



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I607766 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：105137712

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 17 日

(51)Int. Cl. : A61K9/16 (2006.01)

A61K9/127 (2006.01)

A61K31/7088(2006.01)

(30)優先權：2016/06/16 美國

15/184,481

(71)申請人：中原大學(中華民國) CHUNG-YUAN CHRISTIAN UNIVERSITY (TW)

桃園市中壢區中北路 200 號

(72)發明人：黃力夫 HUANG, LEAF (TW)；許毅芝 HSU, YIH-CHIH (TW)；鄭 崗 ZHENG, GANG (US)；葉佳憲 YEH, CHIA-HSIEN (TW)

(74)代理人：李文賢

(56)參考文獻：

WO 2009/002440A2

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：7 共 49 頁

(54)名稱

核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物

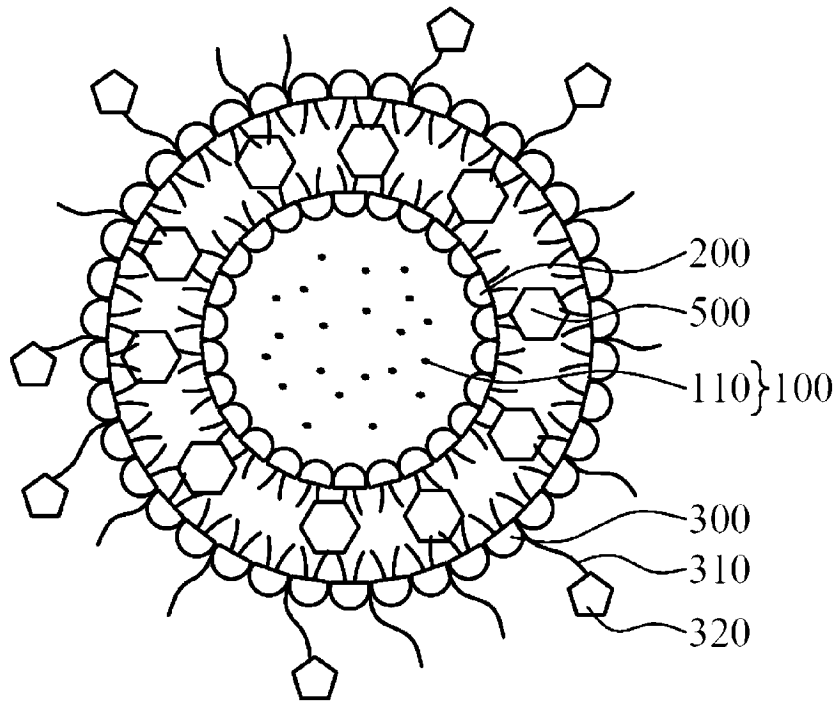
NUCLEIC ACID, MEDICAL NANOPARTICLE(S), AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION THEREOF

(57)摘要

一種醫用奈米粒子組，包含一第一核心、一第一外脂層、一第一內脂層以及一核酸。第一核心包含生物可降解離子沉澱物（Bio-degradable ionic precipitate, BIP）。第一內脂層位於第一核心與第一外脂層之間。核酸位於核心表面，核酸包括序列編號：1 的核苷酸序列。

A medical nanoparticle(s) includes a first core, a first outer lipid layer, a first inner lipid layer, and a nucleic acid. The first core includes a bio-degradable ionic precipitate (BIP). The first inner lipid layer is between the first core and the first outer lipid layer. The nucleic acid is at the surface of the core, and the nucleic acid includes the sequence set forth in SEQ ID NO: 1..

指定代表圖：



符號簡單說明：

100 . . . 核心

110 . . . 生物可降解  
離子沉澱物

500 . . . 光敏劑

200 . . . 內脂層

300 . . . 外脂層

310 . . . 脂質-聚乙  
二醇共軛物

320 . . . 大茴香醯胺

第 3B 圖



申請日: 105/11/17

IPC分類: A61K 9/16 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01)

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物

【英文發明名稱】 Nucleic Acid, Medical Nanoparticle(s), and

Pharmaceutical Composition Thereof

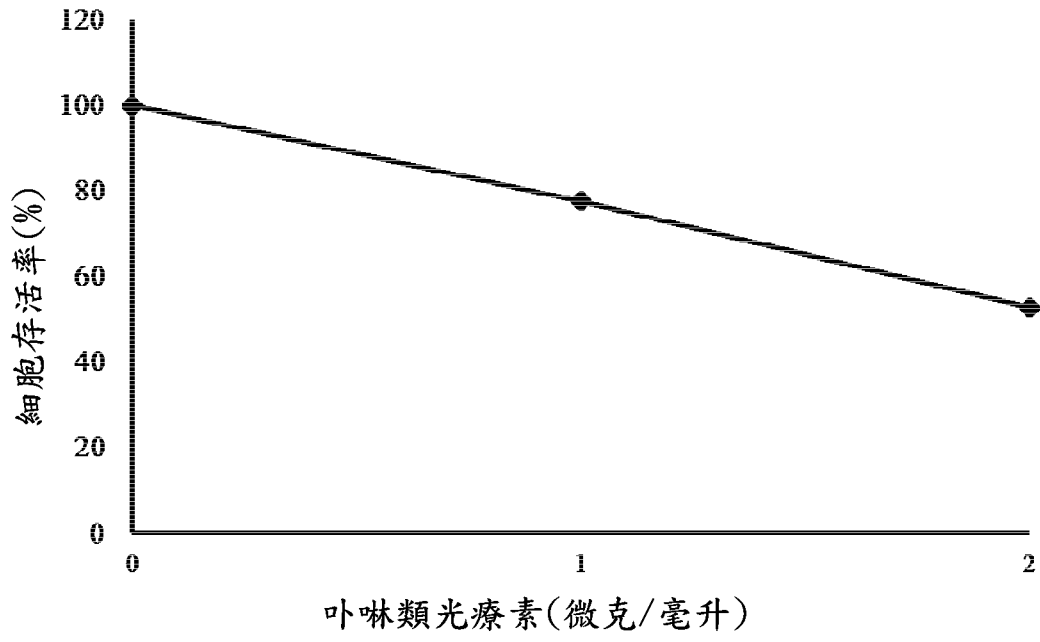
## 【中文】

一種醫用奈米粒子組，包含一第一核心、一第一外脂層、一第一內脂層以及一核酸。第一核心包含生物可降解離子沉澱物（Bio-degradable ionic precipitate, BIP）。第一內脂層位於第一核心與第一外脂層之間。核酸位於核心表面，核酸包括序列編號：1的核苷酸序列。

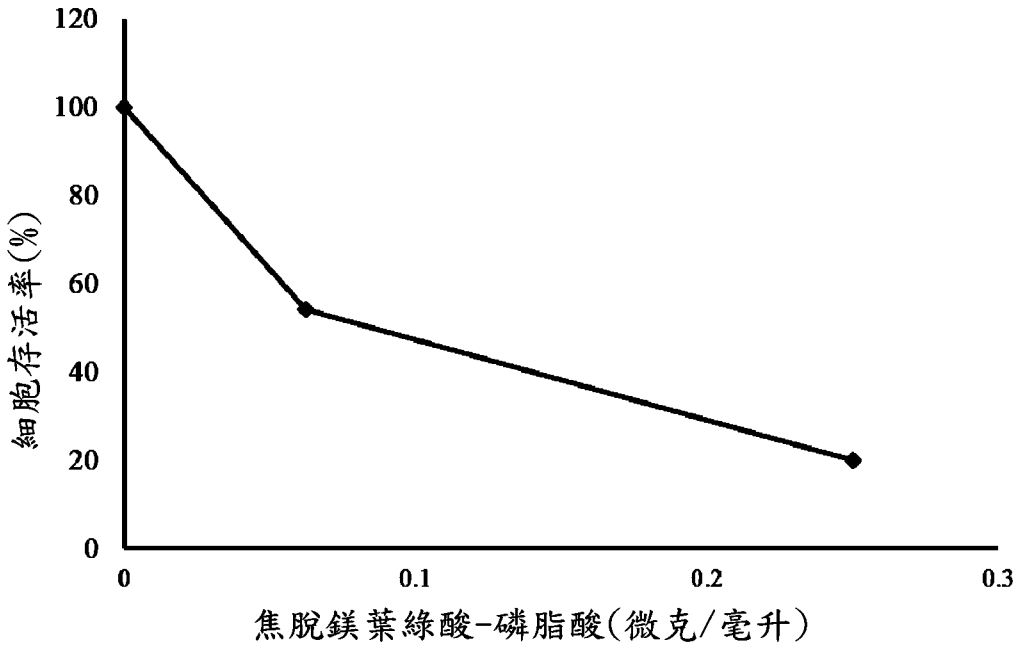
## 【英文】

A medical nanoparticle(s) includes a first core, a first outer lipid layer, a first inner lipid layer, and a nucleic acid. The first core includes a bio-degradable ionic precipitate (BIP). The first inner lipid layer is between the first core and the first outer lipid layer. The nucleic acid is at the surface of the core, and the nucleic acid includes the sequence set forth in SEQ ID NO: 1..

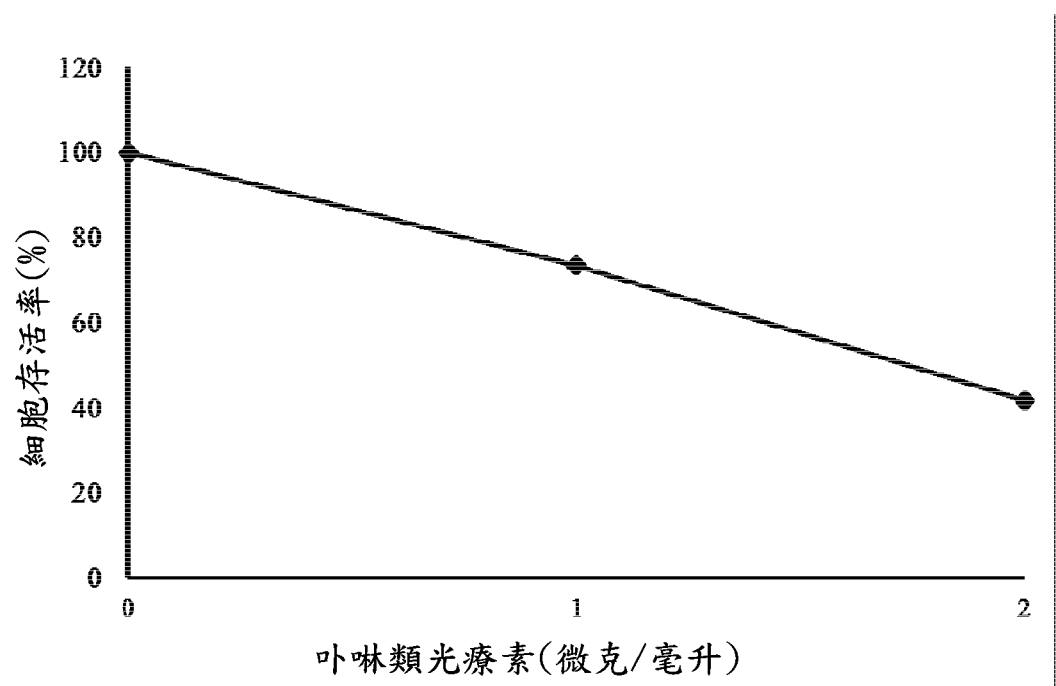
【發明圖式】



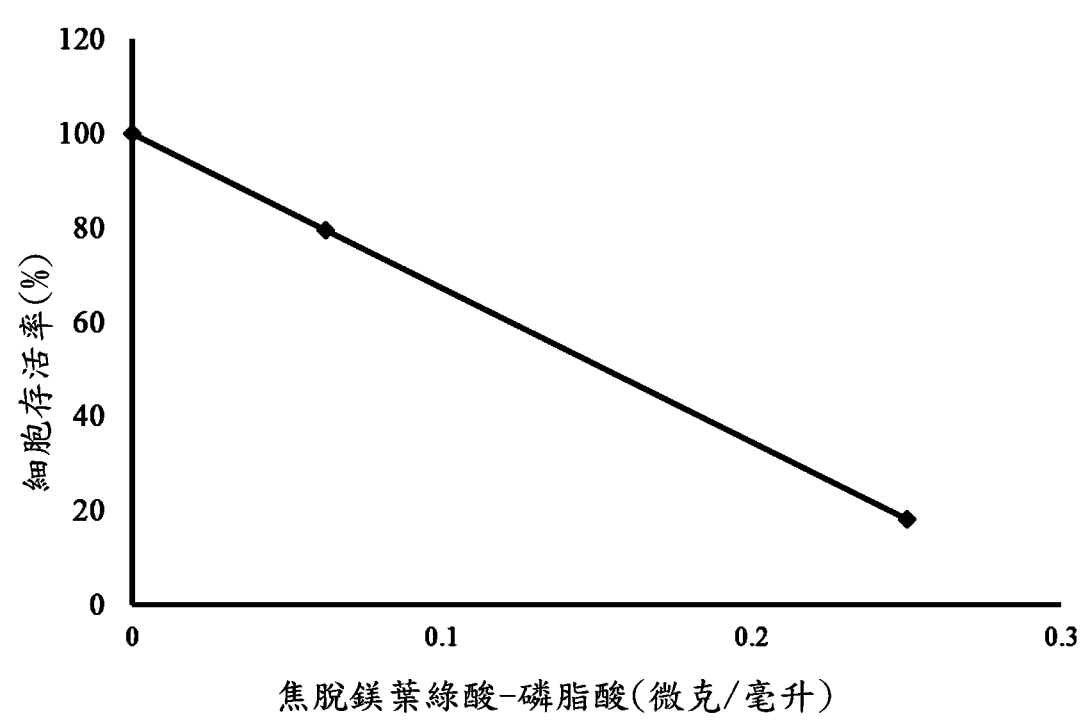
第 1A 圖



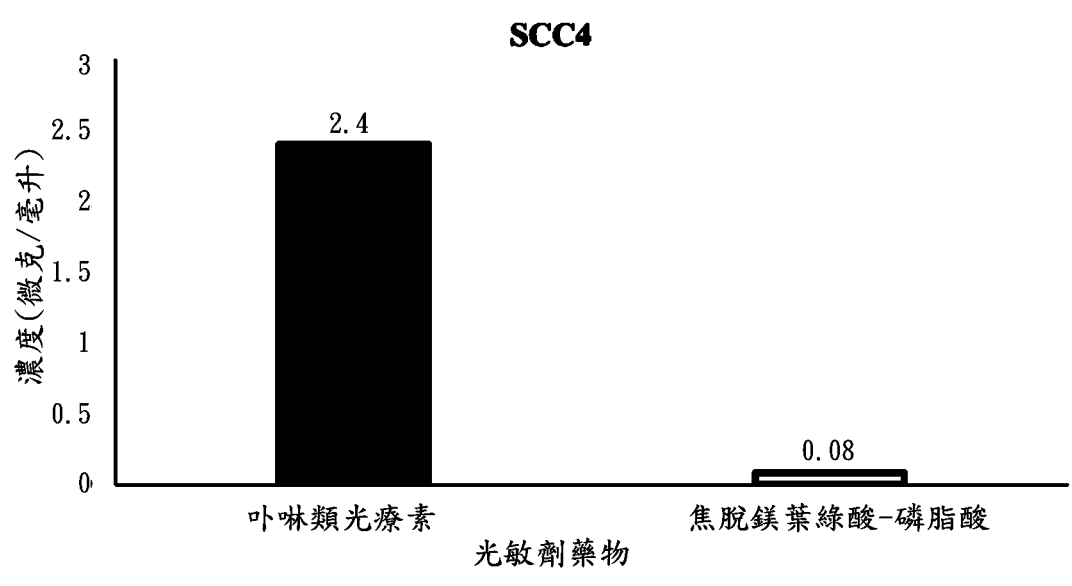
第 1B 圖



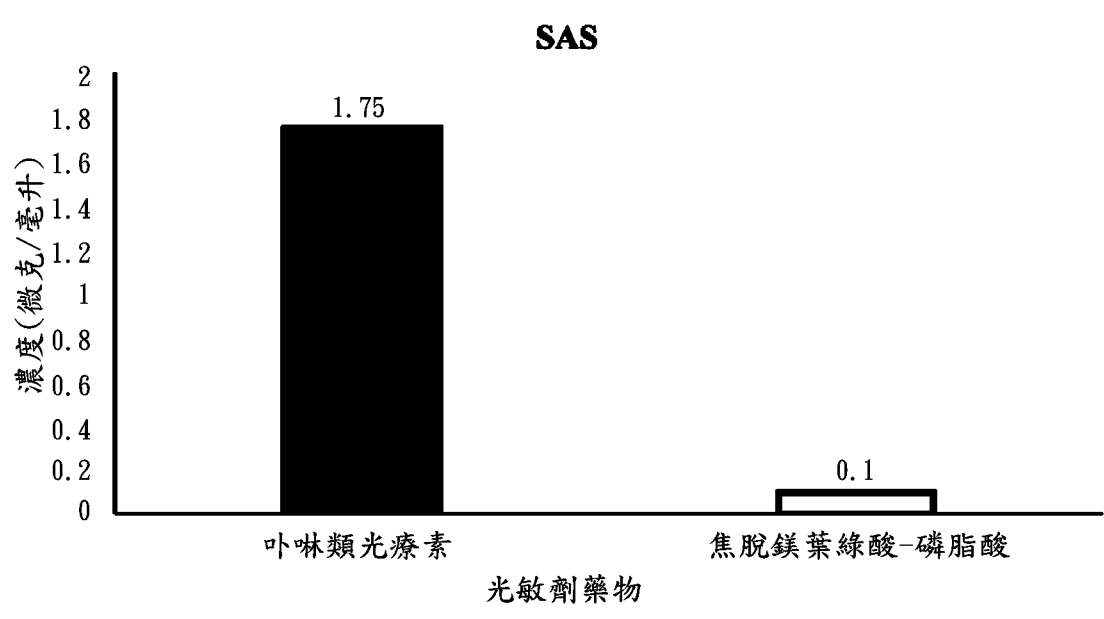
第 1C 圖



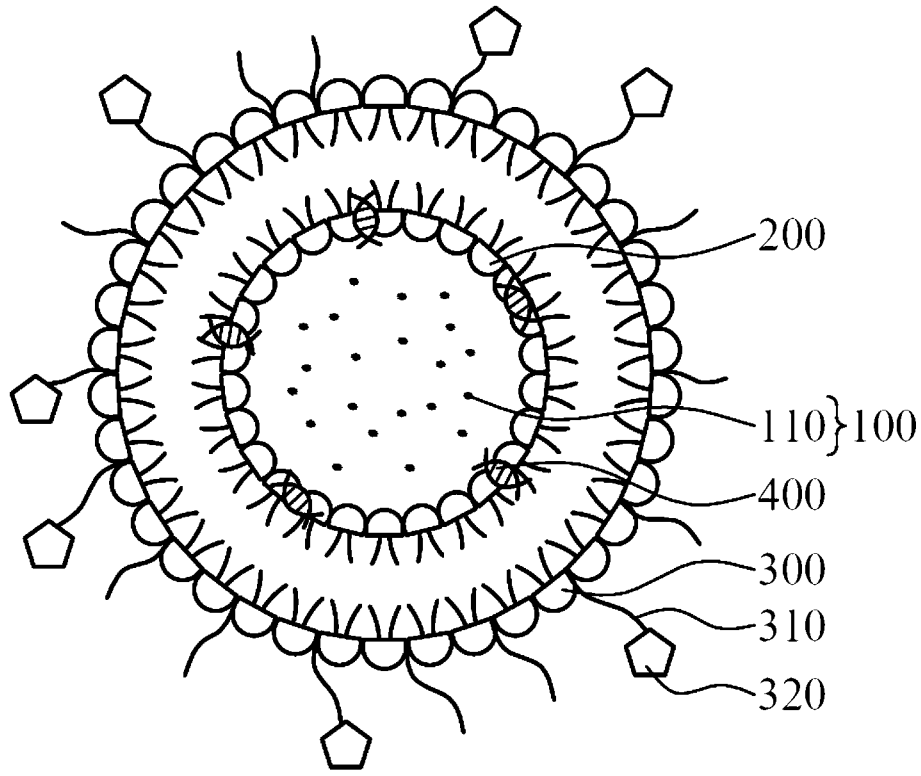
第 1D 圖



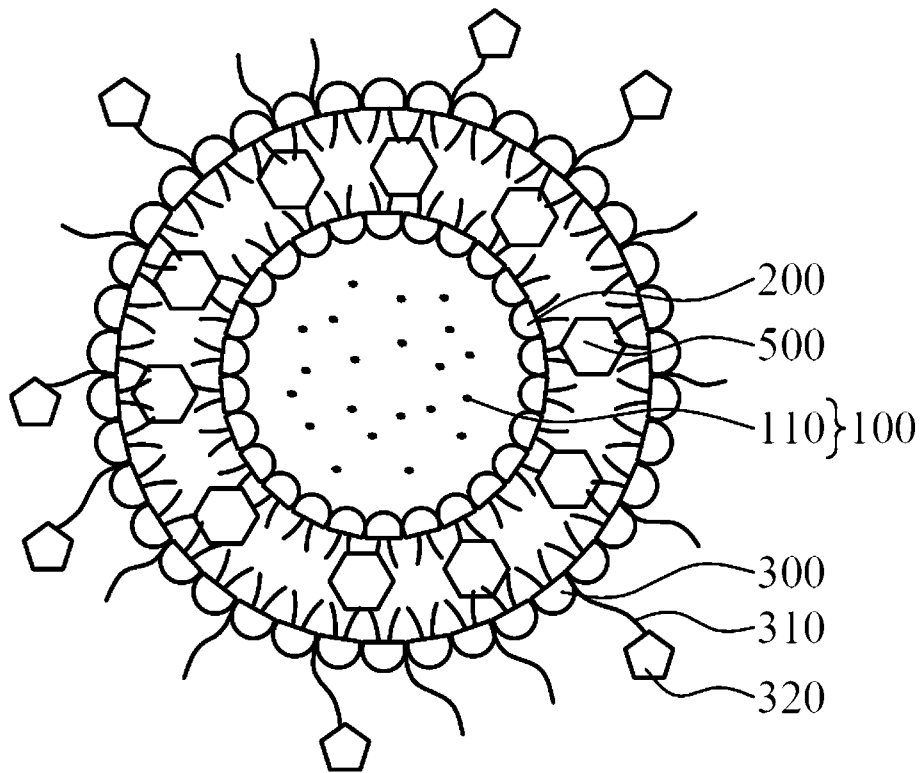
第 2A 圖



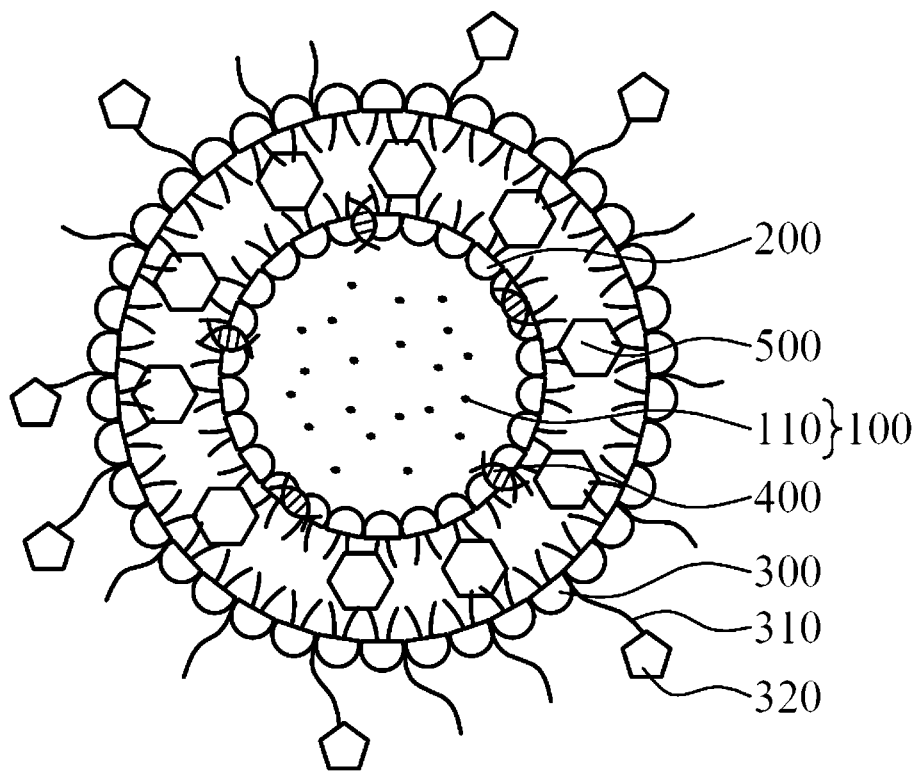
第 2B 圖



第 3A 圖

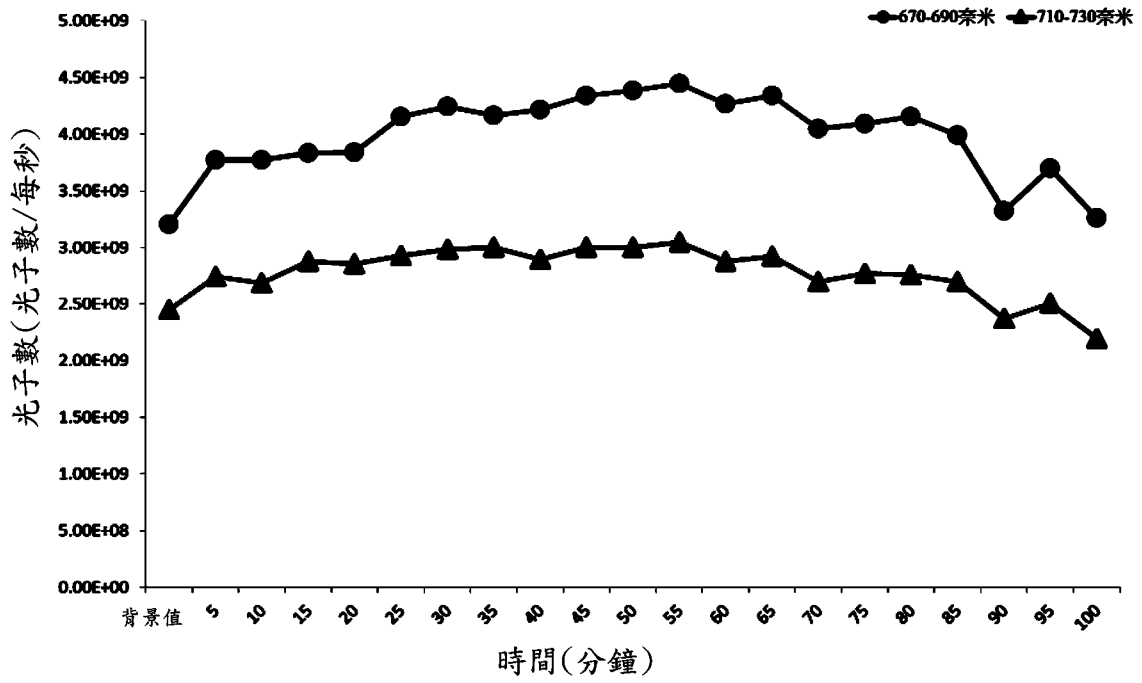


第 3B 圖

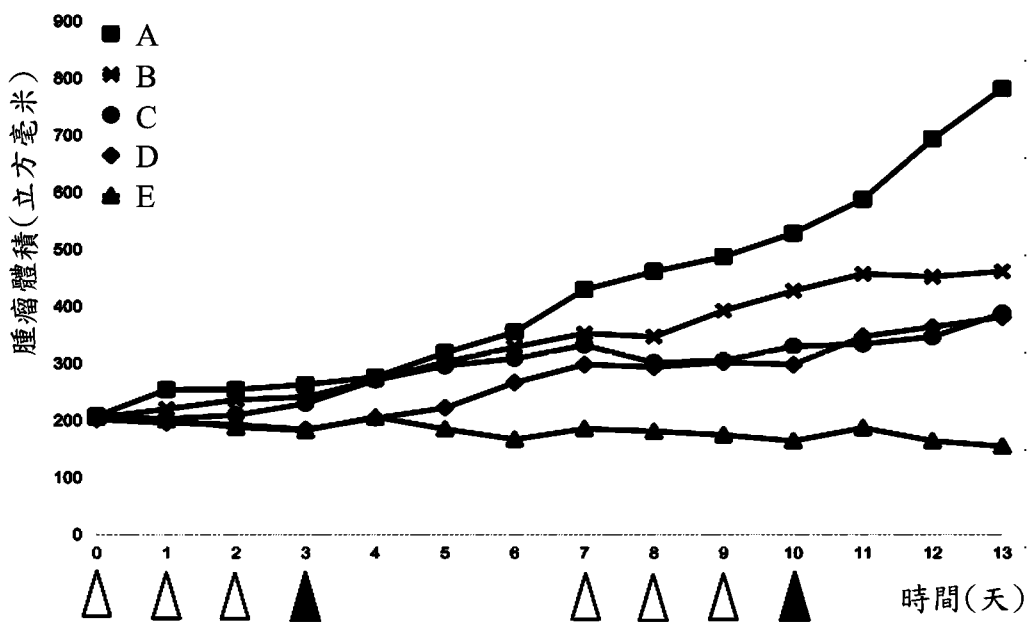


第 3C 圖





第 6 圖



第 7 圖

【指定代表圖】 第3B圖

【代表圖之符號簡單說明】

- 100 核心
- 110 生物可降解離子沉澱物
- 500 光敏劑
- 200 內脂層
- 300 外脂層
- 310 脂質－聚乙二醇共軛物
- 320 大茴香醯胺

【特徵化學式】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物

【英文發明名稱】 Nucleic Acid, Medical Nanoparticle(s), and

Pharmaceutical Composition Thereof

【技術領域】

【0001】 本發明是關於一種新穎的奈米粒子，特別是關於一種核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 癌症又名惡性腫瘤，是一種因細胞不正常增生，且該些增生細胞會進一步侵犯個體其他組織／器官的疾病。依據統計，2012年約有1,410萬人罹患癌症，而有將近820萬人死於癌症，佔全年總死亡人數的14.6%。男性常見的癌症為肺癌、前列腺癌、大腸直腸癌及胃癌；女性常見的癌症為乳癌、大腸直腸癌、肺癌及子宮頸癌；兒童則是以急性淋巴性白血病及腦癌最為常見。導致癌症的原因極為複雜且多元，諸如基因遺傳、肥胖、吸煙、飲酒、運動不足、感染、輻射、飲食習慣及慢性發炎皆可能導致細胞癌化。2015年美國約翰霍普金斯大學的研究更指出，癌症的產生係與運氣相關，即由細胞分裂時所發生的隨機突變所導致。然，目前確切的癌症成因尚不明確，亦加深了預防及治療的困難度。

【0003】 許多學術研究顯示，相較於正常的細胞，癌細胞分裂具有下列特性：（1）代謝速率快；（2）永生性（immortalization），即可不斷分裂，而不會老化或死亡；（3）基因極度不穩定，突變率高，容易產生抗藥性；（4）可大量產生如血管內皮生長因子（vascular endothelial growth

factor, VEGF)、表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)、纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF) 及肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 等各種生長因子，而快速增生，並促進血管新生；以及 (5) 高度侵襲及轉移能力。目前癌症的治療乃以外科手術切除為主；此外，視不同癌症的特性及病患的狀況或需求，醫療人員亦會適度地投予化學治療、放射線治療、免疫治療或單株抗體治療。然而，基於上述癌症的特性，各式療法 (不論是單獨投予或合併治療) 往往無法產生預期的治療功效。再者，多數治療方法由於缺少對癌細胞的專一性，在投予後不但會毒殺癌細胞，更會對周遭正常體細胞造成嚴重傷害，產生無法避免的副作用及健康危害。更甚者，當癌症發生轉移後，無論是何種方法皆無法有效抑制癌細胞的生長，最終造成癌細胞過度／廣泛侵害個體重要組織／器官，導致個體死亡。

#### 【發明內容】

【0004】 有鑑於目前癌症仍被視為一不治之症，各種傳統療法皆無法產生令人滿意的功效；因此，相關領域亟需一種可有效治療癌症的方法，以減緩病患的疼痛與不適，進而改善其生活品質並延長其壽命。

【0005】 一種醫用奈米粒子組，包含一第一核心、一第一外脂層、一第一內脂層及一核酸。核心包含生物可降解離子沉澱物 (Bio-degradable ionic precipitate, BIP)。第一內脂層位於第一核心與第一外脂層之間。核酸位於核心之表面，並且核酸為序列編號：1的核苷酸序列。

【0006】 一種醫藥組合物，其包含一藥學上可接受之添加物以及前述醫用奈米粒子組。

【0007】 一種核酸，為序列編號：1的核苷酸序列。

【0008】 一種醫藥組合物，包含前述之核酸與一藥學上可接受之添加物。

【0009】 綜上所述，在一些實施例中，根據本發明之核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物可以利用核酸（例如諸如小干擾核糖核酸、小髮夾核糖核酸或微核糖核酸等核糖核酸干擾）來抑制表皮生長因子受器的表現及作用，據以抑制癌細胞生長及／或促進癌細胞死亡。在一些實施例中，由於醫用奈米粒子組中的光敏劑在接受特定光源照射／激發後，會釋放自由基，藉以造成癌細胞之氧化性損傷。在一些實施例中，醫用奈米粒子組中的光敏劑更可用於診斷。在一些實施例中，根據本發明之核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物可同時利用核酸及光敏劑以不同的抑制途徑來治療腫瘤，以期達到更好的治療效果。

#### 【圖式簡單說明】

##### 【0010】

[第1A圖]是實驗範例1所闡述之細胞毒性試驗（MTT試驗）結果，其中SCC4細胞在接受卟啉類光療素（photosan）處理後，利用MTT試驗來分析其存活率。

[第1B圖]是實驗範例1所闡述之MTT試驗結果，其中SCC4細胞在接受焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸處理後，利用MTT試驗來分析其存活率。

[第1C圖]是實驗範例1所闡述之MTT試驗結果，其中SAS細胞在接受卟啉類光療素處理後，利用MTT試驗來分析其存活率。

[第1D圖]是實驗範例1所闡述之MTT試驗結果，其中SAS細胞在接受

焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸處理後，利用MTT試驗來分析其存活率。

[第2A圖]是實驗範例1所闡述的柱狀圖，其係分別利用卟啉類光療素及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸來處理SCC4細胞，再利用MTT試驗來分析細胞存活結果。

[第2B圖]是實驗範例1所闡述的柱狀圖，其係分別利用卟啉類光療素及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸來處理SAS細胞，再利用MTT試驗來分析細胞存活結果。

[第3A圖] 是本發明一實施例的醫用奈米粒子示意圖。

[第3B圖] 是本發明另一實施例的醫用奈米粒子示意圖。

[第3C圖] 是本發明再一實施例的醫用奈米粒子示意圖。

[第4A至4C圖]是實驗範例2所闡述之電子顯微照片，其中奈米粒子係分別包覆不同濃度之表皮生長因子受器小干擾核糖核酸（EGFR siRNA）及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸，並利用穿透式電子顯微鏡來進行分析。

[第5A至5F圖]是實驗範例3所闡述的電子顯微照片，其中第5A、5C及5E圖中的顆粒係為奈米粒子之核心（含內脂層），第5B、5D及5F圖中的顆粒則為包覆有內脂層與外脂層的奈米粒子；第5A及5B圖中的顆粒包含EGFR siRNA，第5C及5D圖中的顆粒包含焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸，第5E及5F圖中的顆粒則同時包含EGFR siRNA及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸；所有照片皆是利用穿透式電子顯微鏡來分析顯示。

[第6圖]是實驗範例5所闡述的光子數值（count per second, cps），其係將奈米粒子注射至小鼠後，利用波長為410奈米的光波激發，並

觀察奈米粒子於670-690奈米及710-730奈米波長區段的光子數值。

[第7圖]為異種移植SCC4口腔癌細胞之裸鼠於0-13天每日腫瘤體積變化。

#### 【實施方式】

【0011】 雖然用以界定較廣範圍的數值範圍與參數皆是約略的數值，此處已盡可能精確地呈現具體實施例中的相關數值。然而，任何數值本質上不可避免地含有因個別測試方法所致的標準偏差。在此處，「約」通常係指實際數值在一特定數值或範圍的正負10%、5%、1%或0.5%之內。或者是，「約」一詞代表實際數值落在平均值的可接受標準誤差之內，視本發明所屬技術領域中具有通常知識者的考量而定。除了實驗例之外，或除非另有明確的說明，當可理解此處所用的所有範圍、數量、數值與百分比（例如用以描述材料用量、時間長短、溫度、操作條件、數量比例及其他相似者）均經過「約」的修飾。因此，除非另有相反的說明，本說明書與附隨申請專利範圍所揭示的數值參數皆為約略的數值，且可視需求而更動。至少應將這些數值參數理解為所指出的有效位數與套用一般進位法所得到的數值。

【0012】 除非本說明書另有定義，此處所用的科學與技術詞彙之含義與本發明所屬技術領域中具有通常知識者所理解與慣用的意義相同。此外，在不和上下文衝突的情形下，本說明書所用的單數名詞涵蓋名詞的複數型；而所用的複數名詞時亦涵蓋名詞的單數型。

【0013】 在本說明書中，「核苷酸序列（Nucleotide sequence）」、「多核苷酸（polynucleotide）」或「核酸（nucleic acid）」等詞彙彼此



間可互換使用，且意指一雙股DNA、一單股DNA或DNA之轉錄產物（例如：RNA分子）。需知本發明無關乎自然界或自然狀態下的基因多核苷酸序列。

【0014】 在本說明書中，「核糖核酸干擾（ribonucleic acid interference, RNAi）」是指用以靜默（silencing）或減少基因表現的RNA分子，包含小干擾核糖核酸（small interference ribonucleic acids, siRNA）、小髮夾核糖核酸（small hairpin ribonucleic acids, shRNA）或微核糖核酸（micro-ribonucleic acids, miRNA）。一般來說，這些RNA分子會藉由與靜默基因序列相互同源，進而於動物或植物體產生具序列專一性之後轉錄靜默基因。這些RNA分子可以是內源性或外源性，亦可整合至染色體或以染色體外之轉染載體（transfection vector）形式進行表現。在作用上，這些RNA分子可完全或部份抑制標的基因的表現；亦或是，藉由完全或部份抑制標的基因的功能來產生靜默之功效。

【0015】 在本說明書中，「治療」一詞是指應用或投予本發明任一實施例之核酸、醫用奈米粒子及／或其醫藥組合物至患有癌症之相關病徵及／或相關症狀的一個體，以達到部份或完全減輕、減緩、治癒、延遲、抑制、終止，及／或降低一或多個癌症之相關病徵、相關症狀、病程、臨床標記或其組合的發生。其中，癌症之相關病徵及相關症狀包含，但不侷限於，腫脹、出血、疼痛、潰瘍、淋巴結腫大、咳嗽、咳血、肝腫大、骨頭疼痛、骨折、體重減輕、食慾不振、貧血或其組合。在此「治療」一詞亦可以是指施用本發明任一實施例之核酸、醫用奈米粒子及／或其醫藥組合物至患有早期此些病徵或症狀之個體，以降低個體發展成為癌症之相關病

徵及或相關症狀的風險。

【0016】 其中，「個體 (subject)」一詞是指包含人類的動物，其能接受本發明任一實施例之核酸、醫用奈米粒子及／或醫藥組合物的治療。除非特定指出，否則「個體」一詞同時意指男性及女性，且可以是任何年齡，例如：兒童或成人。

【0017】 在本說明書中，「有效量 (effective amount)」是指一藥物的用量足以產生所欲的療效反應。具體的有效量取決於多種因素，如欲治療的特定狀況、個體的生理條件（如，個體體重、年齡或性別）、接受治療的個體的類型（如，兔子、老鼠、人猿、猴子或人種等）、治療持續時間、目前療法（如果有的話）的本質以及所用的具體配方和化合物或其衍生物的結構。「有效量」亦指一種化合物或組合物，其治療利益效果超越其毒性或有害影響。舉例來說，可將有效量表示成藥物的總重量（譬如以克 (g)、毫克 (mg) 或微克 ( $\mu\text{g}$ ) 為單位），或表示成藥物重量與體重之比例（其單位為毫克／公斤 ( $\text{mg/kg}$ )）。亦或是，有效量可以醫藥組合物中活性成份的濃度來表示，例如莫耳濃度 (molar concentration)、重量濃度 (mass concentration)、體積濃度 (volume concentration)、重量莫耳濃度 (molality)、莫耳分率 (mole fraction)、重量分率 (mass fraction) 及混合比例 (mixing ratio)。所屬技術領域中具有通常知識者可依據動物模式的劑量來計算藥物（如本發明任一實施例之核酸、醫用奈米粒子及／或醫藥組合物）的人體等效劑量 (human equivalent dose, HED)。舉例來說，所屬技術領域中具有通常知識者可依據美國食品藥物管理局 (US Food and Drug Administration, FDA) 所公告之「估算成人

健康志願者在初始臨床治療測式之最大安全起始劑量（Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers）」來估算人體使用之最高安全劑量。

【0018】 在本說明書中，「光動力治療（photodynamic therapy, PDT）」是指利用可見光（通常是由非熱雷射所產生）來激發一光敏劑（photosensitizer），以治療腫瘤。

【0019】 在本說明書中，「光動力診斷（photodynamic diagnosis, PDD）」是指利用可見光（通常是由非熱雷射所產生）來激發一光敏劑，以診斷腫瘤。光敏劑分子在基態(Ground state)時吸收特定光波長的照射能量而躍升到激發態 (Excited state)後，分子若在受激態的單相態 (Singlet state) 直接將能量釋放後，會放出可偵測的螢光並回到基態，這一特性即為光動力診斷的原理，藉此，可以光敏劑之螢光診斷癌病變的所在位置。

【0020】 於本說明書中，「醫藥組合物（pharmaceutical composition）」一詞用以涵蓋一組合物，其係包含一或多種適用於治療應用之活性要素（例如任一實施例所述之核酸或醫用奈米粒子）。

【0021】 於本說明書中，「藥學上可接受之添加物（pharmaceutically acceptable excipient）」是指一物質，其適合與主藥一起使用而不會產生過度的有害副作用（如毒性、刺激及過敏反應）且具有一適當的效益／危害比。另外，各添加物必須為「可接受的（acceptable）」，即與醫藥組合物之其餘成分相容。添加物可以是固態、半固態、液態稀釋液、膏狀物或膠囊的形式。

【0022】 在一實施例中，請參閱第3A圖，一種醫用奈米粒子，其包含一奈米粒子（以下稱第一奈米粒子），且此第一奈米粒子包含一核心100、一外脂層300、一內脂層200及核酸400。此核心100包含生物可降解離子沉澱物（Bio-degradable ionic precipitate, BIP）110。內脂層200位於核心100與外脂層300之間，並且核酸400位於核心100的表面。在一些實施例中，內脂層200可為核心100的表面，並且核酸400是嵌在內脂層200上。換言之，核酸400的一端是位在核心100的內部，另一端是位在核心100的外部。

【0023】 在另一實施例中，請參閱第3B圖，一種醫用奈米粒子，其包含一奈米粒子（以下稱第二奈米粒子），且此第二奈米粒子包含一核心100、一外脂層300、一內脂層200及一光敏劑500。並且此核心100包含生物可降解離子沉澱物110。內脂層200位於核心100與外脂層300之間，光敏劑500位於內脂層200之表面而介於外脂層300與內脂層200之間。在一些實施例中，光敏劑500連接於內脂層200上。

【0024】 在又一實施例中，一種醫用奈米粒子，其包含前述之第一奈米粒子與前述之第二奈米粒子。

【0025】 在再一實施例中，請參閱第3C圖，一種醫用奈米粒子，其包含一核心100、一外脂層300、一內脂層200、一光敏劑500及一核酸400。核心包含生物可降解離子沉澱物110。內脂層200位於核心100與外脂層300之間，並且光敏劑500位於內脂層200之表面而介於外脂層300與內脂層200之間。核酸400位於核心100的表面。在一些實施例中，內脂層200可為核心100的表面，並且核酸400是嵌在內脂層200上。換言之，核酸400

的一端是位在核心100的內部，另一端是位在核心100的外部。在一些實施例中，光敏劑500連接於內脂層200上。

【0026】 其中，前述任一實施例中之核酸400具有抑制表皮生長因子受器（epidermal growth factor receptor, EGFR）的表現及作用能力。此表皮生長因子受器是一種細胞表面受器。當表皮生長因子受器與表皮生長因子（epidermal growth factor, EGF）結合後，會啟動下游各式激酶（例如PKC、ERK、AKT及JAK）的活化，進而促使細胞生長，並抑制其死亡。並且，此表皮生長因子受器已知會過量表現於多種癌細胞上，且參與其中的癌化反應。基於此表現特性，根據本發明任一實施例之核酸、根據本發明任一實施例之具有核酸的醫用奈米粒子或根據本發明任一實施例之具有核酸的醫藥組合物可利用核酸400（例如諸如小干擾核糖核酸、小髮夾核糖核酸或微核糖核酸等核糖核酸干擾）來抑制表皮生長因子受器的表現及作用，據以抑制癌細胞生長及／或促進癌細胞死亡。

【0027】 其中，前述任一實施例中之光敏劑500在接受特定光源照射／激發後會釋放自由基，藉以造成細胞標的（例如：細胞膜、胞器、酵素或DNA）的氧化性損傷，進而達成腫瘤之治療效果。此外，光敏劑500在接受特定光源照射／激發後發出螢光，藉以透過偵測螢光來進行癌症的診斷。另外，亦可透過染劑，其在接收特定光源照射／激發後發出可見／不可見光，藉以透過偵測可見／不可見光來進行癌症的診斷。舉例而言，染劑所發出的光線可以是螢光、冷光、紫外光、可見光或紅外光，只要染劑發出的光線可以讓光偵測器偵測，皆可適用。

【0028】 再者，前述任一實施例中之醫用奈米粒子可藉由滯留增強效

應 (enhanced permeability and retention effect, EPR effect) 進入並停留於癌細胞中產生毒殺／抑制作用。一般來說，相較於正常的組織或器官，多數固體腫瘤 (solid tumor) 具有 (1) 較高的血管密度；(2) 結構缺陷之血管 (例如內皮細胞間具有大間隙或缺少平滑肌層等)；以及 (3) 淋巴系統發展不完全等特性；此些特性一方面可促使特定分子進入並累積於固體腫瘤中，另一方面則使此些特定分子不易被相關免疫細胞所清除，產生所謂滯留增強效應。因此，醫用奈米粒子可利用滯留增強效應來專一標的特定癌細胞。其中，癌細胞可以是源自前列腺癌、肺癌、乳癌、黑色素皮膚癌、血癌、胰臟癌、卵巢癌、肝癌、大腸直腸癌、神經母細胞瘤、神經膠質母細胞瘤、頭頸部癌或口腔癌等的癌細胞。

【0029】 此外，在一些實施例中，核酸400與光敏劑500的同時存在可分別利用不同的抑制途徑來治療腫瘤，以達到更好的治療效果。

【0030】 在一些實施例中，前述任一實施例中之核酸400可包含序列編號：1之核苷酸序列。於另一些實施例中，核酸400可包含序列編號：2之核苷酸序列。

【0031】 在一些實施例中，前述任一實施例中之核酸400可是核糖核酸干擾 (ribonucleic acid interference, RNAi)。

【0032】 於一些實施例中，此核糖核酸干擾可為小干擾核糖核酸 (small interference ribonucleic acids, siRNA)。其中，此小干擾核糖核酸通常可為具有平滑末端 (blunt)、3'-凸出 (3'-overhang) 或5'-凸出 (5'-overhang) 的雙股形式。在一些實施例中，小干擾核糖核酸具有平滑末端，且其正股包含序列編號：1或序列編號：2之核苷酸序列。

【0033】 在另一些實施例中，此核糖核酸干擾可為小髮夾核糖核酸（small hairpin ribonucleic acids, shRNA）。其中，此小髮夾核糖核酸是藉由一小段核酸所形成的間距（spacer）來連結正股及負股，因而形成一環形（loop）結構。在一些實施例中，小髮夾核糖核酸的正股包含序列編號：1或序列編號：2之核苷酸序列。

【0034】 在又一些實施例中，此核糖核酸干擾可是以微核糖核酸（micro-ribonucleic acids, miRNA）或其前驅物（例如：pri-miRNA或pre-miRNA）的形式提供。在一些實施例中，微核糖核酸或其前驅物包含序列編號：1或序列編號：2之核苷酸序列。

【0035】 在一些實施例中，前述任一實施例中之光敏劑500係選自於下列所構成的群組：焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸（pyropheophorbide-phosphatidic acid, Pyro-PA）、卟啉類光療素（photosan）、光螢素（photofrin, PH）、卟啉錫（tin etiopurpurin, SnET2）、苯基紫質衍生物（benzoporphyrin derivative, BPD）及5-氨基酮戊酸（5-aminolaevulinic acid, ALA）。

【0036】 其中，焦脫鎂葉綠酸（pyropheophorbide）是一種葉綠素衍生物，並且焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸為由焦脫鎂葉綠酸與1-棕櫚醯-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼（1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine）反應形成的脂質衍生物。相較於單獨存在的焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸，包覆於醫用奈米粒子中的焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸具有更為顯著的生物活性。適用於激發包含焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸之醫用奈米粒子的光源主要是波長介於400-1,000

奈米 (nm) 的光源。因應不同需求，可使用不同波段的光源。舉例來說，在治療表淺性癌症時，可採用波長介於400-600奈米的藍光、綠光或黃光作為激發光源；而在治療較為深層的癌症時，則可使用波長介於600-1,000的紅光或近紅外光作為激發光。在一特定實施例中，可利用波長為410奈米的光源來激發包含焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸之醫用奈米粒子，以產生自由基進行毒殺作用。

**【0037】** 在一些實施例中，生物可降解離子沉澱物係選自於下列所構成的群組：磷酸鈣 (calcium phosphate, CaP)、檸檬酸鈣、碳酸鈣、碳酸鎂、磷酸鎂及磷酸錳。舉例而言，假設生物可降解離子沉澱物為磷酸鈣，於製備時，先將氯化鈣 (calcium chloride, CaCl<sub>2</sub>)、磷酸氫二鈉 (sodium hydrogen phosphate, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 以及核酸 (如果有) 均勻混合，利用正負電荷之間相互吸引結合的特性進行包覆，藉以形成一包含磷酸鈣及核酸的核心。

**【0038】** 在一些實施例中，內脂層與外脂層構成脂雙層結構，藉以增加醫用奈米粒子於溶液中的穩定性及生物體細胞對醫用奈米粒子的吸收性。

**【0039】** 在一些實施例中，內脂層可是利用陽離子與陰離子相互結合之特性而包覆核心且與核心結合。

**【0040】** 在一些實施例中，內脂層可為一陰離子脂質層，而外脂層可為一陽離子脂質層。其中，陽離子脂質層是利用陽離子與陰離子相互結合之特性而包覆於陰離子脂質層的外圍。

**【0041】** 於另一些實施例中，內脂質層可為一陰離子脂質層，而外脂



質層可為一中性脂質層。其中，中性脂質層是利用脂質疏水端會相互聚集的特性而包覆於陰離子脂質層的外圍。

【0042】 於一些實施例中，陰離子脂質層可以包含，但不限於，二油醯磷脂酸 (dioleoyl phosphatidic acid, DOPA)、2,3-二氫硫-1-丙磺酸 (2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid, DMPS)、1,2-二棕櫚醯-sn-甘油-3-磷絲胺酸 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine, DPPS)、二油醯磷脂醯絲氨酸 (dioleoyl phosphatidylserine, DOPS)、棕櫚醯-油醯基磷脂醯絲氨酸 (palmitoyl oleoyl phosphatidylserine, POPS)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷甘油 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, DMPG)、1,2-二棕櫚醯-sn-甘油-3-磷甘油 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, DPPG)、1,2-二油醯甘油-3-磷酸-1-甘油 (1,2-dioleoyl glycero-3-phospho-1-glycerol, DOPG)、棕櫚油醯磷脂甘油 (palmitoyl oleoyl phosphatidylglycerol, POPG)、二肉豆蔻醯磷脂酸 (dimyristoyl phosphatidic acid, DMPA)、棕櫚醯磷脂酸 (dipalmitoyl phosphatidic acid, DPPA)、二油醯磷脂酸 (dioleoyl phosphatidic acid, DOPA)、棕櫚油醯磷脂酸 (palmitoyl oleoyl phosphatidic acid, POPA)、膽固醇半琥珀酸酯 (cholesteryl hemisuccinate, CHEMS) 或其衍生物。

【0043】 於一些實施例中，陽離子脂質層可包含，但不限於，1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷氯鹽 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride salt, DOTAP)、肉豆蔻醯三甲銨丙烷 (dimyristoyl trimethylammonium propane,

DMTAP ) 、 1,2- 二 棕 櫚 醯 -3- 三 甲 銨 丙 烷 ( 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium propane, DPTAP ) 、 去 醯 磷 脂 醯 肌 醇 甘 露 寡 糖 ( deacylated phosphatidylinositol manno-oligosaccharides, dPIMs ) 、 1,2- 二 油 醯 環 氧 丙 烷 -3- 二 甲 基 羥 乙 基 溴 化 銨 ( 1,2-dioleoyl oxypropyl-3-dimethyl hydroxyethyl ammonium bromide, DORIE ) 、 二 甲 基 二 溴 化 銨 ( dimethyl dioctadecylammonium bromide, DAAB ) 、 1,2- 二 油 醯 -3- 二 甲 基 丙 烷 ( 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane, DODAP ) 、 1,2- 二 油 醯 -sn- 甘 油 -3- 乙 基 磷 酸 膽 鹼 ( 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethyl phosphocholine, DOEPC ) 或 其 衍 生 物 。

【0044】 於 一 些 實 施 例 中 ， 中 性 脂 質 層 可 包 含 ， 但 不 限 於 ， 二 油 醯 磷 脂 醯 膽 鹼 ( dioleoyl phosphatidylcholine, DOPC ) 、 1- 棕 櫚 醯 -2- 油 醯 -sn- 甘 油 -3- 磷 酸 膽 鹼 ( 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC ) 、 1,2- 二 油 醯 -sn- 甘 油 -3- 磷 酸 乙 醇 胺 ( 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE ) 或 其 衍 生 物 。

【0045】 延 續 前 述 例 子 ， 假 設 陰 離 子 脂 質 採 用 二 油 醯 磷 脂 酸 且 陽 離 子 脂 質 採 用 1,2- 二 油 醯 基 -3- 三 甲 基 銨 - 丙 烷 氯 鹽 ， 於 製 備 時 ， 將 包 含 磷 酸 鈣 及 核 酸 的 核 心 與 二 油 醯 磷 脂 酸 混 合 ； 其 中 ， 核 心 中 的 鈣 離 子 會 與 二 油 醯 磷 脂 酸 的 磷 酸 根 反 應 ， 使 二 油 醯 磷 脂 酸 包 覆 於 核 心 的 外 圍 ， 以 形 成 內 脂 層 。 接 著 ， 加 入 陽 離 子 脂 質 1,2- 二 油 醯 基 -3- 三 甲 基 銨 - 丙 烷 氯 鹽 ， 同 樣 利 用 陰 離 子 與 陽 離 子 間 相 互 結 合 的 反 應 ， 將 1,2- 二 油 醯 基 -3- 三 甲 基 銨 - 丙 烷 氯 鹽 包 覆 於 內 脂 層 的 外 圍 ， 以 形 成 外 脂 層 。

【0046】 在某些實施例中，請參閱第3A至3C圖，更包含脂質－聚乙二醇共軛物 (conjugate) 310，並且此脂質－聚乙二醇共軛物 (conjugate) 310係連接於外脂層300。

【0047】 脂質－聚乙二醇共軛物 (conjugate) 310包括脂質與聚乙二醇。其中，脂質係用以連結聚乙二醇與外脂層300。聚乙二醇是一種可增加脂質體 (liposome) 循環期 (circulation lifetime) 的聚合物，其常用以將特定分子 (例如抗體、藥物、蛋白胜肽或配位子) 連接至脂質體表面。另外，由於聚乙二醇為具有一定分子長度的高分子，其具有高度自由度 (degree of freedom)，因此可以有效屏蔽醫用奈米粒子避免其受巨噬細胞或白血球襲擊。在製程上，聚乙二醇可先與脂質連結，再加入特定分子 (即，抗體、藥物、蛋白胜肽或配位子等)，藉以形成「脂質－聚乙二醇－特定分子」共軛物；接著，在製備外脂層時，加入「脂質－聚乙二醇－特定分子」共軛物，共軛物中的脂質會利用其疏水端與脂質體的外脂層之脂質疏水端相互聚集，進而將共軛物穩定嵌合至外脂層中。

【0048】 於一些實施例中，特定分子可為一標靶物質，藉以增加對癌細胞的專一性。於一些實施例中，標靶物質可為 $\alpha$ -Enolase。於一些實施例中，標靶物質可為苯甲醯胺衍生物。於一些實施例中，如第3A至3C圖所示，此標靶物質可為大茴香醯胺 (anisamide, AA) 320。舉例來說，於製備外脂層時，同時加入1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷氯鹽及脂質－聚乙二醇－大茴香醯胺共軛物，藉此將大茴香醯胺連接於醫用奈米粒子的表面。

【0049】 由於大茴香醯胺會與西格瑪受器 (sigma receptor) 結合，

而西格瑪受器則是一種會過量表現於癌細胞表面的分子，因此，大茴香醯胺可作為用來標定癌細胞的標的物。據此，利用此結合特性，將大茴香醯胺連接於任一實施例的醫用奈米粒子的表面，藉以增加醫用奈米粒子對癌細胞的專一性及治療效果。再者，基於大茴香醯胺會標的至癌細胞表面的西格瑪受器，表面具有大茴香醯胺的醫用奈米粒子即可專一地標的至癌細胞，而不會對癌細胞以外的正常體細胞產生毒殺／抑制作用，藉以提升治療效果。

【0050】 其中，適用於連結聚乙二醇之脂質可包含，但不限於，1,2-二肉豆蔻醯-sn-3-甘油-磷酸乙醇胺（1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPE）、1,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE）、1,2-二月桂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺（1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DLPE）、膽固醇（cholesterol）或油酸（oleic acid）。

【0051】 在另一些實施例中，外脂層可更包含一膽固醇。膽固醇係為形成細胞膜及脂質體的要素之一，其具有調節膜流動性的作用，因此又稱為脂質體之流動性緩衝劑；於化學反應中加入膽固醇可增加脂質體的穩定性。因此，在此實施例中，是同時加入1,2-二油醯基-3-三甲基胺-丙烷氫鹽、脂質－聚乙二醇－大茴香醯胺共軛物及膽固醇，使此些成份共同表現於醫用奈米粒子之外脂質層。

【0052】 在一些實施例中，醫用奈米粒子具有特定量之內含物（即，

特定量之核酸及光敏劑），以使其電荷平衡，進而穩定成型。具體來說，在條件許可的情況下，醫用奈米粒子包括特定比例／濃度的核酸及光敏劑，以產生相對較佳的療效。在某些實施例中，醫用奈米粒子中之核酸及光敏劑的重量比（微克／微克）約為1:1-1:32。其中，核酸的濃度可約為每毫升1-10毫克，而光敏劑的濃度則可約為每毫升10-50毫克。在一特定實施例中，醫用奈米粒子中之核酸及光敏劑的重量比（微克／微克）約為1:16。其中，核酸的濃度可約為每毫升2毫克，而光敏劑的濃度則可約為每毫升32毫克。

**【0053】** 在一些實施例中，具有核酸與光敏劑的醫用奈米粒子之核心（含內脂層），其平均直徑約為5-50奈米。舉例來說，核心的直徑可以是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50奈米。在較佳的情況下，核心的平均直徑約為5-30奈米。在更佳的情況下，核心的平均直徑約為6-20奈米。

**【0054】** 在一些實施例中，以脂雙層結構（即內、外脂質層）包覆核心後，醫用奈米粒子的平均直徑約為12-50奈米；亦即，醫用奈米粒子的直徑可以是12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50奈米。在較佳的情況下，醫用奈米粒子的平均直徑約為15-20奈米。在更佳的情況下，醫用奈米粒子的平均直徑約為20奈米。

【0055】 在一些實施例中，以脂雙層結構包覆核心後，醫用奈米粒子的表面電位約為10-70毫伏（millivolt, mV）；亦即，醫用奈米粒子的表面電位可以是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70毫伏。在一特定實施例中，醫用奈米粒子的表面電位約為20-60毫伏。

【0056】 進一步言，前述任一實施例之核酸或醫用奈米粒子能進一步製備成醫藥組合物。換言之，此醫藥組合物包含一藥學上可接受之添加物以及前述任一實施例之核酸或醫用奈米粒子。

【0057】 於此，各醫藥組合物的製備係符合可接受、既定的醫藥程序。選擇與核酸、醫用奈米粒子併用之藥學上可接受的添加物基本上是取決於醫藥組合物所期望的產品形式。其中，添加物可為稀釋劑、賦形劑、分解劑（disintegrants）、粒化黏合劑（granulation binders）、潤滑劑、填充劑、調味劑、色料色素、乳化劑、懸浮劑、肪脂酸、油、分散劑（dispersing agents）、表面活化劑（surfactants）、生物可利用增強劑（bioavailability enhancers）或其組合。

【0058】 在一些實施例中，可以藉由任何適當途徑給予前述之醫藥組合物，舉例來說，藉由口服、非口服（例如肌肉、靜脈、皮下或腹腔注射）、局部或透粘膜投予。

【0059】 若採口服途徑，可將前述任一實施例之核酸或醫用奈米粒子

與不同添加物一起配製成錠劑。其中，添加物可包括賦形劑、分解劑與粒化黏合劑。於此，適合的賦形劑可例如微晶纖維素（microcrystalline cellulose）、檸檬酸鈉（sodium citrate）、碳酸鈣（calcium carbonate）、磷酸氫鈣（dicalcium phosphate）或甘胺酸（glycine）等；適合的分解劑可例如澱粉、藻酸及某些矽酸鹽；以及適合的粒化黏合劑可例如聚乙烯吡咯烷酮（polyvinyl pyrrolidone）、蔗糖、明膠及阿拉伯膠（acacia）等。此外，可以加入如硬脂酸鎂（magnesium stearate）、硫酸月桂酯鈉（sodium lauryl sulfate）或滑石（talc）等潤滑劑。

【0060】 此外，亦可將前述任一實施例之核酸或醫用奈米粒子與不同添加物一起配製成明膠膠囊。於此，明膠膠囊內亦可置入固態組合物作為填充劑。其中，適合的填充劑可例如乳糖（lactose）、高分子量聚乙二醇或其組合。

【0061】 當需要口服給予液態懸浮液及／或酏劑（elixirs）時，核酸或醫用奈米粒子可以結合不同的調味劑、色料或色素，以及若有需要，乳化劑及／或懸浮劑，並加入諸如水、乙醇、丙二醇（propylene glycol）、甘油（glycerin）及其組合之稀釋劑。

【0062】 若採非經腸胃道途徑，可將前述任一實施例之核酸或醫用奈米粒子配置於液態之醫藥組合物中，且其可以是無菌溶液或懸浮液。舉例來說，液態醫藥組合物可以藉由靜脈、肌肉、皮下或腹腔注射給予。為給予無菌的注射液或懸浮液，適合的稀釋劑包含卻不限於1,3-丁二醇（1,3-butanediol）、甘露醇（mannitol）、水、林格氏液（Ringer's solution）及等滲透壓氯化鈉溶液（isotonic sodium chloride solution）。製備可注

注射液亦可使用脂肪酸(例如油酸(oleic acid)及其甘油酯衍生物(glyceride derivatives))，或是自然界中藥學上可接受的油(例如橄欖油(olive oil)或蓖麻油(castor oil))。這些油溶液或懸浮液也可以包含乙醇稀釋劑或羧甲纖維素(carboxymethyl cellulose)或相似的分散劑(dispersing agents)。為配製，亦可使用常用的表面活性劑(surfactants)(例如聚山梨醇酯(Tweens)、聚山梨糖醇單油酸酯(Spans))、其他相似的乳化劑或常用於施予藥學上可接受劑型之生物可利用增強劑(bioavailability enhancers)。

**【0063】** 若採局部表面塗抹途徑，可將核酸或醫用奈米粒子與各種皮膚上可接受的惰性賦形劑配製為各種適於局部表面應用的劑型。局部表面塗抹之醫藥組合物可以為液態、膏狀、洗劑、軟膏、凝膠、噴霧、氣霧、皮膚貼片及類似物等施加型式。典型的惰性賦形劑可以是水、乙醇、聚乙烯吡咯酮(polyvinyl pyrrolidone)、丙二醇、礦物油(mineral oil)、硬脂醇(stearyl alcohol)或產生凝膠物質。

**【0064】** 若採經粘膜吸收途徑，可將核酸或醫用奈米粒子與生物可分解的聚合賦形劑配製成各種可經粘膜吸收的劑型；例如透過口腔粘膜來傳送藥物之頰及／或舌下的藥物劑量單位。其中，可以使用各式藥學上可接受之生物可分解的聚合賦形劑提供一適當的附著度及所需的藥物釋放曲線，且其能與所施予的活性劑及其他存在於頰及／或舌下的藥物劑量單位之成份相容。通常，聚合賦形劑包含附著於口腔粘膜溼表面的親水性聚合物。聚合賦形劑的例子包含，卻非限定於，丙烯酸(acrylic acid)聚合物及共聚物(copolymers)、水解聚乙烯醇(hydrolyzed



polyvinylalcohol)、聚乙烯氧化物、聚丙烯酸酯 (polyacrylates)、乙烯基聚合物 (vinyl polymers) 及共聚合物、聚乙烯吡咯啉、聚葡萄糖 (dextran)、瓜爾膠、果膠、澱粉及纖維素聚合物。

【0065】 依實際需求不同，醫藥組合物可以是固態、半固態、液態、膏狀物、膠囊、噴霧或貼片的形式。據此，此醫藥組合物可以口服、非口服（例如肌肉、靜脈、皮下或腹腔注射）、局部或透粘膜等方式投予，以針對不同臨床狀況產生最佳療效。

【0066】 在投予至個體體內後，醫藥組合物會經由體循環到達腫瘤位置，並藉由醫用奈米粒子的滯留效應或其大茴香醯胺（或其他標靶物質）標的至癌細胞及／或癌化組織。之後，醫用奈米粒子可有效與細胞膜融合（fusion），而被吸收至癌細胞／組織內。一旦進入細胞／組織，醫用奈米粒子會釋放出其中的EGFR siRNA，進而阻斷表皮生長因子的表現，進而抑制癌細胞生長及／或促進其死亡。同時，若再投予一適當的光照，可激發奈米粒子中之焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸活化，產生自由基以對癌細胞／組織造成氧化性損傷。

【0067】 如同前述，在搭配應用上，可利用波長介於400-1,000奈米的光源來激發醫用奈米粒子中焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸的活化。不同的波長具有不同的激發能量，所適用的癌症種類／位置／特性／大小亦有所不同。在一實施例中，係利用波長為410奈米的光源來激發醫用奈米粒子中的焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸。

【0068】 下文提出多個實驗範例來說明本發明的某些態樣，以利本發明所屬技術領域中具有通常知識者實作本發明，且不應將這些實驗範例視

為對本發明範圍的限制。據信所屬技術領域中具有通常知識者在閱讀了此處提出的說明後，可在不需過度解讀的情形下，完整利用並實踐本發明。此處所引用的所有公開文獻，其全文皆視為本說明書的一部分。

#### **【0069】 口腔癌細胞培養**

**【0070】** 實驗範例中所使用的人類口腔癌細胞SCC4及SAS培養於包含10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的DMEM細胞培養液中。將細胞培養於含有5%二氧化碳、37°C的環境中，直到培養足夠的細胞數量時，即可進行後續的分析試驗。

#### **【0071】 製備包覆EGFR siRNA的奈米粒子**

**【0072】** 使用脂質磷酸鈣 (Lipid calcium phosphate、LCP)來包覆siRNA。原理為利用微乳化反應 (microemulsion) 形成Calcium phosphate (CaP) 的奈米核心，再包覆一層陽離子脂質1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷 氯 鹽 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride salt, DOTAP) 及聚乙二醇PEG (polyethylene glycol、PEG)，並亦可在PEG上修飾大茴香醯胺(anisamide、AA)。Anisamide可有效的吸附在癌細胞膜上的西格瑪受器 (sigma receptor) 上，進而達到標的目的。製備方法說明如下，將CaCl<sub>2</sub>及Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>加入到油相 (cyclohexane/Igepal CO-520) 中並加入陰離子脂質二油醯磷脂酸(dioleoyl phosphatidic acid, DOPA) 及EGFR siRNA形成Calcium phosphate (CaP) 奈米核心。加入絕對酒精 (absolute Ethanol) 篩出雜質，以12,500 rpm離心10 min。再加入氯仿 (chloroform)以10,000 rpm離心，取其上清液後即為LCP core。再將LCP core加上DOTAP、膽固醇、1,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺－聚乙二

醇共軛物、可選擇加上或不加上標靶物質anisamide後以氮氣吹乾，並真空抽氣，完成成品。

**【0073】 製備包覆光敏劑藥物Pyropheophorbide的奈米粒子**

**【0074】** 將焦脫鎂葉氯甲酸 (pyropheophorbide) 上接上一條磷脂酸 (phosphatidic acid) 成為 pyropheophorbide-phosphatidic acid，使之帶有親水性和疏水性性質以便嵌合進脂質磷酸鈣 (lipid calcium phosphate) 內層的流體鑲嵌磷脂質。製備過程因 pyropheophorbide 為一光敏劑，能與特定波長光做光化學反應，所以全程需避光。製備方法說明如下：將  $\text{CaCl}_2$  及  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  加入到 oil phase (cyclohexane/lgepal CO-520) 中並加入 DOPA 及 pyropheophorbide-phosphatidic acid 形成 Calcium phosphate (CaP) 奈米核心。加入絕對酒精 (absolute ethanol) 篩出雜質，以 12,500 rpm 離心 10 min。再加入氯仿 (chloroform) 以 10,000 rpm 離心，取其上清液後即為 LCP core。再將 LCP core 加上 DOTAP、Cholesterol、DSPE-PEG、可選擇加上或不加上標靶物質anisamide後以氮氣吹乾，並真空抽氣完成，完成成品。

**【0075】 細胞毒性試驗 (MTT試驗)**

**【0076】** MTT 試 劑 ( 即 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide ) 是一種黃色染料，與粒線體中琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase-ubiquinone, SDH) 及細胞色素 C (cytochrome C) 作用後，會生成不溶於水的藍紫色結晶。將此結晶溶於 DMSO 溶液後，可利用溶液於 570 奈米時的吸光值來判讀細胞存活狀況，藉此換算得知細胞的存活比例。

【0077】 以不包含血清的DMEM培養液配製每毫升5毫克的MTT溶液後，利用孔徑為0.22微米之過濾膜過濾溶液，所得之過濾液即可用以分析應用後續之細胞試驗。

【0078】 將SCC4或SAS細胞種植於48盤孔（每孔洞的細胞量為 $1 \times 10^4$ ）中，分別以卟啉類光療素（photosan）及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸處理48小時後，以100微升之生理食鹽水洗滌細胞，再加入20微升之MTT溶液。於37°C、包含5%二氧化碳之細胞培養箱靜置4小時後，移除MTT溶液，並加入300微升之DMSO。於室溫避光靜置30分鐘。取200微升之上清液至96孔盤，利用酵素結合免疫吸附分析（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）讀值機（VersaMax™ Microplate Reader, Molecular devices, Sunnyvale, USA）讀取上清液於570奈米時的吸光值。

#### 【0079】 奈米粒子分析

【0080】 取1微克奈米粒子滴至鍍碳銅網上，真空乾燥2天後交付清大貴重儀器生物穿透式及掃描式電子顯微鏡（日本Hitachi, HT7700）操作。

#### 【0081】 活體影像系統（in vivo imaging system, IVIS）分析

【0082】 第一組實驗可觀察癌細胞的轉移情形。第一組實驗的實驗方法為首先將螢火蟲用以編碼螢光酵素（luciferase）的基因轉殖至癌細胞中，並以抗生素篩選後，選出螢光酵素基因表現穩定的細胞。接著將螢光酵素基因表現穩定的癌細胞，以皮下注射方式接種於小鼠之右大腿。待腫瘤長至約200立方毫米時，將小鼠分組（包括給藥組與不給藥組，依實驗設計不同組別），進行療程。之後於非侵入式活體分子影像系統（IVIS Imaging System, Lumina series III）取得癌細胞活體影像，並記錄。

【0083】 第二組實驗可觀察含光敏劑之奈米粒子在小鼠體內的傳輸情形。第二組實驗的實驗方法為由尾靜脈注入奈米粒子（每毫升2毫克之EGFR siRNA及每毫升16毫克之光敏劑的奈米粒子／200微升）。將小鼠置於避光處55分鐘。進入儀器前則使用氣麻暫時麻痺老鼠，之後以非侵入式活體分子影像系統內的660奈米光源照射小鼠，以激發奈米粒子內的焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸，再分別照相攝影測量其於670-690奈米及710-730奈米波長區段的吸光值。

#### 【0084】 動物試驗

【0085】 將人類口腔癌細胞 SCC4（ $6 \times 10^5$ ）種植於小鼠（BALB/cAnN.Cg-foxnlnu/CrlNarl，8週大）之皮下組織。等至腫瘤長至200立方毫米後，由尾靜脈注入奈米粒子（15-45 mM／200微升）。將小鼠置於避光處55分鐘，之後利用410奈米的光源照射小鼠，以激發奈米粒子內的焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸，再分別測量其於670-690奈米及710-730奈米波長區段的吸光值。

【0086】 於第0天時，將人類口腔癌細胞SAS（ $6 \times 10^5$ ）種植於小鼠（BALB/cAnN.Cg-foxnlnu/CrlNarl，8週大）之皮下組織。等至腫瘤長至200立方毫米後，由尾靜脈注入一劑奈米粒子（15-45 mM／200微升），總共三劑。第三劑注射後，將小鼠置於避光處55分鐘，之後以保定器將小鼠固定，並利用植物燈光源（其波長可為可見光）進行光動力治療，光照總能量為每平方公分100焦耳。之後，每日測量腫瘤大小及小鼠體重的變化。

#### 【0087】 實驗範例1 不同種類之光敏劑的毒殺效果

【0088】 第1A與1B圖分別為利用不同濃度之卟啉類光療素及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸處理SCC4細胞後，利用MTT試驗所得之細胞存活率曲線圖；利用曲線圖之公式可分別計算二種光敏劑對細胞的半抑制濃度（concentration of 50% inhibition,  $IC_{50}$ ）。結果顯示，卟啉類光療素對SCC4細胞的半抑制濃度為每毫升2.4微克；相較之下，焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸對SCC4細胞的半抑制濃度則為每毫升0.08微克。

【0089】 相似地，在利用不同濃度之卟啉類光療素（第1C圖）及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸（第1D圖）處理SAS細胞後，可得到卟啉類光療素對SAS細胞的半抑制濃度為每毫升1.75微克，而焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸對SAS細胞的半抑制濃度則為每毫升0.1微克。

【0090】 第2A與第2B圖將上述結果做了總整理，以更清楚地表示二光敏劑的毒殺差異。由圖可知，在SCC4細胞中，卟啉類光療素的半抑制濃度為每毫升2.4微克，而焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸則為每毫升0.08微克；二者相差了30倍。至於在SAS細胞中，卟啉類光療素的半抑制濃度為每毫升1.75微克，而焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸則為每毫升0.1微克；二者相差了17.5倍。

【0091】 據此，實驗結果證實相較於卟啉類光療素，焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸對癌細胞具有更佳的抑制功效。以下實驗範例將採用焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸作為光敏劑來製備奈米粒子，並進行相關分析。

## 【0092】 實驗範例2 奈米粒子之最適包覆量

【0093】 在確認以焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸作為光敏劑後，實驗範例2將進一步分析奈米粒子中，EGFR siRNA及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸的最適

含量。

【0094】 如第4A至4C圖所示，包覆每毫升2毫克之EGFR siRNA及每毫升32毫克之光敏劑的奈米粒子，無法穩定形成球形顆粒（第4A圖）。相較之下，包覆每毫升2毫克之EGFR siRNA及每毫升16毫克之光敏劑的奈米粒子（第4B圖），以及包覆每毫升1毫克之EGFR siRNA及每毫升16毫克之光敏劑的奈米粒子（第4C圖）則皆可穩定呈現球體形態。

【0095】 由實驗結果可知，包覆每毫升2毫克之EGFR siRNA及每毫升16毫克之光敏劑的奈米粒子為奈米粒子所能包覆的最大量。以下實驗範例即以包含此劑量之奈米粒子進行相關分析。

### 【0096】 實驗範例3 奈米粒子之粒徑大小

【0097】 在製備包含最大量之EGFR siRNA及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸的奈米粒子後，利用穿透式電子顯微鏡來分析奈米粒子的大小。

【0100】 如第5A至5F圖所示，包覆EGFR siRNA之核心（含內脂層）平均粒徑大小為 $11.1\pm 3.1$ 奈米（第5A圖），包覆EGFR siRNA之奈米粒子平均粒徑大小為 $34.9\pm 3.0$ 奈米（第5B圖），包覆焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸之核心（含內脂層）平均粒徑大小為9-12奈米（第5C圖），包覆焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸之奈米粒子平均粒徑大小為15-20奈米（第5D圖），同時包覆EGFR siRNA及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸之核心（含內脂層）平均粒徑大小為9-12奈米（第5E圖），而同時包覆EGFR siRNA及焦脫鎂葉綠酸－磷脂酸之奈米粒子平均粒徑大小則為20奈米（第5F圖）。

### 【0101】 實驗範例4 奈米粒子之表面電位

【0102】 在製備包含最大量之EGFR siRNA及焦脫鎂葉綠酸－磷脂

酸的奈米粒子後，另利用奈米粒徑分析儀（Zetasizer Nano S90, Malvern, Zurich, Switzerland）來測量奈米粒子的表面電位，藉以分析其相關物理特性。

【0103】 如表1所述，不包含大茴香醯胺之奈米粒子的表面電位平均為 $25.0\pm 0.5$ 毫伏；相較之下，包含大茴香醯胺之奈米粒子的表面電位平均則為 $45.4\pm 4.5$ 毫伏。

【0104】 表1 奈米粒子之表面電位

	+ 大茴香醯胺	- 大茴香醯胺
試驗	表面電位（毫伏）	表面電位（毫伏）
1	49.2	25.7
2	46.7	24.6
3	40.4	24.8
平均值 <sup>a</sup>	$45.4\pm 4.5$	$25.0\pm 0.5$

<sup>a</sup>平均值±均標準偏差（數量為3）

【0105】 結果顯示，加入大茴香醯胺會增加奈米粒子的表面電位；亦即，大茴香醯胺可使奈米粒子具有更高的穩定性及分散性。

#### 【0106】 實驗範例5 標的奈米粒子至腫瘤部位及所需時間分析

【0107】 如前所述，奈米粒子是以410奈米的光波激發，而於670-690奈米及710-730奈米的波長區段可偵測到其發散光。第6圖即是偵測此二波段（670-690奈米標記為紅線，710-730奈米則標記為藍線）的光子數值，進而分析奈米粒子到達／聚集於腫瘤位置的時間。結果顯示，不論是利用何種波段來測量腫瘤部位的光子數值，皆可發現奈米粒子會於注射後的5分鐘開始聚集，並於55分鐘後到達最大量。



【0108】 結果明確指出，奈米粒子可準確地標的至腫瘤部份，且會於注射後的55分鐘達到最高量。

【0109】 **實驗範例6 利用奈米粒子治療腫瘤**

【0110】 由實驗範例5可知，經靜脈注射後，奈米粒子會聚集於腫瘤部位，並於55分鐘時達到最大量。因此，實驗範例6即是採用55分鐘作為間隔時間來進行光動力療法。

【0111】 第7圖為異種移植SCC4口腔癌細胞之裸鼠於0-13天每日腫瘤體積變化。△代表以尾靜脈注射LCP-EGFR siRNA或LCP-Control siRNA或磷酸鹽緩衝生理鹽水；▲代表以尾靜脈注射LCP-Pyro-PA照光或不照光。針對體內動物實驗乃是以異種移植人類口腔癌SCC4裸鼠模式驗證組合治療療效，使用BALB/c裸鼠的皮下移植口腔癌細胞SCC4，並等待腫瘤成長至200 mm<sup>3</sup>以五組實驗，分別為A：對照組 (PBS (磷酸鹽緩衝生理鹽水))、B：光動力對照組 (LCP-Control siRNA + 光動力試劑(PDT)) 及C、D：EGFR siRNA對照組(分為LCP-EGFR siRNA + LCP-Pyro-PA 無光照組及LCP-EGFR siRNA + PBS 伴隨光照組) 及E：組合治療組 (LCP-EGFR siRNA + PDT)，以連續14天的實驗期間觀察腫瘤生長情形。

【0112】 於第14天，A組異種移植SCC4裸鼠的腫瘤體積為782.6mm<sup>3</sup>；B組腫瘤體積為462.2 mm<sup>3</sup>，較A組腫瘤體積減少320.4 mm<sup>3</sup>，可推算PDT抑制腫瘤體積比例為40.9%；C組腫瘤體積為388.7mm<sup>3</sup>，較A組腫瘤體積減少393.9 mm<sup>3</sup>，抑制腫瘤體積比例為50.3%；D組腫瘤體積為381.8mm<sup>3</sup>，較A組腫瘤體積減少400.8mm<sup>3</sup>，抑制腫瘤體積比例為51.2% (p<0.001)；E組腫瘤體積為155.6mm<sup>3</sup>，較A組腫瘤體積減少627.0mm<sup>3</sup>，

組合治療的腫瘤抑制率為80.1%。E組與其他單獨治療 (EGFR siRNA 或 PDT) 相比，抑制腫瘤體積效果最好。

【0113】 因此，由結果可知，具有EGFR siRNA的奈米粒子其本身即具有抑制腫瘤生長的功效；若搭配一適當的光照進行光動力治療，將可達到更佳的治療效果。

【0114】 綜上所述，在一些實施例中，根據本發明之核酸、醫用奈米粒子以及醫藥組合物可以利用核酸（例如諸如小干擾核糖核酸、小髮夾核糖核酸或微核糖核酸等核糖核酸干擾）來抑制表皮生長因子受器的表現及作用，據以抑制癌細胞生長及／或促進癌細胞死亡。在一些實施例中，由於醫用奈米粒子中的光敏劑在接受特定光源照射／激發後，會釋放自由基，藉以造成癌細胞之氧化性損傷。在一些實施例中，醫用奈米粒子中的光敏劑更可用於診斷。在一些實施例中，根據本發明之核酸、醫用奈米粒子以及醫藥組合物可同時利用核酸及光敏劑以不同的抑制途徑來治療腫瘤，以期達到更好的治療效果。

【0115】 雖然上文實施例中揭露了本發明的具體實施例，然其並非用以限定本發明，本發明所屬技術領域中具有通常知識者，在不悖離本發明之原理與精神的情形下，當可對其進行各種更動與修飾，因此本發明之保護範圍當以附隨申請專利範圍所界定者為準。

## 【符號說明】

### 【0116】

100 核心

110	生物可降解離子沉澱物
400	核酸
500	光敏劑
200	內脂層
300	外脂層
310	脂質－聚乙二醇共軛物
320	大茴香醯胺

## 【序列表】

<110> 中原大學

<120> 核酸、醫用奈米粒子組以及醫藥組合物

<130> N/A

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR siRNA

<400> 1

aagtgctgga tgatagacgc adtdt 25

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EGFR siRNA

<400> 2

gaaggaaacu gaauucaaa u 21

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種醫用奈米粒子組，包含：

一第一核心，包含一生物可降解離子沉澱物；

一第一外脂層；

一第一內脂層，位於該第一核心與該第一外脂層之間；及

一核酸，位於該第一核心之表面，該核酸為序列編號：1的核苷酸序列。

【第2項】 如請求項1所述的醫用奈米粒子組，更包括：一光敏劑，位於該第一外脂層與該第一內脂層之間。

【第3項】 如請求項2所述的醫用奈米粒子組，其中該核酸與該光敏劑重量比介於1:1-1:32。

【第4項】 如請求項1所述的醫用奈米粒子組，其中該第一內脂層係為陰離子脂質層，並且該第一外脂層係為陽離子脂質層或中性脂質層。

【第5項】 如請求項1至4中任一項所述的醫用奈米粒子組，更包括至少一脂質－聚乙二醇共軛物，該至少一脂質－聚乙二醇共軛物連接於該第一外脂層。

【第6項】 如請求項5所述的醫用奈米粒子組，更包括至少一標靶物質，各該標靶物質連接於該至少一脂質－聚乙二醇共軛物中之一。

【第7項】 一種醫藥組合物，包含：

一藥學上可接受之添加物；

至少一如請求項1至6中任一項所述的醫用奈米粒子組，位於該藥學上可接受之添加物中；

至少一另一醫用奈米粒子組，位於該藥學上可接受之添加物中，各該另一醫用奈米粒子組包含：

一第二核心，包含一生物可降解離子沉澱物（Bio-degradable ionic precipitate, BIP）；

一第二外脂層；

一第二內脂層，位於該第二核心與該第二外脂層之間；及

一光敏劑，位於該第二外脂層與該第二內脂層之間。

【第8項】如請求項7所述的醫藥組合物，更包括：另一光敏劑，位於該第一外脂層與該第一內脂層之間。

【第9項】如請求項7所述的醫藥組合物，其中該第二內脂層係為陰離子脂質層，並且該第二外脂層係為陽離子脂質層或中性脂質層。

【第10項】如請求項7至9中任一項所述的醫藥組合物，更包括至少一脂質－聚乙二醇共軛物，各該脂質－聚乙二醇共軛物連接於該第一外脂層或該第二外脂層。

【第11項】如請求項10所述的醫藥組合物，更包括至少一標靶物質，各該標靶物質連接於該至少一脂質－聚乙二醇共軛物中之一。

【第12項】一種醫藥組合物，包含：

至少一如請求項1至6中任一項所述的醫用奈米粒子組；以及

一藥學上可接受之添加物，該醫用奈米粒子組位於該藥學上可接受之添加物中。

【第13項】一種核酸，為序列編號：1的核苷酸序列。

【第14項】一種醫藥組合物，包含：

如請求項13所述的核酸；以及

一藥學上可接受之添加物，該核酸與該藥學上可接受之添加物混合。