

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

酸鹼開關複合型奈米藥物傳輸系統之研發  
及其在癌症治療上之應用



pH-Triggered Micellar Drug Delivery System  
for Application in Cancer Therapy

研 究 生：陳宏豪

學 號：9425529

指 導 教 授：莊祚敏、薛敬和 博士

中華民國九十六年七月

## 謝誌

本論文得以順利完成，必須先感謝指導教授莊祚敏博士，當初若沒有莊老師的人脈及安插也就沒有接下來兩年的際遇；再來我要感謝清大化工所的共同指導教授薛敬和博士，薛老師提供了一個相當優良的學習環境及優渥的研究經費，讓學生無後顧之憂地從事論文研究。除此之外，亦要感謝口試委員朱一民教授、林江珍教授、孫一明教授以及劉英麟教授等於口試當天提供許多寶貴的意見，使得本論文更臻堅實，沒有教授們的協助，也就沒有今天這本論文的誕生。

碩士班二年，對於一位非本科系的學生來說，於學習的起步是相當緩慢且辛苦的，但是很幸運地，我遇到了一位不論在學業上或生活上都給了我相當多啟發及開導的人，那就是我的學長駱俊良博士。雖然說這個人脾氣有點古怪，但骨子裡真的是個好人，沒有他的提攜及灌溉，也沒有今天長的跟大樹一樣高的我。對於學長的言謝，並非筆墨可以形容，但是我還是要向學長說聲：「駱俊良學長!真的非常的感謝你!」

另一位必須特別感謝的好人是蔡協志博士，首先恭喜學長今年順利地畢業了，台灣又多了一位百年難得一見的人才，真不簡單。協志在我畢業前夕給了我許多寶貴的意見，在我壓力大的時候適時地開導我，亦在我實驗遇到瓶頸時，給了我許多值得參考的思考方向，對於這位學長真的有種相見恨晚的感覺。另外我還要感謝哲平學長，每當實驗上欠東欠西時，他總會很阿殺力地讓我買東買西，還有學長的FTP站，更讓我紓解不少無處可洩的壓力。有幾位已經畢業的碩士班學長姐，像是克閩、俊凱、聖傑、大全、慶芳等在我碩士班一年級的時候，給了我許多幫助，也共同創造出許多歡笑及充實的生活，謝謝你們陪

我成長，所以我不會忘記感謝你們呢!同儕中，感謝宋岳哲同學，感謝你陪我度過了許多個一起天亮還不能說晚安的日子，祝你成為下一個郭台銘!加油!感謝王韋婷同學及曾士傑學長，沒有你們最後在實驗上及 confocal 的幫忙也就不會有如此漂亮的數據誕生；感謝陳煜仁同學，你有一附好脾氣，祝你改掉「好好喔」的口頭禪。我還要特別感謝偉翔學弟，謝謝你在我畢業前夕幫我趕出許多數據，身為學長沒能在實驗上好好地教導你，希望你能夠體諒。最後我要感謝博荀學長、建宇學弟以及唯聖學弟，謝謝你們在口試前的幫忙，沒有你們，口試便無法順利進行。此外，還要感謝海洋大學電顯中心的黃靜端技士於 TEM 實驗上的幫忙，以及岳哲的同學安恩於 AFM 實驗上的幫忙，有了你們的幫助，本論文就如同畫龍點睛般，變得更加有內容、有質感。

接下來我要感謝我的家人，感謝父母親，您們開明的管教方式使孩兒一路走來風雨無阻；感謝叔叔及叔母，感謝您們從姪兒念大學時就給的所有幫助；感謝大哥、大嫂、二哥、三哥、大姐、二姐、三姐等，您們平時給的鼓勵及援助，小弟皆銘記在心，謝謝您們。最後我要感謝我的女友劉玫英小姐，這一路走來皆有你相伴，在我心情鬱悶的時候，你都會相當有耐性地聽我訴苦；在我壓力大的時候，你都會不厭其煩地開導我；在我心情好的時候，你都會與我一同分享喜悅的心情；在我脾氣暴躁的時候，你都會乖乖地不敢吵我，希望往後的日子依然能夠有妳相伴，更祝我們能夠依循共同的夢想，一路走下去。

最後本人願將撰寫此論文的榮譽及喜悅獻給所有曾經幫助我的親朋好友，非常謝謝你們！

## 摘要

本研究係利用一具有酸鹼應答行為、生物相容性及生物可降解性之 Poly(*D,L*-lactide)-*g*-Poly(*N*-vinylimidazole-co-*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PLA-*g*-P(NVI-co-NVP))接枝共聚物以及具有免疫隱蔽性及生物可降解性之 methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*D,L*-lactide)(mPEG-PLA)二團聯共聚物，利用自我組裝設計出一同時具有環境酸鹼應答行為、可逆開關行為及免疫隱蔽性之接枝/複合型奈米微胞。mPEG 可隱蔽內核結構的強正電性與疏水特性進而增加於體內循環時之穩定性與細胞吞噬量；NVI 可藉由其酸鹼應答行為，待藥物載體被細胞吞噬後，可因正電排斥力造成結構的膨潤進而釋放藥物；PLA 則具有包覆輸水抗癌藥物的能力。

研究中我們首先探討接枝型奈米微胞之形成機制並得到製備時的最佳化條件，而後我們依 PLA-*g*-P(NVI-co-NVP)與 mPEG-PLA 臨界微胞濃度之不同，分別以不同重量比製備出各種組合之複合型奈米微胞，並從中篩選出較佳的組成進一步探討 NVI 本身之酸鹼應答行為對微胞型態之影響，結果指出接枝/複合型奈米微胞皆有良好的 On-Off 酸鹼應答行為。除此之外，我們更利用 TEM 與 AFM 等電子顯微鏡証實奈米微胞於不同環境下之核殼結構與表面型態變化。

藥物載體相關研究方面，我們將抗癌藥物 doxorubicin 包覆於 PLA 疏水內核，並利用免疫隱蔽性之外殼與具有酸鹼應答之特性進行「適時」、「適地」之藥物控制釋放。其中我們探討接枝/複合型藥物微胞之藥物包覆最適化條件(藥物包覆率高達約 40%)，並觀察藥物載體於不同酸鹼環境下之 On-Off 藥物釋放情形，發現於 pH5.0 可得到快速且穩定的藥物釋放曲線；而於 pH7.4 時卻可將藥物確實地包覆於疏水內核。進一步地我們將藥物載體分別與 Hs68、HeLa、HepG2 等正常/癌細胞共同培養，結果指出於 IC<sub>50</sub> 附近，材料不具有任何毒性可言。最後，我們以共軛焦電子顯微鏡證實藥物載體於細胞酸性胞器內進行藥物釋放，而後藉由擴散作用至細胞核內將細胞毒殺。

關鍵字：PLA-*g*-P(NVI-co-NVP)、接枝/複合型奈米微胞、On-Off 酸鹼應答、臨界微胞濃度、藥物控制釋放、細胞毒殺。

# Abstract

A novel mixed micelle comprised of poly(*D,L*-lactide)-*g*-poly(*N*-vinylimidazole-co-*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PLA-*g*-P(NVI-co-NVP)) graft copolymer with methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*D,L*-lactide) (mPEG-PLA) diblock copolymer was successfully developed for application in cancer therapy. The mixed micelle had an biocompatibility, biodegradable, pH-triggered inner core of P(NVI-co-NVP)-*g*-PLA to enable intracellular drug delivery and an extended hydrophilic outer shell of mPEG to hide the inner core. PNVI in backbone of graft copolymer exhibited pH-triggered property, when pH<6.0, the nanoparticle swelled (about 50%) depend on composition of NVI in backbone but not deformed its conformation. Otherwise, the conformation went back to initial state when pH>6.0, if micelle capsulated hydrophobic anticancer drug, this phenomenon would be called as “On-Off” controlled drug release.

In this study, we investigated the effect of mixed micelle with different critical micellar concentration (CMC) of diblock copolymer on micellization. The results indicated that the CMC of diblock copolymer decreasing, the stability of mixed micelles increasing. Furthermore, the average size and polydispersity index (PI) of graft/mixed micelle can be measure by dynamic light scattering with the sample in phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4, it exhibited uniform size (about 70~100 nm) and narrow distribution (about 0.8~1.2). Besides, the core-shell structure of graft/mixed micelle at pH 5.0 or pH 7.4 can be prove by transmission electron microscopy (TEM).

The hydrophobic doxorubicin (DOX) was capsulated into the inner core of graft/mixed micelle by hydrophobic segment PLA for application in cancer therapy, and the capsulated efficiency can be as high as approximately 40 wt%. Graft/mixed micelle both exhibited high releasing rate in the initial 24 hr and the releasing behavior remained constant after 168 hr in the acidic surroundings (pH 5.0). Furthermore, there were rare initial burst releasing of graft/mixed micelle in neutral surroundings (pH 7.4). It means that the “On-Off” controlled drug release had successfully developed by altered pH value. In addition to above study, the efficiency of screening feature of mixed micelle can be distinguished from graft micelle in BSA/PBS stable test and cytotoxicity, it means that mixed micelle exhibited better drug activity and lower material cytotoxicity. Finally, the free DOX and DOX-graft/mixed micelle distribution in cancer cell can be easily confirmed by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Key word : PLA-*g*-P(NVI-co-NVP) 、 CMC 、 mixed micelle 、 pH-triggered 、 On-Off 、 controlled drug release 、 cytotoxicity

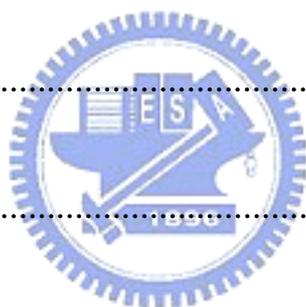
# 目錄

摘 要.....	i
Abstract .....	ii
目 錄.....	iii
表 目 錄.....	vii
圖 目 錄.....	viii
第一章、研究背景與動機 .....	1
第二章、文獻回顧 .....	5
2-1、高分子組成單體之材料性質及其應用 .....	5
2-1-1、poly(ethylene glycol)之性質與應用 .....	5
2-1-2、Poly(D,L-lactide)之性質與應用 .....	6
2-1-3、Poly(N-Vinylpyrrolidone)之性質與應用 .....	8
2-1-4、Poly(N-Vinylimidazole)之性質與應用 .....	9
2-2、高分子奈米微胞之介紹 .....	11
2-2-1、高分子奈米微胞之形成機制.....	11
2-2-2、高分子奈米微胞之包覆原理.....	14
2-2-3、免疫隱蔽性奈米微胞.....	18
2-2-4、生物可降解型奈米微胞.....	20
2-2-5、酸鹼應答型奈米微胞.....	23
2-2-6、開關型奈米微胞.....	26

2-3、複合型奈米微胞之介紹 .....	28
2-3-1、高分子高分子複合型奈米微胞.....	28
2-3-2、高分子微脂粒複合型奈米微胞.....	31
2-4、腫瘤組織構造及其與奈米藥物載體之傳遞行為 .....	34
2-4-1、腫瘤組織構造與藥物傳遞之關係.....	34
2-4-2、奈米藥物載體之藥物傳遞機制.....	35
2-4-3、奈米藥物載體之細胞吞噬機制.....	38
第三章、實驗方法 .....	42
3-1、實驗藥品 .....	42
3-2、實驗裝置 .....	44
3-3、名詞對照 .....	45
3-4、酸鹼應答型接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)之合成 .....	46
3-4-1、PLA-HEMA 之合成 .....	46
3-4-2、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之合成 .....	46
3-5、雙性二團聯共聚物 mPEG-PLA 之合成 .....	47
3-6、共聚物之結構鑑定與分析 .....	48
3-6-1、 <sup>1</sup> H-NMR 結構鑑定與數目平均分子量鑑定 .....	48
3-6-2、FT-IR 鑑定 .....	48
3-6-3、GPC 分子量分佈鑑定 .....	48
3-6-4、臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)之鑑定.....	49
3-7、接枝型奈米微胞之製備 .....	50

3-8、複合型奈米微胞之製備 .....	50
3-9、接枝/複合型奈米微胞之粒徑分析 .....	51
3-10、接枝/複合型奈米微胞之界面電位分析 .....	51
3-11、接枝型奈米微胞之高分子聚集行為分析 .....	51
3-12、接枝/複合型奈米微胞之酸鹼應答行為分析 .....	52
3-13、接枝/複合型奈米微胞之 On-Off 應答行為分析 .....	52
3-14、接枝/複合型奈米微胞之殼核結構分析(TEM and AFM) ....	52
3-15、接枝/複合型奈米微胞之安定性分析 .....	53
3-16、接枝/複合型奈米微胞之藥物包覆測試及性質分析 .....	53
3-17、接枝/複合型奈米微胞之體外藥物釋放模擬分析 .....	54
3-18、接枝/複合型奈米微胞之藥物 On-Off 應答行為分析 .....	55
3-19、接枝/複合型奈米微胞之細胞存活率與細胞毒殺分析 .....	55
3-20、接枝/複合型奈米微胞之細胞內藥物分佈情形與內吞行為分析 .....	58
第四章、實驗結果與討論 .....	60
4-1、酸鹼應答型接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)之製備與鑑定 .....	60
4-2、二團聯共聚物 mPEG-PLA 之製備與鑑定 .....	66
4-3、臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)之鑑定 ..	69
4-4、接枝型奈米微胞之製備與鑑定 .....	74
4-5、接枝型奈米微胞之聚集行為探討 .....	77
4-6、複合型奈米微胞之鑑定與分析 .....	84
(1) $CMC_{Graft} \ll CMC_{B1}$ .....	86

(2) $CMC_{Graft} < CMC_{B2}$ .....	89
(2) $CMC_{Graft} > CMC_{B3}$ .....	91
4-7、接枝/複合型奈米微胞之核殼型態分析 .....	95
4-8、接枝/複合型奈米微胞之酸鹼應答行為分析 .....	98
4-9、接枝/複合型奈米微胞之 On-Off 酸鹼應答行為分析 .....	104
4-10、接枝/複合型奈米微胞之藥物包覆 .....	114
4-11、接枝/複合型奈米微胞之體外藥物釋放模擬 .....	118
4-12、接枝/複合型奈米微胞之安定性分析 .....	123
4-13、接枝/複合型奈米微胞之體外細胞毒殺測試 .....	125
4-15、接枝/複合型奈米微胞之細胞內藥物釋放及分佈測試 .....	132
第五章、結論 .....	138
第六章、參考文獻 .....	144



## 表目錄

---

表 2-1、常見之生物可分解性高分子 .....	22
表 4-1、接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-NVP)之組成比 .....	65
表 4-2、接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-NVP)之性質分析 .....	65
表 4-3、二團聯共聚物 mPEG-PLA 之組成與性質分析 .....	68
表 4-4、各種共聚物之臨界微胞濃度 .....	71
表 4-5、接枝型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值 .....	75
表 4-6、接枝/二團聯型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值 .....	85
表 4-7、接枝型奈米微胞之粒徑大小與藥物含量關係 .....	116
表 4-8、複合型奈米微胞之粒徑大小與藥物含量關係 .....	117



## 圖目錄

圖 1-1、酸鹼應答開/關型奈米微胞之 On-Off 性質示意圖 .....	4
圖 2-1、PEG 二團聯共聚物之奈米微胞於不同領域上之應用 .....	6
圖 2-2、巨乳酸單體之不同光學異構物 .....	7
圖 2-3、PNVI 之 imidazole 官能基在質子酸存在下之質子化與去質子化可逆反應示意圖 .....	9
圖 2-4、PHis-PEG 與 PLLA-PEG-PHis-biotin 之複合型奈米微胞結構與結構破壞示意圖 .....	10
圖 2-5、雙性高分子自組裝形成高分子微胞之示意圖 .....	12
圖 2-6、高分子微胞之物理性包覆藥物示意圖 (a)透析法；(b)乳化法 .....	16
圖 2-7、PEG-b-PAsp(ADR)之化學鍵結型奈米微胞及其藥物釋放之示意圖 .....	17
圖 2-8、PEG-PMPA-PLL 三團連共聚物與 DNA 鍵結形成高分子錯合物微胞之示意圖 .....	18
圖 2-9、免疫隱蔽性奈米微胞 PEG-b-PNIPA 之自組裝與聚集行為之示意圖 .....	19
圖 2-10、不同種類的酸鹼應答巨電解質高分子 .....	25
圖 2-11、溫度應答之開關型載體示意圖 .....	27
圖 2-12、酸鹼應答之開關型載體示意圖 .....	27
圖 2-13、複合型奈米微胞疏水性自我排列示意圖 .....	29
圖 2-14、高分子-微脂粒複合型奈米微胞之形態示意圖 .....	32
圖 2-15、含 poly(ethylene glycol)高分子衍生物之微脂粒 .....	33

圖 2-16、高分子藥物微胞載體自血液累積於腫瘤或癌細胞之傳輸模式示意圖.....	36
圖 2-17、EPR 效應示意圖.....	38
圖 2-18、細胞內吞作用之三種吞噬機制.....	40
圖 2-19、藥物載體於組織或細胞內之藥物釋放模式示意圖.....	41
圖 3-1、PLA-HEMA 之合成示意圖.....	46
圖 3-2、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之合成示意圖.....	47
圖 3-3、mPEG-PLA 之合成示意圖.....	48
圖 4-1、 <i>D,L</i> -lactide 以 Sn(Oct) <sub>2</sub> 行陽離子開環聚合之反應機構示意圖.....	61
圖 4-2、PLA-HEMA 之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	61
圖 4-3、PLA-g-PNVP 之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	63
圖 4-4、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	63
圖 4-5、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之 FT-IR 光譜圖.....	64
圖 4-6、mPEG-PLA 之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	67
圖 4-7、mPEG-PLA 之 FT-IR 光譜圖.....	68
圖 4-8、不同高分子共聚物濃度下，Pyrene 分子之激發光譜 337nm 與 335nm 之強度變化情形.....	71
圖 4-9、不同主鏈組成比之 PLA-g-P(NVI-co-NVP)接枝共聚物於不同濃度下之 I <sub>337</sub> /I <sub>335</sub> 比值變化圖，兩條直線之外插交點即為臨界為包濃度(CMC).....	72
圖 4-10、不同鏈段長度比之 mPEG-PLA 二團聯共聚物於不同濃度下之 I <sub>337</sub> /I <sub>335</sub> 比值變化圖，兩條直線之外插交點即為臨界為包濃度(CMC).....	73

圖 4-11、不同組成比接枝型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值 .....	76
圖 4-12、接枝型奈米微胞聚集行為之示意圖 .....	77
圖 4-13、G0 奈米微胞在不同比例之 DMSO/(DMSO+H <sub>2</sub> O)混合溶液下 之聚集行為 .....	79
圖 4-14、G3 奈米微胞在不同比例之 DMSO/(DMSO+H <sub>2</sub> O)混合溶液下 之聚集行為 .....	79
圖 4-15、G5 奈米微胞在不同比例之 DMSO/(DMSO+H <sub>2</sub> O)混合溶液下 之聚集行為 .....	80
圖 4-16、G0 奈米微胞在不同之初期水含 H <sub>2</sub> O/(DMSO+H <sub>2</sub> O) 下之透 析結果 .....	82
圖 4-17、G3 奈米微胞在不同之初期水含 H <sub>2</sub> O/(DMSO+H <sub>2</sub> O) 下之透 析結果 .....	83
圖 4-18、G5 奈米微胞在不同之初期水含 H <sub>2</sub> O/(DMSO+H <sub>2</sub> O) 下之透 析結果 .....	83
圖 4-19、複合型奈米微胞聚集行為之示意圖 .....	84
圖 4-20、G0B1 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位 .....	88
圖 4-21、G3B1 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位 .....	88
圖 4-22、G5B1 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位 .....	88
圖 4-23、G0B2 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位 .....	90
圖 4-24、G3B2 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位 .....	90

圖 4-25、G5B2 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之	
(A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位.....	90
圖 4-26、G0B3 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之	
(A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位.....	93
圖 4-27、G3B3 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之	
(A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位.....	93
圖 4-28、G5B3 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之	
(A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位.....	93
圖 4-29、以 1：1 混合比組成之複合型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值	
.....	94
圖 4-30、接枝型奈米微胞之 TEM 影像 .....	96
圖 4-31、複合型奈米微胞之 TEM 影像 .....	96
圖 4-32、接枝型奈米微胞之影 AFM 像 .....	97
圖 4-33、複合型奈米微胞之 AFM 影像 .....	97
圖 4-34、接枝型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑	
大小變化情形.....	99
圖 4-35、接枝型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑	
分佈變化情形.....	100
圖 4-36、G3 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之	
粒徑大小變化情形.....	101
圖 4-37、G3 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之	
粒徑分佈變化情形.....	102
圖 4-38、G5 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之	
粒徑大小變化情形.....	103

圖 4-39、G5 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑分佈變化情形.....	103
圖 4-40、G3 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為.....	105
圖 4-41、G3 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下之 On-Off 行為.....	105
圖 4-42、G5 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為.....	107
圖 4-43、G5 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下之 On-Off 行為.....	107
圖 4-44、G3B2 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為.....	109
圖 4-45、G3B2 複合型奈米微胞在不同 pH 值之 On-Off 行為.....	109
圖 4-46、G5B2 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為.....	111
圖 4-47、G5B2 複合型奈米微胞在不同 pH 值之 On-Off 行為.....	111
圖 4-48、高分子奈米微胞 On-Off 酸鹼應答之 TEM 影像(pH 7.4)..	112
圖 4-49、高分子奈米微胞 On-Off 酸鹼應答之 TEM 影像(pH 5.0)..	113
圖 4-50、Doxorubicin hydrochloride 之化學結構式.....	114
圖 4-51、接枝型微胞之藥物包覆行為示意圖.....	116
圖 4-52、複合型微胞之藥物包覆行為示意圖.....	117
圖 4-53、Doxorubicin hydrochloride 在 485nm 之檢量線.....	119
圖 4-54、G5 接枝型藥物微胞於 pH7.4 及 pH5.0 緩衝溶液下之體外藥物釋放模擬.....	120
圖 4-55、G5B2 複合型藥物微胞於 pH7.4 及 pH5.0 緩衝溶液下之體外藥物釋放模擬.....	120
圖 4-56、G5 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下之體外藥 On-Off 釋放行	

為.....	122
圖 4-57、G5B2 複合型奈米微胞在不同 pH 值下之體外藥物 On-Off 釋放行為.....	123
圖 4-58、接枝/複合型奈米微胞於 4wt % BSA/PBS 緩衝溶液 與 PBS 緩衝溶液內之穩定性測試.....	124
圖 4-59、接枝/複合型奈米微胞於不同濃度下對 Hs68 cell 作用 24 小時後之生長抑制情形(n=6).....	126
圖 4-60、接枝/複合型奈米微胞於不同濃度下對 Hs68 cell 作用 72 小時後之生長抑制情形(n=6).....	126
圖 4-61、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HeLa cell 作用 24 小時後之生長抑制情形(n=6).....	128
圖 4-62、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HeLa cell 作用 72 小時後之生長抑制情形(n=6).....	129
圖 4-63、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HepG2 cell 作用 24 小時後之生長抑制情形(n=6).....	131
圖 4-64、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HepG2 cell 作用 72 小時後之生長抑制情形(n=6).....	131
圖 4-65、抗癌藥物 doxorubicin 與 HeLa 細胞共同培養 1 小時及 9 小時後之共軛焦顯微鏡影像。(a) LysoTracker 染色之酸性環境(b) 藥物 doxorubicin (c) (a)與(b)重疊後之影像 .....	135
圖 4-66、G5 接枝型藥物微胞分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時、3 小時及 24 小時後之共軛焦顯微鏡影像。(a)LysoTracker 染色之酸性環境 (b)藥物 doxorubicin(c) (a)與(b)重疊後之影像 .....	136

圖 4-67、G5B2 接枝型藥物微胞分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時、3 小時及 24 小時後之共軛焦顯微鏡影像。(a)LysoTracker 染色之酸性環境 (b)藥物 doxorubicin(c) (a)與(b)重疊後之影像  
.....137



# 第一章、研究背景與動機

『癌症』一般是泛指惡性腫瘤的統稱，是我國十大死因之首。因癌症身亡的死亡人數約佔總體死亡人數的 20%以上，因此，研發有效率的抗癌醫療系統是當今醫療科學領域的首務之急。

癌症(腫瘤細胞)可簡要的區分為(1)血液科惡性疾病，此大類包括了急性或慢性白血病、惡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤等，(2)實質固態瘤，大致又可細分成：(a)上皮細胞癌，如肺癌、胃癌、子宮頸癌等；(b)肉瘤，如軟體組織肉瘤、骨肉瘤等；(c)其他實質固態瘤，如生殖母細胞瘤、視網膜母細胞瘤等。而腫瘤細胞通常具有下列四項特性：(1)同源叢生性(clonality)：腫瘤細胞大多起源於某一細胞，而後再增生分化成另一叢特別的細胞。(2)自律性(autonomy)：腫瘤細胞的生長不會因周遭環境的改變(化學層級作用與物理層及作用)而影響自生的分化，可以無限制的生長。(3)退變性(anaplasia)：腫瘤細胞缺乏正常而且有協調性的細胞分化，可以看到各式各樣不同種類分化的細胞。(4)轉移性(metastasis)：腫瘤細胞具有發展出不連續生長的特性以及能夠藉由血液以及淋巴系統擴散至全身不同組織器官的能力。目前一般臨床上常見的癌症治療方法有外科手術治療、放射線治療、化學治療、荷爾蒙治療以及免疫治療等。本論文之核心目標即是針對傳統化學治療上所遇到的瓶頸，加以研究與探討並克服其缺失。

現今臨床上常見的化學治療主要可分為(1)全身性：採用靜脈注射或是肌肉注射，有些則是經由口服進入體內；(2)局部性：動脈給藥、腹腔內給藥、膀胱內給藥等。上述各類給藥方式都有藥物在體內半衰期過短的缺點，必須採用多次給藥造成藥物濃度呈現鋸齒分布的不良情形。而

現今常見的抗癌藥物皆缺乏對腫瘤細胞之毒殺專一性(specificity)以及位置選擇性(selectivity)，此負作用將會造成一般正常組織的毒害，因此智慧型藥物傳輸系統(intelligent drug delivery system)的應用便由此而生。現今時下常見的傳輸載體有微脂粒(liposome)型、病毒(virus)型、前驅藥物(prodrugs)型、奈米粒子(nanoparticles)型，以及高分子微胞(polymeric micelle)型等等，各載體間各有其優缺點，而以高分子微胞型藥物傳輸載體最具有結構設計上的變化性(variability)及靈活性(flexibility)，且其能夠針對不同的特定環境及特異系統做最直接有效率的應答效果。因此，如何將高分子微胞型藥物傳輸載體有效地應用於癌症治療，是當今學者所努力專研的。而癌症治療上最理想之高分子微胞即是同時具有「免疫隱蔽性」及「癌細胞辨識性」之功能。「免疫隱蔽性」即是其能夠避免被巨噬細胞(macrophages)或嗜中性白血球細胞(neutrophils)所辨識並吞噬，能夠在血液循環中長時間穩定存在，延長其被人體代謝的半衰期。此類高分子微胞通常具有poly(ethylene glycol) (PEG)或 polysaccharides 等高分子鏈，其帶親水基或電中性高分子鏈可提供一動態的遮蔽作用，可有效地排開或推開血液中的蛋白質吸附，進而避開巨噬細胞(phagocytes)的辨識。而「癌細胞辨識性」則是高分子微胞表面鍵結標的官能基(targeting moiety)，如葉酸(folic acid)、醣類(如 galactose 等)或賀爾蒙(hormone)，由於此類標的官能基在癌細胞表面分佈及表現量相較於其他正常細胞為多，故可利用其與癌細胞表面過度表現之葉酸或醣類接受器相結合，來達到藥物載體之專一性。

本研究主要是設計集「生物相容性」、「生物可降解」、「酸鹼應答」、「智慧開關型」以及「免疫隱蔽性」於一身之自我組裝複合型高分子奈米微胞，利用一具有疏水與結晶性之聚酯類高分子 Poly(*D,L*-Lactide)(PLA)作為複合型高分子微胞之內核，其生物相容性與生物分解性良好，已通過 FDA 核准。PLA 分解後產生的乳酸可被人體吸收，不必擔心會對人體造成不良的傷害，因此廣泛應用在藥物釋放及組織工程上。與 PLA 接枝之主鏈 Poly(*N*-vinylimidazole-co-*N*-vinyl-2-pyrrolidone)(P(NVI-co-NVP))，NVI 本身具有良好的酸鹼應答特性，可以有效地應用於癌症治療上；而由文獻上可知，NVP 本身為一生物相容性良好的親水性材料，將 PLA 與 P(NVI-co-NVP)接枝便形成 PLA-g-P(NVI-co-NVP)接枝共聚物。而後我們進一步為了讓高分子奈米微胞能夠延長在體內的循環週期及提高其穩定性，將 PLA-g-P(NVI-co-NVP) 接枝共聚物與一具有免疫隱蔽性及生物可降解性之二團聯共聚物 poly(ethylene glycol)-b-Poly(*D,L*-lactide) 以自我組裝 (self-assembly) 的方式製備成複合型高分子奈米微胞。我們將 *N*-vinylimidazole 設計在接枝共聚物的外殼，使它能夠對環境酸鹼值的改變作快速的應答(開關)效果，利用其在酸性環境下，*N*-vinylimidazole 會抓取環境中的質子並質子化(protonation)的關係，造成一靜電排斥力使得微胞結構變得較為膨潤(開)，藥物便得以釋放；而環境中的酸鹼值一旦回復至中性條件下，*N*-vinylimidazole 便會去質子化(deprotonation)，此時微胞結構便會緊縮(關)將藥物再次包覆起來，如圖 1-1 所示。我們即是利用 *N*-vinylimidazole 之酸鹼應答為出發點，設計一智慧型抗癌藥物

載體，並改質高分子微胞表面及利用血液與細胞內酸鹼值的差異，達到細胞內藥物傳輸治療的效果並提高於體內循環之半衰期與藥物局部釋放之效果。

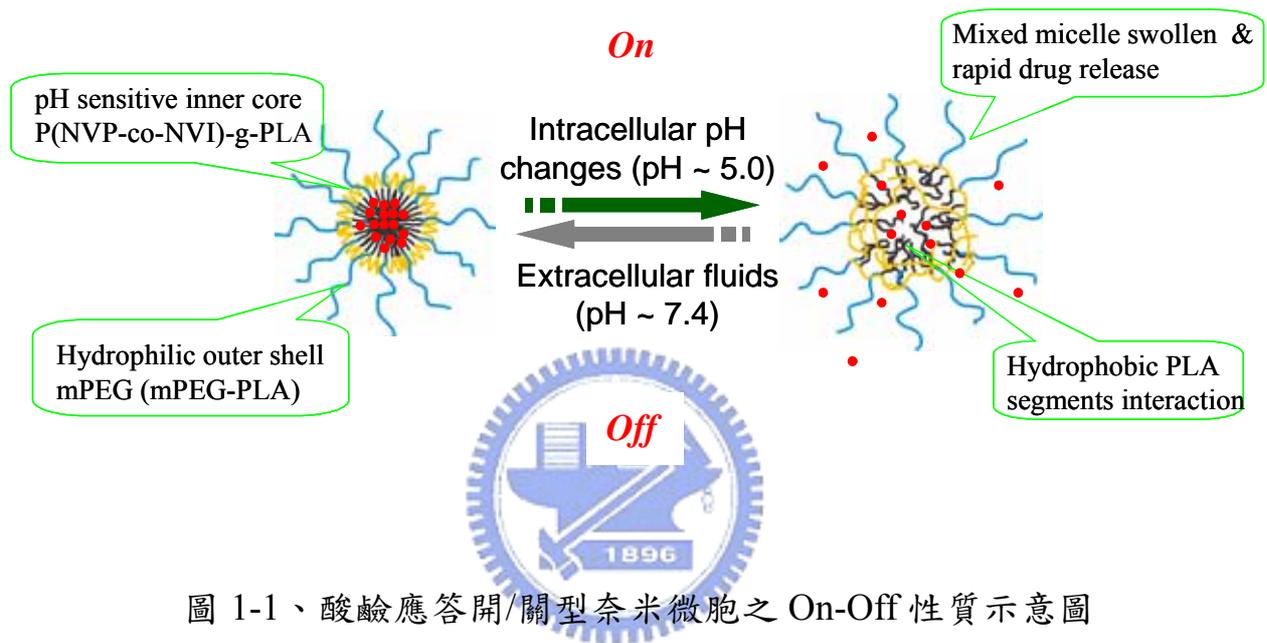


圖 1-1、酸鹼應答開/關型奈米微胞之 On-Off 性質示意圖

## 第二章、文獻回顧

### 2-1、高分子組成單體之材料性質及其應用性

#### 2-1-1、poly(ethylene glycol)之性質與應用

Poly(ethylene glycol)(PEG)可說是在生醫領域應用地最廣且研究地最透徹的高分子之一，一般可由 ethylene glycol 經由酸催化或是鹼催化行開環聚合反應(acid or base-catalyst ring-opening polymerization)而得之，但現今市面上已經有各式各樣已商品化且具有不同分子量的產品可供選擇，甚至是將末端改質成各類官能基或是與各類 peptide、protein、antibody 鍵結好的產品，供學術界或業界直接選購以利研究，這也就是所謂的 PEGylation【1】。PEG 本身為一親水性(water-soluble)、電中性(non-charged)且不具毒性(nontoxic)之高分子，常被用來當作高分子藥物載體或基因載體之親水性外殼。因其具有良好的親水性以及其鏈段在水溶液中具有相當的立體排斥體積(steric repulsion)，使其在體內長時間循環時可以延展其親水鏈段提供一動態的遮蔽作用，可有效地排開或推開血液中的蛋白質吸附，進而避開巨噬細胞(phagocytes)的辨識。PEG 除了應用於載體之外殼外，尚有其他學者將其與疏水鏈段自組裝成高分子奈米微胞後，利用其表面之特殊光化學及光物理性質將其應用於半導體晶圓表面之改質以及一些玻璃基材之改質上，如圖 2-1 所示。而由 PEG 組成之奈米粒子之光學性質主要是由其粒徑大小與組成材料有關【2】。

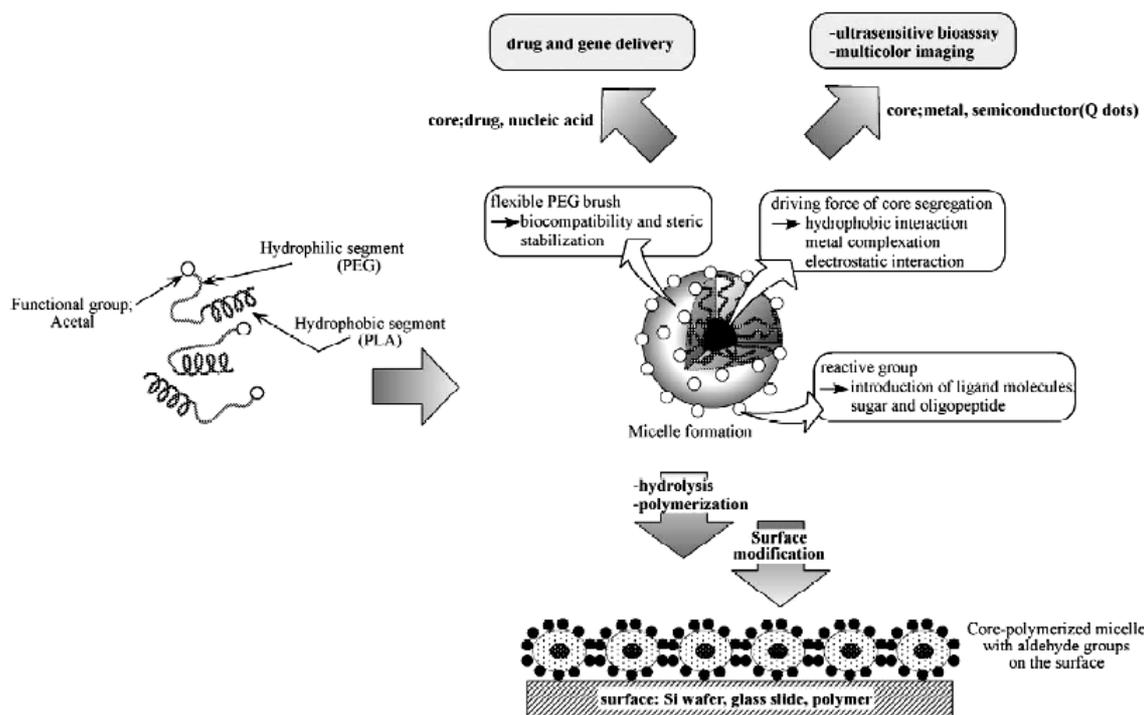


圖 2-1、PEG 二團聯共聚物之奈米微胞於不同領域上之應用(H. Otsuka, K. Kataoka, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55, 403–419)

### 2-1-2、Poly(D,L-lactide)之性質與應用

巨乳酸(Poly(D,L-lactide))是常見的生物可降解性單體，一般可由乳酸(lactic acid)單體經錫觸媒(stannous octanoate)催化，行陽離子開環聚合反應(ring-opening polymerization)得之。聚乳酸依乳酸單體之光學異構物之不同，可分為 L-form 聚乳酸(PLLA)、D-form 聚乳酸(PDLA)及 D,L-form 聚乳酸(PDLLA)，如圖 2-2 所示。PLLA 與 PDLA 之結構規則類似，聚合物之細部結構由結晶態(crystalline)與非結晶態(amorphous)所構成；而 PDLLA 因排列不具有規則性，聚合物為非結晶態(amorphous)。D-form 之乳酸必須由合成反應獲得，而 L-form 之乳酸主要存在於體內各器官，

如肝、腎、肌肉等，所以在生物醫學的應用上大部分是利用 L-form 之聚乳酸(PLLA)與 D,L-form 之聚乳酸(PDLLA)。PLLA 排列規則，容易結晶，為半結晶狀之聚合物，融點( $T_m$ )約為  $170-200^{\circ}\text{C}$ ，玻璃轉移溫度( $T_g$ )約為  $55-65^{\circ}\text{C}$ ，PDLLA 為不具有特定型態之非結晶態透明材料，玻璃轉移溫度( $T_g$ )較 PLLA 稍高，約為  $50-60^{\circ}\text{C}$ ，無明顯之熔點。而聚乳酸的性質參數會因分子量、分子量分佈、純度及製備方法之不同而不同。

Poly(*D,L*-lactide)應用在生醫材料上主要有以下三個主要優勢：(1)生物可降解性(biodegradable)良好，使用後能被自然界中微生物完全降解，形成水和二氧化碳，不會污染環境。(2)機械性質(mechanical)良好，適用於熱塑、吹塑等各種加工製程，可應用於各種塑膠製品及進一步地加工成各類織物、民生用品等等。(3)生物相容性(biocompatibility)良好，其在生醫領域之應用性非常地廣闊，如可製作成免拆式人體可吸收之手術縫合線、一次性輸液工具等，而低分子量之聚乳酸更可將其設計在藥物控制釋放之領域上。

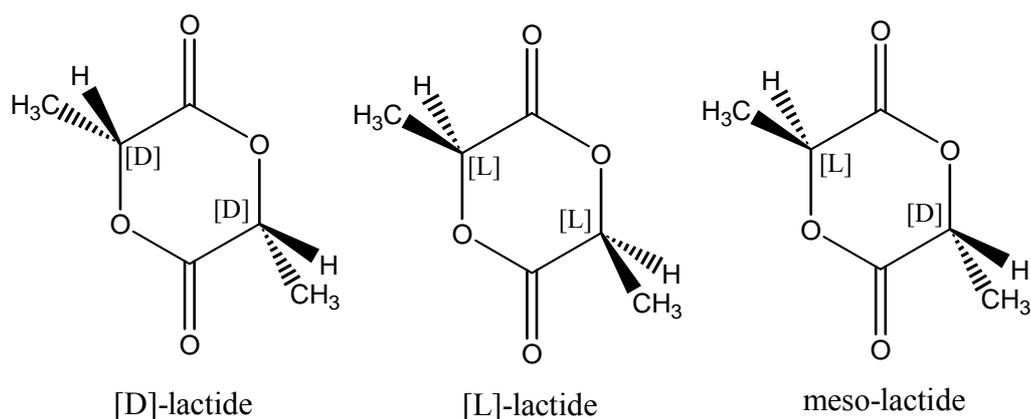


圖 2-2、巨乳酸單體之不同光學異構物

### 2-1-3、Poly(N-Vinylpyrrolidone)之性質與應用

首先，N-Vinylpyrrolidone 單體本身為一極性分子，它與同樣是極性分子之有機酸(carboxylic acid)、醇類(hydroxyl group)、無機鹽類(inorganic salt)及水之相容性良好。而本研究使用之(Poly(N-Vinylpyrrolidone)(PNVP)為一親水性(water-soluble)、電中性(non-charged)且不具毒性(nontoxic)之高分子，其性質與 poly(ethylene glycol)(PEG)非常類似，可由 N-Vinylpyrrolidone 在 AIBN 起始劑作用下行自由基聚合反應(radical polymerization)獲得。常用於生物醫療領域，作為藥品添加物、生物活性蛋白質之高分子修飾基團，且其在血液中之循環時間以及人體相容性甚至比 PEG 還來的好【3】。由文獻可知，PNVP 以往常被學者利用其良好之生物相容性，與不同功能之疏水或親水性單體進行自由基共聚合，設計出不同功能之藥物載體及基因載體。例如，2002 年，Yinfeng Zhuang 等人即是利用 NVP 與具有溫度應答之 NIPAAm 單體，以放射性聚合(radiation polymerization)的方式進行共聚合，形成具有交聯式高分子網狀結構(Interpenetrating Polymer network)之高分子水膠藥物載體【4】。除此之外，2000 年，Dong Woo Lim 等人亦利用 NVP 與 DMAEMA 以自由基聚合的方式先形成共聚合物，再將其作末端作改質修飾，而後再進一步地將其與改質過後的 PEG 結合，形成雙團聯之高分子基因載體【5】。

#### 2-1-4、Poly(N-Vinylimidazole)之性質與應用

N-Vinylimidazole(NVI)為一親水性且具酸鹼應答效果的單體，我們可藉自由基聚合反應(free radical polymerization)，將其聚合為 Poly(N-Vinylimidazole)(PNVI) 【 6 】。其結構與 poly(4-vinylpyridine)相似，皆是一個含有雜原子(heteroatom)之未飽和環狀芳香族化合物(aromatic compound)，二者在 N 的位置上，皆含有一個未鍵結的孤對  $\pi$  電子。此孤對  $\pi$  電子具有抓取環境中氫離子之能力，因此，在酸性環境下(pH<6)，NVI 本身即具有質子化(protonation)的能力，如圖 2-3 所示。我們即是利用 NVI 之酸鹼應答能力，在酸性環境下，藉著 PNVI 高分子鏈段間帶正電性的結果造成靜電排斥力，使奈米微胞本身變得較為膨潤，將包覆在內核的抗癌藥物釋放以達到癌細胞毒殺的效果。除此之外，PNVI 可以與許多帶電性分子產生鍵結(金屬離子、蛋白質結構等)，形成一複合型結構，因此我們可以將某些具有與生物分子產生鍵結能力的配體(ligands)(例如染料或是具有反應性的高分子)輕易地導入 PNVI 形成複合型膠體【7】。

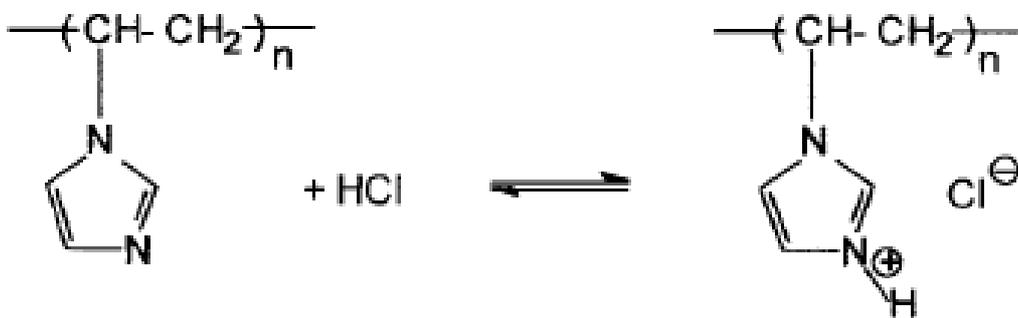


圖 2-3、PNVI 之 imidazole 官能基在質子酸存在下之質子化與去質子化可逆反應示意圖(M.JESU'S MOLINA et al, *Journal of Polymer Science: Part B : Polymer Physical*, 2004, 42, 2294-2307)

其他類似於 imidazole 官能基之高分子，例如 poly-histidine(polyHis)，由 Y. H. Bae 等人研究 polyHis 發現，imidazole 基團在體內可藉由 proton sponge 之機制誘導 endosome membrane disruption activity 【8-9】，如此一來於高分子系統導入 polyHis 於內核，對於細胞內的藥物傳遞會有更佳的效果，如圖 2-4 所示。因此，現今已有其他學者將其應用於 DNA 基因治療，將末端改質成具有 imidazole 的官能基，使其在基因傳遞治療上具有更好的療效 【10】。

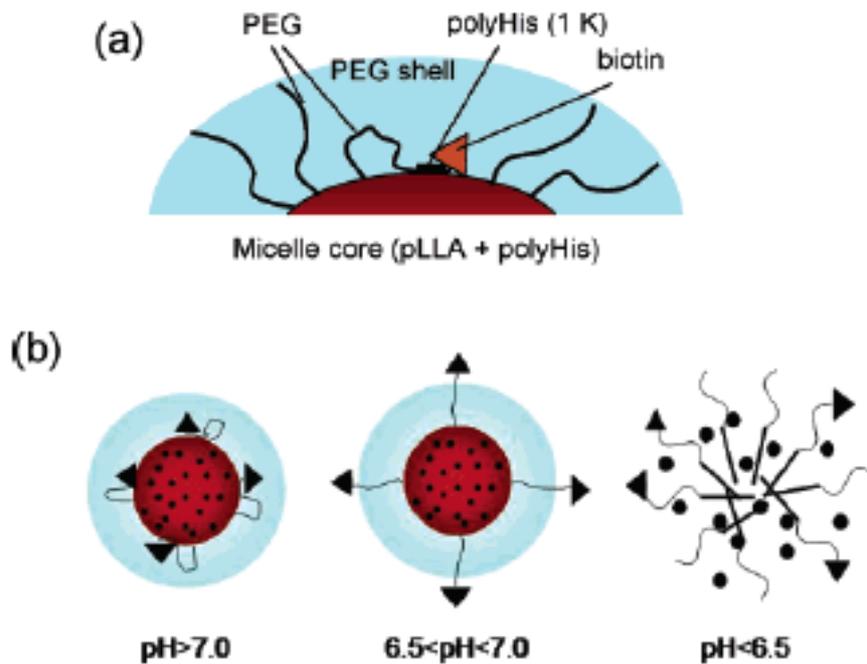


圖 2-4、PHis-PEG 與 PLLA-PEG-PHis-biotin 之複合型奈米微胞結構與結構破壞示意圖(Y. H. Bae et al, *Nano Lett*, 2005, 5, 325. )

## 2-2、高分子奈米微胞之介紹

### 2-2-1、高分子奈米微胞之形成機制

高分子二團聯共聚物欲在水溶液(亦有學者探討其在有機溶液中之組裝情形)中自我組裝成一有序列之結構，通常其結構皆必須具有親疏水性差異明顯的兩段高分子鏈，而隨著親疏水鏈段比列之不同，其在水溶液中之組裝結構亦不相同，常見的結構有微胞(micelle)、棒狀(cylinder)、層板狀(lamella)等結構【11】。在此，我們將研究重點放在高分子微胞之探討上，當我們提高親疏水鏈段之組成比例時(增加親水鏈段比；降低疏水鏈段比)，組裝之結構會由層板狀或棒狀轉為微胞之結構。通常，組成高分子微胞之共聚物包含了兩種(依結構設計需求之不同，有時單體之種類可能有兩種以上)不同溶解度的單體，而這兩種單體可依用途之不同而設計成許多不同形式之雙性共聚物，如二團聯共聚物(diblock copolymer)、三團聯共聚物(triblock copolymer)及接枝共聚物(graft copolymer)等。其中以雙性團聯共聚物(amphiphilic block copolymer)所形成之高分子微胞研究最為完整【12-13】。高分子微胞之形成取決於親疏水性分子鏈段的比例。在水相環境下，當親水性鏈段之分子量大於疏水性鏈段時，高分子鏈會因在水溶液中親疏水性之不同而排列成核殼結構(core-shell structure)的高分子微胞，如圖 2-5 所示。

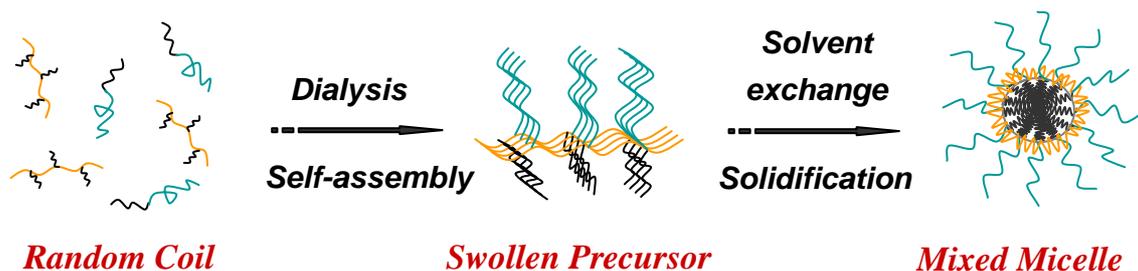


圖 2-5、雙性高分子自組裝形成高分子微胞之示意圖

高分子微胞形成之過程包含了兩種作用力的平衡，其一是使高分子互相聚集的疏水性作用力，其二是避免高分子微胞無限聚集而形成微相(microdomain)的高分子鏈段排斥力。其熱力學行為與小分子量的界面活性劑相似，形成微胞的驅動力主要是因為在水溶液中，雙性共聚合物的疏水性鏈段為了減少與水的接觸面積而自我聚集，再加上覆蓋在疏水性鏈段外層的親水性鏈段使得疏水性鏈段與水的接觸面積減到最低，因此使系統的自由能達到最小值而形成最穩定的狀態【14-15】。

而研究高分子微胞之最重要因素即是高分子微胞本身穩定性之探討，亦即高分子微胞在溶液中因結構不穩定而瓦解或過度聚集造成粒子之沉澱的可能性。在一般情況下，穩定的高分子微胞可以在體內長時間地循環並累積於適當的組織，以進行局部的藥物釋放。而高分子微胞不論在體外與體內的穩定性皆與它們的臨界微胞濃度有關，一般疏水性鏈段對臨界微胞濃度的影響遠大於親水性鏈段【16-17】。以下說明親疏水性鏈段分別對於高分子微胞穩定度的影響：(1)在固定親水性鏈段分子量下

增加疏水性鏈段分子量，臨界微胞濃度會明顯下降，因此會增加高分子微胞的穩定性。(2)在固定疏水性鏈段分子量下增加親水性鏈段分子量，臨界微胞濃度只會小幅上升。(3)在固定親/疏水性鏈段的比例下增加雙性共聚合物分子量，只會造成臨界微胞濃度小幅下降。(4)一般在相同分子量與親/疏水性鏈段比例下，三團聯共聚物的臨界微胞濃度會高於二團聯共聚物的臨界微胞濃度【16-20】。而由雙性接枝共聚物所形成的高分子微胞，相較於團聯共聚物而言，較易發生互相聚集的現象，這是因為接枝共聚物之疏水性鏈段運動性低於團聯共聚物，因此會形成結構較鬆散之高分子微胞，導致某些疏水性鏈段與水接觸，所以高分子微胞彼此間容易聚集形成較大的顆粒【21-26】。

研究高分子微胞的另一項重要參數即為臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC)。在溶液中，雙性共聚合物之濃度高到足以形成微胞之濃度時，此時微胞本身與高分子 (polymer) 也正好達到某一平衡，而此濃度即稱為臨界微胞濃度。嚴格來說，有很多方法都可以用來決定臨界微胞濃度，幾乎任何物理的參數都可以用來表示系統在臨界微胞濃度時的物理性質變化。然而，由於靈敏度的問題，所以只有少數方法真正被用來決定臨界微胞濃度，如高效能液相層析儀 (HPLC)、小角度光散射儀 (small angle light scattering)、螢光光譜儀 (fluorescent spectroscopy) 等。而其中又以螢光光譜儀最為靈敏與精確。當溶液中雙性共聚合物濃度達到臨界微胞濃度或稍高於臨界微胞濃度時【15】，會形成鬆散的高分子微胞結構，在內核中還含有少量的溶劑(水)【21】。然而隨著溶液中雙性共聚合物

濃度之增加，將會改變原先溶液中高分子與微胞之平衡，使其傾向於生成高分子微胞之方向，內核中殘留之些微水溶液亦會逐漸排出於結構外，使內核的結構變的更加緊密及穩定，同時也會使高分子微胞的水合半徑逐漸變小。臨界微胞濃度決定了雙性共聚合物在藥物載體上的應用性，若雙性共聚合物的臨界微胞濃度太高，則其形成的高分子微胞在進入體內時，會因為被大量的血液稀釋而變的不穩定而容易分解，其所攜帶的藥物也因過快的釋放而在血液中沈澱，並因此快速被人體所代謝。因此在研究高分子微胞的藥物控制釋放上，臨界微胞濃度是一個很重要的因素。

### 2-2-2、高分子奈米微胞之包覆原理



高分子微胞的核殼結構提供了攜帶疏水性藥物的空間，因此可以保護藥物不被體內酵素分解(內核)及抵抗蛋白質與細胞的吸附(外殼)，故常被用於藥物控制釋放之研究。而高分子微胞可藉由物理性包覆、化學性鍵結或靜電作用力來包覆藥物。分別敘述如下：(1)物理性包覆，其驅動力主要是疏水性鏈段與藥物間的疏水性作用力。因此，增加疏水性鏈段分子量可以增加藥物的包覆量，實驗也證實藥物的疏水性越高，微胞的包覆效果也越好。常見的物理性包覆方式有溶劑交換法(solvent exchange process)及油相/水相乳化法(O/W emulsion method)，如圖2-6所示。前者是利用有機溶劑與水的緩慢交換使藥物與疏水性高分子聚集；後者則是利用有機溶劑在水中形成乳化粒子，緩慢揮發溶劑而包覆疏水性藥物【27】。(2)化學鍵結方式，即利

用共價鍵(如醯胺鍵(amide bond))來鍵結藥物，此類鍵結非常安定，不容易被酵素分解或水解，因此必須在藥物與高分子之間導入一特定環境下會斷裂之隔離基(spacer)以利藥物釋放，如圖 2-7 所示。K. Kataoka 等人於 2003 年以 poly(ethylene glycol) 與 poly-(aspartic acid) 形成二團聯共聚物 (PEG-b-PAsp) 共價鍵結 adriamycin[PEG-b-PAsp(ADR)] 形成雙性共聚物，進行體內實驗的研究【28】，發現在靜脈注射下，其在體內的循環時間及分佈皆與共聚物鏈段的相對大小有關，較長 PEG 鏈段與較短 PAsp 鏈段在體內的循環時間較長且不易被內質網吸收。(3) 靜電作用力，主要是利用兩種相反電性的物質互相聚集而形成微胞的結構，一般來說，利用這種電性結合的高分子微胞，通常皆應用於基因治療上，利用帶有正電性之高分子鏈段與帶有負電性之 DNA 做電性鍵結，藉此將 DNA 包覆於高分子微胞之內層中以利於攜帶，如圖 2-8 所示。K. Kataoka 等人於 2004 年，利用 PEG-PMPA-PLL 三團連共聚物與帶負電之 DNA 鍵結形成高分子錯合物微胞 (polyion complex micelles)，將其應用於基因治療上【29-33】。

在 高 分 子 微 胞 之 藥 物 包 覆 研 究 上，近 來 有 學 者 利 用 數 學 模 擬 藥 物 包 覆 之 過 程，已 證 實 在 藥 物 包 覆 初 期 時，是 藉 由 核 中 溶 劑(水)分 子 的 互 換 使 藥 物 進 入 高 分 子 微 胞 的 內 核，而 後 藥 物 再 逐 漸 往 內 核 中 心 累 積，並 且 將 高 分 子 微 胞 的 疏 水 鏈 段 推 離 內 核 中 心【34】。因 此，當 高 分 子 微 胞 包 覆 大 量 藥 物 時，由 於 內 核 會 向 外 膨 脹 而 使 得 高 分 子 微 胞 的 粒 徑 變 大。包 覆 藥 物 的 效 率 主 要 是 由 疏 水 性 藥 物 與 雙 性 高 分 子 疏 水 鏈 段 的 相 容 性 來 決 定，而 藥 物

與雙性高分子疏水鏈段的相容性可以依據 Flory-Huggins 作用力參數(interaction parameter) $\chi_{sp}$ 來判斷【35】。當 $\chi_{sp}$ 越小時，藥物與疏水鏈段的相容性就越大。而雙性高分子的親水鏈段與疏水鏈段之比例也會影響包覆藥物的效率；疏水鏈段分子量越大則內核就越大，故藥物包覆量越多；反之，增加親水鏈段的分子量，則高分子微胞的臨界微胞濃度會增加，亦即在固定的雙性高分子濃度下，所能形成微胞的數目相對較少，因此藥物包覆量亦減少。

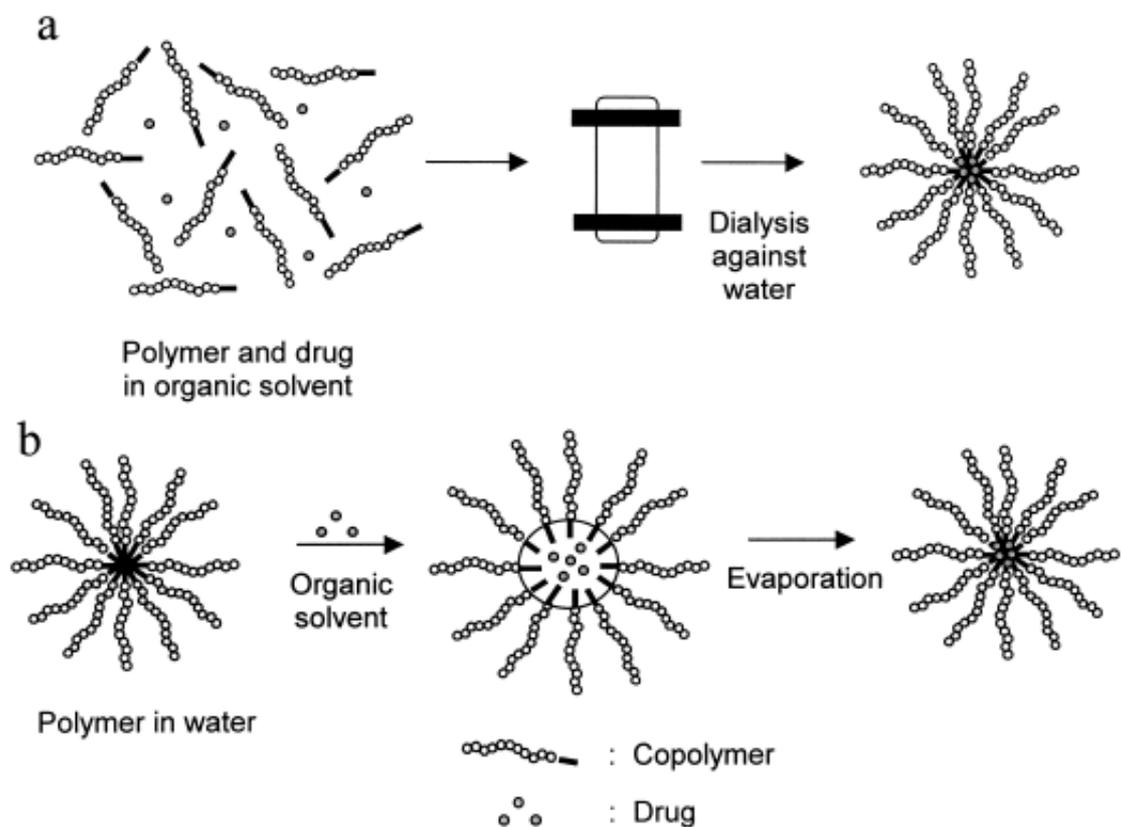


圖 2-6、高分子微胞之物理性包覆藥物示意圖 (a)透析法；(b)乳化法 (M. C. Jones, J. C. Leroux, *J.Europ.Pharm.Biopharm*, 48 (1999) 101-111)

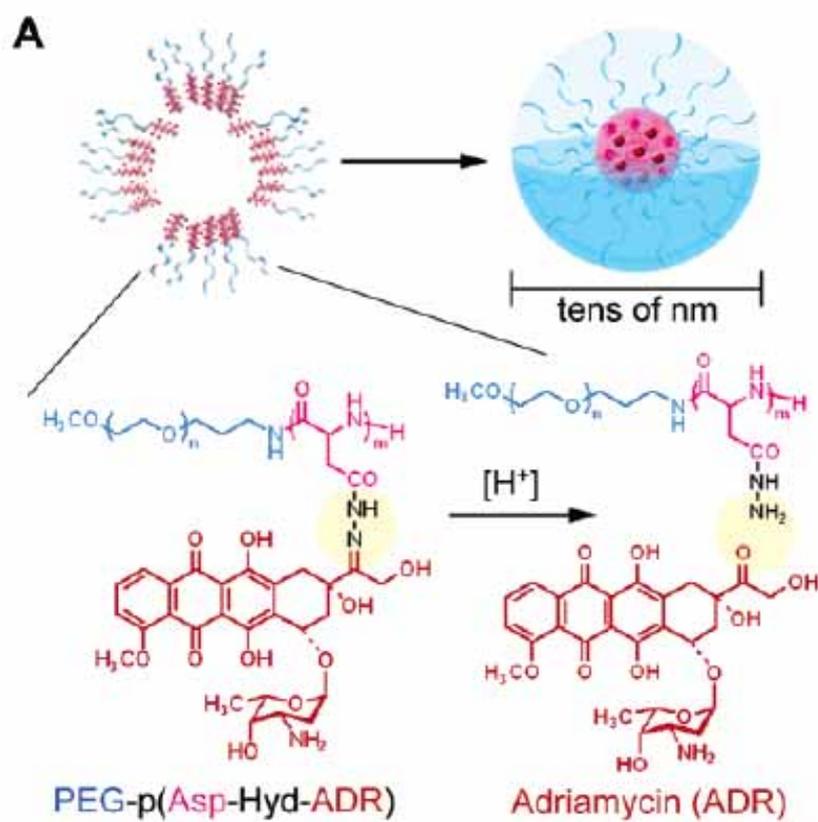


圖 2-7、PEG-b-PAsp(ADR)之化學鍵結型奈米微胞及其藥物釋放之示意圖(Y. Bae, K. Kataoka et al, *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 122-130.)

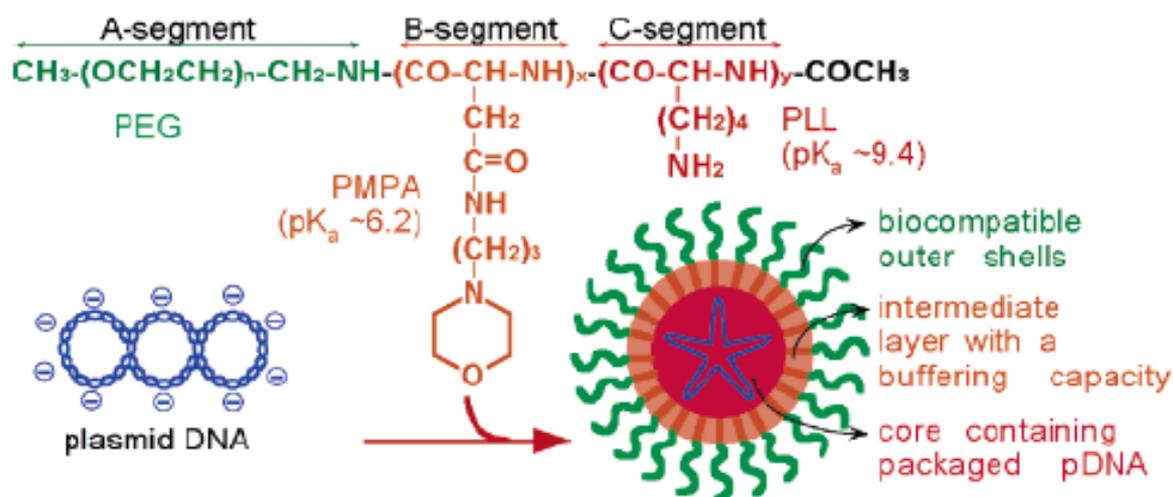


圖 2-8、PEG-PMPA-PLL 三團連共聚物與 DNA 鍵結形成高分子錯合物微胞之示意圖(K. Kataoka et al, *J. AM. CHEM. SOC.* 2005, 127, 2810-2811)

### 2-2-3、免疫隱蔽性奈米微胞

生物體內的細胞膜是由磷脂質(phospholipid)所組成，而磷脂質為一雙性分子(amphiphiles)，是由一個甘油(glycerol)與兩條脂肪酸鏈(fatty acid chain)組成疏水端，另一端為極性頭基(hydrophobic polar headgroup)組成之親水端。磷脂質的親水端(極性頭基)略帶負電性，亦即細胞膜表面之電性為弱負電性，故我們在設計免疫隱蔽性奈米微胞之外殼結構時，就必須選用帶有弱負電性之親水鏈段，常見的弱負電親水性高分子有 poly(ethylene glycol)(PEG)、poly(2-ethyl-2-oxazoline)(PEOz)、poly(2-hydroxyethyl methacrylate)(PHEMA)以及 poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)(PNVP)等等【2,36-38】。由此類高分子組成之奈米微胞皆可避免被巨噬細胞(macrophages)或嗜中性白血球細胞

(neutrophils)所辨識，可有效地提高在體內循環之半衰期，並可利用腫瘤組織之特異性，達到選擇性的自然標的作用 (passive targeting)。此外，微胞粒徑大小亦相當重要，若粒徑小於 100 nm 可避免被免疫系統所辨識；小於 50 nm，則可輕易被腎臟系統所排泄。免疫隱蔽性奈米微胞的例子有很多，相關的文獻亦不勝枚舉，其中於 2005 年時，M. Annka 等人就利用 poly(ethylene glycol)及 poly(N-isopropylacrylamide)，設計一具有免疫隱蔽性與溫度敏感性之二團聯共聚物，並探討在水相中的自組裝行為與溫度應答行為，如圖 2-9 所示【39】。

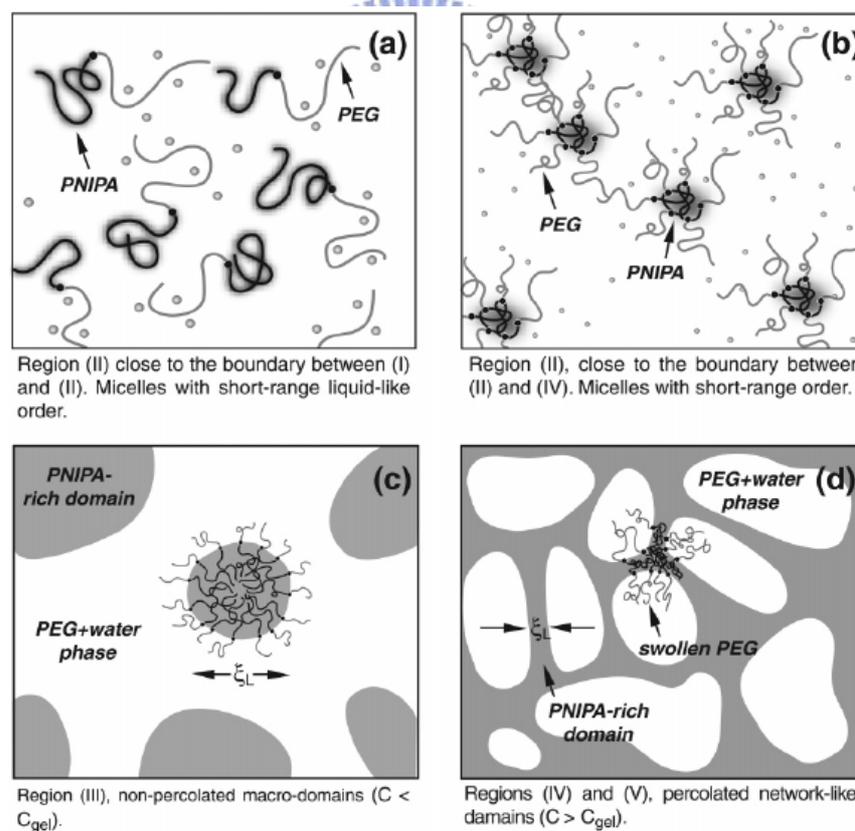


圖 2-9、免疫隱蔽性奈米微胞 PEG-b-PNIPA 之自組裝與聚集行為之示意圖(R. Motokawa, M. Annaka et al, *Macromolecules* 2005, 38, 5748-5760)

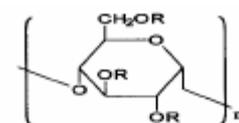
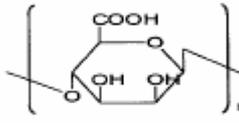
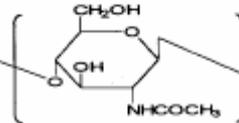
#### 2-2-4、生物可降解型奈米微胞

高分子材料欲應用於生物醫學領域，其基本特性之一即為本身必須具備生物可降解的特徵，所謂的生物可降解性 (biodegradable) 即為材料可被微生物分解或是被體內之酵素分解成微小、無害的小分子系統皆稱之。對於將高分子材料應用於生物體內之行為而言，不見得一定要分解成小分子非可，只要材料本身可行生物吸收 (bioabsorption)、生物再吸收 (bioresorption) 以及生物溶蝕 (bioerosion) 之行為而轉變成可被人體吸收或排泄之小鏈段，我們皆稱為生物可降解性高分子。而此類高分子應用於奈米微胞之製備上，常見的材料有聚酯 (polyester)、聚醯胺 (polyamide)、聚酸酐 (polyanhydride) 以及蛋白質 (protein) 等，如表 2-1 所示【40】。其中聚酸酐本身為聚酯的變形，其本身之降解行為(半衰期)皆比聚酯與聚醯胺來的快(短)，而其中聚醯胺由於其本身具有強烈的氫鍵作用力與排列規則的重複單元(高分子鏈段較剛硬)，故其降解之半衰期相當地長，甚至常被歸類於生物不可降解性高分子。雖然聚酯類高分子本身亦具有氫鍵作用力，但由於其本身之鏈段較柔軟之故，較容易被微生物或體內酵素分解或吸收。至於常見的聚酯類高分子有 poly(*D,L*-lactide)、poly( $\epsilon$ -caprolactone) 等；常見的聚酸酐高分子有 poly(sebacic anhydride)，而聚酯類與聚酸酐類高分子應用於奈米微胞之設計上，通常皆將其設計於奈米微胞之內核，利用其疏水作用力，包覆疏水藥物(例如 doxorubicin)。而常見的聚醯胺類高分子有 poly(2-ethyl-2-oxazoline)，由於聚醯胺類高分子本身較聚酯類高分子親水，故 poly(2-ethyl-2-oxazoline)

本身常被當作奈米微粒之外殼，於體內循環時，可藉其表面帶負電之介面電位穩定地於血液中循環而避免被巨噬細胞 (macrophage) 或嗜中性白血球細胞 (neutrophils) 所辨識，因此可大大地延長奈米微粒於血液中之循環時間，所以由 poly(2-ethyl-2-oxazoline) 所組成之奈米微粒，其本身不但是生物可降解性之微粒亦為免疫隱蔽性微粒之一支。綜觀上述，我們可以依高分子之不同降解半衰期與其他特性，設計出不同用途之奈米微粒。例如 2006 年 J. Rieger 等人發表於 *Adv. Funct. Mater.*，在其研究中，Rieger 團隊利用 poly( $\epsilon$ -caprolactone) 當作奈米微粒之內核以及 poly(ethylene glycol) 當作奈米微粒之外殼，設計出不同型態之團聯與接枝共聚物，探討奈米微粒之穩定性與降解行為等【41】。



表 2-1、常見之生物可分解性高分子【40】

Polymer	Structure	Example	Enzyme
protein			
polypeptides	$\left[ \text{HN}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$	Albumin Fibrinogen Collagen Gelatin	peptide chymotrypsin pepsine papain, etc.
Poly(amino acid)		Poly-L-leucine Poly-L-lysine Poly-L-glutamic acid	
polysaccharides		Amylose Hydroxyethylstarch Dextran	amylase  amylase
		Alginic acid	
		Chitin	lysozyme
polyesters			
Poly( $\alpha$ -hydroxy acids)	$\left[ \text{O}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$	Polylactide Polyglycolide Polyglactin Poly( $\alpha$ -malic acid)	none none none none
Poly( $\omega$ - hydroxy acids)	$\left[ \text{O}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$	Poly- $\epsilon$ -caprolactone	none
Poly(ester-ether)	$\left[ \text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$	Poly(1,4-dioxan-2-one)	none
polyanhydride	$\left[ \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_8-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right]_n$	Poly(sebacic anhydride)	None
polycarbonate	$\left[ \text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$	Poly(1,3-dioxan-2-one)	None

### 2-2-5、酸鹼應答型奈米微胞

近幾年來，酸鹼應答型奈米微胞在癌症治療上逐漸受到重視，已有不少學者利用細胞內外 pH 值差異或癌症組織較低之 pH 值等特性設計微胞結構，達到定點藥物釋放之目的。而所有的酸鹼應答型高分子都具有酸性/陰電性之官能基，如 carboxylic acid 或 sulfonic acid 等；或是具有鹼性/正電性之官能基，如 ammonium salt 等。當外在環境之 pH 值大於或小於官能基的 pKa 值時，就會使酸性官能基去質子化(deprotonation)而帶負電或使鹼性官能基質子化(protonation)而帶正電，常見的酸鹼應答型高分子皆如圖 2-10 所示【42】。

一般而言，酸鹼應答型奈米微胞應用於癌症治療上可簡單地設計成三種不同的類型：

(1) 利用結構中高分子鏈段質子化或去質子化所造成的靜電排斥力(正電排斥力或負電排斥力)，直接造成結構的破壞，進一步地將微胞所包覆之藥物做選擇性地釋放，例如 2004 年，G. H. Hsiue 等人以 poly(D,L-lactide)-g-poly(N-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid)接枝共聚物製備奈米微胞，利用 PLA 之疏水作用力包覆疏水之抗癌藥物 5-FU 後，將奈米微胞置於 pH 5.0 下，可使結構解體釋放出藥物，而於 pH 7.4 時，抗癌藥物則被穩定地被包覆於微胞之內核【43】。

(2) 利用化學鍵結方式，即利用共價鍵(如醯胺鍵(amide bond))來鍵結藥物，在藥物與高分子之間導入一特定酸性環境下會斷裂之隔離基(spacer)以利藥物釋放，通常是將此隔離基之斷鍵酸

鹼值設定在 pH4.5~6.5 之間。亦即是利用癌症組織附近之低 pH 值，進行細胞外或細胞內之藥物釋放。K. Kataoka 等人於 2005 年，即是利用 poly(ethylene glycol)與 poly-(aspartic acid)形成雙團聯共聚物(PEG-b-PAsp)，將其與 adriamycin 行共價鍵結形成 [PEG-b-PAsp(ADR)]之雙性共聚物，以進行體內藥物釋放的研究【44】。

(3) 將奈米微粒之內核設計成帶有電性(正電性或負電性皆可)之高分子鏈段(此鏈段不需設計為疏水鏈段)，利用正負電相吸之原理，將其與相反電性之藥物做電性之結合。然而此具有應答行為之內核，其酸鹼應答範圍同樣地必須界於 pH4.5~6.5 之間，才可應用於癌症治療上。例如，T. G. Park 等人於 2000 年，利用 poly(DMAEMA-co-NVP)-b-PEG-galactose 雙性團聯共聚物包覆帶有負電之 DNA 做為基因治療之載體，並探討其 DNA 包覆與轉染之行為與細胞存活率之相關性【45】。

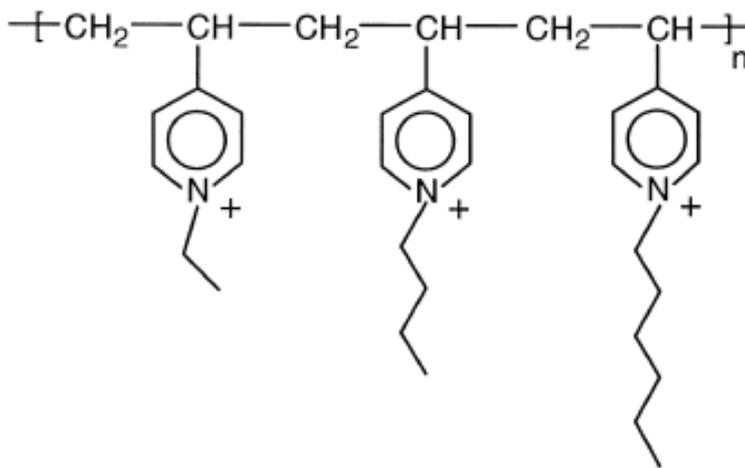


Fig. 1. Quaternized poly(4-vinylpyridine).

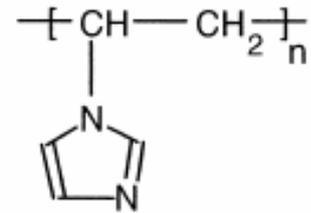


Fig. 3. Poly(vinylimidazole)

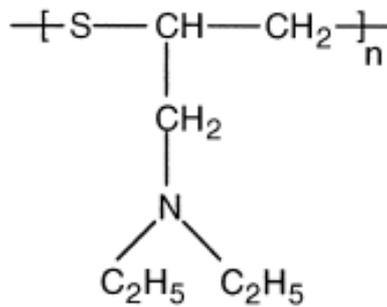


Fig. 2. Poly[thio-1-(*N,N*-diethyl)aminoethylethylene].

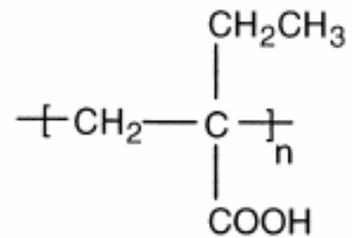


Fig. 4. Poly(2-ethacrylic acid).

圖2-10、不同種類的酸鹼應答巨電解質高分子：

- (1) Poly(4-vinylpyridine),
- (2) Poly[thio-1-(*N,N*-diethyl)aminoethylethylene]
- (3) poly(vinylimidazole)
- (4) poly(2-ethacrylic acid)

(S. R. Tonge, B. J. Tighe, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53 2001, 109–122)

## 2-2-6、開關型奈米微胞

簡言之，開關型奈米微胞即是可藉由人為操控或是環境的改變而具有可逆行為(reversible)之載體，通常可藉由環境中之溫度(temperature)、酸鹼值(pH)、離子強度(ionic strength)、溶劑(solvent)、磁場(magnetic field)、電場(electric field)、光線(light)以及特異分子(specific molecule)存在下來調控載體的開關情形【46-48】。然而開關型載體要作成奈米尺寸並不容易，目前文獻上常見的開關型載體皆是將具有應答行為的高分子接枝在微米尺寸之容器表面，所以其開關行為僅侷限在高分子接枝之表面區域，應答效率有限。另外，開關型載體亦可做成微米尺寸之高分子水膠(hydrogel)，而水膠之膨潤情形可由本身之交聯程度決定，故其開關程度可自由地控制，缺點即為本身無法藉由高分子自組裝成奈米尺寸且具由殼核結構之奈米微胞，這將會限制其應用價值。至於最常見的開關型應答材料有藉由溫度調控的 poly(N-isopropyl acrylamide)(PNIPAAm)，因其本身具有所謂的低臨界溶液溫度(lower critical solution temperature, LCST)，PNIPAAm 之 LCST 約為 32°C，高於此溫度，PNIPAAm 會呈凝膠態；低於此溫度則會呈溶液態，且型態的轉變相當快速，故非常適合拿來當作開關型載體的研究，如圖 2-11 所示【49】。其他較常見的開關型載體有利用環境中酸鹼值的改變來最為調控的因子，例如 poly(methacrylic acid)，其酸鹼應答約在 pH 5.0 附近，可將高分子接枝在載體表面，藉由其本身質子化或去質子化的能力，造成高分子鏈段的膨潤或是收縮，進一步造成開關應答的效果，如圖 2-12 所示【50】。綜觀上述，要研究一開關型載體並不容易，然而要設計成奈米層級之開關型載體更有其難度，本論文即是在挑戰並設計出一具有酸鹼應答之開關型奈米微胞。

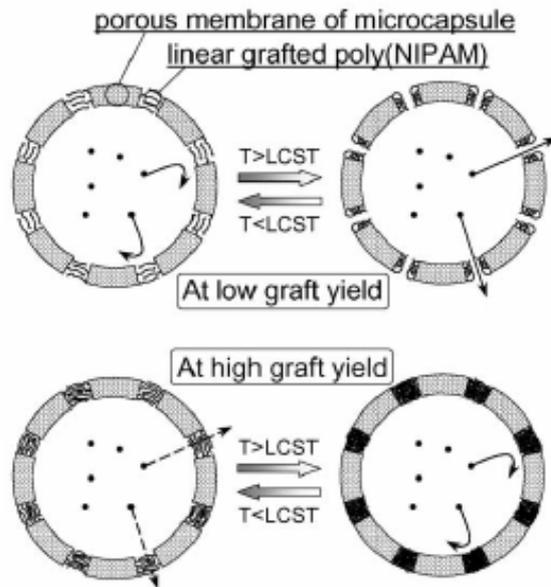


圖 2-11、溫度應答之開關型載體示意圖 (Liang-Yin Chu et al, *Journal of Membrane Science*, 192 (2001) 27–39)

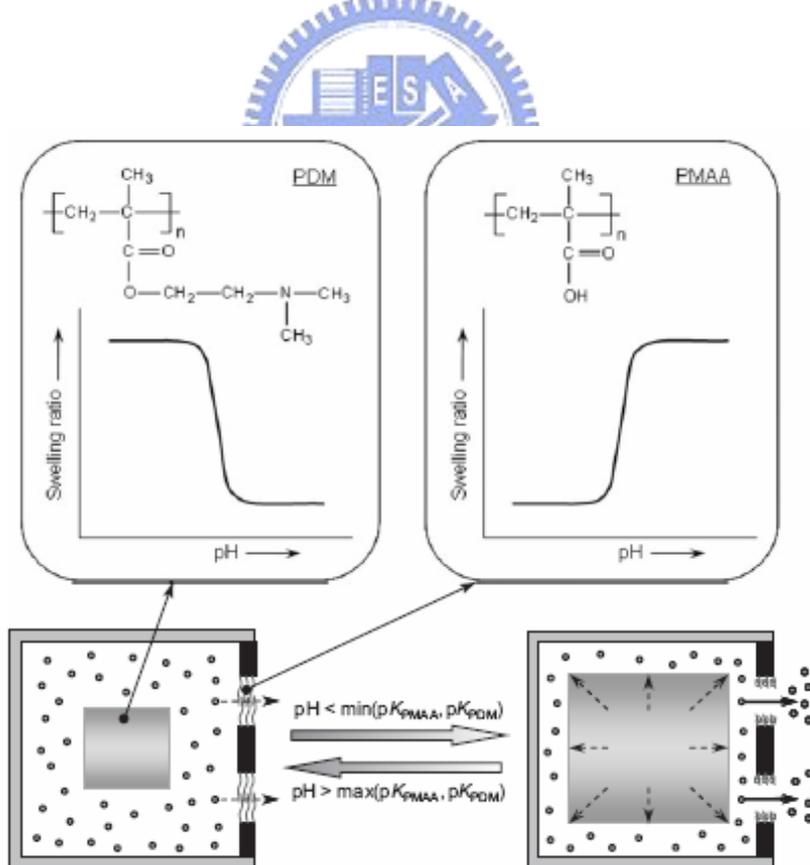


圖 2-12、酸鹼應答之開關型載體示意圖 (Liang-Yin Chu et al, *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, 1865 – 1872)

## 2-3、複合型奈米微胞之介紹

近年來，複合型奈米微胞(mixed micelles)為各界發展奈米科技中重點研究之一。其研究範圍涵蓋層面相當廣泛，包括界面活性劑與高分子系統(surfactant-polymer system)、高分子與微脂粒系統(polymer- liposome system)、以及高分子與高分子系統(polymer-polymer system)等。高分子各自具有其臨界微胞濃度，因此複合型高分子奈米微胞在形成時涉及兩種不同高分子在奈米結構中之嵌入(entry)及逃脫(escape)行為，而逃脫之高分子若其在溶劑中之濃度高於臨界微胞濃度時亦能各自形成單一種奈米結構，因而可能造成系統同時有單一高分子奈米結構與複合型高分子奈米結構並存之形態，而此一現象可由兩種高分子微胞之雜交行為(hybridization)推論得知【51】。此外，共聚合高分子之形態、分子內或分子間相互作用力、以及高分子之立體障礙等亦皆會影響另一組成進入複合結構之能力，因而難以探討其複合型微胞形成之機制。

### 2-3-1、高分子高分子複合型奈米微胞

高分子微胞應用於藥物釋放傳輸系統上是近十幾年來各方研究重點之一。其與微脂粒之差異乃在於高分子種類繁多，並可依實際需要設計與合成；高分子所形成之奈米微胞結構穩定，在體內血液之半衰期較長；再者，高分子微胞可使其同時具有多功能性，可製備成多能化之奈米元件應用於診斷與治療上。然而，高分子縱使可利用分子設計達到多樣化與多功能性，

但可能因其結構複雜或立體障礙過大而無法形成奈米級微胞。因此，兩種高分子組合而成之複合型高分子微胞在現今已逐漸受到重視。而由目前的研究文獻上來看，大部分都在探討因疏水性作用力聚集(hydrophobic interaction)所形成之複合型奈米微胞，如圖 2-13 所示【52-59】。僅有少數是以靜電作用力(electrolytic interaction)的方式來形成複合型高分子微胞【58,60-65】。

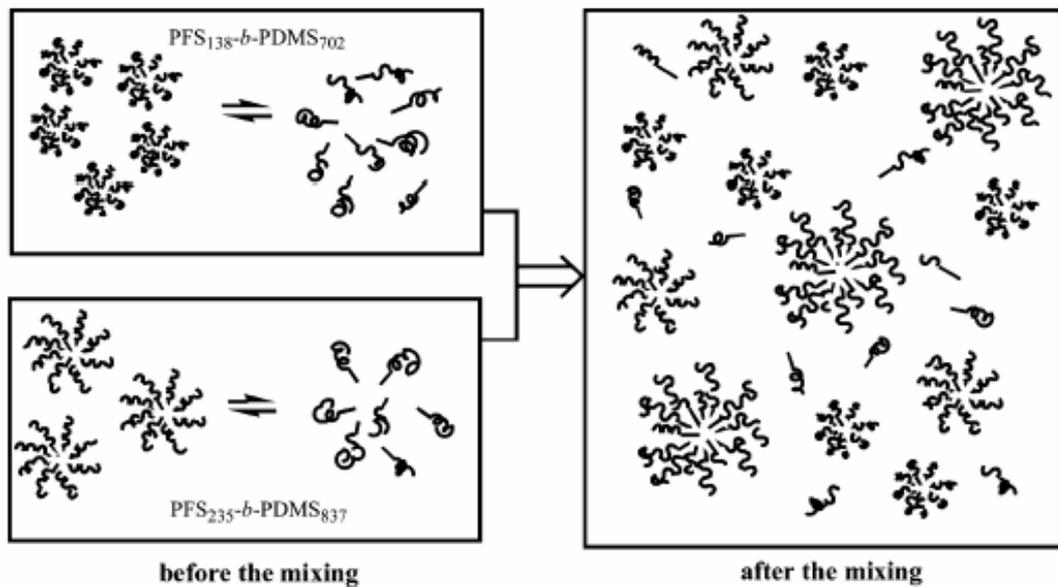


圖 2-13、複合型奈米微胞疏水性自我排列示意圖。

(C. Wu, *Macromol.*, 2004, 37, 2438)

此外，1996 年 P. Sens 等人以兩團聯共聚物探討高分子之不對稱性對於複合型奈米微胞形成之影響。其研究結果結果發現：

(1) 若兩高分子之大小與不對稱性差異不大，則在自我聚集過

程中，較短之高分子會持續的併入較大之高分子所形成的微胞中，而形成複合型高分子微胞；

- (2) 若不對稱性差異大，則複合型高分子微胞與較大之高分子所形成的微胞皆會共同存在【66】。

另外，1999 年 Benjamin Chu 等人也利用溫度的變化，改變  $E_{99}P_{69}E_{99}$  與  $E_{45}B_{14}E_{45}$  三團聯共聚物（E、P、B 分別為 oxyethylene、oxypropylene 和 oxybutylene）在水溶液中的臨界微胞濃度，並藉由其臨界微胞濃度之相對大小，來探討  $E_{99}P_{69}E_{99}$  與  $E_{45}B_{14}E_{45}$  混合物在水溶液中的自我聚集行為，並歸納出以下之結論：

- 
- (1) 對於兩個可互溶的團聯共聚物在一選擇性溶液中通常會自我聚集形成複合型高分子微胞，而不是個別的高分子微胞共存；
- (2) 在固定溫度下，若一團聯共聚物（A）的臨界微胞濃度遠低於另一團聯共聚物（B），則兩者混合之高分子溶液的臨界微胞濃度主要由共聚物（A）來決定。當混合溶液中之共聚物（A）濃度達到其臨界微胞濃度時，則共聚物（A）會先形成微胞，而共聚物（B）會逐漸地加入團聯共聚物（A）所形成之微胞，且隨著團聯共聚物（B）濃度的增加，加入微胞的比例就越高，最後達到其進料之比例；
- (3) 若共聚物（B）的臨界微胞濃度只略高於共聚物（A），會有一部份之共聚物（B）會參與共聚物（A）微胞化的過程，

即使共聚物 (B) 之濃度低於其臨界微胞濃度，這是由於共聚物之分子量分佈的影響。對於具有相同臨界微胞濃度 (coassociation point) 的兩個共聚物而言，他們會同時聚集而形成複合型微胞，且臨界微胞濃度仍然與個別的高分子 (A) 或 (B) 溶液相同。

(4) 複合型微胞之重量平均聚集數 (weight-average association number,  $n_w$ ) 及水力半徑 (hydrodynamic radius,  $R_h$ ) 會介於共聚物 (A) 及共聚物 (B) 間，而在複合型微胞中具有較大比例之共聚物，對於  $n_w$  與  $R_h$  也具有較大之影響【67】。

### 2-3-2、高分子-微脂粒複合型奈米微胞



從 1965 年英國劍橋 Babraham Institute 的 Alec Bangham 發現當磷脂質薄膜分散於水相環境系統中時，會形成許多類似洋蔥多層結構 (multilamella structure) 的中空球體後，微脂粒的形成機制及其可能的應用與發展逐漸受到起重視。由於微脂粒特殊的中空球體及類似生物膜的結構，再加上其為天然物質所構成，具有良好的生物相容性及生物可分解性，使得微脂粒在生物學、製藥以及醫學的研究與應用皆佔有相當重要的地位。但由於微脂粒在體內、體外存在著穩定性的問題，而使得微脂粒的發展與應用受到非常大之限制。因此，近幾年來添加一物質進入微脂粒用於穩定載體結構成為一研究與應用之趨勢。而其中尤以高分子與微脂粒混合製備形成複合型奈米微胞 (或稱為人造微脂粒) 最受重視。其優點不僅可改善微脂粒之穩定性、

提高微脂粒於血液中之半衰期外，更可藉由高分子之特殊結構使微脂粒同時具有環境應答之性質或具有標的之性質。

從文獻上已可得知多種高分子團聯共聚合物應用於高分子-微脂粒複合型奈米微胞系統上。而其形成機制之探討著重磷酯質與高分子之立體空間作用力、構形改變、以及動態穩定性等。例如以 Langmuir-Blodgett technique 探討單一分子層之磷酯質與高分子分散與聚集行為；以螢光光譜儀研究高分子與磷酯質之聚集；以及以橢圓儀(ellipometry)研究分子構形之變化等。

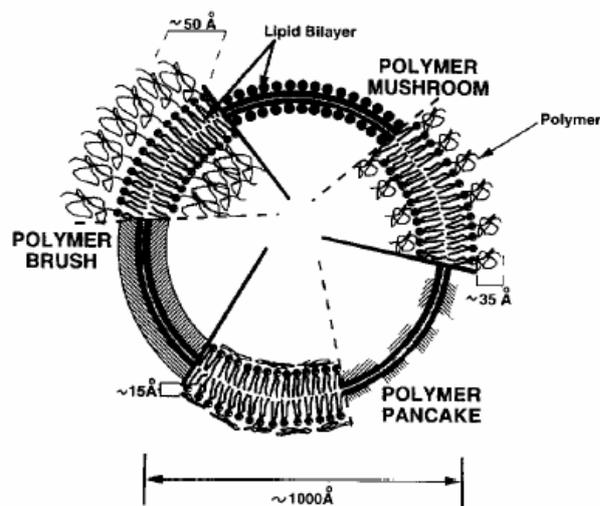


圖 2-14、高分子-微脂粒複合型奈米微胞之形態示意圖。(B. Ceh, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, 24, 165.)

一般常見用於增加微脂粒穩定性的高分子有 poly(ethylene glycol) (PEG) 高分子衍生物、chitosan 高分子衍生物、以及 poly(vinyl alcohol) (PVA) 高分子衍生物等。不同之高分子組成與

結構在微脂粒脂表面會呈現不同之構形，如圖 2-14 所示。其中最常見的高分子為 PEG 與 PVA 等高分子衍生物，由於其本身帶弱電性，因此其與微脂粒之結合方式大部份皆是利用其衍生物(疏水端)與磷脂質之脂肪鏈段以疏水力量(hydrophobic interaction)聚集，而將親水鏈段裸露於外【68-72】，如圖 2-15 所示。而具帶電性之高分子如 chitosan 等，則可利用其電性與帶相反電性之磷脂質產生電性吸引作用，使高分子能緊密與微脂粒結合【73-76】。而這些高分子包覆於微脂粒外層後，高分子鏈段能避免微脂粒之間的相互融合(fusion)，且高分子間無聚集產生，故能增強微脂粒之穩定性。而若高分子本身極具親水性，則其與微脂粒結合後，則能延長微脂粒於血液系統中的循環時間，並且可躲避免疫系統之辨識，或避免與組織或細胞產生沾黏，而提高微脂粒於血液中之半衰期，也可避免微脂粒受鹽類與 lipase 等破壞，使高分子-微脂粒複合型奈米微胞能累積於欲標的之器官或細胞。

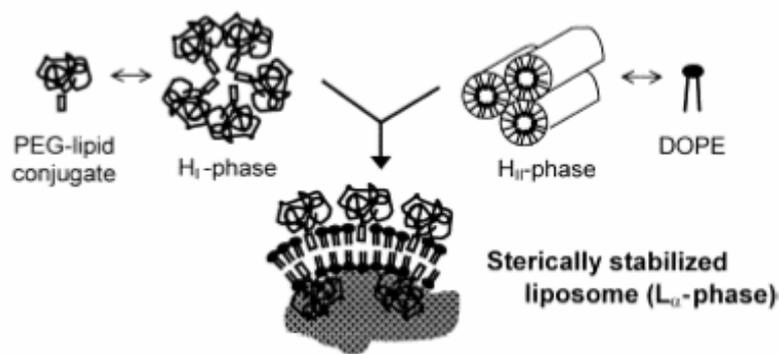


圖 2-15、含 poly(ethylene glycol)高分子衍生物之微脂粒(D. H. Thompson, *J. Control. Rel.*, 2003, 91, 187)

## 2-4、腫瘤組織構造及其與奈米藥物載體之傳遞行為

### 2-4-1、腫瘤組織構造與藥物傳遞之關係

要了解奈米藥物載體對於腫瘤細胞的毒殺機制，我們就必須先對腫瘤組織結構做一個簡單的概述，腫瘤在其組織構造上可分為三大部分，分別為癌細胞、增生血管與collagen-rich interstitium【77】。其中癌細胞佔據整體體積的50%以上，而由癌細胞所增生的血管約佔1至10%，而其餘的體積則為collagen-rich interstitium。癌細胞的支撐與保護則是由增生血管與collagen-rich interstitium 所構成。腫瘤組織之血管具特異性，它能使養份與氧氣大量停留並提供癌細胞之吸收，且其密度極高與一般正常組織不同。這是由於腫瘤細胞能大量分泌一些刺激血管增生之因子，如vascular endothelium growth factor(VEGF)、bradykinin 及nitric oxide等。這些刺激因子除了能增生血管外，還可使血管之上皮細胞間距變大，細胞之通透性增加。而癌細胞之保護則是由collagen 所構成的彈性纖維狀網狀結構所構築，此結構中充滿體液與巨大分子(hyaluronate與proteoglycans)而形成一親水性膠體。此結構與一般正常組織不同，它具有高內部壓力使血管中的體液不易進入，更能防止藥物以擴散方式進入而達到保護癌細胞之功能【78】。造成此一原因是因腫瘤細胞能排除週遭淋巴系統，防止組織與淋巴系統達成擴散平衡，進而增加養份與氧氣停留於腫瘤的時間使癌細胞能充分吸收。

由上述可知，一般的抗癌藥物欲由血液到達細胞造成作用必須克服非常多的困難【79】。其一，藥物必須克服腫瘤層

級的物理性阻力(non cellular based mechanisms)，即組織的高內壓及組織帶酸性之環境對藥物之阻抗。其二，藥物必須克服細胞層級的阻力(cellular mechanisms)，即癌細胞的生物化學性質改變。這些改變包含了apoptosis regulation 及 transport based mechanisms 等。其三，藥物必須克服投藥入體內後之分佈及吸收等。因此，一般的抗癌藥物實質上進入腫瘤並不多，反而造成正常細胞之毒害。一般藥物是以擴散方式由血液進入組織，而奈米粒子作為藥物載體之傳遞方式則與一般藥物不同。藥物載體在血液中流動時，可藉由細胞與細胞間的open gaps (interendothelial junctions 與transendothelial channels)或細胞的transcytosis 模式進入組織，這些方式不受組織內壓力之影響，只與載體之分子特性相關。



#### 2-4-2、奈米藥物載體之藥物傳遞機制

如同先前所述，傳統的給藥方式是經由血液將藥物慢慢地擴散至腫瘤組織處，再經由癌細胞所吸收，此種給藥方式具有dose-dependent的現象，即當血液中藥物濃度越高，癌細胞所吞嚥的藥物也就越多。而此法亦會造成一般正常組織細胞的毒害，所以我們必須設計一智慧型藥物載體，負載疏水性抗癌藥物以進行腫瘤細胞的毒殺。而因藥物載體本身設計之不同，自血液累積於腫瘤組織之機制亦不相同，常見的累積機制有主動標的(active tumor targeting)與被動標的(passive tumor targeting)兩種，如圖2-16所示【80】。

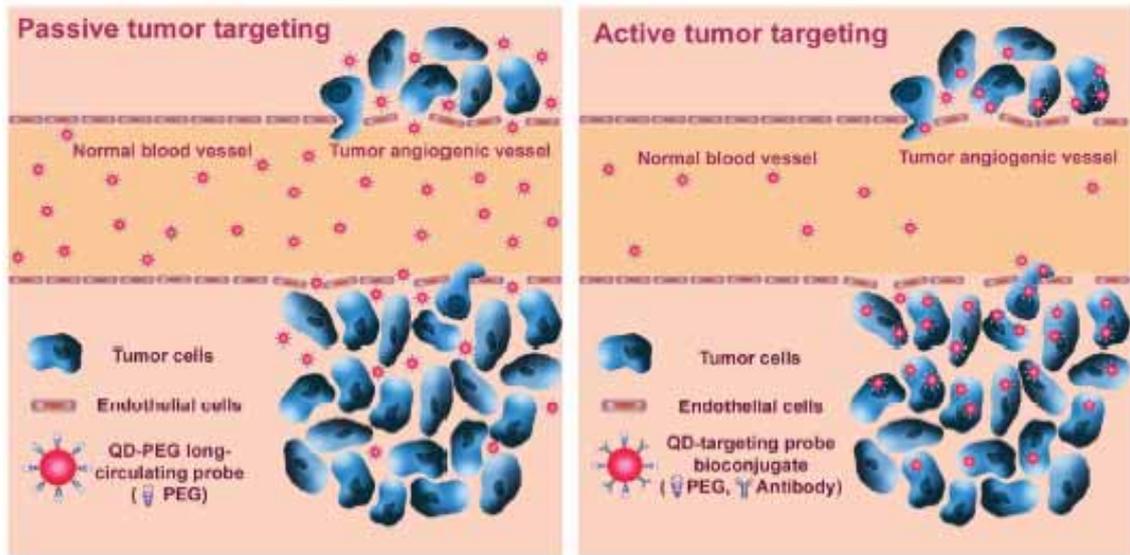


圖 2-16、高分子藥物微胞載體自血液累積於腫瘤或癌細胞之傳輸模式示意圖(Xiaohu Gao, *Nature biotechnology*, 2004, 22(8), 969)

一般而言，使用主動標的機制累積於腫瘤組織之藥物載體，其本身之結構通常都具備有所謂的特殊辨識基或稱標的官能基(targeting moiety)，常見的標的官能基有葉酸(folic acid)、醣類(carbohydrate)以及賀爾蒙(hormone)等等，而標的官能基通常都是將其設計於雙性高分子微胞之親水末端，以化學鍵結的方式鍵結。其作用機制即是藉由凡得瓦力、離子鍵、氫鍵等作用力與癌細胞表面所具有之特定接收器(receptor)結合，此即所謂的主動式標的。此種方式的攝取速度雖然不如吸附式胞飲快，但是其專一性與藥物安全性是其他種傳遞模式無法比擬的。

第二種標的機制為被動式標的，即是先將藥物載體經由靜脈注射(intravenous administration)的方式，經由血液之循環運送至全身，而由於藥物載體(特別是高分子微胞)本身具有體

積小、親水外殼的特性，可以避免被MPS系統(mononuclear phagocyte system)所吸收；以及高分子量的特性，可以避免被腎臟系統所排泄(renal excretion)，此二種優勢可以大大延長藥物載體在體內循環的時間，待其累積於腫瘤細胞附近時，可藉由腫瘤增生過程中分泌比正常細胞多的血管通透因子(vascular permeability factor，如nitric oxide，bradykinin與peroxynitrite等)【81】，造成癌細胞附近血管細胞之通透性增大，進而增加高分子藥物微胞利用transcytosis或junction累積於腫瘤組織。

此外，腫瘤組織的增生亦會破壞周遭的淋巴系統，使高分子藥物微胞載體經由腫瘤組織吸收後，因無正常淋巴系統的滲透作用，使載體於組織中停留較長時間，且不易排出，此現象稱為EPR效應(enhanced permeability and retention effect)【82】，如圖2-17所示。而由於EPR效應之作用，使高分子微胞藥物載體雖無標的官能基，亦能大量累積於腫瘤組織。而腫瘤組織在增生過程中，亦會造成外部週遭血管增生，因此亦可藉由此特性造成高分子藥物微胞載體大量累積於腫瘤部位【83】。

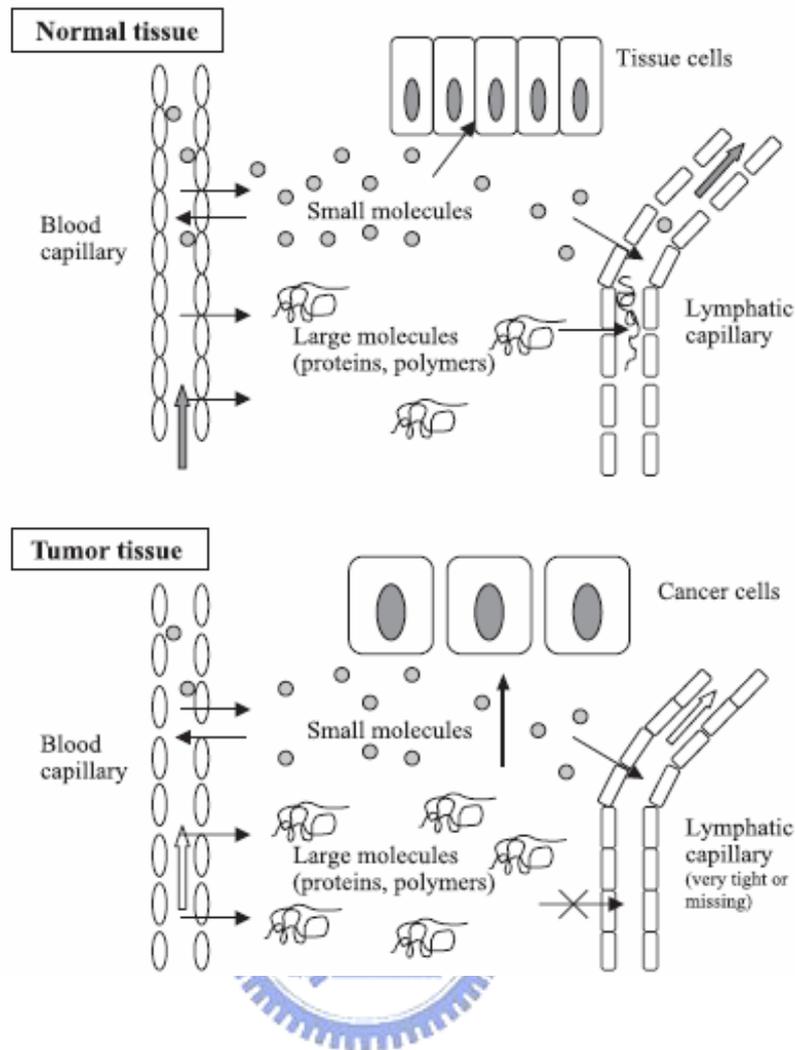


圖 2-17、EPR 效應示意圖

(K. Ulbrich, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56, 1023-1050)

### 2-4-3、奈米藥物載體之細胞吞噬機制

主動標的機制與被動標的機制是藥物載體自血液累積於腫瘤組織與癌細胞附近之作用機制，而藥物載體所包覆之藥物欲從細胞外進入細胞內必須經過所謂的細胞內藥物傳遞機制(intracellular drug delivery)與細胞外藥物傳遞機制(extracellular drug delivery)兩種，如圖 2-19 所示【84】。而在介紹這兩種傳遞機制之前，就必須先介紹何謂細胞的內吞

作用(endocytosis)【85-87】，簡單來說，內吞作用即是細胞進食的生理行為，其可細分為(1)吞噬作用(phagocytosis)：當外來物體積屬於比較巨大的層級(數微米)，細胞必須藉細胞膜經吞噬作用將其吞噬而形成所謂的 phagosome(吞噬小體的一種)，phagosome 會進一步地將其吞噬之物體傳遞至溶酶體(lysosome)，而溶酶體則會利用其內部之酵素將吞噬之外來物分解成小分子以利細胞吸收或排泄。通常會進行此項程序的是免疫系統中的巨噬細胞(macrophage)或嗜中性白血球細胞(neutrophils)。(2)胞飲作用(pinocytosis)：大體上之作用機制與吞噬作用類似，差別在於“進食”之物體體積相較於吞噬作用小的許多(數奈米以下)，而胞飲作用尚可進一步地細分為液相胞飲(fluid phase pinocytosis)與吸附性胞飲(adsorptive pinocytosis)，其作用後將形成所謂的吞噬小體(endosome)，同樣地，吞噬小體會將外來物傳遞至溶酶體處經由酵素進行分解。(3)受器調和內吞作用(receptor-mediated endocytosis)：藥物載體其上若接有特殊之標的官能基，可藉其與細胞上之抗體經由受器調和內吞作用傳遞至細胞內部，而後之分解過程皆與吞噬作用及胞飲作用類似，如圖 2-18 所示。

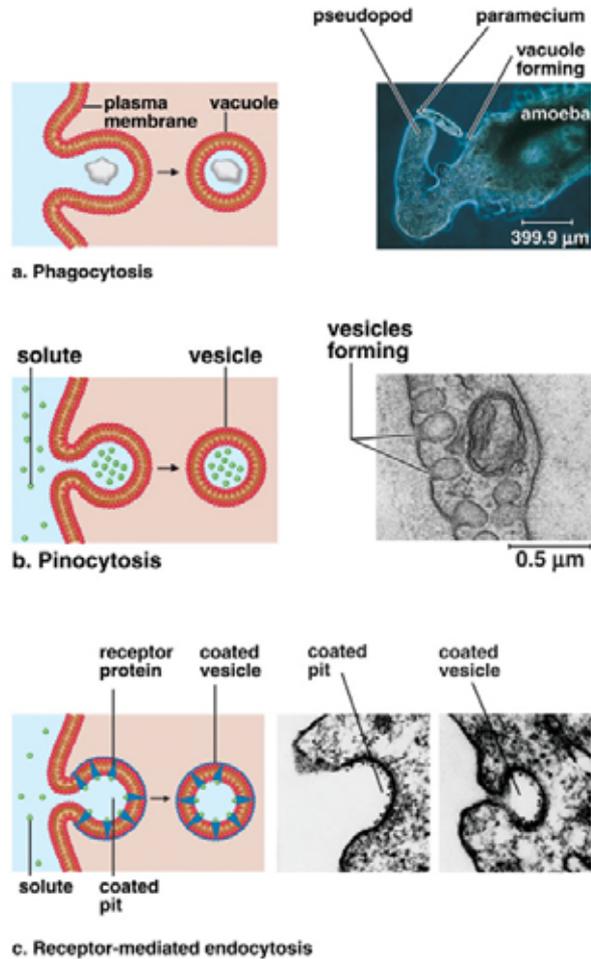


圖 2-18、細胞內吞作用之三種吞噬機制

(Copyright : McGraw-Hill Company)

而不論是細胞內藥物傳遞機制或是細胞外藥物傳遞機制皆必須通過細胞的內吞作用來達到藥物傳遞的效果，差別在於細胞內藥物傳遞機制是先經由細胞的內吞作用將藥物載體整個吞噬後，吞噬小體之pH值會由細胞外的中性環境慢慢藉由proton pump (ATPase)的作用，使吞噬小體成為一酸性環境(pH5.0~6.0)，可藉由此酸鹼環境之變化造成具有酸鹼應答之藥物載體結構產生破壞而釋放藥物或使藥物與載體之鍵結水解斷裂，使藥物脫離載體【88-91】。此外，吞噬小體會進而與溶酶體(lysosomes)結合形成次級溶酶體

(secondary lysosomes)(pH4.0~5.0)，此處具有豐富與多樣之酵素能分解載體或分解特殊之隔離基(spacer)，亦可使藥物與載體分離【92-93】。而細胞外藥物傳遞機制同樣地也是利用腫瘤組織具有較正常組織較低的pH值(約6.5~6.8)及較高之溫度(約38~39℃)，藥物載體若具有在此區間之應答效果，其內部之藥物便得以釋放，且藉由細胞的內吞作用傳遞至細胞內。除此之外，我們尚可設計一種所謂的高分子藥物(polymer-drug)與酵素載體(polymer-enzyme)，將其先後投遞腫瘤組織附近，藉由酵素的作用將藥物與高分子的鍵結切斷，再藉由細胞的內吞作用傳遞至細胞內以進行癌細胞的毒殺。

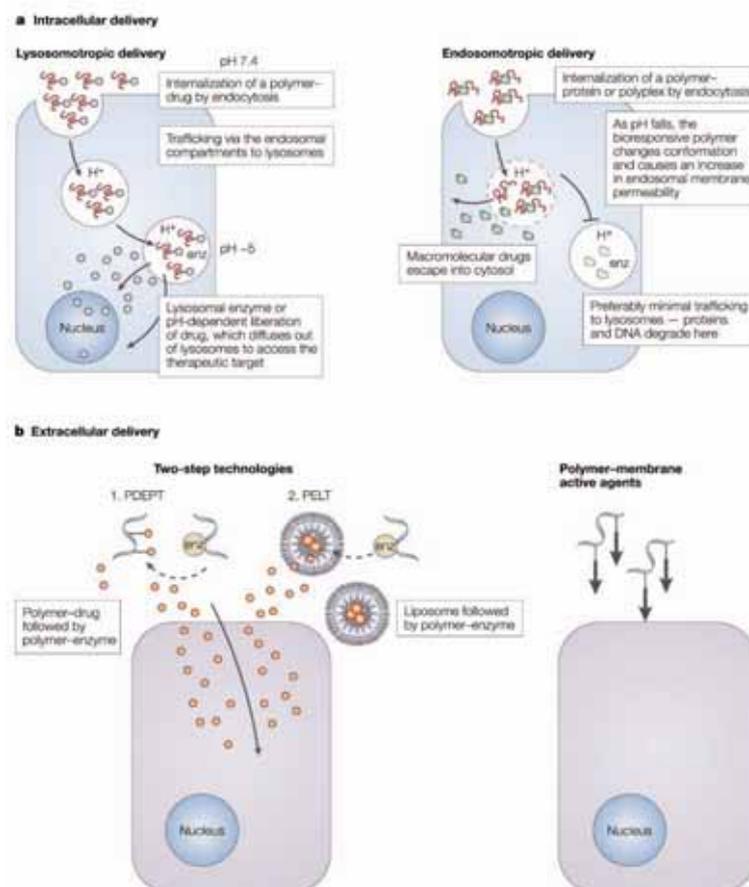


圖 2-19、藥物載體於組織或細胞內之藥物釋放模式示意圖

(R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2003, 2, 347-360)

## 第三章、實驗方法

### 3-1、實驗藥品

1. D,L-lactide, LA (Lancaster): 以 THF 再結晶純化兩次，抽氣過濾乾燥後放入 desicator 中備用。
2. 2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA (TCI): 以分子塞除水，減壓蒸餾後於 4°C 下冷藏備用。
3. Stannous octoate, Sn(Oct)<sub>2</sub> (Sigma): 直接使用。
4. Azobisisobutyronitrile, AIBN (Aldrich): 以 methanol 再結晶純化得 AIBN 固體結晶，乾燥後放入 desiccator 備用。
5. N-Vinylimidazole, NVI (TCI): 減壓蒸餾後於 4°C 下冷藏備用。
6. N-Vinyl-2-pyrrolidone, NVP(Fluka): 減壓蒸餾後於 4°C 下冷藏備用。
7. Methoxy poly(ethylene glycol), mPEG(Aldrich): 直接使用。
8. Acetone (HPLC degree, TEDIA): 直接使用。
9. Methanol, MeOH (TEDIA): 直接使用。
10. Ethanol, EtOH (TEDIA): 直接使
11. Toluene (TEDIA): 以 Sodium Tablet 除水，常壓下蒸餾後使用。
12. Dimethyl sulfide, DMSO (HPLC degree, TEDIA): 直接使
13. N,N-Dimethylformamide, DMF (HPLC degree, TEDIA): 直

- 接使用。
14. Dichloromethane, DCM(TEDIA): 直接使用。
  15. Tetrahydrofuran, THF(HPLC degree, TEDIA): 直接使用。
  16. N-methylpyrrolidone, NMP(HPLC degree, TEDIA): 直接使用。
  17. pyrene (Sigma): 直接使用。
  18. Uranyl acetate dehydrate(Fluka): 直接使用。
  19. Doxorubicin, Dox(東洋): 直接使用。
  20. Fetal bovine serum, FBS(GIBCO): 直接使用。
  21. Bovine Serum Albumin, BSA(Sigma): 直接使用。
  22. L-glutamine(GIBCO): 直接使用。
  23. Non-essential amino acid(GIBCO): 直接使用。
  24. Penicillin/streptomycin(GIBCO): 直接使用。
  25. Trypsin 0.25% in EDTA(GIBCO): 直接使用。
  26. Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO): 直接使用
  27. Paraformaldehyde (Showa): 直接使用。
  28. Lyso Tracker Green DND-26 (Molecular Probe): 直接使用。
  29. Triton X-100 (TEDIA): 直接使用。
  30. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT (ICN): 直接使用。
  31. Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM(GIBCO): 直接使用。
  32. Minimum essential medium, MEM(GIBCO): 直接使用。

33. Dimethyl sulfide-d6 + 1%  $v/v$  TMS (CIL): 直接使用。

34. Deuterium oxide, D2O (CIL): 直接使用。

35. Chloroform-d + Silver foil (CIL): 直接使用。

### 3-2、實驗裝置

1. 核磁共振光譜儀 (Nuclear magnetic resonance spectrophotometer, NMR: Bruker AM-500 NMR)。

2. 傅立葉紅外線光譜儀 (Fourier transfer infrared spectrophotometer, FT-IR: FTS-155, Bio-Rad)。

3. 凝膠滲透層析儀 (Gel permeation chromatography, GPC: Machery- Nagel NUCLEOGEL)。

4. 粒徑分析儀與介面電位儀 (Zetasizer 3000HSA:Malvern)。

5. 離心機 (Centrifugator: KA-1000, KUBOTA)。

6. 螢光光譜儀 (Fluorescence spectrometer: F-2500) (HITACHI)。

7. 冷凍乾燥機 (Freeze dryer, Heto CT 60E)。

8. 超過濾裝置 (Stirred Ultrafiltration Cell: Millipore MWCO 10,000)。

9. 穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscopy, JEOL JEM-2010)。

10. 原子力電子顯微鏡 (Atomic force microscopy, Bioscope AFM)

11. 無菌操作台 (Laminar flow, 海天)。

12. CO<sub>2</sub> 培養箱 (CO<sub>2</sub> incubator: NAPAC Model 6100 CO<sub>2</sub>)。
13. 96 孔盤酵素判讀儀 (Elisa Reader: Awareness StateFax2100)。
14. 倒立式像位差顯微鏡 (Phase contrast microscopy: Wild MPS 51S)。
15. 高溫滅菌箱 (Autoclave: Tomin, Tomin Medical Equipment LTD)。
16. 血球計數盤。
17. 共軛焦顯微鏡 (Laser Confocal Microscopy, Leica TCS-SP2)。
18. 透析膜 (Spectrapor dialysis membrane; MWCO: 6000~8000)

### 3-3、名詞對照



1. PLA  
poly(*D,L*-lactide)
2. PLA-HEMA:  
poly(*D,L*-lactide) with end-capped of HEMA
3. PLA-g-P(NVI-co-NVP): (*G0*、*G1*、*G2*、*G3*、*G4*、*G5*)  
poly(*D,L*-lactide)-g-  
poly(N-Vinylimidazole-co-N-Vinylpyrrolidone)
4. mPEG-PLA (*B1*、*B2*、*B3*)  
methoxypoly(ethyleneglycol)-b-poly(*D,L*-lactide)

### 3-4、酸鹼應答型接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)之合成

#### 3-4-1、PLA-HEMA 之合成

*D,L*-lactide 在 40°C 真空烘箱乾燥一天備用。將適量之起始劑 2-hydroxyethyl methacrylate 置於圓底雙頸瓶中，連接真空管線於真空下預熱至 50°C，將其殘留的水分除去，而後在充滿氮氣的環境中將已純化之 *D,L*-lactide 及除水之 toluene 置於反應瓶中並加熱至 130°C，待 *D,L*-lactide 完全溶解後，加入 1 wt.% Sn(OOct)<sub>2</sub> 觸媒進行陽離子開環反應。反應進行 16~18 個小時，以 DCM 稀釋產物，再加入少量的 0.1 N KOH/methanol 溶液於 0°C 下緩慢終止反應。接下來將產物通過 Silica Gel Column 除去鹽類及不純物，再以 hexane 再沉澱(Reprecipitate) 除去未反應單體，最後將產物收集以機械 pump 將剩餘 solvent 除去並乾燥得之。其反應式如下圖所示。

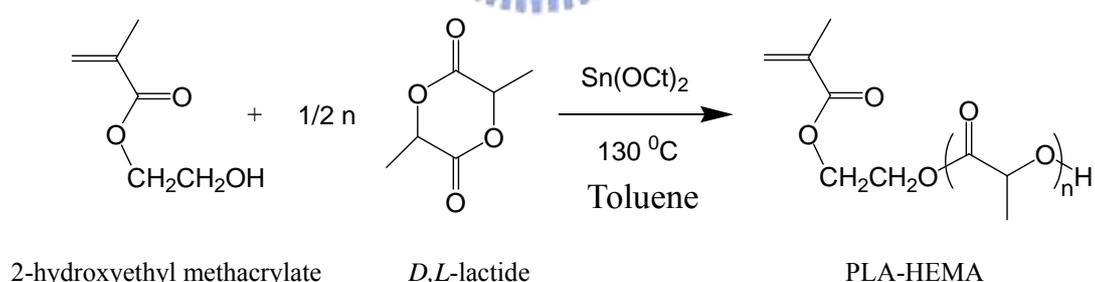


圖 3-1、PLA-HEMA 之合成示意圖

#### 3-4-2、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之合成

將定量之 PLA-HEMA、NVI 單體、NVP 單體及起始劑 AIBN 置於雙頸圓底燒瓶中。而後加入反應溶劑 methanol，待

反應物完全溶解，導入無水無氧之氮氣，進行 degas 3 次，將系統之氧氣除去，提高反應的成功率。而後於 70°C 下進行自由基聚合反應共 24 小時。反應完成，以 ether 進行再沉澱，除去未反應之單體。產物以抽氣過濾的方式收集並於 40°C 烘箱中乾燥 24 小時，保存於真空狀態下備用。並改變組成比例，以合成不同比例的接枝共聚物，其反應式如下。

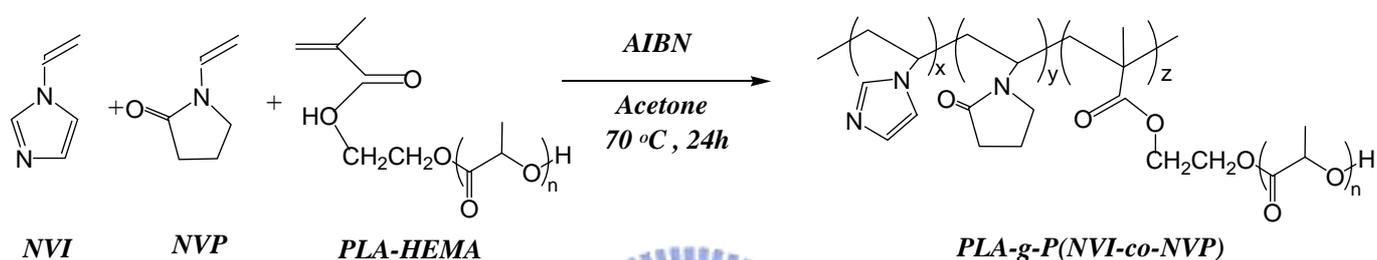


圖 3-2、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之合成示意圖

### 3-5、雙性二團聯共聚物 mPEG-PLA 之合成

*D,L*-lactide 在 40°C 真空烘箱乾燥一天備用。將適量已純化之 *D,L*-lactide、methoxy poly(ethylene glycol) (分子量 5000) 及除水之 toluene 置於圓底雙頸瓶中。連接真空管線，於真空下預熱至 50°C 將反應物殘餘水分除去，而後將氮氣 purge 至系統中並升溫至 130°C，在單體完全溶解的情況下加入 1 wt.% Sn(OOct)<sub>2</sub> 觸媒進行陽離子開環反應。反應進行 16~18 個小時，以 DCM 稀釋產物，再加入少量的 0.1 N KOH/methanol 溶液於 0°C 下緩慢終止反應。接下來將產物通過 Silica Gel Column 除去鹽類及不純物，再以 ether 再沉澱(Reprecipitate)除去未反應單體，最後以抽氣過濾的方式收集產物並乾燥得之。其反應式

如下圖所示。

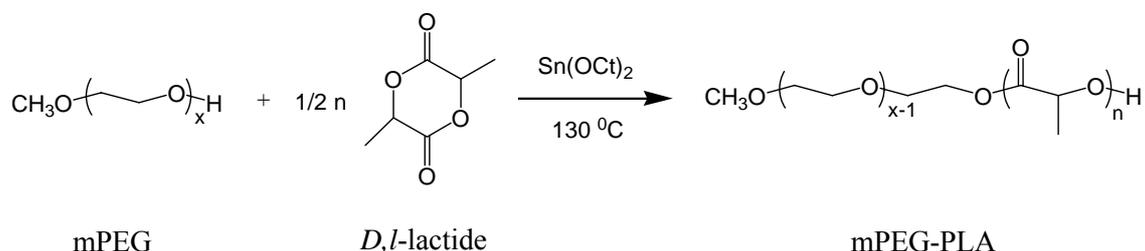


圖 3-3、mPEG-PLA 之合成示意圖

### 3-6、共聚合物之結構鑑定與分析

#### 3-6-1、 $^1\text{H-NMR}$ 結構鑑定與數目平均分子量鑑定

將定量樣品溶於含 1%(v/v) TMS 或 mPEG (分子量 2000) 之 DMSO-d6 中，經核磁共振光譜儀(NMR spectrophotometer)分析，可確定樣品結構及組成比例。

#### 3-6-2、FT-IR 鑑定

將樣品以 THF 或 Methanol 溶解後，塗佈於 NaCl 或 KBr 鹽片上，經傅立葉紅外線光譜儀(FT-IR spectrophotometer)分析，可獲得樣品之官能基定性結構。

#### 3-6-3、GPC 分子量分佈鑑定

將 5mg 的待測樣品容於 1000mg 之 NMP 中，利用凝膠滲透層析儀(GPC)測量，可得重量平均分子量(weight-average

molecular weight,  $M_w$ )、數目平均分子量 (number-average molecular weight,  $M_n$ ) 及分子量分佈 (polydispersity index, PDI)。GPC 流動相為 NMP，流量為 1 ml / min，測量溫度為 40°C。

### 3-6-4、臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC) 之鑑定

將共聚合物溶解於 methanol 中，緩慢滴入以磁石攪拌之二次水，利用旋轉濃縮機在室溫下濃縮 2 小時，將 methanol 完全除去。將共聚合物水溶液配製成 8 mg/mL，再以二次水等量稀釋至  $1 \times 10^{-4}$  mg/mL。

將 pyrene 配製為濃度  $6 \times 10^{-5}$  M 之 acetone 溶液。再以二次水稀釋至濃度  $1.2 \times 10^{-6}$  M，以旋轉濃縮機在室溫下濃縮 2 小時，將 acetone 完全除去。而後將上述之共聚合物水溶液與 pyrene 溶液等體積混合，使共聚合物溶液濃度變為 4 mg/mL 至  $5 \times 10^{-5}$  mg/mL；pyrene 濃度則為  $6 \times 10^{-7}$  M。混合溶液靜置 24 小時，使 pyrene 分子將均勻分散。以螢光光譜儀於激發光譜 390 nm 下。觀察最高濃度之樣品與對低濃度之樣品其在 300-350 nm 之最高螢光強度，並以此強度之比值 ( $I_{337.5}/I_{335.5}$ ) 對濃度對數座標作圖，曲線底部與反曲點兩直線外插交叉點相對之濃度定義為臨界微胞濃度。

### 3-7、接枝型奈米微胞之製備

取適量(5mg、10mg、15mg、20mg)之接枝高分子共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)分別溶解於 5mL DMSO 中，並以磁石攪拌 2 小時使其均勻分散於溶劑中。而後將高分子溶液置於透析膜 (dialysis bag, MWCO: 6000-8000) 中，以去離子水透析 48 小時，前 12 小時，每 2 小時更換一次去離子水，之後每 6 小時更換一次去離子水。將透析完之水溶液冷凍乾燥後，可得到棉絮狀高分子微胞。

取 10mg 之接枝高分子共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)溶解於 5mL DMSO 中，並以磁石攪拌 2 小時使其均勻分散於溶劑中。而後分別加入不同比例之去離子水(0%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、22.5%、25%、30%)於接枝高分子共聚物溶液中，並持續攪拌 30 分鐘後置於透析膜(dialysis bag, MWCO: 6000-8000)中。以去離子水透析 48 小時，前 12 小時，每 2 小時更換一次去離子水，之後每 6 小時更換一次去離子水。測其初期水含量對奈米微胞形成的粒徑大小、分散度與穩定度的影響。將透析完之水溶液冷凍乾燥後，可得到棉絮狀高分子微胞。

### 3-8、複合型奈米微胞之製備

取定量之接枝高分子共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)以及不同比例(0%、25%、50%、75%、100%)之二團連高分子共聚物 mPEG-b-PLA 共同溶解於 5mL DMSO 中並以磁石攪拌 2 小時使其均勻混合。而後將高分子溶液置於透析膜 (dialysis bag,

MWCO: 6000-8000) 中，以去離子水透析 48 小時，前 12 小時，每 2 小時更換一次去離子水，之後每 6 小時更換一次去離子水。將透析完之水溶液冷凍乾燥後，可得到棉絮狀高分子微胞。

### 3-9、接枝/複合型奈米微胞之粒徑分析

取透析完之接枝/複合型奈米微胞 3mL 於比色管中，以動態光散射粒徑分析儀(DLS, Zetasizer 3000HSA:Malvern)分析接枝/複合型奈米粒子懸浮液之平均粒徑及分佈情形(PI)。藉以觀察接枝型奈米微胞之粒徑分佈與複合型奈米微胞粒徑分佈之差異。操作溫度 25°C，scattering angle 90°，波長 488 nm。微胞於生理食鹽水(phosphate buffer saline, PBS)濃度為 0.1 mg/mL。



### 3-10、接枝/複合型奈米微胞之界面電位分析

取透析完之接枝/複合型奈米微胞 3mL 於比色管中，以動態光散射粒徑分析儀(DLS, Zetasizer 3000HSA:Malvern)分析接枝/複合型奈米粒子懸浮液於 25°C 下之界面電位，可推測出微胞的表面結構。

### 3-11、接枝型奈米微胞之高分子聚集行為分析

將接枝型共聚合物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)溶解於 DMSO 中，加入不同體積比例(85%、80%、75%、70%、65%、60%)之二次水使其配置成 H<sub>2</sub>O/DMSO 共溶劑，以動態光散射儀

(DLS, Zetasizer 3000HSA:Malvern) 觀察奈米微胞在 H<sub>2</sub>O/DMSO 共溶劑環境下之水合直徑及 PI 變化，藉以評估及模擬奈米微胞在透析初期聚集時，接枝型共聚合高分子之聚集行為。

### 3-12、接枝/複合型奈米微胞之酸鹼應答行為分析

取 5mL 透析完之接枝/複合型奈米微胞，先調控高分子微胞溶液之酸鹼值至 pH 7.4，測其在該 pH 值下之粒徑大小與粒徑分佈；再依序降低溶液之 pH 值(pH7.0、pH6.5、pH6.0、pH5.5、pH5.0、pH4.5)，測其在不同酸鹼值下，奈米微胞粒徑與分佈之變化情形，藉此觀察奈米微胞之酸鹼應答行為。

### 3-13、接枝/複合型奈米微胞之 On-Off 應答行為分析

取 5mL 透析完之接枝/複合型奈米微胞，先將高分子微胞溶液之酸鹼值調控在 pH7.4 之人體正常中性條件下，並每隔一段時間(15~30 分鐘，共 105 分鐘)測其奈米微胞之粒徑大小與分佈之變化；而後再將高分子微胞溶液之酸鹼值調控在 pH5.0 之酸性條件下，同樣地，每隔一段時間(15~30 分鐘，共 105 分鐘)測其奈米微胞之粒徑大小與分佈之變化。上述 210 分鐘為一個循環，共 3 個循環，可藉此分析高分子奈米微胞在體內循環之酸鹼應答動力學。

### 3-14、接枝/複合型奈米微胞之表面型態與殼核結構分析

(TEM and AFM)

取透析完之接枝/複合型奈米微胞(2mg/mL)，滴於 TEM

鍍碳銅網上靜置 1 分鐘，待接枝/複合型奈米微胞貼附於銅網後，使用 tissue 從銅網的側面小心地將 solvent 吸乾。而後將 TEM 染劑 uranyl acetate(2 wt.%)滴於銅網上靜置 1 分鐘，待 uranyl acetate 與奈米微胞作用完成後，使用 tissue 從銅網的側面小心地將 solvent 吸乾。上述步驟皆完成後，將 TEM 鍍碳銅網置於 40°C 真空烘箱中乾燥保存 24 小時備用。而後再以不同倍率之 Transmission electron microscopy(TEM)觀察接枝/複合型奈米微胞之殼核結構。AFM 試片之製備是將上述透析溶液滴於矽晶片上，置於烘箱乾燥後即可進行操作。

### 3-15、接枝/複合型奈米微胞之安定性分析

首先配製 8 wt.%之 BSA /2X PBS(Bovine Serum Albumin/2X Phosphate Buffer Saline，PBS 濃度為正常濃度的 2 倍)，而後取 2mL 透析後之接枝/複合型奈米微胞與上述配製之 8 wt.% BSA /2X PBS 緩衝溶液等體積混合，於 37°C 下靜置保存，每隔一段時間以動態光散射(Dynamic light scattering, DLS)觀察其粒徑與穩定性的變化，以評估其安定性。

### 3-16、接枝/複合型奈米微胞之藥物包覆測試及性質分析

先取 10mg 之接枝型高分子溶解於 DMSO；再另外取適量 (5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、30mg)之抗癌藥物 doxorubicin (DOX) 溶解於 DMSO 中，而後在 DOX 溶液中分別加入 1.5 倍莫爾比(TEA:DOX=1.5:1)之 triethylamine (TEA)，使 DOX 變成疏水性以利高分子攜帶。將高分子溶液與 DOX 溶液混合

(DMSO 總體積為 5mL)後，攪拌 1 小時，加入 10%之二次水攪拌 30 分鐘後，快速將溶液裝入透析膜(MWCO 6000~8000)內透析。透析前 12 小時，每 2 小時換 1 次二次水；而後每 6 小時換 1 次二次水，透析時間共約 48~72 個小時，可由透析液由橘紅色轉為無色判斷終止時間，透析完畢後，將高分子藥物微胞冷凍乾燥後可得暗紅色棉狀高分子藥物微胞固體，將其收集置於 desiccator 保存。複合型奈米微胞之藥物包覆製備方法亦同，高分子的使用量分別為 10mg 之接枝型高分子與 10mg 之二團聯型高分子。

高分子藥物微胞之藥物包覆量測試系將高分子藥物微胞以 5mL 之 DMSO 溶解，利用 UV/VIS 測量波長 485nm 之吸收峰。比對藥物在 DMSO 之檢量線可計算出包覆的藥物重量。利用下式計算藥物包覆率 (drug loading efficiency)：

$$\text{藥物包覆率(\%)} = \frac{\text{包覆藥物總重}}{\text{高分子藥物微胞總重}} \times 100\%$$

### 3-17、接枝/複合型奈米微胞之體外藥物釋放模擬分析

取 5mg 冷凍乾燥後之接枝/複合型高分子藥物微胞分別溶解於 pH 7.4 的 phosphoric acid buffer solution 與 pH 5.0 的 succinic acid buffer solution，doxorubicin 之濃度必須小於 100 $\mu$ g/mL。將溶解之高分子藥物微胞緩衝溶液置於超過濾裝置內(超過濾膜 MWCO 10,000)，控制溫度在 37 $^{\circ}$ C(模擬人體正常體溫)，並定時取樣，以 UV/Vis 測量波長 485nm 之 doxorubicin 吸收，並對照藥物在不同酸鹼值水溶液下之檢量線計算釋放的藥量。

### 3-18、接枝/複合型奈米微胞之藥物 On-Off 應答行為分析

取 5mg 冷凍乾燥後之接枝/複合型高分子藥物微胞溶解於去離子水中，再將溶液之酸鹼值調控在 pH7.4 之人體正常中性條件下，並置於超過濾裝置內(超過濾膜 MWCO 10,000)，控制溫度在 37°C(模擬人體正常體溫)。每隔一段時間(15~30 分鐘，共 105 分鐘)以 UV/Vis 測量波長 485nm 之 doxorubicin 吸收；而後再將高分子微胞溶液之酸鹼值調控在 pH5.0 之酸性條件下，同樣地，每隔一段時間(15~30 分鐘，共 105 分鐘)以 UV/Vis 測量波長 485nm 之 doxorubicin 吸收並對照藥物在不同酸鹼值水溶液下之檢量線計算在不同的酸鹼值環境下，藥物釋放的重量。

。上述 210 分鐘為一個循環，共 3 個循環，可藉此分析高分子奈米微胞在體內循環之藥物釋放情形。



### 3-19、接枝/複合型奈米微胞之細胞存活率與細胞毒殺分析

培養基的配置方法係將 DMEM 粉末(或 MEM 粉末，不同培養基對應不同的細胞株)以 900mL 之去離子水溶解，加入 1.5 克之 NaHCO<sub>3</sub>，並以 HCl 水溶液調整酸鹼值至 pH7.4。而後將培養基移入無菌操作臺並加入 100mL 之胎牛血清 (Fetal Bovine serum, FBS) 後，再以 0.22µm 之無菌過濾設備過濾 DMEM 培養基至已滅菌之血清瓶中，最後再分別加入 10mL 之 L-glutamine、1mL 之 Non-essential amino acid (100X) 與 1mL 之 Penicillin/streptomycin(100X)後置於 4°C 冰箱保存。

磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 的配置方法係

將 8 克 NaCl、0.2 克 KCl、1 克 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 與 0.2 克 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶於 1L 之去離子水，並攪拌 1 小時，而後將緩衝溶液置於高溫高壓滅菌釜內（120°C,60min）消毒後，至於 4°C 冰箱保存。從液態氮中拿出 HeLa（人類子宮頸癌細胞）、HepG2（人類肝癌細胞），並在 37°C 水浴中加以解凍，將解凍後之癌細胞加入培養皿，並加入 10ml 之 DMEM 培養基後，置入 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱(incubator)中進行細胞培養。待細胞成長至培養皿之八分滿後，將體積比 1:9 的胰蛋白酶(trypsin/EDTA)PTA 溶液加入培養皿中，蓋滿整個培養皿。接著靜置 1 至 3 分鐘後，用手輕輕地均勻拍打培養皿，使細胞從培養皿脫落，待細胞已完全漂浮至溶液中(此時培養基將會由原本之淡紅色變為粉紅色)，加入微量之新鮮培養基稀釋，並以微量分注器(pipetman)均勻地抽吸數次，將細胞分散。接下來將含有胰蛋白酶之培養基裝入離心管中，並以 PBS 稀釋，放入離心機中，以轉速 1500rpm 離心 5 分鐘，離心完後取走上層澄清液，加入定量之培養基，以進行細胞計數。

細胞計數使用之計數盤為血球計數器(hemocytometer)，以微量分注器分別取 100 $\mu$ L 的細胞培養基及 100 $\mu$ L 之 trypan blue，注入 96 well 之培養皿中，將兩者均勻混合。而後將混合後之溶液滴於計數盤中，進行細胞計數。由於 trypan blue 會將凋亡之細胞染成深藍色，而活體細胞則無法染色，因此可於顯微鏡下算出計數盤四個角落(計數在盤光學顯微鏡下為一九宮格之圖形)的活體細胞數目 N，而總細胞數目可由下列公式求得：

$$\text{總細胞數 (cell/mL)} = N/4 \times (\text{稀釋倍數}) \times 10^4$$

計算完畢，於 96 well 培養皿中，每孔種植  $1 \times 10^4$  個細胞。12 小時後，待細胞貼附於培養皿，移除培養皿內之培養基並以 PBS 清洗兩次，加入含有不同高分子濃度之培養基，培養 48 小時，以比色分析法分析細胞之存活率。

比色分析法(MTT assay)實驗是利用活體細胞中之粒腺體 (mitochondria) 進行呼吸作用，作用時會有能量的轉移，同時也有電子傳遞的反應。而 MTT(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide) 會與電子作用，由原來黃色的 MTT 代謝為藍紫色的晶體，若存活的細胞越多，其紫色也越深。將培養皿內之培養基移除，以 PBS 清洗兩次後加入 200 $\mu$ L 含有 MTT 之培養基(1mg/mL)，置入恆溫培養箱 (incubator) 中反應三小時。而後將 well 的液體抽取乾淨，再加入 200 $\mu$ L 細胞培養用之 DMSO 與 EtOH 混合溶液 (v:v=1:1)，溶解產生之結晶物，反應 10 分鐘後，從每 1 well 取出 100 $\mu$ L 之溶液置於另一個新的 96 well 培養皿中，並以 96 well 培養皿酵素判讀儀 (Elisa Reader) 測定波長 570nm 之吸收，而波長 630nm 為背景扣除值。控制組之培養基不加任何高分子。實驗重複 6 次 (n=6)，細胞存活率 (cell viability) 的計算方式如下：

$$\text{細胞存活率 (\%)} = \text{吸收度}_{\text{sample}} / \text{吸收度}_{\text{control}} \times 100\%$$

細胞毒殺實驗 (growth inhibition assay) 則是於 96 well 培養皿中，每一 well 種植  $1 \times 10^4$  個細胞後，分別加入不同濃度的含有藥物或高分子藥物微胞之培養基 (藥物濃度介於 1-90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，經過 48 小時後，以比色分析法分析不同藥物濃度下的細胞存活率，比較藥物與高分子藥物微胞對癌細胞毒殺的效果。實驗重複 6 次 ( $n=6$ )。

### 3-20、接枝/複合型奈米微胞之細胞內藥物分佈情形與內吞行為分析

DOX 及接枝/複合型奈米藥物微胞在細胞內的分布與釋放情形，可利用共軛焦顯微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy) 觀察。在 6 well 培養盤中置入蓋玻片，並在蓋玻片上黏貼一加強圈標示其觀測範圍，每一 well 各種植  $2 \times 10^5$  個癌細胞 (HeLa cell)。經 12 小時待癌細胞貼附後，在不同時間下，加入藥物濃度為 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之 DOX 與藥物微胞培養基溶液 2mL。於固定時間下移除培養基，以 PBS 清洗後加入含有 LysoTracker DND-26 之無血清培養液 3 mL (80-100 nM，溶於 MEM 培養基)，反應 1 小時，以 PBS 清洗 2 次。必要時添加含有 Triton X-100 之 PBS (0.1%) 幫助洗淨。而後以 4wt.% 之 paraformaldehyde 的 PBS 溶液固定細胞 (反應 10~15 分鐘)。以 PBS 清洗後，於加強圈範圍內滴入含有 80% glycerol 的 PBS 溶液 15  $\mu\text{L}$ ，使其貼附於載玻片上，最後在蓋玻片的四周滴上指甲油加強固定並避光保存。

共軛焦顯微鏡物鏡之設定為 400X，Doxorubicin 之激發雷射光波長與放射光波長分別為 485 nm 及 590 nm；LysoTracker 則分別為 504 nm 及 511nm。掃描所得之影像經重疊後可判斷 DOX 在細胞內釋放的分佈情形。



## 第四章、實驗結果與討論

### 4-1、酸鹼應答型接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)之製備與鑑定

酸鹼應答型接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)是由單體 N-Vinylimidazole(NVI)、N-Vinyl-2-pyrrolidone(NVP)以及巨單體 PLA-HEMA 所構成。其合成步驟主要由兩個聚合反應組成：

(1) 陽離子開環聚合反應 (cationic ring-opening polymerization)，其反應機構如圖 4-1 所示，陽離子開環反應之特性為反應之聚合度 (degree of polymerization) 可以控制的非常理想，即單體進料比與產物組成比非常接近；分子量分佈也相當均一。本研究首先是利用 stannous octoate( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) 作為反應之觸媒，與反應單體 *D,L*-lactide 之 carbonyl group 形成配位鍵結以提高 carbonyl group 之反應活性，進一步地使 2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA) 末端帶有孤對電子對之 hydroxy group 進行  $\text{SN}_2$  反應，攻打缺乏電荷密度之 carbonyl group，此即為聚合反應之起始反應 (initiation)。而後反應活性種將會轉移至下一個 *D,L*-lactide 單體上，之後便是成長反應 (propagation) 的發生，高分子鏈便由此慢慢成長至預期之分子量，待反應時間終了，才加入 0.1N 之 KOH/methanol 與觸媒作用，中止其反應活性。陽離子開環反應所合成之 PLA-HEMA 經由  $^1\text{H-NMR}$  分析，可鑑定其結構(如圖 4-2 所示)： $\delta$  1.4-1.7(m,  $\text{CH}_3$  from PLA)； $\delta$  1.92(s,  $\text{CH}_3$  from HEMA)； $\delta$  4.33(s,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  from HEMA)； $\delta$  5.1-5.2(m,  $\text{CH}$  from PLA)； $\delta$  5.58、 $\delta$  6.10(s,  $=\text{CH}_2$  from HEMA)。

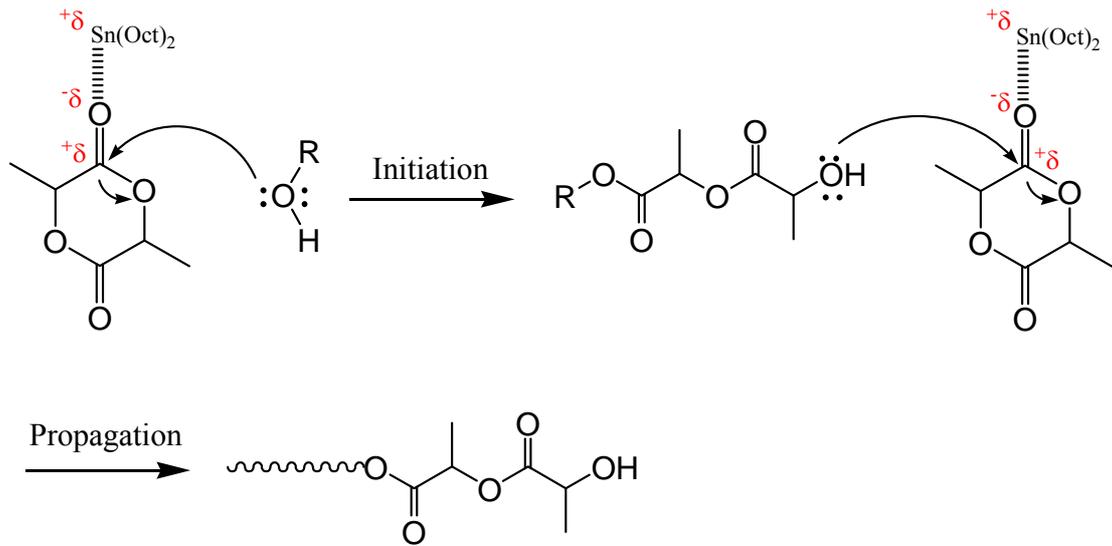


圖 4-1、*D,L*-lactide 以  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  行陽離子開環聚合之反應機構示意圖

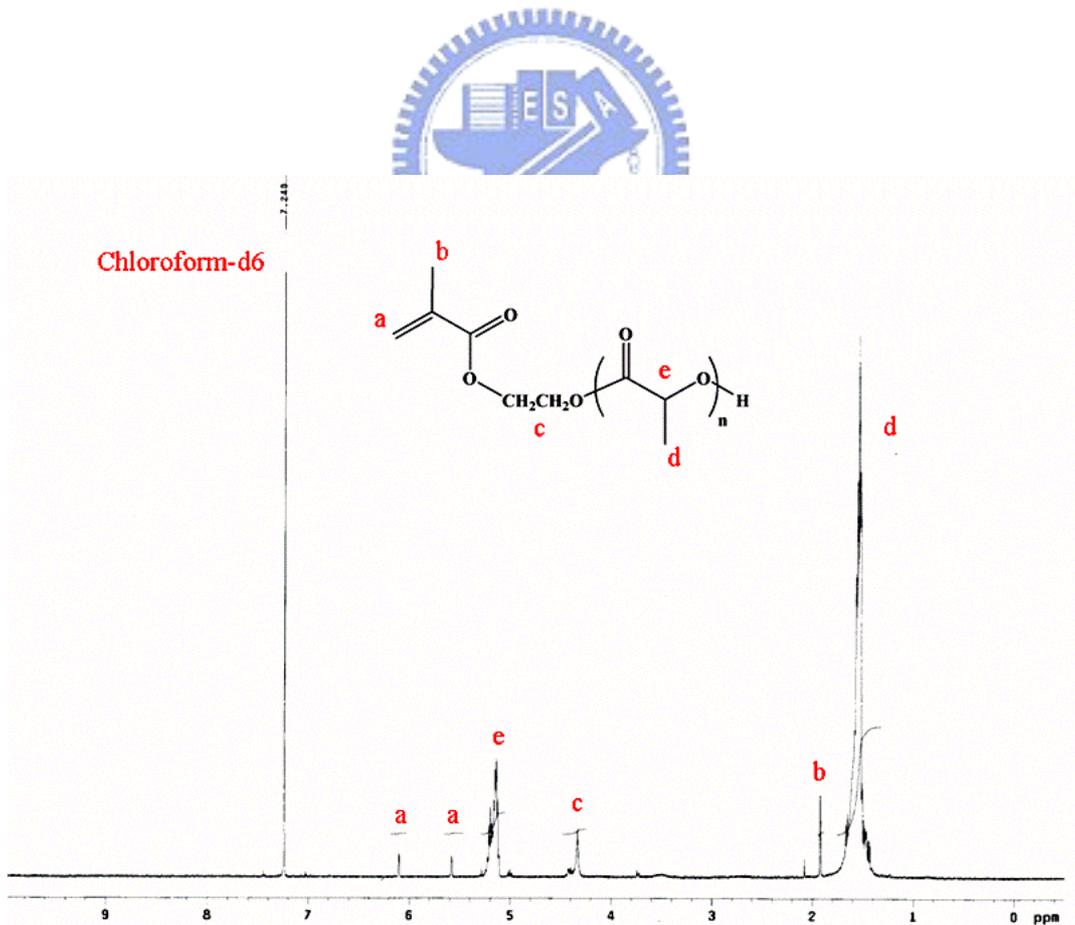


圖 4-2、PLA-HEMA 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖

(2) 自由基共聚合反應(free radical polymerization)，因自由基成長的快且其終止反應就包刮了再結合(recombination)、不均化(disproportionation)以及自由基轉移(radical transfer)三種，故其本身之特性為成長反應相當快速但較難得到分子量均一之高分子。本研究是利用巨單體 PLA-HEMA 與 NVI、NVP 行自由基接枝共聚合反應，相較於傳統之接枝共聚合反應而言，此法可得到結構較明確之接枝共聚合物。因傳統之接枝共聚合是先將主鏈製備完成，再將其與側鏈單體進行聚合反應，但不容易將未反應之巨單體鏈段與分枝共聚合物分離，造成分枝的數目和長度不均一。本研究所合成之 PLA-g-PNVP(主鏈不含酸鹼應答之單體 NVI，即 G0)與 PLA-g-P(NVI-co-NVP)接枝共聚合物經  $^1\text{H-NMR}$  分析，可鑑定其結構(如圖 4-3、圖 4-4 所示)、組成比(表 4-1)與數目平均分子量(表 4-2)： $\delta$  1.27(s,  $\text{CH}_3$  from PLA-HEMA)； $\delta$  1.4-1.5(m,  $\text{CH}_3$  from PLA-HEMA)； $\delta$  1.6-1.9(broad,  $\text{CH}_2$  from NVI、NVP and PLA-HEMA)； $\delta$  2.0-2.1(broad,  $-\text{COCH}_2\text{CH}_2$  from NVP)； $\delta$  2.2(broad,  $-\text{COCH}_2$  from NVP)； $\delta$  3.1-3.2(broad,  $\text{CH}_2\text{NCH}_2$  from NVP； $-\text{NCH}_2$  from NVI)； $\delta$  4.19(s,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  from PLA-HEMA)； $\delta$  5.1-5.2(m,  $\text{CH}$  from PLA-HEMA)； $\delta$  6.9-7.8(broad,  $\text{CH}$  from NVI)。

此外，接枝共聚合物亦利用傅立葉紅外線光譜儀(FT-IR)進行結構分析(如圖 4-5 所示)： $1660\text{ cm}^{-1}$  為 NVP 上的 amide group 行 stretching vibration 之吸收； $1750\text{ cm}^{-1}$  為 PLA-HEMA 上的 ester group 行 stretching vibration 之吸收。綜合上述，可確認已成功地合成出 PLA-g-P(NVI-co-NVP)接枝共聚合物。

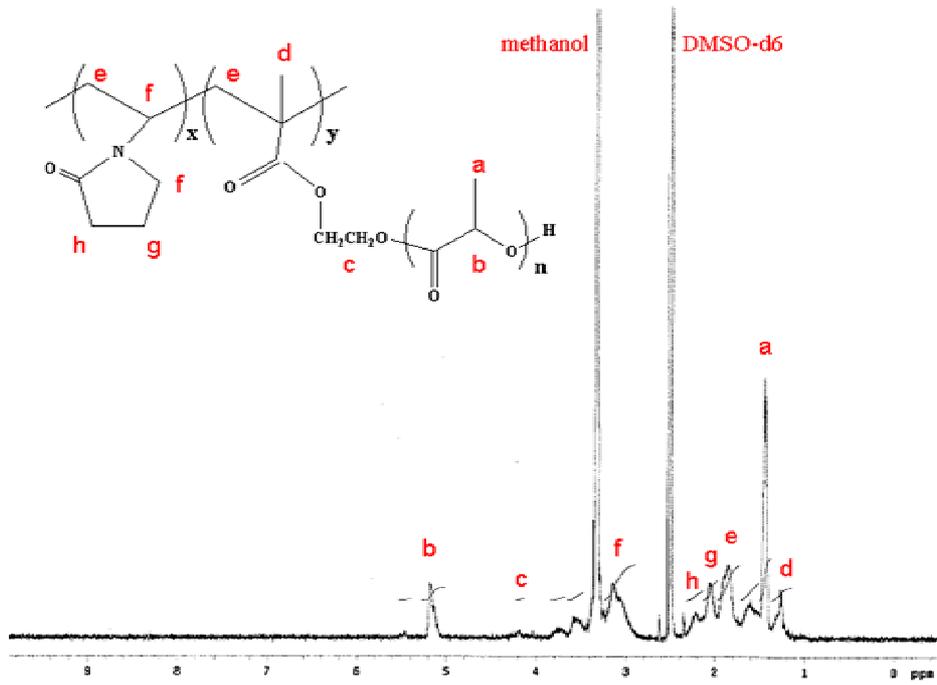


圖 4-3、PLA-g-PNVP 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖

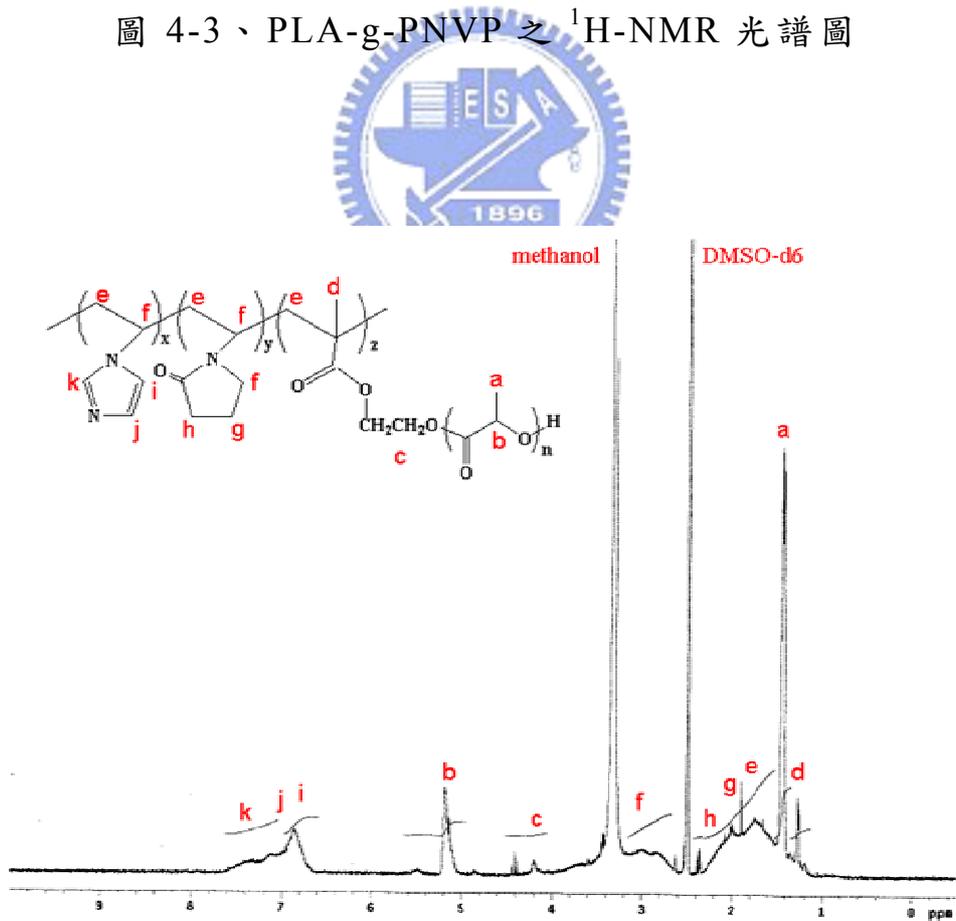


圖 4-4、PLA-g-P(NVI-co-NVP) 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖

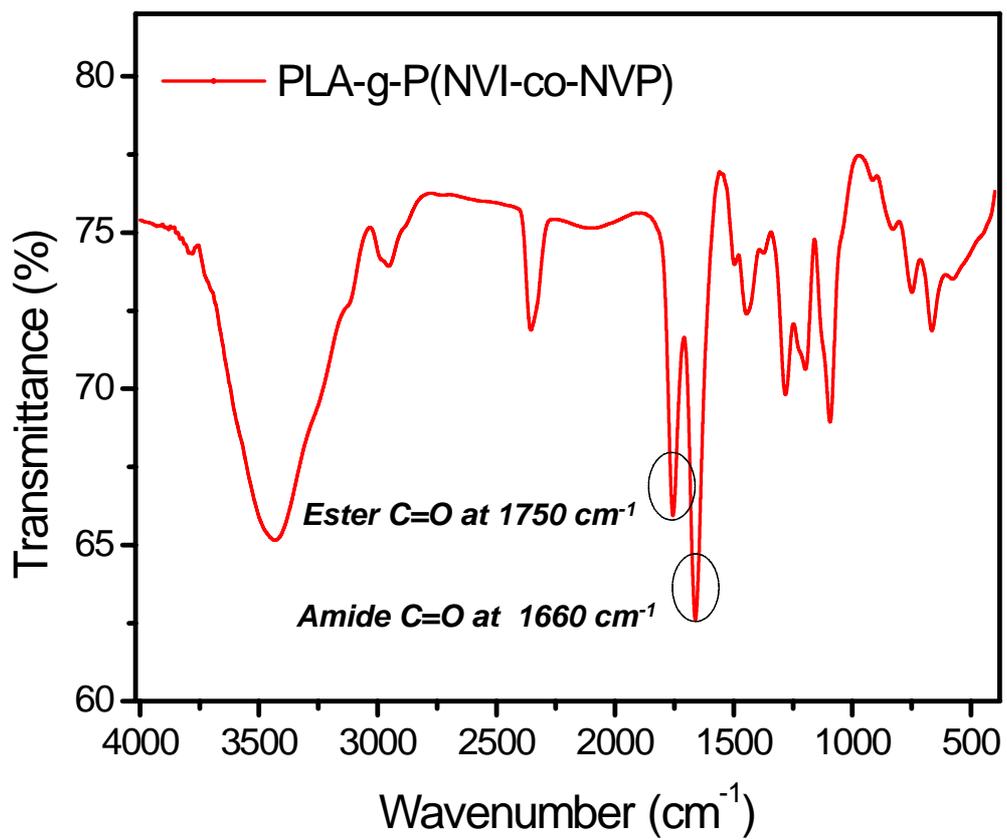


圖 4-5、PLA-g-P(NVI-co-NVP)之 FT-IR 光譜圖

表 4-1、接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)之組成比

Polymer	Code	In feed (mol%)			In copolymer (mol%)		
		PLA	NVI	NVP	PLA	NVI	NVP
PLA-g-PNVP	G0	3.4	0	96.6	3.6	0	96.4
PLA-g- P(NVI-co-NVP)	G1	3.3	9.7	87	3.0	9.9	87.1
	G2	3.3	19.3	77.4	2.9	22.7	74.4
	G3	3.2	29	67.8	2.5	28.4	69.1
	G4	3.2	38.8	58	2.7	39.4	57.9
	G5	3.2	48.4	48.4	3.3	48	48.7



表 4-2、接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-NVP)之性質分析

Polymer	Code	Mn <sup>(a)</sup> of backbond	Mn <sup>(a)</sup> of side chain	Total Mn <sup>(b)</sup> of Graft copolymer
PLA-g-PNVP	G0	9427	7164	16591
PLA-g- P(NVI-co-NVP)	G1	9512	5970	15482
	G2	9415	5771	15186
	G3	9624	4975	14599
	G4	9609	5373	14982
	G5	9437	6567	16004

(a) Mn of backbone & side chain determined by <sup>1</sup>H-NMR.

(b) Total Mn of Graft copolymer = Mn of backbone + Mn of side chain

## 4-2、二團聯共聚物 mPEG-PLA 之製備與鑑定

二團聯共聚物 mPEG-PLA 是由巨單體 mPEG 及 poly(*D,L*-lactide)所構成。其合成反應步驟是由 mPEG 與 *D,L*-lactide 以 Sn(OOct)<sub>2</sub> 為觸媒進行陽離子開環聚合反應而形成共聚物。反應機制則與 PLA-HEMA 之合成反應類似，本研究首先是利用 stannous octoate(Sn(OOct)<sub>2</sub>)作為反應之觸媒，與反應單體 *D,L*-lactide 之 carbonyl group 形成配位鍵結以提高 carbonyl group 之反應活性，進一步地使 mPEG 末端帶有孤對電子對之 hydroxy group 進行 SN<sub>2</sub> 反應，攻打缺乏電荷密度之 carbonyl group，後續之反應皆與 PLA-HEMA 類似，差別在於 mPEG 末端所形成之活性自由基較不容易攻打 *D,L*-lactide 單體(因高分子鏈可能會隱蔽末端之活性自由基，降低其與單體反應之機率)，進而提高反應之困難度。

所合成之 mPEG-PLA 經由 <sup>1</sup>H-NMR 之分析，可鑑定其結構 (如圖 4-6 所示)：δ 1.4-1.6 (m, CH<sub>3</sub> from PLA)；δ 2.34(broad, -OH from PLA)；δ 3.36(s, -OCH<sub>3</sub> from mPEG)；δ 3.59-3.62(s, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> from mPEG)；δ 4.3-4.4(m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> from mPEG conjugated with PLA)；δ 5.1-5.2(m, CH from PLA)。本研究合成三種不同分子量之 mPEG-PLA 共聚物，經由 <sup>1</sup>H-NMR 可推算出數目平均分子量，再輔以凝膠滲透層析儀 (GPC) 之測試，可得其 polydispersity index (PDI)，列於表 4-3。

此外，mPEG-PLA 二團聯共聚物亦利用傅立葉紅外線光譜儀(FT-IR)進行結構分析(如圖 4-7 所示)：1100  $\text{cm}^{-1}$  為 mPEG 與 PLA 上的 ether group 行 stretching vibration 之吸收；1750  $\text{cm}^{-1}$  為 PLA 上的 ester group 行 stretching vibration 之吸收。綜合上述，可確認已成功地合成出 mPEG-PLA 二團聯共聚物。

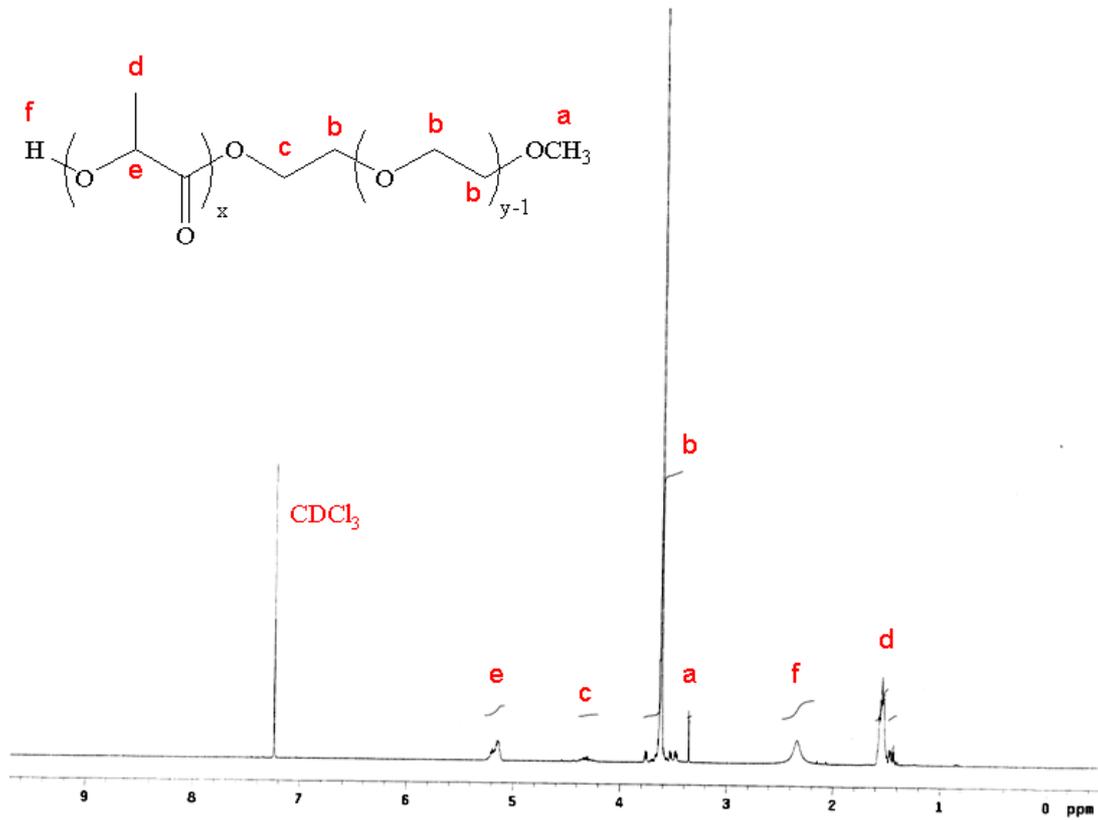


圖 4-6、 mPEG-PLA 之  $^1\text{H-NMR}$  光譜圖

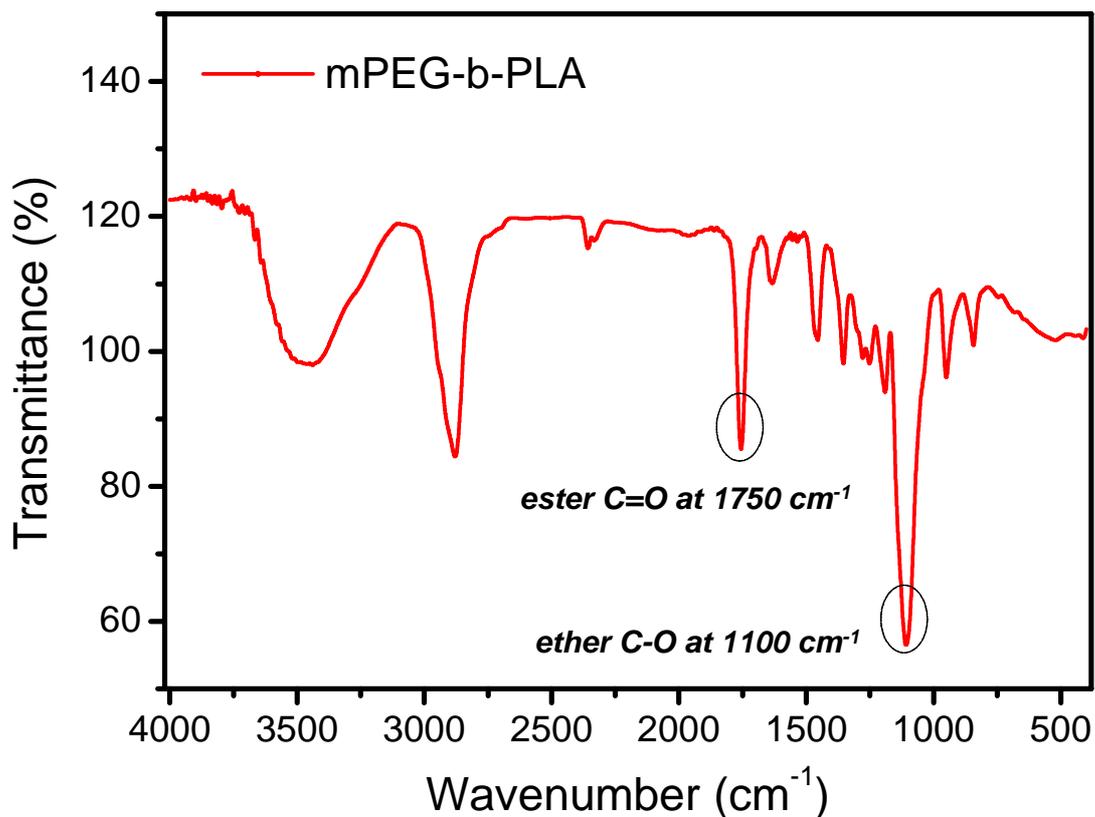


圖 4-7、mPEG-PLA 之 FT-IR 光譜圖

表 4-3、二團聯共聚合物 mPEG-PLA 之組成與性質分析

Code	In feed (mol %)		In copolymer (mol %)		Mn <sup>(a)</sup> of mPEG	Mn <sup>(a)</sup> of PLA	PDI <sup>(b)</sup>
	mPEG	LA	mPEG	LA			
B1	19.4	80.6	12.6	87.4	5000	530	1.05
B2	4.6	95.4	6.7	93.3	5000	1090	1.15
B3	3.6	96.4	4.0	96.0	5000	1750	1.2

(a) Mn of mPEG & PLA determined by <sup>1</sup>H-NMR.

(b) PDI determined by GPC

#### 4-3、臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)之鑑定

微胞形成機制一直以來皆是各界探討之研究重點之一，而微胞之模型最早是由 Hartley 於 1936 年所提出（但此模型是以界面活性劑為組成微胞之小單元所提出）【94】，後繼的一些研究如中子散射實驗、光散射實驗，均證實此結構確實存在且符合熱力學平衡與結構穩定性平衡之原理。

雙性共聚物(amphiphilic copolymer)於水溶液中欲組裝成高分子微胞之最低濃度即稱為臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)，臨界微胞濃度之概念應用於癌症治療之藥物微胞載體上可以提供一個淺顯易懂的概念。即當藥物微胞於體內循環時，勢必會被體內大量的血液稀釋，如果臨界微胞濃度太高將造成微胞結構的不穩定而使高分子鏈段脫離瓦解，進一步地造成藥物毒殺正常組織之副作用。因此，在設計與研究一新型態高分子奈米微胞之首要研究重點即是鑑定高分子奈米微胞之臨界微胞濃度。

臨界微胞濃度之測量是利用疏水性分子 pyrene 當作螢光染劑，pyrene 的激發波長會隨著其本身所處環境極性的改變而改變。亦即，在低濃度微胞尚未形成的情況下，pyrene 會分散於水溶液中(極性環境)，此時 pyrene 之激發波長為 335nm；而當共聚物濃度提高時，開始有所謂的微胞前趨體的產生，此時疏水性的 pyrene 分子會傾向於疏水之微胞內核(非極性環境)，此時 pyrene 之激發波長為 337nm，如圖 4-8 所示【95-97】。本實驗是利用螢光光譜儀，固定放射波長(emission wavelength)

在 390nm 的情況下，觀察激發波長在 335nm 與 337nm 之強度變化。而臨界微胞濃度可由吸收強度在 337nm 與 335nm 之比值與激發波長作圖(即  $I_{337}/I_{335}$  對激發波長作圖)，再將兩條直線做外插，可求得交點，即臨界微胞濃度。

本實驗共探討：(1)設計三種不同主鏈組成比之接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)，探討其臨界微胞濃度的變化；(2)設計三種不同鏈段長度比之二團聯共聚物 mPEG-PLA，探討其臨界微胞濃度的變化。實驗結果如圖 4-9 與圖 4-10 所示，並整理於表 4-4。由實驗結果，可知當接枝共聚物主鏈之 NVI 含量提高時，臨界微胞濃度有些微下降，這是因為接枝共聚物主鏈之親水性降低了，但這並不代表 NVI 為疏水之單體(查文獻可知，NVI 為親水單體)，只是相對於 NVI 而言，NVP 之親水性較 NVI 好，故 NVP 在整個接枝共聚物主鏈之含量降低造成主鏈之親水性降低，進一步地使臨界微胞濃度降低。另外，在二團聯共聚物方面，可知當提高疏水端 PLA 之長度，臨界微胞濃度有顯著地下降，這是因為二團聯共聚物之疏水作用力有顯著的提高所造成。

綜合上述，我們可以得到下列結論：

- (1) 降低雙性共聚物親水端之親水作用力，可稍微地降低其臨界微胞濃度。
- (2) 提高雙性共聚物疏水端之疏水作用力，可明顯地降低其臨界微胞濃度。
- (3) 接枝共聚物之臨界微胞濃度大抵上皆較二團聯共聚物低，這是因為 PLA 接於其側鏈，造成共聚物本身之活動

性降低使得聚集力變強，且因為接枝型共聚物之 PLA 鏈段皆較二團聯共聚物長，且接枝密度也較高，故其有較強之疏水作用力，即聚集力較強之故。

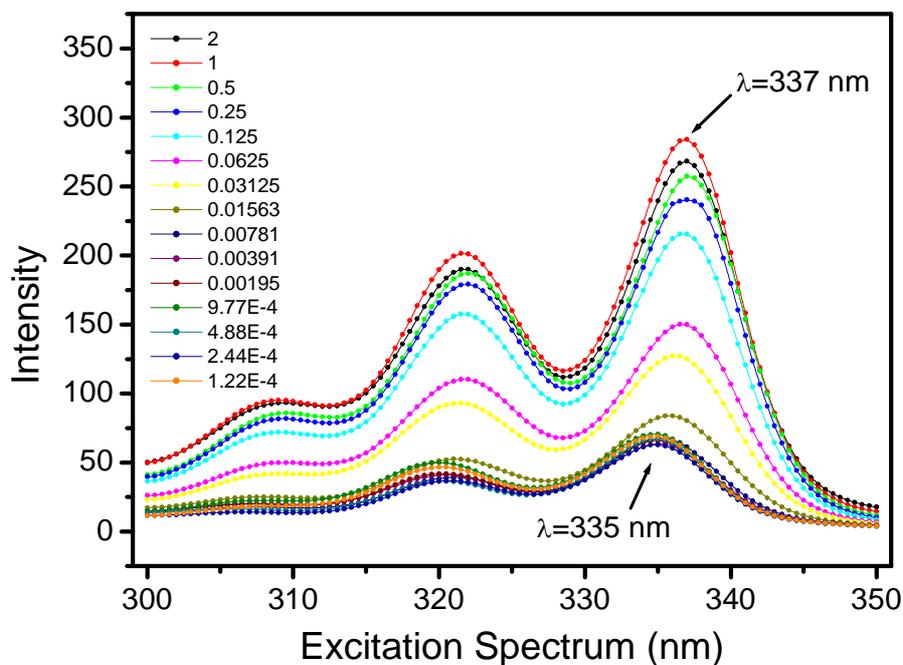
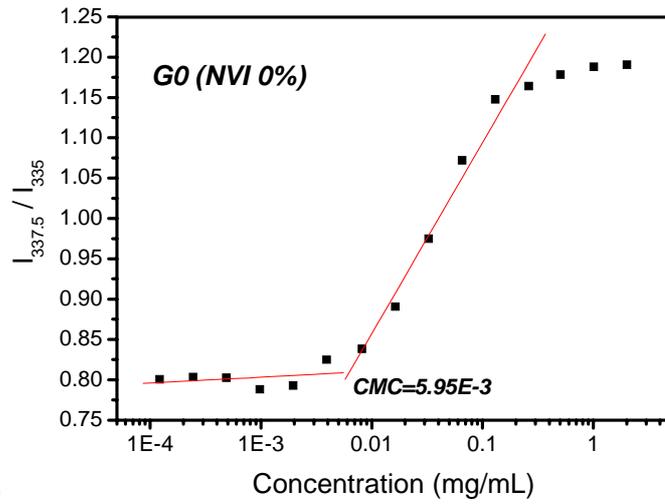


圖 4-8、不同高分子共聚物濃度下，Pyrene 分子之激發光譜 337nm 與 335nm 之強度變化情形

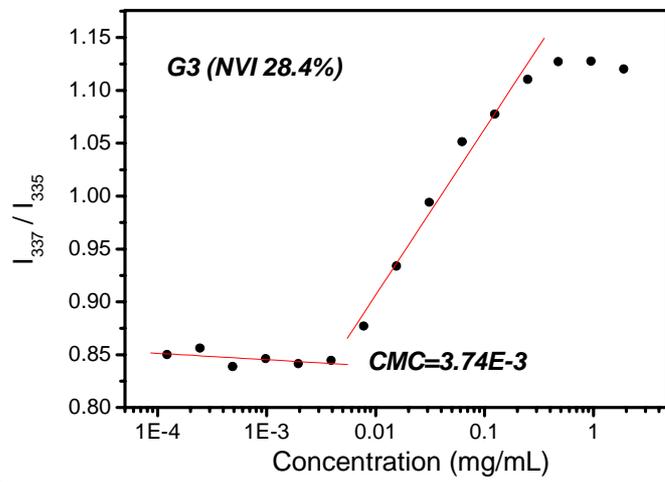
表 4-4、各種共聚物之臨界微胞濃度

Code	CMC (mg/L)	Annotation
G0	5.95	PLA-g-PNVP (NVI 0 mol%)
G3	3.74	PLA-g-P(NVI-co-NVP) (NVI 28.4 %)
G5	2.22	PLA-g-P(NVI-co-NVP) (NVI 48 %)
B1	84.0	mPEG-PLA (Mn5000:530)
B2	16.0	mPEG-PLA (Mn5000:1050)
B3	5.4	mPEG-PLA (Mn5000:1750)

(A)



(B)



(C)

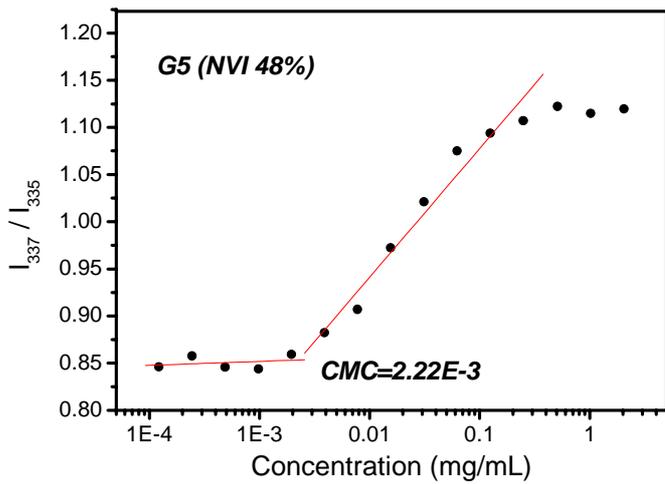
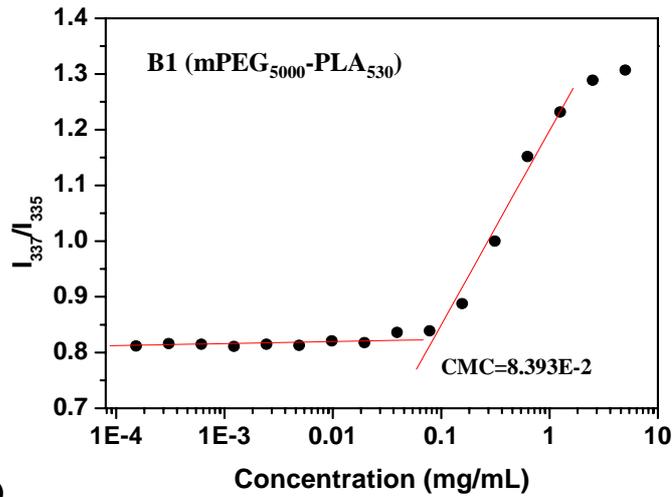
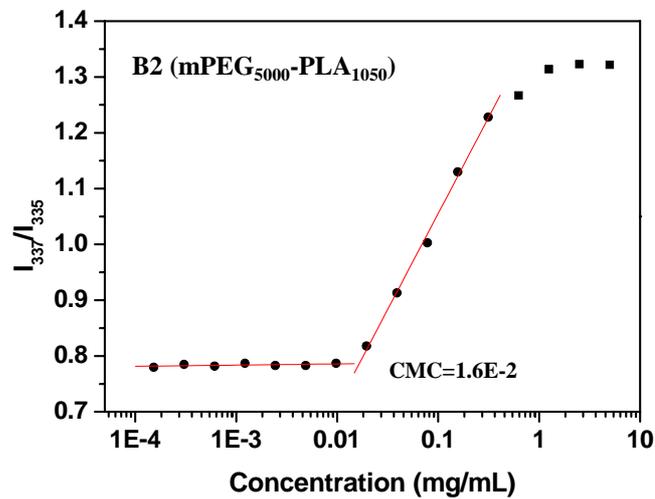


圖 4-9、不同主鏈組成比之 PLA-g-P(NVI-co-NVP)接枝共聚物於不同濃度下之  $I_{337}/I_{335}$  比值變化圖，兩條直線之外插交點即為臨界為包濃度(CMC)

(D)



(E)



(F)

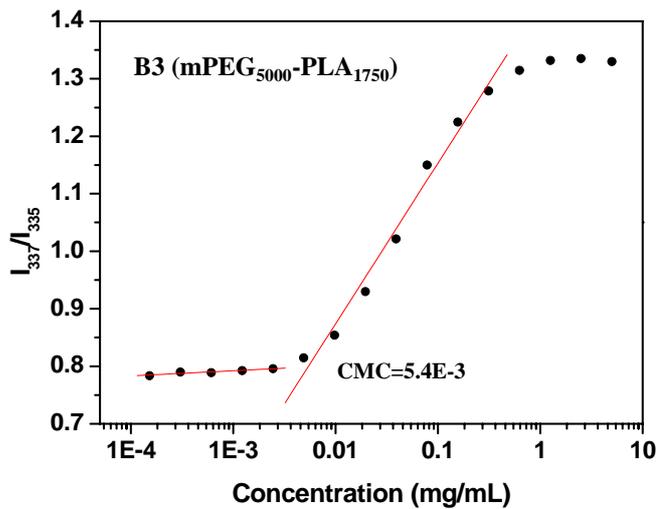


圖 4-10、不同鏈段長度比之 mPEG-PLA 二團聯共聚物於不同濃度下之  $I_{337}/I_{335}$  比值變化圖，兩條直線之外插交點即為臨界為包濃度(CMC)。

#### 4-4、接枝型奈米微胞之製備與鑑定

高分子雙團聯共聚物欲在水溶液中自我組裝成一有序列之結構，通常其結構皆必須具有親疏水性差異明顯的兩段高分子鏈，而隨著親疏水鏈段比列之不同，其在水溶液中之組裝結構亦不相同，常見的結構有微胞(micelle)、棒狀(cylinder)、層板狀(lamella)等結構。當我們提高親疏水端之組成比例時(增加親水鏈段比；降低疏水鏈段比)，組裝之結構會由層板狀或棒狀轉為微胞之結構。而高分子微胞之形成取決於親疏水性分子鏈段的比列。在水相環境下，當親水性鏈段之分子量大於疏水性鏈段時，高分子鏈會因在水溶液中親疏水性之不同而排列成核殼結構(core-shell structure)的高分子微胞。

高分子微胞形成之過程包含了兩種作用力的平衡，其一是使高分子互相聚集的疏水性作用力，其二是避免高分子微胞無限聚集而形成微相(microdomain)的高分子鏈段排斥力。其熱力學行為與小分子量的界面活性劑相似，形成微胞的驅動力主要是因為在水溶液中，雙性共聚物的疏水性鏈段為了減少與水的接觸面積而自我聚集，再加上覆蓋在疏水性鏈段外層的親水性鏈段使得疏水性鏈段與水的接觸面積減到最低，因此使系統的自由能達到最小值而形成最穩定的狀態。

本研究製備之接枝型奈米微胞的方式與一般雙性二團聯共聚物奈米微胞之製備方式相同，是採用傳統的透析(dialysis)方式，先將接枝型共聚物溶解於 DMSO 有機溶劑中，再將溶液置入透析膜(dialysis bag)，利用透析膜內外濃度梯度之差異，緩慢地將 DMSO 置換成水溶液。此法之優點在於可避免

雙性共聚物在初期快速且過度地聚集，利用緩慢地置換水與有機溶劑，最終將可得到規則排列且具有核殼結構(core-shell structure)的奈米微胞。實驗之結果整理於表 4-5。

而本論文對於接枝型奈米微胞之研究重點是在探討接枝共聚物主鏈組成比之不同對於其應答行為之關係，探討之重點將著重於：NVI(酸鹼應答材料)含量的多寡與接枝型奈米微胞之粒徑大小、粒徑分布、酸鹼應答型為、膨潤行為、開關行為、藥物包覆含量、藥物釋放行為及癌細胞毒殺行為等的關係。故由表 4-5 及圖 4-11 所得之實驗結果，我們選用平均粒徑較小且粒徑分佈較均一的 G3(NVI 28.4%)與 G5(NVI 48%)作為往後實驗探討的對象；並選用主鏈不含 NVI 之 G0(NVI 0%)做為實驗的對照組。



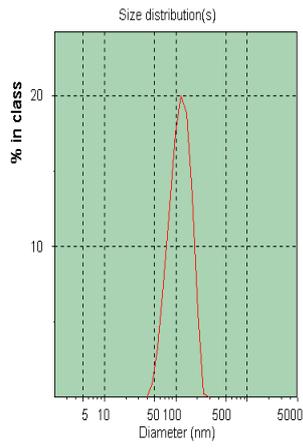
表 4-5、接枝型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值

Code <sup>(a)</sup>	Average Diameter ±SD(nm) <sup>(b)</sup>	Polydispersity Index ±SD <sup>(b)</sup>
G0	107.3±0.5	0.113±0.006
G1	129.4±1.4	0.1±0.009
G2	87.5±0.6	0.14±0.002
G3	118.2±1.1	0.067±0.008
G4	114.2±1.8	0.165±0.035
G5	96.8±1.3	0.072±0.005

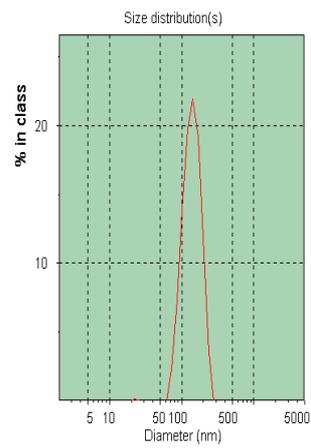
(a) Graft copolymer with NVI X\*10 %

(b) SD-standard deviation of three independent measurements

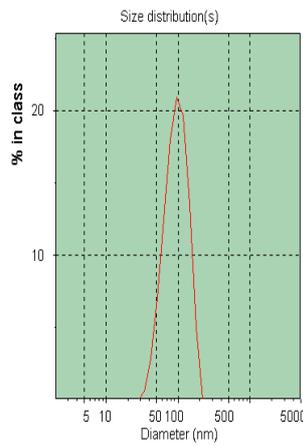
(A) G0 (NVI\_0%)



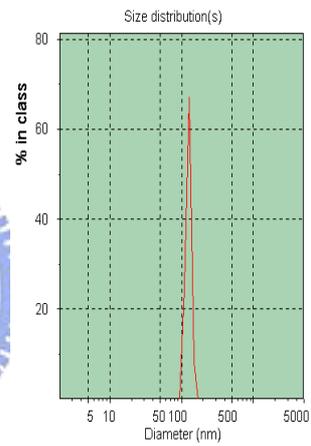
(B) G1 (NVI\_9.9%)



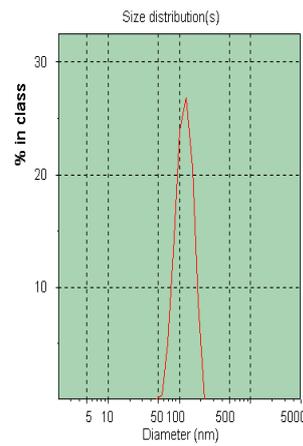
(C) G2 (NVI\_22.7%)



(D) G3 (NVI\_28.4%)



(E) G4 (NVI\_39.4%)



(F) G5 (NVI\_48%)

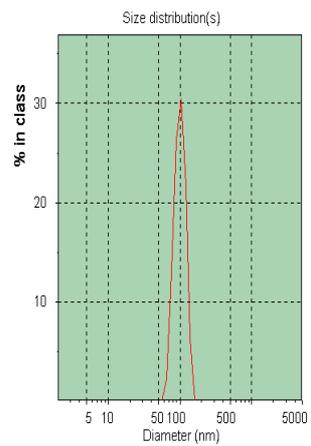


圖 4-11、不同組成比接枝型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值

#### 4-5、接枝型奈米微胞之聚集行為探討

本實驗在探討接枝型奈米微胞之形成機制，由傳統文獻可知，雙性團聯共聚物在形成奈米微胞的過程中，高分子鏈段間之親疏水作用力會彼此互相地抵抗，而奈米微胞為了得到最小的表面自由能，其親疏水鏈段會傾向於達到熱力學之平衡而選擇規則地排列，進而形成奈米微胞。然而，此過程並非速成，雙性共聚物會在共溶劑(cosolvent，即有機溶劑與水)中組裝形成所謂的微胞前趨體(precursor，此為一膨潤結構)，而後隨著有機溶劑之減少，雙性共聚物之疏水端作用力慢慢提高，微胞前趨體會慢慢固化，最終轉為一規則排列之核殼微胞結構，其示意圖如圖 4-12 所示。

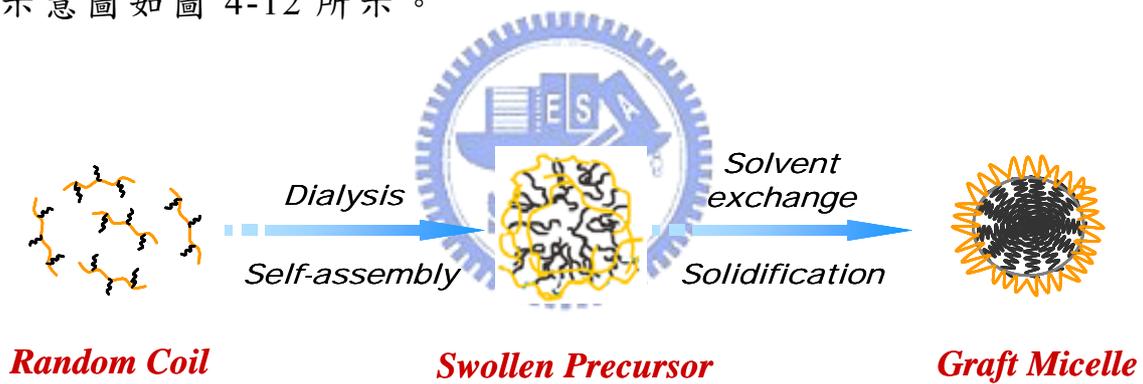


圖 4-12、接枝型奈米微胞聚集行為之示意圖

實驗結果則如圖 4-13 至圖 4-15 所示，無論是 G0、G3 或是 G5，一開始在含有少量 H<sub>2</sub>O 的情況下(H<sub>2</sub>O 含量低於 15%)，由於有機溶劑對於接型枝共聚物之溶解度尚高，且共聚物疏水端 PLA 聚集力小於親水端 P(NVI-co-NVP)之分散力，故此時接枝型共聚物是呈現自由捲曲(random coil)的型態而無法藉由儀器測得其粒徑大小；然而當共溶劑中之 H<sub>2</sub>O 含量不斷增加

(H<sub>2</sub>O 含量介於 15~30%時)，造成疏水端 PLA 作用力不斷增強，於是便慢慢地形成微胞前趨體(precursor)，在此區間，儀器已經可以偵測到奈米微胞的粒徑大小，但是其粒徑分佈仍然處於一混亂狀態，我們可藉此推測此時微胞內核呈現一膨潤狀態，亦即溶劑與疏水端 PLA 共處；而後隨著 H<sub>2</sub>O 含量不斷地提高(高於 30%)，PLA 之疏水作用力不斷增強進而產生內核排除溶劑效應。最後，H<sub>2</sub>O 含量繼續的提高將造成內核溶劑的排除，微胞的結構最終也趨於穩定。

另外，由 G0 與 G3、G5 之形成機制可以發現，G0 在形成初期，DMSO 及 NVP 會與 H<sub>2</sub>O 產生良好的氫鍵作用力，故其粒徑分佈不至於像 G3 與 G5 般混亂；然而 NVI 的介入(G3 與 G5)，會打亂 DMSO 及 NVP 與 H<sub>2</sub>O 之氫鍵作用力，因在中性條件下，仍然有些許 NVI 氮上之氫原子未解離，因此 NVI 不僅會與 H<sub>2</sub>O 產生氫鍵作用力，與 DMSO 及 NVP 同樣地也會產生氫鍵作用力，故造成結構初期的混亂。然而當 DMSO 完全地被 H<sub>2</sub>O 交換時(即微胞形成時)，系統便變得較不複雜，在有 NVI 的存在下(G3 與 G5)，其粒徑大小與分佈反而較 G0 來的好(參考表 4-5)。推論為若環境中僅有水分子，除了 NVP 會與 H<sub>2</sub>O 產生良好的氫鍵作用力(C=O...H-OH)，NVI 更可利用其比 NVP 稍微疏水的特性(但 NVI 仍為親水單體)，使得接枝共聚物之疏水作用力增強造成微胞結構的穩定。

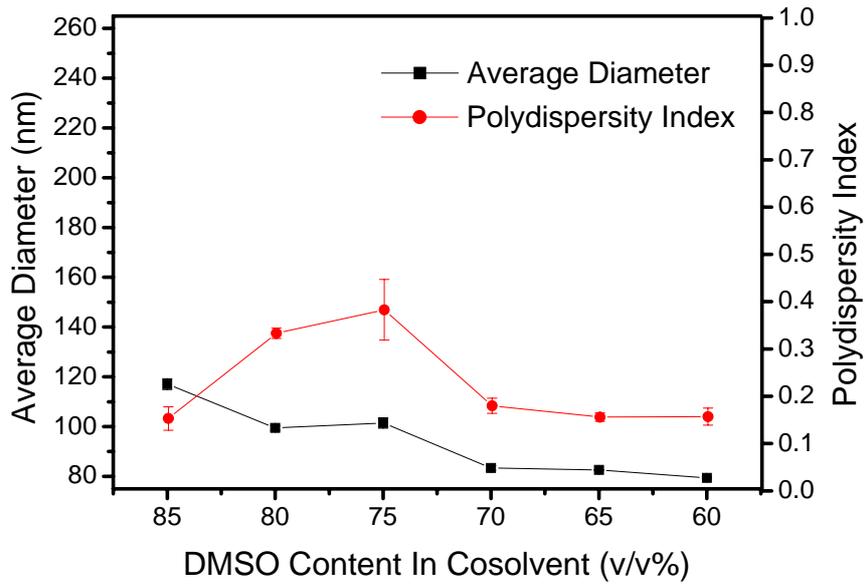


圖 4-13、G0 奈米微粒在不同比例之 DMSO/(DMSO+H<sub>2</sub>O) 混合溶液下之聚集行為

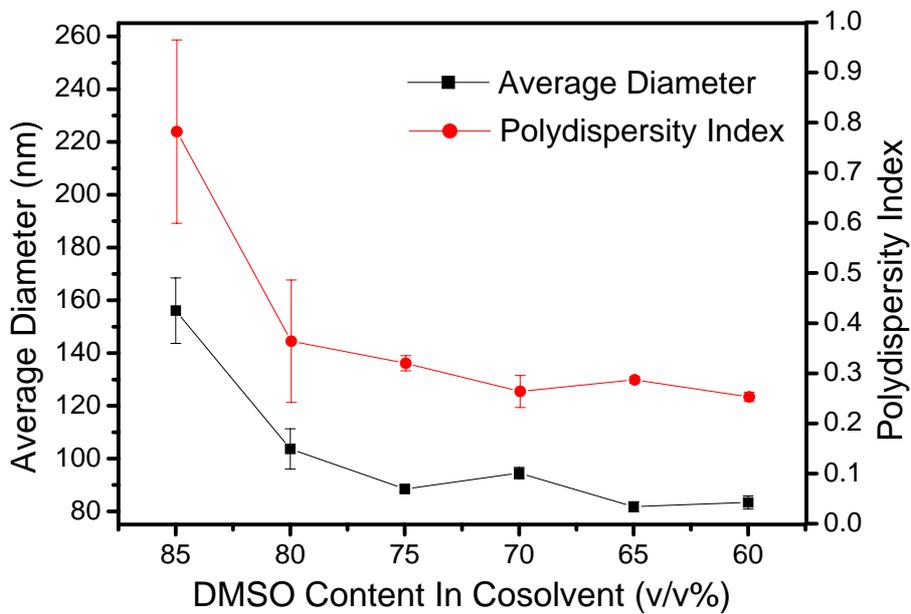


圖 4-14、G3 奈米微粒在不同比例之 DMSO/(DMSO+H<sub>2</sub>O) 混合溶液下之聚集行為。

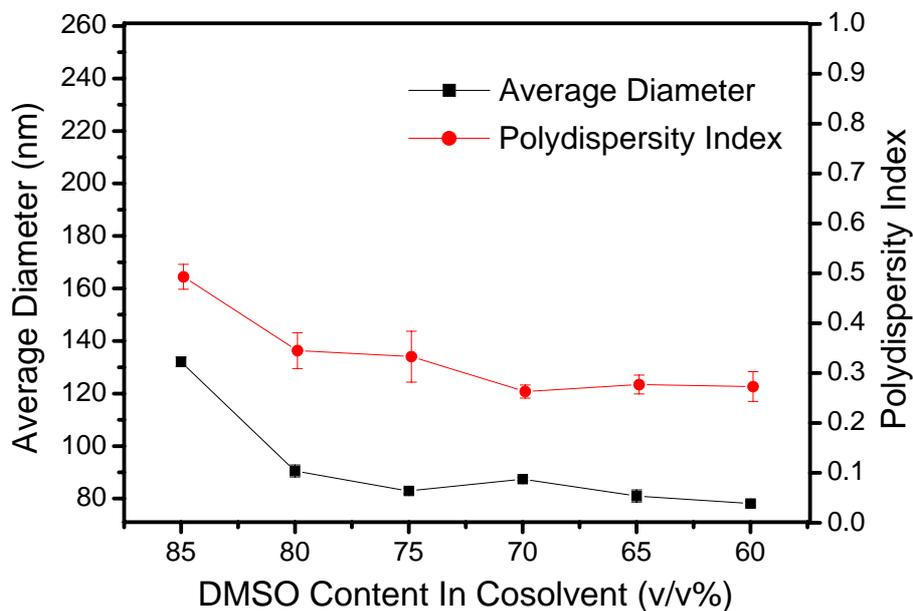


圖 4-15、G5 奈米微胞在不同比例之 DMSO/(DMSO+H<sub>2</sub>O) 混合溶液下之聚集行為。

由上述實驗可知，接枝共聚物之奈米微胞形成過程中包含三個主要步驟，而此三步驟之轉換對於微胞形成與藥物包覆具有非常重要之影響：

- (1) 接枝共聚物由自由捲曲狀態逐漸形成微胞前趨體膨潤結構。
- (2) 微胞前趨體膨潤結構排除核內有機溶劑轉變為緊密結構。
- (3) 隨著 H<sub>2</sub>O 的增加，微胞由緊密結構逐漸固化。

因此，我們藉由上述三項結論，進一步做透析前水含量對於微胞形成之粒徑大小與粒徑分佈之研究，實驗結果如圖 4-16 至圖 4-18 所示。由結果我們可以發現一個共通的現象，無論是 G0、G3 亦或是 G5，其粒徑大小都有一個先上升後下降的趨勢。G0 在水含量達 5 % 時，粒徑達到最大值；而 G3 與 G5 在水含量達 10 % 時，粒徑達到最大值。這是因為接枝共聚物是在此水含量下置於透析膜內透析(此時共聚物本身之型態為自由捲曲之狀態)，於透析初期，由於大量的 H<sub>2</sub>O 瞬間進入透析膜內與 DMSO 做置換，造成微胞前趨體在還沒穩定之前，有過多分散於共溶劑中的共聚物插入微胞內，造成結構的堆疊與不穩定。而當 G0、G3、G5 之透析前水含量達 20% 時，微胞粒徑有變小的趨勢，且粒徑分佈達到最小值。這是因為接枝共聚物於此水含量下處於微胞形成過程之第二階段(即膨潤狀態之微胞前趨體結構)，此時將其置於透析膜內透析，由於共溶劑中已有一膨潤之前趨體存在，其餘分散之共聚物僅要依循熱力學原理，緩慢地插入微胞前趨體，降低疏水端之表面自由能，而後隨著水含量的提高，微胞亦會朝第三階段(即固化)進行最後的步驟。

綜合上述，我們可以得到下列結論：

- (1) 當奈米微胞欲包覆疏水性藥物時，我們選擇初期水含量為 10 % 之比例進行與藥物的混合後，再進行透析。因在此比例下共聚物是以自由捲曲之狀態與疏水性藥物混合，而後再置於透析膜內透析，此時由於 H<sub>2</sub>O 瞬間地與 DMSO 進行置換，造成共聚物之疏水作用力瞬間地提高，使其能夠大量地補抓疏水性藥物而形成微胞前趨體

的結構。雖然此法可得到較高的藥物包覆率，但微胞本身之粒徑大小卻也會因此上升，因此欲得到高包覆率且分佈均一之高分子奈米藥物微胞，仍尚有許多待討論之空間。

- (2) 當欲探討未包覆藥物之奈米微胞的應答行為時，我們選擇初期水含量為 20 % 之比例直接進行透析。在此比例下，無論是 G0、G3 或 G5 皆可得到最小的粒徑分佈，當水含量繼續提高時，雖說粒徑大小仍持續下降，但是粒徑分佈卻有緩慢上升的趨勢，這是因為共聚物在合成時，有些疏水作用力較高的高分子(PLA 比例較高)先行自我聚集成粒徑極小的顆粒，造成粒徑分佈提高之故。

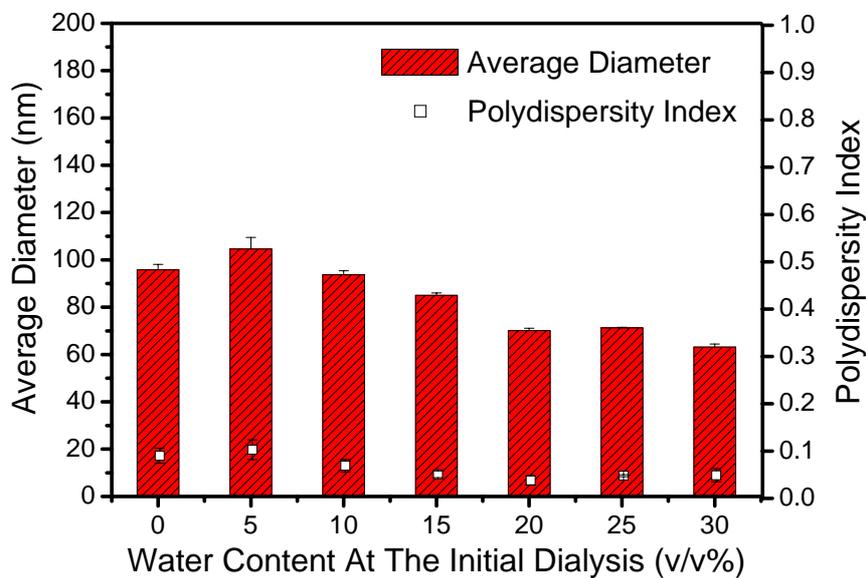


圖 4-16、G0 奈米微胞在不同之初期水含  $H_2O/(DMSO+H_2O)$  下之透析結果

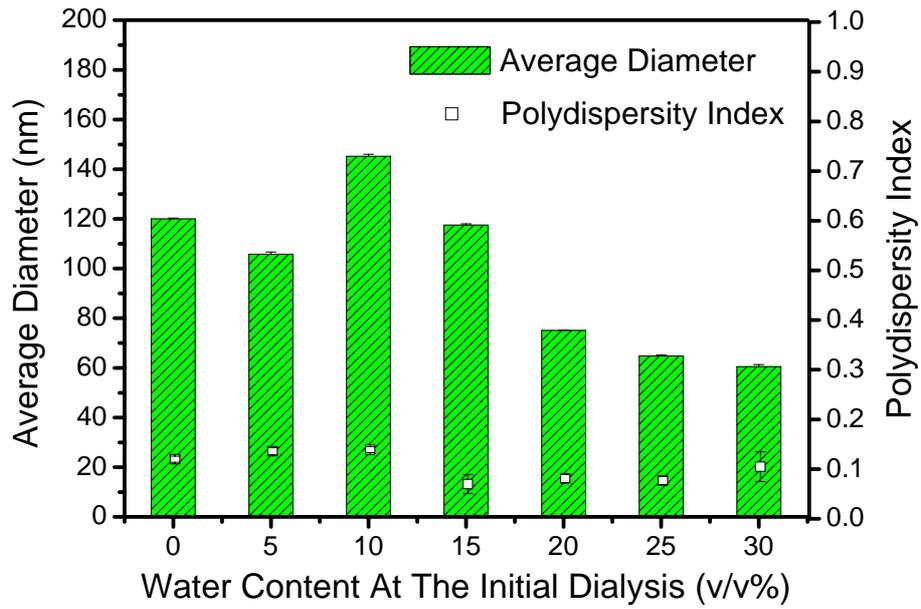


圖 4-17、G3 奈米微胞在不同之初期水含  $H_2O/(DMSO+H_2O)$  下之透析結果。

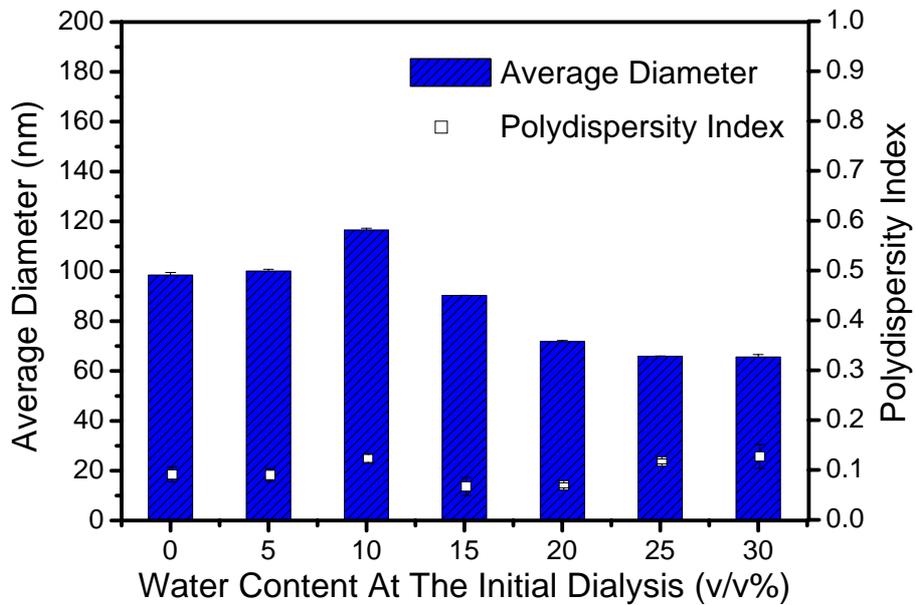


圖 4-18、G5 奈米微胞在不同之初期水含  $H_2O/(DMSO+H_2O)$  下之透析結果。

#### 4-6、複合型奈米微胞之鑑定與分析

複合型奈米微胞的製備與接枝型奈米微胞相同，是採用傳統的透析(dialysis)方式，先將接枝型共聚物與二團聯共聚物溶解於 DMSO 有機溶劑中，再將溶液置入透析膜(dialysis bag)，利用透析膜內外濃度梯度之差異，緩慢地將 DMSO 置換成水溶液。此法之優點在於可避免雙性共聚物在初期快速且過度地聚集，利用緩慢地置換水與有機溶劑，最終將可得到規則排列且具有核殼結構(core-shell structure)的奈米微胞，其示意圖如圖 4-19 所示。在單一組成奈米微胞之研究中，以透析法所製備之 mPEG-PLA 與 PLA-g-P(NVI-co-NVP)奈米微胞，經動態光散射儀測得其水合直徑(hydration diameter)如表 4-6 所示。由表 4-6 可知，接枝型奈米微胞之粒徑大小大抵上皆較二團聯型奈米微胞小，且粒徑分佈也較二團聯型奈米微胞均一。這是因為接枝型共聚物之 PLA 鏈段皆較二團聯共聚物長，且接枝密度也較高，故其有較強之疏水作用力，即聚集力較強，這也就是為什麼接枝型共聚物之臨界微胞濃度較二團聯共聚物高的原因。

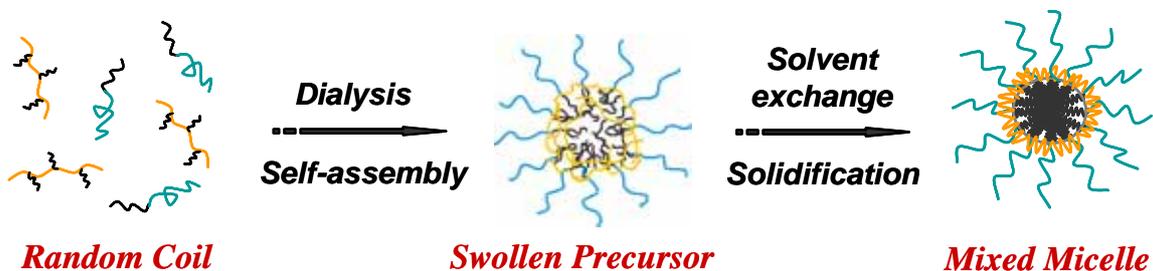


圖 4-19、複合型奈米微胞聚集行為之示意圖

本實驗主要是由 PLA-g-P(NVI-co-NVP)(G0、G3、G5)接枝共聚物以及 mPEG-PLA (B1、B2、B3) 二團聯共聚物進行複合型奈米微胞之形成機制分析。是將高分子依不同之重量比例混合，以透析法製備複合型高分子奈米微胞。並利用動態光散射儀、界面電位分析儀、<sup>1</sup>H-NMR 探討複合型高分子奈米微胞之粒徑大小、粒徑分佈、介面電位分佈及其聚集行為。並以臨界微胞濃度(CMC)之不同，分三部分討論，由臨界微胞濃度之研究結果可知，接枝型共聚物之 CMC 皆較二團聯共聚物小，將之搭配與不同 CMC 之二團聯共聚物共同討論，探討其 CMC 之差異對複合型奈米微胞形成機制之影響。第一部份為接枝型共聚物與 B1 之組合( $CMC_{Graft} \ll CMC_{B1}$ )、第二部分為枝型共聚物與 B2 之組合( $CMC_{Graft} < CMC_{B2}$ )、第三部分為枝型共聚物與 B3 之組合( $CMC_{Graft} \approx CMC_{B3}$ )。



表 4-6、接枝/二團聯型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值

Code	Average Diameter $\pm SD(\text{nm})^{(c)}$	Polydispersity Index $\pm SD^{(c)}$
(a)G0	107.3 $\pm$ 0.5	0.113 $\pm$ 0.006
(a)G3	118.2 $\pm$ 1.1	0.067 $\pm$ 0.008
(a)G5	96.8 $\pm$ 1.3	0.072 $\pm$ 0.005
(b)B1	169.6 $\pm$ 11.4	0.383 $\pm$ 0.235
(b)B2	150.4 $\pm$ 0.8	0.226 $\pm$ 0.011
(b)B3	73.8 $\pm$ 1.2	0.269 $\pm$ 0.024

(a) Graft copolymer with NVI 0%, 28.4%, 48%  
(b) Diblock copolymer : mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>500</sub>, mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>1050</sub>, mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>1750</sub>  
(c) SD-standard deviation of three independent measurements

### (1) $CMC_{Graft} \ll CMC_{B1}$

將 CMC 差異較大之 PLA-g-P(NVI-co-NVP)(G0、G3、G5) 與 mPEG-PLA (B1) 依不同重量比混合，觀察不同重量比例之組成下，mPEG-PLA 對複合型奈米微胞之粒徑大小、粒徑分佈、界面電位及形成機制之影響。主要以動態光散射儀、界面電位儀以及穿透式電子顯微鏡探討及觀察複合型奈米微胞之組成關係與微胞型態。

圖 4-20 為 G0 與 mPEG-PLA (B1) 依不同重量比混合製備之複合型奈米微胞粒徑大小、粒徑分佈以及界面電位關係圖。由圖可知，隨著 mPEG-PLA 含量之增加，粒徑大小有緩慢下降之趨勢且其粒徑分佈均呈現一窄分佈(narrow distribution)。由複合型奈米微胞與單一組成之高分子奈米微胞之差異性可知，複合型奈米微胞之大小主要是由 CMC 較小的接枝型奈米微胞決定。而由於 mPEG-PLA (B1) 之疏水作用力過於微弱(疏水端過短)，僅有少部份之 PLA 高分子鏈段能夠插入接枝型奈米微胞之內核，其餘皆以 random coil 的型態隨著溶劑的交換被排出透析膜外。我們進一步地以界面電位所得結果來佐證上述之推測，由圖可知，G0 接枝型奈米微胞之界面電位與 G0B1 複合型奈米微胞之界面電位幾乎沒有差別，意即複合型奈米微胞之表面幾乎沒有 mPEG 鍊段的存在，可以推知 G0 與 B1 之組合無法成功地製備出複合型奈米微胞。

圖 4-21 與圖 4-22 分別為 G3、G5 與 mPEG-PLA (B1) 依不同重量比混合製備之複合型奈米微胞粒徑大小、粒徑分佈以及界面電位關係圖。由圖可知，兩者之粒徑變化與界面電位皆有共同趨勢，故並在一起共同討論。由粒徑變化之趨勢圖可知，隨著 mPEG-PLA(B1) 含量之增高，粒徑大小有緩慢下降之趨勢，但粒徑分佈卻由接枝型奈米微胞原先之窄分佈(narrow distribution,  $PI=0.11$ )變為複合型奈米微胞之雜亂分佈(broad distribution)。G3、G5 與 G0 之差別在於 G0 之主鍊沒有酸鹼應答之 NVI，而 NVI 在中性條件下，會與 mPEG 產生微弱之氫鍵作用力(隨著環境中 pH 值降低，氫鍵作用力將增強)，也就是說 mPEG-PLA(B1) 是利用 mPEG 與 NVI 本身之微弱氫鍵作用力貼附在 CMC 較小之接枝型奈米微胞表面，並非以疏水端之 PLA 插入接枝型奈米微胞之內核，這也就是為什麼隨著 B1 含量之增加，粒徑分佈會越趨混亂之原因。同樣地，我們可由界面電位之變化來佐證上述之推測，由圖可知，隨著 B1 含量之增加，界面電位由單純接枝型奈米微胞之正值(G3 為  $14.6\pm 1.2\text{mV}$ ；G5 為  $15.8\pm 0.6\text{mV}$ )轉為  $4.0\text{mV}$  左右，而單純 mPEG-PLA(B1) 之界面電位為負值 ( $-5.4\pm 3.8\text{mV}$ )。對照 mPEG-PLA(B1) 含量之增加，造成奈米微胞粒徑分佈變廣之現象，可以推得 mPEG-PLA(B1) 是以貼附在接枝型奈米微胞表面的方式降低奈米微胞之界面電位。

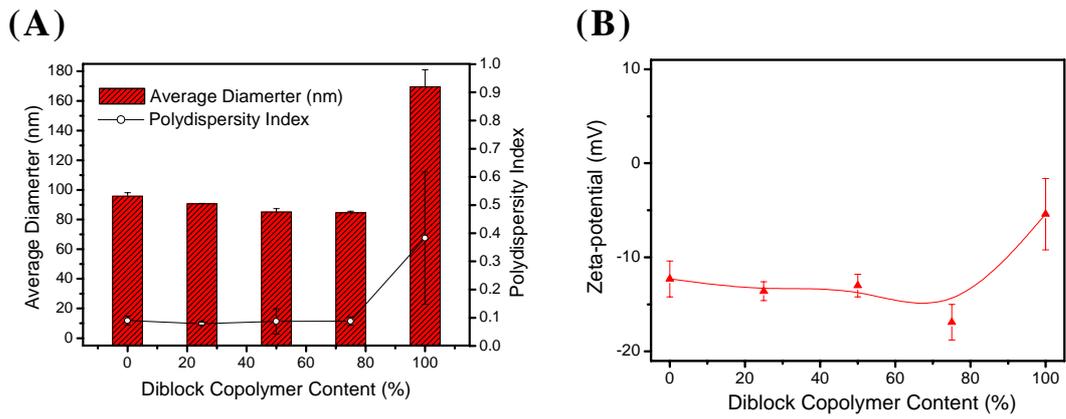


圖 4-20、G0B1 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

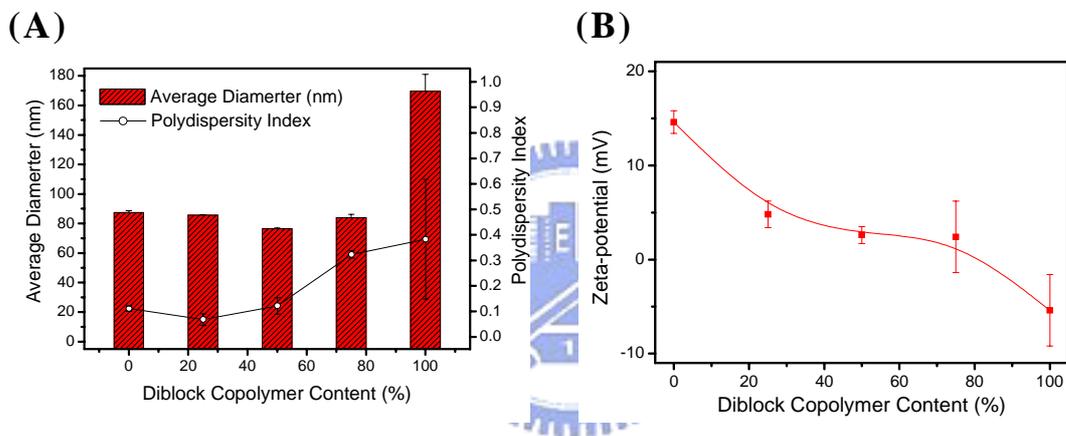


圖 4-21、G3B1 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

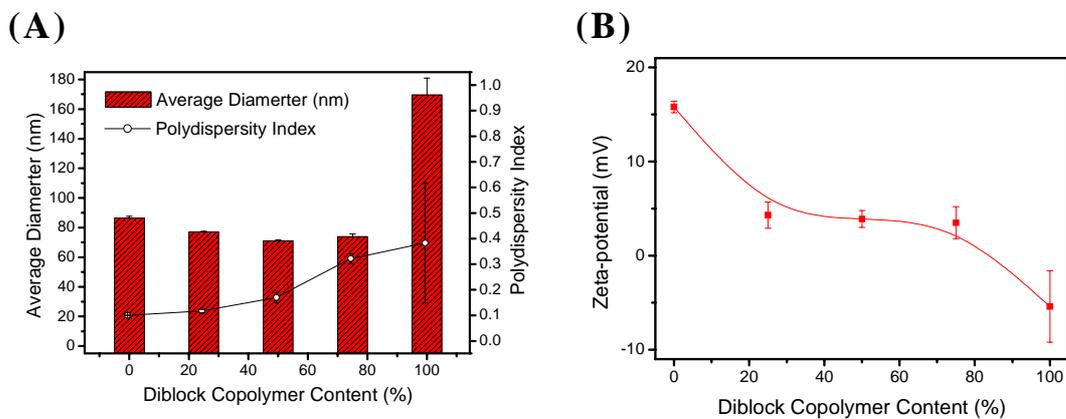


圖 4-22、G5B1 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

## (2) $CMC_{Graft} < CMC_{B2}$

除了臨界微胞濃度差異極大之 Graft 與 B1 混合系統，本實驗亦探討臨界微胞濃度差異較小之接枝共聚物 G0、G3、G5 與二團聯共聚物 B2 之混合系統。將 G0、G3、G5 與 mPEG-PLA(B2) 依不同重量比混合，以透析方式製備複合型奈米微胞以觀察在不同比例下，mPEG-PLA(B2)對複合型奈米微胞之粒徑大小、粒徑分佈、界面電位及形成機制之影響。主要以動態光散射儀、界面電位儀以及穿透式電子顯微鏡探討及觀察複合型奈米微胞之組成關係與微胞型態。

圖 4-23 至圖 4-25 分別為 G0、G3、G5 與 mPEG-PLA (B2) 依不同重量比混合製備之複合型奈米微胞粒徑大小、粒徑分佈以及界面電位關係圖。由圖可知，不論是 G0 系統亦或是 G3、G5 系統，隨著 mPEG-PLA (B2)含量之增加，其粒徑大小皆有緩慢下降的趨勢，且其粒徑分佈僅在 G3B2 混合系統於 75%之比例下有稍微上升之趨勢。因 mPEG-PLA (B2)有較 mPEG-PLA (B1)長的疏水端，故其在接枝型奈米微胞形成微胞前趨體時，可有效地以疏水端 PLA 插入膨潤之微胞結構中，且隨著水含量的提高，微胞的結構將會變得更緊密，而此時 mPEG 可藉其親水及排斥體積效應，有效地阻擋溶劑中其餘分散之共聚物的堆疊，進而避免結構的混亂，這也就是為什麼本系統並沒有像  $CMC_{Graft} \ll CMC_{B1}$  般，隨著 mPEG-PLA 二團聯共聚物比例之增加而造成粒徑分佈的遽增。而由介面電位之分佈，可說明隨著 mPEG-PLA (B2)比例之增加，微胞之介面電位有趨向於 mPEG-PLA (B2)本身之介面電位的趨勢，搭配粒徑分佈，更可進一步地說明此系統確實成功地被製備出來。

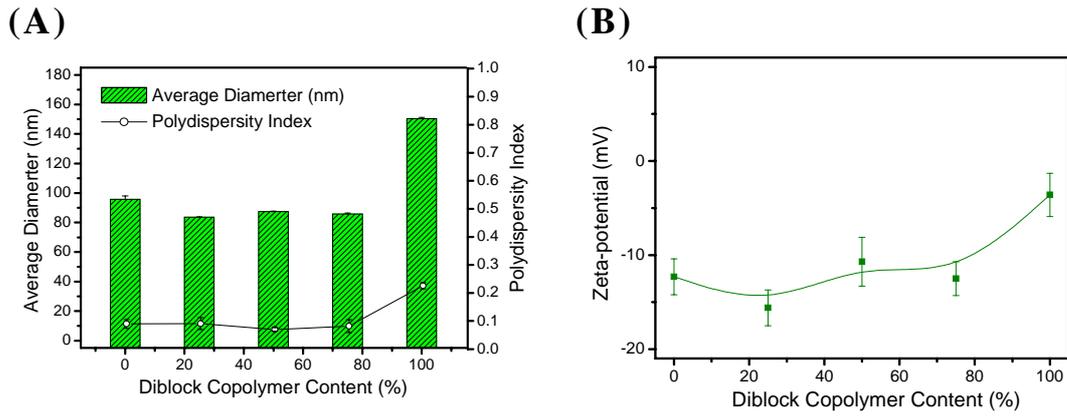


圖 4-23、G0B2 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

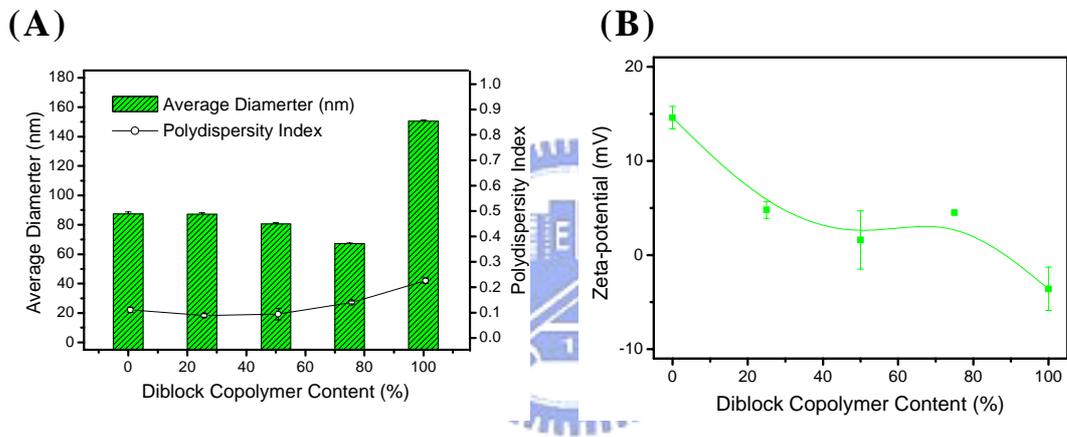


圖 4-24、G3B2 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

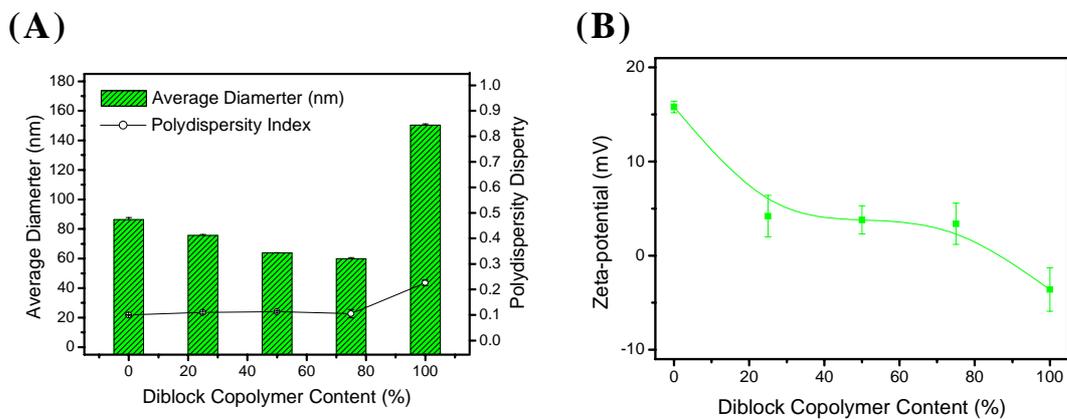


圖 4-25、G5B2 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

### (3) $CMC_{Graft} \approx CMC_{B3}$

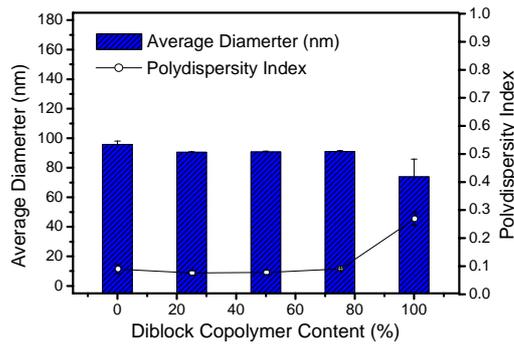
本系統有別於上述臨界微胞濃度差異較大之 Graft 與 B1 混合系統或 Graft 與 B2 混合系統，選用臨界微胞濃度差異較小之接枝共聚物 G0、G3、G5 與二團聯共聚物 B3 之混合系統。將 G0、G3、G5 分別與 mPEG-PLA(B3) 依不同重量比混合，以透析方式製備複合型奈米微胞以觀察在不同比例下，mPEG-PLA(B3)對複合型奈米微胞之粒徑大小、粒徑分佈、界面電位及形成機制之影響。主要以動態光散射儀、界面電位儀以及穿透式電子顯微鏡探討及觀察複合型奈米微胞之組成關係與微胞型態。

圖 4-26 至圖 4-28 分別為 G0、G3、G5 與 mPEG-PLA (B3) 依不同重量比混合製備之複合型奈米微胞粒徑大小、粒徑分佈以及界面電位關係圖。由臨界微胞濃度的觀點來看，G0、G3、G5 與 B3 之臨界微胞濃度相差無幾，故可預期本複合型奈米微胞之形成機制是由兩種共聚物藉由親疏水作用力之差異性同時組裝而成。而由圖可知，雖然微胞之形成機制與  $CMC_{Graft} < CMC_{B2}$  系統不同，但是透析之最終結果卻相差無幾，推論為 mPEG-PLA(B2)疏水端 PLA 之鏈長已足夠穩定複合型奈米微胞之外殼，且 mPEG-PLA(B2)之親水端 mPEG 鏈段長與 mPEG-PLA(B3)相同，故其親水性與排斥體積效應相差無幾，差別在於有較長疏水端 PLA 之 mPEG-PLA(B3)可進一步地穩定微胞的內核結構，能夠增加複合型奈米微胞於體內循環之半衰期及避免被體內免疫系統所辨識而遭吞噬。另外，本系統之界面電位分佈及其變化趨勢皆與  $CMC_{Graft} < CMC_{B2}$  系統類似，隨著 mPEG-PLA (B3)比例之增加，微胞之界面電位有趨

向於 mPEG-PLA (B3) 本身之介面電位的趨勢。

接下來，我們以接枝型共聚物為出發點來探討複合型奈米微包形成機制。以 G0 為例，主鏈不具有酸鹼應答材料 NVI 之接枝共聚物 G0，其與 mPEG-PLA(無論是 B1、B2 或 B3) 組成之複合型奈米微胞，是以親疏水作用力為主要驅動力。因 G0 之親水端主鏈 NVP 與 mPEG-PLA 之親水端 mPEG 間不存在有任何強烈之交互作用力，我們由上述粒徑分佈之平穩趨勢可加以驗證，而二者皆為生物適應性相當好的材料，以二者作為外殼結構之藥物載體皆能夠有效地延長其在體內之循環時間。至於 G3 或 G5 與 mPEG-PLA(無論是 B1、B2 或 B3) 組成之複合型奈米微胞，在本實驗看不出有任何明顯的差異性存在，其親水端主鏈皆含有酸鹼應答材料 NVI，差別在於 G3 含有 28.4 % 之 NVI；而 G5 含有 48 %。主鏈含有 NVI 之 G3 與 G5，在中性條件下，其與 mPEG-PLA 組成之複合型奈米微胞，除了有親疏水作用力存在，NVI 與 mPEG 尚有氫鍵作用力存在。此氫鍵作用力會使 mPEG 貼附於接枝共聚物之主鏈上，而貼附作用在系統含有較少之 mPEG-PLA 時(50%)，可有效地阻擋系統中分散之共聚物繼續的貼附；然而當提高 mPEG-PLA 之比例時(75%)，由於在透析初期，系統之二團聯共聚物分佈過於混亂，隨著水比例之增加，雜亂分佈之共聚物快速地聚集，造成組成比較少之接枝共聚物無法有效地以氫鍵作用力與 mPEG 鍵結，使得粒徑分佈些微的上昇，圖 4-29 則為以 1:1 混合比組成之複合型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值示意圖。

(A)



(B)

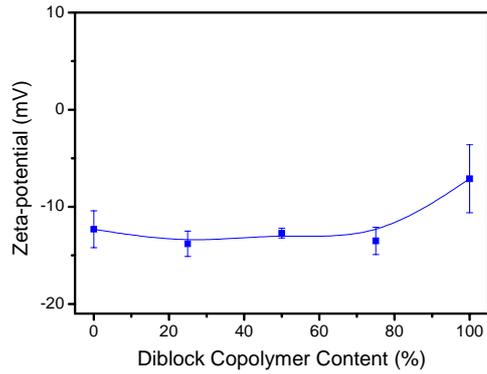
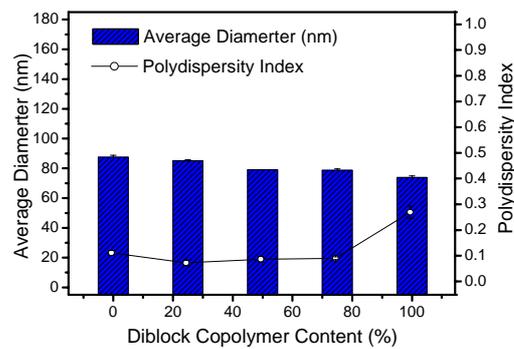


圖 4-26、G0B3 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

(A)



(B)

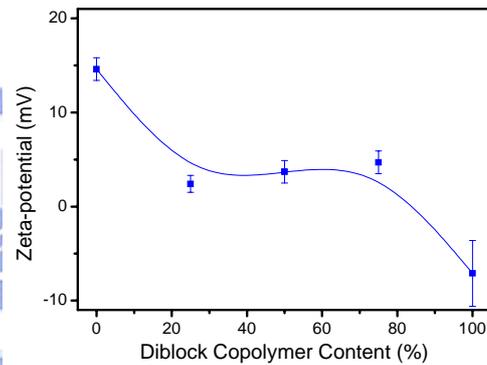
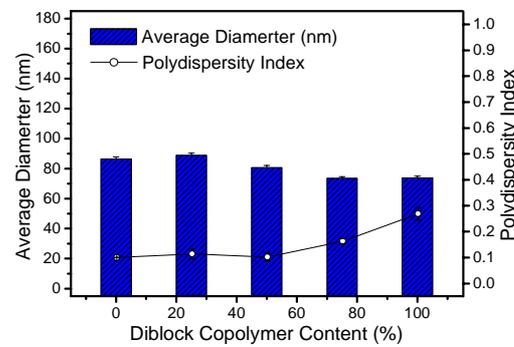


圖 4-27、G3B3 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

(A)



(B)

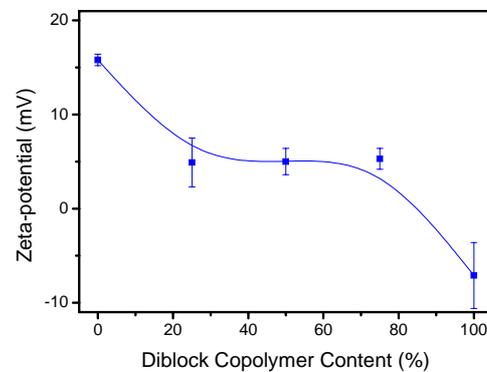


圖 4-28、G5B3 複合型奈米微胞在不同混合比例製備下之 (A)粒徑大小與粒徑分佈 (B)介面電位

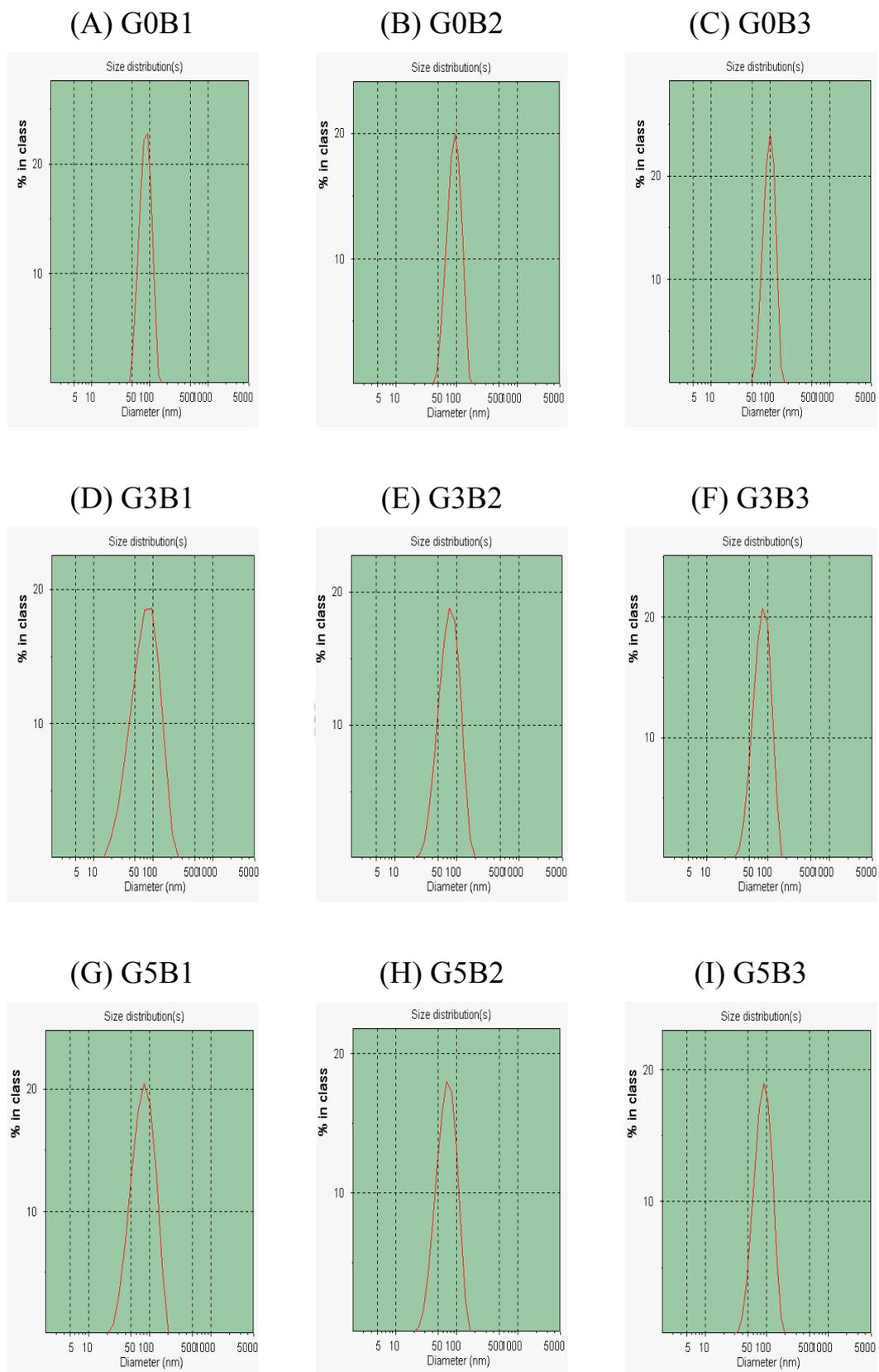


圖 4-29、以 1 : 1 混合比組成之複合型奈米微胞之平均粒徑與 PI 值

#### 4-7、接枝/複合型奈米微胞之核殼型態分析

經透析法所製備之接枝/複合型奈米微胞以  $0.45\mu\text{m}$  之 filter 過濾掉雜質後，將之滴於鍍碳銅網上，而後與染劑醋酸鈾(Uranyl acetate)染色，置於室溫下，待其完全乾燥後，以穿透式電子顯微鏡(TEM)分析其型態。Uranyl acetate 是一種酸性染劑，與 DNA 及各種蛋白質有良好的染色效果，以化學觀點來看，通常化合物若含有具親核力之孤對電子對(lone pair)，皆可與 Uranyl acetate 作用並染色。而接枝共聚物主鏈上之 NVI 具有與 Uranyl acetate 作用之能力，因其 imidazole 環上帶有孤對電子對之 Nitrogen 可與 Uranyl acetate 鍵結，圖 4-30 及圖 4-31 分別為接枝型與複合型奈米微胞之 TEM 影像。

此外，取透析完之接枝/複合型奈米微胞先以  $0.45\mu\text{m}$  之 filter 過濾掉雜質再以二次水稀釋 5 倍後滴於矽晶片上，置於室溫下，待其完全乾燥後，以原子力顯微鏡(AFM)分析其型態。藉以瞭解所製備之接枝/複合型奈米微胞具有何種型態，同時亦可比較以 TEM 與 AFM 所測得之高分子微胞粒徑與動態光散射儀所測得之粒徑的差異性。圖 4-32 及圖 4-33 分別為接枝型與複合型奈米微胞之 AFM 影像，白色箭頭所指的地方即為奈米微胞，其大小接近於動態光散射儀所測得之粒徑，其餘白點則為水漬造成的痕跡。

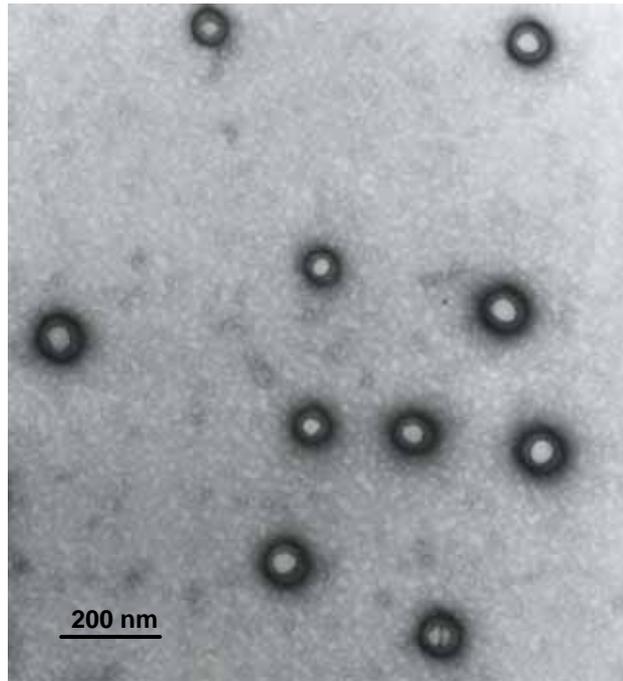


圖 4-30、接枝型奈米微胞之 TEM 影像

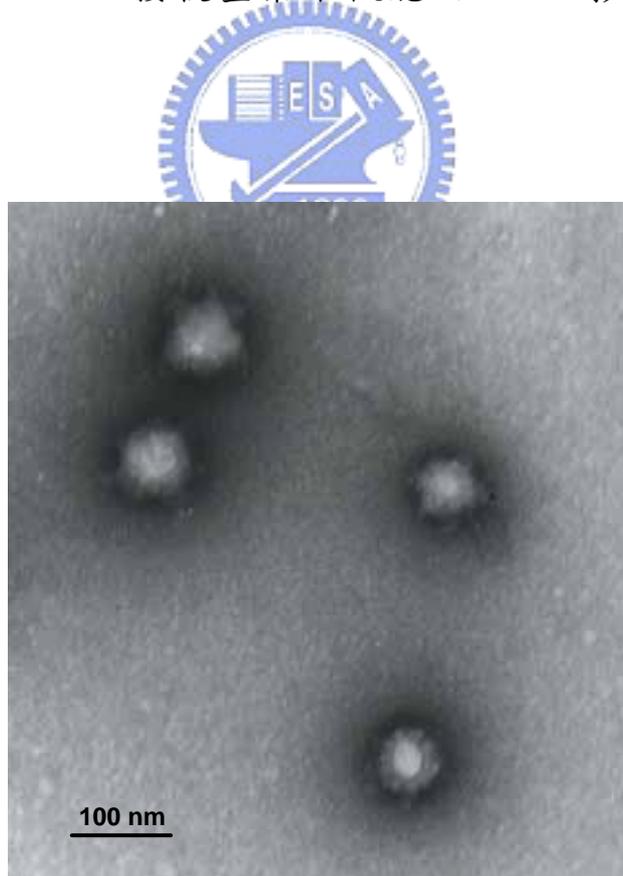


圖 4-31、複合型奈米微胞之 TEM 影像

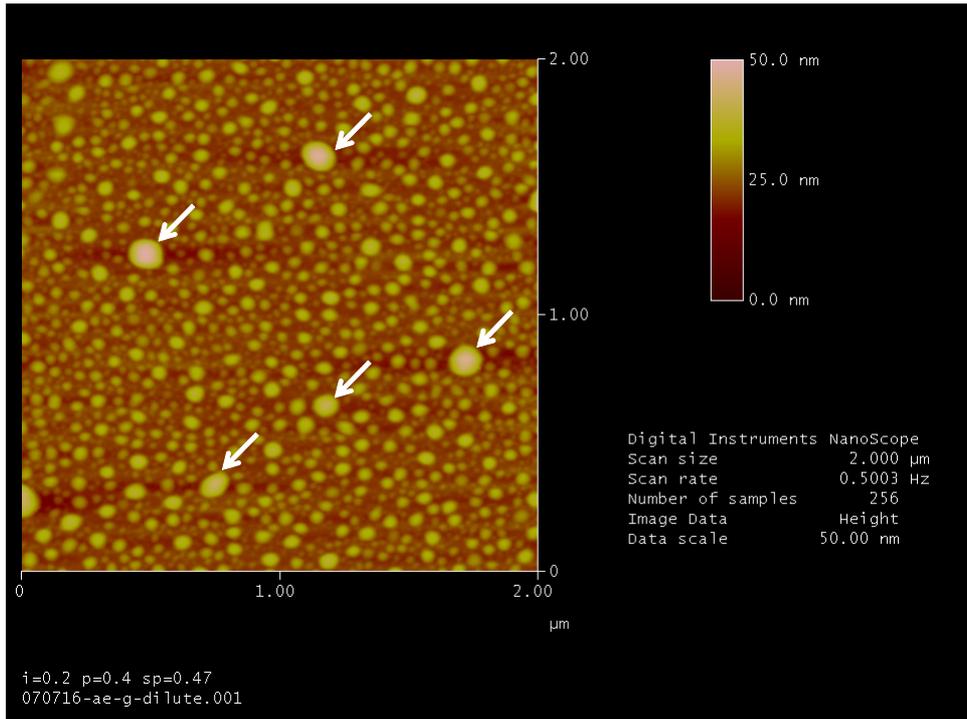


圖 4-32、接枝型奈米微胞之影 AFM 像

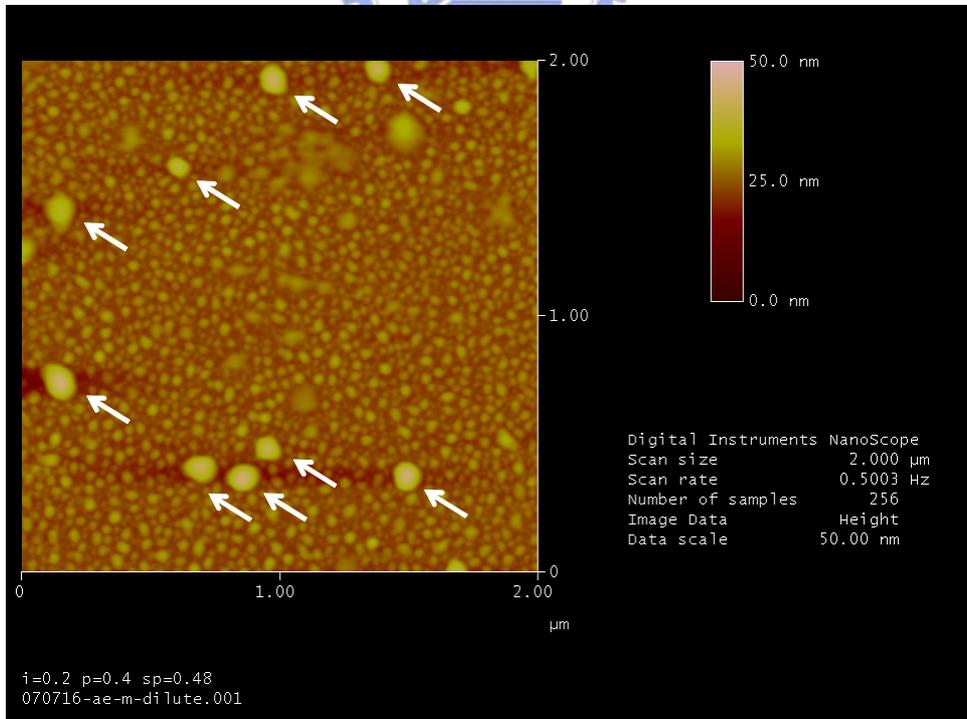


圖 4-33、複合型奈米微胞之 AFM 影像

#### 4-8、接枝/複合型奈米微胞之酸鹼應答行為分析

本研究利用具有酸鹼應答行為之接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)，將其製備成接枝型奈米微胞與複合型奈米微胞，藉由細胞內酸鹼值之改變，探討藥物微胞對於癌症組織之毒殺與治愈效果。將奈米微胞分散於二次水或 PBS 水溶液中，改變環境之 pH 值，可改變奈米微胞之結構與表面型態，接著利用動態光散射粒徑分析儀(DLS)可量測其粒徑大小與粒徑分佈。

在酸性環境下，imidazole 環上帶有未鍵結  $\pi$  電子之 nitrogen 具有 protonation 的能力，會抓取環境中之 proton 進而使得 imidazole 環帶有較強的正電性，這會使接枝型奈米微胞外殼結構藉由正電排斥力造成結構的膨潤化及提高其親水性。接枝型奈米微胞之酸鹼應答實驗結果如圖 4-34、圖 4-35 所示，分別為 G0、G3、G5 之粒徑大小及粒徑分佈變化趨勢圖。由圖可知，G0 接枝型奈米微胞由於其主鍊上不具有酸鹼應答之 NVI，故隨著環境中 pH 值的降低，奈米微胞的結構並可以說幾乎沒有改變，相當地穩定，但相對的，無法應用於酸鹼應答之癌症治療上。

而 G3 接枝型奈米微胞之主鍊上具有 28.4 % 之 NVI，在中性環境下 (pH>6.0)，奈米微胞之結構並不會有多大的改變；而將環境中之 pH 值慢慢降低 (pH<6.0)，G3 接枝型奈米微胞之粒徑大小會慢慢上升，值得注意的是其粒徑分佈幾乎沒有改變，此現象是由兩種作用力所造成：其一為奈米微胞主鍊 P(NVI-co-NVP) 之電性排斥力造成結構的膨潤，其二為側鍊

PLA 之疏水作用力穩定穩胞之結構使其不至於瓦解。另外，G5 接枝型奈米微胞同樣地具有與 G3 接枝型奈米微胞類似的應答行為，差別在於具有 48 % NVI 之主鏈，其酸鹼應答效果更甚於 G3 接枝型奈米微胞。

進一步地，我們由圖可知，G3 接枝型奈米微胞之粒徑大小在 pH7.4 時為  $54.4 \pm 0.4 \text{ nm}$ ，pH4.5 時為  $74.4 \pm 0.8 \text{ nm}$ ，共膨潤 36.8 %；而 G5 接枝型奈米微胞之粒徑大小在 pH7.4 時為  $60.2 \pm 0.9 \text{ nm}$ ，pH4.5 時為  $89.5 \pm 0.5 \text{ nm}$ ，共膨潤 48.7 %。由此可知，隨著主鏈 NVI 含量之增加，奈米微胞之膨潤效果亦會增加。膨潤效果則是參考傳統水膠(hydrogel)之膨潤率公式，膨潤依據則修改為粒徑大小的變化而非奈米微胞的重量。

$$\text{Degree of Swelling} = (R_i - R_f) / R_i \times 100\%$$

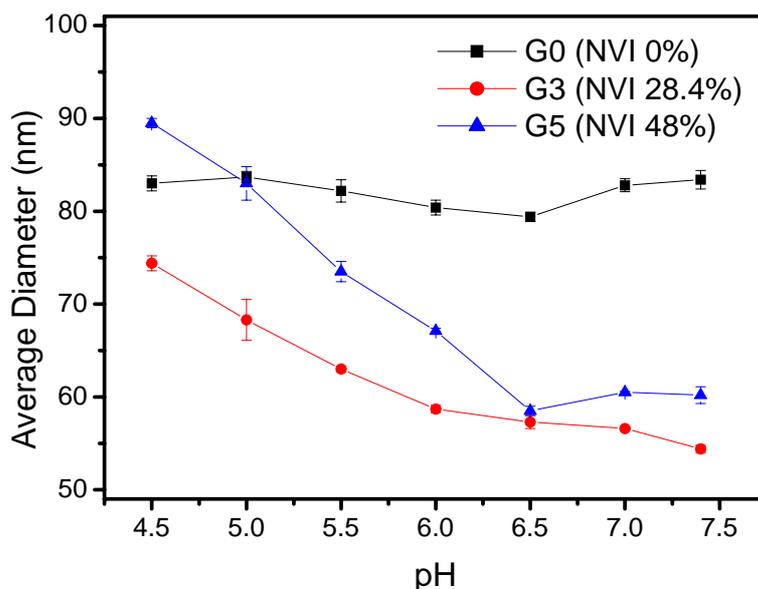


圖 4-34、接枝型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑大小變化情形

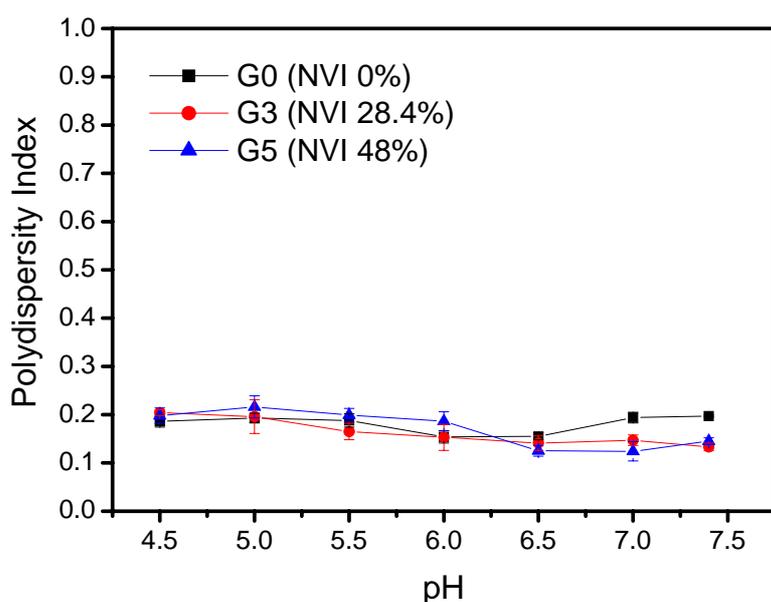


圖 4-35、接枝型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑分佈變化情形

我們進一步地以 1:1 的重量比將接枝共聚物 PLA-g-P(NVI-co-NVP)(G3 及 G5) 分別與不同鏈段比之二團連共聚物 mPEG-PLA(B1、B2 及 B3) 混合，製備出 G3 或 G5 複合型奈米微胞，並探討複合型奈米微胞之酸鹼應答膨潤行為(由於 G0 接枝型奈米微胞不具有酸鹼應答效果，在此不作討論)。G3 複合型奈米微胞之實驗結果如圖 4-36、圖 4-37 所示，大抵上複合型奈米微胞之膨潤行為皆不若接枝型奈米微胞般顯著，這是因為 mPEG-PLA 之疏水端 PLA 會增加複合型奈米微胞的穩定性；親水端 mPEG 則會增加複合型奈米微胞在膨潤時之立體障礙。而由圖可知，G3B1 複合型奈米微胞由於 B1 之疏水端 PLA 過短，無法穩定微胞結構，造成其粒徑分佈相當地混亂。G3B2 及 G3B3 複合型奈米微胞則可因環境中 pH

值的降低，造成微胞結構的膨潤且其粒徑分佈仍相當地穩定。二者之間，又以 G3B2 有較佳的酸鹼應答效果，因 G3B2 之 mPEG-PLA 有較短之疏水端，其疏水作用力造成微胞穩定的效果不若 G3B3 般顯著。而 G3B2 複合型奈米微胞之粒徑大小在 pH7.4 時為  $86.3\pm 1.7\text{nm}$ ，pH4.5 時為  $111.2\pm 0.1\text{nm}$ ，共膨潤 28.9%；而 G3B3 複合型奈米微胞之粒徑大小在 pH7.4 時為  $94\pm 1.1\text{nm}$ ，pH4.5 時為  $111\pm 0.2\text{nm}$ ，共膨潤 18.1%。由上述之實驗結果可得知，G3B2 很明顯地有較佳之酸鹼應答效果，故我們後續之研究探討，G3 類之複合型奈米微包將以 G3B2 為主要探討對象。

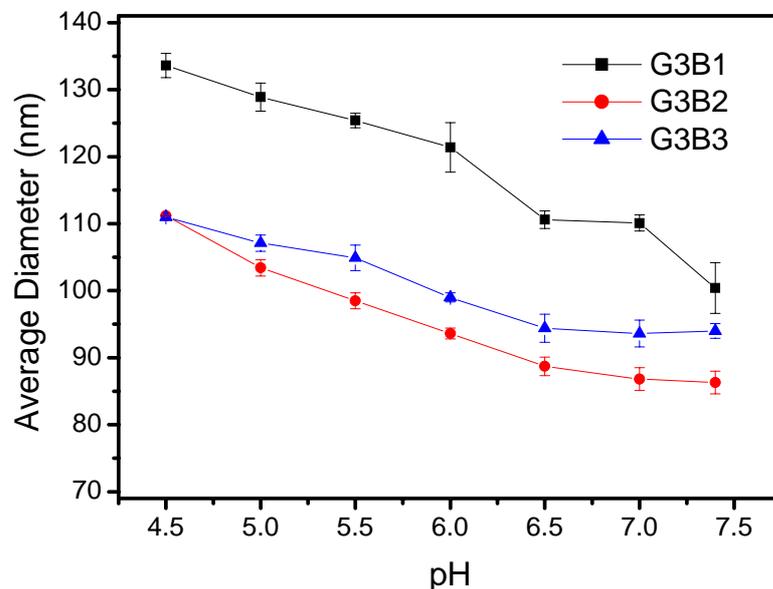


圖 4-36、G3 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散射觀察之粒徑大小變化情形

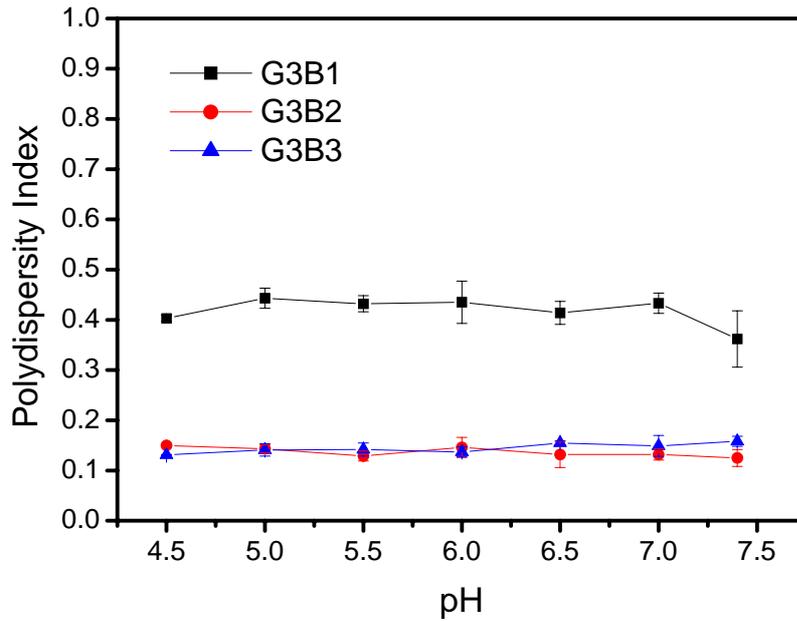


圖 4-37、G3 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑分佈變化情形

G5 複合型奈米微胞之酸鹼應答膨潤行為則如圖 4-38、圖 4-39 所示，其應答行為皆與 G3 複合型奈米微胞類似，差別在於 G5 複合型奈米微胞有較佳的膨潤效果，這是因為其接枝共聚物之主鏈有較高的 NVI 含量(48%)。值得注意的是，G5B1 較 G3B1 有較佳的穩定性，推測為接枝共聚物主鏈上含量較多之 NVI 可與 mPEG-PLA 有較佳的氫鍵作用力與相容性，但由於 B1 之 PLA 過短之故，仍然不適合作為後續研究探討之對象(詳細原因可參考 4-6、複合型奈米微胞之鑑定與分析)。另外，G5B2 複合型奈米微胞之粒徑大小在 pH7.4 時為  $79.1 \pm 1.6 \text{ nm}$ ，pH4.5 時為  $116.9 \pm 1.9 \text{ nm}$ ，共膨潤 47.9%；G5B3 複合型奈米微胞之粒徑大小在 pH7.4 時為  $85.7 \pm 1.5 \text{ nm}$ ，pH4.5 時為  $117.5 \pm 1.0 \text{ nm}$ ，共膨潤 37.1%。由上述之實驗結果可得知，G5B2 很明顯地有較佳之酸鹼應答效果，故我們後續之研究探討，G5 類之複合型奈米微包將以 G5B2 為主要探討對象。

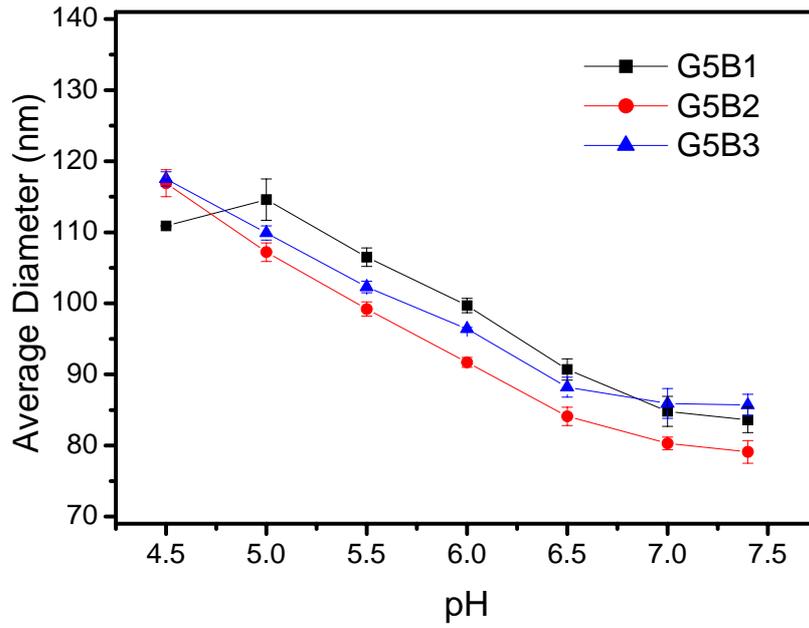


圖 4-38、G5 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑大小變化情形

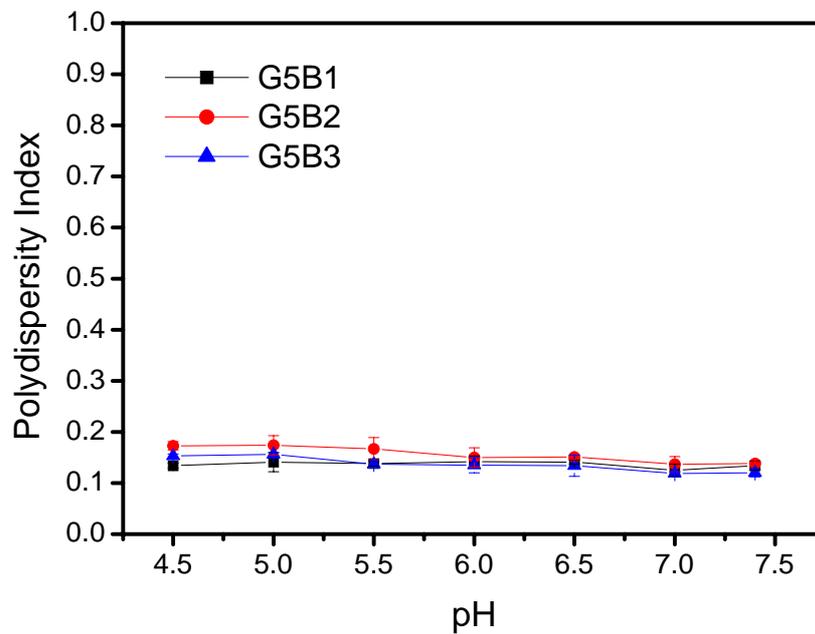


圖 4-39、G5 複合型奈米微胞在不同 pH 值下，以動態光散色觀察之粒徑分佈變化情形

#### 4-9、接枝/複合型奈米微胞之 On-Off 酸鹼應答行為分析

藥物載體經癌細胞由胞飲作用吞噬並將癌細胞毒殺後，癌細胞將因為凋亡而逐漸分裂成凋亡小體(apoptotic body)，而凋亡小體將會進一步地被體內巨噬細胞(macrophage)吞噬【98】。然而傳統之藥物載體一旦經由上述機制作用後，最終將被巨噬細胞吞噬且消化，但載體本身並沒有辦法回復為原狀，亦即藥物載體將持續地隨著在體內之循環，不斷地將藥物釋放，這將會增加抗癌藥物對正常細胞的毒殺性。故本研究即在討論一具有開關行為之藥物載體，期望能夠提高藥物載體對於腫瘤細胞之毒殺性與專一性。更進一步地，被巨噬細胞消化之凋亡小體，其內之藥物載體，期望能夠繼續地在體內循環且不將藥物釋放，等到再次地與腫瘤細胞接觸時，才進行腫瘤細胞的毒殺動作。

本研究首先探討 G3 及 G5 接枝型奈米微胞之 On-Off 酸鹼應答行為，圖 4-40 及圖 4-41 為 G3 接枝型奈米微胞之短時間快速 On-Off 酸鹼應答行為與長時間之 On-Off 酸鹼應答行為。由圖可知，G3 接枝型奈米微胞並不會隨著環境中酸鹼值快速的改變而造成結構的瓦解，其結構僅隨著 pH 值做膨潤與收縮的行為，這可幫助包覆於載體內之疏水藥物做釋放與包覆的動作。在快速地改變 pH 值的初期，G3 接枝型奈米微胞仍可穩定地維持其結構，而在後期之粒徑分佈卻有些微的上昇，是其缺點。然而由長時間的 On-Off 酸鹼應答行為可知，奈米微胞可在固定的 pH 值下穩定維持其結構，並不會隨著時間的增長造成結構的瓦解，且不論 pH 值如何改變，其粒徑分佈一直處於窄分佈(narrow distribution)的型態。

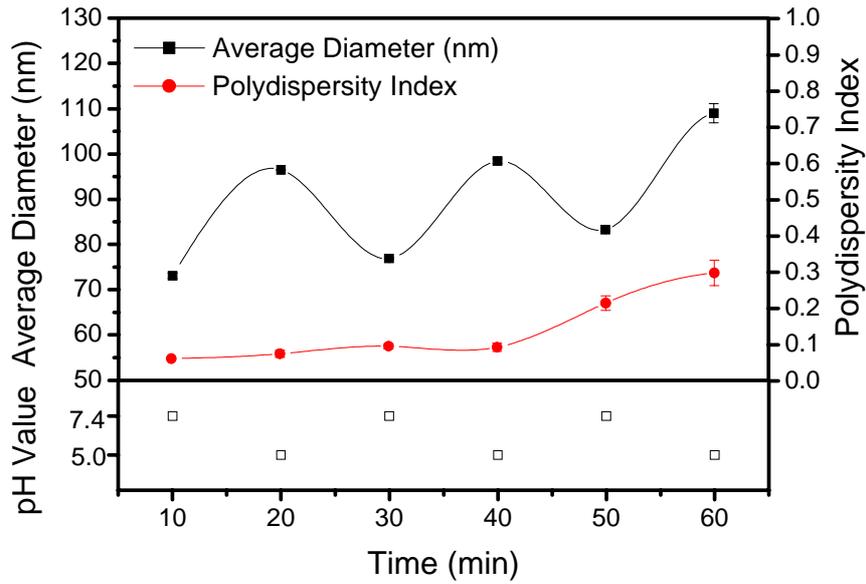


圖 4-40、G3 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為

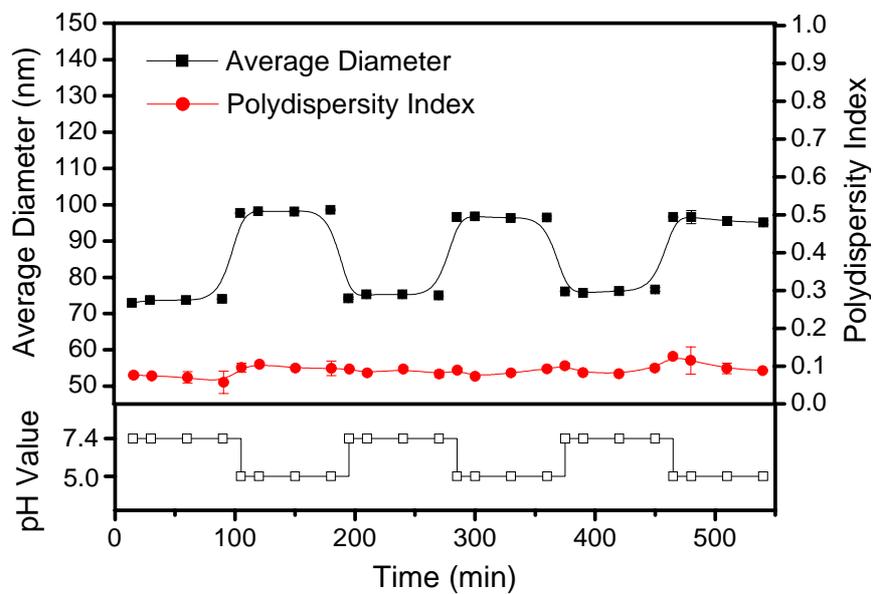


圖 4-41、G3 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下之 On-Off 行為

圖 4-42 及圖 4-43 為 G5 接枝型奈米微胞之短時間快速 On-Off 酸鹼應答行為與長時間之 On-Off 酸鹼應答行為。由圖可知，G5 接枝型奈米微胞亦不會隨著環境中酸鹼值快速的改變而造成結構的瓦解。其膨潤與收縮之行為(比率)比 G3 接枝型奈米微胞表現的更佳，且在快速地改變 pH 值的情況下，其粒徑分佈無論是初期或後期僅有些微的上昇，可以說是相當地穩定。由長時間的 On-Off 酸鹼應答行為可知，G5 接枝型奈米微胞亦可在固定的 pH 值下穩定維持其結構，並不會隨著時間的增長造成結構的瓦解，且不論 pH 值如何改變，其粒徑分佈仍可一直處於窄分佈(narrowdistribution)的型態。

到此為止，我們製備之 G3 與 G5 接枝型奈米微胞可說是相當成功，而又以 G5 接枝型奈米微胞表現的較佳，但是顧慮到 G5 接枝型奈米微胞之外殼有較高比例之 NVI，恐會造成較高正常細胞的毒殺性(因介面電位帶有正電性之藥物載體容易與帶有負電性之細胞膜表面作用，造成癌細胞毒殺之選擇性降低，亦即造成正常細胞的毒殺)。故我們仍持續地探討 G3 與 G5 接枝型奈米微胞之差異性，並製備 G3B2 複合型奈米微胞與 G5B2 複合型奈米微胞，探討其短時間快速 On-Off 酸鹼應答行為與長時間之 On-Off 酸鹼應答行為。並期望能夠藉由介面電位帶有負電位及具有立體排斥體積效應之 mPEG 親水外殼隱蔽奈米微胞 NVI 的正電性，延長其在體內循環之半衰期，最後藉由 EPR 效應(enhanced permeability and retention effect)累積於腫瘤組織附近，提高對於腫瘤細胞之毒殺選擇性，進而降低正常細胞的毒殺性。

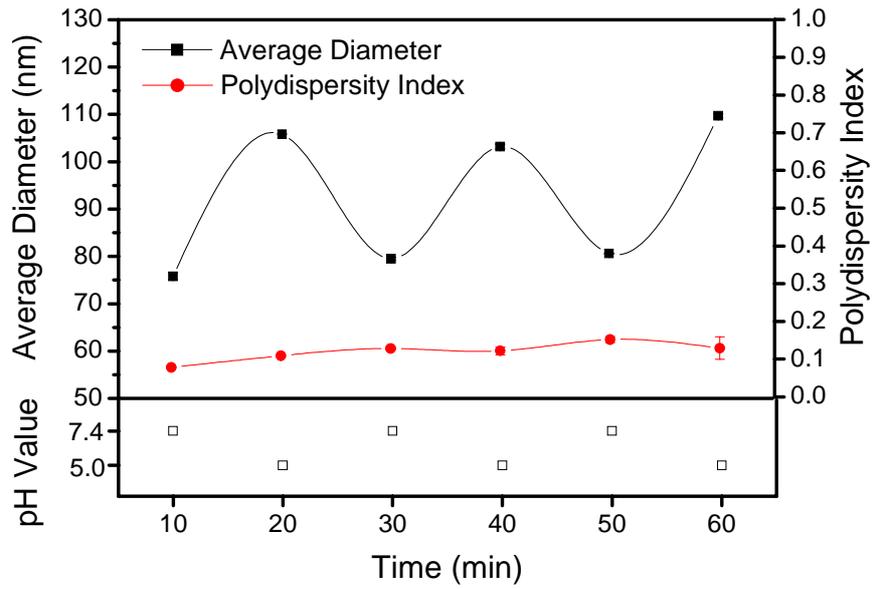


圖 4-42、G5 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為

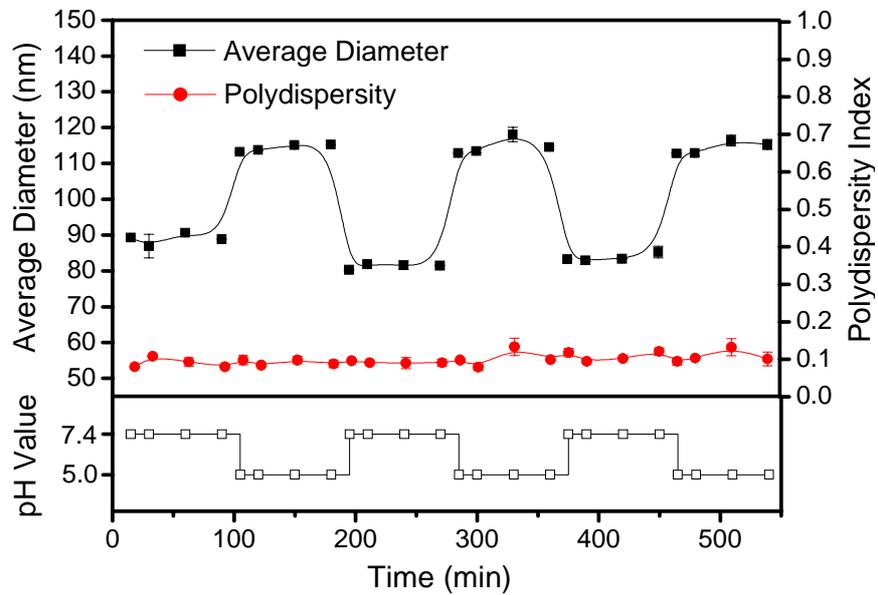


圖 4-43、G5 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下之 On-Off 行為

圖 4-44 為 G3B2 複合型奈米微胞之短時間快速 On-Off 酸鹼應答行為。由圖可知，G3B2 複合型奈米微胞並不會隨著 pH 值快速的改變造成結構的瓦解(粒徑分佈卻有明顯的變化，不若 G3 接枝型奈米微胞般穩定)，而粒徑分佈在第二次將 pH 值調回至 7.4 時卻有明顯上升的現象，推測是因為當第一次將 pH 值調降至 5.0 時，結構快速的膨潤，我們在 G3B2 複合型奈米微胞結構還沒穩定時就再次地將 pH 值調回 7.4，造成膨潤於外之共聚物鏈段在來不及重新排列組裝時，就強迫其快速地將結構收縮而使得結構堆疊變得較為混亂。在第二次將 pH 值調降至 5.0 時，粒徑分佈又立刻變回穩定的狀態，這是因為在 pH5.0 時，G3B2 複合型奈米微胞變得較為親水，造成原本堆疊的奈米微胞又可再次地分散於溶劑中。同樣的情形亦發生在第三回調控 pH 值時，差別在於第三次將 pH 值調降至 5.0 時，結構已變得過為混亂而使得 G3B2 複合型奈米微胞無法再次回復至窄分布的型態。

圖 4-45 為 G3B2 複合型奈米微胞之長時間 On-Off 酸鹼應答行為，由圖可知，長時間之 On-Off 酸鹼應答因為有足夠的時間在特定的 pH 值下做結構的重新排列，故其粒徑分佈並不會像短時間般混亂，且 G3B2 複合型奈米微胞亦不會隨著時間的增加造成結構的不穩定而瓦解。最重要的是，不論我們將藥物載體應用於體內(in vivo)或體外(in vitro)實驗，其作用機制是比較偏向於長時間 On-Off 酸鹼應答行為，因癌細胞在吞噬與凋亡的過程至少要數小時至數天不等，在這段時間內，藥物載體皆可穩定地藉由細胞內酸鹼值的改變，進行穩定的藥物釋放。

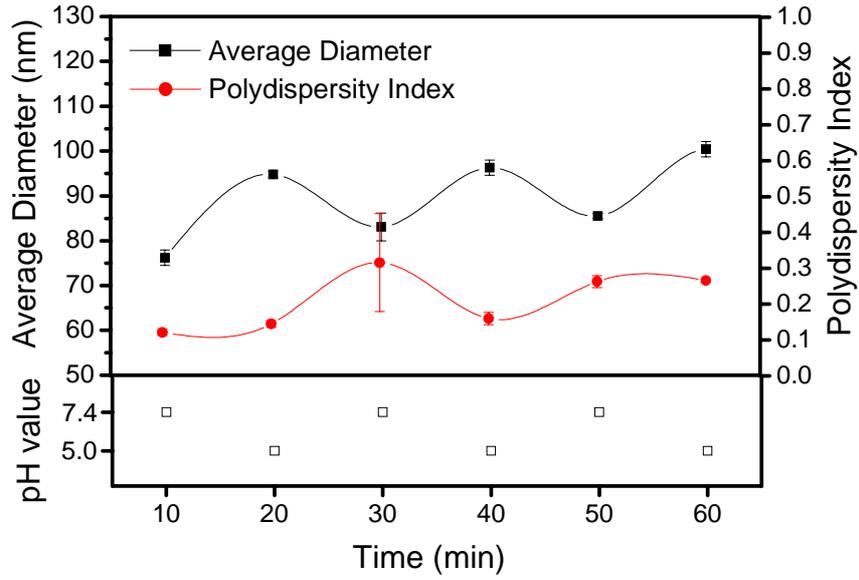


圖 4-44、G3B2 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為

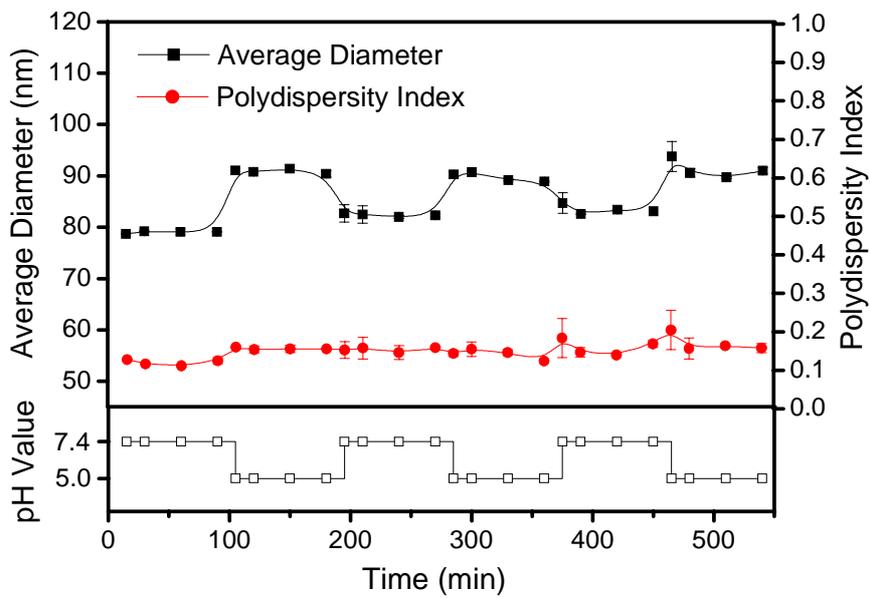


圖 4-45、G3B2 複合型奈米微胞在不同 pH 值之 On-Off 行為

圖 4-46 及圖 4-47 為 G5B2 複合型奈米微胞之之短時間快速 On-Off 酸鹼應答行為與長時間之 On-Off 酸鹼應答行為。由圖可知，G5B2 複合型奈米微胞具有與 G3 及 G5 接枝型奈米微胞般的穩定度及 On-Off 酸鹼應答行為，不論在短時間或長時間的應答，皆有良好的表現，亦即 G5 接枝共聚物與 B2 二團聯共聚物可有良好的組裝關係。我們希望藉由 G5B2 複合型奈米微胞表面 mPEG 較佳之親水與排斥體積效應，期望能夠避免藥物載體在還沒接近腫瘤組織之前，延長其在體內循環之半衰期。

圖 4-48 則為高分子奈米微胞在穿透式電子顯微鏡下所拍攝的照片，分別為(A)pH5.0(1st)之低倍率影像、(B) pH5.0(1st)之高倍率影像、(C)pH7.4(2nd)之低倍率影像、(D)pH7.4 之高倍率影像。由(A)與(B)之影像可得知在酸性條件下，圖中深色的部份為位於接枝共聚物主鏈上之 NVI，其可與染劑 uranyl acetate 作用，原本位於外殼結構的 NVI，在酸性條件下造成微胞膨潤的結果，結構確實變得較為混亂但是整體仍維持一球狀結構，且粒徑分佈仍如同上述之實驗結果與推測般，並沒有因結構膨潤而造成瓦解。另外，(C)與(D)為將第一次酸化後之高分子奈米微胞再次地將 pH 值調回 7.4 後之 TEM 影像，圖中白色的部份為無法藉由染劑 uranyl acetate 染色的疏水端 PLA；而黑色的部份仍為 NVI。由圖可知，由於微胞之結構因 pH 值的變化反覆地開開關關造成原本位於外殼之 NVI，落入微胞的內核中，但整體而言仍然維持著良好的球狀結構，大部分的 PLA 仍然為了降低微胞之表面自由能，選擇有序地再次排列於疏水內核。

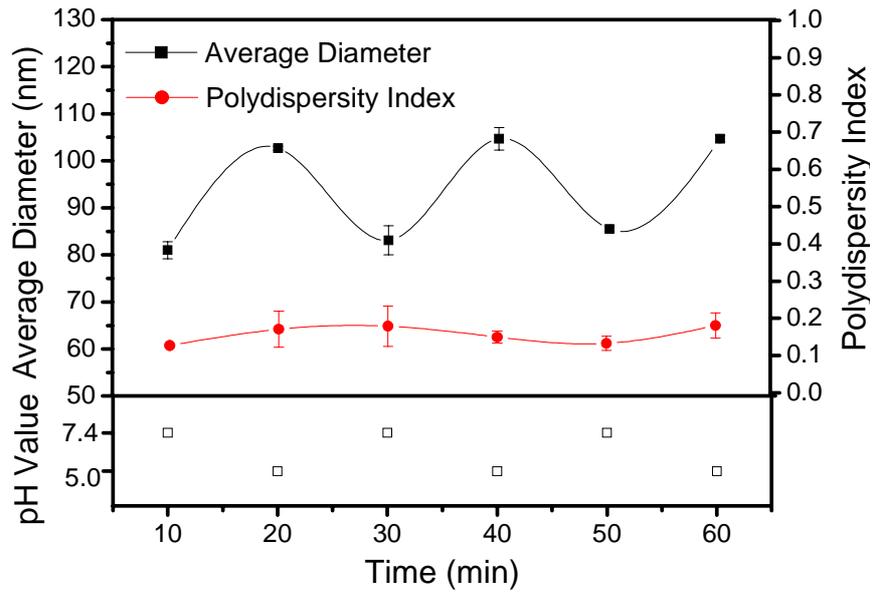


圖 4-46、G5B2 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下短時間內之快速 On-Off 行為

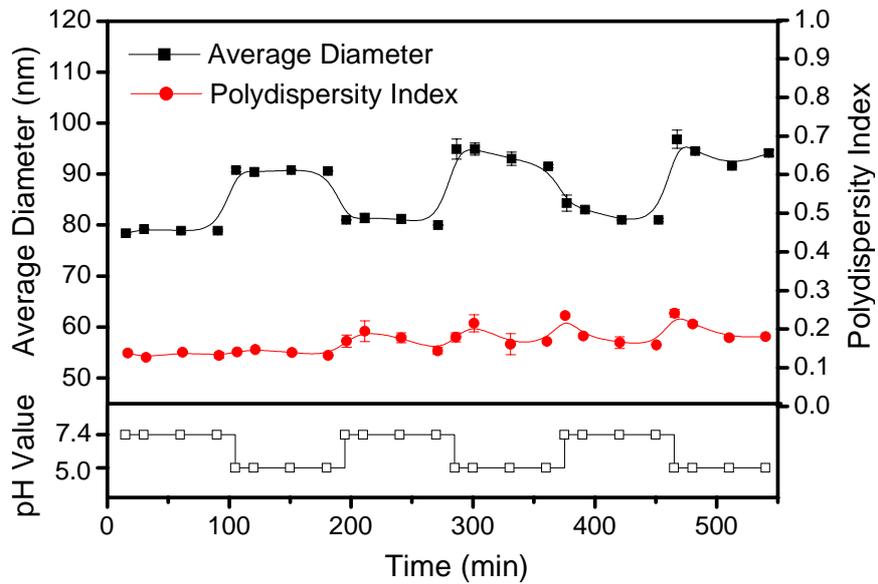
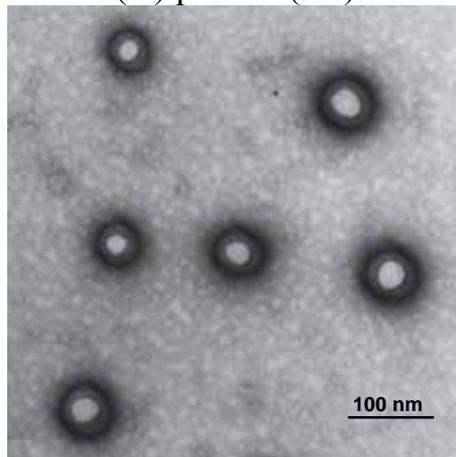
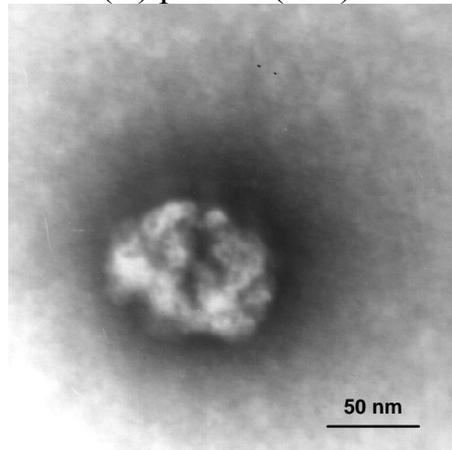


圖 4-47、G5B2 複合型奈米微胞在不同 pH 值之 On-Off 行為

(A) pH 7.4 (1st)



(B) pH 7.4 (2nd)



(C) pH 7.4 (3rd)

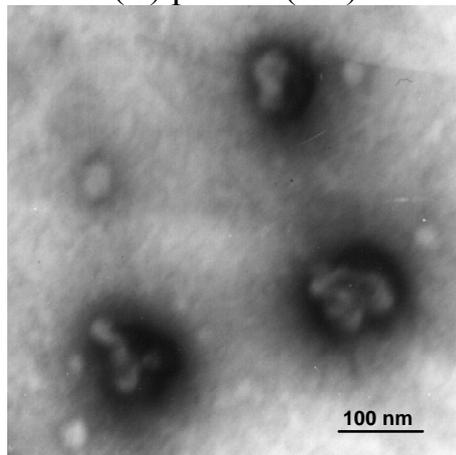
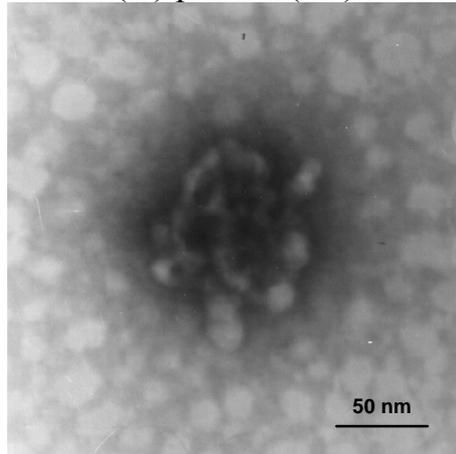
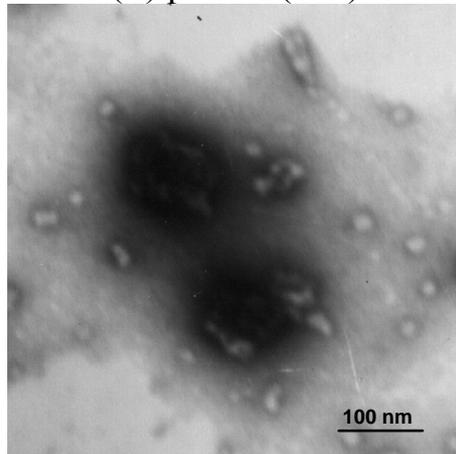


圖 4-48、高分子奈米微胞 On-Off 酸鹼應答之 TEM 影像(pH 7.4)

(D) pH 5.0 (1st)



(E) pH 5.0 (2nd)



(F) pH 5.0 (3rd)

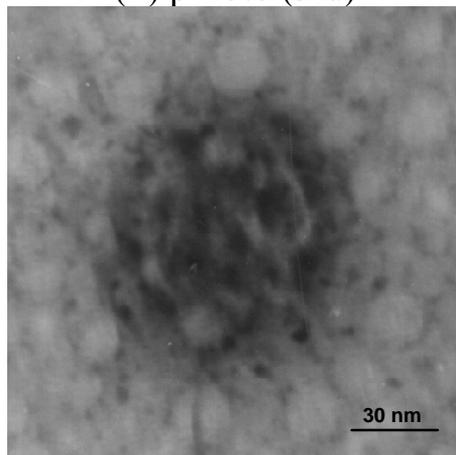


圖 4-49、高分子奈米微胞 On-Off 酸鹼應答之 TEM 影像(pH 5.0)

#### 4-10、接枝/複合型奈米微胞之藥物包覆

首先，我們同樣選用 G3 及 G5 接枝型奈米微胞，作為探討奈米微胞對於藥物包覆行為之先驅，我們選用之抗癌藥物為 Doxorubicin hydrochloride(DOX · HCl)。

而 DOX · HCl 是一種對多種癌症均有治療效果的抗癌藥物，如圖 4-49 所示，為一細胞週期非特異性之抗癌藥物，主要作用機制是透過共價鍵結與 DNA 結合以及烷化 DNA，造成 DNA 交互鍵結而抑制其合成。Dox 可以抑制第一型和第二型的拓撲異構酶(topoisomerase)，干擾 DNA 雙股的分離和螺旋的活性並導致自由基的形成和脂質的過氧化反應，上述作用將引發細胞凋亡(apoptosis)，由於心肌對氫氧自由基特別敏感，使 Dox 容易對心臟產生累積性的傷害而致命。DOX · HCl 為水溶性，加入有機鹼 TEA 去除 HCl 後不溶於水，可以在製備藥物微胞時與內核之 PLA 做疏水性鍵結。

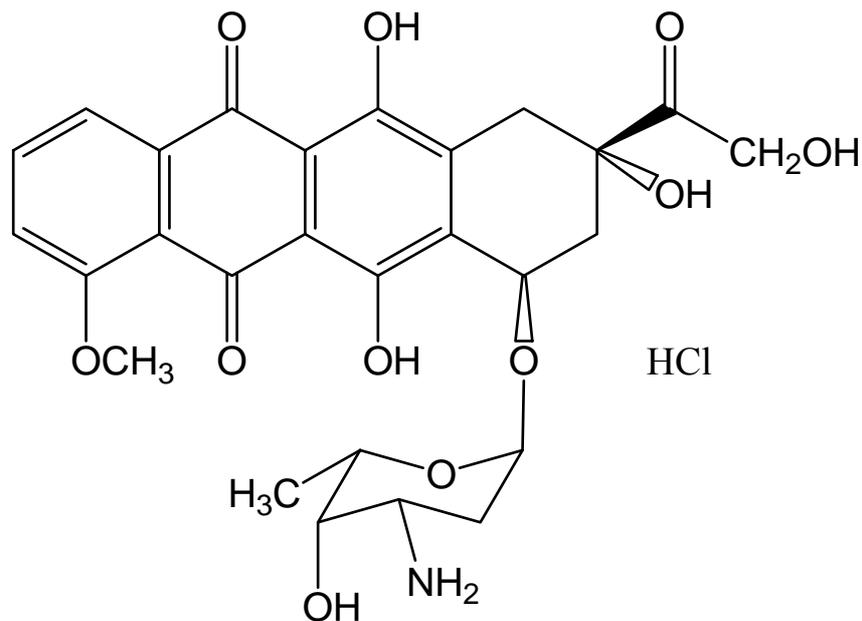


圖 4-50、Doxorubicin hydrochloride 之化學結構式

圖 4-50 為接枝型奈米微胞之藥物包覆行為示意圖，影響高分子微胞之藥物包覆行為有很多。例如：(1)共聚物在形成微胞前趨體時所加入的初期水含量，這將影響微胞之膨潤結構，越膨潤藥物包覆率則越高，最終我們選用 10% 之初期水含量作後續之藥物包覆探討；(2) DOX·HCl 與 TEA 之莫耳比，DOX·HCl 原為親水性分子，TEA 可抓取 HCl 進而使 DOX 變為疏水性以利包覆，最終我們選用 DOX:HCl=1:1.5 之莫耳比作後續之藥物包覆探討；(3)高分子共聚物與疏水性 DOX 溶於 DMSO 之混合攪拌時間，攪拌時間則為 1 小時；(4)選用之溶劑亦會影響包覆行為，但在此我們僅探討 DMSO 對包覆行為的影響；(5)高分子共聚物與 DOX 選用之濃度，在此我們固定共聚物濃度僅改變 DOX 的濃度，實驗結果如表 4-7 所示。

我們將乾燥之藥物微胞溶解於 DMSO 以 UV/Vis 測量波長 485nm 的吸收度，對照藥物溶解在 DMSO 時的檢量線(圖 4-52)，可以計算 DOX 之藥物包覆率。由表可知，在上述操作條件下(接枝共聚物之濃度則固定為 10mg / 5mL)，隨著 DOX 濃度的提高，接枝型奈米微胞之藥物包覆率有顯著的改變，在 30 mg/mL 的 DOX 濃度下，可得到最高的藥物包覆率(G3 為 36.9%，G5 為 42.3%)。此外，我們可發現 G5 藥物微胞不論是在粒徑大小(平均約 200nm)或粒徑分佈(皆為 narrowdistribution)皆表現地比 G3 藥物微胞好，G3 藥物微胞由於粒徑過大(平均約 300nm)，在靜脈注射下於血液中循環時，易被血液中之巨噬細胞辨識為外來侵入者吞噬，而失去癌症治療之目的。故最終為們選用 G5 藥物微胞作為後續體外細胞毒殺實驗之測試，並進一步地製備 G5B2 複合型奈米藥物微

胞，比較二者之差異。

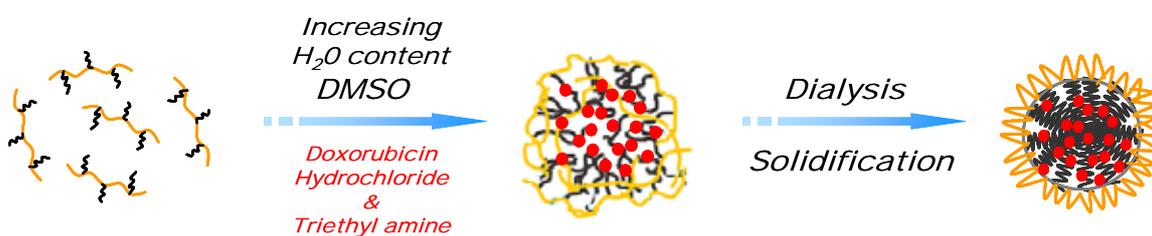


圖 4-51、接枝型微胞之藥物包覆行為示意圖

表 4-7、接枝型奈米微胞之粒徑大小與藥物含量關係

Code <sup>(a)</sup>	Dox (mg/5mL DMSO)	Average Diameter (nm)	PI <sup>(b)</sup>	Drg Content <sup>(c)</sup> (%)
G3	10	305.9±5.3	0.157±0.007	0.1
	20	292.3±3.8	0.12±0.021	11.7
	30	299.3±10.2	0.153±0.011	36.9
G5	10	199.7±1.3	0.11±0.013	0.23
	20	209±8.8	0.145±0.027	26
	30	199.7±10.2	0.176±0.012	42.3

<sup>(a)</sup>G3(NVI 28.4%) ; G5(NVI 48%)  
<sup>(b)</sup>Polydispersity Index determined by Zetasizer  
<sup>(c)</sup> $W_{\text{dox}}/W_{\text{dox}}+W_{\text{polymer}} \times 100\%$

複合型微胞之藥物包覆行為如圖 4-51 所示，高分子共聚物先於 DMSO 溶劑中與疏水藥物 DOX 形成藥物微胞前趨體以利藥物包覆，而後再以透析法將混何溶液置入透析膜內，隨著溶劑的置換，DOX 會慢慢地被包覆於疏水內核。而為了探討複合型藥物微胞與接枝型藥物微胞在粒徑大小、粒徑分佈以及藥物包覆量的差異，我們將 G5 接枝共聚物之濃度固定為 10mg

/ 5mL，並額外加入 10mg 之 B2 二團聯共聚物，以 1：1 的混合比例溶解於 DMSO 溶劑中，其餘操作條件則與上述接枝型藥物微胞相同。在改變 DOX 濃度的情況下，我們得到如表 4-8 之結果，隨著 DOX 濃度的提高，藥物包覆率亦跟著上升，直到藥物濃度達到 30mg/5mL 時產生聚集。對照表 4-7 與表 4-8 的結果，我們可以發現複合型藥物微胞可用較低的藥物濃度得到較高的藥物包覆率。而本研究製備之藥物微胞皆比傳統團聯共聚物所形成藥物微胞之最高藥物包覆率高出許多(大約為 10%~15%左右)。

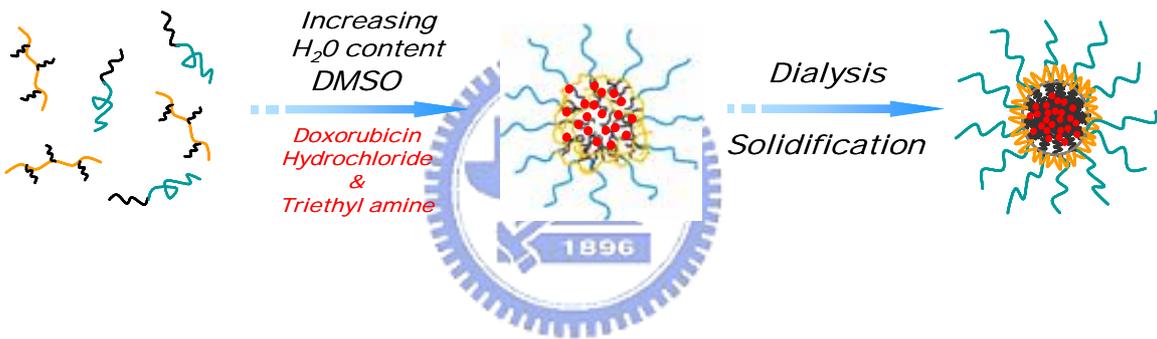


圖 4-52、複合型微胞之藥物包覆行為示意圖

表 4-8、複合型奈米微胞之粒徑大小與藥物含量關係

Code <sup>(a)</sup>	Dox (mg/5mL DMSO)	Average Diameter (nm)	PI <sup>(b)</sup>	Drg Content <sup>(c)</sup> (%)
G5B2	5	223.6±0.9	0.121±0.012	0.01
	10	191.1±1	0.11±0.017	4.9
	15	213.8±0.7	0.178±0.005	18.4
	20	227.6±0.9	0.17±0.021	31.2
	25	244.2±2.2	0.198±0.014	38.5
	30	981.5±32.3	0.639±0.12	∞

(a) G5(NVI 48%) ; B2(mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>1050</sub>)  
(b) Polydispersity Index determined by Zetasizer  
(c)  $W_{\text{dox}}/W_{\text{dox}}+W_{\text{polymer}} \times 100\%$

#### 4-11、接枝/複合型奈米微胞之體外藥物釋放模擬

藥物微胞之體外藥物釋放模擬，是將冷凍乾燥後之藥物微胞溶解於 pH7.4 或 pH5.0 之緩衝溶液後置於超過濾裝置內(超過濾膜 MWCO 10,000)。並於不同時間內以 UV/Vis 測量波長 485nm 的吸收度，對照藥物溶解在不同 pH 值緩衝溶液時的檢量線(圖 4-52)，可以計算 DOX 於不同時間點之藥物釋放量。

圖 4-53 為 G5 接枝型藥物微胞於 pH7.4 及 pH5.0 緩衝溶液下之體外藥物釋放模擬結果。由圖可知，於 pH7.4 之緩衝溶液下，藥物微胞是處於關(Off)的狀態，雖在初期有冷凍乾燥所造成之內核收縮將藥物擠出的突釋(initial burst)現象，造成之損失約為 5%，以及因接枝型藥物微胞本身外層結構無 mPEG 之遮蔽效應造成前 48hr 有約 5%的藥物損失。此後，接枝型藥物微胞皆將藥物包覆的相當好，不再有多餘的釋放現象出現，總釋放量則約為 10%。而於 pH5.0 之緩衝溶液下，藥物微胞是處於開(On)的狀態，位於微胞外殼之 NVI 將因質子化使得微胞結構變得較為膨潤，此時包覆於內核之疏水藥物便得以釋放，釋放初期由於微胞外殼迅速地膨潤化，造成約 15%之突釋，而後隨著時間的增加，藥物釋放量亦隨著增加，並於 168hr 達到約 70%之釋放量。

圖 4-54 則為 G5B2 複合型藥物微胞於 pH7.4 及 pH5.0 緩衝溶液下之體外藥物釋放模擬結果。由圖可知，G5B2 複合型藥物微胞無論是在 pH7.4 或 pH5.0 之緩衝溶液下皆有較小的突釋現象，其中 pH7.4 之突釋量約為 2%，pH5.0 之突釋量則約為 10%。因 G5B2 複合型藥物微胞外殼有 mPEG 之遮蔽作用，

使得其在 pH7.4 下可維持在非常低的釋放量，值得注意的是藥物釋放量於 168hr 時僅釋放了約 5%，由此可知，G5B2 複合型藥物微胞可長時間存在於中性環境下穩定地包覆藥物。而一旦 G5B2 複合型藥物微胞處於酸性環境下 (pH5.0)，同樣可由 NVI 之質子化造成結構的膨潤進而將包覆於內之疏水藥物釋放，且釋放量同樣的可由時間的增長做緩慢的增加，並於 168hr 達到約 67% 之釋放量。

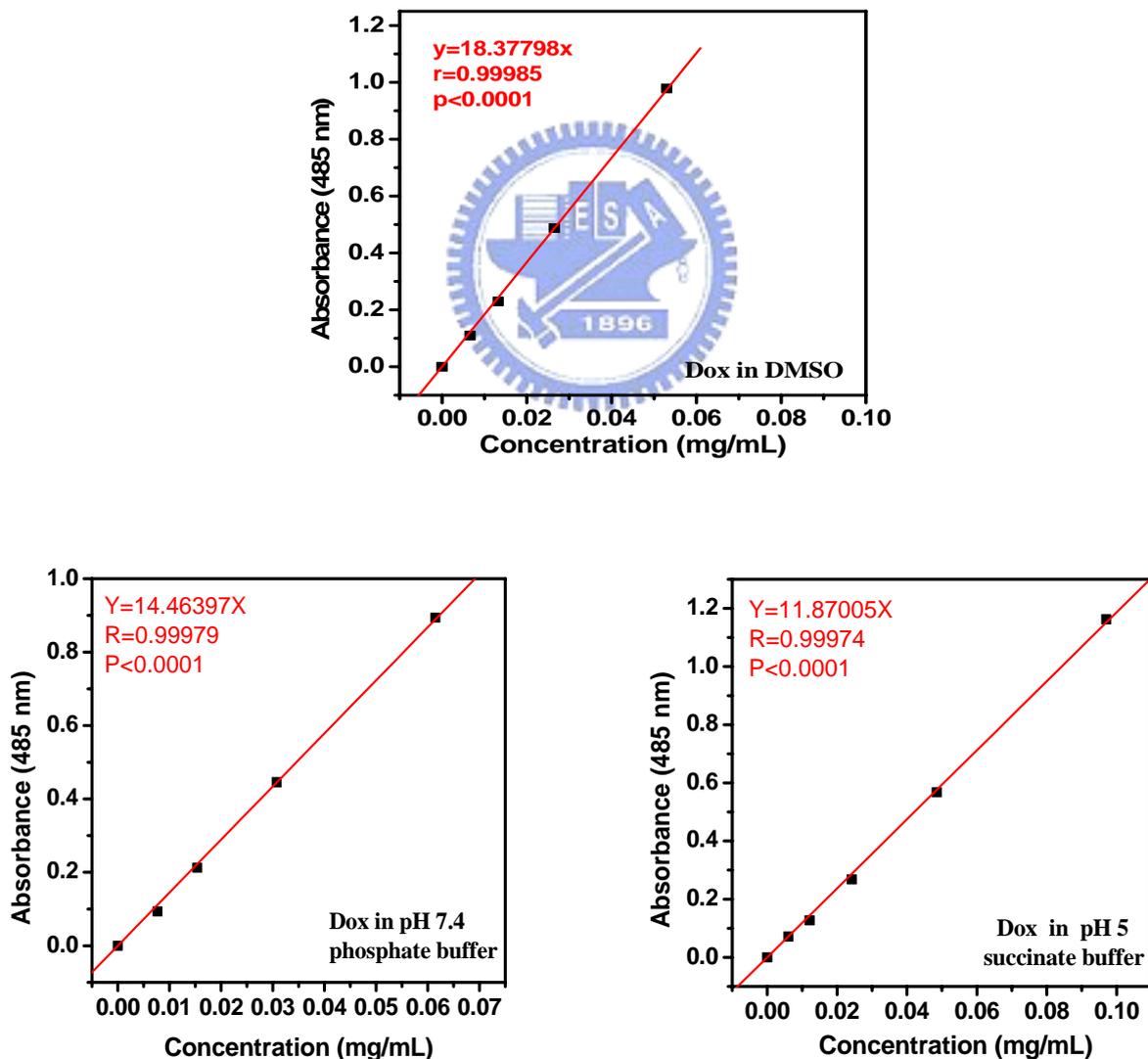


圖 4-53、Doxorubicin hydrochloride 在 485nm 之檢量線

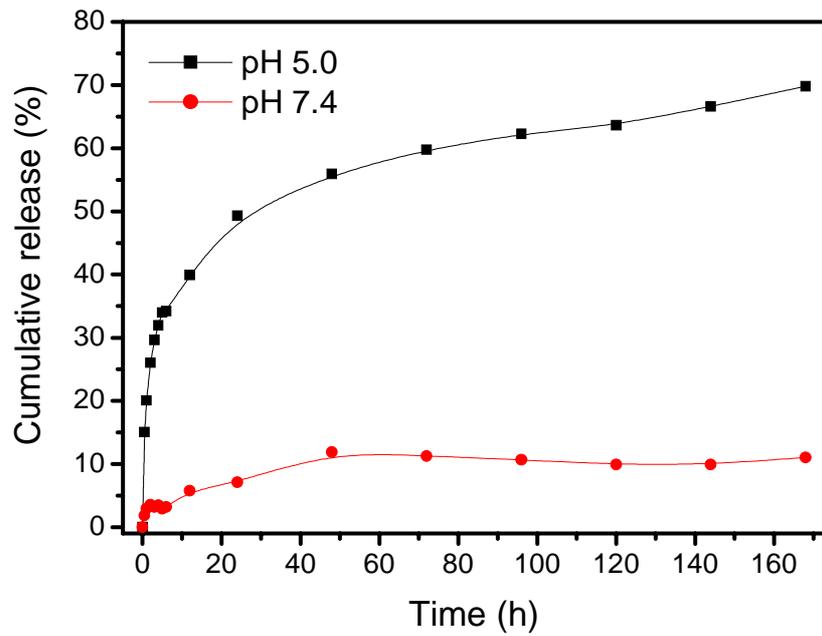


圖 4-54、G5 接枝型藥物微胞於 pH7.4 及 pH5.0 緩衝溶液下之體外藥物釋放模擬

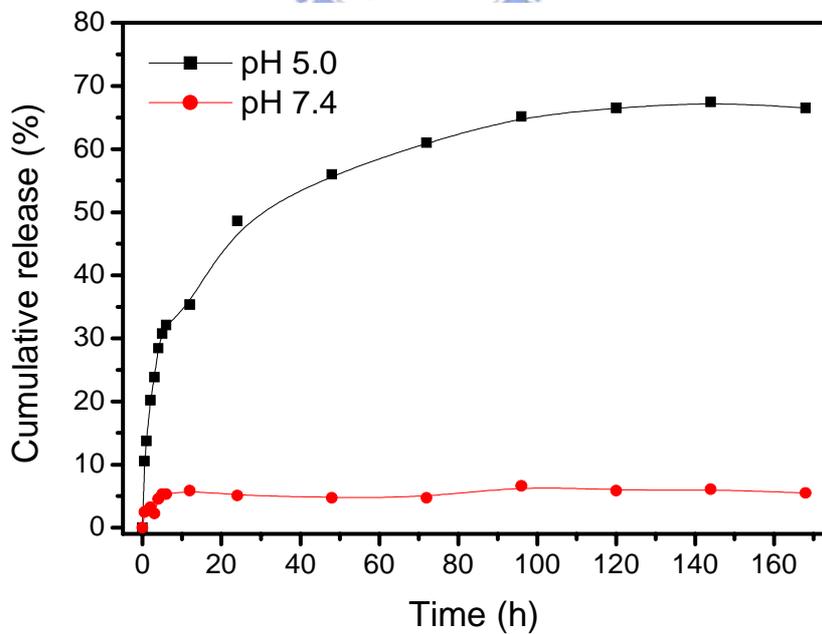


圖 4-55、G5B2 複合型藥物微胞於 pH7.4 及 pH5.0 緩衝溶液下之體外藥物釋放模擬

此外，我們進一步探討接枝/複合型藥物微胞利用其本身之 On-Off 酸鹼應答行為進行體外之藥物釋放模擬，實驗結果如圖 4-55 及圖 4-56 所示。我們可以發現無論是 G5 接枝型藥物微胞亦或是 G5B2 複合型藥物微胞於 pH5.0 之酸性環境下，微胞之結構皆處於開(On)的狀態，二者皆有穩定的藥物釋放速率，而一旦將環境中之酸鹼值調至 pH7.4，微胞之結構皆處於關(Off)的狀態，此時便不再釋放藥物，藥物釋放速率便快速的下降。而由圖可知，於 pH7.4 時，按照常理，藥物釋放量應該處於持平(不變)而非下降的狀態，推測是因為當我們將緩衝溶液由 pH5.0 滴定至 pH7.4 時，藥物微胞由原本膨潤的結構慢慢地收縮而將環境中的疏水藥物再次地包覆於疏水內核(因 DOX 為疏水性藥物，且其溶解度在 pH7.4 時之水相環境中較差，故較傾向於疏水之環境)，而此情形不論是 G5 接枝型藥物微胞亦或是 G5B2 複合型藥物微胞皆為如此。

我們進一步探討接枝/複合型藥物微胞之差異性，由圖可知，G5 藥物微胞在本研究有較高的藥物釋放量(相較於先前接枝/複合型藥物微胞之體外藥物釋放模擬研究，二者之藥物釋放量並無多大的差別)，推測由於 G5B2 藥物微胞之外殼有 mPEG 存在，在酸性環境下，會與接枝共聚物主鏈上之 NVI 產生強烈的氫鍵作用力而貼附於微胞表面，進一步地影響微胞的膨潤效果，在一般的藥物釋放模擬實驗下看不出此效應對於藥物釋放之影響情形，而由於 On-Off 反覆地改變微胞之結構，造成結構過於混亂，使得藥物於釋放初期無法穩定釋放，進而影響後續之釋放量。綜觀上述，本研究所設計之藥物載體確實具有 On-Off 酸鹼應答之藥物釋放功能。

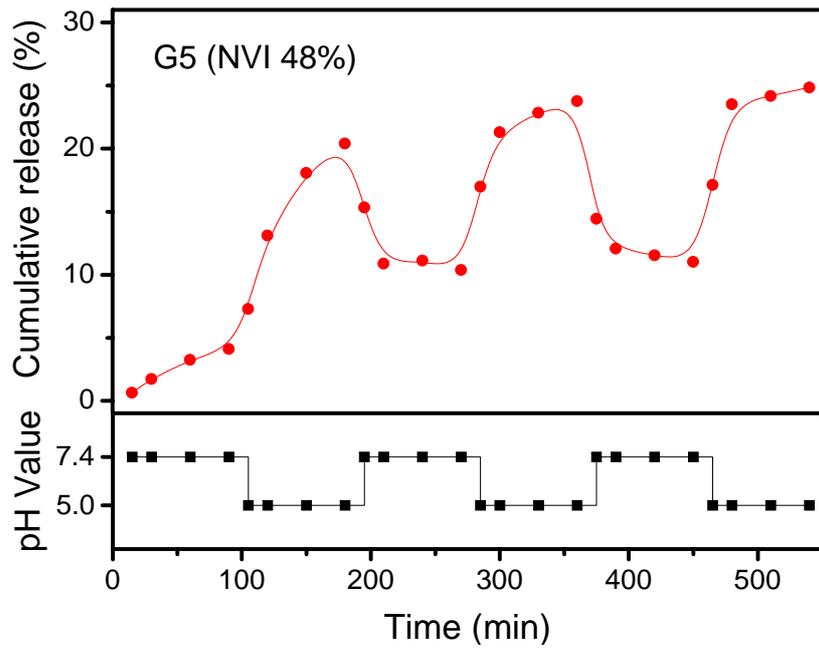


圖 4-56、G5 接枝型奈米微胞在不同 pH 值下之體外藥 On-Off 釋放行為

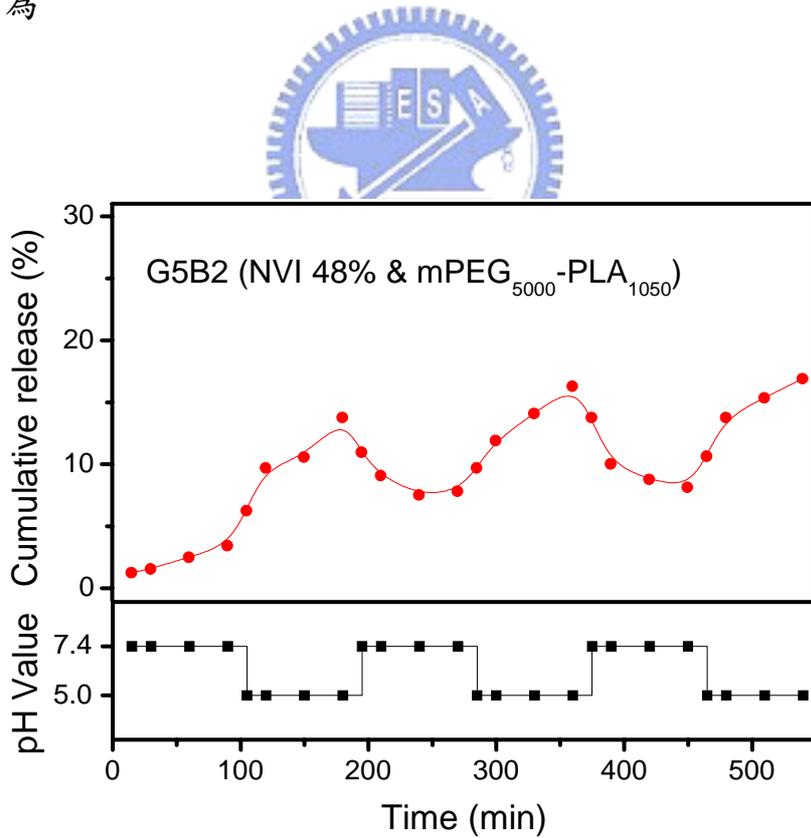


圖 4-57、G5B2 複合型奈米微胞在不同 pH 值下之體外藥物 On-Off 釋放行為

#### 4-12、接枝/複合型奈米微胞之安定性分析

為了探討接枝/複合型奈米微胞經靜脈注射後於血液中循環時之穩定度，我們先取冷凍乾燥之接枝/複合型奈米微胞溶解於兩倍濃度 PBS 緩衝溶液(2mg/mL)，而後加入等體積之牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液(8 wt.%)，均勻混合後，製備出 4wt 之 BSA/PBS 緩衝溶液，以模擬微胞於體內循環之環境【99-100】。於 37°C 不同時間下，利用動態光散射儀觀察接枝/複合型奈米微胞之穩定度(粒徑大小及粒徑分佈)，並將微胞溶解於不含 BSA 之 PBS 緩衝溶液作為對照組觀察兩者之間的差異性。

實驗結果如圖 4-57 所示，G5 接枝型奈米微胞可於 BSA/PBS 緩衝溶液下穩定存在 48hr(即至少可於人體血液內循環 48hr)，而後即與 BSA 產生聚集，這是由於隨著時間的增長，G5 外殼之 NVI 會與環境中少數的氫離子產生鍵結並帶微弱正電性，而表面帶有負電性之 BSA 蛋白質分子(粒徑大小約 10nm)將會快速地累積貼附於微胞表面，此結果將進一步地造成微胞間彼此的聚集，使得粒徑瞬間攀升。而 G5B2 複合型奈米微胞由於微胞表面有 mPEG 的遮蔽作用，使得 G5B2 複合型奈米微胞可於 BSA/PBS 緩衝溶液下穩定存在 96hr(即至少可於人體血液內循環 96hr)，而 mPEG 之所以有遮蔽作用是因為 mPEG 位於複合型奈米微胞之外殼，其表面帶有弱負電性(由上述介面電位分析之實驗可知)，可隱蔽 NVI 之弱正電性，且由於其本身高分子鏈段之剛硬性，可有效地排開 BSA 之吸附。綜合上述結果，我們可得知 G5B2 複合型奈米微胞有較高的穩定度，藉由靜脈注射後於血液中至少可穩定循環四天，而藥物載體欲

藉由 EPR 效應累積於腫瘤組織內，四天的時間可說是綽綽有餘。

另外，我們觀察接枝/複合型奈米微胞於單純之 PBS 緩衝溶液下之穩定性，發現隨著時間的增長，奈米微胞之粒徑大小及分佈幾乎不會改變，可說是非常地穩定，故可推測，上述之實驗結果確實為奈米微胞與帶有微小體積之 BSA 產生聚集，而非奈米微胞本身因結構的不穩定而自我聚集。

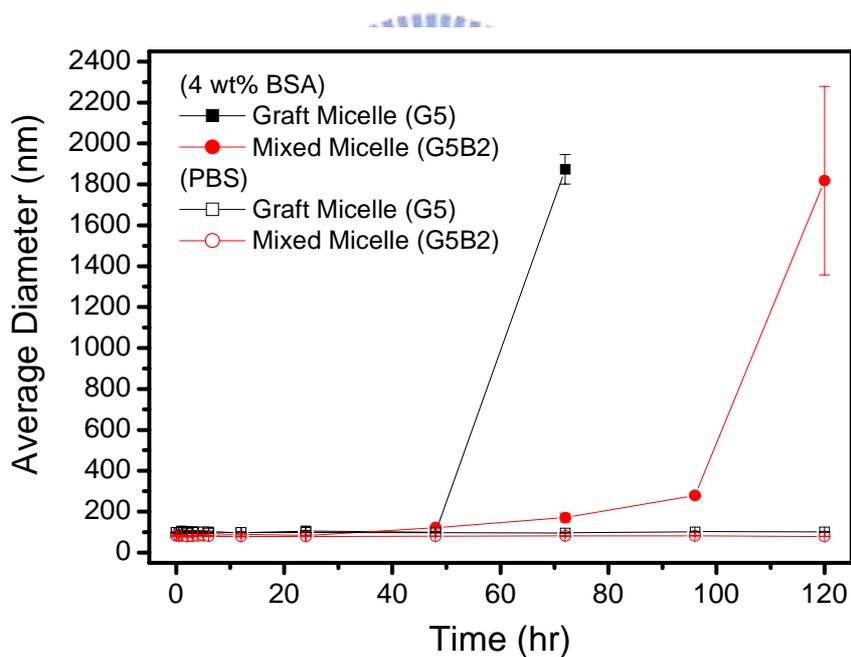


圖 4-58、接枝/複合型奈米微胞於 4wt % BSA/PBS 緩衝溶液與 PBS 緩衝溶液內之穩定性測試

#### 4-13、接枝/複合型奈米微胞之體外細胞毒殺測試

為了區分本研究製備之藥物載體於體內循環時是否會對正常細胞造成不必要的毒殺性，茲將未含藥物之 G5 接枝型奈米微胞與 G5B2 複合型奈米微胞分別配製成不同濃度之 DMEM 培養基溶液，進而與人類纖維母細胞(Hs68)共同培養。

實驗結果如圖 4-58 及圖 4-59 所示，G5B2 複合型奈米微胞造成之正常細胞毒殺效果皆比 G5 接枝型奈米微胞小，這是由於複合型奈米微胞表面之 mPEG 可降低內核 NVI 之正電性與毒性，於 24 小時的培養下，G5B2 複合型奈米微胞即使在高劑量的載體濃度下亦有將近 80% 的細胞存活率，而 G5 接枝型奈米微胞僅有將近 50% 之細胞存活率。而由 72 小時之實驗曲線可知，G5B2 複合型奈米微胞與 G5 接枝型奈米微胞之  $IC_{50}$  (定義為將 50% 的總細胞數毒殺之濃度) 分別約為 2150 $\mu$ g/mL 及 710 $\mu$ g/mL，二者差了 3 倍之多，可見 G5B2 複合型奈米微胞確實有達到原本預期之遮蔽與保護效果，明顯降低接枝共聚物主鏈 NVI 所造成之正電毒殺性。

由上述實驗結果與上一節討論之安定性分析可知，G5B2 複合型奈米微胞有較穩定的體內循環時間與較低的正常細胞毒殺性，可藉由 mPEG 之表面弱負電性及遮蔽效應避免血液中蛋白質吸附及內質網系統捕抓且降低對於正常細胞之毒性，這對於經靜脈注射藉由 EPR 效應累積於腫瘤組織之化學癌症治療而言非常重要，待藥物載體累積於腫瘤組織，即可藉由本身之 On-Off 酸鹼應答行為進行毒殺。接下來，我們將探討本研究製備之藥物載體對於不同種類之癌細胞之毒殺情形。

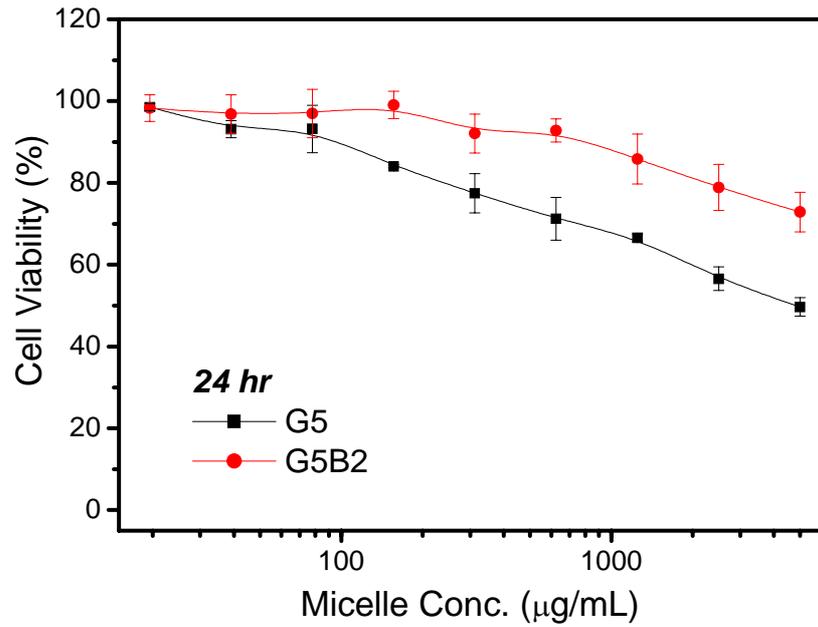


圖 4-59、接枝/複合型奈米微胞於不同濃度下對 Hs68 cell 作用 24 小時後之生長抑制情形(n=6)

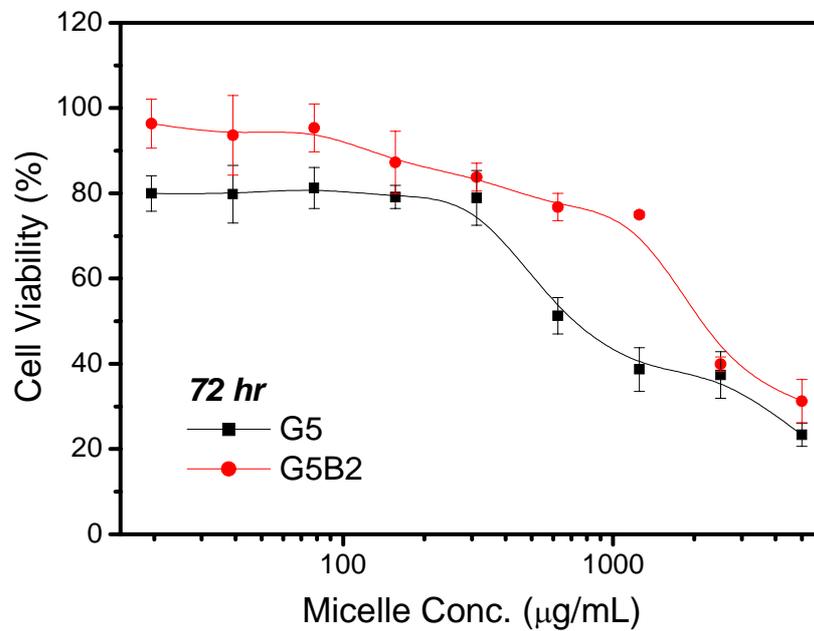


圖 4-60、接枝/複合型奈米微胞於不同濃度下對 Hs68 cell 作用 72 小時後之生長抑制情形(n=6)

為了了解 G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞對於癌細胞生長的抑制效果以及對癌細胞之毒殺能力，我們以 doxorubicin hydrochloride (Dox·HCl) 為對照組，將冷凍乾燥後之藥物微胞與 Dox·HCl 分別依不同劑量溶解於 MEM 培養基內，與細胞數為  $2 \times 10^4$  之 HeLa 細胞共同培養以觀察在不同時間下 HeLa 細胞之存活情形。

藥物載體與 HeLa 細胞培養 24 小時後之實驗結果如圖 4-60 所示，由圖可知，Dox·HCl 對於 HeLa 細胞有較高之毒殺能力，其  $IC_{50}$  約為  $0.94 \mu\text{g/mL}$ ，而 G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞之  $IC_{50}$  則分別為  $2.95 \mu\text{g/mL}$  與  $1.52 \mu\text{g/mL}$ 。值得一提的是，在此濃度下，未負載藥物之單純載體對於正常細胞幾乎沒有任何毒殺性可言，可見造成癌細胞死亡之主因是由抗藥藥物所造成而非載體本身。而 DOX 與藥物載體毒殺之差異性是由於小分子 Dox·HCl 可藉由擴散機制穿透細胞膜並進一步擴散至細胞核毒殺癌細胞，因此作用速度較快，故有較高的毒殺效果；而 G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞則是藉由胞飲作用 (endocytosis) 進入細胞，於 endosomal compartments 或 lysosomal compartments 內藉由 proton sponge 造成環境酸化而使藥物微胞結構膨潤後將藥物釋放。我們進一步對照先前於 pH5.0 下之藥物釋放結果，G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞之藥物釋放量約達總包覆量之 49.3 % 與 48.6 %。相較於 Dox·HCl，載體所釋放之 Dox 對癌細胞之作用劑量較低，因而其細胞毒殺能力較差。另一方面，由於 G5 接枝型藥物微胞之外殼於酸性環境下帶有強正電性，推測其在接近癌細胞時即對細胞膜造成某些程度上

的傷害而較不易進入細胞內，反之，G5B2 複合型藥物微胞由於有 mPEG 的隱蔽效果可有效遮蔽正電荷，因此較易藉由胞飲作用達到細胞內藥物釋放之毒殺機制。

藥物載體與 HeLa 細胞培養 72 小時後之實驗結果如圖 4-61 所示，由圖可知，Dox·HCl 對於 HeLa 細胞同樣有較高的毒殺能力，其  $IC_{50}$  約為  $0.35 \mu\text{g/mL}$ ，而 G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞之  $IC_{50}$  皆約為  $0.93 \mu\text{g/mL}$ ，對照藥物釋放曲線關係圖，可說明藥物載體對於癌細胞的毒殺皆來自於 DOX 的毒性所致。而在 72 小時長時間的培養下，G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞造成之毒殺效果差異減小，且相當接近於較近於 Dox·HCl 之毒殺效果，推測為包覆於藥物載體內之 Dox 於 72 小時長時間下可得到穩定的釋放(分別有 59.8%及 61%之釋放率)，對照細胞存活率與材料毒性實驗，可進一步地證實細胞毒殺確實為抗癌藥物所造成。

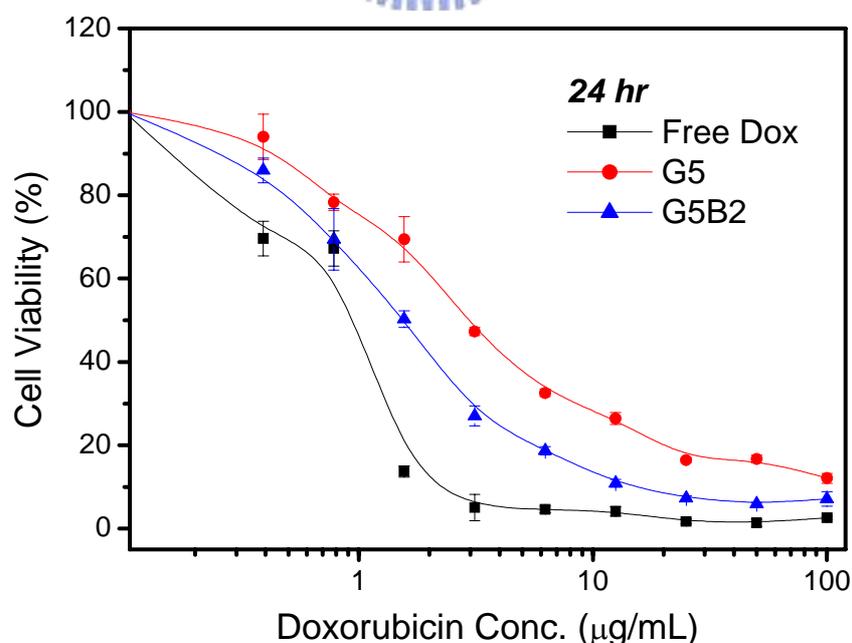


圖 4-61、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HeLa cell 作用 24 小時後之生長抑制情形(n=6)

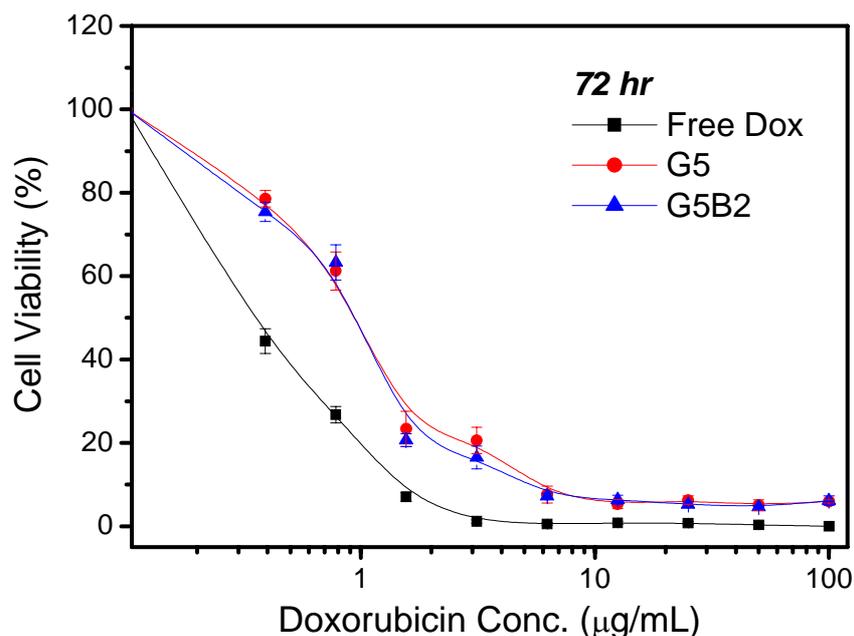


圖 4-62、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HeLa cell 作用 72 小時後之生長抑制情形 (n=6)

除了針對 HeLa 細胞之毒殺測試外，我們亦取 G5 接枝型藥物微胞及 G5B2 複合型藥物微胞與人類肝癌細胞 HepG2 共同培養，同樣以 Dox·HCl 為對照組進行細胞毒性測試。由文獻可知，肝癌細胞對於化學治療之抵抗力較強【101】，Dox 與一般常用之抗癌藥物對於肝癌僅有 10~15%之療效。與藥物載體培養 24 小時之實驗結果如圖 4-62 所示，由圖可知，我們可發現 HepG2 細胞之毒殺效果與 HeLa 細胞有非常明顯的差別，G5B2 複合型藥物微胞即使在高劑量之藥物濃度培養下，亦有約 80%之細胞存活率，而 G5 接枝型藥物微胞之  $IC_{50}$  則約為 6  $\mu\text{g/mL}$ ，造成此差異結果是因為 G5 接枝型藥物微胞因表面帶有正電性易被癌細胞吸附，造成額外的細胞毒性。而 Dox·HCl 對 HepG2 細胞毒殺之  $IC_{50}$  則約為 0.77  $\mu\text{g/mL}$ ，對照 Dox·HCl

與 HeLa 細胞共同培養 24 小時的毒殺結果可知兩者  $IC_{50}$  相當接近。我們由此可知，小分子抗癌藥物之擴散機制皆可快速且有效地對癌細胞進行毒殺，而不同癌細胞的胞飲行為以及其對藥物載體的抵抗性亦會影響最後的毒殺效果。

圖 4-63 為藥物載體對 HepG2 細胞作用 72 小時後的毒殺曲線，由圖可知，Dox·HCl、G5B2 複合型藥物微胞、G5 接枝型藥物微胞的  $IC_{50}$  分別為  $0.49 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.58 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.78 \mu\text{g/mL}$ ，可發現 G5B2 複合型藥物微胞有較接近於單純藥物的毒殺效果。但在較高的藥物濃度作用下，即可區分藥物載體與 Dox·HCl 之間的差別，利用擴散機制毒殺癌細胞的小分子藥物還是比藥物載體有效率，但相對的卻會造成正常細胞更嚴重的負面毒殺效果。另外，我們可發現不論是藥物載體亦或是小分子藥物皆僅能對 HepG2 細胞造成一定程度以內的傷害（接枝/複合型藥物微胞造成之毒殺僅約 60%；Dox·HCl 則約 80%），即使再提高藥物劑量，毒殺效果仍不見起色。這是因為 HepG2 細胞有較高的抗藥性以及堆疊的生長特性，抗癌藥物僅能毒殺生長於上層的 HepG2 細胞，而無法與生長於內層的其餘細胞作用。

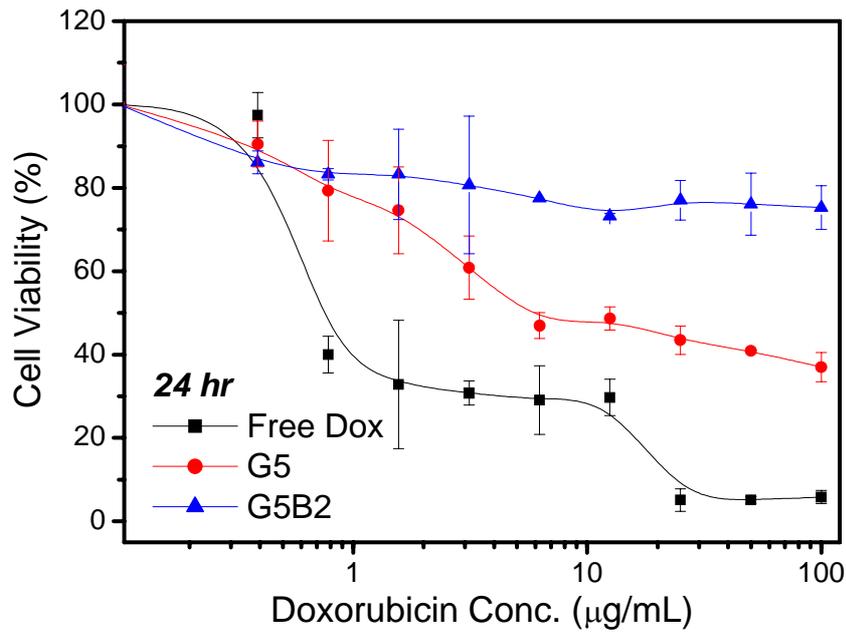


圖 4-63、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HepG2 cell 作用 24 小時後之生長抑制情形 (n=6)

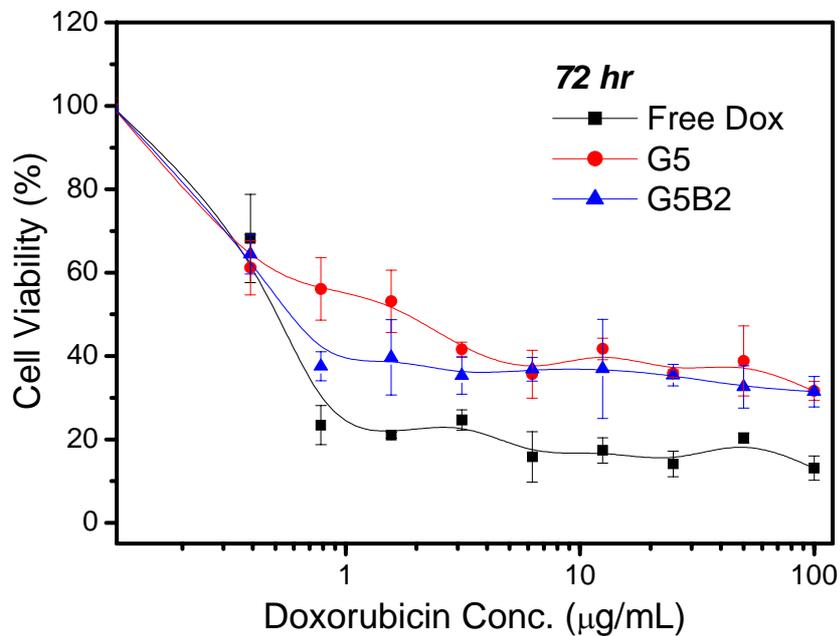


圖 4-64、DOX 與藥物微胞於不同濃度下對 HepG2 cell 作用 72 小時後之生長抑制情形 (n=6)

#### 4-15、接枝/複合型奈米微胞之細胞內藥物釋放及分佈測試

本研究為了觀察接枝/複合型藥物微胞對於癌細胞吞噬後之細胞內分佈情形，將製備好的樣品以共軛焦顯微鏡作為觀察之工具。雷射掃描共軛焦顯微鏡(confocal laser scanning microscope)之原理為當激發雷射光聚焦於樣品之斷層面或稱為聚焦面(focus plane)時，我們可利用調整光學針孔光圈(pinhole)的大小蒐集來自樣品聚焦平面的激發螢光，再將非同一聚焦面的激發螢光排除於光學針孔光圈外，即可行成所謂的共軛焦距影像(confocal Image)，故以一般雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察所得之圖像皆為 2D 影像。除此之外更可利用激發雷射光對樣品做光學切片式的斷層掃描，而後將所得影像經處理並重新排列後可得到一個完整的 3D 影像【102】。一般顯微鏡下所觀察的影像有來自聚焦面(Focal plane)及非聚焦面(out-of focal plane)的光，因此所提供的影像品質解析較差，無法層層的深入樣品作顯微觀察；而共軛焦技術能夠去除傳統顯微鏡影像的迷光(stray light)可提供更高的光學解析影像。

我們將接枝/複合型藥物微胞及抗癌藥物 Dox·HCl 分別與 HeLa 細胞共同培養，於不同時間點下觀察 Dox·HCl 位於 485 nm 及 590 nm 之激發光波長與放射光波長；另外以 LysoTracker 作為染劑(LysoTracker 可與細胞內之酸性胞器作用)，其激發光波長與放射光波長則分別為 504 nm 及 511nm。觀察所得之掃描影像並經重疊後可判斷接枝/複合型藥物微胞與 doxorubicin 在細胞內的釋放與分佈情形。

圖 4-64 為 DOX·HCl 分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時與 9 小時之分佈情形，綠色螢光為染劑 LysoTracker 分佈於細胞內酸性胞器的位置(a);紅色螢光為 DOX 的分佈(b);而圖 4-64(c) 則為酸性胞器與抗癌藥物分佈的重疊影像。由圖可知，於 1 小時的作用時間下，大部分的抗癌藥物皆藉由擴散作用進入細胞質內並分佈於細胞核周圍，僅有少部份的藥物能進入細胞核。而由於使用的抗癌藥物帶有 HCl 的關係，可酸化 DOX 所處環境，故可進一步確認此時抗癌藥物尚未進入細胞核內(因細胞核內並無明顯的紅色螢光與綠色螢光)。隨著 DOX·HCl 與 HeLa 細胞作用時間的增加，我們可發現，發出紅色螢光的抗癌藥物已大量地累積於細胞核內，而由於 HCl 酸化的關係，使得細胞核內亦分佈著 LysoTracker 的綠色螢光。另外於 24 小時的培養下，由於細胞絕大部分皆已凋亡，故無法於顯微鏡下觀察藥物分佈情形。



圖 4-65 為 G5 接枝型藥物微胞分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時、3 小時及 24 小時之共軛焦顯微鏡影像，在培養 1 小時後，藥物載體可藉由胞飲作用進入細胞質的溶酶體內進行藥物釋放。而由圖可知，此時僅有非常少量的抗癌藥物分佈於細胞質並與 LysoTracker 所處位置重疊，故推測此時藥物載體處於初步酸化且抗癌藥物分佈於溶酶體周遭。相較於 3 小時的培養，可發現抗癌藥物的釋放量於此時已漸漸提高，並藉由擴散作用分佈於細胞質而另有少部份被細胞核吸收。值得一提的是，我們觀察影像中 HeLa 細胞的型態可發現與平常培養時不同，推論為 G5 接枝型藥物微胞表面帶有正電的 NVI 外殼造成載體在未進入癌細胞之前有額外的正電毒殺效果【103】，進一

步使載體無法經由 endocytosis 於溶酶體內進行藥物釋放。而藥物載體與 HeLa 細胞作用 24 小時後抗癌藥物已大量地累積於細胞核內，且影像中可看出有少部分經由細胞核破裂及細胞凋亡過程產生的小碎片(凋亡小體)。

圖 4-66 為 G5B2 複合型藥物微胞分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時、3 小時及 24 小時後之共軛焦顯微鏡影像，由於 G5B2 複合型藥物微胞之外殼 mPEG 帶有弱負電性可中和 NVI 的正電性以及具有遮蔽疏水內核的能力，使其更容易被癌細胞吞噬並藉由胞飲作用進行酸鹼應答的藥物釋放。故於釋放初期(1 小時及 3 小時)，發現 G5B2 複合型藥物微胞有較 G5 接枝型藥物微胞高的釋放效果(紅色螢光的強度較高)。而培養 3 小時後，我們可發現抗癌藥物不僅均勻地分佈在細胞質，有些甚至已經進入細胞核內(可由 LysoTracker 綠色螢光的分佈與 DOX 紅色螢光的分佈清楚分辨)。隨著作用時間的增加，24 小時後可發現 DOX 的紅色螢光不但提高且大部分皆集中於細胞核內。除此之外，亦發現細胞質內仍有抗癌藥物的紅色螢光，推測藥物載體仍持續地釋放藥物。

綜合上述，我們再搭配藥物釋放、微胞穩定性以及細胞毒殺等實驗可知，雖然 G5B2 複合型藥物微胞的膨潤效果較差(約差 0.8 %)且藥物釋放量稍低(約差 2.4%)，但 G5B2 複合型藥物微胞具有較高的穩定性與安定性可於血液長時間地循環，且較容易藉由胞飲作用進入細胞進行藥物釋放，故 G5B2 複合型藥物微胞有較低的細胞毒殺存活率。所以具有高度穩定性及既快速又準確的釋放機制實為設計一藥物載體的首要條件。

1 h

9 h

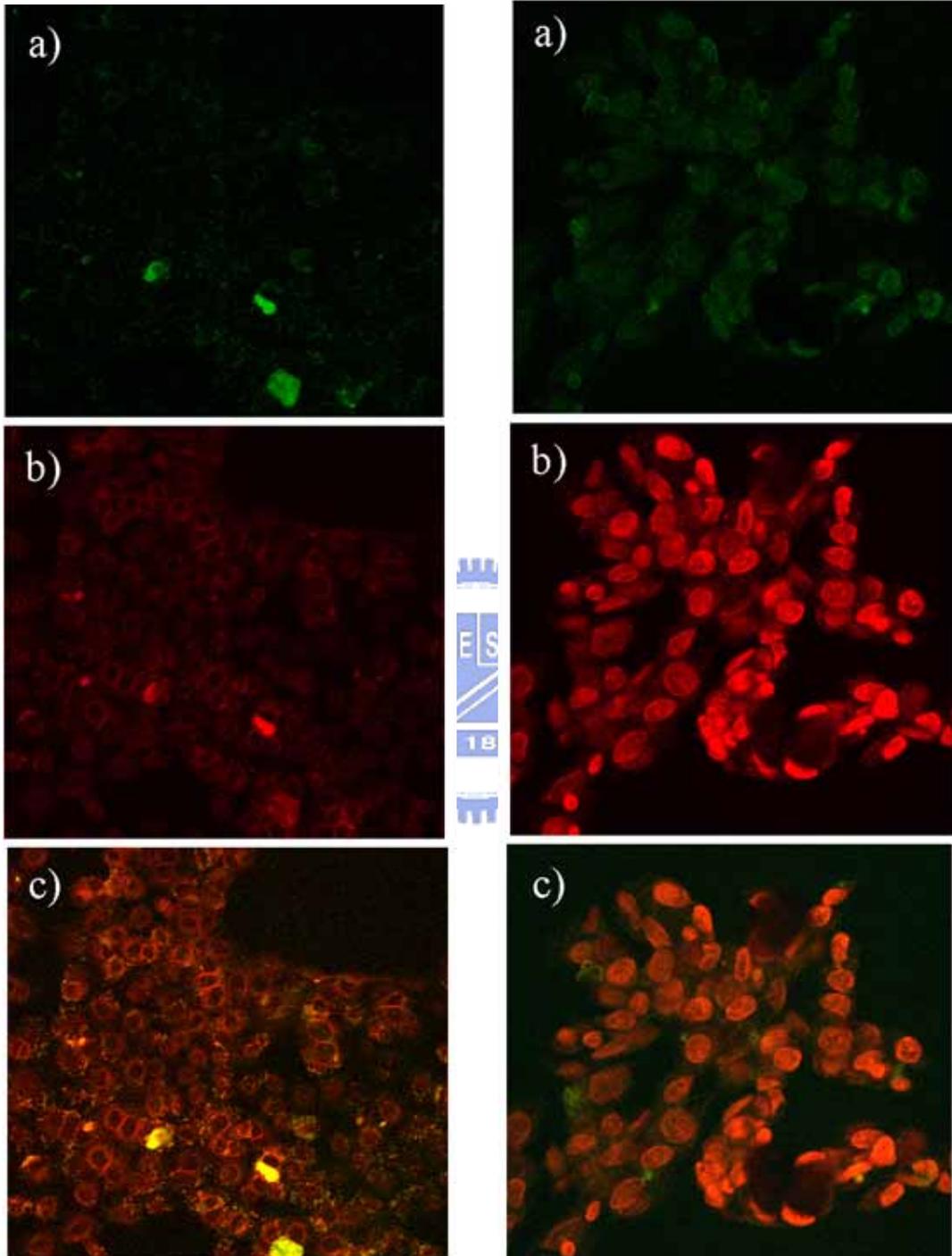


圖 4-65、抗癌藥物 doxorubicin 與 HeLa 細胞共同培養 1 小時及 9 小時後之共軛焦顯微鏡影像。(a) LysoTracker 染色之酸性環境 (b) 藥物 doxorubicin (c) (a)與(b)重疊後之影像

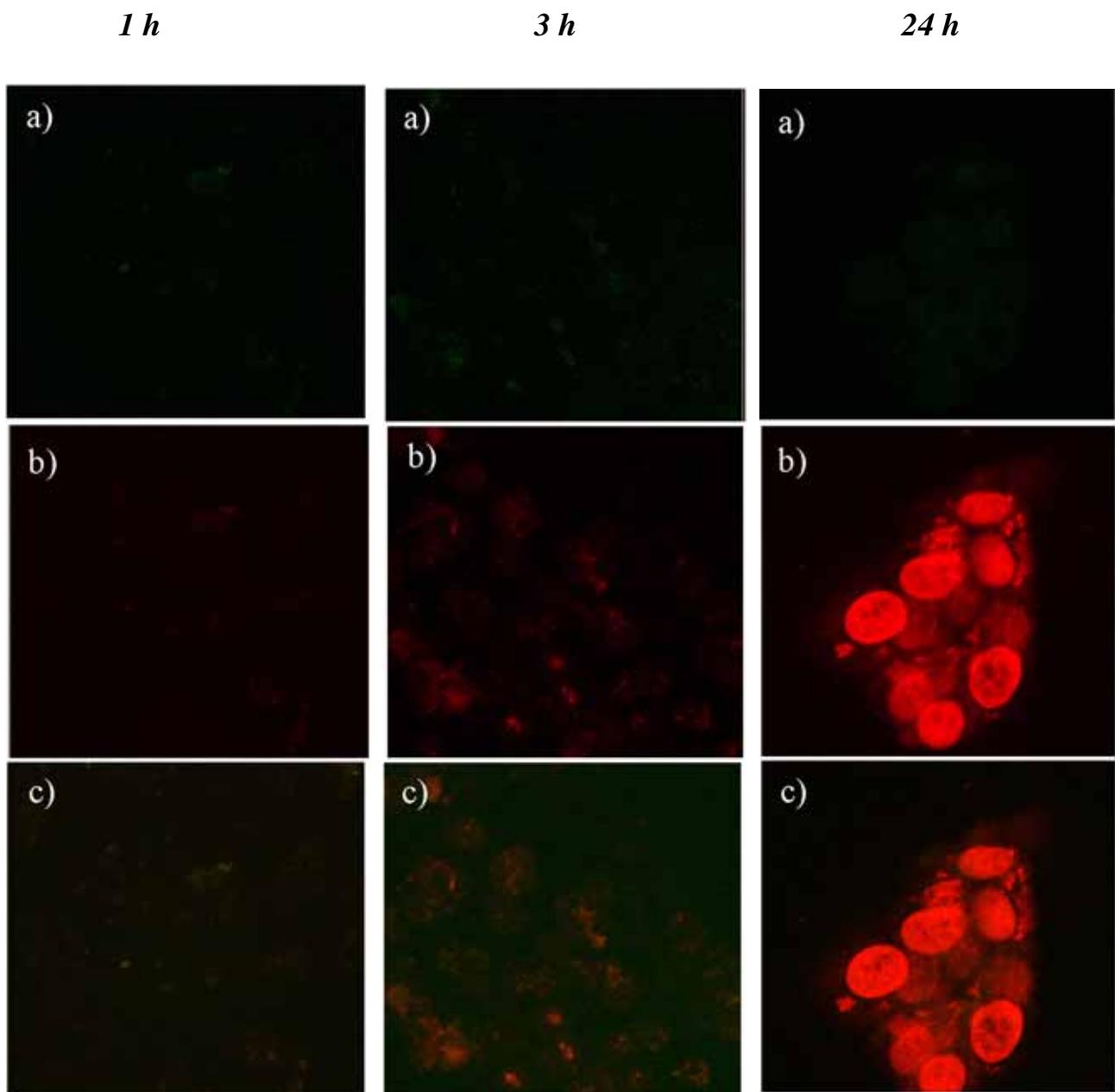


圖 4-66、G5 接枝型藥物微胞分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時、3 小時及 24 小時後之共軛焦顯微鏡影像。  
 (a) LysoTracker 染色之酸性環境 (b) 藥物 doxorubicin  
 (c) (a) 與 (b) 重疊後之影像

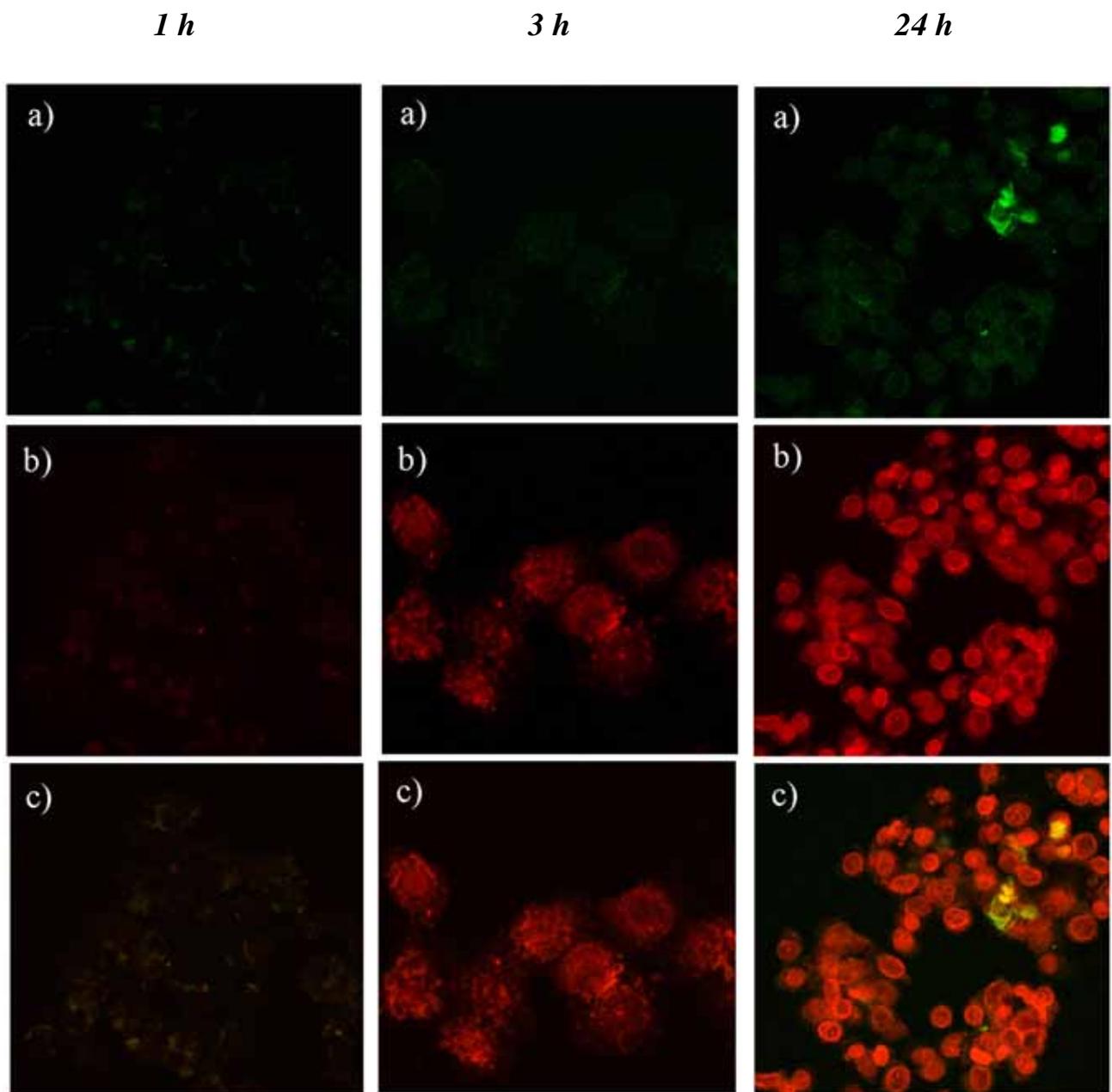


圖 4-67、G5B2 複合型藥物微胞分別與 HeLa 細胞共同培養 1 小時、3 小時及 24 小時後之共軛焦顯微鏡影像。  
 (a) LysoTracker 染色之酸性環境 (b) 藥物 doxorubicin  
 (c) (a)與(b)重疊後之影像

## 第五章、結論

本研究係利用具有酸鹼應答、生物相容性及生物可降解性之接枝共聚物 Poly(*D,L*-lactide)-*g*-Poly(*N*-vinylimidazole-co-*N*-vinyl-2-pyrrolidone)(PLA-*g*-P(NVI-co-NVP))，與具有免疫隱蔽性及生物可降解性之二團聯共聚物 methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*D,L*-lactide)(mPEG-PLA)，設計出一同時具有環境酸鹼應答行為、可逆開關行為及免疫隱蔽性之複合型高分子奈米微胞。mPEG 可隱蔽內核結構的強正電性與疏水特性進而增加於體內循環之穩定性與細胞吞噬量；而 NVI 可藉由其酸鹼應答行為，待藥物載體被細胞吞噬後，可藉由正電排斥力造成結構的膨潤進而釋放藥物；PLA 則具有包覆輸水抗癌藥物的能力。研究中對 mPEG-PLA 及 PLA-*g*-P(NVI-co-NVP)之合成與性質、臨界微胞濃度(CMC)、奈米微胞之製備、複合型奈米微胞之形成機制、酸鹼開關行為、微胞型態之分析、體外藥物釋放模擬、材料毒性、細胞毒殺分析與內吞作用進行探討並得到以下結論：

1. 利用陽離子開環聚合反應可以合成分子量準確且分子量分佈狹窄的巨單體 PLA-HEMA，再將 PLA-HEMA 與 NVI 及 NVP 單體藉由自由基共聚合反應可合成出結構明確之接枝共聚物 PLA-*g*-P(NIPAAm-co-MAAc)。經由  $^1\text{H-NMR}$  與 FT-IR 之分析，可確定成功地合成出不同主鏈組成比之 G0、G1、G2、G3、G4、G5 接枝共聚物，且主鏈與側鏈之總分子量約為 5:3 時，奈米微胞有較小的粒徑大小與較窄的粒徑分佈。
2. PLA-*g*-P(NVI-co-NVP) 的重量平均分子量因為 PLA 導入

P(NVI-co-NVP)後性質差異太大，與層析管柱作用力不同，因此 PLA-g-P(NVI-co-NVP)之分子量須以  $^1\text{H-NMR}$  計算得知。

3. 利用 methoxy poly(ethylene glycol) 為巨單體進行 *D,L*-lactide 之陽離子開環聚合反應可以成功地合成出 mPEG-PLA，且經由  $^1\text{H-NMR}$ 、FT-IR 與 GPC 之鑑定，可確定成功地合成出三種不同鏈段比之 B1、B2、B3 二團連共聚物。
4. 經由臨界微胞濃度 (CMC) 之鑑定可發現，降低雙性共聚物親水端之親水作用力，可稍微地降低 CMC (NVI 組成比提高，CMC 降低)；提高雙性共聚物疏水端之疏水作用力，可明顯地降低 CMC (PLA 分子量變大，CMC 變小)。接枝共聚物之 CMC 大抵上皆較二團聯共聚物低，這是因為 PLA 接於其側鏈，造成共聚物本身之活動性降低使得聚集力變強，且因為接枝型共聚物之 PLA 鏈段皆較二團聯共聚物長，接枝密度亦較高，故其有較強之疏水作用力，即聚集力較強之故。
5. 由奈米微胞形成機制之探討可知，微胞在形成過程中包含三個主要步驟，而此三步驟之轉換對於微胞形成與藥物包覆具有非常重要之影響：(1) 高分子於溶液中由自由捲曲狀逐漸形成微胞前趨體膨潤結構。(2) 微胞前趨體膨潤結構排除核內有機溶劑轉變為緊密結構。(3) 隨著水含量的增加，微胞由緊密結構逐漸固化。
6. 由初期水含量對於奈米微胞透析結果之探討可知，G0、G3、G5 接枝型奈米微胞分別於 5%、10%、10% 之初期水含量下可得到較混亂的微胞型態，並於此初期水含量下進行藥物包覆實驗，可得到較大的藥物包覆量；而又分別皆於 20% 之初期水含

量下可得到最佳的粒徑大小與分佈(平均粒徑皆約為 80 nm ; 粒徑分佈則皆小於 0.1)。

7. 由動態光散射儀與介面電位分析儀之測試可知複合型奈米微胞確實成功地被製備出來，其中，B2 及 B3 二團聯共聚物之疏水端 PLA 皆比 B1 二團聯共聚物長，故可與 G0、G3、G5 等接枝共聚物形成粒徑大小與粒徑分佈較佳的複合型奈米微胞。而接枝共聚物與二團聯共聚物之重量比為 1 : 1 時又可得到較小的粒徑大小與較窄的粒徑分佈。即 G0B2、G0B3、G3B2、G3B3、G5B2 以及 G5B3 等組合皆可得到結構較穩定的複合型奈米微胞。
8. 接枝/複合型奈米微胞經由動態光散射儀可確定其粒徑大小與分佈情形；藉由 AFM 影像分析，可確認微胞之球型結構與表面型態；藉由 TEM 影像分析，更可證明其殼核結構確實存在。
9. 由接枝/複合型奈米微胞之酸鹼應答行為分析可知，主鏈具有 48% NVI 之 G5 接枝型奈米微胞有較高的膨潤情形，於酸性環境下，其結構可膨潤約 48.7%。而 G5B2 複合型奈米微胞之酸鹼應答行為又比 G5B3 複合型奈米微胞佳(G5B2 複合型奈米微胞之膨潤比為 47.9%；G5B3 則為 37.1%)，因 B3 二團聯共聚物之 PLA 分子量為 1750，雖可大大地穩定奈米微胞的結構，但卻遏止了其膨潤效果。
10. 而由 On-Off 酸鹼應答行為分析可知，不論是 G3、G5 接枝型奈米微胞亦或是 G3B2、G5B2 複合型奈米微胞於長時間高分子鏈有足夠的反應時間進行重新組裝的前提之下，皆有穩定的 On-Off 行為，微胞的粒徑大小皆隨著 pH 值的變化而做膨潤與

收縮的改變，粒徑分佈卻不會隨著 On-Off 次數增加而變雜亂。另外於短時間的快速 On-Off 酸鹼應答行為測試，發現僅有 G5 接枝型奈米微胞與 G5B2 複合型奈米微胞有穩定的 On-Off 酸鹼應答行為。

11. 由 On-Off 酸鹼應答之 TEM 影像可知，pH 值降低會使位於微胞外殼的 NVI 因酸化造成正電排斥力，進而使微胞變得較為混亂但仍為一球型結構；而 pH 值一旦又回復為中性時，微胞又會重組回殼核結構，但結構較原先稍為混亂，但整體仍不失為一個具有良好 On-Off 酸鹼應答性質的奈米微胞。
12. 於相同的製備條件下，接枝型藥物微胞之藥物包覆量以 G5 接枝型藥物微胞較高，高達 42.3%；G3 接枝型藥物微胞雖較低，但也有 36.9% 之藥物包覆率，缺點是其粒徑分佈過於雜亂，故予以淘汰。而 G5B2 複合型藥物微胞可用較少的藥物劑量卻達到相同劑量下較高的包覆率。
13. 比較接枝/複合型藥物微胞之藥物釋放效果，於 pH5.0 時兩者並無明顯差別，且於釋放 24 小時後，皆可達到將近 50% 的藥物釋放量；而於 pH7.4 時兩者差別相當明顯，G5B2 複合型藥物微胞由於表面具有 mPEG 之穩定與遮蔽作用，故可於中性環境下穩定包覆藥物，釋放量僅約 5%，而 G5 接枝型藥物微胞卻有 10% 的藥物損失。另外在不斷地改變 pH 值的條件之下，接枝/複合型藥物微胞仍具有 On-Off 酸鹼應答的藥物釋放行為。
14. 以牛血清蛋白(BSA)進行載體穩定性測試，實驗結果發現由於接枝型奈米微胞於中性環境下表面帶有弱正電，因此較易與表

面帶負電的蛋白質互相吸引，進而造成蛋白質與疏水內核因疏水作用力的關係造成大量的聚集，其穩定性僅維持 48 小時。而複合型奈米微胞由於有 mPEG 的隱蔽作用，穩定性可持續 96 小時之久。

15. 將單純的接枝/複合型奈米微胞與人類纖維母細胞(Hs68)共同培養，發現複合型奈米微胞有較低的材料毒性(即較高的生物相容性)，且於 72 小時的培養下，其  $IC_{50}$  僅為接枝型奈米微胞的三分子一。由此可知，複合型奈米微胞外殼的 mPEG 確實能夠隱蔽內核 NVI 的正電性，大大地提高載體實際應用於動物實驗上的學術價值。
16. 由接枝/複合型藥物微胞對於 HeLa 細胞與 HepG2 細胞之毒殺結果可知，G5 接枝型藥物微胞與 G5B2 複合型藥物微胞皆對癌細胞有良好的生長抑制能力，而又以 G5B2 複合型藥物微胞於低濃度下有較佳的毒殺效果( $IC_{50}$  較低)。就癌細胞而言，doxorubicin 對 HeLa 細胞有較佳的生長抑制效果。若排除藥物載體本身的藥物釋放率，其毒殺效果幾乎與 free DOX 沒有差別，可再次證明細胞毒殺確為 doxorubicin 所致而非載體本身造成的毒性。
17. 經由共軛焦顯微鏡影像證實接枝/複合型藥物微胞是藉由胞飲作用於酸性胞器處進行藥物釋放，意即抗癌藥物於溶酶體內釋放後再經由擴散作用累積至細胞質，而後快速進入細胞核進行毒殺。其中又以 G5B2 複合型藥物微胞較易被細胞吞噬，有較快及較佳的毒殺行為。另外，由於擴散作用比胞飲作用快，因此未經包覆的 DOX·HCl 有較強及較快的細胞毒殺能力。

綜合上述，本研究所製備之接枝/複合型奈米微胞皆具有相當均一的粒徑大小與分佈，單純就 On-Off 酸鹼應答的觀點來說，接枝型奈米微胞有較佳的表現效果，即其結構具有較明顯的環境應答可逆膨潤行為與藥物開關釋放行為。然而，一個理想的藥物傳輸載體，必須同時具備許多優點，而本研究所製備之複合型奈米微胞即同時具有快速的環境應答行為以及良好的免疫隱蔽能力。也就說此複合型藥物傳輸載體不僅可藉由靜脈注射於血液中穩定地循環，並藉由 EPR 效應大量地累積於腫瘤組織附近，而後藉由其快速的 On-Off 酸鹼應答行為進行細胞毒殺。最重要的是，細胞凋亡後，載體本身可藉由 On-Off 的特性，於中性環境下穩定地存在，待再次累積於腫瘤組織附近時，進行第二次的毒殺機制。此特性不僅可減少藥物傳輸載體對於正常細胞的毒殺機率亦可降低藥物的使用劑量，可說是一舉數得的好載體，必定可成為未來奈米藥物傳輸系統上的明日之星。

## 第六章、参考文献

1. M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, 459–476
2. Hidenori Otsuka, Yukio Nagasaki, Kazunori Kataoka, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55, 403–419
3. I. K. Park et al. *Journal of Controlled Release*, 2003, 86, 349–359
4. Yinfeng Zhuang et al, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2003, 88, 724–729
5. Dong Woo Lim et al, *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 688-695
6. G. Savin, W. Burchard, C. Luca, C. Beldie, *Macromolecules*, 2004, 37, 6565-6575
7. Belma isik, *Adv. Poly. Tech.*, 2003, 3, 246-251
8. C. Pichon, C. Goncalves, P. Midoux, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 53, 75-94
9. J. M. Bennis, J. S. Choi, R. I. Mahato, J. S. Park, S.W. Kim, *Bioconjug. Chem.*, 2000, 11, 637-645
10. P. Midoux, M. Monsigny, *Bioconjug. Chem.*, 1999, 10, 406-411
11. M. C. Jones, J. C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1999, 48, 101–111.
12. G. Riess, *Prog. Polym. Sci.*, 2003, 28, 1107–1170
13. Vladimir P. Torchilin, *J. Contr. Rel.*, 2001, 73, 137–172
14. Z. Gao, A. Eisenberg, *Macromolecules*, 1993, 26, 7353–7360.
15. F.M. Winnik, A.R. Davidson, G.K. Hamer, H. Kitano, *Macromolecules*, 1992, 25, 1876–1880.
16. G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, *Pharm. Res.*, **1993**, 10, 970–974.

17. G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, *Langmuir*, **1993**, 9, 945–949.
18. R. Nagarajan, K. Ganesh, *Macromolecules*, **1989**, 22, 4312–4325.
19. P. Alexandridis, J. F. Holzwarth, T. A. Hatton, *Macromolecules*, **1994**, 27, 2414–2425.
20. P. Alexandridis, V. Athanassiou, S. Fuluda, T. A. Hatton, *Langmuir*, **1994**, 10, 2604–2612.
21. S. Cammas, K. Suzuki, C. Sone, Y. Sakurai, K. Kataoka, T. Okano, *J. Contr. Rel.*, **1997**, 48, 157–164.
22. M. Yokoyama, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **1992**, 9, 213–248.
23. F. M. Winnik, A. R. Davidson, G. K. Hamer, H. Kitano, *Macromolecules*, **1992**, 25, 1876–1880.
24. M. Yokoyama, T. Okano, K. Kataoka, *J. Contr. Rel.*, **1994**, 32, 269–277.
25. S. B. La, T. Okano, K. Kataoka, *J. Pharm. Sci.*, **1996**, 85, 85–90.
26. J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, *J. Contr. Rel.*, **1998**, 53, 119–131.
27. M. C. Jones, J. C. Leroux, *J. Europ. Pharm. Biopharm*, 48 (1999) 101-111.
28. Younsoo Bae, Kazunori Kataoka et al, *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 122-130.
29. S. Katayose, K. Kataoka, *J. Pharm. Sci.*, **1998**, 87, 160–163.
30. L.W. Seymour, K. Kataoka, A.V. Kabanov, Cationic block copolymers as self-assembling vectors for gene delivery, in: A.V. Kabanov, L.W. Seymour, P. Felgner (Eds.), *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery. From Laboratory to Clinical Trial*, John Wiley and Sons, Chichester, **1998**, pp. 219–239.

31. K. Kataoka, H. Togawa, A. Harada, K. Yasugi, T. Matsumoto, S. Katayose, *Macromolecules*, **1996**, 29, 8556–8557.
32. M. A. Wolfert, E. H. Schacht, V. Toncheva, K. Ulrich, O. Nazarova, L. W. Seymour, *Human Gene Ther.*, **1996**, 7, 2123–2133.
33. K. Kataoka et al, *J. AM. CHEM. SOC.* 2005, 127, 2810-2811
34. L. Xing, W.L. Mattice, *Langmuir*, **1998**, 14, 4074–4080.
35. C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **1999**, 16, 1–35.
36. G. H. Hsiue et al, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 317, 69 – 75
37. Y. H. Bae et al, *Journal of Controlled Release*, 2003, 90, 363–374
38. H. Liu, Y. Chen, Z. Shen, H. Frey, *Reactive & Functional Polymers*, 2007, 67, 156 – 164
39. R. Motokawa, M. Annaka, *Macromolecules* 2005, 38, 5748-5760
40. J. R. Gomez and G. Gomez, *Brit. J. Clin. Pract.*, **1972**, 26, 33-34.
41. J. Rieger, C. Jerome et al, *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, 1506 – 1514.
42. S. R. Tonge, B. J. Tighe, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 53, 109–122
43. C. L. Lo, K. M. Lin, G. H. Hsiue, *J. Controlled Release* 2005, 104, 477
44. Y. Bae, K. Kataoka et al, *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 122-130.
45. D. W. Lim, T. G. Park et al, *Bioconjugate Chem.* 2000, 11, 688-695
46. T. Tanaka, I. Nishio, S. Sun, S. Ueno-Nishio, *Science* 1982, 218, 476–478.
47. M. Shibayama, T. Tanaka, *Adv. Polym. Sci.*, 1993, 109, 1-62.
48. T. Miyata, N. Asami, T. Urugami, *Nature*, 1999, 399, 766–769.
49. Liang-Yin Chu et al, *Journal of Membrane Science*, 192 (2001) 27–39
50. Liang-Yin Chu et al, *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, 1865 – 1872

51. P. Cai, C. Wang, J. Ye, Z. Xie, C. Wu, *Macromol.*, 2004, 37, 3438.
52. P. Sens, C. M. Marques, J. F. Joanny, *Macromolecules*, **1996**, 29, 4880-4890.
53. T. Liu, V. M. Nace, B. Chu, *Langmuir*, **1999**, 15, 3109-3117.
54. (a) Miroslav Štěpánek, Klara Podhajecka, Eva Tesarova, and Karel Prochazka, *Langmuir*, **1999**, 17, 4240-4224. (b) Miroslav Štěpánek, Klara Podhajecka, and Karel Prochazka, *Langmuir*, **1999**, 17, 4245-4250.
55. S. Dia, P. Ravi, C. Y. Leong, K. C. Tam, and L. H. Gan, *Langmuir*, **2004**, 20, 1579-1604.
56. S. Groger, D. Geschke, J. Karger, F. Stallmach, C. Konak, *Macromolecular Rapid Communications*, **2004**, 1015-1018.
57. P. Cai, C. Wang, J. Ye, Z. Xie, C. Wu, *Macromolecules*, **2004**, 37, 3438-3443.
58. W. Zhang, L. Shi, Y. An, L. Gao, B. He, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 200-204.
59. N. Kang, M. E. Perron, R. E. Prud'homme, Y. Zhang, G. Gaucher, J. C. Leroux, *Nano Letters*, **2005**, 5, 315-319.
60. I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2002**, 202, 127-133.
61. A. Harada, K. Kataoka, *Science*, **1999**, 283, 65.
62. P. Matějček, J. Humpolíčková, K. Procházka, Z. Tuzar, M. Špírková, M. Hof, S. E. Webber, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 8232-8240.
63. E. A. Lysenko, P. S. Chelushkin, T. K. Bronich, A. Eisenberg, V. A. Kabanov, A. V. Kabanov, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 12352-12359.
64. M. Štěpánek, K. Podhájecká, E. Tesařová, K. Procházka, *Langmuir*, **2001**, 17, 4240-4244.

65. K. Podhájecká, M. Štěpánek, K. Procházka, *Langmuir*, **2001**, 17, 4245-4250.
66. P. A. Sivakumar, K. Panduranga Rao, *Reactive & Functional Polymers*, **2001**, 49, 179–187.
67. T. Liu, V. M. Nace, B. Chu, *Langmuir*, **1999**, 15, 3109-3117.
68. A. Kim, M.O. Yun, Y. K. Oh, W. S. Ahn, C. K. Kim, *International Journal of Pharmaceutics*, **1999**, 180, 75–81.
69. C. Managit, S. Kawakami, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, *International Journal of Pharmaceutics*, **2003**, 266, 77–84.
70. J. Boada, M. Gallardo, M. A. Alsina, J. Estelrich, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2001**, 182, 191–198.
71. H. Takeuchi, H. Kojima, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Journal of Controlled Release*, 2001, 75, 83–91.
72. J. Guo, Q. Ping, G. Jiang, L. Huang, Y. Tong, *International Journal of Pharmaceutics*, **2003**, 260, 167–173.
73. I. Henriksen, S. R. Vågen, S. A. Sande, G. Smistad, J. Karlsen, *International Journal of Pharmaceutics*, **1997**, 146, 193-204.
74. V. A. Kabanov, A. A. Yaroslavov, *Journal of Controlled Release*, **2002**, 78, 267–271.
75. N. Gupta, A. A. Patela, R. Nassarb, Y. M. Lvovc, M. J. McShaned, J. D. Palmera, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2004**, 245, 137–142.
76. A. A. Yaroslavov, V. Ye. Klu'kov, A. A. Efimova, M. O. Ignatiev, *Thin Solid Films*, **1995**, 265, 66-70.
77. R. K. Jain, *Cancer Res.* 1987, 47, 3039.
78. R.K. Jain, *J. Controlled Release* 2001, 74, 7.
79. A. Chilkoti, R. Dreher, E. Meyer, D. Raucher, *Adv. Drug Deliv. Rev.*,

- 2002, 54, 613.
80. I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 631.
81. R. K. Jain, *J. Controlled Release* 2001, 74, 7.
82. H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release*, 2000, 65, 271.
83. R. Duncan, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999, 2, 441.
84. R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2003, 2, 347.
85. D. Putnam, J. Kopecek, *Adv. Polym. Sci.* 1994, 122, 55.
86. R. Duncan, Selective endocytosis, In V. H. Lee (ed.), *Marcel Dekker*, New York, 1986, 581.
87. C. J. T. Hoes, J. Feijen, *Makromol Chem.* 1993, 70, 119.
88. R. Gillies, J.M.J. Frechet, *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 361.
89. H. S. Yoo, E. A. Lee, T. G. Park, *J. Controlled Release* 2002, 82, 17.
90. S. H. Kim, J. H. Jeong, K. W. Chun, T. G. Park, *Langmuir* 2005, 21, 8852.
91. N. Murthy, J. Campbell, N. Fausto, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* 2003, 14(2), 412.
92. J. Kopecek et al, *J. Controlled Release*, 1990, 11, 279.
93. V. Omelyanenko, P. Kopeckova, C. Gentry, J. Kopecek, *J. Controlled Release*, 1998, 53, 25.
94. G. S. Hartley, Aqueous solutions of paraffin chain salts, Paris: Hermann, 1936
95. Kalyanasundaram K, Thomas J K, *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 2039.
96. M. Wihelm, C. L. Zhao, Y. Wang, R. Xu, M. A. Winnik, J. L. Mura,

- G. Riess, M. D. Croucher, *Macromolecules*, 1991, 24, 1033.
97. R. Nagarajan, K. Ganesh, *J. Chem. Phys.*, 1989, 90, 5843.
98. M. Tanaka, *International Congress Series*, 2005, 1285, 55–59
99. P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano, *J. Controlled Release*, 2005, 104, 313 – 321.
100. J. Park, S. Kurosawa, J. Watanabe, K. Ishihara, *Anal Chem*, 2004, 76, 2649–2655.
101. W. Y. Siu, A. Lau, T. Arooz, J. P. H. Chow, H. T. B. Ho, R.Y.C.Poon, *Mol. Cancer Ther.* 2004, 5, 621.
102. A. van Blaaderen, *Langmuir* 1992, 8, 1514-1517
103. D. Fischer, T. Kissel, et. al., *Pharmaceutical Research*, 1999, 16, 1273-1279

