

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

(轉移性腫瘤動物模型建立及體內放射治療應用研究)
(Establishment of metastatic animal tumor models and
their application in internal radiotherapy)

計畫編號：1022001INER049

受委託機關(構)：臺北榮民總醫院

計畫主持人：藍耿立

聯絡電話：(02) 2875-7270 ext. 206

E-mail address：kllan@vghtpe.gov.tw

核研所聯絡人員：徐維荃

報告日期：102 年 12 月 20 日

目 錄

| | |
|---|----|
| 目 錄 | I |
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 壹、計畫緣起與目的 | 5 |
| 貳、研究方法與過程 | 9 |
| 一、材料 | 9 |
| 二、細胞培養 | 9 |
| 三、動物腫瘤模式之建立 | 9 |
| 四、EGF-Lipo-Dox 製備..... | 10 |
| 五、微脂體對 doxorubicin 包覆率分析 | 10 |
| 六、測定 EGF-LipoDox 溶液之 doxorubicin 濃度 | 11 |
| 七、放射性 ^{111}In -oxine 藥物製備 | 12 |
| 八、放射性 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 藥物製備 | 12 |
| 九、細胞螢光攝取實驗 | 13 |
| 十、細胞毒殺實驗 | 13 |
| 十一、 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 細胞攝取實驗 | 14 |
| 十二、 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 於荷腫瘤小鼠模式之生物分布及藥物動力學實驗 | 14 |
| 十三、統計分析 | 15 |
| 參、主要發現與結論 | 16 |
| 一、EGF-LipoDox 製備及物理與化學性質分析 | 16 |
| 二、細胞螢光攝取實驗 | 17 |
| 三、細胞毒殺實驗 | 20 |
| 四、 ^{111}In -Lipo-Dox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 於 MDA-MB468 細胞之積聚..... | 21 |
| 五、 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 藥物於荷 MDA-MB468 | |

| | |
|--|-----------|
| 腫瘤小鼠之藥物動力學微脂體對 doxorubicin 包覆率分析 | 23 |
| 六、 ¹¹¹ n-EGF-LipoDoxI 及 ¹¹¹ In-LipoDox 藥物於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠之生物分布 | 24 |
| 肆、參考文獻 | 34 |

中文摘要

行政院原子能委員會核能研究所研發之奈米診療藥物銻¹⁸⁸-脂質體(Re¹⁸⁸-liposome)目前正針對具有多發性轉移的病人進行第零期人體臨床試驗。在此時，試驗顯示令人鼓舞的成果，同時沒有毒性跡象。核能研究所刻正申請 Re¹⁸⁸-liposome 劑量遞增之第一期人體臨床試驗。Re¹⁸⁸-脂質體在眾多的荷瘤動物模型已表現出顯著的療效。為了擴大 Re¹⁸⁸-脂質體技術的潛力，我們利用 Re¹⁸⁸-脂質體技術平台繼續開發腫瘤靶向脂質體藥物。人類上皮癌佔約 50%的所有癌症死亡。這種類型的癌症，其特徵在於過度活化和表達表皮生長因子受體(EGFR)。EGFR 訊號傳導通路是腫瘤細胞增殖，生存，轉移和血管生成的關鍵。EGF - EGFR 信號通路已被確認為一個重要的抗癌藥物靶標。在這個研究中，我們結合 EGF 與 LipoDox 並標記銻¹¹¹(In¹¹¹)產生 In¹¹¹-EGF LipoDox。我們利用 EGFR 高表達腫瘤細胞株 MDA - MB468 進行了 In¹¹¹-EGF LipoDox 特異性結合，內化和細胞毒性測試，並進行 In¹¹¹-EGF LipoDox 在 MDA - MB468 荷瘤動物中的分佈和藥物動力學研究。EGF-LipoDox 可經由與細胞 EGFR 專一性的結合並內吞，大幅增加細胞對微脂體包覆藥物的攝取量，同時也提高對 MDA-MB468 細胞的毒性。生物分布實驗結果顯示，荷 MDA-MB468 腫瘤之小鼠，注射 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 4 小時後，肝臟與脾臟之放射活性積聚分別為 43.85±4.24 及 70.56±18.31 %ID/g，注射後 96 小時則為 30.96±12.03 及 139.08±56.83 %ID/g，顯示 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 藥物快速被肝臟與脾臟吸收。¹¹¹In-EGF-LipoDox 在腫瘤的放射性活度的累積明顯高於肌肉中。我們將繼續結合 EGFR 靶向配體與脂質體包覆藥物並探討其在上皮

細胞生長素受體過度表達的腫瘤之臨床開發應用。

關鍵字：脂質體 liposome, 表皮生長因子 EGF、表皮生長因子受體 EGFR、腫瘤靶向 tumor-targeting

Abstract

Re¹⁸⁸-liposome developed by Institute of Nuclear Energy Research (INER) is currently under phase 0 human clinical trial in patients with multiple metastases. At this point, the trial has shown encouraging results of early sign of efficacy in the absence of toxicity. INER is applying for the permission for dose-escalating phase I. Re¹⁸⁸-liposome had shown significant efficacy in numerous tumor-bearing animal models. To extend the potential of Re¹⁸⁸-liposome technology, we continuously develop tumor targeting liposomal drug. Human epithelial cancers account for approximately 50% of all cancer deaths. This type of cancer is characterized by excessive activation and expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR). The EGFR pathway is critical for cancer cell proliferation, survival, metastasis and angiogenesis. The EGF-EGFR signaling pathway has been validated as an important anticancer drug target. In this project, we have conjugated EGF with LipoDox followed by labeling ¹¹¹In to generate ¹¹¹In-EGF-LipoDox as the radioactive surrogate. The specific binding, internalization and cytotoxicity (IC₅₀) of LipoDox and EGF-LipoDox in high EGFR-expression tumor cell lines (MDA-MB468) were investigated. The biodistribution and pharmacokinetics of radioactive counterparts in MDA-MB468 tumor-bearing animals were studied. High uptake of EGF-LipoDox was found in high EGF receptor-expressed MDA-MB468 cells. The radioactivity distribution after i.v. injection of ¹¹¹In-EGF-LipoDox revealed high liver and spleen uptake (43.85±4.24 and 70.56±18.31 %ID/g at 4 h p.i., individually). The accumulation of radioactivity in tumor was modest, but still higher than that in muscle. We will continue exploring incorporate this EGFR

targeting ligands with liposomal drug for treatment of EGFR-expressing cancers.

Key words: liposome, epidermal growth factor (EGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), tumor-targeting

壹、計畫緣起與目的

癌症是國人十大死因之首，傳統治療常利用手術切除腫瘤，並合併放射線治療及化學治療。化學療法為了避免抗癌藥物造成正常組織毒性而產生的副作用，常常只能給予低於適當濃度的抗癌藥物劑量，因此伴隨著抗藥性以及癌細胞轉移的發生，造成治療的失敗。標靶治療能夠減低藥物的副作用，增加抗癌療效，冀望能發展成為新的癌症療法。

人類表皮生長因子(EGF)是由 53 個氨基酸組成的小分子多肽，分子量約 6000 dalton，分子內有三對二硫鍵結構，其相關之惡性腫瘤佔了所有癌症致死率的一半以上。這類型癌症的特色是表皮生長因子以及它們的受體(EGFR)家族過度的活化，激發受體內在酪氨酸激酶的活性，引發細胞內的訊息傳遞，而此訊息傳導路徑在癌症細胞增生、存活、代謝、血管生成以及對化學及放射治療之拮抗性扮演著關鍵的角色[1,2]，並已被驗證為重要的抗癌藥物機制；部分針對此生長因子的標靶治療藥物已進入臨床使用[1]。表皮生長因子與受體結合時形成二聚體並誘發細胞內吞，此作用有利於標靶藥物進入細胞內造成 DNA 傷害。

Doxorubicin 是一種廣泛使用及對多種癌症均有治療效果的抗癌藥物，主要作用機制是經由螯合 DNA、抑制 topoisomerase II 和產生氫氧自由基等來毒殺細胞。除了一般常見的化療副作用如嘔吐、噁心、黏模組織發炎和脫髮外，由於心肌對氫氧自由基的傷害特別敏感，而 doxorubicin 容易對心臟產生累積性的傷害，因而限制了這個藥物的使用[3,4]。利用微脂體包覆之 doxorubicin (liposomal

doxorubicin；商品名 LipoDox[®])可降低 doxorubicin 所引發的急性及慢性毒性，但不會降低其抗癌的活性，對 AIDS-related Kaposi's sarcoma、乳癌與卵巢癌之療效較 doxorubicin 為佳[5]。

微脂體是由磷脂質雙層膜(phospholipid bilayer)所組成的雙層空心微球，粒徑由幾十個奈米(nm)到幾十個微米(μm)。磷脂質磷酸端為親水性，脂質端為疏水性，可同時作為厭水性(hydrophobic)及親水性(hydrophilic)藥品的載體；親水性藥品可包覆在微脂體內的水溶液中，厭水性藥品則可以包埋在微脂體的脂雙層中。包覆在微脂體內的藥物在血清中不易被代謝，可舒緩藥物與正常組織的直接接觸，有效降低副作用。利用表面修飾方法，可將微脂體表面進行多樣性變化，微脂體表層插上聚乙二醇等聚合物分子修飾，可以穩定微脂體的結構，還能降低微脂體被網狀內皮系統清除的速率，因此可以延長微脂體於生物體內循環的半衰期[4,6]。微脂體類的大分子載體無法穿透健康的血管上皮組織，因此被包覆藥物在正常組織的積聚量可望大幅降低；另一方面腫瘤血管內皮組織間隙較大，足夠容許大分子載體通過，因此微脂體可於腫瘤處滲出而積聚在腫瘤(此效應被稱為 enhanced permeability and retention, EPR, effect，可視為一種被動式標靶作用)，達到較為理想之藥物動力學[7]。

微脂體目前已被廣泛應用做為各類治療藥物的標靶運送載體，但一般的微脂體只具有被動性的標靶作用，主動性標靶免疫微脂體是近來微脂體領域研究的趨勢與重點[8,9,10]。在微脂體上加上特定的抗體或具細胞黏附作用的配體(biological cell adhesive ligand)即可增強其在特定組織、細胞或病源上結合的能力。主動性標靶免疫微脂體目前主要利用 PEG-DSPE(polyethylene glycol

distearoylphosphatidylethanolamine)作為 spacer，DSPE 與微脂體膜組成同屬磷脂質，因此可插入微脂體膜，使 PEG 突出於微脂體外，而 PEG 端可共價鍵結抗體分子或有興趣之配體(ligand)。與其他利用免疫機轉的藥物比較，免疫微脂體可同時攜帶多種類型的藥物，所使用的單株抗體、微脂體與化學藥物都對癌細胞有特異性的結合或殺傷力，而且抗體不需直接與藥物結合，穩定性高，不易引發免疫反應，在體內循環時間長，也可對腫瘤鄰近細胞產生作用。免疫微脂體可經由受體媒介將藥物送到細胞之內，分布到整個腫瘤組織，而非標靶性的微脂體分布僅限於腫瘤的基質。免疫微脂體的組合可任意變化，可選用特定的配體與所選的微脂體藥物結合，遠較其他治療方法選擇性多，可用來輸送 doxorubicin 及其他已經核准使用的現有藥物，或是游離態會有嚴重毒性，在藥理學上有所限制的舊藥。前期實驗結果顯示，本實驗室已成功於 LipoDox 表面結合人類表皮生長因子(hEGF)成為標靶性免疫微脂體藥物 EGF-LipoDox，利用共軛焦螢光顯微鏡觀察到 EGF-LipoDox 能藉由內吞作用進入腫瘤細胞內。

利用放射性同位素標幟分子、胜肽或抗體所得之核醫藥物，藉由不同的放射特性可達到核醫造影診斷或放射治療等不同目的，例如 Octreoscan[®] 即為以 ¹¹¹In 標幟之體抑素類似物(octreotide, somatostatin analogue)，可用於偵測及定位原發及轉移神經內分泌腫瘤和胰臟腫瘤。將微脂體與正子(如鎂-68 和銅-64)或加馬(如鎳-99m 和鈾-111)放射核種結合，利用非侵入性生物造影方法探討藥物於生物體內的分布及藥物動力學，為近年來相當熱門之研究課題。本研究比較 LipoDox 及 EGF-LipoDox 兩者之細胞毒性，再以放射性同位

素標幟成為 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox，進行二者於荷 MDA-MB468 腫瘤(會大量表現人類表皮生長因子受體)動物之生物分布及藥物動力實驗，評估此免疫微脂體做為藥物載體的特性。

本研究開發表皮生長因子與微脂體化療藥物結合之標靶免疫微脂體化療藥物(EGF-LipoDox)，使其成為兼具主動標靶能力以及藥物傳遞系統(drug delivery system)特性之標靶免疫微脂體化療藥物，以突破現有抗癌藥物的困境。此標靶免疫微脂體化療藥物之優勢包括：(一)可針對重要的細胞傳導路徑(表皮生長因子之訊息傳導)將藥物或放射核種帶至腫瘤；(二)可以同時攜帶多種治療用毒殺物質(如化學/生物藥物或放射性同位素)，縮短治療流程，減少長期治療所累積的副作用；(三)相較於抗體標靶治療，此生長因子為內生性分子，可免於外來抗體引發免疫排斥及清除作用的顧慮；(四)未來可利用具殺傷力之放射性同位素(如 ^{90}Y 或 ^{177}Lu ，可釋出高或低能量 β 射線)進行放射標靶治療，對於已具抗藥性的細胞仍有毒殺能力，且放射線所造成的旁觀者效應(bystander effect)亦可對未結合到此免疫微脂體之腫瘤細胞及其周圍微環境造成毒殺效果。

本計劃首先於 LipoDox 表面結合人類表皮生長因子(EGF)成為標靶性免疫微脂體藥物 EGF-LipoDox，測定此二藥物於表現人類表皮生長因子受體之腫瘤細胞(MDA-MB468)之特異性結合與內吞能力，比較兩者之細胞毒性。再分別以銥-111 標幟得到 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox，再於荷 MDA-MB468 腫瘤動物進行生物分布及藥物動力實驗。本研究結果已確立標靶免疫微脂體化療藥物於腫瘤細胞之毒性及荷腫瘤動物之藥動模式，本計畫建立之腫瘤標靶治療動物平台，應可對癌症標靶治療發展有所貢獻。

貳、研究方法與過程

一、材料

細胞培養基及細胞培養添加物皆購自HyClone Laboratories公司。Column (40 × 8 mm) 及 Sephadex™ G-50 Fine 購自Amersham Biosciences公司。8-Hydroxyquinoline (oxine) 購自Sigma-Aldrich公司 (St. Louis, MO, USA)。¹¹¹In-indium chloride (in 0.05 M HCl; 3.7-74 MBq) 購自核能研究所。ITLC™ SG購自Pall Corporation公司。Maleimide- carboxyl polyethylene glycol (Mr 3400)-derived distearoylphosphatidylethanolamine (Maleimide-PEG-DSPE)購自NOF 公司。所有其他化學藥品購自Merck & Co., Inc公司。LipoDox及doxorubicin由台灣微脂體公司提供。

二、細胞培養

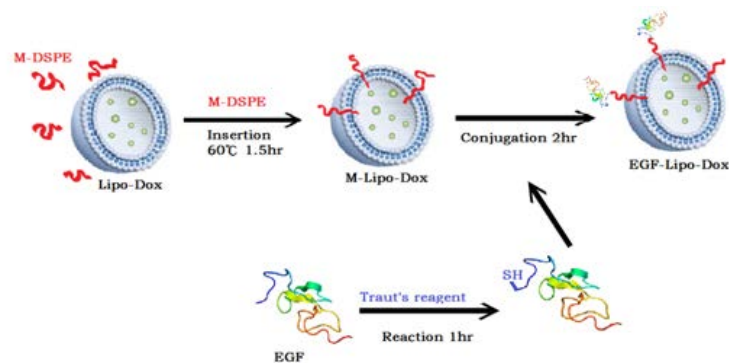
人類乳癌細胞株 MDA-MB468，由中央研究院蕭宏昇老師實驗室提供。MDA-MB468 細胞株以含 10% FBS 之 L15 培養於 0 % CO₂、37°C 恆溫培養箱中。以 trypsin-EDTA 將貼附於培養盤上切下來進行細胞的分盤與放大，待細胞培養至相當數量後，即可用來進行細胞實驗或將腫瘤細胞植入小鼠體內。

三、動物腫瘤模式之建立

雌性 Balb/c 裸小鼠，4-6 週，體重 20~25 克，購自國家實驗動物中心。Balb/c 裸小鼠於其腹部乳腺植入 1×10^7 MDA-MB468 細胞，植入後第 30 天腫瘤大小約 40 ~ 50 mm³，即可進行生物分布、藥物動力學等動物實驗。

四、EGF-Lipo-Dox 製備

將 1 mg Maleimide-PEG-DSPE 溶於 117.6 μ l HEPES Buffer，配置成 2.5 mM Maleimide-PEG-DSPE 溶液，取 76.9 μ l Maleimide-PEG-DSPE 溶液加入 1 ml Lipo-Dox 中(total lipid of Lipo-Dox : Maleimide-PEG-DSPE = 100: 1.5 (molar ratio))，於 60°C 下進行 insertion 1.5 小時。Insertion 後即得到表面具有 Maleimide-PEG-DSPE 修飾之 LipoDox (簡稱為 M-LipoDox)。將 1mg Traut's reagent 溶於 100 μ l HEPES 緩衝溶液中，取 10.5 μ l 含 Traut's reagent 溶液加入 1 mg EGF 中，(EGF : Traut's reagent = 1:8 (molar ratio)) 於室溫下反應 1 小時，利用薄膜過濾離心法去除未反應之 Traut's reagent。將 EGF-Traut 加入 M-LipoDox 中，於室溫下反應 2 小時。以膠體層析法(Sephadex 4B)去除未反應之小分子反應物，純化得 EGF-LipoDox。再以 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析 EGF-LipoDox 上 EGF 的數量。使用粒徑分析儀(N4 plus, COULTER, U.S.A.)分析經化學修飾 EGF-LipoDox 之粒徑變化。EGF-LipoDox 製備流程圖如圖二。



圖二、EGF-LipoDox 製備流程圖(M-DSPE 代表 Maleimide-PEG-DSPE)

五、微脂體對 doxorubicin 包覆率分析

Doxorubicin 為螢光物質，以 470 nm 的激發光激發時，在 582 nm 得到最大散射光。先以有機相(20 mM ammonium acetate + 60% 2-propanol) 稀釋標準液以及稀釋並打破微脂粒溶液，此步驟目的是為了打破微脂粒結構，將包覆於微脂粒內的 doxorubicin 完全釋放出來。步驟如下：利用微量滴管吸取 1mL 的(20 mM ammonium acetate + 60% 2-propanol)溶液於小的 5mL 玻璃瓶中。再利用微量滴管吸取 102 μ L 的 doxorubicin 標準液(或包覆 doxorubicin 的微脂粒溶液)於 20 mM ammonium acetate + 60% 2-propanol 溶液裡。利用螢光偵測器量測吸收值並換算成濃度。再以水相(10% sucrose + 10 mM histidine) 稀釋標準液以及稀釋微脂粒溶液，此步驟目的是測量未被微脂體所包覆之 doxorubicin 含量。步驟如下：利用微量滴管吸取 1mL 的(10% sucrose + 10 mM histidine)溶液於小的 5mL 玻璃瓶中。再利用微量滴管吸取 10 μ L 的 doxorubicin 標準液(或包有 doxorubicin 的微脂粒溶液)於 10% sucrose + 10 mM histidine 溶液裡。利用螢光偵測器量測吸收值並換算成濃度。將樣品之有機相(代表微脂體內外之 doxorubicin total 量)、水相(代表微脂體外 free doxorubicin 的量)的讀數所計算出 doxorubicin 的濃度，以下列公式計算其包覆率。

$$\text{※ 包覆率公式} \rightarrow \left(1 - \frac{[\text{Doxorubicin}]_{\text{free}}}{[\text{Doxorubicin}]_{\text{total}}}\right) * 100\% = \text{Encapsulation}(\%)$$

六、測定 EGF-LipoDox 溶液之 doxorubicin 濃度

將 LipoDox 標準品 (2 μ g/ μ L)進行序列稀釋，稀釋後濃度如

下：0.015626、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。將 3 μL EGF-LipoDox 加入 87 μL HEPES 中稀釋三十倍，分別將 30 μL 標準品序列稀釋溶液及 EGF-LipoDox 樣品稀釋液，加入 96 wells 螢光測量盤(黑色避光之 96 孔盤)中，加入樣品 5 倍量(150 μL) 酸化之 isopropanol 以 ex470/em582 量測其螢光值，計算得 EGF-LipoDox 溶液中 doxorubicin 濃度。

七、放射性 ^{111}In -oxine 藥物製備

8-Hydroxyquinoline (oxine) 以 100 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 之比例溶解於 anhydrous ethanol，配製 0.2 M sodium acetate buffer，並調整 pH 值至 5.5。取一玻璃試管，依序加入 1 mCi $^{111}\text{InCl}_3$ 溶液、2 μL oxine 及 500 μL 0.2 M sodium acetate buffer，混合均勻後於 50°C 反應 30 分鐘。反應時間終了後以 300 μL chloroform 萃取三次，萃取之有機相移入 2 c.c.螺旋紋樣品瓶中，以 rotary evaporator 抽乾去除 chloroform。抽乾的產物以 10 μL ethanol 溶解後，測量活性並以放射薄層分析法分析產物純度(固定相：ITLC/SG；展開相：ethanol)。在此系統， $^{111}\text{InCl}_3$ 之 R_f 為 0 ~ 0.1， ^{111}In -oxine 之 R_f 則為 0.9 - 1.0。 ^{111}In -oxine 標幟產率 >70%。

八、放射性 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 藥物製備

將溶解之 ^{111}In -oxine 取出置入 eppendorf tube 中，並加入 40 μL 的純水稀釋酒精，避免微脂體破裂。將 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 快速加入 eppendorf tube 當中，混合均勻後於 37°C 反應 30 分鐘。反應時間終了，加入 doxorubicin 總量 20 倍的 EDTA 於室溫下反應 30 分鐘，將黏附於微脂體表面之 free ^{111}In 競

爭下來後，取出所有產物通過 Sephadex G-50 resin column 進行純化，並以生理食鹽水沖提，0.5 mL 收集一管，連續收集 12 管，以 dose calibrator 測量各管活性並紀錄。¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 約於流出 0.7 mL 至 1.2 mL 時出現。¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 經純化後的放射化學純度 >90%，可用來進行動物實驗或細胞實驗。

九、細胞螢光攝取實驗

於 12 孔細胞培養盤中種植 MDA-MB468 腫瘤細胞(2.5×10^5 cells/well)，於 37°C，CO₂培養箱中培養一天，去除培養盤中原有之培養基，以 1 mL PBS 清洗細胞後分別加入 0.5 mL 含 free doxorubicin、LipoDox 及 EGF-LipoDox 之培養基(等同 doxorubicin 濃度 50 μM)於 37°C，及含 free doxorubicin、LipoDox 及 EGF-LipoDox 並添加 1.5 μg anti-EGFR 抗體(cetuximab, C225)之培養基，於 CO₂培養箱中靜置 2 小時。去除含有藥物之培養基後，並以 0.5 mL PBS 清洗 3 次後，直接以螢光顯微鏡觀察並拍攝影像；或加入 RIPA lysis buffer 150 μL 將細胞裂解，隨後加入 350 μL 酸化 iso-propanol，並將 doxorubicin 萃取至 isopropanol 中，吸取 200 μL 含 isopropanol 之細胞裂解液，置於 96 孔螢光測量盤以 ex470/em582 測量其螢光值。以 doxorubicin 所建立之標準曲線換算細胞所攝入之 doxorubicin 量實驗。

十、細胞毒殺實驗

於 96 孔盤中，每個 well 植入 1×10^3 cells 並以含有等同下列 doxorubicin 濃度之 LipoDox 及 EGF-LipoDox (0、0.1、0.3、1、3、

10 和 30 μM)的 L15 medium 中於 37°C 恆溫環境下培養細胞。培養 72 小時後，以 MTT assay 測量存活細胞數量。MTT assay 簡述如下：調配的 10x MTT solution (50 mg/mL 溶於三次水) 以 serum free medium 稀釋成 1x MTT solution 來使用。將各個 well 中的細胞培養液吸出，並以 200 μL PBS 輕輕清洗細胞三次，加入 100 μL 1x MTT solution (5 mg/mL) ，培養 3 小時後，將 MTT solution 從 well 移出，加入 200 μL DMSO 將沈澱呈紫黑色之 MTT formazan 溶解，多次搖晃以完全溶解，最後將 96 well plate 放入 ELISA reader 測量吸光值 (OD 值，讀取波長設為 570 nm) ，並換算為各細胞之數量 (利用 OD 值與細胞數之標準曲線求得)。將存活之細胞數除以未加藥組別之細胞數即可得到細胞存活分率 (survival fraction) 。

十一、 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 細胞攝取實驗

將 MDA-MB-468 細胞種於 6 孔盤 (1×10^6 cells/well)，培養 24 小時後，每個 well 加入 2 μCi ^{111}In -LipoDox、 ^{111}In -EGF-LipoDox 及 C225 抗體 (6 μg) + ^{111}In -EGF-LipoDox (1 mL medium 中)，於 37°C 培養 1、2、4、8、24 小時後 (n=3)，將含放射藥物之培養液吸出，以 1 mL PBS (pH ~ 7.3) 清洗細胞三次，加入 500 μL trypsin-EDTA 將細胞切下並將細胞懸浮液吸出，所有吸出之液體分別收集於不同之 counting tube 中，使用 γ -counter 來測量活性，計算藥物於細胞中積聚的比例。細胞對藥物之攝取數值以 % radioactivity uptake/ 10^6 cells 表示。

十二、 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 於荷腫瘤小鼠模式之生物分布及藥物動力學實驗

於荷 MDA-MB468 腫瘤之小鼠 (腫瘤大小約 40~50 mm³) 40 隻進行生物分布實驗，任意分為 10 組，每組 4 隻。每隻小鼠分別經尾靜脈注射 100 μCi (3.7 MBq in 100 μL) 之 ¹¹¹In-LipoDox 或 ¹¹¹In-EGF-LipoDox (所含 doxorubicin 濃度皆為 5 mg/kg)，於注射後 4、24、48、72、96 小時各犧牲一組老鼠，迅速摘取器官樣本，包括血液、肺臟、心臟、肝臟、小腸、大腸、腎臟、脾臟、膀胱、尿液、肌肉等器官及腫瘤。稱重後利用 γ-counter 計測其放射活性，再轉換成 %ID/g (% injection dose per gram of organ)，分析放射性藥物於各器官各個時間點之分布。

荷 MDA-MB468 腫瘤之小鼠 10 隻 (腫瘤大小約 40~50 mm³) 任意分為二組，每組 5 隻，分別經尾靜脈注射 100 μCi (3.7 MBq in 100 μL) 之 ¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox，藥物注射後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8 小時及之後每間隔 4 或 8 小時直到 72 小時，於對側尾靜脈以定量毛細管 (體積為 1 μL) 採集血液，以 γ-counter 計測放射活性，經過校正轉換與計算，單位為 %ID/mL。實驗結果利用藥物動力學分析軟體 WinNolin，以 two-compartment 模式分析，計算得相關藥物動力學參數，其中 AUC (area under curve) 表示時間與藥物濃度曲線下之面積，t_{1/2} 為血液中之平均活性半衰期，CL (clearance rate) 為血液清除率。

十三、統計分析

使用 t-test 之統計學方法進行各組別之間的比較。數值 < 0.05 視為此兩者具有明顯之統計差異。

參、主要發現與結論

一、EGF-LipoDox 製備及物理與化學性質分析

測定 EGF-LipoDox 溶液之 doxorubicin 濃度，計算得 EGF-LipoDox 溶液中 doxorubicin 濃度為 0.442 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。台灣微脂體提供之 LipoDox，其 doxorubicin 及磷脂質濃度分別為 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 及 13.69 $\mu\text{mole}/\text{mL}$ ，可估算 EGF-LipoDox 溶液中磷脂質濃度約為 2.87 $\mu\text{mole}/\text{mL}$ 。利用 maleimide-PEG-DSPE 末端的 maleimido group 可連結 EGF 蛋白並鑲嵌於 LipoDox 微脂體表面。經上述製備步驟，純化得 EGF-LipoDox，取 70.7 μL (磷脂濃度 2.87 $\mu\text{mole}/\text{mL}$) 進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。電泳分析圖(圖三)經軟體圈選 ROI，計算得 EGF-LipoDox 中所含蛋白量約為 EGF 標準品(4 μg)的 66%，即 202 nmole EGF-LipoDox 所含 EGF (分子量 10.8 kDa) 蛋白量約 1.98 μg 。以下列公式計算 EGF-LipoDox 上 EGF 的數量，得出平均每一個微脂體粒子約含 69 個 EGF。以粒徑分析儀分析 EGF-LipoDox 之粒徑約為 111.7 nm，與 LipoDox 107.4 nm 相近(圖四)。EGF-LipoDox 之 doxorubicin 包覆率為 93%，亦與 LipoDox 之包覆率 91%相近。結果顯示此生產流程不致明顯改變微脂體的物理性質。

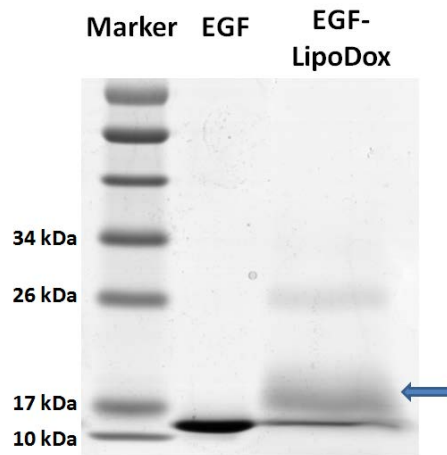
→EGF個數=

$$\frac{1.98 \times 10^{-6} (\text{g}) * 6.02 * 10^{23} (\text{個}/\text{mole})}{10.8 * 10^3 (\text{g}/\text{mole})} = 1.104 * 10^{14} (\text{個})$$

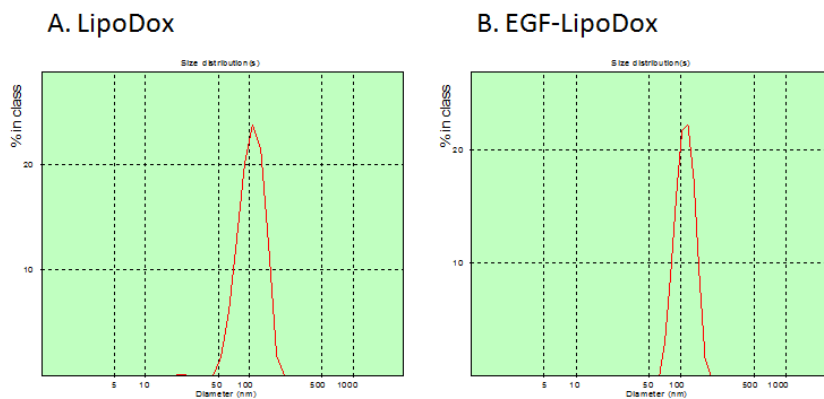
→Lipo-Dox顆數

$$\begin{aligned} &= 2.87 (\mu\text{mole}/\text{ml}) * 70.7 * 10^{-3} (\text{ml}) * 7.5 * 10^{12} (\text{particle}/\mu\text{mole}) \\ &= 1521.82 * 10^9 (\text{particles}) \end{aligned}$$

(100 nm 大小之微脂體每 μmole 磷脂質約含 7.5×10^{12} particles)。



圖三、以外插法製備之 EGF-LipoDox，利用 Sepharose CL-4B 移除未結合之蛋白，以 12% SDS-PAGE 檢視。Marker 表示分子量標準品，EGF 表示含 $4 \mu\text{g}$ EGF 蛋白標準品，EGF-LipoDox 表示經純化後之 EGF-LipoDox 樣品取 $70.7 \mu\text{L}$ (磷脂濃度 $2.87 \mu\text{mole/mL}$) 進行電泳分析之結果。箭號位子顯示經由接合於 maleimide-PEG-DSPE 上而鑲嵌於之 LipoDox 表面之 EGF 蛋白。

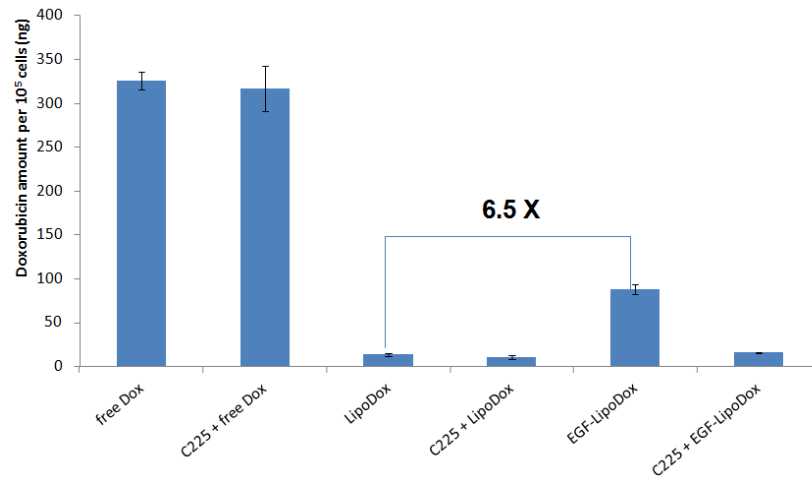


圖四、以粒徑分析儀分析(A)LipoDox 及(B)EGF-LipoDox 之粒徑。兩者粒徑分別約為 107.4 nm 與 111.7 nm。

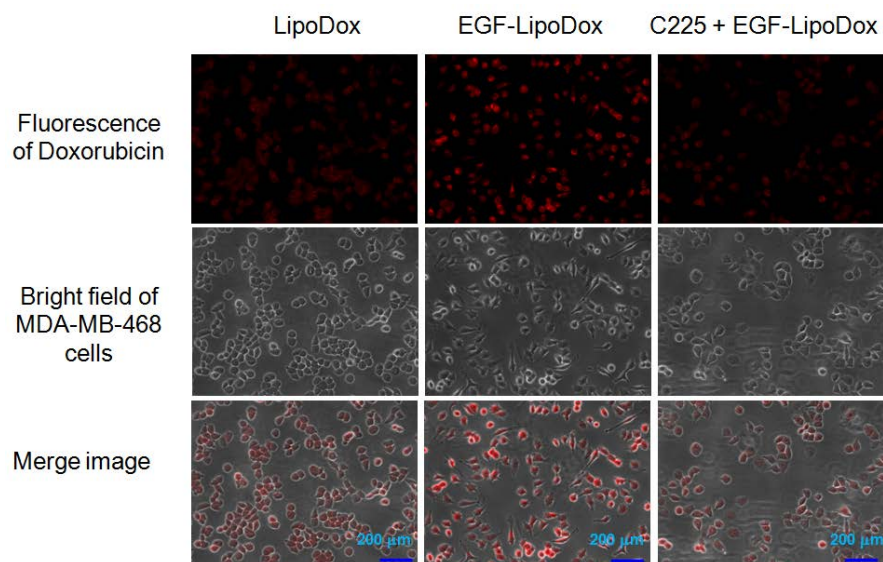
二、細胞螢光攝取實驗

本實驗利用 doxorubicin 為螢光物質之特性，以螢光偵測及螢

光顯微鏡觀察 EGF-LipoDox 是否可專一性的結合並進入高度表現 EGFR 之 MDA-MB468 細胞。MDA-MB468 腫瘤細胞 (2.5×10^5 cells/well)，分別加入 0.5 mL 含 free doxorubicin、LipoDox 及 EGF-LipoDox 之培養基(等同 doxorubicin 濃度 $50 \mu\text{M}$)於 37°C 、 CO_2 培養箱中靜置 2 小時後，可觀察到 free doxorubicin 可以自由擴散進入細胞中，細胞攝取量達 $325.9 \pm 9.8 \text{ ng doxorubicin}/10^5 \text{ cells}$ (圖五)；doxorubicin 被微脂體包覆成為 LipoDox 後，喪失經擴散進入細胞的能力，細胞攝取量($13.3 \pm 1.4 \text{ ng doxorubicin}/10^5 \text{ cells}$)大幅降低。相較於 LipoDox，細胞攝取 EGF-LipoDox 的量 ($87.7 \pm 5.8 \text{ ng doxorubicin}/10^5 \text{ cells}$) 為攝取 LipoDox 的 6.5 倍($13.3 \pm 1.4 \text{ ng doxorubicin}/10^5 \text{ cells}$) (圖五)，顯示 EGF 修飾可提高細胞對微脂體包覆化療藥物的攝取。為確認 EGF-LipoDox 是否藉由專一性結合 EGFR 而進入細胞中，本實驗另外添加可與 EGFR 結合之抗體 (cetuximab, C225)，來阻擋 EGF 與 EGFR 結合區域。添加相當於 EGFR 總量 60 倍的 C225 抗體後，大幅抑制了細胞對 EGF-LipoDox 的攝取 ($15.6 \pm 0.9 \text{ ng doxorubicin}/10^5 \text{ cells}$)，而 free doxorubicin 及 LipoDox 則不受添加 C225 抗體影響(圖五)，實驗結果證實 EGF-LipoDox 的攝取係經由 EGF 與細胞膜上 EGFR 的專一性結合而進入細胞。MDA-MB468 細胞與 LipoDox、EGF-LipoDox 及 C225+EGF-LipoDox 培養 2 小時後，以螢光顯微鏡觀察細胞內螢光強度(來自 doxorubicin)，亦得到相同結果，EGF-LipoDox 於細胞中累積的螢光量明顯高於 LipoDox 及 C225+EGF-LipoDox (圖六)。



圖五、MDA-MB468 腫瘤細胞(2.5×10^5 cells/well)，分別加入 0.5 mL 含 free doxorubicin、LipoDox 及 EGF-LipoDox 之培養基(等同 doxorubicin 濃度 $50 \mu\text{M}$)於 37°C ，及含 free doxorubicin、LipoDox 及 EGF-LipoDox 並添加 $1.5 \mu\text{g}$ anti-EGFR 抗體(C225)之培養基，於 CO_2 培養箱中靜置 2 小時，將細胞裂解後並將 doxorubicin 萃取至 isopropanol，於 96 孔螢光測量盤以 ex470/em582 測量其螢光值。以 doxorubicin 所建立之標準曲線換算細胞所攝入之 doxorubicin 量($\text{ng}/10^5$ cells)。

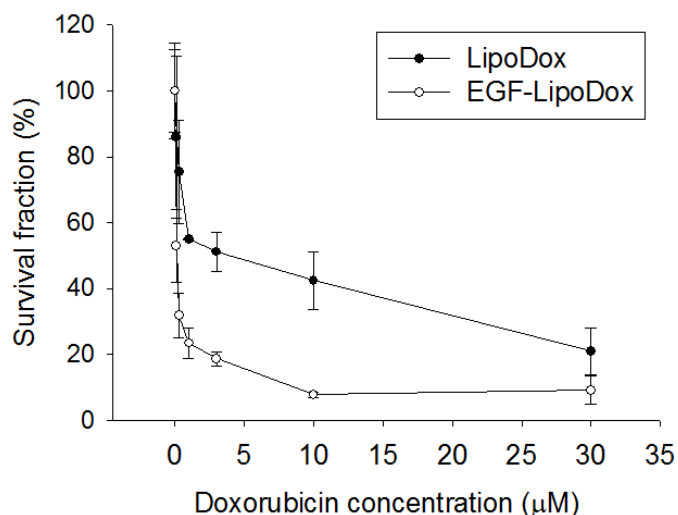


圖六、MDA-MB468 腫瘤細胞分別加入含 LipoDox、EGF-LipoDox 及 C225+EGF-LipoDox 之培養基(等同 doxorubicin 濃度 $50 \mu\text{M}$)於

37°C，CO₂培養箱中靜置 2 小時。去除含有藥物之培養基後，直接以螢光顯微鏡以相同曝光秒數(紅色螢光 1000 ms，亮視野 44 ms)拍攝影像。並利用影像軟體將亮視野與螢光影像疊合(Merge image)。

三、細胞毒殺實驗

為了探討脂體藥物 LipoDox 及 EGF-LipoDox 對於 MDA-MB468 細胞毒殺作用的差異，了解腫瘤細胞藉由 EGFR 內吞藥物是否會加強腫瘤治療效果。本研究將微脂體藥物 LipoDox 及 EGF-LipoDox 加至 MDA-MB468 細胞，培養 72 小時後，去除含藥之培養基，並比較其毒性差異。EGF-LipoDox 對於 MDA-MB468 細胞造成的毒性(IC₅₀ = 0.1 μM)高於 LipoDox (IC₅₀ = 1 μM) (圖七)，明確證實 EGF-LipoDox 微脂體藥物被高度表現 EGFR 之 MDA-MB468 腫瘤細胞內吞後，藥物毒殺腫瘤的效果顯著增強。



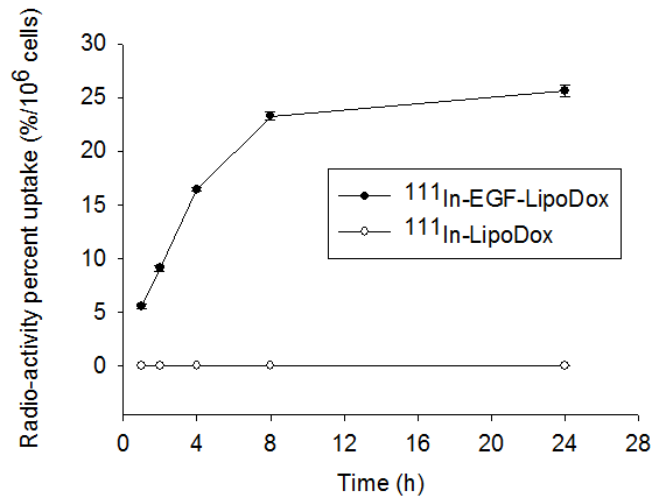
圖七、細胞毒性測試。MDA-MB468 細胞以不同濃度的 Lipo-Dox 或是 EGF-LipoDox 作用 72 小時，以 MTT assay 測量存活細胞數

量。將存活之細胞數除以未加藥組別之細胞數得到細胞存活分率 (survival fraction) ，以平均值±S.D 表示 (每個時間點 n = 3) EGF-LipoDox 對 MDA-MB468 細胞的毒性(IC₅₀ = 0.1 μM)高於 LipoDox (IC₅₀ = 1 μM)。

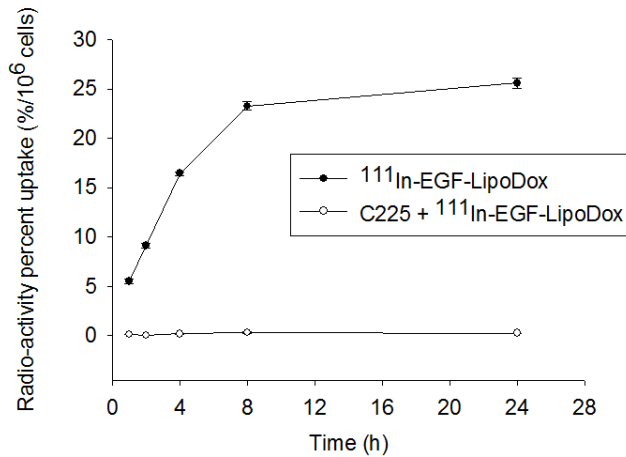
四、¹¹¹In-Lipo-Dox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 於 MDA-MB468 細胞之積聚

為證實 EGF-LipoDox 可經由 EGFR 進行腫瘤標靶治療，本研究以銨-111 標幟 LipoDox 及 EGF-LipoDox 得到 ¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 進行後續相關研究。以 ¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 於 MDA-MB468 細胞進行細胞放射性攝取實驗。將 MDA-MB468 細胞種於 6 孔盤 (1 × 10⁶ cells/well)，培養 24 小時後，每個 well 加入 2 μCi ¹¹¹In-LipoDox、¹¹¹In-EGF-LipoDox 及 C225 抗體(6 μg) + ¹¹¹In-EGF-LipoDox (1 mL medium 中)，於 37°C 培養 1、2、4、8、24 小時後(n = 3)，使用 γ-counter 測量活性，計算放射性藥物於細胞中積聚的比例。結果顯示在加入 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 藥物後，MDA-MB468 細胞持續攝取微脂體藥物，積聚之放射活性隨時間上升，培養 24 小時之積聚比例達 25.6±0.5 %/10⁶ cells (圖八)，相較於無法藉由 EGFR 進入細胞之 ¹¹¹In-LipoDox，在加入細胞 24 小時後，細胞積聚之放射活性低於 0.1%/10⁶ cells。添加 C225 抗體後，亦可觀察到 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 於 MDA-MB468 細胞的積聚量大幅下降，雖然 C225 + ¹¹¹In-EGF-LipoDox 組別中，細胞之放射性積聚量仍隨時間緩慢增加，但培養 24 小時後之放射活性積聚比例僅在 0.3%/10⁶ cells 以下(圖九)。此結果顯示放射性標幟後之 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 仍維持與 EGF-LipoDox 相當之結合能力，且

亦經由 EGFR 專一性結合而進入 MDA-MB468 細胞中。



圖八、於 MDA-MB468 細胞分別加入 ¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox，經過 1、2、4、8、24 小時取出細胞測量放射活性，MDA-MB468 細胞攝取 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 微脂體藥物的量隨時間逐漸增加，而對 ¹¹¹In-LipoDox 則幾乎不攝取。細胞攝取量以 radioactivity percent uptake (%/10⁶ cells) 顯示，以平均值 ± S.D 表示 (每個時間點 n = 3)。

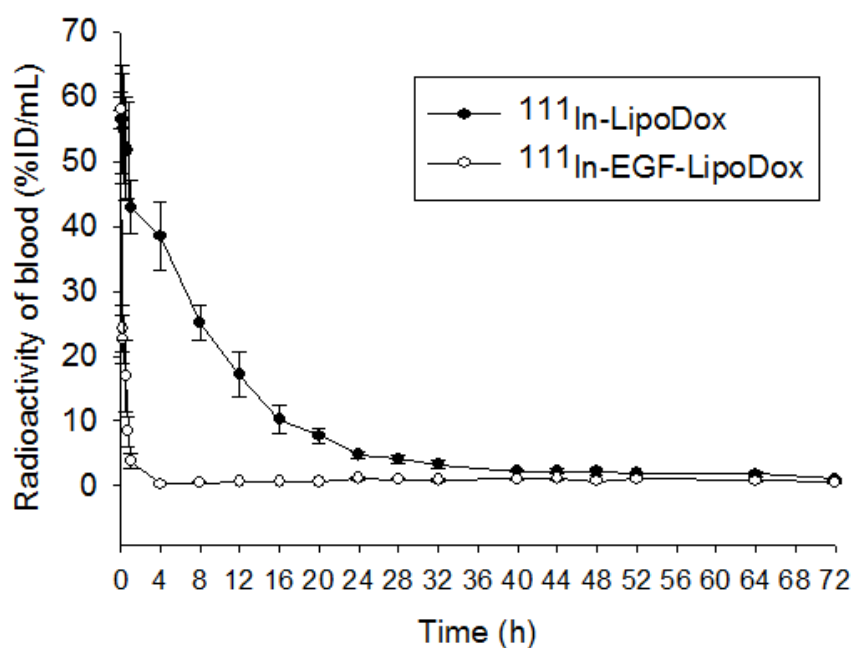


圖九、於 MDA-MB468 細胞分別加入 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 及 C225 + ¹¹¹In-EGF-LipoDox，經過 1、2、4、8、24 小時取出細胞測量放射活性，於兩個組別中 MDA-MB468 細胞攝取 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 微脂體藥物的量皆隨時間逐漸增加，但另外添加 C225 抗體後，細胞對 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 的攝取大幅下降，顯

示 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 與 EGFR (大幅表現於 MDA-MB468 細胞膜上) 的專一性結合效果。細胞攝取量以 radioactivity percent uptake(%/10⁶ cells)顯示，以平均值 \pm S.D 表示 (每個時間點 n = 3)。

五、 $^{111}\text{In-LipoDox}$ 及 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 藥物於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠之藥物動力學

在藥物動力學評估實驗中，於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠，分別從尾靜脈注射 $^{111}\text{In-LipoDox}$ 及 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ ，可觀察血液中活性隨時間排除 (圖十);分析注射藥物後 72 小時內之活性-時間變化曲線，利用 WinNonlin 軟體求得半衰期 ($t_{1/2}$)、清除效率 (clearance rate, CL)、AUC (area under curve) 等參數(如表一)。藥物動力學實驗結果顯示， $^{111}\text{In-LipoDox}$ 在體內停留時間長，血液清除速率緩慢 ($t_{1/2\alpha} = 6.48$ h, $Cl = 0.01$ mL/h, $AUC = 616.85$ h · %ID/mL，圖十)，注射後 64 小時血液活性仍有 1.8 ± 0.3 %ID/mL，此結果與文獻報導聚乙二醇修飾之微脂體藥物，可滯留於血液循環中較長時間的現象相符 [21,22]。相較於 $^{111}\text{In-LipoDox}$ ， $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 靜脈注射到小鼠體內後，血液清除速率甚快，注射後 4 小時之血液活性僅有 0.3 ± 0.1 %ID/mL，曲線下面積 AUC 大幅下降($t_{1/2} = 0.07$ h, $Cl = 1.69$ mL/h, $AUC = 81.87$ h · %ID/mL)。為深入探討 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 血液清除快速的原因，本研究接著進行 $^{111}\text{In-LipoDox}$ 及 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 藥物於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠之生物分布，觀察藥物在不同組織之積聚隨時間之變化。



圖十、¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 藥物於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠之藥物動力學，數據以活性-時間曲線表示，數據以平均值± S.E.M.表示（每個時間點 n =5）。

表一 於荷 MDA-MB468 腫瘤之小鼠，經尾靜脈注射 ¹¹¹In-LipoDox 及 ¹¹¹In-EGF-LipoDox 藥物，由活性-時間曲線求得之藥物動力學參數：

| 藥物 \ 參數 | $t_{1/2\alpha}$ (h) | AUC _{0→t} (h × %ID/mL) | CL (mL/h) |
|-------------------------------|---------------------|---------------------------------|-----------|
| ¹¹¹ In-LipoDox | 6.48 | 616.85 | 0.01 |
| ¹¹¹ In-EGF-LipoDox | 0.07 | 81.87 | 1.69 |

由 WinNonlin 程式計算，使用 two-compartment 模型。 $t_{1/2}$ = mean elimination half-life, AUC = area under curves, CL = clearance rate。

六、¹¹¹In-EGF-LipoDox 及 ¹¹¹In-LipoDox 藥物於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠之生物分布

荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠經尾靜脈注射 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 後 4、24、48、72 及 96 小時之放射活性分布如表二所示。血液中的藥物迅速排除，與藥物動力學實驗結果相似，肝臟、脾臟和骨髓於注射後 4 小時之放射活性高達 43.85 ± 4.24 、 70.56 ± 18.31 和 4.01 ± 2.59 %ID/g，注射後 96 小時為 30.96 ± 12.03 、 139.08 ± 56.83 和 17.60 ± 9.04 %ID/g，顯示血液中的 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 藥物快速且大量地被富含網狀內皮系統的器官如肝臟、脾臟和骨髓所吸收，導致血液活性快速下降。MDA-MB468 腫瘤之積聚量，於注射後 48 及 72 小時分別為 1.18 ± 0.53 及 1.23 ± 0.23 %ID/g，腫瘤與肌肉積聚比 (tumor-to-muscle ratio) 分別為 6.18 ± 2.98 及 5.73 ± 2.23 ，顯示 $^{111}\text{In-EGF-LipoDox}$ 在腫瘤部位積聚量仍高於肌肉組織。

於荷 MDA-MB468 腫瘤之小鼠注射 $^{111}\text{In-LipoDox}$ 後 4、24、48、72 及 96 小時後的生物分布如表三所示。 $^{111}\text{In-LipoDox}$ 藥物在血液中的循環時間長，與藥物動力學觀查結果相符(圖十，表一)，注射後 72 小時血液仍有 2.53 ± 0.51 %ID/g 的活性。在腫瘤積聚方面，注射 $^{111}\text{In-Lipo-Dox}$ 後 24 小時腫瘤達到最大積聚量(9.47 ± 1.08 %ID/g)，注射後 96 小時仍高達 9.13 ± 1.42 %ID/g，顯示 $^{111}\text{In-Lipo-Dox}$ 可藉由 enhanced permeability and retention 的被動式標靶作用而積聚於腫瘤。一如預期， $^{111}\text{In-Lipo-Dox}$ 在網狀內皮系統如肝臟、小腸、脾臟和骨髓也有較高積聚，於注射後 96 小時放射活性積聚量分別為 10.45 ± 2.70 、 16.63 ± 6.51 、 77.93 ± 17.78 和 19.75 ± 1.99 %ID/g。

表二 荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠經尾靜脈注射 ^{111}In -EGF-LipoDox 後之生物分布

| 器官 | 4 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|--------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Blood | 0.88 ± 0.54 | 0.68 ± 0.27 | 0.84 ± 0.53 | 0.40 ± 0.07 | 0.33 ± 0.06 |
| Heart | 0.20 ± 0.08 | 0.32 ± 0.03 | 0.39 ± 0.11 | 0.45 ± 0.06 | 0.37 ± 0.08 |
| Lung | 0.79 ± 0.55 | 2.56 ± 0.78 | 1.70 ± 0.40 | 1.08 ± 0.19 | 0.84 ± 0.18 |
| Liver | 43.85 ± 4.24 | 48.05 ± 2.77 | 35.08 ± 12.11 | 38.50 ± 6.72 | 30.96 ± 12.03 |
| Stomach | 0.34 ± 0.11 | 0.38 ± 0.04 | 1.12 ± 0.55 | 0.82 ± 0.27 | 0.49 ± 0.06 |
| S. intestine | 6.59 ± 2.99 | 5.62 ± 5.04 | 6.27 ± 6.70 | 5.17 ± 4.12 | 2.52 ± 1.87 |
| L. intestine | 0.42 ± 0.30 | 0.64 ± 0.27 | 1.27 ± 0.62 | 0.61 ± 0.14 | 0.51 ± 0.11 |
| Pancreas | 0.11 ± 0.08 | 0.28 ± 0.06 | 0.47 ± 0.20 | 0.58 ± 0.19 | 0.45 ± 0.12 |
| Spleen | 70.56 ± 18.31 | 116.92 ± 41.94 | 218.56 ± 89.79 | 170.42 ± 39.26 | 139.08 ± 56.83 |
| Kidney | 1.29 ± 0.61 | 4.70 ± 3.53 | 4.36 ± 1.12 | 4.64 ± 0.39 | 4.22 ± 0.99 |
| Muscle | 0.10 ± 0.03 | 0.17 ± 0.08 | 0.19 ± 0.02 | 0.23 ± 0.06 | 0.22 ± 0.09 |
| Bladder | 0.27 ± 0.02 | 0.41 ± 0.01 | 0.64 ± 0.13 | 0.65 ± 0.16 | 0.53 ± 0.10 |
| Urine | 0.97 ± 0.19 | 3.53 ± 1.84 | 0.86 ± 0.13 | 1.21 ± 0.38 | 1.42 ± 0.36 |
| Bone marrow | 4.01 ± 2.59 | 6.57 ± 0.99 | 12.38 ± 5.23 | 21.54 ± 7.11 | 17.60 ± 9.04 |
| Feces | 1.62 ± 1.03 | 1.38 ± 0.33 | 0.95 ± 0.40 | 2.78 ± 0.33 | 3.29 ± 1.82 |
| Bone only | 0.21 ± 0.04 | 0.38 ± 0.12 | 0.58 ± 0.11 | 0.62 ± 0.11 | 0.50 ± 0.13 |
| Tumor | 0.40 ± 0.19 | 0.92 ± 0.37 | 1.18 ± 0.53 | 1.23 ± 0.23 | 1.02 ± 0.29 |
| T/B ratio | 0.50 ± 0.18 | 1.38 ± 0.29 | 1.68 ± 0.89 | 3.13 ± 0.46 | 3.10 ± 0.81 |
| T/M ratio | 4.80 ± 2.95 | 7.75 ± 3.44 | 6.18 ± 2.98 | 5.73 ± 2.23 | 4.82 ± 1.05 |

器官放射活性積聚以每克組織百分注射劑量 (%ID/g)表示，數據表示成平均值 ± S.D. (每個時間點 n = 4)。SI: small intestine, LI: large intestine

表三 荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠經尾靜脈注射 ^{111}In -LipoDox 後之生物分布

| 器官 | 4 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| Blood | 51.34 ± 4.29 | 14.65 ± 2.19 | 4.28 ± 0.69 | 2.53 ± 0.51 | 1.36 ± 0.38 |
| Heart | 4.39 ± 1.76 | 2.72 ± 0.70 | 1.92 ± 0.27 | 2.14 ± 0.27 | 2.02 ± 0.41 |
| Lung | 10.81 ± 3.07 | 3.56 ± 1.01 | 2.66 ± 0.41 | 2.07 ± 0.21 | 1.84 ± 0.53 |
| Liver | 17.03 ± 1.63 | 16.67 ± 7.01 | 10.96 ± 3.09 | 10.63 ± 1.27 | 10.45 ± 2.70 |
| Stomach | 1.82 ± 0.52 | 2.09 ± 0.11 | 2.38 ± 0.17 | 3.02 ± 0.55 | 2.83 ± 0.27 |
| S. intestine | 14.88 ± 7.90 | 14.90 ± 7.50 | 14.02 ± 0.71 | 16.27 ± 5.69 | 16.63 ± 6.51 |
| L. intestine | 2.52 ± 1.07 | 5.10 ± 1.59 | 4.14 ± 0.73 | 3.91 ± 1.21 | 4.33 ± 1.58 |
| Pancreas | 2.06 ± 1.12 | 1.05 ± 0.24 | 0.85 ± 0.13 | 1.40 ± 0.14 | 1.48 ± 0.41 |
| Spleen | 17.68 ± 1.49 | 49.79 ± 8.14 | 67.77 ± 12.45 | 84.76 ± 3.97 | 77.93 ± 17.78 |
| Kidney | 10.94 ± 3.08 | 12.23 ± 2.02 | 12.19 ± 1.09 | 14.05 ± 0.80 | 13.69 ± 2.36 |
| Muscle | 0.50 ± 0.17 | 0.78 ± 0.41 | 0.48 ± 0.08 | 0.85 ± 0.36 | 0.69 ± 0.10 |
| Bladder | 1.27 ± 0.47 | 1.29 ± 0.77 | 1.78 ± 0.89 | 1.98 ± 0.43 | 2.12 ± 0.26 |
| Urine | 0.45 ± 0.11 | 8.09 ± 0.81 | 5.39 ± 3.41 | 3.87 ± 1.89 | 3.43 ± 0.29 |
| Bone marrow | 2.59 ± 1.57 | 8.14 ± 2.37 | 9.06 ± 2.55 | 10.89 ± 6.74 | 19.75 ± 1.99 |
| Feces | 1.36 ± 1.53 | 2.13 ± 1.13 | 1.54 ± 1.26 | 3.98 ± 0.60 | 3.54 ± 1.28 |
| Bone only | 0.17 ± 0.04 | 0.60 ± 0.05 | 0.51 ± 0.18 | 0.74 ± 0.11 | 0.96 ± 0.18 |
| Tumor | 2.45 ± 0.18 | 9.47 ± 1.08 | 7.80 ± 2.70 | 8.81 ± 1.77 | 9.13 ± 1.42 |
| T/B ratio | 0.09 ± 0.08 | 0.67 ± 0.18 | 1.78 ± 0.39 | 3.50 ± 0.42 | 6.96 ± 1.26 |
| T/M ratio | 5.11 ± 1.75 | 13.85 ± 4.52 | 16.45 ± 6.28 | 11.50 ± 4.39 | 13.30 ± 1.89 |

器官放射活性積聚以每克組織百分注射劑量 (%ID/g)表示，數據表示成平均值 ± S.D. (每個時間點 n = 4)。SI: small intestine, LI: large intestine

微脂體目前已被廣泛應用做為各類治療藥物的標靶運送載體，但一般的微脂體只具有被動性的標靶作用，主動性標靶免疫微脂體是近來微脂體領域研究的趨勢與重點^[12]。在微脂體上加上特定的抗體或具細胞黏附作用的配體(biological cell adhesive ligand)即可增強其在特定組織、細胞或病源上結合的能力。利用單株抗體辨識腫瘤細胞膜上的腫瘤標記(tumor marker)進行標靶治療(targeted therapy)是一種有效的作用模式。例如以老鼠 anti-HER2 單株抗體進行腫瘤生長抑制的動物實驗中，anti-HER2 抗體可抑制高度 HER2 表現之乳癌細胞的生長。將微脂體表面連結此抗體，可增加微脂體進入腫瘤細胞的能力。但利用單株抗體修飾的微脂體，缺點

是這些外來蛋白可能引發人體的免疫反應。因此尋找更具潛力的標靶分子，是開發標靶藥物一重要的課題。

人類表皮生長因子(EGF)是由 53 個氨基酸組成的小分子多肽，分子量約 6000 dalton，分子內有三對雙硫鍵結構，與其相關之惡性腫瘤佔所有癌症致死率的一半以上。這類型癌症的特色是表皮生長因子以及它們的受體(EGFR)家族過度的活化，激發受體內在酪氨酸激酶的活性，引發細胞內的訊息傳遞，而此訊息傳導路徑在癌症細胞增生、存活、代謝、血管生成以及對化學及放射治療之拮抗性扮演著關鍵的角色^[1]，並已被驗證為重要的抗癌藥物機制；部分針對此生長因子的標靶治療藥物已進入臨床使用^[2]。表皮生長因子與受體結合時形成二聚體，此二聚化會引發細胞內吞作用^[3]，此作用有利於標靶藥物進入細胞內對細胞造成傷害。因此 EGF 修飾的化學分子是一有潛力的標靶藥物。本研究開發表皮生長因子與微脂體化療藥物結合之標靶免疫微脂體化療藥物(EGF-Lipo-Dox)，使其成為兼具主動標靶能力以及藥物傳遞系統(drug delivery system)特性之標靶免疫微脂體化療藥物，以突破現有抗癌藥物的困境。

細胞螢光攝取實驗結果顯示，高度表現 EGFR 細胞株 MDA-MB468 對於 EGF-LipoDox 的攝取量是 LipoDox 攝取量的 6.5 倍。利用 anti-EGFR 抗體(cetuximab, C225)阻擋 EGF 與 EGFR 結合區域後，大幅降低細胞對 EGF-LipoDox 的攝取量。而 free doxorubicin 及 lipoDox 的攝取值則不受影響(圖五、六)，表示 EGF-LipoDox 攝取量下降，是因為 EGFR 結合區域受到阻擋而產生，並非是抗體與藥物形成 protein bound form 而使藥物失去進入細胞的能力。此證據亦證實 EGF-LipoDox 是專一性的結合於 EGFR

而進入細胞中。相似的現象也可於放射性細胞攝取實驗中觀察到(圖八、九)。兩種實驗方法間仍存在些許的差異，在放射性細胞攝取實驗中，與放射藥物共同培養 2 小時後，細胞對 ^{111}In -EGF-LipoDox 的攝取量是 ^{111}In -LipoDox 的 182 倍，遠高於螢光攝取實驗中所觀察到的 6.5 倍。主要原因是 doxorubicin 本身就能進入細胞並與細胞內的 DNA 結合，但在製備 LipoDox 藥物時，doxorubicin 的包覆率無法達到 100%，仍有微量 doxorubicin 在 liposome 之外，因此 LipoDox 組別的螢光讀值會隨著藥物包覆率下降而提高，而較高的背景值直接造成 EGF-LipoDox-to-LipoDox 比值下降。相較於放射性標記的 liposome，liposome 外面的 free ^{111}In 無法直接進入細胞，因此細胞攝取背景值甚低，可得到更為真實的藥物攝取比值。

細胞毒殺實驗中 EGF-LipoDox 對於 MDA-MB468 細胞亦顯現較 LipoDox 更高的毒性(圖七)，與細胞攝取實驗中觀察到細胞攝取較多的 EGF-LipoDox 藥物結果一致，顯示 EGF-LipoDox 對於高度表現 EGFR 的腫瘤細胞是一個很有效的標靶藥物，此結果亦與 Amelie Fondell 等人所發表文獻之結果相符^[26]。雖然有許多的文獻於活體外細胞實驗探討 EGF-liposome 作為標靶的專一性及有效性，但卻缺乏 EGF-liposome 藥物於活體內藥物動力學、生物分布及於動物模式中抑制腫瘤生長等相關文獻。因此本研究以銨-111 標記 LipoDox 及 EGF-LipoDox 得到 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox，進行 ^{111}In -LipoDox 及 ^{111}In -EGF-LipoDox 於荷腫瘤動物之生物分布及藥物動力實驗，研究結果已確立標靶微脂體化療藥物於腫瘤細胞之毒性及荷腫瘤動物之藥動模式。本研究建立腫瘤標靶治療之動

物平台，應可對癌症標靶治療之發展有所貢獻。

PEG 是一種水溶性、無毒性、低抗原性並且具有生物相容性的聚合物，已獲得美國食品藥物管理局(FDA)許可用於人體。蛋白質、藥物或奈米球修飾上 PEG，能夠降低其抗原性、增加在體內的半衰期、以及提升其生物相容性。由於利用 PEG 修飾放射線造影劑、超順磁氧化鐵奈米球(superparamagnetic iron oxide, SPIO)及螢光奈米(quantum dots)能有效提升其生物相容性，因此各種 PEG 修飾分子(蛋白質、藥物、奈米球及造影劑)已日漸廣泛地應用於臨床或臨床前測試。PEG 可經由減少網狀內皮系統對微脂體地吞噬作用而減緩清除率，增加藥物在血液中之 AUC。於荷 MDA-MB468 腫瘤小鼠之藥物動力學結果顯示，¹¹¹In-LipoDox 藥物的確可滯留於血液循環中較長時間($t_{1/2\alpha} = 6.48$ h)，且 AUC 值高達 616.85 h · %ID/g，與過去文獻報導經 PEG 修飾微脂體之藥物動力學研究一致。經尾靜脈注射 ¹¹¹In-LipoDox 後之生物分布，與本實驗室先前發表文獻 (於轉殖 HT-29/luc 基因之小鼠注射包覆 vinorelbine 之 liposome，修飾 6%PEG) 之生物分布結果相似，在肝臟、脾臟、腎臟及腫瘤等器官皆有明顯積聚。由於肝臟與脾臟為生物體內主要網狀內皮系統密佈之處，而微脂體主要藉該系統清除，故會有較高積聚量。另外，¹¹¹In-LipoDox 藥物在小腸處的積聚，和 Ande Bao 等人發表¹注射 LipoDox 於正常大鼠的結果類似，小腸具豐富之血管叢與淋巴叢，可能是造成微脂體藥物大量積聚的原因。

然而經 EGF 修飾之微脂體 EGF-LipoDox，則出現血液清除率明顯提高的現象。生物分布實驗結果顯示，¹¹¹In-EGF-LipoDox 藥物注射後 4 小時，¹¹¹In-EGF-LipoDox 藥物即大量地被肝臟所吸收

(43.85 ± 4.24 %ID/g)，注射後 96 小時，肝臟積聚量仍高達 30.96 ± 12.03 %ID/g。1989 年 Youichi Ishii 等人報導以 EGF 修飾之微脂體，可被活體外培養之大鼠肝細胞大量攝取，並驗證此攝取機制與肝細胞的 EGFR 有關。Raymond M. Reilly 等人研究亦指出，經尾靜脈注射 ^{111}In -DTPA-EGF 藥物於免疫缺乏裸小鼠，24 小時後肝臟的放射活性積聚高達 18.30 ± 4.34 %ID/g。由上述文獻報導，推測本研究發展之 ^{111}In -EGF-LipoDox，可能亦經由與肝細胞表達之 EGFR 結合，將藥物攝取並積聚於肝細胞中。

Christoph Mamot 等人研究指出，以 anti-EGFR 抗體片段(Fab fragments of cetuximab, IMC-C225)修飾之微脂體，在血液中仍保有較長的滯留時間，藥物經靜脈注射後 24 小時肝臟的積聚量僅在 10 %ID/g 以下，且具有良好的腫瘤標靶能力。Wilson W.K. Cheng 及 Theresa M. Allen 比較分別以完整單株抗體分子、抗體 Fab 片段及 single chain Fv 片段修飾之微脂體的生物分布特性，發現抗體片段的大小會影響修飾後微脂體藥物於肝臟的積聚量，其中以抗體 Fab 片段修飾者在血液中停留時間最長，肝臟積聚量也最低。

綜合以上觀點，肝臟細胞表面的生長因子受體可能存在一特殊的辨認機制，可以區分是 EGF ligand 或是 anti-EGFR 抗體分子，使得 EGF 所修飾微脂體被肝細胞所辨識而吞噬，但是對於 anti-EGFR 抗體片段所修飾之微脂體的攝取能力則較低。EGFR 是許多腫瘤高度表現的 biomarker，也廣泛被應用於腫瘤標靶治療的新藥開發中，因此如何降低這些可與 EGFR 結合的分子被肝臟辨識、清除的效果，將是發展腫瘤標靶藥物一個重要的課題。Heewa Kareem 等人之研究證實，於施打放射性標誌之 EGF 前，利用

anti-EGFR 之 Affibody 分子(ZEGFR:₉₅₅)₂ 來飽和肝臟之 EGFR，可以有效阻擋 EGF 被肝臟所攝取，進而提高腫瘤與肝臟積聚比 (tumor-to-liver ratio)。因此利用可與 EGFR 結合的蛋白分子，預先遮蔽肝臟細胞表面的受體，是改善 EGF 修飾之微脂體藥物於身體中之血液動力學及生物分布一個可行的方法。本研究未來亦將深入探討肝臟及脾臟等網狀內皮系統攔截 EGF 修飾微脂體藥物的機制，並找尋改善該藥物之藥物動力學行為及生物分布，增加藥物積聚於腫瘤的比例。

以放射性同位素標幟微脂體的方法可應用於不同組成之微脂體。表面經聚乙二醇修飾之微脂體可包覆之內容物種類甚多，未來針對不同之腫瘤細胞包覆不同的化療藥物，結合具適當放射特性之同位素，配合核醫及分子影像技術，既可偵測藥物於生物體之分布及藥物動力學，亦可兼具治療效果，希望對未來癌症治療研究提供一可利用之技術平台及治療策略。

現今很多藥物傳遞系統 (drug delivery system) 如微脂體 (liposomes)、微胞 (micelles) 或是量子點 (quantum dot)，都可以改變藥物在體內的藥物動力學，減少藥物對正常組織之毒性，並可在其表面修飾各種功能性配體，改變藥物在腫瘤之分布並增進療效。本研究提出將一內生性之人類表皮生長因子結合化療微脂體的概念，開發一新型標靶免疫微脂體化療藥物，針對過度表現 EGFR 之人類乳癌腫瘤細胞，利用標靶治療增加藥物內吞進入腫瘤細胞的能力，使傳統化療藥物能直接進入腫瘤細胞內，提高腫瘤療效。

本研究結果顯示 EGF-LipoDox 經由與細胞 EGFR 的專一性結

合而增加細胞對微脂體藥物的攝取量。EGF-LipoDox 對 MDA-MB468 細胞的毒性($IC_{50} = 0.1 \mu M$)高於 LipoDox ($IC_{50} = 1 \mu M$)，顯示高度表現 EGFR 之 MDA-MB468 腫瘤細胞內吞 EGF-LipoDox 微脂體藥物，會增加藥物毒殺腫瘤的效果。本計畫利用放射性示蹤技術，偵測藥物於生物體之分布，發現 EGF-LipoDox 會被肝臟大量攝取。過去文獻指出利用可與 EGFR 結合的蛋白分子，預先遮蔽肝臟細胞表面的受體，是改善 EGF 修飾之微脂體藥物於身體中之血液動力學及生物分布一個可行的方法，可望提高藥物於腫瘤的積聚量，提供一有效的腫瘤治療策略。

肆、參考文獻

- [1] I. Vivanco, I.K. Mellinghoff, Epidermal growth factor receptor inhibitors in oncology, *Curr Opin Oncol* 22 (2010) 573-578.
- [2] H.J. Lenz, Anti-EGFR mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events, *Oncology (Williston Park)* 20 (2006) 5-13.
- [3] J.P. Kesterson, K. Odunsi, S. Lele, High cumulative doses of pegylated liposomal doxorubicin are not associated with cardiac toxicity in patients with gynecologic malignancies, *Chemotherapy* 56 (2010) 108-111.
- [4] A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies, *Clin Pharmacokinet* 42 (2003) 419-436.
- [5] F.M. Muggia, Liposomal encapsulated anthracyclines: new therapeutic horizons, *Curr Oncol Rep* 3 (2001) 156-162.
- [6] J.M. Harris, N.E. Martin, M. Modi, Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics, *Clin Pharmacokinet* 40 (2001) 539-551.
- [7] R.R. Sawant, V.P. Torchilin, Challenges in development of targeted liposomal therapeutics, *AAPS J* 14 (2012) 303-315.
- [8] P. Baum, D. Muller, R. Ruger, R.E. Kontermann, Single-chain Fv immunoliposomes for the targeting of fibroblast activation protein-expressing tumor stromal cells, *J Drug Target* 15 (2007) 399-406.
- [9] C. Mamot, D.C. Drummond, U. Greiser, K. Hong, D.B. Kirpotin, J.D. Marks, J.W. Park, Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells, *Cancer Res* 63 (2003) 3154-3161.
- [10] L. Xu, C.C. Huang, W. Huang, W.H. Tang, A. Rait, Y.Z. Yin, I. Cruz, L.M. Xiang, K.F. Pirolo, E.H. Chang, Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes, *Mol Cancer Ther* 1 (2002) 337-346.