



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 可分解性陽離子聚合體之合成及性質研究

### Studies of Syntheses and Properties of New Biodegradable Cationic Polymers

計劃編號：NSC90-2216-E-41-6

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：蕭明達 共同主持人：程中玉

嘉南藥理科技大學醫藥化學系

#### 中文摘要

合成一主鏈為 PU 鏈結、側鏈帶有三級胺官能基的生物可溶蝕性高分子，其結構以 IR、 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 鑑定之。質體 DNA 的置備為將含有 pCMV- $\beta$ -Gal 的大腸桿菌在 LB 培養液中大量化，利用質體純化組(QIAGEN Kit)純化出 DNA。由粒徑儀來鑑定 DNA 因高分子的靜電作用力所產生的縮小行為及其自組裝所形成的 PU/DNA 錯合體，這可作為未來體外細胞轉染實驗時的一重要參考，進而評估此生物可分解性高分子作為基因載體的效能。

#### Abstract

A new biodegradable lysine diisocyanate based urethane polymer which contains the pendent tertiary amine group was synthesized. The structure of polyurethane was confirmed by IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR. The preparation of plasmid DNA is inoculation and amplification of pCMV- $\beta$ -Gal-loaded E.coli in LB medium. The protocol of QIAGEN Kit is designed for purification of plasmid DNA. The condensation behavior of DNA with polymer to form self-assembled PU/DNA complexes was characterized by dynamic light scattering. This result shows that transfection of gene into cell will take

complex size into consideration. And we will show that the possibility of using polyurethane as a biodegradable gene delivery carrier.

#### 簡介

基因治療 (Gene therapy) 在生物技術及藥物科學是一項相當新的科技，目前已吸引許多科學家投入此方面之研究。許多疾病，不管是來自遺傳或是傳染(AIDS, Cancer, cystic fibrosis 等) 目前並沒有足夠的治療效果，基因治療被視為這些威脅生命疾病的最終治療手段。此技術乃將基因物質輸送至目標細胞或組織。<sup>(1)</sup>

由於 DNA 的陰離子電荷、大小及血液中的核酶 (nucleases) 等原因，當赤裸的 DNA 被給藥後，在沒有到達目標時即已被破壞裂解，因此治療效果不彰。利用適當的載體 (vectors) 被認為可克服此問題。此載體可保護基因物質並幫助它進入細胞核<sup>(2,3)</sup>。基因載體可分為：病毒性載體 (viral carrier) 及非病毒性載體 (nonviral carrier)<sup>(4)</sup>。病毒性載體雖然其體內 (in vivo) 傳送效率較佳，但可隨機插入染色體形成突變；與體內潛伏病毒重組轉成致病性病毒引發免疫反應，且細胞培育再製性較難，以致於難以大規模製造。所以近來在非病毒性載體的研究上有著相當多的研究投入此一系統。

本計劃開發一生物可溶蝕性高分子，在高分子的結構中包含了 Lysine diisocyanate 及 PEG，在高分子水解的過程中，並不會產生具生物毒性的小分子；在水溶液或緩衝溶液中此高分子可與質體 DNA 形成一粒徑小於 190nm 的錯合體，透過細胞的胞飲作用，體內傳送方式轉染 (transfection) DNA 於目標細胞，並在一定時間後表現出特定蛋白質。

### 實驗方法-高分子的合成

#### (一)Lysine diisocyanate(LDI)之合成

將 50ml 除水乾燥後的 Dichloromethane, 50ml 的 Toluene 及 20ml 的 Pyridine 置於 250ml 的圓底反應瓶中，加入 5.01g(20mmol) 的 lysine ethyl ester dihydrochloride，此時 lysine ethyl ester dihydrochloride 懸浮在溶劑中，將此混合液置於冰浴的環境下 30 分鐘後，慢慢滴入等莫耳的 diphosgene 至反應瓶中，此時混合液呈現黃綠色，在迴流的條件下，加熱至 70°C 反應一小時後，再昇溫至 130°C 反應四小時。待混合液降至室溫後，利用冰的 0.5M HCl 水溶液萃取混合液兩次，收集有機層，再將水層以 Dichloromethane 反萃取一次，加入適量的硫酸鎂至有機層中除去水分，過濾取其濾液，透過減壓蒸餾得到微黃色的 Lysine diisocyanate。產物的純度藉由 IR、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 鑑定之。

#### (二) Polyurethane 的合成

在氮氣條件下，將 LDI 與乾燥過的 DMF 溶劑置入三頸反應瓶中，再將乾燥過的 PEG(分子量 200)以進料漏斗慢慢滴入反應瓶中，[NCO]/[OH] 的莫耳比值為 1.1，觸媒為錫化合物(添加量 1wt%)，藉由不同的反應時間來控制此縮合聚合反應的反應程度，可得到不同分子量的高分子。

#### (三) Polyurethane-amide 的合成

前述的高分子其側鏈為 ester group，我們將藉由一帶有三級胺官能基的胺類化合物來作高分子側鏈官能基的置換，使得

此 PU 鏈結的高分子側鏈能帶有三級胺的結構。取適量的 polyurethane 溶於 DMF 的溶劑中，加入過量的 diethylethylenediamine，在減壓的條件下進行反應三小時，得 polyurethane-amide。粗產物先溶於 Dichloromethane 中，利用 Rotary evaporation 將大部分溶劑移除，再將溶液慢慢地滴入約 4°C 的乙醚中沉澱之。產物以 IR、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 鑑定之。合成的流程圖如圖一所示。

### 實驗方法-質體的準備

#### (一) 質體 DNA 的大量置備

本實驗所使用的 DNA 為一質體 (pCMV-β-gal)，其中含有一段能表現出 beta-galactosidase 的報導基因 (LacZ)，此段報導基因的表現是由人類巨細胞病毒 (CMV) 的啟動子 (early promoter) 調控，啟動子啟動轉錄後，再經轉譯作用合成蛋白質，可經由 X-Gal 染色得知質體在細胞內的轉染效率。安比西林 (Ampicillin) 的基因序列可在大腸桿菌中作用，使大腸桿菌能產生破壞安比西林的酵素，而具有抵抗安比西林的特性。

由質體純化組 (QIAGEN Kit) 來置備質體。首先將帶有質體的細菌以 1.5L 含有 ampicillin 50ug/ml 的 LB medium，在 37°C 下培養 17 小時，將菌體以 6000rpm、離心 15 分鐘沉澱下來。再將菌之沉澱物懸浮於 50ml 的 P1 Buffer (50mM Tris.Cl, pH 8.0; 10mM EDTA; 100ug/ml RNase)，再加入 50ml 的 P2 Buffer (200mM NaOH, 1% SDS)，溫和地搖晃使菌體溶解，置於室溫下五分鐘，加入 50ml 冰冷的 P3 Buffer (3.0M potassium acetate, pH 5.5)，溫和地搖動有白色沉澱物產生，在冰浴的環境下 30 分鐘。以 13500rpm 作超高速離心 30 分鐘，將沉澱物離下，吸取出澄清液，準備 35ml QBT Buffer (Equilibration Buffer) 倒入 Qiagen-tip 2500 column 中，待平衡建立後，準備 220ml 的 QC Buffer (Wash Buffer)，將留在 column 中細菌的屍體和蛋

白質等等的碳水化合物沖出來，再倒入 35ml 的 QF Buffer(Elute Buffer)，將質體 DNA 沖出來後，加入 24.5ml 的 Isopropanol 讓 DNA 沉澱出來，以 70% 的 ethanol 水溶液沖洗之，所得的 DNA 在 Tris-EDTA buffer 中保存之。質體 DNA 的濃度則以紫外光光譜儀測定在 260nm 及 280nm 的吸光度來加以計算。

## (二) 粒徑分析儀(Dynamic Light Scattering)

Polymer 與 DNA 在水溶液中會藉由正負電荷互相吸引而形成一複合體 (complex)，藉由 DLS 來量測在不同 Polymer/DNA(w/w) 值的情況下，其水力半徑的變化。DLS 乃是使用 5mW 低功率的氬氖雷射光(波長 633nm)作分析，其原理是利用粒子在水中的布朗運動，當雷射光打到粒子時，會發生光散射的現象，而儀器本身會收集不同角度的散射，送入電腦作分析，以 Einstein-Stokes 方程式統計計算出粒徑大小。在溫度為 25°C 下，取樣時間設定為自動選取適當的時間，每個樣品皆重複測定三次，資料的分析條件則選在水於 25°C 下的條件—黏度為 0.89mPa<sub>s</sub>，而 refractive index 為 1.333。

## 結果與討論

### 一、Lysine diisocyanate(LDI)之結構鑑定

由 IR 的圖譜中發現在 2260~2270cm<sup>-1</sup> 有一很強的吸收峰，此為 isocyanate group；同樣地在 <sup>1</sup>H NMR(圖三)、<sup>13</sup>C NMR 圖譜中(圖四)也符合 LDI 的化學結構。<sup>1</sup>H NMR 圖譜：

{OCN-CH<sub>2</sub>-, δ=3.3, 2H; OCN-CH-C(O), δ=4.0, 1H; C(O)-O-CH<sub>2</sub>, δ=4.2, 2H; CH<sub>3</sub>, δ=1.3, 3H; -CH<sub>2</sub>-, δ=1.4~1.8, 6H}; 從碳譜中顯示出 Lysine ethyl ester 經由 phosgenation 的反應後，產生了兩個新的 peak 在 122ppm、126ppm，此為 isocyanate group<sup>(5)</sup>。除此之外，我們可以證實合成的 Lysine isocyanate 不會如其他 isocyanate 產品中有 dimers 或 trimers 的產生。

### 二、PU-amide 的結構鑑定

由 IR 圖譜(圖五)中顯示在 2260cm<sup>-1</sup> 處 (-NCO-) 的吸收峰已經消失，在 1720cm<sup>-1</sup> 處有一強的吸收峰 (-NHCOO-), 2883cm<sup>-1</sup> (-CH-). <sup>1</sup>H NMR(圖三)圖譜(CDCl<sub>3</sub>): {α-NH of Lys, δ=5.6, 1H; ε-NH of Lys, δ=5.2, 1H; terminal CH<sub>2</sub> of PEG+CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, δ=4.0~4.2, 6H; CH<sub>2</sub> of PEG, δ=3.6; α-CHNH, δ=3.4, 1H; ε-CH<sub>2</sub>NH, δ=3.05, 2H; CH<sub>2</sub> of tertiary amine, δ=2.8, 6H; CH<sub>2</sub> of Lys, δ=1.3~1.8, 6H; -NCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, δ=0.9, 6H}; 從碳譜(圖四)中顯示 pendent group(-CONH-)其 δ=162.4 ppm, 可以證實帶有三級胺官能基的化合物成功地置換了酯基，且高分子主鏈上的(-NHCOO-)其化學位移分別為 δ=156.4ppm (urethane from α-NH) 及 δ=155.9ppm (urethane from ε-NH)。(圖五)

### 三、質體 DNA 的濃度及主要結構

質體 DNA 的濃度則以紫外光光譜儀測定在 260nm 及 280nm 的吸光度來加以計算。

DNA 的 λ<sub>max</sub>=260nm 其

Absorbance=0.535; Protein 的 λ

max=280nm 其 Absorbance=0.273, 利用

QIAGEN Kit 所純化的 pCMV-β-gal 其 Purity=A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>=1.96, 純度值最好介於 1.7~2.0 之間。

### 四、Polymer/DNA complex 的粒徑

配置不同重量比的 Polymer/DNA, 在室溫下靜置 30 分鐘後，再開始進行粒徑的量測，原本 DNA 在水溶液中的水力半徑約有 2μm, 當重量比值為 5 時，有最小的粒徑為 126nm, 根據此數據結果我們將以 polymer/DNA(w/w)=0.5:1, 1:1, 2:1 為一組; 5:1, 10:1, 20:1 為另一組，作為細胞轉染實驗時比較之。

## 參考文獻

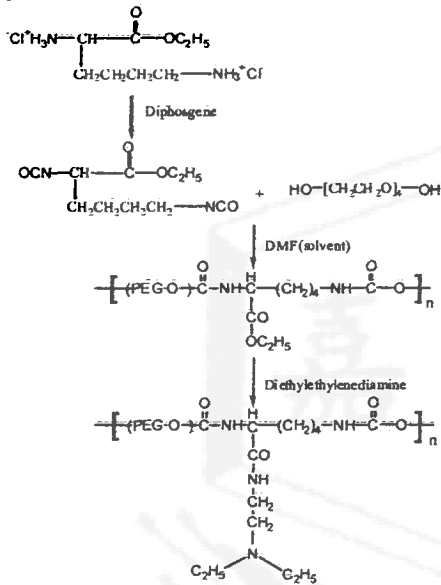
1.K.Sikora, Gene therapy-heralding a new era, Gene Ther., 1(1994) 1~2.

2.M.Nakanish, Gene introduction into animal tissue, Crit. Rev. Ther. Drug Carr.Syst.12(4) (1995)263~310.

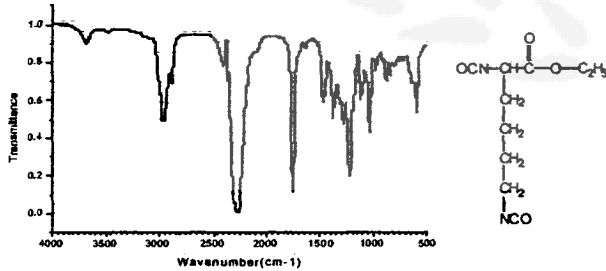
3.P.L.Felgner, Particulate system and polymers for in vitro and in vivo delivery of polynucleotides, Adv. Drug Deliv. Rev.5(1990)163~187.

4.Anderson, W.F., Human gene therapy, science 256(1992)808~813.

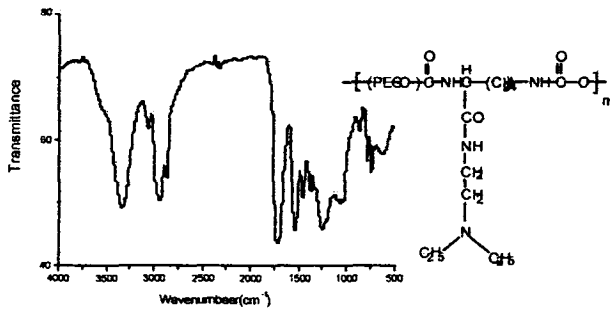
5.George C. Levy, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, 1980



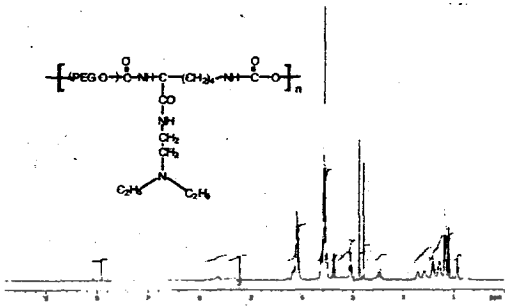
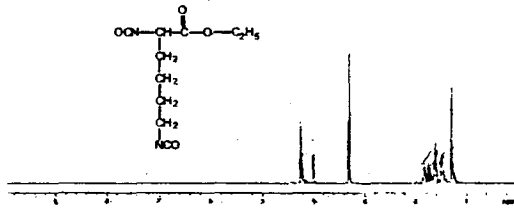
圖一、Polyurethane-amide之合成流程圖



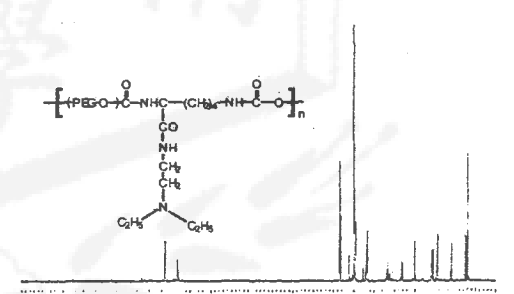
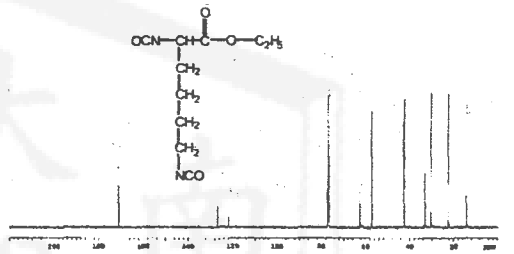
圖二、LDI之IR Spectrum



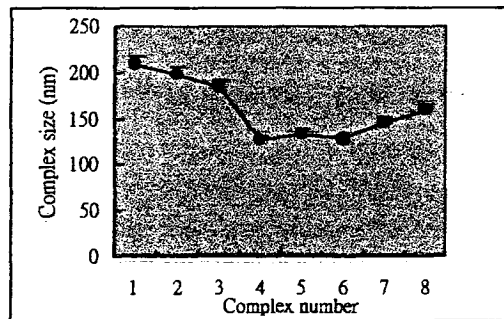
圖五、Polyurethane-amide之IR Spectrum



圖三、<sup>1</sup>H NMR



圖四、<sup>13</sup>C NMR



圖六、不同 Polymer/DNA(w/w)比值下之粒徑變化

	1	2	3	4	5	6	7	8
Polymer/DNA	0.5	1	2	5	10	20	50	100