行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

＊ ********* ** ＊
＊ 計 畫 ＊
＊ ： 以葉酸受器作為標的之抗癌標靶藥物 ＊
＊ 名 稱 ＊
＊ ********* ** ＊

執行計畫學生： 劉盛忠
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-041-005-E
研 究 期 間 ： 99 年 07 月 01 日至 100 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授 ： 蕭明達

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

執 行 單 位： 嘉南藥理科技大學生物科技系（所）

中華民國 100 年 03 月 30 日

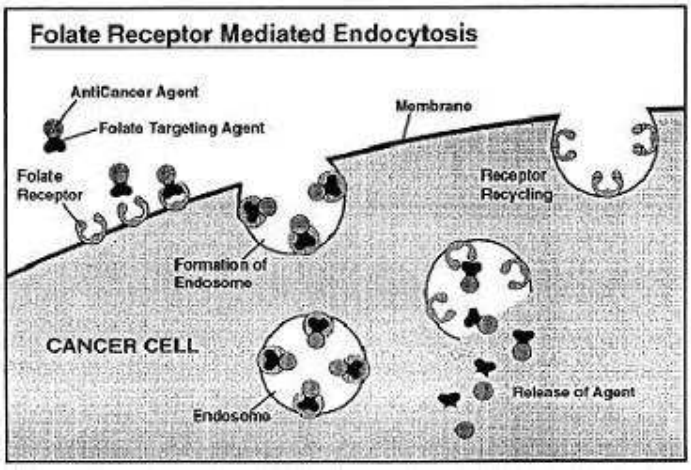
研究計畫摘要：

本研究將計劃擬將PEOH與葉酸利用脫水方式結合，形成具靶向作用的高分子載體。利用FT-IR、NMR確定高分子載體的化學結構，並測試其相關之物化及生化性質，如複合體之表面電位、粒徑大小、細胞毒性、緩衝能力及轉染效力。

研究動機及研究問題：

葉酸(Folate,FA)是人體所必須的維生素。哺乳動物無法在體內自行合成所需之葉酸，所以必須靠外在環境攝取獲得。獲得的方法之一是利用細胞膜表面的特殊蛋白質(Folate binding protein,FBP 或 Folate receptor,FR)當作細胞攝取葉酸的入口，此種蛋白質對葉酸有很高的親和活性。在研究的文獻中顯示[1] [2]，FR 基本上可以分為三種不同的形式，FR-α、FR-β 與 FR-γ，隨著不同的組織而有不同的分佈。FR-α，在一般正常狀況下會表現在組織的上皮細胞中，例如腎臟、胎盤、眼球的視網膜等，但其表現量皆不大；反之，在一些上皮細胞癌組織上，則會有很大的表現量，例如卵巢癌、子宮癌、腦癌、腎臟癌等。FR-β，則是在一些非上皮細胞癌會有所表現。而 FR-γ，則是在造血細胞上才會有表現。

從以上結果我們可以發現，FR 在癌細胞上的表現量遠比一般正常細胞的表現要多，因此，我們便可以利用這個特性來達到標的的目的，並且藉由葉酸受器為媒介的細胞內噬作用(Receptor-mediated endocytosis)，可以有效的把含有藥物的複合體送進細胞內，是一個更好的將藥物送進細胞的方法。

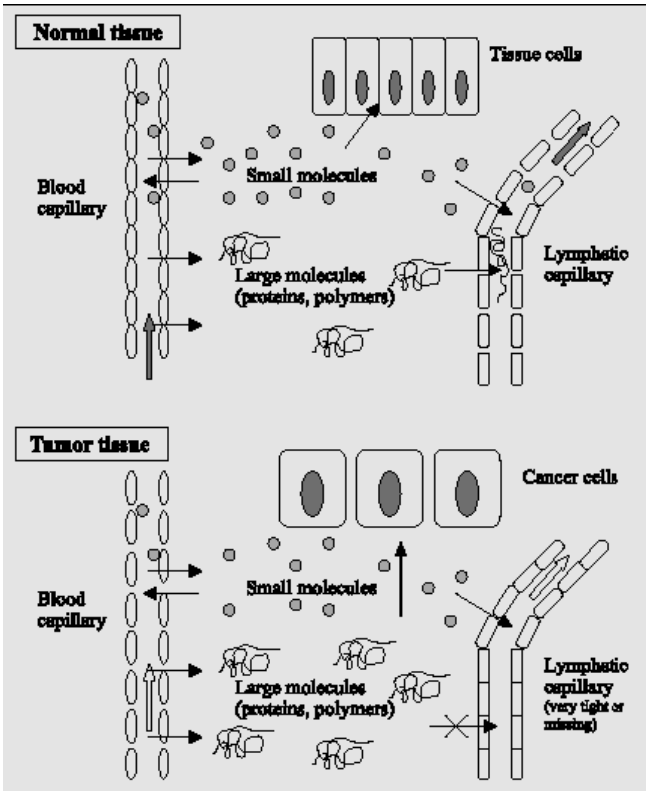


以葉酸接受器做為媒介的細胞內噬作用圖[3]

文獻回顧與探討：

通常癌組織會分泌出比正常細胞多的血管增生因子，因為癌組織需要較多的養分與空氣，所以造成腫瘤組織附近血管比起正常的血管滲透性要來的高，導致分子體積大的高分子藥物載體，也能輕易的滲透、經過癌組織。日本熊本大學

前田浩教授所提出的 EPR 效應(Enhanced Permeation and Retention effect)，說明了癌細胞會破壞淋巴系統，造成高分子停留在腫瘤組織附近時間會比較長，經由此發現，若能將抗癌藥物接合在高分子載體上，可以使高分子藥物載體達到治療的目標。由於 EPR 效應，使得高分子複合體即使沒有標的的官能基也可以大量的累積於癌組織中。如下圖所示。



癌組織的 EPR 效應[4]

利用標的官能基與細胞受器的結合，如抗體-抗原間的專一性或是某些組織上特有的受器，而達到標的作用，即為強制標的。此種方式具有高度專一性與選擇性。帶有標的物的複合體，即可利用此特性直接攻擊目標細胞，如此不僅可以縮短複合體在身體循環滯留的時間，亦可降低被免疫系統辨識的危險性，更能有效率的直接到達目標，大幅降低對其他細胞的影響，是種較為安全且有效的攜帶藥物治療的方式。

從將葉酸受器作為標的物的研究中，也有人提出質疑，由於葉酸接受器在一般組織細胞上仍有些許表現量，認為這樣的標的物在標的癌細胞的同時，也會有機會傷害到正常組織。在文獻[1]中研究指出，大部分標的有葉酸的物質是可以集中到達癌組織的，只有一部分會對肝及腎臟產生鍵結。在肝臟的表現方面，會有這樣的情形發生是因為一些由於發炎的刺激，造成葉酸與活化的巨噬細胞表面的葉酸接受器鍵結，但這些活化的巨噬細胞，會被其餘的巨噬細胞所取代，並且其餘的巨噬細胞是沒有鍵結葉酸能力的。而在腎臟的表現，則是因為腎臟的葉酸接

受器是位於皮髓部近曲小管的頂端，或是面對尿液的小管細胞表面，可以促進尿液裡葉酸的再吸收，所以接枝有葉酸的物質，只會在一些腎臟發生異常，或是蛋白尿的患者，才會有機會到達葉酸接收器。

因此，綜合以上所述，接枝有葉酸的物質，並不會對正常組織造成嚴重的健康危害。

研究方法及步驟：

1.1 材料：

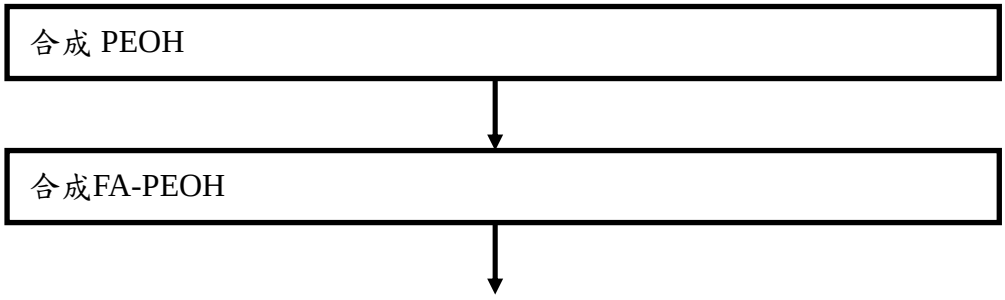
a. 1,4-Diaminobutane
b. Glycidyl methacrylate(GMA)
c. 6-Amino-1-hexanol 97%
d. Dicyclohexylcarbodiimide(DCC)
e. N-hydroxysuccinimide(NHS)
f. Folate(FA)
g. N,N-Dimethylformamide(DMF)
h. Acetone
i. Ethyl acetate
j. 透析膜(3500 MWCO)
k. DNA(pCMV-βgal)

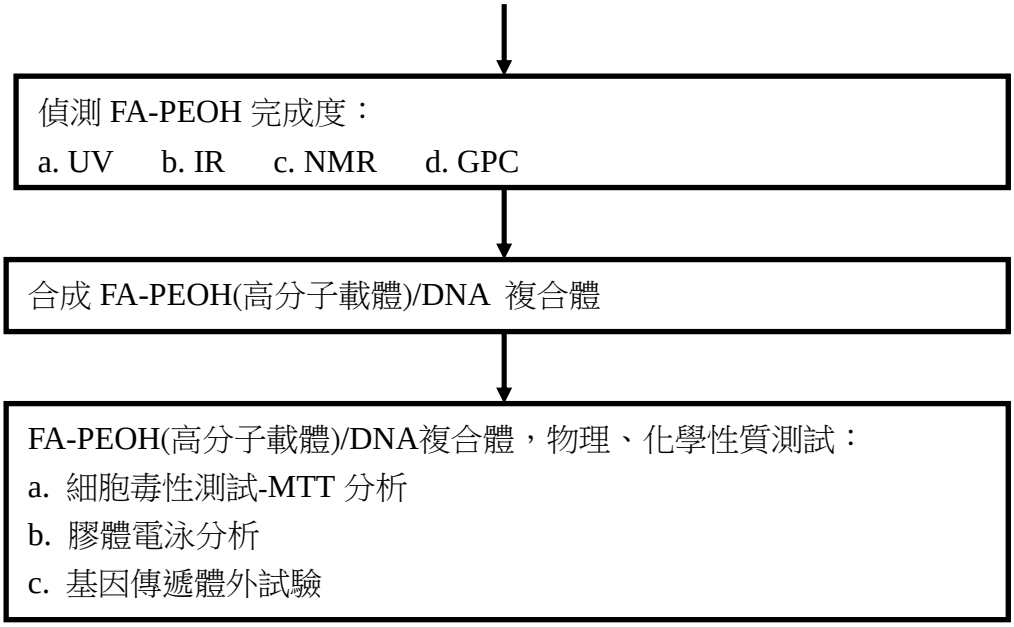
1.2 實驗儀器：

(1) 紫外光/可見光分光度計(UV-Visible Recording Spectrometer)
(2) 傅立葉紅外線光譜儀(Fourier transfer infrared,FT-IR)
(3) 核磁共振光譜儀(Nuclear magnetic resonance,NMR)
(4) 冷凍乾燥機
(5) 真空冷凝減壓濃縮器
(6) 凝膠滲透層析儀(Gel permeation chromatography,GPC)

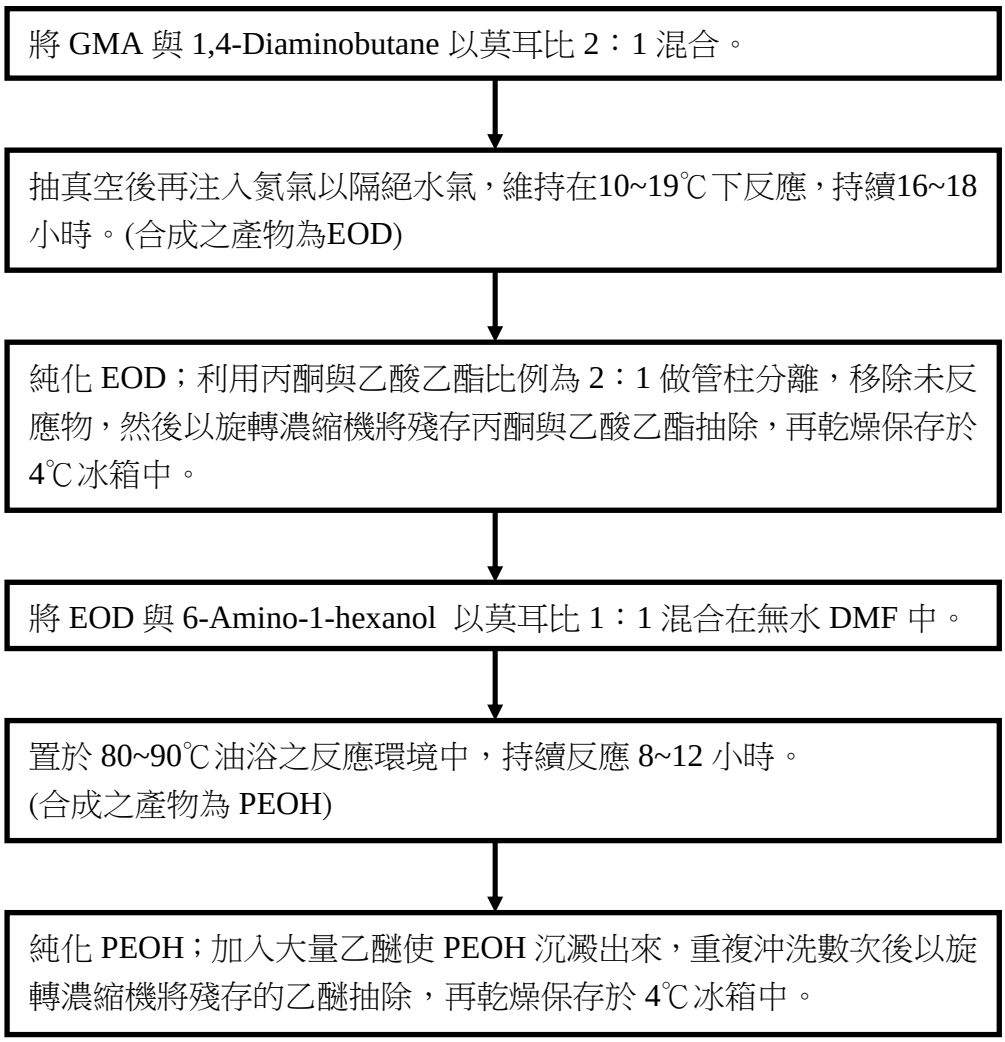
1.3 FA-PEOH之合成與生化性質：

1.3.1 實驗流程圖：合成反應式如圖一所示。



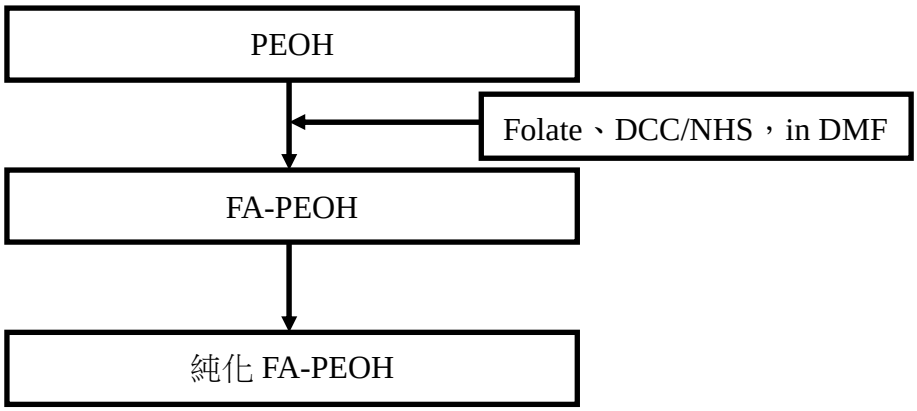


1.3.1.1 PEOH的合成步驟：



1.3.1.2 FA-PEOH的合成：

將PEOH、DCC、NHS、Folate(避光)，以莫耳比1：1：1：1混合。



反應條件	
1. 反應溫度	室溫
2.反應時間	18 hr
3.反應容器	圓底燒瓶、單頸瓶
4.反應環境	磁石攪拌，真空、填氮氣
5.反應溶劑	DMF
6.產物純化方式	大量乙醚沉降
7.產物取得方式	冷凍乾燥

1.4 高分子之酸-鹼滴定分析：

藉由酸鹼滴定法來得知高分子之緩衝能力範圍。將高分子載體溶於 NaCl 溶液(150 mM)，加入 1.0M NaOH 溶液，待確定溶液呈鹼性後記錄其 pH 值。接著以 0.1N HCl 溶液滴定此高分子溶液，並記錄其 pH 質變化，即可得知高分子的緩衝能力。高分子結構中氨基被質子化能力無法含蓋在 pH 5.5 到 7.5，則會減少複合體進入到細胞質，因質子海綿體效應(proton sponge effect)。

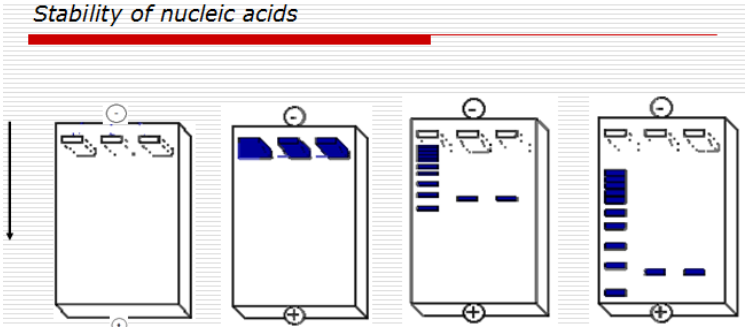
1.5 電位及粒徑大小分析:

高分子/DNA 複合體的粒子大小與攜帶 DNA 之轉染效率成反比，而與攜帶之正電荷成正比，但有一最適當值(Optimal value)。透過 DLS(Dynamic light scattering)來量測在水溶液或緩衝溶液中不同濃度的高分子與質體 DNA 的作用下，其自組裝所形成的奈米尺度複

合物之水力半徑及利用高分子/DNA 複合體在電場中的 Electrophoretic mobility 來量測其帶的電荷及程度。

1.6 膠體電泳分析：

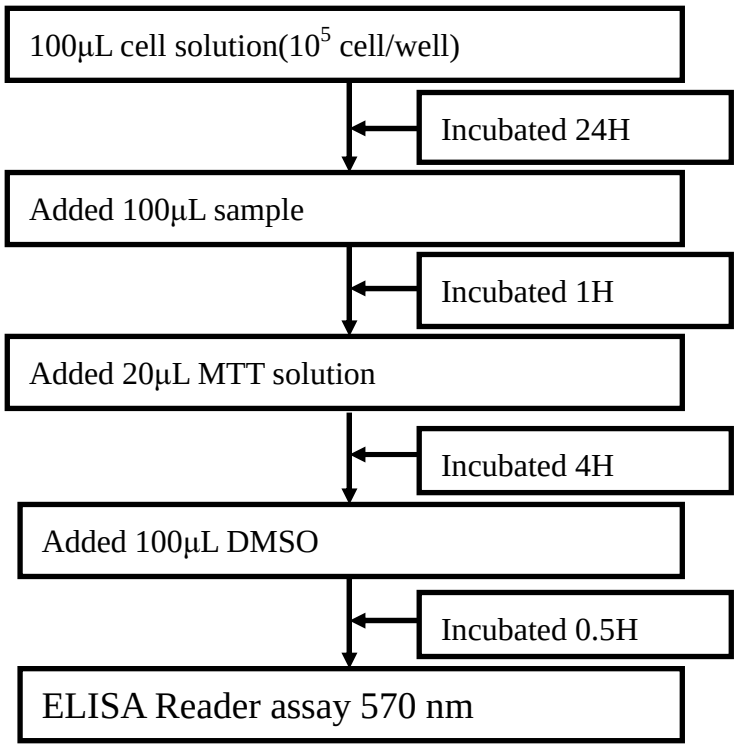
DNA電泳分析主要利用DNA帶負電的特性，於電場中會穿越膠體，而朝向正極移動。因為不同分子量的DNA於膠體的孔隙中移動的速率會有差異，藉此可將不同大小DNA分開。在電極中，DNA移動速率與DNA分子量大小成對數反比，而與DNA序列的組成鹼基無關。藉由膠體電泳分析，分析FA-PEOH/DNA複合體的完成度。



膠體電泳分析[5]

1.7 細胞毒性測試：

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cell(COS-7) solution(5 mg/mL in PBS, pH7.4)take 25mg add 5mL PBS, cell concentration:100000 cell/mL。Sample 必須對細胞不造成危害。



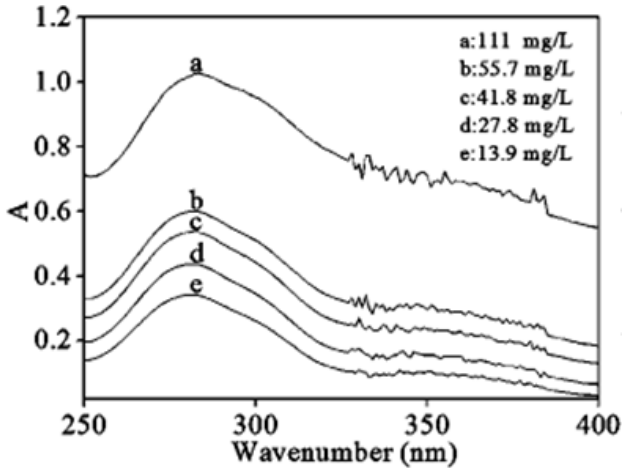
1.8基因傳遞體外試驗：

細胞在受到轉染pCMV-βgal後會表現出半乳糖分解酵素(β-galactosid-ase)。而此酵素可經由化學染色法來觀察其表現量。半乳糖分解酵素可將受質ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galactoside)分解ONPG成為O-nitrophenol與galactose，前者為黃色。藉著ONPG染色法及可用ELISA Reader測定OD 405 nm的吸收值，來評估轉染效果。

結果與討論：

I.高分子之結構鑑定：

由IR圖譜(圖二) 結果顯示主要官能基確實合成存在，利用NMR進一步分析。由H^1-NMR圖(圖三)結果顯示確認合成成功，再藉由GPC分析出polymer的分子量。接著參考文獻[8]製備出葉酸的檢量線，進而算出葉酸的接枝率。



葉酸溶液的紫外光吸收圖[8]

II. 高分子之酸-鹼滴定分析：

酸-鹼滴定檢測於polymers, 用0.1N HCl。由緩衝能力曲線圖(圖四)結果顯示pH 5.5到7.5含蓋在緩衝能力中，利於質子海綿體效應。

III. 電位及粒徑大小分析:

由複合體之表面電為曲線圖(圖五)結果可發現，polymer/DNA complexes 的淨電荷是帶正電的，將有助於使 polymer/DNA complexes 與帶負電細胞膜互相吸引靠近，利於被細胞行內噬作用。

由複合體之平均粒徑曲線圖(圖六)結果可發現，polymer/DNA complexes 的粒徑大小小於一個細胞的大小，如此一來有助於轉染效果。

IV. 膠體電泳分析：

polymers 與 DNA 依不同重量比混合之電泳圖(圖七)。(a)PEOH (b) FA-PEOH.

Lanes 1 為 Marker; Lanes 2 為 Free DNA; Lanes 3~11 為 polymers 與 DNA 之 weight ratio: 1/1, 5/1, 10/1, 50/1, 100/1, 250/1,500/1 ,750/1,1000/1. 由結果可發現，當 FA-PEOH 與 DNA 在 100/1 下， polymers 對 DNA 已有相當包覆能力，使 DNA 不被 EtBr 嵌入。

未來預期結果：

藉由GPC分析出polymer的分子量，再參考文獻[8]推算出葉酸的接枝率。接著以PEI 25k當對照組，將合成出的polymers做細胞毒性測試，且進一步比較對於不同細胞的轉染效果。

經由 FA-PEOH 複合體再進一步作為治癌藥物，則可以使標靶藥物快速地到達適當的地方，並且藉由細胞內噬作用進入到細胞內進行治療，降低藥物對人體其他組織的副作用，且可以減少藥物的使用量以避免不必要的浪費，達到標靶治癌藥物的理念。

參考文獻：

[1]Lu Y., and Low P.S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002；54：675-693.

[2]Shiokawa T., Hattori Y., Kawano K., Ohguchi Y., Kawakami H., Toma K., and Maitani Y. Effect of polyethylene glycol linker chain length of folate-linked microemulsions loading aclacinomycin A on targeting ability and effect in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*. 2005；11：2018-2025.

[3]Wang S., and Low P.S. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *Journal of Controlled Release*. 1998；53：39-48.

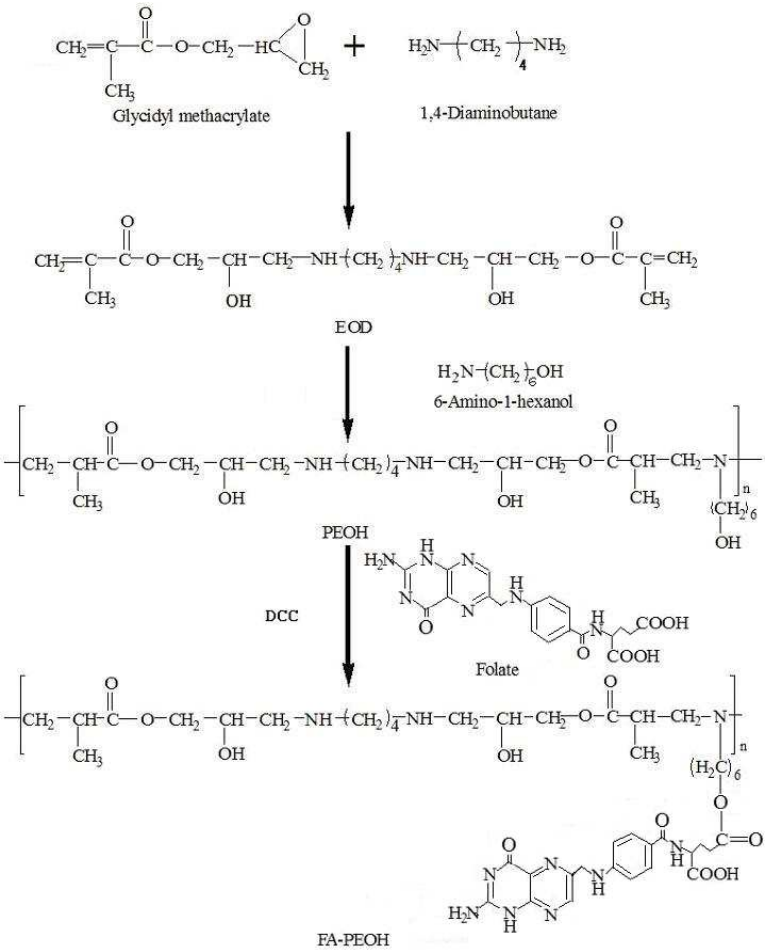
[4]Ulbrich K., and Subr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004；56：1023-1050.

[5]Mao H.Q., Roy K., Troung-Le V.L., Janes K.A., Lin K.Y., Wang Y.,August J.T., Leong K.W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*. 2001；70：399-427.

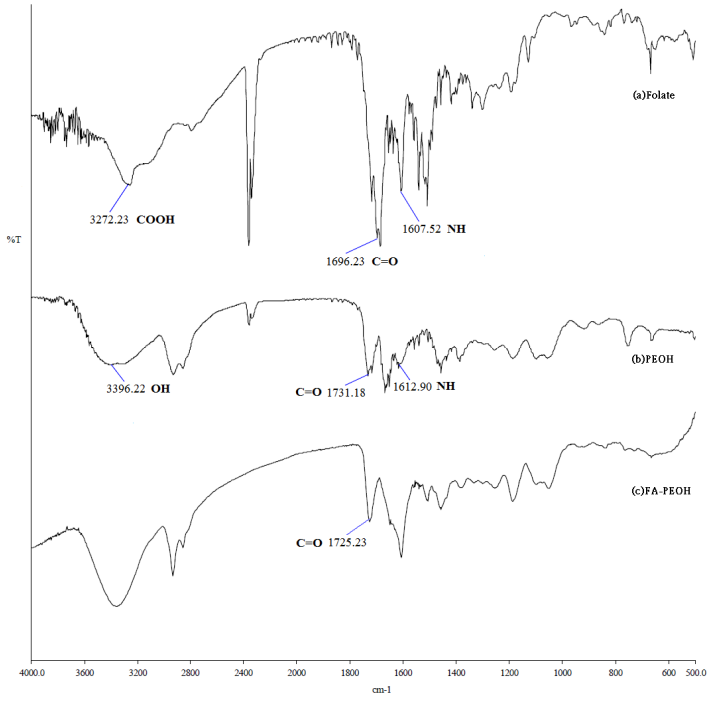
[6]Kim S.H., Jeong J.H., Joe C.O., Park T.G. Folate receptor mediated intracellular protein delivery using PLL–PEG–FOL conjugate, Department of Biological Sciences. *Journal of Controlled Release*. 2005；103：625–634.

[7]李怜，以葉酸標的之聚乙二醇-聚乳酸二團聯共聚物合成及其高分子微胞之研究，碩士論文(2006)。

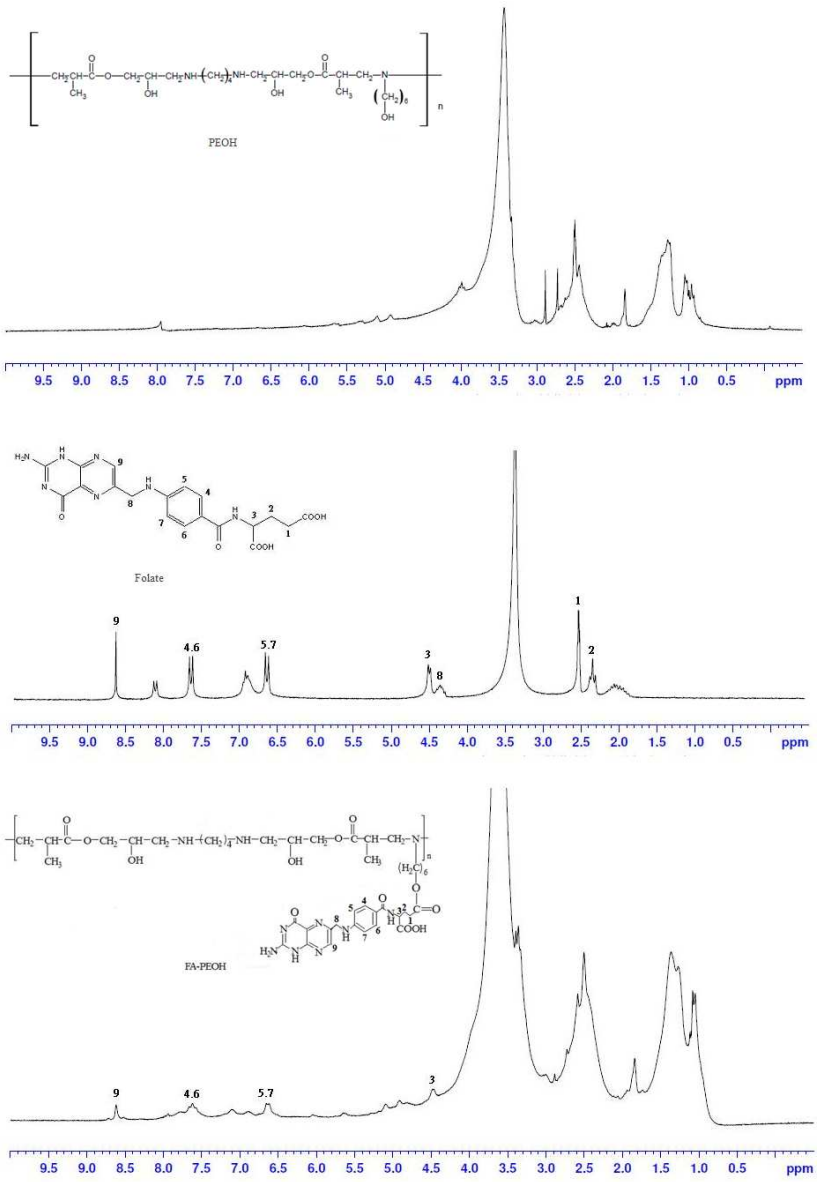
[8] Cheng H., Zhu J.L., Zeng X., Jing Y., Zhang X.Z., Zhuo R.X. Targeted Gene Delivery Mediated by Folate-polyethylenimine-block-poly(ethylene glycol) with Receptor Selectivity. *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 481–487.



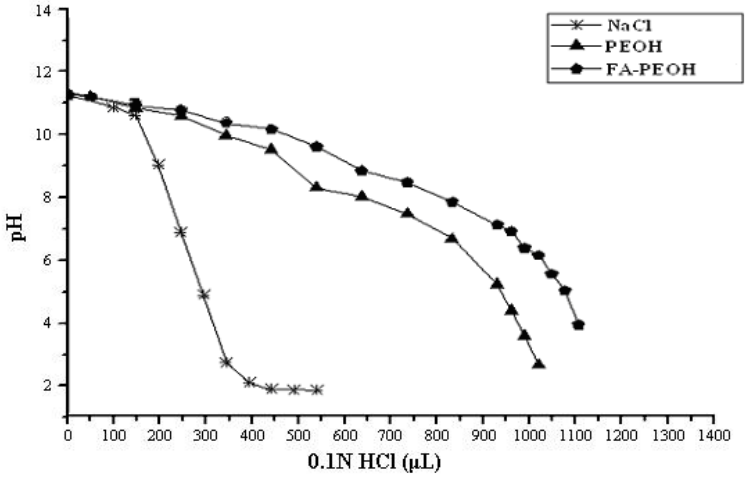
圖一、 FA-PEOH之合成反應式



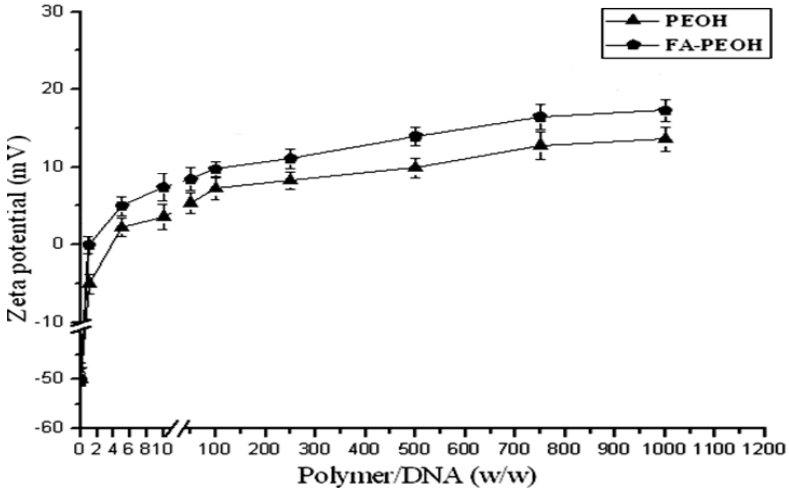
圖二、FA-PEOH之FT-IR光譜圖



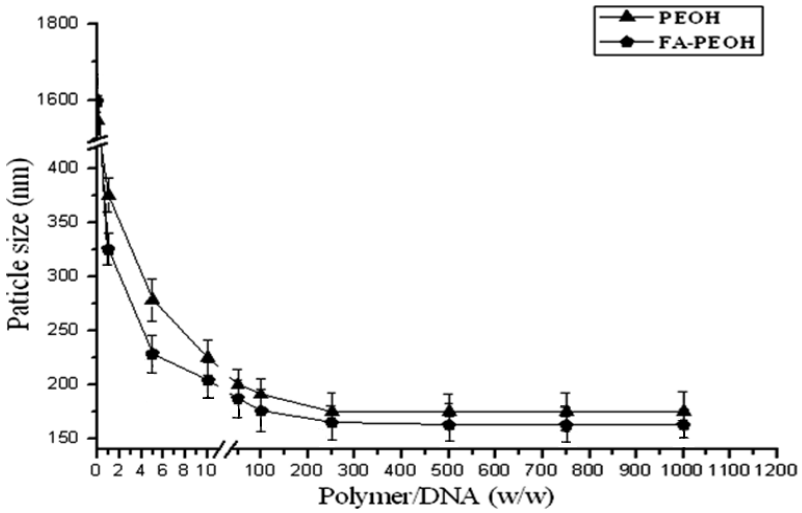
圖三、PA-PEOH之H^1-NMR圖



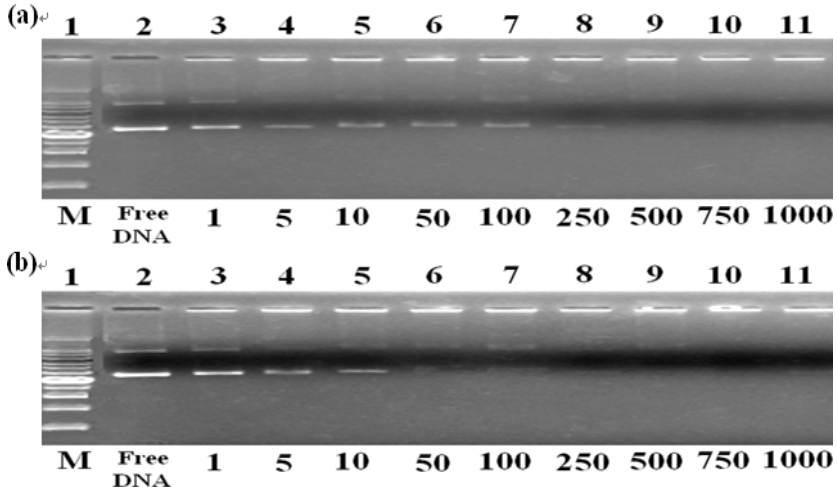
圖四、PEOH、PA-PEOH之緩衝能力曲線圖(以0.1N HCl溶液滴定)



圖五、PEOH、FA-PEOH/DNA 複合體之表面電位曲線圖(結果顯示±SD 值 (n=3))



圖六、PEOH、FA-PEOH/DNA 複合體之平均粒徑曲線圖(結果顯示±SD 值 (n=3))



圖七、PEOH、FA-PEOH/DNA複合體之膠體電泳分析圖