

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

doctoral dissertation



光動力觸發微脂體化療藥物輸送系統之研究

Investigation of liposomal chemotherapy triggered by
photodynamic treatment

彭柏鈞

Po-Chun Peng

指導教授：陳進庭 博士

Advisor : Chin-Tin Chen, Ph.D.

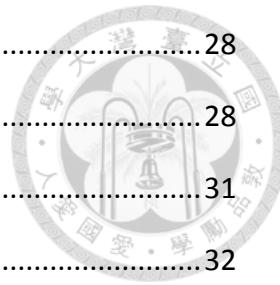
中華民國 104 年 4 月

April, 2015

目錄



摘要.....	7
Abstract.....	8
1.1 癌症治療.....	9
1.2 化學治療.....	9
1.3 微脂體.....	10
1.3.1 微脂體簡介.....	10
1.3.2 微脂體在藥物傳輸的應用	12
1.3.3 Liposomal Doxorubicin	14
1.3.4 Liposomal Cisplatin	15
1.4 光動力治療.....	16
1.4.1 光化學作用機制.....	17
1.4.2 光感物質	18
1.4.3 Liposomal Chlorin e6	19
1.5 惡性周邊神經鞘瘤.....	20
1.5.1 Axl receptor tyrosine kinase.....	21
1.6 研究動機與目的.....	22
第二章 材料與方法.....	24
2.1 藥品與儀器.....	24
2.1.1 藥品.....	24
2.1.2 儀器.....	26
2.2 細胞株.....	26
2.2.1 細胞培養液.....	27
2.2.2 繼代培養方法.....	27
2.2.3 細胞解凍與冷凍方法.....	27



2.3 細胞計數.....	28
2.4 微脂體製備.....	28
2.5 微脂體內藥物定量.....	31
2.6 微脂體內脂質分析.....	32
2.7 PL-cDDP-Ce6 保存穩定性分析	32
2.8 PL-cDDP-Ce6 於血清中的穩定性分析	32
2.9 微脂體藥物釋放分析.....	33
2.10 細胞存活率檢測 - MTT assay	33
2.11 活體動物實驗.....	34
2.11.1 動物與腫瘤模式.....	34
2.11.2 藥物於活體組織分佈.....	34
2.11.3 腫瘤組織細胞核內藥物分析.....	35
2.11.4 光動力治療.....	35
2.11.5 血漿中 Soluble Axl (sAxl)檢測	36
2.11.6 血液生化分析及腫瘤組織切片	36
2.12 統計分析.....	37
第三章 結果.....	38
3.1 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6	38
3.1.1 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 基礎性質分析	38
3.1.2 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 之細胞毒殺效果	39
3.1.3 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於 C26 小鼠腫瘤模式之治療	40
3.2 雙效微脂體機制探討.....	44
3.2.1 雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 作用機制	44
3.2.2 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 作用機制	48
3.3 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於人類惡性周邊神經鞘瘤之應用	51



3.3.1 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST 腫瘤細胞之毒殺效果.....	51
3.3.2 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST 小鼠腫瘤模式之治療.....	52
第四章 討論.....	56
4.1 雙效微脂體的製備.....	56
4.1.1 建構雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6.....	56
4.1.2 脂質及光感物質對雙效微脂體製備的影響.....	56
4.2 PL-cDDP-Ce6 用於腫瘤治療	59
4.3 雙效微脂體應用機制探討.....	61
4.3.1 光感物質對雙效微脂體治療成效的影響.....	65
4.4 雙效微脂體尚待釐清之機制.....	65
4.5 PL-cDDP-Ce6 於人類惡性周邊神經鞘瘤之應用	67
4.6 PL-cDDP-Ce6 臨床應用未來展望	68
參考文獻.....	114



表目錄

表一、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 特性分析。	72
表二、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 保存於 4°C 之穩定性分析。	73
表三、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，老鼠各器官藥物累積量。	74
表四、製作時加入 (A) 0.1、(B) 0.15、(C) 0.2 mg Ce6 所製成之雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 特性分析。	75
表五、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之 血液及組織藥物濃度對時間曲線下面積(AUC)。	76
表六、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之 藥物動力學參數。	77
表七、製作時不加入 Ce6 之 PL-cDDP 及加入 (A) 0.4、(B) 0.8、(C) 1.2、(D) 1.6、 (E) 2.4 mg Ce6 所製成之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 特性分析。	78
表八、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠 之血液及組織藥物濃度對時間曲線下面積(AUC)。	79
表九、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠 之藥物動力學參數。	80
表十、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療後 72 小時之血液生化分析。	81
表十一、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療後 72 小時之全血細胞計數。	82



圖目錄

圖一、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 (A) A375 細胞，(B) A549 細胞，(C) C26 細胞之細胞毒殺效果。	84
圖二、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，分別在第 2 或第 12 小時進行光動力治療之小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。	85
圖三、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 及第 12 小時進行光動力治療之小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。	86
圖四、腫瘤生長至 300 mm^3 後，再以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療之小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。	87
圖五、腫瘤生長至 500 mm^3 後，再以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療之小鼠 腫瘤大小，生存率，體重變化。	88
圖六、雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 照光後粒徑(A)及分散指數(B)變化。	89
圖七、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 照光後 Dox 釋放情形。	90
圖八、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之組織器官藥物累積量變化。	93
圖九、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 並進行照光治療後，小鼠腫瘤內 Dox 累積量。	94
圖十、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 照光後粒徑(A)及分散指數(B)變化。	95
圖十一、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於血清中的穩定性 (Ce6 留存率)。	96
圖十二、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於血清中的穩定性 (cDDP 留存率)。	97
圖十三、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 照光後 cDDP 釋放情形。	98
圖十四、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小	



鼠之組織器官藥物累積量變化。.....	100
圖十五、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST cell lines (A) S462-TY 細胞，(B) ST8814 細胞，(C) T265 細胞之細胞毒殺效果。	101
圖十六、(A) cDDP 及(B) PL-cDDP 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，其腫瘤大小，生存率，體重變化。.....	102
圖十七、以不同 Ce6 劑量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。	103
圖十八、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重，(D)血漿內 sAxl 變化。	104
圖十九、S462-TY 腫瘤生長至 1000 mm^3 後，再以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療，小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。	105
圖二十、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，治療後 72 小時之腫瘤切片。	106
附表一、 SPI-077、Lipoplatin 及 PL-cDDP-Ce6 比較。	107
附表二、 Temoporfin、Talaporfin 及 Chlorin e6 光動力治療比較。	108
附圖一、光動力作用模式。	109
附圖二、常見的磷脂質化學結構。	110
附圖三、(A) 雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 的製備流程; (B)雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 的製備流程。	111
附圖四、以 HPLC 分析 Pt(DDTC) ₂ 。	112
附圖五、雙效型微脂體 PL-cDDP-Ce6 示意圖。	113



摘要

癌症為現代人類主要的死亡原因之一，目前常使用之治療方式中，將化療藥物包覆於微脂體之劑型，雖然能有效降低化療藥物副作用，但也減慢藥物釋放速度，使其療效大幅減弱。近年來我們發展利用光動力效應加速化療藥物由微脂體釋出之雙效微脂體，並發現其除了具有光動力治療與化學治療各自之效果外，還能造成微脂體中化療藥物釋放模式的改變，進而更加提高在活體動物實驗中對腫瘤之療效。為了驗證雙效微脂體的概念，並擴大其適用範圍，在本研究中，我們針對另一同因藥物釋放緩慢問題，而無法產生良好療效之微脂體藥物進行改良，建立結合光動力治療的雙效微脂體，並證實即使包覆不同化療藥物，依然能產生優良治療效力，對體積較大的腫瘤(500 mm^3)也能發揮治癒功效。接著我們更進一步探討雙效微脂體的作用機制，發現其能藉由改善藥物釋放、增加藥物在腫瘤部位累積，以及促進藥物進入腫瘤細胞作用，來達到增進腫瘤治療能力的結果。最後我們更嘗試針對目前除手術外，並無較佳治療方式之人類惡性周邊神經鞘瘤進行治療探討。發現在小鼠腫瘤模式的實驗中，雙效微脂體能減少化療藥物的使用量，於治療後進行血液生化分析，顯示此治療方式具良好使用安全性，而且依然能展現完全清除腫瘤的功效，代表對人類惡性周邊神經鞘瘤也能達到應用。經由對雙效微脂體的了解，希望使其能有更進一步的發展，解決目前臨床腫瘤治療的需求。

關鍵字：微脂體、化學治療、光動力治療、藥物釋放、人類惡性周邊神經鞘瘤

Abstract

Nowadays, cancer is one of the leading causes of mortality worldwide. Using liposome-encapsulated cancer chemotherapy significantly decreases side effects. However, entrapment of drug in liposomes may slow down drug release and attenuate anticancer efficacy. Previously, a dual-effect liposome triggered by photodynamic effect (PDT) was developed to improve the therapeutic efficacy of chemotherapeutic agent-loaded liposomes. Co-encapsulation of the photosensitizer and chemotherapeutic agent in liposome not only could display PDT and chemotherapy effect but also change the release profile of the chemotherapy drug from liposome, enhancing the anti-tumor effect in animal study. To verify the concept of dual-effect liposome and apply this strategy for cancer treatment, encapsulation of another liposomal chemotherapeutic agent in dual-effect liposome was performed. This newly dual-effect liposome could enhance anti-cancer efficacy even encapsulated with other chemotherapy drugs and revealed significant therapeutic effects even on large tumors (500 or 1000 mm³). Investigation of mechanism of dual-effect liposome showed that dual-effect liposome enhanced anti-cancer efficacy by (1) changing drug release, (2) increasing drug accumulation at the target tumor site, and (3) improving more chemotherapeutic medicine to enter the tumor cell. Treatment with dual-effect liposome significantly prevented tumor growth of malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) which is a neurofibrosarcoma from neurofibromatosis type 1 and difficult to be cured. Analysis of blood chemistry showed it is safe to use dual-effect liposome for cancer treatment in murine model. In this study, we evaluated the feasibility of using dual-effect liposome to treat human cancer tumor xenografts *in vivo*, and expected to apply dual-effect liposome to clinical cancer therapy in the near future.

Keyword: Liposome, Chemotherapy, Photodynamic therapy, Drug release, MPNST

第一章 緒論



1.1 癌症治療

自民國 71 年起，癌症便高居國人 10 大死因之首，每年奪走 3 萬多人的生命，並且根據衛生福利部國民健康署民國 100 年癌症登記資料顯示，平均每 5 分 40 秒就有 1 人罹癌 [1]，統計處 102 年統計資料每 11 分 44 秒即有 1 人死於癌症 [2]，不但影響病患和家人之生活品質，也造成龐大的醫療費用支出，因此如何有效防治癌症，是當前重要的醫療課題之一。

癌症臨床治療之困難與瓶頸，可歸納成下列三點。第一、癌細胞的基因異質性與抗藥性 (Heterogeneous Cancer Cells and Drug Resistance) [3]，使得帶有抗藥性基因的癌細胞，得以逃避藥物的作用而繼續生長。雖然從傳統抗癌藥物到目前之標的治療藥物 (targeted drugs) 在癌症治療上雖是一大突破，但抗藥性的問題仍是主要問題；第二、腫瘤的高組織間質液壓 (High Tumor Interstitial Fluid Pressure) [4, 5]，會減少小分子藥物及抗體進入腫瘤部位。相較於正常細胞，小分子藥物及抗體治療藥物在腫瘤細胞的累積量較低，也因此導致治療效果不如預期，並在其他正常器官產生副作用；第三、腫瘤幹細胞 (Cancer Stem Cells) [6, 7] 的存在。相較於一般癌細胞，腫瘤幹細胞對於一般的化療藥物有極高的抗藥性。因此在化療的過程中，如未能有效地標的並且消滅腫瘤幹細胞，會因為腫瘤幹細胞繼續衍生而導致腫瘤的復發。因此，如何使抗癌藥物能夠選擇性的作用在特定的組織或是細胞，一直是科學家研究且致力突破的問題。

1.2 化學治療

癌症的化學治療是利用全身性的給予抗癌藥物之癌症治療方式。一般細胞的成長以及死亡皆處於控制下，相對的，癌細胞則是處於異常增生狀態而不受正常

生理衡定所節制 [8]。化學治療能經由停止癌細胞的生長或直接破壞癌細胞等手段來達成制癌的目地 [9]。由於化學治療會消滅生長快速的癌細胞，在治療時也可能會影響正在生長的正常細胞，例如：造血、胃腸、口腔黏膜，以及髮根等細胞，甚至破壞器官的生理功能，例如：心臟、腎臟、膀胱、肺臟、以及神經系統，因而導致副作用如嘔吐、禿髮、倦怠，甚至引發出血、感染以及貧血。這些不良的副作用將會嚴重影響受治者的日常生活品質，對病患及其家人都是很大的負擔，因此常導致延遲、減少、甚至停止化學治療的進行 [10, 11]。對癌症的化學治療而言，控制減少藥物的不良副作用，是增進其應用價值提升治療成效的重要目標。

1.3 微脂體

為了減少藥物的不良副作用，使藥物能更專一的累積到需治療的部位，避免對其他組織器官的影響，近年來相當多研究投入奈米載體藥物輸送系統的探討。奈米載體包含有微脂體(liposome)、微胞(micelle)、聚合物結合藥物(polymer-drug conjugate)及樹枝狀高分子(dendrimer)等，其中微脂體由於組成成分生物相容性高，藥物適用性廣，所以是近年研發的重點 [12]。

1.3.1 微脂體簡介

1960 年代中期，Bangham 等人首先提出，磷脂質薄膜加入水溶液後加以搖晃，會使脂質形成具有通透性的小球 [13, 14]。隨後於 1968 年，Sessa 和 Weissmann 等人正式將此小球狀物體命名為微脂體(liposome)，並做出明確定義：指出微脂體是由一到數層脂雙層膜(lipid bilayer)所構成的微小囊泡，並有自行密合的特性 [15]。也因為微脂體是由脂雙層包裹水溶液所形成，所以可同時作為疏水性(hydrophobic)和親水性(hydrophilic)藥物的載體，疏水性藥物可嵌入脂雙層中，而親水性藥物則能包覆於微脂體內的水溶液中。



微脂體的結構組成

微脂體是由脂雙層所構成的中空球體，其脂質膜就如同細胞膜一般，主要是由磷脂質所組成。磷脂質是同時具有親水端及疏水端的兩性分子，以丙三醇(glycerol)為骨架，在 C-3 位置接上磷酸根基團形成極性頭基，而在 C-1、C-2 位置接有兩條脂肪酸鏈形成非極性尾端(附圖二) [16]。磷脂質在水溶液中依照熱力學原理，趨向最穩定的排列方式，形成親水的磷酸根頭基指向水層，疏水的兩平行脂肪酸鏈向內相互聚集成脂層的脂雙層構造，並以此脂質膜組合成球體的微脂體。

微脂體除了主要由磷脂質組成外，還常會加入膽固醇。它本身雖無法形成微脂體，但就如同在細胞膜中所扮演的角色，能夠嵌入脂雙層中，和磷脂質形成氫鍵，使脂質排列更緊密，整體相轉移溫度(phase transition temperature)上升，達到穩定微脂體的作用。因此在微脂體脂質組成中加入膽固醇，能增加微脂體於血液中的安定性，較不易發生破裂，延長體內循環的時間，並減少水溶性藥物滲漏 [17]。

另外，由於微脂體在血液循環中常會被蛋白質吸附，使微脂體易於被網狀內皮系統(reticuloendothelial system；RES)清除，或造成其崩散，而影響藥物的半衰期。所以建構微脂體時，常加入接有 polyethylene glycol (PEG) 這種長鏈親水基團的磷脂質，使 PEG 在微脂體的表面形成一層親水的保護層，防止微脂體自身融合聚集，並避免血液中蛋白質吸附 [18]，因而提高微脂體在血液中的半衰期 [19, 20]。

微脂體的製備方法 [21]

微脂體的製作方式大致包含以下幾種作法：



薄膜水合法 (Thin-film hydration method)

將脂質溶於有機溶劑，再利用減壓濃縮方式將有機溶劑抽乾，讓脂質在試管底形成薄膜，加入水溶液並震盪後即可獲得微脂體。

超音波震盪法 (Sonication method)

當脂質在試管底部形成薄膜，並加入水溶液後給予超音波震盪，或在脂質已分散於水溶液形成微脂體後，再以超音波震盪，可造成微脂體破裂再重新密合，以得到粒徑較小的微脂體，但缺點為震盪過久可能會使脂質氧化。

反相蒸發法 (Reverse phase evaporation method)

將脂質溶於有機溶劑後，快速加入含欲包覆藥物的水溶液中，將兩者混合均勻，再利用減壓濃縮方式使有機溶劑揮發即可獲得微脂體。

有機溶劑注射法 (Solvent injection)

將脂質溶於乙醚或乙醇，再注射入攪拌中的水溶液中即可形成微脂體，而粒徑大小會因脂質濃度或注射速度而改變。

濾膜擠出法 (Extrusion)

將上述方式製備的微脂體，在高於相轉移溫度的情況下，藉由擠壓器中的濾膜孔洞大小控制粒徑，經重複擠壓後，可得到所需粒徑大小的均一微脂體。

硫酸銨梯度法 (Ammonium sulfate gradient loading)

先利用薄膜水合法將硫酸銨包覆於微脂體水層，控制粒徑後移除微脂體外的硫酸銨，接著再利用微脂體脂雙層內外的銨離子濃度差，將藥物吸引並包覆入微脂體。

1.3.2 微脂體在藥物傳輸的應用

自從 1970 年代，Gregoriadis 等人依據微脂體分割溶質的特性，提出可以作為攜藥系統的概念，並開始利用微脂體來做為酵素的載體，以大鼠為模式研究 lysosomal storage disease 之治療，此後微脂體就不斷被拿來嘗試當作藥物的攜帶者 [22]。

微脂體因具有下面幾個特性，使它被認為是載運藥物的理想劑型：(1) 微脂體構造與細胞膜構造相似，主要由磷脂質構成，在生物體能被分解，故不具毒性，且由於與細胞膜構造相似，也不易引起免疫反應。(2) 藥物包覆於微脂體內或結合在微脂體的膜上，可以改變藥物動力學(pharmacokinetic)及藥效動力學(pharmacodynamics)，改善藥物治療成效。(3) 高毒性的藥物包覆於微脂體中，可大幅減少副作用。(4) 微脂體的脂質組成、顆粒大小、結構、製備之方式與包裹藥物的選擇性很大，能作調整而符合各種情況 [23]。

為了增進微脂體載運藥物的應用範圍，經科學家多年研究，發現有幾項因素會影響包裹藥物之微脂體在血液中的循環時間：(1) 中性脂質組成的微脂體較不易被網狀內皮系統清除。(2) 顆粒較小的微脂體(粒徑小於 200 nm)，也較不易被網狀內皮系統清除。(3) 由高過渡溫度(higer transition temperature)脂質及高含量膽固醇組成之微脂體穩定度較高。(4) 微脂體表面加上 PEG 保護可延緩於血液中的清除時間 [24]。因此，利用高過渡溫度脂質及高含量膽固醇構成粒徑大小約 200 nm 以下之微脂體，即能提高微脂體於血液中之循環半衰期，建構長效型微脂體。

Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect

建構延長血液中循環時間的長效型微脂體，將有利於實體腫瘤(solid tumors)的治療，主要是由於奈米載體被動累積於腫瘤組織的特性，稱為 Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect。EPR effect 最早於 1986 年由 Matsumura 和 Maeda 所提出 [25]，而後續的研究也陸續指出 [26-30]，由於腫瘤部位為了獲得大量養分及氧氣供給，因此有許多快速新生的血管，血管內皮細胞排列不整齊有較大的孔洞間隙，而使奈米載體易離開血管進入腫瘤組織，另外腫瘤組織缺乏淋巴管回收組織液，因此增加奈米微粒停留於腫瘤的累積量。而這種具腫瘤組織專一性的被動累積特性，將有助於以長效型微脂體為載體的癌症治療，加強對腫

瘤的專一治療。現在臨床癌症治療使用的藥品中，最早核可上市的微脂體藥物 Doxil，以及目前進入臨床二期試驗的 SPI-077，均是利用表面加上 PEG 的穩定長效型微脂體，分別包覆化療藥物 doxorubicin 及 cisplatin 所製成，藉此避免對正常組織的傷害，增加對腫瘤的專一性。

1.3.3 Liposomal Doxorubicin

化療藥物 Doxorubicin 為 Arcamone 等人在 1969 年，由鏈黴菌 *Streptomyces peucetius var caesius*. 中分離出來 [31]，其原先被當作抗生素使用，1974 年時首先由 Cole 等人將它應用在乳癌與其他惡性腫瘤的臨床治療上 [32]。目前已知它在細胞層次作用機制主要有兩方面：(1) Doxorubicin 的 adriamycinone 部分會共價結合嵌入 DNA (intercalate) 和烷化 DNA (alkylate) 造成 DNA 交互鍵結而抑制 DNA 的合成，並會抑制 topoisomerases，干擾 DNA 雙股的分離，使細胞無法複製；(2) Doxorubicin 的 adriamycinone 其電子共振結構容易接受外來能量，而產生自由基 (free radical)，自由基會破壞 DNA、RNA、脂質、蛋白質，使細胞走向死亡。

在醫療上，Doxorubicin 被當作抗生素及廣效性的抗癌藥物，Doxorubicin 在癌症治療上被運用在多種實體腫瘤上，如小細胞肺癌 (small cell lung cancer)、乳癌 (breast cancer)、卵巢癌 (ovary cancer) 與軟組織肉瘤 (soft tissue sarcomas) [33-36]。雖然它能治療多種癌症，但是因為其無法只針對癌細胞有專一性，對身體其他正常組織細胞同樣具有毒殺破壞效果，所以使用上會出現一些副作用。由於它主要傷害身體內分裂旺盛的細胞，如上皮細胞、黏膜細胞與骨髓細胞，所以其副作用有噁心、嘔吐、脫毛、皮膚產生紅斑、疼痛或黏膜炎 (mucositis)、抑制骨髓細胞，由於心肌對氫氧自由基的傷害特別敏感，使 doxorubicin 容易對心臟產生累積性的傷害，通常是不可逆的反應，且死亡率亦會增加，因而限制了 doxorubicin 的使用 [37, 38]。

為改善化療藥物 Doxorubicin 之副作用，科學家嘗試將 Doxorubicin 包覆於微脂體中，建構出 PEGylated liposomal doxorubicin (PL-Dox)，以改變藥物釋放速度，藉此降低 Doxorubicin 之毒性。PL-Dox 粒徑約 100 nm，可以通過腫瘤新生壁的血管漏洞，使的微脂體內的 doxorubicin，能大量累積在腫瘤中，增加治療效果。而微脂體表面連接 PEG 基團形成一層保護膜，可避免微脂體被網狀內皮系統偵測到，而延長 PL-Dox 在血液中循環的時間，更增加藥物進入腫瘤組織累積的機會 [39]。同時因其不容易進入正常組織中，故能減少副作用，尤其對心肌的毒性更是大為降低。但也有文獻指出，PL-Dox 這種長效型的微脂體由於組成太過穩定，導致藥物無法快速釋放 [40]；而微脂體表面接上 PEG 基團，也可能會阻礙微脂體進入細胞 [41, 42]。這些原因都會減低 PL-Dox 對腫瘤的毒殺效力，因而削弱了對癌症治療的成效。

1.3.4 Liposomal Cisplatin

順鉑 (Cisplatin，簡稱 cDDP) 即 cis-diamminedichloroplatinum (II) 是一種含鉑的抗癌藥物，目前已廣泛應用在膀胱癌、卵巢癌、睪丸癌、子宮頸癌、頭頸部腫瘤及非小型細胞肺癌 [43-45]。cDDP 此種化療藥物最早是在 1845 年由義大利科學家 Michele Peyrone 團隊合成發表 [46]，是鉑類藥物中最早被合成的一個，並在 1978 年通過 FDA 審核能用於多種癌症治療。其作用機轉大致與其他的烷基化藥物 (alkylating agents) 相似，主要為 cDDP 進入體內後，會因細胞內的氯離子濃度低，導致順鉑結構中的氯分子被水分子取代，形成帶正電荷的活性物，容易與細胞中的 DNA [47], RNA 或蛋白質產生交互作用，而此交互作用造成 DNA 鏈內或雙鏈間發生交聯，抑制癌細胞的 DNA 複製，活化細胞凋亡路徑，致使癌細胞死亡 [48, 49]。由於 cDDP 和 Dox 的作用機制不相同，目前常被採用為相互替代或相互結合的治療方案[50-53]。雖然 cDDP 是一種非常有效的抗癌藥物，但是也被發現會導致相當嚴重的副作用，包括腎毒性，胃腸道毒性，耳毒性和視神

經病變，而限制了它在臨床上的使用 [54-57]。

近年來科學家利用微脂體的藥物載體系統包覆 cDDP，證實能因此有效降低 cDDP 所造成的腎毒性 [55, 58]。雖然已陸續開發成 SPI-077 或 Lipoplatin 這類微脂體劑型的 cDDP 藥物，也進入臨床測試階段 [59, 60]，但目前還是沒有任何微脂體類 cDDP 藥物通過 FDA 核可成為正式用藥。SPI-077 是一個以 hydrogenated soy phosphatidylcholine : cholesterol : methoxypolyethylene glycol (mPEG-DSPE) 莫耳數比為 51 : 44 : 5 的脂質混合 cDDP 製備而成，具立體穩定的微脂體 cDDP 製劑 [59, 61, 62]。微脂體劑型雖然能延長其存在於血液中的循環時間，並擁有良好的耐受性 [61]，但此種微脂體 cDDP 製劑在臨床試驗第二期時，卻無法有效治療非小型細胞肺癌，只能達到 4.5% 的整體反應率 (overall response rate) [59]。Zamboni 等人 [63] 利用微透析技術 (microdialysis) 檢測 cDDP 在腫瘤部位從 SPI-077 微脂體劑型中釋放情形。此活體實驗在注射入 SPI-077 這種微脂體劑型 cDDP 製劑或 cDDP 後，檢驗於 B16 黑色素瘤細胞均質液中 cDDP 的累積量。實驗發現，經 SPI-077 處理的小鼠組別，其腫瘤中的 cDDP 的累積量為無劑型包覆的 cDDP 組別的 4 倍。但是，經由微透析分析 SPI-077 處理的小鼠組別，檢測不到其腫瘤細胞外液有未經微脂體包覆的 cDDP，顯示微脂體劑型的 cDDP 在腫瘤內的釋放情形不佳。分析腫瘤中 cDDP 結合活性，發現 SPI-077 處理的小鼠組別中 cDDP 與 DNA 結合活性，顯著低於無劑型包覆的 cDDP 組別 4 倍。如此的結果顯示，在臨床試驗中 SPI-077 效果不彰的主要原因，可能是因為在腫瘤位置 cDDP 從微脂體劑型中釋放情形不佳所致。由於微脂體劑型的 cDDP 確實能有效減緩 cDDP 引起的嚴重腎毒性等副作用，因此若能改善微脂體劑型於腫瘤部位釋放不佳的情形，相信應能大幅提升此鉑類化療藥物在癌症治療的效果。

1.4 光動力治療

光動力治療 (Photodynamic therapy ; PDT) 是目前一種新興的癌症治療模

式，主要由光感物質，光和氧分子這三種要素所組成。光動力治療的原理，是利用特定波長的光去激發光感物質，將光能量轉化產生單態氧和自由基，並藉由單態氧和自由基對細胞內核苷酸、蛋白質、脂質等物質造成氧化破壞，進而導致細胞死亡，為近年來相當受到重視的癌症治療方式。

目前 PDT 在癌症臨床治療上，主要應用於口腔癌、食道癌、支氣管癌、肺癌、膀胱癌、皮膚癌、腦瘤和消化道、眼部、婦科之腫瘤，及各種腹腔內之惡性腫瘤。此外，PDT 也被運用在非癌症之疾病治療上，像是類風濕性關節炎 (Rheumatoid)、心臟冠狀動脈阻塞 (Coronary artery)、黃斑退化症 (Macular degeneration)、乾癬症 (Psoriasis)，還有一些皮膚疾病之治療應用 [64-66]。

1.4.1 光化學作用機制 [65]

光動力作用必須有三個必要條件存在：(1) 光感物質；(2) 特定波長的光線；(3) 氧分子的存在，在這三個條件相互作用下，才能達到治療效果。其作用機制主要為當基態 (ground state) 的光感物質，吸收特定波長光源之光子，躍升為激發單態 (excited singlet state)，歷時極短的過渡時間 (life time : 1-100 ns)，馬上又衰退回基態，此時也有可能形成兩個不成對電子軌域的激發三態 (excited triplet state)，此種狀態具有較長之存在時間 (life time : \geq 500 ns)，易與環境中其他分子產生碰撞，如此會出現兩種反應情況 (附圖一)：

(1) Type I reaction。經過光激發後所生成的激發三態，會和周邊環境中的單態接收分子 (singlet state acceptor molecular) 碰撞，產生電子或質子的轉移，造成包含超氧自由基 (superoxide anion ; O_2^-)、過氧化氫 (hydrogen peroxide ; H_2O_2) 及氫氧自由基 (OH^-) 等種類的自由基 (free radical) 形成 [67]。

(2) Type II reaction。則是經過光激發後所生成的激發三態，會和周邊基態氧分子 (ground state oxygen) 碰撞，產生能量的轉移而生成單態氧 (singlet oxygen)，單

態氧於細胞中會容易與其中的核苷酸、蛋白質、脂質等物質作用，進而造成破壞，不過單態氧存在週期短 (life time : < 200 ns)，移動擴散之距離也短 (distribution distance < 45 nm)，所以單態氧只能對其周遭相當近距離範圍內造成傷害 [67]。

光動力作用對細胞所造成之毒殺成效，取決於光感物質與光源。不同種光感物質於細胞內分布位置及累積量都不盡相同，可能會累積在溶酶體 (Lysosome)、粒線體 (Mitochondria)、高基氏體 (Golgi apparatus)、內質網 (Endoplasmic Reticulum)，也可能在細胞膜 (Cell membrane)、細胞核 (Nucleus) 中，另外光源激發波長、光源強度及光照劑量等等因素，都會導致單態氧或自由基產率，而影響到整體光動力效果 [68]。

1.4.2 光感物質

光動力治療所使用之光感物質，是一種能吸收光能，並利用所吸收之光能量，在人體組織或細胞內引起化學反應之物質。在可見光譜中，紅光對人體的穿透力最強，所以光動力治療所使用之光感物質以能吸收紅光為佳。而要提升光動力治療之成效，關鍵在光感物質之改良及開發。第二代的光感藥物其發展重點即是選擇單一的純物質，不但容易研究光感藥物其中成分與光動力成效之間的關係，也較易使用化學合成方式製備。目前第二代光感藥物開發，著重在延長光激發後所產生的激發三態 (excited triplet state) 時間，使用長波長之激發紅光，及降低皮膚光敏性副作用產生等方向。其中包含像是有 Chlorins、Bacteriochlorins、Phthalocyanines、Naphthalocyanines、Pheophorbides、Purpurins 等 [69]。雖然第二代光感藥物已有許多改善之處，但光動力治療在實際運用時會面臨一些問題，像是脂溶性的光感物質於水溶液環境中，會因為疏水性作用使其分子間容易相互聚集 (aggregation)，造成光感物質在激發態的碰撞衰減 (collisional quenching)，而使得光動力治療效果不彰 [70]。光動力治療也會因為光的穿透力不足，對於腫瘤深處無法達到有效激發光感物質之缺點，使得光動力治療在實際臨床應用上

出現一些急待解決、克服之問題 [69, 71]。



1.4.3 Liposomal Chlorin e6

在第二代光感藥物中，Chlorins 類的化合物由於結構上較 Hematoporphyrin derivative (HpD) 這類第一代的光感物質，prophyrin 環的一個外雙鍵(Exopyrrole double bound)被氳化，使得 Chlorins 類的化合物吸收波長紅位移(red shift)，在 650 nm 以上有一明顯吸收波峰。也因為 Chlorins 類吸收波長比 HpD 長，可以使用長波長、穿透力高之光源進行激發，所以在腫瘤穿透效力上也來的更好，因此 Chlorins 類的光感藥物備受重視，也積極被運用在 PDT 相關研究上。此外相較於 HpD，Chlorins 類的化合物於皮膚上的累積量較低，比較沒有皮膚光敏性副作用產生，對於臨床使用上也較為方便 [69]。Chlorin e6 (Ce6)是一由葉綠素 a (chlorophyll a)所得到之光感物質，當溶於乙醚時紅光波段的最大吸收波長為 667 nm，消光係數(extinction coefficient) $\epsilon = 55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，為一極具潛力之光感物質 [72]。

由於脂溶性的光感物質於水溶液環境中，會因為疏水性作用使其分子間容易相互聚集(aggregation)使得光動力治療效果不彰，另外光感物質無法專一累積於腫瘤組織，也會導致治療效果下降以及不良副作用產生 [73, 74]。由於微脂體能作為良好的藥物載體，並能適用於許多不同物化特性之藥物，所以科學家嘗試使用微脂體進行包覆，以降低脂溶性光感物質容易聚集之問題，並藉由微脂體奈米載體的特性，增加腫瘤組織累積增加使用安全性 [75-78]。像是利用 PEGylated liposomal-Chlorin e6 (PL-Ce6) 應用在活體動物實驗上，發現相較於未使用微脂體包覆之 Chlorin e6，在經過光動力治療後，PL-Ce6 能達到更好的腫瘤抑制效應，為光動力治療開啟新的應用模式 [79]。



1.5 惡性周邊神經鞘瘤

惡性周邊神經鞘瘤 (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor, MPNST) 是一種極具侵略性的軟組織惡性腫瘤(soft tissue sarcomas)；有一半的 MPNST 源自於神經鞘細胞偶發的突變所自然產生的，另一半則來自第一型神經纖維瘤 (Neurofibromatosis type 1, NF1) [80]。雖然大部分的 NF1 為良性腫瘤，但不同於皮膚神經纖維瘤(dermal neurofibromas)，約有 30%為叢狀神經纖維瘤(plexiform neurofibromas)，而且此類患者在一生中有 5-13%的機率惡化發展成 MPNST，好發年齡大約在 20-35 歲之間 [81]；而 MPNST 也是造成 NF1 病患死亡的主要原因 [82]。

正常的神經鞘細胞除了許旺細胞(Schwann cells)、周邊神經細胞(perineurial cells)之外，還包括屬於間葉細胞(mesenchymal cells)類的纖維母細胞(fibroblasts)、內皮細胞(endothelial cells)、周細胞(pericytes)、神經外膜脂細胞(epineurial lipocytes)等 [83]；而惡性周邊神經鞘瘤主要起源可能來自於許旺細胞，因為在大部分 MPNST 細胞中可以發現 S100 這個許旺細胞標記(marker) [84, 85]。

雖然確切使良性神經纖維瘤轉變成惡性腫瘤的機制過程尚未明瞭，但可以確定的是單單只有 NF1 基因的突變並不足以導致腫瘤的癌化 [86]。在腫瘤癌化的過程中，NF1 基因的突變只是第一步 [87]，接著伴隨 p53 或其他的突變共同導致腫瘤生成 [88]。文獻指出，在 MNPST 細胞當中，其他和細胞增生或細胞周期相關的抑癌基因例如 p16^{INK4A} (可抑制細胞周期)、p14^{ARF} (負責啟動 P53 訊息傳導路徑)也被發現有突變或者缺失的現象 [89]；和細胞遷徙相關的基因例如 EGFR 以及 PDGF 也被發現有大量表現的情形 [90]，而這些現象在一般正常的周邊神經細胞是不曾發現過的。腫瘤細胞會沿著神經生長，再加上本身具有侵襲(invasion)以及促進血管新生(angiogenesis)的能力 [91]，除不斷增生外，還可能入

侵體內臟器如肺、肝、腦、結締軟組織間、骨骼、甚至淋巴結等部位，導致治療困難。



由於 MPNST 對於化療以及放射線等治療具有抗性，現階段還是以手術切除為主要治療方式。但由於腫瘤組織與周邊正常細胞交織生長，提高手術執行的困難度，不僅可能造成正常神經功能損害，腫瘤的復發率也極高 [92]。導致許多罹患 MPNST 的患者癒後(prognosis)狀況不佳 [93]，死亡率極高，5 年以及 10 年存活率分別只有約 52% 以及 34%。由於尚無一套有效且安全的醫療方法來治療 MPNST，所以目前主要還是以防治為重，其策略包含監控腫瘤的發生、提供遺傳諮詢與做好產前診斷等。另一方面同時尋求更有效的治療方法，目前新興的治療方向朝著腫瘤內訊息傳遞因子抑制劑作開發 [94-97] 或發展直接針對腫瘤進行毒殺的治療方式，期待對於惡性周邊神經鞘瘤有更有利的治療手段。

1.5.1 Axl receptor tyrosine kinase

近來文獻指出惡性周邊神經鞘瘤在 receptor tyrosine kinases (RTKs) 表現上與正常許旺細胞有相當大差異，使得 RTKs 被認為可能會是研究甚至是治療 MPNST 的一個重要指標 [98]。RTKs 其中的 TAM 家族(包含 Axl、TYRO3 與 MER)被認為在腫瘤發展中扮演相當重要的角色，與腫瘤抗藥性、細胞增生、細胞移動及入侵能力有關 [99]。TAM receptor 能被 GAS6 ligand 活化，啟動下游訊息傳遞，在神經細胞調控中，已知能刺激許旺細胞進行細胞分裂 [100]。另外文獻報導 GAS6/Axl 訊息傳遞能透過 RAS、RAC、p38MAPK、MAPKAP kinase 2、PI3K 和 HSP25 等訊息路徑影響肌動蛋白重組(actin reorganization)，直接控制細胞移動能力 [101]。研究發現，確實有較多的 Axl mRNA 表現在 primary MPNST 腫瘤上 [102]，除此之外，Axl 也被發現會大量出現在具抗藥性的細胞(drug resistant cell lines)中 [103, 104]。由於 Axl 被認為與腫瘤增生、惡化有關，因此相當有潛力將其開發為腫瘤診斷或預後的重要標記(marker)。日前台大醫院李銘仁醫師團隊發

現，植有人類 MPNST 細胞株的小鼠，其血液中 soluble Axl 含量與腫瘤大小成正相關，能作為腫瘤體積大小的重要指標，因此 soluble Axl 含量能應用於 MPNST 治療上，成為輔助檢測治療成效的重要依據。



1.6 研究動機與目的

以微脂體做為化療藥物載體，應用於癌症治療，雖然能大幅減少藥物副作用，減輕對正常組織的傷害，但也常因其穩定包覆，使藥物即使累積治腫瘤部位，仍不易由微脂體中釋出，而無法產生作用 [105]。因此如何使微脂體藥物平時穩定包覆，但在到達特定組織時適時釋放，成為改善此治療方式的重要目標。雖然在我們之前的研究中，已成功建立結合光動力治療與化學治療的雙療效治療方式，利用微脂體同時包覆光感物質 Ce6 及化療藥物 Dox，達到良好腫瘤治療效果 [106, 107]，但其增進療效的機制尚未釐清。我們推測雙效微脂體的治療效力來自於：(1) 光動力作用促使化療藥物由微脂體釋放；(2) 光動力作用對腫瘤部位血管造成破壞，使血管滲漏，增加後續藥物的累積。因此本研究希望藉由研究光動力作用對雙效微脂體藥物釋放的影響，以及光動力作用對體內雙效微脂體藥物分布造成的改變，對雙效微脂體的作用機制進行探討。同時比較不同制作方式，包覆不同化療藥物之雙效微脂體應用上的差異，以更加瞭解此結合型治療的適用性。並檢測其對人類腫瘤的治療效果，希望早日達到進一步的應用。所以本研究欲完成三個具體目標如下：

一、建構包覆不同化療藥物之雙效微脂體

為了驗證雙效微脂體的概念是否能擴及到其他同樣有藥物釋放緩慢問題之微脂體化療藥物，改善其缺失而增進治療能力，並同時比較不同包覆方式對微脂體應用產生的影響。我們將針對目前已廣泛應用於臨床癌症治療，但經微脂體包覆後同樣因不易釋放而減弱療效之化療藥物 cDDP，作為第一階段的發展目標。

希望建構出同時包覆有化療藥物 cDDP 及光感物質 Ce6 之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6，並檢測其治療效益，以了解雙效微脂體之概念是否具有更廣泛的運用。



二、探討光動力作用對雙效微脂體藥物釋放及體內分布的影響

為了對雙效微脂體產生良好療效的作用機制，有更詳盡的了解，我們將探討雙效微脂體是否能如之前所預期，在照光激發光感物質產生光動力作用後，對微脂體脂雙層造成氧化破壞，而加速其內化療藥物釋出。並藉由了解雙效微脂體經光動力治療後，活體內藥物分布的改變，以更加釐清其增強療效之確實機制，希望能對此類藥物的改善及將來的治療方式，提供一個思考的依據。

三、將雙效微脂體應用於人類腫瘤治療

在之前的研究，我們僅以小鼠的腫瘤細胞測試療效，對於人類的腫瘤細胞是否也能有同樣功效，目前也還不了解。為了使雙效微脂體的發展能更進一步應用於人類腫瘤治療，我們選擇目前除手術外，並無較佳治療方式之惡性周邊神經鞘瘤(MPNST)，作為我們的研究目標，嘗試利用雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對此種腫瘤進行治療，希望未來能彌補手術上的不足，將雙效微脂體應用於人類腫瘤治療。在獲得更多對雙效微脂體的了解後，期望未來能有更進一步的發展，早日達到應用，解決目前臨床腫瘤治療的需求。

第二章 材料與方法



2.1 藥品與儀器

2.1.1 藥品

來源	藥品
Avanti (Alabaster, Alabama, USA)	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC)
	Polyethyleneglycol-derivated distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE)
Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada)	Sodium chloride (NaCl) Sodium hydroxide (NaOH)
Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit-Haemek, Israel)	Fetal bovine serum (FBS)
Frontier Scientific (Logan, UT, USA)	Chlorin e6 (Ce6)
Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)	0.5% Trypsin-EDTA RPMI 1640 medium DMEM medium 100X Penicillin Streptomycin (P/S) Trypan blue stain 0.4%
Invitrogen by Life Technologies Co. (Carlsbad, CA, USA)	Phosphate Buffered saline (PBS)
Millipore Corporation(Billerica, MA, USA)	Mw cutoff 10,000 濃縮離心管

PAA Laboratories (Coelbe, Germany)	Penicillin G/Streptomycin (P/S)
Panreac Quimica S.A.U (Barcelona, Spain)	Dimethylformamide (DMF)
Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA)	Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit
Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)	Ammonium sulfate
	Ammonium molybdate
	Ascorbic Acid
	Chloroform
	Cholesterol (CHOL)
	cisplatin (cDDP)
	Dimethyl sulfoxide (DMSO)
	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)
	Sodium diethyldithiocarbamate (DDTC)
	Phosphorous standard solution
95% Ethanol	
RPMI 1640 without phenol red	
台灣微脂體公司(Tapei, Taiwan)	Doxorubicin (Dox)
GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden)	CL-4B (Sephadex) G-50 (Sephadex)



2.1.2 儀器

恆溫培養箱 Automatic CO₂ Incubator (Forma Scientific Inc. Marietta, OH, USA)

離心機 KUBOTA 2420 (speed range 0–6000 rpm, timer 0–60 min, Japan)

水浴槽 Water bath (Hotech Instruments Corp., Model 836, Taipei, Taiwan)

螢光光譜儀: FluoroMax-4 Spectrofluorometer (HORIBA Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA)

96 孔盤讀盤機 (Biotrak II Reader, Amersham Biosciences, UK)

電子測量器 Electronic Digital Caliper (Guanglu Measuring Instrument CO., LTD., Guilin, China)

均質機 (PRO Scientific Inc., Bartlesville, CT, USA.)

半導體雷射 Laser diode , 105 mW/cm² , 波長範圍為 662 nm (Arima Laser Corp., Taipei, Taiwan)

粒徑分析儀 Nanoparticle analyzer SZ-100 (HORIBA, Kyoto, Japan)

高效能液相層析儀 (HPLC)

Photo-diode Array detector: SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Autosampler: SIL-10AD VP (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Pump: LC-20 AT (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column: 150 × 4.6 mm C18- Enduro 5 μm 120 Å (SGE Analytical Science, Ringwood, Australia)

Guard Column: 10 × 4 mm C18- Enduro (SGE Analytical Science, Ringwood, Australia)

2.2 細胞株

小鼠大腸癌 C26 細胞株，由台北醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系劉俊仁

教授提供；人類肺癌細胞 H460 訂購自食品工業研究所生物資源保存及研究中心；人類惡性周邊神經髓鞘瘤(MPNST): S462-TY, T265, ST8814 由臺大醫院李銘仁教授提供。



2.2.1 細胞培養液

C26, H460 細胞株培養於含 10% FBS 之 RPMI 1640 培養液, S462-TY, T265, ST8814 細胞株皆培養於含 10% FBS 之 DMEM 培養液。所有細胞培養於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中。

2.2.2 繼代培養方法

將 8×10^5 C-26 細胞株種於 100-mm 培養皿中，培養液體積為 10 ml，培養於於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中，至細胞長至約八成滿，以 PBS 潤洗一次，加入 1 ml Trypsin，使其均勻分布於培養皿中作用約 1 分鐘 (可輕拍培養皿使細胞懸浮)，並於顯微鏡下觀察細胞懸浮情形。待細胞完全懸浮後，加入 9 ml 培養液將培養皿上細胞沖洗下來，吸取至 15 ml 離心管，以 800 rpm 離心 5 分鐘。移除上清液，加入 10 ml 培養液使細胞重新懸浮，接著進行細胞計數。再將其中 8×10^5 細胞種入新的 100 mm 培養皿中，於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中進行繼代培養。

2.2.3 細胞解凍與冷凍方法

解凍細胞時，先從液態氮桶中，迅速將欲解凍之細胞抗凍管取出，放置於 37°C 水浴槽中輕輕搖晃，使細胞漸漸解凍回溫，至冷凍管中細胞液無結冰，即可將細胞液取出，緩緩加入含 40 ml 培養液之 50 ml 離心管中，以 800 rpm 離心 5 分鐘。移除上清液，加入 10 ml 培養液使細胞重新懸浮，將所有細胞種入 100 mm 培養皿中，於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中培養。

冷凍細胞時，將細胞從培養皿中拍取下來，以 800 rpm 離心 5 分鐘。移除上

清液，加入 1 ml 冰冷的冷凍液(培養液中含 5% DMSO)，使細胞重新懸浮，將所有細胞液裝入抗凍管中，置冰上約 15-20 分鐘，再放於-20 °C 至細胞液完全結凍，移至-80 °C。隔天將裝有細胞之抗凍管放入液態氮桶中保存。



2.3 細胞計數

將細胞從培養皿中拍取下來，以 800 rpm 離心 5 分鐘。移除上清液，加入 1 ml 培養液使細胞重新懸浮，取 10 μ l 細胞懸浮液，加入 10 μ l 0.4% Trypan blue，用來區分死細胞和活細胞。當細胞正常時，會因為細胞膜完整，而使通透性低的 Trypan blue 無法進入細胞內，所以此時活細胞呈現透明狀態；若細胞死亡時，其細胞膜通透性增加，使 Trypan blue 能通過細胞膜進入細胞中，使整個細胞呈現藍色，藉此標示死亡之細胞。將細胞懸浮液與 Trypan blue 混合均勻後，取 10 μ l 混合液至細胞計數器上，計數四個角落方塊之活細胞數目。細胞濃度計算公式如下：每毫升細胞數目 = (四個角落方塊之活細胞數目 / 4) \times 2 \times 10⁴。

2.4 微脂體製備

PL-Ce6 以薄膜水合法(Thin-film hydration method)製備，DSPC、cholesterol 以及 DSPE-PEG 以 chloroform 配製成濃度分別為 50、50 以及 5 μ mole/ml 之溶液，Ce6 以 DMF 配製成濃度為 10 mg/ml 之溶液，取 200 μ l DSPC、100 μ l cholesterol、40 μ l DSPE-PEG 溶液至圓底試管，最後加入 20 μ l Ce6 溶液。將脂質與 Ce6 混合後，以減壓濃縮機將有機溶劑抽乾，減壓濃縮條件：溫度 65 °C，轉速 50 rpm，真空度 70 mm Hg，約 30 ~ 40 分鐘後可脫去有機溶劑，在試管底形成脂質薄膜。再加入預熱至 65 °C 之 250 mM 硫酸銨水溶液 1 ml，並以水浴式超音波在 65 °C 下進行震盪水合 30 分鐘。將超音波震盪完之微脂體放入液態氮中快速冷凍，待其完全凝固(約一分鐘)，再置入 65 °C 水浴槽使其完全溶解(約二分鐘)，此冷凍-解凍循環重複五次。之後利用濾膜擠壓方式，在 65 °C 水浴中以 100 nm 聚碳酸酯 PC

membrane 擦壓過濾 10 次，控制微脂體粒徑在 100 nm 左右。並以 Sephadex G-50 膠體過濾層析方式移除未包覆的藥物，收集微脂體部分 1.5 ml，可得到 PL-Ce6。

PL-Dox 依照 PL-Ce6 之製作方式以薄膜水合法製備，但一開始不加入 Ce6，DSPC、cholesterol 以及 DSPE-PEG 以 chloroform 配製成濃度分別為 50、50 以及 5 $\mu\text{mole/ml}$ 之溶液，取 200 μl DSPC、100 μl cholesterol、40 μl DSPE-PEG 溶液至圓底試管。將脂質混合後，以減壓濃縮機將有機溶劑抽乾，減壓濃縮條件：溫度 65°C，轉速 50 rpm，真空度 70 mm Hg，約 30 分鐘後可脫去有機溶劑，在試管底形成脂質薄膜。再加入預熱至 65°C 之 250 mM 硫酸銨水溶液 1 ml，並以水浴式超音波在 65°C 下進行震盪水合 30 分鐘。將超音波震盪完之微脂體放入液態氮中快速冷凍，待其完全凝固(約一分鐘)，再置入 65°C 水浴槽使其完全溶解(約二分鐘)，此冷凍-解凍循環重複五次。之後利用濾膜擦壓方式，在 65°C 水浴中以 100 nm 聚碳酸酯 PC membrane 擦壓過濾 10 次，控制微脂體粒徑在 100 nm 左右。製作出的空微脂體通過 Sephadex G-50 column 將微脂體外液體置換為 0.9% NaCl，形成微脂體內外硫酸銨濃度差，收集微脂體部分 1.5 ml 後，加入 100 μl Dox (10 mg/ml)於 65°C 反應 30 分鐘，結束後置於冰上迅速冷卻，通過 Sephadex G-50 column 移除未包覆之 Dox，收集 2 ml 得到 PL-Dox。

PL-Dox-Ce6 以薄膜水合法(Thin-film hydration method)製備，DSPC、cholesterol 以及 DSPE-PEG 以 chloroform 配製成濃度分別為 50、50 以及 5 $\mu\text{mole/ml}$ 之溶液，Ce6 以 DMF 配製成濃度為 10 mg/ml 之溶液，取 200 μl DSPC、100 μl cholesterol、40 μl DSPE-PEG 溶液至圓底試管，最後加入 10 ~ 20 μl Ce6 溶液。將脂質與 Ce6 混合後，以減壓濃縮機將有機溶劑抽乾，減壓濃縮條件：溫度 65°C，轉速 50 rpm，真空度 70 mm Hg，約 30 ~ 40 分鐘後可脫去有機溶劑，在試管底形成脂質薄膜。再加入預熱至 65°C 之 250 mM 硫酸銨水溶液 1 ml，並以水浴式超音波在 65°C 下進行震盪水合 30 分鐘。將超音波震盪完之微脂體放入液態氮中快速冷

凍，待其完全凝固(約一分鐘)，再置入 65°C 水浴槽使其完全溶解 (約二分鐘)，此冷凍-解凍循環重複五次。之後利用濾膜擠壓方式，在 65°C 水浴中以 100 nm 聚碳酸酯 PC membrane 挤壓過濾 10 次，控制微脂體粒徑在 100 nm 左右。以 Sephadex G-50 膠體過濾層析方式移除未包覆的藥物，並將微脂體外液體置換為 0.9% NaCl，形成微脂體內外硫酸銨濃度差，收集微脂體部分 1.5 ml 後，加入 100 µl Dox (10 mg/ml) 於 65°C 反應 30 分鐘，結束後置於冰上迅速冷卻，通過 Sephadex G-50 column 移除未包覆之 Dox，收集 2 ml 得到 PL-Dox-Ce6 (附圖三 A)。

PL-cDDP 採用酒精注射法製成，DSPC、cholesterol 以及 DSPE-PEG 以 chloroform 配製成濃度分別為 500、500 以及 50 µmole/ml 之溶液，取 200 µl DSPC、100 µl cholesterol、40 µl DSPE-PEG 溶液至圓底試管。將脂質混合後，以減壓濃縮機將有機溶劑抽乾，減壓濃縮條件：溫度 65°C，轉速 50 rpm，真空度 70 mm Hg，約 30 分鐘後可脫去有機溶劑。加入 99.5% 酒精 100 µl 並加熱至 65 °C 使脂質混合物成液態，再快速加入至含 8 mg/ml cDDP 之生理食鹽水 900 µl 中，以水浴式超音波震盪 60 分鐘使微脂體形成。將超音波震盪完之微脂體放入液態氮中快速冷凍，待其完全凝固(約一分鐘)，再置入 65°C 水浴槽使其完全溶解 (約二分鐘)，此冷凍-解凍循環重複五次。之後利用濾膜擠壓方式，在 65°C 水浴中以 100 nm 聚碳酸酯 PC membrane 挤壓過濾 10 次，控制微脂體粒徑在 100 nm 左右。並以 Sephadex G-50 膠體過濾層析方式移除未包覆的藥物，收集微脂體部分 2 ml，可得到 PL-cDDP。

PL-cDDP-Ce6 採用酒精注射法製成，DSPC、cholesterol 以及 DSPE-PEG 以 chloroform 配製成濃度分別為 500、500 以及 50 µmole/ml 之溶液，Ce6 以 DMF 配製成濃度為 20 mg/ml 之溶液，取 200 µl DSPC、100 µl cholesterol、40 µl DSPE-PEG 溶液至圓底試管，最後加入 20 ~ 60 µl Ce6 溶液。將脂質與 Ce6 混合

後，以減壓濃縮機將有機溶劑抽乾，減壓濃縮條件：溫度 65°C ，轉速 50 rpm，真空度 70 mm Hg，約 30 ~ 50 分鐘後可脫去有機溶劑。加入 99.5% 酒精 100 μl 並加熱至 65°C 使脂質混合物成液態，再快速加入至含 8 mg/ml cDDP 之生理食鹽水 900 μl 中，以水浴式超音波震盪 60 分鐘使微脂體形成。將超音波震盪完之微脂體放入液態氮中快速冷凍，待其完全凝固(約一分鐘)，再置入 65°C 水浴槽使其完全溶解 (約二分鐘)，此冷凍-解凍循環重複五次。之後利用濾膜擠壓方式，在 65°C 水浴中以 100 nm 聚碳酸酯 PC membrane 挤壓過濾 10 次，控制微脂體粒徑在 100 nm 左右。並以 Sephadex G-50 膠體過濾層析方式移除未包覆的藥物，收集微脂體部分 2 ml，可得到雙效型微脂體 PL-cDDP-Ce6 (附圖三 B)。

濃縮微脂體藥物 微脂體藥物利用 15 ml 之 Mw cutoff 10000 濃縮離心試管，以 5000 g 離心濃縮至動物實驗所需濃度。濃縮後藥物濃度範圍——Ce6: 175~250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；Dox: 650~950 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；cDDP: 350~700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.5 微脂體內藥物定量

微脂體內 Ce6 定量 Ce6 stock : 10 mg/ml，以 95% 酒精序列稀釋至 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，製作 Ce6 檢量線。微脂體樣品以 95% 酒精稀釋 150 倍，利用 UV-Visible spectrophotometer 檢測波長 400 nm 吸光值。

微脂體內 Dox 定量 Dox stock : 10 mg/ml，以 95% 酒精序列稀釋至 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，製作 Dox 檢量線。微脂體樣品以 95% 酒精稀釋 150 倍，利用 UV-Visible spectrophotometer 檢測波長 470 nm 吸光值。

微脂體內 cDDP 定量 cisplatin 的定量以 HPLC 方式檢測，配置 DDTc 5% (溶於 0.1 N NaOH 中)、NiCl₂ stock 1mg/ml、0.1 N NaOH，取 100 μl 5 % DDTc、100

μl 100 $\mu\text{g/ml}$ NiCl_2 、500 μl 0.1 N NaOH 以及待分析樣品於反應管中，於 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 小時，放在冰上終止反應，並加入 2 ml 乙醚，均勻震盪 10 分鐘使 Pt(DDTC)_2 以及 Ni(DDTC)_2 能夠被萃取到乙醚層，隨後取出乙醚層待乙醚揮發乾後，加入 500 μl 氯仿均勻震盪後以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清 400 μl 到 HPLC 採樣瓶。以 C18 column 分離，流洗條件 $\text{MeOH: H}_2\text{O} = 3:1$ (v/v)，流速 1 ml/min，並以 Photo-diode Array detector 偵測 254 nm 吸光值，HPLC 分析圖見附圖四。

2.6 微脂體內脂質分析

濃度為 1012 $\mu\text{g/ml}$ 之磷標準溶液，以水稀釋 10 倍，取 10, 20, 40, 60, 80 ml (製作檢量線)其量分別為 0.0326, 0.0653, 0.13, 0.196, 0.26 μmole ，樣本的部分取 30 -50 μl 與 400 ml 之 10 N H_2SO_4 混合，於 200°C 下加熱 30 分鐘待其冷卻再開蓋，加入 100 ml 之 9% H_2O_2 ，於 200°C 下加熱 30 分鐘待其冷卻，之後再加入 4.6 ml 之 0.22% ammonium molybdate 和 100 μl 之 ascorbic acid (15%)，再於 100°C 水浴加熱 10 分鐘，並利用 UV-Visible spectrophotometer 檢測波長 830 nm 吸光值，對照檢量線便可推知微脂體溶液中的磷脂質含量。

2.7 PL-cDDP-Ce6 保存穩定性分析

製備好之 PL-cDDP-Ce6 分別避光，並儲存於 4°C 下，1、3、7、14、21、30、60 天後取出，通過 Sephadex G-50 column 移除 free form Ce6 及 free form Dox。利用螢光光譜儀檢測 PL-cDDP-Ce6 中的 Ce6 (Ex : 650 nm，Em : 665 nm)含量，並以前述 cDDP 定量方式分析 cDDP 含量。另外使用粒徑分析儀檢測 PL-cDDP-Ce6 之粒徑大小。

2.8 PL-cDDP-Ce6 於血清中的穩定性分析

微脂體藥物以 100% Fetal bovine serum (FBS) 胎牛血清稀釋五倍，此時微脂

體處在 80% FBS 中，將樣本放置於 37°C 水浴中培養，並於不同時間點取出 50 μ l 的樣品，三重覆每個時間點取三次，接著以 spin column 分離微脂體以及 Free form 的藥物。spin column 組成為：2 ml Sepharose CL-4B 填充在可拋棄式的塑膠管柱中，以 0.9% NaCl 作為流洗液，離心條件：轉速 1,000 rpm 1 分鐘。管住配製好後，先離心數次確認管柱中的水分完全排除（離心 1,000 rpm，1 分鐘，約離心兩次可將 column 中多餘水分移除），之後每個管柱加入樣品 50 μ l，並固定離心條件為 1,000 rpm 1 分鐘，收集的流洗液約為 50 μ l 為第一個 fraction，之後於膠體表面再加入 50 μ l 的 0.9% NaCl，再以離心的方式收集下一個 fraction 此為第二個 fraction，總共收集約五個 fractions 可將微脂體藥物收集完，總流洗液約為 250 μ l。並以前述 Ce6、cDDP 定量方式分析 Ce6、cDDP 含量。

2.9 微脂體藥物釋放分析

將製備好之微脂體裝入 Mw cutoff 12000-14000 之透析袋，置於 37°C 之 PBS 中，分別在 0.5、1、2、3、6、12、24、48、72 小時，取出透析液並補回等量 PBS，由於微脂體分子較大無法通過透析袋孔洞，因此分析透析液中藥物含量，將能了解微脂體之藥物釋出情況。

2.10 細胞存活率檢測 - MTT assay

MTT [3 (4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl) 2,5 diphenyl- tetrazolium bromide] assay 是測量粒線體內 NADH、NADPH 之去氫酶(mitochondrial dehydrogenases)的活性，其能使水溶性 tetrazolium salt (MTT)還原成藍紫色結晶產物 formazan。由於 NADH、NADPH 之去氫酶只有在活細胞中才有活性，故使用此方法檢測細胞存活率。先於 96 孔盤中種入細胞(6000-8000 cells/well)，隔日加入藥物與細胞培養 2 小時後移除藥物並以 PBS 潤洗，接著以 662 nm 雷射光源照光，於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中培養 24 小時，移除培養液，加入 MTT 溶液(溶於未含胎牛血清的培

養液)，MTT 溶液與細胞避光培養 2 小時後移除，所產生的藍紫色結晶產物 formazan 以 DMSO 溶解，並藉由 microplate reader (BIO-Tek Instruments., Vermont, USA)檢測於波長 570 nm 之吸光值。細胞存活率(%) = (mean absorbance of treated cells/mean absorbance of control cells) × 100%。



2.11 活體動物實驗

2.11.1 動物與腫瘤模式

C26 小鼠大腸癌腫瘤模式 所使用之動物為公 BALB/c 小鼠(年齡約 6-8 週大，體重約 17-20 g)，自財團法人國家實驗動物中心購得。C-26 細胞株以皮下注射方式，植入小鼠右上背部，每一隻小鼠注射之腫瘤細胞數目為 2×10^5 (溶於 50 μl 之無 phenol red RPMI 1640 培養液中)。

S462-TY 人類惡性周邊神經髓鞘瘤腫瘤模式 所使用之動物為母 NU/NU 裸鼠(年齡約 4-6 週大，體重約 17-20 g)，自樂斯科生物科技股份有限公司購得。S462-TY 細胞株以皮下注射方式，植入小鼠右上背部，每一隻小鼠注射體積為 100 μl ，腫瘤細胞數目為 3×10^6 ，細胞分散於無 phenol red DMEM 培養液並含 50% matrigel (BD Biosciences)。

2.11.2 藥物於活體組織分佈

當小鼠腫瘤大小約在 100 mm^3 左右時，以尾部靜脈注射方式，施打入藥物，接著將小鼠避光，並在給藥後 2 小時對腫瘤部位進行照光治療(662 nm, 100 J/cm^2)，於不同時間點犧牲小鼠後以心臟採血法，收集小鼠血液，接著取出小鼠之心、肝、皮、肺、腎、腫瘤，秤重後，加入組織重量 5 倍之冰冷 PBS，放置於冰上，以均質機將組織均質化。加入 4 倍體積之酸化酒精(95% ethanol + 0.6 N

HCl)，置於 4°C over night，以打破細胞沉澱蛋白質並萃取藥物。之後使用 12000 rpm 離心 15 分鐘，收集上清液以螢光光譜儀檢測 Ce6 (Ex: 640 nm, Em: 653 nm) 或 Dox (Ex: 470 nm, Em: 582 nm) 含量。另外組織均質液依 cDDP 定量方式，衍生成 Pt(DDTC)₂ 後以 HPLC 分析 cDDP 含量。並以 WinNonlin version 5.3 (Pharsight, Mountain View, CA) 計算藥物動力參數。

2.11.3 腫瘤組織細胞核內藥物分析

在 BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，當腫瘤長至 100 mm³ 時，以尾部靜脈注射方式打入藥物，在給予藥物後第 2 小時進行光動力治療，使用波長為 662 nm，光源強度為 105 mW/cm² 之光源針對腫瘤部位進行照光，照光劑量為 100 J/cm²。於第四小時犧牲小鼠，取下腫瘤並依 Laginha 等人之方式分離腫瘤組織細胞核 [108]，並分析核內 Dox 量。簡單來說，取下腫瘤組織後以 PBS 清洗，加入組織重量 9 倍 pH 7.6 之 nuclear lysis buffer (0.25 mol/L sucrose, 5 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L CaCl₂)，以玻璃均質器研磨十次，接著加入等體積 nuclear lysis buffer 洗出均質液。以細胞過濾網 (70 μm) 濾除較大組織，離心 1000 g, 10 分鐘移除上清液，加入 500 μl nuclear lysis buffer 將沉澱重新懸浮，並將此懸浮液慢慢加進裝有 5 ml sucrose (1.8 mol/L) 之離心管上層，離心 1000 g, 10 分鐘得到細胞核沉澱。以 150 μl nuclear lysis buffer 將沉澱重新懸浮，並依上述組織內 Dox 之檢測方式分析核內 Dox 含量。

2.11.4 光動力治療

在 BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，或在 NU/NU 裸鼠皮下植入 S462-TY 腫瘤細胞，當腫瘤長至 100, 300 或 500 mm³ 時，以尾部靜脈注射方式打入藥物，分別在給予藥物後第 2 或 12 小時進行光動力治療，使用波長為 662 nm，光源強度為 105 mW/cm² 之光源針對腫瘤部位進行照光，照光劑量為 100 J/cm²。每三天

以電子測量器量測腫瘤大小，腫瘤體積計算公式：腫瘤體積 = $1/2$ (最短邊) $^2 \times$ 最長邊。為了檢測所注射入之藥物毒性，每三天測量老鼠體重，因為當藥物對老鼠有毒性，會使老鼠體重下降，而下降幅度若超過起始體重 20%，定為有顯著藥物毒性產生，故以體重變化評估藥物對老鼠之毒性。此外每天持續監控老鼠存活情形，直到老鼠死亡，而根據人道考量，當老鼠腫瘤大小超過 2500 mm^3 時，便施以 CO_2 安樂死。

2.11.5 血漿中 Soluble Axl (sAxl) 檢測

從尾部靜脈注射 PL-cDDP-Ce6 至植有 S462-TY 腫瘤之 NU/NU 老鼠，2 及 12 小時後以 662 nm 光源照射治療，治療後每六天從頸下靜脈採集 50-100 μl 全血，收集至含有抗凝血劑 EDTA 的收集管中，以 3000 rpm 離心 15 分鐘，保留血漿並儲存於 -80°C 。使用 ELISA kit (R&D System) 檢測老鼠血清中 sAxl 含量，首先將 mouse anti-human Axl capture antibody 固著於塑膠孔盤上，經過 1 小時 blocking，將老鼠血清或標準液加入盤中培養，隔日加入 biotinylated goat anti-human Axl detection antibody 培養 2 小時，接著與 streptavidin-HRP 反應呈色，使用 microplate reader 檢測波長 450 nm 之吸光值。

2.11.6 血液生化分析及腫瘤組織切片

從尾部靜脈注射 PL-cDDP-Ce6 至植有 S462-TY 腫瘤之 NU/NU 老鼠，兩 2 及 12 小時後以 662 nm 光源照射治療，治療後 72 小時犧牲小鼠並採集血液， $300\text{ }\mu\text{l}$ 血液收集至含有抗凝血劑 EDTA 塗布的收集管中，保存於 4°C ，以送至台灣小鼠診所(Taiwan Mouse Clinic)進行全血球計數。另外 $400\text{ }\mu\text{l}$ 血液以一般微量離心管收集，置於室溫 30 分鐘，待其凝血後以 3000 rpm 離心 15 分鐘保留血清，保存於 4°C ，以送至台灣小鼠診所進行 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine kinase (CPK), lactate dehydrogenase (LDH),

blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE)血液生化測試。同時取下小鼠腫瘤，置於 10%福馬林固定液中，腫瘤組織和固定液的比例為 1:40 (v/v)，送至台灣小鼠診所進行石蠟包埋及切片。



2.12 統計分析

統計經由 Student's t-test 分析兩組不同處理是否有顯著差異，比較兩組以上之差異則利用 two-way ANOVA test 分析，以 Kaplan-Meier survival curve 評估小鼠存活情況。 $P<0.05$ 視為統計上有顯著差異。統計軟體為 Microsoft Excel 或 IBM SPSS Statistics software。



第三章 結果

3.1 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6

在我們先前的研究中，已成功建構出包覆有化療藥物 Dox 之雙效微脂體 PL-Dox-Ce6，並證實其具良好療效 [106, 107]。在此我們將進一步驗證，雙效微脂體之概念是否能擴及到其他同樣有藥物釋放緩慢問題之微脂體化療藥物，改善其缺失而增進治療能力。因此我們選擇目前已廣泛應用於臨床癌症治療，但經微脂體包覆後同樣因不易釋放而減弱療效之化療藥物 cDDP，作為此階段發展目標。希望建構出同時包覆有化療藥物 cDDP 及光感物質 Ce6 之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6，並檢測其治療效益，以了解雙效微脂體之概念是否具有更廣泛的運用。

3.1.1 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 基礎性質分析

建構雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6

雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 的製作和先前 PL-Dox-Ce6 不同，參考 SPI-077 之製備方式採用酒精注射法製成 [61]，以 DSPC: Cholesterol: DSPE-PEG 莫耳數比為 50: 25: 1 的脂質共 152 μmole 加入 0.4 ~ 1.2 mg Ce6 混合，以減壓濃縮機將有機溶劑抽乾，加入 99.5% 酒精並加熱至 65°C 使脂質混合物成液態，再加入含 8 mg/ml cDDP 之生理食鹽水，以水浴式超音波震盪使微脂體形成。利用濾膜擠壓方式控制微脂體粒徑分布，並以膠體過濾層析方式移除未包覆的藥物，可得到雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 (附圖五)。粒徑大小約為 150 nm，其 Ce6 包覆率約為 84.8%，cDDP 包覆率約為 17.7% (表一)。同時我們也以此方式製作僅包覆單一藥



物之 PL-Ce6 或 PL-cDDP 進行比較，結果顯示 PL-Ce6 和 PL-cDDP-Ce6 粒徑大小類似，約為 150 nm 左右，而 PL-cDDP 粒徑略小，約為 130 nm 左右。而 PL-Ce6 和 PL-cDDP-Ce6 之 Ce6 包覆率類似，約為 87%，PL-cDDP 之 cDDP 包覆率略低於 PL-cDDP-Ce6，約為 15.1%。

雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 保存於 4°C 之穩定性

為了解所建構之雙效微脂體於 4°C 環境保存的穩定性，我們將新鮮製備之 PL-cDDP-Ce6 避光並冷藏保存於 4°C 冰箱中，間隔不同天數取出並移除微脂體外 Ce6 及 cDDP，檢測微脂體內藥物包存量，以計算各時間點藥物滲漏情況，並觀察微脂體粒徑是否因保存時間而改變。由表二可知，PL-cDDP-Ce6 保存於 4°C 並無明顯藥物滲漏情況，即使保存至第 60 天 Ce6 及 cDDP 也均僅滲漏出約 12%，而粒徑到第 60 天也依然維持 150 nm，沒有因保存時間延長而改變，顯示 PL-cDDP-Ce6 保存於 4°C 大致穩定。

3.1.2 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 之細胞毒殺效果

為了解所建構之 PL-cDDP-Ce6 是否具備增進治療效力之作用，我們先以腫瘤細胞株作初步毒殺效果檢測。我們採用三株不同腫瘤細胞，包含人類黑色素瘤細胞 A375、人類肺腺癌細胞 A549 及小鼠大腸癌細胞 C26。將藥物和腫瘤細胞培養 2 小時後移除藥物，接著以 662 nm 雷射光源照光 0.1 J/cm^2 ，激發光感物質 Ce6 產生光動力作用，並於隔日後利用 MTT assay 檢測細胞毒殺效果。結果如圖一所示，加入 PL-cDDP、PL-Ce6、PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 和細胞培養但不照光時，皆不會對腫瘤細胞產生毒性；但以 662 nm 光源照射後，除了未含光感物質 Ce6 之 PL-cDDP 組，其餘各組均因 Ce6 之光動力效應而對腫瘤細胞產生破壞，影響其生存率。其中 PL-cDDP-Ce6 呈現最佳腫瘤細胞毒殺效果，顯示

PL-cDDP-Ce6 除具光動力治療之作用外，還因其內包覆有化療藥物 cDDP 而更加提升整體效果。



3.1.3 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於 C26 小鼠腫瘤模式之治療

雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於植有 C26 腫瘤的 BALB/c 小鼠之藥物分佈檢測

為了將此雙效型微脂體 PL-cDDP-Ce6 應用於活腫瘤治療，因此首先須確認 PL-cDDP-Ce6 於動物體內之藥物分佈情況，以釐清此藥物劑型於活體應用之特性，藉此作為之後治療條件設計的依據。我們於 BALB/c 小鼠右上背以皮下注射植入 C26 小鼠大腸癌細胞。在腫瘤體積生長至 100 mm^3 時，尾部靜脈注射入 PL-cDDP-Ce6，並於不同時間點犧牲老鼠，採集血液後取出腫瘤、肝、脾、肺、腎等組織器官，萃取出血液及組織中藥物後，以螢光分析其中 Ce6 含量，而 cDDP 的含量則利用 diethyldithiocarbamate (DDTC) 和其分子內所含的鉑作用，產生具光波長 254 nm 吸收的衍生物，以 HPLC 分析。各組織藥物分布量如表三所示，在 PL-cDDP-Ce6 靜脈注射入老鼠體內後，首先可以在第二小時血液樣本中，觀察到大量 Ce6 及 cDDP 存在，隨著注射入時間延長，Ce6 及 cDDP 在血中的含量大幅降低，逐漸分布於組織器官。在此同時，我們觀察到在腫瘤部位的 Ce6 及 cDDP 的累積量隨著注射入時間延長而顯著增加，第 12 小時達到最大累積量，並且持續到 24 小時後累積量才逐漸下降(表三)。由於微脂體在體內主要會被網狀內系統所清除，所以除了腫瘤外，此兩種藥物在肝臟及脾臟也有較大累積量。此結果表示 PL-cDDP-Ce6 這種微脂體劑型，確實能載送 Ce6 及 cDDP 至腫瘤累積，而肝臟由於是體內主要藥物代謝器官，因此也會有較多藥物分佈。

雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 C26 腫瘤的 BALB/c 小鼠治療效果



檢測

由上述藥物分布之結果得知，給藥後第 12 小時腫瘤部位會達到最大藥物累積量，而先前實驗室以 PL-Dox-Ce6 對小鼠腫瘤進行治療 [106] 多採取給藥後第 2 小時照光之治療流程，因此首先我們將比較，於給藥後第 2 或第 12 小時對腫瘤部位照光之療效差異，以找出 PL-cDDP-Ce6 適合之治療程序。我們於 BALB/c 小鼠右上背以皮下注射植入 C26 小鼠大腸癌細胞。在腫瘤體積生長至 100 mm^3 時，尾部靜脈注射入 PL-cDDP-Ce6，並分別在給藥後第 2 或第 12 小時以 662 nm 光源對腫瘤部位進行照光 100 J/cm^2 ，持續觀察小鼠腫瘤生長速度及存活情況。結果顯示(圖二 C)，實驗之各組均沒有明顯體重下降現象，代表此治療操作不會產生嚴重影響小鼠健康之副作用。第 2 或第 12 小時照光之療效沒有顯著差異，不管是腫瘤生長之大小變化(圖二 A)或小鼠存活情況(圖二 B)，兩組均十分相似。此一結果和我們先前對 PL-Dox-Ce6 之研究相同 [107]，可能由於注射雙效微脂體後的第 2 小時進行光動力治療，有助於血液中藥物累積至腫瘤，因此即使此時 Ce6 累積量比 12 小時少，而使光動力治療效力較弱，但因增加血液中後續累積至腫瘤之 Dox 量，而產生更強化療作用，最後導致第 2 或第 12 小時照光之療效無明顯差異。由實驗室先前研究結果中得知，於注射 PL-Dox-Ce6 後的第 2 小時進行光動力治療，將有助於血液中藥物累積至腫瘤，並提升第 12 小時腫瘤內藥物分佈量。以一次投藥後，在第 2 小時及第 12 小時分別進行光動力治療，能加強腫瘤治療效果 [107]。而 PL-cDDP-Ce6 在藥物分布和初步療效測試中呈現和 PL-Dox-Ce6 十分類似之結果，所以在後續研究我們將採用先前所發展的一次投藥兩次照光治療方式。

為確認雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 是否能在光動力作用後，加速包覆於水層之化療藥物 cDDP 的釋放，達到更有效的腫瘤治療成效，而非只是單純光動力效應加上化療藥物治療的結果，所以接下來我們在活體動物實驗中使用 PL-Ce6、

PL-cDDP 及 PL-Ce6 + PL-cDDP 與 PL-cDDP-Ce6 比較對於腫瘤的治療效果。實驗以一次投藥兩次照光的腫瘤治療方式，於靜脈注射入 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 及第 12 小時，均進行 662 nm 光源 100 J/cm^2 的光動力治療，觀察對小鼠腫瘤生長速度及存活情況的影響。此次實驗共分為五組：(1) 0.9% NaCl (控制組)，(2) PL-cDDP，(3) PL-Ce6，(4) PL-Ce6 + PL-cDDP，(5) PL-cDDP-Ce6，每組共 6 隻小鼠。體重觀測結果(圖三 C)，各組與控制組相比並無明顯的體重變化，代表各組均無明顯毒性，並不會對小鼠造成太大負擔。檢視小鼠腫瘤生長情況，如圖三 A 顯示各實驗組的小鼠，PL-cDDP 與 PL-Ce6 這兩組在腫瘤治療上沒有太顯著治療效果，PL-Ce6 + PL-cDDP 組別相較於只有 PL-cDDP 或 PL-Ce6 治療，呈現更有效的結果，顯示結合光動力治療及化療的結合治療能有效提升治療效果，但在與 PL-cDDP-Ce6 比較後，PL-cDDP-Ce6 組別還是能最有效的能抑制腫瘤生長並完全消除小鼠腫瘤。在生存率觀察上(圖三 B)，本次實驗的各組中，以 PL-cDDP-Ce6 進行第 2 及第 12 小時照光，能對腫瘤達到最好治療效果，延長所有小鼠存活達 60 天以上，並且已完全治癒這些小鼠的腫瘤，直到實驗結束的第 60 天仍無復發跡象。這樣的結果顯示，PL-Ce6 + PL-cDDP 和 PL-cDDP-Ce6 均同時結合 Ce6 光動力治療的快速毒殺，及化療藥物 cDDP 的生長抑制，因而能有較好治療效益。但其中 PL-cDDP-Ce6 的治療成效仍然優於 PL-Ce6 + PL-cDDP 的組別，可能是因為 PL-cDDP-Ce6 經光照後能促使 cDDP 釋放，改善藥物釋放緩慢的情況，所以在治療初期快速將腫瘤清除，達到完全治癒的效果；而 PL-Ce6 + PL-cDDP 雖然也結合光動力治療及化學治療，但可能因 cDDP 無法於腫瘤部位快速釋放，所以不能及時將腫瘤徹底清除。

雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對較大腫瘤之治療成效

由於一般化療藥物對於較大腫瘤的治療效果往往不彰，而必須提升藥物濃度或反覆持續治療，容易造成嚴重副作用或藥物抗性。另外在光動力治療也會因為

光穿透受限，影響在較大腫瘤之治療效果，導致較深層的腫瘤細胞無法接收足夠的光激發光感物質，使腫瘤細胞啟動修復機制而存活下來，可能造成腫瘤復發。接下來我們欲檢測雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 是否能對較大的腫瘤一樣能達到有效治療，所以將實驗起始的腫瘤大小從 100 mm^3 提升至 300 mm^3 ，於靜脈注射入 PL-cDDP-Ce6 後，第 2 及第 12 小時均進行 662 nm 光源 100 J/cm^2 的光動力治療，觀察對小鼠體重、腫瘤生長速度及存活情況的影響。此次實驗共分為三組：(1) 0.9% NaCl (控制組)，(2) PL-Ce6 + PL-cDDP，(3) PL-cDDP-Ce6，每組共 6 隻小鼠。體重觀測結果(圖四 C)，實驗之各組均沒有明顯體重下降現象，代表此治療操作不會對小鼠造成太大負擔，不會產生嚴重影響小鼠健康之副作用。檢視小鼠腫瘤生長情況(圖四 A)，PL-Ce6 + PL-cDDP 因為結合光動力治療及化療的結合治療，能顯著抑制腫瘤生長，但與 PL-cDDP-Ce6 相比，雙效微脂體組別依然能最有效抑制腫瘤生長，並完全消除小鼠腫瘤。在生存率觀察上(圖四 B)，以 PL-cDDP-Ce6 進行第 2 及第 12 小時照光，能對腫瘤達到最好治療效果，延長所有小鼠存活達 60 天以上，並且已完全治癒這些小鼠的腫瘤，直到實驗結束的第 60 天仍無復發跡象。

在起始腫瘤大小為 300 mm^3 時，PL-cDDP-Ce6 在一次投藥，兩次照光下能達到完全清除腫瘤的治療效果，接著我們將起始腫瘤大小提升至 500 mm^3 ，觀察 PL-cDDP-Ce6 對於大腫瘤之療效，以更加了解此雙效微脂體之發展潛力。由於起始腫瘤較大，本實驗在固定 Ce6 使用劑量(1.75 mg/kg)之前提下，提高 cDDP 劑量為 $3.83, 4.75, 5.71\text{ mg/kg}$ ，想了解在有限的光動力治療效果下，是否能因有更多化療藥物持續作用，而對光動力效果不充足的部分腫瘤組織也產生良好療效。每種劑量之下分為三組：(1) 0.9% NaCl (控制組)，(2) PL-Ce6 + PL-cDDP，(3) PL-cDDP-Ce6，每組共 6 隻小鼠。體重觀測結果(圖五)，實驗之各組均沒有明顯體重下降現象，代表在此 cDDP 使用劑量範圍下，均不會對小鼠造成嚴重影響健康之副作用。檢測腫瘤治療效果(圖五)，在 PL-Ce6 + PL-cDDP 及 PL-cDDP-Ce6

組別，隨著其中 cDDP 濃度的提升，都能顯著抑制腫瘤生長。比較 PL-Ce6 + PL-cDDP 及 PL-cDDP-Ce6 組別，在這兩組在相同 cDDP 濃度下，PL-cDDP-Ce6 組別的腫瘤抑制能力皆優於 PL-Ce6 + PL-cDDP，甚至在 cDDP 濃度提高至 5.71 mg/kg 之 PL-cDDP-Ce6 治療下，能完全消除小鼠腫瘤(圖五 C)，顯示雙效型微脂體 PL-cDDP-Ce6 在對於大小達到 500 mm^3 之腫瘤，依然能達到相當好的治療成效。分別觀察小鼠的生存率 (圖五)，結果顯示的確會隨著 PL-cDDP-Ce6 中 cDDP 濃度的提升，而顯著增加罹癌小鼠的存活率，在 cDDP 濃度提高至 5.71 mg/kg 之 PL-cDDP-Ce6 治療下，能延長所有小鼠存活達 60 天以上，並且已完全治癒這些小鼠的腫瘤，直到實驗結束的第 60 天仍無復發跡象。此結果也表示，雖然光動力治療對於體積較大的腫瘤，因光穿透不足的關係而受到限制，無法有效治療，但藉由釋放微脂體中的化學治療藥物，將能對深層殘存之腫瘤產生良好清除效力，使 PL-cDDP-Ce6 在較大之腫瘤也能達到應用。

3.2 雙效微脂體機制探討

綜合上述實驗和以往研究成果，我們已知不論是包覆 cDDP 之 PL-cDDP-Ce6 或包有 Dox 之 PL-Dox-Ce6，雙效微脂體均呈現十分良好的腫瘤治療效果，但其作用機制目前尚不清楚。因此接下來的實驗我們將探討，雙效微脂體是否真能如同我們所預期，在照光激發光感物質產生光動力作用後，對微脂體脂雙層造成氧化破壞，而加速其內化療藥物釋出。並藉由了解雙效微脂體經光動力治療後，活體內藥物分布的改變，以更加釐清其增強療效之確實機制。

3.2.1 雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 作用機制

經光動力作用後 PL-Dox-Ce6 粒徑變化

由於雙效微脂體的設計，是希望光動力作用能對微脂體產生一定程度的破壞，因此我們首先檢測 PL-Dox-Ce6 在經過光動力作用後粒徑大小之改變，以了解是否對微脂體產生影響。實驗結果顯示(圖六)，PL-Dox-Ce6 經過光照使其內 Ce6 產生光動力作用後，粒徑大小一開始並無明顯變化，和照光前類似約為 155 nm，約 1 小時之後開始上升至 190~200 nm，而 6 小時後又降回至 164 nm，並維持在此粒徑大小。粒徑多分散性指數(polydispersity index)代表微脂體顆粒大小分布的均勻情況，顆粒大小越均一數值越小，越不均勻數值則越大 [109]。實驗結果呈現粒徑多分散性指數在照完光後立即上升，持續至約 6 小時才逐漸下降恢復穩定。此結果顯示，經光動力作用後，會對 PL-Dox-Ce6 微脂體脂質的排列造成改變，使微脂體粒徑大小分布變得較不均一，並有顆粒增大之趨勢，直至 6 小時後才漸漸恢復。

經光動力作用後 PL-Dox-Ce6 內 Dox 釋放變化

上述實驗得知光動力作用會對 PL-Dox-Ce6 產生影響，而為了解此影響是否能如我們所預期，加速其內化療藥物釋放，我們將檢測 PL-Dox-Ce6 在照光後的 Dox 釋放情況。我們在製作 PL-Dox-Ce6 時，加入不同量的 Ce6 (0.1、0.15、0.2 mg)，建構出包覆有不同量光感物質之 PL-Dox-Ce6，希望藉此了解不同強度光動力作用對 Dox 釋放的影響，並釐清光感物質 Ce6 在此雙效微脂體中所扮演的角色。我們首先檢測了加入不同 Ce6 (0.1、0.15、0.2 mg)所製作之雙效微脂體藥物包覆情況，結果如表四所示，隨著加入 Ce6 量增加，微脂體粒徑大小會略為提升，而 Ce6 本身的包覆率並不會有明顯的變化，但 Dox 的包覆率卻會受到 Ce6 加入量的不同而有所影響，隨著 Ce6 的增加 Dox 的包覆率會明顯下降，顯示 Ce6 存在於微脂體脂雙層中，將可能干擾 Dox 藉由硫酸銨梯度所進行的主動包覆。接著我們檢測這些加入不同 Ce6 所製成的 PL-Dox-Ce6，在經過光照使 Ce6 產生光動力作用後 Dox 釋放的情況，實驗結果如圖七所示，PL-Ce6 + PL-Dox 組在各種

Ce6 量下，經光照後均不會有 Dox 釋放增加的情況。而 PL-Ce6-Dox 則會因光照而提升其內 Dox 釋放，並隨著包覆 Ce6 量的增加，產生更強光動力作用，使更多 Dox 由微脂體中釋出。這樣的實驗結果顯示，光動力效應確實會影響光感物質所存在之微脂體，促使其內包覆物漏出，但卻不會對旁邊另外的微脂體產生作用，所以若將光感物質和化療藥物包覆於不同微脂體(PL-Ce6 + PL-Dox 組)，將不會改變其照光後藥物釋放。在此實驗中，Dox 呈現兩階段釋放，顯示剛照完光時，會因光動力對微脂體破壞立即釋出較大量的藥物，而其後可能已造成微脂體不穩定，因此仍持續有藥物由微脂體中緩慢釋出。另外在 PL-Dox-Ce6 無照光的組別有觀察到，隨著 Ce6 的添加，可能造成微脂體無法穩定包覆 Dox，而使較多 Dox 由微脂體中釋出，所以增加 Ce6 雖然能在照光後產生較強光動力作用，使較多 Dox 釋出，達到改善 PL-Dox 藥物釋放緩慢的問題，但也造成其 Dox 包覆率下降，並影響微脂體本身穩定性，因此日後 PL-Dox-Ce6 的發展，須依使用需求，在此特性間進行取捨，以調整出較合適的 Ce6 包覆量。

經光動力作用後 PL-Dox-Ce6 於體內分布之改變

上述實驗已證實 PL-Dox-Ce6 在光動力作用後，能加速其內 Dox 釋放，因此接下來我們想知道，在實際治療時這樣的藥物釋放會對活體內整體的藥物分布產生什麼改變。因此我們將檢測以靜脈注射給予 PL-Dox-Ce6 後，第 2 小時對腫瘤進行照光(662 nm , 100 J/cm^2)，之後觀察 Ce6 及 Dox 在不同組織的分布情況。結果顯示(圖八)，在經過光動力治療後會明顯提高藥物於腫瘤的累積量，並持續至 48 小時仍有較高量藥物存在於腫瘤組織中。而心臟、肝臟及脾臟之藥物累積情況，相較於未進行光動力治療時，有較快藥物清除現象，其餘組織則沒有太大差異。分析小鼠血液及組織藥物濃度對時間曲線下面積(AUC)，結果如表五，發現 Ce6 及 Dox 在腫瘤內累積量於照光後均提升 2 倍左右，而血液、肝臟及脾臟則有較顯著累積下降情況。將各部位累積量加總後，藥物總量在有無照光的兩組大致

相同，顯示光動力治療是藉由改變藥物分布狀態，來提升於腫瘤的累積。而 Ce6 總量在照光組稍微下降，可能是由於照光使 Ce6 產生 photobleaching 現象，影響之後螢光偵測的定量。腫瘤部位在照光後增加藥物累積量的結果，符合文獻及實驗室之前的研究 [107, 110]，可能由於光動力治療對腫瘤部位血管的破壞，使更多血液中的藥物滲入腫瘤組織，因此使 PL-Dox-Ce6 治療效果提升。而心臟、肝臟及脾臟之藥物清除加快，代表化療藥物對這些組織的傷害將減低，有利於 PL-Dox-Ce6 的使用安全性。進一步比較照光與否對 Ce6 及 Dox 藥物動力學參數的影響(表六)，發現照光後 Ce6 及 Dox 半衰期($T_{1/2\beta}$)均縮短，且清除率上升，藥物在體內的平均存留時間(MRT)略為下降，這些結果應該代表 PL-Dox-Ce6 經過光照後微脂體變得較不穩定，而使藥物較快被清除。藥物的分布體積(Vd)在照過光的組別稍微提升，顯示經過光照後有部分藥物不隨微脂體局限於血液中，而分部至體內其他部位。

經光動力作用後 PL-Dox-Ce6 於腫瘤細胞核內分布之改變

Dox 會藉由嵌入 DNA 抑制 topoisomerases 來產生細胞毒性，因此細胞核是 Dox 在細胞內最主要的作用位置 [111]，以顯微鏡觀察也發現，Dox 主要會累積於細胞核中 [106, 112-114]，所以位在細胞核內的 Dox 可視為整體腫瘤組織中具有藥物活性的部分 [108]。另外藉由長效型微脂體穩定包覆之 Dox，除了藥物不易釋放之外，常會因微脂體表面接上 PEG 基團，阻礙微脂體內 Dox 進入細胞 [41, 42]，使得 PL-Dox 即使累積在腫瘤組織，Dox 也無法順利進入腫瘤細胞核中作用。基於以上原因，我們將偵測 PL-Dox-Ce6 經光動力治療後，腫瘤組織細胞核內 Dox 的累積清況，一方面了解在實際治療時，PL-Dox-Ce6 經光動力作用後，是否會加速其內 Dox 釋出，而使更多 Dox 進入細胞核內累積，另一方面也釐清這現象是否就是 PL-Dox-Ce6 有較好療效的原因。因此我們以靜脈注射給予藥物後，第 2 小時進行光動力治療，並於第四小時取出腫瘤分離出細胞核，同時檢測

整體腫瘤組織及腫瘤組織細胞核內 Dox 量，比較 PL-Ce6 + PL-Dox 治療組及 PL-Dox-Ce6 治療組之差異。實驗結果如圖九所示，不論是 PL-Ce6 + PL-Dox 組或 PL-Dox-Ce6 組，在經過光動力治療後，因都具有對血管的破壞，所以都會增加 Dox 在整體腫瘤組織中的累積量(圖九 A)，此一結果符合圖八及文獻的研究 [110]。但當我們分離出細胞核並分析其內藥量後則發現，相較於 PL-Ce6 + PL-Dox 組，PL-Dox-Ce6 組經光動力治療後能更大量的提升細胞核內 Dox 量。此結果和我們先前在 *in vitro* 細胞實驗中，以顯微鏡觀察到 PL-Dox-Ce6 經照光後能加速 Dox 進入細胞核之現象類似 [115]，不僅表示在實際活體治療時，PL-Dox-Ce6 經光動力作用也能加速其內 Dox 釋出，所以才有利於 Dox 大量進入細胞核中累積，更解釋了這一促進藥物釋放且加速 Dox 進入細胞核的現象，就是 PL-Dox-Ce6 治療效果優於 PL-Ce6 + PL-Dox 的主要原因。

3.2.2 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 作用機制

經光動力作用後 PL-cDDP-Ce6 粒徑變化

由於經光動力作用後，會對 PL-Dox-Ce6 微脂體脂質的排列造成影響，使其粒徑大小產生變化，但是還不清楚此現象是否也會發生在包覆其他藥物之雙效微脂體。因此我們將檢測包覆另一化療藥物 cDDP，以另外方式製成之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6，在經過光動力作用後粒徑大小之改變，以了解是否對包覆另外藥物之雙效微脂體也能產生影響。實驗結果顯示(圖十)，PL-cDDP-Ce6 經過光照使其內 Ce6 產生光動力作用後，粒徑大小變化情況和 PL-Dox-Ce6 (圖六)類似，一開始並無明顯改變約為 131 nm，1 小時之後開始顯著上升至 150 nm 左右，而 6 小時後又降回至 134 nm 左右，並維持在此粒徑大小。多分散性指數也呈現在照完光後立即上升，1 小時後開始下降之結果。上述實驗代表經光動力作用後，也會對 PL-cDDP-Ce6 微脂體脂質的排列造成改變，使微脂體粒徑大小分布變得較

不均一，並有顆粒增大之趨勢，直至 6 小時後才漸漸恢復。PL-Dox-Ce6 和 PL-cDDP-Ce6 所呈現的結果十分類似，顯示光動力作用在包覆不同藥物之雙效微脂體，應會產生相似作用。



經光動力作用後 PL-cDDP-Ce6 內 cDDP 釋放變化

由於 PL-Dox-Ce6 和 PL-cDDP-Ce6 在經光動力作用後，粒徑的變化十分相似，因此也將探討 PL-cDDP-Ce6 是否也能如我們所預期，加速其內化療藥物釋放。我們同樣在製作 PL-cDDP-Ce6 時，加入不同量的 Ce6 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.4 mg)，建構出包覆有不同量光感物質之 PL-cDDP-Ce6，希望藉此了解不同強度光動力作用對 cDDP 釋放的影響，同時釐清光感物質 Ce6 在此 PL-cDDP-Ce6 中所扮演的角色。我們首先檢測了加入不同 Ce6 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.4 mg) 所製作之 PL-cDDP-Ce6 藥物包覆情況，結果如表七所示，隨著加入 Ce6 量增加，微脂體粒徑大小及 Ce6 的包覆率並不會有明顯的變化，但 cDDP 的包覆率卻會受到 Ce6 加入量的不同而有所影響，隨著 Ce6 的增加 cDDP 的包覆率會逐漸提升，顯示可能因 Ce6 帶有負電性，吸引溶解後具正電性之 cDDP，而略為增加其被包入微脂體的量。接著我們將包有不同 Ce6 量之 PL-cDDP-Ce6 置於 80% FBS 中，於 37°C 培養，不同時間取出分析微脂體內藥物留存量，以了解 Ce6 的加入是否會影響 PL-cDDP-Ce6 在類似體液環境之中的穩定性。實驗結果顯示，不論是 Ce6 (圖十一)還是 cDDP (圖十二)在微脂體中的留存比率，均不會受到 Ce6 加入量的改變而有所變動，代表 Ce6 加入量在此範圍內並不會對 PL-cDDP-Ce6 的穩定情況產生影響。最後我們檢測這些加入不同量 Ce6 所製成的 PL-cDDP-Ce6，在經過光照使 Ce6 產生光動力作用後 cDDP 釋放的情況。實驗結果如圖十三所示，相較於不照光的組別，PL-cDDP-Ce6 會因光照而提升其內 cDDP 釋放，並隨著包覆 Ce6 量的增加，產生更強光動力作用，使更多 cDDP 由微脂體中釋出。PL-cDDP-Ce6 和 PL-Dox-Ce6 (圖七)得到類似的實驗結果，顯示光動力效應確實

會影響光感物質所存在之微脂體，即使其內包有不同藥物，均能促使所包覆物漏出。而 PL-cDDP-Ce6 內的 cDDP 釋放也同樣呈現兩階段，在剛照完光時會因光動力對微脂體破壞短時間內釋出較大量的藥物，而其後造成微脂體不穩定，使其內藥物持續由微脂體中緩慢釋出。

經光動力作用後 PL-cDDP-Ce6 於體內分布之改變

上述實驗已證實 PL-cDDP-Ce6 在光動力作用後，如同 PL-Dox-Ce6 一樣能加速其內化療藥物釋放，而接下來我們也將釐清，在實際活體治療時 PL-cDDP-Ce6 經光動力作用後會對藥物分布產生什麼改變。因此我們將檢測以靜脈注射給予 PL-cDDP-Ce6 後，第 2 小時對腫瘤進行照光(662 nm, 100 J/cm²)，之後觀察 Ce6 及 cDDP 在不同組織的分布情況。結果顯示(圖十四)，在經過光動力治療後，會明顯提高藥物於腫瘤的累積量，並持續至 48 小時仍有較高量藥物存在於腫瘤組織中。而血漿或其餘組織，相較於未進行光動力治療時，則呈現沒有太大差異或略為加快藥物清除的現象。分析小鼠血液及組織藥物濃度對時間曲線下面積(AUC)，結果如表八，發現經過照光後，腫瘤內 Ce6 累積量提升約 1.4 倍，cDDP 累積量提升 2.6 倍左右，血液、肝臟及脾臟兩藥物累積量略為下降，而腎臟內 cDDP 在照光後則稍微上升。將各部位累積量加總後，藥物總量在有無照光的兩組大致相同，顯示光動力治療是藉由改變藥物分布狀態，來提升於腫瘤的累積。而 Ce6 總量在照光組稍微下降，可能是由於照光使 Ce6 產生 photobleaching 現象，影響之後螢光偵測的定量。進一步比較照光與否對 Ce6 及 cDDP 藥物動力學參數的影響(表九)，發現照光後 Ce6 及 cDDP 半衰期($T_{1/2 \beta}$)均縮短，清除率稍微上升，藥物在體內的平均存留時間(MRT)則無太大變化，這些結果代表經過光照後微脂體變得較不穩定，而使藥物較快被清除。cDDP 的分布體積(Vd)在照過光的組別上升，顯示經過光照後藥物分佈至體內更廣部位。以上結果和 PL-Dox-Ce6 類似，顯示即使雙效微脂體內部包覆不同化療藥物，依然能藉光動力治療對腫瘤部位血

管的破壞，增加藥物累積量，進而使治療效果提升。其餘組織之藥物清除速度加快，則更有利於雙效微脂體的安全應用。



綜合以上實驗結果，我們可以知道不論是包覆 Dox 或 cDDP 之雙效微脂體，在實際應用時均能藉光動力作用，(1) 造成微脂體不穩定，使更多化療藥物加速在腫瘤部位釋出，以利於進入細胞內作用產生毒性；(2) 對腫瘤部位血管破壞，使更多血液中藥物進入腫瘤組織間隙累積。最後致使對腫瘤的治療效力明顯提升。

3.3 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於人類惡性周邊神經鞘瘤之應用

為了使雙效微脂體的發展能更進一步應用於人類腫瘤治療，我們選擇目前除手術外，並無較佳治療方式之惡性周邊神經鞘瘤(MPNST)，作為我們的研究目標，嘗試利用雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對此種腫瘤進行治療，希望未來能彌補手術上的不足，將雙效微脂體應用於人類腫瘤治療。

3.3.1 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST 腫瘤細胞之毒殺效果

為了解 PL-cDDP-Ce6 對是否能應用於人類惡性周邊神經鞘瘤之治療，我們首先以 MPNST 腫瘤細胞株，進行初步毒殺效果檢測。採用 S462-TY、ST8814、T265 三株不同 MPNST 腫瘤細胞，將藥物和腫瘤細胞培養 2 小時後移除藥物，接著以 662 nm 雷射光源照光 0.1 J/cm^2 ，激發光感物質 Ce6 產生光動力作用，並於隔日後利用 MTT assay 檢測細胞毒殺效果。結果如圖十五所示，加入 PL-cDDP、PL-Ce6、PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 和細胞培養但不照光時，皆不會對這三株 MPNST 腫瘤細胞產生毒性；但以 662 nm 光源照射後，除了未含光感物質 Ce6 之 PL-cDDP 組，其餘各組均因 Ce6 之光動力效應而對腫瘤細胞

產生破壞，略為降低其細胞存活率。而相較於其他各組，PL-cDDP-Ce6 呈現最佳腫瘤細胞毒殺效果，顯示 PL-cDDP-Ce6 對於 MPNST 腫瘤細胞，也能藉加速 cDDP 釋放而更加提升治療效果。



3.3.2 雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST 小鼠腫瘤模式之治療

在確認 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST 腫瘤細胞依然能夠顯現良好毒殺效力後，我們將進一步檢測其對於 MPNST 活體腫瘤的治療能力。因此我們將 MPNST 腫瘤細胞 S462-TY 植入 NU/NU 裸鼠皮下，建立 MPNST 小鼠腫瘤模式，用來檢測雙效微脂體對於 MPNST 活體腫瘤之療效。

cDDP 及 PL-cDDP 治療效果檢測

為了掌握化療藥物 cDDP 在 MPNST 小鼠腫瘤模式之治療效力及適用劑量範圍，我們首先檢測不同劑量 cDDP (3.5, 7, 10.5 mg/kg) 對植有 S462-TY 裸鼠之療效，待 S462-TY 腫瘤生長至 100 mm^3 時，以靜脈注射方式注入 cDDP 及 PL-cDDP，比較 cDDP 經微脂體包覆前後之效果差異。實驗結果發現(圖十六)，給予 cDDP 後小鼠有體重下降的情況，而且當使用到最高 10.5 mg/kg 的劑量時，5 隻小鼠中有 1 隻於治療後隔日死亡，應是 cDDP 對正常組織產生毒性之副作用所致。而以 PL-cDDP 進行治療，則因微脂體包覆而減少對正常組織的傷害，所以體重下降情況相對較少。經治療後，不論 cDDP 或 PL-cDDP 組別均隨使用劑量增加，而提升腫瘤生長的抑制效果，並略為延長小鼠存活時間。整體而言，cDDP 治療效力較 PL-cDDP 強，但對正常組織傷害也較 PL-cDDP 嚴重，而兩者使用至最高 10.5 mg/kg 的劑量時，也僅能在治療初期延緩腫瘤生長，並無法對 S462-TY 腫瘤有效清除。

PL-cDDP-Ce6 治療效果檢測



已知 cDDP 使用劑量提高將造成小鼠不良負擔，因此在使用雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療時，我們固定 cDDP 劑量為前次測試不論 cDDP 或 PL-cDDP 組別均無明顯體重下降之最低劑量(3.5 mg/kg)，希望藉由逐步提高 Ce6 使用劑量($1, 1.25, 1.5 \text{ mg/kg}$)增加光動力效果，來提升治療效力。實驗結果如圖十七所示，經過 PL-cDDP-Ce6 治療之各實驗組與控制組相比並無明顯的體重變化，代表各組均無明顯毒性，並不會對小鼠造成太大負擔。而隨著 Ce6 使用劑量增加，對腫瘤生長的抑制效果也會有所提升，並完全清除部分小鼠的腫瘤，特別是當使用至 1.5 mg/kg Ce6 時，能完全清除組內所有小鼠之腫瘤，直到實驗結束時(90 天)，均沒有腫瘤復發的現象。代表 PL-cDDP-Ce6 能在較低較安全之 cDDP 劑量下，藉由提升 Ce6 使用量來提升治療效力，並對 MPNST 小鼠腫瘤模式達到良好治療。

在找到安全且合適之 PL-cDDP-Ce6 使用劑量，應用於 MPNST 小鼠腫瘤模式後，我們接著比較此劑量下 PL-Ce6 + PL-cDDP 和 PL-cDDP-Ce6 治療是否有差異，以了解對於 MPNST 腫瘤，雙效微脂體是否也能因加速其內化療藥物釋放，而更加提升治療效益。結果發現(圖十八)，在 Ce6: 1.5 mg/kg , cDDP: 3.5 mg/kg 之劑量下，PL-cDDP-Ce6 依然能完全清除組內所有小鼠的腫瘤，而 PL-Ce6 + PL-cDDP 治療僅能抑制 S462-TY 腫瘤生長，約至 20 天後腫瘤又重新開始快速增長，這樣顯示 PL-cDDP-Ce6 在 MPNST 腫瘤應該也能藉由加速其內 cDDP 釋出，而使得治療效果有所提升。此次實驗在治療後我們同時採集小鼠血液，觀察血漿中 sAxl 濃度，作為 MPNST 腫瘤除了大小量測外，另一監測腫瘤生長的依據。檢測結果發現(圖十八 D)，腫瘤大小和血漿中 sAxl 濃度呈現正相關，未經治療的控制組 sAxl 濃度隨腫瘤增大而快速上升，PL-Ce6 + PL-cDDP 治療組則是在腫瘤重新恢復增長後，於 24 天左右開始有所提升，PL-cDDP-Ce6 治療因為能將腫瘤

完全清除，所以並無觀察到血漿中之 sAxl。這樣一方面證實 PL-cDDP-Ce6 治療後沒有腫瘤復發之跡象，另一方面也代表量測血漿中 sAxl 能作為 PL-cDDP-Ce6 在實際 MPNST 腫瘤治療時，治療成效之觀察依據。



現階段臨床對於 MPNST 腫瘤的治療，還是以手術切除為主，然而體積較大的腫瘤將增加手術的困難。而我們先前在 C26 小鼠腫瘤模式中，發現 PL-cDDP-Ce6 對 500 mm^3 的較大腫瘤也能呈現良好療效(圖五)，所以在此我們將嘗試，對於體積較大的 MPNST 腫瘤是否也能產生一定影響，以了解 PL-cDDP-Ce6 的治療是否能成為手術外的另一替代方式，彌補治療上的不足。本次實驗我們等 S462-TY 腫瘤生長至 1000 mm^3 時，才開始以 PL-cDDP-Ce6 進行治療，實驗結果發現(圖十九)，隨 cDDP 使用劑量提升，能延長腫瘤抑制效果，並在使用至 Ce6: 1.5 mg/kg, cDDP: 4.07 mg/kg 之劑量下，能對 60% 小鼠達到腫瘤完全清除的療效，並在實驗的 60 天內並無發現腫瘤復發的情況，顯示 PL-cDDP-Ce6 面對體積很大的 MPNST 腫瘤依然能展現很好效果，有潛力成為手術遭遇困難時的另一治療選擇。

為了更加了解 PL-cDDP-Ce6 使用之安全性及對腫瘤的破壞情況，我們在治療後的 72 小時收集小鼠血液，檢測血液生化指數及觀察全血細胞數目變化，以了解此治療是否對正常組器官造成損傷，並同時採下腫瘤進行切片，以 H&E 染色觀察腫瘤組織經治療後的死亡情況。血液生化指數及全血細胞計數結果如表十及表十一，和控制組相比，經 PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 治療會造成腫瘤組織死亡，因此 lactate dehydrogenase (LDH) 會較高，並使部分免疫細胞有所變動，顯示小鼠體內有一些發炎反應產生，其餘數據均沒有太大差異，代表此治療並不會對其餘器官產生明顯毒性。腫瘤進行切片並以 H&E 染色，結果如圖二十一所示，經過 PL-Ce6 + PL-cDDP 治療後，腫瘤部位出現局部壞死(necrosis)情況(紅色圈處)，顯示此治療造成部分腫瘤組織死亡；而 PL-cDDP-Ce6 治療後，腫瘤組

織則呈現大範圍壞死及空洞的狀況，代表在進行治療後 72 小時，幾乎大部分腫瘤組織均已死亡，並逐漸由此部位清除。



第四章 討論



4.1 雙效微脂體的製備

4.1.1 建構雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6

由於我們建構雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 的目的，就是希望藉光動力作用改善 SPI-077 這種包覆 cDDP 之微脂體的藥物釋放緩慢問題，所以製作 PL-cDDP-Ce6 時，我們參照 SPI-077 的製備方式為基礎 [61]，並稍作修改，加入 Ce6 和脂質混合後一起製成同時包覆兩種藥物之 PL-cDDP-Ce6。由表一結果可以知道，我們以此方式製作的微脂體藥物，會因 Ce6 加入而使粒徑增大，這可能是由於 Ce6 存在於脂雙層中，扮演類似膽固醇的角色 [116]，而此粒徑增大之現象在 PL-cDDP-Ce6 同樣存在 [107]。在藥物包覆效率方面，以此方式製作之 PL-cDDP-Ce6 相較於 PL-Dox-Ce6，有更好的 Ce6 包覆效果，因為製作時加入大量脂質，所以 Ce6 有很多可容納位置，日後若需提升微脂體內 Ce6 含量，應該還有很大增加空間。而 cDDP 的包覆情況和 SPI-077 類似 [61]，由於 cDDP 溶解度低，並且以完全被動之方式進行包覆，所以效率並不理想 [117]。但值得注意的是，cDDP 的包覆效率會因 Ce6 的加入而略微增加(表七)，可能是由於 Ce6 具負電性，能吸引溶解後帶有正電性之 cDDP，而使包覆效果有所提升，這情況和文獻中所提出 [118]，具負電性脂質能增加 cDDP 包覆的結果有些類似，所以日後若希望提升 cDDP 的包覆率，將可朝此方向調整。

4.1.2 脂質及光感物質對雙效微脂體製備的影響

脂質

目前實驗室所建構的雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 及 PL-cDDP-Ce6，脂質的使用及比例上基本相同，均是由 DSPC, Cholesterol 及 DSPE-PEG 所構成，而脂質的選擇主要是根據 PL-dox 及 SPI-077，以建構出穩定的微脂體為目標。由長碳鍊不帶電飽和脂肪酸磷脂質 DSPC，搭配結合有 PEG 之脂質 DSPE-PEG，已被證實能顯著延長微脂體在血液循環的時間 [119]，因此並沒有做太多調整。在實驗室先前的研究中，曾簡單探討膽固醇對雙效微脂體穩定性的影響 [120]，發現在 PL-Dox-Ce6 提高膽固醇含量可以提高 Dox 在血清中的穩定性，使 Dox 較不易由微脂體中滲漏，然而卻會降低 Ce6 在血清中的穩定性；而在 PL-cDDP-Ce6 中提高膽固醇含量，則不影響 Ce6 及 cDDP 兩者於血清中的穩定情況。膽固醇在微脂體中的角色和在細胞膜中相同，具有調節微脂體雙層膜穩定度的功能，當雙層膜處於 gel phase 的時候膽固醇可以是脂質間的中介物質，避免脂質間的排列過於緊密；而當雙層膜處於 liquid phase 時，膽固醇又可限制脂質流動性 [121]，因此能增進微脂體對其內藥物的穩定包覆，所以我們能觀察到提高膽固醇含量會增進 PL-Dox-Ce6 中 Dox 的穩定性。然而也有文獻指出，膽固醇的加入可能會影響疏水性藥物的包覆 [122]，這也和我們 PL-Dox-Ce6 中 Ce6 的血清穩定性類似，可能因 Ce6 和膽固醇在微脂體脂雙層膜中位置相仿，膽固醇加入過多會排擠 Ce6 在脂雙層中可包覆的空間，而使 Ce6 由微脂體中滲漏。另外有文獻曾經提到 [123]，Ce6 在 pH 值較低時其羧基(-COOH)上氫離子不易解離，有較好親脂性，因此在酸性環境中有利於 Ce6 在脂雙層內外層間翻轉(flip-flop)。而 PL-Dox-Ce6 製作時為了以硫酸銨梯度法包覆 Dox，微脂體內部硫酸銨溶液 pH 值較外在環境低，因此可能導致位在脂雙層內層的 Ce6 容易翻轉至外層，而外層的 Ce6 則較不易翻轉至內層，再配合上膽固醇在 gel phase 時避免脂質間的排列過於緊密的特性，最終造成使 Ce6 容易由微脂體漏出的結果。但是在包覆 cDDP 的 PL-cDDP-Ce6 中，由於製作時脂質量較多，脂體脂雙層膜中仍有許多可容納 Ce6 的空間，而且並非以硫酸銨梯度法製成，微脂體內外沒有 pH 值差異，所以在我

們嘗試的膽固醇含量範圍下，並不會影響 Ce6 於血清中的穩定情況。而 cDDP 也因本身不容易通過脂雙層膜，所以改變膽固醇加入量也不影響藥物滲漏的情況。



光感物質

在穩定包覆化療藥物 Dox 或 cDDP 的微脂體中加入光感物質 Ce6，我們觀察到顆粒大小及包覆效率上有所改變(表四，表七)。隨著 Ce6 的增加，不論 PL-Dox-Ce6 還是 PL-cDDP-Ce6 的顆粒大小均會有所提升，只是 PL-cDDP-Ce6 的變化較不明顯。文獻中曾經指出，膽固醇的加入會讓微脂體粒徑增大 [116]，而 Ce6 的結構和膽固醇有些相似，Ce6 一端含三個親水性高的羧基(-COOH)，膽固醇則是一端有一個親水性高的羥基(-OH)，而兩者另一端均有一些平面環狀的疏水性結構，因此 Ce6 和膽固醇在雙層膜可能處於相仿的位置，所以基於上述原因，我們推測顆粒大小的提升，可能是由於 Ce6 扮演了類似膽固醇的角色，使脂雙層便得更堅固，而導致微脂體在藉由濾膜擠壓控制粒徑時顆粒增大。

我們同時發現，Ce6 的增加對 Dox 或 cDDP 的包覆率有很不一樣的影響，在 PL-Dox-Ce6 會阻礙 Dox 的包覆，但在 PL-cDDP-Ce6 却會對 cDDP 的包覆效率有所提升。在 PL-Dox-Ce6 的製作上，Dox 藉由硫酸銨梯度主動包覆入微脂體中，而 Ce6 存在微脂體脂雙層中，可能因：(1) 阻擾 Dox 通過脂雙層進入微脂體；(2) 造成硫酸銨梯度消散，而導致 Dox 的包覆下降。曾有文獻指出，膽固醇加入會干擾藥物通過脂雙層，而使利用 pH 梯度方式包覆 Dox 的微脂體包覆效果下降 [124]，在我們的研究中，Ce6 也有可能扮演類似膽固醇的角色，因而阻擾 Dox 通過脂雙層進入微脂體。另外 Dox 的包覆仰賴微脂體內外的銨離子濃度差，過去研究藉由加入離子載體(ionophore) nonactine 的方式，消散銨離子濃度梯度，證實銨離子濃度差是使 Dox 進入微脂體包覆的主要力量 [125]，而我們製作 PL-Dox-Ce6 時加入的 Ce6，也可能藉類似離子載體的方式，消散所建立的離子

濃度梯度，最終使 Dox 的包覆率下降。而在 PL-cDDP-Ce6 的製備上和 PL-Dox-Ce6 有所不同，cDDP 的包覆採被動方式，因此包覆效率較低，但表七的實驗發現，cDDP 的包覆率會因 Ce6 的加入而略微增加。文獻中曾提出，具負電性的脂質能增加 cDDP 的包覆 [118]，因此我們推測此現象可能是由於 Ce6 具負電性，能吸引溶解後帶有正電性之 cDDP，而使包覆效果有所提升。

綜合上述因素，PL-Dox-Ce6 主要因為製程上採用硫酸銨梯度法，雖然能包覆較多 Dox，但微脂體內外的硫酸銨濃度差，會造成 Ce6 本身包覆率及穩定性下降，並因 Ce6 的加入而使 Dox 較無法穩定且高效率的包入微脂體，在 PL-Dox-Ce6 中再增加 Ce6 的空間不大。而 PL-cDDP-Ce6 雖然因採被動包覆方式，對 cDDP 的包覆率較低，但製作出之微脂體，不論是 Ce6 還是 cDDP 方面的血清穩定性均不錯(圖十一，圖十二)，且 cDDP 的包覆率還會因 Ce6 加入而提升，在 PL-cDDP-Ce6 中應該還有很大的 Ce6 增加空間。因此我認為，就雙效微脂體的製備上而言 PL-cDDP-Ce6 較 PL-Dox-Ce6 更適合日後的發展。

4.2 PL-cDDP-Ce6 用於腫瘤治療

微脂體注射進入血液循環後，容易吸附調理素 opsonin，然後被網狀內皮系統加以清除 [126, 127]。所謂網狀內皮系統是生物體內重要的防禦系統，主要包括了肝臟的 Kupffer's cells、肺的 alveolar macrophages、腎的 mesangial cells、脾臟與淋巴組織的 macrophages 等，所以微脂體中藥物常被觀察到會累積於這些器官。這或許是我們實驗中，將 PL-cDDP-Ce6 注射入老鼠體內後，在肝臟及脾臟有較多藥物累積的原因。而這樣的結果，除了和我們之前所建構包覆 Dox 之雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 類似外，也和 SPI-077 的研究相似 [61]，藉由長效型微脂體的包覆，能延長藥物在血液循環的時間，延緩 cDDP 由腎臟清除，進而保護腎臟不受 cDDP 損傷，減弱其不良副作用。此外由表三結果可發現，Ce6 和 cDDP 並不如預期隨微脂體一同累積於各組織，反而呈現這兩個藥物累積與清除速度略

為不同的現象，可能是因為 Ce6 和 cDDP 這兩個藥物在體內代謝清除之位置與速度本就不同，因而使它們在組織的累積情況有所差異。另外，研究也曾指出，血液中的高密度脂蛋白 (HDL) 會將微脂體的磷脂質移除，破壞微脂體膜的穩定，造成所包覆藥物外漏 [128-130]，可能因此導致 PL-cDDP-Ce6 進入血液循環後其內藥物外漏，而兩種藥物滲漏速度的不同，也會造成兩者在組織中累積或清除速度不一致的現象。

腫瘤藥物累積分析(表三)的結果可以知道，PL-cDDP-Ce6 注射入老鼠體內後的第 12 小時，腫瘤部位有最多藥物累積。但在治療效果檢測上(圖二)，第 12 小時進行光動力治療卻和第 2 小時治療的組別沒有明顯差異。這可能是由於：(1) 前人研究曾經指出，光動力治療除了能直接殺死腫瘤細胞外，還能藉由破壞腫瘤附近血管，使養分及氧氣無法順利輸送至腫瘤部位，而達到抑制癌細胞生長的效果 [131-134]。而血液中藥物分析(表三)顯示，在注射後第 2 小時有最大量藥物分布於血液中，於此時進行照光治療或許能對腫瘤附近血管造成較強破壞，因此即使第 2 小時腫瘤部位並無較多藥物累積，但仍能對腫瘤生長達到有效抑制。(2) 在 100 J/cm^2 的光照劑量下，所能引發的 Ce6 光動力效應已到達極限，所以即便第 12 小時腫瘤有較多藥物累積，仍無法拉開與第 2 小時照光治療的效果差距。(3) 於前人研究中曾經探討光動力治療對藥物投遞的影響 [110]，指出光動力治療能破壞腫瘤部位血管，改變血管通透性使藥物易於滲漏至腫瘤間隙，提升藥物累積量而增強治療效益。基於此觀點，第 2 小時照光治療時血液中有較多藥物存在，因此提升較大量血液中藥物累積於腫瘤，而其中的 cDDP 將能對後續腫瘤生長達到較好抑制，所以強化了第 2 小時照光的治療效果。前兩項可能原因，將能由日後檢測血管破壞情況，及提升照光劑量來加以釐清。而第三項假說已於圖八及圖十四的實驗結果得到證實，雙效型微脂體經第 2 小時的光動力治療後，能增加腫瘤部位後續的藥物累積量，所以在之後的研究，我們都採用雙效微脂體搭配一次投藥兩次照光(第 2 及第 12 小時)治療方式。

在 PL-cDDP-Ce6 的治療成效上，與文獻所發表 SPI-077 這種 liposomal cisplatin 相比 [61]，在與我們相同的 C26 動物腫瘤模式中，SPI-077 須使用更高濃度的 cDDP (15 mg/kg)，並須持續三週每週給藥，才能達到有效的腫瘤治療，且在停止給藥後有腫瘤復發的現象產生。與 SPI-077 相較之下，雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對於腫瘤的治療，只需較少劑量，一次給藥，就能有很好療效，顯示 PL-cDDP-Ce6 有其治療療上的優勢。而且當我們將起始治療的腫瘤大小加以提升，PL-cDDP-Ce6 依然能夠將其清除，顯示雙效微脂體對於光動力治療本身光線穿透之限制，應可藉其內化療藥物作用予以改善。我們所採用的光源對組織的穿透深度大約在 5 mm 左右 [135]，而當腫瘤長至 500 mm^3 時其組織厚度將會超過 5 mm，所以此時腫瘤組織較深處應無法獲得充足光照，光動力作用無法達到有效治療。但在這樣的狀況下，雙效微脂體仍能完全清除腫瘤，應該是由於其內的化療藥物對殘存腫瘤細胞產生毒性，所以克服光動力治療的限制，達到良好治療效果。而 PL-Ce6 + PL-cDDP 和 PL-cDDP-Ce6 均同時結合 Ce6 光動力治療及 cDDP 化學治療效果，但 PL-cDDP-Ce6 的治療成效仍然優於 PL-Ce6 + PL-cDDP 的組別，可能是因為 PL-cDDP-Ce6 經光照後能促使 cDDP 釋放，改善藥物釋放緩慢的情況，所以在治療初期快速將腫瘤清除，達到完全治癒的效果，而 PL-Ce6 + PL-cDDP 雖然也結合光動力治療及化學治療，但可能因 cDDP 無法於腫瘤部位快速釋放，所以不能及時將腫瘤徹底清除。

4.3 雙效微脂體應用機制探討

一開始建構雙效微脂體的想法，是希望藉由光動力作用對微脂體產生一定程度的破壞，而加速其內化療藥物釋出。接著在後續研究中，我們又發現光動力作用對血管的破壞，會增加微脂體藥物累積於腫瘤，而且將使更多化療藥物進入細胞，到達其作用位置產生腫瘤細胞毒殺效果。綜合我們對雙效微脂體研究，能夠歸結出幾個能增強腫瘤治療效力的可能原因：

光動力作用加速雙效微脂體內藥物釋出



雙效微脂體不論是 PL-Dox-Ce6 或 PL-cDDP-Ce6，經光照後均觀察到微脂體顆粒大小產生改變(圖六及圖十)，並有增加其內藥物釋出的現象(圖七及圖十三)，代表 Ce6 的光動力作用會對微脂體脂質膜造成影響，進而使其內所包覆之藥物有機會釋放出來。雙效微脂體呈現兩階段藥物釋放，在照光後 6 小時內會有較大量藥物快速釋出，而照光後粒徑變化也觀察到大約 6 小時後，微脂體顆粒大小分布才逐漸趨於平穩。這樣的結果可能表示，雙效微脂體經光動力作用後，會立即影響脂質排列的穩定性，使微脂體破裂或互相融合，因此導致有大量藥物在此時漏出，而約 6 小時後脂質逐漸又恢復穩定的排列狀態，使藥物釋出速度減慢下來，但此時的釋放情況和未經光照的控制組相比，依然處於較快的速度，代表即使微脂體的脂質膜排列趨於穩定，但已無法回復成未照光時的狀態。化療藥物在 6 小時後依然持續的釋出，或許是使雙效微脂體在光動力治療後，還能繼續控制腫瘤生長的重要因素。

圖七及圖十三的實驗均顯示，PL-Ce6 + PL-Dox 或 PL-Ce6 + PL-cDDP 組照光後都不會加速其內化療藥物釋放，此結果代表 Ce6 光動力作用的影響範圍侷限在其所存在的微脂體，不會對另外的微脂體產生作用，可能是由於光動力效應所產生之單態氧擴散距離很短，而我們採用表面有 PEG 修飾之微脂體，能在微脂體外形成固著水層(fixed aqueous layer)，隔開不同微脂體 [136-138]，並且使光感物質 Ce6 穩定存在於微脂體脂層，不易移動至其他微脂體 [139]，最終使光動力作用的影響範圍僅侷限於其所存在的微脂體。而此現象也將能解釋，為何在治療時雙效微脂體效果均優於將兩藥物包覆於不同微脂體的組別。

另外，我們比較有無照光對 PL-Dox-Ce6 或 PL-cDDP-Ce6 藥物動力學參數的影響(表六及表九)，發現照光後藥物半衰期($T_{1/2 \beta}$)縮短，清除率上升，在體內的平均存留時間(MRT)下降，這些結果也代表不論是 PL-Dox-Ce6 或是

PL-cDDP-Ce6，經過光照後微脂體變得較不穩定，有藥物由微脂體中釋出，才會使藥物較快被清除。而藥物的分布體積(Vd)在照過光的組別有所提升，更顯示經過光照後有部分藥物釋出，不隨微脂體局限於血液中，讓這些的 free form 藥物能夠分部至體內更廣泛的部位。所以由活體實驗的結果，也能更加證實，經過光動力作用會有利於微脂體內藥物的釋放。

光動力作用增加雙效微脂體藥物累積於腫瘤

光動力治療對腫瘤的影響主要包含，直接摧毀腫瘤細胞以及破壞腫瘤部位血管兩種方式 [66]。其中光動力治療對血管的破壞，會因為藥物及光照給予條件的不同，而產生短暫血管痙攣(vasospasm)、血管滲漏或是血管栓塞(thrombosis)等不同的影響 [110, 140-142]。近年陸續有研究指出，低劑量的光動力治療能造成腫瘤部位血管滲漏，減低腫瘤組織間質液壓(tumor interstitial fluid pressure)，而有助於血液中微脂體藥物滲入腫瘤部位累積 [110, 140, 143, 144]。而在我們的實驗(圖八及圖十四)也發現，光動力治療後有腫瘤部位藥物累積增加的現象，代表應是光動力造成血管滲漏，使原處於血液中之微脂體藥物更大量的進入腫瘤組織累積，進而連帶使其餘正常組織的藥物分布下降。相對於文獻中進行光動力治療所採用的 Ce6 劑量(2.5 mg/kg) [79]，我們實驗時使用的 Ce6 (1.75 mg/kg)確實屬於相對較低的劑量，因而較可能造成血管滲漏，藉由後續化療藥物的累積，提升治療成效；若再提升光動力治療效力，雖然會有更好的光動力毒殺效果，或造成更多藥物由微脂體釋出，但也可能造成血管栓塞，反而不利於後續藥物累積，但確實情況以及最佳的光動力作用劑量仍有待日後釐清。

增加化療藥物進入腫瘤細胞內作用

我們的實驗結果顯示(圖九)，雖然不論是 PL-Ce6 + PL-Dox 或 PL-Dox-Ce6，在經過光動力治療後，因都具有對血管的破壞，所以都會增加 Dox 在整體腫瘤

組織中的累積量，但當我們分離出細胞核並分析其內藥量後則發現，相較於 PL-Ce6 + PL-Dox 組，PL-Dox-Ce6 組經光動力治療後能更大量的提升細胞核內 Dox 量。雖然 PL-Ce6 + PL-Dox 光動力治療後也有核內藥物增加的情況，但變化量遠不如 PL-Dox-Ce6 多，這可能是由於 PL-Ce6 + PL-Dox 同具光動力對血管的破壞，使整體腫瘤均有較多 Dox，而導致核內藥量也隨著提升，但因缺乏 PL-Dox-Ce6 加速藥物釋放的效果，所以核內藥量相對不多。此結果不僅表示在實際活體治療時，PL-Dox-Ce6 經光動力作用也能加速其內 Dox 釋出，更解釋了這一藥物釋放的現象，就是 PL-Dox-Ce6 治療效果優於 PL-Ce6 + PL-Dox 的主要原因。

另外許多大分子藥物（如微脂體）會以胞吞作用（Endocytosis）的方式被攝入細胞，並包裹於胞內體（Endosome）內，不易釋放至細胞質，因而減弱了藥物治療的能力。為了克服這個現象，近年許多研究指出，在大分子藥物的使用上，若同時給予能分布於胞內體的光感物質，進行光動力治療後便能將胞內體破壞，並導致其內大分子藥物釋出到細胞質，而提升藥物作用效力。此種新興的藥物投遞方式稱為 Photochemical internalization (PCI)，已應用於許多癌症治療的研究 [145-150]。而我們之前的研究發現，PL-Dox-Ce6 進入細胞後可能會位於胞內體中，經過光動力治療後，則可發現 Dox 逐漸往細胞核聚集的現象 [106]。此結果一方面可能是由於，光動力促進 Dox 由微脂體釋放，使 Dox 得以進入細胞核和 DNA 結合；另一方面也有可能是以 PCI 的方式，使藥物由胞內體釋出，而有利於進入細胞核作用。所以基於以上觀點，雙效微脂體除了能藉加速藥物釋放，使小分子藥物順利進入腫瘤細胞之外，應還能利用 PCI 的方式，使藥物離開胞內體，到達其在細胞內須作用的位置產生治療效力。

根據以上幾點，或許能解釋雙效微脂體應用於活體腫瘤治療時，能有良好治療效力的可能機制，並提供日後結合型治療研究的一些思考依據。



4.3.1 光感物質對雙效微脂體治療成效的影響

雙效微脂體的設計，是在穩定包覆化療藥物 Dox 或 cDDP 的微脂體中加入光感物質 Ce6，所以光感物質的加入，是造成治療成效改變的重要因素。基於對雙效微脂體應用機制的了解，我們知道光動力作用會促進藥物由微脂體釋放，此釋放呈現兩階段，且釋出速度均會因光感物質增加而加強(圖七及圖十三)，但在實際應用時，並非釋放越快越好。若增強釋放速度雖然會很快達到很高的 free form 化療藥物濃度，對腫瘤造成較強毒殺，但 free form 藥物也較微脂體藥物更快被清除，因此失去對殘餘腫瘤較長時間的抑制。而且快速大量的釋出，也可能會引發對正常組織的毒性，像在比較照光對 PL-cDDP-Ce6 體內分布影響的實驗中(表八)，經過照光的組別，其腎臟 cDDP 累積量會略為增加，這可能就是因為光動力作用使 cDDP 釋出，而腎臟是 free form cDDP 主要清除的器官，所以增加了在腎臟的藥物累積，所以若釋出 cDDP 量過高將會導致對腎臟的傷害。另外，光動力作用也會造成血管滲漏，使原處於血液中之微脂體藥物更大量的進入腫瘤組織累積(圖八及圖十四)，但光動力作用的強度過強，也可能造成血管栓塞，反而不利於後續藥物累積，致使療效下降。所以雙效微脂體中光感物質的添加，應該在不嚴重影響微脂體本身穩定性的前提下，優先考慮因化療藥物快速釋放而導致的副作用，並可如文獻所提到 [110]，以功率較低的光源進行照光，僅造成血管滲漏而不使血管閉塞，確保較多藥物能滲漏至腫瘤部位，以增進治療成效。

4.4 雙效微脂體尚待釐清之機制

雖然目前我們對雙效微脂體的應用機制已有初步的了解，也大致清楚其具有良好療效的原因，但仍有一些細節須日後更確實的驗證與探討。以下列舉了雙效微脂體在應用時尚待釐清之機制：

光動力作用對雙效微脂體的影響

目前雖然已知光動力作用會造成雙效微脂體顆粒大小改變，並提升藥物釋出量，但這些僅能間接推測出雙效微脂體所發生的變化，我們希望能更直接觀察到微脂體當下的改變，因此可能可以利用電子顯微鏡觀察微脂體的型態，以確實了解光動力作用對雙效微脂體的影響。



雙效微脂體光動力治療對藥物分布的影響

目前我們已知光動力治療後，能使更多藥物進入腫瘤部位累積，依照文獻的報導推測是由於光動力治療造成血管滲漏的原因，但實際對血管所產生的影響我們並未了解。為了能進一步釐清雙效微脂體光動力治療對腫瘤部位血管的改變，我們可以利用組織切片後對血管進行免疫染色，觀察血管及藥物分布情況，或以血管攝影方式了解光動力治療後血管變化。另外在光動力治療後組織中藥物分布的實驗(圖八及圖十四)，我們發現照光後腫瘤藥物累積在前兩個時間點(給藥後4, 6小時)，有稍微停滯的現象，之後累積量才又繼續上升，而部分正常器官照光後有累積量下降情況，這些結果可能是由於光動力治療後使微脂體內藥物較快放出，進而較快被清除所導致，但這一結果也可能是光動力治療對血管破壞所造成。為了釐清光動力治療對藥物分布的影響，我們可以利用同時給予另外的染劑觀察分布狀況，以排除因雙效微脂體加速藥物釋放所造成的變化。

第二次照光所造成的影响

雙效微脂體的治療流程，我們都採取之前所發展的一次給藥兩次照光模式，並也證實能產生良好療效，而我們目前的實驗只知道在照完一次光後，微脂體藥物釋放及體內藥物分布的改變，但並不清楚照完第二次光後的狀態，所以第二次光會對整個治療產生什麼變化，也將是未來需探討的部分。

腫瘤部位的藥物釋放

由我們的實驗得知(圖九)，PL-Dox-Ce6 經光動力治療後會使大量 Dox 進入腫瘤部位的細胞核，此結果表示在實際活體治療時，PL-Dox-Ce6 經光動力作用能加速其內 Dox 釋出。但在 PL-cDDP-Ce6 方面，受限於 cDDP 偵測極限，以同樣實驗無法分析出細胞核內 cDDP 藥量，所以無法以此方式推知 PL-cDDP-Ce6 在腫瘤部位的藥物釋放。為了對 PL-cDDP-Ce6 的藥物釋放也有較詳盡的了解，我們可以採用微透析的方式(microdialysis)，分析腫瘤細胞外液(extracellular fluid)中，由微脂體所釋出的 cDDP 量 [63]；或是分析 cDDP 在細胞內主要引發毒性的作用方式，鉑和核酸共價結合形成之 platinum-DNA adducts [151]，如此也能推知 PL-cDDP-Ce6 在腫瘤部位的藥物釋放，並解釋 PL-cDDP-Ce6 產生良好療效的原因。

4.5 PL-cDDP-Ce6 於人類惡性周邊神經鞘瘤之應用

實驗顯示同時包覆 Ce6 和 cDDP 的雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對於 MPNST 的治療，在 *in vitro* 及 *in vivo* 均觀察到相當良好的治療成效，而這也是首次有效利用雙效微脂體成功應用於 MPNST 這種目前臨床難以治療的人類神經腫瘤。在針對植有 S462-TY 隻小鼠，以 cDDP 或經微脂體包覆後之 PL-cDDP 進行治療時發現，cDDP 治療效力較 PL-cDDP 強，但對正常組織傷害也較 PL-cDDP 嚴重，此結果與文獻中對 SPI-077 的研究類似 [61]，經由微脂體穩定包覆的 cDDP 能大幅降低其副作用，但卻也減弱了對腫瘤的治療效益。而當使用至 10.5 mg/kg 的劑量時，cDDP 治療組 5 隻小鼠中有 1 隻於治療後隔日死亡，應是 cDDP 對正常組織產生毒性之副作用所致，這結果也符合文獻中所提到，在小鼠實驗中，cDDP 以靜脈注射單一劑量的半數致死量(LD_{50})為 12 mg/kg [61]，所以我們使用至 10.5 mg/kg，已對小鼠生存造成相當程度的危害。當我們改以 PL-cDDP-Ce6 進行治療，藉由提升其內 Ce6 含量，除了提高光動力治療本身摧毀腫瘤的效力外，還將能一面加速 cDDP 釋放，一面對血管造成破壞，使更多藥物滲漏至腫瘤，因而產

生更好療效。但 Ce6 劑量若過高，可能會因太快釋出 cDDP 而喪失原本微脂體的緩釋效果，也可能直接造成血管栓塞，反而不利於後續藥物累積，所以最佳的光動力作用劑量的選擇，仍有待日後釐清。台大醫院李銘仁醫師團隊分析叢狀神經纖維瘤 (plexiform neurofibromas) 及 MPNST 病人發現其腫瘤大小會與血清中 soluble Axl (sAxl) 含量成高度正相關，認為將可利用血清裡 sAxl 含量作為 MPNST 腫瘤大小的生物指標(biomarker)。因此我們使用雙效型微脂體治療 MPNST 後除了觀察腫瘤抑制效果外，也同時監測老鼠血液中 sAxl 的含量，發現確實與治療前後 MPNST 大小呈高度正相關，意味將能運用 sAxl 當作叢狀神經纖維瘤或 MPNST 生長或發展、惡化與否的重要生物指標，也能作為臨床療效觀測重要依據。

由於現階段臨床對於 MPNST 腫瘤的治療，還是以手術切除為主，然而體積較大的腫瘤將增加手術的困難，所以我們想針對體積較大的腫瘤提供另一治療方式。一般而言，利用小鼠腫瘤模式進行腫瘤治療效力檢測的研究，大多在腫瘤長至 $50\text{--}200\text{ mm}^3$ 時開始治療，以觀測腫瘤生長是否因治療處理而延遲 [152]。而我們在植有 C26 或 S462-TY 的小鼠腫瘤模式中，針對長至 500 mm^3 或 1000 mm^3 這種相對較大的腫瘤進行治療，均發現 PL-cDDP-Ce6 能呈現良好療效(圖五，圖十九)，顯示 PL-cDDP-Ce6 面對體積很大的腫瘤依然能展現很好效果，有潛力成為手術遭遇困難時的另一治療選擇。

4.6 PL-cDDP-Ce6 臨床應用未來展望

在目前癌症治療藥物中，cDDP 是一種有效且廣泛應用的化療藥物，但由於會導致腎毒性，胃腸道毒性，耳毒性等嚴重的副作用，所以限制了此藥的運用。實際臨床使用上，cDDP 採靜脈注射方式給予，藥物劑量大多為 $25\text{--}100\text{ mg/m}^2$ ，每三到四週給藥一次 [153]。為了減弱 cDDP 的副作用，克服其使用上的限制，以微脂體做為 cDDP 載體的藥物劑型陸續被發展出來，其中以 SPI-077 和

Lipoplatin 在臨床應用中有較多的探討，目前分別進展至臨床二期和臨床三期的研究。在此我們將 SPI-077、Lipoplatin 和 PL-cDDP-Ce6 一起進行比較，整理如附表一，以了解我們所發展的 PL-cDDP-Ce6 將來應用之可能性。PL-cDDP-Ce6 的脂質組成及製作方式與 SPI-077 較類似，但因 Ce6 加入提高了 cDDP 包覆率，使藥物對脂質的比例提升至 1:60 左右，而 Lipoplatin 加入帶負電之脂質 DPPG，以 reverse micelle 方式製成，大幅提高 cDDP 包覆率，使藥物對脂質的比例提升至 1:10 左右，這將是 PL-cDDP-Ce6 未來欲更加提升效率時的參考方向。在小鼠血液中半衰期的比較，PL-cDDP-Ce6 也和 SPI-077 較為類似，能大幅延長 cDDP 在血液中存留的時間，半衰期由未經微脂體包覆前的 0.24 小時提升至 16 或 18 小時，而 Lipoplatin 則可能因採用帶負電脂質製成，相對較快由血液中移除，使其半衰期約在 7 小時左右。進一步推展至人體實驗時，SPI-077 依然呈現較 Lipoplatin 長的血液半衰期，由此結果我們可以推估，PL-cDDP-Ce6 在人體使用時，半衰期應也和 SPI-077 相似，在 80~145 小時左右。另外在臨床試驗中，SPI-077 曾經使用至 420 mg/m^2 的劑量，都沒有病患出現明顯副作用，能大幅提高對 cDDP 的耐受劑量 [154]，但在臨床二期的研究中，其療效卻可能因藥物釋放緩慢而無法展現 [59, 155, 156]。Lipoplatin 在臨床試驗中，也顯示能降低 cDDP 所導致的毒性，最大耐受劑量在 300 mg/m^2 左右，可能因為穩定程度較 SPI-077 略低，而且採用的脂質 DPPG 能促進微脂體與細胞膜融合，增進 cDDP 進入細胞的效率 [118]，使一些正常組織受到 cDDP 影響，而導致最大耐受劑量較 SPI-077 低。但 Lipoplatin 在療效方面則明顯較 SPI-077 來的好，呈現與 cDDP 類似的腫瘤抑制能力[118, 157, 158]。我們所發展的 PL-cDDP-Ce6 在小鼠實驗中，展現良好的治療效力，若以此劑量換算體表面積可推知，我們所採用的 cDDP 量約在 5~18 mg/m^2 左右，遠低於 SPI-077 或 Lipoplatin 的最大耐受劑量，因此 PL-cDDP-Ce6 在實際臨床應用時，應該還有很多 cDDP 劑量增加的安全空間，使療效得以更加提升。

光動力療法於癌症治療的應用已行之有年，許多光感藥物也已核可上市或進入臨床試驗，雖然我們研究中所採用的 Ce6 目前並無臨床相關資料，但在此我們將同樣以 Chlorin 為主要結構，且已有臨床應用經驗的光感藥物 Temoporfin 和 Talaporfin 與 Ce6 一起進行比較，整理如附表二，以更加了解我們所發展的 PL-cDDP-Ce6 將來應用之可能性。這三種光感物質雖同以 Chlorin 為主要結構，但因具不同衍伸基團，所以特性也略有不同。其中 Temoporfin 疏水性最高，能在照光後引發最強光動力效應，臨床治療時所施用的劑量較低，為 5.4 mg/m^2 左右，照光劑量也較低，一般僅以 652 nm 光源照 20 J/cm^2 。但 Temoporfin 因疏水性高，在水中溶解度不好且易聚集，而且在藥物分布上對腫瘤的選擇性較差，因此病患須長時間避光，以避免對正常部位的傷害，並須等到四天後才會在腫瘤有較理想分布，已進行照光治療。而 Talaporfin 和我們所用的 Ce6 結構較類似，為 Ce6 的一羧基接上 aspartyl group 所構成，所以水溶性較好，也因此在體內清除速度較一些疏水性光感物質快。治療時在靜脈注射給予 Talaporfin (40 mg/m^2) 後，較短時間內便進行照光($0.25\sim4$ 小時)，產生對腫瘤部位血管的破壞，而導致血液供應不足使腫瘤死亡 [159]。和上述兩藥物相比，Ce6 本身特性(吸收光波長，光動力效益)與 Talaporfin 較相似，只是水溶性不像 Talaporfin 這麼好，但經微脂體包覆構成 PL-cDDP-Ce6 後，能改善在水中藥物聚集的問題，並可藉 EPR effect 更專一的累積至腫瘤。而我們實驗中所使用的劑量換算後為 $3\sim6 \text{ mg/m}^2$ ，並照光 100 J/cm^2 ，以 Ce6 而言屬於較低劑量的光動力治療，所以 PL-cDDP-Ce6 產生的療效應該有大部分來自 cDDP。就使用安全性來說，Ce6 的光動力治療劑量應該還有提升空間，但提升過多可能會如 Talaporfin 造成血管閉塞，不利藥物後續累積，反而減弱療效，這應該是後續發展需注意的部分。我們採用的二次照光方式，第一次(給藥後 2 小時)目的為促使血管滲漏，增進藥物累積，第二次(給藥後 12 小時)再對腫瘤部位產生較強破壞，所以在往後的應用上，第一次照光時間應可再提前，並以功率較低的光源進行照光，以確保較多藥物能滲漏至腫瘤部位，而

第二次照光的時機，則需選擇藥物被從腫瘤部位清除前實施，需要日後收集更多資訊才能判斷。另外，未來雙效微脂體發展上，若遭遇光感藥物需更換的情況，Temoporfin 或許是不錯的選擇，除了因為其具有很強的光動力效益外，由於疏水性高而造成使用上的不利，應可藉微脂體為載體予以改善，所以 Temoporfin 可能是替代 Ce6 時的另一選擇。



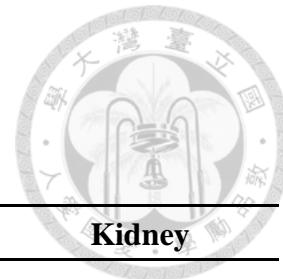
表一、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 特性分析。(N=3)

	Particle size (nm)	lipid recovery %	Ce6 entrapment ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$)	Ce6 entrapment efficiency %	cDDP entrapment ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$)	cDDP entrapment efficiency %
PL-Ce6	$150 \pm 29.7 \text{ nm}$	83.5 ± 2.5	6.8 ± 0.2	87 ± 2.8		
PL-cDDP	$132.6 \pm 27.3 \text{ nm}$	82 ± 3.1			11.9 ± 1.3	15.1 ± 1.7
PL-cDDP-Ce6	$147.3 \pm 31.5 \text{ nm}$	81.5 ± 2.1	6.6 ± 0.2	84.8 ± 2	13.9 ± 1.2	17.7 ± 1.5



表二、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 保存於 4°C 之穩定性分析。(N=3)

	Days							
	0	1	3	7	14	21	30	60
Leakage of Ce6 (%)	0.0	2.7 ± 1.1	5.0 ± 1.9	5.5 ± 2.1	4.9 ± 2.2	9.1 ± 2.7	11.1 ± 1.7	12.5 ± 1.5
Leakage of cDDP (%)	0.0	4.8 ± 0.6	5.7 ± 1.0	5.8 ± 1.8	8.3 ± 1.8	6.8 ± 1.7	10.2 ± 0.9	12.4 ± 0.9
Particle size (nm)	148 ± 10			145 ± 5	148 ± 9	150 ± 7	150 ± 9	150 ± 14



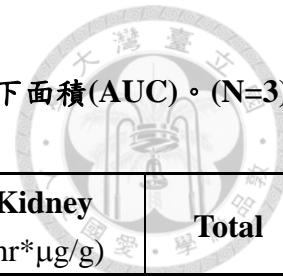
表三、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，老鼠各器官藥物累積量，每個時間點共三隻老鼠。(μg/g)

	Plasma	Tumor	Liver	Spleen	Lung	Kidney
Ce6						
2 h	17.44 ± 1.59	0.90 ± 0.10	2.93 ± 0.44	3.63 ± 0.52	0.60 ± 0.04	2.34 ± 0.40
6 h	9.24 ± 1.31	1.22 ± 0.13	1.83 ± 0.10	3.25 ± 0.31	0.44 ± 0.09	0.65 ± 0.12
12 h	4.92 ± 0.90	1.39 ± 0.15	1.07 ± 0.22	2.92 ± 0.27	0.26 ± 0.04	0.36 ± 0.02
24 h	3.06 ± 0.18	1.24 ± 0.14	0.73 ± 0.07	2.25 ± 0.48	0.19 ± 0.06	0.20 ± 0.09
48 h	2.82 ± 0.09	0.52 ± 0.16	0.48 ± 0.08	1.96 ± 0.13	0.09 ± 0.07	0.15 ± 0.02
cDDP						
2 h	35.00 ± 4.33	2.19 ± 0.92	22.79 ± 0.78	12.94 ± 2.24	1.52 ± 0.24	9.30 ± 1.48
6 h	23.80 ± 0.71	4.17 ± 0.87	21.01 ± 2.29	19.45 ± 3.19	1.71 ± 0.52	5.52 ± 1.48
12 h	18.08 ± 3.24	5.29 ± 0.84	11.08 ± 2.45	25.99 ± 3.80	2.40 ± 0.34	3.53 ± 1.24
24 h	15.98 ± 1.09	4.80 ± 0.99	9.16 ± 0.66	14.16 ± 1.12	1.57 ± 0.37	0.77 ± 0.23
48 h	11.35 ± 1.05	3.39 ± 0.51	8.32 ± 1.05	8.53 ± 0.96	N/A	N/A



表四、製作時加入 (A) 0.1、(B) 0.15、(C) 0.2 mg Ce6 所製成之雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 特性分析。(N=3)

	Particle size (nm)	Ce6 entrapment (μ g/ μ mole)	Ce6 entrapment efficiency %	Dox entrapment (μ g/ μ mole)	Dox entrapment efficiency %
PL-Dox-Ce6 (A)	153.7 ± 39.8	4.9 ± 0.3	50.2 ± 2.3	86.0 ± 1.5	87.8 ± 1.5
PL-Dox-Ce6 (B)	158.8 ± 40.6	7.1 ± 0.9	48.5 ± 4.4	75.3 ± 9.0	76.8 ± 9.2
PL-Dox-Ce6 (C)	162.1 ± 40.1	9.5 ± 0.4	48.5 ± 2.3	49.8 ± 4.4	50.8 ± 4.5



表五、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之血液及組織藥物濃度對時間曲線下面積(AUC)。(N=3)

	Plasma (hr* μ g/ml)	Tumor (hr* μ g/g)	Heart (hr* μ g/g)	Liver (hr* μ g/g)	Spleen (hr* μ g/g)	Lung (hr* μ g/g)	Kidney (hr* μ g/g)	Total
Ce6								
without light	95.32	23.69	1.00	87.79	156.69	2.77	12.12	379.38
Dox								
without light	1261.91	343.73	34.05	1364.56	1417.12	97.95	180.92	4700.23
with light	69.95	46.73	4.04	74.71	136.60	2.96	7.32	342.30
with light	1054.03	780.68	23.42	1271.37	1301.14	96.11	173.18	4699.93

AUC: area under the drug concentration-time curve (hr* μ g/ml)

表六、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之
藥物動力學參數。(N=3)

	$T_{1/2(\beta)}$ (hr)	CL (ml/hr/kg)	MRT (hr)	Vd (ml/kg)
Ce6				
without light	14.12	15.92	12.93	324.25
Dox				
without light	18.38	4.96	16.72	152.89
with light	12.98	6.77	14.79	156.16

$T_{1/2(\beta)}$: elimination half-life, CL: clearance, MRT: mean residence time,

Vd: volume of distribution



表七、製作時不加入 Ce6 之 PL-cDDP 及加入 (A) 0.4、(B) 0.8、(C) 1.2、(D) 1.6、(E) 2.4 mg Ce6 所製成之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 特性分析。(N=3)

	Particle size (nm)	Ce6 entrapment (μ g/ μ mole)	Ce6 entrapment efficiency %	cDDP entrapment (μ g/ μ mole)	cDDP entrapment efficiency %
PL-cDDP	119.1 ± 7.5			10.7 ± 1.3	13.6 ± 1.7
PL-cDDP-Ce6 (A)	121.7 ± 8.4	3.8 ± 0.1	98.0 ± 3.3	10.6 ± 0.5	13.6 ± 0.6
PL-cDDP-Ce6 (B)	117.4 ± 7.7	7.5 ± 0.3	95.7 ± 3.6	12.5 ± 0.9	15.9 ± 1.2
PL-cDDP-Ce6 (C)	124.1 ± 8.5	10.9 ± 0.3	92.9 ± 2.9	13.7 ± 0.5	17.5 ± 0.6
PL-cDDP-Ce6 (D)	121.2 ± 9.0	14.6 ± 0.2	92.8 ± 1.4	14.0 ± 1.4	17.9 ± 1.8
PL-cDDP-Ce6 (E)	128.2 ± 8.1	22.7 ± 1.0	96.5 ± 4.1	15.2 ± 1.5	19.3 ± 2.0



表八、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之血液及組織藥物濃度對時間曲線下面積(AUC)。(N=3)

	Plasma (hr* μ g/ml)	Tumor (hr* μ g/g)	Liver (hr* μ g/g)	Spleen (hr* μ g/g)	Kidney (hr* μ g/g)	Total	
Ce6							
	without light	231.98	33.79	118.20	155.55	15.47	554.99
cDDP	with light	216.07	48.66	108.43	141.02	14.28	528.46
	without light	605.11	233.20	693.95	841.49	112.45	2486.19
	with light	496.24	602.21	590.92	694.41	127.08	2510.85

AUC: area under the drug concentration-time curve (hr* μ g/ml)

表九、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之藥物動力學參數。(N=3)



	$T_{1/2(\beta)}$ (hr)	CL (ml/hr/kg)	MRT (hr)	Vd (ml/kg)
Ce6				
without light	25.56	4.96	16.47	254.58
cDDP				
without light	18.59	4.28	16.45	176.56
with light	17.87	5.24	16.90	210.65

$T_{1/2(\beta)}$: elimination half-life, CL: clearance, MRT: mean residence time,

Vd: volume of distribution

表十、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療後 72 小時之血液生化分析。(N=3)

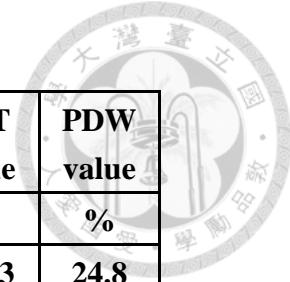
	control	PL-Ce6 + PL-cDDP	PL-cDDP-Ce6
AST (U/l)	86.7 ± 36.7	142.3 ± 93.9	173.7 ± 125.4
ALT (U/l)	39.7 ± 26.1	21.7 ± 4.0	40.3 ± 25.7
CPK (U/l)	144.3 ± 18.5	151.7 ± 59.5	161.3 ± 70.9
LDH (U/l)	1110.0 ± 211.7	3816.7 ± 3041.8	2933.3 ± 1325.1
BUN (mg/dl)	23.23 ± 2.89	22.43 ± 5.16	23.93 ± 2.15
CRE (mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.37 ± 0.25	0.13 ± 0.06

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, CPK: creatinine kinase, LDH: lactate dehydrogenase, BUN: blood urea nitrogen, CRE: creatinine. Results represent mean ± SD of three mice per group.

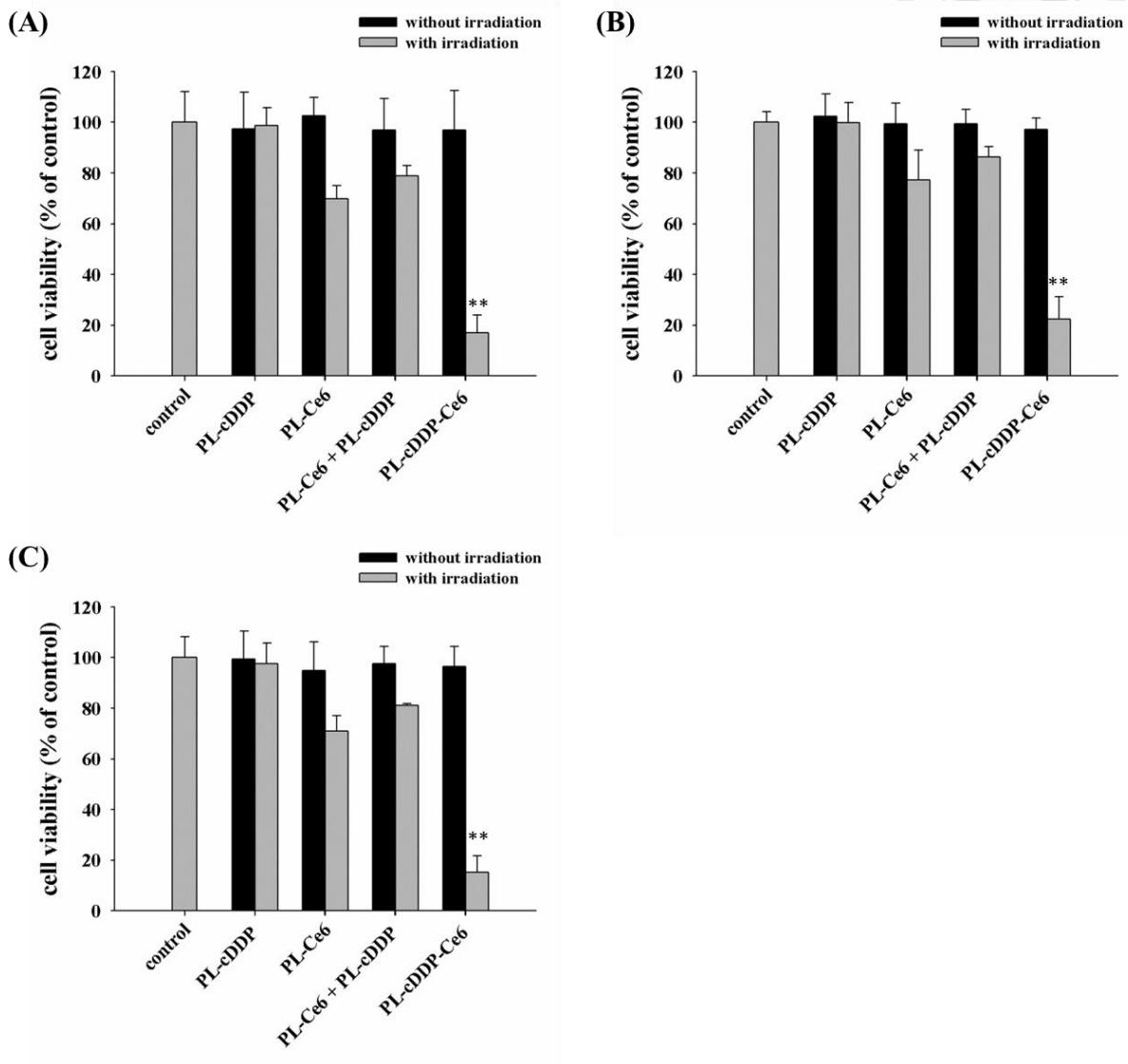


表十一、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療後 72 小時之全血細胞計數。(N=3)

group	ID	WBC count	NEU count	LYM count	MONO count	EOS count	BASO count	NEU % value	LYM % value	MONO % value	EOS % value	BASO % value
	Unit	$10^9/L$	$10^9/L$	$10^9/L$	$10^9/L$	$10^9/L$	$10^9/L$	%	%	%	%	%
control	N1	6.23	2.67	2.38	0.557	0.172	0.445	42.9	38.2	8.95	2.76	7.15
	N2	10.1	4.87	4.05	0.572	0.423	0.182	48.2	40.1	5.66	4.19	1.8
	N3	5.09	2.99	1.04	0.528	0.145	0.378	58.9	20.5	10.4	2.84	7.43
PL-Ce6 + PL-cDDP	N4	7.2	4.95	2.02	0.197	0.004	0.028	68.8	28	2.73	0.051	0.388
	N5	6.46	2.03	2.66	1.09	0.198	0.477	31.5	41.1	16.9	3.07	7.38
	N6	4.77	3.51	1.2	0.052	0.003	0.006	73.5	25.2	1.09	0.069	0.116
PL-cDDP-Ce6	N7	9.13	4.27	3.29	0.906	0.325	0.34	46.7	36.1	9.92	3.56	3.72
	N8	2.72	1.07	1.2	0.316	0.013	0.123	39.4	44	11.6	0.484	4.51
	N9	5.48	2	2.49	0.592	0.181	0.213	36.5	45.5	10.8	3.31	3.89

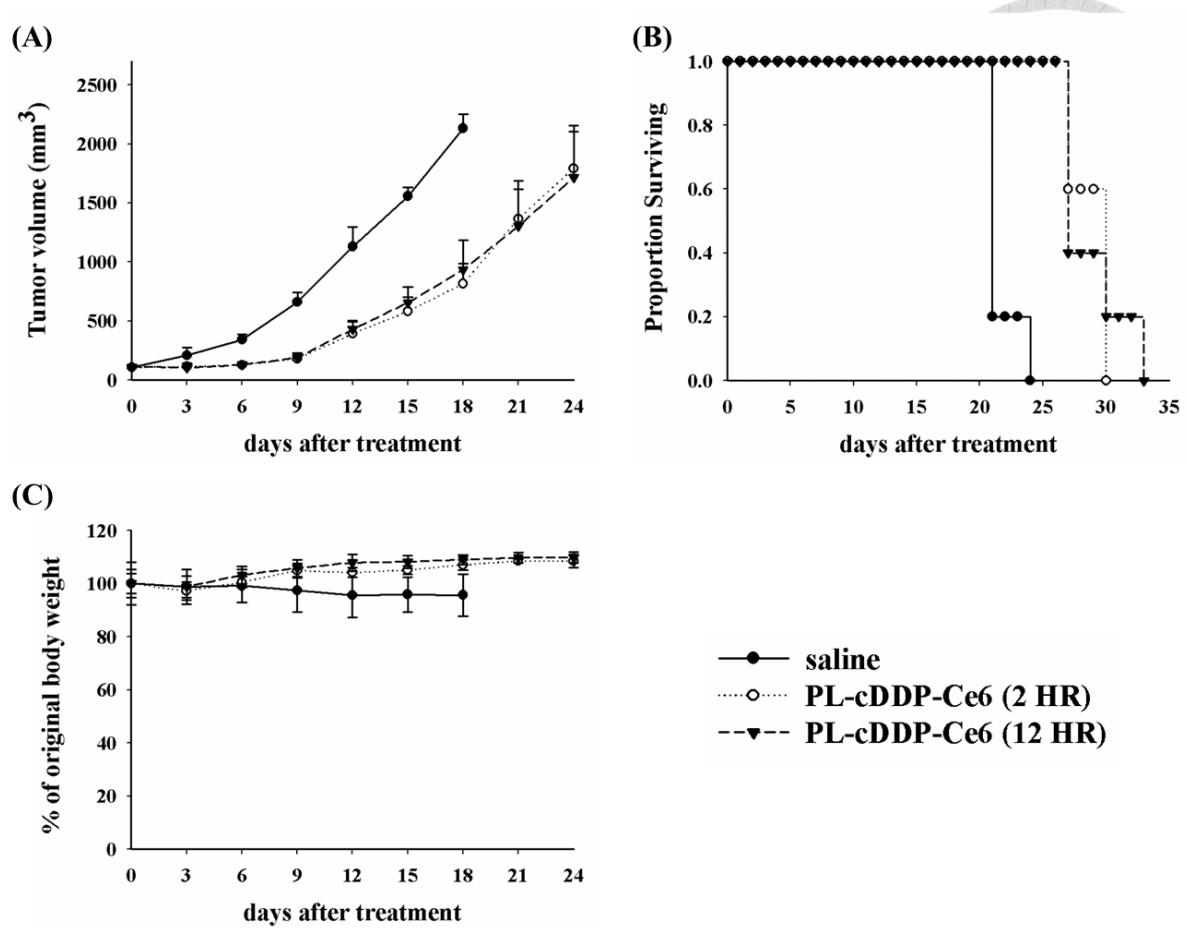


group	ID	RBC count	HGB value	HCT value	MCV value	MCH value	MCHC value	RDW value	PLT count	MPV value	PCT value	PDW value
	Unit	$10^{12}/L$	g/dL	%	fL	pg	g/dL	%	$10^9/L$	fL		%
control	N1	9.62	15.4	51.8	53.8	16.1	29.8	18.4	895	6.41	0.573	24.8
	N2	10.2	15.7	53	52	15.4	29.7	20.4	598	6.59	0.394	19
	N3	8.99	14.2	48	53.4	15.8	29.6	16.4	989	5.71	0.565	17.5
PL-Ce6 + PL-cDDP	N4	6.58	10.5	34.9	53.1	15.9	30	19	1290	6.26	0.808	17.5
	N5	9.75	15.3	52.2	53.5	15.7	29.3	24.1	1160	5.82	0.675	21.7
	N6	8.98	14.2	48.3	53.8	15.8	29.4	18.7	1085	7.9	0.858	20.1
PL-cDDP-Ce6	N7	9.74	14.7	50.6	52	15.1	29.1	20.8	1007	6.61	0.666	21.4
	N8	10.4	16	55.6	53.2	15.3	28.8	22.1	538	9.27	0.499	21.7
	N9	9.35	14.2	48.2	51.5	15.2	29.5	19.4	947	8.43	0.798	20.9



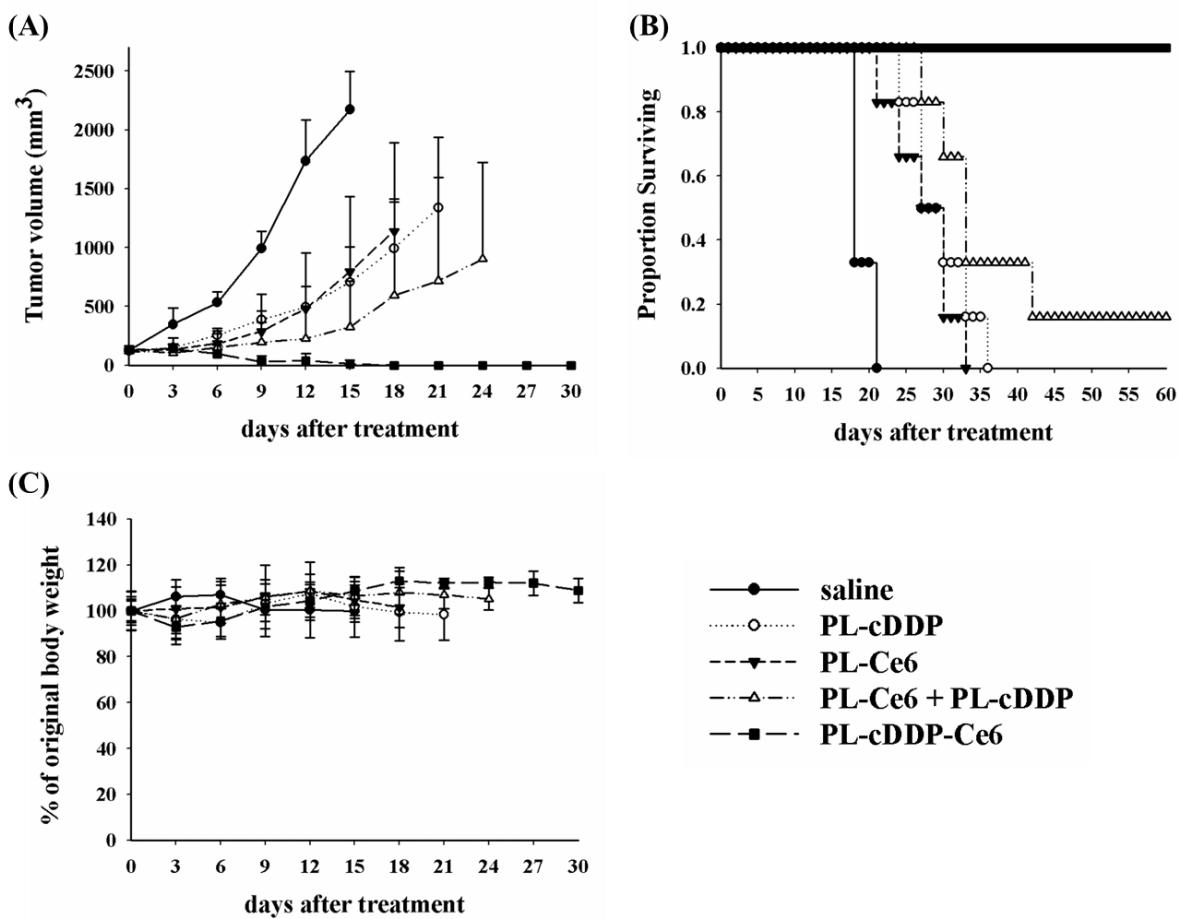
圖一、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 (A) A375 細胞，(B) A549 細胞，(C) C26 細胞之細胞毒殺效果。

(A) A375 細胞，(B) A549 細胞，(C) C26 細胞分別與 PL-cDDP、PL-Ce6、PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cDDP: 1.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 培養 2 小時後移除藥物，接著以 662 nm 雷射光源照光 0.1 J/cm^2 ，於 24 小時後利用 MTT assay 檢測細胞毒殺效果。控制組為不加藥組別，其值訂為 100%。相較於其它組別，PL-cDDP-Ce6 治療組呈現最佳細胞毒殺效果(** $P<0.01$, N=3)。



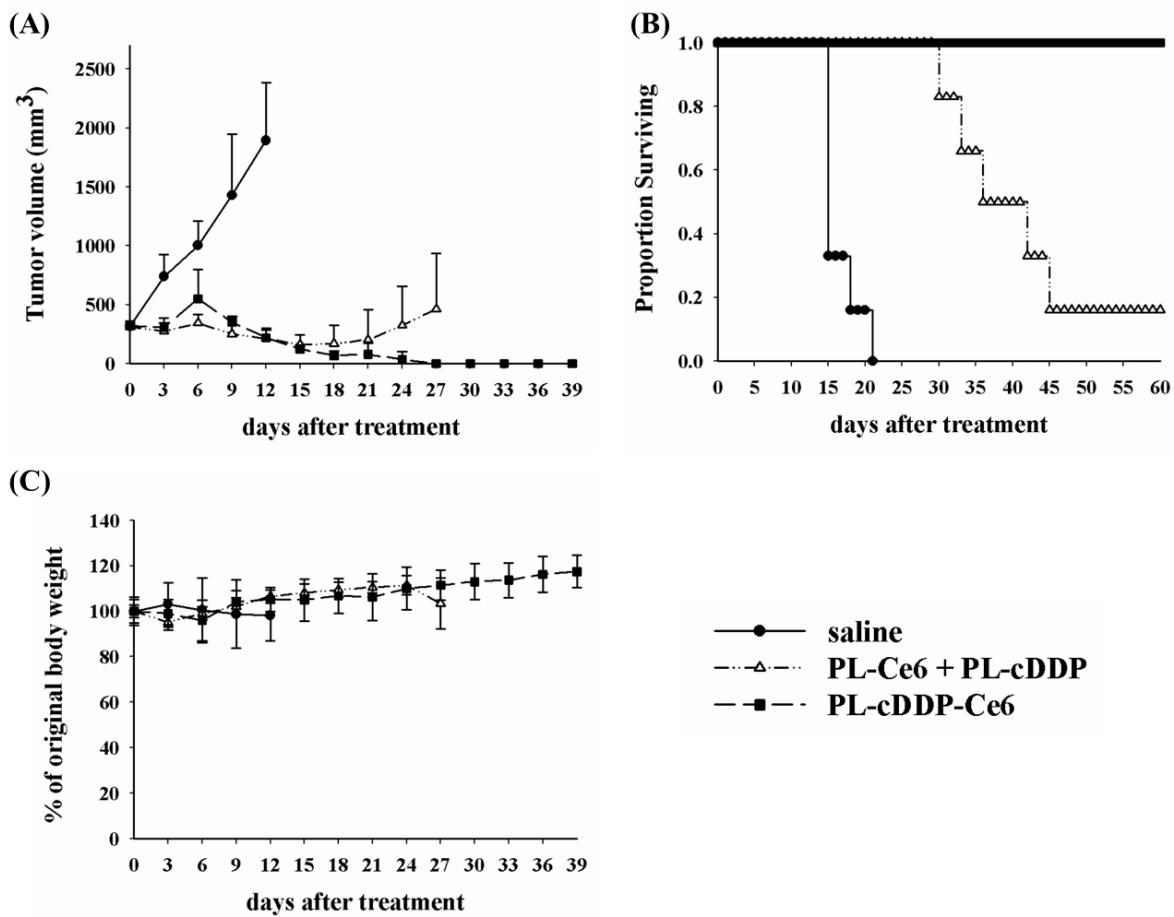
圖二、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，分別在第 2 或第 12 小時進行光動力治療之小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。

BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1.75 mg/kg, cDDP: 3.72 mg/kg) 後，分別在第 2 或 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 ，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小(A)及體重變化(C)，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線(B)。每組各 5 隻小鼠。



圖三、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 及第 12 小時進行光動力治療之小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。

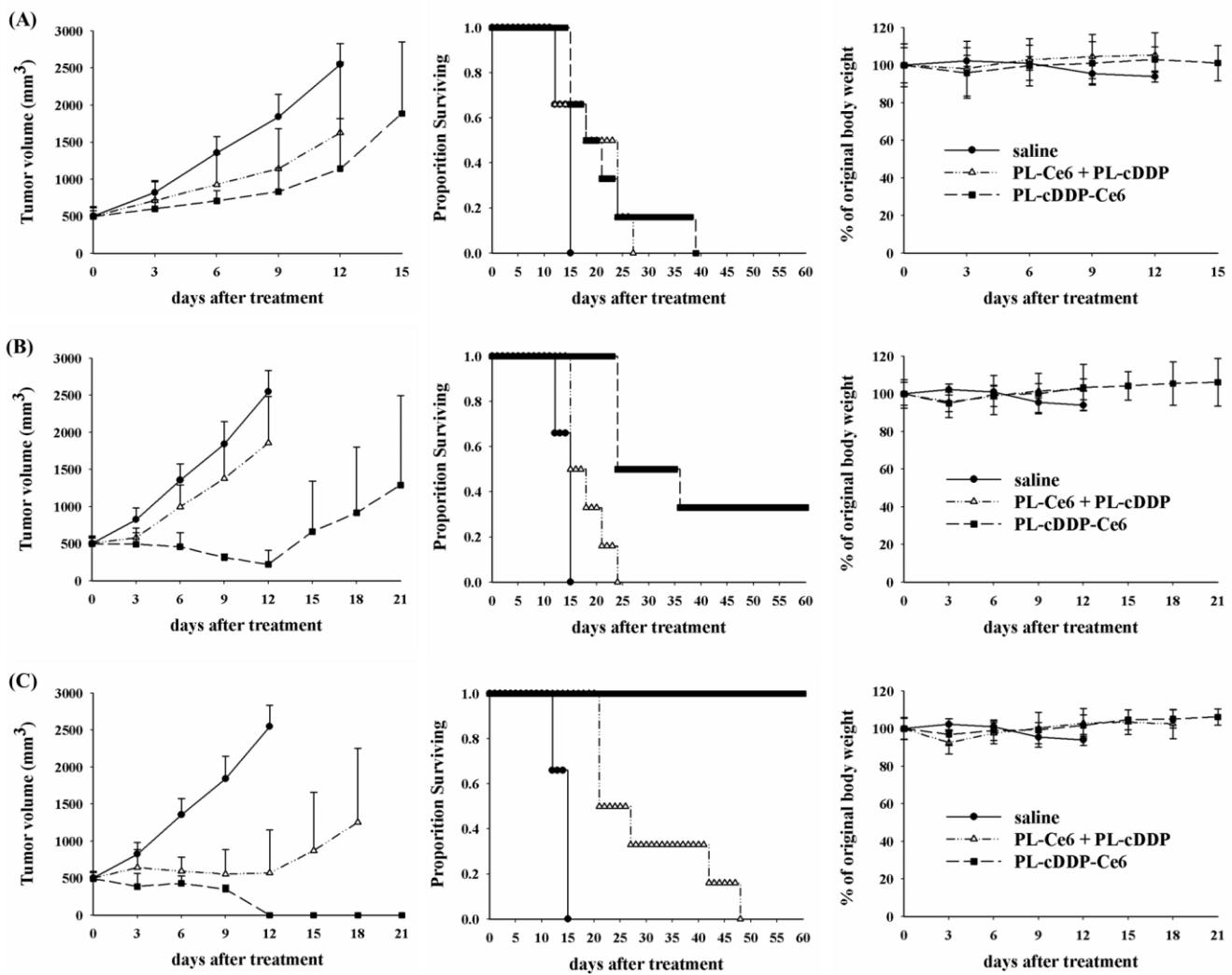
BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 PL-cDDP、PL-Ce6、PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1.75 mg/kg, cDDP: 3.73 mg/kg) 後，在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 ，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小(A)及體重變化(C)，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線(B)。每組各 6 隻小鼠。



圖四、腫瘤生長至 300 mm^3 後，再以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療之小鼠

(A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。

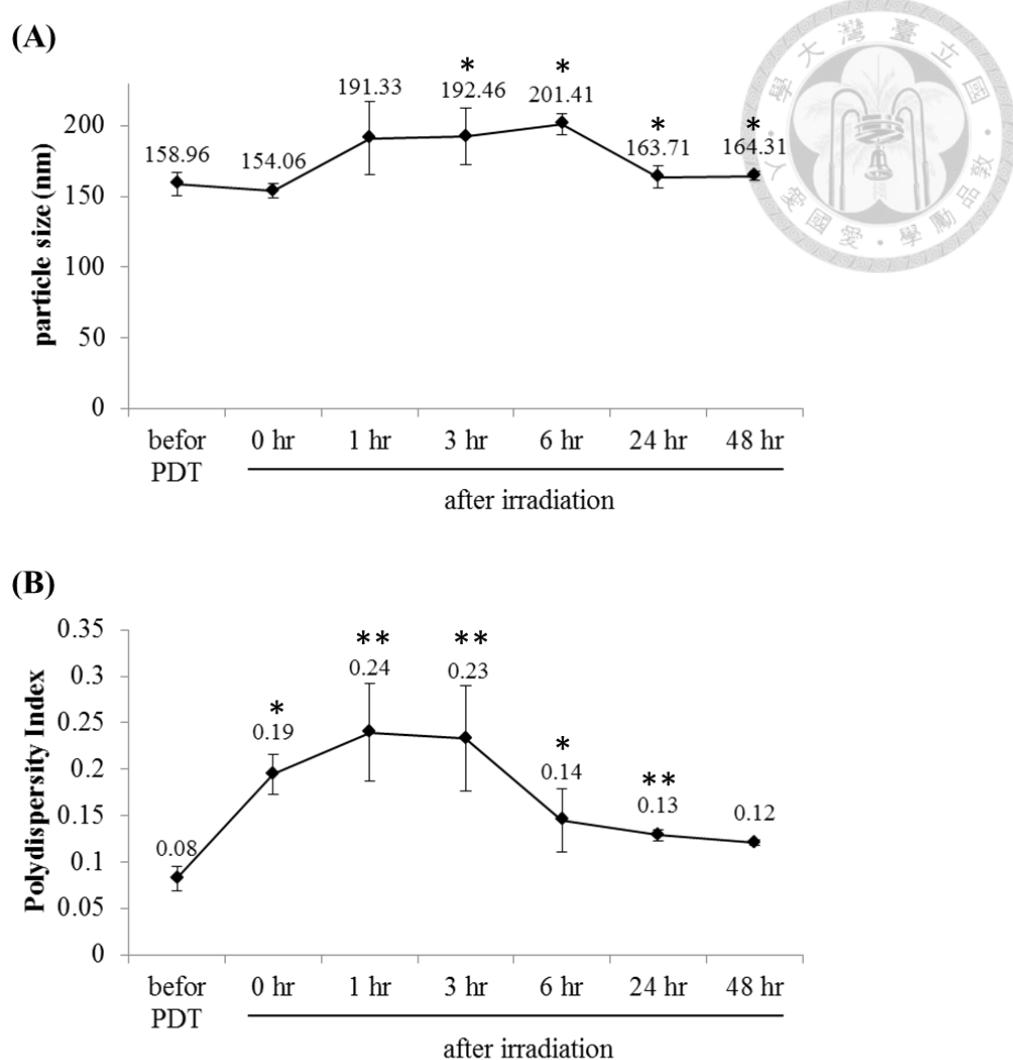
BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 300 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1.75 mg/kg, cDDP: 3.87 mg/kg) 後，在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 ，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小(A)及體重變化(C)，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線(B)。每組各 6 隻小鼠。



圖五、腫瘤生長至 500 mm^3 後，再以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療之小鼠

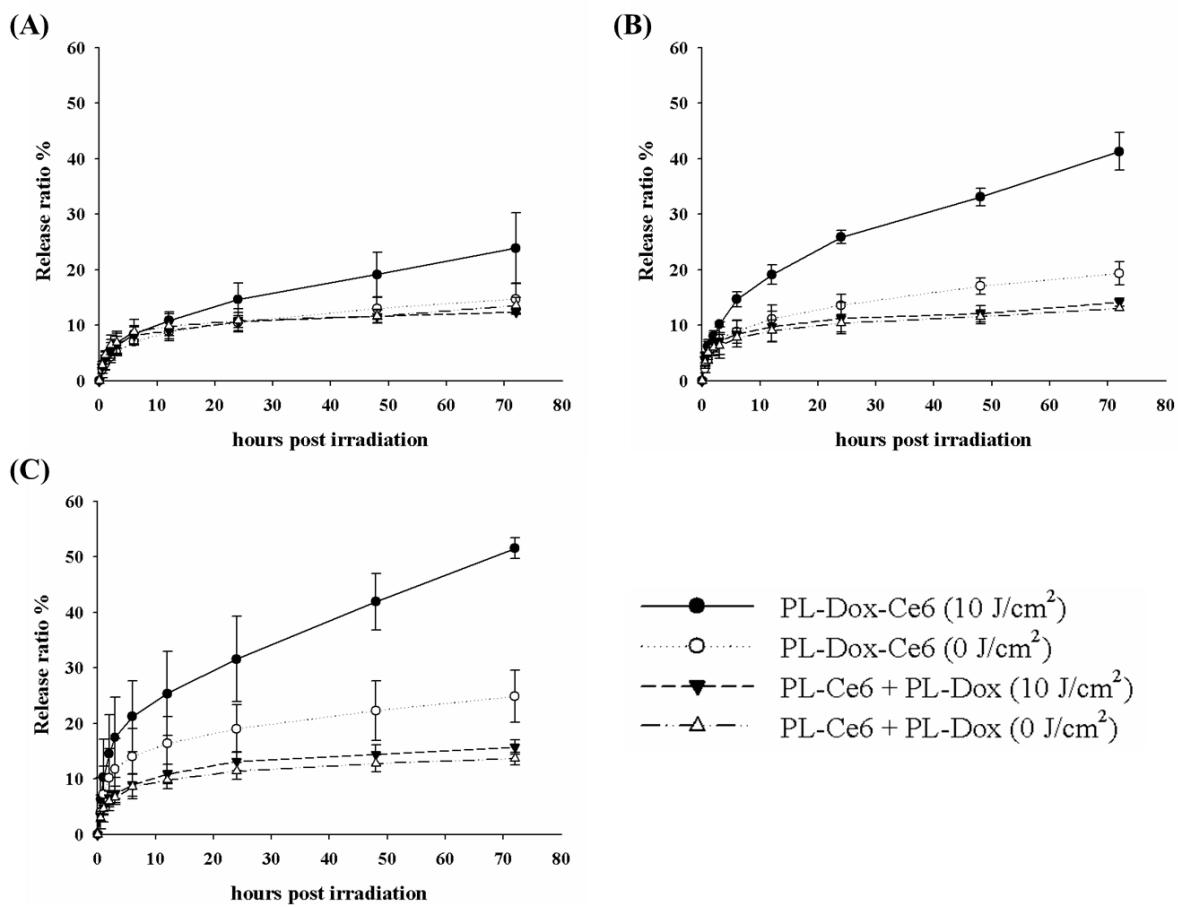
腫瘤大小，生存率，體重變化。

BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 500 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6，藥物劑量分別為(A) Ce6: 1.75 mg/kg, cDDP: 3.83 mg/kg；(B) Ce6: 1.75 mg/kg, cDDP: 4.75 mg/kg；(C) Ce6: 1.75 mg/kg, cDDP: 5.71 mg/kg。並在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 ，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小、體重變化，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線。每組各 6 隻小鼠。



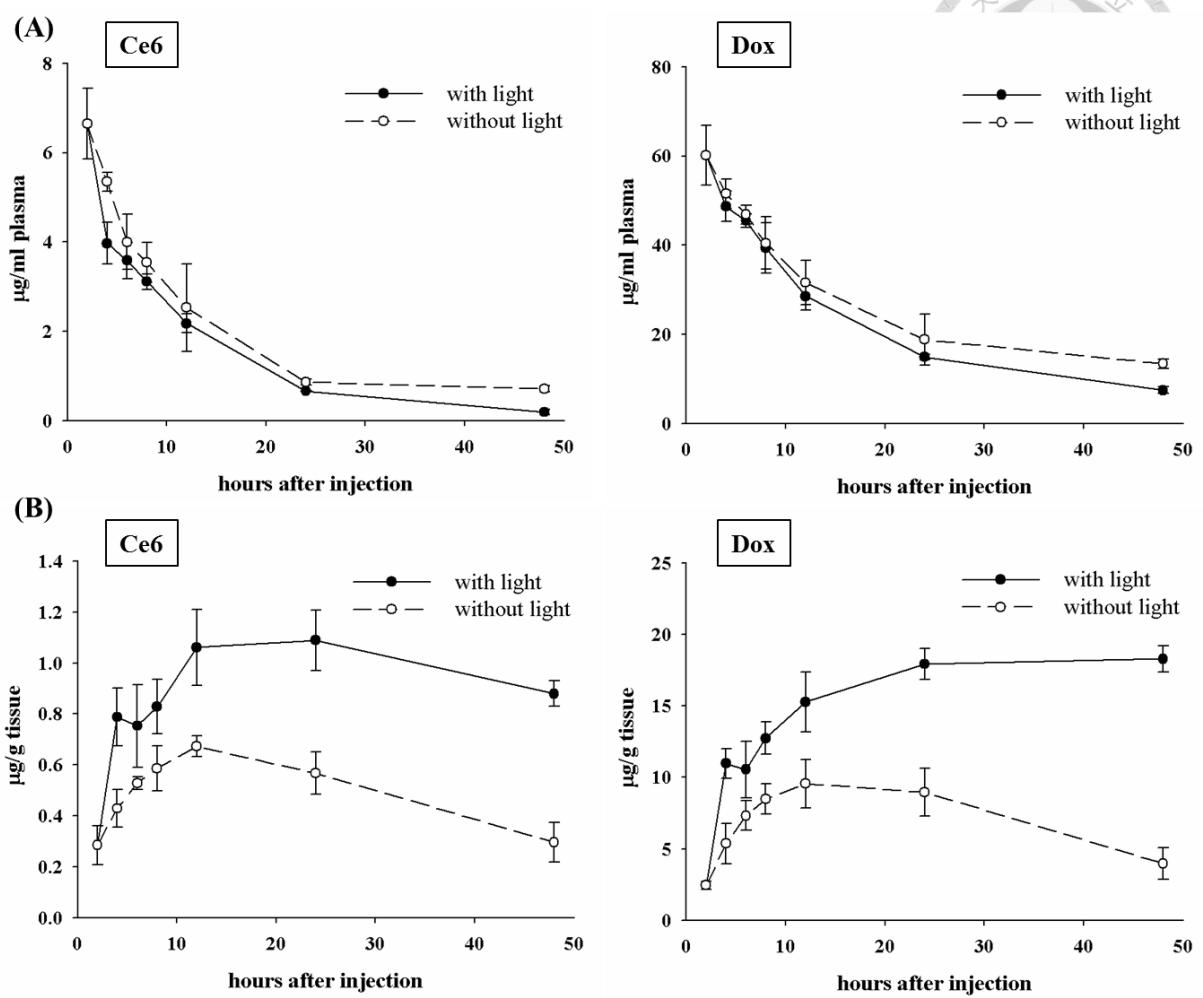
圖六、雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 照光後粒徑(A)及分散指數(B)變化。

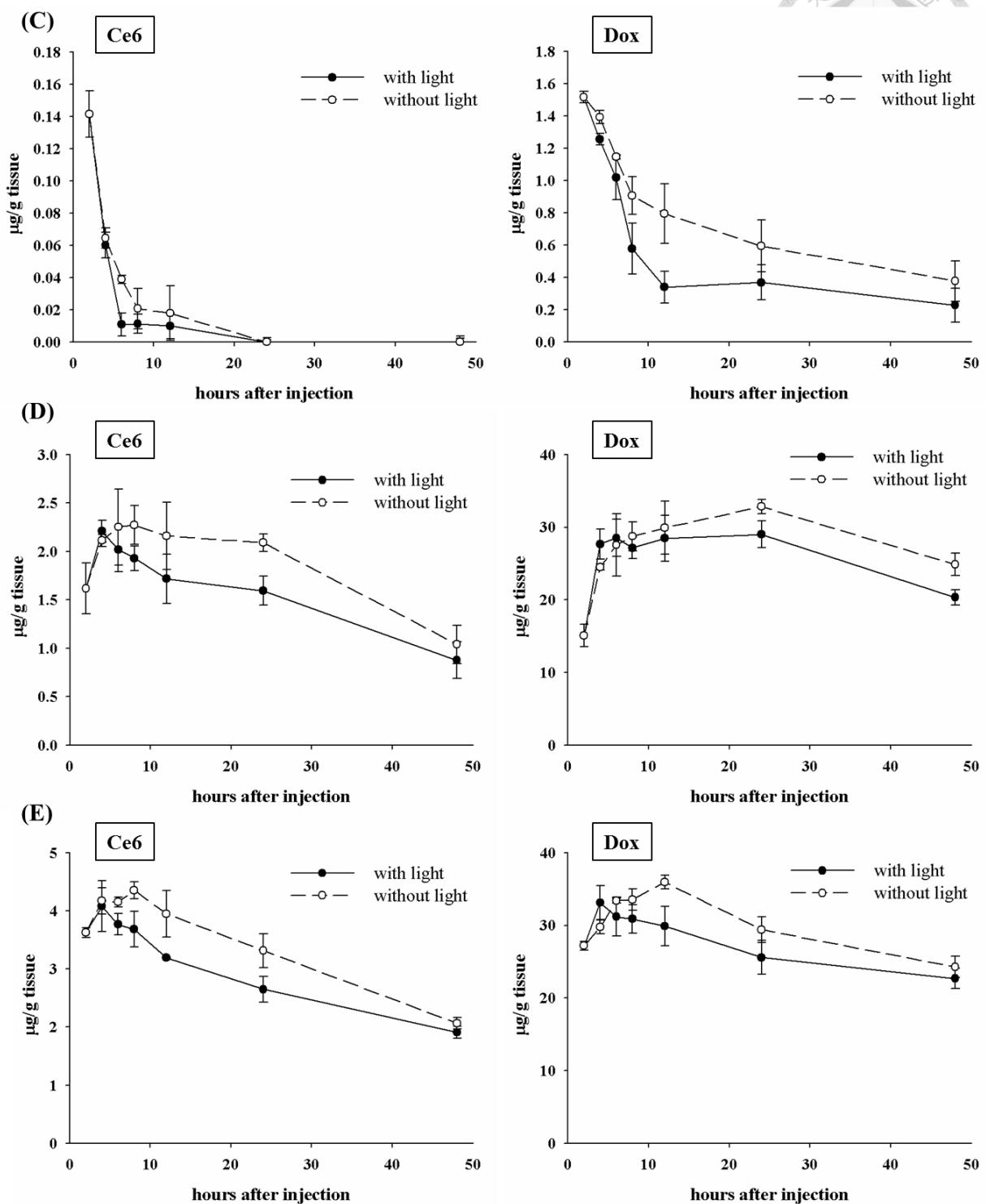
以 662 nm 雷射光源對 PL-Dox-Ce6 進行照光 10 J/cm^2 後，於不同時間點(0、1、3、6、24、48 小時) 利用粒徑分析儀檢測微脂體粒徑大小(A)及粒徑多分散性指數(B)。以 t-test 分析照光後各時間點與照光前之差異(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, N=3)。

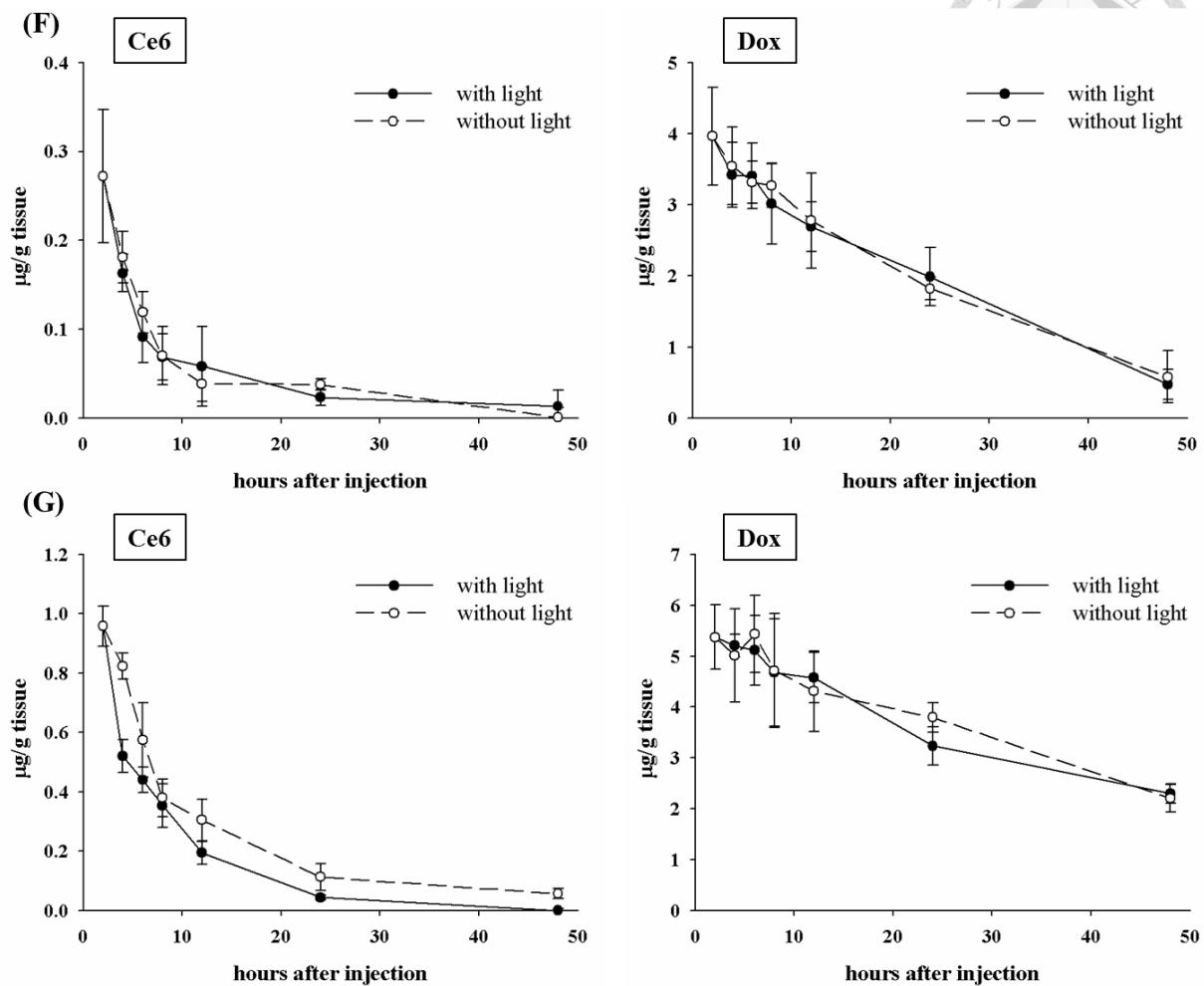


圖七、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 照光後 Dox 釋放情形。

以 662 nm 雷射光源對包覆不同 Ce6 量之 PL-Dox-Ce6 進行照光 10 J/cm² 後，裝入透析袋並置於 37°C 之 PBS 中，於不同時間點 (0、0.5、1、2、3、6、12、24、48、72 小時) 檢測透析液中 Dox 含量，以瞭解 PL-Dox-Ce6 照光處理後 Dox 釋放情況。微脂體製備時加入之 Ce6 量: 0.1 mg (A), 0.15 mg (B), 0.2 mg (C)。(N=3)。

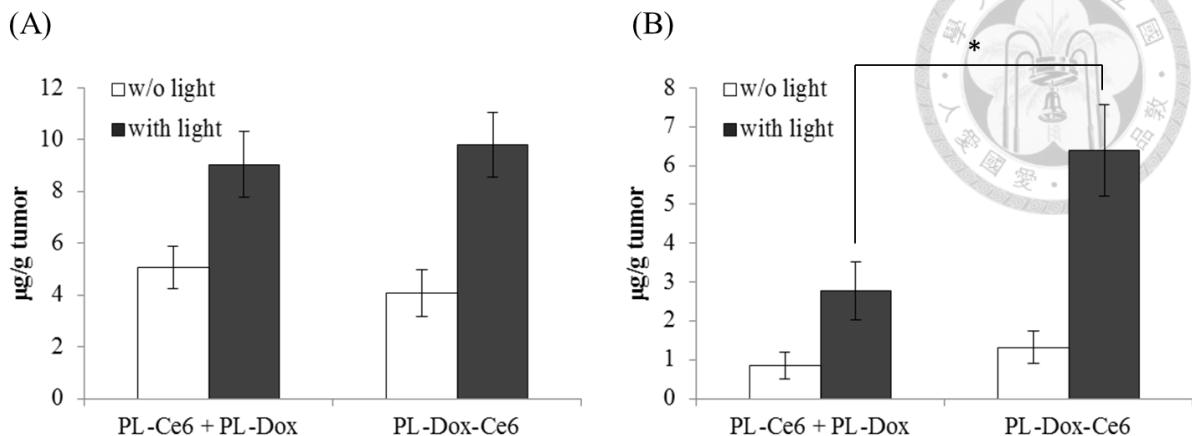
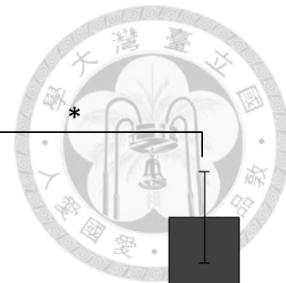






圖八、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之組織器官藥物累積量變化。

BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 PL-Dox-Ce6 (Ce6: 1.75 mg/kg , Dox: 8.31 mg/kg)。並在第 2 小時以 662 nm 雷射光源對腫瘤進行照光 100 J/cm^2 ，於不同時間點 (2、4、6、8、12、24、48 小時) 犧牲小鼠，並比較照光及不照光組別血漿(A)、腫瘤(B)、心臟(C)、肝臟(D)、脾臟(E)、肺臟(F)及腎臟(G)藥物分布情況。每組每時間點各 3 隻小鼠。

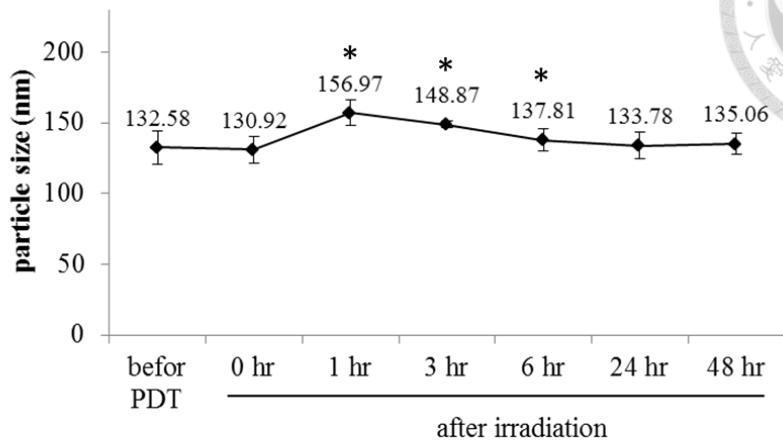


圖九、靜脈注射雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 並進行照光治療後，小鼠腫瘤內 Dox 累積量。

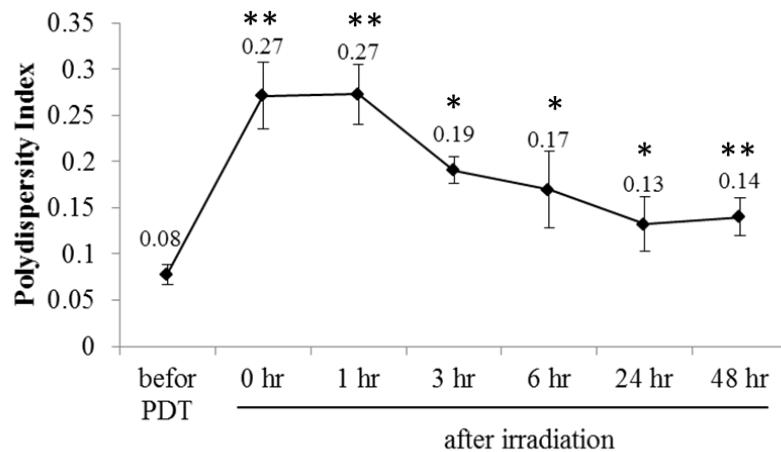
BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 PL-Ce6 + PL-Dox 或 PL-Dox-Ce6 (Ce6: 1.75 mg/kg, Dox: 8.22 mg/kg)。並在給藥後第 2 小時以 662 nm 雷射光源對腫瘤進行照光 100 J/cm^2 ，於第 4 小時取出腫瘤，分離出腫瘤細胞核，比較照光及不照光組別整體腫瘤(A)及腫瘤細胞核內(B) Dox 累積量。每組各 3 隻小鼠。以 t-test 分析各組間差異($*P<0.05$)。



(A)

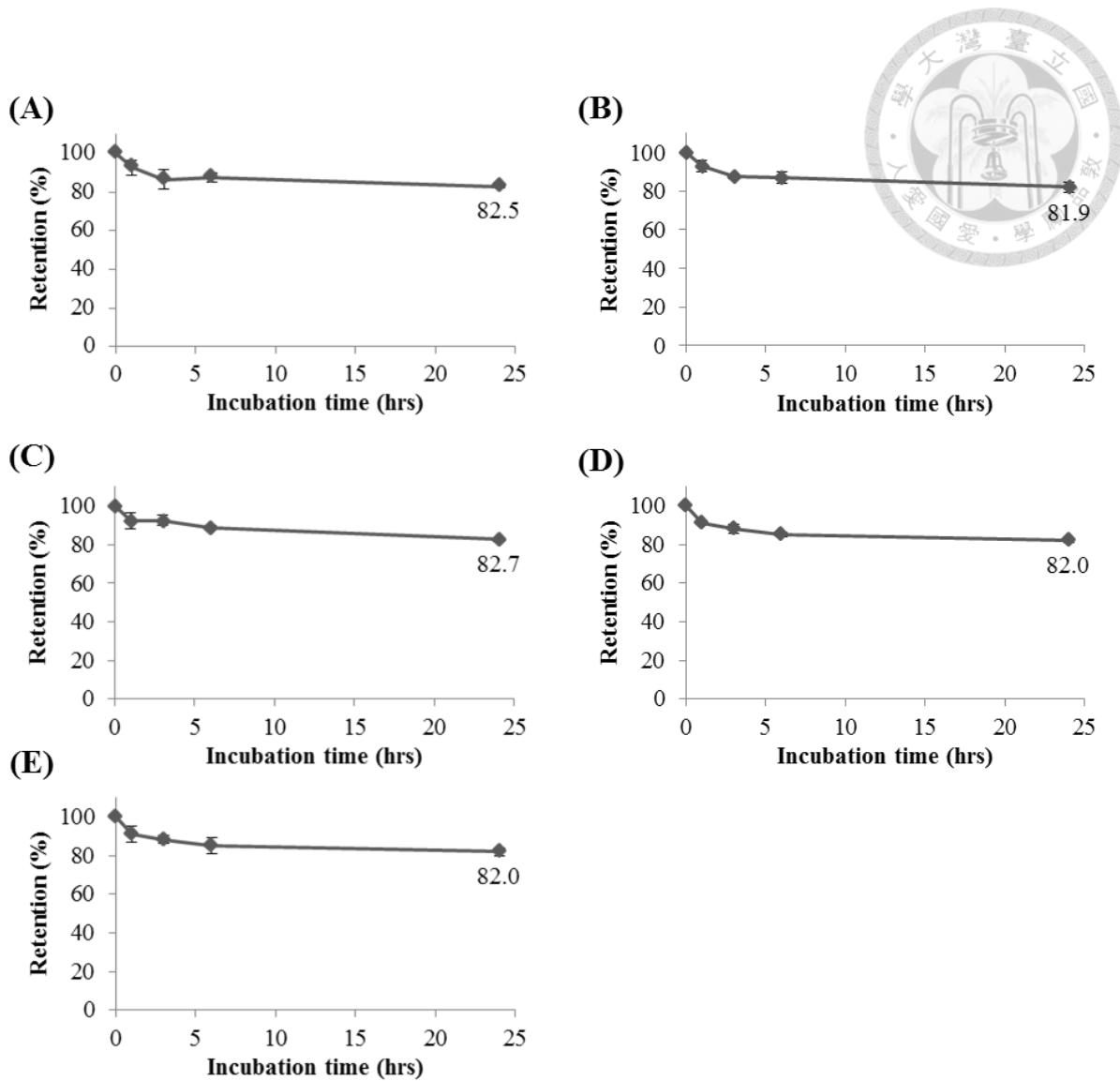


(B)



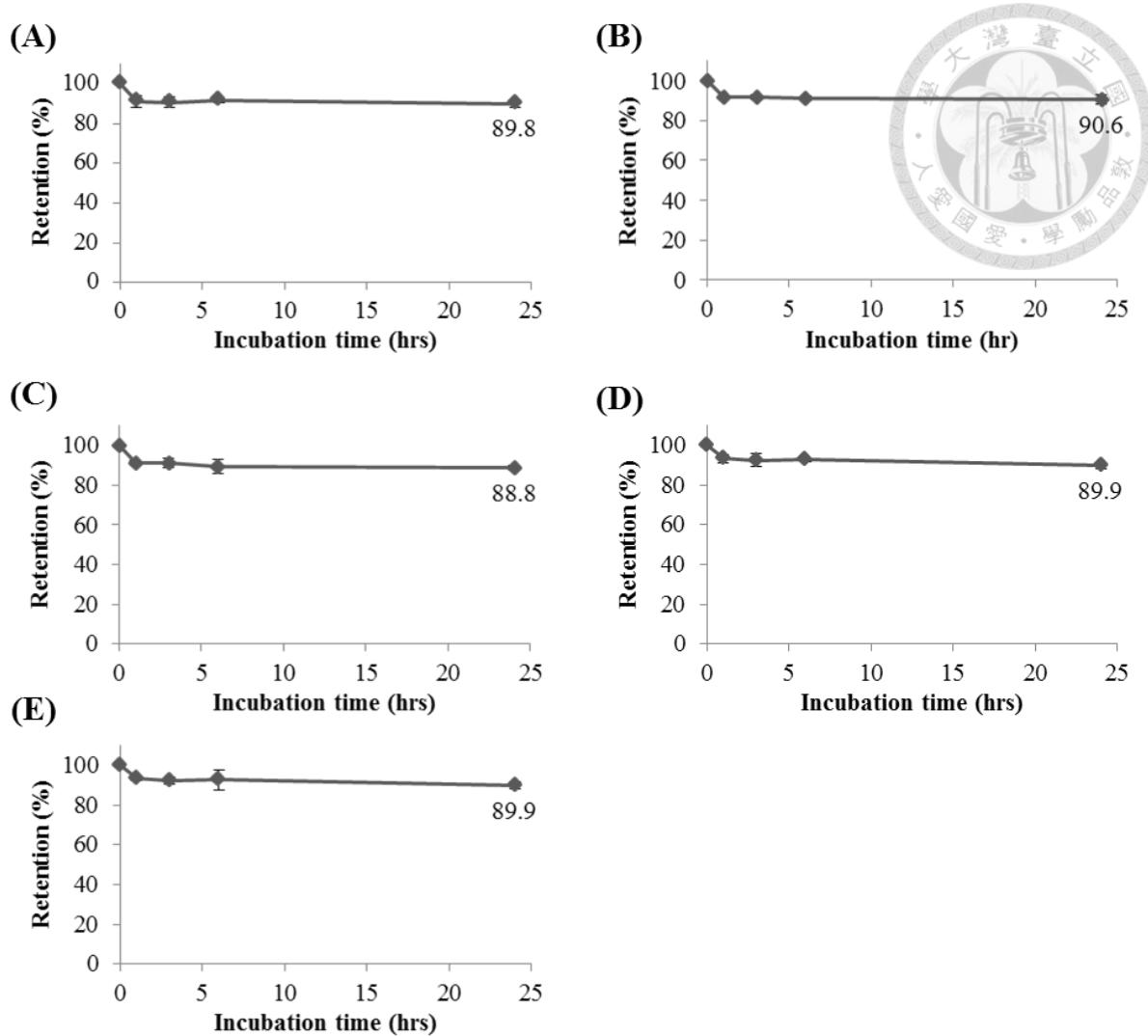
圖十、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 照光後粒徑(A)及分散指數(B)變化。

以 662 nm 雷射光源對 PL-cDDP-Ce6 進行照光 10 J/cm^2 後，於不同時間點(0、1、3、6、24、48 小時) 利用粒徑分析儀檢測微脂體粒徑大小(A)及粒徑多分散性指數(B)。以 t-test 分析照光後各時間點與照光前之差異(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, N=3)。



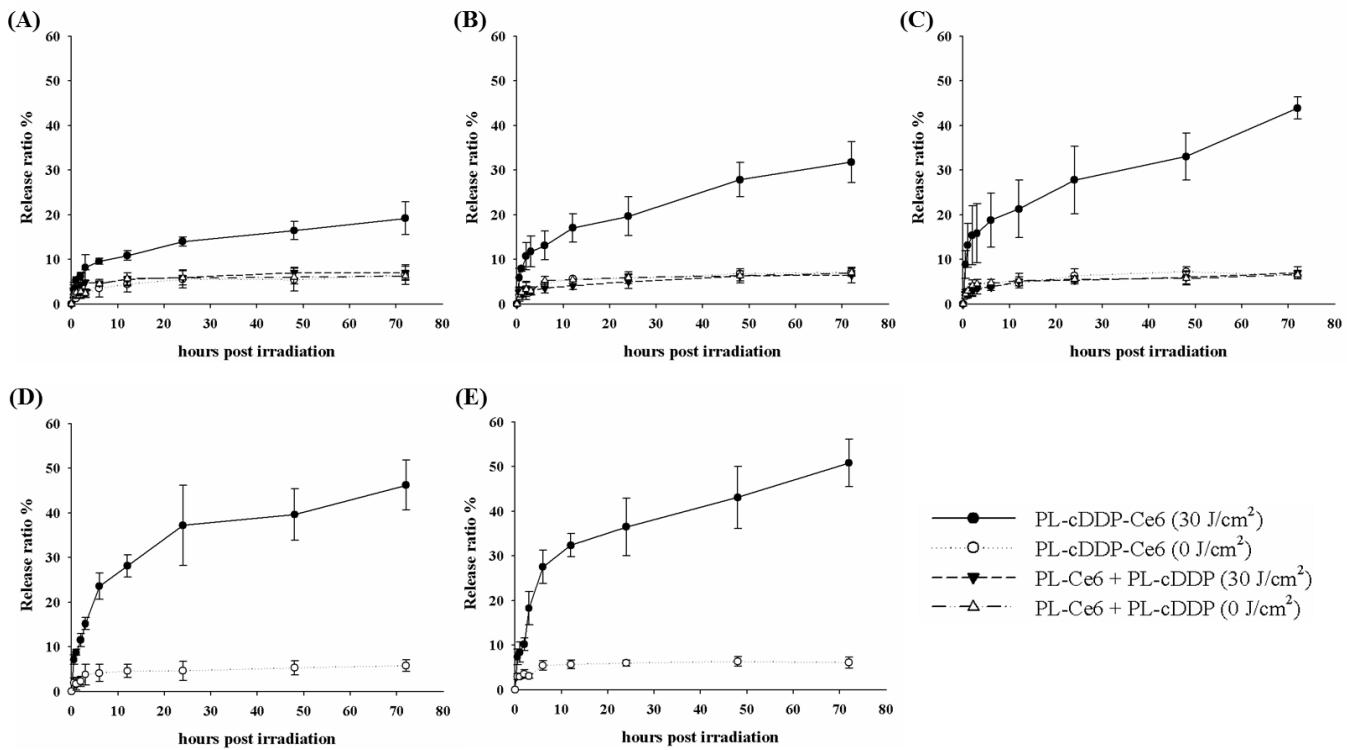
圖十一、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於血清中的穩定性 (Ce6 留存率)。

製作時加入(A) 0.4、(B) 0.8、(C) 1.2、(D) 1.6、(E) 2.4 mg Ce6 所製成之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 與 80% FBS 於 37°C 培養不同時間(0、1、3、6、24 小時)後，以 spin column 分離並分析微脂體內部的 Ce6 含量，以瞭解 PL-cDDP-Ce6 於血清中 Ce6 的留存穩定情況。(N=3)



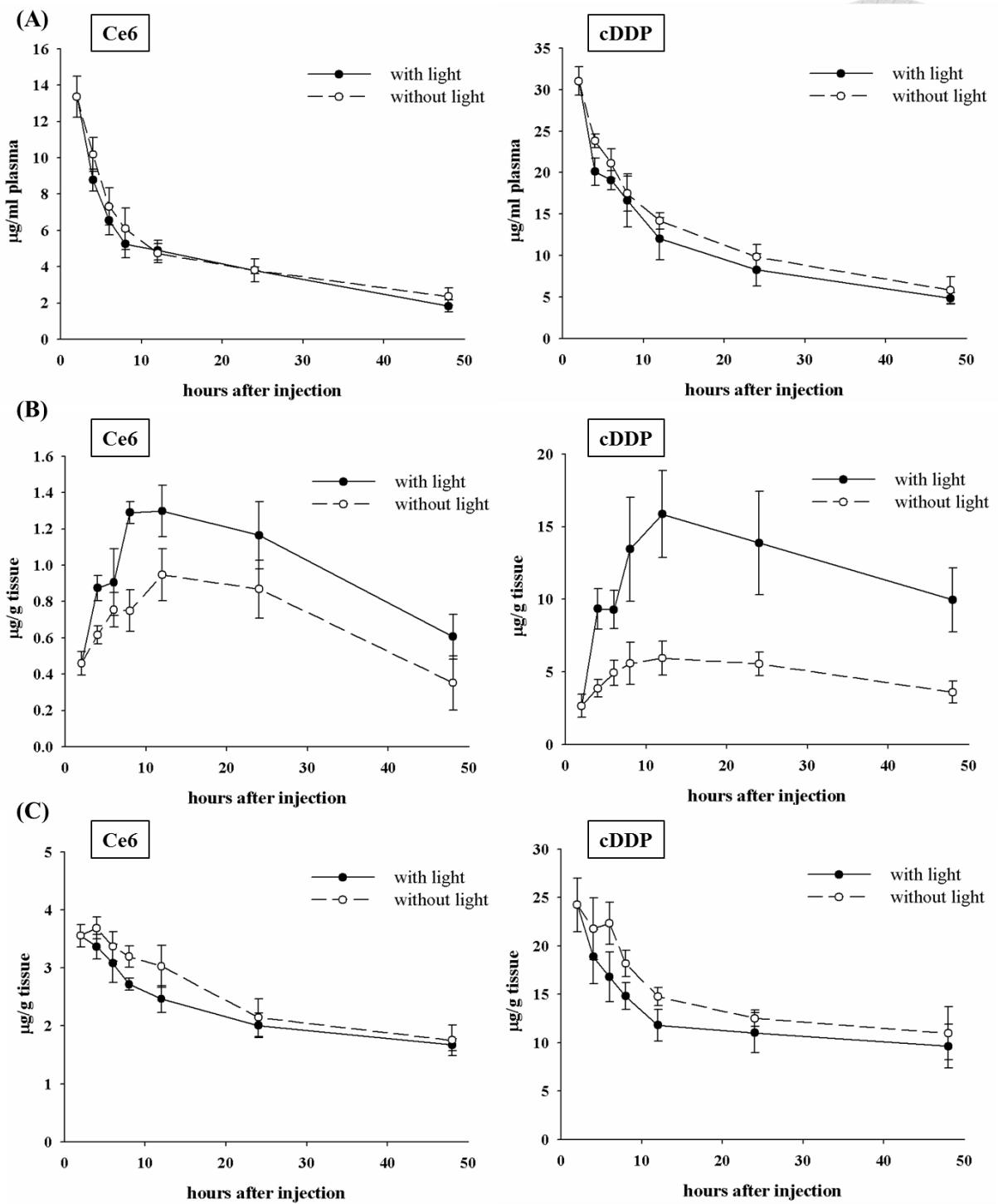
圖十二、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 於血清中的穩定性 (cDDP 留存率)。

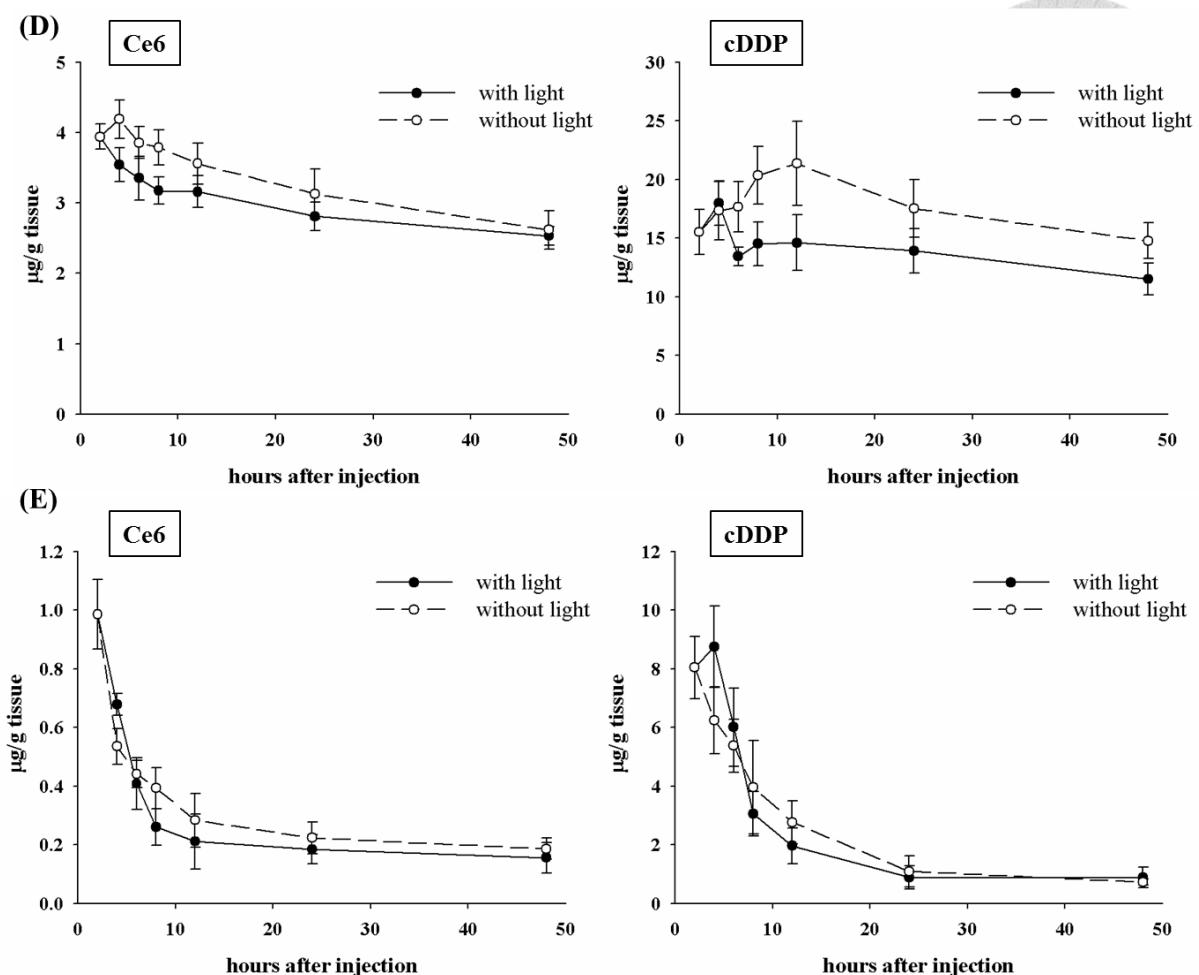
製作時加入(A) 0.4、(B) 0.8、(C) 1.2、(D) 1.6、(E) 2.4 mg Ce6 所製成之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 與 80% FBS 於 37°C 培養不同時間(0、1、3、6、24 小時)後，以 spin column 分離並分析微脂體內部的 cDDP 含量，以瞭解 PL-cDDP-Ce6 於血清中 cDDP 的留存穩定情況。(N=3)



圖十三、包覆不同 Ce6 量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 照光後 cDDP 釋放情形。

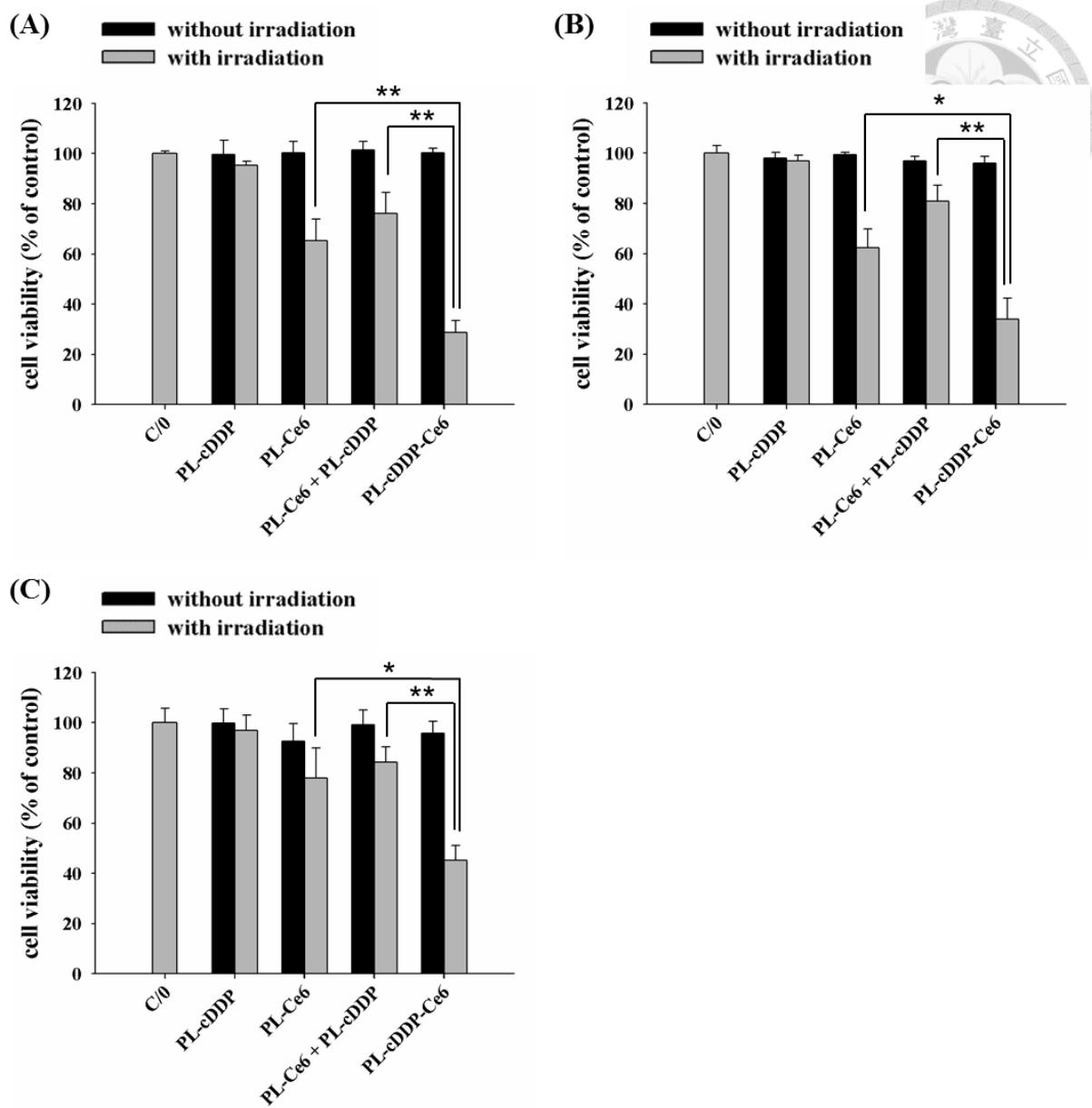
以 662 nm 雷射光源對包覆不同 Ce6 量之 PL-cDDP-Ce6 進行照光 30 J/cm² 後，裝入透析袋並置於 37°C 之 PBS 中，於不同時間點 (0、0.5、1、2、3、6、12、24、48、72 小時) 檢測透析液中 cDDP 含量，以瞭解 PL-cDDP-Ce6 照光處理後 cDDP 釋放情況。微脂體製備時加入之 Ce6 量：0.4 mg (A), 0.8 mg (B), 1.2 mg (C), 1.6 mg (D), 2.4 mg (E)。(N=3)。





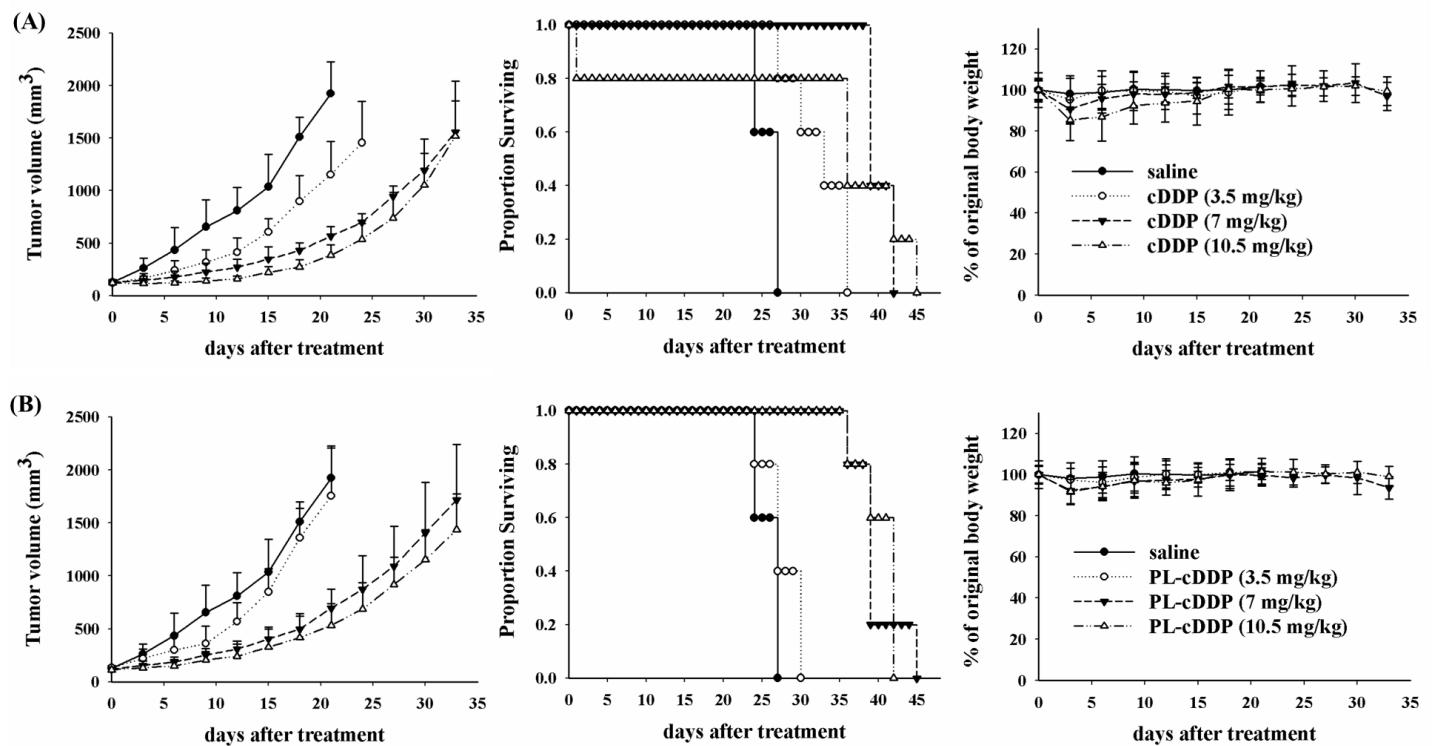
圖十四、靜脈注射雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 後，於第 2 小時進行照光治療，小鼠之組織器官藥物累積量變化。

BALB/c 小鼠皮下植入 C26 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1.75 mg/kg , cDDP: 3.62 mg/kg)。並在第 2 小時以 662 nm 雷射光源對腫瘤進行照光 100 J/cm^2 ，於不同時間點 (2、4、6、8、12、24、48 小時) 犺牲小鼠，並比較照光及不照光組別血漿(A)、腫瘤(B)、肝臟(C)、脾臟(D) 及腎臟(E)藥物分布情況。每組每時間點各 3 隻小鼠。



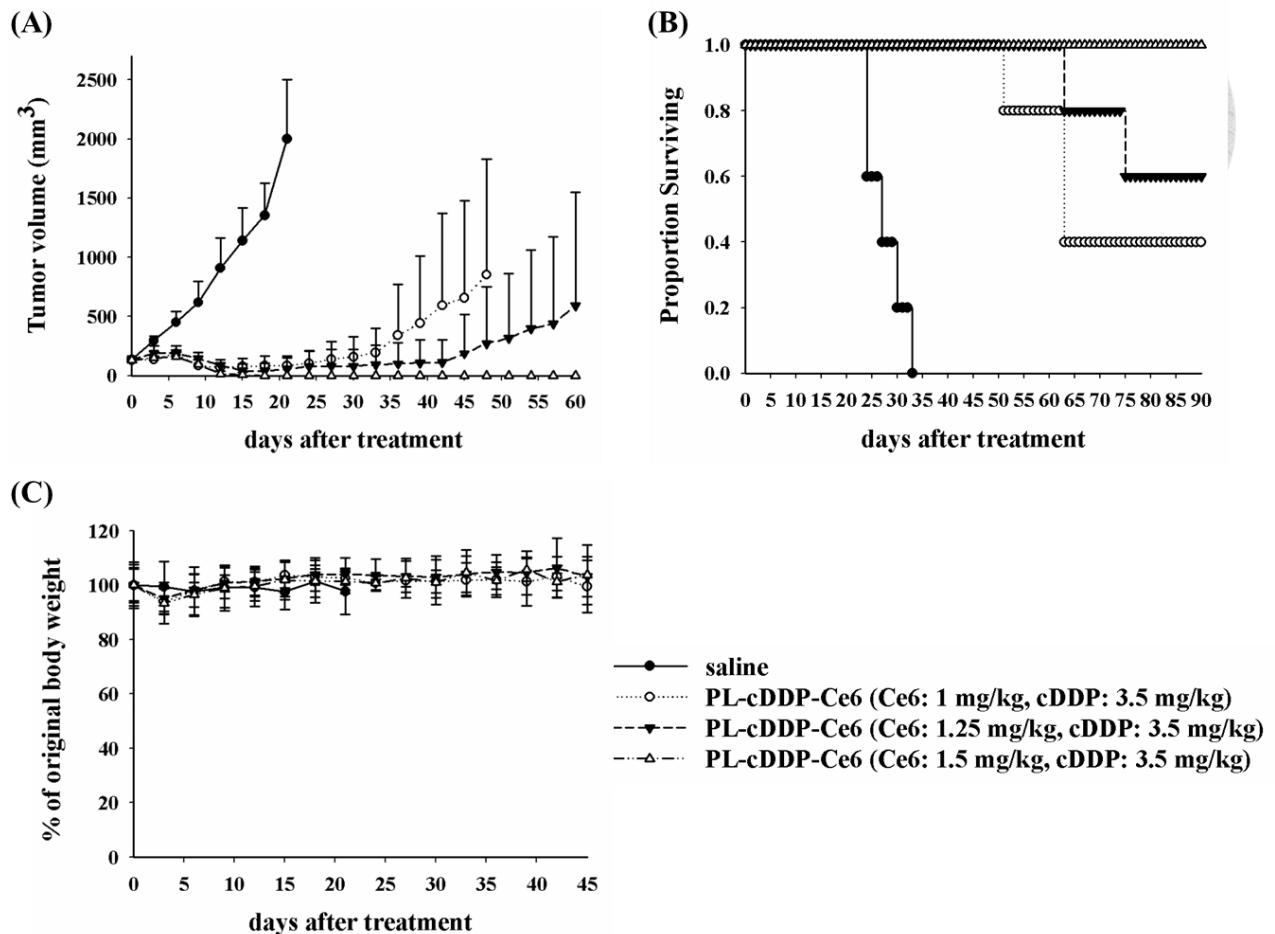
圖十五、雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對 MPNST cell lines (A) S462-TY 細胞，(B) ST8814 細胞，(C) T265 細胞之細胞毒殺效果。

(A) S462-TY5 細胞，(B) ST8814 細胞，(C) T265 細胞分別與 PL-cDDP、PL-Ce6、PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cDDP: 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 培養 2 小時後移除藥物，接著以 662 nm 雷射光源照光 $0.1 \text{ J}/\text{cm}^2$ ，於 24 小時後利用 MTT assay 檢測細胞毒殺效果。控制組為不加藥組別，其值訂為 100%。以 t-test 分析各組間差異 ($*P<0.05$, $**P<0.01$, N=3)。



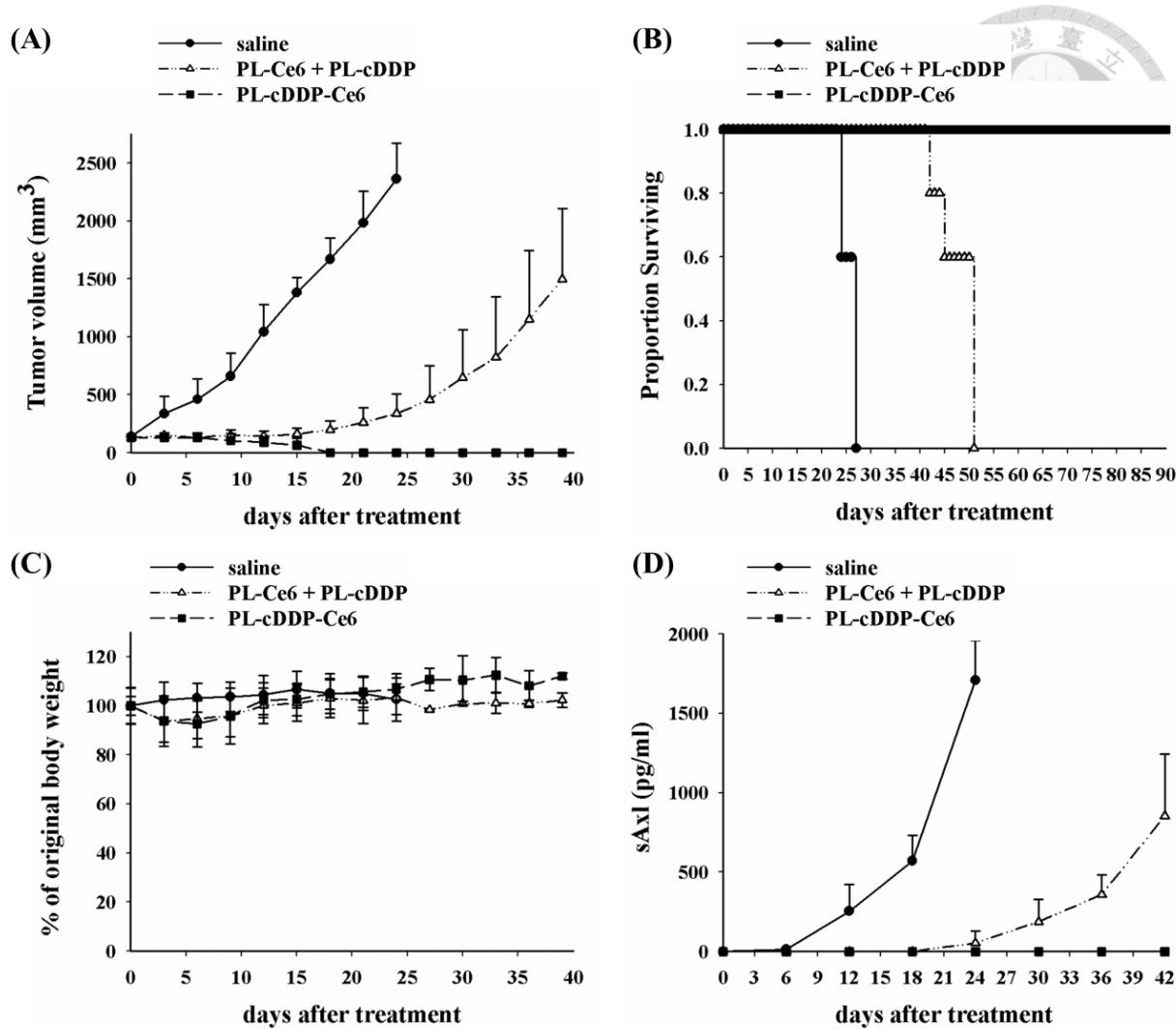
圖十六、(A) cDDP 及(B) PL-cDDP 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，其腫瘤大小，生存率，體重變化。

NU/NU 小鼠皮下植入 S462-TY 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 cDDP 或 PL-cDDP 進行治療，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小及體重變化，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線。除了 10.5 mg/kg cDDP 治療組為 4 隻小鼠外，其餘各組每組 5 隻小鼠。



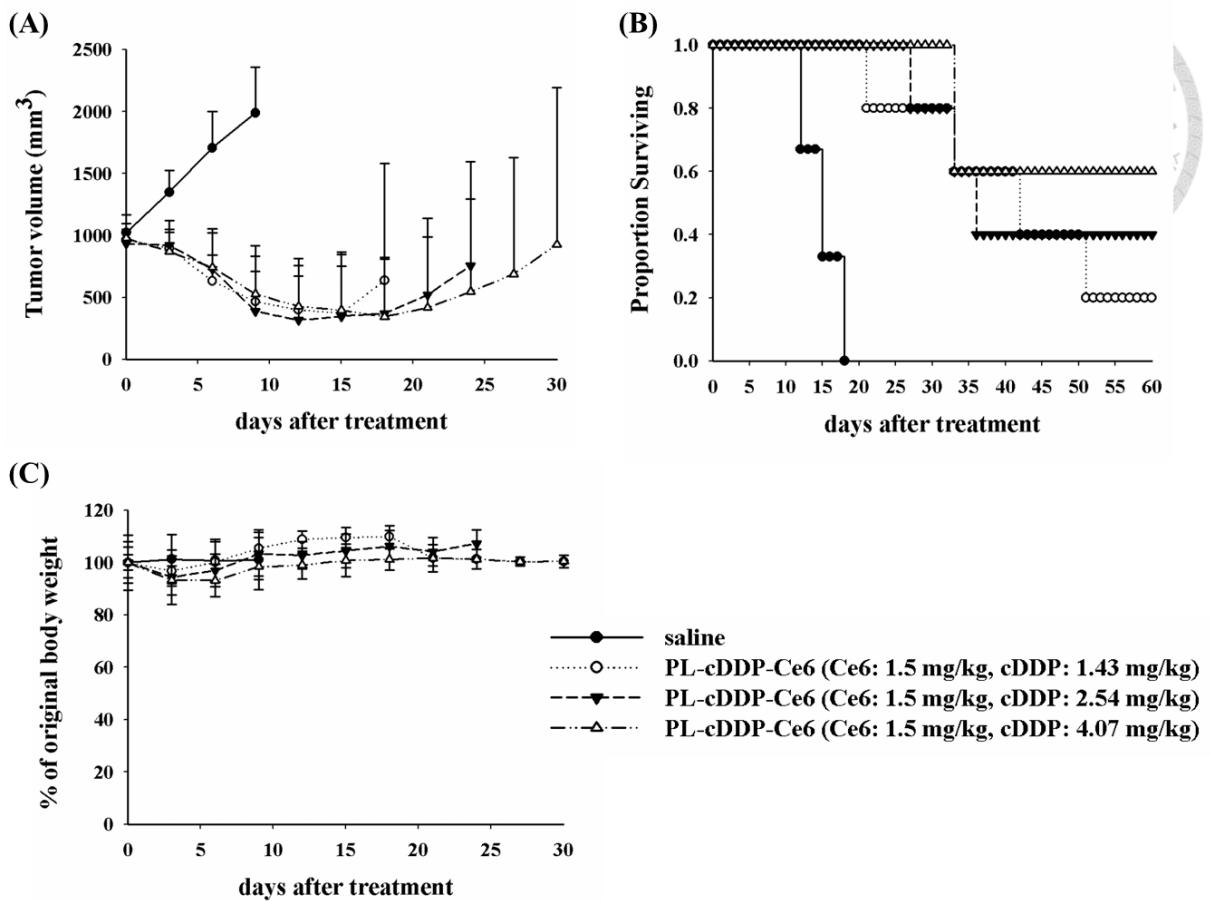
圖十七、以不同 Ce6 劑量之雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。

NU/NU 小鼠皮下植入 S462-TY 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入不同 Ce6 劑量(1 、 1.25 、 1.5 mg/kg)但相同 cDDP 劑量(3.5 mg/kg)之 PL-cDDP-Ce6 後，在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 ，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小(A)及體重變化(C)，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線(B)。每組各 5 隻小鼠。



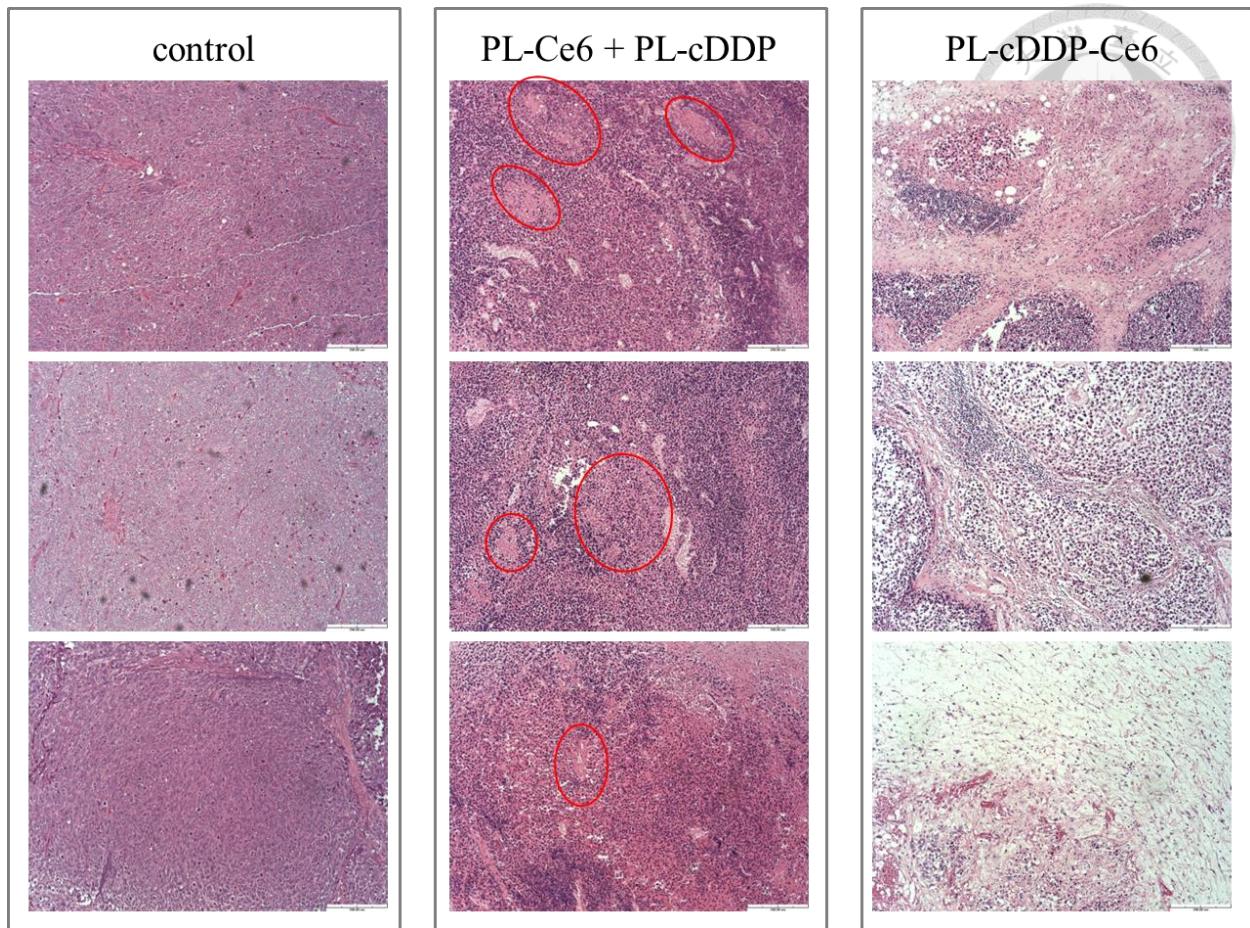
圖十八、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重，(D)血漿內 sAxl 變化。

NU/NU 小鼠皮下植入 S462-TY 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm³ 時，以尾部靜脈注射打入 PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1.5 mg/kg, cDDP: 3.5 mg/kg)，在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm²，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小(A)及體重變化(C)，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm³，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線(B)。每六天採取老鼠血液，測量血漿內 sAxl 濃度(D)。每組各 5 隻小鼠。



圖十九、S462-TY 腫瘤生長至 1000 mm^3 後，再以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 進行治療，小鼠 (A)腫瘤大小，(B)生存率，(C)體重變化。

NU/NU 小鼠皮下植入 S462-TY 腫瘤細胞，於腫瘤長至 1000 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入相同 Ce6 劑量(1.5 mg/kg)但不同 cDDP 劑量(1.43 、 2.54 、 4.07 mg/kg)之 PL-cDDP-Ce6 後，在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 ，控制組為施打 0.9% NaCl 組別。治療後每三天測量每隻老鼠之腫瘤大小(A)及體重變化(C)，當小鼠自然死亡或腫瘤體積超過 2500 mm^3 ，即視為死亡，作出 Kaplan-Meier 存活曲線(B)。每組各 5 隻小鼠。



圖二十、以雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 對植有 S462-TY 腫瘤之小鼠進行治療，治療後 72 小時之腫瘤切片。

NU/NU 小鼠皮下植入 S462-TY 腫瘤細胞，於腫瘤長至 100 mm^3 時，以尾部靜脈注射打入 0.9% NaCl 、PL-Ce6 + PL-cDDP 或 PL-cDDP-Ce6 (Ce6: 1.5 mg/kg, cDDP: 3.5 mg/kg)，在第 2 及第 12 小時以 662 nm 雷射光源進行照光 100 J/cm^2 。治療後 72 小時取下腫瘤，以石蠟包埋並切片，進行 H&E 染色觀察腫瘤組織死亡情況。紅圈處呈現局部壞死狀態。



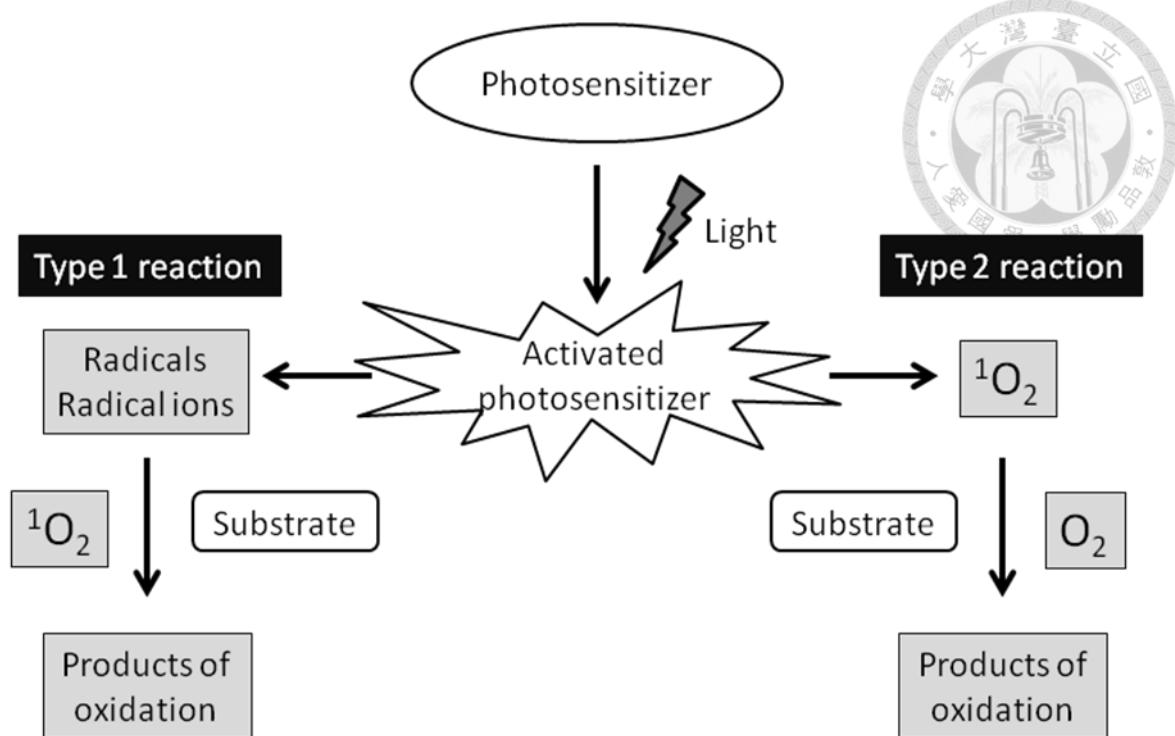
附表一、 SPI-077、Lipoplatin 及 PL-cDDP-Ce6 比較。

	SPI-077	Lipoplatin	PL-cDDP-Ce6
Lipid composition	HSPC, cholesterol, DSPE-PEG2000	HSPC, cholesterol, DPPG, DSPE-PEG2000	DSPC, cholesterol, DSPE-PEG2000
Drug-to-lipid weight ratio	1:70	1:10	1:60
Half-life in mice (hr)	16	7	18
Half-life in humans (hr)	80~145	60~117	
MTD (mg/m²)	420	300	
Clinical status	Phase II	Phase II, III	Preclinical
Indications	ovarian cancer, non-small cell lung cancer, head and neck cancer	pancreatic cancer, head and neck cancer, mesothelioma, breast cancer, gastric cancer, non-small cell lung cancer	
References	[59, 61, 63, 154-156, 160]	[60, 118, 157, 158, 161, 162]	



附表二、Temoporfin、Talaporfin 及 Chlorin e6 光動力治療比較。

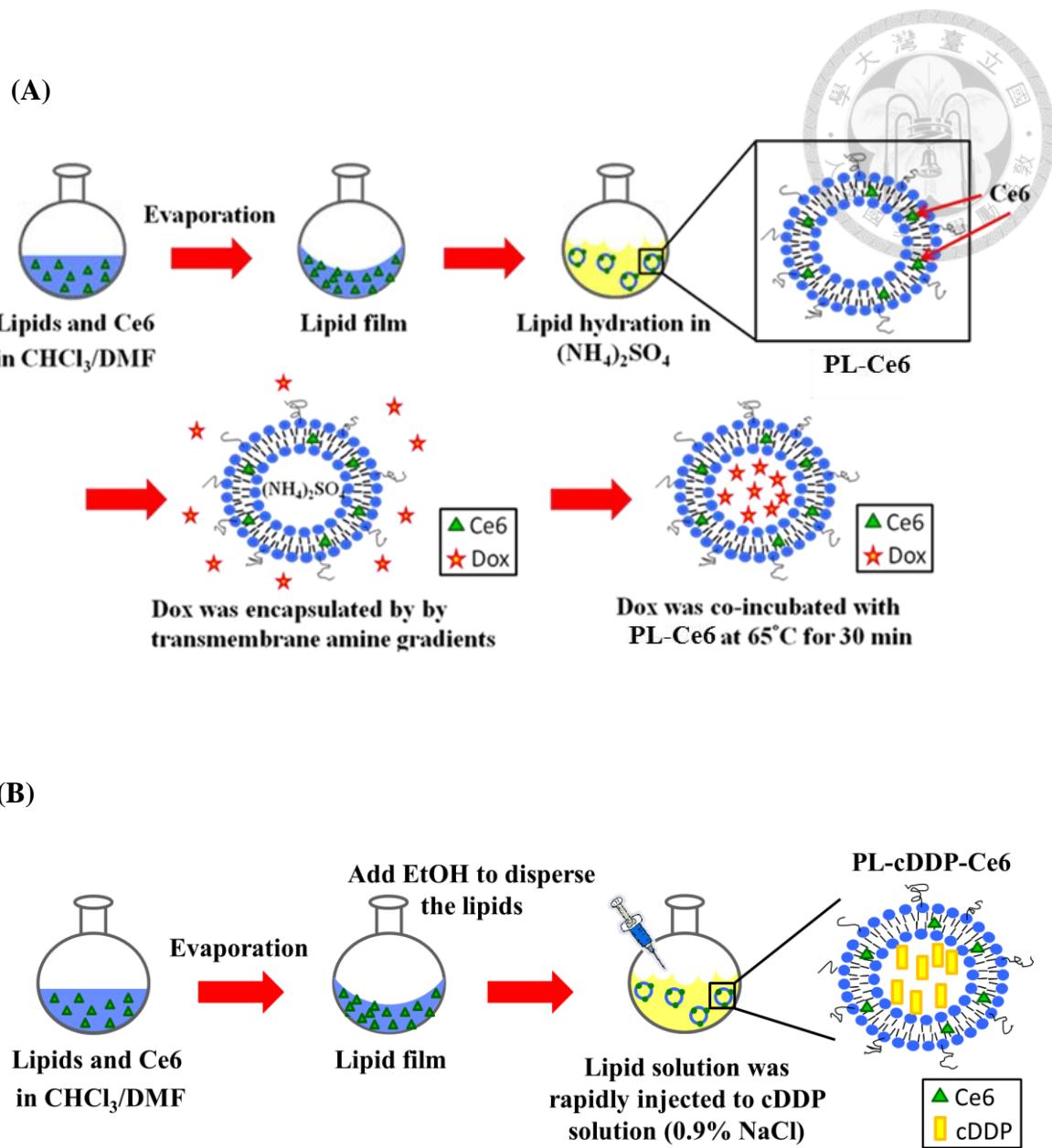
	Temoporfin	Talaporfin	Chlorin e6
Molecular structure			
Photosensitizer dose (mg/m²)	5.4	40	3~6 (in our studies)
λ_{max} (nm)	652	664	662
Light dose (J/cm²)	20	100~200	100 (in our studies)
Drug–light interval (hr)	96	0.25~4	2 & 12 (in our studies)
Application	Europe (2001): neck and head cancer	Japan (2003): lung cancer	
References	[69, 163]	[69, 159, 164]	



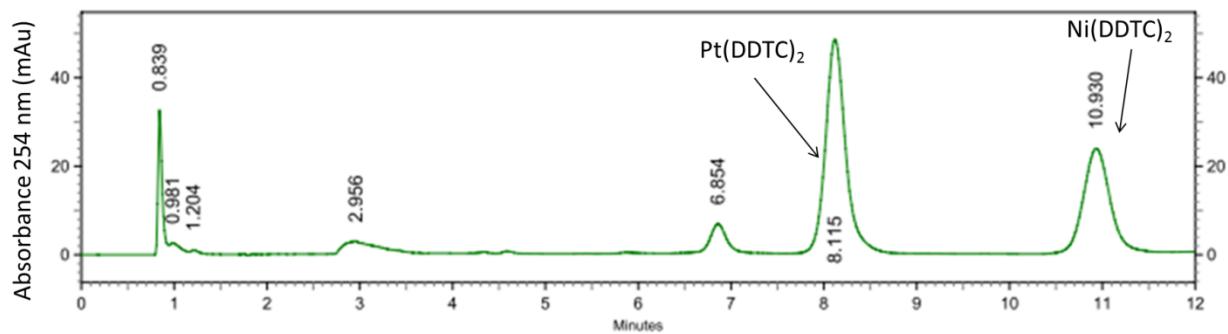
附圖一、光動力作用模式。

Basic phospholipid structure	Substituent (X)	Phospholipid/Characteristic	
	-H	hydrogen	PA anionic
		ethanolamine	PE zwitterionic
		choline	PC zwitterionic
		serine	PS anionic
		glycerol	PG anionic
		phosphatidylglycerol	CL anionic
		inositol	PI anionic

附圖二、常見的磷脂質化學結構 [16]。

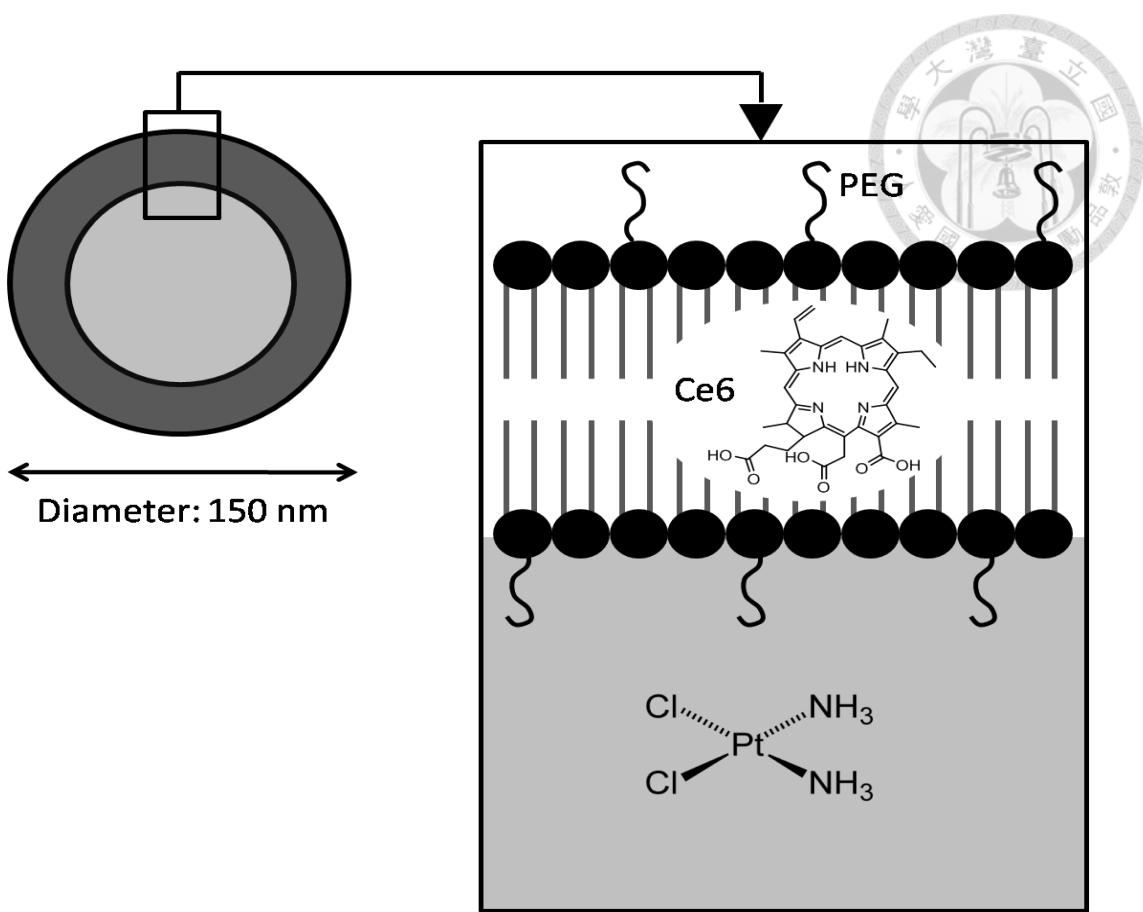


附圖三、(A) 雙效微脂體 PL-Dox-Ce6 的製備流程；(B)雙效微脂體 PL-cDDP-Ce6 的製備流程。



附圖四、以 HPLC 分析 Pt(DDTC)₂。

以 C18 column 分離，流洗條件 MeOH: H₂O= 3:1 (v/v)，流速 1 ml/min，並以 Photo-diode Array detector 偵測 254 nm 吸光值。8.1 min 的 peak 為 Pt(DDTC)₂，10.9 min 的 Peak 為 Ni(DDTC)₂。



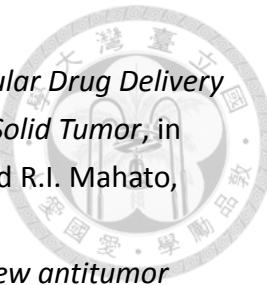
附圖五、雙效型微脂體 PL-cDDP-Ce6 示意圖。



參考文獻

1. 癌症登記線上互動查詢系統 <https://cris.hpa.gov.tw/default.aspx>. 中華民國衛生福利部國民健康署.
2. 民國102年死因統計年報 <http://www.mohw.gov.tw/cht/DOS/>. 中華民國衛生福利部統計處.
3. Cheng, X. and H. Chen, *Tumor heterogeneity and resistance to EGFR-targeted therapy in advanced nonsmall cell lung cancer: challenges and perspectives*. Onco Targets Ther, 2014. **7**: p. 1689-704.
4. Heldin, C.H., et al., *High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 806-13.
5. Raju, B., et al., *High interstitial fluid pressure in rat tongue cancer is related to increased lymph vessel area, tumor size, invasiveness and decreased body weight*. J Oral Pathol Med, 2008. **37**(3): p. 137-44.
6. Dylla, S.J., et al., *Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2428.
7. Lagasse, E., *Cancer stem cells with genetic instability: the best vehicle with the best engine for cancer*. Gene Ther, 2008. **15**(2): p. 136-42.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Malhotra, V. and M.C. Perry, *Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window*. Cancer Biol Ther, 2003. **2**(4 Suppl 1): p. S2-4.
10. Hesketh, P.J., *Chemotherapy-induced nausea and vomiting*. N Engl J Med, 2008. **358**(23): p. 2482-94.
11. Vidall, C., et al., *Evidence-based management of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a position statement from a European cancer nursing forum*. Ecancermedicalscience, 2011. **5**: p. 211.
12. Petros, R.A. and J.M. DeSimone, *Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(8): p. 615-27.
13. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. J Mol Biol, 1965. **13**(1): p. 238-52.
14. Bangham, A.D. and R.W. Horne, *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. J Mol Biol, 1964. **8**(5): p. 660-8.

15. Sessa, G. and Weissman.G, *Phospholipid Spherules (Liposomes) as a Model for Biological Membranes*. J Lipid Res, 1968. **9**(3): p. 310-8.
16. Aktas, M., et al., *Membrane lipids in Agrobacterium tumefaciens: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 109.
17. Allen, T.M. and L.G. Cleland, *Serum-induced leakage of liposome contents*. Biochim Biophys Acta, 1980. **597**(2): p. 418-26.
18. Koning, G.A., J.A. Kamps, and G.L. Scherphof, *Interference of macrophages with immunotargeting of liposomes*. J Liposome Res, 2002. **12**(1-2): p. 107-19.
19. Allen, T.M., *Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery*. Trends Pharmacol Sci, 1994. **15**(7): p. 215-20.
20. Ahmad, I., et al., *Antibody-Targeted Delivery of Doxorubicin Entrapped in Sterically Stabilized Liposomes Can Eradicate Lung-Cancer in Mice*. Cancer Res, 1993. **53**(7): p. 1484-8.
21. Lasch, J., V. Weissig, and M. Brandl, *Preparation of liposomes*, in *Liposomes: a practical approach (2nd ed.)*, V. Torchilin and V. Weissig, Editors. 2003, Oxford University Press: New York. p. 3-29.
22. Gregoria.G and B.E. Ryman, *Liposomes as Carriers of Enzymes or Drugs - New Approach to Treatment of Storage Diseases*. Biochemical Journal, 1971. **124**(5): p. P58-&.
23. Torchilin, V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(2): p. 145-60.
24. Drummond, D.C., et al., *Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 691-743.
25. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
26. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul, 2001. **41**: p. 189-207.
27. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 409-19.
28. Fang, J., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): p. 136-51.
29. Fang, J., T. Sawa, and H. Maeda, *Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS*.



- Adv Exp Med Biol, 2003. **519**: p. 29-49.
30. Seki, T., J. Fang, and H. Maeda, *Tumor-Targeted Macromolecular Drug Delivery Based on the Enhanced Permeability and Retention Effect in Solid Tumor*, in *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, Y. Lu and R.I. Mahato, Editors. 2009, Springer US. p. 93-120.
31. Arcamone, F., et al., *Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius*. Biotechnol Bioeng, 1969. **11**(6): p. 1101-10.
32. Cole, M.P., I.D. Todd, and P.M. Wilkinson, *A preliminary trial of doxorubicin in advanced breast cancer and other malignant disease*. Br J Cancer, 1974. **29**(2): p. 114-6.
33. Suppiah, R., et al., *Phase I/II study of docetaxel, ifosfamide, and doxorubicin in advanced, recurrent, or metastatic soft tissue sarcoma (STS)*. Invest New Drugs, 2006. **24**(6): p. 509-14.
34. Schiller, J.H., *Current standards of care in small-cell and non-small-cell lung cancer*. Oncology, 2001. **61 Suppl 1**: p. 3-13.
35. Kelland, L.R., *Emerging drugs for ovarian cancer*. Expert Opin Emerg Drugs, 2005. **10**(2): p. 413-24.
36. Crivellari, D., et al., *Breast cancer in the elderly*. J Clin Oncol, 2007. **25**(14): p. 1882-90.
37. Singal, P.K. and N. Iliskovic, *Doxorubicin-induced cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1998. **339**(13): p. 900-5.
38. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. Cancer, 2003. **97**(11): p. 2869-79.
39. Hong, R.L., et al., *Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial?* Clin Cancer Res, 1999. **5**(11): p. 3645-52.
40. Thompson, D.H., et al., *Triggerable plasmalogen liposomes: improvement of system efficiency*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1279**(1): p. 25-34.
41. Tseng, Y.L., J.J. Liu, and R.L. Hong, *Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(4): p. 864-72.
42. Bondurant, B., A. Mueller, and D.F. O'Brien, *Photoinitiated destabilization of sterically stabilized liposomes*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1511**(1): p. 113-22.
43. Daley-Yates, P.T. and D.C. McBrien, *Cisplatin metabolites in plasma, a study of their pharmacokinetics and importance in the nephrotoxic and antitumour*



- activity of cisplatin. Biochem Pharmacol, 1984. **33**(19): p. 3063-70.
44. Fossa, S.D., et al., *Prognostic factors in patients progressing after cisplatin-based chemotherapy for malignant non-seminomatous germ cell tumours*. Br J Cancer, 1999. **80**(9): p. 1392-9.
45. Armstrong, D.K., et al., *Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 34-43.
46. Peyrone, M., *Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür*. Justus Liebigs Ann. Chem., 1844. **51**(1): p. 1-29.
47. Pinto, A.L. and S.J. Lippard, *Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA*. Biochim Biophys Acta, 1985. **780**(3): p. 167-80.
48. Fuertes, M.A., C. Alonso, and J.M. Perez, *Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance*. Chem Rev, 2003. **103**(3): p. 645-62.
49. Fuertes, M.A., et al., *Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways*. Curr Med Chem, 2003. **10**(3): p. 257-66.
50. Bramwell, V.H., et al., *Neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin and cisplatin in malignant fibrous histiocytoma of bone: A European Osteosarcoma Intergroup study*. J Clin Oncol, 1999. **17**(10): p. 3260-9.
51. Lyass, O., A. Hubert, and A.A. Gabizon, *Phase I study of doxil-cisplatin combination chemotherapy in patients with advanced malignancies*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3040-6.
52. Humber, C.E., et al., *Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 409-20.
53. Oze, I., et al., *Twenty-seven years of phase III trials for patients with extensive disease small-cell lung cancer: disappointing results*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7835.
54. Krakoff, I.H., *Nephrotoxicity of cis-dichlorodiammineplatinum(II)*. Cancer Treat Rep, 1979. **63**(9-10): p. 1523-5.
55. Potkul, R.K., et al., *Toxicities in rats with free versus liposomal encapsulated cisplatin*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(2): p. 652-8.
56. Arany, I. and R.L. Safirstein, *Cisplatin nephrotoxicity*. Semin Nephrol, 2003. **23**(5): p. 460-4.
57. Coradini, P.P., et al., *Ototoxicity from cisplatin therapy in childhood cancer*. J Pediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(6): p. 355-60.
58. Steerenberg, P.A., et al., *Liposomes as drug carrier system for*

- cis-diamminedichloroplatinum (II). II. Antitumor activity in vivo, induction of drug resistance, nephrotoxicity and Pt distribution.* Cancer Chemother Pharmacol, 1988. **21**(4): p. 299-307.
59. White, S.C., et al., *Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer.* Br J Cancer, 2006. **95**(7): p. 822-8.
60. Boulikas, T., *Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin.* Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(8): p. 1197-218.
61. Newman, M.S., et al., *Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice.* Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43**(1): p. 1-7.
62. Vail, D.M., et al., *STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial.* Cancer Chemother Pharmacol, 2002. **50**(2): p. 131-6.
63. Zamboni, W.C., et al., *Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma.* Cancer Chemother Pharmacol, 2004. **53**(4): p. 329-36.
64. Gomer, C.J., et al., *Properties and applications of photodynamic therapy.* Radiat Res, 1989. **120**(1): p. 1-18.
65. Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 380-7.
66. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update.* CA Cancer J Clin, 2011. **61**(4): p. 250-81.
67. Foote, C.S., *Mechanisms of Photosensitized Oxidation - There Are Several Different Types of Photosensitized Oxidation Which May Be Important in Biological Systems.* Science, 1968. **162**(3857): p. 963-&.
68. Peng, Q., J. Moan, and J.M. Nesland, *Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy.* Ultrastruct Pathol, 1996. **20**(2): p. 109-129.
69. Ormond, A.B. and H.S. Freeman, *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy.* Materials, 2013. **6**(3): p. 817-40.
70. MacRobert, A.J., S.G. Bown, and D. Phillips, *What Are the Ideal Photoproperties for a Sensitizer?, in Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use*, G. Bock and S. Harnett, Editors. 1989, Wiley: Chichester. p. 4-16.

71. Boyle, R.W. and D. Dolphin, *Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers*. Photochem Photobiol, 1996. **64**(3): p. 469-85.
72. Nyman, E.S. and P.H. Hynninen, *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*. J Photoch Photobio B, 2004. **73**(1-2): p. 1-28.
73. Derycke, A.S. and P.A. de Witte, *Liposomes for photodynamic therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(1): p. 17-30.
74. Muehlmann, L.A., et al., *Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy*. Braz J Med Biol Res, 2011. **44**(8): p. 729-37.
75. Tsai, T., et al., *Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles*. Lasers Surg Med, 2009. **41**(4): p. 316-22.
76. Jin, C.S. and G. Zheng, *Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery*. Lasers Surg Med, 2011. **43**(7): p. 734-48.
77. Damoiseau, X., et al., *Increase of the photosensitizing efficiency of the Bacteriochlorin a by liposome-incorporation*. J Photochem Photobiol B, 2001. **60**(1): p. 50-60.
78. Yang, Y.T., et al., *Photodynamic inactivation of chlorin e6-loaded CTAB-liposomes against Candida albicans*. Lasers Surg Med, 2013. **45**(3): p. 175-85.
79. Namiki, Y., et al., *Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome*. Pharmacol Res, 2004. **50**(1): p. 65-76.
80. Miller, S.J., et al., *Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2584-91.
81. Rasmussen, S.A., Q. Yang, and J.M. Friedman, *Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(5): p. 1110-8.
82. Abuelo, D., *Neurofibromatosis: Phenotype, natural history, and pathogenesis, 3rd edition*. J Dev Behav Pediatr, 2002. **23**(2): p. 117-8.
83. Wong, W.W., et al., *Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **42**(2): p. 351-60.
84. Rosenbaum, T., K.M. Patrie, and N. Ratner, *Neurofibromatosis type 1: Genetic and cellular mechanisms of peripheral nerve tumor formation*. Neuroscientist, 1997. **3**(6): p. 412-20.
85. Morioka, N., et al., *A case of neurofibrosarcoma associated with neurofibromatosis: light microscopic, ultrastructural, immunohistochemical*



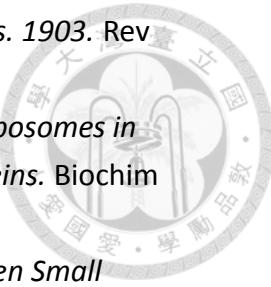
- and biochemical investigations.* J Dermatol, 1990. **17**(5): p. 312-6.
86. Ferner, R.E. and D.H. Gutmann, *International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis.* Cancer Res, 2002. **62**(5): p. 1573-7.
87. Fishbein, L., et al., *Analysis of somatic NF1 promoter methylation in plexiform neurofibromas and Schwann cells.* Cancer Genet Cytogenet, 2005. **157**(2): p. 181-6.
88. Menon, A.G., et al., *Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5435-9.
89. Nielsen, G.P., et al., *Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation.* Am J Pathol, 1999. **155**(6): p. 1879-84.
90. Holtkamp, N., et al., *EGFR and erbB2 in malignant peripheral nerve sheath tumors and implications for targeted therapy.* Neuro Oncol, 2008. **10**(6): p. 946-57.
91. Sheela, S., V.M. Riccardi, and N. Ratner, *Angiogenic and invasive properties of neurofibroma Schwann cells.* J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 645-53.
92. Ferner, R.E., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1.* J Med Genet, 2007. **44**(2): p. 81-8.
93. Ducatman, B.S., et al., *Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases.* Cancer, 1986. **57**(10): p. 2006-21.
94. Widemann, B.C., et al., *Phase I trial and pharmacokinetic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in children with refractory solid tumors or neurofibromatosis type I and plexiform neurofibromas.* J Clin Oncol, 2006. **24**(3): p. 507-16.
95. Gupta, A., et al., *Phase I study of thalidomide for the treatment of plexiform neurofibroma in neurofibromatosis 1.* Neurology, 2003. **60**(1): p. 130-2.
96. Riccardi, V.M., *A controlled multiphase trial of ketotifen to minimize neurofibroma-associated pain and itching.* Arch Dermatol, 1993. **129**(5): p. 577-81.
97. Riccardi, V.M., *Mast-cell stabilization to decrease neurofibroma growth. Preliminary experience with ketotifen.* Arch Dermatol, 1987. **123**(8): p. 1011-6.
98. Mantripragada, K.K., et al., *High-resolution DNA copy number profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors using targeted microarray-based comparative genomic hybridization.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 1015-24.
99. Verma, A., et al., *Targeting Axl and Mer kinases in cancer.* Mol Cancer Ther,



2011. **10**(10): p. 1763-73.
100. Li, R.H., et al., *Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells*. J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2012-9.
101. Nielsen-Preiss, S.M., et al., *Adhesion-related kinase induction of migration requires phosphatidylinositol-3-kinase and ras stimulation of rac activity in immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal cells*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2806-14.
102. Weiner, T.M., et al., *Expression of growth factor receptors, the focal adhesion kinase, and other tyrosine kinases in human soft tissue tumors*. Ann Surg Oncol, 1994. **1**(1): p. 18-27.
103. Mahadevan, D., et al., *A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors*. Oncogene, 2007. **26**(27): p. 3909-19.
104. Liu, L., et al., *Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6871-8.
105. Barenholz, Y., *Liposome application: problems and prospects*. Curr Opin Colloid In, 2001. **6**(1): p. 66-77.
106. Tsai, Y.C., *Investigation of dual-effect liposome in inhibiting tumor growth*. , in *Institute of Microbiology and Biochemistry* 2009, National Taiwan University: Taiwan.
107. Peng, P.C., *Fabricated dual-effect liposome for tumor treatment in C26 tumor-bearing mice*. , in *Institute of Microbiology and Biochemistry* 2010, National Taiwan University: Taiwan.
108. Laginha, K.M., et al., *Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(19 Pt 1): p. 6944-9.
109. Koppel, D.E., *Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants*. J Chem Phys, 1972. **57**(11): p. 4814-6.
110. Snyder, J.W., et al., *Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8126-31.
111. Gewirtz, D.A., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(7): p. 727-41.
112. Lopes de Menezes, D.E., et al., *Cellular Trafficking and Cytotoxicity of Anti-Cd19-Targeted Liposomal Doxorubicin in B Lymphoma Cells*. J Liposome Res, 1999. **9**(2): p. 199-228.
113. Terasaki, T., et al., *Nuclear-Binding as a Determinant of Tissue Distribution of*

Adriamycin, Daunomycin, Adriamycinol, Daunorubicinol and Actinomycin-D. J Pharmacobiodyn, 1984. **7**(5): p. 269-77.

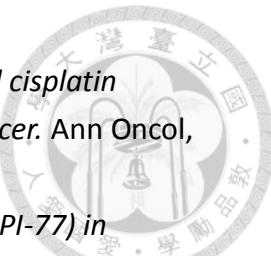
114. Marafino, B.J., Jr., S.N. Giri, and D.M. Siegel, *Pharmacokinetics, covalent binding and subcellular distribution of [3H]doxorubicin after intravenous administration in the mouse*. J Pharmacol Exp Ther, 1981. **216**(1): p. 55-61.
115. Peng, P.C., et al., *Dual-effect liposomes encapsulated with doxorubicin and chlorin e6 augment the therapeutic effect of tumor treatment*. Lasers Surg Med, 2015. **47**(1): p. 77-87.
116. Lee, S.C., et al., *The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated Retinol*. J Liposome Res, 2005. **15**(3-4): p. 157-66.
117. Liu, D., et al., *Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 3309-19.
118. Stathopoulos, G.P. and T. Boulikas, *Lipoplatin formulation review article*. J Drug Deliv, 2012. **2012**: p. 581363.
119. Blume, G. and G. Cevc, *Liposomes for the sustained drug release in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1029**(1): p. 91-7.
120. Lee, H.W., *The optimization of dual-effect liposome encapsulated Ce6 and chemotherapeutic drugs, cisplatin or doxorubicin*, in *Department of Biochemical Science and Technology* 2013, National Taiwan University: Taiwan.
121. Nes, W.R., *Role of sterols in membranes*. Lipids, 1974. **9**(8): p. 596-612.
122. Dos Santos, N., et al., *Improved retention of idarubicin after intravenous injection obtained for cholesterol-free liposomes*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1561**(2): p. 188-201.
123. Mojzisova, H., et al., *Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(11): p. 2748-56.
124. Dos Santos, N., et al., *pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1661**(1): p. 47-60.
125. Barenholz, Y., *Amphipathic weak base loading into preformed liposomes having a transmembrane ammonium ion gradient: From the bench to approved DOXIL*, in *Liposome Technology*, G. Gregoriadis, Editor. 2007, Informa Healthcare: New York p. 1-25.
126. Schroit, A.J., J. Madsen, and R. Nayar, *Liposome-cell interactions: in vitro discrimination of uptake mechanism and in vivo targeting strategies to mononuclear phagocytes*. Chem Phys Lipids, 1986. **40**(2-4): p. 373-93.
127. Wright, A.E., S.R. Douglas, and J.B. Sanderson, *An experimental investigation*



- of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. 1903. Rev Infect Dis, 1989. 11(5): p. 827-34.*
128. Scherphof, G., et al., *Disintegration of Phosphatidylcholine Liposomes in Plasma as a Result of Interaction with High-Density Lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 1978. **542**(2): p. 296-307.
129. Scherphof, G., et al., *Exchange of Phosphatidylcholine between Small Unilamellar Liposomes and Human-Plasma High-Density Lipoprotein Involves Exclusively the Phospholipid in the Outer Monolayer of the Liposomal Membrane*. Biochim Biophys Acta, 1983. **732**(3): p. 595-9.
130. Allen, T.M., *A Study of Phospholipid Interactions between High-Density Lipoproteins and Small Unilamellar Vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1981. **640**(2): p. 385-97.
131. Chin, W.W., et al., *Fluorescence imaging and phototoxicity effects of new formulation of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone*. J Photochem Photobiol B, 2006. **84**(2): p. 103-10.
132. Chin, W.W., et al., *Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(3): p. 1083-93.
133. Kostenich, G., et al., *Monitoring PDT-induced damage using spectrally resolved reflectance imaging of tissue oxygenation*. Cancer Lett, 2005. **219**(2): p. 169-75.
134. Pegaz, B., et al., *Preclinical evaluation of a novel water-soluble chlorin E6 derivative (BLC 1010) as photosensitizer for the closure of the neovessels*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(6): p. 1505-10.
135. Shackley, D.C., et al., *Light penetration in bladder tissue: implications for the intravesical photodynamic therapy of bladder tumours*. BJU Int, 2000. **86**(6): p. 638-43.
136. Sugiyama, I. and Y. Sadzuka, *Correlation of fixed aqueous layer thickness around PEG-modified liposomes with in vivo efficacy of antitumor agent-containing liposomes*. Curr Drug Discov Technol, 2011. **8**(4): p. 357-66.
137. Sadzuka, Y., et al., *Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome*. Int J Pharm, 2002. **238**(1-2): p. 171-80.
138. Dan, N., *Effect of liposome charge and PEG polymer layer thickness on cell-liposome electrostatic interactions*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1564**(2): p. 343-8.
139. Sadzuka, Y., et al., *The phototoxicity of photofrin was enhanced by PEGylated liposome in vitro*. Cancer Lett, 2006. **241**(1): p. 42-8.



140. Cheng, C., et al., *Photodynamic therapy selectively enhances liposomal doxorubicin uptake in sarcoma tumors to rodent lungs*. Lasers Surg Med, 2010. **42**(5): p. 391-9.
141. Fingar, V.H., *Vascular effects of photodynamic therapy*. J Clin Laser Med Surg, 1996. **14**(5): p. 323-8.
142. Debefve, E., et al., *Video monitoring of neovessel occlusion induced by photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne), in the CAM model*. Angiogenesis, 2008. **11**(3): p. 235-43.
143. Perentes, J.Y., et al., *Low-Dose Vascular Photodynamic Therapy Decreases Tumor Interstitial Fluid Pressure, which Promotes Liposomal Doxorubicin Distribution in a Murine Sarcoma Metastasis Model*. Transl Oncol, 2014.
144. Wang, Y., et al., *Photodynamic induced uptake of liposomal doxorubicin to rat lung tumors parallels tumor vascular density*. Lasers Surg Med, 2012. **44**(4): p. 318-24.
145. Selbo, P.K., et al., *Multi-modality therapeutics with potent anti-tumor effects: photochemical internalization enhances delivery of the fusion toxin scFvMEL/rGel*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6691.
146. Woodhams, J., et al., *Intracellular re-localisation by photochemical internalisation enhances the cytotoxic effect of gelonin--quantitative studies in normal rat liver*. J Control Release, 2010. **142**(3): p. 347-53.
147. Norum, O.J., et al., *Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine*. J Photochem Photobiol B, 2009. **96**(2): p. 83-92.
148. Norum, O.J., et al., *Photochemical internalization of bleomycin before external-beam radiotherapy improves locoregional control in a human sarcoma model*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **75**(3): p. 878-85.
149. Norum, O.J., et al., *Photochemical internalization of bleomycin is superior to photodynamic therapy due to the therapeutic effect in the tumor periphery*. Photochem Photobiol, 2009. **85**(3): p. 740-9.
150. Raemdonck, K., et al., *Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization*. J Control Release, 2010. **145**(3): p. 281-8.
151. Pluim, D., et al., *32P-postlabeling assay for the quantification of the major platinum-DNA adducts*. Anal Biochem, 1999. **275**(1): p. 30-8.
152. Teicher, B.A., *Tumor models for efficacy determination*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(10): p. 2435-43.
153. <http://www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian>.
154. Meerum Terwogt, J.M., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of SPI-77, a liposomal encapsulated dosage form of cisplatin*. Cancer Chemother



- Pharmacol, 2002. **49**(3): p. 201-10.
155. Harrington, K.J., et al., *Phase I-II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077 (TM)) in patients with inoperable head and neck cancer*. Ann Oncol, 2001. **12**(4): p. 493-496.
156. Seetharamu, N., et al., *Phase II study of liposomal cisplatin (SPI-77) in platinum-sensitive recurrences of ovarian cancer*. Anticancer Res, 2010. **30**(2): p. 541-5.
157. Boulikas, T., et al., *Systemic Lipoplatin infusion results in preferential tumor uptake in human studies*. Anticancer Res, 2005. **25**(4): p. 3031-9.
158. Stathopoulos, G.P., et al., *Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(4): p. 945-50.
159. Wang, S., et al., *Talaporfin sodium*. Expert Opin Pharmacother, 2010. **11**(1): p. 133-40.
160. Bandak, S., et al., *Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long-circulating liposomes in mouse tumor models*. Anticancer Drugs, 1999. **10**(10): p. 911-20.
161. Veal, G.J., et al., *A phase I study in paediatric patients to evaluate the safety and pharmacokinetics of SPI-77, a liposome encapsulated formulation of cisplatin*. Br J Cancer, 2001. **84**(8): p. 1029-35.
162. Devarajan, P., et al., *Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals*. Anticancer Res, 2004. **24**(4): p. 2193-200.
163. Allison, R.R., et al., *Photosensitizers in clinical PDT*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2004. **1**(1): p. 27-42.
164. Kato, H., et al., *Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung*. Lung Cancer, 2003. **42**(1): p. 103-11.