



(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 I397428B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：098145476

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K9/127 (2006.01)

A61K47/44 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

慶北大學校產學協力團 (南韓) UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION, KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY (KR)

南韓

(72)發明人：呂瑞梅 LU, MAGGIE J. M. (TW)；羅雅勤 LO, YA CHIN (TW)；張璿文 CHANG, LI WEN (TW)；柯怡如 KO, YI JU (TW)；魏明正 WEI, MING CHENG (TW)；李炳憲 LEE, BYUNG-HEON (KR)；梁祥發 LIANG, HSIANG FA (TW)；金仁山 KIM, IN-SAN (KR)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

US 6958241B2

US 2009/0074663A1

US 2009/0291049A1

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：41 共 0 頁

(54)名稱

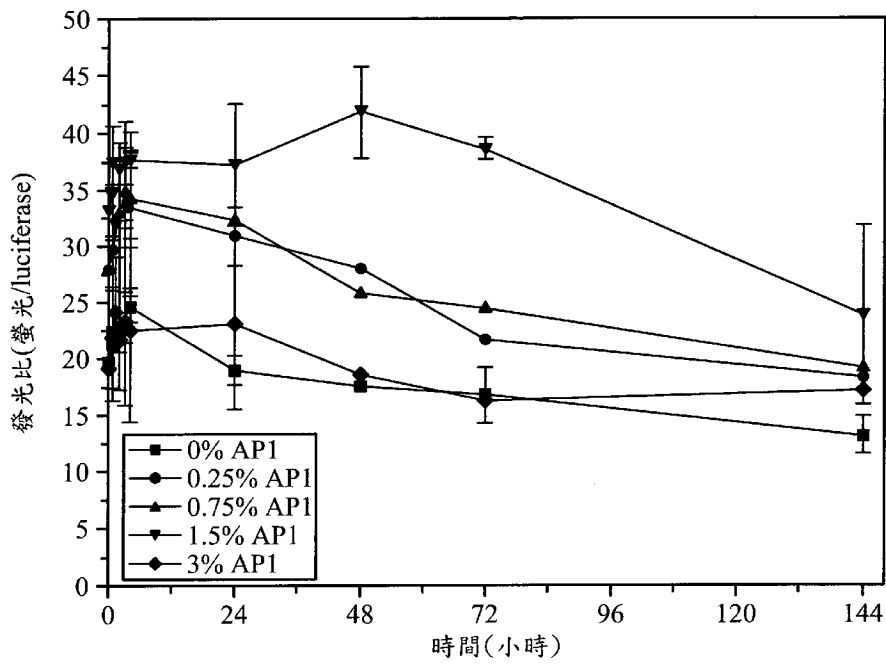
標的第四介白素受體之傳輸系統

DELIVERY SYSTEMS FOR TARGETING INTERLEUKIN-4 RECEPTORS

(57)摘要

本發明提供一種標的第四介白素受體之傳輸系統，包括：一載體，具有一表面；一藥物或一染劑，包覆於該載體內部；以及一胜肽，具有一序列識別號：1 之氨基酸序列，接枝於該載體表面，以標的第四介白素受體，其中該胜肽於該載體中之莫耳百分比為 0.1~5mol%。

A delivery system for targeting an interleukin-4 receptor is provided. The delivery system includes a carrier having a surface, a drug or a dye encapsulated into the carrier, and a peptide having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 grafted on the surface of the carrier that binds interleukin-4 receptors, wherein the peptide has a mole percentage of 0.1-5 in the carrier.



第 19 圖

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種傳輸系統，特別是有關於一種標的第四介白素受體之傳輸系統。

【先前技術】

傳統的小分子抗癌藥物雖然可以抑制腫瘤細胞的分化，進而殺死癌細胞，但因為這些藥物沒有選擇性，因此，常常併發骨髓抑制等副作用。近年來，利用奈米藥物載體包覆抗癌藥物，並利用腫瘤組織血管有較大通透率的特性，使得奈米藥物載體能夠累積在腫瘤位置做藥物釋放並降低副作用。而為了達到更高的治療藥效，目前，開發的奈米藥物載體已經著重在表面配體的修飾，期望能藉由載體表面配體的修飾，使得載體更能辨識癌細胞並進入細胞中做藥物釋放。

利用噬菌體能夠表現多樣性胜肽或蛋白質的特性，已經找出許多能夠標的至細胞表面受體的胜肽序列。韓國 Kyungpook 大學的李炳憲教授藉由噬菌體表現法篩選出能夠標的至動脈粥狀硬化組織(atherosclerotic plaques)的胜肽序列(AP-1)，進一步確認此 AP-1 序列與人類第四介白素(interleukin-4)第 84~89 個氨基酸序列相同，有可能其標的位置為動脈粥狀硬化組織上的第四介白素受體(interleukin-4 receptor)。

【發明內容】

本發明之一實施例，提供一種標的第四介白素受體之傳輸系統，包括：一載體，具有一表面；一藥物或一染劑，包覆於該載體內部；以及一胜肽，具有一序列識別號：1之氨基酸序列，接枝於該載體表面，以標的第四介白素受體，其中該胜肽於該載體中之莫耳百分比為0.1~5mol%。

許多腫瘤細胞(例如肺癌、卵巢癌、腦癌等)表面皆會大量表現第四介白素受體(interleukin-4 receptor)，因此，本發明將能夠標的至第四介白素受體的胜肽序列 AP-1 接枝於奈米載體上，並包覆近紅外光染劑(NIR dye)或例如 doxorubicin 等抗癌藥物，形成一傳輸系統，並藉由細胞吞噬實驗驗證 AP-1 修飾的奈米載體經第四介白素受體進入腫瘤細胞的能力，且由小鼠造影實驗確定 AP-1 修飾的奈米載體能夠標的至腫瘤組織，而此標的腫瘤組織的能力有助於 AP-1 修飾的奈米載體包覆抗癌藥物後，達到更好的治療效果。

為讓本發明之上述目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉一較佳實施例，作詳細說明如下：

【實施方式】

本發明之一實施例，提供一種標的第四介白素受體之傳輸系統，包括一載體，具有一表面，一藥物或一染劑，包覆於載體內部，以及一胜肽，具有一序列識別號：1之氨基酸序列，接枝於載體表面，以標的第四介白素受體。本發明傳輸系統中，胜肽於載體中之莫耳百分比為



0.1~5mol%。

上述載體可包括奈米微粒、高分子奈米微粒、固化脂質奈米微粒、高分子微胞、微脂粒、微乳化液或液態奈米微粒。若選擇微脂粒(liposome)作為載體，其組成可包括第一脂質、第二脂質或膽固醇。上述第一脂質可為磷脂質，例如磷脂醯膽鹼(phosphatidyl choline, PC)、磷脂醯甘油(phosphatidyl glycerol, PG)、磷脂絲胺酸(phosphatidyl serine, PS)或磷脂醯乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)。上述第二脂質可為二硬脂磷脂醯乙醇胺-聚乙二醇(distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol, DSPE-PEG)。微脂粒中，第一脂質於載體中之莫耳百分比為 60~70mol%，第二脂質於載體中之莫耳百分比為 1~10mol%，膽固醇於載體中之莫耳百分比為 1~40mol%。

上述包覆於載體內部的藥物可包括例如 doxorubicin 的有機合成藥物、胜肽藥物、蛋白質藥物或例如質體核酸(plasmid DNA)、反意義寡核酸(antisense oligonucleotide)或 RNAi 的核酸藥物。

值得注意的是，本發明傳輸系統中，作為配體(ligand)標的第四介白素受體的胜肽(序列識別號：1, AP-1)於載體中之莫耳百分比佳為 0.1~3mol%。

許多腫瘤細胞(例如肺癌、卵巢癌、腦癌等)表面皆會大量表現第四介白素受體(interleukin-4 receptor)，因此，本發明將能夠標的至第四介白素受體的胜肽序列 AP-1 接枝於奈米載體上，並包覆近紅外光染劑(NIR dye)或例如 doxorubicin 的抗癌藥物，形成一傳輸系統，並藉由細胞吞

噬實驗驗證 AP-1 修飾的奈米載體經第四介白素受體進入腫瘤細胞的能力，且由小鼠造影實驗確定 AP-1 修飾的奈米載體能夠標的至腫瘤組織，而此標的腫瘤組織的能力有助於 AP-1 修飾的奈米載體包覆抗癌藥物後，達到更好的治療效果。

【實施例】

【實施例 1】

DSPE-PEG2000-AP-1 之製備

AP-1 的氨基酸序列為 CRKRLDRNC，其 2 端的胱氨酸(cystine)上皆有硫基(SH)官能基可以用來接枝於 DSPE-PEG2000-MAL 上的馬來亞醯胺(maleimide)。利用硫基與藥物載體或顯影劑上的馬來亞醯胺鍵結而將標的配體(targeting ligand)結合於奈米藥物載體或顯影劑上的方法在文獻上已多所揭露[Int J Pharm. 2009 Jun 5;374(1-2):145-52, Biomacromolecules. 2008 Oct;9(10):2705-11, Bioconjug Chem. 2007 Mar-Apr;18(2):323-32, Biomaterials. 2007 Nov;28(33):4947-67]。首先，將 AP-1 與 DSPE-PEG2000-MAL 以莫耳比 1:2 的比例溶解於 100 mM 磷酸緩衝溶液中(pH 6.5)，並在 4°C 的環境下反應 4 小時。之後，以 5,5'-二硫基-雙-(2-硝基苯甲酸)(5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB)試劑測量溶液中剩餘的硫基(SH)官能基量，則可計算接枝率。此反應的接枝率大於 95%。由 MALDI-TOF 圖譜顯示，接枝後的反應物其主要分子量為 6,950 左右，如第 1 圖所示。

【實施例 2】

AP-1 修飾微脂粒(含 Cy5.5 染劑)之製備

首先，將磷脂醯膽鹼(phosphatidyl choline, PC)、膽固醇、二硬脂磷脂醯乙醇胺-聚乙二醇(distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol, DSPE-PEG)及 Cy5.5 染劑以 70:30:5:1 的莫耳比例溶解於氯仿，加入至圓底瓶中，並利用旋轉濃縮機(rotary evaporator)去除氯仿使之形成薄膜。接著，加入 PBS 緩衝液進行水合(hydration)，並利用超音波震盪加速其分散，即可獲得粒徑 100~200 nm 的微脂粒。之後，在 60°C 水浴下混入不同比例的 DSPE-PEG2000-AP1，反應 1 小時，以使 DSPE 上的疏水長碳鏈鑲嵌於含 Cy5.5 染劑的微脂粒中。

【實施例 3】

腦腫瘤細胞第四介白素受體免疫螢光染色

將正常卵巢癌細胞(CHO-K1)、大鼠腦腫瘤細胞(C6)與人類腦腫瘤細胞(GBM8401)分別以 5×10^4 /井的密度在圓形玻片上隔夜培養後，吸掉培養液並以 PBS 清洗二次後，以 -20°C 甲醇固定細胞 5 分鐘，再以抗體免疫螢光染色對第四介白素受體染色 1 小時，結果如第 2 圖(CHO-K1 細胞)、第 3 圖(C6 細胞)與第 4 圖(GBM8401 細胞)所示。

在免疫螢光的染色結果(圖 2~4)可清楚觀察到 GBM8401 為 3 株細胞中第四介白素受體表現最強的細胞，環繞於細胞外圍，C6 細胞也有些許表現第四介白素受體，

只是程度上 GBM8401 的表現是最明顯。

【實施例 4】

不同 AP-1 濃度修飾微脂粒之細胞吞入實驗

首先，分別將 GBM8401 細胞及 C6 細胞以 2×10^5 細胞/井的密度培養於放有玻片的 12-井培養盤中。隔天，將細胞以 PBS 緩衝液洗滌 2 次，以去除殘留的胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)。然後，加入不同 AP-1 濃度(0.75%、1.5%、3%)修飾的微脂粒，在 37°C 下培養 1 小時，並用 PBS 緩衝液洗滌 3 次，即可利用螢光顯微鏡照相，結果如第 5~8 圖(GBM8401 細胞)與第 9~12 圖(C6 細胞)所示。圖 5~8 與圖 9~12 顯示，不同 AP-1 濃度修飾的微脂粒，其進入 GBM8401 細胞的能力較 C6 細胞來的好，此現象是由於 GBM8401 細胞表面表現大量的第四介白素受體(interleukin-4 receptor)，經過與 AP-1 的辨識後，促進微脂粒進入細胞內。而微脂粒表面的 AP-1 濃度越高(0.75~3%)，則進入 GBM8401 細胞的能力越強。之後，進一步以共軛焦顯微鏡(confocal microscope)確認以 3% AP-1 修飾的微脂粒，確實可以進入至細胞內，如第 13a~13l 圖所示(Z 軸表示細胞橫切面之深度)。此即表示 AP-1 具有啟動第四介白素受體(interleukin-4 receptor)進行內噬作用而將微脂粒帶入細胞的能力。

【實施例 5】

不同 AP-1 濃度修飾微脂粒標的 GBM8401 腫瘤細胞之

小鼠活體造影

為了評估不同 AP-1 濃度修飾的微脂粒是否可以累積在腦腫瘤部位，本實施例將包覆 Cy5.5 染劑的不同 AP-1 濃度修飾的微脂粒以尾靜脈注射的方式打入已植入 GBM8401 腫瘤細胞的裸鼠體內(5 毫克 Cy5.5/公斤)，之後，觀察老鼠腫瘤細胞在不同時間的螢光分佈，結果如第 14a~18a 圖(歷經 24 小時)、第 14b~18b 圖(歷經 72 小時)、第 14c~18c 圖(歷經 144 小時)與第 19 圖所示。圖 14a~18c 與圖 19 顯示，以 1.5% AP-1 修飾含 Cy5.5 染劑的微脂粒在腦腫瘤細胞中的累積量最高，在 144 小時後仍有明顯的螢光累積。

【實施例 6】

AP-1 修飾微脂粒(含 doxorubicin)之製備

首先，將氫化大豆磷脂醯膽鹼(hydrogenated soy phosphatidyl choline, HSPC)、膽固醇及二硬脂磷脂醯乙醇胺 - 聚 乙 二 醇 (distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol, DSPE-PEG)以 70 : 30 : 5 的莫耳比例溶解於 60°C 乙醇中，並加入 250 mM 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 於 60°C 下水合 60 分鐘。之後，以 Extrusion 控制粒徑大小(200nm→100nm，各過 6 次)。接著，將完成 Extrusion 之微脂粒溶液(Liposome solution)進行透析，以 10%蔗糖+5mM 氯化鈉溶液作為透析液，約 3 小時更換一次，共進行 4 次，以除去微脂粒外圍的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液。之後，將 doxorubicin 溶液徐徐地倒入微脂粒溶液中，

輕輕地均勻搖晃玻璃瓶，使兩溶液混合均勻(負載藥物 (Drug-loading)時， $\text{Vol. Liposome} : \text{Vol. Doxorubicin} = 1 : 1$)，在 60°C 的環境下進行反應 60 分鐘，即可得到包覆 doxorubicin 的微脂粒。之後，計算每顆微脂粒接上 500 條 AP-1 的比例，在 60°C 下混入適當量的 DSPE-PEG2000-AP1 並反應 1 小時，以使 DSPE 上的疏水長碳鏈鑲嵌於含 doxorubicin 的微脂粒中。

【實施例 7】

AP-1 修飾含 doxorubicin 微脂粒對表現第四介白素受體(IL-4 receptor)腫瘤細胞之抑制效果

將大量表現第四介白素受體(IL-4 receptor)的人類肺癌細胞株 H226 植入裸小鼠背部。腫瘤大小達 50 mm^3 後，每星期將 AP-1 修飾含 doxorubicin 的微脂粒以尾靜脈注射的方式注射 2 次，給藥劑量為 1 毫克/公斤，共給藥 8 劑，並定期量測腫瘤大小變化，結果如第 20 圖所示。圖 20 顯示，以 AP-1 修飾含 doxorubicin 的微脂粒(AP1-Lipo-Doxo)對腫瘤細胞的抑制效果達 70%，其腫瘤抑制效果優於 doxorubicin 溶液(Doxo)及 doxorubicin 微脂粒(Lipo-Doxo)。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此項技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作更動與潤飾，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為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為 AP-1 接枝於 DSPE-PGE2000 後的 MALDI-TOF 圖譜；

第 2~4 圖為不同腦腫瘤細胞第四介白素受體(IL-4 receptor)免疫螢光染色的結果；

第 5~8 圖為不同 AP-1 濃度修飾之微脂粒與 GBM8401 細胞培養的結果；

第 9~12 圖為不同 AP-1 濃度修飾之微脂粒與 C6 細胞培養的結果；

第 13a~13l 圖為 3% AP-1 修飾之微脂粒被 GBM8401 細胞吞噬之影像，Z 軸表示細胞橫切面之深度；

第 14a~18a 圖為不同 AP-1 濃度修飾之微脂粒包覆 Cy5.5 標的 GBM8401 腫瘤細胞的小鼠活體造影圖，歷經 24 小時；

第 14b~18b 圖為不同 AP-1 濃度修飾之微脂粒包覆 Cy5.5 標的 GBM8401 腫瘤細胞的小鼠活體造影圖，歷經 72 小時；

第 14c~18c 圖為不同 AP-1 濃度修飾之微脂粒包覆 Cy5.5 標的 GBM8401 腫瘤細胞的小鼠活體造影圖，歷經 144 小時；

第 19 圖為不同濃度 AP-1 隨時間在腫瘤內累積強度的趨勢圖；

第 20 圖為 AP-1 修飾含 doxorubicin 之微脂粒對大量表現第四介白素受體(IL-4 receptor)的肺癌細胞(H226)之抑制

效果。

【主要元件符號說明】

無。

【序列編號】

<110> 財團法人工業技術研究院

<120> 標的第四介白素受體之傳輸系統

<160> 1

<150>

<151>

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<400> 1

CRKRLDRNC 9

公 告 本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98145416

A61K 9/27 (2006.01)

※申請日：98 12 29

※IPC 分類：

A61K 47/44 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 35/00 (2006.01)

標的第四介白素受體之傳輸系統 / Delivery systems
for targeting interleukin-4 receptors

二、中文發明摘要：

本發明提供一種標的第四介白素受體之傳輸系統，包括：一載體，具有一表面；一藥物或一染劑，包覆於該載體內部；以及一胜肽，具有一序列識別號：1 之氨基酸序列，接枝於該載體表面，以標的第四介白素受體，其中該胜肽於該載體中之莫耳百分比為 0.1~5mol%。

三、英文發明摘要：

A delivery system for targeting an interleukin-4 receptor is provided. The delivery system includes a carrier having a surface, a drug or a dye encapsulated into the carrier, and a peptide having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 grafted on the surface of the carrier that binds interleukin-4 receptors, wherein the peptide has a mole percentage of 0.1-5 in the carrier.

七、申請專利範圍：

1. 一種標的第四介白素受體之傳輸系統，包括：
 - 一載體，具有一表面；
 - 一藥物或一染劑，包覆於該載體內部；以及
 - 一胜肽，具有一序列識別號：1 之氨基酸序列，接枝於該載體表面，以標的第四介白素受體，其中該胜肽於該載體中之莫耳百分比為 0.1~5mol%。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該載體包括奈米微粒、高分子奈米微粒、固化脂質奈米微粒、高分子微胞、微脂粒、微乳化液或液態奈米微粒。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該微脂粒包括第一脂質、第二脂質或膽固醇。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該第一脂質為磷脂質。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該磷脂質包括磷脂醯膽鹼(phosphatidyl choline, PC)、磷脂醯甘油(phosphatidyl glycerol, PG)、磷脂絲胺酸(phosphatidyl serine, PS)或磷脂醯乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)。
6. 如申請專利範圍第 3 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該第二脂質為二硬脂磷脂醯乙醇胺-聚乙二

乙
二
醇

 (distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol,

DSPE-PEG)。

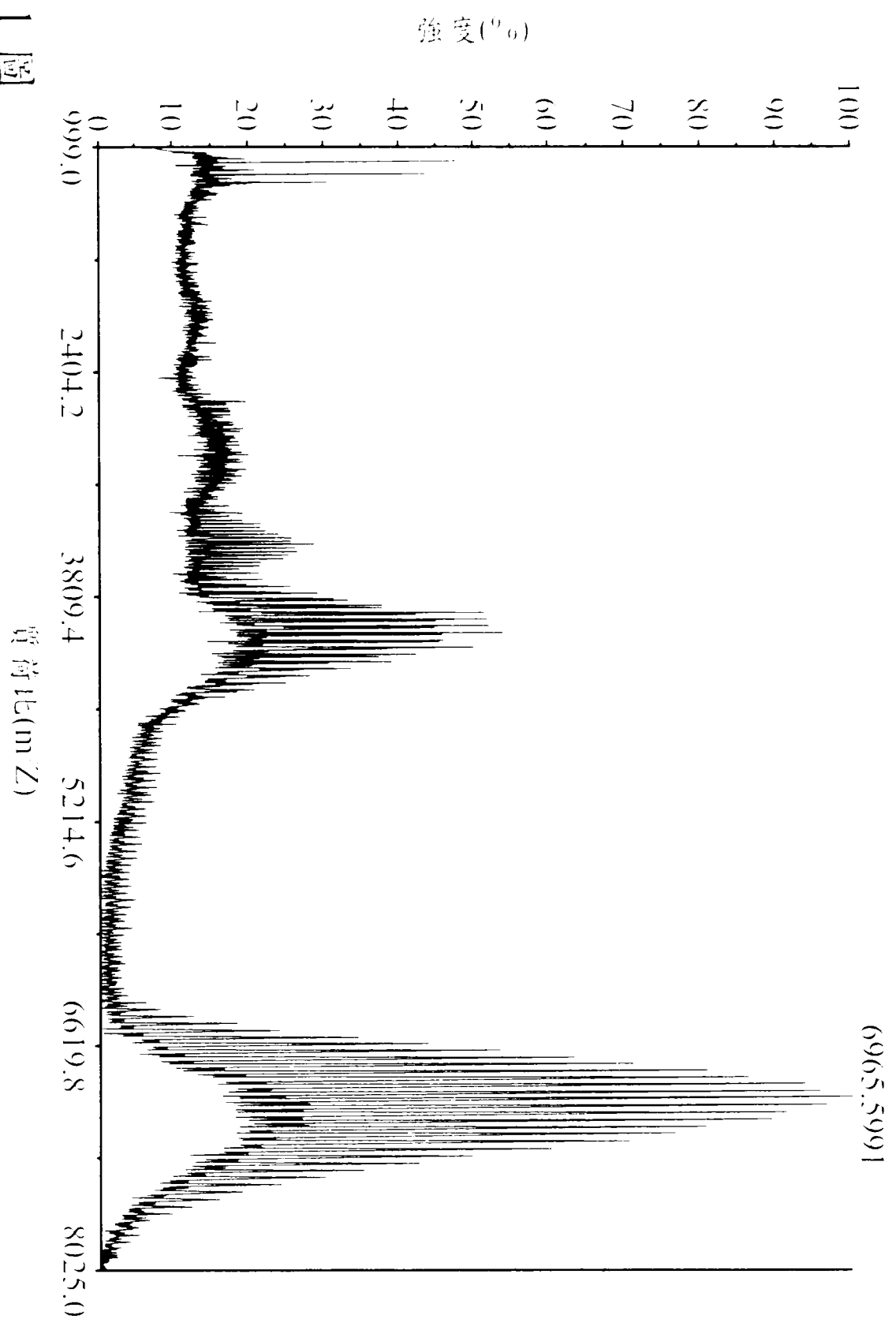
7. 如申請專利範圍第 3 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該第一脂質於該載體中之莫耳百分比為 60~70mol%，該第二脂質於該載體中之莫耳百分比為 1~10mol%，該膽固醇於該載體中之莫耳百分比為 1~40mol%。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該藥物包括有機合成藥物、胜肽藥物、蛋白質藥物或核酸藥物。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該核酸藥物包括質體核酸(plasmid DNA)、反意義寡核酸(antisense oligonucleotide)或 RNAi。

10. 如申請專利範圍第 1 項所述之標的第四介白素受體之傳輸系統，其中該胜肽於該載體中之莫耳百分比為 0.1~3mol%。

第 1 圖



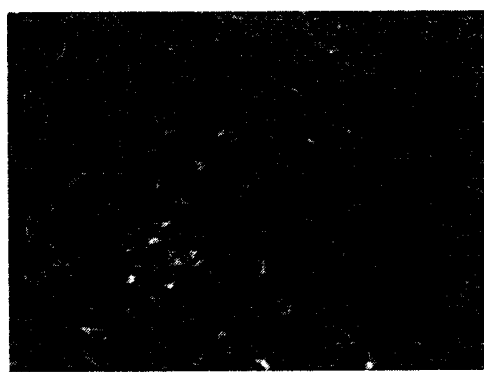
第4圖



GBM18401

第四介白素受體

第3圖



C6

第四介白素受體

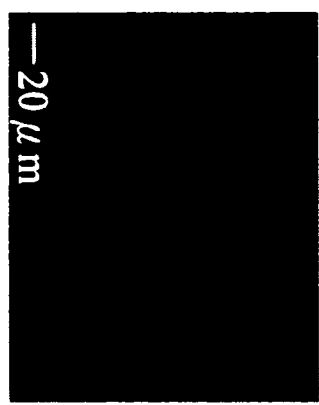
第2圖



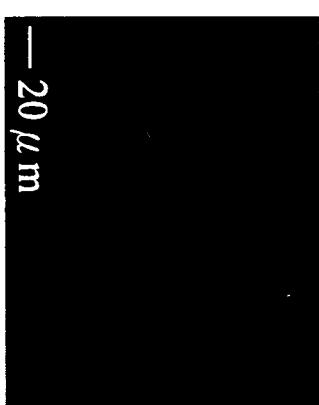
CHO-K1

第四介白素受體

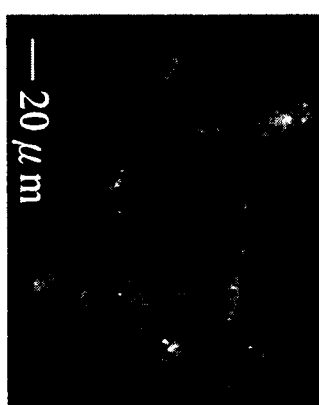
0% AP1



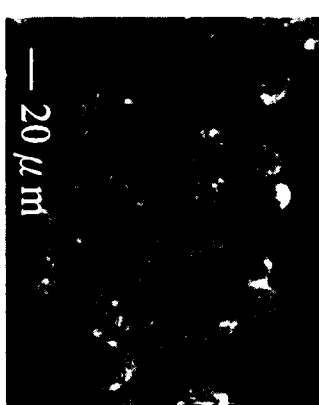
0.75% AP1



1.5% AP1



3% AP1

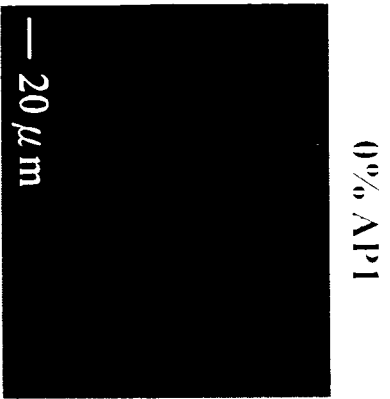


第5圖

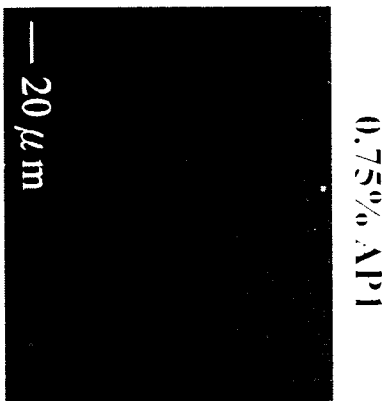
第6圖

第7圖

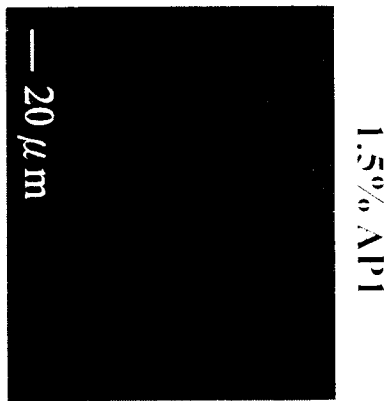
第8圖



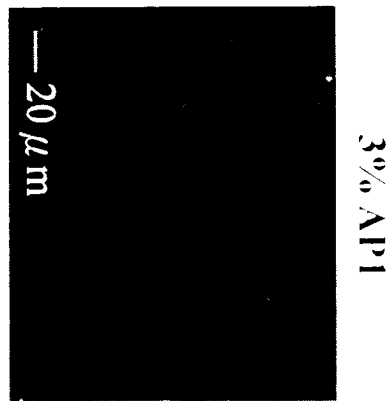
第 9 圖



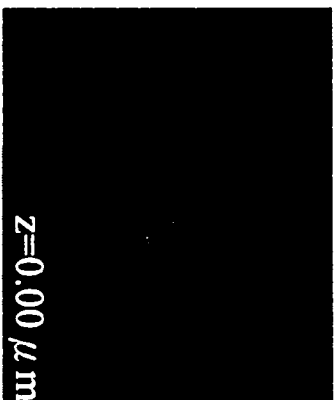
第 10 圖



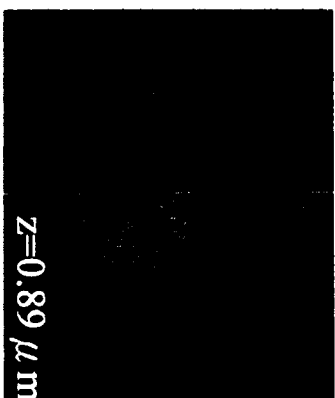
第 11 圖



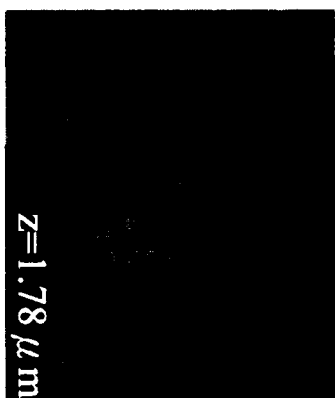
第 12 圖



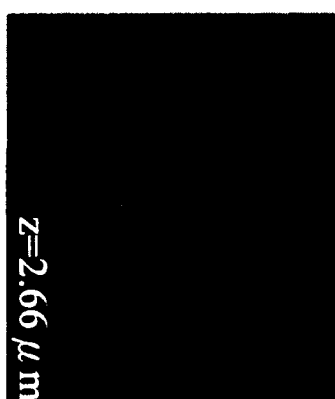
第 13a 圖



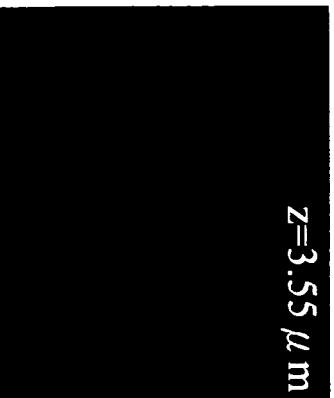
第 13b 圖



第 13c 圖



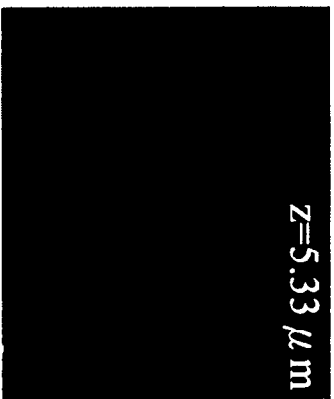
第 13d 圖



第 13e 圖



第 13f 圖



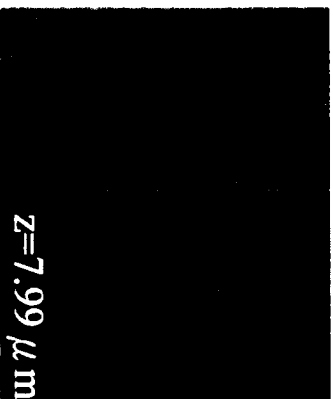
第 13g 圖



第 13h 圖



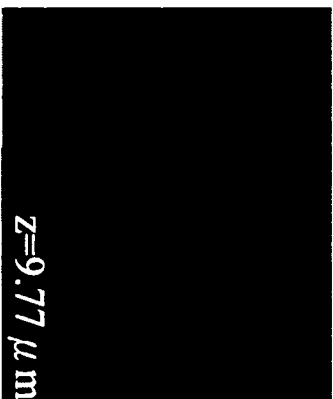
第 13i 圖



第 13j 圖



第 13k 圖



第 13l 圖

第 14c 圖



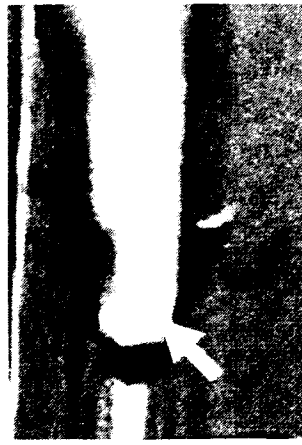
0% AP1

第 14b 圖



0% AP1

第 14a 圖



0% AP1

0.25% AP1



第 15a 圖

0.25% AP1



第 15b 圖

0.25% AP1



第 15c 圖

0.75% AP1



第 16a 圖

0.75% AP1



第 16b 圖

0.75% AP1



第 16c 圖

1.5% API



第 17a 圖

1.5% API



第 17b 圖

1.5% API



第 17c 圖

3% AP1



第 18a 圖

3% AP1

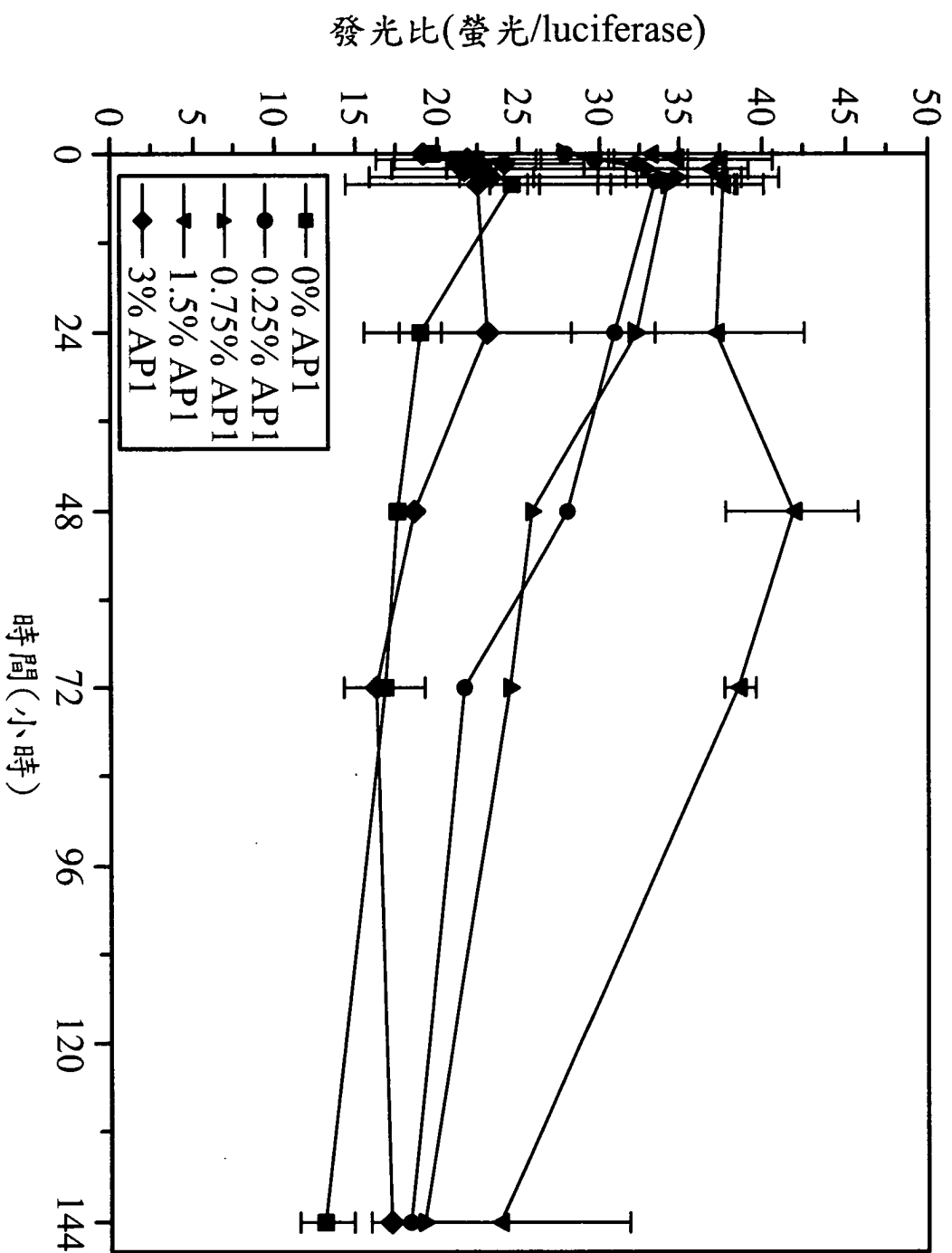


第 18b 圖

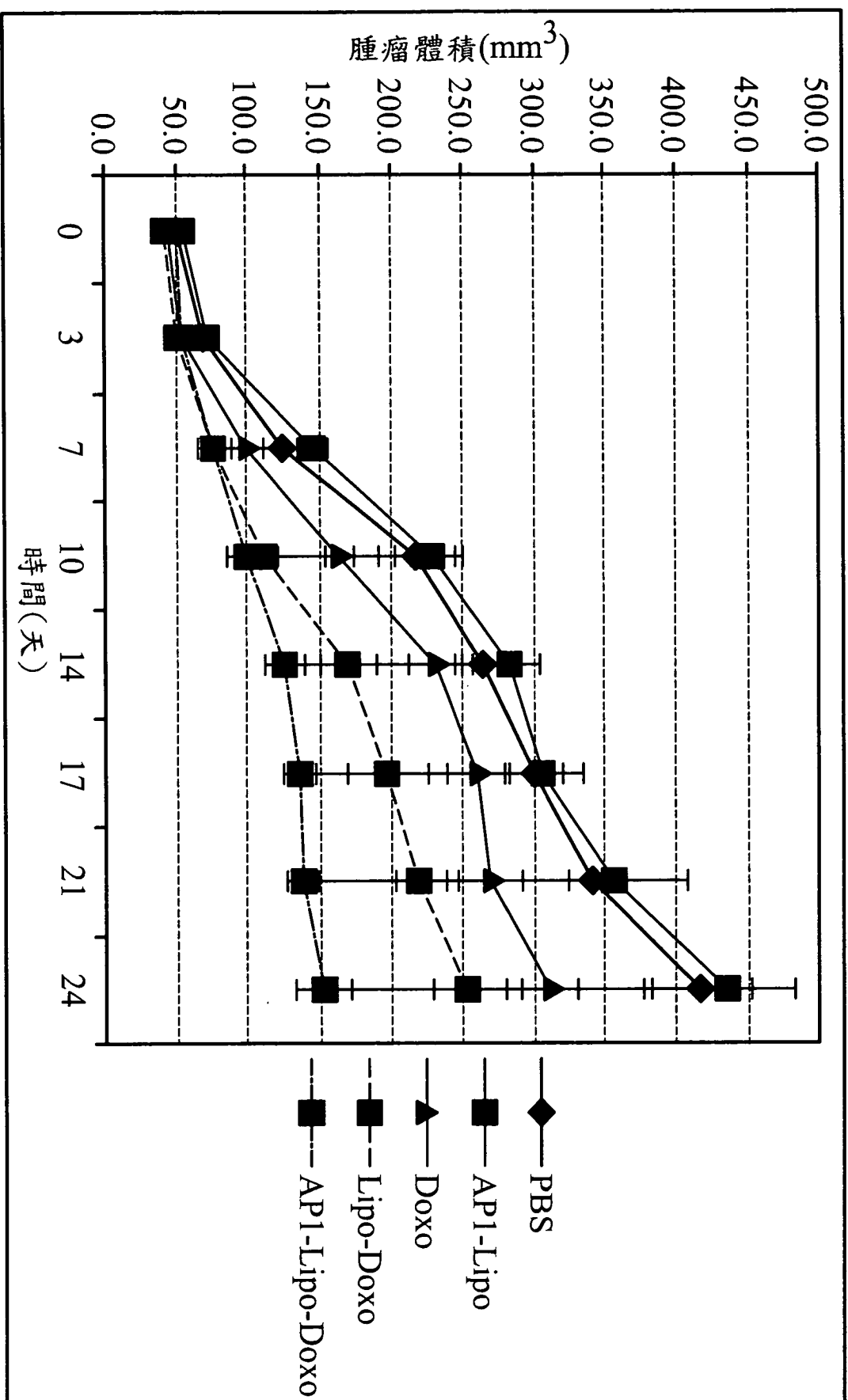
3% AP1



第 18c 圖



第19圖



第 20 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (19) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。