

【11】證書號數：I253453

【45】公告日：中華民國95(2006)年4月21日

【51】Int. Cl.<sup>7</sup>： C08G18/77, A61L27/00

發明 全 11 頁

【54】名稱：生物可分解性陽離子聚合物

BIODEGRADABLE CATIONIC POLYMER

【21】申請案號：092132809

【22】申請日：中華民國92(2003)年11月21日

【11】公開編號：200517408

【43】公開日：中華民國94(2005)年6月1日

【72】發明人：蕭明達 SHAU, MINDA；程中玉 CHERNG, JONGYUH；楊琮富 YANG, TSUNGFU；金惟國 CHIN, WEIKUO

【71】申請人：嘉南藥理科技大學 CHIA NAN UNIVERSITY OF PHARMACY AND SCIENCE  
臺南縣仁德鄉二仁路1段60號

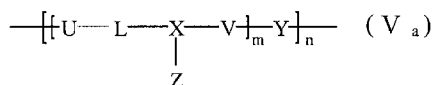
【74】代理人：蔡坤財

1

2

[57]申請專利範圍：

1. 一種生物可分解性陽離子聚合物，該生物可分解性陽離子聚合物之骨架及側鏈具有胺基，且該生物可分解性陽離子聚合物之分子式(V<sub>a</sub>)如下所示：

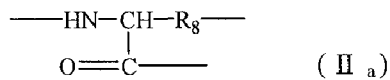


其中

U為(R<sub>1</sub>-O)<sub>d</sub>，而其中R<sub>1</sub>為C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>烷基或經取代烷基，d為介於4至200之一整數，

L為  $\text{—}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{—}$ ，

5. X為含有額外胺基或醯胺之胺基酸(Amino Acid)基團，其分子式(II<sub>a</sub>)如下所示：

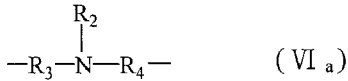


10.

其中該 R<sub>8</sub> 係選自於由 -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>- 及 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>- 所組成之一族群，

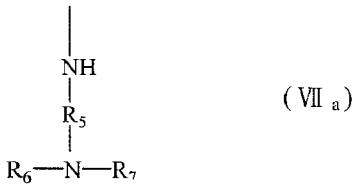
V 為 -COO-，

Y 為胺基，其分子式 (VI<sub>a</sub>) 如下所示：



其中 R<sub>2</sub> 為氫或 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基，R<sub>3</sub> 與 R<sub>4</sub> 為相同之 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基，

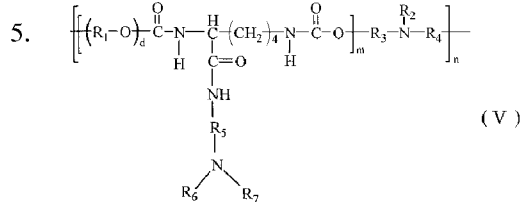
Z 為另一胺基，其分子式 (VII<sub>a</sub>) 如下所示：



其中 R<sub>5</sub> 為 C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基，R<sub>6</sub> 與 R<sub>7</sub> 為相同或不同之 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基，  
m 為介於 1 至 10 之整數，以及  
n 為介於 1 至 20 之一整數。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 R<sub>1</sub> 係選自於由 C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 烷基所組成之一族群。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 R<sub>1</sub> 為乙烷基時，該 d 為介於 4 至 200 之一整數。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 R<sub>1</sub> 為丙烷基時，該 d 為介於 9 至 34 之一整數。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 X 以 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>- 為較佳。
6. 一種生物可分解性陽離子聚合物，該生物可分解性陽離子聚合物之骨架

及側鏈具有胺基，係用以將核酸引入細胞中，其中該生物可分解性陽離子聚合物之分子式 (V) 如下所示：



該分子式中 R<sub>1</sub> 為 C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基或經取代烷基，其中 d 為介於 4 至 200 之一整數；

R<sub>2</sub> 為氫或 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

15. R<sub>3</sub> 與 R<sub>4</sub> 為相同之 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

R<sub>5</sub> 為 C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；以及

R<sub>6</sub> 及 R<sub>7</sub> 為相同或不同之 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基；

m 為介於 1 至 10 之整數；以及

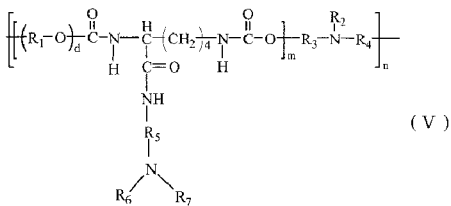
n 為介於 1 至 20 之一整數。

20. 7. 如申請專利範圍第 6 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 R<sub>1</sub> 為係選自於由 C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 烷基所組成之一族群。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 R<sub>1</sub> 為乙烷基時，該 d 為介於 4 至 200 之一整數。
9. 如申請專利範圍第 7 項所述之生物可分解性陽離子聚合物，其中該 R<sub>1</sub> 為丙烷基時，該 d 為介於 9 至 34 之一整數。
30. 10. 一種生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，該生物可分解性陽離子聚合物之骨架及側鏈具有胺基，係用以將核酸引入細胞中，其中該生物可分解性陽離子聚合物之製造方法至少包含：
  35. 提供左旋離胺酸二異氰酸甲酯 (L-Lysine Methyl Ester Diisocyanate；LDI) 與聚二醇 (Polyol)；
  - 40.

進行一聚合反應，係將 LDI 與聚二醇在 75 至 85°C 於無水之二甲基甲醯胺(Dimethyl Formamide ; DMF)中反應至一第一預定 NCO/OH 莫耳比，以得到末端為異氰酸(Isocyanate-Terminated)之一預聚合物；

進行一鏈延長反應，係將該預聚合物降低約 0 至 10°C 以緩慢加入一鏈延長劑至一第二 NCO/OH 莫耳比，再藉由一有機錫化合物為一觸媒，於 75 至 85°C 進行該鏈延長反應，以得到一聚胺酯，其中該聚胺酯之該 LDI 提供至少一烷氧(Alkoxide)基；以及

進行一胺解反應，係以另一胺類置換該聚胺酯之該至少一烷氧基為一胺基，以形成該生物可分解性陽離子聚合物，其中該一胺基係與該核酸鍵結，且該生物可分解性陽離子聚合物之分子式(V)如下所示：



該分子式中 R<sub>1</sub> 為 C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基或經取代烷基，其中 d 為介於 4 至 200 之一整數；

R<sub>2</sub> 為氫或 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

R<sub>3</sub> 與 R<sub>4</sub> 為相同之 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

R<sub>5</sub> 為 C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；以及

R<sub>6</sub> 與 R<sub>7</sub> 為相同或不同之 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基；

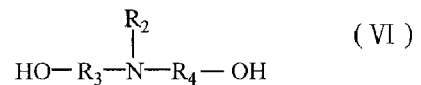
m 為介於 1 至 10 之整數；以及

n 為介於 1 至 20 之一整數。

11.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該聚二醇係選自於由聚乙二醇(Polyethylene Glycol ; PEG)、聚丙二醇(Polyethylene Glycol ; PPG)、

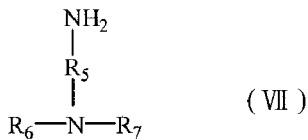
聚四亞甲基二醇(Polytetramethylene Glycol ; PTMG)、以及聚四亞甲基醚二醇(Polytetramethylene Ester Glycol ; PTMEG)所組成之一族群。

- 5. 12.如申請專利範圍第 11 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該聚乙二醇之聚合度介於 4 至 200 。
- 10. 13.如申請專利範圍第 11 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該聚丙二醇之聚合度介於 9 至 34 。
- 15. 14.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該聚合反應係在約 80°C 反應為較佳。
- 20. 15.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該第一預定 NCO/OH 莫耳比為約 2/1 。
- 25. 16.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該第二預定 NCO/OH 莫耳比為約 1/1 。
- 30. 17.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該鏈延長反應係在約 80°C 反應為較佳。
- 35. 18.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該鏈延長反應係進行約 120 分鐘為較佳。
- 40. 19.如申請專利範圍第 10 項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該鏈延長劑為以下式(VI)表示之一種胺類(Amine)：



其中R<sub>2</sub>為氫或C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基，R<sub>3</sub>與R<sub>4</sub>為相同之C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基。

- 20.如申請專利範圍第19項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該鏈延長劑為N- 甲基二乙醇胺(N-Methyldiethanolamine；MDEA)。
- 21.如申請專利範圍第10項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該有機錫化合物係為二月桂酸二丁錫(Dibutyltin Dilaurate)。
- 22.如申請專利範圍第21項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該有機錫化合物係添加0.1至1重量百分比。
- 23.如申請專利範圍第21項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該有機錫化合物係添加0.5重量百分比。
- 24.如申請專利範圍第10項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該至少一烷氧基為甲氧基。
- 25.如申請專利範圍第10項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該另一胺類之分子式(VII)以下式表示：

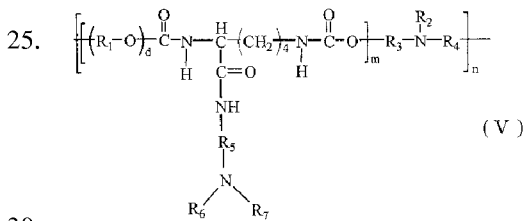


其中R<sub>5</sub>為C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基，R<sub>6</sub>與R<sub>7</sub>為相同或不同之C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基。

- 26.如申請專利範圍第25項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該另一胺類為N,N- 二乙基乙二胺(N,N-Diethylethylenediamine；DEDA)。
- 27.如申請專利範圍第10項所述之生物

可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該生物可分解性陽離子聚合物之分子量(Molecular Weight；MW)介於6000至62000之間。

- 5. 28.如申請專利範圍第10項所述之生物可分解性陽離子聚合物之製造方法，其中該核酸帶有一基因，且該核酸係選自於由DNA及RNA所組成之一族群。
- 10. 29.一種於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法至少包含：
- 15. 形成該核酸與該生物可分解性陽離子聚合物之一複合體；以及施用該複合體於該細胞，係使該複合體藉由一胞飲作用將該核酸引入該細胞；
- 20. 其中該生物可分解性陽離子聚合物之骨架及側鏈具有胺基，且該生物可分解性陽離子聚合物之分子式(V)如下所示：



- 30. 該分子式中R<sub>1</sub>為C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基或經取代烷基，其中d為介於4至200之一整數；R<sub>2</sub>為氫或C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；R<sub>3</sub>與R<sub>4</sub>為相同之C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；R<sub>5</sub>為C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；以及R<sub>6</sub>與R<sub>7</sub>為相同或不同之C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基；m為介於1至10之整數；以及n為介於1至20之一整數。

- 40. 30.如申請專利範圍第29項所述之於活

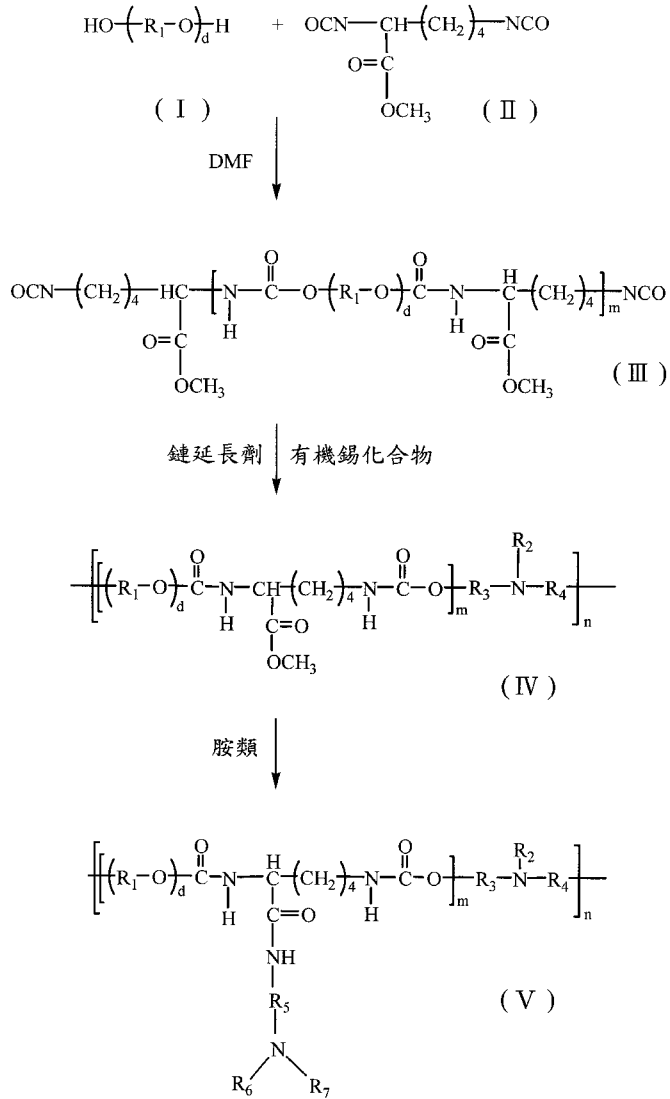
體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該  $R_1$  為係選自於由  $C_2-C_3$  烷基所組成之一族群。

31. 如申請專利範圍第 30 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該  $R_1$  為乙烷基時，該  $d$  為介於 4 至 200 之一整數。
32. 如申請專利範圍第 30 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該  $R_1$  為丙烷基時，該  $d$  為介於 9 至 34 之一整數。
33. 如申請專利範圍第 29 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該生物可分解性陽離子聚合物與該核酸具有一質量比(Mass Ratio)介於 1/1 至 50/1 之間。
34. 如申請專利範圍第 29 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該生物可分解性陽離子聚合物與該核酸具有一質量比介於 5/1 至 30/1 之間。
35. 如申請專利範圍第 29 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該生物可分解性陽離子聚合物與該核酸具有一質量比為 20/1。
36. 如申請專利範圍第 29 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該核酸帶有一基因，且該核酸係選自於由 DNA 與 RNA 所組成之一族群。
37. 如申請專利範圍第 36 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該 DNA 係選自於由雙股 DNA、單股

DNA 與合成之寡核苷酸(Synthetic Oligonucleotides)所組成之一族群。

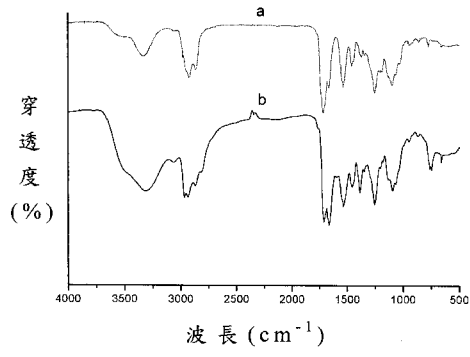
38. 如申請專利範圍第 36 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該 RNA 係選自於由轉譯(Sense)RNA、反譯(Anti-sense)RNA 與核酸(Ribozyme)RNA 所組成之一族群。
  39. 如申請專利範圍第 29 項所述之於活體外利用生物可分解性陽離子聚合物將核酸引入細胞的方法，其中該細胞係選自於由一腫瘤細胞與一初代培養細胞所組成之一族群。
- 圖式簡單說明：
15. 第 1 圖係繪示依據本發明之一較佳實施例的一種生物可分解性陽離子聚合物之反應流程圖；
  20. 第 2 圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU 的 FT-IR 光譜；
  25. 第 3(a)圖與第 3(b)圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU 的  $^1H$ -NMR 光譜；
  30. 第 4 圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU 經過不同時間分解後，分解時間與分子量之關係圖；
  35. 第 5 圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU/DNA 複合體的質量比與粒徑之關係圖；
  40. 第 6 圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU/DNA 複合體之電泳分析；
  45. 第 7 圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU/DNA 複合體之質量比與表面電荷電位之關係圖；
  50. 第 8(a)圖至第 8(c)圖係繪示本發明之一較佳實施例之 DEDA-PU/DNA 複合體之細胞毒性分析；以及
  55. 第 9 圖係繪示依照本發明一較佳實施例之 DEDA-PU/DNA 複合體與市售之 PEI 及 PDMAEMA 比較，轉染腫

瘤細胞之相對效率圖。

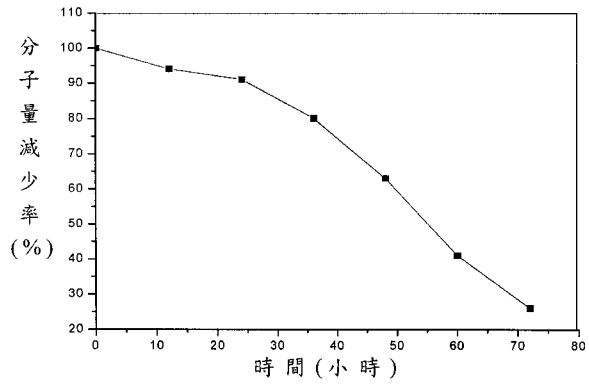


第 1 圖

(7)

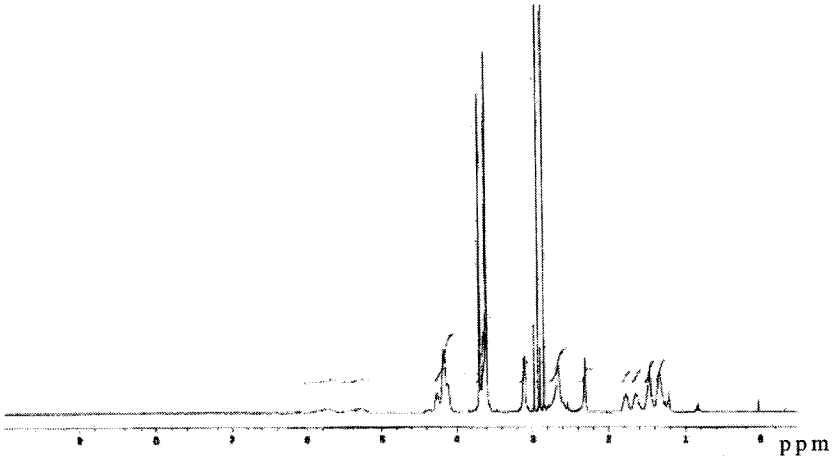


第 2 圖

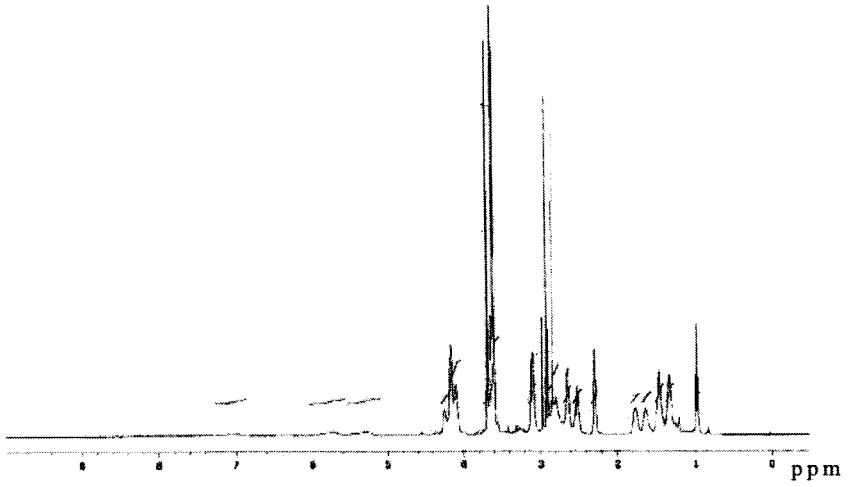


第 4 圖

(8)



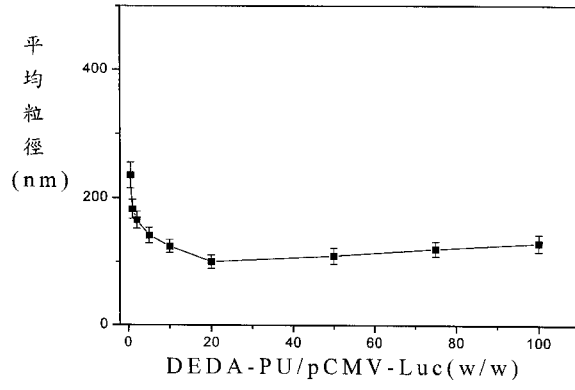
第3(a)圖



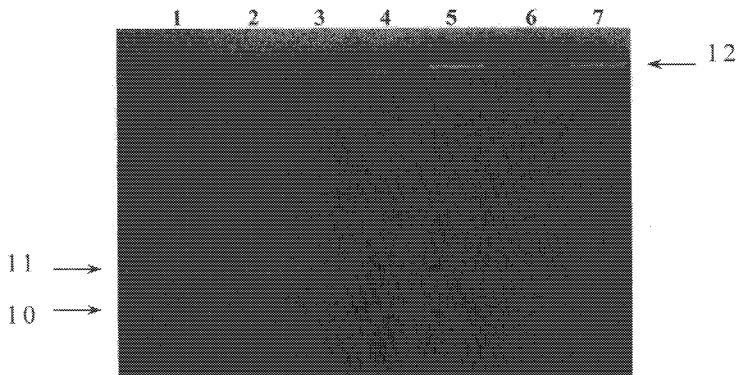
第3(b)圖



(9)

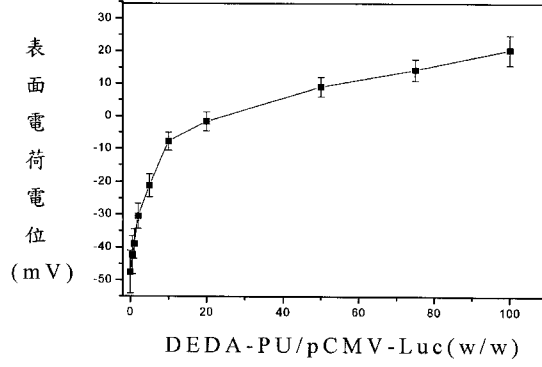


第 5 圖

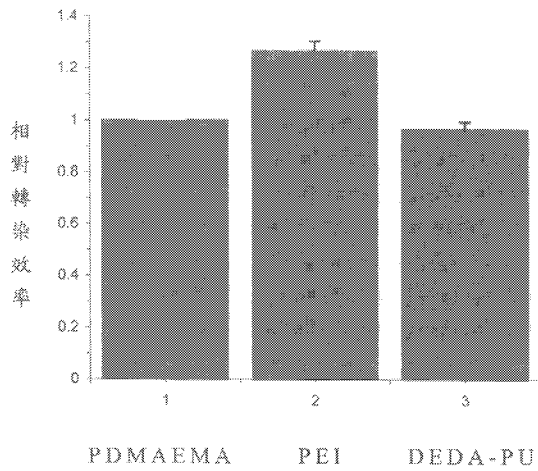


第 6 圖

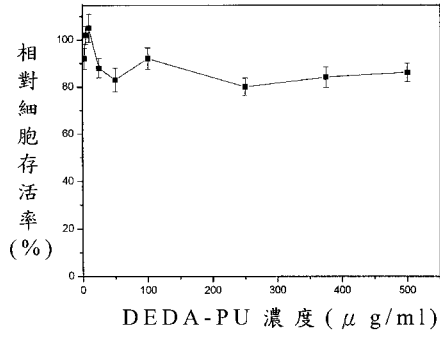
(10)



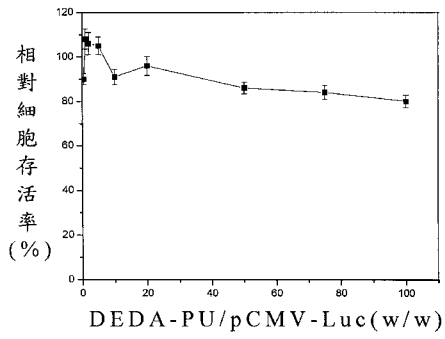
第 7 圖



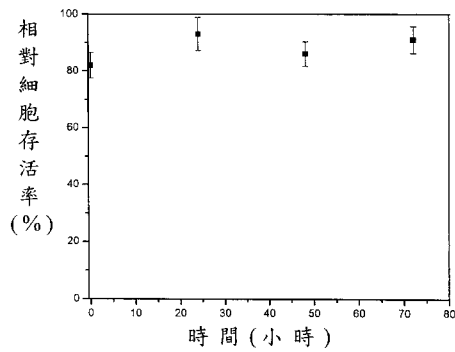
第 9 圖



第 8(a) 圖



第 8(b) 圖



第 8(c) 圖

