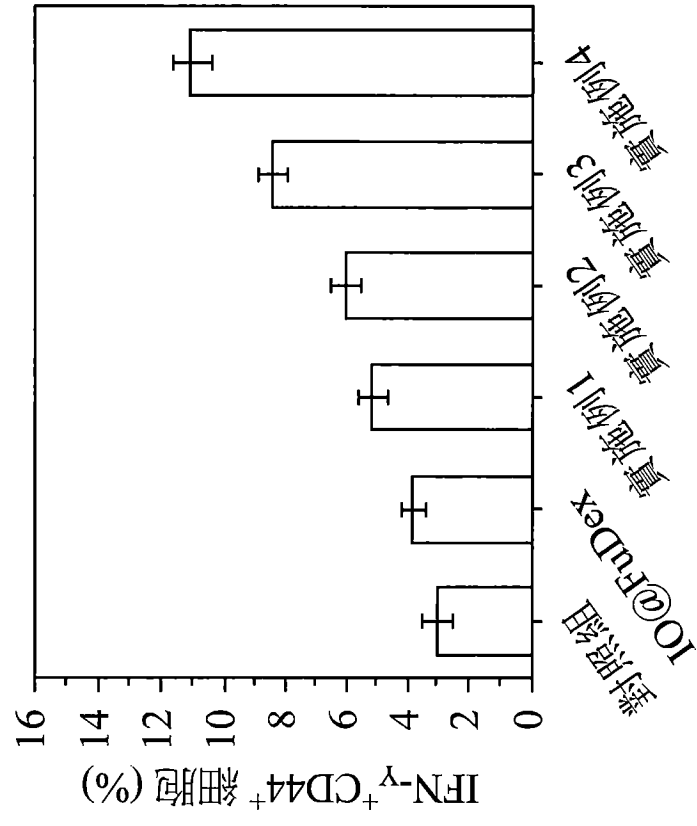


第 16H 圖

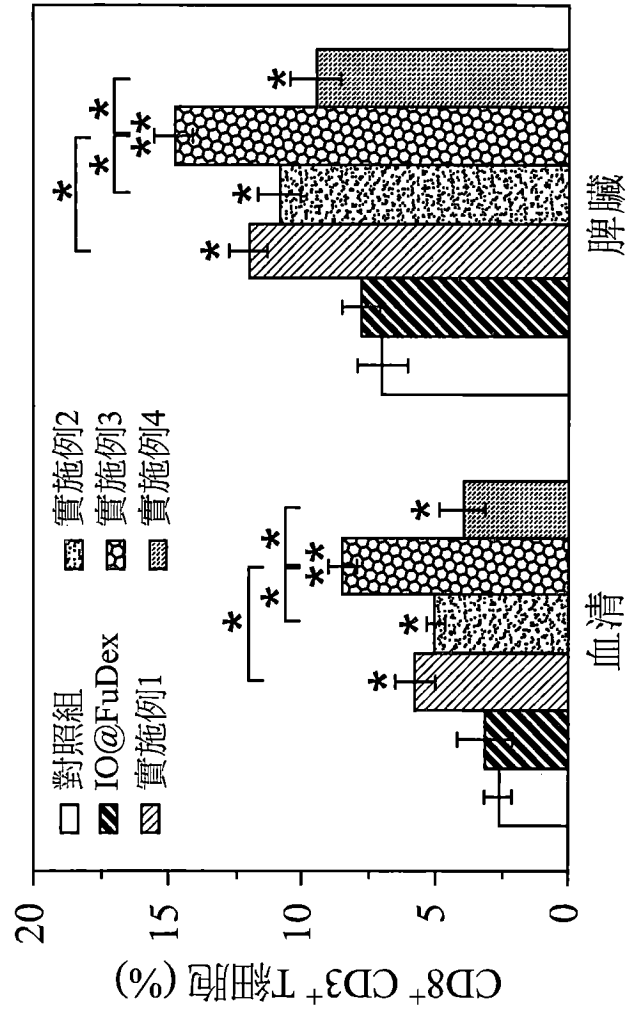
第 16G 圖



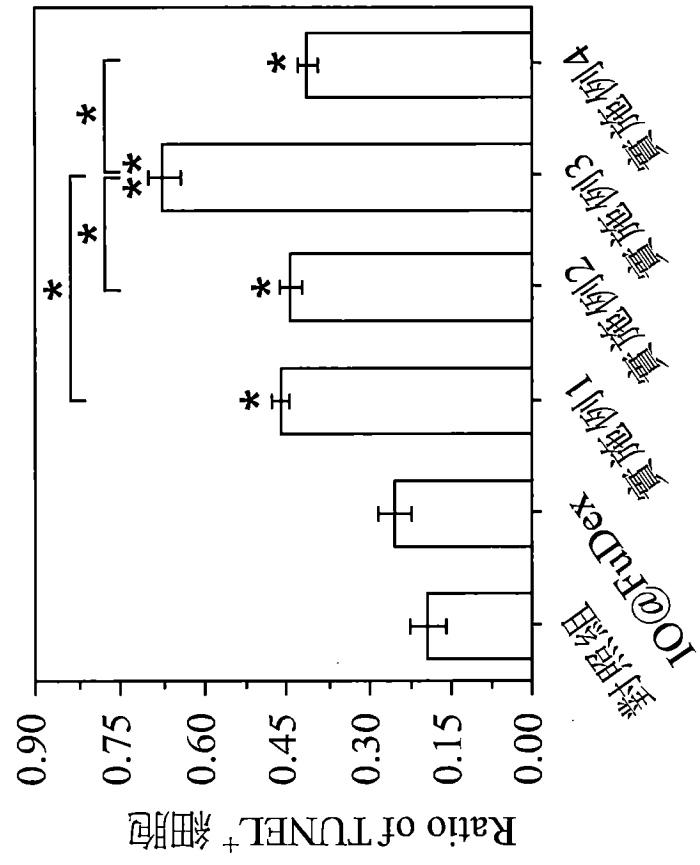
第 16I 圖



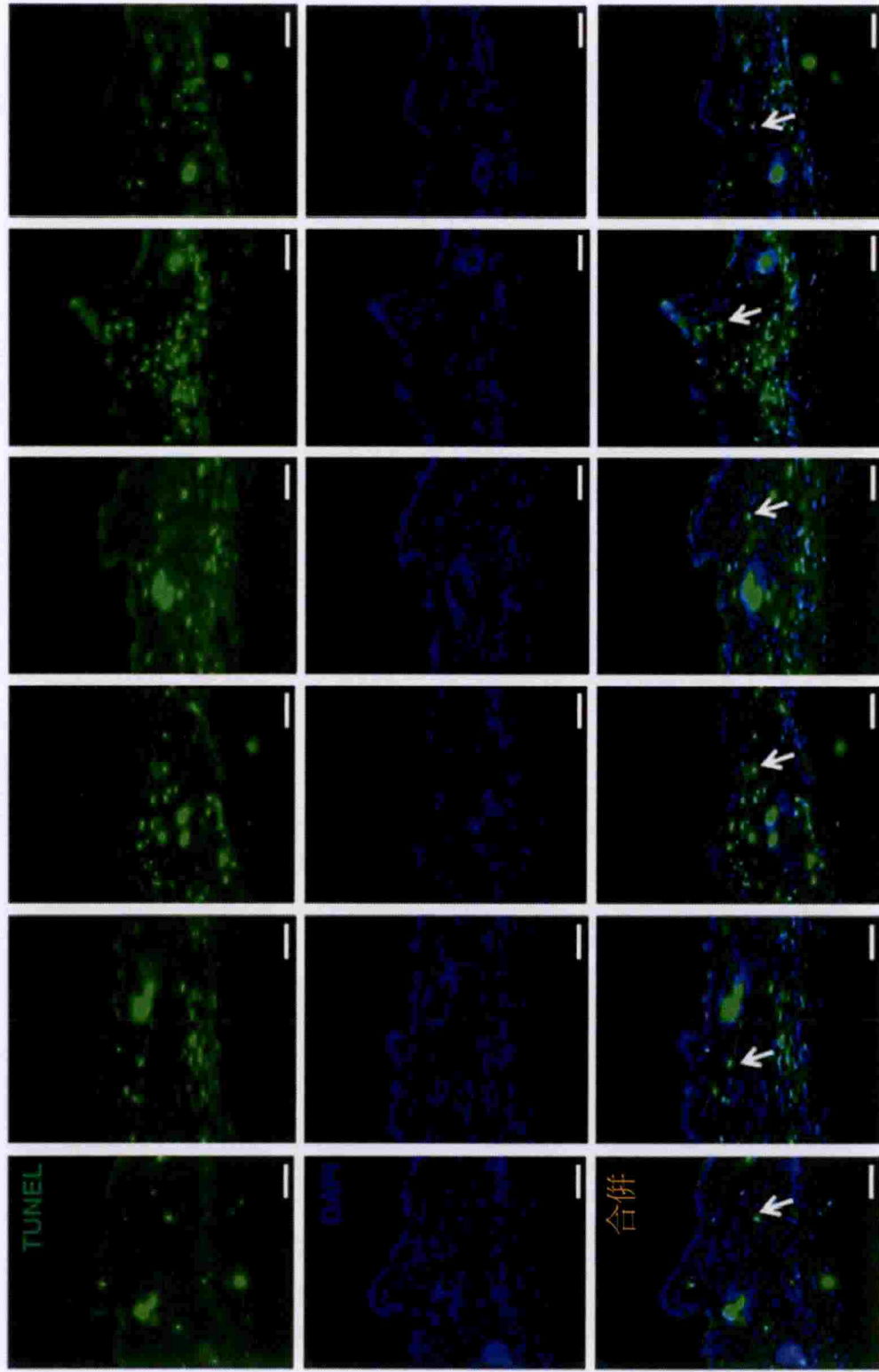
第 17A 圖



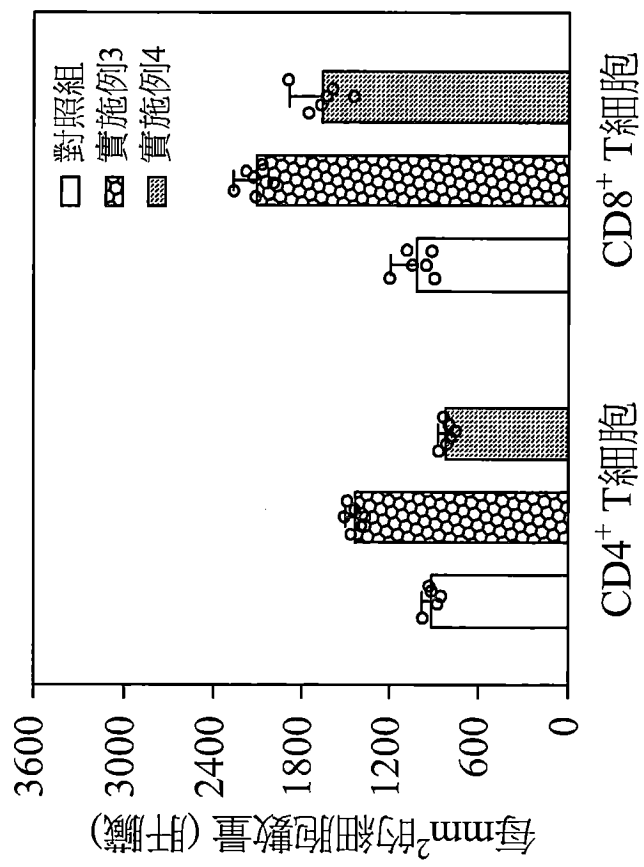
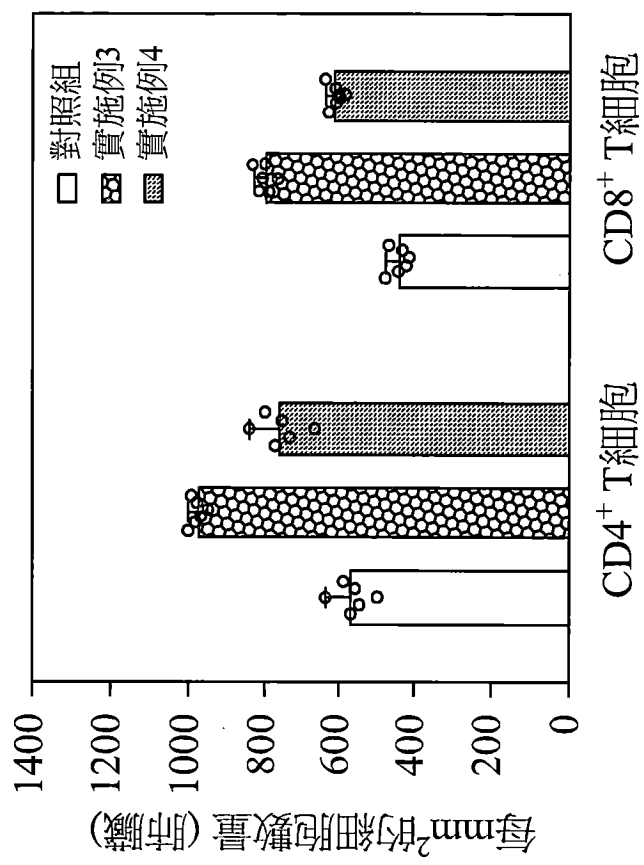
第 17B 圖



第 17C 圖

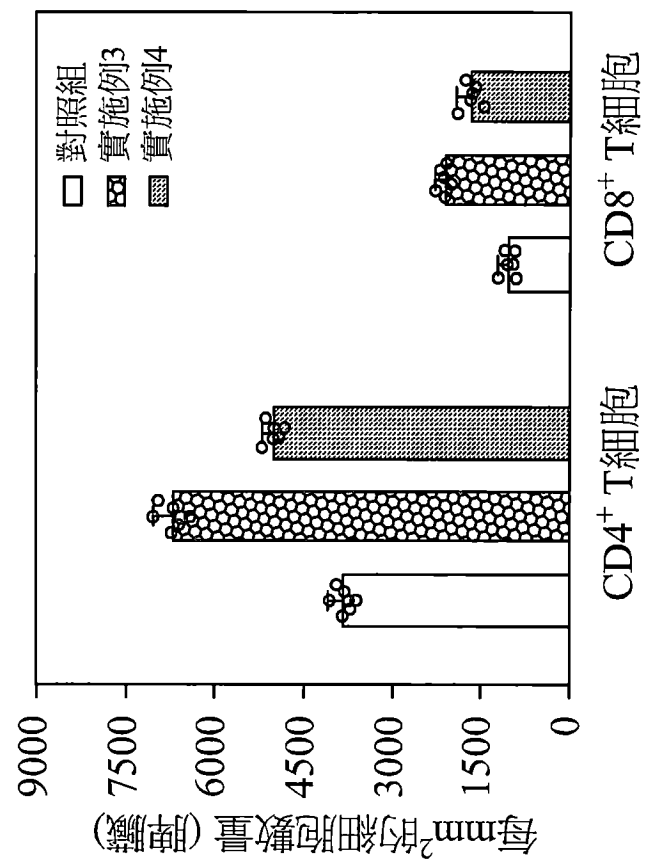
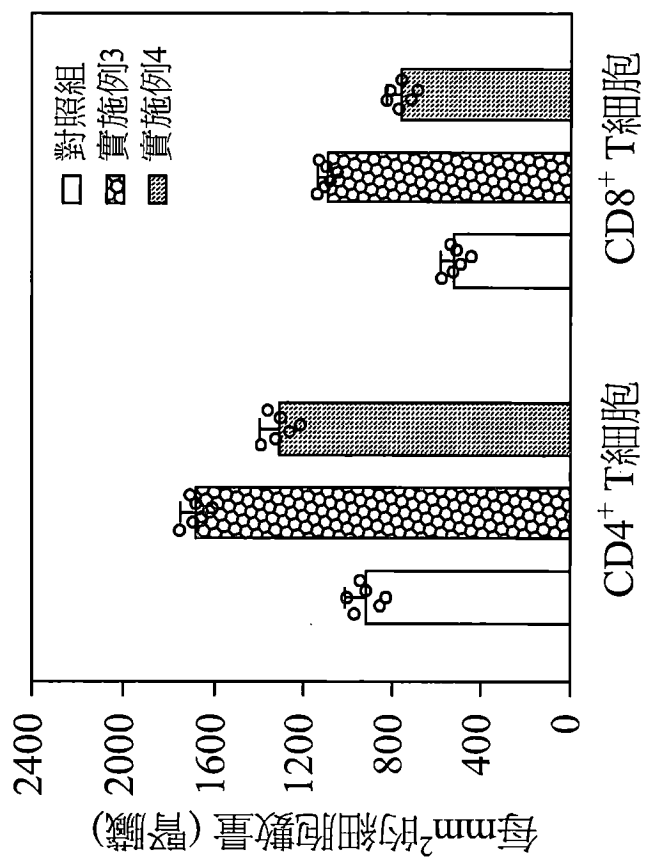


第 17D 圖



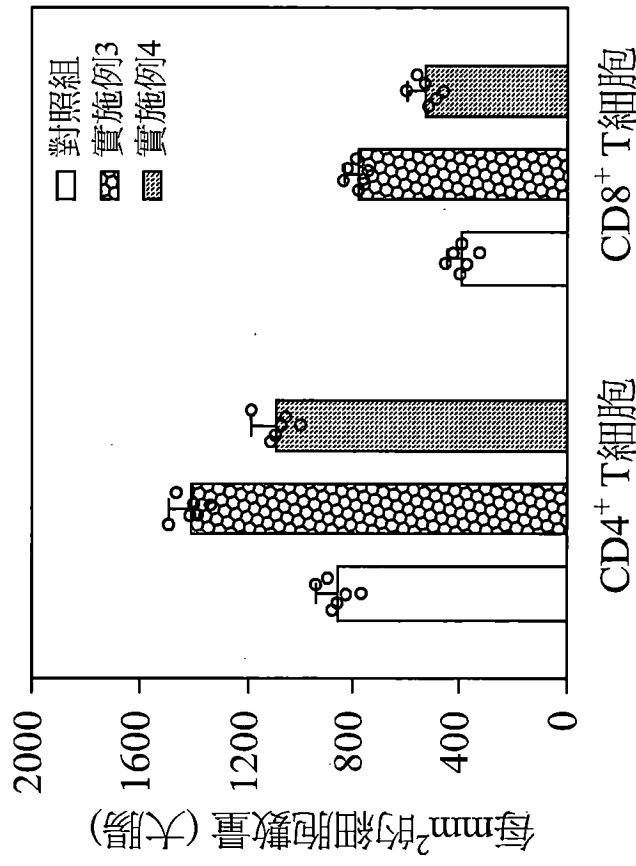
第 18B 圖

第 18A 圖

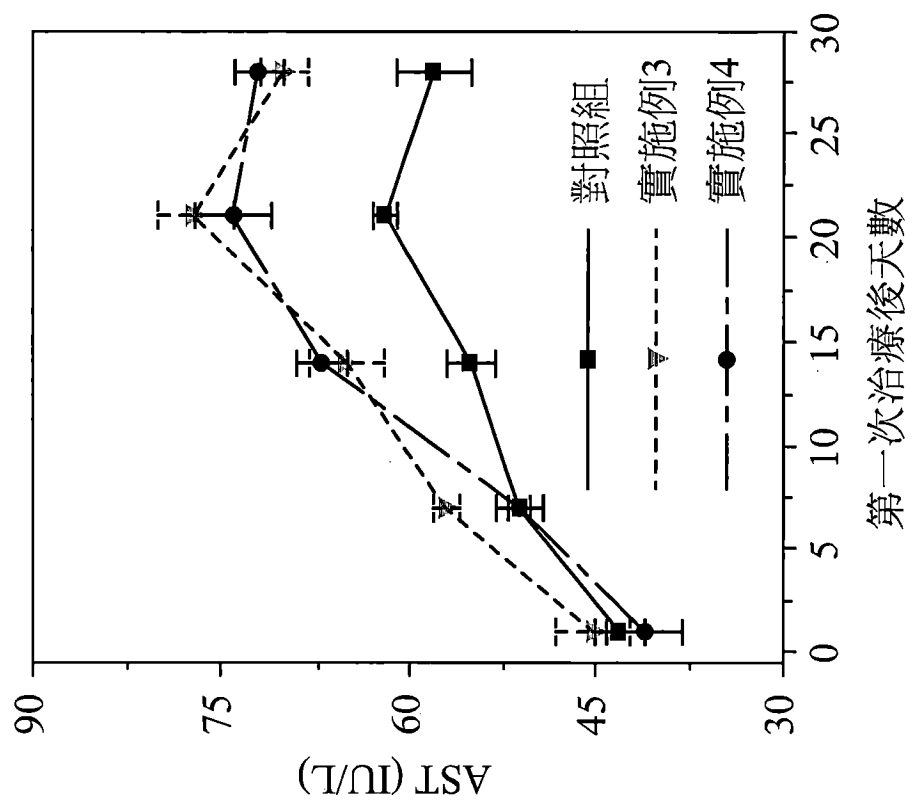


第18D圖

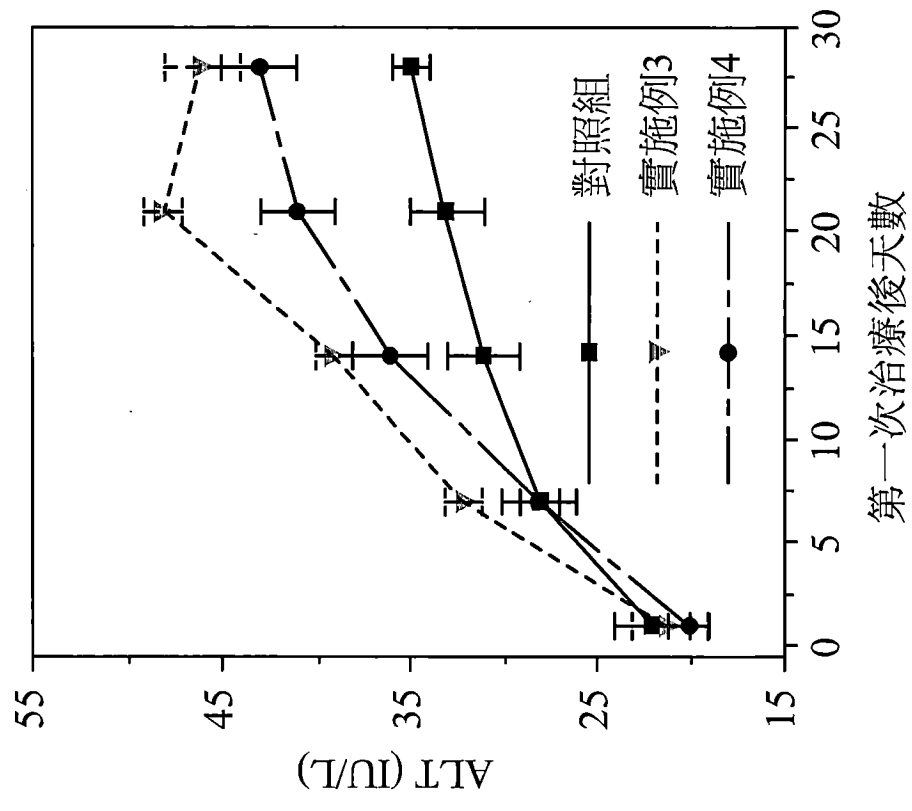
第18C圖



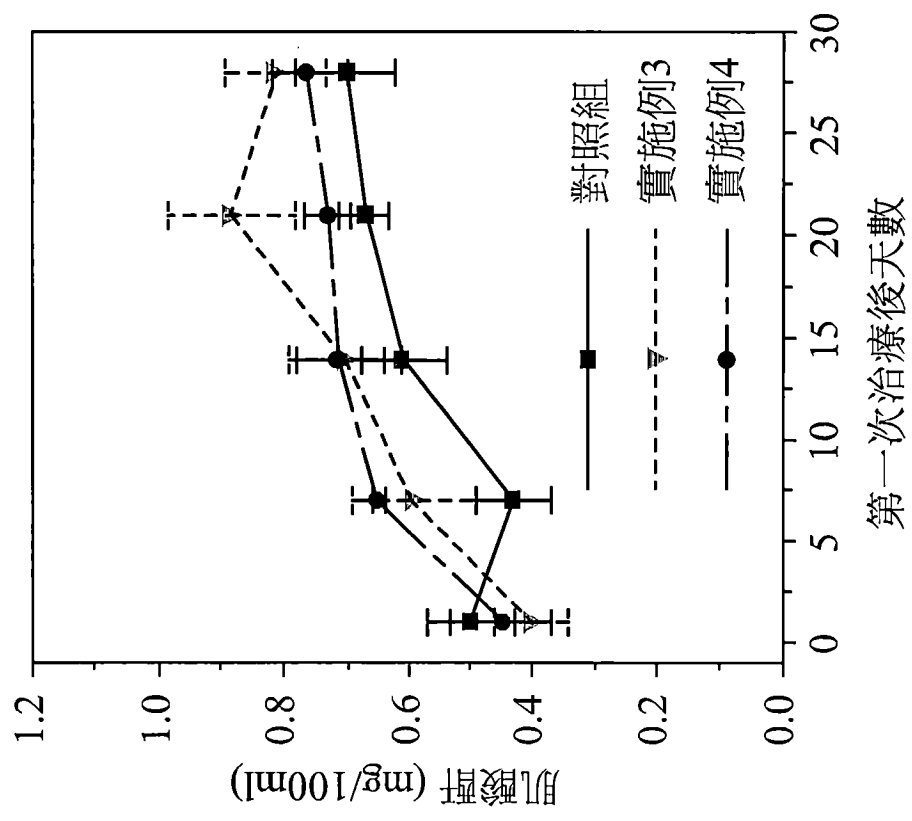
第 18E 圖



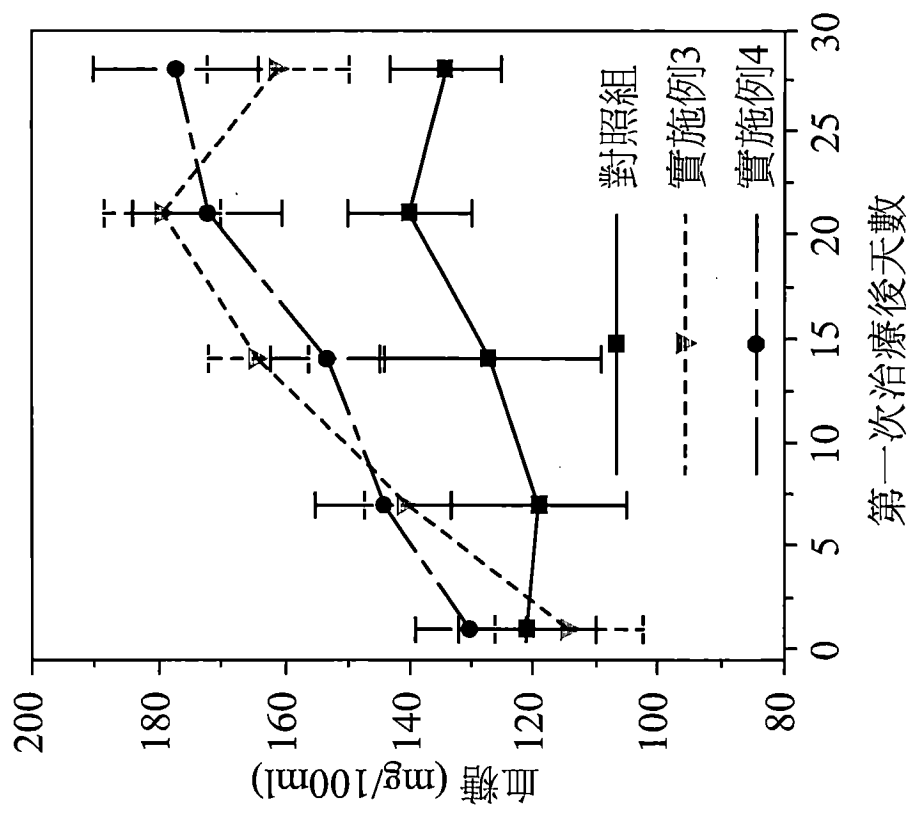
第 19A 圖



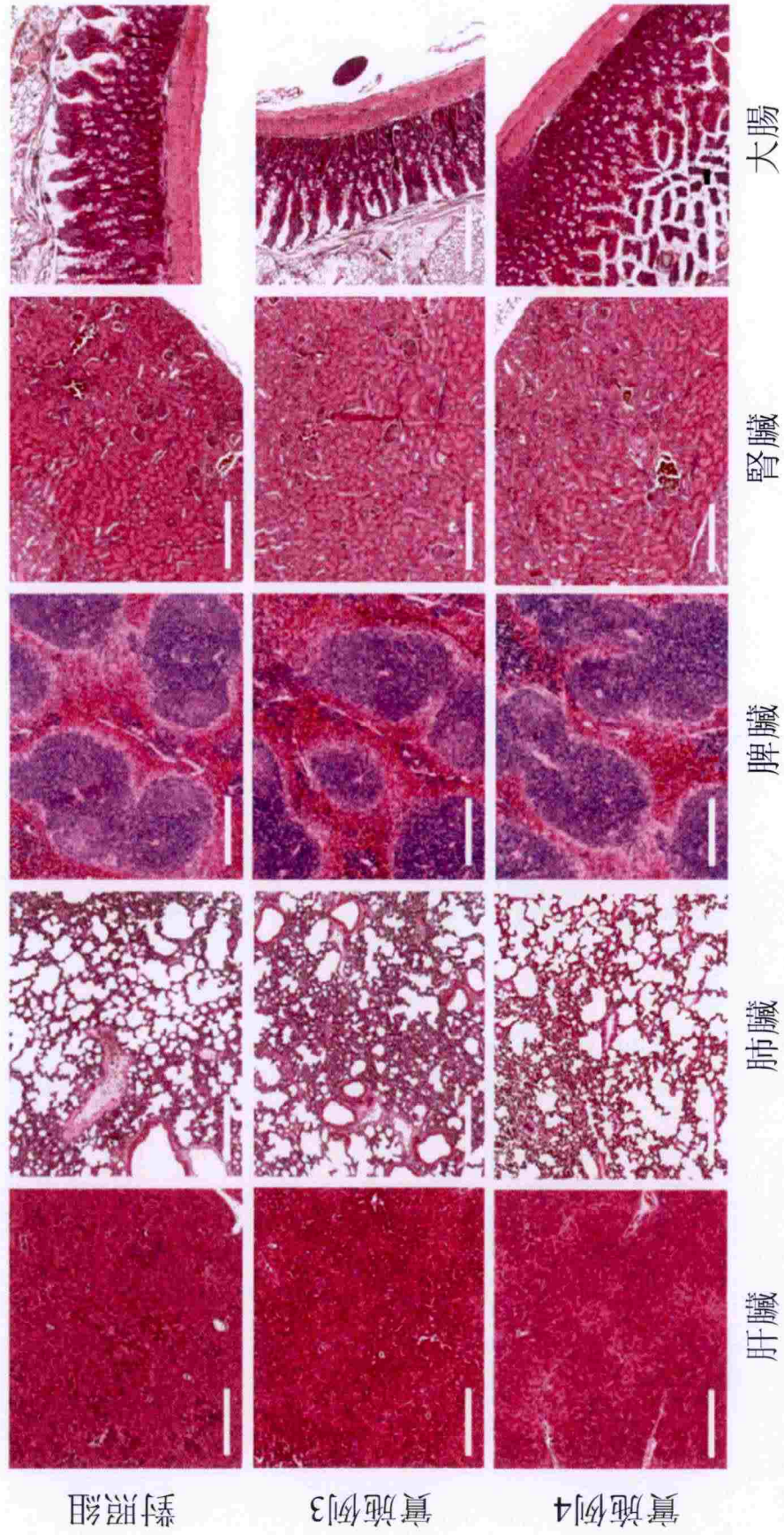
第 19B 圖



第 19C 圖



第 19D 圖



第 20 圖