

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

診斷腦腫瘤 In-111-Liposome 造影劑製備及應用

**Preparation and application of In-111-Liposome as a diagnostic
imaging agent for brain tumors**

計畫編號：992001INER075

受委託機關(構)：南台科技大學

計畫主持人：吳文海 教授

核研所聯絡人員：張志賢

聯絡電話：0958227352

E-mail address：wh0806@mail.stut.edu.tw

報告日期：99 年 11 月 30 日

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	1
壹、計畫緣起與目的.....	5
貳、研究方法與過程.....	8
一、微脂體之製備及純化.....	8
二、主動標靶型微脂體製備.....	8
(一)Liposome-MAL-GSH(Traut).....	8
(二)Liposome-MAL-RGD.....	9
(三)Liposome-MAL-RGD-GSH(Traut).....	9
三、細胞培養及動物模型建立.....	11
四、生物分佈.....	12
五、自動放射顯影術及蘇木伊紅染色.....	13
六、微單光子發射電腦斷層造影 (MICROSPECT/CT).....	15
參、主要發現與結論.....	16
一、微脂體粒徑及穩定度測試.....	16
二、主動標靶型微脂體製備.....	18
(一)Liposome-MAL-GSH(Traut)/RGD 接枝率測試.....	18
(二)Liposome-MAL-RGD-GSH(Traut)接枝率測試.....	20
三、完成放射性標誌奈米微脂體放射性試劑之動物實驗評估.....	21
四、結論.....	26
肆、參考文獻.....	27

中文摘要

以 RGD 胜肽接枝於微脂體，可使其對腫瘤細胞具有靶向性 (Targeting Liposome)。而以穀胱甘肽(glutathione,GSH)接枝於微脂體，可使微脂體通過血腦屏障(blood-brain barrier)，輸送至腦部釋放藥物。本研究製備以 PEG 長鏈修飾之微脂體，使其可提升微脂體保存穩定度及血液循環時間，由微脂體穩定度測試顯示，於 4℃ 冷藏保存 60 天，微脂體粒徑仍保持穩定。以 RGD 胜肽及穀胱甘肽分別接枝於微脂體表面，製備主動標靶型微體。由 BCA assay 測試得知 RGD 胜肽及穀胱甘肽於微脂體表面之接枝率，結果顯示 RGD 胜肽及穀胱甘肽成功接枝於微脂體表面，其接枝率分別為 10.96%及 16.94%。

將 RGD 胜肽及穀胱甘肽同時接枝於微脂體表面，可使微脂體具有腫瘤細胞靶向性及通過血腦屏障之能力，達到治療腦部腫瘤效果。本研究將 RGD 接枝之微脂體以穀胱甘肽進行改質，並以 BCA assay 測其接枝率，由測試結果顯示 RGD 接枝率為 11.23%，穀胱甘肽為 17.93%，證明 RGD 及穀胱甘肽同時接枝於微脂體表面。

以放射性造影劑標誌奈米微脂體之放射化學產率 (radio chemical yield; RCY) 大於 85%。透過組織解剖及 H&E 染色驗證，証實成功建立原位型 F344/F98 之腦神經膠質腫瘤動物模型 (glioma animal model)。奈米微脂體放射藥物經尾靜脈注入植有 F344/F98 腫瘤大白鼠，並於注射後 1、24 及 48 小時後進行生物分佈 (bio-

distribution; Bio-D)、自動放射照像 (autoradiography; ARG)、蘇木伊紅染色 (H&E stain) 及微單光子電腦斷層影像進行評估。生物分佈實驗結果顯示，腫瘤器官於放射性試劑之奈米微脂體注射後 24 小時有最高攝取量達 $1.75 \pm 0.12\%$ 。在自動放射照像和蘇木伊紅染色實驗結果顯示一致之清楚腫瘤形態及區域。同時，生物分佈和自動放射照像之 ROI (region of interest) 圈選半定量結果，皆分別呈現對此試劑有非常高之腫瘤／正常腦組織器官吸收比 (tumor-to-normal brain ratio) (注射後 24 小時之 ROI 分析達 29 倍)。微單光子電腦斷層影像亦於此試劑注射後 24 小時清楚呈現腫瘤之影像及形態。本計畫實驗結果証實，包覆放射性試劑之奈米微脂體呈現高腫瘤／正常腦組織之吸收比 (tumor-to-normal brain ratio)，並且透過微單光子電腦斷層儀 (mSPECT/CT) 得到清晰之腦腫瘤影像。由研究結果推測，此包覆放射性試劑之奈米微脂體之研究將非常具潛力進一步作為腦神經膠質瘤 (glioma) 之診斷性或療效性劑之開發。

關鍵字：微脂體；放射性造影劑；穀胱甘肽；RGD

Abstract

The PEG modified liposomes have a higher stereo stability and longer circulation time. Coupled with glutathione and RGD, the PEG modified liposome were shown to bind with great specificity to tumor tissue and the ability to transport across the blood-brain barrier.

In this study, the ligand glutathione and RGD were conjugated with PEG modified liposome. The resulting ligand coupling efficiency was 10.96% and 16.94% respectively by BCA assay. When glutathione and RGD were concurrently conjugated with PEG modified liposome, the ligand coupling efficiency was 11.23% for RGD and 17.93% for glutathione.

The radio-labelled liposome was administrated into the orthotopic F344/F98 brain glioma/animal model via tail vein. Biodistribution study, mircoSPECT/CT imaging, autoradiography and H&E staining were carried out at varying postinjection time points, 1, 24, and 48 h. The biodistribution study indicated a maximal brain tumor uptake at 1.75 ± 0.12 %ID/g at 24 h postinjection. Both of autoradiography and H&E staining showed a clear and correspondent tumor region. The microSPECT/CT imaging also revealed a most clear tumor image at 24 h postinjection. From ROI analysis, the tumor-to-normal brain uptake

could reach at 29 fold at 24 h postinjection. This work demonstrated that Radio-labeled liposome could display a high tumor-to-normal brain ratio uptake, indicating its potential as a diagnostic and therapeutic agent for brain glioma.

Keywords: Liposome; Glioblastoma multiforme ; RGD ;Glutathione

壹、計畫緣起與目的

神經膠質瘤 (glioma) 為腦部最常見的原發性神經系統性腫瘤，惡性的神經膠質瘤增長迅速往往導致高復發率及高死亡率。依據世界衛生組織 (WHO) 定義，其腫瘤惡性程度的高低可以分成四個等級 (Grade 1 — pilocytic astrocytoma; Grade 2 — astrocytoma; Grade 3 — anaplastic astrocytoma; Grade 4 — glioblastoma multiforme)。上述四個等級之中，又以第四級的多形性膠原母細胞瘤 (glioblastoma multiforme; GBM) 屬最具侵犯性之原發性腦腫瘤，具高分裂速度、腫瘤-正常組織邊緣浸潤及血管新生等現象[1]，因此，導致臨床上棘手的治療策略及預後。目前，臨床上最主要的治療方式包括手術切除再加上術後放射治療 (radiotherapy; RT) [2,3]，不幸的，目前上述的治療方式仍難以有效治療 GBM 之病患，臨床目前僅小於百分之五的病人有機會能被治愈[4,5]為改善 GBM 之療效情況及早期偵測等，有必要發展其新穎之 GBM 治療策略或治療模式。

奈米技術已廣泛使用於包括物理、化學、生物及醫學等。近年來，它在癌症診斷及治療上亦展現突出的成果。奈米粒子 (典型約於 20-120 奈米) 之所以能有效成功地被釋放至腫瘤處是因為奈米粒子對腫瘤之通透性增強及停滯效應 (enhanced permeability and retention effect (EPR effect))[6]及細胞的木馬屠城現象 (cellular Trojan Horse)。

以微脂體包覆藥物治療惡性腫瘤有下列三個優點:1.延長藥物在體內循環時間;2.增加藥物於腫瘤組織之累積量;3.以配位子(ligand)修飾微脂體，可使其具有功能性。使用 PEG 修飾微脂體，微脂體表面之 PEG 長鏈可提供立體障礙，減少調理素(oposonins)與微脂體作用，避免微脂體被網狀內皮系統(Reticuloendothelial system,RES)清除，增加藥物之體內循環時間，以及提升微脂體保存穩定性[7]。由文獻中可得知，腫瘤血管間隙(intercellular space)約為 500nm[8,9,10]，單層奈米微脂體(small unilamellar vesicles,SUV)粒徑約為 100nm 左右，可通過腫瘤血管間隙，增加微脂體於腫瘤組織之藥物累積量。RGD 胜肽對腫瘤血管內皮細胞(tumor vascular endothelial cells)表現之 $\alpha\beta3$ 結合素具有親和性，於微脂體表面接枝 RGD 胜肽製備主動標靶型微脂體(Targeting liposome)可增加微脂體對腫瘤細胞之選擇性，提升藥物累積量[11]。

腦部血管具有血腦屏障，由緊密連接(tight junction)之內皮細胞及基底膜(basement membrane)組成，其緊密結構可阻止大部分物質通過，只有水、葡萄糖、氧氣等小分子可通過。穀胱甘肽可與腦部血管之運送體結合通過血腦屏障[12]，若於微脂體表面接枝穀胱甘肽，可使微脂體攜帶藥物通過血腦屏障至腦部釋放。

因血腦屏障阻礙藥物以及藥物載體進入腦部組織，故現行藥物治療腦部腫瘤效果並不理想。本研究以 RGD 胜肽及穀胱甘肽同時接

枝於微脂體表面，使其具有腫瘤選擇性及血腦屏障穿透能力，以達到通過血腦屏障治療腦部腫瘤並提升治療效率之效果。

近幾年來，有許多放射性核種被用來與奈米微脂體進行標誌，其結果在核子醫學影像及放射治療上呈現有潛力發展之藥物型式。這些放射性核種包括有硼-10 (10B)，(氟-18) 18F, 銅-64 (64Cu)，鎳-67 (67Ga), 鉕-90 (90Y), 鎝-99m (99mTc)，銦-111 (111In)，鎢-177 (177Lu), 銑-186 (186Re)，銑-188 (188Re) and 225Ac 等，最近已被 Ting 及 Phillips 等人回顧及進行彙整[13,14]。

經過文獻的搜尋後，發現目前僅有少數研究針對放射性標誌奈米微脂體於腦部腫瘤進行評估。雖然有個案研究顯示利用放射性核種 (鎝-99m 及銦-111) 標誌奈米微脂體能顯示腫瘤正相關之結果並能得到可見得之腫瘤影像。然而，由於缺乏更多前臨床實驗資料及具有療效性核種的引入，目前仍難以研判此放射性標誌奈米微脂體是否具潛力在此領域繼續發展。在本研究中，將放射性標誌長循式奈米微脂體 (Radio-labeled Liposome) 並將此藥物施於原位型植入之腦神經膠質瘤動物腫瘤模型 (F344/F98)。藥物經尾靜脈注入後，其生物分佈、藥物動力學、自動放射照影 (腦部區域及全身)、蘇木伊紅染色及微單光子電腦斷層造影等項目將依序完成，以評估放射性標誌奈米微脂體藥物作為多形性膠原母細胞瘤診斷或療效性劑之可行性。

貳、研究方法與過程

一、微脂體之製備及純化

本研究以脂質薄膜水合法製備奈米微脂體[17]。製備方法為 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)，膽固醇 (Cholesterol)，1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-poly(ethyleneglycol) 2000(DSPE-PEG₂₀₀₀)，1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-poly(ethyleneglycol)3400-Maleimide(DPSE-PEG₃₄₀₀-MAL)以莫耳比 3:2:0.24:0.06 溶於氯仿中，以旋轉蒸發器將溶劑蒸發，使其在圓底燒瓶內壁形成脂雙層薄膜後，加入 5mM DTPA 水溶液，於 65°C 水浴中以手搖法獲得多層微脂體 (MLVs)，將多層微脂體進行凍融法 6 次。利用 LIPEX-10 擠壓機，以氮氣擠壓通過 200 nm，100 nm 和 50 nm 之聚碳酸酯(PC)薄膜，獲得單層微脂體(Liposome-MAL)。以 Sephadex G-50 管柱移除未包埋之 DTPA，由 ZetaSizer3000 測量微脂體粒徑，且利用 phosphorus assay 測得磷酸根濃度[18]。

二、主動標靶型微脂體製備

(一)Liposome-MAL-GSH(Traut)

本研究反應條件如表.1，實驗步驟為將 GSH(穀胱甘肽)及 Traut's reagent 溶於 pH 7.2 之 HEPES 緩衝溶液，再取 GSH 及 Traut's reagent 溶液(莫耳比 1:1)，通氮氣，於室溫下進行震盪反應 2 小時，反應完

成後，加入 Liposome-MAL 並通氮氣，於室溫下震盪反應 12 小時。
以 Sephadex G-50 管柱進行純化，以 BCA protein assay 分析
GSH(Traut)與 Liposome- MAL 鍵結率。

(二)Liposome-MAL-RGD

將 RGD 胜肽溶於 pH 7.2 之 HEPES 緩衝溶液，加入 Liposome
-MAL 並通氮氣，於室溫下震盪反應 12 小時。以 Sephadex G-50 管
柱進行純化，以 BCA protein assay 分析 RGD 與 Liposome- MAL 鍵
結率。

(三)Liposome-MAL-RGD-GSH(Traut)

將製備之 Liposome-MAL-RGD 溶液離心濃縮後，加入
Traut's reagent 改質之 GSH 並通氮氣，於室溫下震盪反應 12 小時。
以 Sephadex G-50 管柱進行純化，以 BCA protein assay 分析
GSH(Traut)與 Liposome - MAL-RGD 鍵結率。

Sample	Molar ratio	Reaction volume
GSH (stock 10 mg/ml)	1	10 μ l (\sim 325.7 nmole)
Traut's(2 mg/ml,14.5 mM)	1	23 μ l (\sim 325.7 nmole)
condition	RT,2hr	
RGD(stock 1 mg/ml)	0.25	47 μ l (81.4 nmole)
Liposome-MAL(phospholipid conc. \sim 21.65 μ mol/ml)	0.25	375.8 μ l (MAL \sim 81.4 nmole)
condition	RT,12hr	

表.1 反應條件

三、細胞培養及動物模型建立

F98 神經膠質瘤細胞利用 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培養液 (含 10%FBS 及 1%PS) 培養。準備細胞液 (並置於 HBSS without Ca^{2+} , Mg^{2+} 培養液中) 置於 4°C 冰浴, 待進行腦腫瘤植入用。腦腫瘤植入手術進行之前, 先以 Isoflurane 進行誘導性麻醉, 並以腹腔注射 Zoletil[®] 麻醉劑做深度麻醉 (50-75 mg/kg body weight), 待老鼠昏迷後將其頭部毛髮剔除, 再將其固定至立體定位架準備進行手術。首先利用優碘將老鼠頭皮消毒, 以兩耳連線及鼠體中線之交點為中心軸縱向剪開約一公分, 刮淨頭骨上皮膜後, 在頭部人字縫之前 5 mm 及中線右邊 3 mm 交點處, 以電鑽鑽出直徑約 1 mm 之小洞, 取細胞液 10 μl (含 2×10^5 細胞) 在 5 mm 深度處注射 (速率為 3 $\mu\text{l}/\text{min}$), 注射完後等待兩分鐘後才取出注射針 (以緩慢速率抽針; 約維持 2 分鐘), 以骨蠟密封小孔, 將傷口以優碘消毒, 用縫線將頭縫合。腫瘤細胞植入後 12 天, 將投與藥物進行各種動物實驗評估。

四、生物分佈

「Fischer/F98」原位型植入神經膠質瘤大鼠模型將用於進行 Radio-labeled Liposome 之生物分佈評估。首先，先將腦瘤模型老鼠（腫瘤細胞植入後第 12 天）分別分成 3 個群組。每隻老鼠將分別施予尾靜脈（i.v.）注射放射性標誌微脂體（~14.8 MBq）。接著，於藥物注射後 1、24 及 48 小時以過量之二氧化碳（CO₂）犧牲並取其組織器官，包括：左腦正常組織、腫瘤、心、肝、脾、肺、腎、胰、小腸、大腸、睪丸、肌肉、皮毛及血液等於試管中，隨後利用自動加馬射線偵檢器（2480 WIZARD2TM Automatic Gamma Counters; PerkinElmer, USA）進行放射線計數及定量分析。最終組織器官之放射活度生物分佈以每克器官重之百分注射放射藥物強度為單位（%ID/g）表示。

五、自動放射顯影術及蘇木伊紅染色

自動放射顯影術 (autoradiography) [19]及蘇木伊紅染色 (H&E stain) 方法[20]係參考自文獻。與生物分佈實驗相似，原位型植入神經膠質瘤大鼠模型 (Fischer/F98) 分別施予尾靜脈注射放射性標誌微脂體 (~44 MBq)。並分別於藥物注射後 1、24 及 48 小時以過量之二氧化碳 (CO₂) 犧牲，並取下全腦組織。其腦組織與鋁泊容器內之包埋膠 (optimal cutting temperature; OCT) 一同處以乾冰 (dry ice) 預冷；接著，將腦組織小心插入半凝之包埋膠內，固定後先放置 -20°C 冷凍 1 小時再轉往放至冷凍切片機台內 (CM3050, Leica, Bensheim, Germany) 準備進行切片。以冠狀 (coronal section) 切面進行切片並控制其厚度在 20 μm。為了能同時比對自動放射顯影 (autoradiography) 及蘇木伊紅 (H&E) 之影像，其相鄰之兩片切片樣品 (back-to-back) 將分別用於進行自動放射顯影及蘇木伊紅染色之實驗。蘇木伊紅染色實驗方法係根據 Sigma-Aldrich® 之操作程序進行。自動放射顯影部份，先將切片樣品放置影像板 (imaging plates; IPs; BAS-SR2040, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) 上，並將片闌 (cassette; 2040, Fuji Photo Film) 關上，使之暴射 3 天時間。隨後，將 IPs 板利用 FLA5100 讀取機 (Fuji Photo Film) 進行影像讀取，其參數設定如下：解析度 = 25 μm、梯度 = 32 位元以截取影像。另外，

利用 ROI 分析 (region of interest; ROI) 進行腫瘤及正常腦組織吸收之半定量分析。其圈選部份分為「腫瘤區域」、「左腦正常組織區域」及「背景值區域」, 並利用 Image Gauge (version 3.0, Science Lab 2004, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) 軟體予以計算單位面積下之光通量密度 (intensity of photo-stimulated luminescence; PSL-BG/mm²)。

六、微單光子發射電腦斷層造影 (microSPECT/CT)

微單光子電腦斷層影像係使用微單光子電腦斷層掃描儀 (X-SPECT, Gamma, Medica, Northridge, CA, USA) 造影得之。原位型植入神經膠質瘤大鼠模型 (Fischer/F98) 分別施予尾靜脈注射銻-188-BMEDA-Liposome (~300 MBq)。接著，老鼠分別於注射 1、24 及 48 小時後進行 microSPECT/CT 腦部腫瘤造影。造影先以電腦斷層掃描後，隨即進行 SPECT 造影。造影完畢後，以 COBRA 軟體進行電腦斷層 (CT) 影像重建、Luma GEM 軟體用以 SPECT 影像重建，IDL 6.0 軟體則用以進行 SPECT/CT 影像融合處理。

參、主要發現與結論

一、微脂體粒徑及穩定度測試

本研究以 DSPC，Cholesterol，DSPE-PEG₂₀₀₀ 及 DSPE-PEG₃₄₀₀-MAL 製備之 PEG 修飾微脂體(pegylated liposome)粒徑為 82.4nm (如圖.1)。微脂體之磷脂質濃度可由磷含量分析(phosphorous assay)獲得，由磷酸分析標準曲線(如圖.2)計算可得磷脂質濃度，經水合、擠壓、管柱純化、薄膜離心後製得之微脂體，磷脂質濃度為 21.65 μ mol/ml。

PEG 長鏈可提供微脂體立體障礙，使其不易因碰撞而產生融合或聚集。將 PEG 修飾之微脂體儲存於 4 環境下 60 天，觀察其粒徑變化，發現粒徑由 82.4nm 增至 96.2nm(如圖.3)，粒徑變化不大，證明以 PEG 修飾微脂體可有效提升微脂體保存期限。

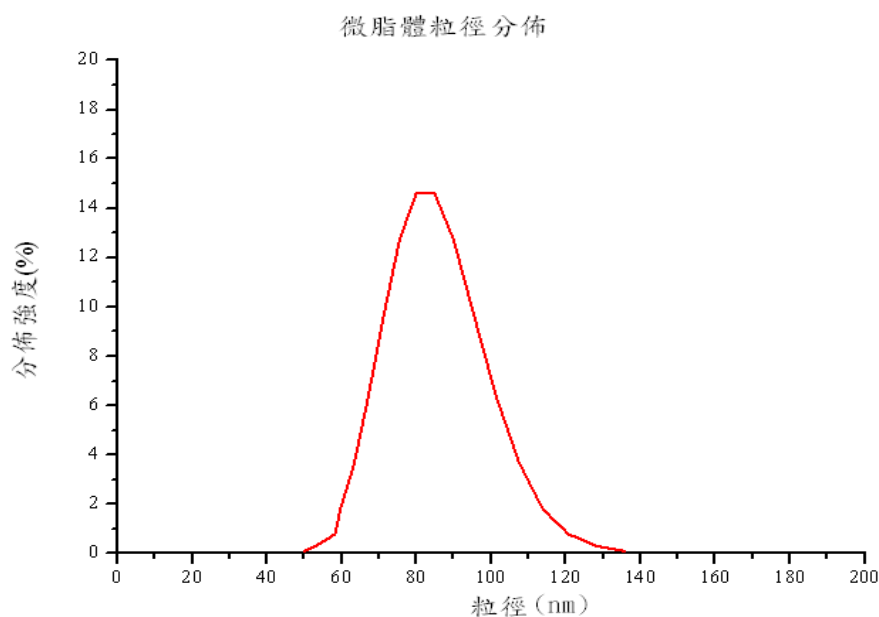


圖 1：微脂體粒徑分佈

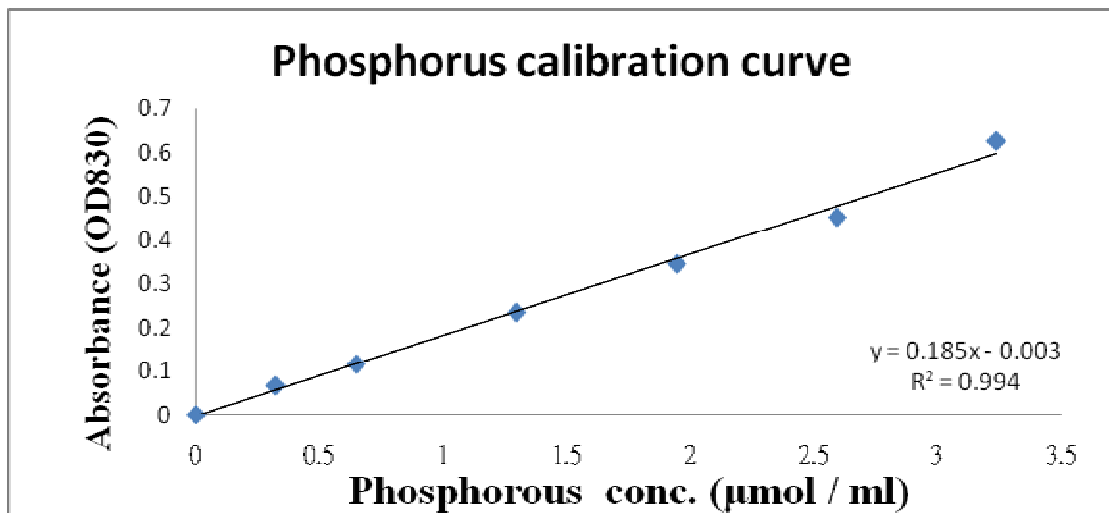


圖.2：磷含量分析標準曲線

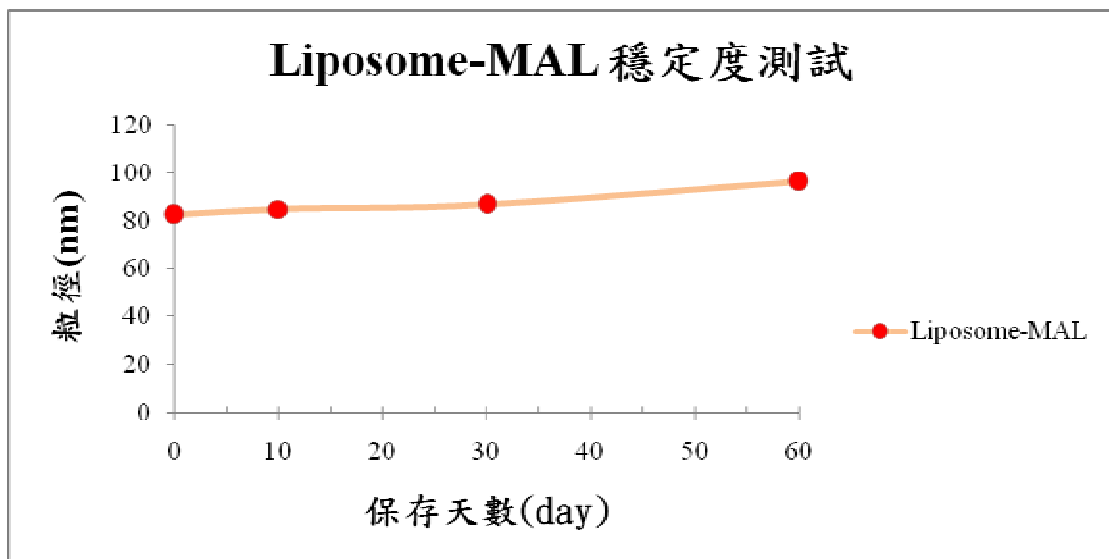


圖.3：微脂體穩定度測試

二、主動標靶型微脂體製備

(一)Liposome-MAL-GSH(Traut)/RGD 接枝率測試

將 GSH(以 Traut's reagent 改質後)/RGD 與 Liposome-MAL 通氮氣後，於室溫下震盪反應 12 小時後，以 BCA assay 測試其接枝率，並測量微脂體粒徑變化。

接枝率計算公式為：接枝效率(%) = $C_2/C_1 \times 100\%$

C_1 = GSH(Traut)/RGD 之添加濃度

C_2 = Liposome-MAL-GSH(Traut)/Liposome-MAL-RGD 吸收度減掉

Liposome-MAL 吸收度 即為接枝於 Liposome-MAL 上之 GSH(Traut)/RGD 吸收度，帶入 GSH(Traut)/RGD 濃度曲線公式中求出接枝之 GSH(Traut)/RGD 濃度。

由 BCA 測試可得知，經過 Sephadex G-50 管柱層析分離後，Liposome-MAL 及接枝後之 Liposome-MAL-GSH(Traut)/Liposome-MAL-RGD 其吸收度出現在 7~12 管，而 GSH(Traut)吸收度出現於 17~27 管，RGD 吸收度出現於 19~29 管，由 Liposome-MAL 接上 GSH(Traut)/RGD 後吸收度增加，以及 GSH(Traut)/RGD 於反應後吸收度下降(如圖.4,圖.5)，可證明 GSH(Traut)/RGD 接枝於微脂體表面使得 GSH(Traut)/RGD 濃度降低，而 Liposome-MAL 之吸收度提高。

由接枝率公式計算可得出 GSH(Traut)之接枝率為 16.94%，RGD 之接枝率為 10.96%。而測量 Liposome-MAL 接枝前後之粒徑變化可

得知，GSH(Traut)接枝前粒徑為 89.1nm，接枝後為 94.3nm，RGD接枝前粒徑為 91.4nm，接枝後為 94.4nm(如表.2)，此因GSH(Traut)/RGD 接枝於 Liposome-MAL 表面，使得 Liposome-MAL 粒徑增加。

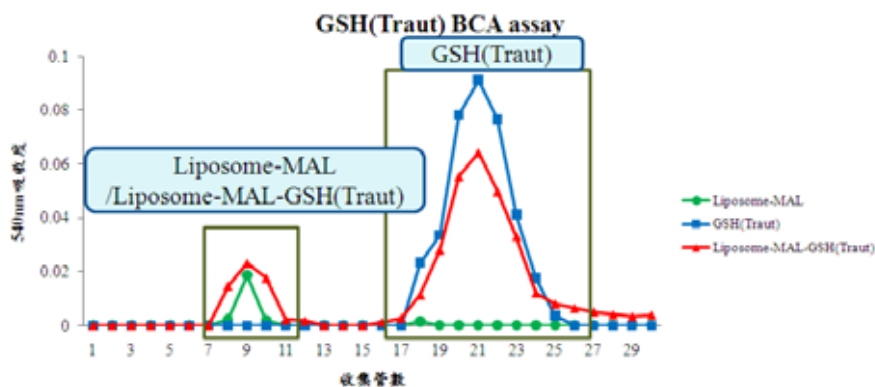


圖.4：BCA assay of Liposome-MAL-GSH(Traut)

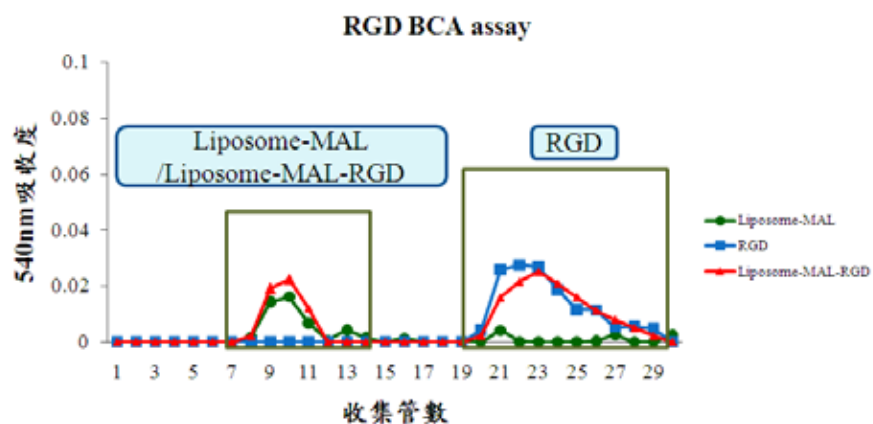


圖.5：BCA assay of Liposome-MAL-RGD

Sample	粒徑(nm)
Liposome-MAL	89.1
Liposome-MAL-GSH(Traut)	94.3
Liposome-MAL	91.4
Liposome-MAL-RGD	94.4

表.2：Liposome-MAL 接枝 GSH(Traut)/RGD 前後之粒徑比較

(二)Liposome-MAL-RGD-GSH(Traut)接枝率測試

將 GSH(以 Traut's reagent 改質後)加入 Liposome-MAL-RGD 並通氮氣後，於室溫下反應 12 小時後，以 BCA assay 測試其接枝率，其中 Liposome-MAL-RGD 已由 BCA assay 測定其接枝率為 11.23% (如圖.6)。GSH(Traut)與 Liposome-MAL-RGD 反應後，以 BCA assay 測定其接枝率為 17.93%(如圖.7)。由 BCA assay 結果可證明 RGD 及 GSH(Traut)均接枝於微脂體表面，且接枝率與單獨接枝於微脂體表面並無明顯不同。

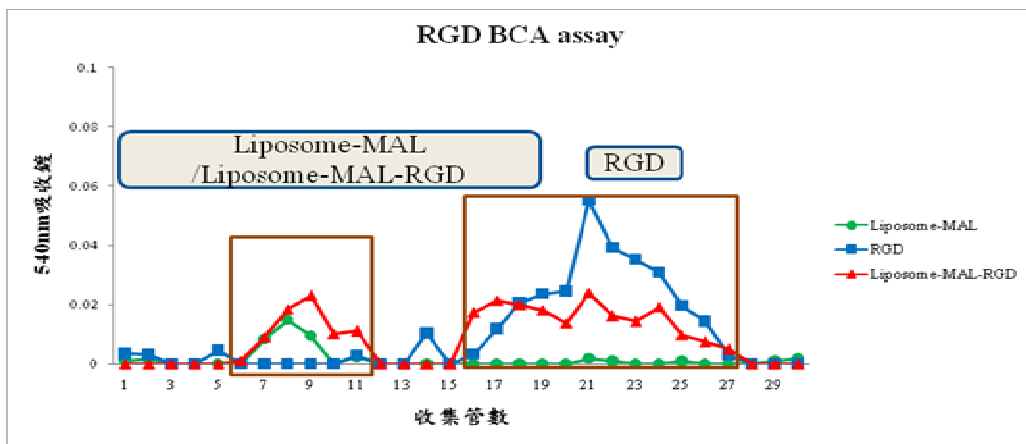


圖.6：BCA assay of Liposome-MAL-RGD

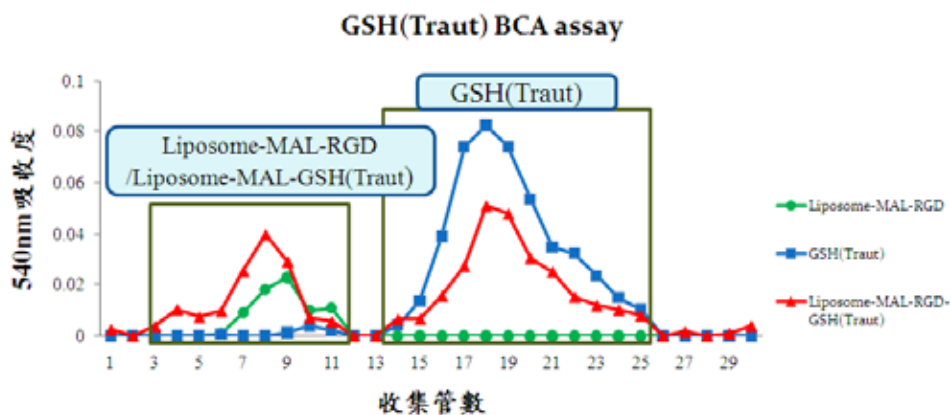


圖.7：BCA assay of Liposome-MAL-RGD-GSH(Traut)

三、完成放射性標誌奈米微脂體放射性試劑之動物實驗評估

放射性標誌奈米微脂體放射性試劑經尾靜脈注入老鼠體內後，以犧牲老鼠後選取不同器官並測定放射性活度，完成此試劑之活體生物分佈評估。透過動物實驗完成多項之生物分佈及影像評估，其項目如下所示：

- I. 完成 *in vivo* 生物分佈評估
- II. 完成 *ex vivo* 腦部區域自動放射照像評估
- III. 完成 *ex vivo* 全身自動放射照像評估
- IV. 完成 *ex vivo* 自動放射照像 ROI 圈選半定量評估
- V. 完成 *in vivo* 微單光子電腦斷層造影評估

放射性標誌奈米微脂體經尾靜脈注入老鼠體內後，以犧牲老鼠後選取不同器官加以定量量測放射性活度，完成此試劑之活體生物分佈評估。如表.3 所示，生物分佈呈現長循環特性，主要原因為奈米粒子表面修飾聚乙二醇 (polyethylene glycol) 之親水特性有關，將使得變得不易被血清中的調理素 (opsonin) 蛋白辨識，絕大部份逃過網狀內皮系統 (Reticuloendothelial system; RES) 之捕獲。腦腫瘤區域於此試劑注入後 24 小時達累積之最高量 $1.75\pm 0.12\%$ 。非靶器官中，以肝、脾之器官為累積之最高量，分別為 $2.02\pm 1.06\%$ (肝；注入後 24 小時) 及 $27.44\pm 4.61\%$ (脾；注入後 48 小時)。其它在胃

及小腸等器官，隨著時間增長而增加此試劑之累積現象，推測與此奈米藥物之生理代謝途徑有關。另外，在腦腫瘤與正常腦組織之吸收比 (tumor-to-normal brain ratio) (如圖.8 所示)，在 24 小時可達 29 倍，在 48 小時可達最高之 37 倍，顯示此試劑之高度專一性，將有潛力作為診斷或療效劑之開發。

Organ	Uptake (%ID/g)		
	1 hr	24 hr	48 hr
Whole blood	5.96±0.95	2.21±0.69	1.23±0.21
Muscle	0.04±0.01	0.03±0.01	0.06±0.01
Testis	0.08±0.01	0.13±0.01	0.16±0.03
Pancreas	0.40±0.00	0.29±0.08	0.33±0.11
Stomach	0.29±0.05	0.39±0.26	0.59±0.04
S-intestine	0.43±0.04	1.46±0.12	1.84±0.33
L-intestine	0.17±0.03	0.26±0.04	0.48±0.11
Kidney	1.33±0.20	2.69±1.14	5.07±0.64
Spleen	3.50±0.46	21.83±2.14	27.44±4.61
Liver	1.78±0.42	2.02±1.06	1.98±0.04
Lung	1.39±0.20	0.69±0.29	0.56±0.05
Heart	0.74±0.07	0.41±0.08	0.34±0.04
Normal brain	0.08±0.03	0.06±0.02	0.05±0.01
Tumor	0.28±0.09	1.75±0.12	1.25±0.58
Tumor/Brain	3.50	29.17	37.20

表 3: Radio-labeled-Liposome 試劑在植有 Fischer/F98 orthotopic glioma 大白鼠之生物分佈結果

透過 *ex vivo* 之自動放射照像 (autoradiography) 實驗，顯示放射性標誌奈米微脂體於腦腫瘤區域呈高度專一性之累積特性 (high tumor-to-normal ratio)，腦部 autoradiography 影像清晰呈現此試劑累積於腫瘤部位 (如圖.9 所示)，而相對於腫瘤位置，正常腦組織僅有非常低之攝取量。另外，透過蘇木伊紅染色 (H&E stain) 結果，能清楚對照其腫瘤及正常腦組織之形態及區域。利用 autoradiography 影像進行之 ROI (region of interest) 圈選，以進行藥物於腦腫瘤及正常腦組織之累積半定量測定 (如圖.10 所示)。結果與動物之生物分佈相似；其最高之腫瘤累積量為此試劑注射後 24 小時，而從 24 小時後逐步降低。同樣地，放射性標誌奈米微脂體放射藥物於注射後 48 小時達最高之腫瘤對正常腦組織吸收比 36 倍。透過微單光子電腦斷層儀 (mSPECT/CT) 進行大鼠腦部區域之造影，能清楚顯示腦腫瘤區域之影像 (如圖.11 所示)。放射性標誌奈米微脂體注射 24 小時後，能有最佳之腫瘤影像。主要由於 Radio-labeled Liposome 透過促進性滲透與滯留效應 (Enhanced permeability and retention effect) 專一性累積於腫瘤位置。

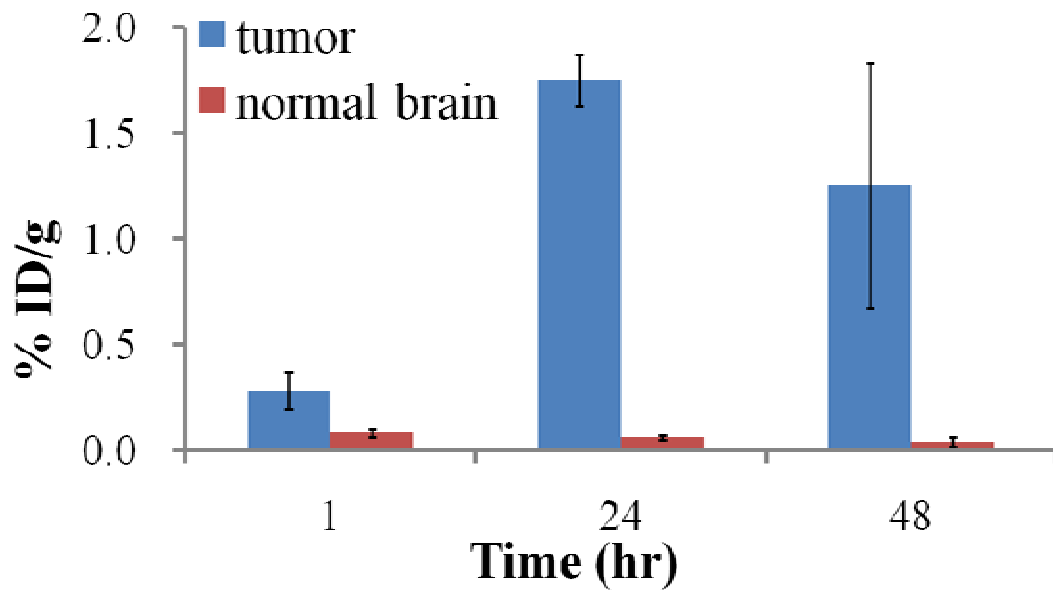


圖.8：Radio-labelde-Liposome 於腦腫瘤及正常腦組織之吸收比 (tumor-to-normal ratio)。

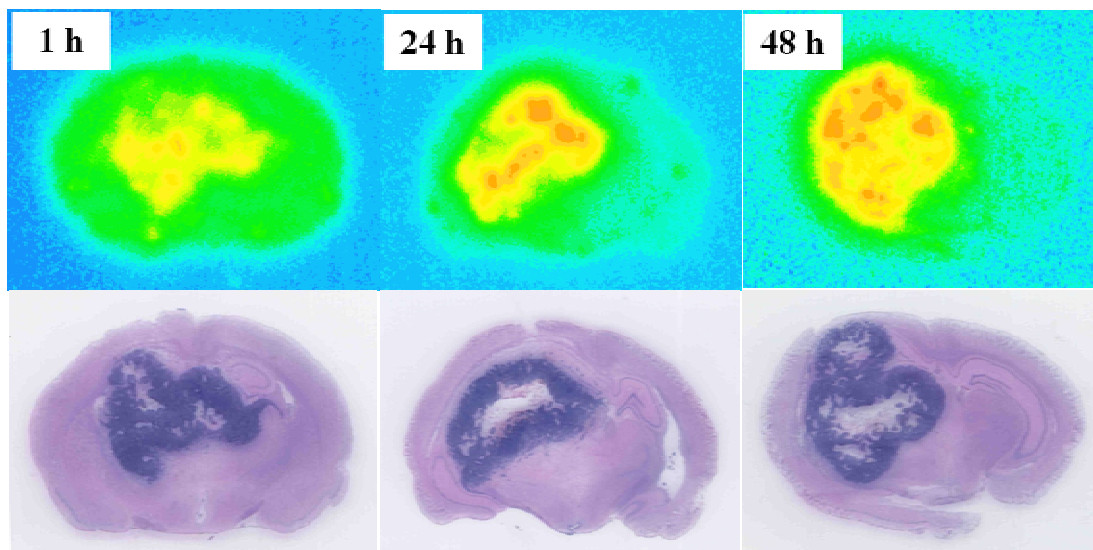


圖.9：放射性標誌奈米微脂體放射性試劑於腦部分佈之 ex vivo 自動放射照像 (autoradiography) 及蘇木伊紅染色 (H&E stain)，顯像其腫瘤及正常腦組織形態。

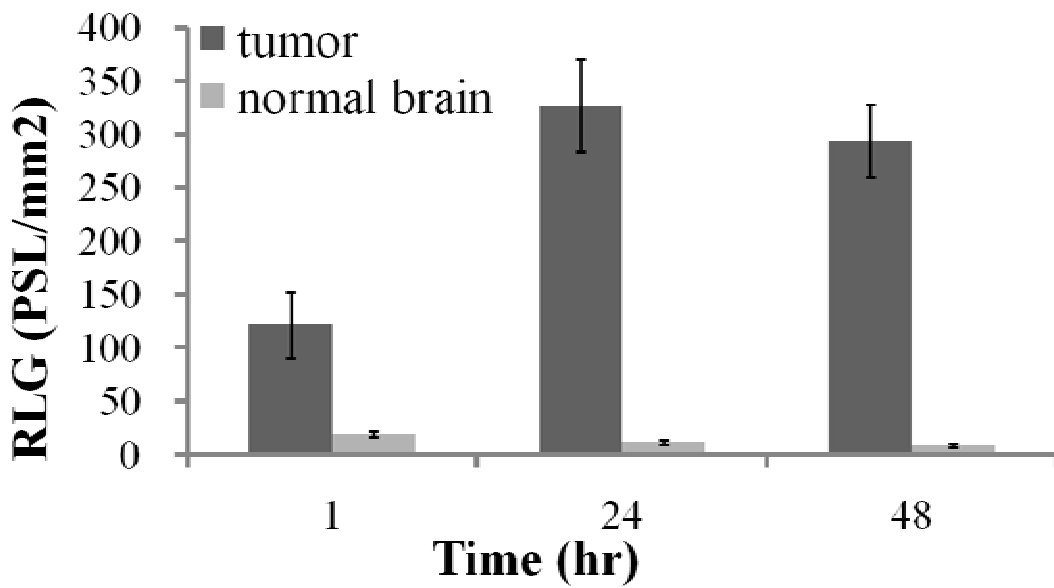


圖.10: 利用 Radio-labeled-Liposom autoradiography 影像之 ROI (region of interest) 圈選，進行腦腫瘤及正常腦組織之累積半定量測定。

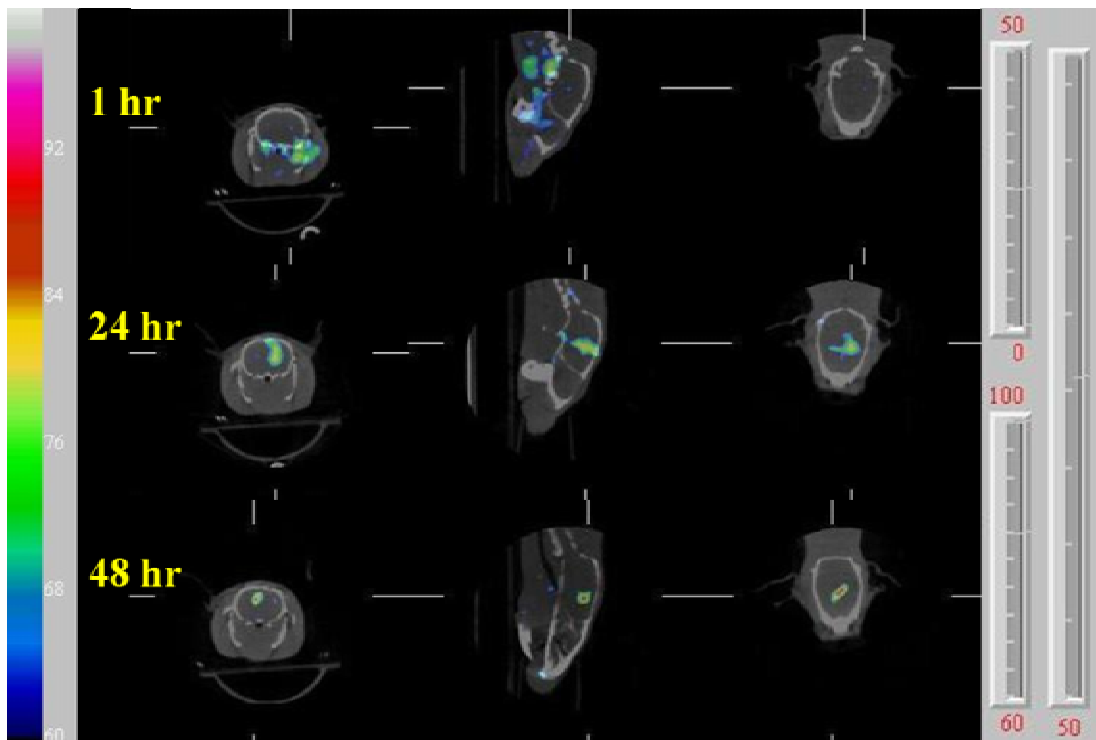


圖.11: 放射性標誌奈米微脂體放射藥物經尾靜脈注射後 1、24 及 48 小時之腦部區域微單光子電腦斷層 (mSPECT/CT) 影像。注射放射性活度為 7 mCi。

四、結論

- (一)製備之 PEG 修飾微脂體平均粒徑為 82.4nm，微脂體於 4°C 保存 60 天後，其粒徑為 96.2nm，粒徑變化不大。
- (二)由 BCA assay 判斷 RGD 及 GSH(Traut)成功接枝於微脂體上，RGD 接枝率為 10.96%，且微脂體粒徑由 91.4nm 增至 94.4nm。GSH (Traut)接枝率為 16.94%。且微脂體粒徑由 89.1nm 增至 94.3nm。
- (三)將 Liposome-MAL-RGD 與 GSH(Traut)反應 12 小時，並以 BCA assay 測其接枝率，證明 RGD 與 GSH(Traut)同時接枝於微脂體表面，其接枝率分別為 11.23%、17.93%。以 RGD 及 GSH(Traut)接枝之微脂體可應用於腦部腫瘤治療之主動標靶型載體。
- (四)放射性標誌奈米微脂體 (Radio-labeled-Liposome) 能展現高腫瘤／正常腦組織之吸收比 (tumor-to-normal brain ratio)，並透過微單光子電腦斷層儀 (mSPECT/CT) 能清楚看見腦部腫瘤影像。由研究結果顯示，此試劑之研究具有潛力進一步作為腦神經膠質瘤 (glioma) 之診斷性或療效性劑之開發。

肆、参考文献

1. Mathieu D, Lecomete R, Tsanaclis AM, Larouche A, Fortin D. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can. J. Neurol. Sci* 2007; 34: 296-306.
2. Raizer JJ. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J. Neuro-Oncol* 2005; 74: 77-86.
3. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* 2009; 16: 748-754.
4. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* 2005;5:161-171.
5. Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak E, Werner-Wasik M, Lustig R. et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of radioation therapy oncology group 93-05 protocol. *J Radiation Oncology Biol Phys* 2004;60: 853-860.
6. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y and Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000; 64:271-284.
7. Gabriele Blume, Gregor Cevc. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bio membranes* Volume 1029, Issue 1, 2 November 1990, Pages 91-97.
8. G.Lawton, P.M. Paciorek and J.F. Waterfall, The design and biological profile of ACE inhibitors, *Adv. Drug Res.* 23 (1992), pp. 161–220.
9. Rejmanova, P., Kopacek, J., Pohl, J., Baudys, M., and Kostka, V.,

- Polymers containing enzymatically degradable bonds, 8, Degradation of oligopeptide sequences in N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by bovine spleen cathepsin, *B. Macromol. Chem.*, 184, 2009–2020, 1983.
10. Duncan R., Cable H.C., Lloyd J.B., Rejmanova P., Kopacek J. Polymers containing enzymatically degradable bonds, 7. Design of oligopeptide side chains in poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] copolymers to promote efficient degradation by lysosomal enzymes. *Makromol Chem.* 1984;184:1997–2008.
 11. Nallamothe R, Wood GC, Pattillo CB, Scott RC, Kiani MF, Moore BM, Thoma LA. A Tumor Vasculature Targeted Liposome Delivery System for Combretastatin A4: Design, Characterization, and In Vitro Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2006; 7(2): Article 32.
 12. R Kannan, J F Kuhlenkamp, E Jeandidier, H Trinh, M Ookhtens, N Kaplowitz. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J Clin Invest.* 1990 June; 85(6): 2009–2013.
 13. Ting G, Chang CH and Wang HE. Cancer Nanotargeted Radiopharmaceuticals for Tumor Imaging and Therapy. *ANTICANCER RESEARCH* 29: 4107-4118 (2009)
 14. Phillips WT, Goins BA and Bao A. Radioactive liposomes. *Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2009;1:69-83.
 15. Bao A, Goins B, Klipper R, Negrete G, Phillips WT. ¹⁸⁶Re-liposome labeling using ¹⁸⁶Re-SNS/S complexes: in vitro stability, imaging, and biodistribution in rats. *J Nucl Med* 2003; 44:1992–9.

16. Chen LC, Chang CH, Yu CY, Chang YJ, Hsu WC, Ho CL, Yeh CH, Luo TY, Lee TW, Ting G. Biodistribution, pharmacokinetics and imaging of ¹⁸⁸Re-BMEDA-labeled pegylated liposomes after intraperitoneal injection in a C26 colon carcinoma ascites mouse model. *Nucl. Med. Biol.* 2007; 34: 415-423.
17. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., and Cullis, P. R. / Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta*, 812 (1985): 55–65.
18. Bartlett GC. Phosphorus assay in column chromatography. *Scripps Clinic and Research Foundation*. 1958; 234: 466-468.
19. Chow TH, Lin YY, Huang JJ, Wang HE et al. Diagnostic and therapeutic evaluation of ¹¹¹In-vinorelbine-liposomes in a human colorectal carcinoma HT-29/luc-bearing animal model. *Nucl Med Biol* 2008; 35: 623-634.
20. Chang YJ, Chang CH, Yu CY, Chang TJ, Chen LC, Chen MH, Lee TW, Ting G. *Nucl. Med. Biol.* 37: 95-104 (2010).