201611827

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201611827 A

(43)公開日： 中華民國 105 (2016) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：103134041 (22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl.： *A61K9/113 (2006.01)* *A61K47/04 (2006.01)*
A61K47/42 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學 (中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)
新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：胡尚秀 HU, SHANGHSIU (TW) ；陳三元 CHEN, SANYUAN (TW) ；賴彥合 LAI, YENHO (TW)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：20 共 67 頁

(54)名稱

蛋白質／石墨烯奈米複合藥物載體

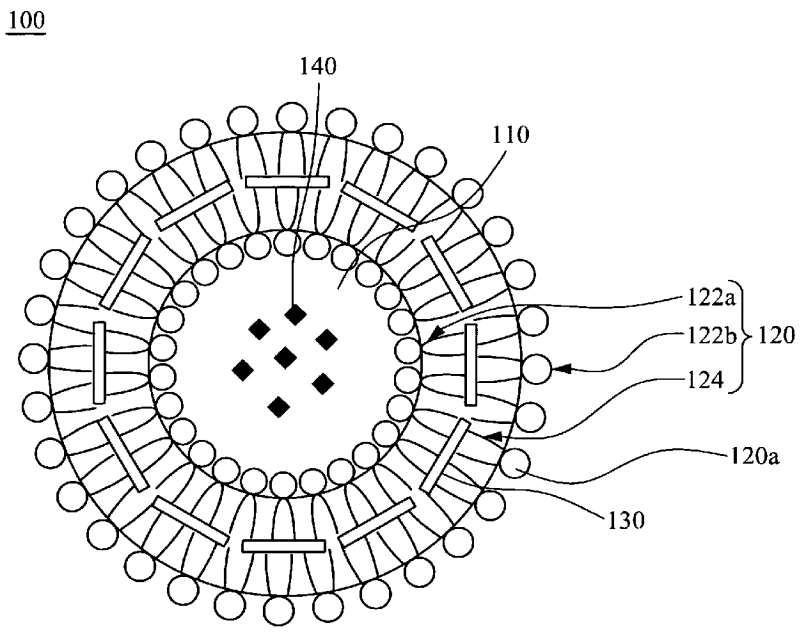
PROTEIN-GRAPHENE NANOCOMPOSITE DRUG CARRIER

(57)摘要

一種藥物載體包含水相溶液、乳鐵蛋白殼層、石墨烯以及藥物。乳鐵蛋白殼層包覆水相溶液，且包含至少兩層親水層以及至少一疏水層。兩層親水層為乳鐵蛋白殼層之內、外殼層，且疏水層夾於兩層親水層之間。石墨烯散佈於疏水層中，且藥物位於水相溶液及/或疏水層中。

A drug carrier is provided, including an aqueous solution, a lactoferrin shell, graphenes, and a drug. The lactoferrin shell encloses the aqueous solution, and includes at least two hydrophilic layers and at least one hydrophobic layer. The two hydrophilic layers are the inner shell and the outer shell of the lactoferrin shell, and the hydrophobic layer is sandwiched by the two hydrophilic layers. The graphenes are dispersed in the hydrophobic layer, and the drug is in the aqueous solution and/or the hydrophobic layer.

指定代表圖：



第 1 圖

符號簡單說明：

100・・・藥物載體

110・・・水相溶液

120・・・乳鐵蛋白殼層

120a・・・乳鐵蛋白

122a・・・第一親水層

122b・・・第二親水層

124・・・疏水層

130・・・石墨烯

140・・・藥物

201611827

201611827

發明摘要

※申請案號：103134041

※申請日： 103. 9. 30

※IPC 分類：

A61K 9/113 (2006.01)

A61K 47/04 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

蛋白質/石墨烯奈米複合藥物載體

PROTEIN-GRAPHENE NANOCOMPOSITE DRUG CARRIER

【中文】

一種藥物載體包含水相溶液、乳鐵蛋白殼層、石墨烯以及藥物。乳鐵蛋白殼層包覆水相溶液，且包含至少兩層親水層以及至少一疏水層。兩層親水層爲乳鐵蛋白殼層之內、外殼層，且疏水層夾於兩層親水層之間。石墨烯散佈於疏水層中，且藥物位於水相溶液及/或疏水層中。

【英文】

A drug carrier is provided, including an aqueous solution, a lactoferrin shell, graphenes, and a drug. The lactoferrin shell encloses the aqueous solution, and includes at least two hydrophilic layers and at least one hydrophobic layer. The two hydrophilic layers are the inner shell and the outer shell of the lactoferrin shell, and the hydrophobic layer is sandwiched by the two hydrophilic layers. The graphenes are dispersed in the hydrophobic layer, and the drug is in the

aqueous solution and/or the hydrophobic layer.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

100：藥物載體

110：水相溶液

120：乳鐵蛋白殼層

120a：乳鐵蛋白

122a：第一親水層

122b：第二親水層

124：疏水層

130：石墨烯

140：藥物

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

【發明名稱】(中文/英文)

蛋白質/石墨烯奈米複合藥物載體

PROTEIN-GRAPHENE NANOCOMPOSITE DRUG CARRIER

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種藥物載體，特別是有關於一種包含乳鐵蛋白及石墨烯的藥物載體。

【先前技術】

【0002】 目前常見之藥物載體多以無機物或是高分子組成，必須經過改質或是嫁接其他分子，以降低免疫細胞或蛋白對載體的吞噬，進而增加載體傳遞至所欲治療的區域的機率。雖然無機物或是高分子可藉由改質進而操控載體的特性，但也存在易受到溫度與環境酸鹼性影響造成不穩定的缺點。另，大部分之無機物或是高分子載體生物相容性不佳，因而限制此類載體的發展性。

【0003】 此外，大多數的藥物載體因結構穩定性不佳，藥物可能在抵達所欲治療的區域前已在傳遞過程中釋放，而無法將藥物確實傳遞至所欲治療的區域，故難以掌握投藥量，治療效果不佳。若能有效地控制藥物釋放的時機與劑量，將可解決前述問題，並大幅提升治療的效果，但是目前大多數的藥物載體並不具有此種釋放藥物的機制。

【0004】 有鑑於此，在投藥治療疾病的技術領域中，仍需要

一種具專一性、穩定性高且可控制釋藥時機與釋放量的藥物載體，以提升治療的效果。

【發明內容】

【0005】本發明結合乳鐵蛋白與石墨烯合成在單一載體，是一個兼具有雙重療法(化療藥物傳遞與光熱療)的功能磁性蛋白奈米藥物載體。此乳鐵蛋白及石墨烯之載體並可結合氧化鐵奈米粒子，則可得到雙重標靶(化學及物理)的功能磁性蛋白奈米藥物載體。

【0006】本發明之一態樣提供一種藥物載體，包含水相溶液、乳鐵蛋白殼層、石墨烯以及藥物。乳鐵蛋白殼層包覆水相溶液，且包含至少兩層親水層以及至少一疏水層。疏水層夾於兩層親水層之間。石墨烯散佈於疏水層中，且藥物位於水相溶液及/或疏水層中。

【0007】根據本發明之一實施方式，乳鐵蛋白殼層係由雙性乳鐵蛋白組成。

【0008】根據本發明之一實施方式，雙性乳鐵蛋白佔藥物載體總重之約 1~5 重量百分比。

【0009】根據本發明之一實施方式，石墨烯佔藥物載體總重之約 0.05~0.5 重量百分比。

【0010】根據本發明之一實施方式，石墨烯爲還原氧化石墨烯。

【0011】根據本發明之一實施方式，石墨烯之直徑約爲 20~100 nm。

【0012】 根據本發明之一實施方式，藥物載體更包含氧化鐵，散佈於疏水層中。

【0013】 根據本發明之一實施方式，藥物載體之粒徑約爲100~400 nm。

【0014】 根據本發明之一實施方式，位於水相溶液中之藥物爲親水性藥物。

【0015】 根據本發明之一實施方式，親水性藥物爲小紅莓(Doxorubicin, DOX)或順鉑(Cisplatin，CDDP)。

【0016】 根據本發明之一實施方式，位於疏水層中之藥物爲疏水性藥物。

【0017】 根據本發明之一實施方式，疏水性藥物爲薑黃素(Curcumin, Cur)或紫杉醇(Paclitaxel)。

【圖式簡單說明】

【0018】 爲使本發明之特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第 1 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體的剖面示意圖。

第 2 圖係顯示本發明另一實施方式之藥物載體的剖面示意圖。

第 3 圖係顯示本發明一實施方式之製造藥物載體的流程示意圖。

第 4 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體的剖面示意圖。

第 5 圖係顯示本發明另一實施方式之藥物載體的剖面示意圖。

第 6 圖係顯示本發明一實施方式之製造藥物載體的流程示意圖。

第 7A~7C 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體的電子顯微鏡影像圖。

第 8A~8D 圖係顯示本發明一實施方式之具有不同石墨烯濃度之藥物載體的粒徑分布圖。

第 9A 圖係顯示本發明一實施例與比較例在近紅外光照射下的溫度-時間關係圖。

第 9B 圖係顯示本發明一實施例與比較例之藥物包覆量的柱狀圖。

第 9C~9D 圖係顯示本發明一實施例在不同近紅外光照射時間及強度下的累積釋放量-時間關係圖。

第 10A~10B 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體與不同細胞培養後的細胞存活率-藥物載體濃度關係圖。

第 11A~11D 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體對不同細胞進行標靶能力測試的共軛焦顯微鏡影像圖。

第 11E 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體進行標靶能力測試的共軛焦顯微鏡影像圖。

第 11F 圖係顯示第 11E 圖延 A-A'沿線之剖視圖。

第 11G 圖係顯示第 11E 圖延 B-B'沿線之剖視圖。

第 12A~12D 圖係顯示本發明實施例與比較例之藥物載體進行光熱療細胞毒性測試的共軛焦顯微鏡影像圖。

第 12E 圖係顯示本發明實施例與比較例在不同條件下細胞存活率的柱狀圖。

第 13 圖係顯示本發明一實施方式之具有螢光標記的藥物載體注射至老鼠 1 天及 5 天後之螢光影像圖。

第 14 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體注射至老鼠並以近紅外光照射不同時間後之紅外線熱能影像圖。

第 15A 圖係顯示經不同條件治療後的老鼠相對腫瘤體積-時間關係圖。

第 15B 圖係顯示經不同條件治療後的老鼠體重-時間關係圖。

第 16A~16C 圖係顯示經不同條件治療後老鼠的活體影像圖及腫瘤細胞的生長狀況示意圖。

第 17A~17C 圖係顯示載體進行近紅外光照射的治療示意圖。

第 18 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體的電子顯微鏡影像圖。

第 19 圖係顯示本發明之實施例與比較例進行磁導引測試之腫瘤區域鐵濃度的柱狀圖。

第 20 圖係顯示本發明一實施方式之藥物載體在不同環境下的累積釋放量-時間關係圖。

【實施方式】

【0019】 請參照第 1 圖，其顯示本發明一實施方式之藥物載體 100 的剖面示意圖。藥物載體 100 包含水相溶液 110、乳鐵蛋白殼層 120、石墨烯 130 以及藥物 140。乳鐵蛋白殼層 120 包覆水相溶液 110，且包含第一親水層 122a、第二親水

5

層 122b 以及疏水層 124。第一親水層 122a 及第二親水層 122b 分別爲乳鐵蛋白殼層 120 之內、外殼層，且疏水層 124 夾於兩層親水層 122a 及 122b 之間。石墨烯 130 散佈於疏水層 124 中，且藥物 140 位於水相溶液 110 中。值得注意的是，第 1 圖中僅繪示兩層親水層 122a 及 122b 與一層疏水層 124。在另一實施方式中，本發明之藥物載體的乳鐵蛋白殼層可包含多於兩層之親水層與複數層疏水層，且每一疏水層係夾於每兩層親水層之間。

【0020】 乳鐵蛋白殼層 120 係由乳鐵蛋白 120a 自組裝而成。在一實施方式，乳鐵蛋白 120a 爲雙性乳鐵蛋白，且佔藥物載體 100 總重之約 1~5 重量百分比(wt%)。

【0021】 在現有技術中，少有以乳鐵蛋白作爲載體之結構，大部分都是把乳鐵蛋白當作包覆的藥物作爲治療用途，或是將乳鐵蛋白嫁接在載體表面作爲其他用途。本發明之藥物載體採用乳鐵蛋白作爲藥物載體的外殼，由於乳鐵蛋白係一種人體免疫蛋白質，可以被免疫細胞或蛋白辨識，而使藥物載體在傳遞的過程中不會被吞噬。藉由乳鐵蛋白的保護使得本發明之藥物載體在體內的循環時間得以增長。另，乳鐵蛋白具有穿越血腦屏障(Blood-brain barrier, BBB)的能力與腫瘤標靶的功能及專一性，特別是對於腦瘤的標靶能力及專一性。因此，本發明之藥物載體在治療腦癌上表現出相當大的潛力。

【0022】 散佈於疏水層 124 中之石墨烯 130 係作爲支撐結構，以穩定藥物載體 100。

【0023】在一實施方式中，石墨烯 130 佔藥物載體 100 總重之約 0.05~0.5 wt%。當石墨烯濃度降至約 0.02wt%時，藥物載體會有塌陷的現象，其原因在於濃度不足時，剛性的石墨烯無法支撐起結構。當石墨烯濃度增至約 0.6 wt%時，乳鐵蛋白會以披蓋的方式沉積於石墨烯表面而無法形成球體。石墨烯 130 之濃度必須控制此範圍內，才能形成穩定的載體。

【0024】石墨烯 130 可以吸收近紅外光(Near infrared, NIR)，且吸收 NIR 之後石墨烯 130 會因爲生熱導致藥物載體 100 的變形或崩解，進而使得乳鐵蛋白殼層 120 包覆之藥物 140 釋出。因此，透過外加的 NIR 刺激，將可控制藥物釋放的時機，並達到光熱療的效果。在一實施方式中，石墨烯 130 係由還原氧化石墨烯改質之疏水性還原氧化石墨烯。在一實施方式中，石墨烯 130 爲奈米等級，其直徑約爲 20~100 nm。

【0025】在現有技術中，雖有以石墨烯作爲藥物載體，但大多爲將單片石墨烯改質或是額外的嫁接藥物而製得載體，此種載體製備過程繁複，且因石墨烯係以單一平面作爲載體，故藥物裝載量少。本發明之藥物載體係透過雙性乳鐵蛋白具有的親疏水性與油相石墨烯乳化，以形成球體，藥物係包覆於球體內。相較於平面之石墨烯載體，本發明之藥物載體提供立體的空間，可裝載較多的藥量。因此，本發明藥物載體不需經過繁複的改質或是額外的嫁接即可製得，且可包覆裝載較多的藥量。

【0026】在此實施方式中，藥物 140 係位於水相溶液 110 中，爲親水性藥物，例如：小紅莓(Doxorubicin, DOX)及順鉑(Cisplatin，CDDP)。

【0027】綜上所述，藥物載體 100 中的乳鐵蛋白 120a 因爲是人體自身所擁有的蛋白，故能降低免疫系統對藥物載體 100 的吞噬與長時間循環的效果。另，乳鐵蛋白 120a 還具有在腦部細胞之標靶專一性與穿越血腦屏障的能力。藥物載體 100 中的石墨烯 130 可以穩定藥物載體 100 之殼層，並能透過光熱療與結合化療的雙重治療方法，造成低劑量高毒殺能力的效果，在臨床治療上不但能降低藥物劑量來減少副作用更能達到高劑量所能達到的效果。此外，還可以透過 NIR 的不同刺激強度與時間來達到精準控制釋藥劑量和釋藥與否的開關效果。

【0028】請參照第 2 圖，其顯示本發明另一實施方式之藥物載體 200 的剖面示意圖。藥物載體 200 包含水相溶液 210、乳鐵蛋白殼層 220、石墨烯 230 以及藥物 240。乳鐵蛋白殼層 220 係由乳鐵蛋白 220a 自組裝而成，包覆水相溶液 210，且包含第一親水層 222a、第二親水層 222b 以及疏水層 224。第一親水層 222a 及第二親水層 222b 分別爲乳鐵蛋白殼層 220 之內、外殼層，且疏水層 224 夾於兩層親水層 222a 及 222b 之間。石墨烯 230 及藥物 240 散佈於疏水層 224 中。

【0029】在此實施方式中，藥物 240 係位於位於疏水層 224 中，爲疏水性藥物，例如：薑黃素(Curcumin, Cur)及紫杉醇(Paclitaxel)。

【0030】 藥物載體 200 與藥物載體 100 之不同之處在於藥物載體 100 之藥物 140 爲親水性藥物，位於水相溶液 110 中，而藥物載體 200 之藥物 240 爲疏水性藥物，位於位於疏水層 224 中。此不同之處並不影響本實施例各組成(例如：乳鐵蛋白 220a 及石墨烯 230)的功能。因此，藥物載體 200 具有與藥物載體 100 相同之功能與優點。

【0031】 請參照第 3 圖，其顯示本發明一實施方式之製造藥物載體 100 或藥物載體 200 的流程示意圖。首先，分別準備石墨烯油相溶液 310a 以及第一乳鐵蛋白水相溶液 310b，並混合油相溶液與第一乳鐵蛋白水相溶液，乳化以形成油包水型(Water-in-oil, w/o)的第一乳化液 320a。接著，準備第二乳鐵蛋白水相溶液 320b，並混合第一乳化液與第二乳鐵蛋白水相溶液，乳化以形成水包油包水型(Water-in-oil-in water, w/o/w)之第二乳化液 330。然後，去除第二乳化液中之有機溶劑及雜質，以得到藥物載體 340。

【0032】 藥物載體 100 裝載之藥物爲親水性藥物，其製造方法包含在步驟 310b 中，將藥物溶於第一乳鐵蛋白水相溶液，藉由水相溶液包覆於藥物載體 100 內。藥物載體 200 裝載之藥物爲疏水性藥物，其製造方法包含在步驟 310a 中，將藥物溶於石墨烯油相溶液，藉由油相溶液包覆於藥物載體 200 內。

【0033】 在步驟 320a 中，混合油相溶液與第一乳鐵蛋白水相溶液，以形成第一乳化液包含混合、乳化以及攪拌等步驟。在此步驟中，乳鐵蛋白自組裝成水相中空載體，並分

散於油相溶液中，以形成油包水型之第一乳化液，其中藥物被包覆於水相中空載體內。

【0034】 在步驟 340 中，去除第二乳化液中之有機溶劑及雜質包含：揮發有機溶劑，及離心、清洗以去除雜質。雜質包含未反應之物質。

【0035】 在一實施方式中，由於乳鐵蛋白爲雙性乳鐵蛋白，其具有疏水端與親水端，故在乳化時能與油相的石墨烯依親、疏水結構排列成中空載體，同時此製程不需要其他乳化劑的幫助便可以簡單的乳化步驟便可製得。

【0036】 請參照第 4 圖，其顯示本發明一實施方式之藥物載體 400 的剖面示意圖。藥物載體 400 包含水相溶液 410、乳鐵蛋白殼層 420、石墨烯 430、藥物 440 以及氧化鐵 450。乳鐵蛋白殼層 420 係由乳鐵蛋白 420a 自組裝而成，包覆水相溶液 410，且包含第一親水層 422a、第二親水層 422b 以及疏水層 424。第一親水層 422a 及第二親水層 422b 分別爲乳鐵蛋白殼層 420 之內、外殼層，且疏水層 424 夾於兩層親水層 422a 及 422b 之間。石墨烯 430 及氧化鐵 450 散佈於疏水層 424 中，且藥物 440 位於水相溶液 410 中。

【0037】 在一實施方式中，氧化鐵 450 爲四氧化三鐵(Fe_3O_4)奈米粒子。

【0038】 由於藥物載體 400 包含氧化鐵 450，故具有影像及磁導引控制之功能，例如：使用磁鐵或磁場去控制載體內的氧化鐵 450 的行爲。因此，藥物載體 400 除具有光熱療的效果外，還多了一種物理性的磁導引功能，透過磁鐵的

導引，除可加強藥物載體 400 對腦部的標靶外，還能將其引導至其他想要治療的區域，因而可增加藥物載體 400 於所欲治療之位置的累積量。此外，藉由氧化鐵 450，藥物載體 400 可具有 MRI 磁振造影的效果。

【0039】 藥物載體 400 與藥物載體 100 之不同之處在於相較於藥物載體 100，藥物載體 400 更包含氧化鐵 450。此不同之處並不影響本實施例氧化鐵 450 之外的其餘組成(例如：乳鐵蛋白 420a 及石墨烯 430)的功能。因此，藥物載體 400 之其餘組成具有與藥物載體 100 相同之功能與優點。

【0040】 請參照第 5 圖，其顯示本發明另一實施方式之藥物載體 500 的剖面示意圖。藥物載體 500 包含水相溶液 510、乳鐵蛋白殼層 520、石墨烯 530、藥物 540 以及氧化鐵 550。乳鐵蛋白殼層 520 係由乳鐵蛋白 520a 自組裝而成，包覆水相溶液 510，且包含第一親水層 522a、第二親水層 522b 以及疏水層 524。第一親水層 522a 及第二親水層 522b 分別爲乳鐵蛋白殼層 520 之內、外殼層，且疏水層 524 夾於兩層親水層 522a 及 522b 之間。石墨烯 530、藥物 540 及氧化鐵 550 散佈於疏水層 524 中。

【0041】 藥物載體 500 與藥物載體 400 之不同之處在於藥物載體 400 之藥物 440 爲親水性藥物，位於水相溶液 410 中，而藥物載體 500 之藥物 540 爲疏水性藥物，位於位於疏水層 524 中。此不同之處並不影響本實施例各組成(例如：乳鐵蛋白 520a、石墨烯 530 及氧化鐵 550)的功能。因此，藥物載體 500 具有與藥物載體 400 相同之功能與優點。

【0042】 請參照第 6 圖，其顯示本發明一實施方式之製造藥物載體 400 或藥物載體 500 的流程示意圖。首先，分別準備石墨烯 610a 以及氧化鐵 610b，並混合石墨烯與氧化鐵，以得到含有石墨烯及氧化鐵之油相溶液(石墨烯@氧化鐵油相溶液)620a。接著，準備第一乳鐵蛋白水相溶液 620b，並混合含有石墨烯及氧化鐵之油相溶液與第一乳鐵蛋白水相溶液，以形成油包水型(Water-in-oil, w/o)的第一乳化液 630a。準備第二乳鐵蛋白水相溶液 630b，並混合第一乳化液與第二乳鐵蛋白水相溶液，以形成水包油包水型(Water-in-oil-in water, w/o/w)之第二乳化液 640。然後，去除第二乳化液中之有機溶劑及雜質，以得到藥物載體 650。

【0043】 在步驟 610b 中，氧化鐵係溶於油相溶液中，其濃度約爲 5~30 mg/mL。氧化鐵之濃度需控制在此範圍內才能形成具有完整的球形之載體。

【0044】 藥物載體 400 裝載之藥物爲親水性藥物，其製造方法包含在步驟 620b 中，將藥物溶於第一乳鐵蛋白水相溶液，藉由水相溶液包覆於藥物載體 400 內。藥物載體 500 裝載之藥物爲疏水性藥物，其製造方法包含在步驟 620a 中，將藥物溶於石墨烯@氧化鐵油相溶液，藉由油相溶液包覆於藥物載體 500 內。

【0045】 在步驟 630a 中，混合油相溶液與第一乳鐵蛋白水相溶液，以形成第一乳化液包含混合、乳化以及攪拌等步驟。在此步驟中，乳鐵蛋白自組裝成水相中空載體，並分散於油相溶液中，以形成油包水型之第一乳化液，其中藥

物被包覆於水相中空載體內。

【0046】 在步驟 650 中，去除第二乳化液中之有機溶劑及雜質包含：揮發有機溶劑，及離心、清洗以去除雜質。雜質包含未反應之物質。

【0047】 在一實施方式中，此製備方法採用雙性乳鐵蛋白及疏水性還原氧化石墨烯，並另添加疏水性氧化鐵作爲油相溶液。在乳化時乳鐵蛋白與油相的石墨烯及氧化鐵依親、疏水結構排列成中空載體，不需要其他乳化劑的幫助便可製得。此製備方法所製得之藥物載體，因包覆氧化鐵而具有影像及磁導引控制之額外功能。

【0048】 值得注意的是，本發明之藥物載體可包含親水性藥物位於水相溶液中或疏水性藥物位於疏水層中，亦可同時包含親水性藥物及疏水性藥物。

【0049】 本發明之藥物載體係結合乳鐵蛋白與石墨烯，經由簡單的乳化製程而形成，爲一種以乳鐵蛋白爲主體的奈米中空多功能藥物載體，不但能透過簡單的調配乳鐵蛋白的比例以改變藥物載體的粒徑大小，也能有效的包覆藥物和降低藥物的毒性。若用以包覆癌症藥物，可降低癌症藥物的副作用。不像習知的高分子載體必須改質或是嫁接其他分子以降低免疫細胞或蛋白對其的吞噬，本發明之藥物載體外表擁有自身免疫系統所能辨識的乳鐵蛋白，可以直接增加藥物載體在身體循環的時間，並可抵達所欲治療的區域。此外，石墨烯可以吸收 NIR，可藉以控制藥物釋放的時機，具有光熱療的效果。另，本發明之藥物載體可添加

氧化鐵，加上石墨烯的特性，除了光熱療的效果外還多了物理性的磁導引功能，透過磁導引可將藥物載體引導至所欲治療的區域，並加強藥物載體對該區域的標靶。本發明之藥物載體爲製程簡單又具有多功能的奈米蛋白無毒的中空載體，除了用在癌症治療外還能透過改變其包覆的物質以達成其他醫療目的，例如：包覆 DNA 或其他修復蛋白達到組織修復的功能，或是包覆其他螢光物質達到生物顯影的目的，在臨床醫學上有巨大的潛力。

【0050】 以下列舉數個實施例及實驗例以更詳盡闡述本發明之藥物載體，然其僅爲例示說明之用，並非用以限定本發明，本發明之保護範圍當以後附之申請專利範圍所界定者爲準。

還原氧化石墨烯的合成

【0051】 奈米等級還原氧化石墨烯(reduced graphene oxide, rGO)的合成係透過 modified Hummer method，包含以下步驟：

1. 取原石墨烯片加入 H_2SO_4、$K_2S_2O_8$和 P_2O_5 混合後加熱至 80°C 維持 12 小時。
2. 以去離子水和乙醇洗滌步驟 1 之石墨烯片，並將石墨烯片在充滿氮氣的環境下乾燥一個晚上。
3. 將乾燥後的石墨烯粉末加進 H_2SO_4中，並緩緩加入 $KMnO_4$，攪拌以使石墨烯粉末氧化。

4. 將步驟 3 之混合液放入冰浴中繼續攪拌 2 小時，最後用去離子水終止反應。
5. 加入 H_2O_2 至步驟 4 之溶液直到溶液轉成亮黃色以去除 MnO_2。
6. 加入 1% HCl 和去離子水至步驟 5 之溶液，並以 6000 轉離心 10 分鐘，離心 3 次直至 pH 值約爲 6~7，以純化氧化石墨烯粉末。
7. 利用超音波探針剝離氧化石墨烯，並以 12000 轉離心 30 分鐘取上清液，以取得小尺寸且均勻的氧化石墨烯。
8. 加入稀氨水將 pH 值調至約爲 11.5~11.8，並加熱至 80°C 維持 12 小時，這時溶液將從褐色轉呈黑色。
9. 將步驟 8 之溶液用超聲波震盪機震約 1 小時，以得到均勻 rGO 溶液，並將此溶液以 12000 轉離心 30 分鐘，以去除大尺寸的 rGO，即可取得小尺寸的 rGO 片。

疏水性還原氧化石墨烯的製備

【0052】 將上述奈米等級之 rGO 片改質爲疏水性包含以下步驟：

1. 取 100mg 的 rGO 和 400mg 的脂肪胺混合並溶入

100mL 的乙醇中，在室溫下反應 2 小時。

2. 利用孔徑爲 0.2 μM 大小的尼龍膜和多次的乙醇清洗，以去除多餘的脂肪胺，最後獲得疏水性的 rGO。

藥物載體的製備

【0053】 本發明一實施方式之藥物載體的製備方法包含以下步驟：

1. 將 0.75mg 的疏水性 rGO 溶於 250 μL 的氯仿中做爲油相溶液。
2. 取 2mg 的乳鐵蛋白(Lactoferrin, Lf)和 0.5mg 的小紅莓(Doxorubicin, DOX)溶於 100 μL 去離子水做爲第一層的水相溶液。
3. 將步驟 2 之第一層水相溶液與步驟 1 之油相溶液混合後，以超音波打碎機(20 kHz，130 W)乳化 1 分鐘，得到油包水型(Water-in-oil, w/o)之第一乳化液。
4. 取 400 μL 含 2%的乳鐵蛋白做爲第二層的水相溶液。
5. 將步驟 4 之第二層水相溶液與步驟 3 之 w/o 第一乳化液做第二次乳化，以得到水包油包水型(Water-in-oil-in-water, w/o/w)之第二乳化液。
6. 將步驟 5 之第二乳化液在室溫下攪拌直到有機溶劑

揮發爲止。

7. 將步驟 6 之產物離心，移除未反應的物質，並將其分散於二次水中，以得到藥物載體，其結構請參照第 1 圖之藥物載體 100。

【0054】 以下實驗例一至實驗例八以具有藥物載體 100 之結構的藥物載體進行實驗。值得注意的是，說明書中之「未包覆藥物之載體」代表結構與藥物載體 100 相似之載體，惟其水相溶液並不包含藥物。

實驗例一

【0055】 爲了成功製造出本發明之藥物載體，rGO 的直徑必須調控在 20~100nm。爲了確定載體的型態與大小，使用了掃描電子顯微鏡(scanning electron microscope, SEM)和穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope, TEM)進行觀測。

【0056】 請參照第 7A~7C 圖，其顯示本發明一實施方式之藥物載體的電子顯微鏡影像圖。第 7A 圖爲 SEM 圖、第 7B 圖爲 TEM 圖，以及第 7C 圖爲第 7B 圖之局部放大圖。由第 7A 圖中可以看出藥物載體之粒徑約爲 100nm~350nm，且並沒有從圖中觀察到藥物載體有明顯的缺口，代表乳鐵蛋白和 rGO 的組成結構是完好穩定的。

【0057】 由第 7B~7C 圖可以看出藥物載體具有中空的雙層

結構，殼層厚度約 25nm，且兩層殼層之間也不存在相分離。疏水層之無機 rGO 的對比比較強，因此會較內層還有外層之有機乳鐵蛋白殼層的親水層還暗，含有 rGO 組成的乳鐵蛋白殼層會使得載體具有穩定的結構。雖然有文獻指出乳鐵蛋白可以當成表面活性劑，但它本身並不能單獨乳化。如果只有單純的乳鐵蛋白與氯仿，而沒有 rGO 的存在，並不會形成任何顆粒或球體，只會單純形成薄膜。只有在加入 rGO 時，才能形成具有乳鐵蛋白與 rGO 之載體。

實驗例二

【0058】 在本發明之藥物載體中，rGO 扮演著穩定載體結構、吸收近紅外光(Near, infrared, NIR)達到光熱療，和 NIR 觸發釋藥系統的要素。rGO 的濃度對於乳體蛋白/rGO 藥物載體的合成與否及粒徑大小具有直接關係。

【0059】 請參照第 8A~8D 圖，其係本發明一實施方式之具有不同 rGO 濃度之藥物載體的粒徑分布圖。第 8A~8D 圖分別顯示具有 0.03wt%、0.15wt%、0.3wt%以及 0.6wt%的 rGO 濃度之藥物載體以動態光散射儀(Dynamic light scattering, DLS)量測並分析之粒徑分布圖。請參照第 8A 圖，當 rGO 濃度降到 0.03wt%時，載體經乾燥後雖然會形成球體，但球體會有塌陷的現象，而無法作爲藥物載體。這是因爲濃度不足時，剛性的 rGO 無法支撐起結構。請參照第 8B 圖及第 8C 圖，當 rGO 濃度爲 0.15wt%及 0.3wt%時，載體具有穩定的結構，粒徑大小分布會在 120~450nm 之間。請參照

第 8D 圖，如果繼續增加 rGO 濃度至 0.6wt%時，乳鐵蛋白反而會以披蓋的方式層積於 rGO 表面(Lf-coated)，而不會形成球體。因爲沒有球體的形成，圖中顯示之粒徑範圍包含了部分的奈米 rGO 片與 Lf-coated 之 rGO。因此，唯有 rGO 維持適合的濃度，約爲 0.05~0.5 wt%，才能形成穩定的載體。

實驗例三

【0060】 實施例三係探討 NIR 對本發明之藥物載體的影響以及藥物載體之藥物包覆量。

【0061】 由於本發明之藥物載體中的 rGO 可以吸收 NIR 並發熱，因此當以 NIR 照射 rGO 與載體時皆可以發現溫度的上升。請參照第 9A 圖，其係顯示本發明實施例與比較例分散於磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)中，在 NIR 照射(808nm, 2 W/cm^2)下的溫度-時間關係圖，其中線條 712 代表實施例之具有乳鐵蛋白與 rGO 之載體、線條 714 代表比較例之純 rGO 以及線條 716 代表比較例之純乳鐵蛋白。如第 9A 圖所示，當單純乳鐵蛋白溶液(線條 716)照射 NIR 時，並無明顯的溫度變化，而純 rGO(線條 714)以及實施例之載體(線條 712)的溫度皆有明顯的上升。其中，由於乳鐵蛋白的熱傳導速率較 rGO 低，因此實施例之載體(線條 712)的溫度上升略低於比較例之純 rGO(線條 714)，但是相對於比較例之純 rGO，實施例之載體對於 NIR 仍有超過 85%的吸收效率，故在光熱療效應上並不會有太

大的影響。

【0062】請參照第 9B 圖係顯示本發明一實施例與比較例之藥物包覆量的柱狀圖，其中柱狀物 722 代表比較例之純 rGO、柱狀物 724 代表比較例之乳鐵蛋白以披蓋的方式層積於 rGO 表面(Lf-coated rGO)以及柱狀物 726 代表實施例之具有乳鐵蛋白與 rGO 之藥物載體，且用以測試包覆量的藥物爲 DOX。兩個比較例皆無法形成球體，故藥物係裝載於 rGO 片上，而非包覆於其中。因此，在包覆藥物的能力上，由於實施例之雙乳化載體的水相核心提供了較大的空間來包覆水相藥物 DOX，並可防止其擴散出載體，因此實施例之藥物載體包覆 DOX 的能力(9.43 μmol/g)遠遠高於比較例之 rGO (1.35 μmol/g)和比較例之 Lf-coated rGO (3.81 μmol/g)。

【0063】請參照第 9C~9D 圖，其係分別顯示本發明實施例之藥物載體在不同 NIR 照射時間及強度下的累積釋放量-時間關係圖。請參照第 9C 圖，在藥物釋放方面，線條 732 代表未受 NIR 照射之藥物載體、線條 734 以及線條 736 分別代表藥物載體經 NIR 照射 1 分鐘以及 5 分鐘。未受 NIR 照射之藥物載體因結構穩定，使其 2 小時內的自然釋放量低於 8%。然而在 NIR 的刺激下，透過 rGO 的光熱轉換會造成局部加熱，而使藥物載體之殼層結構或分子排列產生變形。當藥物載體分別經 NIR 照射 1 分鐘以及 5 分鐘後，於 1 小時候約達到 20%以及 60%的高釋放量。

【0064】藥物載體在釋藥方面有形變回復的功能，但回復的

能力取決於刺激強度的大小，當刺激太強時會使載體完全破壞而無法回復，因此當刺激超過 5 分鐘，就算將 NIR 刺激停止無法復原的變形也會導致釋藥速率仍舊保持較快的速率進行。請參照第 9D 圖，若使用短暫性的 NIR 刺激(約 1 分鐘)，藥物載體的釋藥模式將會以階梯方式呈現，而釋藥的劑量取決於 NIR 的強度，也代表了熱刺激釋放是個可開關的模式。第 9D 圖中以 NIR 強度爲 0 W/cm^2、0.4 W/cm^2、0.8 W/cm^2 以及 2 W/cm^2 進行實驗，並分別以線條 742、744、746 以及 748 表示藥物隨時間的累積釋放量。同樣的局部加熱增強了藥物載體殼層的滲透性與藥物的擴散速率。當在 5 分鐘內移除 NIR 照射刺激，藥物載體將會返回初始微量釋藥的狀態。這樣的蛋白質恢復過程可以理解爲肽熱敏行爲，像是一些肽鍵在溫水中會以螺旋線圈的形式存在而在冷水中卻變成三螺旋序列的凝膠的結構。本發明之藥物載體的藥物釋放模式爲熱敏感可逆藥物釋放模式，其可以防止藥物的自然釋放也能精確地透過 NIR 的照射時間來控制藥物的釋放行爲。

實驗例四

【0065】 生物安全性測試：本發明之藥物載體具有良好的生物安全性，也具有標靶特定腫瘤細胞的能力。在細胞實驗上，選用具有大量乳鐵蛋白受器的 RG2(腦瘤細胞)與少量乳鐵蛋白受器的 MRC-5(肺部纖維正常細胞)進行生物安全性測試的實驗。另，爲測試本發明之藥物載體本身之生物安

全性，實驗例四使用之藥物載體並未包覆藥物。請參照第10A~10B 圖，其係分別顯示本發明一實施方式之藥物載體與 RG2 細胞以及 MRC-5 細胞培養 24 小時後的細胞存活率-藥物載體濃度關係圖。由圖中可知，即使於高達 4 mg/mL 藥物載體的濃度下，細胞存活率仍高達 93%±6%。因此，本發明之藥物載體確實具有良好的生物安全性。

實驗例五

【0066】 標靶能力測試：以流式細胞儀(Flow cytometry)偵測包覆有螢光物質的藥物載體，並藉由螢光物質測試本發明之藥物載體是否可準確地將藥物運送至腫瘤細胞。本實驗例係將包覆螢光物質之藥物載體分別與 RG2 細胞及 MRC-5 細胞培養 4 小時後，對細胞進行染色並以共軛焦顯微鏡觀察。

【0067】 請參照第 11A~11D 圖，其係顯示本發明之藥物載體對不同細胞進行標靶能力測試的共軛焦顯微鏡影像圖，其中第 11A、11B 圖係對 RG2 細胞進行測試，第 11C、11D 圖係對 MRC-5 細胞進行測試。第 11A、11 C 圖係顯示將細胞染色影像圖與藥物載體螢光影像圖合併之共軛焦顯微鏡影像圖，而第 11B、11 D 圖僅顯示藥物載體螢光的共軛焦顯微鏡影像圖。在第 11A 圖中，細胞核呈藍色，細胞質呈綠色，而藥物載體在第 11B 圖中呈紅色，在合併之第 11A 圖中呈黃色。在第 11C、11D 圖中，細胞核呈藍色，細胞質呈黃色，藥物載體呈紅色。

【0068】 由第 11A~11D 圖可知，細胞吞噬之藥物載體停留在 RG2 細胞內多種區域，包含細胞質(藍色區域)。而藥物載體在 MCR-5 細胞只停留在細胞表面，並未被 MCR-5 細胞吞噬。透過共軛聚焦顯微鏡，可以發現本發明之藥物載體對於 RG2 細胞具有高效率的標靶能力以及良好的內吞作用。此外，於培養 1 小時內即可明顯地看出 RG2 細胞與 MRC-5 細胞間不同的藥物載體吞噬量的巨大差異，除了代表乳鐵蛋白標靶 RG2 細胞(腫瘤細胞)的效率外，還表示藥物載體具有穿越血腦屏障(Blood-brain barrier, BBB)的能力。因此，本發明之藥物載體在治療腦癌上表現出相當大的潛力。

【0069】 第 11E 圖係顯示本發明之藥物載體對 RG2 細胞進行標靶能力測試的共軛焦顯微鏡影像圖。第 11F 圖係顯示第 11E 圖延 A-A'沿線之剖視圖，而第 11G 圖係顯示延 B-B'沿線之剖視圖。由第 11E~11G 圖可知，本發明之藥物載體可被 RG2 細胞吞噬並停留在細胞內多種區域。

實驗例六

【0070】 光熱療細胞毒性測試：將無載體之對照組、未包覆藥物之載體以及本發明之包覆不同 DOX 濃度的藥物載體分別與 RG2 細胞在體外(in vitro)培養 1 小時後，以 NIR 照射 5 分鐘(808nm, 2 W/cm^2)。接著，以碘化丙啶對細胞進行染色，綠色螢光代表活細胞，紅色螢光代表死細胞，以共軛焦顯微鏡觀察並計算細胞存活率。

【0071】 請參照第 12A~12D 圖，其係分別顯示無載體之對照組、未包覆藥物之載體、包覆 0.25 μg/mL DOX 的藥物載體以及包覆 0.05 μg/mL DOX 的藥物載體經 NIR 照射並染色後之共軛焦顯微鏡影像圖。請參照第 12A 圖，無載體之對照組經 NIR 照射細胞培養皿 4 分鐘後，並無任何細胞被殺死，代表 NIR 照射並不會殺死細胞。請參照第 12B 圖，若將 NIR 照射在有加入載體的培養皿時，細胞就會大量死亡(圖中紅色螢光部分)。而在 NIR 的照射範圍外，癌細胞仍可存活(圖中綠色螢光部分)。請參照第 12C 圖，一旦使用 NIR 照射加上包覆 0.25 μg/mL DOX 的藥物載體，不只是照射區域的細胞，連同照射周圍的細胞都會死亡。請參照第 12D 圖，藥物載體包覆藥量只有第 12C 圖之藥物載體的 0.2 倍時，配合光熱化療法仍然能殺死大多數的腫瘤細胞。

【0072】 請參照第 12E 圖，其係顯示本發明之藥物載體與比較例在不同條件下與 RG2 細胞培養後之細胞存活率的柱狀圖。柱狀物 810、820 以及 830 之條件係不使用 DOX，其分別代表無載體之對照組、未經 NIR 照射之載體以及經 NIR 照射之載體的細胞存活率。柱狀物 840、850 以及 860 之條件係使用 0.25 μg/mL DOX，其分別代表純 DOX 之對照組、未經 NIR 照射之藥物載體以及經 NIR 照射之藥物載體的細胞存活率。柱狀物 870、880 以及 890 之條件係使用 0.05 μg/mL DOX，其分別代表純 DOX 之對照組、未經 NIR 照射之藥物載體以及經 NIR 照射之藥物載體的細胞存活率。由第 12E 圖可知，柱狀物 810、820 以及 830 因不含 DOX，

故不太會造成細胞死亡。柱狀物 840 係代表純 DOX 之對照組，濃度爲 0.25 μg/mL，其約可造成 50%的細胞死亡，故 Dox 之半數致死量(IC_{50}) 約爲 0.25 μg/mL。柱狀物 850 係代表包覆 0.25 μg/mL DOX 之藥物載體，但與細胞培養後並未受 NIR 照射，故 DOX 仍包覆於藥物載體內，細胞死亡率不高。柱狀物 860 係代表包覆 0.25 μg/mL DOX 之藥物載體，並於細胞培養後並受 NIR 照射。一旦使用 NIR 照射加上包覆 DOX 的藥物載體，相對於相同濃度的純 DOX 藥物(柱狀物 840)只造成 50%的細胞死亡，此效果相當的顯著。配合第 12C 圖的結果可知，不只是照射區域的細胞，連同照射周圍的細胞都會死亡。柱狀物 870、880 以及 890 之條件係將 DOX 濃度由 0.25 μg/mL 降低至 0.05 μg/mL，故純 DOX 之對照組(柱狀物 870)及未經 NIR 照射之藥物載體(柱狀物 880)之細胞存活率皆有提升。然而，值得注意的是，包覆 0.05 μg/mL DOX 並經 NIR 照射之藥物載體(柱狀物 890)，其包覆的藥量只有 Dox 之 IC_{50}的 0.2 倍時，配合光熱化療法仍然能殺死 95%以上的癌細胞。

【0073】 從上述結果可以得出下列幾個結論，(1)：若載體沒有包藥，只有 NIR 照射區域的細胞會被消滅，其他範圍的治療效果較差；(2)：本發明之藥物載體結合光熱化療，約有 95%的細胞會消滅；(3)：結合光熱化療的藥物載體只需 0.2 倍的藥物劑量就能殺死整個區域的癌細胞，將細胞存活率降到 10%以下。從這裡就可以看出光熱療與化療結合的優異的效果。有如此進步的效率係因爲本發明之藥物載

體具有以下三種特性：(1)快速的細胞標靶與吞噬、(2)高熱敏感性與快速的藥物釋放與(3)NIR 光熱療對寬廣區域的影響。因此，本發明之藥物載體整合了高細胞吞噬效率和光熱療，使得藥物能精確地送到目標細胞，並藉由 NIR 照射控制藥物在目標細胞的釋放。此種治療方式不但可用較低的的藥物劑量達到同樣的療效，亦可提升消滅癌細胞的能力。

實驗例七

【0074】 實驗例七透過老鼠體內(in vivo)的腫瘤(RG2 細胞)治療實驗，觀察本發明之藥物載體的標靶效率，並以 NIR 照射，觀察腫瘤溫度的變化。另，透過不同的治療條件，觀察治療對腫瘤體積與老鼠體重的影響。

【0075】 請參照第 13 圖，其係顯示本發明一實施方式之具有螢光標記的藥物載體注射至老鼠 1 天及 5 天後之螢光影像圖。從靜脈注射 100 μL 濃度爲 1wt%之藥物載體，其係由 Cy 5.5 標記，並藉由落射熒光顯微鏡觀察螢光訊號。螢光訊號(Ex: 640 nm, Em: 710 nm)在第 1 天與第 5 天都被觀察到，而且強度並沒有降低，顯示標靶的成功與載體的劑量累積。本發明之藥物載體的標靶效率主要是藉由藥物載體上的乳鐵蛋白來控制，乳鐵蛋白能使藥物載體快速地貼近 RG2 細胞並增加癌細胞吞噬效率。

【0076】 請參照第 14 圖，其係顯示本發明一實施方式之藥物載體注射至老鼠並以 NIR 照射 0 分鐘(min)、1min、2min

以及 3min 後之紅外線熱能影像圖。以強度爲 2 W/cm^2 之 NIR 照射在老鼠腫瘤部位，由圖可知，由於藥物載體之 rGO 會吸收 NIR，老鼠腫瘤部位的溫度會隨著照射時間的增加而上升，照射 3 分鐘後腫瘤溫度約由 31°C 上升至 55°C。老鼠腫瘤溫度的上升代表本發明之藥物載體於活體中，確實可以傳遞至腫瘤部位。

【0077】 請參照第 15A 圖，其係顯示經不同條件治療後的老鼠相對腫瘤體積-時間關係圖。治療條件分別爲使用 PBS+NIR 照射、純 DOX+NIR 照射、未包覆藥物之載體+NIR 照射以及覆有 DOX 之藥物載體+NIR 照射，並分別以線條 910、920、930 以及 940 代表相對腫瘤體積隨時間的變化。觀察治療 24 小時後之相對腫瘤體積，其係以治療後之腫瘤體積爲基準。由圖可知，治療後 3 天內，老鼠腫瘤的大小在注入未包覆藥物之載體(線條 930)以及藥物載體(線條 940)，並經 NIR 照射的處理治療的兩種條件下皆明顯變小。而 PBS+NIR 照射(線條 910)以及純 DOX+NIR 照射(線條 920)之對照組卻是變大的，確認了體內治療的效果。然而，在第 3 天後，未包覆藥物之載體+NIR 照射(線條 930)處理的老鼠腫瘤又逐漸開始長大。相對地，覆有 DOX 之藥物載體+NIR 照射(線條 940)的老鼠腫瘤經過治療，在身上的幾乎完全消失，並在接下來的 2 個月內都沒有復發。PBS+NIR 照射(線條 910)由於未注射藥物，故無法治療腫瘤；純 DOX+NIR 照射(線條 920)由於藥物並未包覆於載體中，故難以到達腫瘤區域進而具有治療的效果；未包覆藥物之載

體+NIR 照射(線條 930)由於載體可到達腫瘤區域，且加上 NIR 之光熱療，故治療初期可使腫瘤體積變小，但載體並未包覆藥物，故無法完全殺死腫瘤細胞，使一段時間後腫瘤又逐漸開始生長。由上述結果可知，僅有結合本發明之藥物載體及 NIR 照射才可以完全殺死腫瘤細胞，使其不會復發。

【0078】 此外，請參照第 15B 圖，其係顯示經不同條件治療後的老鼠體重-時間關係圖。治療條件分別爲使用 PBS+NIR 照射、純 DOX+NIR 照射、未包覆藥物之載體+NIR 照射以及覆有 DOX 之藥物載體+NIR 照射，並分別以線條 950、960、970 以及 980 代表老鼠體重隨時間的變化。第 15B 圖顯示注入覆有藥物的載體和無藥物的載體之老鼠，在體重的變化上差別並不大，代表含有乳鐵蛋白及石墨烯之載體大幅地降低抗癌藥物對身體的傷害。

實驗例八

【0079】 在 NIR 照射的刺激下，載體能達到的溫度(約 55°C)即足以殺死癌細胞，因此無法確認光熱療與化療的結合是否具有優勢。爲此，實驗例八係探討包覆藥物與否之載體加上 NIR 照射對治療腫瘤細胞的影響。

【0080】 取三組患有皮下腫瘤的裸鼠分別進行三種治療，包含使用 PBS 加上 NIR 照射之對照組、使用未包覆藥物之載體加上 NIR 照射之載體+NIR 組以及使用覆有 DOX 之藥物載體加上 NIR 照射之藥物載體+NIR 組，其中 NIR 照射強

度爲 2 W/cm^2。在經過 3 天的治療後，載體+NIR 組以及藥物載體+NIR 組的腫瘤會生成黑色結痂，而對照組並無任何外觀變化。然而，在經過 7 天之後，載體+NIR 組的腫瘤會重新開始變大，而藥物載體+NIR 組的腫瘤卻會持續變小，並於一個月後完全消失。在最終的觀察，載體+NIR 組的腫瘤將會由 NIR 照射區域的周圍開始復發生長。雖然已變成結痂的腫瘤細胞中心並無重新生長，但是在 14 天後腫瘤細胞轉移到照射區域旁的周圍形成新的腫瘤繼續生長。

【0081】 請參照第 16A~16C 圖，其係顯示經不同條件治療 14 天後老鼠的的活體影像圖及腫瘤細胞的生長狀況示意圖，其中在腫瘤細胞的生長狀況示意圖中，白底部分代表腫瘤活細胞 1010，網點部分代表腫瘤死細胞 1020。第 16A 圖係經 PBS 加上 NIR 治療之對照組，顯示僅經 NIR 照射而未注入載體或藥物載體之老鼠，其腫瘤細胞並不會死亡。第 16B 圖係注入未包覆藥物之載體並經 NIR 照射治療之載體+NIR 組，顯示雖然注入載體並經 NIR 照射會使照射部分之腫瘤細胞死亡，但由於載體並未包覆藥物，經過一段時間後，腫瘤細胞會轉移至照射區域的周圍，並形成新的腫瘤繼續生長。第 16C 圖係注入包覆 DOX 之藥物載體並經 NIR 照射治療之藥物載體+NIR 組，顯示結合光熱療與化療，不僅可殺死腫瘤細胞，且因 NIR 照射而之釋放 DOX 可擴散並殺死照射區域周圍之腫瘤細胞，而使腫瘤不會復發。

【0082】 結果顯示只依靠光熱療的方式來治療腫瘤之載體+NIR 組，很難完全清除癌細胞，且癌細胞容易轉移到無

NIR 照射區域繼續生長。但是，當結合光熱療與化療，即藥物載體+NIR 組，治療一個月後腫瘤仍不會復發，顯示抗癌藥物不但消滅了照射區域的腫瘤，連照射區域旁的腫瘤細胞也得以清除。造成此結果的原因是本發明之藥物載體具有良好的熱敏感性質，可使腫瘤的溫度上升到約 50°C，不但能殺死癌細胞，也能促進藥物的吸收與釋放。

【0083】 載體進行 NIR 照射的治療示意圖如第 17A~17C 圖所示，圖中以虛線代表腫瘤活細胞 1110，並以實線代表腫瘤死細胞 1120。第 17A 圖顯示載體位於腫瘤細胞(腫瘤活細胞 1110)並進行 NIR 照射之示意圖，載體在此圖中係以藥物載體 100 代表。當載體爲未包覆藥物之載體時，經 NIR 照射後，腫瘤細胞的生長狀況如第 17B 圖所示，其中載體之結構與藥物載體 100 相似，惟其水相溶液並不包含藥物。由於載體含有石墨烯 130，故石墨烯 130 會吸收 NIR 並導致載體的變形或崩解，載體也因而分解成小片段(部分乳鐵蛋白 120a 會吸附於石墨烯 130)。另，由於吸收 NIR，載體的溫度會上升(約 55°C)並足以殺死癌細胞。因此，NIR 照射區域之腫瘤細胞會死亡(腫瘤死細胞 1120)，而未受 NIR 照射區域之腫瘤細胞會存活(腫瘤活細胞 1110)。此種治療方式僅有光熱療之效果，並無法完全將腫瘤細胞殺死。當載體裝載藥物時(藥物載體 100)，經 NIR 照射後，腫瘤細胞的生長狀況如第 17C 圖所示。由於藥物載體 100 含有石墨烯 130，故石墨烯 130 會吸收 NIR 並導致藥物載體 100 的變形或崩解，藥物載體 100 因而分解成小片段，進而釋出

包覆之藥物 140。釋出之藥物 140 向外擴散至未受 NIR 照射區域，故 NIR 照射區域及其周圍區域之腫瘤細胞皆會死亡(腫瘤死細胞 1120)。同上所述，本發明之藥物載體顯示結合光熱療與化療的治療方式，其不僅可殺死腫瘤細胞，亦可使腫瘤不會復發。

藥物載體的製備

【0084】本發明另一實施方式之藥物載體的製備方法包含以下步驟：

1. 取 8mg 乳鐵蛋白溶於 400 μL 去離子水做爲水相溶液。
2. 取 4mg 氧化鐵溶於 250 μL 的氯仿。
3. 將 0.75mg 的疏水性 rGO 溶於步驟 2 之溶液中做爲油相溶液。
4. 將步驟 1 之水相溶液與步驟 3 之油相溶液混合後，以超音波打碎機(20 kHz，130 W)乳化 30 秒，得到油包水型(Water-in-oil, w/o)之乳化液。
5. 將步驟 4 之乳化液使用真空濃縮揮發，去除氯仿的部分，以得到無毒的藥物載體。
6. 將步驟 5 之產物以 140K 分子量孔洞的透析膜在乾淨的去離子水中透析，以去除殘存的無組裝的乳鐵蛋白、氧化鐵以及雜質，即可獲得含有石墨烯、氧

化鐵以及乳鐵蛋白之藥物載體(石墨烯/氧化鐵@乳鐵蛋白藥物載體)。其中，氧化鐵爲油性氧化鐵 Fe_3O_4 奈米粒子，其覆有油酸(Oleic acid)，製備方法可參考文獻 Sun, S. H., et al. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(1), 273-279。藥物係溶於步驟 1 之乳鐵蛋白水相溶液或步驟 3 之油相溶液，製得之藥物載體結構分別如第 4 圖之藥物載體 400 或第 5 圖之藥物載體 500。

【0085】 請參照第 18 圖，其係顯示依據上述方法製得之藥物載體的 SEM 電子顯微鏡影像圖。圖中載體之乳鐵蛋白濃度爲 2 wt%，且於製備載體時，氧化鐵濃度爲 16 mg/mL。載體需在特定的乳鐵蛋白與氧化鐵比例下才能較完整的成形。乳鐵蛋白的濃度會影響載體的大小，濃度越高則載體外層殼層越厚。藥物載體的大小則會影響包覆藥物的效率(Encapsulation efficiency, EE%)，由於藥物載體越大，其內部中空的體積也會越大，故藥物載體越大包覆效率越好。此外，當氧化鐵濃度不足 6 mg/ml 時，載體將無法成形，氧化鐵濃度需控制在 5~30 mg/ml 時，才能形成具有完整球形的載體。

【0086】 以下實驗例九至實驗例十以具有藥物載體 500 之結構的藥物載體進行實驗。

實驗例九

【0087】 磁導引：爲了驗證磁導引在治療腫瘤標靶的功效，利用磁鐵在老鼠腫瘤部位做磁導引動作，分別以 1 小時、4 小時以及 8 小時，三個不同的磁鐵吸附時間來觀察藥物載體透過磁導引後在腫瘤累積的效果。

【0088】 請參照第 19 圖，其係顯示無載體之對照組、未經磁導引之藥物載體組(載體組)以及經磁導引之藥物載體組(載體+磁導引組)於不同時間之腫瘤區域鐵濃度的柱狀圖。其中，柱狀物 1210、1220 以及 1230 分別代表載體組於 1、4、8 小時後，在腫瘤區域的鐵濃度，且柱狀物 1240、1250 以及 1260 分別代表載體+磁導引組經磁導引 1、4、8 小時後，在腫瘤區域的鐵濃度，而對照組由於並未注入藥物載體，故在腫瘤區域並不會有氧化鐵。由圖中可知，隨著時間的變長，載體組以及載體+磁導引組之腫瘤部位的鐵濃度會隨時間增加，若與沒有注射藥物載體的對照組相比，可以得知氧化鐵濃度的來源是藥物載體。未經磁導引之藥物載體亦可傳遞至腫瘤區域，但經磁導引，可大幅提升傳遞至腫瘤區域的藥物載體。

實驗例十

【0089】 實施例十係以上述製備方法製得包覆有薑黃素(Curcumin, Cur)之藥物載體，並測試其藥物釋放能力。請參照第 20 圖，其顯示藥物載體在不同環境下的累積釋放量-時間關係圖，其中線條 1310 以及 1320 分別代表藥物載體

在 40% 二甲基亞楓(Dimethyl sulfoxide, DMSO)+60%水以及 100%水的環境下之藥物隨時間的累積釋放量。由圖可知，包覆有薑黃素之藥物載體在 40% DMSO+60%水的環境下，其藥物釋放呈現兩階段，一開始釋放速度較快，而後緩慢釋放藥物。藥物載體在 100%水的環境下則不太會釋放藥物。

【0090】 本發明之藥物載體，可藉由乳鐵蛋白之腫瘤標靶的功能與專一性，使本發明之藥物載體於身體循環的時間增長，並可準確地抵達所欲治療的區域。此外，石墨烯可穩定載體結構，並利用其吸收 NIR 之特性，使本發明之藥物載體可藉由 NIR 控制藥物釋放的時機與釋放量。本發明之藥物載體可包含氧化鐵，使藥物載體除了具有光熱療的效果之外，還多了物理性的磁導引功能，並透過磁導引將藥物載體引導至所欲治療的區域，可加強藥物載體對該區域的標靶。本發明之藥物載體爲製程簡單又具有多功能的奈米蛋白無毒的中空載體，藉由改變其包覆的物質以達成各種不同之醫療目的，例如：包覆癌症藥物以達到化療的功能，包覆 DNA 或其他修復蛋白達到組織修復的功能，或是包覆其他螢光物質達到生物顯影的目的。本發明之藥物載體在臨床醫學上有巨大的潛力。

【0091】 雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護

範圍當視後附之申請專利範圍所界定者爲準。

【符號說明】

【0092】

100、200、400、500：藥物載體

110、210、410、510：水相溶液

120、220、420、520：乳鐵蛋白殼層

120a、220a、420a、520a：乳鐵蛋白

122a、222a、422a、522a：第一親水層

122b、222b、422b、522b：第二親水層

124、224、424、524：疏水層

130、230、430、530：石墨烯

140、240、440、540：藥物

310a、310b、320a、320b、330、340、610a、610b、620a、620b、630a、630b、640、650：步驟

450、550：氧化鐵

712、714、716、732、734、736、742、744、746、748、910、920、930、940、950、960、970、980、1310、1320：線條

722、724、726、810、820、830、840、850、860、870、880、890、1210、1220、1230、1240、1250、1260：柱狀物

1010、1110：腫瘤活細胞

1020、1120：腫瘤死細胞

申請專利範圍

1. 一種藥物載體，包含：

一水相溶液；

一乳鐵蛋白殼層，包覆該水相溶液，其中該乳鐵蛋白殼層包含：

至少兩層親水層；以及

至少一疏水層，夾於該些親水層之間；

複數個石墨烯，散佈於該疏水層中；以及

一藥物，位於該水相溶液及/或該疏水層中。

2. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中該乳鐵蛋白殼層係由雙性乳鐵蛋白組成。

3. 如請求項 2 所述之藥物載體，其中該雙性乳鐵蛋白佔該藥物載體總重之約 1~5 重量百分比。

4. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中該些石墨烯佔該藥物載體總重之約 0.05~0.5 重量百分比。

5. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中該些石墨烯爲還原氧化石墨烯。

6. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中該些石墨烯之直徑約爲 20~100 nm。

7. 如請求項 1 所述之藥物載體，更包含氧化鐵，散佈於該疏水層中。

8. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中該藥物載體之粒徑約爲 100~400 nm。

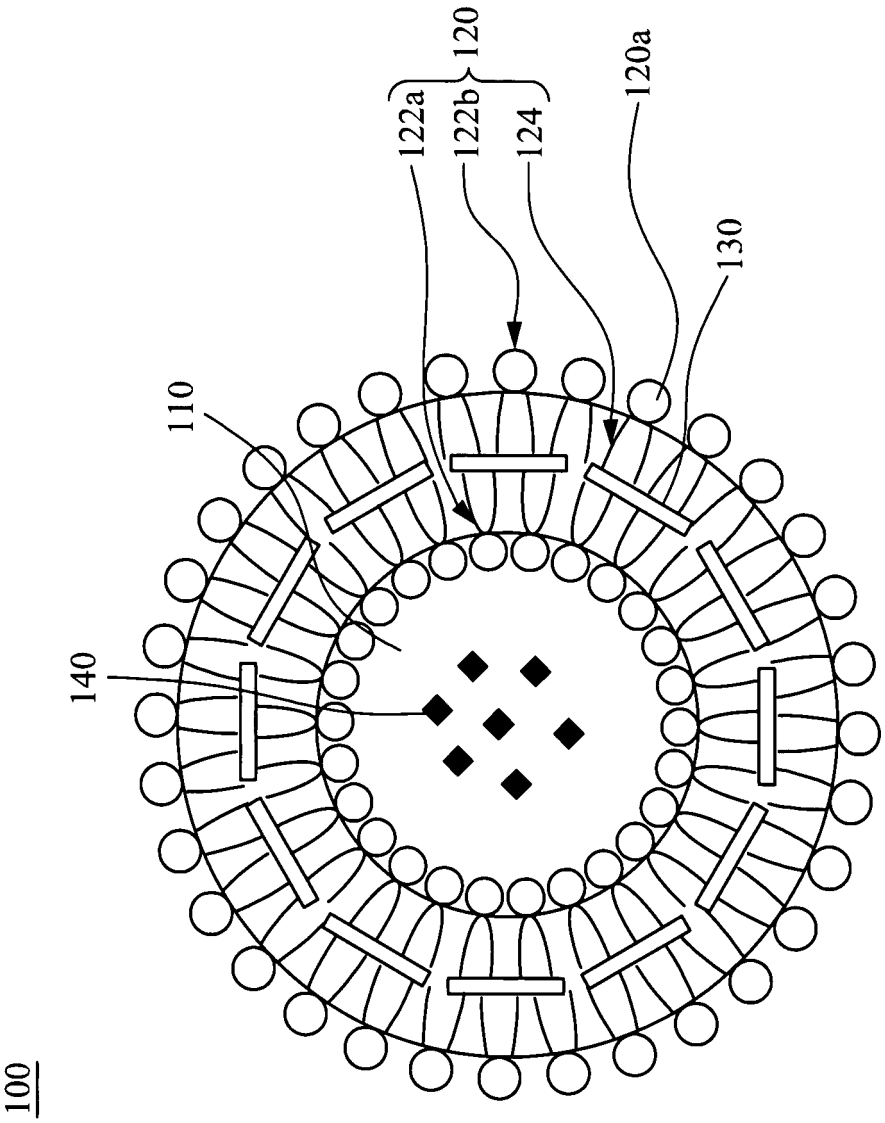
9. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中位於該水相溶液中之該藥物爲一親水性藥物。

10. 如請求項 9 所述之藥物載體，其中該親水性藥物爲小紅莓(Doxorubicin, DOX)或順鉑(Cisplatin，CDDP)。

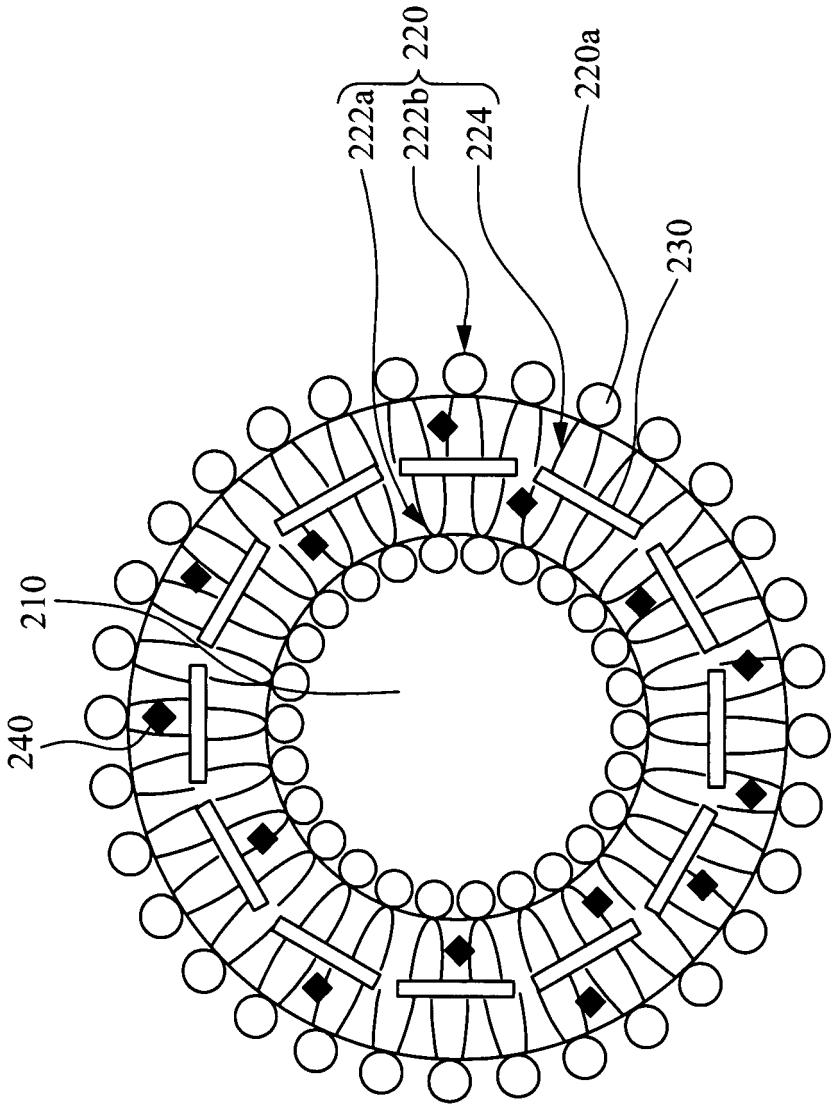
11. 如請求項 1 所述之藥物載體，其中位於該疏水層中之該藥物爲一疏水性藥物。

12. 如請求項 11 所述之藥物載體，其中該疏水性藥物爲薑黃素(Curcumin, Cur)或紫杉醇(Paclitaxel)。

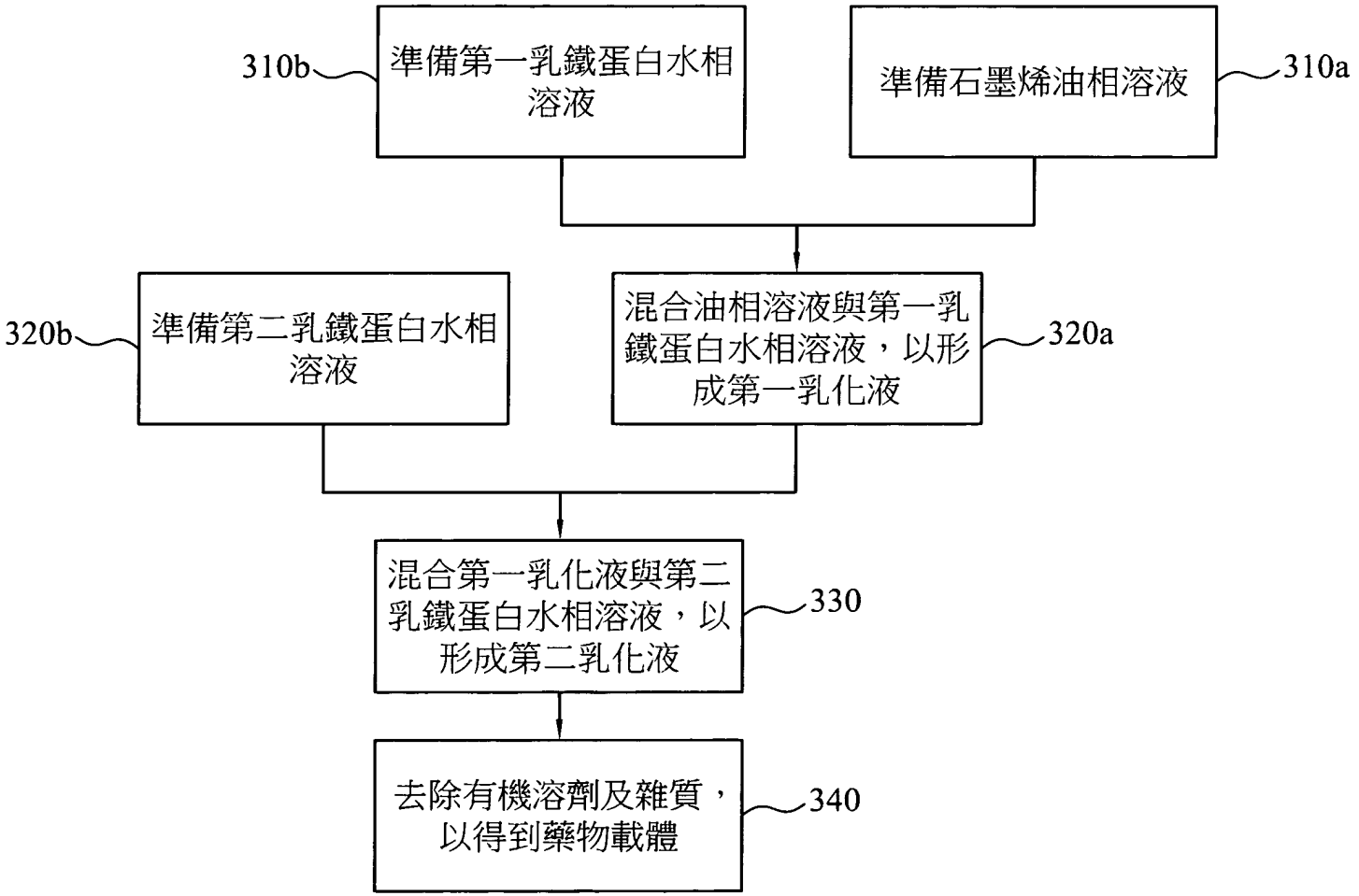
圖式



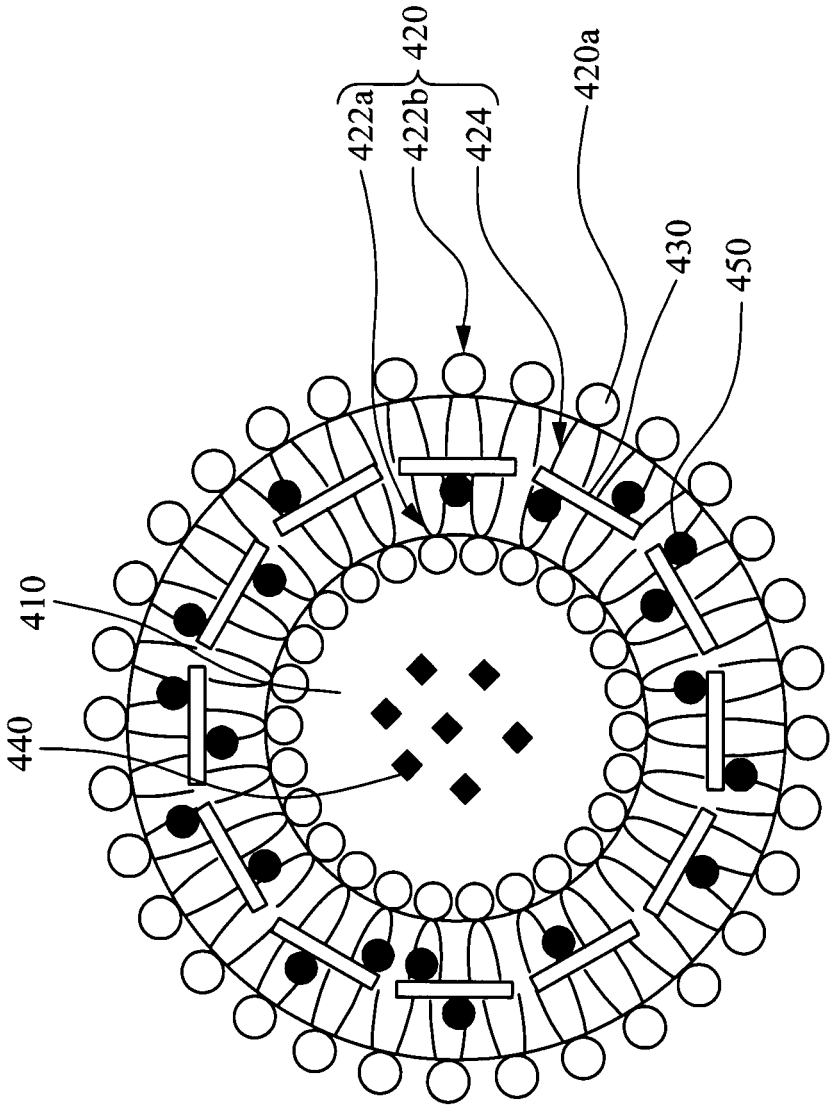
第 1 圖



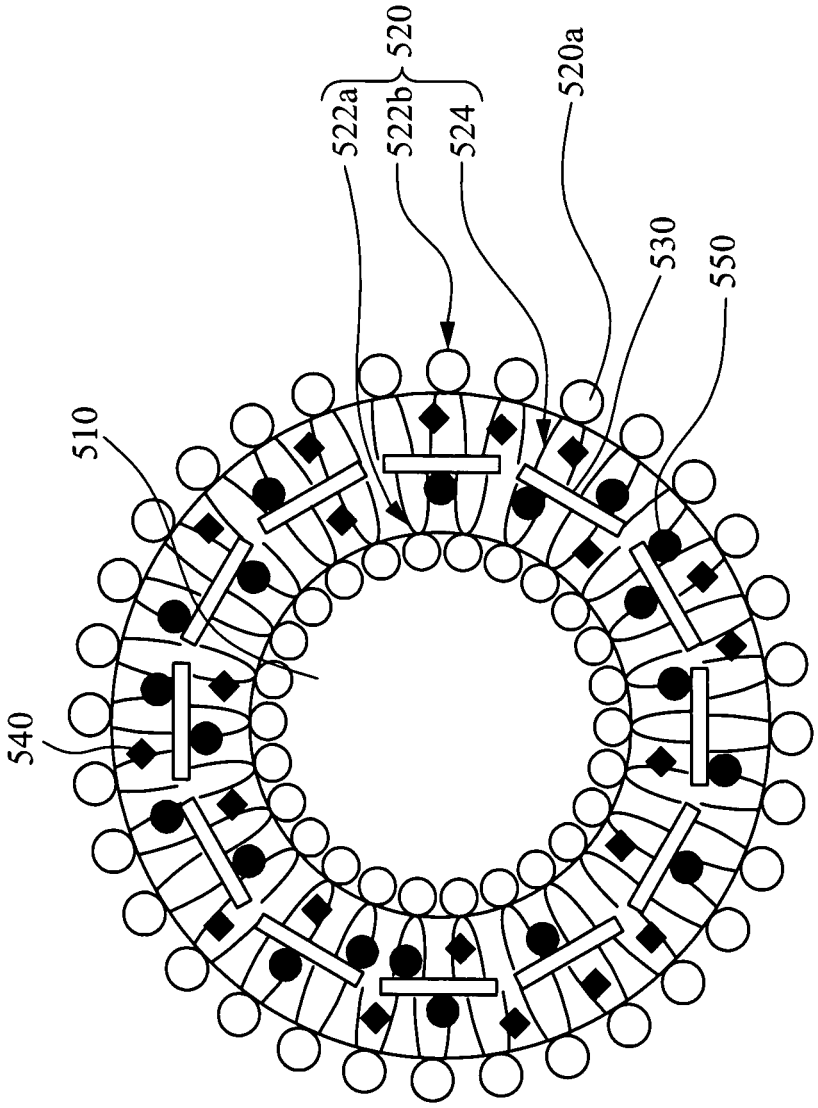
第 2 圖


310b
準備第一乳鐵蛋白水相溶液
準備石墨烯油相溶液
310a
320b
準備第二乳鐵蛋白水相溶液
混合油相溶液與第一乳鐵蛋白水相溶液，以形成第一乳化液
320a
混合第一乳化液與第二乳鐵蛋白水相溶液，以形成第二乳化液
330
去除有機溶劑及雜質，以得到藥物載體
340

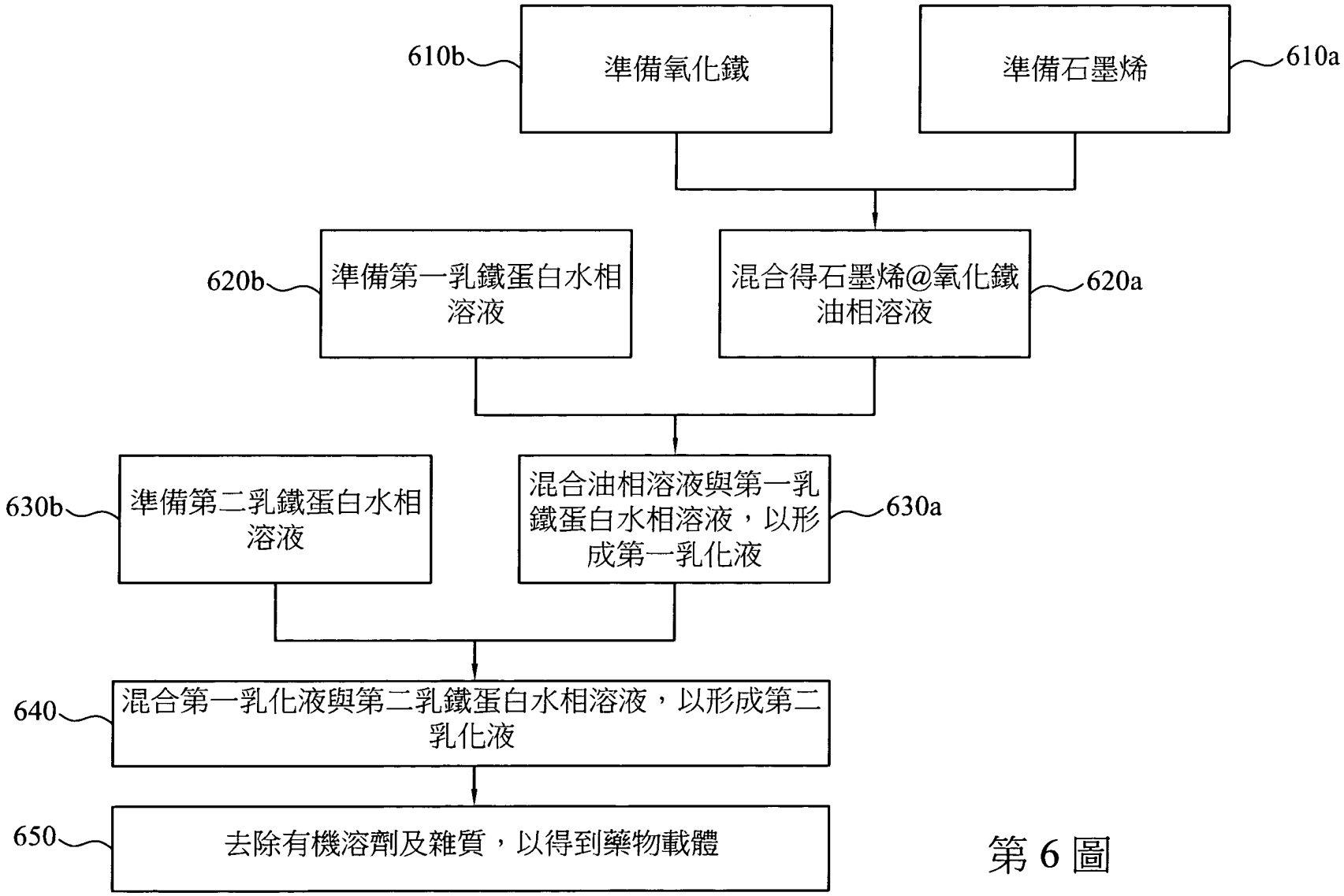
第 3 圖



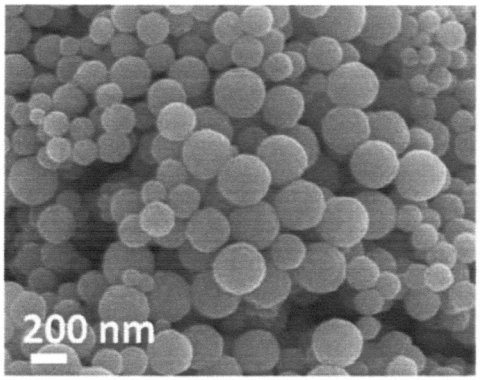
第 4 圖



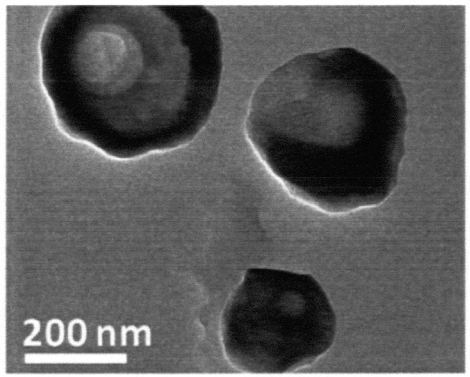
第 5 圖


610b
準備氧化鐵
準備石墨烯
610a
620b
準備第一乳鐵蛋白水相溶液
混合得石墨烯@氧化鐵油相溶液
620a
630b
準備第二乳鐵蛋白水相溶液
混合油相溶液與第一乳鐵蛋白水相溶液，以形成第一乳化液
630a
640
混合第一乳化液與第二乳鐵蛋白水相溶液，以形成第二乳化液
650
去除有機溶劑及雜質，以得到藥物載體

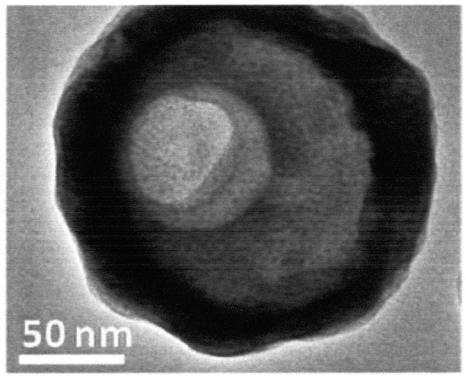
第 6 圖



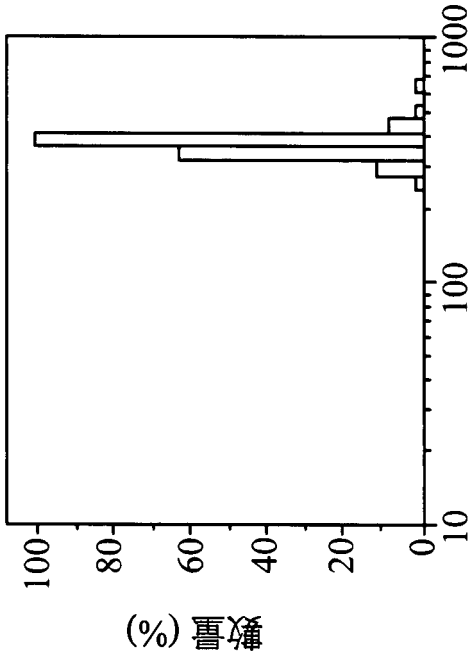
第 7A 圖



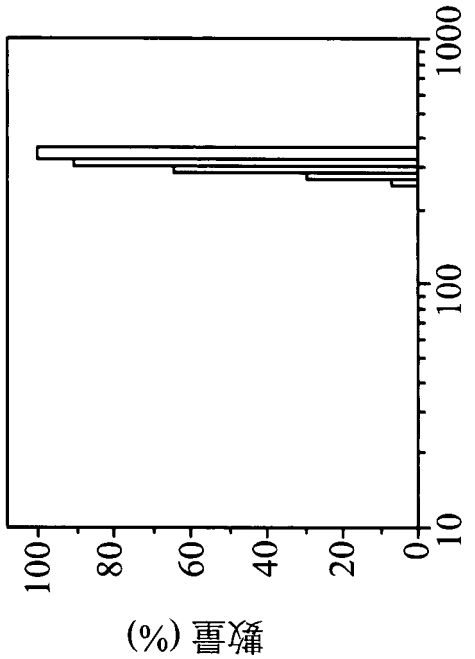
第 7B 圖



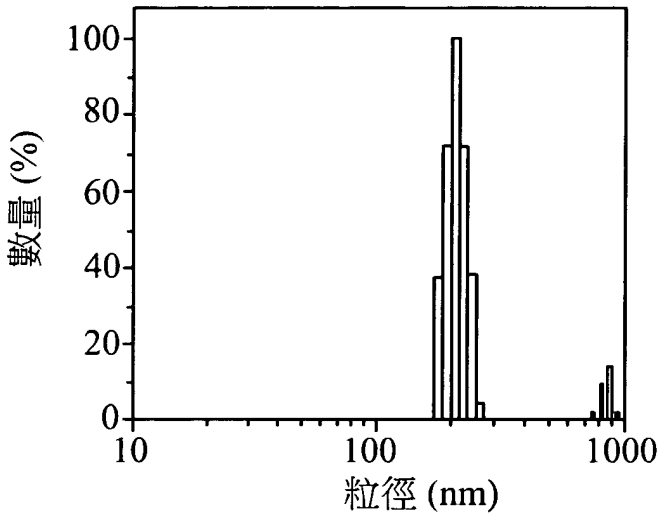
第 7C 圖


數量 (%)
0
20
40
60
80
100
10
100
1000
粒徑 (nm)

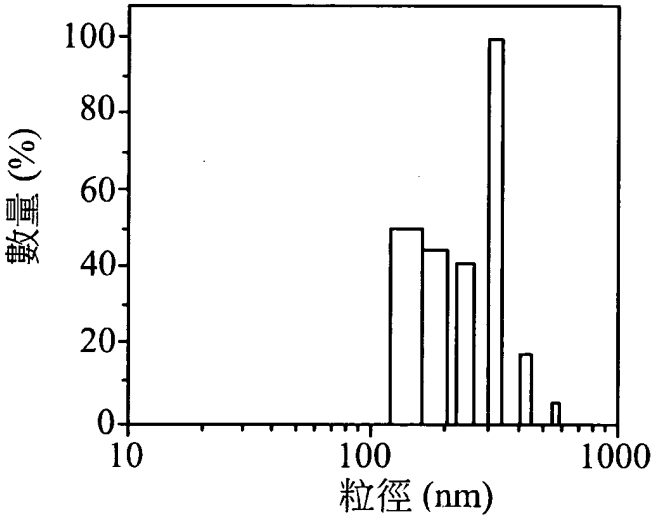
第 8B 圖


數量 (%)
0
20
40
60
80
100
10
100
1000
粒徑 (nm)

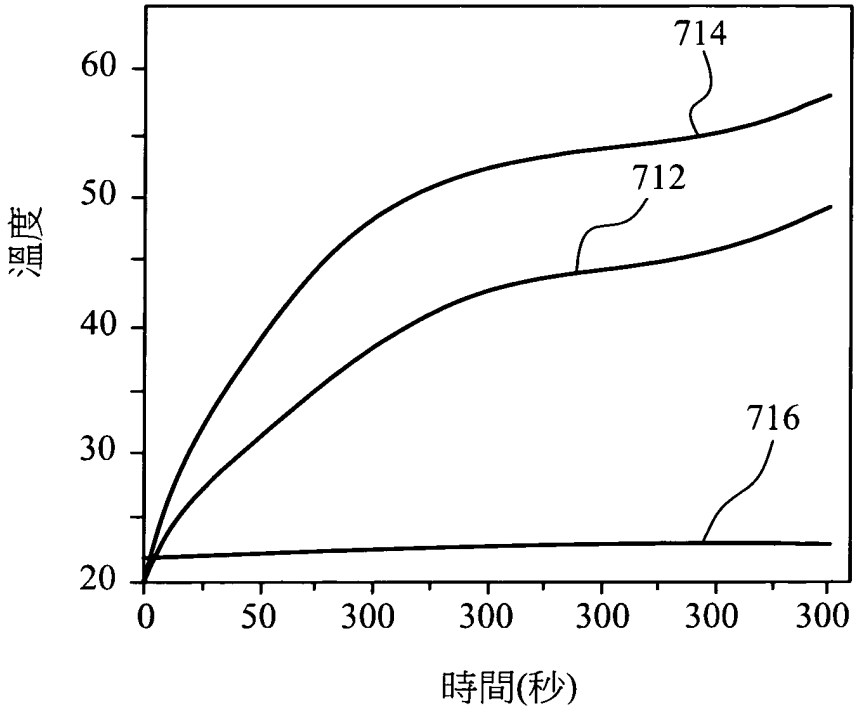
第 8A 圖


100
80
60
40
20
0
數量 (%)
10
100
1000
粒徑 (nm)

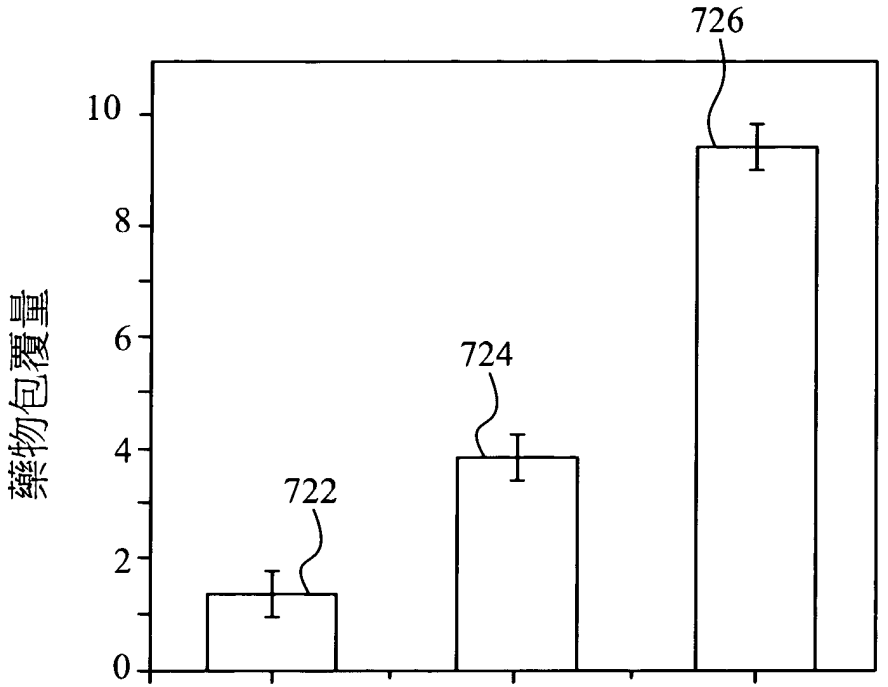
第 8C 圖


100
80
60
40
20
0
數量 (%)
10
100
1000
粒徑 (nm)

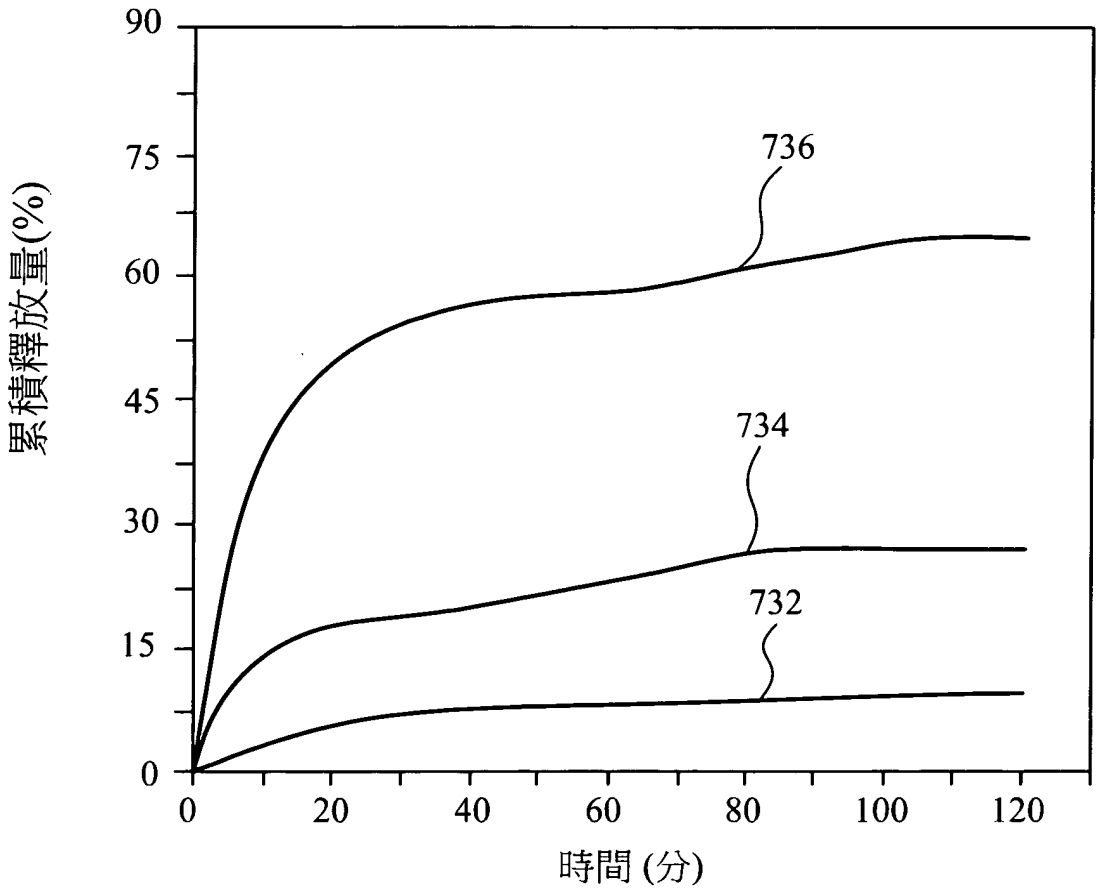
第 8D 圖


714
712
716
60
50
40
30
20
0
50
300
300
300
300
300
溫度
時間(秒)

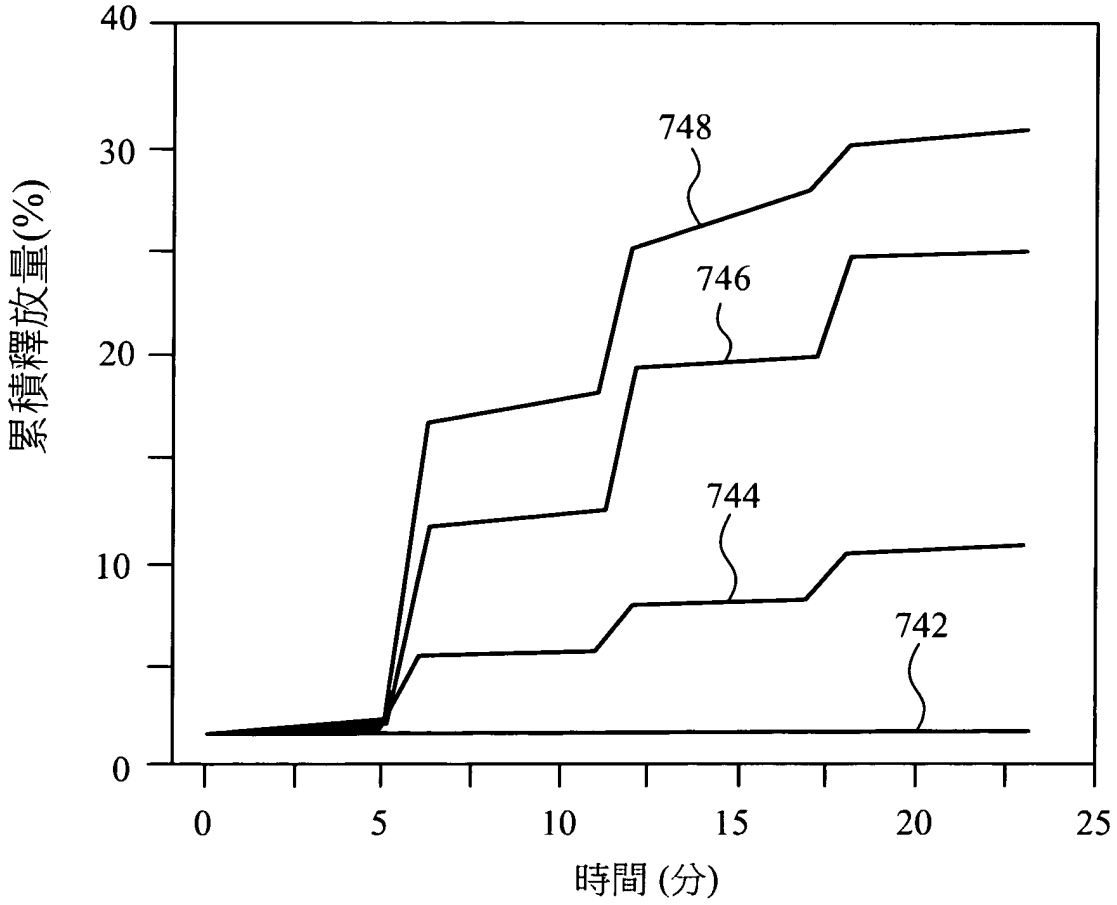
第 9A 圖


726
724
722
10
8
6
4
2
0
藥物包覆量

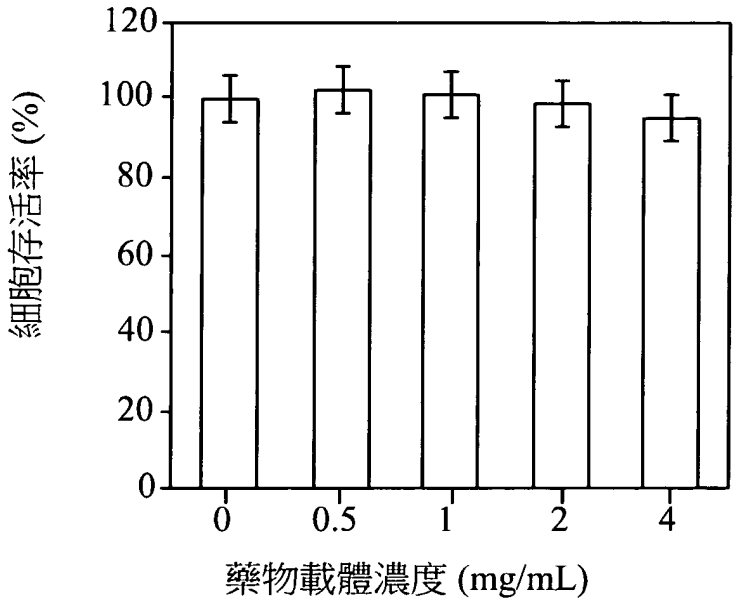
第 9B 圖



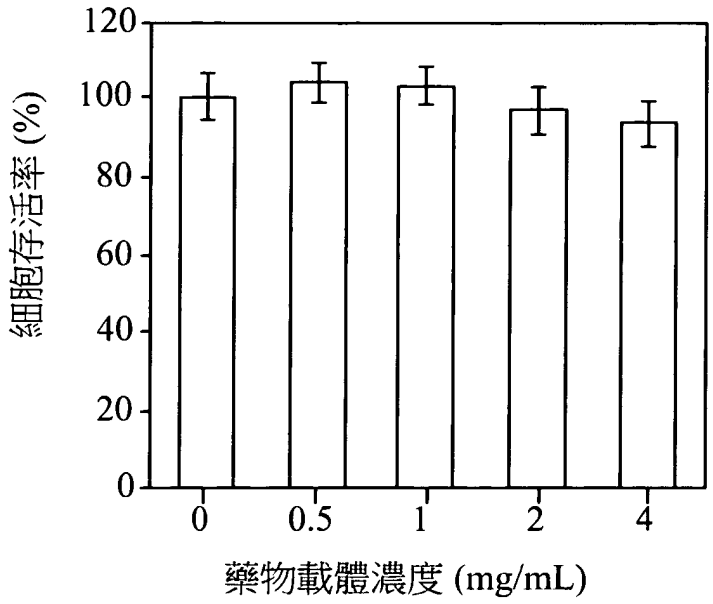
第 9C 圖



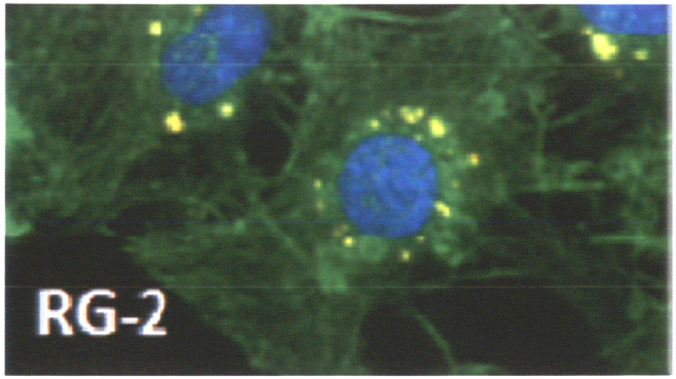
第 9D 圖


120
100
80
60
40
20
0
細胞存活率 (%)
0
0.5
1
2
4
藥物載體濃度 (mg/mL)

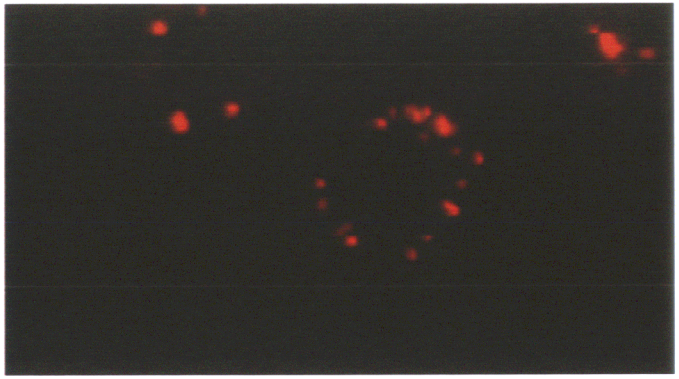
第 10A 圖


120
100
80
60
40
20
0
細胞存活率 (%)
0
0.5
1
2
4
藥物載體濃度 (mg/mL)

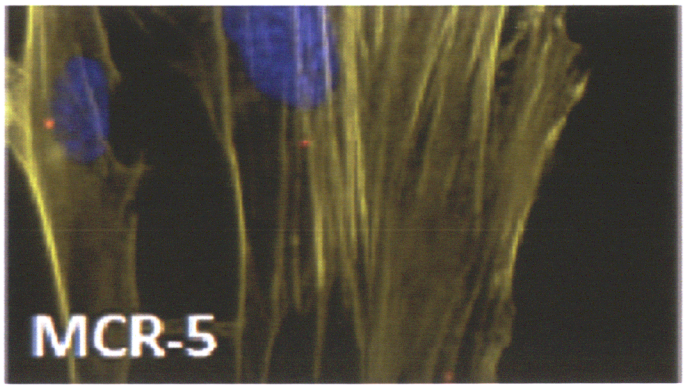
第 10B 圖



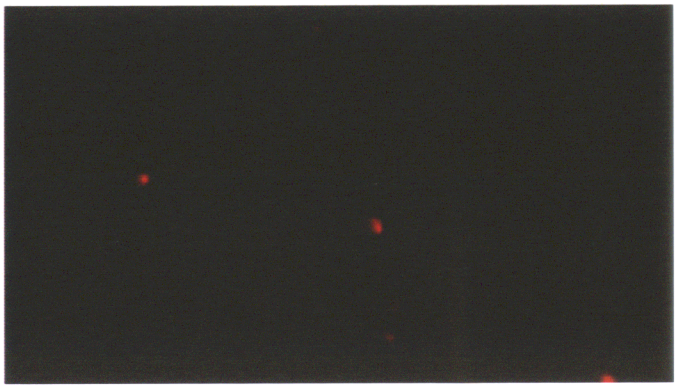
第 11A 圖



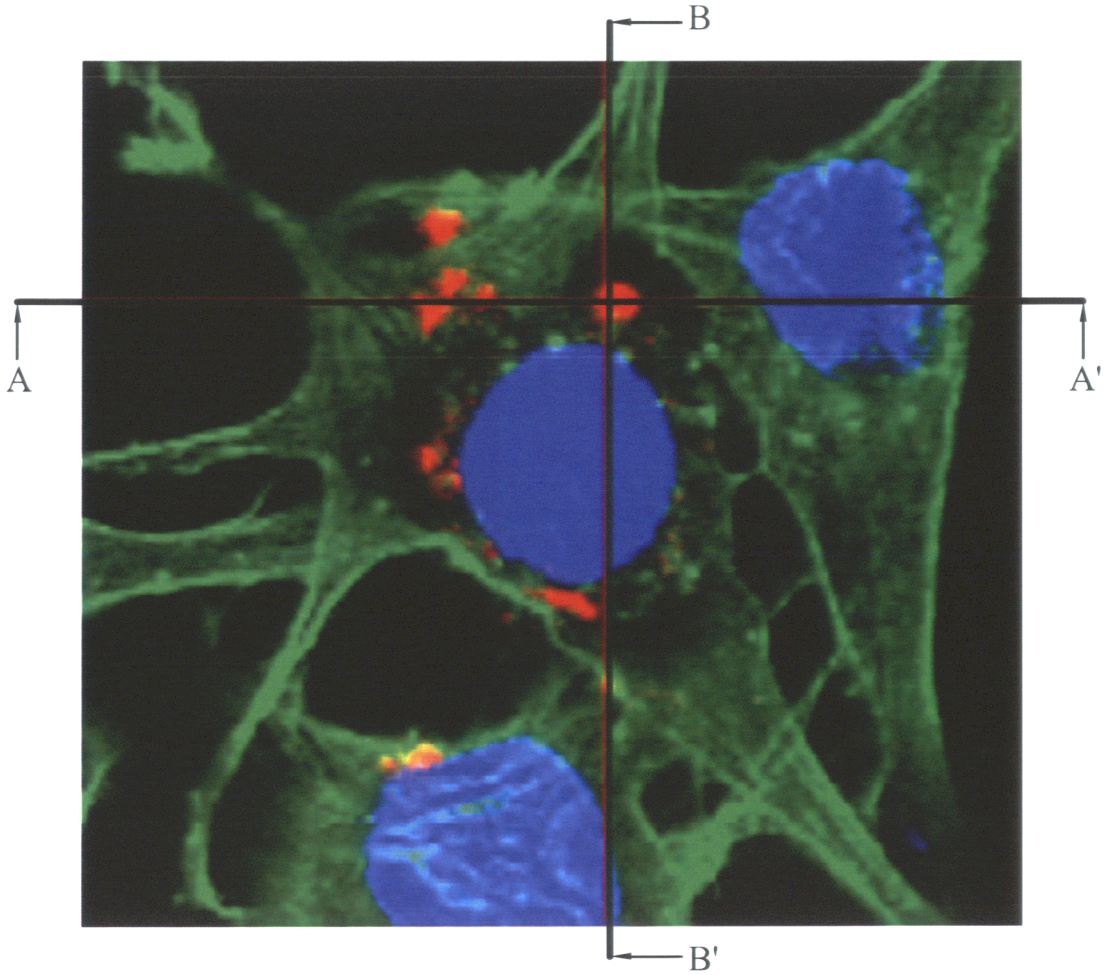
第 11B 圖



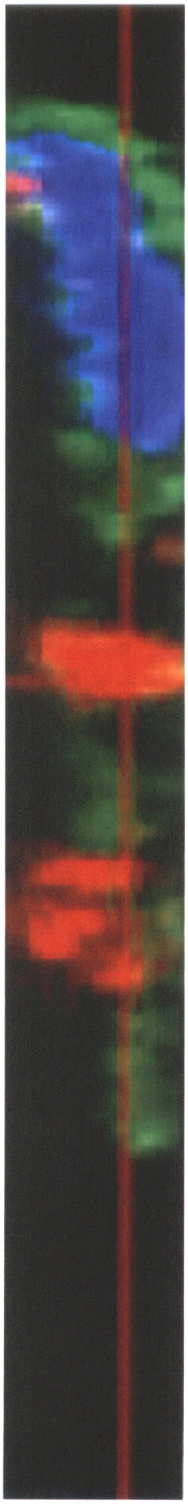
第 11C 圖



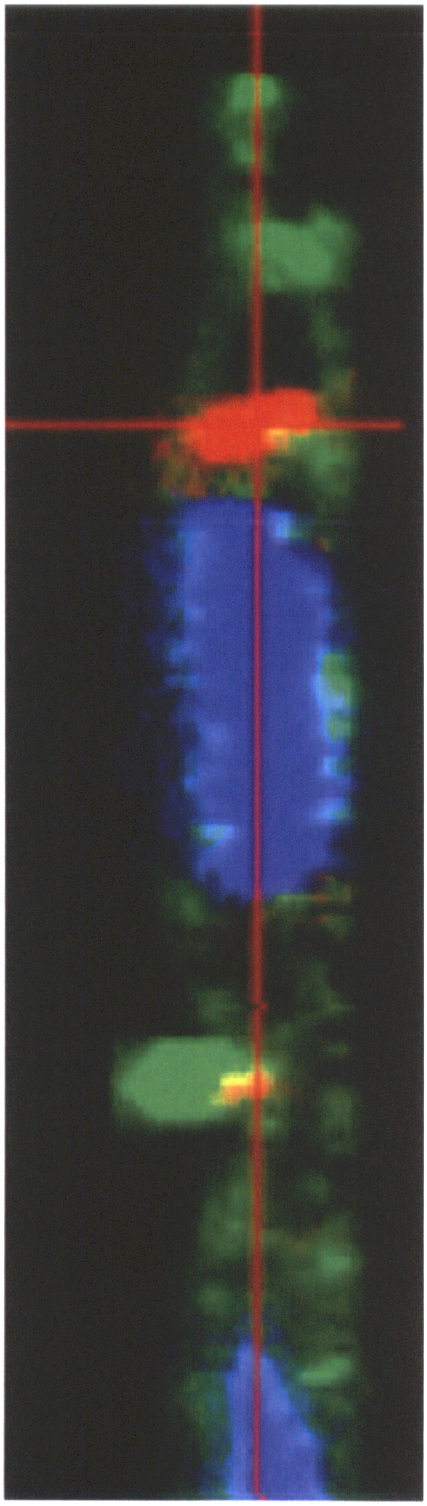
第 11D 圖



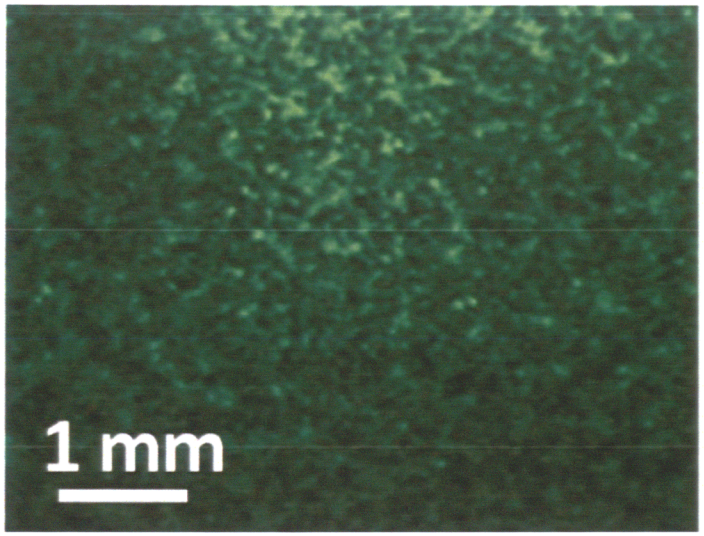
第 11E 圖



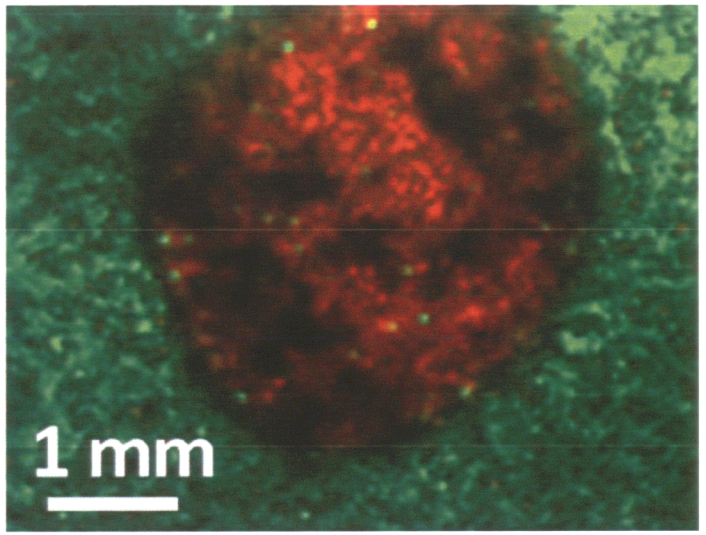
第 11F 圖



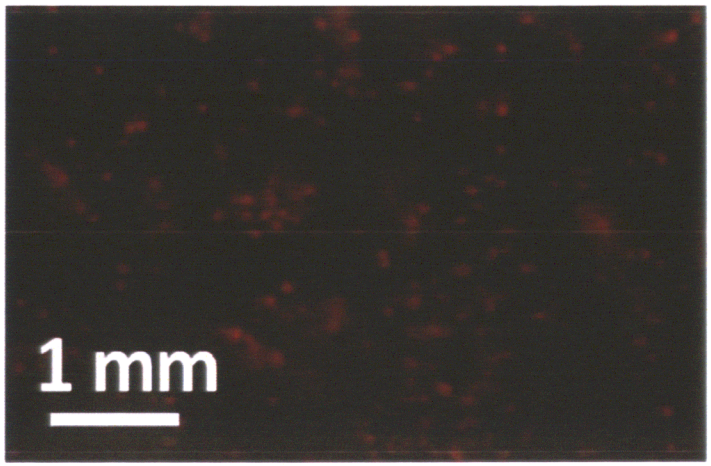
第 11G 圖



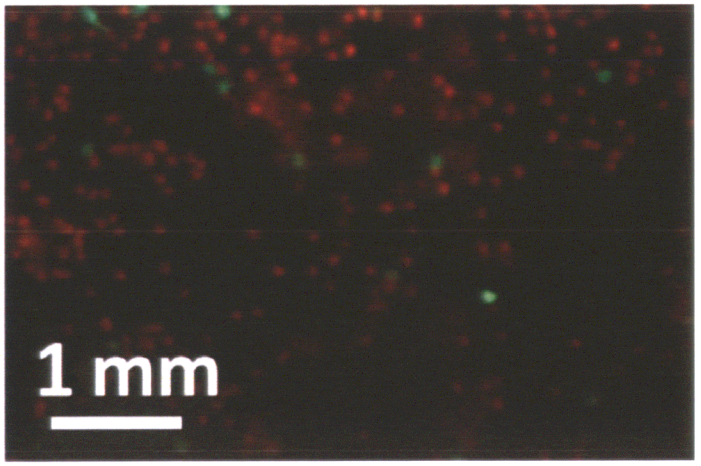
第 12A 圖



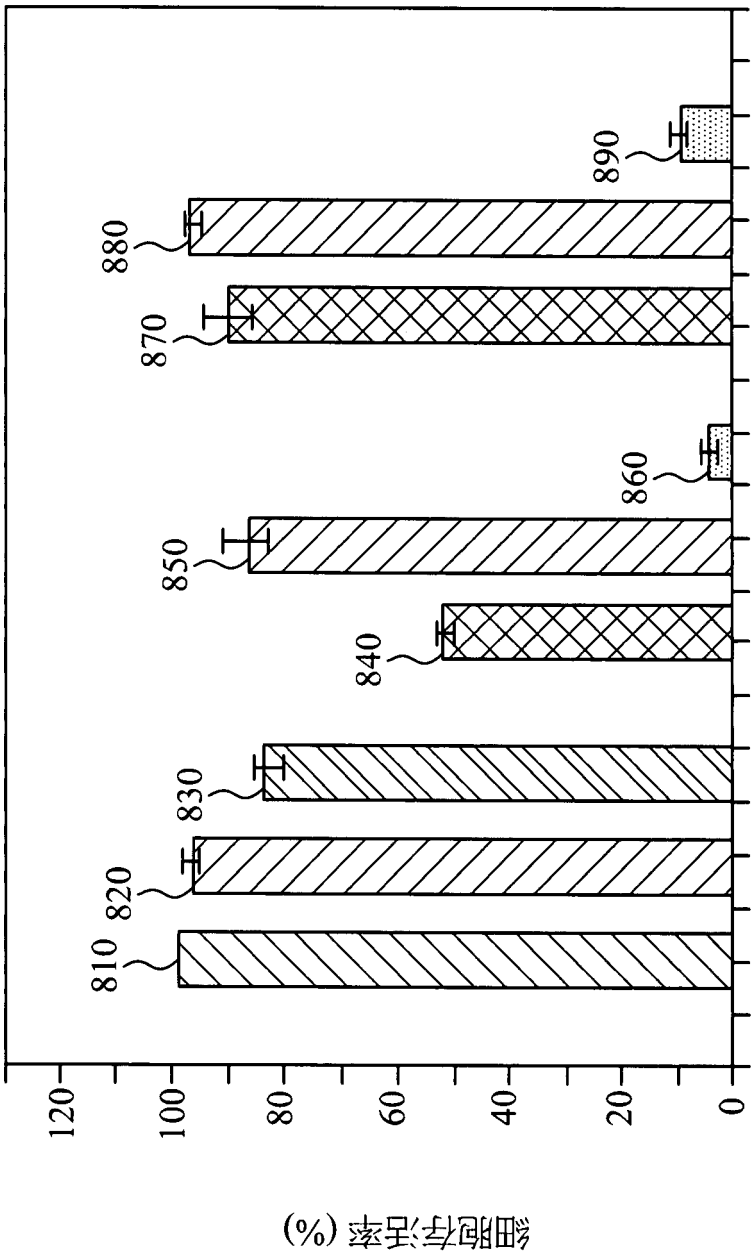
第 12B 圖



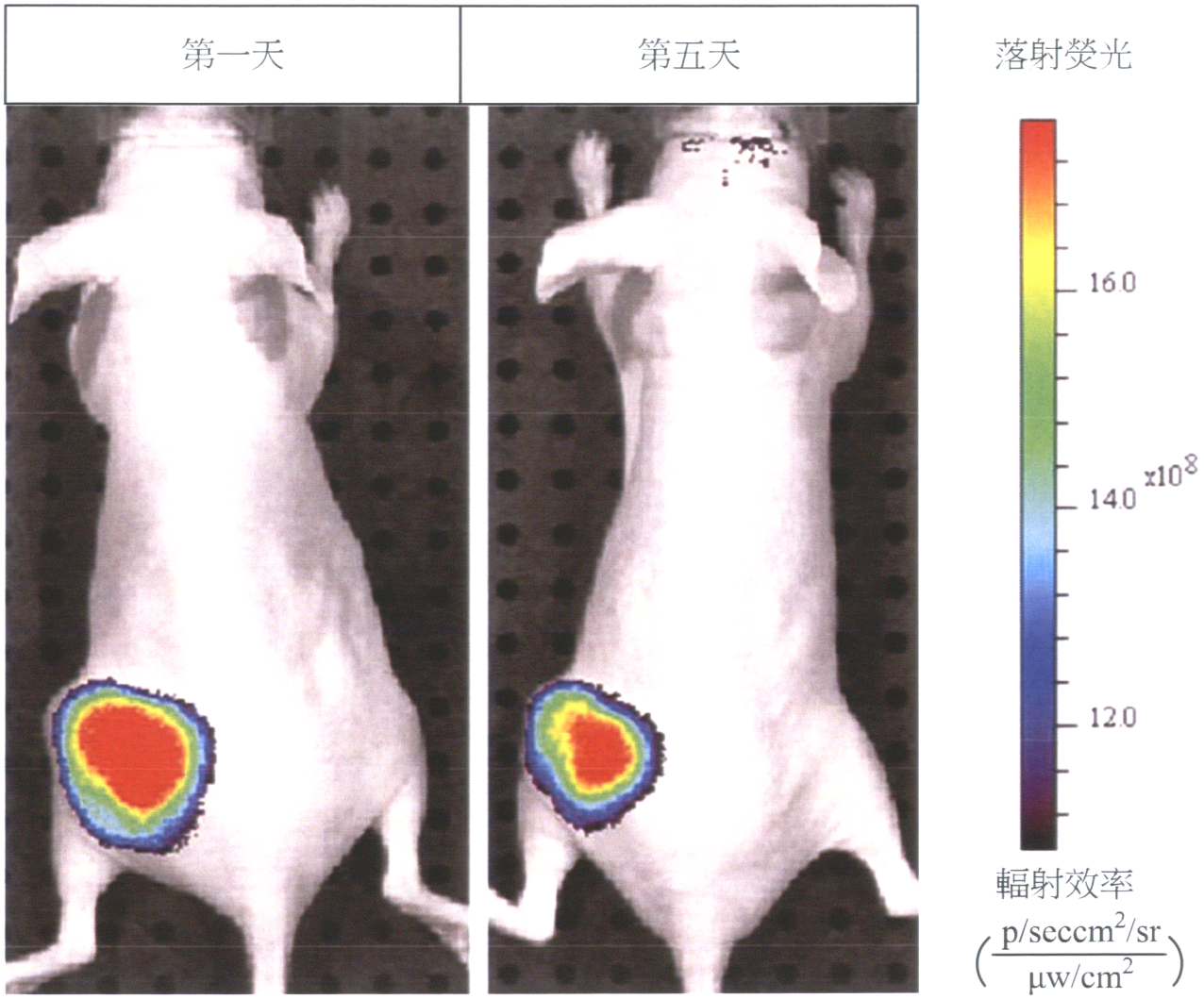
第 12C 圖



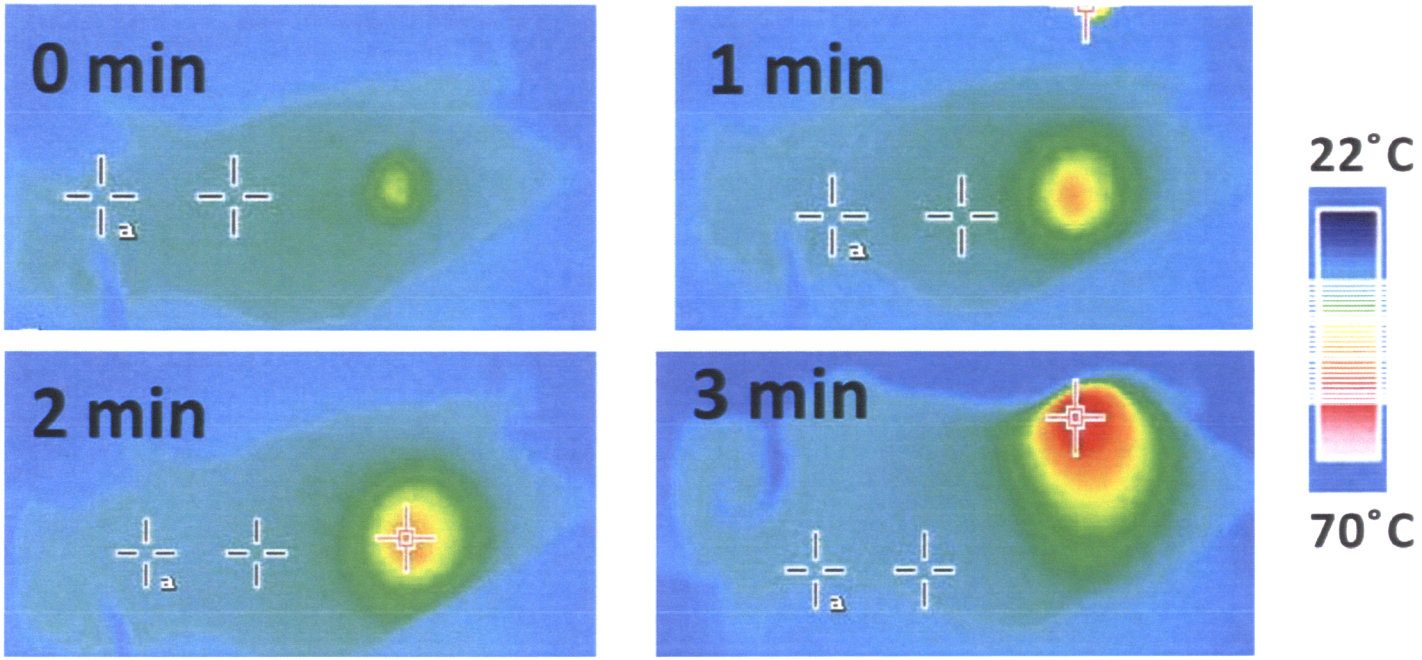
第 12D 圖



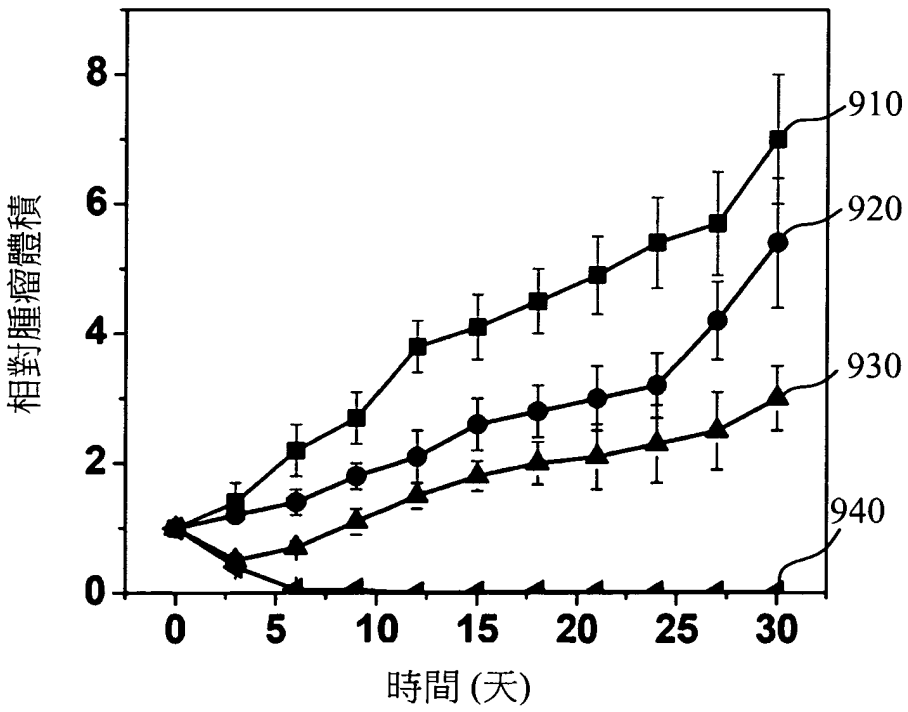
第 12E 圖



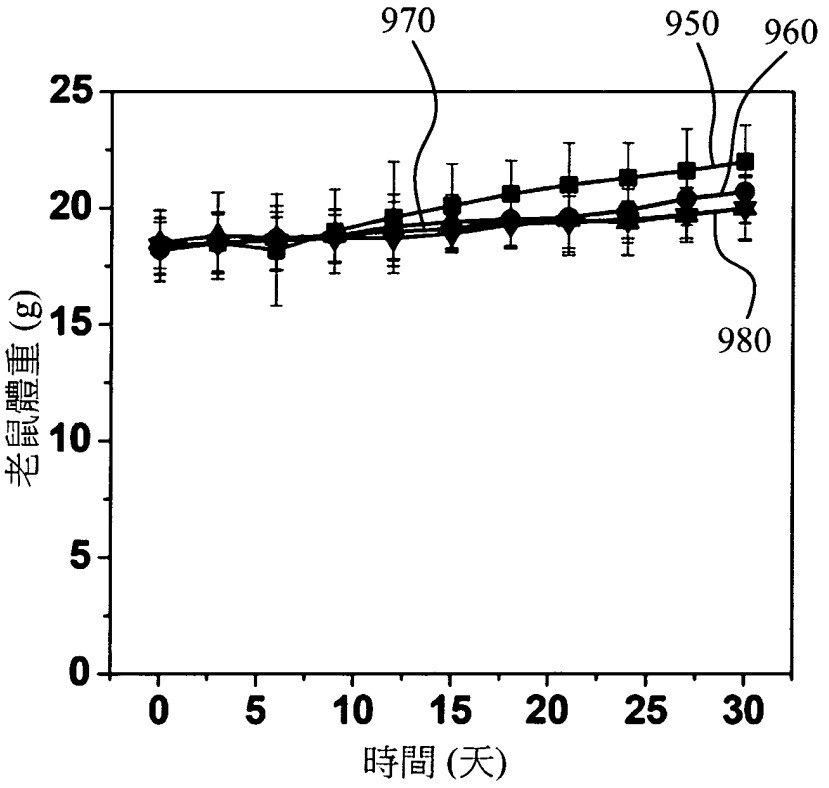
第 13 圖



第 14 圖

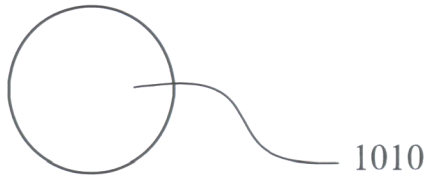

相對腫瘤體積
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
25
30
時間 (天)
910
920
930
940

第 15A 圖

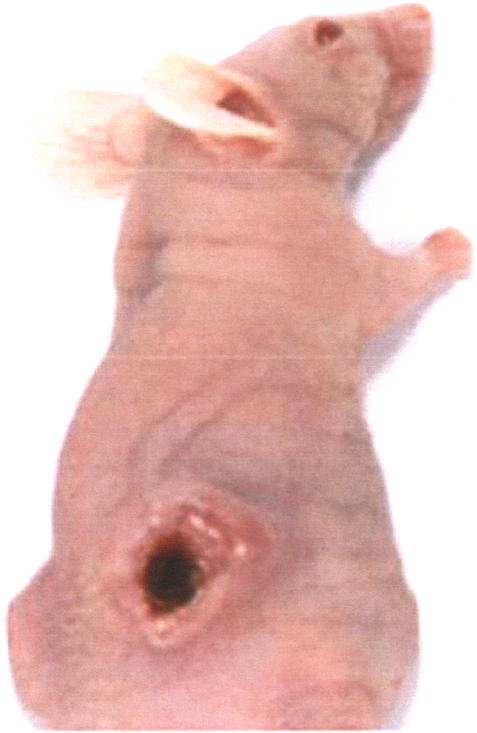

老鼠體重 (g)
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
時間 (天)
970
950
960
980

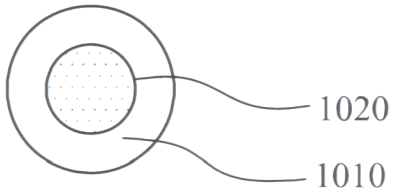
第 15B 圖





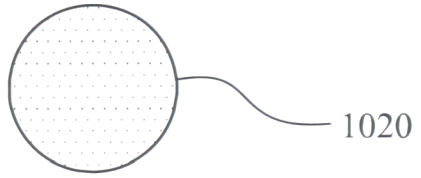
第 16A 圖



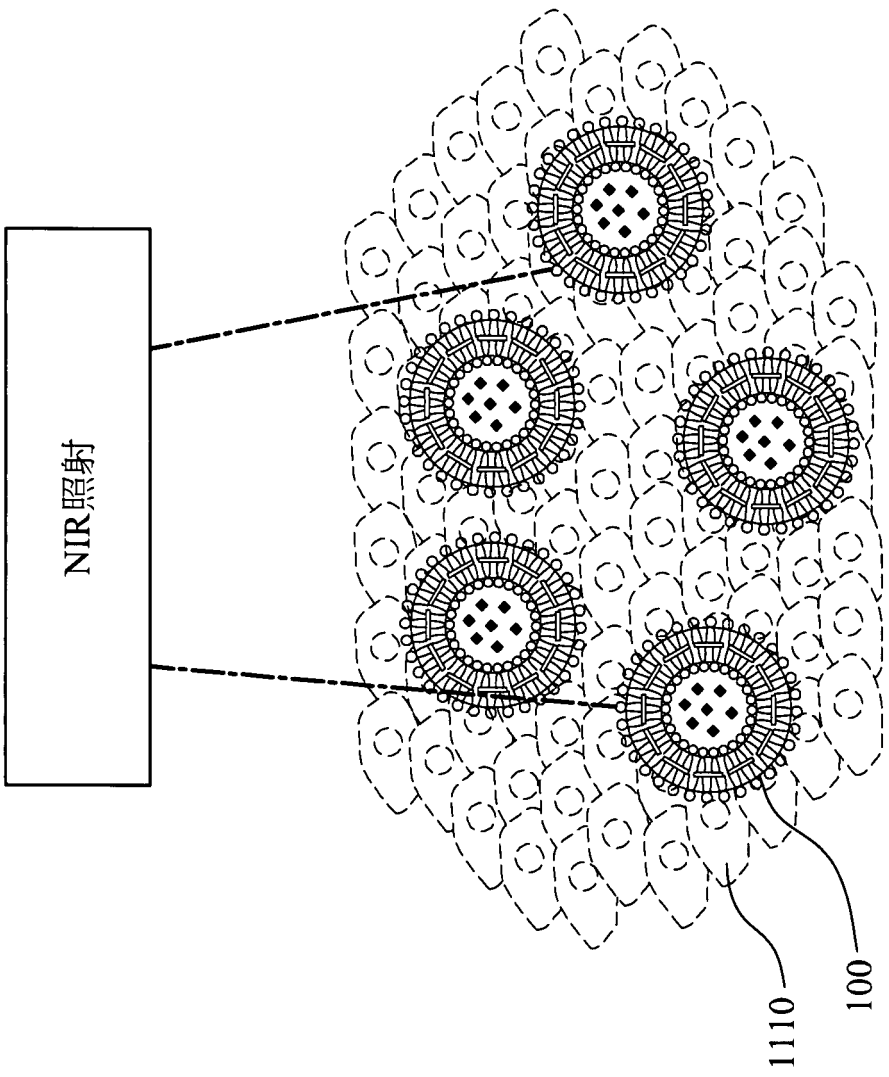


第 16B 圖

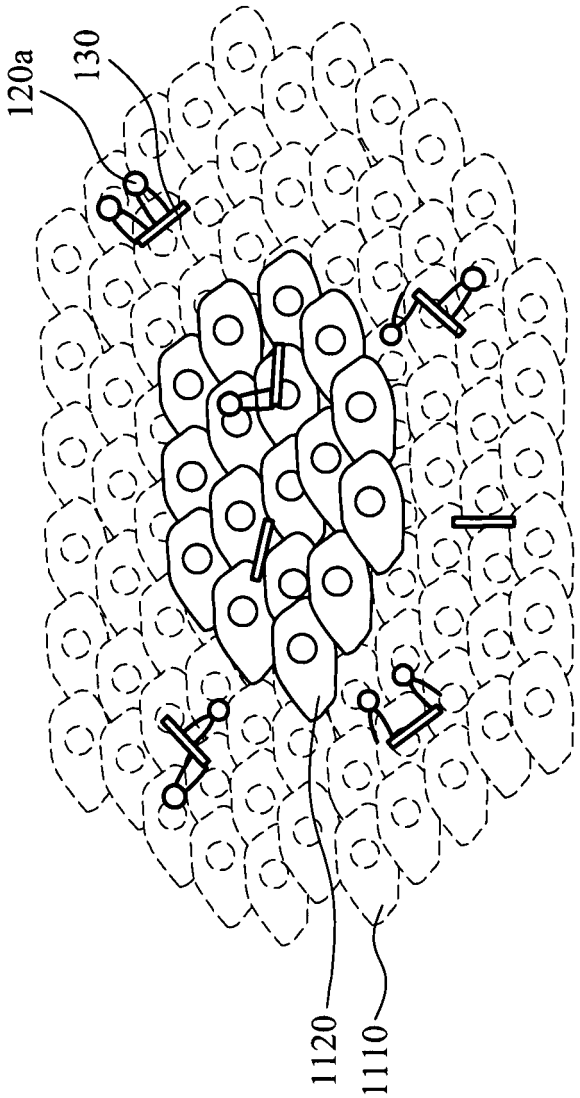




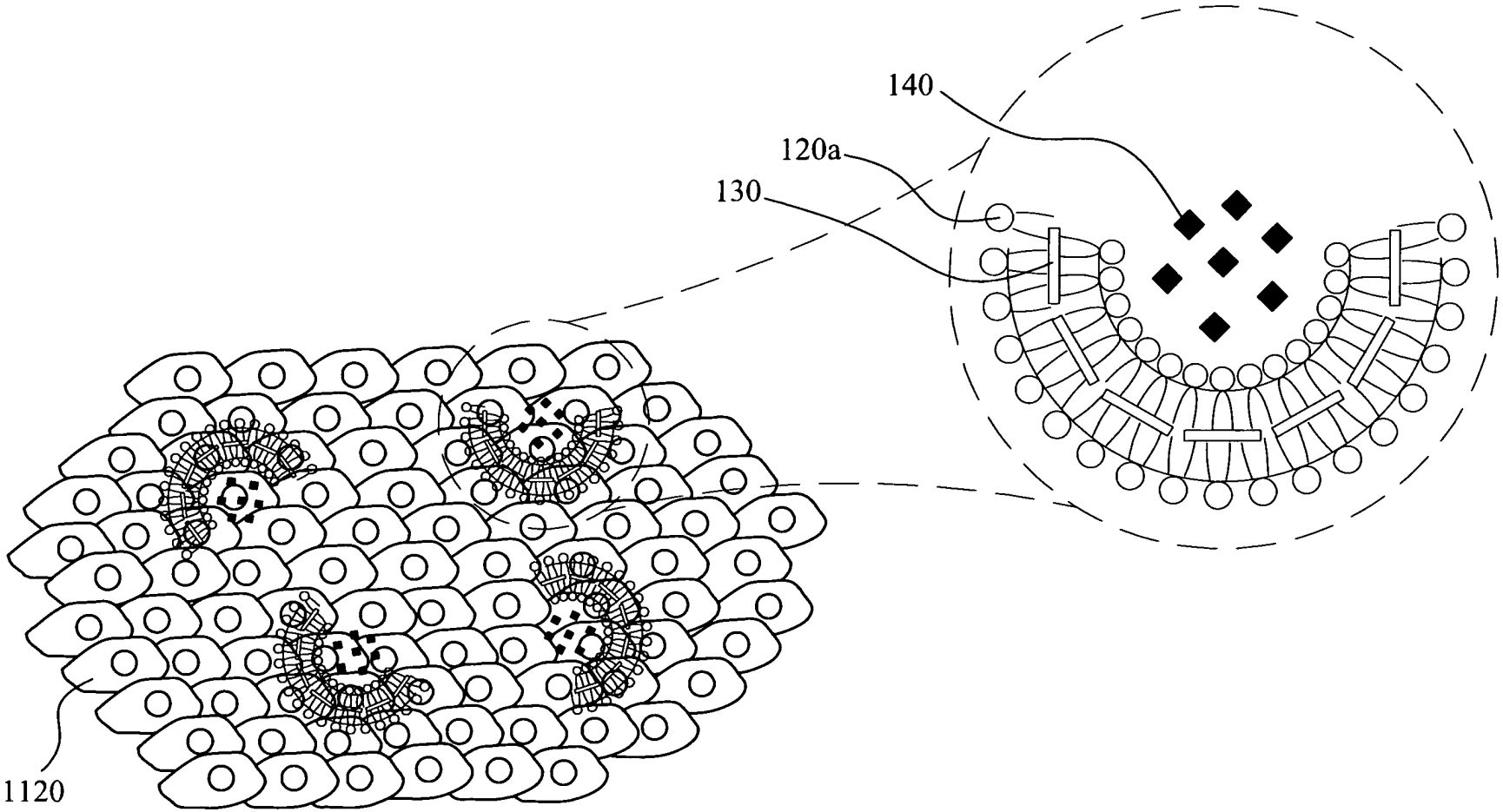
第 16C 圖



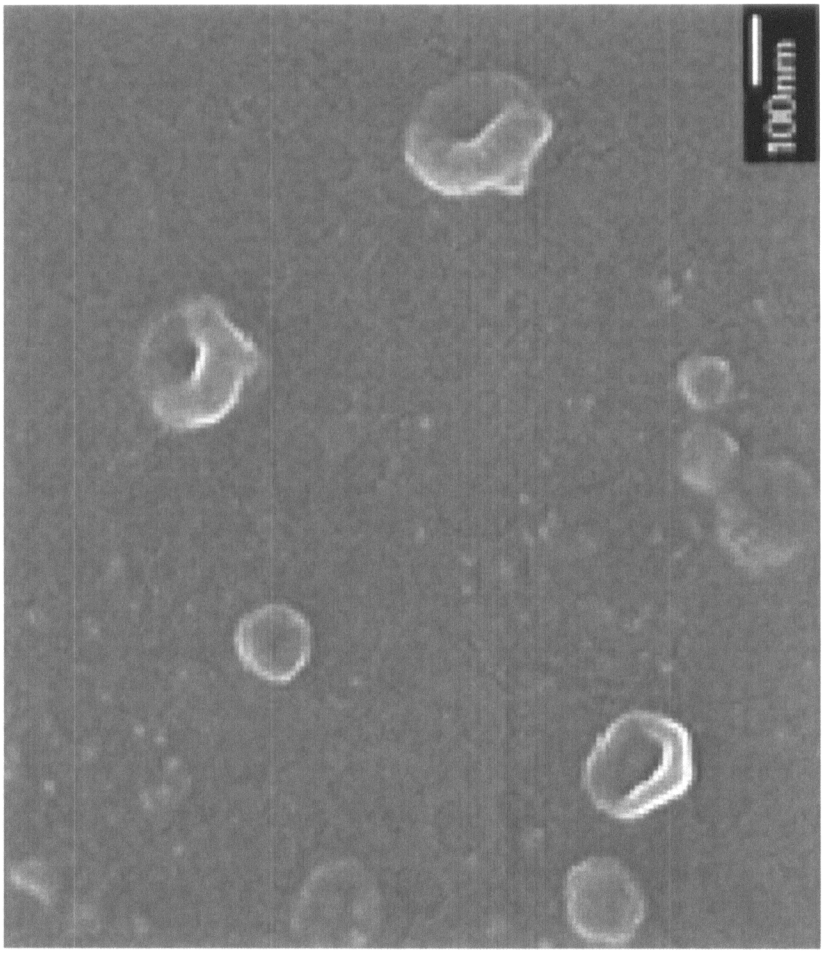
第 17A 圖



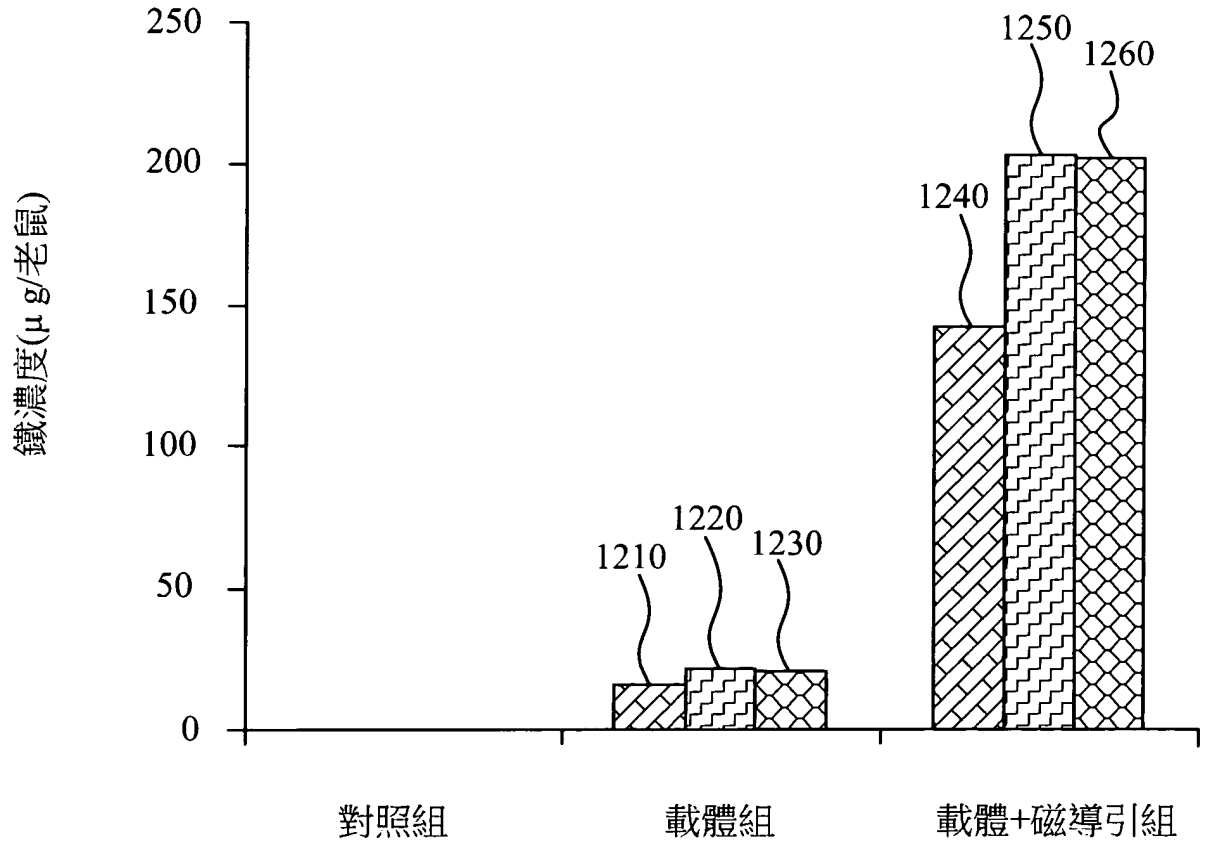
第 17B 圖



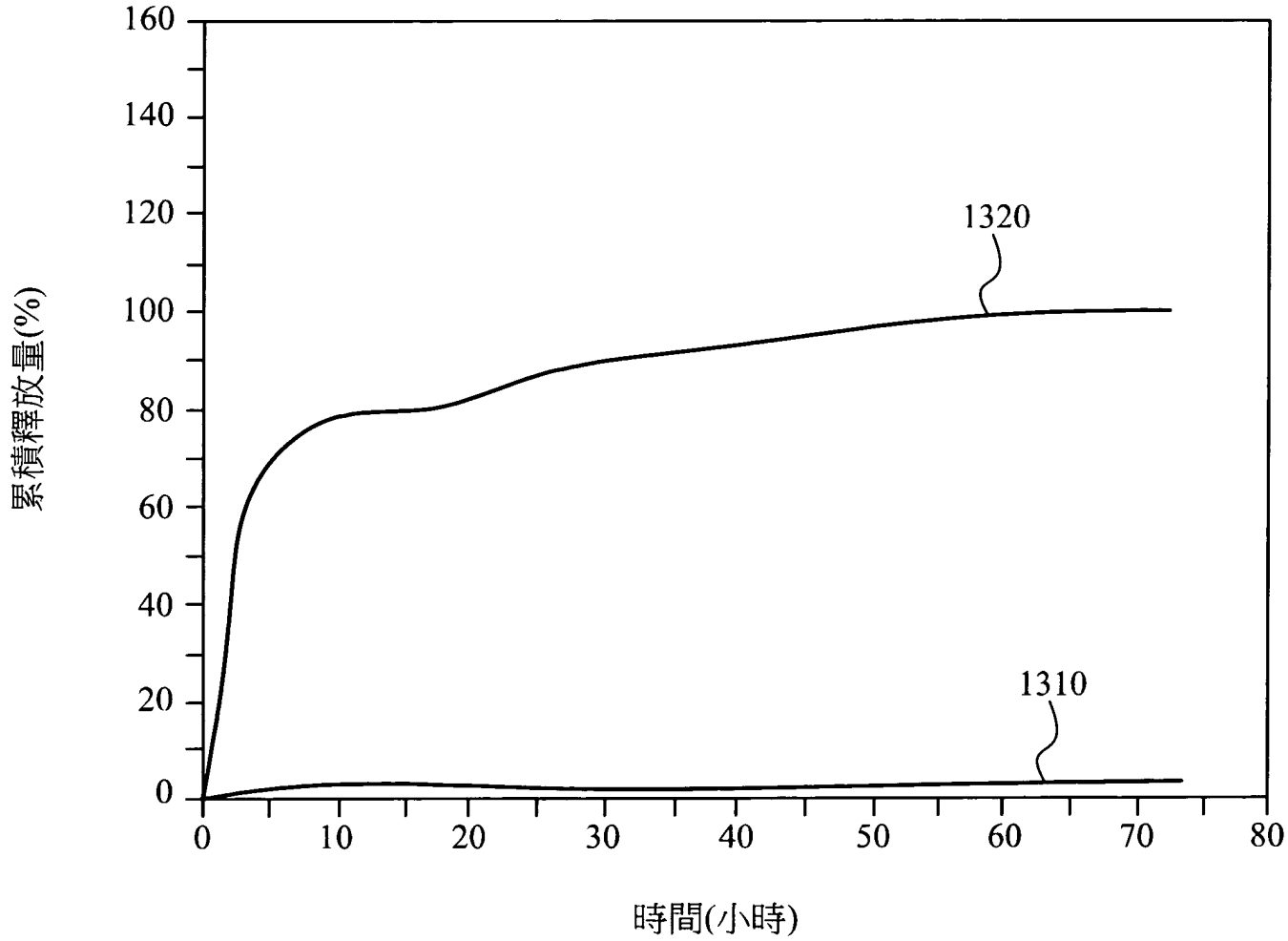
第 17C 圖



第 18 圖


250
200
150
100
50
0
鐵濃度(μg/老鼠)
1210
1220
1230
1240
1250
1260
對照組
載體組
載體+磁導引組

第 19 圖


160
140
120
100
80
60
40
20
0
累積釋放量(%)
1320
1310
0
10
20
30
40
50
60
70
80
時間(小時)

第 20 圖