


# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

新陽離子型 poly(urethane-co-ethylenimine)之合成及其  
質子海綿效應與高分子/DNA 奈米複合體基因轉染效率關係  
之研究(重點研究計畫)  
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2221-E-041-015-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：嘉南藥理科技大學醫藥化學系

計畫主持人：蕭明達  
共同主持人：程中玉  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：黃鐘謀、高浩哲  
共同主持人：程中玉



處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96 年 09 月 28 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 95-2221-E-041-015

執行期限：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

主持人：蕭明達 嘉南藥理科技大學醫藥化學系

共同主持人：程中玉 中正大學化學暨生物化學系

計畫參與人員：黃鐘謀 中正大學化學暨生物化學系

高浩哲 中正大學化學暨生物化學系

### 一、中文摘要

本研究室先前已開發出低細胞毒性且水可溶蝕之陽離子型聚胺基甲酸酯系統 (PUs)，此系統之基因載體雖有優異之性質，但其轉染效率仍有改善之空間。為了保存陽離子型 PU 之既有優點及提升其轉染效率，本研究計畫合成出含低分子量 PEI 之陽離子型 PU 系統 Poly(urethane-co-ethylenimine)，並研究其在基因轉染方面之各種性質，已完成之部份如下：合成新穎陽離子型 PU 系統 Poly(urethane-co-ethylenimine)、仿生溶液之裂解分析、緩衝能力測試、細胞毒性測試、高分子/DNA 複合體之粒徑及表面電位分析、體外轉染效率評估。

**關鍵詞：**聚胺基甲酸酯，轉染，基因載體，緩衝能力

### Abstract:

The goal of this project is to design and synthesize a biodegradable cationic Poly(urethane-co-ethylenimine) with low cytotoxicity and high transfection efficiency. Works of this project have been carried out as following items: synthesis of novel cationic Poly(urethane-co-ethylenimine), hydrolytic degradation of polymer, buffering capacity, evaluation of cytotoxicity, hydrodynamic diameter and surface charge density of polymer/DNA complex, transfection efficiency in vitro.

**Keywords:** Polyurethane; Transfection; Gene vector; Buffering capacity.

### 二、緣由與目的

基因治療 (Gene therapy) 是指使用分子生物學中 DNA 重組及轉染

(transfection) 的技術，將重組的 DNA 分子傳遞至一個生物體的細胞內，把帶有遺傳性、新陳代謝或癌症等致病基因加以修補或置換，使其恢復正常功能，或藉輸入重組的正常基因來代替已喪失功能的基因，以製造必要之產物，然而此技術最重要的關鍵是如何將所需的基因傳遞到適當的人體組織細胞中。一般用於傳遞基因的載體可分為兩大類：病毒性載體 (viral carrier)，及非病毒性載體 (non-viral carrier)

1. 病毒性載體: 主要是利用具複製能力且經過改良而被抑制的病毒外殼，攜帶有治療目的的 DNA 至體內。以病毒為主的載體來傳遞 DNA 是目前最有效的攜帶方式，因此病毒性載體在基因治療上被廣泛的應用和研究，如反轉錄病毒

(Retrovirus)、腺病毒 (Adenovirus)、及 Adeno-Associated virus (AAV)。然而其多變的轉染效力、有毒性及引發免疫反應等缺點，限制了病毒性載體的應用層面。由於病毒性載體在使用上的一些問題，使科學界致力於發展有效且安全性高的非病毒性載體。

2. 病毒性載體在使用上有嚴重缺陷，使

得發展非病毒性載體成為另一個引人注目新方向。非病毒性載體的優點為使用上簡單方便，易於大量製造外，不易產生特殊的免疫反應及急性的毒性。陽離子型高分子載體 (cationic polymer carrier) 使用在基因傳遞系統的陽離子型高分子常帶有正電性的胺基，這些高分子須具備以下的基本功能 (1) 能將 DNA 縮成奈米大小的結構 (2) 在包覆 DNA 時能有效的遮蔽 DNA 的陰電性，利用淨正電荷和細胞膜表面結合，進而達成傳遞效果。目前文獻中發表的陽離子型高分子主要有：Poly(L-Lysine) (PLL)、Polyethyleneimine (PEI)，Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylate (PDMAEMA)、及 Poly(amido amine) (PAA)、及 Polyurethane (PU) 等系統。 [1-12]

高分子傳輸系統乃利用陽離子型高分子 (Polycation) 和帶負電伸展之質體 DNA 分子藉由靜電作用力，自組裝形成一奈米尺度之複合體，並利用陽離子型高分子之淨正電荷與細胞膜表面結合，以細胞吞飲作用的方式進入細胞，如圖 1 所示。

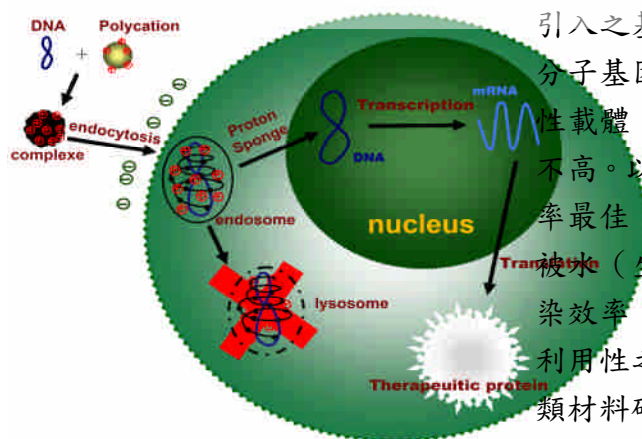


圖 1. polycation/DNA 複合物轉染機制  
當複合體進入到細胞後，會由高基氏體送出含有分解酵素的溶小體與內質體融合，以便利用溶小體的酵素將外來物進行分解。在內質體未與溶小體結合前，會先通入氫離子降低內質體的 pH，以提供溶小體內酵素作用的環境。一般而言，帶胺基的陽離子型高分子會使得氫離子大量進入內

質體，此結果會造成外界對內質體的滲透壓上升，而使得內質體破裂，也就是所謂的質子海綿效應 (proton sponge effect)。此時高分子/DNA 複合體會因內質體的破裂而進入細胞溶質 (cytosol)，當複合體進入細胞溶質時，會釋放出質體 DNA，此時質體 DNA 會通過細胞溶質進入細胞核，因此一個高分子的質子海綿效應越高，其基因轉殖效率越高。在目前已知的陽離子型高分子中，以 PEI 的質子海綿效應最佳，其原因是 PEI 具有高度的分支網狀結構，每三個原子即具有一個可質子化的胺基氮原子，使得 PEI 形成一個有效的質子海綿體 (proton sponge)，此結構可以使質體 DNA 穩定而緊密地連接其中，在生理環境下，可隨著 pH 改變而具有緩衝能力 (buffer capacity)。高分子基因載體的優點為使用上簡單方便，易於大量製造，不易產生特殊的免疫反應及引起急性的毒性。高分子材料與細胞膜的作用機制可以透過不同的方式來完成，不受細胞種屬的限制。除此之外，非病毒性載體也不受所引入之基因大小的限制，而病毒性載體能引入之基因體約在 5 與 36K 之間。然而高分子基因載體並非完美無缺，相對於病毒性載體，高分子基因載體之轉染效率始終不高。以目前高分子材料而言，PEI 轉染效率最佳，但其缺點為細胞毒性太高且無法被水 (生物) 分解，因此，如何開發高轉染效率、低毒性、可被分解及高等生物可利用性之高分子基因轉染材料，為目前此類材料研究者努力的方向。本研究室自 90 年開始，積極開發低細胞毒性且水可溶蝕之陽離子型聚胺基甲酸酯(cationic polyurethanes)，已開發出一系列陽離子型 PU 基因載體，雖然陽離子型 PU 系統之基因載體有優異之性質，但其轉染效率仍有改善之空間。T. Kissel 在其研究中指出，當 PEI 分子量大於 25KD 時，具有極佳之轉染效率，但其毒性也隨著急速增加；當

PEI 分子量小於 2KD 時，雖然幾乎沒有細胞毒性，但其轉染效率也急速下降。為了保存陽離子型 PU 之水解性及沒有細胞毒性之優點，並改善其轉染效率，本研究計畫合成出含低分子量 PEI 之陽離子型 PU 系統 “poly(urethane-co-ethylenimine)”，並探討其相關性質。

### 三、實驗方法

#### 1. 實驗藥品

- (1) Diethyl bis(hydroxymethyl) Malonate 97%
- (2) 1,6-Diisocyanatohexane 98 %
- (3) Methanol
- (4) Dimethylformamide
- (5) Polyethyleneimine
- (6) Dibutyltin dilaurate

#### 2. 實驗步驟

(1) Diethyl bis(hydroxymethyl) Malonate 與 1,6-Diisocyanatohexane 依照比例溶於 Dimethylformamide 內 40°C 下合成 Polyurethane (PU) 加入 Methanol 封尾，乙醚萃取。

(2) 在 PU 加入低分子量 PEI 在 40°C 經由胺解置換反應(Aminolysis reaction)成功合成出 PEI-PU<sub>s</sub>

- (3) 測量分子量與電泳水解測試
- (4) 進行細胞毒性以及細胞轉染實驗

### 四、結果與討論

#### 1. 結構鑑定

PEI-PU<sub>s</sub> 由 Diethyl bis(hydroxymethyl) Malonate 與 1,6-Diisocyanatohexane 依 scheme 1 合成 PU 後加入 PEI 經由胺解反應，成功合成出不同分子量的 PEI-PU<sub>s</sub>。結構鑑定上使用 FT-IR、<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR。

Figure 1. 展示 PEI-PU<sub>s</sub> 在 2260 cm<sup>-1</sup> 異氰酸酯之特性吸收峰已經消失，1720 cm<sup>-1</sup> (伸縮振動，C=O 胺基甲酸酯)、1651 cm<sup>-1</sup> (伸縮振動，C=O 醯胺)、1553 cm<sup>-1</sup> (彎曲振

動，N-H 醯胺)和 3320 cm<sup>-1</sup> (伸縮振動，N-H 胺基甲酸酯)依然存在，NMR 碳譜上可看到 PEI 與 PU 主鏈經由胺解反應接合。GPC 的資料顯示 PEI-PU<sub>s</sub> 分子量約為 62KD~65KD 且 polydispersity 為 1.02，溶劑 THF，標準品為 polystyrene。

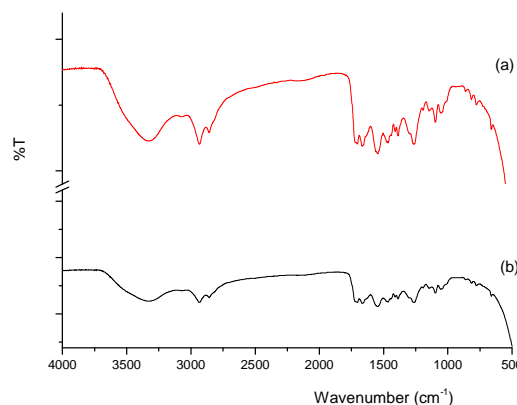


Figure 1. FT-IR spectra of PEI(423)-PU (a) and PEI(25K)-PU (b).

#### 2. 不同種類聚合物的緩衝能力

利用酸鹼滴定實驗測試 PEI、PEI423-PU、PEI25K-PU 的緩衝能力 (Figure 2)。加入 0.1N 的 NaOH 使其起始 pH 值介於 11~12 間，結果得知緩衝能力 PEI25K-PU 大於 PEI423-PU，而介於 PEI 與 NaCl 之間，具有良好的緩衝能力，代表其質子海綿效應也越佳，高分子的質子海綿效應越高，其基因轉殖效率越高。

#### 3. 膠體電泳

PEI423-PU 與 DNA 在 w/w 為 1/1 情況有包覆，PEI25K-PU 與 DNA 在 w/w 為 1/1 有完整包覆，PEI-PU<sub>s</sub> 上的正電荷可與 DNA 上磷酸根的負電荷吸引，將 DNA 完整包覆。

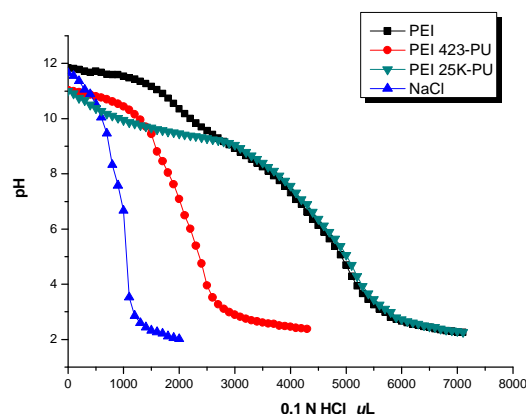


Figure 2. Acid-base titration profile of various

polymers with 0.1 N HCl solution.

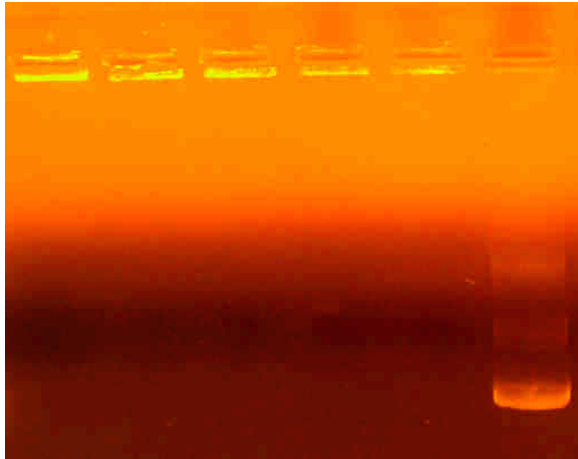


Figure 3. DNA gel retardation and restriction shown by gel retardation. Lane

- (1) PEI 423/ pCMV-βgal(w/w):1/1;
- (2) PEI25K-PU / pCMV-βgal (w/w):1/1;
- (3) PEI25K-PU / pCMV-βgal (w/w):2/1 ;
- (4) PEI423-PU / pCMV-βgal (w/w):2/1 ;
- (5) PEI25K-PU / pCMV-βgal (w/w):3/1 ;
- (6) 400 ng pCMV-βgal.

#### 4. 細胞毒性與轉染效率

- (1) 使用XTT試劑觀察PEI-PUs與DNA形成complex後，對於細胞產生的毒性影響，顯示polymer的毒性較PEI低。(Figure 4)
- (2) PEI-PUs與DNA形成complex後送入細胞測試其轉染效率，在w/w=1:3 PEI 25K-PU具有與PEI 25K類似良好的轉染效率，w/w= 1:200 時PEI 423-PU則具有不錯的轉染效率。

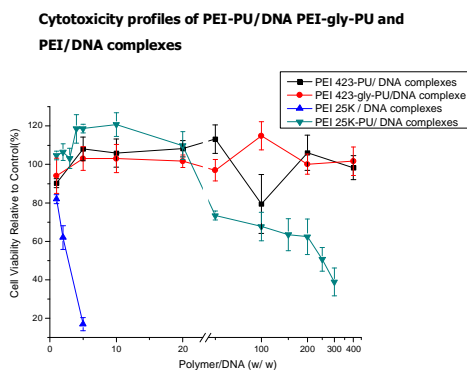


Figure 4. Toxicity of PEI-PU and PEI in COS-7 cells. Results are presented as mean ± SD (n=3).

#### Relative transfection efficiency of polymer/DNA complexes in COS-7 cells

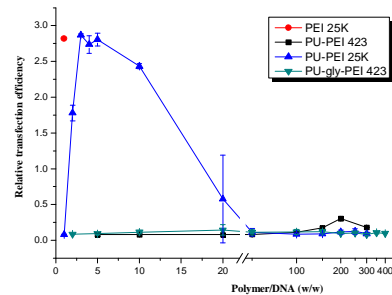


Figure 5. Transfection efficient of PEI-PU and PEI in COS-7 cells. Results are presented as mean ± SD (n=3).

#### Conclusion

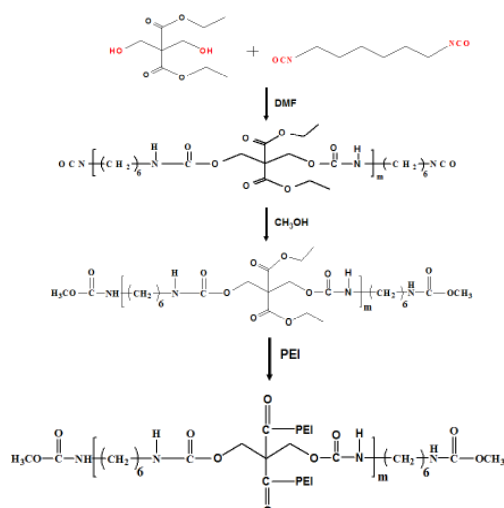
1. 利用低分子量 PEI 與 PU 成功合成出具有低毒性與高轉染效率的陽離子型高分子 poly(urethane-co-ethylenimine)。
2. PU-PEI 同時具有易溶於水並且高緩衝效果，能有效將 DNA 包覆成帶正電荷小顆粒，在轉染系統中為一良好載體材料。

#### 五、參考文獻

- (1) Wolfert, M. A.; Seymour, L. W. *Gene Therapy* **1996**, *3*, 269-273
- (2) Lechardeur, D.; Sohn, K.-J.; Haardt, M.; Joshi, P. B.; Monck, M.; Graham, R. W.; Beatty, B.; Squire, J.; O'Brodivich, H.; Lukacs, G. L. *Gene Therapy* **1999**, *6*: 482-497
- (3) Mumper, R. J.; Wang, J.; Klakamp, S. L.; Nitta, H.; Anwer, K.; Tagliaferri, F.; Rolland, A. P. *J. Controlled Release* **1998**, *52*, 191-203
- (4) Mumper, R. J.; Duguid, J. G.; Anwer, K.; Barron, M. K.; Nitta, H.; Rolland, A. P. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 701-709.
- (5) Kabanov A. V.; Kabanov V. A. *Bioconjugate Chem.*, **1995**, *6*, 7-20.
- (6) Lim Y. -B; Kim C.-H.; Kim K.; Kim S. W; Park J -S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6524-6525.
- (7) Woolfert, M. A. ; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; Seymour, L. W. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 2123-2133.
- (8) Pouton, C. W.; Lucas, P.; Thomas, B. J; Uduchi, A. N; Milroy, D. A.; Moss, S. H. *J. Controlled Release* **1998**, *53*, , 289-299.

- (9) Behr J. –P. *Chimia*, **1997**, 51, 34-36.
- (10) Zhang, J. Y.; Becman E. J.; Piesco, NP; Agarwal, S *Biomaterials* **2000**, 21, 1247-1258.
- (11) Yang, T. F.; Chin, W. K.; Cherng, J. Y.; Shau, M D. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1926-1932.
- (12) Tseng S. J.; Tang, S. C.; Shau, M D.\*; Zeng, Y. F.; Cherng, J. Y.; Shin, M F. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16 (6): 1375-1381.
- (13) Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta MA, et al. *A versatile vector gene and Oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : Polyethylenimine.* *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, 92: 7297-7301.
- (14) Behr JP. *The proton Sponge: A Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit.. chimia*, **1997**; 51: 34-36.
- (15) Petersen H, Merdan T, Kunath K, Fischer D, Kissel T. Poly(ethylenimine-co-L-lactimide-co-succinimide): A biodegradable polyethylenimine derivative with advantageous pH dependent hydrolytic degradation for gene delivery *Bioconjug. Chem*, **2002**;13: 812-821.

接枝前PU主鏈		Mw : 32KD		
PU-PEI(423)	Mw :	62172.7	Mn : 61109	PI : 1.05
PU-PEI(25K)	Mw :	65608.24	Mn : 66927.5	PI : 1.02



Scheme 1. Synthesis of PEI-PUs

