

通过甲基丙烯酰胺侧基迈克尔加成制备阳离子聚碳酸酯*

张孝进 陈富偈 钟振林**

(武汉大学化学与分子科学学院 生物医用高分子材料教育部重点实验室 武汉 430072)

摘 要 针对高分子量的聚乙烯亚胺(PEI)作为基因载体效率高但毒性大,而低分子量的聚乙烯亚胺虽毒性低但对基因的结合能力差、转染效率低的矛盾,设计合成了主链可生物降解而侧链带有胺类化合物的阳离子聚碳酸酯.首先,2-氨基-1,3-丙二醇和甲基丙烯酰氯反应制得2-(甲基丙烯酰胺基)-1,3-丙二醇,再用氯甲酸乙酯在室温下用三乙胺作碱关环反应得到2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯(MATC)单体.该单体在二氯甲烷溶液中在1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)催化下开环聚合得到聚(2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯)(PMATC).然后,利用侧基双键和乙二胺或者低分子量PEI的迈克尔加成反应分别制备了带有乙二胺侧基的阳离子聚碳酸酯PTMC-EDA以及带有PEI侧链的聚碳酸酯PTMC-PEI.凝胶色谱(GPC)法测得聚碳酸酯PMATC、阳离子聚碳酸酯PTMC-EDA和PTMC-PEI的重均分子量分别为6300、7400、15100,分子量分布指数分别为1.21、1.83和2.17.这类带有多胺侧基或侧链的阳离子聚碳酸酯在较低用量下即能与pDNA形成表面带正电的粒径200 nm左右的复合物.它们具有与不可降解的25 kDa PEI类似的对pDNA的优良结合能力,并且对细胞的毒性要低得多.

关键词 聚碳酸酯, 聚乙烯亚胺, 聚阳离子, 开环聚合, 迈克尔加成

在过去的几十年间,生物可降解或者生物可吸收的聚合物由于在生物医学领域的应用,如医疗植入物和药物释放系统等,越来越受到人们的重视^[1].由于其具有良好的生物相容性和生物可降解性,脂肪族聚碳酸酯在生物医学和制药中得到越来越广泛的应用^[2].脂肪族聚碳酸酯一般是由六元环碳酸酯单体开环聚合制得的,降解是通过表面侵蚀进行的.在聚碳酸酯中引入羧基、羟基、氨基等功能性基团,可提高聚碳酸酯的亲水性、降解速率和机械强度等性能^[3-5].

在基因治疗领域,聚乙烯亚胺(PEI)及其衍生物作为非病毒载体获得了迅速发展^[6].阳离子聚合物PEI被广泛地用作体内和体外基因转染,这主要是由于它具有很多优于其他阳离子聚合物的特点,如对DNA有很强的结合能力、能有效保护DNA使之免受细胞内核酸酶的降解、具有从体内中逃逸的能力等,它是目前合成的阳离子聚合物中最有效的基因载体之一^[7-9].高分子量的PEI能与DNA形成紧密的复合物,基因转染效率高,但是细胞毒性大^[10].与之相反,低分子量的PEI在细胞培养的过程中显示出很低的细胞毒

性^[11],但是它不能有效结合DNA,显示出很低的转染效率^[12].

为了克服这些问题,研究者们通过在生物可降解聚合物主链上接枝小分子量PEI使之既具有可生物降解的性能,又达到高效低毒的效果^[13-19].在本文中合成了一种带有甲基丙烯酰胺侧基的聚碳酸酯,然后通过双键和胺类化合物(乙二胺或者PEI)的迈克尔加成反应制备了阳离子聚碳酸酯,考察了该阳离子聚碳酸酯的细胞毒性,并研究了该阳离子聚碳酸酯与DNA形成复合物的能力以及该复合物的粒径和zeta电势.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

四氢呋喃、三乙胺、氯甲酸乙酯、二氯甲烷和苯甲醇均经干燥重蒸;1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)购自Alfa公司,直接使用;600 Da和25 kDa PEI自Alfa公司购得,直接使用;pGL-3质粒自Promega公司购得;人类子宫颈癌细胞(HeLa)购自中国典型培养物保藏中心(武汉),DMEM培养基干粉购自Gibco;噻唑蓝

* 庆祝卓仁禧院士80华诞专稿;2011-04-18收稿,2011-05-23修稿;国家自然科学基金(基金号20974082)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: zljzhong@whu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11119

(MTT)购自 Amresco;二甲亚砜购自 Sigma;24 孔培养板(TCPS)购自 Becton Dickinson;GelRed 染料购自 Biotium 公司.

$^1\text{H-NMR}$ 用 Mercury VX-300 型核磁共振波谱仪在 300 MHz 下测定, CDCl_3 或者 D_2O 为溶剂. $^{13}\text{C-NMR}$ 用 Unity-Inova 600 型核磁共振波谱仪在 150 MHz 下测定, CDCl_3 为溶剂. FTIR 用 Perkin-Elmer-2 红外光谱仪测量. 聚合物的分子量和分散度由 Waters-2690D 高压液相凝胶色谱仪(GPC)系统进行测定, 四氢呋喃或者超纯水为流动相, 流速为 1.0 mL/min.

1.2 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯单体(MATC)的合成

将 10.0 g (0.11 mol) 2-氨基-1,3-丙二醇、12.2 g (0.121 mol) 三乙胺和 50 mL 无水乙醇置于 100 mL 圆底烧瓶中, 冰浴搅拌下逐滴滴加 13.0 g (0.125 mol) 甲基丙烯酰氯, 约 30 min 滴加完. 撤走冰浴, 室温下反应 3 h. 过滤, 滤液浓缩, 并用无水乙醇重结晶得到白色固体 2-(甲基丙烯酰胺基)-1,3-丙二醇, 产率 79%. FTIR: $\nu = 3366\text{ cm}^{-1}$ (OH), $\nu = 1655\text{ cm}^{-1}$ (CONH I), $\nu = 1536\text{ cm}^{-1}$ (CONH II). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , δ): 5.63 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 5.39 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4.01 (t, 1H, NCH), 3.60 (m, 4H, CH_2O), 1.87 (s, 3H, CH_3).

将 9.30 g (58.5 mmol) 2-(甲基丙烯酰胺基)-1,3-丙二醇、14.5 g (134 mmol) 氯甲酸乙酯和 300 mL 无水四氢呋喃置于 500 mL 圆底烧瓶中, 冰浴中搅拌下逐滴滴加 16.4 g (162 mmol) 三乙胺, 约 30 min 滴加完. 撤走冰浴, 室温下反应 2 h. 过滤, 滤液浓缩后加入过量无水乙醚, 析出白色晶体, 并用体积比为 1:3 的四氢呋喃和无水乙醚混合溶剂重结晶 3 次, 得到白色晶体 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯, 产率为 58%. FTIR: $\nu = 1744\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$), $\nu = 1666\text{ cm}^{-1}$ (CONH I), $\nu = 1521\text{ cm}^{-1}$ (CONH II). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ): 7.05 (s, 1H, NH), 5.81 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 5.45 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4.65 (d, 2H, CH_2O), 4.52 (m, 1H, NCH), 4.49 (d, 2H, CH_2O), 1.99 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ): 169.1, 148.6, 139.0, 121.3, 71.1, 41.6, 18.7. $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_3$ 185.18; Calcd. C 51.52, H 5.69, N 7.61; Found C 51.89, H 5.99, N 7.57.

1.3 聚(2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯)(PMATC)的合成

将 0.555 g (3.00 mmol) 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯、8.1 mg (0.075 mmol) 苯甲醇和 9.2 mg (0.06 mmol) 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)溶于 2 mL 无水二氯甲烷中, 室温下反应 5 h. 用 50 mL 正己烷沉淀, 所得聚合物在 40℃ 下真空干燥 24 h, 产率为 97%.

1.4 PMATC 与胺的迈克尔加成反应制备 PTMC-EDA 或 PTMC-PEI

将相对于聚碳酸酯侧基不饱和双键 10 倍量(摩尔比)的胺类化合物(乙二胺或者 600 Da PEI)和 10 mL 无水二氯甲烷置于 50 mL 圆底烧瓶中, 搅拌下加入 0.10 g 聚(2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯)的 10 mL 无水二氯甲烷溶液, 45℃ 搅拌 24 h. 用旋转蒸发器浓缩后加水溶解, 用 0.1 mol/L 稀盐酸调节 pH 至中性, 转入截留分子量为 1000 Da 的透析袋中, 在二次水中透析两天, 冻干.

1.5 阳离子聚碳酸酯(PTMC-EDA 或 PTMC-PEI)的 pDNA 复合物

阳离子聚碳酸酯溶于 150 mmol/L NaCl 溶液中(pH 7.4), 过滤除菌, 制备成 1 mg/mL 的溶液. 在 1.5 mL 无菌离心管中加入 5.0 μL pDNA 的储存液(200 ng/ μL), 用已灭菌的 150 mmol/L NaCl 溶液稀释至 50 μL . 按照一定的重量比, 在温和震荡下加入计算量的阳离子聚碳酸酯溶液, 与质粒 DNA 混合, 震荡 5 s 形成不同重量比的复合物. 该复合物在室温下静置 0.5 h 后, 用于凝胶电泳、粒径、电势以及细胞转染等实验.

1.6 琼脂糖凝胶电泳

将已制备的不同重量比的复合物, 加入含有 GelRed 染料的 0.7% 琼脂糖凝胶中进行电泳实验. 电泳条件为 80 V 下 80 min, 然后在凝胶成像仪(Vilber Lourmat)下通过紫外照射成像观察.

1.7 复合物粒径和电势测定

复合物的粒径和 zeta 电势使用 Nano-ZS ZEN3600(MALVERN)型纳米粒度及表面电势分析仪在 25℃ 时测定. 适量的聚合物溶液和 1 μg pDNA 按照 1.5 节中制备方法制备不同重量比的复合物. 混匀后, 在室温放置 30 min, 然后将复合物溶液用 150 mmol/L NaCl 溶液稀释到 1 mL 测定复合物的粒径; 用超纯水稀释到 1 mL 测定复合物的电势.

1.8 细胞存活率检测

材料的细胞毒性实验是根据 MTT 法在人类子宫颈癌细胞 HeLa 上进行的. HeLa 细胞以 5000 细胞/孔的密度在 96 孔培养板中接种,每孔中加入 100 μL 完全 DMEM 培养基. 阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 或 PTMC-PEI) 或者 PEI 溶于完全 DMEM 培养基,过滤灭菌,用培养基将其等比例系列稀释成不同浓度的高分子溶液,待细胞在 5% CO_2 培养箱中于 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后,每孔细胞中加入阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 或 PTMC-PEI) 或者 PEI 溶液 100 μL (对照组直接加入 100 μL DMEM 培养基). 继续培养 24 h 后,向所有孔中各加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液. 用铝箔包裹培养板,于 37 $^\circ\text{C}$ 湿润环境中温育 4 h. 弃去孔中的培养基和 MTT,各加入 150 μL DMSO,并在室温下振荡,溶解紫色结晶甲瓩. 用酶标仪 (550 BIO-RAD, 美国) 在 570 nm 处记录吸光值 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$). 每个浓度及对照组做 4 个平行样. 根据吸光值计算细胞的相对存活率. 空白组即不加细胞及聚合物溶液,对照组即不加聚合物溶液.

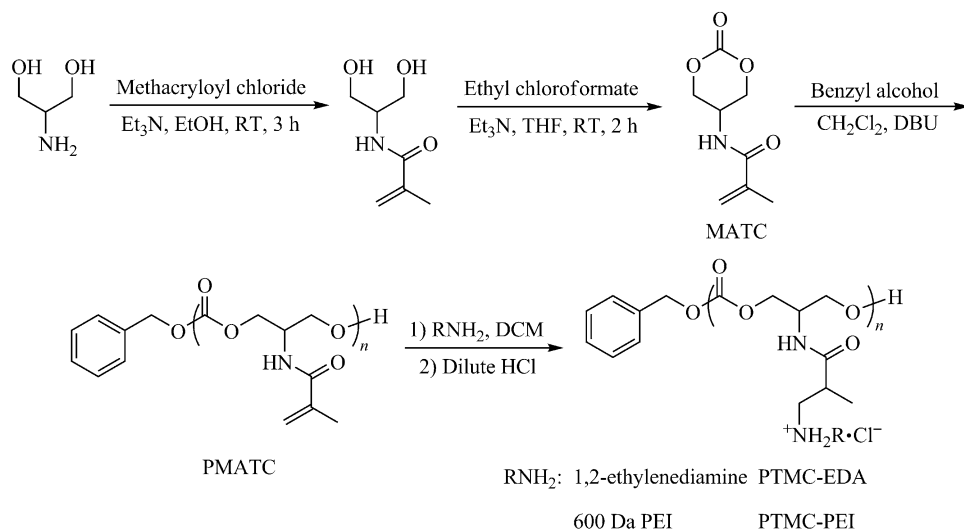
$$\text{细胞相对存活率}(\%) = 100 \times (\text{实验组 OD} - \text{空白组 OD}) / (\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD})$$

2 结果与讨论

2.1 阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 和 PTMC-PEI) 的合成及表征

功能化的 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯单体 MATC 由丝氨酸经过两步反应制得 (示意图 1). 首先,丝氨酸和甲基丙烯酰氯在室温下由三乙胺作碱反应制得 2-(甲基丙烯酰胺基)-1,3-丙二醇,产率 79%. 然后,2-(甲基丙烯酰胺基)-1,3-丙二醇用氯甲酸乙酯在室温下用三乙胺作碱关环得到 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯,产率为 58%.

2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯 (MATC) 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图及解析见图 1. $^1\text{H-NMR}$ 谱图中 $-\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2-$ 亚甲基上的氢裂分为一对双峰 ($\delta = 4.65$ 和 4.49),表明环状结构的存在. $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图中峰的个数和 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯中碳的数目一致,在 $\delta = 169.1$ 和 148.6 处出现了 2 个羰基碳的化学位移. 从 FTIR 谱图中不仅可以看到六元环上碳酸酯羰基的振动峰 (1744 cm^{-1}),而且还可以找到酰胺 I 带 (1666 cm^{-1}),酰胺 II 带 (1521 cm^{-1}),酰胺 III 带 (1188 cm^{-1}).



Scheme 1 Synthesis of polycarbonates PMATC, PTMC-EDA, and PTMC-PEI

2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯 (MATC) 在二氯甲烷溶液中用 DBU 作为催化剂、苯甲醇作为引发剂进行聚合得到聚(2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯) (PMATC) (示意图 1). 引发剂苯甲醇的加入是为了调节聚合物的分子量. 所得到的 PMATC 通过甲基丙烯酰胺侧基和

多胺的迈克尔加成反应制得阳离子聚碳酸酯. 在本研究中选用了乙二胺和 600 Da PEI 这两种胺类化合物,得到的阳离子聚碳酸酯分别以 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 表示. 为了尽量避免交联副反应的发生,胺的用量大大过量,胺与双键的摩尔比为 10:1,反应结束后通过在水中透析除去多余的

胺,冻干得到产物.透析后 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 的收率分别为 16% 和 25%.

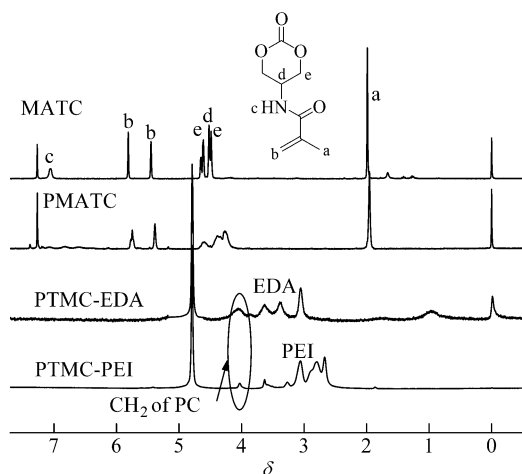


Fig. 1 ^1H -NMR spectra of the carbonate monomer and polymers (MATC and PMATC in CDCl_3 , PTMC-EDA and PTMC-PEI in D_2O , 300 MHz)

聚碳酸酯 PMATC, 阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 的 ^1H -NMR 谱图见图 1. 相比聚碳酸酯 PMATC 谱图,原有的在 $\delta = 5.3$ 及 5.7 处的甲基丙烯酸侧基中双键 CH_2 的两个峰消失,而聚碳酸酯主链中的亚甲基的峰仍然在 $\delta = 4.1$ 附近清晰可见.

聚合物的分子量和分子量分布由凝胶色谱仪 (GPC) 测定. 聚碳酸酯 PMATC、阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 的重均分子量分别为 6300、7400、15100, 分子量分布指数分别为 1.21、1.83 和 2.17. 正如所期望的,侧基与胺类化合物加成后,聚合物分子量变大. 然而,所得到的阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 的分子量比预计的低,并且分子量分布变宽,说明在迈克尔加成反应时聚碳酸酯 PMATC 主链碳酸酯键出现了或多或少的降解.

2.2 阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 或 PTMC-PEI) / pDNA 复合物的制备及表征

将阳离子聚碳酸酯溶液按一定重量比滴加到 pDNA 溶液中,混匀后即形成阳离子聚碳酸酯/pDNA 复合物. 形成的复合物通过琼脂糖凝胶电泳实验、粒径和 zeta 电势进行了表征.

凝胶电泳法的结果显示阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 能在低重量比下阻止 pDNA 的迁移,表明它们对 DNA 有很强的结合能力. 如图 2 所示,随着重量比的增加,阳离子聚碳

酸酯的用量越来越多, pDNA 在电泳时的迁移因与聚阳离子形成复合物而逐渐被阻滞. 600 Da PEI 即使在重量比 2.5 的时候也不能与 DNA 形成稳定的粒子,而 25 kDa PEI 在重量比为 0.15 时就能紧密结合 DNA^[20]. PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 则分别在重量比为 0.2 和 0.15 时能使 DNA 完全不出孔,其 DNA 结合能力与 25 kDa PEI 相近.

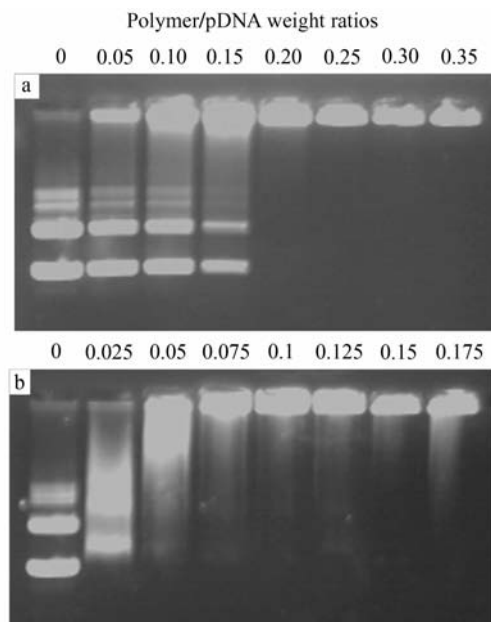


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis retardation assay for the pDNA polyplexes of PTMC-EDA (a) and PTMC-PEI (b) at various polymer/pDNA weight ratios

阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 或 PTMC-PEI) 和 pDNA 复合物的粒径是通过动态光散射法在 150 mmol/L NaCl 溶液中测定的,结果如图 3 所示. PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 在重量比为 0.125 到 1 的范围内,可与 pDNA 形成平均粒径为 200 nm 左右的复合物粒子. 25 kDa PEI 与 pDNA 形成复合物的粒径也为 200 nm 左右,而合成阳离子聚碳酸酯所用低分子量原料 600 Da PEI 与 pDNA 的复合物粒径在 700 nm 以上.

阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 或 PTMC-PEI) 和 DNA 复合物的 zeta 电势是在 10 mmol/L NaCl 溶液中测定的,结果如图 4 所示. 随着阳离子聚碳酸酯用量的增高,复合物的表面电势逐渐升高. PTMC-EDA 复合物的表面电势在 24 ~ 30 mV 之间,而 PTMC-PEI 复合物的表面电势略高,为 25 ~ 37 mV. 作为对照,同时也测量了高、低分子量 PEI/pDNA 复合物的表面电势. 25 kDa PEI/pDNA 复合物具有最高的电势,在 30 ~ 38 mV 之

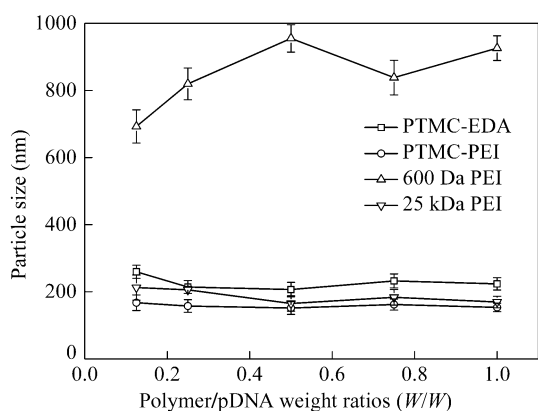


Fig. 3 Particle size of the polycation/pDNA polyplexes at various weight ratios

间,而 600 Da PEI/pDNA 复合物显示出最低的电势,仅为 2~7 mV.

以上结果表明,阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 对 pDNA 有优良的结合能力,与高分子量的 25 kDa PEI 比较类似,在较低用量下即能与 pDNA 形成紧密的表面带正电的微粒.

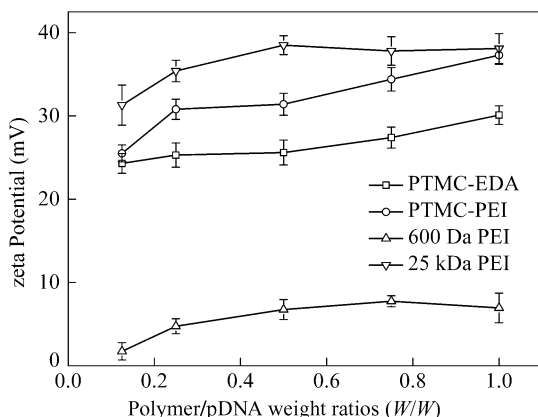


Fig. 4 Surface charge of polycations/pDNA polyplexes at various weight ratios in 10 mmol/L NaCl solution

2.3 阳离子聚碳酸酯 (PTMC-EDA 或 PTMC-PEI) 的细胞毒性

用 MTT 法测定了阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 的细胞毒性,结果如图 5 所示.阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 对 HeLa 细胞上基本

无毒,浓度为 0.5 mg/mL 时细胞存活率约 90%,这和低分子量的 600 Da PEI 结果相似. PTMC-PEI 的毒性稍高,但浓度为 0.5 mg/mL 时细胞存活率仍高达 80%. 与此形成鲜明的对照,25 kDa PEI 在 HeLa 细胞上显示较大的毒性,半致死剂量约为 7 μ g/mL. 可见,阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI 与 25 kDa PEI 相比具有低得多的细胞毒性.

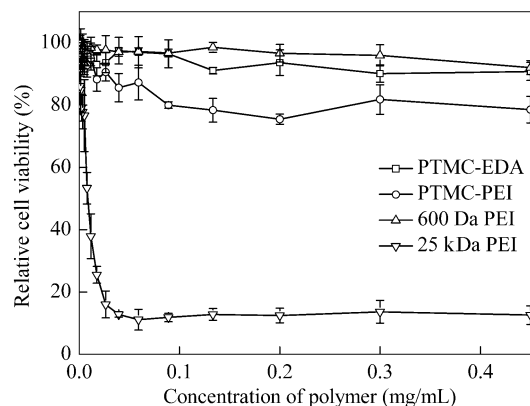


Fig. 5 Relative HeLa cell viability at 24 h post addition of the polycations (MTT assay)

3 结论

从 2-氨基-1,3-丙二醇出发经两步反应较高产率地合成了 2-(甲基丙烯酰胺基)三亚甲基碳酸酯单体 MATC,该单体开环聚合得到侧链带有甲基丙烯酰胺基的聚碳酸酯 PMATC,然后通过侧基双键和胺类化合物乙二胺或者 PEI 的迈克尔加成反应分别制备了阳离子聚碳酸酯 PTMC-EDA 和 PTMC-PEI. 这类带有多胺侧基或侧链的阳离子聚碳酸酯在较低用量下即能与 pDNA 形成表面带正电的粒径 200 nm 左右的复合物. 它们对 pDNA 的复合能力与不可降解的 25 kDa PEI 类似的优良的结合能力,但对细胞的毒性要低得多. 加之生物可降解的主链结构,这类阳离子聚碳酸酯有望成为高效低毒的基因载体.

REFERENCES

- 1 Nair L S, Laurencin C T. Prog Polym Sci, 2007, 32(8-9): 762 ~ 798
- 2 Artham T, Doble M. Macromol Biosci, 2008, 8(1): 14 ~ 24
- 3 Zhang X J, Mei H J, Hu C, Zhong Z L, Zhuo R X. Macromolecules, 2009, 42(4): 1010 ~ 1016
- 4 Zhang X J, Chen F J, Zhong Z L, Zhuo R X. Macromol Rapid Commun, 2010, 31(24): 2155 ~ 2159
- 5 Zhang X J, Zhong Z L, Zhuo R X. Macromolecules, 2011, 44(7): 1755 ~ 1759

- 6 Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60(2): 247 ~ 266
- 7 Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M A, Mergny M D, Scherman D, Demeneix B, Behr J P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(16): 7297 ~ 7301
- 8 Pei Yuanyuan (裴媛媛), Wang Weiwei (王伟伟), Liu Xianguo (刘先国), Shuai Xintao (帅心涛). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2010, (1): 79 ~ 86
- 9 Chen Lei (陈磊), Tian Huayu (田华雨), Pu Taikuan (朴泰宽), Wan Shanhui (丸山厚), Jing Xiabin (景遐斌). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2009, (6): 499 ~ 505
- 10 Schaffer D V, Fidelman N A, Dan N, Lauffenburger D A. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67(5): 598 ~ 606
- 11 Godbey W T, Barry M A, Saggau P. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3): 321 ~ 328
- 12 Kunath K, von Harpe A V, Fischer D, Petersen H, Bickel U, Voigt K, Kissel T. *J. Control Release*, 2003, 89(1): 113 ~ 125
- 13 Tang G P, Guo H Y, Alexis F, Wang X, Zeng S, Lim T M, Ding J, Yang Y Y, Wang S. *J Gene Med*, 2006, 8(6): 736 ~ 744
- 14 Jiang H L, Kim Y K, Arote R, Nah J W, Cho M H, Choi Y J, Akaike T, Cho C S. *J Control Release*, 2007, 117(2): 273 ~ 280
- 15 Lu B, Xu X D, Zhang X Z, Cheng C S, Zhuo R X. *Biomacromolecules*, 2008, 9(10): 2594 ~ 2600
- 16 Wang C F, Lin Y X, Jiang T, He F, Zhuo R X. *Biomaterials*, 2009, 30(27): 4824 ~ 4832
- 17 He F, Wang C F, Jiang T, Han B, Zhuo R X. *Biomacromolecules*, 2010, 11(11): 3028 ~ 3035
- 18 Li Z T, Guo J, Zhang J S, Zhao Y P, Lv L, Ding C, Zhang X Z. *Carbohydr Polym*, 2010, 80(1): 254 ~ 259
- 19 Dai J, Zou S Y, Pei Y Y, Cheng D, Ai H, Shuai X T. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1694 ~ 1705
- 20 Peng Q, Zhong Z L, Zhuo R X. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19(2): 499 ~ 506

CATIONIC POLYCARBONATES PREPARED VIA MICHAEL ADDITION OF AMINES ON THE PENDANT METHACRYLAMIDO GROUPS

ZHANG Xiaojin, CHEN Fujie, ZHONG Zhenlin

(Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract This paper reports the preparation and pDNA complexation characteristics of cationic polycarbonates with pendant ethylenediamino groups or low molecular PEI side chains. The polyamino pendant groups or side chains were introduced on the polycarbonate backbone via Michael addition with methacrylamido pendant groups. First, cyclic carbonate monomer, 2-(methacrylamido) trimethylene carbonate (MATC) was prepared from 2-amino-1,3-propanediol by a two-step reaction. Ring-opening polymerization of MATC using 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) as a catalyst afforded poly(2-metacrylamidotrimethylene carbonate) (PMATC). Then, cationic polycarbonates PTMC-EDA and PTMC-PEI were prepared by Michael addition of ethylenediamine and 600 Da PEI, respectively, on the methacrylamido pendant groups. The weight average molecular weights measured by GPC of polymers PMATC, PTMC-EDA, and PTMC-PEI were 6300, 7400, and 15100, and the polydispersity indexes were 1.21, 1.83 and 2.17, respectively. Cationic polycarbonates could form stable complexes with plasmid DNA at low polymer/pDNA weight ratios. The average diameters of the complexes were around 200 nm. The zeta potentials of cationic polycarbonates and DNA complexes were about 30 mV. The characteristics of the cationic polycarbonates of forming polyplexes with pDNA were very similar to those of 25 kDa PEI. Their cytotoxicity measured by MTT assay, however, was very low. The excellent ability for DNA complexation and low toxicity suggest that the cationic polycarbonates might have a good potential for use as gene vectors.

Keywords Polycarbonate, Polyethyleneimine, Polycation, Ring-opening polymerization, Michael addition