

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

188Re-EGF-Dox-Liposome 之活體外及活體內特性研究
In vitro and in vivo characterization of 188Re-EGF-Dox-Liposome

計畫編號：992001INER077

受委託機關(構)：台北榮民總醫院癌病中心

計畫主持人：顏上惠

核研所聯絡人員：李德偉 博士

聯絡電話：(02)28712121-2017

E-mail address：kllan@vghtpe.gov.tw

報告日期：99 年 11 月 30 日

目 錄

目 錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	4
貳、研究方法與過程.....	7
一、大量製備表皮生長因子蛋白質及分離純化.....	7
二、EGF-LIPODOX 的製備.....	7
三、結合共聚焦顯微鏡觀察.....	7
四、細胞毒殺測試.....	7
五、DOXORUBICIN 在細胞中之累積.....	7
六、小鼠毒性測試.....	7
參、主要發現與結論.....	10
一、成功純化表皮生長因子蛋白質.....	10
二、產生新分子 EGF-LIPODOX.....	10
三、EGF-LIPODOX 有效的結合表皮生長因子受體過度表達之癌細胞 並進入細胞核.....	10
四、EGF-LIPODOX 增加表皮生長因子受體過度表達之癌細胞中 DOXORUBICIN 的累積.....	10
五、EGF-LIPODOX 與 LIPODOX 毒殺死癌細胞的比較.....	10
六、EGF-LIPODOX 與 LIPODOX 毒性之比較.....	10
肆、參考文獻.....	16

中文摘要

許多人類腫瘤因為過度表達上皮細胞生長素 EGF 受體(EGF Receptor)能造成血管新生及增加腫瘤細胞對毒殺性藥物及放射線所造成之細胞凋亡具有耐受度，並增加腫瘤惡性度及降低病人存活率。針對 EGF 蛋白質訊息傳遞路徑的靶向性(Target Therapy)療法，包括抗體(如 Erbitux, Panitumumab)及小分子 drug(如 Iressa, Tarceva)等，雖然有一定程度的效果，但不是所有的患者都能受惠於這些藥物，而且耐藥性最後總是會發生。本計畫主要目標是為發展一種新型上皮細胞生長素結合微脂體載裝之化療藥 EGF-LipoDox。包埋 doxorubicin 的微脂體(LipoDox)比單獨使用 doxorubicin 有更安全的有效藥理特性，因此已廣泛地被使用在癌症治療上，為了加強 LipoDox 的治療效果，我們將 EGF 標識至 LipoDox 上。這項策略依據可能產生的優勢是：EGF 的腫瘤特異性可降低 LipoDox 分佈到 EGFR 表現量少的正常細胞而減少化療藥 doxorubicin 造成的毒性。我們的數據顯現表皮生長因子標記的 LipoDox 對表皮生長因子受體高表達之癌細胞，相較於 LipoDox 具更強的毒殺效果。在動物毒性研究方面，表皮生長因子標記的 LipoDox 比 LipoDox 並未顯示更多毒性。鑑於這些令人鼓舞的數據，表皮生長因子標記的 LipoDox 值得進一步開發用於治療表皮生長因子受體高表達之癌症。

關鍵字： 上皮細胞生長素;靶向性療法;微脂體

Abstract

Many human cancers are characterized by overexpression of EGF receptor (EGFR), which contributes to angiogenesis as well as increased resistance of tumor cells to apoptotic effect of cytotoxic agents. Although new target therapies against EGFR signaling pathway, including antibody and small molecules, have achieved some degree of success, not all patients were benefited by these drug and drug resistance always occurs in the responder eventually. This major goal of this project is to develop an innovative biological therapeutics targeting EGFR-expressing cancers. Liposome loaded with doxorubicin (LipoDox) exhibited more favorable toxicity profile as opposed to doxorubicin alone, which has been widely prescribed for cancer treatment. To further enhance the therapeutic effect of Dox-liposome, we had labeled it with EGF. This strategy is based on the rationale that the targeting effect of EGF should further decrease toxicity of doxorubicin by minimizing its distribution to normal cells where EGFR is scarcely expressed. Our data demonstrated better killing effect of EGF-LipoDox on EGFR-expressing cancer than that of LipoDox. In animal toxicity studies, EGF-LipoDox did not show discernibly increased toxicity as compared to LipoDox. Given these encouraging data, EGF-LipoDox merits further

development for the treatment of EGFR-expressing cancers.

key words: epithelial growth factor (EGF), target therapy; liposome

壹、計畫緣起與目的

惡性腫瘤已經連續超過 20 年成為台灣人民第一死因，其中人類表皮性癌症如肺癌、大腸癌、乳癌、頭頸癌、胰臟癌等，主要與表皮生長因子 (Epithelial growth factor, EGF) 和其受體 (EGFR) 群活化有關，此細胞訊號傳導路徑對癌症的惡性度治療的反應及病患的存活率有密切的關係¹。當表皮因子結合其受體，受體將產生二聚物 (dimer) 並造成自體磷酸化 (autophosphorylation)，進而引起下游一系列的蛋白質活化及訊號傳導，最終產生的效應為促進細胞生長、促進血管新生 (angiogenesis)、抑制細胞凋亡 (apoptosis)、引發細胞轉移等 (右圖²)，這些分子生物機制解釋了過度表達此表皮生長因子受體的癌細胞的極度惡性，因此，無數的學術單位及藥廠皆專注於研發對

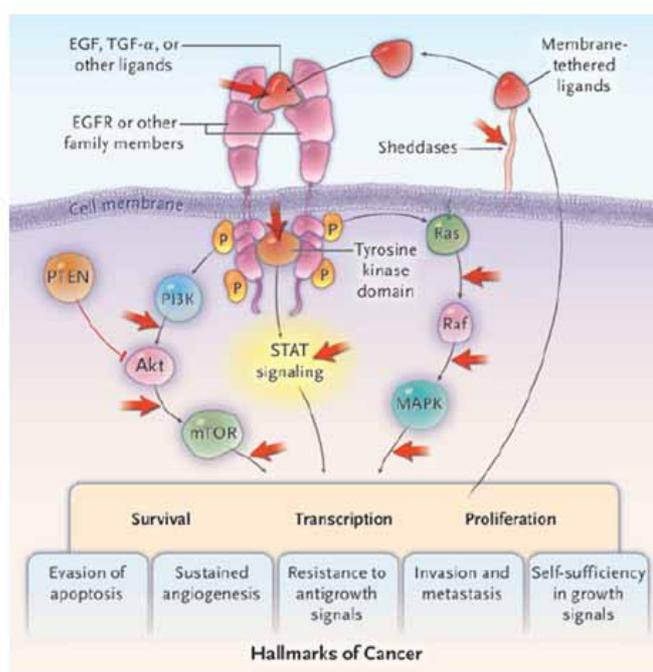
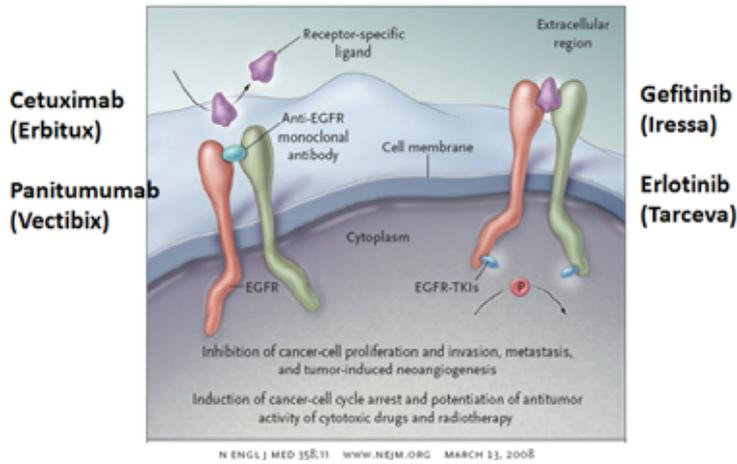


Figure 1. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathway. N ENGL J MED 361;10 NEJM.ORG SEPTEMBER 3, 2009

抗此一路徑的標靶治療藥物 (下圖³)。我們將建立一個新穎的治療方法，以微脂體包埋藥物可增加對標靶腫瘤細胞的毒殺效果，EGF-LipoDox 是含 doxorubicin 的微脂體包埋 EGF，對於選擇 EGF 是因為在癌症發展上，其在 EGF-EGFR 訊息傳遞路徑所扮演著重要角色。在近 20 年中，以血管新生之研究針對此路徑對腫瘤治療

Two classes of EGF-EGFR inhibitors are now in clinical use:
anti-EGFR antibodies & tyrosine kinase inhibitors



已有相當的發展，本計畫的目標在於藉由 EGF 使 LipoDox 更專一性結合腫瘤細胞表現的 EGFR，以改進化療藥

LipoDox 的療效。

奈米大小的微酯體 (liposomes) 利用酯質聚合體結構形成藥物遞送系統 (Drug Delivery System, DDS) 的，利用此一策略包覆攜帶化療藥物，已廣泛地用於癌症治療。由於一般正常組織的緊密血管細胞排列，大於 5 奈米的物質很難穿透正常組織血管，相反的，微酯體包覆之化療藥其大小通常約為 100 奈米，可通過腫瘤新生壁的血管縫隙而更有效地累積在腫瘤中，此一作用機轉乃學理中所謂的“增加的滲透力及藥物滯留效應 (enhanced permeability and retention effect)”⁴⁻⁵。這些微酯體化學藥物形成之複合物的主要優點是可改進藥物動力學 (Pharmacokinetics) 及生物分佈 (Biodistribution) 進而增加療效。比起傳統的化學藥物治療，這一類藥物最著名的例子，為 liposome 包埋的 doxorubicin (LipoDoxTM)，在諸多臨床試驗中已證明微酯體包埋的 doxorubicin 可明顯降低單獨使用 doxorubicin 所造成的毒性，因此已廣泛地被使用在癌症治療上⁶⁻⁷。

為了更進一步改良微酯體包覆 doxorubicin，我們利用免疫微酯體 (Immunoliposome) 的概念，以製造出對腫瘤更具專一效果並同時降低對正常組織傷害的微酯體藥物。免疫微酯體 (Immunoliposome) 乃結合微酯體藥物及針對腫瘤特異蛋白之抗體 (Antibody) 或胜肽片段 (peptide) 作為標靶引導系統 (Targeting

system)，藉由在藥物動力學、生物分佈及藥物標靶遞送的多重優點，可將選擇的微脂體藥物較專一地遞送到腫瘤細胞及其週遭組織，增強對腫瘤細胞的毒殺反應⁸⁻⁹。許多人類腫瘤，包括胰腺癌、胃癌、大腸癌、肺癌、頭頸部癌等，因為過度表達上皮細胞生長素 EGF 受體 (EGF Receptor) 能造成血管新生及增加腫瘤細胞對毒殺性藥物及放射線所造成之細胞凋亡具有耐受度，並增加腫瘤惡性度及降低病人存活率。本計畫發展一新型上皮細胞生長素結合微脂體載裝之化療藥 EGF-LipoDox。為了加強 LipoDox 的治療效果，我們將 EGF 標識至 LipoDox 上。這項策略可產生的優勢是(1)EGF 對過度表達上皮細胞生長素 EGF 受體的腫瘤特異性可增加 EGF-LipoDox 的細胞毒殺效果；(2)降低 LipoDox 分佈到 EGFR 表現量少的正常細胞而減少化療藥 doxorubicin 造成的毒性。我們的實驗數據顯現表皮生長因子標記的 LipoDox 對表皮生長因子受體高表達之癌細胞，相較於 LipoDox 具更強的毒殺效果。在動物毒性研究方面，表皮生長因子標記的 LipoDox 比 LipoDox 並未顯示更多毒性。鑑於這些令人鼓舞的數據，表皮生長因子標記的 LipoDox 值得進一步開發用於治療表皮生長因子受體高表達之癌症。

貳、研究方法與過程

一、大量製備表皮生長因子蛋白質及分離純化：我們首先將利用基因工程表達分泌蛋白的酵母菌 DNA 質粒，pCIZ-alpha, 建立了一個六溴氨酸標籤的人表皮生長因子（hEGF-hexahistidine）融合基因。酵母菌是在室溫下培養和甲醇誘導分泌蛋白表達三天。收集之培養基通過一個鎳樹脂柱（Nickel-resin column）非特異性結合的蛋白質被 5mM imidazole 清洗後，結合的蛋白質用 150mM imidazole 洗出，並利用 pH 值 7.4 之 PBS 緩衝液透析。

二、EGF-LipoDox 的製備：使用 Traut' reagent (2-iminothiolane) 與 EGF 結合，得到 EGF-SH 之產物。再將 EGF-SH 與 maleimide-PEG-DSPE 結合，得到 EGF-PEG-DSPE。利用 Sephadex G-10 column 除去多餘之 Traut' reagent 與 maleimide-PEG-DSPE，獲得純化後之 EGF-PEG-DSPE。存化後之 EGF-PEG-DSPE 溶液中加入適當量之 LipoDox，60 °C 下反應一小時，使 EGF-PEG-DSPE 插入 LipoDox 之 lipidbilayer 中，再藉由 Sepharose 4B column 移除未插入 LipoDox 中之 EGF-PEG-DSPE，即得到所需之最終產物 EGF-LipoDox。測量 EGF-LipoDox 之 phospholipids 濃度及粒徑大小以利後續之實驗使用。

三、EGF-LipoDox 與 MDA-MB-468、MCF-7 乳癌細胞及正常乳腺細胞株 MCF-10 結合共聚焦顯微鏡觀察：於 6-well plate 中放入一蓋玻片，隨後植入細胞。待細胞貼附盤底及玻片

後，分別加入實驗組之藥物 EGF-LipoDox 及控制組之藥物 LipoDox 或 doxorubicin，在 37°C 下反應 30 分鐘。反應結束後將 6-well plate 中之蓋玻片取出，放置於一載玻片上，固定細胞後，利用 Dox 放出之螢光波長，利用共聚焦顯微鏡觀察 EGF-LipoDox 有無進入細胞內。細胞核染色則利用 DAPI 染劑。

四、細胞毒殺測試：Renca、A431、SKOV-ip1、BT474、MCF-7、MDA-MB-468 種於 96 孔盤 (5×10^3 細胞/孔) 並與不同濃度之 EGF-LipoDox、LipoDox 或 doxorubicin 培養 3 天。細胞的活性用 MTT 法測定。25 微升 MTT 溶液被添加到細胞中。2 小時後加入 0.1 毫升萃取緩衝液(20%十二烷基硫酸鈉 50%二甲基甲酰胺)。在 37°C 經過 4 小時後，使用 Plate Reader (Bio-Rad) 偵測光密度 (570nm)。

五、doxorubicin 在細胞中之累積： $10 \mu\text{M}$ 的 EGF-LipoDox 或 LipoDox 與 MDA-MB-468、MCF-7 乳癌細胞或正常乳腺細胞株 MCF-10 置於 96-well plate 中 (1×10^5 cells/well) 培養 30 分鐘後，培養液連同藥物被去除並將細胞以 PBS 溶液清洗 3 次，細胞溶解後 doxorubicin 之濃度以 485nm 激發光及 645nm 之釋放光譜以連續波長分析儀偵測。

六、小鼠毒性測試：雌性 balb/c 小鼠隨機分為 4 組，每組 2 只小鼠分別通過尾靜脈給予 EGF-LipoDox (1mg)，LipoDox (1mg)，doxorubicin (0.6mg)，或 PBS 等藥物。3 天後實驗老鼠被犧牲並取出肝臟、小腸、肺臟及心臟這些組織經

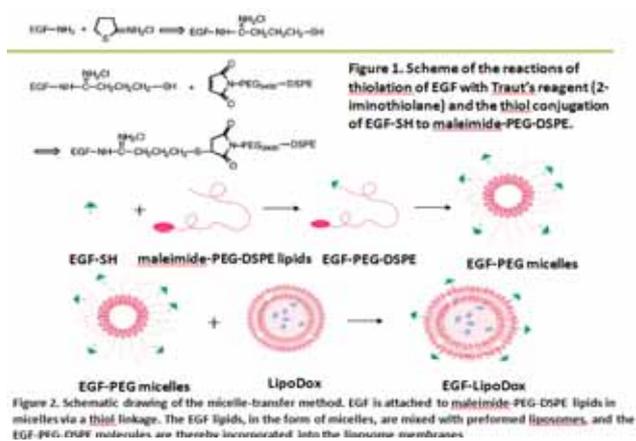
洗淨，用 10% 的固定甲醛，然後用石蠟和嵌入切片用蘇木精和伊紅染色（HE）後置於顯微鏡下觀察急毒性。而亞急毒性試驗之實驗老鼠則經由尾靜脈注射 EGF-LipoDox（1mg），LipoDox（1mg），doxorubicin（0.6mg），或 PBS 等藥物並於 14 天後被犧牲已取出器官。

參、主要發現與結論

一、我們已成功地純化表皮生長因子蛋白質



二、我們並以 EGF 結合 LipoDox 產生新分子 EGF-LipoDox。

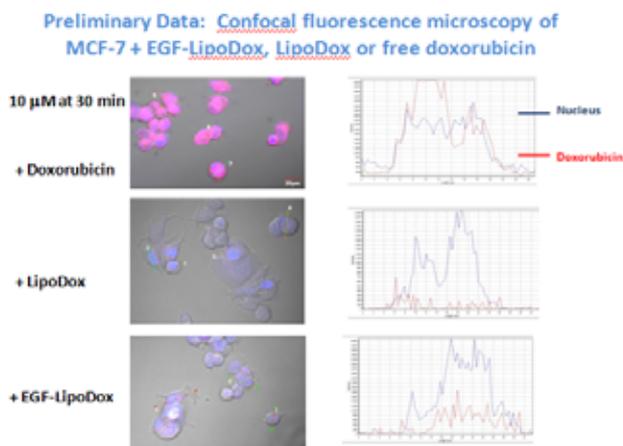
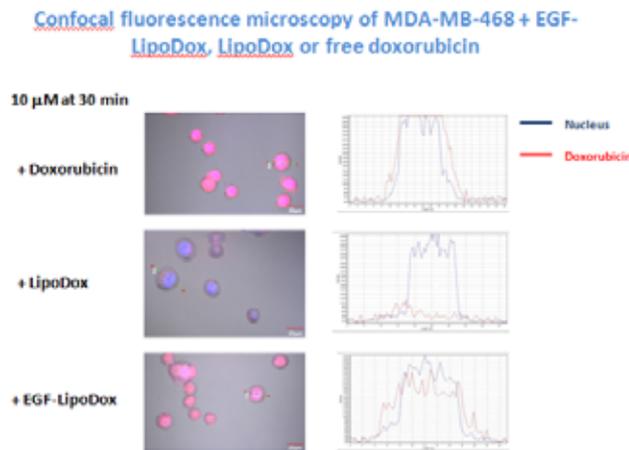
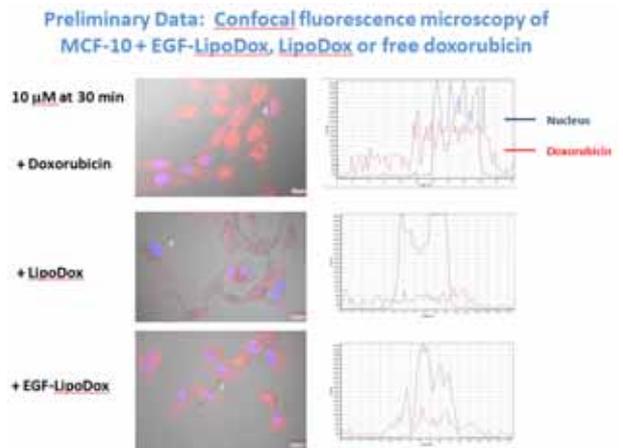


Quality control of EGF-LipoDox

EGF-LipoDox	
LipoDox (from TLC)	Doxisome (Pilot-15)
Particle size (nm)	144.5
Zeta potential (mV)	6.79
Phospholipid concentration (mmol/ml)	2.70
Volume (ml)	2
Doxorubicin concentration (mg/ml)	0.4
PEG to phospholipid molar ratio	6 %
pH	6~7
Clarity and color	Clear and red
Sterility	0.22µm filtered
EGF to phospholipid molar ratio	~

三、EGF-LipoDox 被證明能有效的結合表皮生長因子受體過度

表達之癌細胞並進入細胞核。如左圖中顯現化療藥 doxorubicin 可在 30 分鐘內迅速進入細胞核，也就是 doxorubicin 之作用目標 DNA 所在。



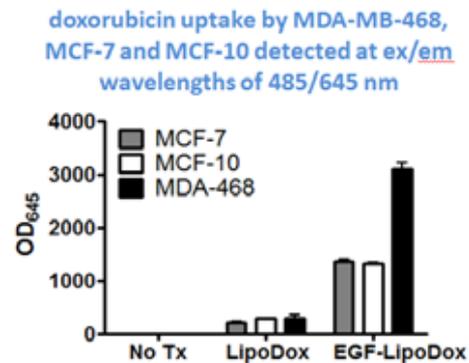
圖中共聚焦顯微鏡觀察可見染成藍色的細胞核與 doxorubicin 的紅色自體螢光重疊，然而，由於 LipoDox 中之 doxorubicin 無法快速釋出，所以只有很少數的 doxorubicin 紅色自體螢光進入細胞核。反之，EGF-LipoDox 與

表皮生長因子受體過度表達之 MDA-MB-468 乳癌細胞結

合，doxorubicin 的紅色自體螢光與染成藍色的細胞核呈現明顯重疊。利用表皮生長因子受體表達少的 MCF-7 乳癌細胞（前頁圖）及正常乳腺細胞株 MCF-10（上圖）進行相同實驗，EGF-LipoDox 比 LipoDox 並未顯現更明顯的 doxorubicin 細胞核內累積。因此，這些結果符合預期的 EGF-LipoDox 作用，也就是其對表皮生長因子受體過度表達之癌細胞，如 MDA-MB-468，較具專一性，而對表皮生長因子受體過度表達少之癌細胞或正常細胞較不專一毒性。

四、EGF-LipoDox 增加 doxorubicin 在表皮生長因子受體過度表達之癌細胞中之累積。

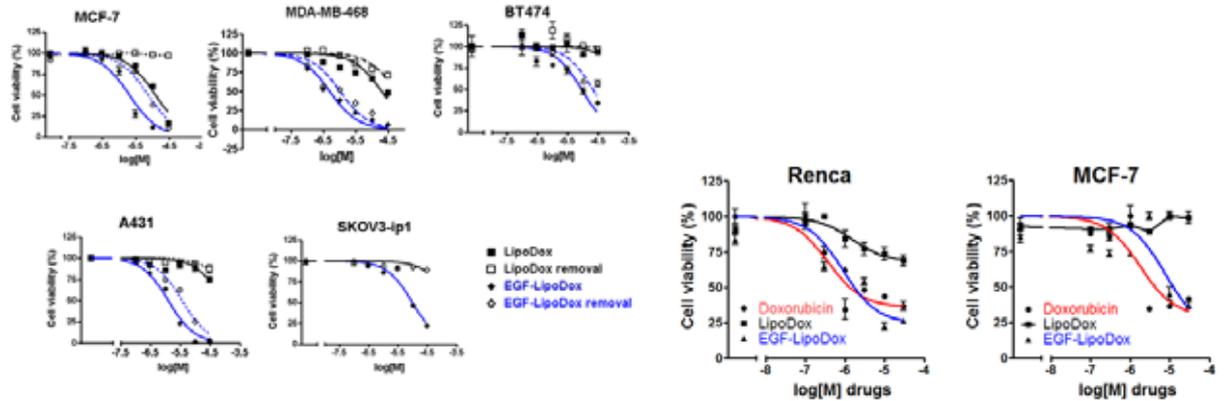
EGF-LipoDox 或 LipoDox 與 MDA-MB-468、MCF-7 乳癌細胞或正常乳腺細胞株 MCF-10 置於 6-well plate 中培養 30 分鐘後，培養液



連同藥物被去除並將細胞以 PBS 溶液清洗 3 次，細胞溶解後 doxorubicin 之濃度以 485nm 激發光及 645nm 之釋放光譜偵測。相較於 MCF-7 和 MCF-10，MDA-MB-468 當與 EGF-LipoDox 培養時可顯著吸收 doxorubicin。而此一現象在與 LipoDox 培養之實驗組並未發現。

五、EGF-LipoDox 有效地殺死癌細胞（MDA-MB-468, BT474, MCF-7, A431 及 SKOV-ip1）的濃度與 LipoDox 比較低於超過 10-100 倍(下圖左)。在表皮生長因子受體過度表達之癌

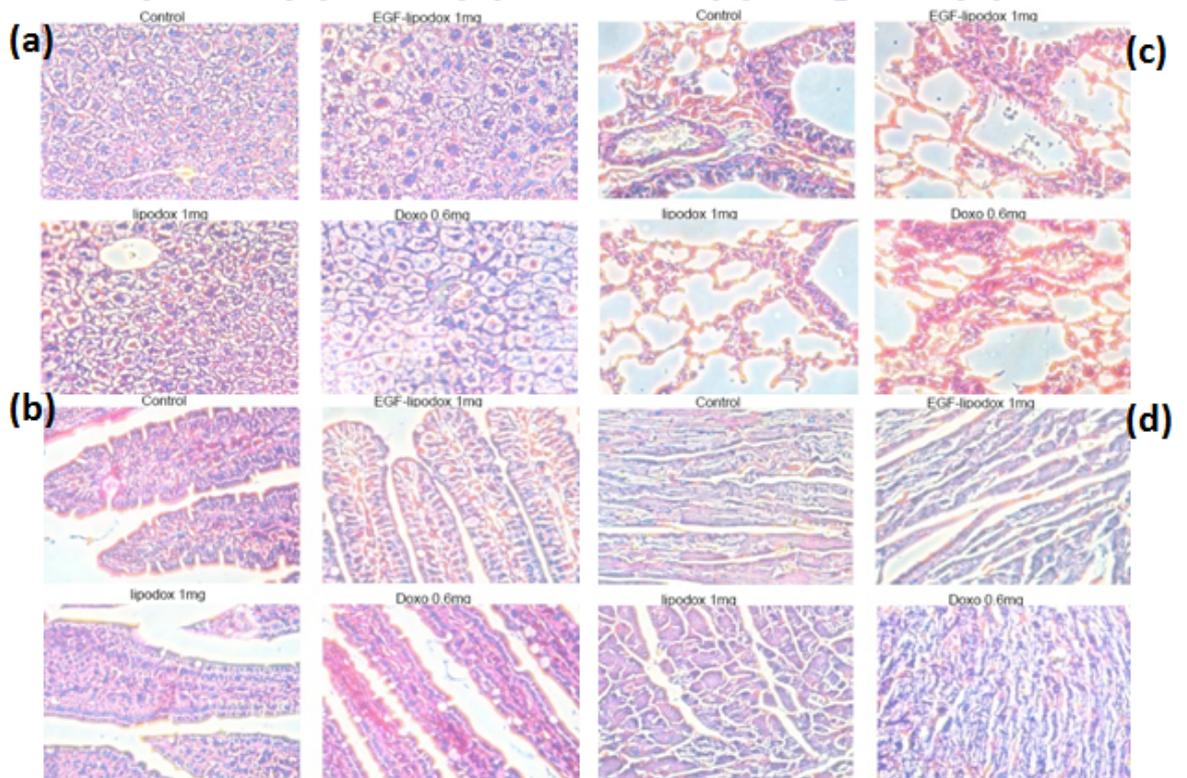
細胞 Renca 中，EGF-LipoDox 與 doxorubicin 具有類似的細胞毒殺效果，而在皮生長因子受體低表達之癌細胞 MCF-7 中並無此現象(下圖右)。



六、EGF-LipoDox 相較於 LipoDox 並未顯現較大之毒性

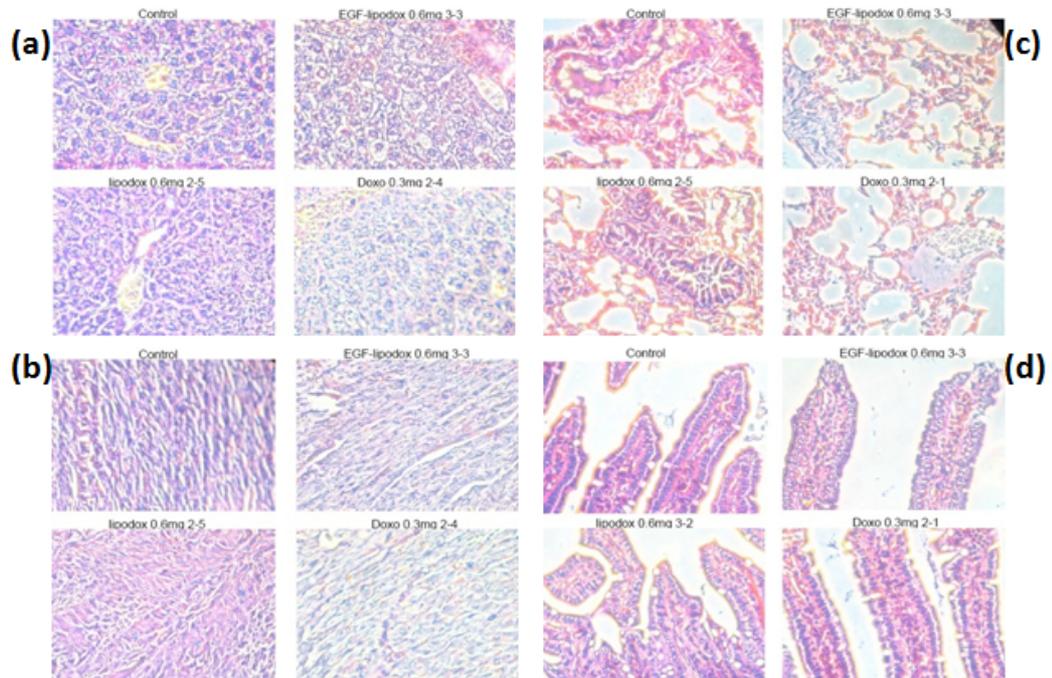
(一) 在急性毒理試驗中(下圖)，EGF-LipoDox (1mg)，LipoDox (1mg)，doxorubicin (0.6mg)，或 PBS 等藥物經由靜脈注射入實驗老鼠，3 天後實驗老鼠被犧牲並取出(a)肝臟、(b)小腸、(c)肺臟及(d)心臟。這些組織經切片及 HE 染色後置於顯微鏡下觀察。doxorubicin (0.6mg) 注射之實驗老鼠器官顯現明顯毒性變化，而 EGF-LipoDox (1mg)，LipoDox (1mg) 在所有器官切片中皆呈現類似的病理型態。

acute toxicity (3 days) of doxorubicin, LipoDox and EGF-LipoDox (a) Liver (b) intestine (c) lung and (d) heart



(二)在亞急性毒理試驗中(次頁圖)，EGF-LipoDox (0.6mg)，LipoDox (0.6mg)，doxorubicin (0.3mg)，或 PBS 等藥物經由靜脈注射入實驗老鼠，14 天後實驗老鼠被犧牲並取出(a)肝臟、(b)小腸、(c)肺臟及(d)心臟。這些組織經切片及 HE 染色後置於顯微鏡下觀察。doxorubicin (0.6mg) 注射之實驗老鼠器官顯現明顯毒性變化，而 EGF-LipoDox (1mg)，LipoDox(1mg) 在所有器官切片中皆呈現類似的病理型態。

subacute toxicity (2 weeks) of doxorubicin, LipoDox and EGF-LipoDox (a) Liver (b) intestine (c) lung and (d) heart



我們希望此一新製造新分子可對抗 EGF-EGFR 傳導路徑之癌症，透過細胞及未來活體動物實驗，了解此一新藥是否可增進 Re188-LipoDox 對抗腫瘤之專一性，同時減低對正常器官及組織之毒性。

肆、參考文獻

1. Mamot C, Rochlitz C. Targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR)--a new therapeutic option in oncology? *Swiss Med Wkly* 2006;136:4-12.
2. Gazdar AF. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1018-20.
3. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
4. Torchilin VP, Lukyanov AN. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discov Today* 2003;8:259-66.
5. Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol* 2006;24:39-47.
6. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 2008;26:57-64.
7. Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, Martin FJ, Hilger RA, Working PK. Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. *Semin Oncol* 2004;31:16-35.
8. Rivest V, Phivilay A, Julien C, et al. Novel liposomal formulation for targeted gene delivery. *Pharm Res* 2007;24:981-90.
9. Pirollo KF, Xu L, Chang EH. Immunoliposomes: a targeted delivery tool for cancer treatment. In: Curiel DT, ed. *Vector Targeting for Therapeutic Gene Delivery*; 2002.