

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

陽離子性高分子微RNA傳送系統溫感式長效注射劑型之開發

報告類別：成果報告

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 110-2637-E-041-001-

執行期間：110年08月01日至111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
(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 111 年 08 月 25 日

中文摘要：微RNA(microRNA; miRNA)治療提供各類疾病之新治療目標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。目前核酸傳送系統研發蓬勃發展，但核酸產品端所需考量之特性如劑型之發展較少著墨。故本計劃鎖定智慧型溫感式聚氧乙烯(PEO(poly-ethylene oxide))-聚氧丙烯(PP0(poly-propylene oxide))-聚氧乙烯 嵌段共聚高分子(Poloxamer 407 (P407))為基底之陽離子性高分子聚乙炔亞胺(polyethylenimine (PEI))/miRNA長效注射劑型配方之開發，來達成緩釋及降低系統性副作用之效果。由流變動態力學分析可得知：當P407濃度減少時sol-gel轉換溫度隨著上升；其中當P407濃度減少為5% w/v時，水膠 sol-gel轉換溫度約為 36.5℃，達到人體目標溫度範圍(35-37℃)。P407(5% w/v) 水膠之溶蝕重量損失率隨時間增加而增加。在室溫下、P407(5% w/v) 水膠配方可順利通過22-gauge針頭。體外溶離測試顯示P407(5% w/v) 水膠配方具有緩釋miR之效果。與未加入P407(5% w/v)相比、加入P407(5% w/v) 之PEI/miR傳送系統配方均能維持較高HeLa細胞存活率與細胞膜完整性。總之、P407(5% w/v) 水膠配方滿足了溫感式PEI/miRNA長效注射劑型之必要條件，也為下一步進入臨床測試條件提供堅實的基礎。

中文關鍵詞：微RNA；聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚高分子；陽離子性高分子；溫感式長效注射劑型；sol-gel轉換溫度

英文摘要：MicroRNA (microRNA; miRNA) therapy provides new therapeutic targets for various diseases as the recent booming trend of nucleic acid therapy. However, the establishment of a miRNA delivery system remains a key factor in its clinical success. At present, the research and development of nucleic acid delivery systems is booming, but the characteristics that need to be considered at the nucleic acid product side, such as the development of dosage forms, are less focused. Therefore, this project focuses on the development of cationic polymer polyethylenimine (PEI)/miRNA long-acting injection formulations based on the intelligent temperature-sensitive polyoxyethylene (PEO (poly-ethylene oxide))-PP0 (poly-propylene oxide))-PEO block copolymer (Poloxamer 407 (P407)) to achieve sustained release and reduce systemic side effects. From the rheological dynamic mechanical analysis, it can be known that when the concentration of P407 decreases, the transition temperature of sol-gel increases. Among them, when the concentration of P407 is reduced to 5% w/v, the transition temperature of the sol-gel is about 36.5 °C, reaching the target temperature range of the human body (35-37 °C). Erosion weight loss rate of P407(5% w/v) hydrogel increases with time. At room temperature, the P407 (5% w/v) hydrogel formulation passes smoothly through a 22-gauge needle. In vitro dissolution test shows that P407 (5% w/v) hydrogel formulation has the effect of slow release of

miR. Compared with no P407 (5% w/v), the PEI/miR delivery system formulation with P407 (5% w/v) maintained higher HeLa cell viability and cell membrane integrity. In conclusion, the P407 (5% w/v) hydrogel formulation satisfies the necessary conditions for a temperature-sensitive PEI/miRNA long-acting injection formulation, and also provides a solid foundation for the next step into clinical testing conditions.

英文關鍵詞：MicroRNA; PEO-PP0-PEO block copolymer; cationic polymer; temperature-sensitive long-acting injection formulations; sol-gel transition temperature

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·····	4
參考文獻·····	10

中文摘要

微 RNA(microRNA; miRNA)治療提供各類疾病之新治療目標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。目前核酸傳送系統研發蓬勃發展，但核酸產品端所需考量之特性如劑型之發展較少著墨。故本計劃鎖定智慧型溫感式聚氧乙烯(PEO(poly-ethylene oxide))-聚氧丙烯(PPO(poly-propylene oxide))-聚氧乙烯 嵌段共聚高分子(Poloxamer 407 (P407) 為基底之陽離子性高分子聚乙烯亞胺(polyethylenimine (PEI))/miRNA 長效注射劑型配方之開發，來達成緩釋及降低系統性副作用之效果。由流變動態力學分析可得知：當 P407 濃度減少時 sol-gel 轉換溫度隨著上升；其中當 P407 濃度減少為 5% w/v 時，水膠 sol-gel 轉換溫度約為 36.5°C，達到人體目標溫度範圍(35-37°C)。P407(5% w/v) 水膠之溶蝕重量損失率隨時間增加而增加。在室溫下、P407(5% w/v) 水膠配方可順利通過 22-gauge 針頭。體外溶離測試顯示 P407(5% w/v) 水膠配方具有緩釋 miR 之效果。與未加入 P407(5% w/v)相比、加入 P407(5% w/v) 之 PEI/miR 傳送系統配方均能維持較高 HeLa 細胞存活率與細胞膜完整性。總之、P407(5% w/v) 水膠配方滿足了溫感式 PEI/miRNA 長效注射劑型之必要條件，也為下一步進入臨床測試條件提供堅實的基礎。

關鍵詞：微 RNA；聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚高分子；陽離子性高分子；溫感式長效注射劑型；sol-gel 轉換溫度

英文摘要

MicroRNA (microRNA; miRNA) therapy provides new therapeutic targets for various diseases as the recent booming trend of nucleic acid therapy. However, the establishment of a miRNA delivery system remains a key factor in its clinical success. At present, the research and development of nucleic acid delivery systems is booming, but the characteristics that need to be considered at the nucleic acid product side, such as the development of dosage forms, are less focused. Therefore, this project focuses on the development of cationic polymer polyethylenimine (PEI)/miRNA long-acting injection formulations based on the intelligent temperature-sensitive polyoxyethylene (PEO (poly-ethylene oxide))-PPO (poly-propylene oxide))-PEO block copolymer (Poloxamer 407 (P407)) to achieve sustained release and reduce systemic side effects. From the rheological dynamic mechanical analysis, it can be known that when the concentration of P407 decreases, the transition temperature of sol-gel increases. Among them, when the concentration of P407 is reduced to 5% w/v, the transition temperature of the sol-gel is about 36.5 °C, reaching the target temperature range of the human body (35-37 °C). Erosion weight loss rate of P407(5% w/v) hydrogel increases with time. At room temperature, the P407 (5% w/v) hydrogel formulation passes smoothly through a 22-gauge needle. In vitro dissolution test shows that P407 (5% w/v) hydrogel formulation has the effect of slow release of miR. Compared with no P407 (5% w/v), the PEI/miR delivery system formulation with P407 (5% w/v) maintained higher HeLa cell viability and cell membrane integrity. In conclusion, the P407 (5% w/v) hydrogel formulation satisfies the necessary conditions for a temperature-sensitive PEI/miRNA long-acting injection formulation, and also provides a solid foundation for the next step into clinical testing conditions.

Keywords: MicroRNA; PEO-PPO-PEO block copolymer; cationic polymer; temperature-sensitive long-acting injection formulations; sol-gel transition temperature

前言

微 RNA(microRNA; miRNA)治療提供各類疾病之新治療目標為最近蓬勃發展的基因治療趨勢，非病毒性基因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，然而 miRNA 非病毒性傳送系統劑型之發展仍較少著墨。本計劃研究重點鎖定以智慧型溫感式 PEO(poly-ethylene oxide)-PPO(poly-propylene oxide)-PEO 嵌段共聚高分子為基底之陽離子性高分子/miRNA 長效注射劑型配方之開發，來達成緩釋、降低系統性副作用、及增進病人順從性之效果，尤其適用於慢性疾病或癌症治療。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

本計畫將聚焦於智慧型溫感式 PEO-PPO-PEO 嵌段共聚高分子為基底之陽離子性高分子/miRNA 長效注射劑型配方之開發，以發展成為高效率、高精準、及低毒性之非病毒性 miRNA 傳送系統。

文獻探討

隨著基因載體 (vectors)的改進，嵌合抗原受體(chimeric antigen) T 細胞免疫治療的興起以及基因組編輯(genome editing)技術的突破，基因治療(gene therapy)再次回到疾病治療的焦點。miRNA 是小的無蛋白質編碼 RNA，會對基因表達產生負面影響，自從 1993 年被發現以來，已經發現大約 2500 種人類成熟的 miRNA，由病理學許多的證據顯示許多疾病與異常的 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，故在癌症治療上比沉默單一訊息傳導路徑來得有利。miRNA 作為藥物的廣泛臨床應用取於傳送系統之成功建構，所以尋找一個具有安全性而且有效率的傳送方式是目前發展 miRNA 治療的關鍵。非病毒性載體傳送方式是由 miRNA 與非病毒性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，在一段時間後沉默目標基因。除了擁有較病毒性載體毒性低及低免疫抗原性(immunogenicity)、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使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。陽離子性高分子非病毒性載體、相對於小分子脂質、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)作用並在細胞內可保護及有效傳送 miRNA 至目標。

目前核酸傳送系統研發日新月異蓬勃發展，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，發展為核酸產品端所需考量之特性如劑型之發展及臨床之適用性較少著墨。長效注射(long acting injectable)劑型主要可降低給藥頻率、增進病人順從性(如精神科用藥)、並降低副作用，理想長效注射配方適用於慢性疾病或癌症治療、在治療範圍濃度內、必需能傳送藥物於預先設計之可控制速率一段長時間。常用長效注射高分子以 in situ forming 設計能以正常注射器注射於人體並在體內形成凝膠或黏稠 depot 形式而藥物可緩釋一段長時間數天或月。溫感式水膠材料，溫度啟動相變化(sol-gel 轉換、人體溫度 37°C)、液體膨潤形成三度網狀凝膠結構而達藥物緩釋效果。此類水膠高分子擁有低臨界溶液溫度(lower critical solution temperature (LCST))特性，當外界溫度低於水膠高分子 LCST 為溶解狀態，當外界溫度高於 LCST 高分子從溶液中相分離而形成凝膠狀態，此類相變化為可逆性(reversible)，其相變化乃由於溫度增加、高分子之疏水性而增加亂度或構形變化(如 micelle packing、coil to helix transition)導致自由能減少而形成凝膠結構。

熱感可逆式嵌段共聚高分子 PEO-PPO-PEO 之 poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO)-based systems，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。相較於微脂粒(liposomes)與奈米顆粒、PEO-PPO-PEO 嵌段共聚高分子在水溶液中可自發性形成微胞(micelles; 由溫度及濃度同時決定狀態)，除了擁有親油性 PPO 核心(core)可容納親油性藥物及對照劑等分子與外層 corona 擁有親水性 PEO 可抵抗免疫系統外吞作用來增進血液循環時間及安定性外，不需繁複製備純化過程並且有較佳儲存與體液安定性、成本較低、與外層可彈性化學修飾功能性分子等諸多優點，也被美國藥典視為安全物質(“Generally Recognised as Safe” (GRAS)(FDA))。PEO-PPO-PEO 共聚高分子對某些特定結構會在溫度升高至 37°C 人體溫度(高於 LCST)時，由於親油性 PPO 作用增強堆積來降低表面張力形成而中心正方體相凝膠 (body-centered cubic phase gels)呈現 sol-gel 轉換而被視為智慧型緩釋注射劑型。水凝膠為包含水與三度交連網狀固體所組成之分散系統，而固體為連續相液體則為固定相。一般在特定 EO 比率下，愈長之 PO 凝膠轉換溫度愈低，而 poloxamers (14.8% Pluronic F127)之 sol-gel 轉換溫度之濃度低於 poloxamines (30% Tetronic 1107)。一般 Pluronic F127 會與其他比率 Pluronic (如 F68)之共同使用來調整凝膠轉換溫度，然而加入過多濃度之 F68 會降低凝膠轉換溫度。Pluronic 由於擁有多晶型轉換之特性，視不同 EO 比率而定其轉換為凝膠態包含了液態及固態而被應用於藥學配方中之乳化、助溶、及分散劑使用。藥物在 Pluronic F127 凝膠之釋放主要由藥物經凝膠中之水道(water channels)擴散及凝膠 matrix 本身溶離共同產生。

研究方法

1. **實驗材料:** miRNA 以 mmu-miR-494-3p(miR-494; Guangzhou RiboBio Co., Ltd. (Guangzhou, China))及 Cy3 橘紅螢光染料(excitation 547 nm ; emission 563 nm)標記 mmu-miR-494-3p (miR-494- Cy3; Guangzhou RiboBio Co.)作為模型; 陽離子性高分子載體為 25 kDa Branched polyethylenimine (PEI; Sigma-Aldrich Co., USA)◦PEO-PPO-PEO 嵌段共聚高分子界面活性劑 Poloxamer 407 (P407; Pluronic F127)、果膠(from citrus peel; Galacturonic acid $\geq 74.0\%$ (dried basis)、以及鈣離子(CaCl_2)、來自 Sigma-Aldrich Co.◦本計畫以 HeLa (human cervical cancer cells; 人類子宮頸癌)細胞株作為細胞模型, 使用 5% CO_2 , 37°C 恆溫培養箱中培養, 細胞培養液為 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)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/ miRNA 複合體

將陽離子性高分子濃度之水溶液 (500 μL ; 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PEI) 緩慢加入 miR-494 固定濃度水溶液 (500 μL ; 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 溫感式 Poloxamer 407 水膠之配方

適當重量之 P407、於 4°C 下緩慢加入 PBS 中、並固定保持攪拌條件下形成水溶液, 並過夜放置於 4°C 冰箱中形成透明水膠溶液。同樣地各種添加適量之、PEI/ miRNA 複合體、果膠、及鈣離子(CaCl_2)、P 407 水膠配方亦相同地於 4°C 下製備並保存備用。

2.3 水膠之 sol-gel 轉換溫度分析

在 sol-gel 轉換溫度時、LCST 溫感式水膠流體力學性質產生劇烈變化, 當溫度大於 sol-gel 轉換溫度時水膠是凝膠狀態、而溫度小於 sol-gel 轉換溫度時水膠為液體狀態, 我們的目標為 sol-gel 轉換溫度接近人體溫度 (35-37°C) 為凝膠狀態。本計畫採用流變與黏彈性研究之動態力學分析 (dynamic mechanical analysis; 旋轉式(a cone-partitioned-plate fixture)流變儀(ARES G2; TA instruments; USA; 國立成功大學化學工程學系))進行、即施以一個小振盪式應力而分析其所產生之應變、彈性物質應力與應變沒有相差、而黏性物質應變之黏滯相差為 phase angle $\delta=90^\circ$ 、得到二個重要參數: 剪力儲存(彈性)模數(shear storage (elastic) modulus (G')) 及剪力損失(黏度)模數(shear loss (viscosity) modulus (G''))。 G' 代表儲存彈性能量特性、而 G'' 代表黏度損失能量特性、當 G' 愈高時彈性特性愈顯著、反之 G'' 愈高時黏性特性愈顯著。對理想彈性行為則 $G' \gg G''$ 、而理想黏性行為則 $G' \ll G''$ 。水膠水溶液在 sol 狀態 $G' > G''$ 、在凝膠點 $G' = G''$ ($\tan \delta =$

1; $\delta=45^\circ$)、在 gel 狀態 $G'' < G'$ 、而 G'' 數值大小亦可做為水膠機械強度之判斷指標。流變儀操作條件:模式 :oscillation - temperature ramp; 溫度範圍:25~40°C; 升溫速率 : $1^\circ\text{C}/\text{min}$; strain : 1.25%; frequency : 10 rad/s。

2.4 水膠配方之溶蝕性(erosion) 測試

水膠配方之 PBS 水溶液置於事先稱重之微量離心管內於 37°C 並置之 50 rpm 恆溫震盪式水浴槽中，並於水膠形成後加入 1.5 mL PBS 水溶液並稱重，每隔一段時間吸走上層之液體並再次記錄重量，我們以稱得之減少水膠重量除以一開始之水膠重量來表示水膠配方之溶蝕性。

2.5 水膠配方水溶液注射性測試

我們使用 22-gauge 針頭注射器(3 mL; Becton- Dickson & Co. USA)模擬肌肉給藥途徑，將 2mL 水膠配方水溶液注入 37°C 之 PBS 水溶液中，並記錄注射之順暢性以了解是否可用於實際臨床之使用。

2.6 水膠配方體外溶離測試(*in vitro* dissolution test)

我們採用無薄膜擴散系統(membrane-less diffusion system)進行測試，水膠配方(以 Cy3 橘紅螢光染料(excitation 547 nm ; emission 563 nm)標記 mmu-miR-494-3p)置放於 5 mL 試管中並放置於 37°C 之 50 rpm 恆溫震盪式水浴槽中，1.5 mL PBS 溶離液置放於水膠上方、並每隔 2 小時吸取上方溶離液置放等量之溶離液並分析 Cy3 螢光強度、可得知溶離曲線。

2.7 細胞毒性與細胞膜完整性測試

水膠配方加至 HeLa 細胞培養盤 (flat-bottom 96-well plate ; 10^4 cells/well)於 37°C ; 5% CO_2 在細胞培養箱中生長。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。

結果與討論

水膠配方之 sol-gel 轉換溫度分析

由流變動態力學分析可得知:當 P407 濃度減少時 sol-gel 轉換溫度

隨著上升；其中 P407 20% w/v 之配方在室溫時已成形為水膠狀態，故不符合人體注射劑型之使用 (Figure 1)。當 P407 濃度減少為 10% w/v 時、水膠 sol-gel 轉換溫度上升至約為 27°C，然而亦未達到人體目標溫度範圍(35-37°C) (Figure 2)。最後當 P407 濃度減少為 5% w/v 時，水膠 sol-gel 轉換溫度約為 36.5°C，達到人體目標溫度範圍(35-37°C) (Figure 3)。繼續減少 P407 濃度至 5% w/v 以下，水膠 sol-gel 轉換溫度皆超過 39°C，故不適用於人體長效注射劑型使用。接著我們發現加入 PEI/ miRNA 複合體於 P407(5% w/v)配方中，水膠 sol-gel 轉換溫度(約 36.3 °C)與 P407(5% w/v)配方之 sol-gel 轉換溫度(約 36.5 °C)沒有顯著差別，均落於目標溫度範圍(35-37°C)內。最後當加入果膠(2% w/v; 5mM CaCl₂)於 P407(5% w/v)配方中，sol-gel 轉換溫度下降至室溫時即為水膠狀態，雖然如文獻報導果膠對於機械強度有提昇效果，然而加入果膠配方不適用於溫感式注射劑型之應用。

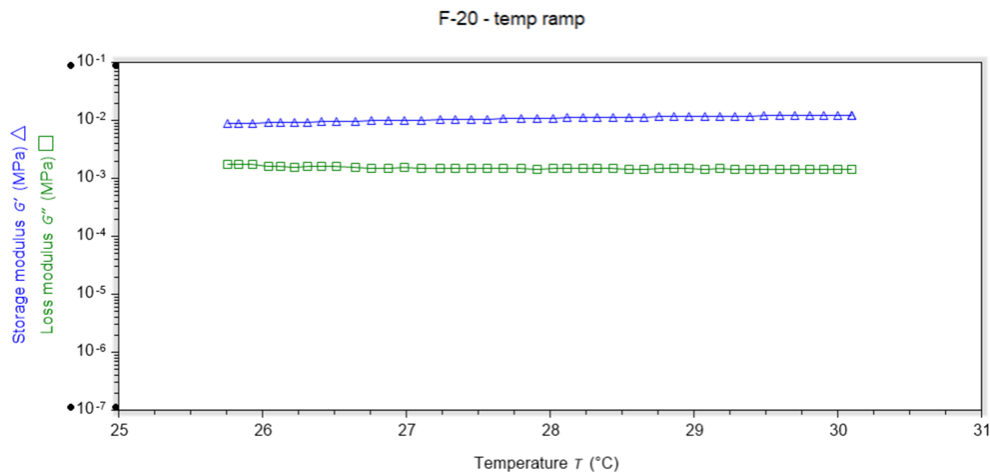


Fig. 1 P407(20% w/v) 之流變動態力學分析

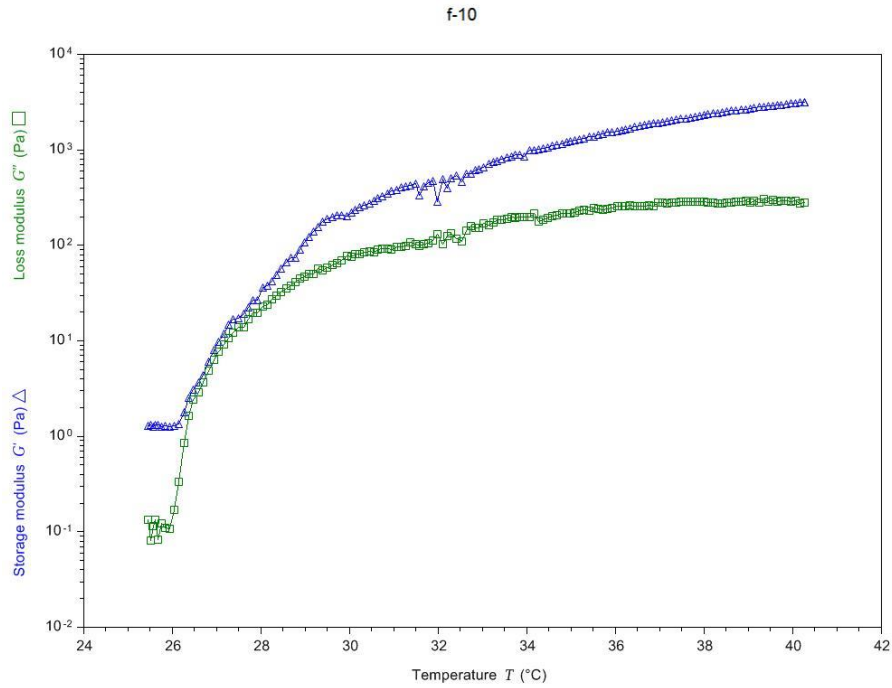


Fig. 2 P407(10% w/v) 之流變動態力學分析

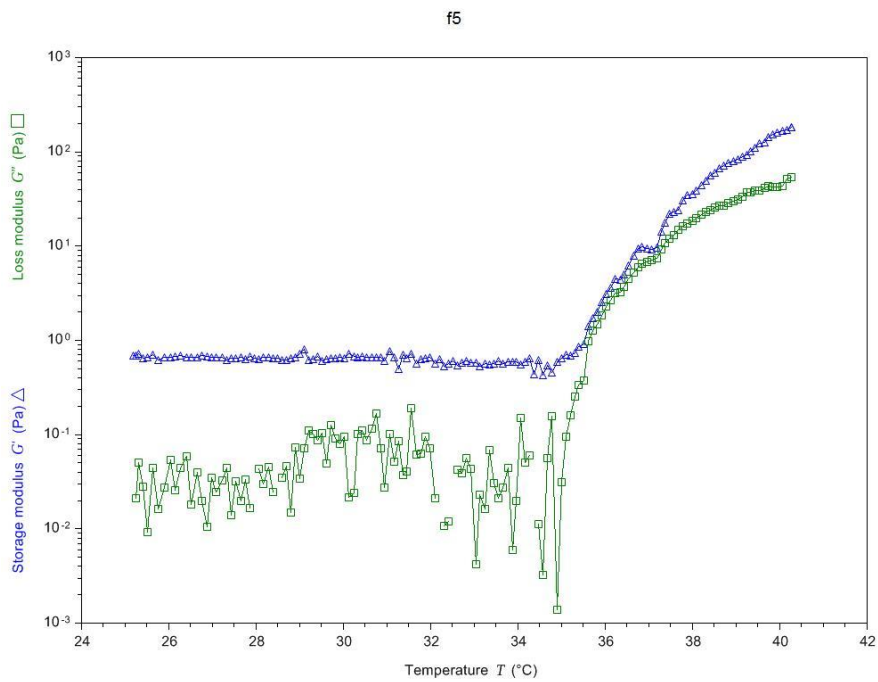


Fig. 3 P407(5% w/v) 之流變動態力學分析

水膠配方之溶蝕性測試

由 Fig. 4 得知 P407(5% w/v) 水膠之溶蝕重量損失率隨時間增加而增加，在 12 hr 時、水膠溶蝕重量損失率只有 $4.2 \pm 1.2\%$ 、表示水膠三度空間結構仍維持一定緊密度，在 96 hr 時、水膠溶蝕重量損失率達到 $31.5 \pm$

3.4%、亦顯示水膠網狀結構已被水溶液滲入而導致網狀結構之孔洞已被打開。

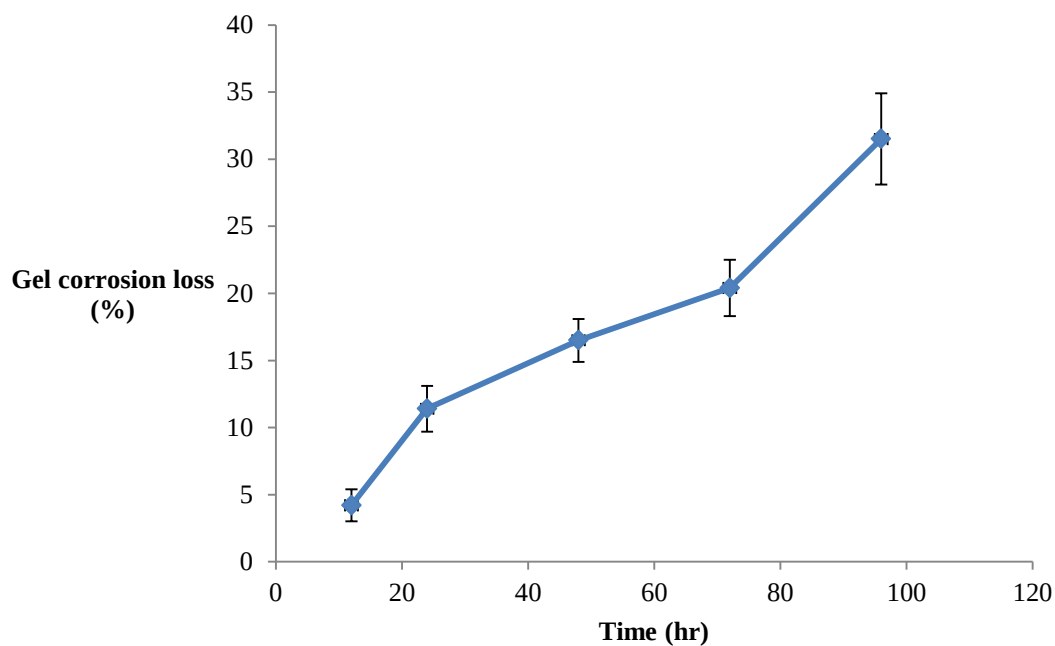


Fig. 4 P407(5% w/v) 之溶蝕性分析 (n=3)

水膠配方水溶液注射性測試

P407(5% w/v) 在室溫及 37°C 下之 sol-gel 狀態轉變如 Fig. 5 及 Fig. 6。在室溫下、P407(5% w/v) 水膠配方如同水溶液般可順利通過 22-gauge 針頭。



Fig. 5 在室溫下 P407(5% w/v) 之 sol 狀態

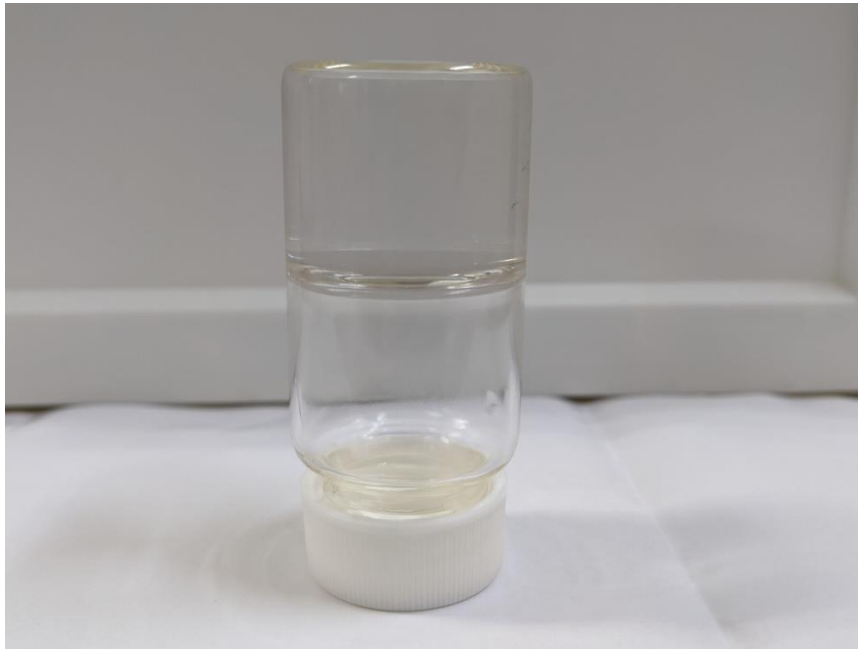


Fig. 6 在 37°C 下 P407(5% w/v) 之 gel 狀態

水膠配方體外溶離測試

由 Fig. 7 得知：直到 12 hr 時、miR-494- Cy3 才有釋放，而 12 hr 之後、miR-494- Cy3 呈現緩和之釋放，並在 288hr 時、miR-494- Cy3 幾近全部釋放完畢；同時對比於溶蝕重量損失試驗、miR-494- Cy3 之體外溶離時間較長，亦顯示穿透 P407(5% w/v) 水膠網狀結構亦延遲了 miR-494- Cy3 之釋放；其中有可能陽離子性性高分子/ miRNA 複合體穿越水膠網狀結構鍵結水及陽離子性高分子電荷之阻抗效應加乘所造成。

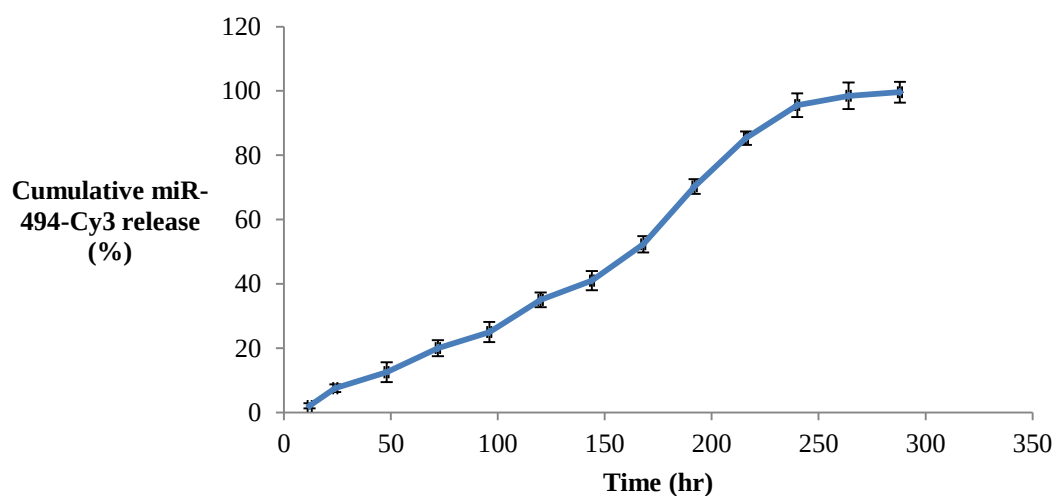


Fig. 7 P407(5% w/v) 之體外溶離分析 (n=3)

細胞毒性與細胞膜完整性測試

雖然體外測試時間較長(288 hr)，但因細胞生長至 48 hr 已接近佈滿細胞測試孔盤，故本實驗只測試至 48 hr。與未加入 P407(5% w/v)相比、加入 P407(5% w/v) 之 PEI/miR-494 傳送系統配方均能維持較高細胞存活率與細胞膜完整性(Fig. 8 及 Fig.9)。P407(5% w/v) 水膠配方提供細胞膜保護作用，然而受限於計劃時限，未能完成 P407(5% w/v) 之 PEI/miR-494 傳送系統水膠配方細胞轉染效率評估。總之、P407(5% w/v) 水膠配方滿足了溫感式陽離子性高分子/miRNA 長效注射劑型之必要條件，也為下一步進入臨床測試條件提供堅實的基礎。

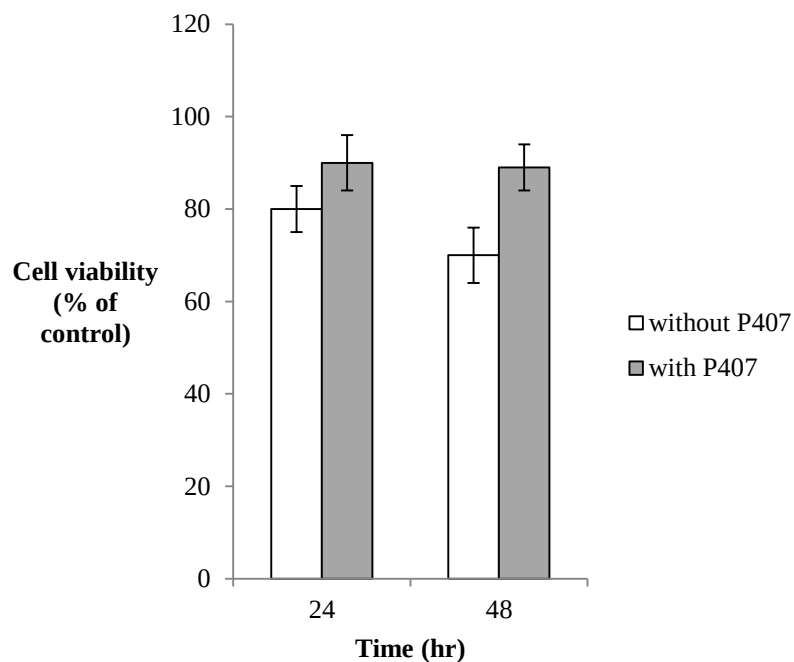


Fig. 8 P407(5% w/v) 之 PEI/miR-494 傳送系統配方對於 HeLa 細胞毒性之影響 (n=3; positive control (100%): untreated cells)

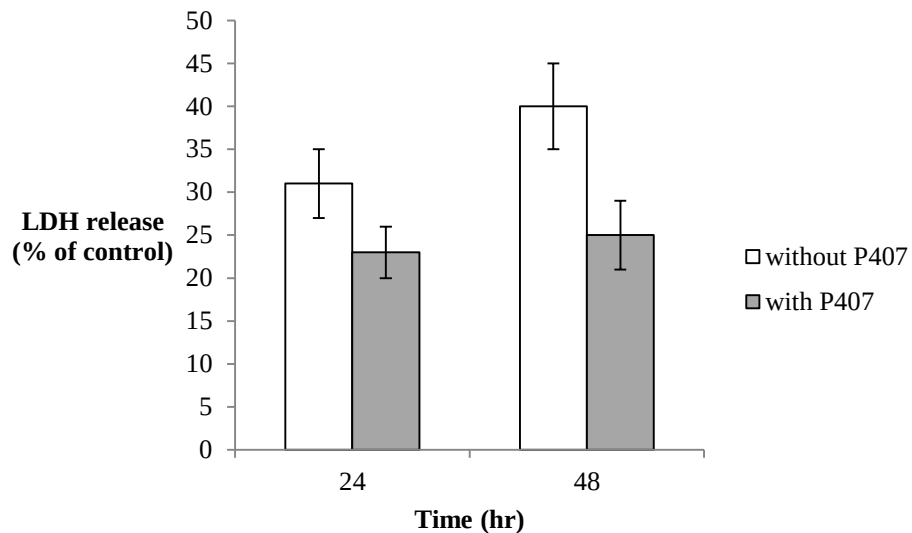


Fig. 9 P407(5% w/v) 之 PEI/miR-494 傳送系統配方對於 HeLa 細胞膜完整性之影響 (n=3; negative control (100%): untreated cells)

參考文獻

- [1] Ma CC, Wang ZL, Xu T, He ZY, Wei YQ. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol Adv.* 2020;40:107502.
- [2] Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell.* 2019;179(5):1033-1055.
- [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] Mollaei H, Safaralizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):12369-12384.
- [5] Jiao Y, Xia ZL, Ze LJ, Jing H, Xin B, Fu S. Research Progress of nucleic acid delivery vectors for gene therapy. *Biomed Microdevices.* 2020;22(1):16.
- [6] Bono N, Ponti F, Mantovani D, Candiani G. Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar!. *Pharmaceutics.* 2020;12(2):183.
- [7] Chatterjee S, Chi-Leung Hui P. Review of Stimuli-Responsive Polymers in Drug Delivery and Textile Application. *Molecules.* 2019;24(14):2547.
- [8] Zarrintaj P, Ramsey JD, Samadi A, et al. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2020;110:37-67.
- [9] Abdeltawab H, Svirskis D, Sharma M. Formulation strategies to modulate drug release from poloxamer based in situ gelling systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020;17(4):495-509.
- [10] Shu H, Zhang Y, Zhang M, et al. 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.

- [11] Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709-2728.
- [12] Martău GA, Mihai M, Vodnar DC. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector-Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers (Basel)*. 2019;11(11):1837.

110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：110-2637-E-041-001-		
計畫名稱：陽離子性高分子微RNA傳送系統溫感式長效注射劑型之開發					
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	0		
		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。)			本計劃研究為挑戰性的研究課題，其發展潛力在於取代傳統藥物無法達成之效果。本實驗室長期來對於高分子核酸載體材料有著實質研發成果，對於國內在分子生醫材料研發領域當有所助益。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。		