

科技部補助專題研究計畫報告

雙性共聚高分子表面活性劑於陽離子性高分子微RNA傳送系統配方之應用

報告類別：成果報告

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 109-2637-E-041-004-

執行期間：109年08月01日至110年07月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學藥學系(含碩士班)

計畫主持人：郭榮華

計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

本研究具有政策應用參考價值：☐否 ☒是，建議提供機關科技部, 衛生福利部

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：☒否 ☐是

中 華 民 國 110 年 08 月 25 日

中文摘要：微RNA(microRNA; miRNA)治療為最近蓬勃發展的核酸治療趨勢，然而miRNA傳送系統之建立仍為其臨床成功的關鍵因素。共聚高分子界面活性劑較少應用於非病毒性核酸載體miRNA傳送而且對於影響細胞之分子機轉亦尚未建立，故本計劃提出加入雙性共聚高分子三區段架構PEO (poly-ethylene oxide)-PPO (poly-propylene oxide)-PEO高分子界面活性劑於陽離子性高分子及脂質載體之miRNA傳送系統配方，能充分了解PEO-PPO-PEO共聚高分子界面活性劑影響細胞傳送miRNA之機轉，並期許能發展成為高效率低毒性之非病毒性miRNA傳送系統。所有PEO-PPO-PEO共聚高分子界面活性劑(P407; P124; 及F127)、在測試最高劑量20%下、對於MH-S小鼠肺泡巨噬細胞均無顯著細胞毒性及保持相當細胞膜完整性。同時所有PEO-PPO-PEO共聚高分子界面活性劑配方對MH-S巨噬細胞均擁有極佳之免疫生物相容性(無顯著免疫發炎反應NO自由基之釋放)，對於陽離子性脂質/ miRNA傳送系統提供了稍許細胞膜完整性之保護作用，然而降低陽離子性脂質/ miRNA傳送系統之細胞轉染效率。相反地、所有PEO-PPO-PEO共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性高分子/ miRNA傳送系統細胞轉染效率均能維持與未加入高分子界面活性劑相當程度，並且對於陽離子性高分子/ miRNA傳送系統提供細胞膜完整性之保護作用亦擁有極佳之免疫生物相容性。總之PEO-PPO-PEO共聚高分子界面活性劑最大貢獻在於提供細胞毒性之保護作用，而細胞轉染效率之影響在於載體之種類選擇。

中文關鍵詞：微RNA；共聚高分子界面活性劑；非病毒性載體；陽離子性脂質；陽離子性高分子

英文摘要：MicroRNA (microRNA; miRNA) therapy is a recently booming trend in nucleic acid therapy. However, the establishment of miRNA delivery systems is still a key factor for clinical success. Copolymer surfactants are rarely used in the non-viral miRNA delivery systems, and the cellular molecular mechanism has not yet been established. Therefore, this plan proposes to add amphiphilic copolymer three-segment structure PEO (poly-ethylene oxide) -PPO (poly-propylene oxide)-PEO polymer surfactants in the miRNA delivery system formula of cationic polymer and lipid carrier, can develop into a non-viral miRNA delivery system with high efficiency and low toxicity, and can fully understand the effect of PEO-PPO-PEO copolymer surfactants on the mechanism of miRNA delivery systems. All PEO-PPO-PEO copolymer surfactants (P407; P124; and F127), at the highest dose tested at 20%, have no significant cytotoxicity to MH-S mouse alveolar macrophages and maintain considerable cell membrane integrity. At the same time, all PEO-PPO-PEO copolymer surfactant formulations have excellent immune biocompatibility to MH-S macrophages (no significant immune inflammatory response to the release of NO free radicals). For cationic lipids / miRNA delivery system provides a little protection of the integrity of the

cell membrane, but reduces the cell transfection efficiency of the cationic lipid/miRNA delivery system. On the contrary, all PEO-PP0-PEO copolymer surfactant formulations can maintain the transfection efficiency of cationic polymer/miRNA delivery system to the same level as without polymer surfactants, also can protect the integrity of cell membranes and have excellent immune biocompatibility. In conclusion, the greatest contribution of PEO-PP0-PEO copolymer surfactants is to provide protection against cytotoxicity, and the effect of cell transfection efficiency lies in the choice of carrier types.

英文關鍵詞：MicroRNA; copolymer surfactants; non-viral carriers; cationic lipid; cationic polymer

目錄

中英文摘要及關鍵詞	II-III
前言	1
研究目的	1
文獻探討	1
研究方法	3
結果與討論	5
參考文獻	10

中文摘要

微 RNA(microRNA; miRNA)治療為最近蓬勃發展的核酸治療趨勢，然而 miRNA 傳送系統之建立仍為其臨床成功的關鍵因素。共聚高分子界面活性劑較少應用於非病毒性核酸載體 miRNA 傳送而且對於影響細胞之分子機轉亦尚未建立，故本計劃提出加入雙性共聚高分子三區段架構 PEO (poly-ethylene oxide)-PPO (poly-propylene oxide)-PEO 高分子界面活性劑於陽離子性高分子及脂質載體之 miRNA 傳送系統配方，能充分了解 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑影響細胞傳送 miRNA 之機轉，並期許能發展成為高效率低毒性之非病毒性 miRNA 傳送系統。所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 、在測試最高劑量 20%下、對於 MH-S 小鼠肺泡巨噬細胞均無顯著細胞毒性及保持相當細胞膜完整性。同時所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對 MH-S 巨噬細胞均擁有極佳之免疫生物相容性(無顯著免疫發炎反應 NO 自由基之釋放)，對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統提供了稍許細胞膜完整性之保護作用，然而降低陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統之細胞轉染效率。相反地、所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性高分子/ miRNA 傳送系統細胞轉染效率均能維持與未加入高分子界面活性劑相當程度，並且對於陽離子性高分子/ miRNA 傳送系統提 細胞膜完整性之保護作用亦擁有極佳之免疫生物相容性。總之 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑最大貢獻在於提供細胞毒性之保護作用，而細胞轉染效率之影響在於載體之種類選擇。

關鍵詞：微 RNA; 共聚高分子界面活性劑; 非病毒性載體; 陽離子性脂質; 陽離子性高分子

英文摘要

MicroRNA (microRNA; miRNA) therapy is a recently booming trend in nucleic acid therapy. However, the establishment of miRNA delivery systems is still a key factor for clinical success. Copolymer surfactants are rarely used in the non-viral miRNA delivery systems, and the cellular molecular mechanism has not yet been established. Therefore, this plan proposes to add amphiphilic copolymer three-segment structure PEO (poly-ethylene oxide) -PPO (poly-propylene oxide)-PEO polymer surfactants in the miRNA delivery system formula of cationic polymer and lipid carrier, can develop into a non-viral miRNA delivery system with high efficiency and low toxicity, and can fully understand the effect of PEO-PPO-PEO copolymer surfactants on the mechanism of miRNA delivery systems. All PEO-PPO-PEO copolymer surfactants (P407; P124; and F127), at the highest dose tested at 20%, have no significant cytotoxicity to MH-S mouse alveolar macrophages and maintain considerable cell membrane integrity . At the same time, all PEO-PPO-PEO copolymer surfactant formulations have excellent immune biocompatibility to MH-S macrophages (no significant immune inflammatory response to the release of NO free radicals). For cationic lipids / miRNA delivery system provides a little protection of the integrity of the cell membrane, but reduces the cell transfection efficiency of the cationic lipid/miRNA delivery system. On the contrary, all PEO-PPO-PEO copolymer surfactant formulations can maintain the transfection efficiency of cationic polymer/miRNA delivery system to the same level as without polymer surfactants, also can protect the integrity of cell membranes and have excellent immune biocompatibility. In conclusion, the greatest contribution of PEO-PPO-PEO copolymer surfactants is to provide protection against cytotoxicity, and the effect of cell transfection efficiency lies in the choice of carrier types.

Keywords: MicroRNA; copolymer surfactants; non-viral carriers; cationic lipid; cationic polymer

前言

微 RNA(microRNA; miRNA)治療為最近蓬勃發展的核酸治療趨勢，然而 miRNA 傳送系統之建立仍為其臨床成功的關鍵因素。非病毒性核酸載體由於安全性較高及製程簡單性，被廣泛應用於核酸傳送之應用。共聚高分子界面活性劑較少應用於非病毒性核酸載體 miRNA 傳送而且對於影響細胞之分子機轉亦尚未建立，故本計劃提出加入雙性共聚高分子三區段架構 PEO (poly-ethylene oxide)-PPO (poly-propylene oxide)-PEO 高分子界面活性劑於陽離子性高分子及脂質載體之 miRNA 傳送系統配方，能充分了解 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑影響細胞傳送 miRNA 之機轉，本計劃特色在於配方之彈性調配避免化學修飾既存載體分子結構以滿足臨床之實際需求，期許能發展成為高效率低毒性之非病毒性 miRNA 傳送系統。

研究目的

本計畫將聚焦於加入雙性共聚高分子三區段架構 PEO-PPO-PEO 高分子界面活性劑於非病毒性載體之 miRNA 傳送系統之配方，以發展成為高效率、高精準、及低毒性之 miRNA 傳送系統。

文獻探討

由於基因突變與衆多人體疾病（如癌症、愛滋病、阿茲海默症等）有密切關連性而促使科學家發展有效基因療法。基因治療涵蓋了廣泛之應用例如對基因本身或後天性疾病、癌症之基因置換或 knockdown 、及免疫疫苗之發展。外來性之核酸分子如 DNA 及 RNA 均被用於解決基因不規則之治療，這些核酸分子能增進基因表現而補足有缺陷之功能性蛋白質或者透過基因抑制而壓制無法正常運作之蛋白質來達到醫療效果。由病理學許多的證據顯示許多疾病與異常的微 RNA (micro RNA ; miRNA)表現息息相關，因此研究 miRNA-base 治療方法越來越受到重視。miRNA 療法之潛力在於取代傳統藥物無法達成之效果(如 miRNA 主要是影響基因後轉錄表現，可避開直接改變 DNA 遺傳物質序列之風險)並可做為疾病診斷的 biomarkers。另外，miRNA 並不需完美鹼基配對故能調控諸多基因網路及訊息傳導路徑，故在癌症治療上比 siRNA 沉默單一訊息傳導

路徑來得有利。成功基因療法樞紐關鍵在於核酸分子傳送，所以尋找一個具有安全性而且有效率的方式是目前發展核酸治療的關鍵。核酸傳送方式必須滿足能穿越細胞膜並保護基因或 RNA 於細胞內免於核酸酵素 (nucleases) 之降解；並把基因或 RNA 進入 miRNA 目標；而且並沒有嚴重之不利副作用產生。傳送核酸分子可分為物理性 (無載體) 及載體(vectors)方式。核酸載體可分為兩大類: 病毒 (viral carrier) 及非病毒性 (non-viral carrier)。天然病原體之病毒性載體雖然其體內傳送效率較佳，但潛在性的危險(如反轉錄病毒可隨機嵌入染色體形成突變、與體內潛伏病毒重組轉成致病性病毒引發免疫反應 (immunogenicity; 腺病毒))、腺相關病毒無法傳送較大基因、細胞培育及可再製性較難掌握以至於難以大規模製造等因素使得許多研究轉向於擁有良好生物相容性之非病毒性載體。非病毒性載體方式是由質體 DNA 或 RNA 與載體形成奈米複合體 (complexes) 並透過體內傳送方式轉染於目標細胞，在一段時間後表現出特定蛋白質或沉默目標基因。除了擁有較病毒性載體毒性低、易製備、可傳送較大基因等優點外，其在細胞內非永久性表現之特性故投藥劑量及頻率較為彈性，對於癌細胞、非繁殖性細胞之治療及組織工程之幹細胞基因調控非常適合此短時效之特性。目前主要發展出脂質 (lipids)、高分子 (polymers)、蛋白質、無機奈米顆粒、及混合系統(如 lipid-polymer hybrid、polymer-peptide hybrid、inorganic-organic hybrid)、生物混合系統(如紅血球 (RBC (red blood cell))、血小板、免疫細胞、癌細胞及幹細胞、細胞衍生之細胞胞外泌體 extracellular vesicle (EV)) 等常用之非病毒性載體系統。雙鏈單價 (N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) 脂質分子最早被利用於核酸傳送，以後各種不同之親水性頭基及親油性化學結構陸續被開發而出，並且結合不帶電之磷脂、pH 敏感性脂質、或者膽固醇之幫助性脂質 (help lipid) 形成目前常用之核酸轉染脂質試劑(如 Lipofectamine)。相對於小分子脂質，高分子量之陽離子性高分子載體能更有效地緊縮核酸成不同大小與形態之複合體 (polyplexes)，並利用陽離子之淨正電荷和細胞膜表面互相結合，進而造成內含 (internalization) 作用。目前常用之陽離子性高分子為聚賴胺酸 poly(L-lysine) (PLL)、聚乙烯亞胺 polyethylenimine (PEI)、聚丙烯胺 (polyallylamine, PAA)、幾丁胺糖 (Chitosan)、陽離子性奈米樹狀體 (polyamidoamine、Janus dendrimers、and polypropylamine dendrimers)、poly(amino acids) (self-assembled polypeptide、protamine and histones 等)、生物可生分解性高分子 (biodegradable polymers (cyclodextrins、cationic dextran、poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-coated with cationic polymer 等) 及生物可生分解性蛋白質、hydrogels、自組裝兩性共聚合物 (self-assembled amphiphilic block copolymers (Tri-block copolymers、polymer micelles、nanogels、polymersomes、amphiphilic core-shell nanoparticles))、細胞穿透性胜肽 (cell penetrating peptide, CPP)、專一性吸附能力之分子模版高分子 (Molecularly imprinted polymers (MIP))、混合系統等。PEI 為目前最常用之陽離子性高分子載體亦被稱為核酸傳送之 "golden standard"，可分為線性跟分枝結構。PEI 比起目前其他高分子之優點在於對於不同種類之細胞

株擁有較高之轉染效率，生物不可分解性為 PEI 做為核酸傳送載體缺點之一，同時其轉染效率與對細胞毒性亦與 PEI 之分子量有相關性。

雖然目前核酸傳送研發日益蓬勃發展，但大部份均集中於載體之化學性修飾改質及不斷載體新材料之發現，但因其化學結構分子不可更改性而缺乏臨床彈性應對空間，相對發展為核酸產品端所需考量之特性如安定性、劑型之發展、及臨床之適用性較少著墨。故本計劃即針對發展成功核酸產品所必需之配方做更深入開發與應用，我們將研究重點鎖定於加入雙性共聚高分子(Amphiphilic copolymers)界面活性劑於非病毒性載體之 miRNA 傳送系統。在眾多雙性共聚高分子中，以親水性 PEO(poly-ethylene oxide)及親油性 PPO(poly-propylene oxide)為架構之非離子性雙性共聚高分子(以三區段架構 PEO-PPO-PEO 最常被使用)因擁有特殊生物特性及彈性結構範圍能解決藥物輸送一些問題，而被廣泛使用於藥學及生物醫學之應用中，但往往被視為藥學賦形劑(如界面活性劑、凝膠形成(gelation)劑、及包覆(coating)藥物)之配方)，其作用只侷限於改變藥物之物理化學性質:如保護藥物免於被代謝系統降解，增加藥物溶解度，延長在體內滯留時間等，藥理活性作用之主軸仍集中於藥物本身，直到近年來許多研究實驗證實當結合了雙性共聚高分子界面活性劑(如 Pluronic (BASF))與抗癌藥物配方時，能夠控制及改變藥物原來對細胞之藥理基因表現，並被認為在治療癌症之抗藥性(抗癌藥物癌細胞細胞膜上抗藥性蛋白 Pgp 被 Pluronic 干擾並且細胞 ATP 被選擇性去除)等問題上有非常潛力發展空間，另外 PEO-PPO-PEO 共聚高分子更進一步結合了偵測、治療、監控三合一功能性分子(Theranostics)用於癌症個人化醫學(Personalized medicine)治療新趨勢，因此在生物科技突飛猛進之時代，雙性共聚高分子界面活性劑在藥理活性中所扮演之角色，尤其在細胞分子層次上之作用機轉，值得深入再研究。雖然較少被開發但目前 PEO-PPO-PEO 共聚高分子被使用於核酸傳送系統(主要集中於 pDNA 與 siRNA)之應用主要在增加病毒性(adenovirus and lentivirus)或非病毒性(lipid and polymer)複合體顆粒體外安定性與增加細胞轉染效率、於再生醫學支架之製備，利用 Pluronic 溫感性之特性來形成水凝膠以延長提昇基因表現、並且在無使用載體之核酸傳送能增加滯留時間來增進轉染效率。

研究方法

1. **實驗材料:** miRNA 以 mmu-miR-494-3p (miR-494; Guangzhou RiboBio Co., Ltd. (Guangzhou, China)作為模型；陽離子性高分子及脂質載體為 25 kDa Branched polyethylenimine (PEI; Sigma-Aldrich Co., USA) 及 Lipofectamine 2000 (Lipo; Invitrogen Corp., USA)。PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑以親水親油平衡值 HLB(hydrophilic-lipophilic balance)

高低不同物化特性作為影響傳送效率及細胞毒性效果，分別為 P407;F127; 及 P124，來自 Sigma-Aldrich Co.。本計畫以 MH-S (小鼠肺泡巨噬細胞 (murine alveolar macrophages (ATCC No. CRL-2019)))細胞株作為細胞模型，使用 5% CO₂，37°C 恆溫培養箱中培養，細胞培養液為 RPMI-1640 含 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum (FBS))。

2. 實驗步驟:

2.1 製備陽離子性高分子及脂質/ miRNA 複合體

將陽離子性高分子濃度之水溶液 (500 μ L ; 5 μ g/ μ L PEI) 及脂質 (500 μ L; 2:1 v (Lipo)/v(miR-494) ratio) 緩慢加入 miR-494 固定濃度水溶液 (500 μ L ; 50 nM)，以確保複合體的適當粒子大小，然後均勻混合靜置 30 分鐘以得到複合體。

2.2 細胞轉染、細胞毒性、細胞膜完整性、與免疫系統之生物相容性測試

在不同濃度溶液的轉染條件下加至細胞培養盤 (flat-bottom 6-well plate ; 80% confluence ; 1x 10⁶ cells/well) 於 37°C ; 5% CO₂ 細胞培養箱中作用 4 小時進行轉染，4 小時後更換培養液細胞繼續在培養箱中生長 24 小時。細胞毒性以加入 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Japan) 測定。

Cell Counting Kit-8 試劑中含有

WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-di-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]。WST-8 在電子攜帶者(1-MEthoxy PMS)的作用下被細胞粒線體中的去氫化酶還原成具高水溶性黃褐色的 Formazan dye (以分光光度計(450 nm 波長下之吸光值) 比較由活細胞的標準曲線計算而得))，由 Formazan dye 產生的量與細胞存活量成正比。細胞膜遭到毒害後細胞膜完整性破損因而釋放出 Lactate Dehydrogenase (LDH) 酵素至細胞培養液中，藉由加入可與 LDH 反應的呈色試劑 (490 nm 波長; TOX 7 in vitro toxicology assay kit (Sigma-Aldrich Co.))，即可測得細胞膜完整性的相關情形。免疫系統生物相容性則透過 MH-S 巨噬細胞測定免疫發炎反應 NO 自由基之釋放，MH-S 細胞培養後取 100 μ L 上清液加入 100 μ L Griess 試劑(1% sulphanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.0% phosphoric acid) 於室溫下作用 10 mins，測定 540 nm 波長下之吸光值(positive control: 0.1 μ g/mL LPS(Lipopolysaccharide))，再比較 nitrite (NaNO₂) 標準濃度曲線而間接得到 NO 自由基釋放量。

2.3 細胞轉染效率測試

細胞轉染效率細胞轉染效率將以 qRT-PCR(定量即時反轉錄聚合酶鏈式反應; Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain

Reaction)確認 mmu-miR-494-3p 目標細胞內之表現程度。首先我們將純化 MH-S 細胞 total RNA，細胞離心後以 TRIZOL reagent (phenol and guanidine isothiocyanate; Invitrogen)打碎細胞膜後，以 chloroform 進行相分離，之後水相之 RNA 以 isopropyl alcohol 沉澱物而出，RNA 沉澱物再以 75%酒精清洗並以空氣乾燥 10 分鐘，純化後之 total RNA 以 UV 分光光度計分析 E260/E280 的比值(應在 1.9 以上)，並以電泳法(1% agarose gel; 100V.;20min)檢視其結構之完整性(RNA integrity number (RIN) > 6)。而除了 28S 及 18S rRNA 有清楚的片段之外進行膠體的電泳其他區域應沒有其他肉眼可見的 rRNA 片段分布。接著 miRNA 之純化以 miRVana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies,USA)進行，並以 small RNA assay 在 Agilent Bioanalyzer 2100 管柱分析儀中進行定量。我們將以 RNA 樣本 (400 ng per reaction)進行核糖核酸的反轉錄 (reverse transcription)成 cDNA(TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA))，當 PCR 開始後與 DNA 序列相接合的探針會被帶有 DNA 聚合酶水解 5'端的螢光就會釋放，接著再加入 kappa probe Fast qPCR master mix kits (KapaBiosystems, Inc.,USA)進行放大反應(95°C for 2 min followed by 45 cycles (95°C for 5sec, 55°C for 20sec))。mmu-miR-494-3p 之序列為 RT: GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCC GAGGTATTTCGCACCAGAGCC AACGAGGTT;F: GGCTGAAACATACACGGGA。我們以 18 S (RT:GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCA ACTAATGATC;F:AGGTTTCCGTAGGTGAACC)做為 miRNA internal control，以 melting curve analysis (60°C to 99°C)中呈現一個 peak 來確認 PCR 放大反應之特異性。

結果與討論

PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 對於 MH-S 細胞毒性與細胞膜完整性之影響

由 Fig. 1 及 Fig. 2 得知：相對於 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑 P407 及 P124、F127 對於 MH-S 細胞、在測試最高劑量 20%下、細胞存活率及細胞膜完整性較低，然而所有 P407; P124;及 F127 均無顯著細胞毒性(細胞存活率均> 80%)及保持相當細胞膜完整性(>70%)。

Fig. 1A

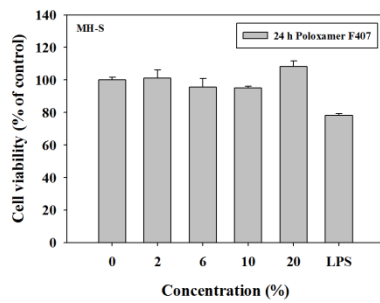


Fig. 1C

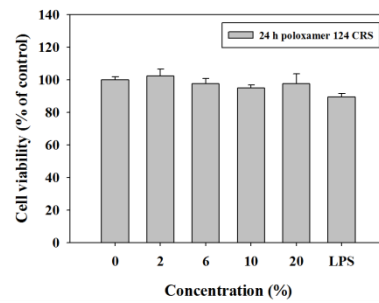


Fig. 1B

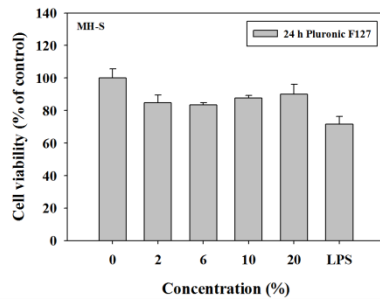


Fig. 1 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407 (Fig. 1A); P124(Fig. 1B);及 F127((Fig. 1C))) 對於 MH-S 細胞毒性之影響 (n=3)

Fig. 2A

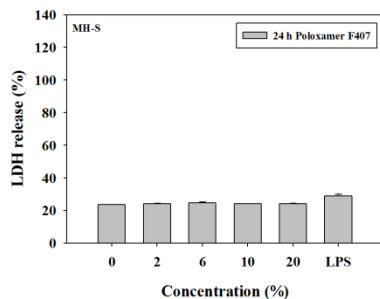


Fig. 2C

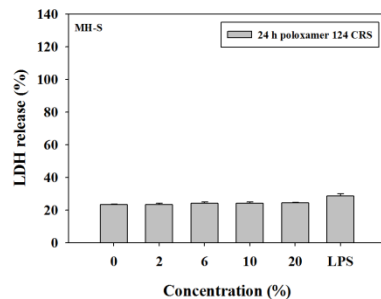


Fig. 2B

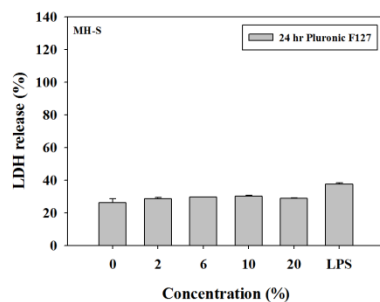


Fig. 2 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407 (Fig. 2A); P124(Fig. 2B);及 F127((Fig. 2C))) 對於 MH-細胞膜完整性之影響 (n=3)

PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統免疫系統之生物相容性之影響

由 Fig. 3 得知：所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407;

P124;及 F127) 、陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統、及界面活性劑於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統配方對 MH-S 巨噬細胞均無顯著免疫發炎反應 Nitrate 之釋放，均擁有極佳之免疫生物相容性。

Fig. 3

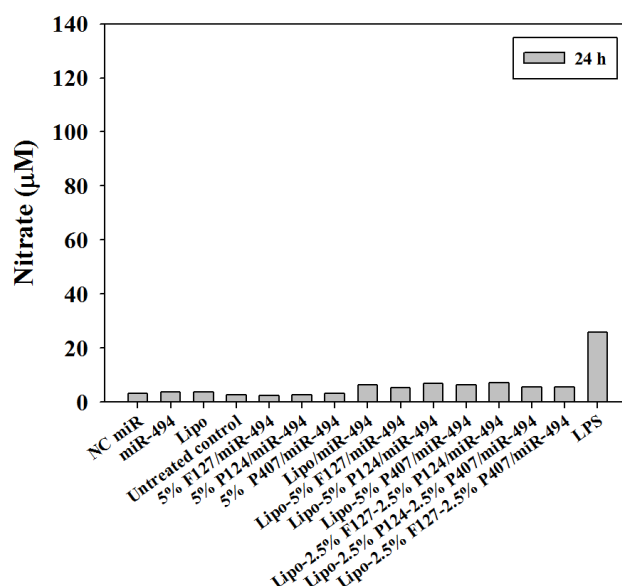


Fig. 3 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統免疫系統之生物相容性之影響 (n=3; positive control LPS)

PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統細胞膜完整性之影響

由 Fig. 4 得知：所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統提供了稍許細胞膜完整性之保護作用。

Fig. 4

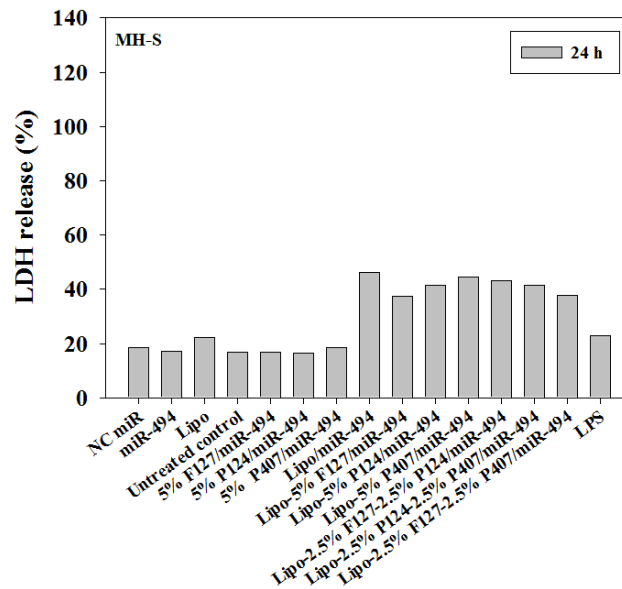


Fig. 4 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統免疫系統細胞膜完整性之影響 (n=3)

PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統細胞轉染效率之影響

由 Fig. 5 得知：所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 配方降低陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統之細胞轉染效率，其中尤以高親水性 F127 配方降低細胞轉染效率最多，另外；所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑、在無載體狀況下、亦無法提昇 miRNA 細胞轉染效率。

Fig. 5

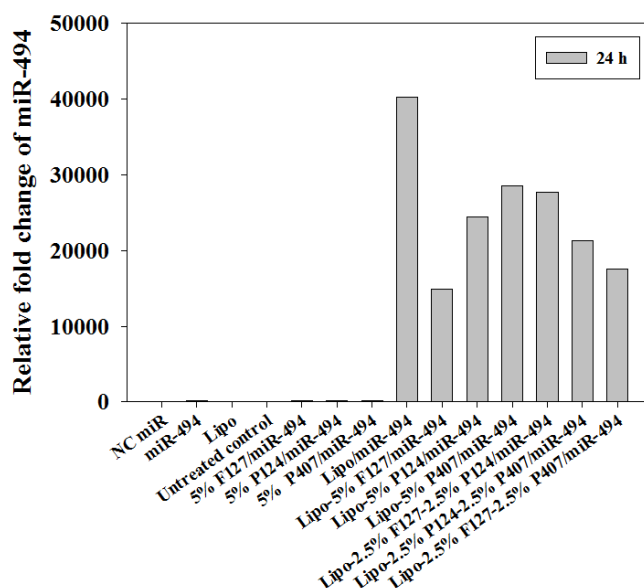


Fig. 5 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統細胞轉染效率之影響 (n=3; negative control: NC miRNA(miR; random sequence))

PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑配方對於陽離子性高分子 (PEI)/ miRNA 傳送系統之影響

與未加入高分子界面活性劑相比、所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 配方對於 PEI/ miRNA 傳送系統細胞轉染效率均能維持相當程度($p>0.05$)，並且對於 PEI/ miRNA 傳送系統提昇 20-30% 細胞膜完整性之保護作用亦擁有極佳之免疫生物相容性。綜合上述，所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 、在測試最高劑量 20%下、對於 MH-S 巨噬細胞均無顯著細胞毒性及保持相當細胞膜完整性。同時所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑 (P407; P124;及 F127) 配方對 MH-S 巨噬細胞均擁有極佳之免疫生物相容性(無顯著免疫發炎反應 Nitrate 之釋放)，對於陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統提供了稍許細胞膜完整性之保護作用，然而降低陽離子性脂質/ miRNA 傳送系統之細胞轉染效率。相反地、所有 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑(P407; P124;及 F127) 配方對於 PEI/ miRNA 傳送系統細胞轉染效率均能維持與未加入高分子界面活性劑相當程度，並且對於 PEI/ miRNA 傳送系統提 細胞膜完整性之保護作用亦擁有極佳之免疫生物相容性。總之 PEO-PPO-PEO 共聚高分子界面活性劑最大貢獻在於提供細胞毒性之保護作用，而細胞轉染效率之影響在於載體之種類選擇。

參考文獻

- [1] Shahryari A, Saghaeian Jazi M, Mohammadi S, Razavi Nikoo H, Nazari Z, Hosseini ES, Burtscher I, Mowla SJ, Lickert H. Development and Clinical Translation of Approved Gene Therapy Products for Genetic Disorders. *Front Genet.* 2019;10:868.
- [2] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):203-222.
- [3] Uludag H, Ubeda A, Ansari A. At the Intersection of Biomaterials and Gene Therapy: Progress in Non-viral Delivery of Nucleic Acids. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:131.
- [4] Buck J, Grossen P, Cullis PR, Huwyler J, Witzigmann D. Lipid-Based DNA Therapeutics: Hallmarks of Non-Viral Gene Delivery. *ACS Nano.* 2019;13(4):3754-3782.
- [5] Jiang C, Chen J, Li Z, Wang Z, Zhang W, Liu J. Recent advances in the development of polyethylenimine-based gene vectors for safe and efficient gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019;16(4):363-376.
- [6] Labatut AE, Mattheolabakis G. Non-viral based miR delivery and recent developments. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;128:82-90.
- [7] Khaliq NU, Park DY, Yun BM, Yang DH, Jung YW, Seo JH, Hwang CS, Yuk SH. Pluronics: Intelligent building units for targeted cancer therapy and molecular imaging. *Int J Pharm.* 2019;556:30-44.
- [8] Rey-Rico A, Cucchiari M. PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine-An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
- [9] Shu H, Zhang Y, Zhang M, Wu J, Cui M, Liu K, Wang J. Addition of free poloxamer 407 to a new gene vector P407-PEI-K12 solution forms a sustained-release *in situ* hydrogel that enhances cell transfection and extends gene expression. *Oncol Lett.* 2019;17(3):3085-3096.

109年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：郭榮華			計畫編號：109-2637-E-041-004-		
計畫名稱：雙性共聚高分子面活性劑於陽離子性高分子微RNA傳送系統配方之應用					
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇	
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇	
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	1		林嘉緯(中山醫學大學)
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)			本計劃研究可擴展至產學相關合作領域，故預期能在技術移轉或專利質與量獲得進展及良性回饋。		