

聚丙烯亚胺-聚谷氨酸苄酯多臂接枝聚合物的制备及其结构表征*

张璇^{1,2}, 鹏越峰³, 蔡青青³

- (1. 深圳市精神卫生中心, 广东 深圳 518020;
2. 深圳市心理健康重点实验室, 广东 深圳 518020;
3. 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055)

摘要: 以第二代聚丙烯亚胺树状大分子(PPI)末端的氨基为引发剂,与L-谷氨酸苄酯的N-酸酐(BLG-NCA)进行开环聚合合成了多臂聚丙烯亚胺-聚谷氨酸苄酯聚合物,分别用IR、¹H NMR、¹³C NMR和GPC对聚合物结构进行表征。结果表明,PPI端氨基能够作为引发剂参与反应引发BLG-NCA开环聚合,并证实成功合成了多臂聚丙烯亚胺-聚谷氨酸苄酯聚合物。该聚合物有望成为新型的非病毒基因载体材料。

关键词: 聚丙烯亚胺树状大分子; 聚谷氨酸苄酯; 非病毒基因载体; 开环聚合

中图分类号: O632 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2013)03-0083-05

Synthesis and Characterization of Multi-armed Polypropylenimine Dendrimer-poly (benzyl-L-glutamate) Graft Polymer

ZHANG Xuan^{1,2}, PENG Yuefeng³, CAI Qingqing³

- (1. Shenzhen Mental Health Center, Shenzhen 518020, China;
2. Shenzhen Key Lab for Psychological Healthcare, Shenzhen 518020, China;
3. Shenzhen Institute of Advanced Technology Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Multi-armed polypropylenimine dendrimer-poly (benzyl-L-glutamate) was synthesized by ring-opening polymerization of BLG-NCA using primary amine-terminated polypropylenimine dendrimer (PPI) as the macroinitiator. Its chemical structure was characterized by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, and GPC analysis. The results showed that the primary amine of PPI participated in initiating the ring-opening polymerization of BLG-NCA monomer. And multi-armed polypropylenimine dendrimer-poly (benzyl-L-glutamate) was successful synthesized. The multi-armed polymer might be a potential candidate as nonviral gene carriers.

Key words: polypropylenimine dendrimer; poly (benzyl-L-glutamate); nonviral gene carrier; ring-opening polymerization

随着基因治疗的不断深入,非病毒基因载体的研究越来越受到人们的重视,阳离子聚合物是近年发展起来的一种新型非病毒基因载体,由于其表面存在大量的阳离子电荷,通过与siRNA或DNA链上负电性的聚电解质(磷酸根)的静电作用缔合

成复合物,从而保护siRNA或DNA使其免受核酸酶的降解,在此过程中,含目的基因的质粒体积会被高度压缩成50~200 nm大小的纳米球,大大增强了对细胞膜的穿透能力^[1-2]。聚丙烯亚胺(Poly(propylenimine), PPI)树状聚合物1993年首次被

* 收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31100683)

作者简介: 张璇(1976年生),女,副主任药师,博士; E-mail: zhangxuan0222@163.com

合成出来,它的大小由代数来标明,并随代数增加而增加^[3-4]。与聚酰胺-胺树状聚合物(Poly(amidoamine), PAMAM)一样, PPI 树状聚合物有聚胺的典型结构,外部为伯胺基团,内部为叔胺基团。与 DNA 的结合能力是 PPI 发挥转染作用的先决条件,研究发现^[5],随着代数的增加,与 DNA 的结合能力增强,但 PPI 的毒性会随代数的增加而急剧增加,这大概是 PPI 到目前为止没有像 PAMAM 一样被广泛研究的原因之一。许多学者尝试着对低代数的 PPI 进行化学修饰以改善其作为基因载体的性能^[6-8]。

具有支化结构的聚合物,尤其是树状大分子,表现出的性能是传统线性聚合物所不能达到的^[9],为了减少毒性并且保持较高的转染率,许多学者研究设计出可生物降解的伪树状大分子材料(pseudodendrimers), Russ 等^[10]以较小相对分子质量的 PEI (oligoethylenimine, OEI) 为核,通过二丙烯酸酯将包括 OEI 在内的低聚胺连接在 OEI 表面,以形成可生物降解的,富含氨基的大分子聚合物,此大分子聚合物不仅表现出很好的 DNA 结合能力和转染效率,而且具有明显的肿瘤靶向性。Chen 等^[11]以 OEI 为核,合成了多分枝的聚谷氨酸骨架,再将 OEI 接枝到聚谷氨酸骨架表面,此大分子聚合物在不同细胞系中都表现出优于 PEI25K 的转染效率,其转染效率受血清的影响很小。然而, OEI 结构的不对称性使以 OEI 为核的伪树状大分子并没有典型的树状大分子的对称结构。

本研究拟对第二代树状大分子 PPI 表面进行修饰,使其表面接枝上聚谷氨酸苄酯,合成结构对称的多臂聚谷氨酸苄酯材料,通过对树状大分子的结构进行可控设计,从而大大增加载体的生物相容性及生物可降解性,降低其毒性,使其有望成为新型的非病毒基因载体材料。

1 实验部分

1.1 实验原料

第二代聚丙烯亚胺树状大分子(G2.0PPI)由中国科学院深圳先进技术研究院提供(¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 1.33(m, 4 H, NCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.55 (m, 24 H, NCH₂CH₂CH₂N), 2.34 (m, 20 H, NCH₂CH₂CH₂N), 2.39 (m, 16H, NCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.67 (t, 16H, CH₂NH₂)。L-谷氨酸(生化试剂,上海生化试剂二厂); 苯甲醇、硫酸、四氢呋喃、石油醚(30~60℃)、氯仿、乙醚(均为分析纯,

广州化学试剂厂); 双(三氯甲基)碳酸酯(化学纯,上海化工专科学校实验化工厂)。

1.2 L-谷氨酸苄酯的 N-酸酐(BLG-NCA)的制备

参考文献[12],于三颈瓶中加入 L-谷氨酸、苯甲醇、机械搅拌下滴加一定量的硫酸,加热至 70℃左右,真空脱水 6 h,产物倒入含碳酸氢钠的冰水中,至冰箱中过夜,抽滤,重结晶,干燥得 L-谷氨酸苄酯(BLG)。再在反应瓶中加入新制得的 BLG、四氢呋喃以及双(三氯甲基)碳酸酯,在 50℃加热 10 min,再继续升温至 60℃左右,待反应液转透明后继续搅拌 30 min。加入低沸点的石油醚沉淀、冷藏放置 12 h 后,抽滤,再用石油醚洗涤数次,真空干燥得白色结晶状 BLG-NCA。

1.3 聚丙烯亚胺-聚谷氨酸苄酯多臂接枝聚合物(Multi-armed PBLG, MP)的合成

将 BLG-NCA 加入到无水氯仿中,剧烈搅拌使其溶解,同时将 G2.0PPI 的无水氯仿溶液置三颈烧瓶中,室温下搅拌片刻后,往烧瓶中滴加一定量的 BLG-NCA 的氯仿溶液,引发剂 G2.0PPI 与 BLG-NCA 的摩尔比例为 1:100。混合液在室温下搅拌 72 h 反应,反应完全后旋转蒸发除去绝大部分溶剂,加入冰乙醚沉淀,抽滤,室温下真空干燥 24 h,得白色 MP 固体。

1.4 表征

1.4.1 红外光谱的测定 采用 KBr 压片制备, G2.0PPI 样品用其 CHCl₃ 液在 KBr 晶片上涂膜制备,各样品的 IR 谱分析在 PerkinElmer 683 型红外光谱仪上进行。

1.4.2 核磁共振测定 在 Bruker 公司的 AV-600 型核磁共振仪进行 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 的测定,均以 CF₃COOD 为溶剂,温度为 25℃。

1.4.3 GPC 测定 以聚苯乙烯作为标准物,四氢呋喃为流动相,流速为 1.0 mL/min,检测温度为 30℃,在 Perkin-Elmer Series 200 凝胶渗透色谱仪上进行。

2 结果与讨论

2.1 聚丙烯亚胺-聚谷氨酸苄酯多臂接枝聚合物(MP)的合成

共聚物的合成路线如图 1 所示。以 G2.0PPI 末端的伯胺为引发剂,用开环聚合的方法在室温下引发 BLG-NCA 的聚合,即得到多臂接枝聚合物 MP。

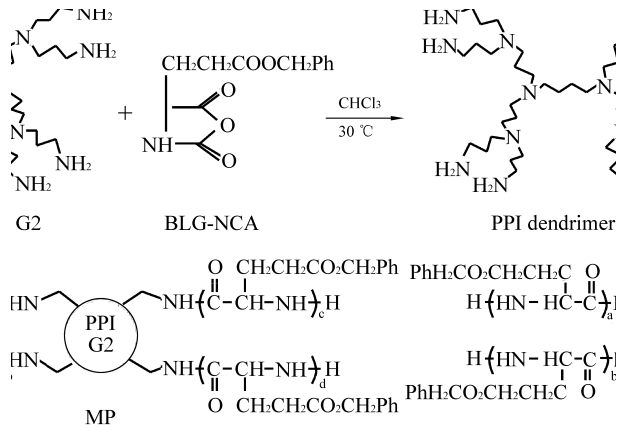


图 1 MP 的合成路线

Fig. 1 Synthetic scheme of MP

2.2 IR 光谱分析

由图 2 可见, G2.0PPI 的 IR 图谱中 3 346 cm^{-1} 为伯胺 N-H 的伸缩振动, 2 941、2 861 和 2 805 cm^{-1} 为 C-H 的伸缩振动, 1 564 cm^{-1} 为伯胺 N-H 的弯曲振动, 1 470、1 382 和 1 312 cm^{-1} 为 C-H 的弯曲振动。MP 的 IR 图谱中 1 735 cm^{-1} 峰代表生成的酯基中 C=O 的伸缩振动, 而 737 和 697 cm^{-1} 为苯环上 C-H 的弯曲振动, 由此图谱可初步确定生成了聚谷氨酸苄酯的结构。

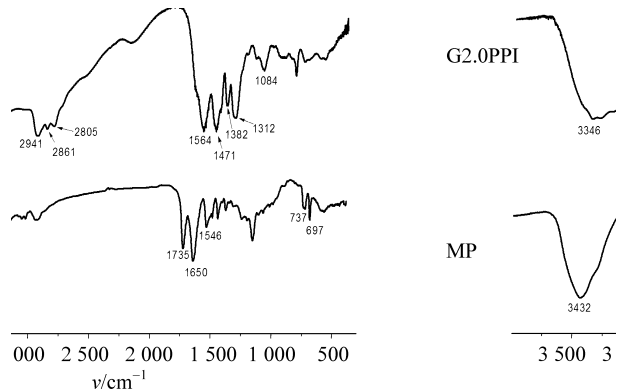


图 2 G2.0PPI 和 MP 的 IR 谱图

Fig. 2 IR spectra of G2.0PPI and MP

2.3 ^1H NMR 的测定

图 3 为以 CF_3COOD 为溶剂的 G2.0PPI、BLG-NCA 和 MP 的 ^1H NMR 谱图, G2.0PPI 在 δ 3.28 和 3.41 (峰 c 和 d) 分别为 PPI 上与叔胺及伯胺相连碳上的氢, 从 BLG-NCA 的氢谱可见, δ 7.2 (峰 i)

为苯环上的氢的信号, δ 5.1 (峰 h) 为 PBLG 链段上苄基 ($-\text{CH}_2\text{Ph}$) 上的氢, δ 4.3 (峰 g) 为 ($-\text{CH}-$) 上的氢, δ 2.3 ~ 1.8 以及 2.7 ~ 2.5 (峰 e、f) 分别属于链接苄基和主链的两组氢的信号。在 MP 的氢谱中 g 峰消失, 而在 δ 4.7 (峰 j) 的位置上出现 PBLG 骨架上 ($-\text{CH}-$) 峰, 说明开环聚合成功。MP 的氢谱中, 既有 G2.0PPI 的峰 c 和 d, 又有 PBLG 侧链上的峰 e、f、h 和 i。由图谱可确定聚合物 MP 的生成。根据 MP 中苯环上的氢 (δ 7.2) 和 PPI 上与叔胺及伯胺相连碳上的氢 (δ 3.2 ~ 3.6) 的积分面积之比计算出聚合物 MP 中两组分的质量比及相对分子质量, 分别为 1: 102 及 23 111, 可见聚合物的实际组成与反应的投料比接近, 说明反应是一种可控反应, 因此可通过调节 BLG-NCA 单体和作为引发剂的 PPI 之间的摩尔比来调节聚合物的组成。

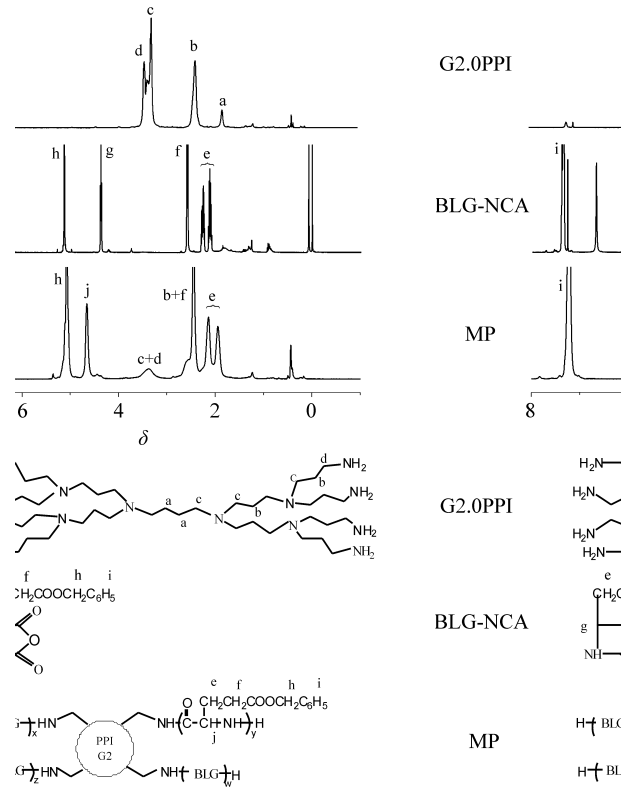


图 3 G2.0PPI、BLG-NCA 和 MP 的 ^1H NMR 谱图

Fig. 3 ^1H NMR spectra of G2.0PPI, BLG-NCA and MP

2.4 ^{13}C -NMR 的测定

从图 4 中 MP 的碳谱可见, δ 173.8 和 53.5 (峰 7 和 8) 分别属于 PBLG 骨架上的两种碳 ($-\text{NHCO}-$ 和 $-\text{CHNHCO}-$)。 δ 69.1 (峰 12) 为

PBLG 链段上苄基上的碳, 而 δ 135.0 和 128.7 (峰 13 和 14) 为 PBLG 链段苯环上的碳信号。 δ 27.1 和 29.7 (峰 9 和 10) 分别属于链接苄基和主链的两组碳的信号。从 G2.0PPI 的碳谱可见, δ 40.6 是大分子引发剂 G2.0PPI 中 $(\text{NH}_2\text{CH}_2-)$ 碳上的峰 (峰 4), 在反应后向高场移动到 δ 23.5 位置, 而峰 1、2、3、5 和 6 未见明显移动, 说明 G2.0PPI 上所有的端氨基都作为引发剂参与了反应, 并同时引发了 BLG-NCA 的开环聚合。

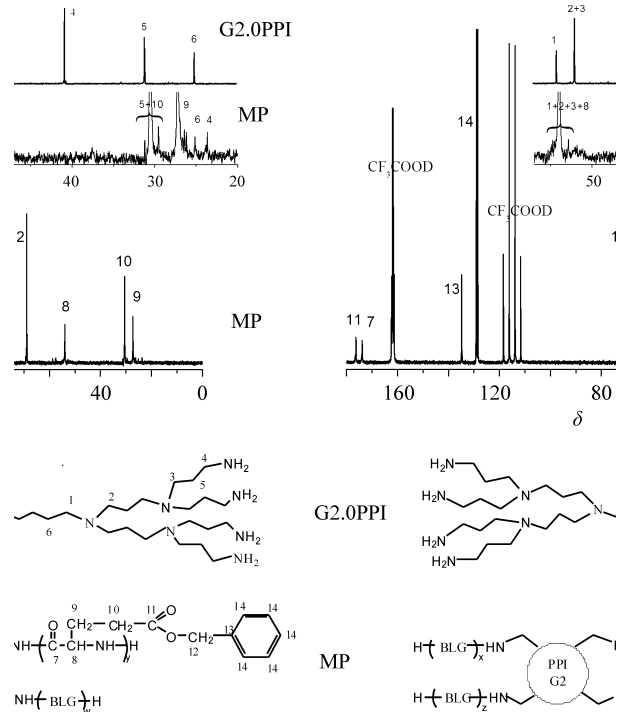


图 4 G2.0PPI 和 MP 的 ^{13}C NMR 谱图

Fig. 4 ^{13}C NMR spectra of G2.0PPI and MP

2.5 GPC 的测定

图 5 为 MP 的 GPC 图谱, 曲线上的聚合物是单一峰, GPC 计算所得的 M_n 为 23 348, 相对分子质量分布为 1.385, 与 ^1H NMR 计算得到的相对分子质量 23 111 相比, GPC 测得的聚合物的相对分子质量稍微偏大, 这是由于生成的多臂聚合物材料有着与 GPC 标样聚苯乙烯不同的流体力学行为所致。

3 结论

本研究采用开环聚合的方法, 合成了 PPI-PBLG 多臂接枝聚合物, 用 IR、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及 GPC 对共聚物进行了表征。结果证实了生成了多臂聚谷氨酸苄酯聚合物的可行性, 产物中无残留

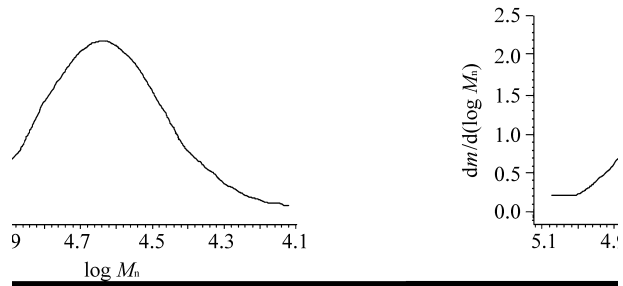


图 5 MP 的 GPC 谱图

Fig. 5 GPC chromatogram of MP

反应物。此聚合物具有树状大分子的对称结构, 将为进行下一步聚合物作为非病毒基因载体转染细胞的研究奠定实验基础。

参考文献:

- [1] PANDITA D, SANTOS J L, RODRIGUES J, et al. Gene delivery into mesenchymal stem cells; a biomimetic approach using RGD nanoclusters based on poly (amidoamine) dendrimers[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12 (2): 472 - 481.
- [2] LIU Y, REINEKE T M. Degradation of poly (glycoamidoamine) DNA delivery vehicles: polyamide hydrolysis at physiological conditions promotes DNA release[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11 (2): 316 - 325.
- [3] SMITH D K. Dendrimers and the double helix -from DNA binding towards gene therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8 (14): 1187 - 1203.
- [4] KLINGLER J, KAUFMANN D. Polypropyleneimine generation four; a suitable vector for targeted gene alteration *in vitro*[J]. *J Drug Target*, 2012, 20 (5): 474 - 480.
- [5] ZINSELMAYER B H, MACKAY S P, SCHATZLEIN A G, et al. The lower-generation polypropyleneimine dendrimers are effective gene-transfer agents [J]. *Pharm Res*, 2002, 19 (7): 960 - 967.
- [6] KOPPU S, OH Y J, EDRADA-EBEL R, et al. Tumor regression after systemic administration of a novel tumor-targeted gene delivery system carrying a therapeutic plasmid DNA[J]. *J Control Release*, 2010, 143 (2): 215 - 221.
- [7] RUSS V, GÜNTHER M, HALAMA A, et al. Oligoethyl-amine-grafted polypropyleneimine dendrimers as degradable and biocompatible synthetic vectors for gene delivery [J]. *J Control Release*, 2008, 132 (2): 131 - 140.
- [8] TARATULA O, GARBUZENKO O B, KIRKPATRICK P, et al. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2009, 140 (3): 284 - 293.

- [7] FAN H S, WANG H, ZHAO N, et al. Hierarchical nanocomposite of polyaniline nanorods grown on the surface of carbon nanotubes for high-performance supercapacitor electrode [J]. *J Mater Chem*, 2012, 22(6): 2774 – 2780.
- [8] TANG Z, TANG C H, GONG H. A high energy density asymmetric supercapacitor from nano-architected Ni(OH)₂/carbon nanotube electrodes [J]. *Adv Funct Mater*, 2012, 22(6): 1272 – 1278.
- [9] BOSE S, KUILA T, MISHRA A K, et al. Carbon-based nanostructured materials and their composites as supercapacitor electrodes [J]. *J Mater Chem*, 2012, 22(3): 767 – 784.
- [10] LIU N, ZHANG S T, FU R W, et al. Carbon aerogel spheres prepared via alcohol supercritical drying [J]. *Carbon*, 2006, 44(12): 2430 – 2436.
- [11] LIU N, ZHANG S T, FU R W, et al. The fabrication and structure of carbon aerogel spheres prepared by inverse suspension/emulsion polymerization and ambient pressure drying method [J]. *J Appl Polym Sci*, 2007, 104(5): 2849 – 2855.
- [12] 刘宁, 符若文, 王俊冰. 炭气凝胶微球的储电性能研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(5): 59 – 63.
- [13] MACIA-AGULLO J A, MOORE B C, CZZORLA-AMOROS D, et al. Activation of coal tar pitch carbon fibres; Physical activation vs chemical activation [J]. *Carbon*, 2004, 42(7): 1367 – 1370.
- [14] 徐斌, 吴峰, 曹高萍, 等. 炭化温度对 CO₂ 活化 PAN 基活性炭纤维微结构的影响 [J]. *新型炭材料*, 2006, 21(1): 14 – 18.
- [15] RODRIGUEZ-REINOSO F, MOLINA-SABIO M, GONZALEZ M T. The use of steam and CO₂ as activating agents in the preparation of activated carbons [J]. *Carbon*, 1995, 33(1): 15 – 23.
- [16] 韩鹏献, 王成扬, 时志强, 等. 水蒸汽活化树脂炭用做双电层电容器电极材料 [J]. *无机材料学报*, 2007, 22(6): 1046 – 1050.
- [17] LU C L, XU S P, GAN Y X, et al. Effect of pre-carbonization of petroleum cokes on chemical activation process with KOH [J]. *Carbon*, 2005, 43(11): 2295 – 2301.
- [18] 付晓亭, 贾凡, 李文斌, 等. 马铃薯淀粉微孔炭微球的制备及其电化学性能 [J]. *物理化学学报*, 2012, 28(8): 1906 – 1912.
- [19] LI M, LI W, LIU S X. Hydrothermal synthesis, characterization, and KOH activation of carbon spheres from glucose [J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(8): 999 – 1004.
- [20] ZHAI D Y, DU H D, LI B H, et al. Porous graphitic carbons prepared by combining chemical activation with catalytic graphitization [J]. *Carbon*, 2011, 49(2): 725 – 729.
- [21] YUE Z R, CHRISTIAN L M, JAMES E. Preparation of fibrous porous materials by chemical activation: 1. ZnCl₂ activation of polymer-coated fibers [J]. *Carbon*, 2002, 40(8): 1181 – 1191.
- [22] LIOU T H. Development of mesoporous structure and high adsorption capacity of biomass-based activated carbon by phosphoric acid and zinc chloride activation [J]. *Chem Eng J*, 2010, 158(2): 129 – 142.
- [23] JAGTOYEN M, DERBYSHIRE F. Activated carbons from yellow poplar and white oak by H₃PO₄ activation [J]. *Carbon*, 1998, 36(7/8): 1085 – 1097.

(上接第 86 页)

- [9] TOMALIA D A. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry [J]. *Prog Polym Sci*, 2005, 30(3/4): 294 – 324.
- [10] RUSS V, ELFBERG H, THOMA C, et al. Novel degradable oligoethylenimine acrylate ester-based pseudodendrimers for *in vitro* and *in vivo* gene transfer [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(1): 18 – 29.
- [11] CHEN L, TIAN H, CHEN J, et al. Multi-armed poly(L-glutamic acid)-graft-oligoethylenimine copolymers as efficient nonviral gene delivery vectors [J]. *J Gene Med*, 2010, 12(1): 64 – 76.
- [12] 张静夏, 周永言, 黄爱东. 双(三氯甲基)碳酸酯法合成 L-聚谷氨酸苄酯 [J]. *化学试剂*, 2004, 26(2): 105 – 106.