



(21)申請案號：100126252

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 25 日

(51)Int. Cl. : C12N15/67 (2006.01)

C12N15/87 (2006.01)

C08B37/08 (2006.01)

C08G73/04 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：王麗芳 WANG, LI FANG (TW)；宋國勳 SUNG, KUO HSUN (TW)；羅于倫 LO, YU LUN (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

WO 2010083039A1

2008 年 08 月 13 日，Low molecular weight polyethylenimine grafted N-maleated chitosan for gene delivery: properties and in vitro transfection studies, Lu B, Biomacromolecules, 2008, vol.9, pp: 2594-2600

2009 年 05 月 18 日，Gene expression, biodistribution, and pharmacoscintigraphic evaluation of chondroitin sulfate-PEI nanoconstructs mediated tumor gene therapy, Pathak A, ACS Nana 2009 3(6):1493-505

審查人員：林桂滿

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：14 共 0 頁

(54)名稱

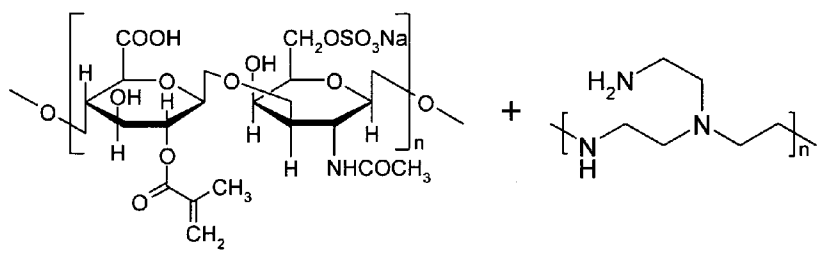
聚乙烯亞胺接枝醣的共聚物做為基因載體

POLYSACCHARIDE-GRAFTED POLYETHYLENIMINE AS A GENE CARRIER

(57)摘要

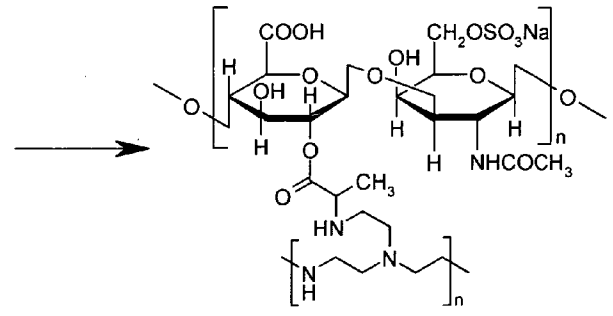
本案公開一種基因載體及其製備方法，係將硫酸化軟骨素與甲基丙醯酸酐進行反應，以獲得硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，再將聚乙烯亞胺與硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯進行麥可加成反應而形成共價鍵結，以形成該基因載體。該基因載體可有效降低聚乙烯亞胺的細胞毒性，並增加聚乙烯亞胺轉染基因的能力。

The present invention discloses a gene carrier and the preparation method thereof. Chondroitin sulfate (CS) is reacted with methacrylic anhydride (MA) to form chondroitin sulfate-methacrylate (CSMA), which is further covalently bound with polyethylenimine (PEI) using the Michael addition to afford the CSMA-PEI gene carrier. The CSMA-PEI gene carrier can effectively reduce the cytotoxicity of PEI and enhance the transfection efficiency of PEI.



CSMA

Polyethylenimine (PEI)



CSMA-polyethylenimine (CSMA-PEI)

反應方程式 II

## 公告本

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100126752

※申請日：100.07.25

※IPC分類：

C12N 15/67 (2006.01)

15/87 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C08B 37/08 (2006.01)

聚乙烯亞胺接枝糖的共聚物做為基因載體

C08G 73/04 (2006.01)

POLYSACCHARIDE-GRAFTED POLYETHYLENIMINE AS A GENE CARRIER

## 二、中文發明摘要：

本案公開一種基因載體及其製備方法，係將硫酸化軟骨素與甲基丙醯酸酐進行反應，以獲得硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，再將聚乙烯亞胺與硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯進行麥可加成反應而形成共價鍵結，以形成該基因載體。該基因載體可有效降低聚乙烯亞胺的細胞毒性，並增加聚乙烯亞胺轉染基因的能力。

## 三、英文發明摘要：

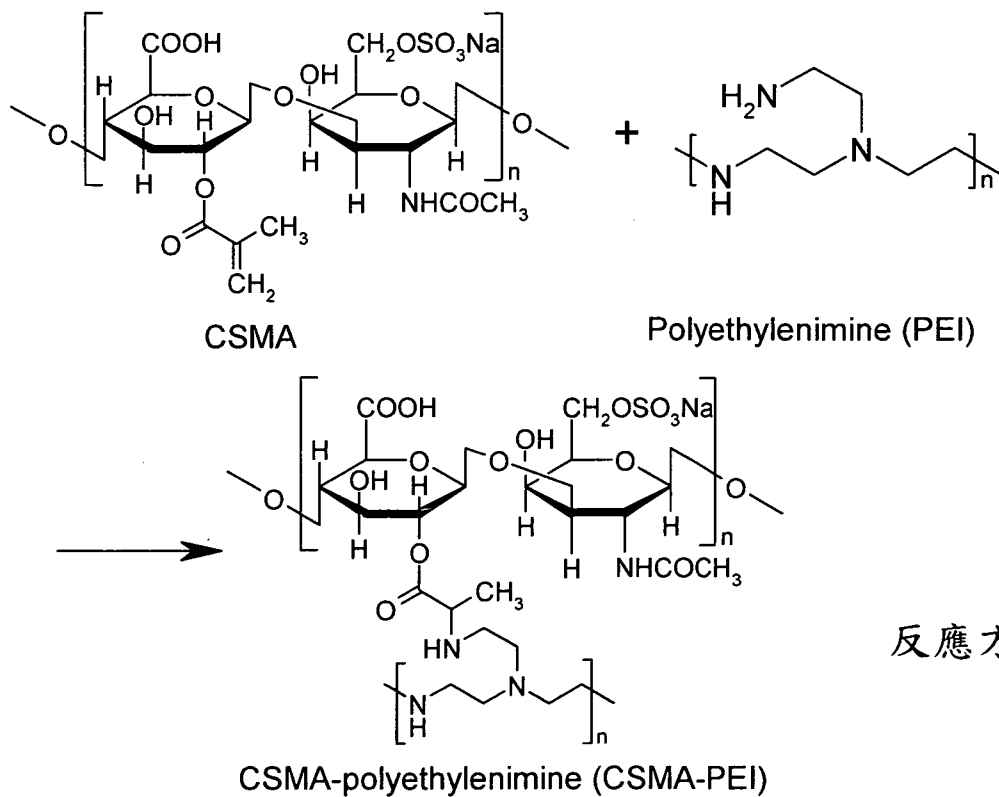
The present invention discloses a gene carrier and the preparation method thereof. Chondroitin sulfate (CS) is reacted with methacrylic anhydride (MA) to form chondroitin sulfate-methacrylate (CSMA), which is further covalently bound with polyethylenimine (PEI) using the Michael addition to afford the CSMA-PEI gene carrier. The CSMA-PEI gene carrier can effectively reduce the cytotoxicity of PEI and enhance the transfection efficiency of PEI.

## 四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

## 五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本案係關於一種基因載體，尤其是以聚乙烯亞胺接枝糖的共聚物做為基因載體。

### 【先前技術】

聚乙烯亞胺是一個極具有潛力的基因載體，本身擁有高轉染能力以及緩衝能力，在細胞內脂體(endosomes)能持續地被質子化，使得大量的氫離子湧入，提高滲透壓，進而造成細胞內脂體的漲破，將所攜帶的基因藥物(例如：DNA 或小干擾 RNA)釋放到細胞質中，發揮療效功能。

本案發明人於中華民國專利申請號 099144853 公開了以聚乙烯亞胺與四氧化三鐵為材料所製備的 PAAIO-PEI 奈米粒子，其可作為乘載遺傳物質的非病毒性的基因載體，其可維持超順磁特性，並且與聚乙烯亞胺相較具有更低的細胞毒性。

此外，中華民國專利公開號 201018523 公開一種微脂體，該專利公開案為了防止以化學修飾微脂體的方式所造成與微脂體結合的蛋白發生活性衰退的情形以及減少化學修飾的微脂體的純化步驟，因此，將帶正電聚合物(例如聚乙烯亞胺)與界面活性聚合物以非共價鍵結合方式分佈於中空球體結構的中性脂質膜上而形成微脂體。但是該專利公開號並未克服聚乙烯亞胺所產生的細胞毒性。

雖然聚乙烯亞胺具有上述優點及先前技術上的應用，但是為了克服聚乙烯亞胺的毒性而仍擁有它穿透細胞膜的高能力，解決聚乙烯亞胺的高毒性仍為臨床應用需要克服的問題。

本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，

並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案，能夠克服先前技術的不足，以下為本案之簡要說明。

### 【發明內容】

本發明選用帶負電荷的天然多醣體，即硫酸化軟骨素，為材料，並將硫酸化軟骨素利用共價鍵方式進行修飾，使經雙鍵修飾的硫酸化軟骨素和聚乙烯亞胺進行麥可加成反應而形成共價鍵結，而成為低毒性、高乘載力的奈米級基因載體。此外，藉由調控硫酸化軟骨素與聚乙烯亞胺的比例而調整基因載體的正負電荷比，藉由不同於聚乙烯亞胺進入細胞的內噬機制，來降低聚乙烯亞胺的細胞毒性，並增加聚乙烯亞胺轉染基因的能力。

本發明提供一種製備基因載體的方法，其係將硫酸化軟骨素與甲基丙醯酸酐進行反應，以獲得硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，再將聚乙烯亞胺共價地鍵結至硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，以形成該基因載體。

獲得硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯後，以乙醇加以沈澱。而聚乙烯亞胺在與硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯產生共價鍵結前，先與吡啶混合。製備出該基因載體後，採用透析膜來透析基因載體，以移除多餘的聚乙烯亞胺。此外，該基因載體可乘載例如 DNA、RNA、互補 DNA、微型 RNA 及小干擾 RNA 等的遺傳物質。

本發明另提供一種根據上述方法所製備的基因載體，包括硫酸化軟骨素、鍵結於硫酸化軟骨素的甲基丙烯酸酯、以及聚乙烯亞胺。其中，甲基丙醯酸酐與硫酸化軟骨素鍵結形成硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，聚乙烯亞胺則共價地鍵結於該硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯的甲基丙醯酸酐基團。

根據上述構想，所製備的基因載體可乘載如上所述的遺傳物

質。

本發明另提供一種基因載體，包括：醣類，帶有一雙鍵基團；以及帶正電分子，其具有胺基，該胺基共價地鍵結至該雙鍵基團。

該醣類包括硫酸化軟骨素，該雙鍵基團來自甲基丙烯酸酯且為碳-碳雙鍵基團，且該帶正電分子包括聚乙烯亞胺。

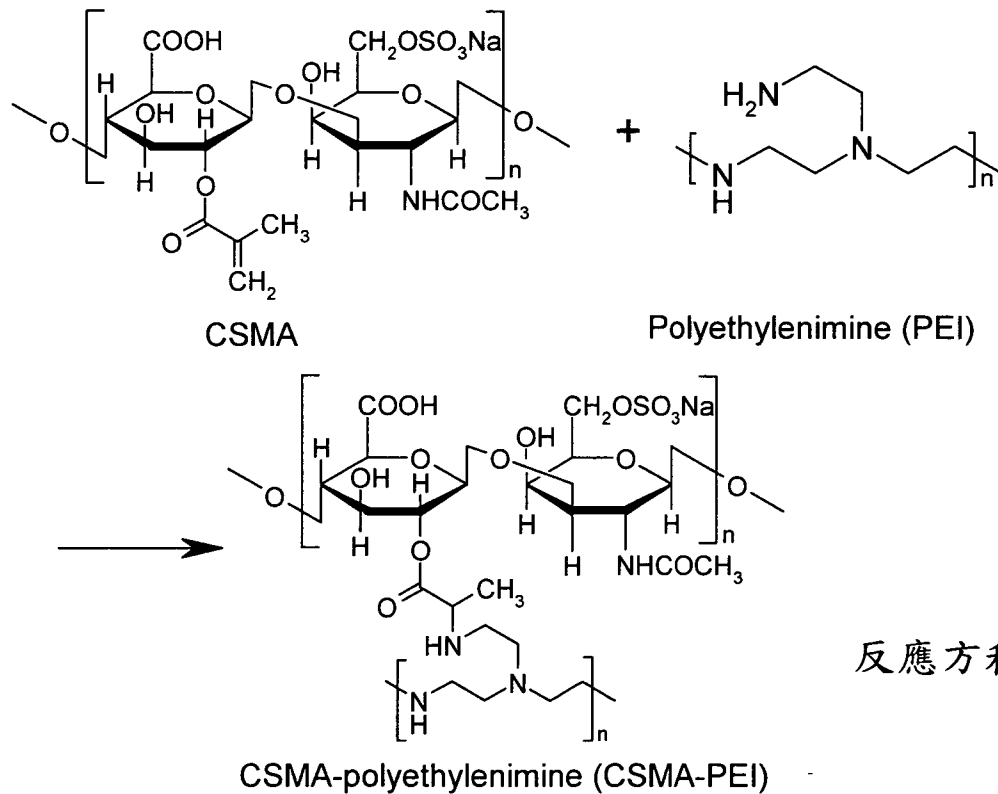
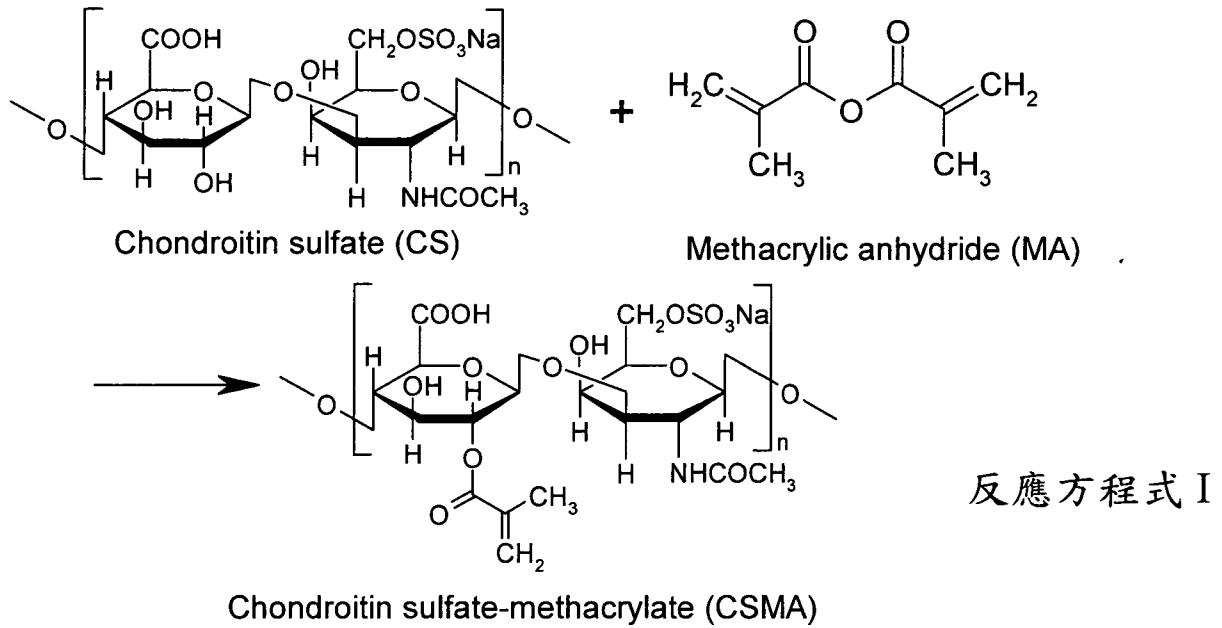
### 【實施方式】

本案所提出之發明將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明之範圍。

本發明請求保護的基因載體包括兩部分，一為高分子，例如醣類分子，另一為帶正電分子。帶正電分子上的胺基與醣類分子上的雙鍵基團形成共價性鍵結。所形成的“醣類分子-帶正電分子”可作為基因載體，而進一步轉染例如 DNA、RNA、互補 DNA (cDNA)、微型 RNA (microRNA) 或小干擾 RNA (siRNA) 等遺傳物質至細胞或組織，而達成治療或毒殺效果。

在本發明的一實施例中，是以甲基丙醯酸酐(methacrylic anhydride, MA)修飾硫酸化軟骨素(chondroitin sulfate, CS)，成為硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯(chondroitin sulfate-methacrylate, CSMA)。再以帶正電的聚乙烯亞胺(polyethylenimine, PEI)與 CSMA 形成共價性鍵結，成為硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯-聚乙烯亞胺(CSMA-PEI)基因載體。此 CSMA-PEI 基因載體為帶正電的奈米粒子，利用胺基與遺傳物質產生靜電吸引力，形成聚電解質來乘載基因，並以轉染方式送入細胞或組織。本發明之實施例之反應方

程式 I 及 II 如下所示。



### 一、硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯(CSMA)之製備：

取 5 g 硫酸化軟骨素(CS)溶於 250 mL 水中，再將 60 mL 甲基丙醯酸酐(MA)慢慢滴入硫酸化軟骨素(CS)溶液，接著再慢慢滴入 5 N 氫氧化鈉溶液，反應 48 小時。之後將反應混合物置於 4°C 隔夜以終止反應。以大量乙醇反覆沈澱及離心(5 分鐘、6000 rpm)該



反應混合物，將沈澱物置於真空烘箱乾燥 48 小時，獲得 CSMA。

二、硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯-聚乙烯亞胺(CSMA-PEI)之製備：

藉由本發明的技術可製備不同聚乙烯亞胺(PEI)含量之 CSMA-PEI，以下僅說明本發明所定義之高、中、低 PEI 含量之 CSMA-PEI，本領域的技術人士可依據類似方法製備出其他 PEI 含量之 CSMA-PEI。

將 1.5 g PEI (分子量約 10K Dalton)溶於 1.5 L 水中，待其完全溶解後，再加入 1.5 mL 吡啶並攪拌 2 小時。將 CSMA 溶液(52.7 mg CSMA 溶於 52.7 mL 水中)慢慢滴入前述的 PEI 溶液，並於室溫反應 48 小時。利用透析膜(允許透析的分子量約 25000 Dalton)將多餘的 PEI 移除，冷凍乾燥 CSMA-PEI 溶液，獲得高 PEI 含量之 CSMA-PEI。而中、低 PEI 含量之 CSMA-PEI，分別以 300 mg 及 100 mg PEI (分子量約 10K Dalton)進料量，再以相同製備方法製備而成。

三、CSMA-PEI/pDNA 奈米粒子之製備及特性：

CSMA-PEI 基因載體乘載遺傳物質之製備是透過控制 CSMA-PEI 基因載體的濃度來調整 CSMA-PEI 基因載體與遺傳物質(例如質體 DNA)間的比例(N/P 比值)而完成。相同體積的 CSMA-PEI 基因載體與質體 DNA 溶液以 1 至 9 的 N/P 比值混合，並立即以高速振盪。CSMA-PEI/pDNA 奈米粒子在分析前先置於室溫 30 分鐘以進行完全錯合。N/P 比值可為 1、2 至 9 的整數或者 1 至 9 之間的非整數，例如 1.5、2.5 等。本發明實驗所使用的質體 DNA 包括但不限於市售的 pEGFP-C1 (Clontech)、pGL3 (Promega)、其他市售質體或自行設計、製備的質體。

CSMA-PEI 基因載體對遺傳物質的結合能力以洋菜膠體電泳加以評估。以前述方法及不同 N/P 比值製備出的 CSMA-PEI/pDNA

奈米粒子，在有或無 10%胎牛血清(FBS)的條件下混合不同時間後，以 0.8%洋菜膠體電泳測定磁性奈米粒子的穩定度。

動態光散射(DLS)及 zeta 電位：使用 Zetasizer Nano ZS instrument (Marlvern, Worcestershire, UK)及雷射都卜勒流速計測量 CSMA-PEI/pDNA 奈米粒子的平均流體直徑及 zeta 電位。動態光散射係以 633 nm 雷射及 90 度散射角進行測量。樣本濃度為 0.1 mg/mL 且溫度維持於 25°C。以保麗龍奈米球(220 ± 6 nm 及 -50 mV；Duke Scientific, USA)驗證儀器的性能。每一樣本的粒子尺寸及 zeta 電位進行三重複實驗。

穿透式電子顯微鏡(TEM)技術：奈米粒子的尺寸及外觀以 cryo-TEM (Jeol JEM-1200, Tokyo, Japan)觀察。以碳蒸鍍的銅網 (200 mesh, Agar Scientific Ltd. Essex, UK)輝光放電 1.5 分鐘，將一滴樣本溶液置於銅網上並於室溫風乾，再以電子顯微鏡觀察。

#### 四、細胞毒殺作用試驗：

將 U87 (人類神經膠母細胞瘤細胞株)細胞以  $1 \times 10^5$  cells/well 之密度種入 12 孔培養盤的孔洞並培養 24 小時。在將細胞及 CSMA-PEI 基因載體(或 CSMA-PEI/pDNA 奈米粒子)培養於無 FBS 之 DMEM 培養液 4 小時後，再培養於含 10% FBS 之 DMEM 培養液 72 小時，藉由測定細胞存活率來評估 CSMA-PEI 奈米粒子的細胞毒殺作用。以本領域的技術人士所熟知的 MTT 呈色法估計活細胞的粒腺體還原酶活性而測定出活細胞數目及存活率。

#### 五、轉染效率：

將 U87 細胞以  $1 \times 10^5$  cells/well 之密度種入 12 孔盤並培養於添加 10% FBS 的 DMEM 培養液 24 小時。當細胞長至 50~70%聚滿程度時，更換為添加或不添加 10% FBS 的 1 mL DMEM 培養液。此外，準備 4  $\mu$ g pEGFP-C1 (控制組)以及 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈

米粒子，分別與細胞共同培養 4 小時後，更換新鮮培養液，再培養細胞 72 小時。在螢光顯微鏡下直接觀察綠螢光蛋白表現，以分析轉染效率。

至於冷光素酶試驗，步驟如上所述，比較 CSMA-PEI/pGL3 奈米粒子、單獨的 pGL3 質體 DNA (作為負控制組)及 N/P 值為 3、5、7、9、15 的 PEI/pGL3 聚複合物(作為正控制組)對 U87 細胞的轉染效率。為了定量冷光素酶的表現，以 1 mL 的 0.1 M PBS 溫和地潤濕經轉染的細胞兩次，再加入 200  $\mu$ L/well 的裂解緩衝液(0.1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, and 0.1% TritonX-100, pH 7.8)並於-20°C 隔夜靜置。第二天，將細胞裂解產物(lysate)回溫至室溫，以高速離心 30 分鐘。混合上清液與冷光素酶試劑(Promega, Madison, WI, USA)後，使用 TopCount NXT™ 盤式閃爍及冷光計數器(Perkin Elmer, NJ, USA)偵測冷光素酶活性。以 Bicinchoninic acid (BCA) 蛋白試劑套組(Pierce Rockford, IL, USA)測定細胞裂解產物的總蛋白量。

#### 六、CSMA-PEI 基因載體的特性：

由於 PEI 已知具有高轉染力，為臨床上最廣泛使用的非病毒式載體，但是細胞毒性高。因此，本發明藉由 PEI 的轉染能力並利用共價鍵結，將 PEI 鍵結到具有雙鍵修飾的硫酸化軟骨素 (CSMA)，藉由調控 CSMA 與 PEI 的比例，形成穩定且帶正電的 CSMA-PEI 基因載體。

請參閱第 1 圖(a)至第 1 圖(c)，其分別為 CSMA、PEI 及 CSMA-PEI 的 <sup>1</sup>H-NMR 圖譜，由此可知 CSMA 和 PEI 進行麥可加成反應(Michael addition)，第 1 圖(a)的 CSMA 之雙鍵部分(即符號“A”，d = 5.6 ppm, 6.1 ppm)和第 1 圖(b)的 PEI 之胺基(d = 2.6 ppm)反應形成碳氮單鍵(第 1 圖(c)的符號“C”)，而在第 1 圖(c)的

CSMA-PEI 的  $^1\text{H-NMR}$  圖譜出現  $d = 1.1$  ppm 的訊號。此外，第 1 圖(a)的符號“B”表示 CSMA。此外，由動態光散射實驗證明，在水溶液下並不會有粒子的產生(未示出)，因此，CSMA 和 PEI 並非以電荷吸引力方式，而是以共價鍵結方式形成 CSMA-PEI 基因載體。

在定性上，請參閱第 2 圖的 CSMA、PEI 及 CSMA-PEI 的傅立葉轉換紅外線光譜分析圖譜。該分析技術為本發明的技術人士所熟知，在此不再贅述其實驗方法。在第 2 圖中，CSMA-PEI 的波峰都有 CSMA 和 PEI 的特性鍵結，較明顯部份為 PEI 一級胺部份( $2846\text{ cm}^{-1}$ ,  $1948\text{ cm}^{-1}$ )，原本 CSMA 只有醯胺波峰，和 PEI 進行麥可加成反應後出現一級胺的波峰，其證明本發明成功地合成 CSMA-PEI 基因載體。

在定量上，請參閱第 3 圖的 CSMA、PEI、CSMA-PEI 的紫外光/可見光光譜。該光譜分析技術為本發明的技術人士所熟知，在此不再贅述其實驗方法。由於 PEI 胺基上的孤對電子和溴化銅形成螯合物，在波長 630 nm 有特性吸收，因此可利用 PEI 檢量線算出 CSMA 鍵結 PEI 的含量。由於 CSMA 在波長 630 nm 並未有特性吸收，由此也可得知，CSMA 與 PEI 產生共價鍵結。

如同先前技術第 1 段所記載的聚乙烯亞胺的特性，本實驗欲測試對基因載體而言是非常重要的緩衝能力。因此，本發明亦測試 CSMA-PEI 基因載體的緩衝能力測試，我們利用 0.1 N HCl 滴定濃度為 1 mg/mL 之材料水溶液，觀察其酸鹼值變化。如第 4 圖所示，各比例的 CSMA-PEI 均可維持較恆定的酸鹼值，表示本發明的 CSMA-PEI 基因載體在細胞內仍維持緩衝效果。

在尺寸測量上，請參閱表 1，其顯示不同 PEI 含量的 CSMA-PEI 基因載體承載 pEGFP-C1 質體 DNA 後的 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子的直徑小於 185 nm，且隨著 N/P 比例增加，有逐漸縮小的

傾向。而由 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子的表面電位分析可知，除了 N/P = 1 為負值外，其他比例的奈米粒子均帶正電。由穿透式電子顯微鏡亦可得知 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子呈現圓形(結果未顯示)。

表 1、CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子之動力光散射分析

CSMA-PEI/pEGFP-C1 (高)	散射光強度 (kcps)	相位都普勒干涉(PDI)	尺寸(奈米)	Zeta 電位 (mV)
N/P = 1	104.17±5.24	0.353±0.040	182.47±10.66	-24.10±0.99
N/P = 3	154.75±4.60	0.366±0.092	167.90±1.13	9.66±0.33
N/P = 5	143.65±11.24	0.326±0.004	119.50±4.38	17.90±2.69
N/P = 7	136.25±10.68	0.539±0.122	76.25±5.31	20.00±2.40
CSMA-PEI/pEGFP-C1 (中)	散射光強度 (kcps)	相位都普勒干涉(PDI)	尺寸(奈米)	Zeta 電位 (mV)
N/P = 1	104.05±9.83	0.355±0.024	142.20±14.28	-23.30±1.13
N/P = 3	179.20±60.81	0.235±0.043	128.40±16.26	2.16±2.81
N/P = 5	209.00±12.73	0.306±0.038	133.95±0.21	15.90±1.48
N/P = 7	190.00±2.40	0.562±0.074	87.23±9.27	15.60±1.84
CSMA-PEI/pEGFP-C1 (低)	散射光強度 (kcps)	相位都普勒干涉(PDI)	尺寸(奈米)	Zeta 電位 (mV)
N/P = 1	94.05±5.73	0.689±0.118	127.85±18.03	-18.60±0.21
N/P = 3	170.60±5.80	0.516±0.065	120.90±7.78	19.20±0.14
N/P = 5	167.80±14.00	0.543±0.236	85.99±0.11	16.20±0.42
N/P = 7	134.80±31.68	0.696±0.076	68.83±11.84	22.80±3.25

### 七、CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子受血清之影響

請參閱第 5 圖(a)至第 5 圖(c)，以不同 N/P 比例調製的 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子與 10%胎牛血清混合均會使奈米粒子受到血清不同程度的影響，其中以 N/P = 7 影響比較不大而維持在直徑 100 nm 以下(與表 1 之尺寸比較)。而高、中、低三種不同 PEI 分子量的 CSMA-PEI 基因載體中，又以“CSMA-PEI (低)”基因載體與質體 DNA 形成的 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子之尺

寸受到血清的影響最低。

為了瞭解本發明的 CSMA-PEI 基因載體對質體 DNA 的保護能力，以 DNA 膠體電泳分析質體 DNA 是否被 CSMA-PEI 基因載體包覆。結果顯示，在  $N/P = 1$  時，仍發現質體 DNA 部分裸露於 CSMA-PEI 基因載體之外，而其他  $N/P$  比例的結果則顯示 CSMA-PEI 基因載體完整地包覆質體 DNA (結果未顯示)。此外，在 10% 胎牛血清的環境下，CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子仍不受胎牛血清的影響，只有在  $N/P = 1$  下質體 DNA 裸露(結果未顯示)，證明了本發明具有聚電解質結構的的基因載體穩定度非常高。

#### 八、CSMA-PEI/pDNA 奈米粒子轉染基因的功效

本實驗係以綠色螢光表現來評估基因載體乘載轉染基因的轉染功效。請參閱第 6 圖，可知 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子在高、中、低 PEI 含量下均具有高綠色螢光表現，而且隨著  $N/P$  比例增加而增加轉染作用。在  $N/P = 7$  時，U87 細胞的轉染效果最佳，而且相對於“PEI”組，高、中、低 PEI 含量的 CSMA-PEI 基因載體乘載 pEGFP-C1 而進行轉染效果均顯著地增加。

由第 6 圖可知，由於 pEGFP-C1 可由 CSMA-PEI 基因載體送入 U87 細胞大量表現綠螢光蛋白而未造成細胞死亡，表示硫酸化軟骨素的生物相容性特性將可使硫酸化軟骨素被用來修飾聚乙烯亞胺本身的毒性，而使 CSMA-PEI 基因載體的轉染效率較聚乙烯亞胺佳，且未造成毒性。

#### 九、CSMA-PEI 基因載體、CSMA-PEI/pDNA 奈米粒子的細胞毒性

請參閱第 7 圖，經修飾後的 CSMA-PEI 基因載體的細胞毒性明顯降低，在濃度  $10 \mu\text{g/mL}$  以上時，相對於“PEI”組(對照組)，CSMA-PEI 基因載體仍然維持低毒性，尤其是“CSMA-PEI (低)”這一組。而在 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子在不同  $N/P$  比例下，

U87 細胞存活率與其他對照組別相較仍高達 90%以上，表示本發明的 CSMA-PEI 基因載體及 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子的低細胞毒性(第 8 圖)。

除了螢光轉染實驗，另以冷光轉染實驗進行基因載體及奈米粒子的細胞毒性測試。請參閱第 9 圖，可知 CSMA-PEI/pGL3 奈米粒子和“PEI”組(對照組)以及“Lipofectamine”組的轉染程度接近，但是 CSMA-PEI 基因載體本身的毒性降低，使得 CSMA-PEI 基因載體更適合乘載遺傳物質進入細胞(第 10 圖)。

本發明實屬難得的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖(a)至第 1 圖(c)分別為本發明(a)經雙鍵修飾之硫酸化軟骨素(CSMA)、(b)聚乙烯亞胺(PEI)以及(c)硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯-聚乙烯亞胺(CSMA-PEI)的  $^1\text{H-NMR}$  圖譜。

第 2 圖為 CSMA、PEI 及 CSMA-PEI 的傅立葉轉換紅外線光譜分析圖譜。

第 3 圖為 CSMA、PEI、CSMA-PEI 的紫外光/可見光光譜。

第 4 圖為 CSMA、PEI、CSMA-PEI 的緩衝能力分析圖譜。

第 5 圖(a)至第 5 圖(c)分別為不同 PEI 含量之 CSMA-PEI 基因載體與 pEGFP-C1 在不同 N/P 比例混合後，存在於 10%胎牛血清中(a) 0 小時、(b) 2 小時及(c) 4 小時後的 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子之尺寸比較。

第 6 圖為不同 PEI 含量及不同 N/P 比例所調製的 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子進行轉染作用後之螢光強度比較。

第 7 圖為不同濃度之 CSMA-PEI 對 U87 細胞之細胞毒性。

第 8 圖為 CSMA-PEI/pEGFP-C1 奈米粒子轉染 U87 細胞之細胞毒性。

第 9 圖為 CSMA-PEI/pGL3 奈米粒子轉染 U87 細胞之細胞毒性。

第 10 圖 CSMA-PEI/pGL3 奈米粒子轉染 U87 細胞之相對冷光強度。

**【主要元件符號說明】**

- A CSMA 之雙鍵部分
- B CSMA
- C 碳氮單鍵



## 七、申請專利範圍：

### 1.一種製備一基因載體的方法，包括步驟：

將一硫酸化軟骨素與一甲基丙醯酸酐進行反應，以獲得一硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯；以及

將一聚乙烯亞胺共價地鍵結至該硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，以形成該基因載體。

### 2.如申請專利範圍第1項所述的方法，還包括步驟：使用乙醇沈澱該硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯。

### 3.如申請專利範圍第1項所述的方法，還包括步驟：將該聚乙烯亞胺與一吡啶混合。

### 4.如申請專利範圍第1項所述的方法，還包括步驟：以一透析膜透析該基因載體，以移除多餘的聚乙烯亞胺。

### 5.如申請專利範圍第1項所述的方法，還包括步驟：將該基因載體與一遺傳物質混合。

### 6.如申請專利範圍第5項所述的方法，其中該遺傳物質係選自由一DNA、一RNA、一互補DNA、一微型RNA及一小干擾RNA所組成的群組其中之一。

### 7.一種基因載體，包括：

一硫酸化軟骨素；

一甲基丙醯酸酐，鍵結於該硫酸化軟骨素上，以形成一硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯；以及

一聚乙烯亞胺，被配置以共價地鍵結於該硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯，以形成該基因載體。

### 8.如申請專利範圍第7項所述的基因載體，其中該基因載體被配置以乘載一遺傳物質。

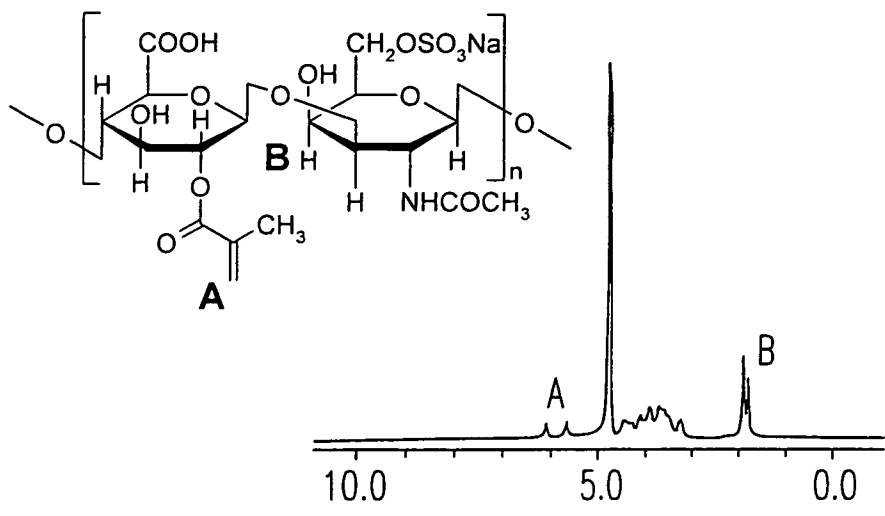
### 9.一種基因載體，包括：

一醣類，帶有一雙鍵基團，其中該雙鍵基團來自一甲基丙醯酸酐且為一碳-碳雙鍵基團；以及

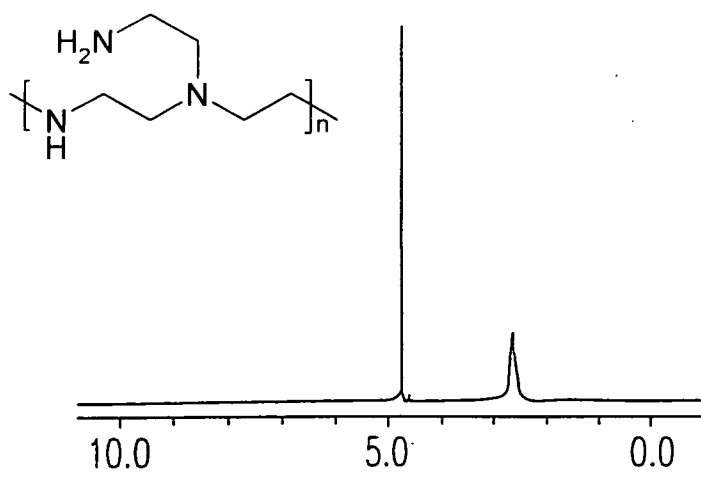
一帶正電分子，其具有一胺基，該胺基被配置以共價地鍵結至該雙鍵基團。

10.如申請專利範圍第9項所述的基因載體，其中該醣類包括一硫酸化軟骨素，且該帶正電分子包括一聚乙烯亞胺。

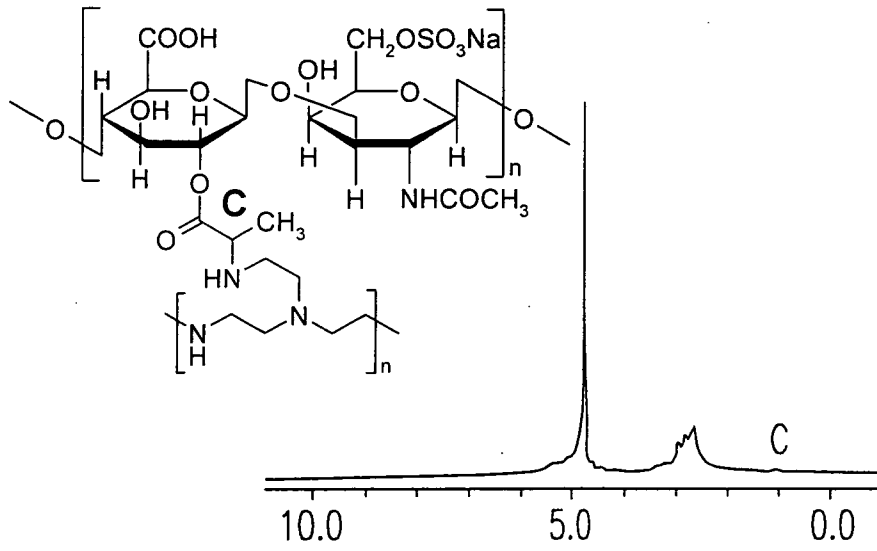
八、圖式：



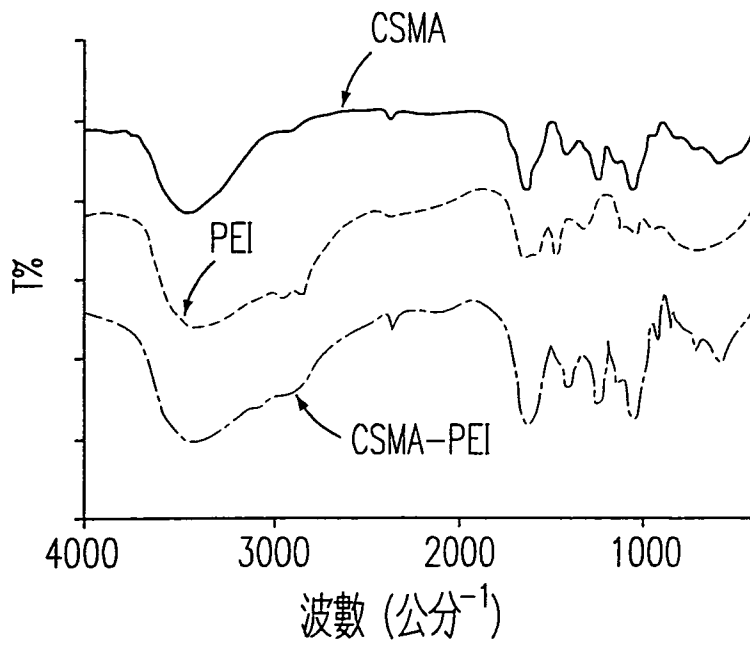
第 1 圖(a)



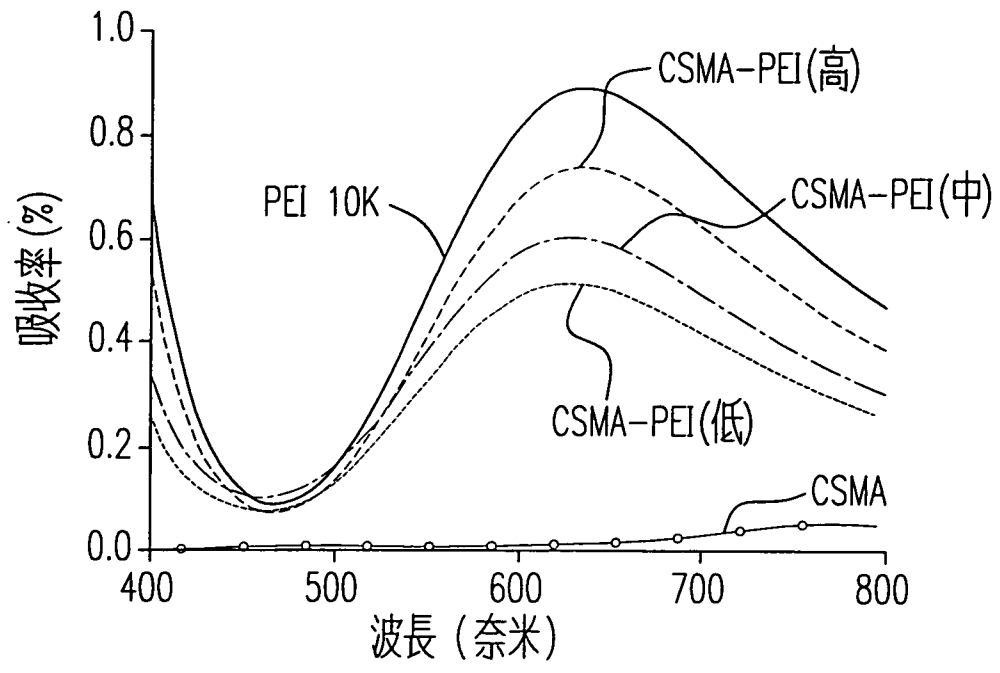
第 1 圖(b)



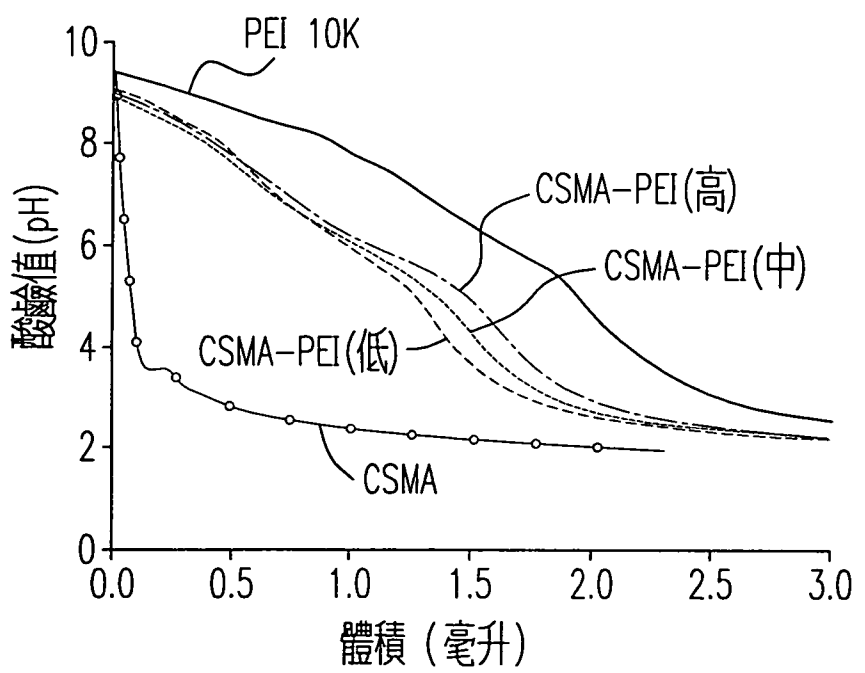
第1圖(c)



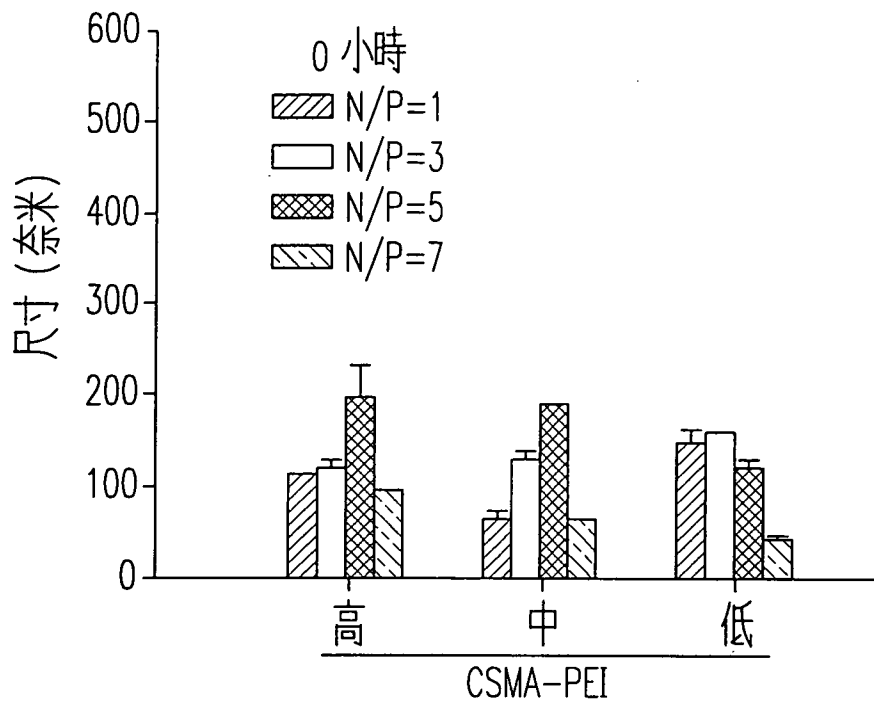
第2圖



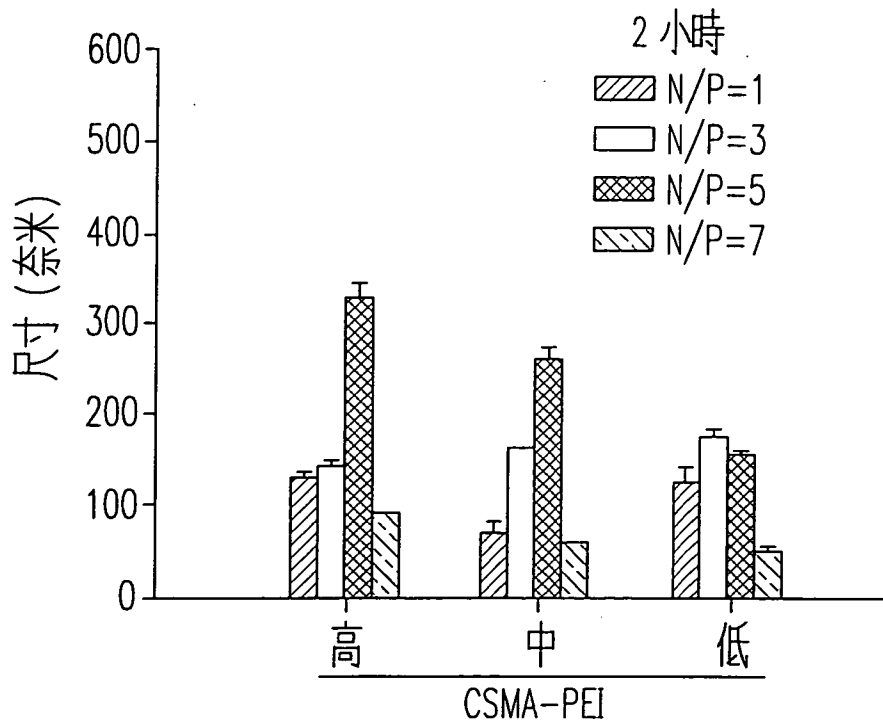
第3圖



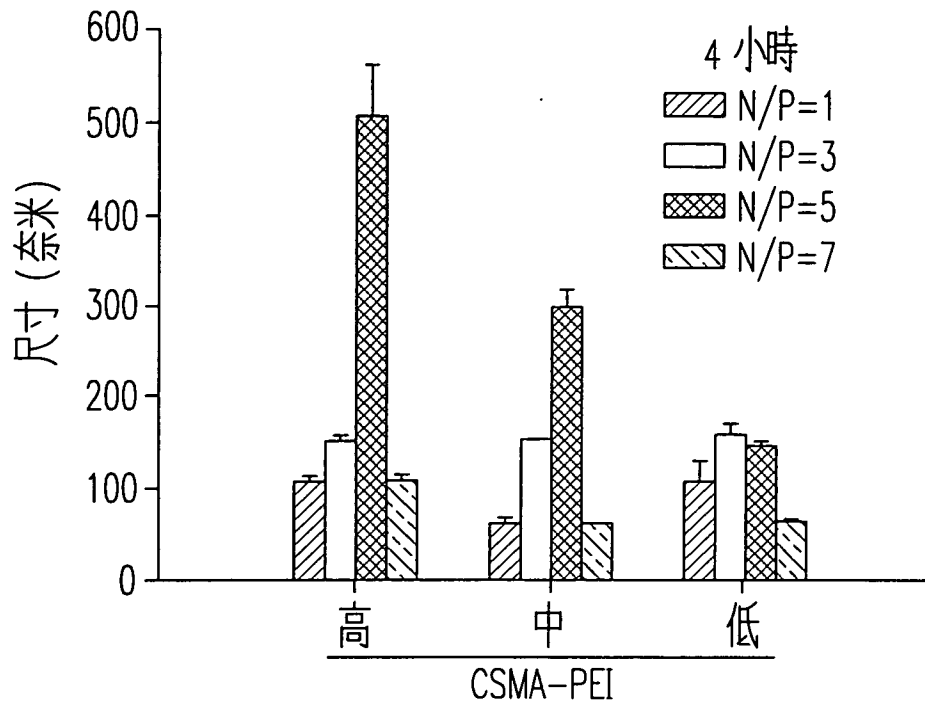
第4圖



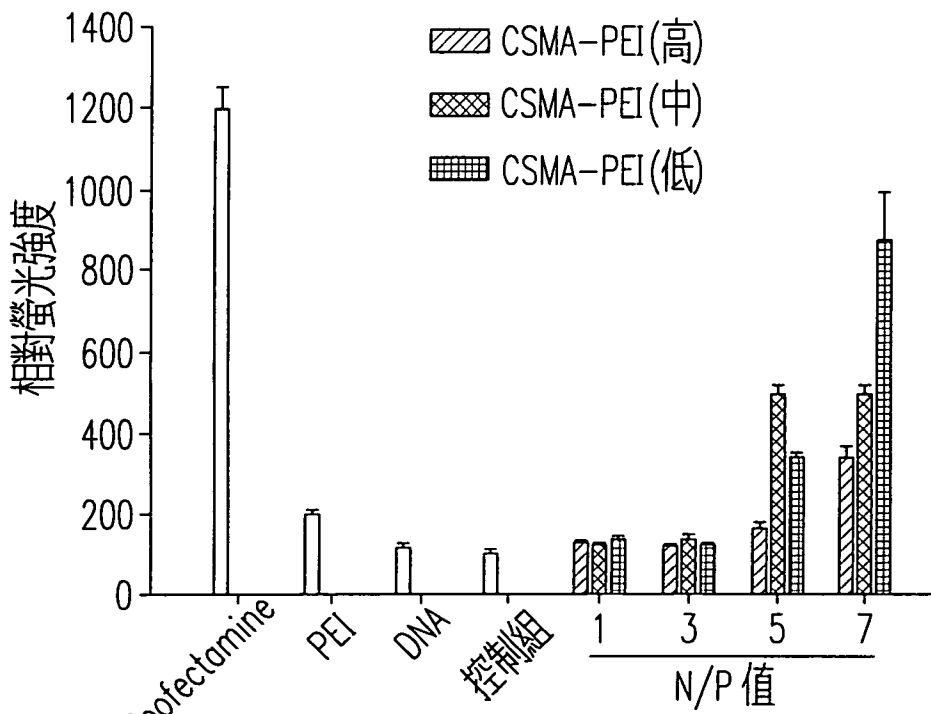
第 5 圖(a)



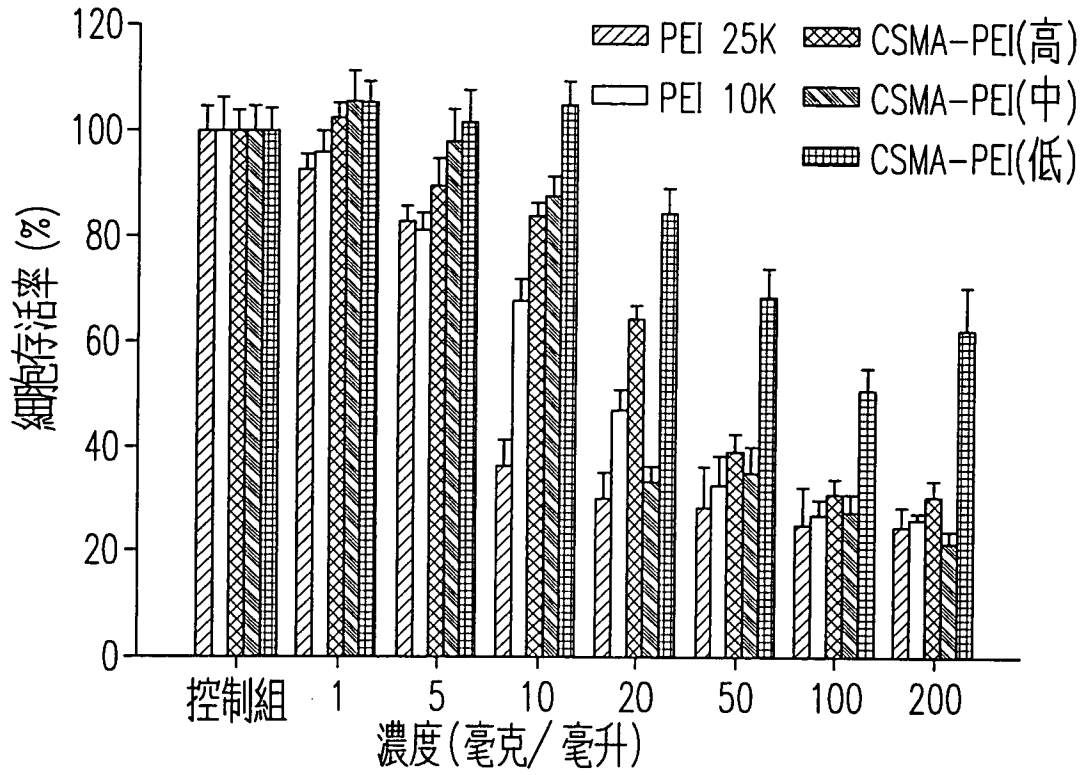
第 5 圖(b)



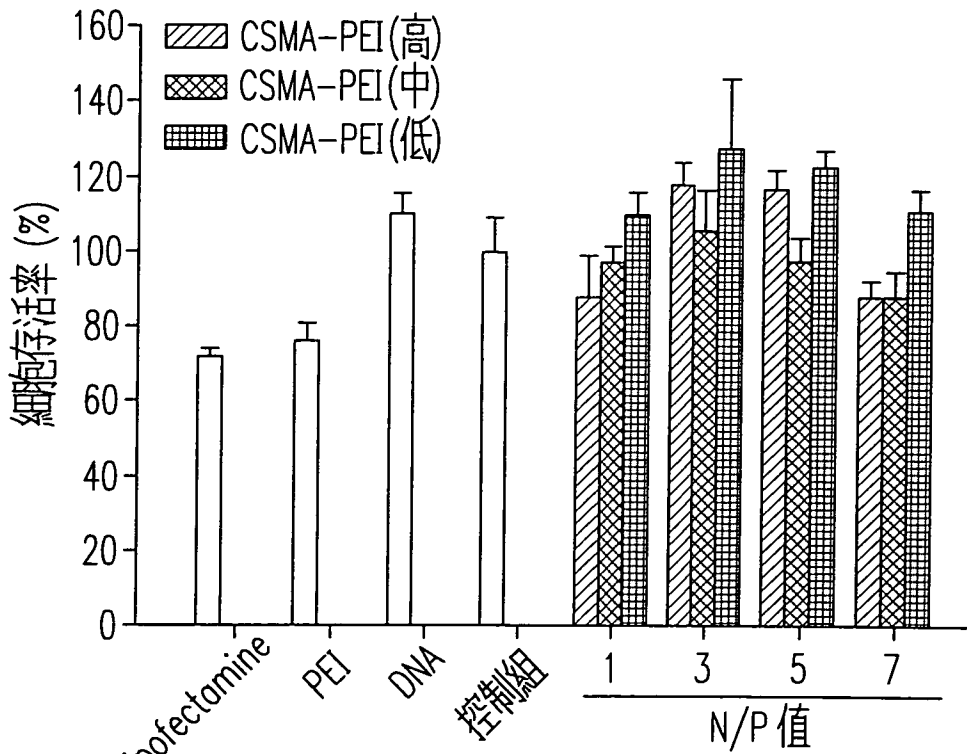
第 5 圖(c)



第 6 圖

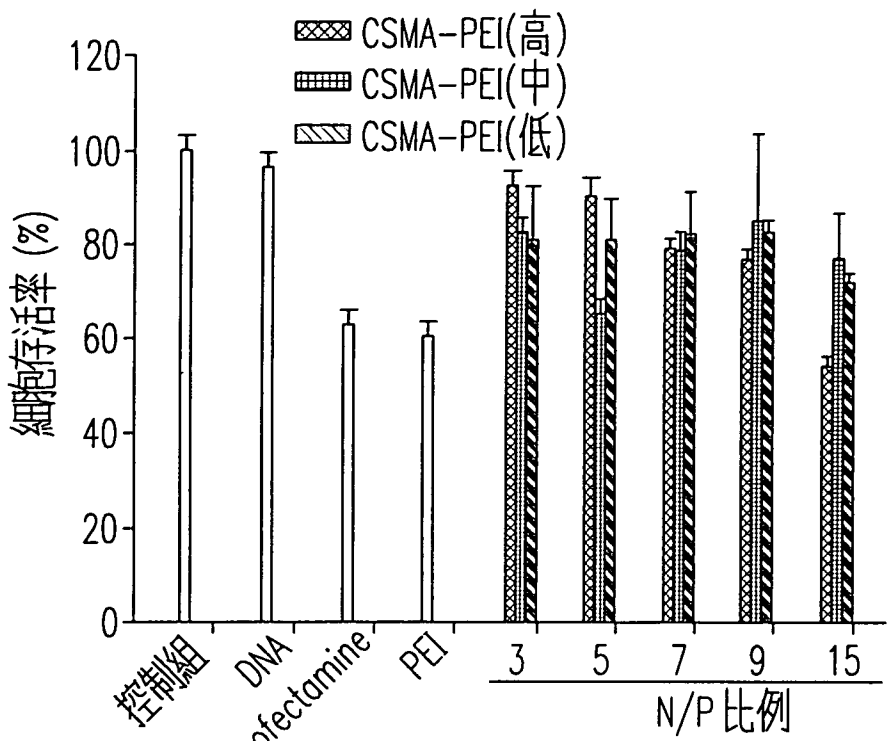


第7圖

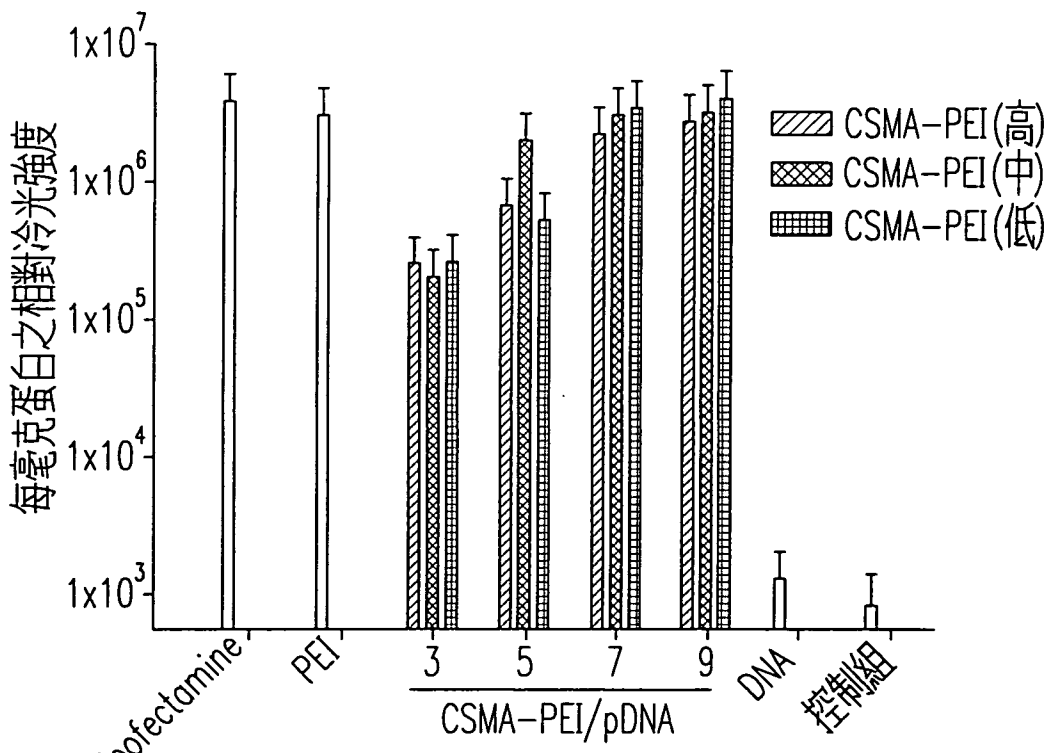


第8圖





第9圖



第10圖