

聚乙二醇-聚乙烯亚胺共聚物的制备及其表征^{*}

张璇, 潘仕荣, 吕澍, 胡海梅, 张未
(中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

摘要: 用亲水的聚乙二醇对聚乙烯亚胺进行改性, 制备适用于基因转染的非病毒类载体。以异佛尔酮二异氰酸酯活化聚乙二醇, 再与聚乙烯亚胺反应, 两步法合成了聚乙二醇-聚乙烯亚胺 (PEG-PEI) 嵌段共聚物, 分别用 IR、¹H NMR、GPC、DSC 对共聚物进行了表征。在 IR 谱图上可见 mPEG-NCO 中异氰酸基、及 PEG-PEI 中脬基的特征峰; 根据 ¹H NMR 谱图计算表明, 此聚合反应为可控反应, 通过调节 PEG 与 PEI 的投料比例可控制共聚物组成及相对分子质量; GPC 曲线上共聚物为一单峰, 与 PEG 和 PEI 均聚物峰位置不同, 表明产物是 PEG-PEI 共聚物, DSC 分析也表明共聚物 T_m 较均聚物均有不同程度的下降, 这是 PEG 和 PEI 两种嵌段相互缠结的结果。因此证明成功合成了 PEG-PEI 共聚物。

关键词: 聚乙烯亚胺; 聚乙二醇; 共聚物; 异佛尔酮二异氰酸酯

中图分类号: O632.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 06-0053-05

随着基因治疗的不断深入, 非病毒基因载体的研究近年来取得了很大进展。阳离子聚合物是被广泛研究的非病毒载体之一, 通过其分子链上的正电荷与 DNA 链上的负电荷的静电作用缔合并转变成纳米级复合体^[1], 保护 DNA 免受核酸酶降解。1995 年, Boussif^[2-3] 首次报道了聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 可作为非病毒载体。PEI 结构单体 (—CH₂—CH₂—NH₂—) 中每 3 个原子含一个氮原子, 可质子化生成正电性氨基, 成为与基因复合的作用点, 在体内有较高的转染率。但是, 因为 PEI 强的渗透作用, 破坏细胞的溶酶体膜, 显示出细胞毒性^[4], 为了改善 PEI 的生物性能, 采用引入 PEG 对其进行修饰, PEG 是无毒和抗免疫原性的水溶性大分子, 有优良的生物相容性, 通过 PEG 修饰 PEI 形成共聚物即可克服 PEI/DNA 复合物溶解性差、细胞毒性大和传送过程中沉积等不足^[4]。用 PEG 修饰 PEI 的方法, 国外报道多使用特异活性的 PEG 修饰剂, 例如含琥珀酰亚胺酯端基的 PEG^[5-6], 含环氧化物端基的 PEG^[7], 含醛基端基的 PEG, 它们的制备复杂, 来源缺少, 所得 PEG-PEI 共聚物的产率较低。

异佛尔酮二异氰酸酯 (IPDI) 属脂环族二异氰酸酯, 其相对分子质量大, 蒸气压低, 毒性小, 并且有良好的耐候性、耐热性和耐溶剂性^[8], 以 IPDI 为原料制造的食品、医药、化妆品包装袋用

黏接剂, 具有柔软、耐水、耐油、耐热、无毒等特点, 已获得美国 FDA 的认可。2002 年, Petersen^[9] 用己二异氰酸酯 (HMDI) 作偶联剂制备了 PEI-b-PEG。IPDI 同 HMDI 相比 2 个 —NCO 基团的活性较低, 反应速度较平稳, 毒性较低、稳定性好、耐老化性能优、原料易得、反应简单, 故用作本研究的偶联剂。本研究开辟了一条 PEG-PEI 共聚物的新的制备方法。

1 实验部分

1.1 实验原料

聚乙烯亚胺 (PEI, M_w 25 000, Aldrich-Sigma 公司产品, 支链型, 无水); 聚乙二醇单甲醚 (mPEG, M_w 为 2 000 和 5 000, Fluka 公司); 异佛尔酮二异氰酸酯 (IPDI, 广州市汇采涂料化学品有限公司, 进口分装); 二月桂酸二丁基锡 (DBTL, 广东丽宝涂料助剂公司); 氯仿 (分析纯, 广州试剂二厂, 用前用无水氯化钙干燥过夜, 再在 60 °C 与 IPDI 回流 4 h, 以除去微量水和乙醇); 乙醚 (分析纯, 广州试剂二厂); 石油醚 (30 ~ 60 °C, 分析纯, 广州试剂二厂)。

1.2 异氰酸酯单端基聚乙二醇的制备

将 mPEG 先 110 °C 脱水处理 4 h, 再用定量氯仿溶解。称 10 倍摩尔量 IPDI 溶于氯仿, 加入 0.6% ~ 0.7% 的催化剂 DBTL。将上述两溶液混合,

* 收稿日期: 2006-01-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570500)

作者简介: 张璇 (1976 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 潘仕荣; E-mail: gzpshr@163.com

75 °C左右回流反应 8 h, 所得产物在石油醚中沉淀, 沉淀用氯仿溶解, 再用石油醚沉淀, 此操作重复多次直至将过量的异佛尔酮去除干净, 真空干燥, 得白色蜡状至粉末状固体。

1.3 PEG-PEI嵌段共聚物的合成

将 PEI 用 20 倍 (质量比) 氯仿溶解, 磁力搅拌下将异氰酸酯活化的单甲氧基聚乙二醇的氯仿溶液逐滴加入 PEI 溶液中, 再加入 0.6% ~ 0.7% 的催化剂 DBTL, 置 60 °C 回流反应 16 h 蒸去多余氯仿, 余下液体用大量乙醚沉淀, 过滤, 真空干燥, 称量。

1.4 表 征

1.4.1 IR 分析 mPEG、mPEG-NCO、PEG-PEI 样品分别采用 KBr 压片制备; PEI 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 ¹H NMR 测定 以 CDCl₃ 为溶剂, 温度 26 °C, 在 Bruker AM 400 型核磁共振仪上进行。

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 1.0 mL/min, 温度 40 °C, 在 Waters 515 / 410 凝胶渗透色谱仪上进行。

1.4.4 DSC 分析 程序升温速率为 10 °C/min 在 NETZSCH DSC204 差示扫描量热仪上进行。

2 结果与讨论

2.1 共聚物的合成

共聚物的合成路线如图 1 所示。

在预聚反应中 mPEG 被活化, 末端的羟基转变为异氰酸根的预聚体, 此预聚体对 PEI 中的氨基有较高的反应活性。IPDI 的 2 个异氰酸基连接方式不同, 活性也不同, 脂链上 NCO 的活性比脂环上

的 NCO 的活性大 8 ~ 10 倍。用作偶联剂与 PEG 反应时, 脂链上的 NCO 在催化剂作用下先与 —OH 反应后, 脂环上的 NCO 就难于再与 —OH 反应, 故生成的预聚体副反应少。加入过量的 IPDI 可使反应进行的更加完全。而 Petersen^[9] 使用的 HMDI 上的两个 NCO 为对称结构, 活性相同, 有可能同时和两个 mPEG 反应而无法再继续与 PEI 反应, 本实验采用 IPDI 做偶联剂可避免此种情况。与 PEI 反应前必须将过量的 IPDI 除去, 因为残留的 IPDI 可使 PEI 大分子间形成交联而至使溶解性下降。

IPDI 可溶于石油醚, 而活化的 PEG 在石油醚中沉淀^[10], 用大量的石油醚反复洗涤预聚体可除去 IPDI 活化的 PEG 不稳定, 研究发现预聚体放置 3 d 后 NCO 的质量百分含量下降了一半以上, 故 PEG 预聚体必须尽快和 PEI 进行反应。

将活化的 PEG 缓慢逐滴加入 PEI 溶液中, 使 PEG 与 PEI 充分发生共聚反应, 避免局部浓度过高。生成的聚合物在乙醚中立即沉淀, 而未反应的 PEI 不沉淀可除去未反应的 PEI

2.2 红外光谱分析

在图 2 (a) 中, 3 300 ~ 3 400 cm⁻¹ 的宽峰代表 N—H 的伸缩振动, 2 900 cm⁻¹ 峰代表亚甲基 C—H 伸缩振动, 表明聚合物 PEI 中存在有 —NH— 和 CH₂, 证实了 PEI 的 (—CH₂—CH₂—NH₂—) 结构。图 2 (b) 中 3 300 ~ 3 500 cm⁻¹ 的宽峰代表 O—H 的伸缩振动, 2 888 cm⁻¹ 峰代表亚甲基 C—H 伸缩振动, 1 108 cm⁻¹ 峰代表 C—O 醚键的吸收峰, 说明 mPEG 中有 —CH₂—CH₂—O— 和 —OH 的存在。图 2 (c) 和图 2 (b) 相比, 多了 2 267 和 1 719 cm⁻¹ 两个

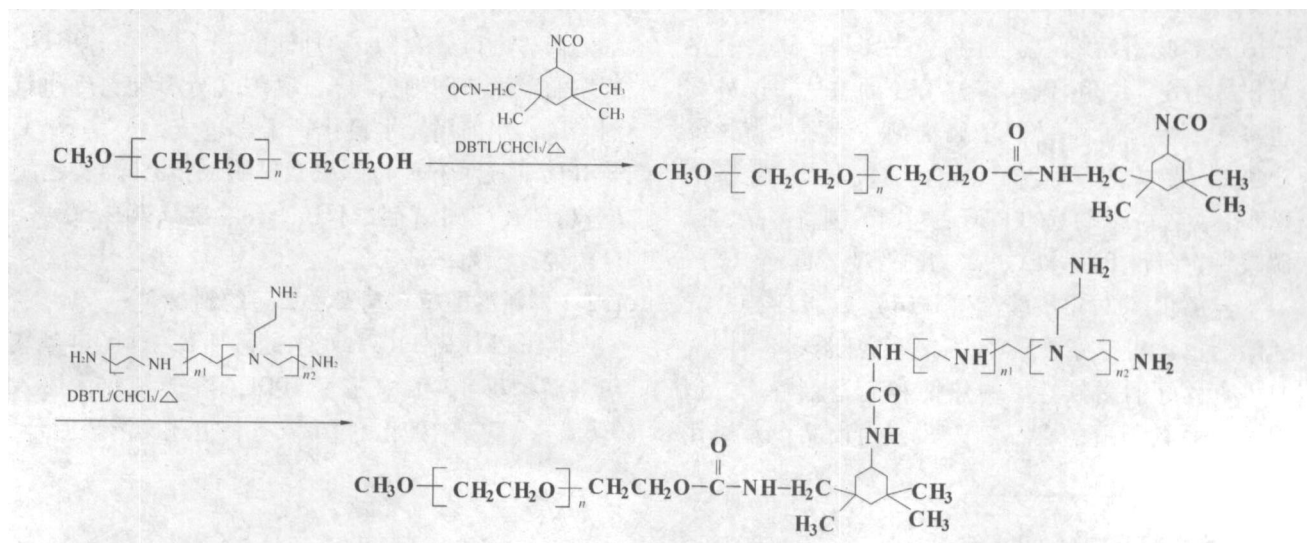


图 1 PEG-PEI 共聚物的合成路线

Fig 1 Synthetic scheme of PEG-PEI copolymer

峰, 位于 $2\,267\text{ cm}^{-1}$ 峰代表未参加反应的脂环链上的 NCO 的伸缩振动, $1\,719\text{ cm}^{-1}$ 峰代表生成的氨基甲酸酯中 $\text{C}=\text{O}$ (酰胺 I) 的伸缩振动, 表明 mPEG 发生预聚反应, $-\text{OH}$ 转化为 $-\text{NCO}$ 。图 2 (d) 中 $3\,410\text{ cm}^{-1}$ 峰应为 $\text{O}-\text{H}$ 及 $\text{N}-\text{H}$ 两峰的叠加, 此峰同样显得很宽。和 2 (c) 相比, $2\,267\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\text{O}=\text{C}=\text{N}$ 吸收峰消失, 表明活化的 mPEG 中的 NCO 与 PEI 反应完全, 而 $1\,700\text{ cm}^{-1}$ 的 $\text{C}=\text{O}$ 氨基甲酸酯基峰仍存在并增加了脲基在 $1\,570\text{ cm}^{-1}$ 的伸缩振动, 由此可初步确定共聚物 PEG-PEI 的生成。

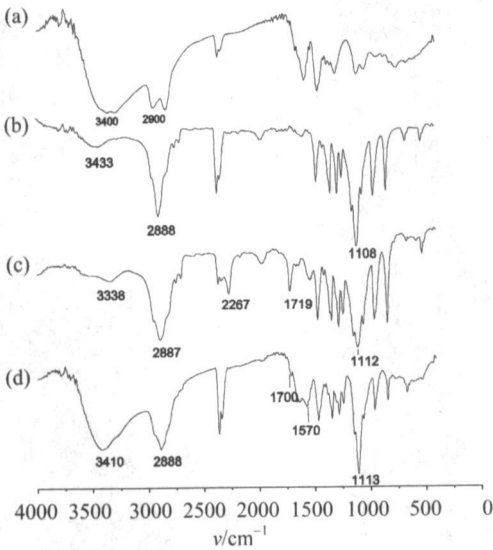


图 2 均聚物与共聚物的 IR 谱图

Fig. 2 IR spectra of homopolymers and copolymers
(a) PEI (b) mPEG (c) mPEG-NCO (d) PEG-PEI

2.3 ^1H NMR 的测定

图 3-1 中, a ($\delta 2.772$) 和 b ($\delta 2.656$) 处的吸收峰应归属分别与仲胺和叔胺相连的亚甲基质子 ($-\text{CH}_2-$) 的化学位移。图 3-2 中 d ($\delta 3.667$), e ($\delta 3.831$) 和 f ($\delta 3.717$) 的峰均为 mPEG 中亚甲基质子 ($-\text{CH}_2-$) 的化学位移, c ($\delta 3.387$) 处的吸收峰为 $\text{CH}_3\text{O}-$ 中甲基的 $-\text{CH}_3$ 质子的化学位移。图 3-3 同图 3-2 相比, 主要在低场出现了一系列峰, g ($\delta 3.025$) 处的吸收峰为与氨基甲酸酯基相连的亚甲基质子 ($-\text{CH}_2-$) 的化学位移, h ($\delta 2.964$) 处的峰应为 $-\text{NCO}$ 相连的次甲基 ($-\text{CH}$) 质子的化学位移, i, j, k, l ($\delta 1.700, 1.061, 1.200, 0.925$) 的几处峰均为环己烷上的亚甲基及与之相连的甲基上质子的化学位移。图 3-4 同图 3-1 和图 3-3 相比, 既有 PEG 上质子的特征吸收峰 c'', d'', e'', f'' ($\delta 3.399, 3.658, 3.776, 4.112$), 又有 PEI 上质子的特征吸收峰 a', b' ($\delta 2.783, 2.659$), 低场 i', j', k', l' ($\delta 1.701, 1.063, 1.232, 0.880$) 处还可见环己烷上的亚甲基及与之相连的甲基上质子的吸收峰, 由此图谱可进一步确定聚合物为 PEG 与 PEI 的共聚物。

同时可根据共聚物中乙烯亚胺单元 ($\delta 2.5 \sim 3.0$) 和乙二醇单元 $\delta 3.6$ 中相关氢的积分面积之比计算出共聚物中两组分的质量比及相对分子质量, 见表 1。

从表 1 中可以看出, 由 ^1H NMR 所计算的不同投料比所得的共聚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, 因此可通过改变反应物的投料比来调节生成共聚物的组成。

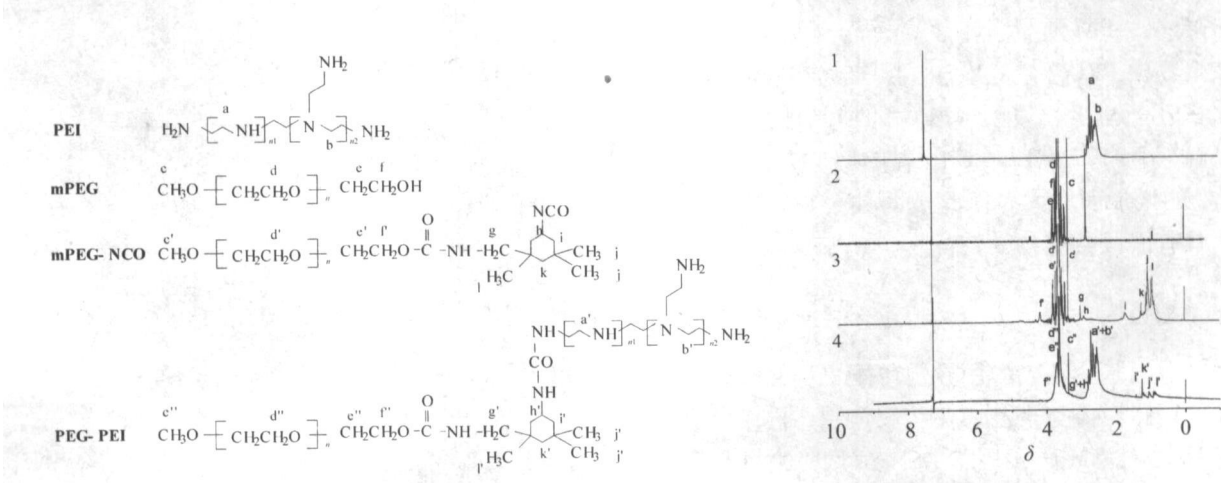


图 3 均聚物与共聚物的 ^1H NMR 谱图

Fig. 3 ^1H NMR spectra of homopolymers and copolymers
1. PEI 2. mPEG 3. mPEG-NCO and 4. PEG-PEI

表 1 PEG-PEI 共聚物的组成及相对分子质量
Tab. 1 Compositions and molecular weights of PEG-PEI copolymer

名称	反应物				产物				
	$M_n(\text{PEG})$	$M_n(\text{PEI})$	$\frac{r(\text{PEG})}{r(\text{PEI})}$	$\frac{w(\text{PEG})}{w(\text{PEI})}$	修饰 $\%$	$\frac{r(\text{PEG})}{r(\text{PEI})}$	$w(\text{PEI}) \%$	$M_n(\text{PEG-PEI})$	$y \%$
PEI		25 000	—	—	—	—	100	25 000	—
PEG-PEI (2-25-1)	2 000	25 000	4.17	1/3	0.5	2.9	81.13	31 000	79.55
PEG-PEI (2-25-2)	2 000	25 000	12.5	1/1	1.8	10.5	54.41	46 000	75.0
PEG-PEI (2-25-3)	2 000	25 000	37.5	3/1	4.5	26.0	32.51	77 000	75.0
PEG-PEI (5-25-1)	5 000	25 000	1.67	1/3	0.3	1.8	73.53	34 000	73.86
PEG-PEI (5-25-2)	5 000	25 000	5	1/1	1.24	7.2	41.06	61 000	75.29
PEG-PEI (5-25-3)	5 000	25 000	15	3/1	3.54	20.6	19.55	128 000	87.34

2.4 GPC 的测定

图 4a、b、c、d 分别为 PEI、PEG、PEG-PEI (2-25-2)、PEG-PEI (5-25-2) 的 GPC 图，曲线上共聚物为一单峰，与 PEI 和 PEG 均聚物峰位置不同，表明产物是 PEG-PEI 共聚物，没有 PEG 和 PEI 均聚物的存在。GPC 计算所得聚合物 PEG-PEI (2-25-2) 和 PEG-PEI (5-25-2) 的 M_n 分别为 44 740 和 53 990，相对分子质量分布值分别为 1.24 和 1.16，与 ^1H NMR 计算得到的相对分子质量相比，GPC 测得的聚合物的相对分子质量偏小，这是由于嵌段共聚物有着与 GPC 标样聚苯乙烯不同的流体力学行为所致。本文研究的共聚物的相对分子质量以 ^1H NMR 的测定结果为准。

2.5 共聚物的 DSC 分析

图 5 中 a 线的峰为 mPEG 结晶熔融的吸热峰， T_m 为 66 $^{\circ}\text{C}$ 。b、c、d 线共聚物的 T_m 分别为 52.7、50.2、49.3 $^{\circ}\text{C}$ ，较均聚物 T_m 有不同程度的下降，这是 PEG 和 PEI 两种嵌段的相互缠结的结果使结晶度下降^[11]，PEI 质量含量越高， T_m 下降就越大。随着共聚物中 PEI 含量的增加，共聚物在低温一侧的峰面积逐渐减少，表明 mPEG 的结晶性被破坏。同时高温一侧 127 ~ 128 $^{\circ}\text{C}$ 出现的吸热峰强度随 PEI 含量的增加而增大。由此表明共聚物存在微相分离，具有嵌段共聚物的特征。

3 结 论

将单甲氧基聚乙二醇用异佛尔酮二异氰酸酯活化生成预聚体，再与聚乙烯亚胺聚合制备嵌段共聚物，用 IR、 ^1H NMR、GPC、DSC 对共聚物进行了表征。结果表明，生成了 PEG-PEI 共聚物，产物中无残留反应物，该聚合反应为可控反应，通过调节 PEG 与 PEI 的投料比例可控制共聚物组成及相对分子质量。PEG-PEI 嵌段共聚物有望成为新型非病毒基因载体材料。

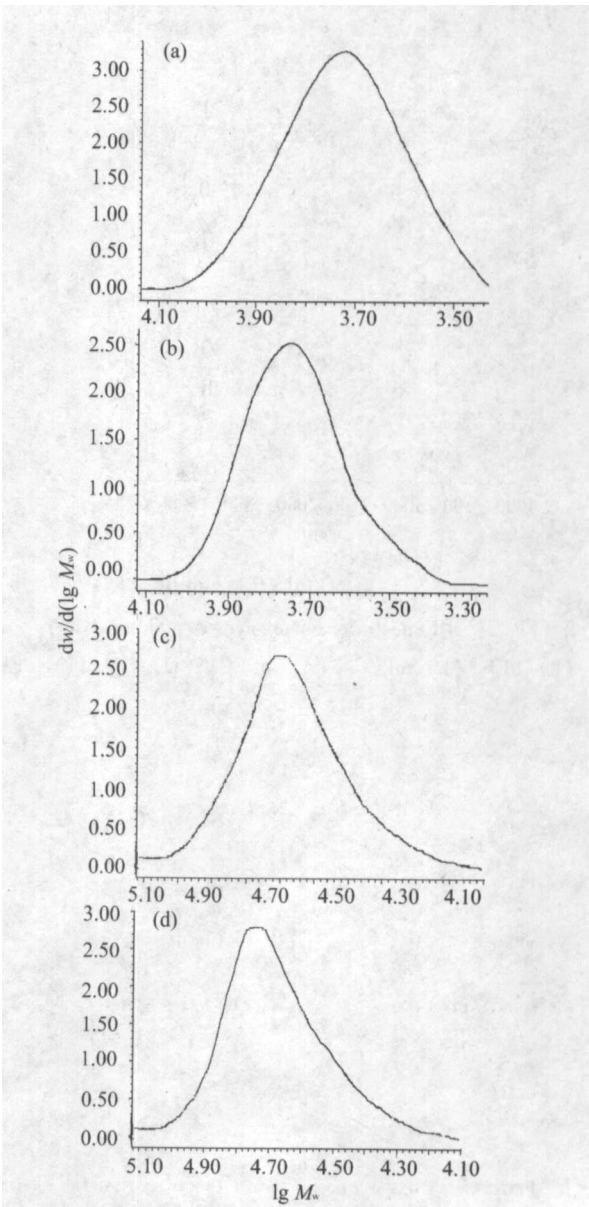


图 4 均聚物与共聚物的 GPC 谱图

Fig. 4 GPC trace of homopolymers and copolymers
(a) PEI (b) mPEG (c) PEG-PEI (2-25-2)
and (d) PEG-PEI (5-25-2)

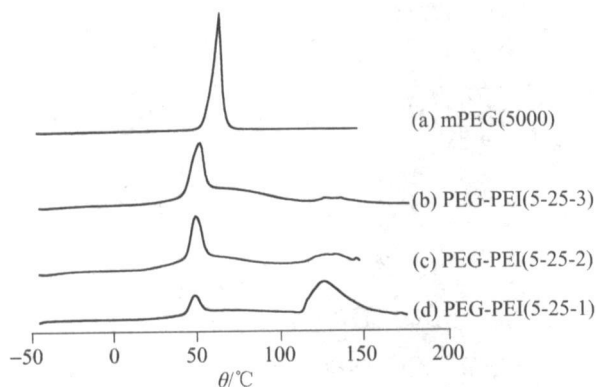


图 5 mPEG 及共聚物的 DSC 曲线

Fig 5 DSC curves of mPEG and copolymers

参考文献:

- [1] KAKIYAMA Y, KATAOKA K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds[J]. *Adv Drug delivery Reviews* 2002 54(2): 203 - 222
- [2] BOUSSIF O, LEZOUALCH E, ZANTA M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo* polyethylenimine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92(16): 7297 - 7301
- [3] BOUSSIF O, ZANTA M A, BEHR J P. Optimized galenicics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1 000 fold[J]. *Gene Ther* 1996 3(12): 1074 - 1080
- [4] GODBEY W T, MUKOSA G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery[J]. *J Controlled Release* 2001 72(1 - 3): 115 - 125

- [5] JUNG W H, JAE H P, KANG M H, et al. PEGylated polyethylenimine for *in vivo* local gene delivery based on lipidized emulsion system[J]. *J Controlled Release* 2004 99(1): 167 - 176
- [6] TANG G R, ZENG J M, GAO A S J, et al. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent[J]. *Biomaterials* 2003 24(13): 2351 - 2362
- [7] SUNG S J, MIN S Y, CHO K Y, et al. Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine[J]. *Biol Pharm Bull* 2003 26(4): 492 - 500
- [8] 钟立. 异氰酸酯的合成与应用[J]. *化工进展*, 2000(4): 50 - 53
- [9] PETERSEN H, FECHNER P M, MARTIN A L, et al. Polyethylenimine graft poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system[J]. *Bioconjugate Chem* 2002 13(4): 845 - 854
- [10] PETERSEN H, KUNATH K, MARTIN A L, et al. Star shaped poly(ethylene glycol)- block polyethylenimine copolymers enhance DNA condensation of low molecular weight polyethylenimines[J]. *Biomacromol* 2002 3(5): 926 - 936
- [11] 邓联东, 孙多先, 姚芳莲, 等. 聚乙二醇-聚己内酯三嵌段共聚物的合成与表征[J]. *现代化工*, 2003 23(6): 35 - 37.

Synthesis and Characterization of Poly(ethylene Glycol) - Polyethylenimine Copolymer

ZHANG Xuan, PAN Shirong, LÜ Shu, HU Haimei, ZHANG Wei

(The No. 1 Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract PEI was modified with PEG in order to improve its physical properties for nonviral gene delivery. mPEG was modified with IPDI, which was reacted with PEI to synthesize the block copolymer of PEG-PEI. The copolymer was characterized by IR, ¹H NMR, GPC, DSC analysis. IR spectrum showed the absorption of the isocyanate of mPEG-NCO and absorption of the urea bond of PEG-PEI. The results of ¹H NMR analysis indicated the polymerization was a controlled reaction, in which the composition and molecular weight of the copolymer could be controlled through adjusting ratio rates. The GPC of the copolymer exhibited only one peak different from that of PEG and PEI homopolymers, illustrating the product only contained PEG-PEI copolymer. DSC measurements of copolymer showed a shift of *T_m* to lower values in comparison to the *T_m* of PEG homopolymer, implying the entanglement of the two blocked chains. The results indicated the PEG-PEI block copolymers were synthesized successfully.

Key words polyethylenimine; monomethoxy (polyethylene glycol); copolymer; isopropyl diisocyanate