

การตรึงอาร์จีดีเพปไทด์บนพื้นผิวของพอลิคาร์บอนเนตที่มีไทโรซีน



นาย อติสร ผู้พัฒน์พงศ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6740-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF RGD PEPTIDE ON THE SURFACE OF
TYROSINE-CONTAINING POLYCARBONATES



Mr. Adisorn Poopattanapong

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6740-4

Thesis Title Immobilization of RGD peptide on the Surface of Tyrosine-
 Containing Polycarbonates
By Mr. Adisorn Poopattanapong
Field of Study Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor Assistant Professor Vipavee P. Hoven, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree




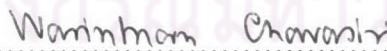
..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Supawan Tantayanont, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Assistant Professor Vipavee P. Hoven, Ph.D.)


 Member
(Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)

 Member
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

อดิศร ผู้พัฒนาพงศ์: การตรึงอาร์จีดีเปปไทด์บนพื้นผิวของพอลิคาร์บอเนตที่มีไทโรซีน (IMMOBILIZATION OF RGD PEPTIDE ON THE SURFACE OF TYROSINE-CONTAINING POLYCARBONATES) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. วิภาวี โฮვნัน; 82 หน้า. ISBN 974-17-6740-4

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรึงทางเคมีของเปปไทด์ที่มีลำดับกรดแอมิโนอาร์จีดี (อาร์จีดีอาร์จีดีเอสและจีอาร์จีดีเอส) บนพื้นผิวของพอลิคาร์บอเนตที่มีไทโรซีน ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่ข้าง พอลิ(ดีทีอี-โค-20%ดีที)คาร์บอเนต โดยผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ปฏิกิริยาในขั้นแรกเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วยเอ็น-ไฮดรอกซีซัคซินิไมด์ (เอ็นเอชเอส) ในภาวะที่มี 1-(3-ไดเมทิลแอมิโนโพรพิล)-3-เอทิลคาร์โบไดอิมิด ไฮโดรคลอไรด์ (อีดีซีไอ) ขั้นที่สองเป็นการติดอาร์จีดีเปปไทด์ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยติดตามความสำเร็จของการตรึงเปปไทด์ด้วยวิธีนินไฮดรินและเทคนิคอิเล็กโทรโฟโตอิลเลกตรอนสเปกโทรสโกปี (เอ็กพีเอส) จากการใช้สารละลายเฮกซะเมทิลีนไดอะมินเป็นสารมาตรฐานพบว่าสามารถคำนวณความหนาแน่นของหมู่แอมิโนได้ประมาณ 8.07×10^{-8} , 6.51×10^{-8} และ 5.13×10^{-8} โมล/ตารางเซนติเมตร สำหรับการตรึงด้วยอาร์จีดี อาร์จีดีเอส และจีอาร์จีดีเอส ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์พื้นผิวของพอลิ(ดีทีอี-โค-20%ดีที)คาร์บอเนตที่ตรึงด้วยอาร์จีดีเปปไทด์หลังจากติดฉลากด้วยเฮปทาฟลูออโรบิวทิลคลอไรด์ด้วยเทคนิคเอ็กพีเอสพบว่าได้เปอร์เซ็นต์การแทนที่ของ อาร์จีดีเอส และจีอาร์จีดีเอส เป็น 75 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลจากการศึกษาความเข้ากันได้กับเซลล์พบว่าจีอาร์จีดีเอสมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มการยึดเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (บี95) เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิสไตรีนที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (ทีซีพีเอส) ค่าสัดส่วนการยึดเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 92 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 117 และ 129 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังการตรึงด้วยจีอาร์จีดีเอส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหมู่ไกลซีนที่เพิ่มขึ้นทำให้เปปไทด์มีอิสระในการเคลื่อนที่ส่งผลให้ส่วนที่เป็นลำดับอาร์จีดีสามารถแสดงการตอบสนองต่อเซลล์อย่างจำเพาะเจาะจงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ลายมือชื่อนิสิต.....อดิศร ผู้พัฒนาพงศ์.....

ปีการศึกษา 2547ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572564023: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE
 KEYWORD: RGD PEPTIDE/ TYROSINE-DERIVED POLYMER/ SURFACE
 MODIFICATION

ADISORN POOPATTANAPONG: IMMOBILIZATION OF RGD PEPTIDE
 ON THE SURFACE OF TYROSINE-CONTAINING POLYCARBONATES.
 THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR VIPAVEE P. HOVEN,
 Ph.D; 82 pp. ISBN 974-17-6740-4

This research has focused on chemical immobilization of RGD-containing peptides (RGD, RGDS, GRGDS) on the surface of tyrosine-derived polycarbonates having carboxyl pendant groups, poly(DTE-co-20%DT carbonate) through a two-step reaction. The first step involved an activation of carboxyl groups by *N*-hydroxysuccinimide (NHS) in the presence of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI). The second step was a covalent attachment of RGD-containing peptides. The success of peptide immobilization was determined by ninhydrin method and x-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Using hexamethylenediamine as a standard, the grafting density of $\sim 8.07 \times 10^{-8}$, 6.51×10^{-8} , and 5.13×10^{-8} mol/cm² were estimated for immobilization of RGD, RGDS, and GRGDS, respectively. According to XPS analysis of RGD-immobilized poly(DTE-co-20%DT carbonate) surface after labeling with heptafluorobutyryl chloride, 30 and 74% substitution were calculated for immobilization of RGDS and GRGDS, respectively. Results from *in vitro* cell studies demonstrated that among all studied RGD-containing peptides, GRGDS can best enhance fibroblast (B95) adhesion and proliferation on the polymer surface. Taking 100% of TCPS as a positive control, cell adhesion ratio and proliferation ratio were elevated from 92 and 100% of the virgin polymer to 117 and 129% respectively, after GRGDS immobilization. Evidently, the extra glycine spacer introduces the flexibility to the peptide and thus allows the RGD part to effectively mediate its specific response to the cells.

Field of study Petrochemistry and Polymer Science Student's signature Adisorn Poopattana
 Academic year 2004 Advisor's signature Vp. Hoven
 Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my heartfelt gratitude and appreciation to my advisor, Asst. Prof. Dr. Vipavee P. Hoven, for supporting me both in science and in life, and encouraging me throughout the course of my study. I am sincerely grateful to the members of the thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Supawan Tantayanont, Asst. Prof. Dr. Varawut Tangpasuthadol, Asst. Prof. Dr. Warithorn Chavasiri for their comments, suggestions and time to read thesis.

Many thanks go to Prof. Dr. Joachim Kohn for his support in poly(DTE-co-DT carbonate), Asst. Prof. Dr. Varawut Tangpasuthadol for fruitful suggestions on solving some research problems, Assoc. Prof. Dr. Yasuhiko Iwasaki for XPS analyses.

Special thanks go to Miss. Supralee Buranapraditkun from Allergy and Clinical Immunology Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her excellent assistance and suggestions on cell culture studies. Many thanks go to all OSRU members for their assistance, suggestions concerning experimental techniques during my thesis work.

Finally, I would like to especially thank my family members: father, mother, young sister and relatives for their love, kindness and support throughout my entire study.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF TABLES.....	xv
LIST OF ABBREVIATION.....	xvii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Statement of Problem.....	1
1.2 Objectives.....	1
1.3 Scope of Investigation.....	2
CHAPTER II THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	3
2.1 Historic Overview of Tyrosine-derived Polycarbonates.....	3
2.2 The Cell-adhesive Peptide Arg-Gly-Asp (RGD).....	9
2.3 Surface Modification of Biomaterial by Immobilization of Biomolecules.....	13
2.3.1 Crosslinking and Conjugation Reactions.....	14
2.3.2 Chemical Reactivity of Proteins.....	15
2.3.3 Nucleophilic Substitution and Addition Reactions.....	19
2.3.4 Immobilization of RGD Peptides on Polymers.....	19
2.4 Analysis of RGD-modified Polymers.....	25
2.5 Cell Surface and Cell Adhesion.....	26
2.6 Characterization Techniques.....	30
2.6.1 Contact angle measurements.....	30

2.6.2 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	31
CHAPTER III EXPERIMENTAL.....	34
3.1 Materials.....	34
3.2 Equipments.....	35
3.2.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR).....	35
3.2.2 Contact Angle Measurements.....	35
3.2.3 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	36
3.2.4 Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR).....	36
3.2.5 UV-Spectroscopy.....	36
3.2.6 Hemocytometer.....	36
3.2.7 Statistical Analysis.....	37
3.3 Experimental.....	37
3.3.1 Activation of Poly(DTE-co-20%DT carbonate) with <i>N</i> - hydroxysuccinimide under Homogeneous Condition.....	37
3.3.2 Preparation of Poly(DTE-co-20%DT carbonate) Films.....	38
3.3.3 Activation of Poly(DTE-co-20%DT carbonate) with <i>N</i> -hydroxysuccinimide under Heterogeneous Condition.....	38
3.3.4 Synthesis of L-3,5-Dibromotyrosine.....	38
3.3.5 Reaction of Activated Poly(DTE-co-20%DT carbonate) Film with L-3,5-Dibromotyrosine.....	38
3.3.6 Reaction of Activated Poly(DTE-co-20%DT carbonate) Film with RGD-containing Peptide.....	39
3.3.7 Labeling of Immobilized RGD-containing Peptide by Heptafluorobutryl chloride.....	39

	Page
3.3.8 Determination of the Amino Groups on Poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) surface after RGD Immobilization.....	39
3.3.9 Cell study.....	40
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	41
4.1 Activation of Poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) with <i>N</i> -hydroxysuccinimide under Homogeneous Condition.....	42
4.2 Activation of Poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) with <i>N</i> -hydroxysuccinimide under Heterogeneous Condition.....	44
4.2.1 Effect of Solvent.....	44
4.2.2 Effect of NHS/EDCI Concentration.....	47
4.2.3 Effect of Reaction Time.....	48
4.3 Reaction of Activation of Poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) Film with L-3,5-Dibromotyrosine.....	49
4.3.1 Synthesis of L-3,5-Dibromotyrosine.....	50
4.3.2 Attachment of L-3,5-Dibromotyrosine on the Surface of Activated Poly(DTE- <i>co</i> - 20%DT carbonate) Film.....	51
4.4 Attachment of RGD-containing Peptides on the Surface of Activated Poly(DT- <i>co</i> -20%DT carbonate) Film.....	52
4.4.1 Effect of Immobilization Time.....	54
4.4.2 Effect of RGD-containing Peptide Concentration.....	54
4.4.3 Effect of RGD-containing Peptide.....	55
4.5 Cell Study.....	58
CHAPTER V CONCLUSION AND SUGGESTION.....	60
REFERENCES.....	62

	Page
APPENDICES.....	.66
APPENDIX A.....	.67
APPENDIX B.....	.70
APPENDIX C.....	.79
VITAE.....	.82



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1	Chemical structures of (A) tyrosine-derived polycarbonates, (B) tyrosine-derived polyarylates.....4
2.2	Chemical structures of Bisphenol A and tyrosine dipeptide.....5 Chemical structure of desaminotyrosyl-tyrosine alkyl esters, abbreviated 'DTR'6
2.4	Schematic summary of the mechanism of degradation of tyrosine- derived polycarbonates.....7
2.5	Chemical structure of RGD.....10
2.6	Schematic drawing of the general structure of integrin. Two types of integrins are shown, one with an α subunit which is proteolytically processed into two disulfide- linked fragments at a cleavage site (shown as a gap in the structure on the left). Other integrins have subunits that are not processed.....11
2.7	Integrin family.....12
2.8	Reactive groups of amino acid side chains. Functional groups A to F are the six most reactive entities. G and H are less reactive. (A) amino groups of N-terminal amino acids and α -amino groups of lysines; (B) carboxyl groups of aspartic, glutamic acids and C-terminal amino acids; (C) thiol group of cysteine; (D) thioether of methionine; (E) imidazolyl group of histidine; (F) guanidiny group of arginine; (G) phenolic group of tyrosine; and (H) indolyl group of tryptophan.....17

Figure	Page
2.9 RGD peptides react via the <i>N</i> -terminus with different groups on polymers: (A) carboxyl groups, preactivated with a carbodiimide and NHS to generate an active ester, (B) amino groups, preactivated with DSC, (C) hydroxyl groups, preactivated as tresylate, (D) hydroxyl groups, preactivated as <i>p</i> -nitrophenyl carbonate.....	21
2.10 Chemoselective ligation of selected pairs of functional groups. (A) thiol and bromoacetyl-RGD. (B) aldehyde and aminoxy-RGD. (C) acrylate and thiol-RGD. (D) maleinimide and thiol-RGD.....	23
2.11 Schematic representation of the modification route. Surface Ti: water-vapor plasma-pretreated titanium; Surface A: poly(3-aminopropyl) siloxane pendant surface; Surface M: maleimide-modified surfaces with different alkyl chains; Surface P: peptide- or L-cysteine-modified surfaces; H-SR: L-cysteine, RGDC, GRGDSPC.....	24
2.12 Schematic representation of the Young's equation.....	30
2.13 Schematic representation of wettability.....	31
2.14 Schematic diagram of the x-ray photoelectron emission process.....	31
2.15 Schematic drawing of XPS instrument.....	32
4.1 Mechanism of an activation of surface carboxyl group followed by a coupling reaction with RGD-containing peptide.....	41
4.2 ¹ H NMR spectra of (a) poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) and poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) after reacted with <i>N</i> -hydroxysuccinimide in (b) tetrahydrofuran and (c) 10% (v/v) methanol/methylene chloride.....	43
4.3 Water contact angle of poly(DTE- <i>co</i> -20%DT carbonate) film after the reaction with aqueous solution of 0.1 M NHS/EDCI: advancing (○) and receding (●) water contact angle.....	45

Figure	Page
4.4 ATR-FTIR spectra of poly(DTE-co-20%DT carbonate) film and activated poly(DTE-co-20%DT carbonate) film.....	46
4.5 ¹ H NMR spectra of poly(DTE-co-20%DT carbonate) film after the reaction with 0.1 M NHS/EDCI in (a) water, (b) 20% ethanol/water, (c) 50% ethanol/water and (d) ethanol for 2 h.....	47
4.6 %Yield of activation of poly(DTE-co-20%DT carbonate) film after reaction with NHS/EDCI solution in ethanol for 2 h as a function of NHS/EDCI concentration.....	48
4.7 % Yield of activation of poly(DTE-co-20%DT carbonate) film after reaction with NHS/EDCI solution in ethanol as a function of reaction time: 0.1 M NHS/EDCI (●) and 0.05 M NHS/EDCI (○).....	49
4.8 ¹ H NMR spectrum of L-3,5-dibromotyrosine.....	50
4.9 Chemical structures of RGD, RGDS and GRGDS.....	53
4.10 Calibration curve of UV absorbance as a function of 1,6-hexanediamine concentration using ninhydrin method.....	53
4.11 Amino concentration per surface area of immobilized RGD on poly(DTE-co-20%DT carbonate) surface as a function of immobilization time.....	54
4.12 Amino concentration per surface area of immobilized RGD on poly(DTE-co-20%DT carbonate) surface as a function of peptide concentration.....	55
4.13 Amino concentration per surface area of immobilized RGD-containing peptides on poly(DTE-co-20%DT carbonate) surface using the peptide concentration of 0.05 M and immobilization time of 24h.....	56
4.14 <i>In vitro</i> cell adhesion ratio (CAR) of fibroblasts on polymer substrates.....	59

Figure	Page
4.15 <i>In vitro</i> cell proliferation ratio (CPR) of fibroblasts on polymer substrates.....	59
A-1 The ¹ H-NMR (400 MHz CDCl ₃) of poly(DTE-co-20%DT carbonate) film.....	68
A-2 The ¹ H-NMR (400 MHz CDCl ₃) of activated poly(DTE-co-20%DT carbonate) film.....	68
A-3 The ¹ H-NMR (400 MHz DCl) of L-3,5-dibromotyrosine.....	69
B-1 Calibration curve of UV-absorbance as a function of 1,6-hexanediamine concentration analyzed by ninhydrin method.....	73



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Physico-mechanical properties of tyrosine-derived polycarbonates.....	8
2.2	Cell attachment and proliferation on surfaces of tyrosine-derived polycarbonates.....	9
2.3	Nature and properties of physical adsorption and chemical binding.....	14
2.4	Chemical modification of amino acid side chains.....	17
2.5	pKa of some reactive groups in amino acids and model peptides.....	18
4.1	Atomic composition of controlled poly(DTE-co-20%DT carbonate) film and NHS-activated poly(DTE-co-20%DT carbonate) film after L-3,5-dibromotyrosine attachment.....	52
4.2	Atomic composition RGD-immobilized poly(DTE-co-20%DT carbonate) film after labeling with heptafluorobutyryl chloride.....	58
B-1	Water contact angle of activated poly(DTE-co-20%DT carbonate) films after reaction with <i>N</i> -hydroxysuccinimide in water as a function of reaction time.....	71
B-2	%Yield of activation of poly(DTE-co-20%DT carbonate) with <i>N</i> -hydroxysuccinimide as a function of coupling agent concentration.....	72
B-3	%Yield of activation of poly(DTE-co-20%DT carbonate) with <i>N</i> -hydroxysuccinimide as a function of reaction time.....	72
B-4	UV-absorbance at $\lambda = 538$ nm of standard 1,6-hexanediamine solution for generating a calibration curve.....	74
B-5	Amino content of RGD-poly(DTE-co-20%DT carbonate) film as a function of immobilization time.....	74
B-6	Amino-content of RGD-poly(DTE-co-20%DT carbonate) film as a function of RGD concentration.....	75

Tables	Page
B-7 Amino contents of RGDS-poly(DTE-co-20%DT carbonate) and GRGDS-poly(DTE-co-20%DT carbonate) using peptide concentration of 0.05 M.....	76
B-8 Number of fibroblast attachment on polymer surfaces after 12 h incubation.....	77
B-9 Number of fibroblast proliferation on polymer surface.....	78



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATION

ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
CDCl ₃	: Deuterated chloroform
CAR	: Cell adhesion ratio
CPR	: Cell proliferation ratio
DCC	: Dicyclohexyl carbodiimide
ECM	: Extracellular matrix
EDCI	: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
FBS	: Fetal bovine serum
GRGDS	: H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-OH
HFBC	: Heptafluorobutyl chloride
MHz	: Megahertz
NHS	: <i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMR	: Nuclear magnetic resonance spectroscopy
PBS	: Phosphate buffer saline
RGD	: H-Arg-Gly-Asp-OH
RGDS	: H-Arg-Gly-Asp- Ser-OH
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
TCPS	: Tissue culture polystyrene
WSC	: Water soluble carbodiimide
XPS	: X-ray photoelectron spectroscopy
θ_A	: Advancing contact angle
θ_R	: Receding contact angle