

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系碩士班



碩士論文

Department of Biochemical Science & Technology

College of Life Science

National Taiwan University

master thesis

Tacrolimus 眼用微胞劑型之開發

Development of Ophthalmic Tacrolimus-loaded

Micellar Formulations

柯蘊恬

Yun Tien Ko

指導教授：陳進庭 教授

Chin Tin Chen, Ph.D.

中華民國 110 年 7 月

July, 2021



## 謝辭

兩年很漫長、卻也轉瞬即逝，曾經以為跨不過的坎，還有那些煩惱焦慮的夜晚，都落在身後了，剩下走過這些的自己，還有身邊一路陪伴、鼓勵、指導的所有你和妳，謝謝你們，讓我能夠帶著溫暖一直向前。

衷心感謝我的指導教授——陳進庭老師這兩年來的悉心指導，感謝老師在我的研究過程中給予耐心、細心和用心的指導、鼓勵與幫助，讓我終能走出學習的困境，並找到前進的方向。兩年的時間，我不僅建立了邏輯思維的系統，更學習到做學問的嚴謹態度，我也將勇敢去學習更多，在此致上學生的誠摯謝意。

感謝吳亘承老師、謝堅銘老師於學生口試，對學生論文給予諸多指教與建議，使我能自不同面向來思考，讓論文內容更完整與豐富，在此表達由衷的感謝。

感謝實驗室的夥伴們，柏鈞學長、佳穎學姊、定崙學長、令潔、小波和芊仔，謝謝你們在學術上所給予的指教，以及在我人生感到迷惑時給予我指引，不過最重要的是，有你們的陪伴，再煩悶的實驗生活都能夠變得有趣，遇見你們真的很開心！

感謝身邊的朋友們，一起為了研究生生活努力著的你們、或是已經在上班的你們，以及感謝我的另一半，不論是見面或是文字訊息的交談，和你們共度那些一同分享喜怒哀樂的時刻，都帶給我歡笑或是給了我支持的力量，日後也要一起開開心心、可可愛愛！

感謝我的爸爸、媽媽和姊姊，開心或辛苦的時候能有你們的陪伴，而我在台北唸書最好的事就是能夠時常好好一起吃飯吧，我很珍惜也很謝謝有這樣的機會，也謝謝你們對我從小到大的支持，讓我能夠無後顧之憂地去做想做的事。

最後，也想謝謝自己，謝謝你堅持住，這麼認真的去做了好多事，然後好好地把它們完成了。還有謝天！

寫在最後的最後，願所有關心我的每一個你，能夠健康快樂、日子安好。

## 中文摘要



由於眼睛自身的保護機制，眼藥的遞送仍是一大挑戰。眼睛的物理屏障由淚膜、角膜和結膜所構成，不論是親水性或疏水性藥物的滲透都受到了阻礙；而淚液的分泌也導致藥物無法長時間停留在眼睛表面，使得眼藥的生體可利用率 (bioavailability) 僅有 5%，甚至更低；因此眼藥的遞送為重要的研究課題。

Tacrolimus (TAC) 源自一土壤菌叢 *Streptomyces tsukubaensis*，最初用來預防移植手術引起的排斥反應；現今可針對乾眼症、春季性結膜炎等發炎症狀來做治療。近年來，許多研究開發利用懸浮液 (suspensions)、軟膏 (ointments)、奈米顆粒 (nanoparticles) 等載體來遞送 TAC 至眼睛。考量 TAC 在水中的低溶解度、病患對於藥物的依順性 (compliance) 及藥物的滲透性，本研究選擇微胞 (micelles) 作為開發的劑型，並透過增稠劑的添加來延長藥物停留在眼睛表面的時間。

本研究重點在於 TAC 微胞劑型的開發與優化，首先依據美國食品藥物管理局 (FDA) 的資料庫從中篩選賦形劑來進行實驗設計，為符合規範及因應安全性考量須調整滲透壓及酸鹼值。之後於比較有無添加增稠劑兩種組成的差異時，發現有添加增稠劑組別的黏度有顯著的增加，並於藥物釋放的結果中得到較緩慢的釋放速率；另外，根據細胞毒性試驗的結果，劑型組成顯示具有低細胞毒性，而以細胞攝入的試驗結果得到，添加增稠劑至劑型中並不會影響細胞對於藥物的攝入。

本研究開發出能承載 TAC 的微胞溶液並證實這一劑型的安全性，未來可透過動物實驗，進一步驗證溶液的黏度對於眼藥停留在眼表的影響，同時藉由控制藥物釋放的速率，來達到提升眼藥生體可利用率的目的。

關鍵字：微胞、Tacrolimus、眼藥遞送、劑型開發、眼藥水

## 英文摘要



Current drug delivery towards ophthalmic preparations remains limited. The physical barrier of eye consists of the tear film, cornea and conjunctiva, hampering both hydrophilic and hydrophobic drugs to penetrate. Lacrimal secretions also impede the drugs to stay on the ocular surface, resulting in a low bioavailability of the ocular drugs, which is only 5% or even less.

Tacrolimus (TAC) is a macrolide immunosuppressant isolated from a strain of *Streptomyces tsukubaensis*. It was used to prevent immune rejection caused by transplant surgery, and now it can also be treated for dry eye syndrome, vernal conjunctivitis and other inflammatory symptoms. In recent years, many formulations have been developed as carriers to deliver TAC to eyes, such as suspensions, ointments, and nanoparticles.

This study focuses on the development and optimization of TAC-loaded micelle. The excipients used in this micelles preparation were selected from the U.S. Food and Drug Administration (FDA) database. In order to meet specifications and safety requirements, we adjusted the osmotic pressure and pH value of drugs. Furthermore, to prolong the retention time of TAC on the ocular surface, the viscosity enhancers were incorporated in the formulation. The sample containing viscosity enhancer had a higher viscosity and showed a slower drug release rate. Based on the *in vitro* cytotoxicity, we found the optimized formulation had good cellular tolerance and low cytotoxicity. The addition of viscosity enhancers has no obvious effects on the uptake of the drugs by the cells based on the results of cellular uptake study.

This study developed a micellar formulation and confirmed its safety. In the future, animal experiments would be conducted to further verify the effects of the eye drops' viscosity on the ocular surfaces. Meanwhile, by adjusting the viscosity of eye drop and

controlling the release of drugs, the formulation has potential to improve the poor bioavailability of hydrophobic drugs.



Keywords: micelles, Tacrolimus, ocular drug delivery, formulation development, eye drops

# 目錄



口試委員會審定書 .....	i
謝辭 .....	ii
中文摘要 .....	iii
英文摘要 .....	iv
目錄 .....	vi
圖目錄 .....	viii
表目錄 .....	ix
第一章、 研究背景 .....	1
1.1    Tacrolimus .....	1
1.2    眼睛生理學 .....	3
1.3    眼用製劑 (Ophthalmic preparations) .....	5
1.4    微胞 (micelles) .....	7
1.5    增稠劑 (viscosity enhancers) .....	8
1.6    實驗設計 (design of experiments) .....	9
1.7    研究動機與目的 .....	13
第二章、 材料與方法 .....	14
2.1    藥品與儀器 .....	14
2.2    細胞株 (Cell lines) .....	18
2.3    實驗方法 .....	20
2.3.1    Tacrolimus-loaded 微胞開發及劑型優化 .....	20
2.3.2    Tacrolimus 定量分析 .....	22
2.3.3    微胞特性分析 .....	23



2.3.4	安定性試驗.....	24
2.3.5	體外藥物釋放試驗.....	24
2.3.6	體外細胞毒性測定.....	26
2.3.7	體外細胞攝入試驗.....	27
2.4	統計方法 .....	28
第三章、結果 .....		29
3.1	Tacrolimus-loaded 微胞開發、劑型優化及特性分析 .....	29
3.2	增稠劑添加對劑型之影響 .....	32
3.3	Tacrolimus 定量分析 .....	35
3.4	Tacrolimus 微胞溶液黏度測定 .....	36
3.5	安定性試驗 .....	37
3.6	體外藥物釋放試驗 .....	37
3.7	體外細胞毒性測定 .....	39
3.8	體外細胞攝入試驗 .....	40
第四章、討論 .....		41
4.1	Tacrolimus-loaded 微胞溶液製備與其特性分析 .....	41
4.2	增稠劑對於 Tacrolimus 微胞溶液黏度的影響與評估 .....	43
4.3	微胞溶液於室溫貯放下的安定性評估 .....	44
4.4	添加增稠劑對於藥物釋放之影響 .....	45
4.5	透過細胞毒性試驗評估微胞溶液之安全性 .....	46
4.6	添加增稠劑對於細胞攝入之影響 .....	47
第五章、結論 .....		49
第六章、未來發展 .....		50
參考文獻 .....		90
附錄 .....		96

## 圖目錄



圖一、滲透壓及 pH 之調整 (添加增稠劑).....	79
圖二、劑型 pH 值調整後的滲透壓測定 (day 0 & day 7).....	80
圖三、劑型 pH 值調整後的粒徑尺寸及分布測定 (day 0 & day 7).....	81
圖四、HPLC 層析圖譜，以不同分析條件分析 Tacrolimus.....	83
圖五、黏度測定.....	84
圖六、安定性試驗——Tacrolimus 含量測定.....	85
圖七、藥物釋放速率.....	86
圖八、細胞毒性試驗.....	88
圖九、細胞攝入試驗.....	89

## 表目錄



表一、試驗中的因子、水準與因變數 .....	51
表二、資料分析——粒徑尺寸及分布測定 .....	52
表三、資料分析——定量分析 Tacrolimus 溶解度 .....	54
表四、資料分析——定量分析 Tacrolimus 含量 (20 days) .....	56
表五、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics .....	58
表六、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 1: particle size) .....	60
表七、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 2: PDI) .....	62
表八、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 3: solubility of Tacrolimus) .....	64
表九、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 4: concentration of Tacrolimus after 20 days) .....	66
表十、優化的配方組成 .....	67
表十一、優化組別之特性分析 .....	67
表十二、滲透壓及 pH 之調整 (未添加增稠劑) .....	68
表十三、含增稠劑微胞溶液之外觀 (未加 Tacrolimus) .....	69
表十四、含增稠劑 (Carbomer copolymer type A) 微胞溶液之粒徑尺寸及分布 測定 (未加 Tacrolimus) .....	72
表十五、含增稠劑 (CMC sodium) 微胞溶液之粒徑尺寸及分布測定 .....	72
表十六、含增稠劑 (CMC sodium) 微胞溶液之外觀 (加入 Tacrolimus) .....	73
表十七、粒徑尺寸及分布測定 (調整滲透壓及 pH 之後) .....	74
表十八、以不同 pH 值之 TBS 進行劑型 pH 值的調整 .....	74

表十九、劑型 pH 值調整後的外觀觀察，分別為剛製備出來 (A) day 0 與製 備後貯放於室溫之下(B) day 20 之結果 .....	75
表二十、劑型 pH 值以 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer solutions 調整後的粒徑尺寸 及分布測定 .....	77
表二十一、安定性試驗——外觀觀察 .....	78

# 第一章、研究背景



## 1.1 Tacrolimus

### 1.1.1 歷史

環孢黴素 (Cyclosporine A, CsA) 是一用於降低器官移植中排斥作用的免疫抑制劑 (immunosuppressive agent)，於西元 1969 年自真菌中被分離出來，直至 1983 年時，才正式應用於臨床中[1]；而在 1987 年，有一同樣用作免疫抑制劑的化合物 Tacrolimus 被發現，兩者的作用機制非常相似[2][3]，不過根據過去研究指出，相較於較早發現的環孢黴素，Tacrolimus 的療效更好，並且在長期使用下所造成的腎毒性較低[4]。

### 1.1.2 Tacrolimus (TAC) 介紹

Tacrolimus 是從一土壤鏈霉菌屬微生物 (*Streptomyces tsukuba*) 中所分離出的發酵產物 (見附圖一)。最初的用途為治療接受移植手術患者而出現的排斥反應，1989 年，一研究使用 Tacrolimus 來抑制兔子因角膜移植所引起的排斥反應，在那之後陸續有研究開發 Tacrolimus 在眼睛疾病中的應用，現今 Tacrolimus 已用於治療除了角膜移植引起的排斥作用，其他還包含了眼睛的發炎症狀，例如乾性角結膜炎 (keratoconjunctivitis sicca)，也是俗稱的乾眼症、葡萄膜炎 (uveitis)、春季性角結膜炎 (vernal keratoconjunctivitis) 等疾病[5]。

Tacrolimus 的分子式為  $C_{44}H_{69}NO_{12}$ ，分子量為 804 g/mol，在水中的溶解度為  $1.824 \times 10^{-2}$  mg/L (即一升的水可溶解約  $1.824 \times 10^{-2}$  mg TAC)，是一水溶性相當不佳的化合物，其 log P 為 3.03，顯示 Tacrolimus 是一親脂性的物質[6]。

### 1.1.3 作用機制

Tacrolimus 是一種免疫抑制劑，作為鈣調磷酸酶抑制劑 (calcineurin inhibitor)，主要作用在 T 細胞的訊息傳遞路徑中，藉由抑制介白素 (interleukins) 的產生，阻止因發炎反應而引起的過度免疫反應，達到治療的效果。一般而言，免疫反應的產生源自於外來物質的入侵，當外來物質作為抗原與 T 細胞上的受體結合後，引發了下游的訊息傳遞，促進細胞內鈣離子的增加，鈣離子與鈣調蛋白 (calmodulin) 結合進而活化了鈣調磷酸酶，鈣調磷酸酶作為核轉錄因子 (nuclear factor of activated T cells, NF-AT) 的亞基 (subunit)，會將其去磷酸化 (dephosphorylation) 並自細胞質進入細胞核中，與核內其他亞基結合形成複合物後，核轉錄因子會去結合在介白素的啟動子上，促使了轉錄作用的進行，進而生成引發免疫反應的發炎物質，例如 interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4。而 Tacrolimus 在進入 T 細胞後，與 FK 結合蛋白 (FK-binding protein, FKBP) 結合，形成與鈣離子競爭結合並抑制鈣調磷酸酶的複合物，被阻斷去磷酸化作用的核轉錄因子，無法進入細胞核也因此無法進行轉錄作用生成發炎物質，使得免疫反應終將因 Tacrolimus 的作用而受到了抑制[6] (見附圖二)。

### 1.1.4 TAC 引起之副作用

一般 Tacrolimus 常見用於減緩移植手術引發的排斥作用，主要可能會引發急性腎功能衰竭、神經毒性、感染，其他症狀像是引起腹瀉、噁心、胃腸不適、貧血、頭痛、失眠、皮膚搔癢、紅腫灼熱等副作用。

根據過去文獻指出，局部給予 Tacrolimus 軟膏 (ointments) 至眼睛會造成輕微的副作用，舉例如下：短暫的異物感及造成視力模糊、也會對眼睛產生灼熱感以及可能引發角膜感染，包括細菌性角膜炎 (bacterial keratitis)、皰疹性角膜炎 (herpetic keratitis) 或是細菌性角膜潰瘍 (bacterial corneal ulcer)[7]。

#### 1.1.4-1 灼熱感的產生

膜蛋白 TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member

1)，俗稱辣椒素受體，是一種離子通道受體，出現在許多痛覺受器的細胞膜上，該離子通道遇上辣椒素、燙人的溫度等物質及訊息，就會讓鈉離子與鈣離子通過，活化的 TRPV1 被磷酸化，而引發下游訊息的生成，由腦部判讀成熱、發炎或辛辣食物所引起的燒灼感[8]。

上述免疫反應中的鈣調磷酸酶是 TRPV1 磷酸化及去磷酸化的主要調節物 (regulator)，可以抑制 TRPV1 的活化，但是當 Tacrolimus 抑制鈣調磷酸酶的作用時，會有利於 TRPV1 的磷酸化，進而活化 TRPV1，而誘發了灼熱感的產生。

### 1.1.5 應用劑型種類及給藥途徑

目前 Tacrolimus 可以針對腎臟、肝臟等器官移植做治療，其他還有應用於皮膚疾病，例如牛皮癬、異位性皮膚炎[9]，眼睛的適應症還包含了乾眼症、角結膜炎等[10]。而當前的 Tacrolimus 劑型則包含了口服的膠囊 (capsules)、局部給藥的凝膠 (gels)、軟膏以及靜脈注射 (injections) 的給藥途徑。

## 1.2 眼睛生理學

### 1.2.1 眼睛結構

眼睛是一個複雜的器官，最外層由角膜 (cornea)、結膜 (conjunctiva) 和鞏膜 (sclera) 組成；中間血管層由脈絡膜 (choroid)、睫狀體 (ciliary body) 和虹膜 (iris) 組成；內神經層包括視網膜 (retina)。在解剖學上，眼球通過睫狀體和晶體 (lens) 分為前眼和後眼。角膜、結膜、虹膜、睫狀體和晶體被分類為眼前組織，而眼後組織如鞏膜、後脈絡膜和視網膜等[11]（見附圖三）。

### 1.2.2 眼藥遞送系統中的屏障

眼用製劑在開發上所遇到的挑戰，主要在於眼睛本身所擁有的生理屏障及結



構屏障[12, 13]。

### 1.2.2-1 生理屏障

對於眼睛局部給藥，藥物所會遇上的最外層屏障是為淚膜 (tear film)，由脂質、水和黏蛋白組成：最外層的脂質層有助於防止淚液的蒸發，中間水層則是由主淚腺和副淚腺維持，是為最厚的一層，約佔 90% 的總淚膜，最內層的黏蛋白層可以潤濕和潤滑眼表、洗淨異物並有助於防止感染。

一般而言，眼藥水在給藥後會因為反射性地眨眼以及淚液的分泌，即在 15 至 30 秒內被沖刷掉，此外藥物也很有可能因為經由鼻淚管流失至全身循環，而導致其他的副作用產生。

### 1.2.2-2 結構屏障

藥物可透過角膜或是結膜進入眼內。

- 1) 角膜是眼睛最外側的凸形透明組織，覆蓋著虹膜及瞳孔 (pupil)，一個正常成年人的角膜厚度約為 500~600  $\mu\text{m}$ 。角膜由外而內依次分為上皮細胞層 (epithelium)、前彈力層 (Bowman's layer)、基質層 (stroma)、後彈力層 (Descemet's membrane)、內皮細胞層 (endothelium)；上皮細胞緊密排列使得親水性藥物無法輕易通過細胞，且具有 efflux transporters 會主動將外來物質外排；基質層約佔角膜厚度的 90%，主要由水、膠原蛋白、蛋白聚醣組成，是疏水藥物的限速屏障 (rate-limiting barrier)；因此，無論藥物屬於親水或疏水性質，都難以輕易地穿透角膜。
- 2) 結膜為覆蓋在上、下眼瞼內和眼白處的一層黏膜，含有血管、纖維組織及淋巴管，相較於角膜，其上皮細胞的排列相對鬆散，雖然有助於親水性藥物的吸收，但是因血管的存在可能會導致大量藥物流失、進入全身循環系統，從而降低藥物在眼部的生體可利用率 (bioavailability, BA)。

眼用製劑一般為局部給藥，當藥物要停留或是滲透通過眼表，首先須克服淚膜

屏障，減少藥物被淚液沖刷，而藥物在通過淚膜屏障之後，大部分的藥物會進入全身循環，使得僅有 5%、甚至更少的藥物到達眼內[14]，除了造成眼藥的生體可利用率相當低，還有可能因此造成額外的副作用。



## 1.3 眼用製劑 (Ophthalmic preparations)

### 1.3.1 定義

根據世界衛生組織編纂的《國際藥典》 (*The International Pharmacopoeia*, 2019) 所示，對於眼用製劑的定義為「以活性藥物成分治療結膜、結膜囊或眼瞼，並將其製備為無菌的液體、半固體或固體製劑」 (“They are sterile, liquid, semi-solid, or solid preparations that may contain one or more active pharmaceutical ingredient(s) intended for application to the conjunctiva, the conjunctival sac or the eyelids”)。

### 1.3.2 分類

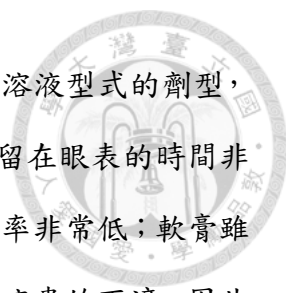
常見眼用製劑可分為液體的眼藥水 (溶液、懸浮液)、半固體 (軟膏、凝膠)、固體則包含了植入式裝置 (ocular inserts) 等[15]。

### 1.3.3 規範

眼用溶液的滲透壓應相當於 0.9% 的氯化鈉溶液，不過眼睛對於 0.6% 至 2.0% 氯化鈉溶液的滲透壓仍具有耐受性；而眼用溶液的 pH 值在 pH6.5-8.5 的範圍內不會造成角膜的損傷，且以接近淚液 (pH 7.4) 最為理想[16]。

### 1.3.4 Tacrolimus 眼用製劑

當前研究開發 Tacrolimus 眼用製劑的劑型包含水溶液 (solutions)[17]、軟膏 [18][19]、懸浮液 (suspensions)[20]、奈米顆粒 (nanoparticles)[21]、奈米微胞



(nanomicelles)[22]、奈米乳液 (nanoemulsions)[23]等(見附表一)。溶液型式的劑型，雖然給藥相對方便，但也因為是液體的緣故，使得給藥後眼藥停留在眼表的時間非常短暫，容易因淚液的沖刷而快速地流失，導致眼藥生體可利用率非常低；軟膏雖然延長了眼藥在眼表作用的時間，但因為本身的油膩感，會造成病患的不適，因此降低了病患的依順性 (patient compliance)；奈米顆粒在生產或處理過程中，則容易受內毒素 (endotoxins) 的汙染，在製造上需要格外注意；奈米乳液須考慮到製備技術或儀器，所需耗費的成本可能較高，且在賦形劑 (excipients) 的使用上需要評估其安定性[24]。

目前市面上 Tacrolimus 眼用製劑的產品有日本千壽製藥股份有限公司 (Senju Pharmaceutical Co.,Ltd.) 於 2008 年上市的 “Talyms”，為 0.1% 的懸浮液[25]，適應症包含春季性角結膜炎、異位性角膜結膜炎，根據其臨床試驗結果，並無公開其可能造成之副作用，僅可推測使用懸浮液因懸浮顆粒較大，可能對病患眼睛造成刺激性，或是藥物易因淚液沖刷而流失；同時，一個待上市的产品 “Tacrosolv”，則是利用 “Marinosolv” 此技術平台來進行微胞水溶液的開發，以植物成分皂苷來包覆水溶性較差的 Tacrolimus，適應症為過敏性結膜炎，於 2020 年 8 月時開始進行臨床二期試驗，試驗項目包括劑量增量 (dose escalation) 及療效與安全性評估 (efficacy and safety assessment)[26]，未來若是完成二期試驗尚需進行臨床三期試驗。



## 1.4 微胞 (micelles)

### 1.4.1 起源

約莫 30 年前，便有研究利用微胞來承載藥物，且為了遞送藥物進行治療，將其設計類似於天然載體的結構，例如病毒，親水端朝外、疏水鏈相互聚集形成微胞的核心，而小分子疏水性藥物便可以溶於疏水性的核內，因此可以透過微胞來承載並遞送藥物以達到治療的目的[27] [28]。

### 1.4.2 臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC)

微胞由一水相系統及界面活性劑 (surfactants) 所組成，處於熱力學穩定的狀態，可形成球、柱、片狀等形狀。一般常見界面活性劑具有親水基團 (hydrophilic head groups) 與疏水基團 (hydrophobic groups)，如下圖所示界面活性劑溶解於水相中時，當僅有單個界面活性劑分子溶於其中時，它會被水分子所包圍，界面活性劑的親水基團會受水所吸引與其作用、疏水基團則因受到排斥而朝向溶液表面的空氣，形成了看似頭朝下、尾朝上的情況，一旦界面活性劑的濃度逐漸增加、系統中有越來越多的界面活性劑分子，直到溶液表面的界面活性劑達到飽和狀態，此時溶液內界面活性劑的疏水基團會相互作用、朝內聚集，而親水基團向外與水作用，逐漸形成類似球狀的顆粒構型，即界面活性劑達到或超過一特定濃度時，便會在水中形成微胞顆粒，而此微胞形成時的濃度是為臨界微胞濃度。

在形成微胞的過程中，親水基團會去遮蔽疏水基團，使得疏水基團無法與水相互作用，疏水基團向彼此靠近聚集，也從而降低了界面活性劑與水相系統界面（此指界面活性劑與水之間作用之交界面）的自由能 (interfacial free energy)，而形成微胞的主要驅動力 (driving force)，便是將界面的自由能最小化[29] [30]，也因此，當提升界面活性劑的濃度，在疏水基團的聚集使得界面自由能降低的同時，也逐漸促使了微胞的形成（附圖四）。



### 1.4.3 微胞在藥物遞送的應用

由於微胞由疏水的核與親水的外層所組成，使得這樣的顆粒非常適合用於疏水性藥物的遞送；而以微胞對於疏水性藥物的增溶作用 (solubilization) 及穩定作用 (stabilization)，使藥物能夠延長作用時間以改善治療的效果。

雖然以微胞溶液給藥至體內，會因為血液的稀釋及其成分使得微胞溶液過早被分解，這也造成了微胞藥物在全身給藥時，其中的臨床試驗治療效果有限，不過對於局部的眼部給藥而言，因為眼表淚液的體積較小，僅有 7  $\mu\text{L}$ ，對於微胞穩定性影響極低，而能夠將此問題的疑慮減至最小。

在眼睛的遞送上，微胞可以透過跨細胞途徑 (transcellular pathway)、細胞旁途徑 (paracellular pathway) 或是內吞作用 (endocytosis) 來進入角膜細胞。值得注意的是，一些聚氧乙烯化的非離子性界面活性劑 (polyoxyethylated nonionic surfactants) 是 P-glycoprotein (Pgp) 外排幫浦 (efflux pump) 的抑制劑 (inhibitors)，Pgp 為細胞膜上的一主動運輸蛋白，扮演著生物屏障的角色來將細胞中的毒素和外來物 (xenobiotics) 排出，因此 Pgp 對於藥物的吸收及體內藥物動向 (drug disposition) 中扮演了非常重要的角色[31]，而聚氧乙烯化的非離子性界面活性劑——此類賦形劑的添加，或許有助於克服藥物被排出的可能[32]，例如 poloxamer 188, polyoxyl 35 castor oil, polyoxyl 40 stearate, Tween 80 等。

## 1.5 增稠劑 (viscosity enhancers)

過去有研究指出，添加增稠劑能夠增加眼藥的黏度，使得眼藥的在眼睛的滯留時間 (residence time) 增加[33] [34]，藥物有機會透過這樣的方式有更長的時間能夠發揮其藥效且被眼睛組織所吸收。



### 1.5.1 作用機制

對於親水性增稠劑而言，作用機制為透過將微胞相接在一起、或是本身與微胞作用而使顆粒變得較大，因此可以降低流動性，並使得黏度增大，在這樣的作用下，系統中的分散相（意指微胞顆粒）不容易聚集和凝聚，因此可以使整體系統更為穩定；且增稠劑吸附分散相表面的同時，其親水性也使得微胞顆粒更容易在水相中分散[35]。

### 1.5.2 Carboxymethylcellulose sodium (CMC sodium) 之作用

當 CMC sodium 溶解於水中時，它會與水中的離子產生靜電交互作用 (electrostatic interaction)——自身的醣類基團發生水合作用 (hydration)，利用羥基 (hydroxyl group) 與溶劑相互作用以形成氫鍵，同時其構型與水的結構能夠良好地契合[36]；這種相互作用的程度隨著分子量的增加而提升，因此像是 CMC sodium 這樣的多醣能夠與大量的水結合以降低流動性，使得黏度提高。

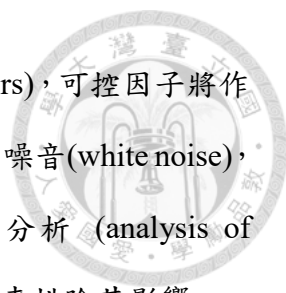
## 1.6 實驗設計 (design of experiments)

### 1.6.1 簡介

實驗的意義主要是透過科學研究的方法去建立並驗證假說，來發現過去未知或不清楚的效應，藉此來說明一個已知的作用；而實驗設計的目的是去探究自變數 (independent variables) 與因變數 (dependent variables) 之間的因果關係，藉由操縱自變數，然後探討其對因變數的影響：哪些自變數對因變數有影響，以及這些自變數的水準 (level) 要如何設計才能達到預期的結果。

### 1.6.2 組成要素

- 因子 (factors, variables or inputs)：實驗的輸入變數，又可分為可控因子



(controllable factors) 與不可控因子 (uncontrollable factors)，可控因子將作為實驗中水準(level) 定義的依據、不可控因子則視為白噪音(white noise)，會影響各水準的輸出 (response)，但可經由變異數分析 (analysis of variance) 的隨機區集設計(blocking and randomization) 來排除其影響。

- 水準 (levels, settings)：各因子的設定，有不同數值的變化。
- 因變數/反應變數 (responses, outcomes, characteristics)：實驗的輸出，受因子水準的改變而有不同的結果。

舉例而言，一乳液 (emulsion) 所含成分中的油相可視作因子，添加的濃度即水準，調整此因子的水準會對於製備所得的乳液有所影響，可能改變了其因變數，例如粒徑大小、穩定性等。

實驗設計的目的便是在於透過規劃，有系統地修改輸入因子的水準設定來收集資料，進而分析製程條件和產品組成如何影響最終產品，並決定最佳產出的因子設定。

### 1.6.3 方法應用

首先找出影響因變數的製程變數，也就是因子，傳統實驗方法會以一次一因子 (one-factor-at-a-time, OFAT) 來進行實驗，但是當一實驗中有多項因子，就需要考慮到因子之間是否有交互作用效果 (interaction effects) 的可能，此時可以利用多因子實驗 (factorial experiment) 來討論，不過實驗次數過多時，考量到成本、時間及人力，無法全部都操作時，便可以使用部分因子實驗 (fractional factorial experiment)。

接著進一步找出製程變數可能影響高良率 (defect-free-rate) 或是最小變異 (minimal variation) 的範圍，以求產出最佳化 (optimization)，透過反應曲面法 (response surface methodology) 中的中央合成設計 (central composite design) 或其他實驗設計方法來達成。



#### 1.6.4 類型

實驗設計中包含了許多方法種類，例如因子設計 (factorial design)、反應曲面法 (response surface methodology)、混合設計 (mixture design)、田口設計 (Taguchi design)。以其中的反應曲面法說明，集合了統計與數學而衍生出的方法，可以經由分析與建模尋找並獲得最適效果的變因組合條件，需要經過一連串的取樣與計算過程，以快速有效的方法接近尋求的答案。

##### 1.6.4-1 Box-Behnken Design (BBD)

反應曲面法中的 Box-Behnken Design (BBD)，於 1960 年由 George E. P. Box 與 Donald Behnken 所設計。以下以三因子為例，BBD 利用 12 個邊緣節點 (middle edge nodes) (附圖五中黑點處) 及中心點 (central points) (附圖五中白點處) 來建立二次方程式[37][38][39]，每個因子需要是能夠被量化的數值，並且需要設定三個水準 (levels)；我們將所使用的賦形劑作為試驗設計中的因子，並同時考量三個水準，依各別最大效價對應為最高的水準、濃度為 0 時則作為最低的水準、取 0 與最大效價的平均值作為中間的水準；例如所使用的 Kolliphor ELP 其最大效價為 5%，我們便將 5%、2.5%、0% 依序對應高、中、低濃度的三個水準，來進行設計，其中所謂的中心點便是取各個賦形劑 (因子) 於中濃度 (中間水準) 的組合，而為了實踐實驗設計原則中的完全重複試驗，中心點的存在便可以透過較少的試驗成本來降低試驗誤差。

經過取樣與計算，可以建立二次式模型 (quadratic model)，模型需要執行缺適性 (lack-of-fit) 檢定，以確認迴歸模型能否充分描述試驗因子與反應變數之間的函數關係，如果模型中未包含重要的項 (比如交互作用項或二次項)，則有可能出現缺適性，可以透過標準差 (standard deviation, Std. Dev.) 來量測缺適性，差距越小即代表配適度越高；其中在缺適性檢定中，可以得到決定係數 (coefficient of determination, COD，記為  $R^2$ )，用以解釋二次迴歸式與因變數之間的相關性強度，不過因為實驗中存在殘值 (residual)，為試驗中無法解釋但會造成觀測誤差的部分，

一旦因子愈多，殘值所造成之殘差平方和 ( $SS_{res}$ ) 愈小，會造成決定係數的高估(因  $R^2 = 1 - SS_{res}/SS_{tot}$ ) ( $SS_{tot}$ , total sum of squares)，故我們應同時將因子的數量納入考量，進行決定係數的修正 (adjusted  $R^2$ )。

以 BBD 來進行試驗，可以以快速有效的方式、較少的實驗成本及時間，獲得最適化的條件，並且能夠深入探討因子間交互作用對因變數影響的程度。



## 1.7 研究動機與目的

現今眼用製劑開發上的問題之一是藥物短暫停留眼表、而造成生體可利用率低下的問題，是以如何延長藥物停留在眼表的時間，並有效地增加藥物穿透眼睛組織，便成了當今研究發展的方向之一。

本研究將以承載 Tacrolimus 為目標，進行眼用製劑的開發與設計。相較於較早開始發展的環孢黴素，過去研究證實了 Tacrolimus 的療效較佳，且長期使用造成的腎毒性較低，是以本研究選擇 Tacrolimus 作為活性藥物成分 (active pharmaceutical ingredient, API) 來進行劑型的開發。目前市面上也有廠商致力發展 Tacrolimus 的眼用製劑，而以日本 Senju 公司上市產品 Talymus 為例，便是將其設計為懸浮液的劑型，提高了藥物承載濃度，但有可能因懸浮液中顆粒較大而對眼睛造成中度的刺激性。本研究方向將以開發奈米等級的微胞水溶液來承載 Tacrolimus。

透明澄清的眼藥水為本研究發展的方向之一，希望病患在接受給藥的同時，能夠將不適感降至最低，相較於軟膏等給藥方式更能讓病患接受，而透明澄清的液體也不會造成短暫視力混濁的問題，因此能夠提升病患的依順性。另外，透過添加增稠劑的方式，使眼藥水能夠黏附在眼表的時間更長，避免被淚液沖刷而快速流失，間接地提升了穿透的藥量，也能夠減少病患接受給藥的頻率。

## 第二章、材料與方法



### 2.1 藥品與儀器

#### 2.1.1 藥品

名稱	廠商
Acetonitrile	J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
BCA solution	G-biosciences (St. Louis, MO, USA)
BSA Standard	G-biosciences (St. Louis, MO, USA)
Carbomer copolymer type A (allyl pentaerythritol crosslinked)	Lubrizol (Wickliffe, OH, USA)
Carbomer homopolymer type B (allyl pentaerythritol crosslinked)	Lubrizol (Wickliffe, OH, USA)
Carbomer homopolymer type C (allyl pentaerythritol crosslinked)	Emperor Chemical Co., Ltd. (Taipei City, Taiwan)
Carboxymethylcellulose sodium	SIGMA (St. Louis, MO, USA)
Copper solution	G-biosciences (St. Louis, MO, USA)
Hydroxyethyl cellulose (4000 mPa·s at 1%)	Emperor Chemical Co., Ltd. (Taipei City, Taiwan)
Hypromellose 2910 (3 mPa·s)	Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)



Methylcellulose	SIGMA (St. Louis, MO, USA)
95% Ethanol	TTL Corp. (Taipei City, Taiwan)
Poloxamer 188	SIGMA (St. Louis, MO, USA)
Poloxamer 407	BASF (Ludwigshafen, Germany)
Polyoxyl 15 hydroxystearate	BASF (Ludwigshafen, Germany)
Polyoxyl 35 castor oil	ELGIN (Taipei City, Taiwan)
Polyoxyl 40 hydrogenated castor oil	BASF (Ludwigshafen, Germany)
Polyoxyl 40 stearate	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Polysorbate 60	SIGMA (St. Louis, MO, USA)
Polysorbate 80	Emperor Chemical Co., Ltd. (Taipei City, Taiwan)
RIPA lysis buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Sodium chloride	Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada)
Tacrolimus	Chunghwa Chemical Synthesis & Biotech Co., Ltd. (New Taipei City, Taiwan)

### 2.1.2 細胞培養耗材

名稱	廠商
10X Trypsin-EDTA,0.5%	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Bovine pituitary extract	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Dulbecco's phosphate buffered saline	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Epidermal growth factor	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)

FNC Coating Mix	Protech Technology Enterprise Co., Ltd. (Taipei City, Taiwan)
Keratinocyte-Serum Free Medium	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)

### 2.1.3 使用軟體

軟體	廠商
Design-Expert	Stat-Ease Inc. (Minneapolis, MN, USA)

### 2.1.4 儀器

儀器	型號	廠商
純水製造機	Milli-Q Reference Ultrapure Water Purification System	Millipore Corp. (Billerica, MA, USA)
二氧化碳培養箱		
離心分離機	Microfuge 18	Beckman Coulter Inc. (Brea, Ca, USA)
共軛焦顯微鏡	TCS SP5	Leica Microsystems
無菌操作檯		HAE TIAN SCIENCE CO., LTD. (New Taipei City, Taiwan)
經皮吸收垂直擴散槽		慶發玻璃有限公司
動態散射 Zeta 電位 及粒徑分析儀	SZ-100	Horiba , Ltd. (Kyoto, Japan)
電子天平	XR 205SM-DR	Precisa Ltd. (Livingston,

---

高效液相層析儀	ES 225SM-DR	Scotland, UK)
	System controller: SCL-10AVP	Shimadzu Co., Ltd. (Kyoto, Japan)
	Auto injector: SIL-10ADVP	
	UV-Vis detector: SPD-10A	
	Column oven: CTO-10ACVP	
	Liquid chromatograph: LC-10ADVP	
滲透壓測定儀	Type 16	Löser Messtechnik (Berlin, Germany)
手持式 pH meter	LAQUAtwin	Horiba , Ltd. (Kyoto, Japan)

---





## 2.2 細胞株 (Cell lines)

名稱	來源
SIRC [Statens Seruminstitut Rabbit Cornea] (BCRC 60093)	BCRC

### 2.2.1 細胞培養與繼代

本研究所使用的細胞株之培養液成分為 90% Minimum essential medium (Eagle) in Earle's BSS + 10% fetal bovine serum，以 10 mL 培養液培養細胞於 10 cm 培養皿 (petri-dish) 內，置於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱 (CO<sub>2</sub> incubator)。

當細胞生長至八分滿時，即繼代至新培養皿。移除廢液後以 PBS 潤洗一次，確保培養皿之培養液不干擾後續 trypsin 作用。加入 1 ml 0.25% trypsin-EDTA，作用約三分鐘，使其分解細胞與培養皿之附著蛋白，於顯微鏡下觀察細胞懸浮情形待細胞懸浮後，加入 9 mL 培養液，藉由血清終止 trypsin 反應並以培養液沖洗下細胞，收集至離心管，以 800 rpm 離心五分鐘；移除上清液，加入 1 mL 培養液懸浮細胞，計算細胞數目後，以適當比例、將細胞種入新的 10 cm 培養皿中，於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養。

### 2.2.2 細胞解凍與冷凍

#### 2.2.2-1 解凍

將細胞於液態氮桶中取出後，將凍管放入 37°C 水浴不斷搖動使其迅速解凍，時間控制在兩分鐘左右。吸取凍管內細胞至 50 cc 離心管中，緩慢加入 medium (共 20 mL) 並搖晃離心管，以稀釋 DMSO，接著於 800 rpm 離心 5 分鐘；離心完成，除去上清液，並以 1 mL complete medium 重新懸浮細胞，取 10 mL medium 至培養皿中，並將細胞吸出、緩慢均勻加至培養皿中，並同時搖勻培養皿中的 medium，

顯微鏡下觀察並拍照，將細胞置於於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

### 2.2.2-2 冷凍

當細胞生長至約七到八分滿時進行冷凍保存。事先準備冷凍培養液 (含 93% complete medium, 7 % DMSO) 並將其置於冰上預冷；將細胞收集下來後，以 1 mL 冷凍培養液重新懸浮細胞，分裝至冷凍小管中；將其置於漸凍盒中再放置在 4°C 冰箱 30 分鐘，移至 -20°C 冰箱至結冰，再移至 -80°C 冰箱中，最後將其凍存於液態氮桶中。

### 2.2.3 細胞計數

以 Trypan Blue 區分活細胞與死細胞，當細胞正常生長時，trypan blue 無法輕易地穿透細胞膜而使得細胞呈現透明外觀，反之，因死亡細胞膜不完整、通透性增加，使得 trypan blue 得以將其染成藍紫色。將細胞從培養皿中分離下後以 800 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液，並以 1 mL complete medium 重新懸浮細胞；取 10  $\mu$ L 細胞懸浮液加入 10  $\mu$ L 0.4% w/v trypan blue 混合均勻，相當於將原始細胞液稀釋兩倍，取 10  $\mu$ L 至血球計數器中，血球計數器中的兩個槽內分別又區分成九個正方形區塊，面積各為 0.01 cm<sup>2</sup>，深度為 0.01 cm，因此體積為 10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>(=10<sup>-4</sup> mL)，計數四個角落方格中之活細胞數目。

細胞濃度 (cells/mL)=(四角落方格之活細胞數/4)  $\times$  2  $\times$  10<sup>4</sup>。



## 2.3 實驗方法

### 2.3.1 Tacrolimus-loaded 微胞開發及劑型優化


#### 2.3.1-1 Tacrolimus-loaded 微胞製備

加入 Tacrolimus、界面活性劑 poloxamer 188, poloxamer 407, polyoxyl 15 hydroxystearate (Kolliphor HS-15), polyoxyl 35 castor oil (Kolliphor ELP), polyoxyl 40 hydrogenated castor oil (Kolliphor RH40), polyoxyl 40 stearate, polysorbate 60, polysorbate 80、水及部分組別加入增稠劑 (carboxymethylcellulose sodium) 至 4 mL 玻璃樣品瓶中，以 120 rpm 攪拌均勻，最終形成微胞水溶液。

#### 2.3.1-2 Tacrolimus-loaded 微胞配方優化

劑型組成的開發先是篩選賦形劑，而後設計不同的配方組成，最後進行劑型的優化：

- 1) 在界面活性劑的選擇上，依據美國 FDA “Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products” 此資料庫，以用途作為依據，篩選出用於眼用製劑中的界面活性劑，同時參考 HLB 值 (Hydrophilic-Lipophilic Balance)，選擇其中較高者 (8 以上)、為較親水之界面活性劑，適合用於製備水溶液，自此選擇了其中 8 種界面活性劑。
- 2) 接著設計不同的配方組成，設計之賦形劑含量範圍參考了資料庫中對於每一界面活性劑的最大效價 (maximum potency)，相當於最高單位劑量，在此劑量內使用可視為無安全疑慮；將 8 種界面活性劑作為設計中的因子與其最大效價分別設定為各自的水準(見表一)，套入 BBD 實驗設計法、利用軟體 “Design-Expert” 設計，即可得 120 組配方 (見附表三)。
- 3) 分析製備所得的微胞特性，包含粒徑尺寸 (particle size) 及分布 (polydispersity index, PDI)、Tacrolimus 在劑型中的溶解度及穩定性 (室溫貯放 20 天後



Tacrolimus 含量測定)，作為初步資料的蒐集，並透過數學的計算建立一回歸模型；進一步設定劑型中各個標準 (criteria)：粒徑尺寸及分布愈小愈好，顆粒設定為奈米尺寸，即 1000 nm 以內，而 PDI 設定於 0.3 以內，Tacrolimus 溶解度則是愈高愈好，在劑型中的濃度盡可能地接近 0.1%，接著套用到所建立的模型，設計出優化的配方組成。

### 2.3.1-3 增稠劑之添加

增稠劑的選擇，首先依據美國 FDA “Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products” 資料庫，同樣篩選了使用於眼用製劑中的增稠劑，並且從中選擇較常被使用的增稠劑來進行研究，其中使用 7 種增稠劑如下：Carbomer copolymer type A, Carbomer homopolymer type B, Carbomer homopolymer type C, carboxymethyl cellulose sodium (CMC sodium), hydroxyethyl cellulose (HEC), Hypromellose 2910 (HPMC), methylcellulose，進行下一步的篩選。

將增稠劑加入不含有 Tacrolimus 的劑型當中，添加的濃度則為各增稠劑可使用之最大效價，並依各組別之相容性、粒徑尺寸及分布來選擇增稠劑；製備所得的微胞溶液先進行外觀觀察後，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，以進行初步的穩定性評估，觀察外觀是否產生明顯的變化，選擇外觀穩定者，測定粒徑尺寸及分布，後續進行 Tacrolimus 的添加，以 1 mg/mL 的濃度加入藥物至溶液中，混合均勻後觀察外觀及測定粒徑尺寸及分布。

### 2.3.1-4 製程調整

以不同的添加順序將劑型組成分混合，並比較之間在外觀和粒徑尺寸的差異。製備方法共有四種，分別如下：將 Tacrolimus、界面活性劑與水在 120 rpm 轉速下、以磁石攪拌混合，再接著加入 CMC sodium，混合均勻以形成微胞溶液；第二種則是混合界面活性劑、CMC sodium、水後再加入 Tacrolimus；以及界面活性劑、部分的水、Tacrolimus，先將他們混合後再加入 CMC sodium 及另一部分的水；最後一種則是同時加入並攪拌所有賦形劑和 API，最後形成微胞溶液；透過外觀的觀察、

粒徑尺寸及分布來比較之間的差異，探討製程中所添加賦形劑或 API 的順序是否會影響微胞溶液的特性。



### 2.3.1-5 Tacrolimus-loaded 微胞最終產品調整

為符合《中華藥典》對於眼用溶液滲透壓及酸鹼值之規範，眼用溶液之滲透壓應相當於 0.9% 氯化鈉溶液，不過眼睛對於 0.6% 至 2.0% 氯化鈉溶液之滲透壓仍具有耐受性，而以最理想的滲透壓為 308m Osm/kg，大多患者則是可以接受滲透壓介於 200-600 mOsm/kg 範圍內的溶液；眼用溶液之 pH 值以接近淚液 (pH 7.4) 最為理想，又以 pH 6.5-8.5 為可避免造成角膜損害之範圍。利用氯化鈉溶液及 TBS (Tris buffered saline) 來調整滲透壓約至 308 mOsm/kg、酸鹼值至  $\text{pH } 6.5 \pm 0.05$  至  $8.5 \pm 0.05$  之間。

### 2.3.2 Tacrolimus 定量分析

Tacrolimus 的分析主要是使用高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 進行藥物含量測定，藉由逆相 (reverse phase) 液-液層析法，移動相使用極性溶劑、固定相使用非極性的碳-18 管柱(C-18 column)，透過壓力使待測樣品在固定相中移動，因待測物中物質與固定相的作用力不同，在此根據極性差異進行分離，不同的物質先後通過管柱，並通過偵測器 (detector) 得到不同的峰值信號 (peak signal)，每個峰皆代表不同的化合物或混合物，最後進行分析、比對信號來判斷待測物中之藥物含量。

#### 2.3.2-1 檢量線配製

以 95% 乙醇溶解 Tacrolimus 至濃度 10 mg/mL，接著以 Acetonitrile (ACN)進行序列稀釋，將標準液配製為濃度 1000, 500, 250, 100, 10  $\mu\text{g/mL}$  濃度之標準品，在此濃度區間可得到一線性、 $r^2 = 1.000$  之檢量線，故在此區間之濃度可測得精準的定量結果。



### 2.3.2-2 樣品前處理

以 ACN 進行稀釋；添加增稠劑之樣品，需經過 0.45  $\mu\text{m}$  注射型過濾器進行過濾，以避免樣品於分析管住中析出。

### 2.3.2-3 分析條件

以高效液相層析儀 (HPLC) 進行藥物含量測定，流速為 1.2 mL/min.，偵測波長為 213 nm，管柱烘箱溫度為 50°C，樣品注入體積為 10  $\mu\text{l}$ ，分析時間為 12 分鐘，移動相分別為二次水及 ACN，以等位梯度進行沖提，流動相比例為 ACN:ddH<sub>2</sub>O = 75:25，注射針以 ACN 清洗。

## 2.3.3 微胞特性分析

### 粒徑大小及分布測定

微胞的粒徑大小與分布可利用粒徑分析儀測定。其作用原理為利用光散射原理測定懸浮在液體中的顆粒粒徑分布，當激光束照射到溶液中的懸浮顆粒時，由於顆粒的隨機布朗運動，使顆粒產生的散射光也有不同的起伏波動，散射光的相位相互疊加、產生亮區與暗區，使光強度呈波動形式，可以藉由分析散射強度圖得知粒徑大小分布。

### 滲透壓測定

微胞溶液的滲透壓可使用滲透壓儀測定。其作用原理為利用冰點下降法 (freezing point depression method) 之原理進行滲透壓的測定；當一水溶液、其中因溶質的存在，相較於純水，水溶液的冰點會較低。

當水溶液被快速冷卻至冰點以下，此時溫度雖然以達到結冰點、甚至超過結冰溫度，而不發生結冰的現象，稱之為「過冷現象」，此時液體狀態極不穩定，若給予劇烈的搖動或振動，會使其立即結晶、形成冰晶，並且晶化的過程會釋放凝固熱，此時的放熱作用會造成溶液的溫度上升，且逐漸到達穩定平衡狀態（而未發生液化



前)，測量其下降之溫度。

與純水相比，當水溶液的凝固點每下降  $1.858^{\circ}\text{C}$  時，其滲透壓便增加  $1\text{ mOsm/kg}$ ，透過比對水溶液凝固點下降的程度，可以推算出水溶液的滲透壓。

$$C_{\text{osm}} = \Delta T / K$$

- $C_{\text{osm}} = \text{osmolality (osmol/kg)}$
- $T = \text{depressing freezing temperature (}^{\circ}\text{C)}$
- $K = \text{coefficient of freezing point} = 1.858 (^{\circ}\text{C kg/osmol})$

### pH 值測定

微胞溶液的酸鹼值可使用 pH meter 測定。

### 黏度測定

微胞溶液的黏度可使用黏度計測定，並考慮到待測樣品黏度較低，以 shear rate 為  $150\text{ rpm}$  的轉速下進行測定。

### 2.3.4 安定性試驗

將製備所得的微胞溶液以  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  的注射型過濾器進行過濾，並貯放於室溫下 (ambient temperature)，在指定時間點進行 Tacrolimus 的含量分析，以製備第 0 天時 Tacrolimus 的含量作為 100%，其餘指定天數時相比於第 0 天的含量將其換算為百分比，用以計算 Tacrolimus 的降解程度，來評估 Tacrolimus 在劑型中之穩定性。

### 2.3.5 體外藥物釋放試驗

採用 Franz cell 直立式擴散式裝置 (vertical Franz diffusion cells) 進行。

#### 2.3.5-1 Franz cell 分類

- *in vitro* permeation testing (IVPT): 膜作為 API 擴散的限速屏障；
- *in vitro* release testing (IVRT): 膜用以判定 API 擴散的能力，此試驗主要探討 IVRT 之結果。



### 2.3.5-2 Membranes for IVRT

一般合成膜有直徑、孔徑大小、厚度、化學組成、親疏水性質及孔隙率等差異。使用於評估藥物釋放應以對 API 阻抗力最小、且同時能夠保留劑型中其他組分的膜較為合適，於

附表二列舉常見的人工合成膜（以下簡稱人工膜）。

### 2.3.5-3 sink condition

當溶質濃度在一溶液中的濃度越趨近飽和時，溶離的速率便會顯著地降低，足以嚴重影響到實驗結果，而一般我們會要求溶液至少能溶解 3 倍劑型中藥物量的能力，如此稱它維持 sink condition；以體外試驗所使用之 30% ethanol pH = 7.4 磷酸鹽緩衝溶液作為介質來溶解 Tacrolimus，接著以 0.22  $\mu\text{m}$  的注射型過濾器進行過濾，以去除多餘或沉澱的 Tacrolimus，利用 ACN 進行稀釋後再進行定量，將結果進行比對，以評估使用此一緩衝溶液作為介質是否合適。

### 2.3.5-4 實驗流程

上蓋為給藥室 (donor chamber)、下座為接收槽 (receptor chamber)，加入 0.1 mL 的樣品於給藥室，並以 Parafilm® 封好、以避免樣品蒸發而流失，接收槽為一雙層玻璃槽、內部充填 5 mL 的 30% ethanol pH = 7.4 磷酸鹽緩衝溶液，底部放入磁石、以 600 rpm 的速度進行攪拌，給藥室與接收槽的接觸表面積為 1  $\text{cm}^2$ ，中間以孔洞 0.22  $\mu\text{m}$  的 cellulose acetate (CA) 合成膜作為穿透屏障，並以金屬夾固定；接收槽外玻璃夾層間以 32  $^{\circ}\text{C}$  之循環水浴進行恆溫，以模擬眼表之溫度；於固定時間點 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4 小時採取 0.25 mL 樣品，並補回同樣體積之磷酸鹽緩衝溶液，以維持 sink condition；接著以 HPCL 進行藥物含量分析。



### 2.3.6 體外細胞毒性測定

透過 MTT 試驗 (MTT assay) 測量細胞生存率 (cell viability)，以評估 Tacrolimus-loaded 微胞溶液對於兔子角膜上皮細胞 (SIRC) 的毒性。MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 可用以測量粒線體內 NADH, NADPH 去氫酶 (mitochondrial dehydrogenases) 之活性，其可使水溶性 tetrazolium salt (MTT) 還原成藍色結晶物 formazan。由於 NADH 及 NADPH 去氫酶只有在活細胞中才具有活性，故可利用此方法間接檢測細胞存活率。

將  $7 \times 10^3$  個細胞種至 96 孔盤中，並在 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 下培養 18 小時；加入以培養液稀釋 10 倍的 Tacrolimus-loaded 微胞水溶液至孔 (well) 中，與細胞共培養 0.5 小時，接著將其替換為培養液後再培養 24 小時，移除培養液，並加入 10  $\mu$ L 的 5 mg/mL MTT 溶液至每個孔中，再與細胞避光培養 2 小時後移除，所產生的藍紫色結晶產物 formazan 以 100  $\mu$ l DMSO 溶解，並以 Microplate Reader 於波長 570 nm 下測量吸光值，定量 formazan。細胞存活率之公式如下：

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{mean absorbance of treated cells}}{\text{mean absorbance of control cells}} \times 100\%$$

藥物處理的部分，則是先將微胞水溶液以 0.22  $\mu$ m 的無菌注射型過濾器進行過濾，在有增稠劑添加的組別則因增稠劑無法透過過濾器過濾，另取所需之增稠劑以高溫高壓滅菌，再與其餘無菌之水溶液進行混合，以確保得到無菌之溶液，接著與上述相同作法，將細胞與稀釋 10 倍後的微胞水溶液培養不同時間，處理的時間分別為 1、2、4 及 24 小時，用以測定微胞水溶液對於細胞所產生之毒性是否具時間相依性 (time-dependence)；另外，將微胞水溶液以培養液稀釋 100 倍與細胞共培養 24 小時，評估稀釋倍率較高之劑型所可能對細胞存活產生的影響。



### 2.3.7 體外細胞攝入試驗

將藥物與細胞共培養至指定時間後，觀測細胞將藥物攝入的量，用以判定與比較在劑型添加增稠劑之後，藥物被細胞攝入的情況和差異。

種下  $10^6$  顆細胞至 30-mm 培養皿中，於  $37^{\circ}\text{C}$  下培養約 20 小時，使細胞良好地貼附在培養皿上，接著以 PBS 清洗兩次，加入 0.5 mL 以無血清、無酚紅之培養液稀釋 10 倍的藥物，在藥物處理 15 分鐘後，移除培養液，並以 PBS 清洗後，加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 刮除細胞。

將部分細胞液進行藥物的定量，另一部分則用於蛋白質的定量；部分細胞液加入 ACN 稀釋後 vortex，以 10000 rpm 離心 10 分鐘取上清液並利用 HPLC 進行藥物含量測定。定量細胞中之蛋白質，用以標準化 (normalize) 藥量來計算細胞內單位蛋白質藥量的攝入，細胞藥物攝入量計算公式如下：

$$\text{Drug uptake } (\mu\text{g}/\text{mg protein}) = C_{\text{TAC}}/C_{\text{protein}}$$

- $C_{\text{TAC}}$ : the intracellular concentration of Tacrolimus
- $C_{\text{protein}}$ : the concentration of cellular protein

透過 BCA assay 的方式完成定量，原理為 BCA (bicinchoninic acid) 於鹼性條件下可將雙價的銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 還原成單價的亞銅離子 ( $\text{Cu}^{+}$ )，再由兩分子的 BCA 螯合亞銅離子，產物呈藍紫色，在 562 nm 的波長，蛋白質濃度於 20-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  可呈現線性關係；以 BSA (bovine serum albumin) 作為 standard 並稀釋至不同濃度，以 BCA solution 及 Copper solution 配置使用溶液 (working solution)，接著分別與 standard 和樣品混合均勻，加至 96 孔盤中，放入  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱反應 1 小時，拿出後冷卻至室溫，以 562 nm 的波長測定吸光值。

## 2.4 統計方法

本研究試驗結果皆至少重複三次，統計數據以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  (standard error of the mean) 呈現，分析方法為 Student's *t*-test 進行檢定。當  $P < 0.05$  標示為\*；當  $P < 0.01$  標示為\*\*；當  $P < 0.001$  標示為\*\*\*。

### 第三章、結果



#### 3.1 Tacrolimus-loaded 微胞開發、劑型優化及特性分析

我們以 Box-Behnken Design，即 BBD 實驗設計法，來設計不同配方組成，與其他方法如因子設計或中央合成設計等方法相比，BBD 試驗的次數最少、解析度較高，也符合我們所使用之界面活性劑種類較多，能夠依據各個界面活性劑使用上的濃度限制來做設計。

依據以下步驟進行設計，包含初步分析 (Analysis)、優化 (Optimization) 及驗證 (Post-analysis)：

##### 3.1.1 初步分析 (Analysis)

蒐集有關特性分析的數據，並透過數學的運算得以構建模型，接著用以調整配方；依據 BBD 所設計之組成配方製備承載 Tacrolimus 的微胞，進行初步的特性分析，結果列於表二、表三及表四，並且藉由所蒐集到的數據建立模型，對於粒徑尺寸、粒徑分步、Tacrolimus 溶解度的回歸模型分別如下：

- $\text{particle size} = 11.54 - 0.05A + 0.36B + 0.31D + 0.26E - 0.34F - 0.13G - 1.33H + 0.33AG + 0.60DF + 0.31DG + 0.34FG + 0.44FH - 0.28B^2 + 0.48F^2 + 0.47H^2$ ；
- $\text{PDI} = 0.17 + 0.01A + 0.06B + 0.01D + 0.01E + 0.09F + 0.02AE + 0.01BC + 0.02BD - 0.03BH + 0.03DF + 0.02F^2 - 0.01G^2 + 0.01H^2$ ；
- $\text{solubility of TAC} = 0.76 - 0.01B + 0.10D + 0.03E + 0.12F + 0.02G + 0.16H - 0.04BF - 0.02CG - 0.03DF - 0.02DG + 0.02EG - 0.02FG - 0.02FH + 0.01B^2 - 0.04D^2$ ；

其中英文字母 A、B、C.....分別代表以下：poloxamer 188, poloxamer 407, polyoxyl 15 hydroxystearate, polyoxyl 35 castor oil, polyoxyl 40 hydrogenated castor oil, polyoxyl 40 stearate, polysorbate 60, polysorbate 80，模型中相乘及二次項皆代表著交互作用項，各項係數皆以四捨五入進位呈現，其數值越大則代

表對於相關特性的影響越大。

關於眼藥水的粒徑尺寸及分布，一般以粒徑小於  $10\ \mu\text{m}$  為要求 [40]，超過此尺寸的顆粒容易造成患者眼部的不適，因而產生異物感；另一方面，較小的顆粒具有較大的表面積，能夠與角結膜產生良好的相互作用，並且有機會更快地釋放藥物。我們就結果來看（表二），每組的數值十分相近，所製得的微胞粒徑尺寸皆於  $20\ \text{nm}$  以內（ $9.7$  至  $18.9\ \text{nm}$ ），而 PDI 大多小於  $0.4$ ，僅有三組 PDI 大於  $0.4$ ，一般會以 PDI 小於  $0.3$  作為溶液中顆粒粒徑大小分布均一的判斷依據，不過以 PDI 小於  $0.4$  的結果來討論，也能說明大部分顆粒均勻地分散在溶液中；而表六和表七為利用軟體計算出粒徑尺寸及分布結果所得的變異分析表和缺適度檢定表，本篇研究之顯著性門檻 (significance threshold) 設定為  $0.1\%$ ，即 P 值 (P value) 小於  $0.0001$  ( $p < .0001$ )，分別可以看出 polysorbate 80 對粒徑尺寸、poloxamer 407 及 polyoxyl 40 stearate 對粒徑分布的影響最大，不過雖然能自變異分析表看出界面活性劑成分對於粒徑尺寸及分布的影響，但又因組間結果差異並不大，且皆為奈米尺寸，因此難以透過調整界面活性劑的組成，來控制微胞的粒徑尺寸及分布。

接著看到 Tacrolimus 在劑型中溶解度測定的結果，以變異分析表（表八）可以知道 polyoxyl 35 castor oil、polyoxyl 40 hydrogenated castor oil、polyoxyl 40 stearate、polysorbate 80 及 poloxamer 407 與 polyoxyl 40 stearate 的相互作用對於 Tacrolimus 的溶解度影響最大；以缺適度檢定表來看，我們知道，統計學上的迴歸分析 (regression analysis) 用以研究特性間的關係，通常利用一數學模型來表示，又迴歸模式是否有效及其解釋能力大小，一般是以決定係數 (coefficient of determination,  $R^2$ ) 作為指標，當  $R^2$  愈趨近於  $1$ ，表示大部分因變數之變異是由自變數影響而來，也代表利用自變數來解釋因變數的能力越強，因此所建立的迴歸模型為合適且可接受的，在經由計算後，得到表中調整後的 R 平方 (adjusted  $R^2$ ) 為  $0.9345$ ，代表著此特性，也就是 Tacrolimus 的溶解度有約  $93\%$  受到配方組成的影響，顯示出利用數學計算出的迴歸模型來推測 Tacrolimus 溶解度，應具相當可信度。



### 3.1.2 配方組成之優化 (Optimization)

為了優化配方，我們由蒐集到的數據建立一迴歸模型，並藉此模型來重新設計出配方及預測不同配方組成所得溶液的特性，我們從中依據粒徑尺寸及分布、Tacrolimus 的溶解度及短時間貯放後之安定性所做之綜合性評估，取其中三組配方作為優選之組別，如表十所列，將其分別命名為 A、B、C，三組的粒徑尺寸及分布都相當小，選擇綜合評分最高者為 A、TAC 溶解度較高者為 B 以及組 C 為組成中多了前兩組沒使用的 poloxamer 407，接著以數學計算，透過建立模型預測相關特性，進行後續的實驗。

### 3.1.3 驗證 (Post-analysis)

為了驗證設計出的模型是否具有可信度，我們利用模型計算賦形劑之間的比例，並依此進行微胞溶液的製備，將分析所得微胞溶液的特性，進而與模型預測的結果相互比較，可見表十一，預測的數值與實際上實驗所得到的結果相當接近，所以由後續驗證的分析結果來看，此模型具有可靠度，我們可以利用建立的模型來進行配方組成的設計以及結果的預測。

### 3.1.4 pH 值及滲透壓之調整

為了避免病患在使用眼藥水時受到損害，應提升安全性並且盡可能降低使用上可能出現的不適感，因而調整眼藥溶液的滲透壓及 pH 值；眼睛對於眼藥水的高或低滲透壓並不具耐受性，而不當的 pH 值則有可能導致角膜損傷。在調整滲透壓及 pH 值的過程中，先是選擇了 0.9% 的氯化鈉溶液，不過因為微胞溶液本身離子的存在，而使得滲透壓偏高，約為 400 mOsm/kg；因而改以採用 0.6% 的氯化鈉溶液，此時滲透壓調整至  $288.0 \pm 1.63$ 、pH 則為  $5.41 \pm 0.01$ ；下一步則是加入了 2M Tris-buffered saline (TBS) 來進行 pH 值的調整，最終可以得到滲透壓約為 300 mOsm/kg、pH 值趨近於 7 的溶液 (表十二)，符合法律規範且具有一定的安全性，在使用上人類的眼睛對於這樣的滲透壓及 pH 值也不會產生不適感。



## 3.2 增稠劑添加對劑型之影響

### 3.2.1 劑型與增稠劑之相容性評估

為了增加溶液的黏度，以提高眼藥水停留在眼睛表面時間的可能，選擇使用增稠劑來加入上述優選的組別當中，來調整溶液的黏度。而在篩選增稠劑的第一步，將增稠劑與不含有 Tacrolimus 之劑型混合後，以外觀作為評定的標準，觀察賦形劑之間的相容性。在剛製備完成的溶液中，使用 Carbomer copolymer type A 作為增稠劑的組別呈現半透明貌，在離心後變為透明而有少許沉澱，可能為增稠劑無法均勻分散在系統當中；加了 Carbomer homopolymer type B 的組別外觀呈現不透明且在離心後出現分層的現象，代表系統相對不穩定；Carbomer homopolymer type C 無法與其他賦形劑混合均勻；CMC sodium 與系統混合後呈現透明的外觀，離心後仍維持透明澄清貌；加入 HEC 的溶液外觀為不透明；加入 HPMC 或是 methylcellulose 的外觀雖然呈現半透明的樣貌，卻是在攪拌後，仍無法與其他賦形劑混合均勻，見表十三。

所以根據外觀觀察藉以初步判定增稠劑與其他賦形劑相容性的結果，將選擇第一種及第四種，分別為 Carbomer copolymer type A 與 CMC sodium，作為增稠劑的候選者，進行下一步的篩選。

可以看到表十四，加了 Carbomer copolymer type A 的組 B 及 C，粒徑大於 1000 nm，且 PDI 大於 0.4，顯示溶液中有許多大小不一的顆粒，且其中有相當大的顆粒，已經超出最初我們對於奈米尺寸的要求，故判定此一增稠劑不適用；表十五則是添加 CMC sodium 粒徑尺寸及分布的測定結果，粒徑小且符合我們對於微胞顆粒的要求，顯示以 CMC sodium 加入系統之中能夠與其餘賦形劑均勻地混合，且在 0.5% 的濃度下來添加與系統其他組成分具有良好的相容性，所以在後續的實驗中，選用 CMC sodium 作為增稠劑添加至劑型中，並將配方命名為 A4、B4、C4。



### 3.2.2 藥物與劑型之作用

雖然在相容性的評估時，已經以外觀及粒徑尺寸來篩選增稠劑，而選擇了 CMC sodium 作為候選者，不過尚無法確認藥物是否會與其產生交互作用而有其他不良的影響，便製備了含有藥物及增稠劑之微胞溶液。可以看到表十五的結果中，在 Tacrolimus 加入了含有增稠劑的劑型之後，因藥物被包裹在微胞顆粒之中，使得粒徑變大，而外觀則是從透明變為半透明的樣貌（表十六）。

### 3.2.3 製程調整之影響

在調整製程上，我們期望以最少的時間來完成微胞溶液的製備，以最佳的效率來製備出符合我們對於眼藥水要求的溶液，包括粒徑在奈米尺寸等級且溶液呈現透明澄清的樣貌。

我們實際調整了微胞溶液製備時添加賦形劑和 API 的順序，製備完成後以肉眼觀察外觀及測定粒徑尺寸及分布。根據附圖七的結果，在外觀上並沒有明顯的差異，皆呈現透明澄清的外貌，顯示系統均勻地混合，接著進一步測定他們的粒徑尺寸及分布，所得數值如附表四所列，可以見到不論是先加入增稠劑、或是在其餘賦形劑與藥物混合後才加入、或是同時將賦形劑及藥物一同攪拌直到容易呈現均勻的樣貌，在粒徑尺寸及分布的測定中，呈現了相近的結果。

所以根據以上的結果，在後續的實驗當中，我們選擇製備時間最少、效率最佳的方式來製備微胞溶液，也就是將所有賦形劑、水相和 Tacrolimus 同時以磁石攪拌直至均勻的方式來進行微胞溶液的製備。

### 3.2.4 滲透壓及 pH 值之調整及其影響

為了避免病患在使用眼藥水時受到損害，應提升安全性並且盡可能降低使用上可能出現的不適感，同樣調整了眼藥溶液的滲透壓及 pH 值；我們使用 0.6% 的氯化鈉溶液及 2M TBS 將滲透壓及 pH 調整至理想的範圍內，A4、B4、C4 之滲透

壓分別為 289、305、301，及 pH 值分別為 7.48、7.35、7.35 (圖一)，符合法律規範且具有一定的安全性，用於眼睛中也不會產生不適感。

但同時，發現在調整了滲透壓和 pH 值之後，所測得的粒徑變大許多，見表十七。一開始推測為劑型 pH 值造成之影響，便想透過調整劑型的 pH 值來觀察是否為其原因，先是加入了不同 pH 值之 TBS 以製備出不同 pH 值的微胞溶液 (表十八)，分別進行了一周內的外觀觀察、滲透壓及粒徑尺寸與分布之測定。外觀上如表十九所示，沒有明顯的變化，在室溫貯放一個禮拜後也沒有肉眼可觀察到之變化；滲透壓的結果如圖二所列，因溶液中離子數量沒有改變，所以滲透壓並不會受到影響；而在粒徑尺寸及分布的結果中 (圖三)，雖然在稍微偏鹼的劑型中，發現粒徑尺寸的改變，卻無法從中觀察及歸納出，對於劑型而言，是否在較酸或鹼性的環境下，所產生粒徑尺寸的變化有一定的趨勢。

此時，我們推翻一開始的假定，選擇從問題的根本——我們所測得變大的粒徑會是微胞顆粒本身亦或是 CMC sodium——來進行討論。如果是微胞顆粒本身，便可以透過改變緩衝液或試劑的使用，來調整 pH 值或滲透壓，但是這樣的情況在沒有 CMC sodium 的添加下並不會發生，所以認為或許是 CMC sodium 發生作用；如果是 CMC sodium，就可能是因為 pH 值、鹽類或者是同時受到 pH 及鹽類的影響，使得 CMC sodium 發生作用，而導致粒徑的改變。是以，我們改以配置 pH 7.4 及 7.0 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer solutions 來進行 pH 值的調節，而滲透壓仍是使用 0.6% 的氯化鈉溶液來調整，據表二十，分別比較了有無添加增稠劑的組別，可以看到沒有增稠劑的組 A，其粒徑大小與原先測得一致，落在 20 nm 以內；含有增稠劑的組 A4，在沒有氯化鈉溶液的添加時，粒徑小於 100 nm，溶液也呈現透明貌，但是一旦加入了氯化鈉溶液，不論是否添加 pH 7.4、pH 7.0 的 buffer 或是沒有添加，他們的粒徑都超過 100 nm，我們推測是因為氯化鈉的存在使得粒徑尺寸發生了變化。



### 3.3 Tacrolimus 定量分析

以 HPLC 進行 Tacrolimus 的定量分析。參考過去文獻[41]，將流速設定為 1.0 mL/min.，管柱溫度 50°C，樣品注入體積為 10  $\mu$ L，以 ACN 清洗注射針 (needle wash)，標準品稀釋液為乙醇，移動相使用二次水 (移動相 A) 及 ACN (移動相 B)，使用 C18 管柱進行分析，以 213 nm 波長進行偵測。採梯度沖提 (gradient elution) 方式，一開始移動相 A：移動相 B 比例為 70:30，2 分鐘時移動相 A：移動相 B 比例為 0:100，8 分鐘時移動相 A：移動相 B 比例回到 70:30，時間程序 (time program) 共計 12 分鐘，所得的 HPLC 圖譜如圖四 (A)。

在改變移動相的比例時，峰線隨著 ACN 的增加，而有了上升的現象，當移動相比例回到與起始時相同的比例，峰線也隨之趨於平緩，回到原先基線 (baseline) 的位置；Tacrolimus 的滯留時間為 6.511 分，此時 Tacrolimus 濃度為 100  $\mu$ g/mL。

為了使分析方法更適合進行樣品的定量，進行了以下參數的調整：

考慮到當標準品濃度較低時，例如濃度稀釋至 50  $\mu$ g/mL 的標準品溶液，所得的圖峰 (peak) 較小、訊號強度稍低，且與雜訊的訊號強度相近，為使樣品中 Tacrolimus 所被偵測得到的訊號強度增強，先是調整了樣品注入體積，增加至 20  $\mu$ L；另外考量到以梯度沖提進行層析，峰線在移動相比例改變時需要時間平衡，為避免此現象的發生，將沖提方式改以等位沖提 (isocratic elution)，移動相的比例則調整成 ACN:ddH<sub>2</sub>O = 70:30，而此時圖譜呈現見圖四 (B)。

Tacrolimus 的滯留時間為 10.360 分，此時 Tacrolimus 濃度為 100  $\mu$ g/mL。相較於一開始的分析條件下，圖峰的滯留時間 (retention time) 晚了近四分鐘；而以等位沖提的方式層析，峰線可避免因梯度沖提所致圖峰上升、下降的現象，使得峰線在整個分析過程中較為平穩。

而以上述條件進行層析，Tacrolimus 的圖峰會於分析過程中的後段才出現，為使圖峰大致於分析過程中的一半時間出現、即使得圖峰向前移，將流速提升至 1.2

mL/min.，同時改變移動相比比例為 ACN:ddH<sub>2</sub>O = 75:25，卻出現了拖尾 (tailing) 的現象，如圖四 (C)。

Tacrolimus 的滯留時間為 8.324 分，此時 Tacrolimus 濃度為 100 µg/ml。雖然滯留時間減少，但是出現拖尾現象，推測為樣品注入體積稍高。

因此減少了樣品注入體積為 10 µL，可得圖四 (D)；另外，Tacrolimus 圖峰以前出現了雜訊 (noise) (滯留時間分別為 2.638 分及 3.805 分)，推測由於乙醇的 UV 界限波長 (UV cut off) 在波長 210 nm，與 Tacrolimus 的分析波長 213 nm 相當接近，所以出現了雜訊，為了降低此雜訊，標準品溶液改先以乙醇溶解後，再以 ACN 稀釋，而最終分析條件下定量 Tacrolimus 的圖譜如圖四 (E) 所示。

將流速設定為 1.2 mL/min.，管柱溫度 50°C，樣品注入體積為 10 µL，以 ACN 清洗注射針，標準品稀釋液為乙醇與 ACN，移動相使用二次水及 ACN，採等位沖提方式層析，移動相二次水與 ACN 比例為 75:25，使用 C18 管柱進行分析，以 213 nm 波長進行偵測。

在標準品濃度 10 µg/mL 至 1000 µg/mL 的範圍內，可以計算得到一  $R^2=1$  的線性回歸方程式 (附圖八)，意指使用 HPLC 並以上述分析參數進行 Tacrolimus 的定量，所得的波峰面積 (peak area) 在代入此式後，可以換算得到精確定量的結果，即推算出 Tacrolimus 的濃度。

### 3.4 Tacrolimus 微胞溶液黏度測定

我們期望在劑型中加入增稠劑，能夠提高微胞溶液的黏度，如此有機會提高溶液在眼睛表面的停留時間，使得劑型有更長的時間能夠發揮藥效並且被眼睛組織所吸收，或許能夠改善眼藥溶液低的生體可利用率。因此我們針對未添加及有添加 CMC sodium 的組別進行了黏度的測定，測得的結果如圖五所示，未加入 CMC sodium 作為增稠劑的組別 A、B 及 C，其黏度約為 5 mPa·s，而加入 CMC sodium

之組別 A4、B4 及 C4，黏度則是高了約 10 倍、黏度約為 50 mPa·s，其差異在計算相較後具統計意義，可以見得，增稠劑的添加確實能增加劑型的黏度，有機會藉此延長劑型停留在眼睛表面的時間。

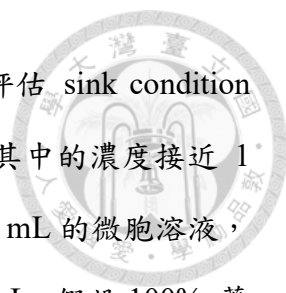


### 3.5 安定性試驗

為了解所建構之微胞溶液於室溫環境貯放的穩定性，我們將新鮮製備之 TAC-loaded micelle 避光並貯放於室溫之下，間隔不同天數時取出進行外觀觀察，並檢測在微胞溶液中藥物的含量，以計算各時間點藥物降解情況，並觀察外觀上是否因保存時間而改變。由表二十一可知，在室溫下貯放的微胞溶液，在短時間內 (20 天) 外觀上並沒有產生肉眼可觀察之改變，仍是維持透明澄清的外觀，沒有因保存時間延長而改變；而 Tacrolimus 含量的測定，以製備第 0 天時 TAC 的含量作為 100%，其餘指定天數時相比於第 0 天的含量將其換算為百分比，用以計算 Tacrolimus 的降解程度，來評估 Tacrolimus 在劑型中之穩定性，根據圖六並沒有看到發生明顯的降解，所以推論以優化的配方組成所製備出的微胞溶液，對於 Tacrolimus 來說，是一個穩定而不易發生降解的環境，顯示 TAC-loaded micelle 避光貯存於室溫大致穩定。

### 3.6 體外藥物釋放試驗

已知 TAC 這類疏水性物質若包覆於微胞顆粒，能夠穩定存在其中，並且承載一定的 TAC 含量；由於我們希望 TAC-loaded micelle 實際應用於眼睛疾病的治療，在此之前我們想要知道 TAC-loaded micelle 添加了增稠劑後，對於藥物釋放會有什麼樣的影響，所以我們將 TAC-loaded micelle 加至 Franz cell 的給藥室，於 32 °C、30% ethanol 磷酸鹽緩衝溶液中，評估微胞溶液的藥物釋放情況。



首先我們需要評估介質對於藥物釋放試驗是否合適，而在評估 sink condition 的測試中，相較於本研究所製備出的微胞溶液，Tacrolimus 在其中的濃度接近 1 mg/mL，將其視為 1 mg/mL，且於 Franz cell 的給藥室中加入 0.1 mL 的微胞溶液，故此時加入的藥量為 0.1 mg，而 Franz cell 的接收槽體積約為 5 mL，假設 100% 藥物能夠通過人工膜並溶於下層的緩衝溶液中，為了維持 sink condition，在此 5 mL 的緩衝溶液應要能溶解 0.3 mg 或更多的藥量，即 1mL 的緩衝溶液須至少能夠溶解 0.06 mg 的 Tacrolimus；根據測試結果我們得到使用 30% ethanol pH = 7.4 磷酸鹽緩衝溶液來溶解 Tacrolimus，其定量所得為 0.15 mg，即超過上述所要求之藥量，所以使用此緩衝溶液來進行微胞溶液的體外藥物釋放測試是合適的。

在選定藥物釋放試驗的介質後，我們實際評估微胞溶液的藥物釋放情況，在附圖九列出了劑型在添加了增稠劑後藥物釋放測試的結果，其中呈現的方式縱軸為累積藥量，橫軸則是時間，可以看到附圖九 (A) 未添加 CMC sodium 的 A、B、C 組別在 0.5 小時的時間點測得 TAC，而附圖九 (B) 有添加 CMC sodium 的 A4、B4、C4 組別則很有可能因為添加了增稠劑，在穿透人工膜需要較長的時間，使得藥物在以 Franz cell 試驗得到了較慢釋出的結果，在 1 小時的時間點測得 TAC，這樣的結果我們可以知道 TAC-loaded micelle 在添加了增稠劑後，會使得藥物較慢穿透人工膜。

又根據圖七可以看到在 1.5 小時的時候，我們計算了累積藥量百分比，作為藥物在此時間點釋放的速率；在沒有增稠劑添加的情況下，藥物能夠較快地被釋出，又因為作為眼藥水的形式存在，我們無法控制流動性高的液體在穿過人工膜時的速率，使得測得累積藥量之數據分散程度較高，而得到較大的標準差，而黏度較低的眼藥水，容易因為淚液的分泌、眨眼的動作、最終遭沖刷而導致藥物的流失；在添加了 CMC sodium 之後，因為黏度較高的緣故，使得樣品不同於流動性高的組別反而具較小的差異，更能夠得到準確之試驗結果，據結果，藥物的釋放速率降低，因黏度的關係而以較慢的速率穿透人工膜。



### 3.7 體外細胞毒性測定

本實驗為了證實所設計出配方組成之微胞溶液在模擬眼藥水短暫停留眼表所可能對細胞所造成之影響，以 MTT assay 評估劑型對於兔子角膜細胞的毒性。考量到藥物停留在眼睛表面的時間相當短暫，所以我們希望盡可能減少劑型與細胞共培養的時間，以及考慮實驗操作上可能因時間過短所造成的實驗誤差，我們選擇將劑型與細胞共培養 0.5 小時。由圖八 (A) 我們可以看到，以劑型處理細胞 0.5 小時，並改換培養基培養細胞 24 小時後，細胞的存活率仍相當高，顯示劑型在短時間內並不會對細胞產生明顯的毒性或是細胞在經過劑型處理後能夠自行修復，根據 MTT assay 的結果我們知道，所製備的微胞溶液對於兔子角膜上皮細胞具有低細胞毒性。

另以劑型對細胞分別處理不同時間，包含了 1、2、4 及 24 小時，用以觀察劑型對於細胞毒性是否具時間相依性 (time-dependence)。在圖八 (B)(C) 中，劑型對藥物處理一小時後的細胞存活率僅約 30%，隨著處理時間的增加，可以明顯看到細胞存活率的降低，而在處理了 24 小時後，存活率僅剩下 6%，也就證實了劑型對於兔子角膜細胞所產生之毒性具有時間相依性，不過在實際給予病患藥物時，眼藥停滯眼表的時間相當短暫，所以劑型仍具使用上之安全性。

相比於上述將劑型稀釋 10 倍的結果，我們想要調整劑型的稀釋倍率，去評估劑型濃度之差異對於細胞毒性的影響；我們將劑型稀釋了 100 倍後，並加入培養皿中與細胞共培養 24 小時 (圖八 (D))，不論是有添加增稠劑的組別，或是沒有添加，細胞存活率約為 10-20%，可以見得稀釋後的劑型對於細胞的毒性還是很明顯；如果需要進一步降低劑型可能造成的毒性，我們可以透過調整其中賦形劑的濃度來達成，首先需要探討在我們的劑型中，所使用的賦形劑在我們設計的配方組成中對於細胞存活率的影響，因此我們根據所選用賦形劑之最大效價，即各個賦形劑用於劑型中的最高濃度作為標準來進行試驗，個別將其稀釋 10、100、1000 倍，並與

細胞共培養 24 小時後測定細胞存活率，可以得到稀釋了 10 倍的 5% K.ELP、7% P40S 及 4% T80 對於細胞有較高的毒性 (圖八 (E))。



### 3.8 體外細胞攝入試驗

在 TAC-loaded micelle 實際應用於眼睛疾病的治療之前，我們想要知道 TAC-loaded micelle 添加了增稠劑後，對於藥物在細胞攝入是否產生影響，因此我們透過體外細胞的試驗來進行研究。

我們利用細胞內蛋白質含量作為標準化的依據，將所測得之 TAC 含量與蛋白質含量相除，計算得到細胞攝入的數值，結果如圖九所示，以未添加 CMC sodium 的劑型處理細胞 30 分鐘後，細胞所攝入的 Tacrolimus 含量稍微較高，不過在統計意義上並不具有顯著差異，與添加了 CMC sodium 的組別結果相當，所以我們推論增稠劑 CMC sodium 的添加在體外細胞攝入試驗中並不會明顯地影響細胞對於藥物的攝入，而未來我們將會以動物試驗來驗證給藥後，藥物被細胞所攝入的實際情況。

## 第四章、討論




### 4.1 Tacrolimus-loaded 微胞溶液製備與其特性分析

我們透過 BBD 所設計出的組別、進行了資料的蒐集，並分析這些數據以獲得一具有可靠度的回歸模型，接著利用建構的模型來進行配方組成的設計以及結果的預測，進一步分析了獲選組別的特性，可以得到粒徑尺寸及分布符合我們對於微胞顆粒應為奈米等級的要求，外觀上也呈現透明澄清的樣貌，以此降低病患在接受給藥時，可能會產生的不適感或是視力混濁的情況，進而提升病患依順性；值得一提的是，此時 Tacrolimus 在這樣的配方組成之下，濃度可達約 0.1%，相較於過去部分文獻中研究製備的 Tacrolimus 製劑濃度還要來得高，或許藉此配方組成可以提升像 Tacrolimus 這類疏水性藥物的溶解度。

我們利用 0.6% 的氯化鈉溶液及 2M TBS 來調整滲透壓及 pH 值，經過調整後的微胞溶液其滲透壓及 pH 值皆符合法律規範並具有一定的安全性，在使用上也能夠盡可能地降低人類眼睛對於眼藥水的不適感。

而在增稠劑的添加上，我們透過相容性的評估，依據外觀、粒徑尺寸與分布來篩選增稠劑，最終以 CMC sodium 作為增稠劑來添加至劑型當中，在製備了含有藥物及增稠劑的微胞溶液後，我們發現 Tacrolimus 的加入，在含有增稠劑的劑型顆粒變大了，而外觀則是呈現半透明的樣子；因為 TAC 分子量不小，作為一個疏水性的藥物，為了要去容納在微胞顆粒的空間，很有可能因此改變了微胞本身的結構，同時影響了粒徑尺寸因此造成藥物被包裹在微胞顆粒之中後，使得粒徑變大。由於測定顆粒尺寸時，光在穿透較大的微胞顆粒發生會產生散射現象，使得溶液的外觀也受到影響，形成了半透明的樣貌。

在調整製程上，我們期望以最少的時間來完成微胞溶液的製備，以最佳的效率來製備出符合我們對於眼藥水要求的溶液，包括粒徑在奈米尺寸等級且溶液呈現




透明澄清的樣貌；而當我們在探討不同製備方式可能造成不同的結果時，我們先是假設了一個前提，就理論而言，微胞的形成維持在一個動態的平衡，也就是這個分散在水相中的顆粒，會不斷地崩解又不斷地形成顆粒，所以不論是何種製備方式，當配方組成相同時，即便以不同添加順序來製備，一旦系統達到平衡狀態時，最終所形成的微胞顆粒都應該是相同的，唯有製備方式的差異可能會加速或減速達到平衡所需的時間及過程；我們實際調整了微胞溶液製備時添加賦形劑和 API 的順序，製備完成後以肉眼觀察外觀及測定粒徑尺寸及分布，我們發現上述的結果與最初所提出的假設相同，雖然以不同的添加順序加入界面活性劑、增稠劑或是 API，且所需要花費的製備時間不同，但每一製程中所得的微胞溶液外觀及粒徑尺寸並無明顯差異，所以我們選擇製備時間最少、效率最佳的方式來製備微胞溶液。

我們在調整溶液的滲透壓及 pH 時，發現粒徑變大，而根據結果我們推論是 CMC sodium 本身與氯化鈉溶液中的離子發生交互作用，在過去文獻的搜尋中，我們發現，氯化鈉的存在會與 CMC sodium 發生作用，所以我們合理推測其中的氯離子與 CMC sodium 發生交聯作用 (crosslinking)，使得 CMC sodium 本身結構變得更為龐大，也因此粒徑測定時，很有可能測得變大的粒徑為與氯離子發生作用的 CMC sodium；而雖然粒徑變大了，但是尺寸仍在我們可以接受的範圍，溶液呈現透明澄清的外觀，也符合一開始對於製備出透明眼藥水的要求。

為了製備符合《國際藥典》定義之眼用製劑為「無菌的製劑」，我們透過 0.22  $\mu\text{m}$  的無菌注射型過濾器將微胞水溶液過濾，可以得到無菌的水溶液，而在含有增稠劑的組別，我們將增稠劑以高溫高壓（壓力相當於 1.2  $\text{kg}/\text{cm}^2$ ，溫度約 121 $^{\circ}\text{C}$ ，時間為 20 分鐘）滅菌，再與前一步過濾所得的無菌溶液進行混合，便可以得到無菌之微胞水溶液。

我們將製備的微胞溶液與市售產品 “Talymus” 進行比較，Talymus 為含有 0.1% TAC 的懸浮液，其所添加主要賦形劑為聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)，常作為眼藥水中的潤滑劑來使用，相比微胞劑型，一般懸浮液的懸浮顆粒遠大於微



胞顆粒，可能對病患產生刺激性；且因藥物未包裹於類似於微胞顆粒的疏水核中，除了藥物本身顆粒較大會造成病患不適，同時若是藥物無法快速進入眼睛組織，很容易受淚液沖刷而流失；另一方面，相較於一種以上賦形劑的使用，單一類型的賦形劑用於劑型當中，有可能以較高的濃度添加至配方，而我們為了降低單一賦形劑可能造成的毒性，我們的微胞劑型使用一種以上的賦形劑，便有機會去降低各個賦形劑的用量，以較低的濃度添加至配方當中。

根據文獻，關於微胞的特性之一——界面電位 (zeta-potential)，會影響微胞的穩定性、藥物釋出速率、細胞攝入情況等[42]，可以透過雷射干涉法 (laser interferometric method) 來測定，這點在未來後續眼藥水的開發上也應納入分析的項目，以改善眼藥的遞送。

## 4.2 增稠劑對於 Tacrolimus 微胞溶液黏度的影響與評估

我們期望透過增稠劑的添加，來提高微胞溶液的黏度，便有機會提高溶液在眼睛表面的滯留時間，得以有更長的時間能夠發揮藥效並且被眼睛組織吸收，或許能夠改善眼藥溶液低的生體可利用率；根據結果，增稠劑的添加確實能提高劑型的黏度，有機會藉此延長劑型停留在眼睛表面的時間，而在實際的應用上，未來將透過動物試驗進行驗證。

同時，我們在過去的文獻中[43] 發現，CMC sodium 可以直接與角膜上皮細胞結合，使得眼藥停留在眼表時間延長，間接地提升了眼藥的穿透，此外 CMC sodium 也能夠促進傷口的痊癒，在針對乾眼症的症狀上具有濕潤眼表及改善淚膜完整性的功用；此一功能具有可同時與 Tacrolimus 所能針對治療之乾眼症做併用的可能，因薛格連氏症候群 (Sjögren's syndrome) 所引起的乾眼症為一自身免疫性疾病，過去已有臨床試驗結果證實 Tacrolimus 眼藥水能成功改善乾眼症患者的淚液穩定性及眼表的狀態；所以 CMC sodium 的添加除了有助於延長眼藥停留的時間，也具有

潛力能夠提升薛格連氏症候群所致乾眼症的治療效果。

除了黏度會影響眼藥停留在眼表的時間，生物黏附的強度也會造成差異，因此有時會進一步探討黏膜黏附 (mucoadhesion)，意指黏膜與材料間相互黏附的狀態[44]。目前已有許多研究開發黏膜黏附的試驗，例如拉伸試驗 (tensile test)、剪力試驗 (shear tests)、黏著強度試驗 (peel test) 等方法，不過由於沒有一個標準的設備可用於測試生物黏附強度，因此無可避免地出現了測試方法之間的不一致性，所以一般在研究中，還是多以動物實驗來評估生物黏附強度[45]；而在藥物遞送系統中，有一群聚合物材料稱作 mucoadhesive polymers，添加到製劑中可用以延長製劑停留在黏膜的時間，以增強吸收、進而提高藥物的治療效果，例如本研究所使用的 poloxamer 188 與 poloxamer 407，在一研究中，便是使用了 poloxamer 407 來製備微胞，並於黏膜中承載、遞送疏水性藥物吲哚美辛 (indomethacin)[46]。

### 4.3 微胞溶液於室溫貯放下的安定性評估

為了評估所建構之微胞溶液於室溫環境貯放的穩定性，我們將新鮮製備之 TAC-loaded micelle 避光並貯放於室溫之下，發現溶液外觀無明顯改變，且 TAC 沒有發生嚴重降解的情況。理論上，微胞顆粒的形成為一自發反應，當水相中的界面活性劑達到臨界微胞濃度，便會逐漸包裹聚攏，疏水鏈相互作用聚集，而朝外的親水端與水作用，若要破壞微胞的結構，則需另外施以外力，例如強力或快速的攪拌、超音波震盪、離子的加入等，但是在貯放過程中沒有外力的施加，並不會對微胞顆粒產生影響，而 TAC 本身雖然易受到強烈的光作用產生降解，或是相較於酸性環境下，鹼性環境對於 TAC 來說較不穩定，但在貯放期間並沒有因為這些因素作用於 TAC 上，所以溶液的外觀和 TAC 並沒有產生巨大的改變，同時我們也推論以優化的配方組成所製備出的微胞溶液，對於 Tacrolimus 此一 API 是一個穩定而不易發生降解的環境，顯示 TAC-loaded micelle 避光貯存於室溫大致穩定。



#### 4.4 添加增稠劑對於藥物釋放之影響

已知 TAC 可以穩定地被包覆於微胞顆粒之中，並且承載一定的 TAC 含量；由於我們希望 TAC-loaded micelle 實際應用於眼睛疾病的治療，在此之前我們想要知道 TAC-loaded micelle 在增稠劑的添加後，是否會影響藥物釋放的結果。

第一步先判定得到我們所使用的磷酸鹽緩衝溶液，TAC 在其中的溶解度應要為 Franz cell 試驗中所加入最高藥物濃度的三倍以上，以符合 sink condition，在這步中我們證實此緩衝溶液適合用以進行體外藥物釋放試驗；接著，我們實際評估了微胞溶液的藥物釋放情況，增稠劑的存在，使溶液黏度增加並且形成了更緻密的結構，在穿透人工膜需要較長的時間，未來我們將透過動物試驗來評估與考量藥物能否順利釋出並且釋放足以發揮藥效的含量；並且在藥物釋放速率的比較中，沒有增稠劑添加的組別其藥物能夠較快地被釋出，在實際給藥的情況中，黏度較低的眼藥水很有可能因為淚液的分泌、眨眼的動作、容易遭沖刷而導致藥物的流失；在添加了 CMC sodium 之後，因為黏度較高的緣故，藥物的釋放速率降低，以較慢的速率穿透人工膜。

由藥物釋放自 2-4 小時間所採樣的結果，藥物釋放百分比幾乎相當，即在試驗開始後約 2 小時達到釋放平衡 (release equilibrium)，此時藥物釋放百分比約為 20%，我們推論 20% 為 TAC 在此實驗條件下最大累積釋放藥量百分比，透過 sink condition 的測試，我們排除了試驗中介質不適合的可能。我們推論有以下因素使得最大累積釋放藥量百分比僅有 20%。在人工膜的選用上，我們選擇了親水性的 CA，雖然疏水性的 TAC 較不受膜的影響穿透過膜，不過仍可能有少部分的 TAC 被困在膜的孔隙之中，而阻止 TAC 進入接收槽；或是微胞因其水溶液的性質與親水的膜作用，因而困在膜的孔隙，降低了過膜的藥量，等等因素都有可能使得累積釋放藥量百分比降低；若要提升過膜的藥量，或許可以透過調整介質組成，其中改變 ethanol 於介質中的比例有機會提高 TAC 過膜的累積藥量[47]，因 ethanol 可增加親


脂性 (lipophilic) 物質的溶解，故透過提高介質中 ethanol 的濃度可能可以提高釋放的藥量。

我們利用 *in vitro* 的方式比較藥物釋放的情形，在利用人工膜的情況下，無法模擬眼藥水在活體眼睛中釋放藥物的狀態，僅能以相同的實驗條件比較實驗組別之間的釋放速率。在此試驗中我們無法得知，穿透過膜的是從微胞顆粒中釋出的藥物本身、亦或是由微胞顆粒所攜帶過膜的藥物；微胞顆粒中藥物的釋出取決於微胞顆粒中心核內與藥物分子之間相互作用的性質和強度、微胞本身的穩定性、以及藥物分子從微胞中心擴散的速率等[48]；對於 TAC-loaded 微胞溶液，應作用於角膜區域，微胞顆粒可以透過有效地被吸收並在眼睛組織中釋放 TAC，或者是在進入角膜前，TAC 自微胞顆粒中釋出，便有可能被吸收，因此對於微胞溶液，應增加被組織吸收或者延長眼藥水在眼睛表面停留的時間；我們的微胞溶液在活體中藥物釋放的情況為何，未來將以動物實驗來評估實際的情況。若能夠透過調整眼藥水的黏度，使得眼藥水在眼表停留足夠的時間，並且控制藥物釋出的速率，便能夠有效地增加藥物被吸收並且提高發揮藥效的可能性，並且減少給藥頻率以提高病患依順性。

#### 4.5 透過細胞毒性試驗評估微胞溶液之安全性

本實驗為了探討所設計出配方組成之微胞溶液在模擬眼藥水短暫停留眼表所可能對細胞所造成之影響，透過 MTT assay 評估劑型對於兔子角膜細胞的毒性，根據結果得到，所製備的微胞溶液對於兔子角膜上皮細胞具有低細胞毒性，而未來可以透過動物實驗觀察微胞溶液對於動物眼睛之刺激性等，以測試藥物安全性。

而以藥物處理細胞較長時間之後，仍可以見得稀釋後的劑型對於細胞的毒性還是很明顯，我們推論生長型態為單層的兔子角膜上皮細胞，對於界面活性劑很敏感，即使是低濃度的界面活性劑也很容易造成這樣單層細胞的死亡；在過去的文獻




中也指出，界面活性劑會透過與細胞磷脂質雙層膜結合而對其產生物理性質的轉變，包含了滲透性 (permeability)，進而對其產生毒理作用[49]；當然，根據 FDA 的資料庫，這些賦形劑的使用都是核可安全的，不過藥物在不同的方式處理之下，或者是進行不同物種間、年齡等差異之下的試驗，都有可能得到不一樣的結果，而未來如果有必要調整配方組成時，在安全的考量之下，便可以參考 MTT assay 的結果，來降低或替換這些界面活性劑之濃度或種類，以降低可能產生的毒性。

#### 4.6 添加增稠劑對於細胞攝入之影響

我們所製備出來的微胞顆粒因為其粒徑尺寸小且或許可以延長停留眼表的時間，有機會增加通過細胞屏障的藥量，使得藥物能夠到達眼中、避免被沖刷的比例提升；而因為微胞顆粒本身具有較大表面積，能更好地與角膜結膜作用，容易被細胞攝入；在 TAC-loaded micelle 實際應用於眼睛疾病的治療之前，我們想要知道 TAC-loaded micelle 添加了增稠劑後，對於藥物在細胞攝入是否產生影響，因此我們透過體外細胞試驗來進行研究。

根據實驗結果，我們推論增稠劑 CMC sodium 的添加在體外細胞攝入試驗中並不會明顯地影響細胞對於藥物的攝入；我們知道，CMC sodium 可以直接與角膜上皮細胞結合，進而延長眼藥停留在眼表時間，所以此增稠劑的添加或許有助於眼藥的穿透，不過在此試驗之中，無法模擬眼睛實際的情況，包括淚液的分泌、沖刷及眨眼等，也在文獻搜尋的結果中並沒有看到模擬淚液流洗的體外試驗，所以對於藥物實際給予患者眼部，且能被細胞所攝入的實際情況，將會以動物試驗來驗證。

相較於 free drug 在眼睛中的遞送，以微胞劑型來承載 TAC 或許有機會提高藥物進入細胞的量，我們參考過去文獻，與 free drug 相比，以微胞劑型承載一疏水性藥物薑黃素 (curcumin) 可以增加體外試驗中細胞攝取的藥量和動物試驗中滲透進入角膜的藥量[50]；而在另一篇研究也指出，利用微胞劑型來攜帶一 model



drug-- Coumarin 6，能夠顯著地提升細胞攝入藥物的結果[51]；根據另一篇文獻，相比於 free drug 的形式，利用微胞劑型能夠更快且使得更多的疏水性藥物被人類角膜上皮細胞所攝入，也能夠較快地進入細胞內的胞器，另外以紐西蘭兔進行角膜滲透性試驗 (corneal permeation study)，發現與以油做為基底的 (oil-based) 市售眼藥相比，該篇所開發之微胞劑型有較高的角膜滲透率，顯示以微胞劑型具有潛力提升被細胞攝取及進入動物角膜的藥量[52]，由以上文獻顯示，利用微胞能夠有效提高細胞攝入藥物的含量，相比 free drug，微胞作為疏水性藥物的載體，能有效遞送藥物至眼睛當中；而本篇試驗可透過將 TAC 溶於 DMSO 中，配製與劑型中藥物相同濃度的對照組並與細胞共培養，再測定細胞攝入之藥量，來比較有無劑型承載 TAC 是否影響藥物於細胞攝入之結果，同樣也可與市售產品相比藥物攝入之差異。

## 第五章、結論



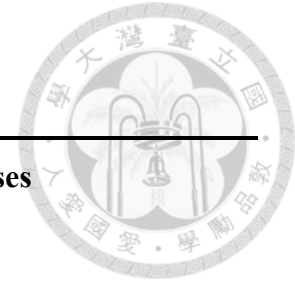
1. 本研究首先以 Box-Behnken Design 實驗設計法設計出一可靠的回歸模型，並藉由此模型計算並設計出不同的配方組成及預測其特性，以此調整組成並篩選出優化的組別。
2. 我們製備了一安全、穩定的微胞製劑，粒徑尺寸為奈米等級、PDI < 0.4 呈現均一的溶液，這一劑型承載約 0.1% 的疏水性藥物 Tacrolimus，符合我們最初的目標，並且在調整滲透壓及 pH 值後，作為眼藥水的形式發展，有望成功遞送藥物至眼睛當中。
3. 透過篩選而以 CMC sodium 作為增稠劑添加至劑型後，可以提高眼藥水的黏度，其添加不會影響細胞對於藥物的攝入，我們有望透過較高黏度的微胞溶液來延長劑型在眼表的停留時間，藉此改善眼部的生體可利用率。

## 第六章、未來發展



本研究以實驗設計的方式開發劑型組成，設計出可承載約 0.1% Tacrolimus 的微胞劑型，並證實了微胞溶液的安全性與短期室溫貯放下之穩定性，且在體外試驗如藥物釋放及細胞攝入測定的結果，我們知道，增稠劑的添加使得藥物釋放速率較緩慢，而以細胞測試攝入的情形並沒有顯著影響，未來將會透過動物實驗，進一步驗證溶液的黏度對於眼藥停留在眼表的影響，同時藉由控制藥物釋放的速率，來達到提升眼藥生體可利用率的目的，並且確認具備足夠療效，我們期望開發安全、有效的微胞溶液來改善藥物在眼睛中的遞送。

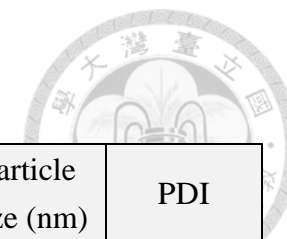
表一、試驗中的因子、水準與因變數



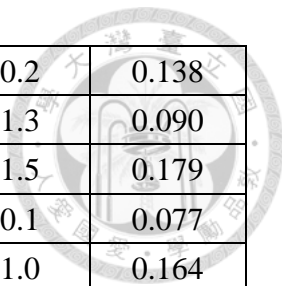
Factors	Levels			Responses
	Low (%)	Medium (%)	High (maximum potency) (%)	
P188	0	0.05	0.1	
P407	0	0.1	0.2	
HS15	0	0.125	0.25	• Particle size
K. ELP	0	2.5	5	• Polydispersity index
RH40	0	0.5	1	• Solubility of TAC
P40S	0	3.5	7	• The contents of TAC after 20 days
T60	0	0.025	0.05	
T80	0	2	4	

P188: poloxamer 188, P407: poloxamer 407, HS15: Kolliphor HS-15, K. ELP: Kolliphor ELP, RH40: Kolliphor RH40, P40S: polyoxyl 40 stearate, T60: Polysorbate 60, T80: Polysorbate 80

表二、資料分析——粒徑尺寸及分布測定

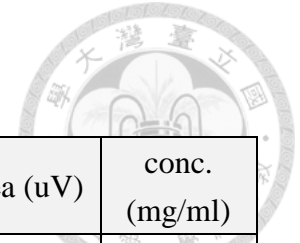


sample	particle size (nm)	PDI	sample	particle size (nm)	PDI	sample	particle size (nm)	PDI	sample	particle size (nm)	PDI
1	11.3	0.213	31	11.1	0.142	61	11.9	0.131	91	11.1	0.196
2	11.0	0.227	32	10.0	0.223	62	12.1	0.313	92	15.9	0.210
3	12.4	0.146	33	12.4	0.139	63	10.7	0.349	93	15.3	0.091
4	11.6	0.150	34	13.5	0.265	64	12.2	0.204	94	9.8	0.217
5	11.0	0.134	35	13.7	0.263	65	11.3	0.182	95	11.3	0.309
6	11.7	0.162	36	11.8	0.302	66	12.8	0.264	96	10.4	0.193
7	11.8	0.045	37	10.0	0.139	67	9.7	0.302	97	10.2	0.118
8	12.8	0.056	38	11.8	0.087	68	11.3	0.160	98	13.0	0.136
9	13.8	0.051	39	10.8	0.200	69	10.6	0.102	99	12.5	0.213
10	13.7	0.263	40	11.5	0.085	70	10.8	0.174	100	10.8	0.242
11	11.4	0.240	41	13.9	0.362	71	13.0	0.098	101	15.2	0.067
12	10.7	0.222	42	13.0	0.088	72	11.2	0.143	102	13.8	0.307
13	12.1	0.298	43	11.5	0.217	73	12.2	0.251	103	10.8	0.266
14	10.8	0.234	44	12.8	0.227	74	10.4	0.056	104	11.7	0.186
15	12.0	0.111	45	11.2	0.158	75	11.4	0.228	105	11.0	0.271
16	12.8	0.205	46	13.0	0.226	76	12.4	0.076	106	11.1	0.190
17	11.6	0.173	47	13.7	0.229	77	18.9	0.141	107	11.8	0.315
18	14.3	0.216	48	10.9	0.005	78	10.9	0.169	108	10.4	0.123
19	11.2	0.184	49	10.7	0.124	79	12.5	0.418	109	13.0	0.223

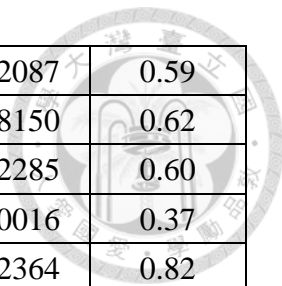


20	13.7	0.218	50	14.5	0.078	80	11.7	0.167	110	10.2	0.138
21	10.6	0.146	51	11.0	0.020	81	11.9	0.187	111	11.3	0.090
22	13.3	0.309	52	12.0	0.200	82	11.8	0.396	112	11.5	0.179
23	10.2	0.063	53	10.8	0.096	83	11.7	0.142	113	10.1	0.077
24	11.8	0.093	54	10.0	0.135	84	11.2	0.268	114	11.0	0.164
25	12.9	0.174	55	11.5	0.142	85	11.5	0.403	115	12.0	0.090
26	10.4	0.118	56	12.1	0.299	86	12.8	0.069	116	11.6	0.114
27	11.2	0.051	57	11.7	0.242	87	12.3	0.140	117	10.6	0.240
28	10.6	0.132	58	11.2	0.158	88	11.2	0.313	118	11.4	0.108
29	11.2	0.231	59	11.4	0.213	89	12.2	0.152	119	10.7	0.107
30	11.7	0.116	60	15.1	0.068	90	12.2	0.313	120	11.9	0.402

表三、資料分析—定量分析 Tacrolimus 溶解度

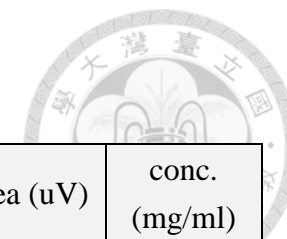


sample	area (uV)	conc. (mg/ml)	sample	area (uV)	conc. (mg/ml)	sample	area (uV)	conc. (mg/ml)	sample	area (uV)	conc. (mg/ml)
1	951004	0.86	31	576723	0.52	61	678066	0.61	91	998667	0.90
2	893603	0.81	32	828023	0.75	62	934827	0.84	92	353282	0.32
3	568316	0.51	33	531440	0.48	63	1305962	1.18	93	186800	0.16
4	698022	0.63	34	536259	0.48	64	539789	0.48	94	702042	0.63
5	679369	0.61	35	373821	0.33	65	917100	0.83	95	1278155	1.15
6	630081	0.57	36	702489	0.63	66	984484	0.89	96	391469	0.35
7	487837	0.44	37	734408	0.66	67	734444	0.66	97	486473	0.44
8	340123	0.30	38	657871	0.59	68	194620	0.17	98	494908	0.44
9	50909	0.04	39	910549	0.82	69	956542	0.86	99	203312	0.18
10	377691	0.34	40	841358	0.76	70	1250334	1.13	100	453588	0.41
11	701439	0.63	41	665689	0.60	71	444643	0.40	101	190395	0.17
12	703898	0.63	42	482962	0.43	72	741972	0.67	102	545040	0.49
13	396411	0.35	43	550041	0.49	73	832036	0.75	103	1067191	0.96
14	448455	0.40	44	490825	0.44	74	833653	0.75	104	443147	0.40
15	678930	0.61	45	935500	0.84	75	656142	0.59	105	1014820	0.92
16	564231	0.51	46	211175	0.19	76	319154	0.28	106	575536	0.52
17	586840	0.53	47	791268	0.71	77	63672	0.05	107	765530	0.69
18	393819	0.35	48	514645	0.46	78	529521	0.48	108	1070276	0.97
19	784228	0.71	49	946684	0.85	79	785799	0.71	109	699929	0.63

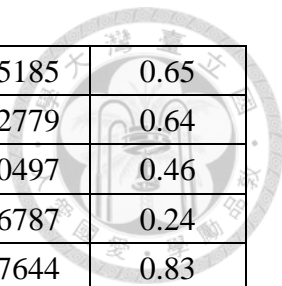


20	242214	0.21	50	292980	0.26	80	655420	0.59	110	652087	0.59
21	1075341	0.97	51	432042	0.39	81	938025	0.85	111	688150	0.62
22	618470	0.56	52	665774	0.60	82	742505	0.67	112	662285	0.60
23	482465	0.43	53	687461	0.62	83	532746	0.48	113	410016	0.37
24	243818	0.22	54	657762	0.59	84	401587	0.36	114	912364	0.82
25	538428	0.48	55	785338	0.71	85	593414	0.53	115	665487	0.60
26	669610	0.60	56	895295	0.81	86	458217	0.41	116	629478	0.64
27	507041	0.45	57	727999	0.66	87	557102	0.50	117	949417	0.81
28	486345	0.44	58	648157	0.58	88	1251067	1.13	118	575952	0.55
29	1058738	0.96	59	669706	0.60	89	344889	0.31	119	663955	0.64
30	608709	0.55	60	225226	0.20	90	949750	0.86	120	1132929	1.10

表四、資料分析——定量分析 Tacrolimus 含量 (20 days)

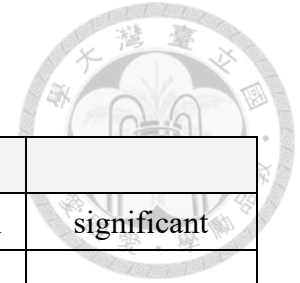


sample	area (uV)	conc. (mg/ml)	sample	area (uV)	conc. (mg/ml)	sample	area (uV)	conc. (mg/ml)	sample	area (uV)	conc. (mg/ml)
1	930684	0.84	31	533916	0.48	61	582176	0.51	91	1010659	0.92
2	925986	0.83	32	771524	0.70	62	936077	0.85	92	349821	0.28
3	493333	0.45	33	485388	0.44	63	1276255	1.18	93	172128	0.11
4	695196	0.63	34	568146	0.52	64	496500	0.42	94	690961	0.61
5	616881	0.56	35	350135	0.32	65	886095	0.80	95	568700	0.49
6	684698	0.62	36	786180	0.71	66	989050	0.90	96	405208	0.33
7	529991	0.48	37	671360	0.61	67	1051035	0.96	97	519622	0.44
8	332667	0.31	38	615381	0.56	68	183709	0.12	98	494056	0.42
9	50531	0.05	39	849114	0.77	69	984726	0.89	99	208574	0.14
10	386991	0.35	40	813106	0.73	70	1172629	1.08	100	476126	0.40
11	729121	0.66	41	638788	0.58	71	419882	0.35	101	191404	0.13
12	709150	0.64	42	465964	0.42	72	649506	0.57	102	596721	0.52
13	406532	0.37	43	518229	0.47	73	791537	0.71	103	969139	0.88
14	421549	0.38	44	499132	0.45	74	776269	0.69	104	486940	0.41
15	823577	0.74	45	955575	0.86	75	969631	0.88	105	1044126	0.95
16	564738	0.51	46	202715	0.19	76	332923	0.26	106	603829	0.53
17	572571	0.52	47	768762	0.69	77	58798	0.00	107	815117	0.73
18	391647	0.36	48	344567	0.32	78	513513	0.44	108	1011871	0.92
19	740897	0.67	49	980738	0.88	79	882751	0.80	109	751029	0.67



20	240307	0.22	50	266492	0.25	80	630880	0.55	110	735185	0.65
21	897738	0.81	51	399629	0.37	81	956639	0.87	111	722779	0.64
22	587590	0.53	52	646630	0.59	82	844460	0.76	112	540497	0.46
23	484715	0.44	53	716639	0.65	83	643027	0.56	113	306787	0.24
24	261529	0.24	54	642252	0.58	84	514023	0.44	114	917644	0.83
25	510669	0.46	55	819120	0.74	85	386817	0.32	115	913147	0.83
26	690435	0.62	56	953657	0.86	86	411048	0.34	116	673262	0.59
27	476483	0.43	57	735429	0.66	87	699682	0.62	117	803063	0.72
28	493378	0.45	58	597251	0.54	88	1006439	0.92	118	595355	0.52
29	1112150	1.00	59	633448	0.57	89	273290	0.21	119	779220	0.70
30	437287	0.40	60	218017	0.20	90	982003	0.89	120	1206605	1.11

表五、模型建立—ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics



Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	3.10	16	0.1936	107.11	< 0.0001	significant
B-POLOXAMER 407	0.0043	1	0.0043	2.38	0.1260	
C-POLYOXYL 15 HYDROXYSTEARATE	0.0006	1	0.0006	0.3328	0.5653	
D-POLYOXYL 35 CASTOR OIL	0.5638	1	0.5638	311.96	< 0.0001	
E-POLYOXYL 40 HYDROGENATED CASTOR OIL	0.0386	1	0.0386	21.37	< 0.0001	
F-POLYOXYL 40 STEARATE	0.8029	1	0.8029	444.29	< 0.0001	
G-POLYSORBATE 60	0.0128	1	0.0128	7.11	0.0089	
H-POLYSORBATE 80	1.50	1	1.50	827.46	< 0.0001	
BF	0.0315	1	0.0315	17.41	< 0.0001	
CG	0.0110	1	0.0110	6.07	0.0154	
DF	0.0210	1	0.0210	11.64	0.0009	
DG	0.0068	1	0.0068	3.78	0.0546	
EG	0.0056	1	0.0056	3.12	0.0805	
FG	0.0095	1	0.0095	5.25	0.0239	
FH	0.0132	1	0.0132	7.30	0.0081	
B <sup>2</sup>	0.0066	1	0.0066	3.65	0.0590	
D <sup>2</sup>	0.0552	1	0.0552	30.53	< 0.0001	

Residual	0.1861	103	0.0018			
Lack of Fit	0.1786	96	0.0019	1.71	0.2321	not significant
Pure Error	0.0076	7	0.0011			
Cor Total	3.28	119				

Std. Dev.	0.0425		R <sup>2</sup>	0.9433
Mean	0.7444		Adjusted R <sup>2</sup>	0.9345
C.V. %	5.71		Predicted R <sup>2</sup>	0.9169

表六、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 1: particle size)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	162.89	15	10.86	17.15	< 0.0001	significant
A-POLOXAMER 188	0.1607	1	0.1607	0.2539	0.6154	
B-POLOXAMER 407	7.14	1	7.14	11.28	0.0011	
D-POLYOXYL 35 CASTOR OIL	5.22	1	5.22	8.25	0.0049	
E-POLYOXYL 40 HYDROGENATED CASTOR OIL	3.91	1	3.91	6.18	0.0145	
F-POLYOXYL 40 STEARATE	6.58	1	6.58	10.40	0.0017	
G-POLYSORBATE 60	0.9516	1	0.9516	1.50	0.2229	
H-POLYSORBATE 80	98.58	1	98.58	155.73	< 0.0001	
AG	2.39	1	2.39	3.77	0.0549	
DF	7.60	1	7.60	12.01	0.0008	
DG	2.34	1	2.34	3.70	0.0571	
FG	2.80	1	2.80	4.43	0.0378	
FH	4.59	1	4.59	7.26	0.0082	
B <sup>2</sup>	2.31	1	2.31	3.64	0.0590	
F <sup>2</sup>	6.89	1	6.89	10.89	0.0013	
H <sup>2</sup>	6.63	1	6.63	10.47	0.0016	
Residual	65.83	104	0.6330			

Lack of Fit	65.56	97	0.6759	17.61	0.0003	significant
Pure Error	0.2687	7	0.0384			
Cor Total	228.72	119				

Std. Dev.	0.7956		R <sup>2</sup>	0.7122
Mean	11.85		Adjusted R <sup>2</sup>	0.6706
C.V. %	6.71		Predicted R <sup>2</sup>	0.5638

表七、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 2: PDI)



Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.7830	16	0.0489	38.09	< 0.0001	significant
A-POLOXAMER 188	0.0014	1	0.0014	1.12	0.2922	
B-POLOXAMER 407	0.2352	1	0.2352	183.05	< 0.0001	
C-POLYOXYL 15 HYDROXYSTEARATE	0.0001	1	0.0001	0.0517	0.8206	
D-POLYOXYL 35 CASTOR OIL	0.0081	1	0.0081	6.28	0.0138	
E-POLYOXYL 40 HYDROGENATED CASTOR OIL	0.0032	1	0.0032	2.52	0.1153	
F-POLYOXYL 40 STEARATE	0.4716	1	0.4716	367.06	< 0.0001	
G-POLYSORBATE 60	6.446E-06	1	6.446E-06	0.0050	0.9437	
H-POLYSORBATE 80	0.0008	1	0.0008	0.6013	0.4398	
AE	0.0067	1	0.0067	5.24	0.0241	
BC	0.0039	1	0.0039	3.02	0.0854	
BD	0.0061	1	0.0061	4.76	0.0314	
BH	0.0145	1	0.0145	11.32	0.0011	
DF	0.0174	1	0.0174	13.56	0.0004	
F <sup>2</sup>	0.0126	1	0.0126	9.78	0.0023	
G <sup>2</sup>	0.0039	1	0.0039	3.01	0.0859	

H <sup>2</sup>	0.0047	1	0.0047	3.65	0.0590	
Residual	0.1323	103	0.0013			
Lack of Fit	0.1195	96	0.0012	0.6777	0.8149	not significant
Pure Error	0.0129	7	0.0018			
Cor Total	0.9153	119				

Std. Dev.	0.0358		R <sup>2</sup>	0.8554
Mean	0.1834		Adjusted R <sup>2</sup>	0.8330
C.V. %	19.55		Predicted R <sup>2</sup>	0.8060

表八、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 3: solubility of Tacrolimus)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	3.10	16	0.1936	107.11	< 0.0001	significant
B-POLOXAMER 407	0.0043	1	0.0043	2.38	0.1260	
C-POLYOXYL 15 HYDROXYSTEARATE	0.0006	1	0.0006	0.3328	0.5653	
D-POLYOXYL 35 CASTOR OIL	0.5638	1	0.5638	311.96	< 0.0001	
E-POLYOXYL 40 HYDROGENATED CASTOR OIL	0.0386	1	0.0386	21.37	< 0.0001	
F-POLYOXYL 40 STEARATE	0.8029	1	0.8029	444.29	< 0.0001	
G-POLYSORBATE 60	0.0128	1	0.0128	7.11	0.0089	
H-POLYSORBATE 80	1.50	1	1.50	827.46	< 0.0001	
BF	0.0315	1	0.0315	17.41	< 0.0001	
CG	0.0110	1	0.0110	6.07	0.0154	
DF	0.0210	1	0.0210	11.64	0.0009	
DG	0.0068	1	0.0068	3.78	0.0546	
EG	0.0056	1	0.0056	3.12	0.0805	
FG	0.0095	1	0.0095	5.25	0.0239	
FH	0.0132	1	0.0132	7.30	0.0081	
B <sup>2</sup>	0.0066	1	0.0066	3.65	0.0590	

D <sup>2</sup>	0.0552	1	0.0552	30.53	< 0.0001	
Residual	0.1861	103	0.0018			
Lack of Fit	0.1786	96	0.0019	1.71	0.2321	not significant
Pure Error	0.0076	7	0.0011			
Cor Total	3.28	119				

Std. Dev.	0.0425		R <sup>2</sup>	0.9433
Mean	0.7444		Adjusted R <sup>2</sup>	0.9345
C.V. %	5.71		Predicted R <sup>2</sup>	0.9169

表九、模型建立——ANOVA for Reduced Quadratic model and Fit Statistics (for Response 4: concentration of Tacrolimus after 20 days)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	5.76	4	1.44	141.95	< 0.0001	significant
D-POLYOXYL 35 CASTOR OIL	0.9640	1	0.9640	95.03	< 0.0001	
E-POLYOXYL 40 HYDROGENATED CASTOR OIL	0.0993	1	0.0993	9.79	0.0022	
F-POLYOXYL 40 STEARATE	1.87	1	1.87	184.79	< 0.0001	
H-POLYSORBATE 80	2.82	1	2.82	278.19	< 0.0001	
Residual	1.17	115	0.0101			
Lack of Fit	1.01	108	0.0094	0.4279	0.9707	not significant
Pure Error	0.1535	7	0.0219			
Cor Total	6.93	119				

Std. Dev.	0.1007		R <sup>2</sup>	0.8316
Mean	0.5696		Adjusted R <sup>2</sup>	0.8257
C.V. %	17.68		Predicted R <sup>2</sup>	0.8169

表十、優化的配方組成

(volume percentage concentration)

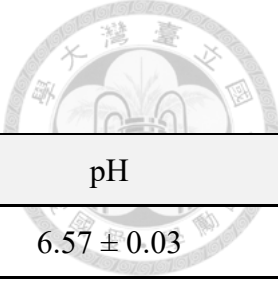
Formula	P188 (%)	P407 (%)	HS15 (%)	K. ELP (%)	RH40 (%)	P40S (%)	T60 (%)	T80 (%)	Water (%)
A	0.075	0	0.248	5	1	6.689	0	3.952	83.036
B	0.027	0	0.171	5	1	6.768	0.002	3.999	83.123
C	0.004	0.036	0.221	5	0.997	6.995	0	3.971	82.776

P188: poloxamer 188, P407: poloxamer 407, HS15: Kolliphor HS-15, K. ELP: Kolliphor ELP, RH40: Kolliphor RH40, P40S: polyoxyl 40 stearate, T60: Polysorbate 60, T80: Polysorbate 80

表十一、優化組別之特性分析


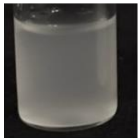
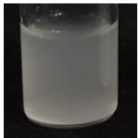







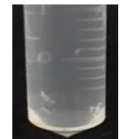



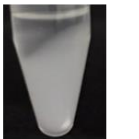
	Expected results				Actual results			
Formula	particle size	PDI	solubility (mg/ml)	conc. after 20d (mg/ml)	particle size	PDI	solubility (mg/ml)	conc. after 20d (mg/ml)
A	10.96	0.268	1.319	1.129	11.9	0.239	1.04	1.05
B	11.392	0.261	1.294	1.138	11.7	0.252	1.02	1.03
C	11.654	0.257	1.328	1.147	11.6	0.229	0.93	1.03

表十二、滲透壓及 pH 之調整 (未添加增稠劑)






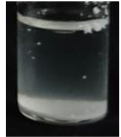



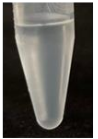


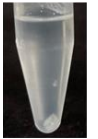

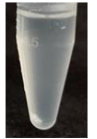

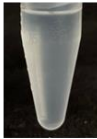



Samples	Osmolality (mOsm/kg)	pH
A	$286.67 \pm 0.58$	$6.57 \pm 0.03$
B	$286.67 \pm 1.53$	$6.60 \pm 0.03$
C	$283.67 \pm 3.79$	$6.60 \pm 0.04$

表十三-1、含增稠劑微胞溶液之外觀 (未加 Tacrolimus)



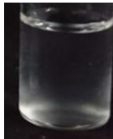
	A1	B1	C1	A2	B2	C2	A3	B3	C3
P188	0.075%	0.027%	0.004%	0.075%	0.027%	0.004%	0.075%	0.027%	0.004%
P407	0%	0%	0.036%	0%	0%	0.036%	0%	0%	0.036%
HS15	0.248%	0.171%	0.221%	0.248%	0.171%	0.221%	0.248%	0.171%	0.221%
K. ELP	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
RH40	1%	1%	0.997%	1%	1%	0.997%	1%	1%	0.997%
P40S	6.689%	6.768%	6.995%	6.689%	6.768%	6.995%	6.689%	6.768%	6.995%
T60	0%	0.002%	0%	0%	0.002%	0%	0%	0.002%	0%
T80	3.952%	3.999%	3.971%	3.952%	3.999%	3.971%	3.952%	3.999%	3.971%
Water	82.986%	82.983%	82.726%	82.556%	82.553	82.296%	79.036%	79.033	78.776%
Viscosity enhancer	CARBOMER COPOLYMER TYPE A (0.05%)			CARBOMER HOMOPOLYMER TYPE B (0.48%)			CARBOMER HOMOPOLYMER TYPE C (4%)		
Description after preparation	translucent			opaque			can't be stirred homogeneously		
Appearance									
Description after centrifugation	transparent with a few precipitates			layered			-		
Appearance							-	-	-

表十三-2、含增稠劑微胞溶液之外觀 (未加 Tacrolimus)

	A4	B4	C4	A5	B5	C5	A6	B6	C6
P188	0.075%	0.027%	0.004%	0.075%	0.027%	0.004%	0.075%	0.027%	0.004%
P407	0%	0%	0.036%	0%	0%	0.036%	0%	0%	0.036%
HS15	0.248%	0.171%	0.221%	0.248%	0.171%	0.221%	0.248%	0.171%	0.221%
K. ELP	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
RH40	1%	1%	0.997%	1%	1%	0.997%	1%	1%	0.997%
P40S	6.689%	6.768%	6.995%	6.689%	6.768%	6.995%	6.689%	6.768%	6.995%
T60	0%	0.002%	0%	0%	0.002%	0%	0%	0.002%	0%
T80	3.952%	3.999%	3.971%	3.952%	3.999%	3.971%	3.952%	3.999%	3.971%
Water	82.986%	82.983%	82.726%	82.556%	82.553	82.296%	79.036%	79.033	78.776%
Viscosity enhancer	CARBOXYMETHYLCELLULOSE SODIUM (0.5%)			HYDROXYETHYL CELLULOSE (1.6%)			HYPROMELLOSE 2910 (0.5%)		
Description after preparation	transparent and a little low fluidity			opaque with some precipitates			translucent, not clear and heterogeneous		
Appearance									
Description after centrifugation	transparent and clear			transparent with a few of precipitates			transparent, clear and heterogeneous		
Appearance									



表十三-3、含增稠劑微胞溶液之外觀 (未加 Tacrolimus)

	A7	B7	C7
P188	0.075%	0.027%	0.004%
P407	0%	0%	0.036%
HS15	0.248%	0.171%	0.221%
K. ELP	5%	5%	5%
RH40	1%	1%	0.997%
P40S	6.689%	6.768%	6.995%
T60	0%	0.002%	0%
T80	3.952%	3.999%	3.971%
Water	82.986%	82.983%	82.726%
Viscosity enhancer	METHYLCELLULOSE (0.5%)		
Description after preparation	translucent, not clear and heterogeneous		
Appearance			
Description after centrifugation	-		
Appearance	-	-	-

表十四、含增稠劑 (Carbomer copolymer type A) 微胞溶液之粒徑尺寸及分布測定 (未加 Tacrolimus)

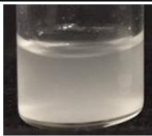
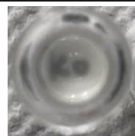
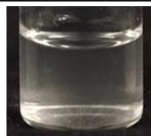

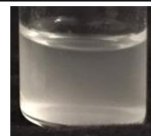
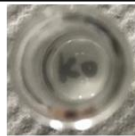
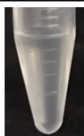


	A1		B1		C1	
	particle size (nm)	PDI	particle size (nm)	PDI	particle size (nm)	PDI
average	13.9 ± 0.9	0.478 ± 0.063	1069.6 ± 1829.1	0.513 ± 0.164	4968.0 ± 396.6	1.334 ± 0.275

表十五、含增稠劑 (CMC sodium) 微胞溶液之粒徑尺寸及分布測定

	A4				B4				C4			
	particle size (nm)		PDI		particle size (nm)		PDI		particle size (nm)		PDI	
TAC	w/o	w/	w/o	w/	w/o	w/	w/o	w/	w/o	w/	w/o	w/
average	17.8 ± 0.51	180.0 ± 223.3	0.410 ± 0.028	0.537 ± 0.145	18.8 ± 0.62	19.6 ± 2.49	0.425 ± 0.020	0.359 ± 0.012	16.7 ± 0.37	20.6 ± 0.53	0.373 ± 0.012	0.399 ± 0.031



表十六、含增稠劑 (CMC sodium) 微胞溶液之外觀 (加入 Tacrolimus)

	A4	B4	C4
P188	0.075%	0.027%	0.004%
P407	0%	0%	0.036%
HS15	0.248%	0.171%	0.221%
K. ELP	5%	5%	5%
RH40	1%	1%	0.997%
P40S	6.689%	6.768%	6.995%
T60	0%	0.002%	0%
T80	3.952%	3.999%	3.971%
Water	82.986%	82.983%	82.726%
Viscosity enhancer	CARBOXYMETHYLCELLULOSE SODIUM (0.5%)		
Tacrolimus	0.1%		
Description after preparation	translucent	transparent with few precipitates	translucent
Appearance	 	 	 
Description after centrifugation	transparent with few precipitates		
Appearance			

表十七、粒徑尺寸及分布測定 (調整滲透壓及 pH 之後)

	A4		B4		C4	
	particle size (nm)	PDI	particle size (nm)	PDI	particle size (nm)	PDI
average	333.3 ± 31.7	0.338 ± 0.016	716.0 ± 152.3	0.396 ± 0.013	593.4 ± 189.3	0.384 ± 0.015

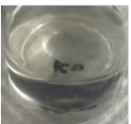


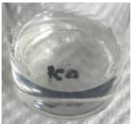

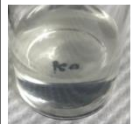
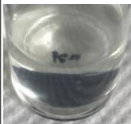
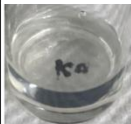
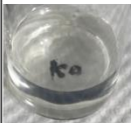
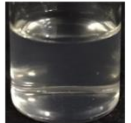
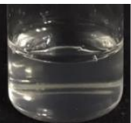

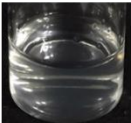
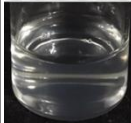
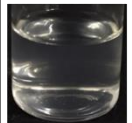
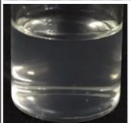
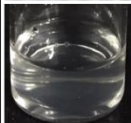

表十八、以不同 pH 值之 TBS 進行劑型 pH 值的調整

pH/sample	A4			B4			C4		
TBS	7.72	7.38	7.31	7.87	7.66	7.14	7.90	7.76	7.18
formulation	7.61	6.89	6.67	7.81	7.25	6.42	7.79	7.07	6.24

表十九、劑型 pH 值調整後的外觀觀察，分別為剛製備出來 (A) day 0 與製備後貯放於室溫之下(B) day 20 之結果

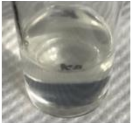



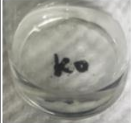

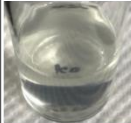


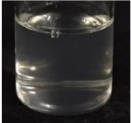
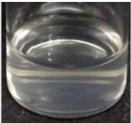

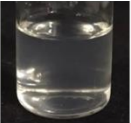

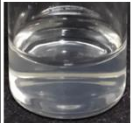

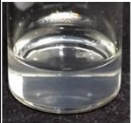
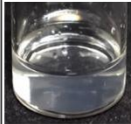


(A) day 0

pH/sample	A4			B4			C4		
TBS	7.72	7.38	7.31	7.87	7.66	7.14	7.90	7.76	7.18
formulation	7.61	6.89	6.67	7.81	7.25	6.42	7.79	7.07	6.24
Pictures									
									
Description	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent

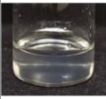
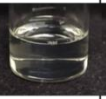
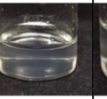
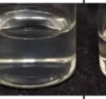
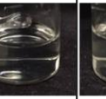
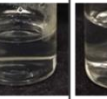
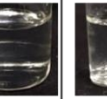

(B) day 20



pH/sample	A4			B4			C4		
TBS	7.72	7.38	7.31	7.87	7.66	7.14	7.90	7.76	7.18
formulation	7.61	6.89	6.67	7.81	7.25	6.42	7.79	7.07	6.24
Pictures									
									
Description	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent	Translucent



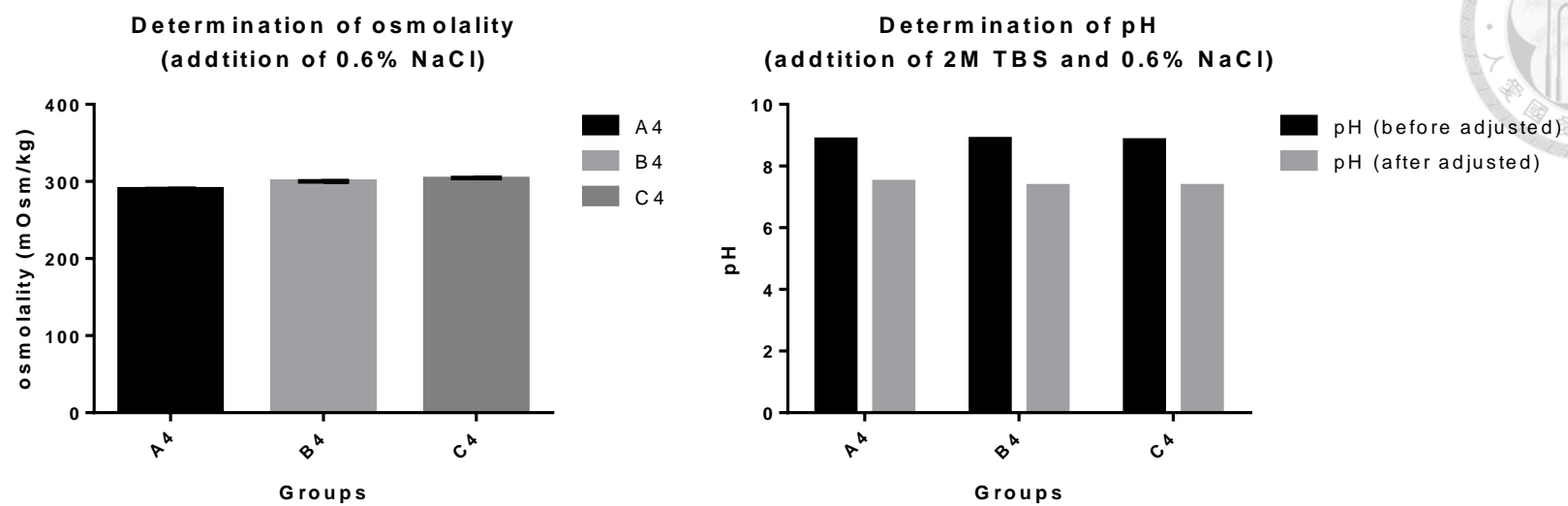
表二十、劑型 pH 值以  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer solutions 調整後的粒徑尺寸及分布測定

	A		A4					
CMC sodium	-		+					
NaCl	+		+			-		
buffer	+	-	+	+	-	+	+	-
	(pH 7.4)		(pH 7.4)	(pH 7.0)		(pH 7.4)	(pH 7.0)	
Average particle size (nm)	12.9	12.5	456.0	332.4	335.2	24.8	24.1	16.6
PDI	0.261	0.269	0.338	0.331	0.323	0.401	0.421	0.331
Appearance								

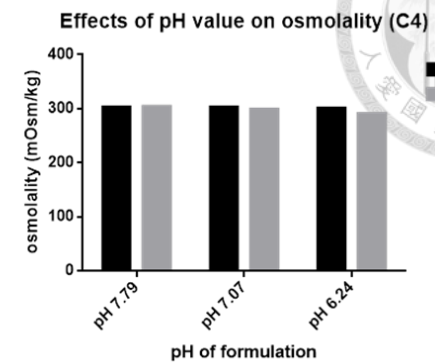
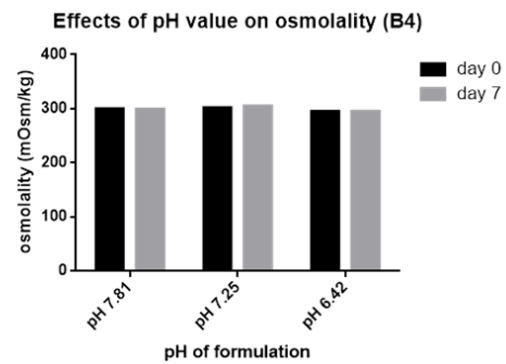
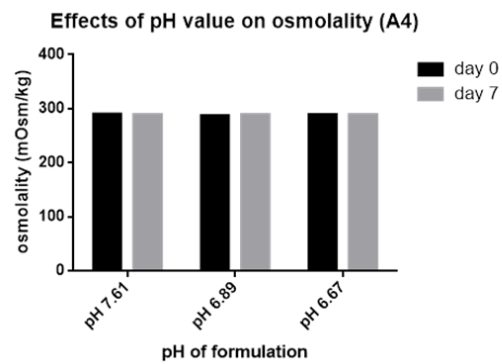
+: with  
-: without

表二十一、安定性試驗——外觀觀察

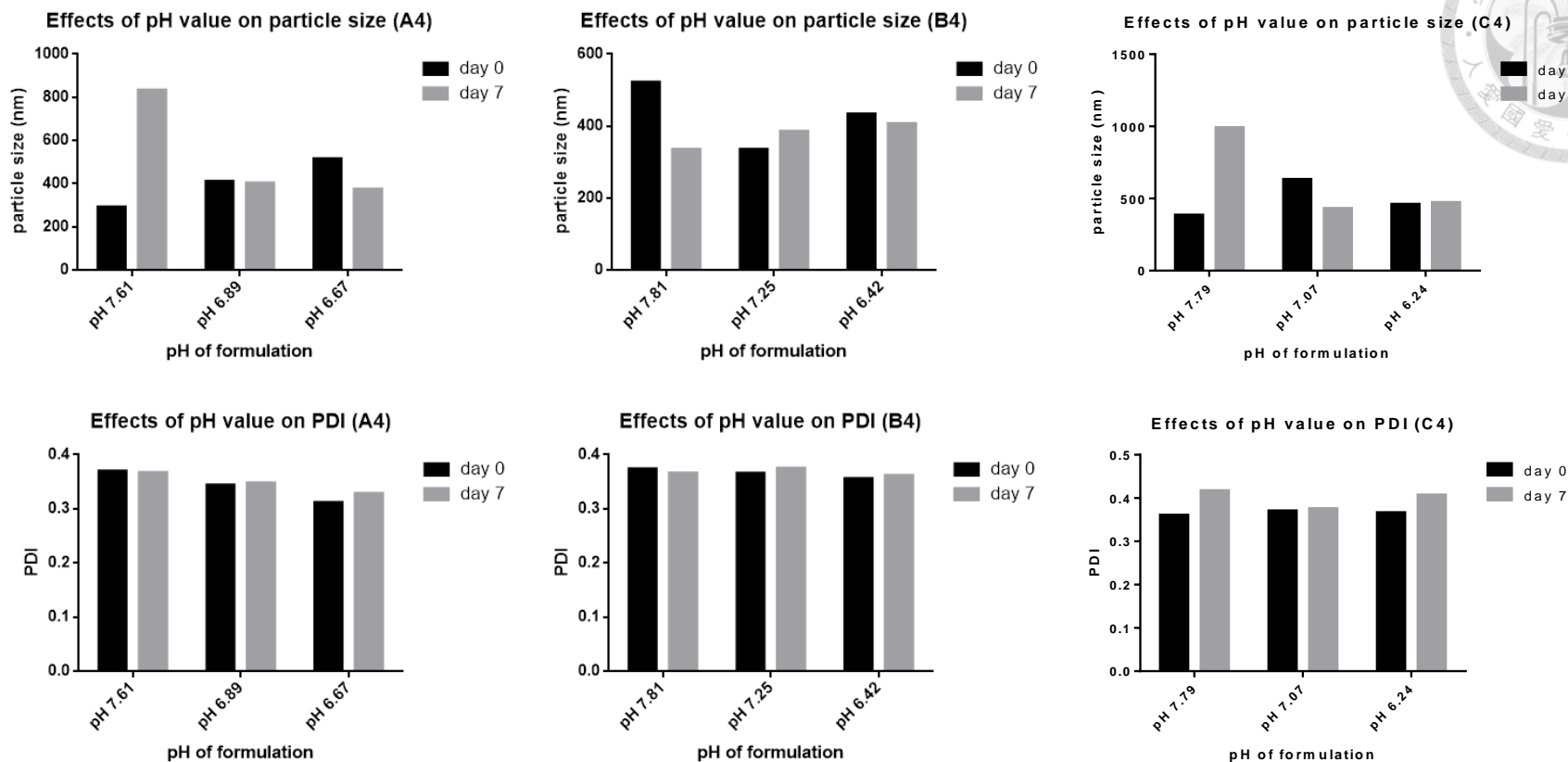
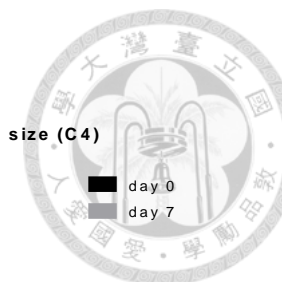
Appearance/Groups	A	B	C	A4	B4	C4
Day 0	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear
Day 7	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear
Day 20	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear	Transparent and clear



圖一、滲透壓及 pH 之調整 (添加增稠劑)

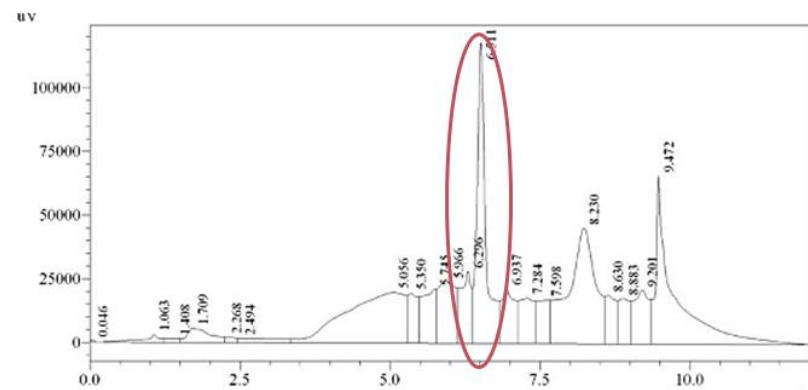


圖二、劑型 pH 值調整後的滲透壓測定 (day 0 & day 7)

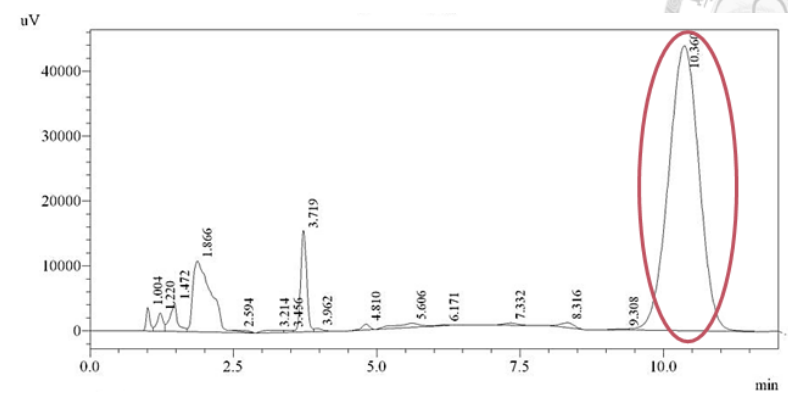


圖三、劑型 pH 值調整後的粒徑尺寸及分布測定 (day 0 & day 7)

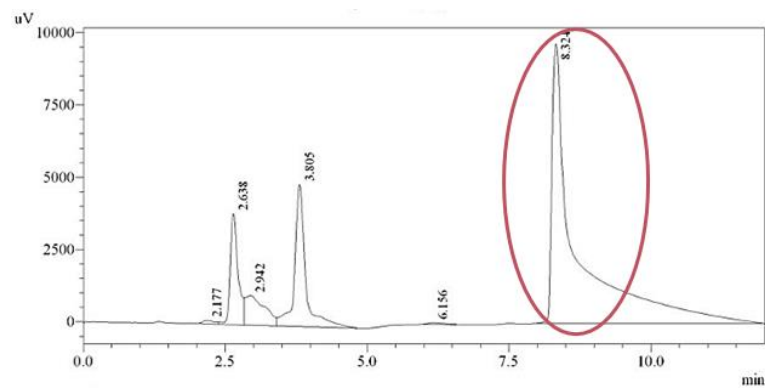
(A)



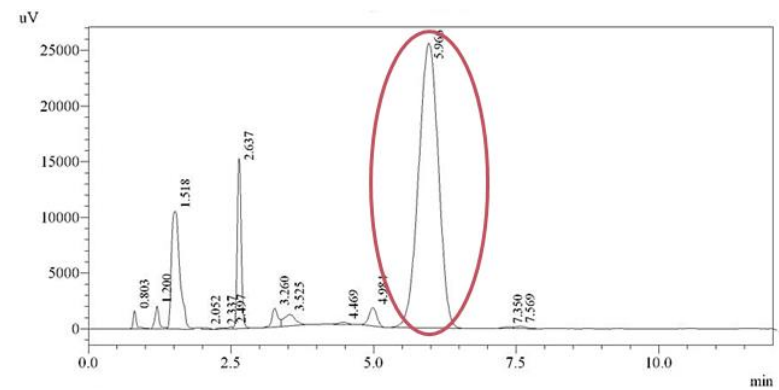
(B)



(C)

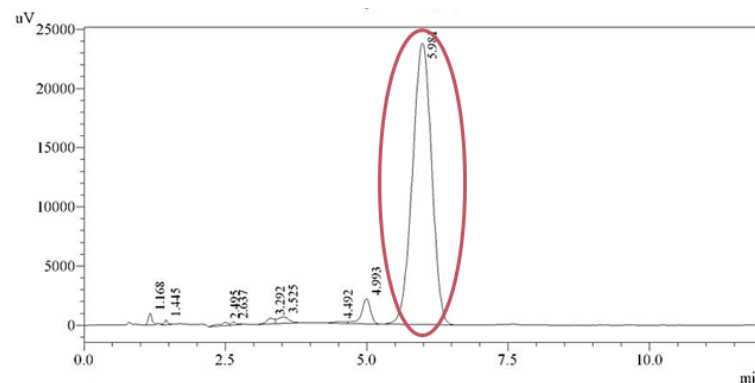


(D)



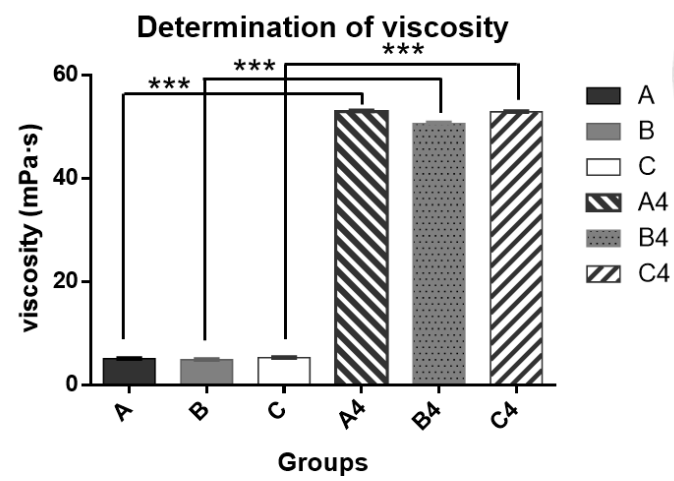


(E)



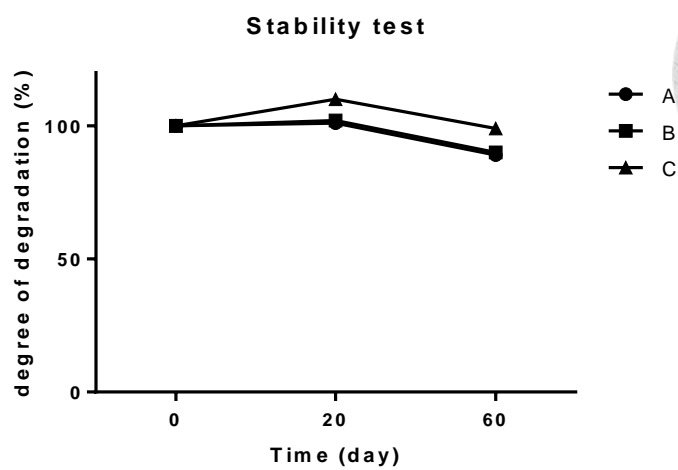
圖四、HPLC 層析圖譜，以不同分析條件分析 Tacrolimus 含量

(A) 梯度沖提，0 分鐘時移動相 A：移動相 B = 70:30，2 分鐘時 A:B = 0:100，8 分鐘時 A:B = 70:30；(B) 等位沖提移動相 A：移動相 B = 70:30；(C) 提升流速為 1.2 mL/min.，移動相 A：移動相 B = 75:25；(D) 樣品注入體積為 10  $\mu$ L，在減少樣品注入體積後，解決了拖尾現象的發生；(E) 標準品溶液改先以乙醇溶解後，再以 ACN 稀釋。

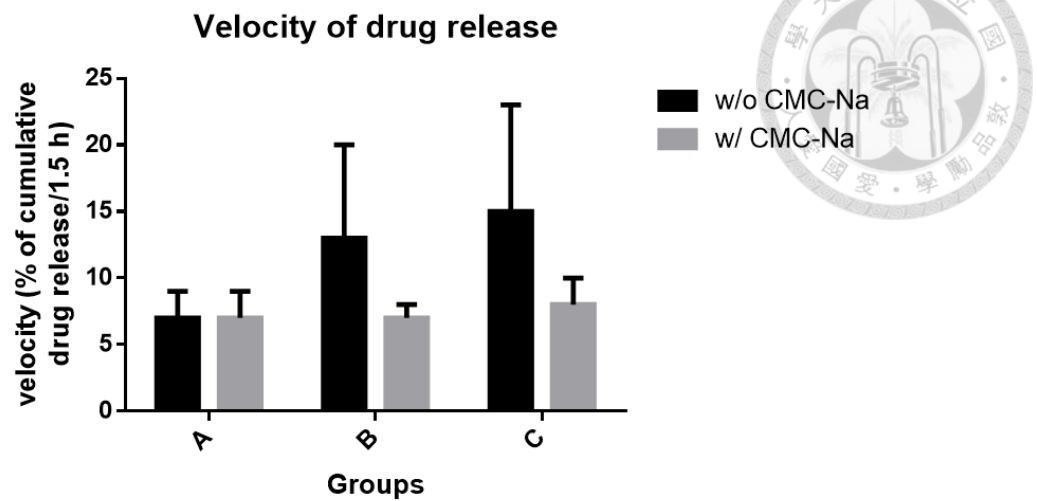


\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

圖五、黏度測定



圖六、安定性試驗——Tacrolimus 含量測定

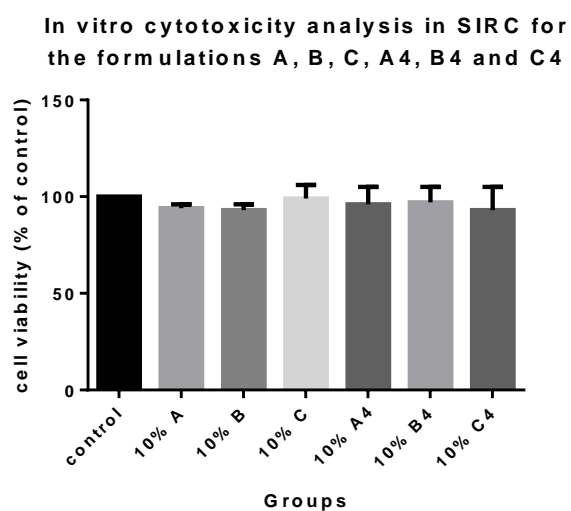


\*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001

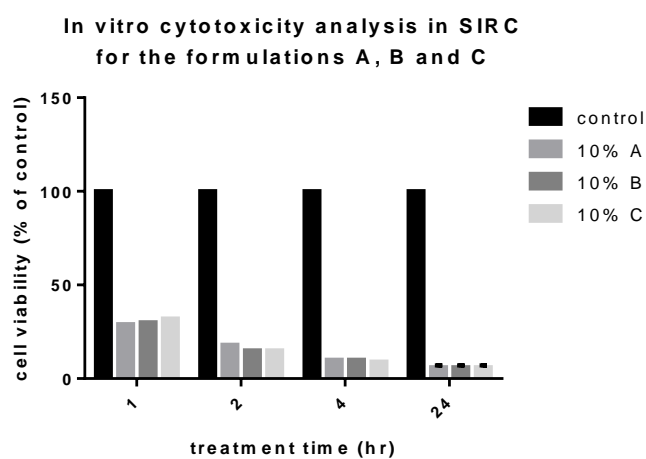
圖七、藥物釋放速率



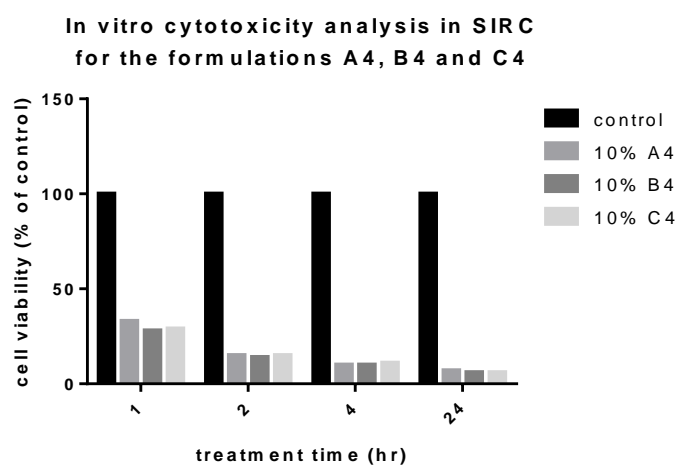
(A)



(B)

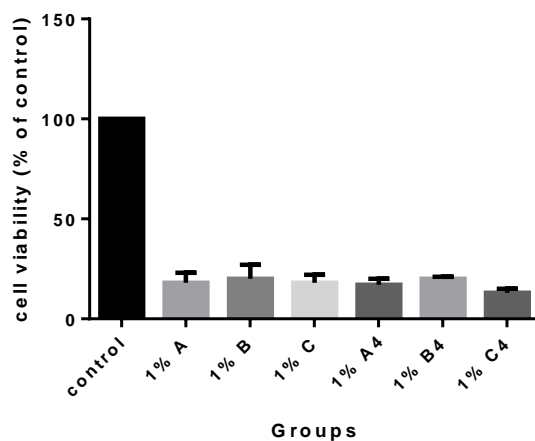


(C)



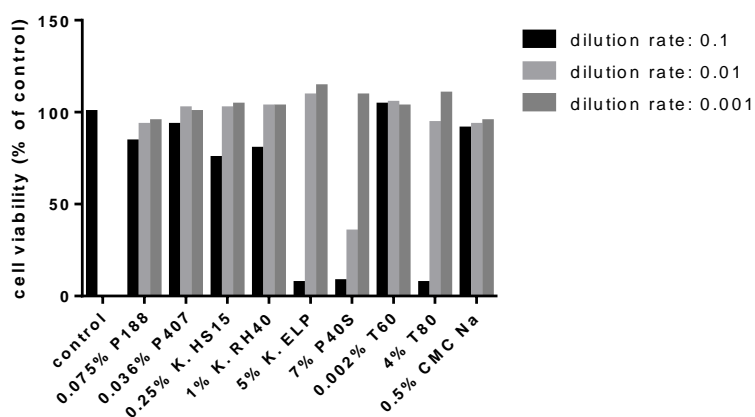
(D)

**In vitro cytotoxicity analysis in SIRC for the formulations A, B, C, A4, B4 and C4**



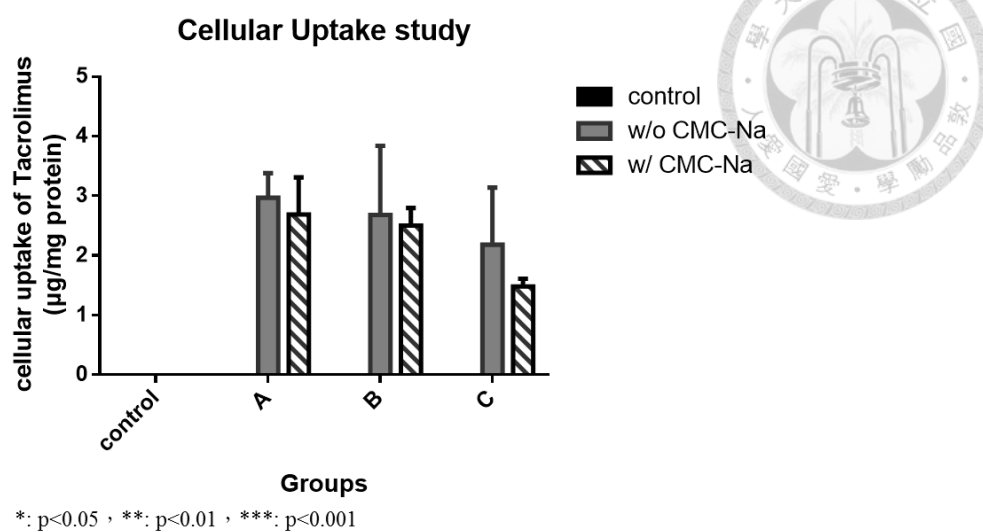
(E)

**In vitro cytotoxicity analysis in SIRC for the excipients**



**圖八、細胞毒性試驗**

(A) 將稀釋 10 倍的劑型與細胞共培養 0.5 小時，再移除劑型並以培養液培養 24 小時後測定細胞存活率，(B) 以稀釋 10 倍的劑型（未添加增稠劑）與細胞共培養指定時間點，(C) 以稀釋 10 倍的劑型（添加增稠劑）與細胞共培養指定時間點，(D) 以稀釋 100 倍的劑型與細胞共培養 24 小時後測定細胞存活率，(E) 賦形劑對細胞之毒性測試。



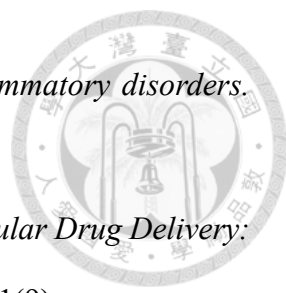
**圖九、細胞攝入試驗**

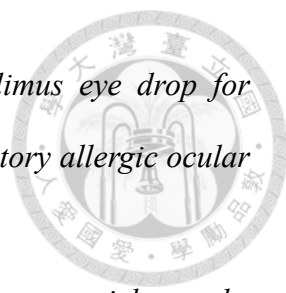
由左至右分別為組別 A、B、C 及個別添加增稠劑後的結果，添加增稠劑至配方中使得細胞攝入的藥量稍微較低，不過在統計上並不具顯著差異。

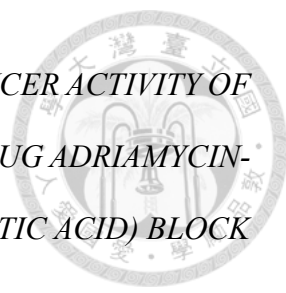
## 參考文獻

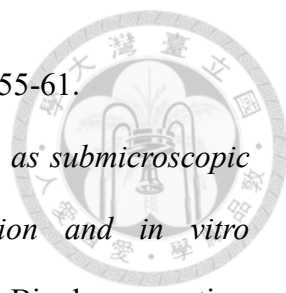


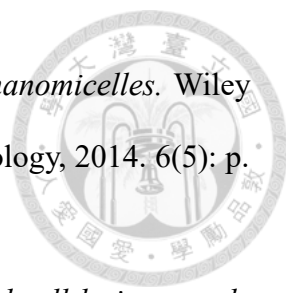
1. Matsuda, S. and S. Koyasu, *Mechanisms of action of cyclosporine*. Immunopharmacology, 2000. 47(2-3): p. 119-125.
2. Zhai, J., et al., *Tacrolimus in the treatment of ocular diseases*. BioDrugs, 2011. 25(2): p. 89-103.
3. Kapturczak, M., H. Meier-Kriesche, and B. Kaplan. *Pharmacology of calcineurin antagonists*. in *Transplantation proceedings*. 2004. Elsevier.
4. Pirsch, J.D., et al., *A comparison of tacrolimus (fk506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation I*. Transplantation, 1997. 63(7): p. 977-983.
5. Erdinest, N., H. Ben-Eli, and A. Solomon, *Topical tacrolimus for allergic eye diseases*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2019. 19(5): p. 535-543.
6. Gupta, A., A. Adamiak, and M. Chow, *Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2002. 16(2): p. 100-114.
7. Hazarika, A.K., & Singh, P. K., *Efficacy of topical application of 0.03% tacrolimus eye ointment in the management of allergic conjunctivitis*. Journal of natural science, biology, and medicine, 2015. 6(Suppl 1), S10.: p. S10.
8. Anand, P., & Bley, K., *Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch*. British journal of anaesthesia, 2011. 107(4): p. 490-502.
9. Pereira, U., et al., *Mechanisms of the sensory effects of tacrolimus on the skin*. British Journal of Dermatology, 2010. 163(1): p. 70-77.

- 
10. Shoughy, S.S., *Topical tacrolimus in anterior segment inflammatory disorders*. Eye and Vision, 2017. 4(1): p. 1-7.
  11. Souto, E.B., et al., *Advanced Formulation Approaches for Ocular Drug Delivery: State-Of-The-Art and Recent Patents*. Pharmaceutics, 2019. 11(9).
  12. Sharma, O.P., V. Patel, and T. Mehta, *Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype*. Drug Deliv Transl Res, 2016. 6(4): p. 399-413.
  13. Srinivasarao, D.A., G. Lohiya, and D.S. Katti, *Fundamentals, challenges, and nanomedicine-based solutions for ocular diseases*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2019. 11(4): p. e1548.
  14. Almeida, H., et al., *In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations*. Drug discovery today, 2014. 19(4): p. 400-412.
  15. Baranowski, P., et al., *Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods*. ScientificWorldJournal, 2014. 2014: p. 861904.
  16. Ahuja, M., et al., *Topical ocular delivery of NSAIDs*. The AAPS journal, 2008. 10(2): p. 229-241.
  17. Reinhard, T., et al., *Topical FK506 as immunoprophylaxis after allogeneic penetrating normal-risk keratoplasty: a randomized clinical pilot study*. Transplant international, 2005. 18(2): p. 193-197.
  18. Hazarika, A.K. and P.K. Singh, *Efficacy of topical application of 0.03% tacrolimus eye ointment in the management of allergic conjunctivitis*. Journal of natural science, biology, and medicine, 2015. 6(Suppl 1): p. S10.
  19. Barot, R.K., et al., *Therapeutic effect of 0.1% tacrolimus eye ointment in allergic ocular diseases*. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 2016. 10(6): p. NC05.

- 
20. Miyazaki, D., et al., *Steroid-sparing effect of 0.1% tacrolimus eye drop for treatment of shield ulcer and corneal epitheliopathy in refractory allergic ocular diseases*. Ophthalmology, 2017. 124(3): p. 287-294.
  21. Wu, Q., et al., *Development and effects of tacrolimus-loaded nanoparticles on the inhibition of corneal allograft rejection*. Drug delivery, 2019. 26(1): p. 290-299.
  22. Liu, D., et al., *A novel FK506 loaded nanomicelles consisting of amino-terminated poly (ethylene glycol)-block-poly (D, L)-lactic acid and hydroxypropyl methylcellulose for ocular drug delivery*. International journal of pharmaceutics, 2019. 562: p. 1-10.
  23. Zhang, J., et al., *Cationic nanoemulsions with prolonged retention time as promising carriers for ophthalmic delivery of tacrolimus*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020. 144: p. 105229.
  24. Wadhwa, S., et al., *Nanocarriers in Ocular Drug Delivery: An Update Review*. Current Pharmaceutical Design, 2009. 15(23): p. 2724-2750.
  25. Fukushima, A., et al., *Therapeutic effects of 0.1% tacrolimus eye drops for refractory allergic ocular diseases with proliferative lesion or corneal involvement*. British Journal of Ophthalmology, 2014. 98(8): p. 1023-1027.
  26. Siegl, C., et al., *Pharmacokinetics of topically applied tacrolimus dissolved in Marinosolv, a novel aqueous eye drop formulation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2019. 134: p. 88-95.
  27. Trivedi, R. and U.B. Kompella, *Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles*. Nanomedicine (Lond), 2010. 5(3): p. 485-505.
  28. Mandal, A., et al., *Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies*. J Control Release, 2017. 248: p. 96-116.

- 
29. Yokoyama, M., et al., *CHARACTERIZATION AND ANTICANCER ACTIVITY OF THE MICELLE-FORMING POLYMERIC ANTICANCER DRUG ADRIAMYCIN-CONJUGATED POLY(ETHYLENE GLYCOL)-POLY(ASPARTIC ACID) BLOCK COPOLYMER*. Cancer Research, 1990. 50(6): p. 1693-1700.
  30. Owen, S.C., D.P.Y. Chan, and M.S. Shoichet, *Polymeric micelle stability*. Nano Today, 2012. 7(1): p. 53-65.
  31. Lin, J.H. and M. Yamazaki, *Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics*. Clinical pharmacokinetics, 2003. 42(1): p. 59-98.
  32. Pepic, I., J. Lovric, and J. Filipovic-Grcic, *Polymeric micelles in ocular drug delivery: rationale, strategies and challenges*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2012. 26(4): p. 365-377.
  33. Malhotra, S., et al., *Design and Evaluation of Voriconazole Eye Drops for the Treatment of Fungal Keratitis*. Journal of Pharmaceutics, 2014. 2014: p. 1-9.
  34. Vooturi, S., et al., *Effect of Particle Size and Viscosity of Suspensions on Topical Ocular Bioavailability of Budesonide, a Corticosteroid*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2020. 36(6): p. 404-409.
  35. Kortemeier, U., Venzmer, J., Howe, A., Grüning, B., & Herrwerth, S., *Thickening agents for surfactant systems*. SÖFW Journal, 2010. 136(3), 30.
  36. Kumsah, C., G. Pass, and G. Phillips, *The interaction between sodium carboxymethylcellulose and water*. Journal of Solution Chemistry, 1976. 5(11): p. 799-806.
  37. El Hami, A. and P. Pougnet, *Embedded Mechatronic Systems 2: Analysis of Failures, Modeling, Simulation and Optimization*. Vol. 2. 2020: Elsevier.
  38. Venil, C. and P. Lakshmanaperumalsamy, *Application of statistical design to the optimization of culture medium for prodigiosin production by Serratia marcescens*

- 
- SWML08. Malaysian Journal of Microbiology, 2009. 5(1): p. 55-61.
39. Motwani, S., et al., *Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007.
  40. Zimmer, A. and J. Kreuter, *Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. 16(1): p. 61-73.
  41. Subasranjan, A. and R. Hemant, *An improved validated ultra high pressure liquid chromatography method for separation of tacrolimus impurities and its tautomers*. Drug testing and analysis, 2010. 2(3): p. 107-112.
  42. Lallemand, F., et al., *Successfully improving ocular drug delivery using the cationic nanoemulsion, novasorb*. Journal of drug delivery, 2012. 2012.
  43. Garrett, Q., et al., *Carboxymethylcellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing*. Investigative ophthalmology & visual science, 2007. 48(4): p. 1559-1567.
  44. Mansuri, S., et al., *Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system*. Reactive and functional polymers, 2016. 100: p. 151-172.
  45. Shaikh, R., et al., *Mucoadhesive drug delivery systems*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2011. 3(1): p. 89.
  46. Eshel-Green, T. and H. Bianco-Peled, *Mucoadhesive acrylated block copolymers micelles for the delivery of hydrophobic drugs*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. 139: p. 42-51.
  47. Friuli, V., et al., *Influence of dissolution media and presence of alcohol on the in vitro performance of pharmaceutical products containing an insoluble drug*. Journal of pharmaceutical sciences, 2018. 107(1): p. 507-511.

- 
48. Vaishya, R.D., et al., *Controlled ocular drug delivery with nanomicelles*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2014. 6(5): p. 422-437.
49. Partearroyo, M.A., et al., *Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis: a study using B16 melanoma cells*. Biochemical pharmacology, 1990. 40(6): p. 1323-1328.
50. Li, M., et al., *New nanomicelle curcumin formulation for ocular delivery: improved stability, solubility, and ocular anti-inflammatory treatment*. Drug development and industrial pharmacy, 2017. 43(11): p. 1846-1857.
51. Song, K., et al., *Novel ultra-small micelles based on rebaudioside A: a potential nanoplatform for ocular drug delivery*. International journal of pharmaceutics, 2018. 552(1-2): p. 265-276.
52. Guo, C., et al., *Nanomicelle formulation for topical delivery of cyclosporine A into the cornea: in vitro mechanism and in vivo permeation evaluation*. Scientific reports, 2015. 5(1): p. 1-14.
53. Souto, E.B., et al., *Advanced formulation approaches for ocular drug delivery: State-of-the-art and recent patents*. Pharmaceutics, 2019. 11(9): p. 460.
54. Mojaddam, M. and K.R. Pullen, *Optimization of a centrifugal compressor using the design of experiment technique*. Applied Sciences, 2019. 9(2): p. 291.



## 附錄

附表一、Tacrolimus 眼用製劑

Formulation	Conc.	Disease	Advantages	Disadvantages
solution	0.06%	PKP	<ul style="list-style-type: none"> <li>effective</li> <li>easy to instill, convenient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>low drug-contact time (drug loss)</li> <li>poor ocular bioavailability</li> </ul>
ointment	0.03%/0.1%	AKC, VKC	<ul style="list-style-type: none"> <li>effective, safe</li> <li>prolonged contact time</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>poor patient compliance (greasiness)</li> <li>temporary blurring of vision</li> </ul>
suspension	0.1%	AKC, VKC	<ul style="list-style-type: none"> <li>prolonged contact time</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>irritation (particle size)</li> <li>loss of drug</li> </ul>
nanoparticle	-	corneal allograft rejection	<ul style="list-style-type: none"> <li>enhance transcorneal permeation and absorption</li> <li>effective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>particle contamination</li> </ul>
eye drop (tacrolimus dissolved in Marinosolv)	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>higher long-term storage stability</li> <li>more tacrolimus reached higher levels in ocular tissues</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>low drug-contact time</li> </ul>
nanomicelle	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>higher concentration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>rapid tear dilution</li> <li>lack of sustained/controlled release</li> </ul>
nanoemulsion	-	IIAOD	<ul style="list-style-type: none"> <li>improved solubility</li> <li>reduced dosing frequency</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>selection of excipients affects its stability</li> <li>high preparation cost</li> </ul>
suspension	0.1%	AKC, VKC	<ul style="list-style-type: none"> <li>safe and effective</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>irritation (particle size)</li> <li>loss of drug</li> </ul>

AKC: atopic keratoconjunctivitis, VKC: vernal keratoconjunctivitis, PKP: penetrating keratoplasty, IIAODs: immune-mediated inflammatory anterior ocular diseases

附表二、常見的人工合成膜

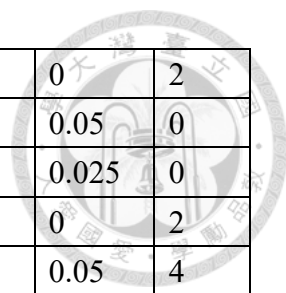
Membranes	Hydrophilic/hydrophobic
Polysulfone (PS)	Hydrophobic
Polymethylsiloxane (PDMS)	Hydrophobic
Polycarbonate	Hydrophilic
Mixed cellulose ester (MCE)	Hydrophilic
Nylon	Hydrophilic
Polyvinylidene fluoride (PVDF)	Hydrophilic
Cellulose acetate (CA)	Hydrophilic
Polyethersulfone (PES)	Hydrophilic



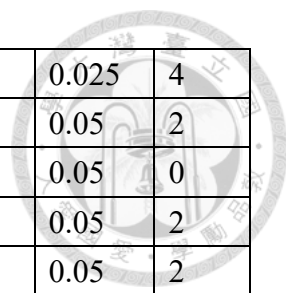
附表三、數據蒐集所需製備之微胞溶液組成

(volume percentage concentration)

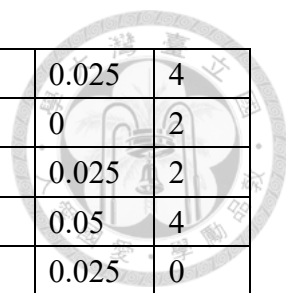
Surf.	P188	P407	K. HS15	K. ELP	K. RH40	P40S	T60	T80
run								
1	0.05	0	0.25	2.5	0.5	7	0	2
2	0.1	0	0.125	2.5	0	7	0.025	2
3	0	2	0.125	2.5	1	0	0.025	2
4	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
5	0.1	1	0	2.5	0.5	0	0.025	4
6	0	1	0	2.5	1	3.5	0.05	2
7	0.05	1	0.25	5	0	0	0.025	2
8	0.05	0	0	2.5	0	3.5	0.025	0
9	0.05	0	0.125	0	0.5	0	0.025	0
10	0	2	0.125	2.5	0.5	3.5	0.05	0
11	0.05	1	0	0	1	7	0.025	2
12	0.1	1	0.125	0	0.5	7	0	2
13	0.05	2	0.125	0	0.5	7	0.025	0
14	0.1	2	0	0	0.5	3.5	0.025	2
15	0	1	0.25	2.5	1	3.5	0	2
16	0	1	0.125	5	1	3.5	0.025	0
17	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
18	0.05	2	0	2.5	1	3.5	0.025	0
19	0.05	0	0.125	5	1	3.5	0	2
20	0.1	1	0.125	0	1	3.5	0.025	0
21	0.05	0	0	2.5	1	3.5	0.025	4
22	0	1	0.25	2.5	0.5	7	0.025	0
23	0.05	0	0.125	0	0	3.5	0	2
24	0.05	1	0	0	0	0	0.025	2
25	0.05	1	0	5	0.5	3.5	0.05	0
26	0	1	0.125	0	0.5	7	0.05	2
27	0.1	0	0.125	2.5	1	0	0.025	2
28	0.1	0	0.25	0	0.5	3.5	0.025	2
29	0.1	1	0.125	5	1	3.5	0.025	4
30	0.1	1	0.125	5	0.5	0	0	2
31	0.05	0	0.125	0	1	3.5	0.05	2
32	0	1	0.125	0	1	3.5	0.025	4



33	0.05	2	0.25	2.5	0.5	0	0	2
34	0.05	1	0.125	2.5	0	7	0.05	0
35	0.05	2	0.25	2.5	0	3.5	0.025	0
36	0.05	2	0	2.5	0.5	7	0	2
37	0.05	1	0	0	0.5	3.5	0.05	4
38	0.05	1	0	5	1	0	0.025	2
39	0.05	2	0	2.5	0	3.5	0.025	4
40	0	0	0.25	5	0.5	3.5	0.025	2
41	0.05	1	0.125	2.5	1	7	0	0
42	0.05	0	0.25	2.5	1	3.5	0.025	0
43	0.1	1	0	2.5	0	3.5	0.05	2
44	0.05	1	0.25	5	0.5	3.5	0	0
45	0.05	1	0.25	5	0.5	3.5	0.05	4
46	0.05	1	0.25	0	0.5	3.5	0.05	0
47	0	2	0	5	0.5	3.5	0.025	2
48	0.05	0	0.25	2.5	0.5	0	0.05	2
49	0.1	0	0.125	2.5	0.5	3.5	0	4
50	0.05	1	0.125	2.5	1	0	0.05	0
51	0.05	0	0	2.5	0.5	0	0	2
52	0.1	1	0.25	2.5	1	3.5	0.05	2
53	0.05	1	0.125	2.5	0	0	0.05	4
54	0.1	1	0.125	0	0	3.5	0.025	4
55	0	1	0.25	2.5	0.5	0	0.025	4
56	0.1	1	0.125	5	0.5	7	0.05	2
57	0.05	2	0.125	5	0	3.5	0	2
58	0	1	0.25	2.5	0	3.5	0.05	2
59	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
60	0.1	1	0.25	2.5	0.5	0	0.025	0
61	0.1	1	0.25	2.5	0	3.5	0	2
62	0.05	1	0	5	0	7	0.025	2
63	0	1	0	2.5	0.5	7	0.025	4
64	0.1	2	0.125	2.5	0	0	0.025	2
65	0.1	2	0.125	2.5	0.5	3.5	0.05	4
66	0.05	1	0.25	5	1	7	0.025	2
67	0.05	0	0.125	0	0.5	7	0.025	4
68	0	1	0.125	0	0	3.5	0.025	0

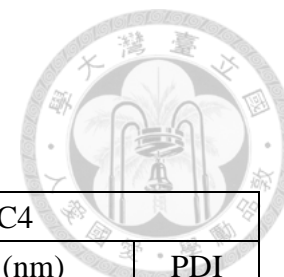


69	0.05	0	0.25	2.5	0	3.5	0.025	4
70	0.05	0	0	2.5	0.5	7	0.05	2
71	0.1	0	0.125	2.5	0.5	3.5	0.05	0
72	0.05	2	0	2.5	0.5	0	0.05	2
73	0.05	2	0.125	5	1	3.5	0.05	2
74	0.05	0	0.125	5	0.5	0	0.025	4
75	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
76	0.05	1	0.25	0	1	0	0.025	2
77	0	1	0.125	0	0.5	0	0	2
78	0.05	2	0.125	0	0.5	0	0.025	4
79	0.1	2	0.125	2.5	1	7	0.025	2
80	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
81	0	0	0.125	2.5	1	7	0.025	2
82	0.05	2	0.25	2.5	0.5	7	0.05	2
83	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
84	0.1	2	0.125	2.5	0.5	3.5	0	0
85	0	2	0.125	2.5	0	7	0.025	2
86	0	0	0.125	2.5	0.5	3.5	0	0
87	0.1	1	0	2.5	1	3.5	0	2
88	0.1	1	0.25	2.5	0.5	7	0.025	4
89	0.1	1	0.125	0	0.5	0	0.05	2
90	0	1	0.125	5	0.5	7	0	2
91	0.05	1	0	5	0.5	3.5	0	4
92	0.05	2	0.125	5	0.5	0	0.025	0
93	0.05	1	0.125	2.5	0	0	0	0
94	0.05	1	0.25	0	0	7	0.025	2
95	0.05	1	0.125	2.5	1	7	0.05	4
96	0.05	2	0.125	0	0	3.5	0.05	2
97	0	0	0	0	0.5	3.5	0.025	2
98	0.1	1	0.125	5	0	3.5	0.025	0
99	0.05	1	0	0	0.5	3.5	0	0
100	0	2	0.25	0	0.5	3.5	0.025	2
101	0	1	0	2.5	0.5	0	0.025	0
102	0.1	1	0	2.5	0.5	7	0.025	0
103	0.05	1	0.125	2.5	0	7	0	4
104	0.05	2	0.125	0	1	3.5	0	2



105	0.05	2	0.25	2.5	1	3.5	0.025	4
106	0	1	0	2.5	0	3.5	0	2
107	0.1	2	0.25	5	0.5	3.5	0.025	2
108	0	0	0.125	2.5	0.5	3.5	0.05	4
109	0.05	0	0.125	5	0.5	7	0.025	0
110	0.05	1	0.25	0	0.5	3.5	0	4
111	0.05	0	0.125	5	0	3.5	0.05	2
112	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
113	0	0	0.125	2.5	0	0	0.025	2
114	0	2	0.125	2.5	0.5	3.5	0	4
115	0.05	1	0.125	2.5	0.5	3.5	0.025	2
116	0.1	0	0	5	0.5	3.5	0.025	2
117	0	1	0.125	5	0	3.5	0.025	4
118	0	1	0.125	5	0.5	0	0.05	2
119	0.05	1	0.125	2.5	1	0	0	4
120	0.05	2	0.125	5	0.5	7	0.025	4

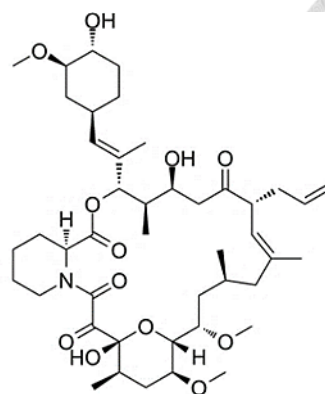
Surf.: surfactants, P188: poloxamer 188, P407: poloxamer 407, HS15: Kolliphor HS-15, K. ELP: Kolliphor ELP, RH40: Kolliphor RH40, P40S: polyoxyl 40 stearate, T60: Polysorbate 60, T80: Polysorbate 80



附表四、微胞溶液製程調整——粒徑尺寸及分布

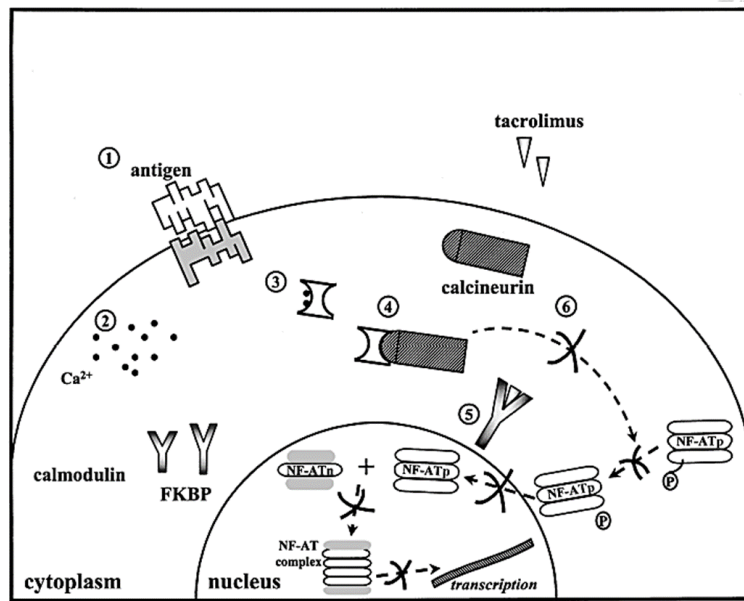
	A4		B4		C4	
preparation method	particle size (nm)	PDI	particle size (nm)	PDI	particle size (nm)	PDI
1	16.6	0.361	16.6	0.360	16.8	0.367
2	17.8	0.307	16.4	0.350	16.7	0.352
3	16.4	0.376	17.5	0.358	16.0	0.372
4	16.5	0.378	16.9	0.359	16.3	0.366

**Tacrolimus**  
Tsubuka macrolide immunosuppressant

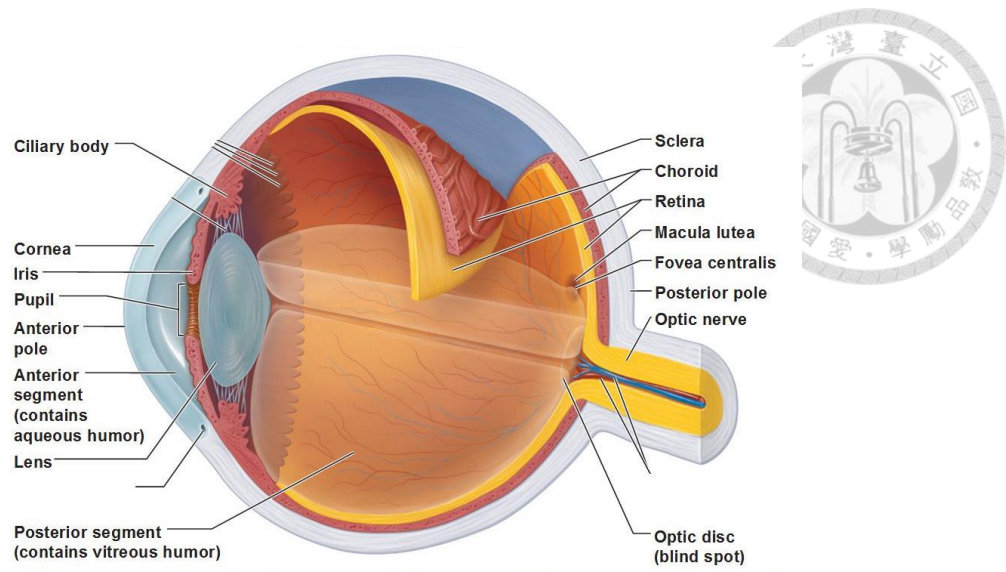


#### 附圖一、Tacrolimus 命名緣由及結構示意圖

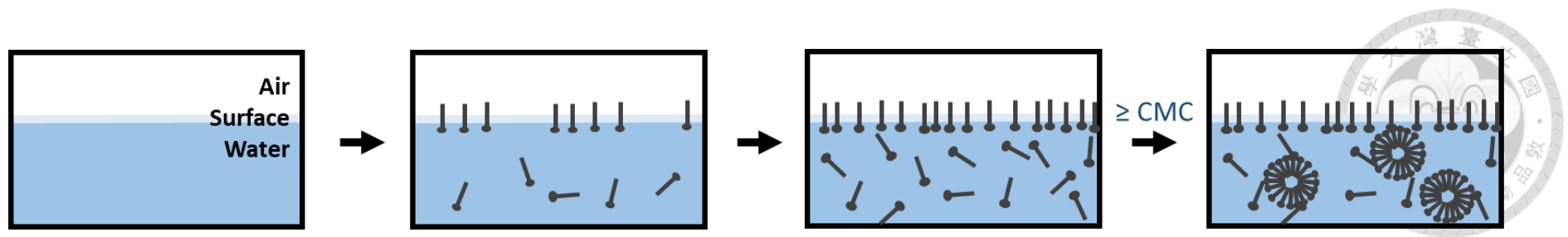
Tacrolimus 提取來自日本筑波 (Tsubuka) 的土壤菌叢，其字首“T”便是取自筑波的字頭；而“acrol”則是由於 Tacrolimus 具有大環內酯 (macrolide) 的結構；字尾的“imus”則是代表著作為免疫抑制劑 (immunosuppressant) 的功用。



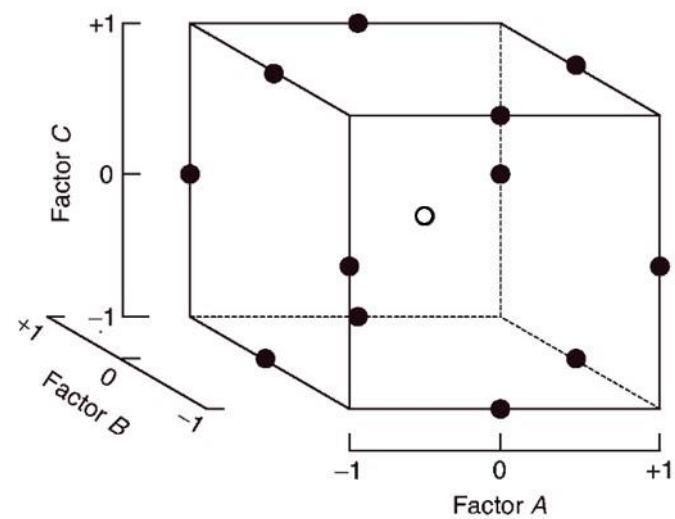
附圖二、Tacrolimus 的作用機制[6]



附圖三、眼睛結構[53]



附圖四、微胞形成過程 (modified from Wikipedia)



附圖五、三因子 Box-Behnken Design 圖示[54]

(Tacrolimus + surfactants + water)

↓  
stir for 30 min.  
at 120 rpm

+ CMC sodium

↓  
stir overnight at  
120 rpm

Micelle formation

(Surfactants + CMC sodium + water)

↓  
stir overnight at  
120 rpm

+ Tacrolimus

↓  
stir overnight at  
120 rpm

Micelle formation

(Tacrolimus + surfactants  
+ water)

↓  
stir for 30 min.  
at 120 rpm

+ (CMC sodium + water)

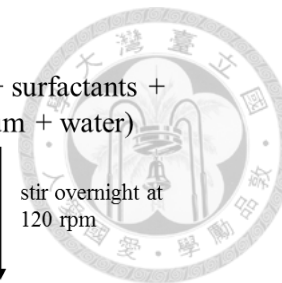
↓  
stir overnight at  
120 rpm

Micelle formation

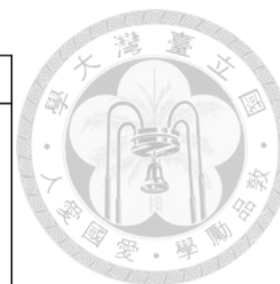
(Tacrolimus + surfactants +  
CMC sodium + water)

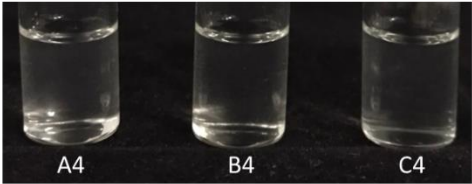
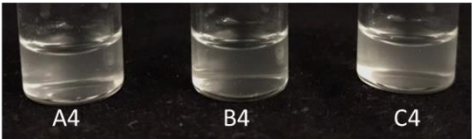
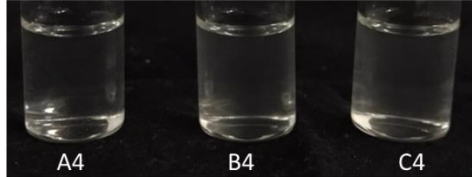
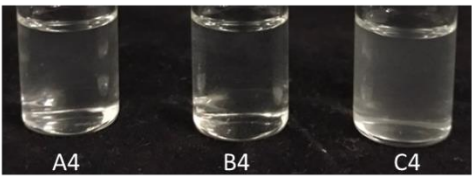
↓  
stir overnight at  
120 rpm

Micelle formation



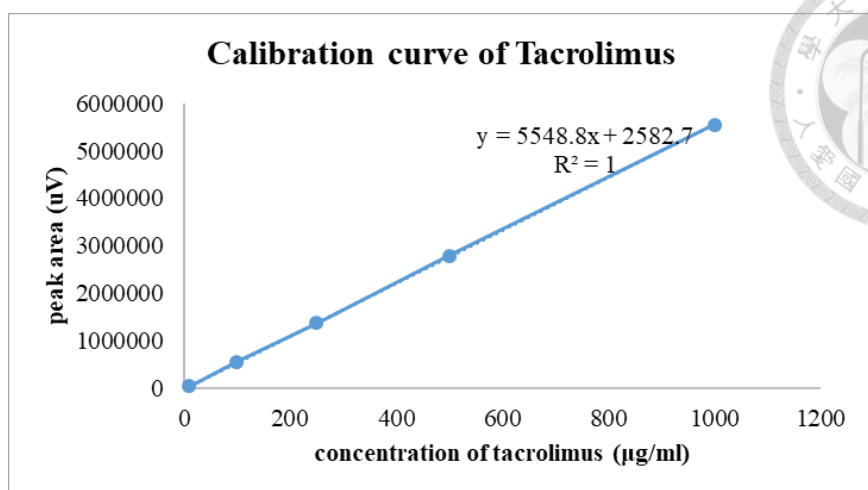
附圖六、微胞溶液製程調整



Preparation method	1: (TAC + surf. + water) + CMC-Na	2: (surf. + CMC-Na + water) + TAC
Pictures		
Preparation method	3: (TAC + surf. + water) + (CMC-Na + water)	4: TAC + surf. + CMC-Na + water
Pictures		

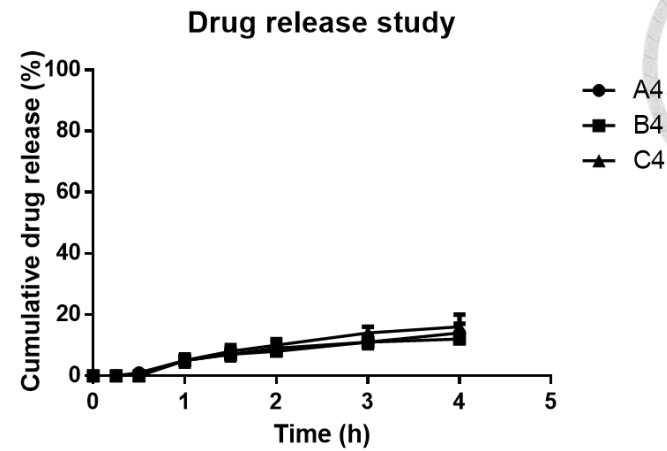
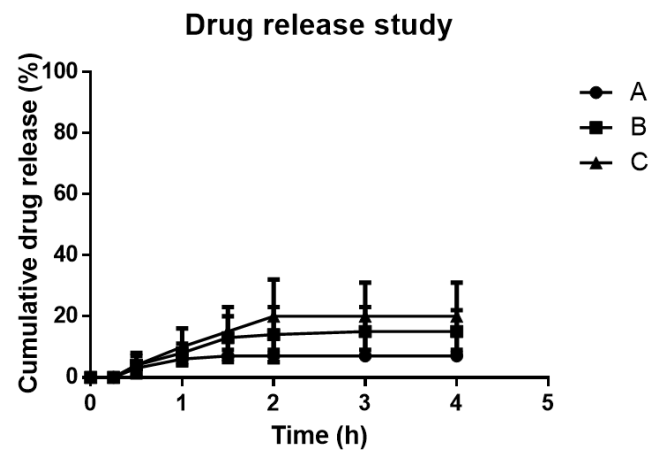
surf.: surfactants

附圖七、微胞溶液製程調整——外觀觀察



附圖八、Tacrolimus 檢量線的建立

所得方程式為一線性回歸式，將得到的波峰面積代入計算，可以推算得到 Tacrolimus 的濃度。



附圖九、以 Franz cell 評估藥物釋放情況，於不同時間點，採取 (A) 未添加和 (B)有添加 CMC sodium 之微胞溶液在試驗中的樣品並計算其累積釋放藥量。