

具有荧光探针的靶向肽/聚(醚-酰胺)制备 及其肝癌细胞靶向性能研究*

宋春梅^{1,4**} 张 亮¹ 梁晟斌¹ 钱 旻² 杜 冰² 余亦华^{3,4} 李建奇^{3,4}

(华东师范大学¹ 化学系² 生物系³ 物理系⁴ 上海市磁共振重点实验室 上海 200062)

摘 要 通过端氨基聚乙二醇(PEG(I))与二亚乙基三胺五乙酸二酐(DTPAA)开环合成新型端氨基聚(醚-酰胺)(PEG/DTPA)共聚物造影剂配体(II)(Step 1); II的端氨基与偶联剂3-马来酰亚胺苯甲酸-N-琥珀酰亚胺酯(MBS)的活化端COOH反应,生成偶联剂/聚(醚-酰胺)MB/PEG/DTPA(III')(Step 2);再通过III'中MBS的C=C双键与肝癌细胞靶向黏附肽FAM-AGKGTPSLETPC-(SH)-COOH(FAM-13)上的巯基SH发生Michael加成反应(Step 3),合成含有荧光探针FAM(5-carboxyfluorescein)的肝癌靶向肽/聚(醚-酰胺)(FAM-13/PEG/DTPA, III)。用¹H-NMR和¹³C-NMR等方法对共聚物进行表征。III对正常肝细胞L-02几乎观察不到荧光现象,而对肝癌细胞BEL-7404则有很强的黄绿色荧光,III对肝癌细胞有很强的靶向性。大分子配体III可望用于制备大分子造影剂及靶向载体负载药物。

关键词 FAM-13/PEG/DTPA 共聚物, 荧光探针, 肝癌靶向肽, 配体

基因治疗^[1]是治疗肿瘤的强有力的方法之一。然而存在两个问题,一是基因不能靶向于目标细胞,二是在药物评价时采用传统放射性同位素标记存在放射性污染。采用载体负载基因可以解决上述问题,然而用病毒作载体存在安全问题,因此高分子载体成为研究重点。如果在高分子造影剂载体上连接对人体某一组织或器官具有亲和性的基团,那么就能增强组织或器官的靶向性,从而实现靶向治疗,并可通过磁共振方法跟踪^[2,3],该领域是近年来的研究热点。但要制备的造影剂与靶向基团顺利结合,必须先制得具有可反应官能团的配体。

本文把端氨基聚(醚-酰胺)(PEG/DTPA, II)共聚物与肝癌细胞靶向多肽FAM-13偶联,反应后多肽保持生物学活性,提出的MBS偶联方法具有普适性。并对共聚物进行了表征及靶向性对比实验。制备的产物可作为高分子造影剂、DNA药物或其他癌症药物的载体,以及利用半衰期长的造影剂^[5]跟踪药物的释放及癌症治疗情况。

1 实验部分

1.1 实验试剂及配制

二亚乙基三胺五乙酸二酐(DTPAA);端氨基

聚乙二醇(PEG3350, $M_n = 3350$)、三氯化钆($GdCl_3 \cdot 6H_2O$, AR)和3-马来酰亚胺苯甲酸-N-琥珀酰亚胺(MBS)购自Fluka;荧光素FAM标记肝肽FAM-13(FAM-AGKGTPSLETPC-(SH)-COOH, 华大天源多肽公司定做);无水乙醇(CP, 上海建鑫化学试剂厂);无水乙醚、三乙胺(TEA)和N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 分子筛干燥后减压蒸馏)(AR, 国药集团化学试剂有限公司);磷酸缓冲液(PBS)(pH = 7.4);肝癌细胞株BEL-7404和正常肝细胞株L-02购自中国科学院上海细胞库。

1.2 端氨基聚(醚-酰胺)共聚物配体(II)的合成

取端氨基聚乙二醇(I)(1 g, 0.2985 mmol)于单口瓶中,磁力搅拌使其溶于干燥DMF。再取DTPAA(0.0714 g, 0.2 mmol)加热溶于3 mL DMF,滴加。加入三乙胺84 μ L(0.6 mmol),室温反应24 h,减压蒸出DMF,无水乙醇重结晶3次,真空干燥得白色粉末产物II 1.01 g,产率94.2%。

1.3 含有荧光探针的肝癌靶向肽/聚(醚-酰胺)FAM-13/PEG/DTPA共聚物III的合成

在5 mL单口瓶中加入II(36 mg, 6.912 μ mol NH_2), MBS(2.16 mg, 6.912 μ mol), TEA(0.4 μ L),干燥DMF(2 mL),磁力搅拌下室温反应3 h,减压

* 2009-08-11 收稿, 2009-10-12 修稿; 国家高科技研究发展计划(863 计划, 项目号 2004AA302080)、上海市闵行区区域“三区联动”项目(项目号 48100270)、上海市科委重点项目(项目号 44031000)和上海市磁共振重点实验室(华东师范大学)开放课题基金资助; ** 通讯联系人, E-mail: cmsong@chem.ecnu.edu.cn

蒸出 DMF. 然后加入 FAM-13 肝肽 (12 mg, 7.4088 μmol), PBS (9 mL, pH = 7.4), 磁力搅拌下室温反应 24 h, 透析 72 h (透析袋截留分子量是 3400), 每隔 8 h 换透析液 1 次, 至透析外液无颜色, 透析内液为带有黄绿色荧光的产物水溶液, 冻干后得淡黄色粉末产物 33.8 mg **III**, 合成过程见示意图 1.

1.4 肿瘤及正常细胞培养

将 BEL-7404 细胞及正常肝细胞 L-02 置于含 10% 小牛血清-1% 双抗, pH 7.0 的 RPMI 1640 培养基中常规培养 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2). 将生长状态良好的肝癌细胞和正常细胞经过胰酶消化后用 RPMI 1640 培养基重悬浮细胞, 密度调至 10^4 个/mL; 将细胞置入加有盖玻片的 12 孔板中, 爬片生长到盖玻片底面积的 50% ~ 70% 时, 用于免疫荧光细胞化学实验. 用 PBST 抗体稀释液将培养基洗净, 70% 酒精固定 15 min, 洗净后, 加偶联 FAM-13 肽的 **III** (0.05 mg/mL) 孵育 1 h (37 $^{\circ}\text{C}$); PBST 清洗, 缓冲甘油封片, 在荧光显微镜下观察.

1.5 分析与测试方法

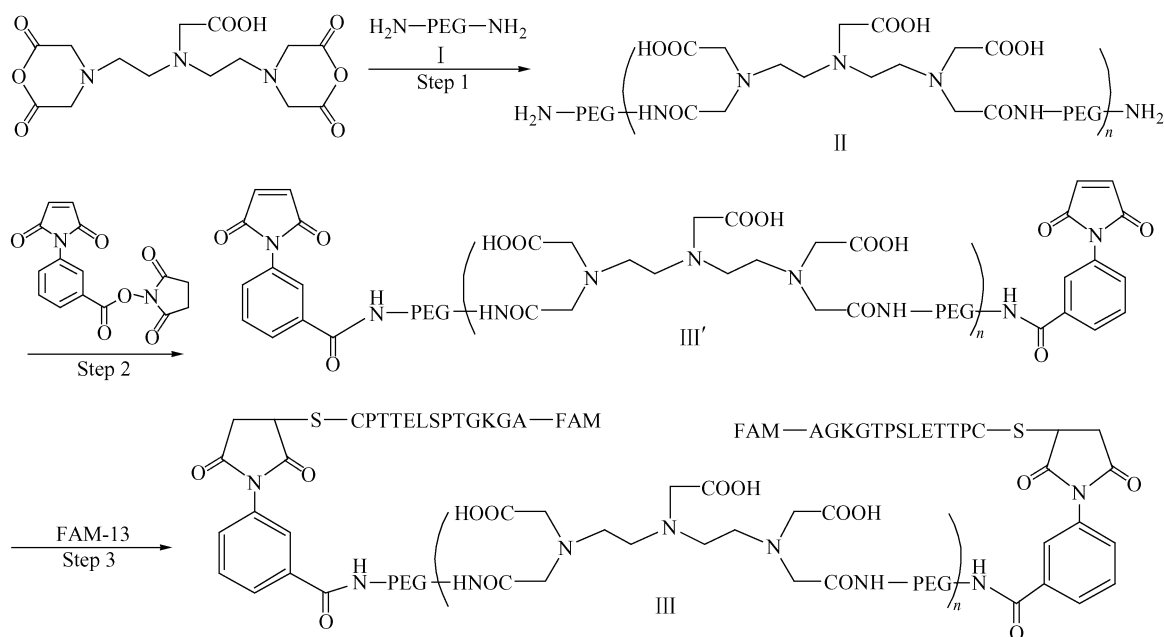
用 Bruker DRX 500 MHz NMR 核磁共振波谱仪进行核磁共振测定, 质子谱以四甲基硅烷 (TMS) 为内标, 溶剂为氘代氯仿 CDCl_3 、氘代二甲亚砜 $\text{DMSO}-d_6$ 或氘代重水 D_2O ; ^1H -NMR 实验, 频

率为 500.13 MHz, 谱宽 10.0 kHz, 32.77 K 数据点, 重复周期为 3.00 s, 累加 32 次; ^{13}C -NMR 实验, 频率为 125.77 MHz, 谱宽 37.59 kHz, 32.77 K 数据点, 重复周期为 30.00 s, 累加 1024 次. 分子量, 凝胶渗透色谱 (GPC) 法, 用 Waters 1525 型凝胶渗透色谱仪, 流动相为 DMF.

2 结果与讨论

2.1 端氨基聚(醚-酰胺)共聚物配体 II 的表征

端氨基聚乙二醇 I 的 ^1H -NMR (CDCl_3) 谱图见图 1(A), 对应 H 质子归属见图中注释. 端氨基聚(醚-酰胺)共聚物 II 的 ^1H -NMR (CDCl_3) 谱图见图 1(B), 聚合物中对应氢质子的归属如下: δ = 2.86 (DTPA 上 m 位 CH_2), 2.94 (DTPA 1 位 CH_2), 3.12 (PEG 上 q 位 CH_2 [5]), 3.27 ~ 3.35 (PEG 上 r, t, u 位 CH_2), 3.43 ~ 3.77 (PEG 上 s 位 CH_2), 4.15 (DTPA 上 k, o, n 位 CH_2), 6.45 (PEG 上 v 位 NH_2), 6.85 (CONH 键上 NH), 8.01 (DTPA 上 x 位 COOH), 8.20 (DTPA 上 w 位 COOH). 从图 1(A), (B) 和 (C) 的比较中可以看出, 产物 r 位 CH_2 由于与 DTPAA [5] 发生开环加成, 向低场偏移. GPC 方法测定数均分子量为 10400, 所以示意图 1 中 n 的平均值为 1.9.



Scheme 1 Synthesis of copolymers

2.2 含有荧光探针的肝癌靶向肽 FAM-13/PEG/DTPA 共聚物配体 III 的合成及表征

前面制备了含有 DTPA 造影功能基的共聚物

II, 肝癌细胞靶向多肽原来的次序为 NH_2 -AGKGTPSLETPP-COOH [4], 多肽链有 4 个 OH、2 个 NH_2 、2 个 COOH, 难点在于不经过剧烈的反应

条件下,与多肽特定位点 COOH 端反应,不影响多肽生物活性的条件下将两者连接起来.为了解决该问题,选用 MBS 作为偶联剂,首先在温和的条件下将 II 和 MBS 的活化端 COOH 反应 (Step 2); 为了避免发生副反应,在 NH_2 -

AGKGTPSLETPP-COOH 中引入半胱氨酸,变成 FAM-AGKGTPSLETPP-(SH)-COOH,利用 SH 与 MBS 上的双键反应,合成含有荧光探针的肝癌靶向肽/聚(醚-酰胺) (FAM-13/PEG/DTPA, III) 共聚物,此反应条件温和,无副反应 (Step 3).

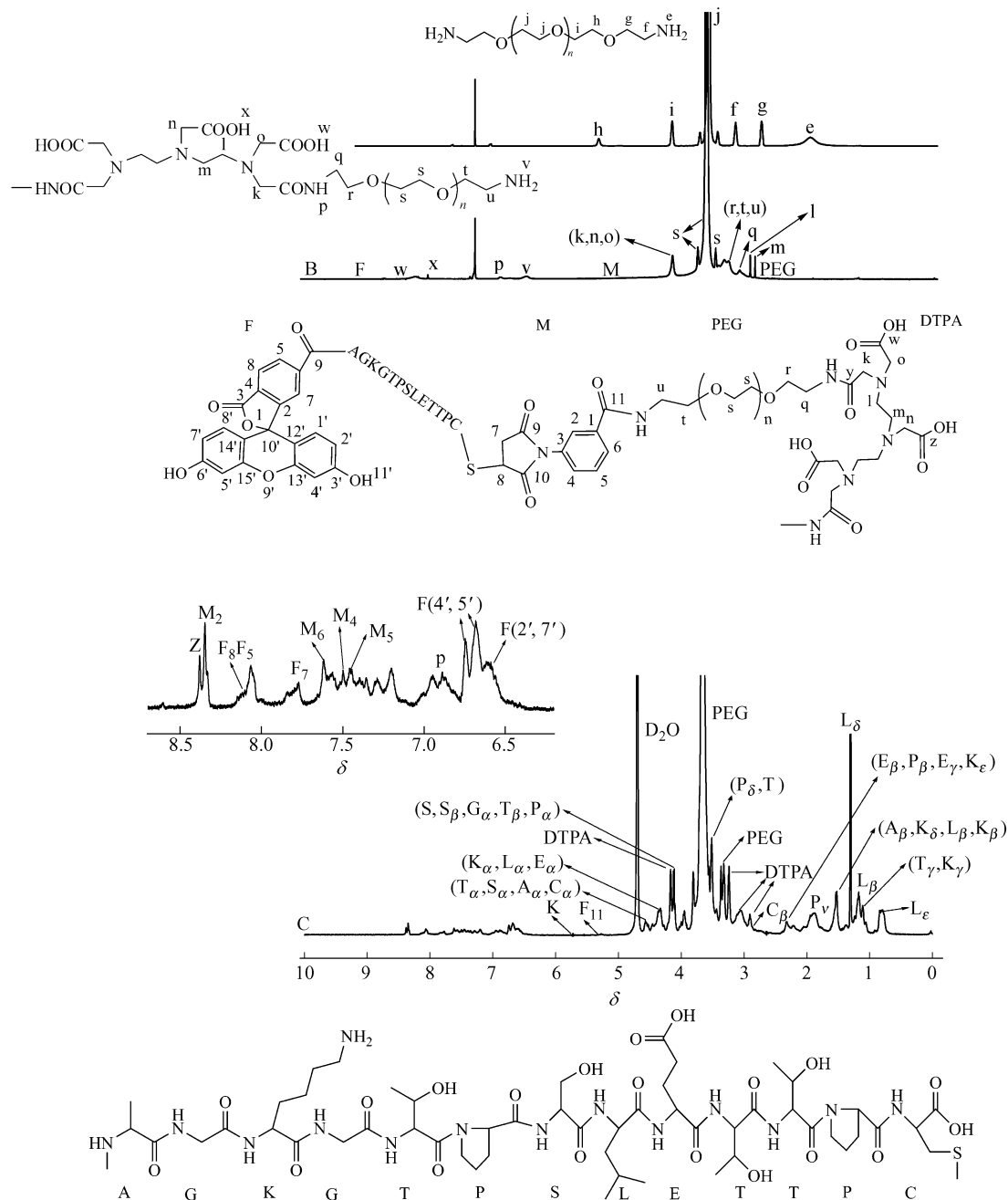


Fig. 1 The ^1H -NMR spectra of I, II and III
Curve A, I; Curve B, II; Curve C, III

共聚物 III 的 ^1H -NMR (D_2O) 谱图见图 1 (C). 在 Step 2 中, II 的端氨基与偶联剂 MBS 发生亲核取代反应后, MBS 上苯环及 II 中 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2$ 峰位有明显变化. 反应后 III 中 $\delta = 7.44 \sim 7.45$

(MBS 5 位 CH)、7.49 (MBS 4 位 CH)、7.56 ~ 7.61 (MBS 6 位 CH) 和 8.33 ~ 8.35 (MBS 2 位 CH); 原料 MBS 中苯环: $\delta = 7.64$ (5 位 CH)、7.77 (4 位 CH)、7.95 (6 位 CH) 和 8.45 (2 位

CH);反应后向高场偏移.Ⅲ中 PEG: $\delta = 3.32$ (PEG 上 q 位 CH_2), 3.36 (PEG 上 u 位 CH_2), $3.56 \sim 3.67$ (PEG 上 s 位 CH_2), 3.80 (PEG 上 r 位 CH_2), 3.81 (PEG 上 t 位 CH_2);与原料Ⅱ中 PEG 化学位移相比向低场偏移.在 Step 3 中,连接 FAM-13 后Ⅲ中: $\delta = 2.90$ 、 2.80 (半胱氨酸 C_β 位 CH_2), 4.57 (C_α 位 CH);原料 FAM-13: $\delta = 3.17$ 、 2.92 (半胱氨酸 C_β 位 CH_2), 4.78 (C_α 位 CH);反应后向高场偏移.在Ⅲ中: $\delta = 2.94$ (MBS 7 位 CH_2), 3.77 (MBS 8 位 CH);原料 MBS: $\delta = 6.94$ (7 位和 8 位 CH);反应后向高场偏移.

其它的 H 质子归属如下: $\delta = 0.809$ (亮氨酸 L_ϵ 位 CH_3), 1.11 (苏氨酸 T_γ 位 CH_3), 1.18 (赖氨酸 K_γ 位 CH_2), 1.31 (L_δ 位 CH), $1.52 \sim 1.54$ (丙氨酸 A_β 位 CH_3 , K_δ 位 CH_2 , L_β 位 CH_2 , K_β 位 CH_2), 1.85 、 1.90 (脯氨酸 P_γ 位 CH_2), $2.05 \sim 2.06$ (谷氨酸 E_β 位 CH_2 , P_β 位 CH_2 一个 H), 2.20 (E_γ 位 CH_2), 2.30 (P_β 位 CH_2 的一个 H), 2.32 (K_ϵ 位 CH_2), 2.91 (DTPA 中 m 位 CH_2), $3.06 \sim 3.23$ (DTPA 1 位 CH_2), 3.43 、 3.51 (P_δ 位 CH_2), 3.52 (T 上 OH), 3.54 (丝氨酸 S 上 OH), 4.09 (S_β 位 CH_2), 4.11 (甘氨酸 G_α 位 CH_2), 4.12 (T_β 位 CH), 4.14 (P_α 位 CH), 4.16 (DTPA 中 k、w、n 位 CH_2), 4.33 、 4.34 、 4.35 (分别是 K_α 位 CH, L_α 位 CH, E_α 位 CH), 4.45 、 4.50 、 4.52 (分别是 T_α 位 CH, S_α 位 CH, A_α 位 CH), 5.30 (FAM 上 OH, F11'), 5.75 (K 上 NH_2), $6.56 \sim 6.61$ (FAM 2', 7' 位 CH), $6.68 \sim 6.74$ (FAM 4', 5' 位 CH), $6.88 \sim 6.94$ (聚合物 p 位 NH), $7.19 \sim 7.28$ (FAM 1', 8' 位 CH), $7.76 \sim 7.79$ (FAM 7 位 CH), $8.06 \sim 8.10$ (FAM 5 位 CH, 多肽中 CONH, FAM 8 位 CH), 8.38 (A 上 NH), 8.60 (DTPA 中 COOH).

根据核磁图计算每个大分子连接含有荧光素的多肽 1.54 个.

2.3 含有荧光探针肝癌靶向肽 FAM-13/PEG/DTPA 共聚物Ⅲ的靶向性修饰效果

如何检测所合成的聚合物具有靶向性是个难点.本实验在多肽 $\text{NH}_2\text{-AGKGTSPSLETPC-(SH)-COOH}$ 的氨基端设计连接黄绿色的 6-羧基荧光素 (FAM) 作为荧光探针,用荧光探针进行检测.

研究了共聚物Ⅲ的靶向性修饰效果,肝癌细胞特异性鉴定结果如下:免疫荧光细胞化学实验显示,Ⅲ孵育后的细胞,在正常肝细胞 L-02 只有极微弱的自发荧光(图 2),而肝癌细胞 BEL-7404

则产生很强的黄绿色荧光(图 3),因此认为Ⅲ是与肝癌细胞特异结合的.图 3 中肿瘤细胞表面环绕一圈黄绿色荧光,说明Ⅲ中的 FAM-13 肝癌黏附肽能与单个肝癌细胞特异性结合,且结合位点位于肿瘤细胞的膜表面.仔细观察细胞膜发现,每个细胞膜上都在某个部位荧光特别集中,说明膜的不同部位与Ⅲ的结合量是不同的,进而推断肝癌细胞膜上存在某种蛋白受体与Ⅲ中的 FAM-13 肽有着较强的结合能力.

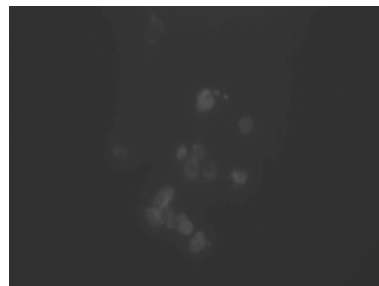


Fig. 2 The fluorescence image of Ⅲ in normal cells L-02

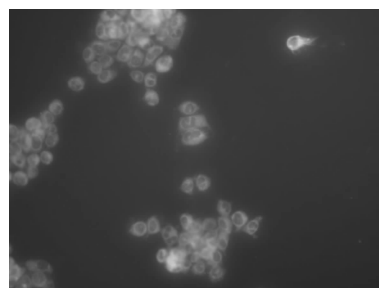


Fig. 3 The fluorescence image of Ⅲ in liver cancer cells BEL-7404

所以,Ⅲ中的 FAM-13 肽仍然具有很强的靶向浸润肿瘤细胞的能力,且是与肿瘤细胞膜表面抗原结合.Ⅲ中的 FAM-13 肽的线性表位中有与肿瘤细胞特异结合的功能表位,这是其作为肝癌药物靶向载体的理论基础.Ⅲ不仅可以作为肿瘤靶向药物的载体,也可作为探针来研究肿瘤细胞表面的受体蛋白,为药物的优化设计提供科学依据.大分子配体具有靶向多肽,具有可以与钆形成稳定络合物的 DTPA 结构,可望作为肝癌组织靶向性药物载体及大分子造影剂.

3 结论

用简便的方法合成了含有荧光探针的肝癌靶向肽 FAM-13/PEG/DTPA 共聚物Ⅲ.用 NMR 方法表征了大分子结构.研究了含荧光探针的肝癌靶向肽 FAM-13/PEG/DTPA 共聚物Ⅲ的靶向性能,细胞实验表明Ⅲ对肝癌细胞 BEL-7404 有很强的

特异性结合能力.

REFERENCES

- 1 Putnam D. *Nature Materials*, 2006, 5(6): 439 ~ 451
- 2 Bertolini F, Shaked Y. *Nature Reviews*, 2006, 6(11): 835 ~ 836
- 3 Wood K C, Azarin S M, Arap W, Langer R, *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 403 ~ 405
- 4 Qian Min(钱旻), Zhou Zhongliang(周忠良), Zhang Ping(章平), Du Bing(杜冰), Wang Peng(王鹏), Yu Meng(郁萌). Chinese patent, ZL, 200410017050. 7. 2006-02-22
- 5 Song Chunmei(宋春梅), Xue Haili(薛海丽), Li Jianqi(李建其), Yu Yihua(余亦华), Peng Min(彭敏), Qian Min(钱旻), Du Bing(杜冰), Chen Qun(陈群), Xie Meiran(谢美然). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (3): 278 ~ 283

SYNTHESIS OF FLUORESCENCE LABELED PEPTIDE/POLY(ETHER-AMIDE) WITH TARGETING FUNCTION TO LIVER CANCER CELLS

SONG Chunmei^{1,4}, ZHANG Liang¹, LIANG Shengbin¹, QIAN Min², DU Bing², YU Yihua^{3,4}, LI Jianqi^{3,4}

(¹ Chemistry Department, ² Biology Department, ³ Physics Department,

⁴ Shanghai Key Laboratory of Magnetic Resonance, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract To develop and characterize a new cancer target gene delivery carrier, which could be used as potential blood pool magnetic resonance (MR) contrast agents, a novel FAM-AGKGTSPLETTTPC-COOH/poly(ether-amide) (FAM-13/PEG/DTPA) copolymer (Ⅲ) with fluorescence probe was designed and obtained first from the reaction of the amino group terminated poly(ether-amide) (PEG/DTPA) copolymer ligand (Ⅱ) with heterobifunctional cross-linker *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) (Step 2), and then Michael addition of C=C double bond in MBS moiety with SH group in FAM-labeled hepatocarcinoma specific adhesin peptide, FAM-AGKGTSPLETTTPC-(SH)-COOH (FAM-13), in high yield (Step 3). Ⅱ was prepared by the reaction of diethylenetriamine pentaacetic acid dianhydride (DTPAA) with amino group terminated PEG (Ⅰ) (Step 1). The two copolymers of Ⅱ and Ⅲ were characterized by ¹H-NMR and ¹³C-NMR measurements. The liver tumor-specific identification and antigen localization of Ⅲ with the fluorescein-labeled FAM-13 peptide were performed under cellular level. Targeting properties of Ⅲ were tested on the normal cells and liver cancer cells, respectively. No fluorescence was observed on normal liver cells L-02, while strong yellowish green fluorescence was observed on the liver cancer cells BEL-7404. The property of FAM-13 peptide in Ⅲ for recognizing specifically the liver cancer cells was demonstrated. It was also demonstrated that the chemically synthesized Ⅲ with peptide FAM-13 still had the property for targeting on the surface membrane of liver cancer cells in vitro, thus further indicating that the specific targeting effect of the objective tissue was mediated by the peptides of Ⅲ insert into the cell membrane. It is evident that the Ⅲ with FAM-13 peptide would be an excellent candidate for the targeting therapy to hepatocarcinoma. So ligand molecules Ⅲ with targeting peptides can target hepatocellular carcinoma. Ligand Ⅲ is a promising candidate, which can be coordinated with Gd³⁺ ion to give the macromolecular contrast agent.

Keywords FAM-13/PEG/DTPA copolymer, Fluorescence probe, Liver target peptide, Ligand