

苯丙氨酸改性树枝状聚赖氨酸的合成及表征*

郝挥红 史清洪 张 猛 秦 明 孙 彦**

(天津大学化工学院生物化工系 天津 300072)

摘 要 以双苄甲氧羰基赖氨酸(Di-Fmoc-Lysine)为支化单元采用固相多肽合成技术制备了一种树枝状聚赖氨酸.该聚合物表面活性氨基通过与苄甲氧羰基苯丙氨酸(Fmoc-Phe)反应获得表面完全替代的苯丙氨酸改性树枝状聚赖氨酸.产物的分子量和结构经 MS 和 NMR 进行了表征.研究表明,利用该方法得到的产物分子量单一,是一种潜在的理想非病毒治疗载体.

关键词 非病毒载体, 树枝状, 多聚赖氨酸, 表面改性

随着基因治疗技术的发展,非病毒类载体在近期的研究中越来越受到了广泛的关注^[1-3].目前,处于临床实验的基因治疗病历中有近四分之一采用了非病毒基因治疗载体,这些载体主要包括脂质体、裸 DNA 等.作为研究中常用的一类非病毒基因运载手段,聚合物载体多以正离子聚合物为主并通过其上氨基所带的正电荷与 DNA 负电荷间的静电引力使 DNA 分子缩合成高稳定性、小粒径的复合物(polyplex).这种由静电作用而引发的缩合一直被视为质粒跨膜运输的主要手段.但作为一类非病毒载体,聚合物载体虽多见于实验室研究中,其在临床上的应用仍鲜有报道.造成这种情况的主要原因之一在于目前所广泛采用的线性正离子聚合物往往存在着一定的分子量分布,造成了其代谢途径和毒性的差异和不确定性^[3],从而限制了其在临床上的应用.而树枝状聚合物以其规则的支化单元、独有的合成方式避免了上述的问题,展现出巨大的医学应用潜力^[4].Denkewalter 等率先从 N^{α} , N^{ϵ} -双叔丁氧羰基赖氨酸出发采用液相合成技术获得了树枝状聚赖氨酸^[5].由于其优良的生物相容性,树枝状聚赖氨酸受到了广泛地重视,并被应用于细胞转染过程^[6].近来病毒生理学的研究成果显示,病毒基因组在病毒包装过程中的缩合是一个多种作用力驱动的结果^[7].有鉴于此,一些研究组相继开发了基于非静电作用转染策略的聚合物载体^[8-10].

本文从赖氨酸出发,合成了 N^{α} , N^{ϵ} -双苄甲氧羰基赖氨酸(Di-Fmoc-Lysine)单体,进而利用固相

多肽合成方法制备获得 3 代树枝状聚赖氨酸(poly(lysine) dendrimer generation 3, PL dendrimer G3).通过该聚合物表面的活性氨基与苄甲氧羰基苯丙氨酸(Fmoc-Phe)反应可获得苯丙氨酸封端的 PL dendrimer G3 产物(Phe-PL dendrimer G3),从而开发出含有疏水性的苯基的聚合物载体.该产物采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和 ^1H 核磁共振仪进行分子量和结构的表征.

1 实验部分

1.1 试剂

苄甲氧羰基-甘氨酸-王(Fmoc-Gly-Wang)树脂(0.50 mmol/g)、9-苄甲氧羰基琥珀酰亚胺(Fmoc-Osu)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)、三氟乙酸(TFA)购自上海吉尔生化有限公司.苄三酮、吡啶、哌啶、对甲基苯酚、二氯甲烷(DCM)均为市售分析纯试剂.

1.2 N^{α} , N^{ϵ} -双苄甲氧羰基赖氨酸的合成

Di-Fmoc-Lysine 的合成反应如图 1 所示.将 1 g 赖氨酸倒入含有 20 mL 二氧六环与水的混和溶剂(体积比为 1:1)的三口瓶中,并在冰浴条件下用 4 mol/L NaOH 调节 pH 至 10.0.另称取 7 g Fmoc-Osu 溶于 25 mL 二氧六环后,滴加进三口瓶,滴加速度为 5~10 滴/min.反应过程中控制 pH 在 10.0,以确保瓶内无沉淀析出;当 Fmoc-Osu 加入体积超过 1/3 后,调节 pH 至 8.0~8.5,反应过夜.反应物中加入 50 mL 乙醚萃取后,弃去乙醚层;水相另加入

* 2004-12-28 收稿,2005-02-20 修稿;** 通讯联系人,E-mail:ysun@tju.edu.cn

50 mL 乙醚并于冰浴下调节 pH 至 3, 振荡萃取后分出醚层; 余下水相复用 25 mL 乙醚萃取两次; 合并各次乙醚萃取相并于 50℃ 水浴下蒸出乙醚, 得

白色油状液体; 该液体经乙酸乙酯和石油醚重结晶, 冷冻干燥, 可得白色粉末 3.87 g, 收率 95.77% .

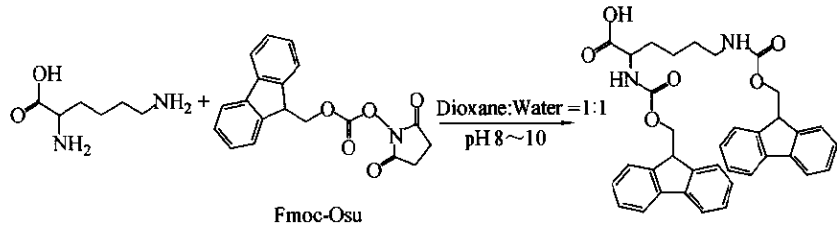


Fig. 1 Synthesis route of *N*^ε, *N*^ε-di-Fmoc-L-lysine Di-Fmoc-Lysine

1.3 PL dendrimer G3 的合成

本文采用 HOBt/DIC 固相多肽合成技术制备得到了 3 代树枝状聚赖氨酸^[11], 合成步骤如图 2 所示. 多肽合成仪为自制的 50 mL 梨形三颈瓶. 0.5 g 经 DCM 溶胀 Fmoc-Gly-Wang 树脂用 50% 哌啶/DCM 脱保护后, 用 DCM 与乙醇洗涤并弃去液

相. 然后, 向其中加入含有 Di-Fmoc-Lysine 的 DMF 溶液和 HOBt; 搅拌 30 min 后加入 DIC. 反应过程中 —NH₂:—COOH: DIC: HOBt = 1:3:4:1. 反应时间为 24 h, 期间采用茚三酮定性显色法监测反应进度. 反应完全后的树脂用哌啶/DCM 脱保护, 再次经 DCM/乙醇洗涤后, 弃去液相. 重新加入新的 Di-

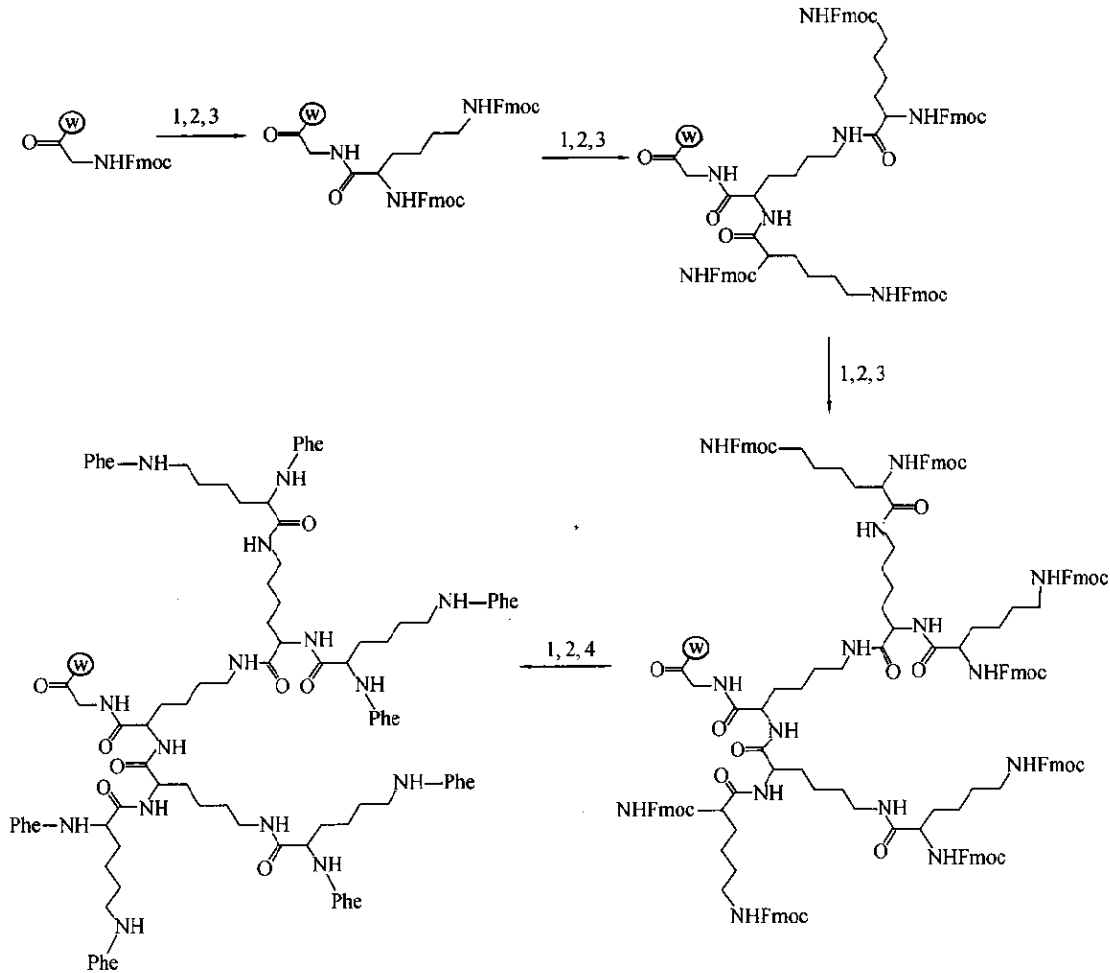


Fig. 2 Synthesis Scheme of Fmoc-PL dendrimer G3 and Fmoc-Phe-PL dendrimer G3

1) 50% piperidine/DCM; 2) DCM, EtOH; 3) Di-Fmoc-Lysine in DMF, HOBt, DIC; 4) Fmoc-Phe in DMF, HOBt, DIC

Fmoc-Lysine 的 DMF 溶液重复上述步骤合成第 2 代聚合物. 如此重复两次最终合成连接在树脂上的 3 代聚赖氨酸 (Wang 树脂-Gly-Lys-(Lys)₂-(Lys)₄-(Fmoc)₈). 该聚合物继续用于后续的表面功能化反应. 作为对照的 3 代聚赖氨酸, 可通过上述反应得到的 Wang 树脂用 50% 的 TFA/DCM 进行切割旋蒸, 然后冲入乙醚, 析出白色粉末; 该乙醚溶液静置冰箱里过夜, 使沉淀充分; 离心并收集沉淀, 用乙醚洗涤离心 3 次, 冷冻干燥, 可得树枝状聚赖氨酸的 3 代化合物. 第 2、3 代反应时间分别为 2 天和 3 天.

1.4 PL dendrimer G3 的表面功能化

反应合成的连接于 Wang 树脂上的 3 代聚赖氨酸用哌啶/DCM 脱保护并经 DCM/乙醇洗涤后, 弃去液相. 然后, 加入 Fmoc-Phe 的 DMF 溶液和 HOBt; 搅拌 30 min 后加入 DIC. 反应过程中 Wang 树脂表面氨基与 Fmoc-Phe 的摩尔比为 1:3. 反应程度采用茚三酮定性显色法检测. 脱保护和聚合物切割步骤同 1.3 所述. 最终收率为 58.7%.

1.5 聚合物的表征

在本文的研究中, Di-Fmoc-Lysine 采用 Thermo 公司 LCQ Advantge MAX 型离子阱质谱检测; 聚合物分子量采用 Bruker 公司 Biflex III 型 MALDI-TOF MS 分析, 分析过程中采用 α -氰基-4-羟基肉桂酸为基质. ¹H-NMR 分析分别在 Bruker 公司 AV400 核磁共振仪和 Varian Mercury VX300 核磁共振仪上完成.

2 结果与讨论

2.1 Di-Fmoc-Lysine 合成与表征

虽然目前 Di-Fmoc-Lysine 已有商品化产品, 但很少见到其合成方法的公开文献报道. 由于赖氨酸的 α -氨基和 ϵ -氨基具有不同 pK_a 值, 因此本文通过控制反应体系的 pH 值, 使酰化试剂 Fmoc-Osu 依次与 α -氨基和 ϵ -氨基反应获得 Di-Fmoc-Lysine. 反应后用有机溶剂萃取除去过量的 Fmoc-Osu, 酸化后再用有机溶剂萃取得到比较纯净的产物, 然后再重结晶纯化产品. 本实验中采取滴加的方式加入 Fmoc-Osu 是为了减少其在碱性条件下水解带来的影响, 以提高反应收率, 节省原料.

图 3 为 Di-Fmoc-Lysine 产品的 ¹H-NMR (以 DMSO-*d*₆ 为溶剂) 图谱, 各质子峰的位置 (δ) 为: 1.18 (γ -H), 1.36 (δ -H), 1.63 (β -H), 2.97 (ϵ -H), 3.9 (α -H), 4.2 ~ 4.3 及 7.3 ~ 7.9 (Fmoc-H). 上述

各氨基酸对应的质子峰位置与文献报道相符^[12], Fmoc 基团的结果与标准图谱的位置一致. 利用 ¹H-NMR 结果进而可以考察酰化试剂 Fmoc-Osu 与赖氨酸的反应程度. 图 3 中赖氨酸 β -, γ -和 δ -氢原子数量为 6, 相应的质子峰面积之和为 2.97; 而 Fmoc 上氢原子总数为 22, 相应的质子峰面积为 11.98. 利用该 ¹H-NMR 结果, 通过比较质子峰面积可知, 赖氨酸的 ϵ -氨基和 α -氨基已经完全被 Fmoc 所保护, 反应是完全的.

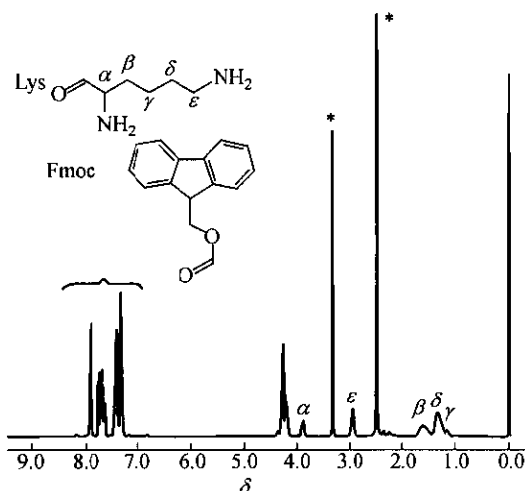


Fig. 3 ¹H-NMR spectrum of Di-Fmoc-Lysine in DMSO-*d*₆

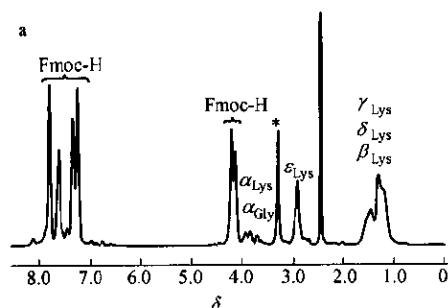
The symbol of * stands for the peaks of solvent

同时, Di-Fmoc-Lysine 的 ES-IT MS 结果显示, 在 $m/z = 613.4$ 的位置有明显质谱峰, 其对应于 $[M + Na]^+$, 而在 m/z 小于 613.4 范围内无明显质谱峰出现. 这说明得到的产物中赖氨酸的 α -氨基和 ϵ -氨基均被 Fmoc 基团保护. 将所收集的产物真空干燥后, 测得产物的收率在 95% 以上, 与 NMR 结果相符.

2.2 PL dendrimer G3 及衍生物的合成与表征

考虑到空间位阻效应的影响, 树枝状聚赖氨酸的合成多采用液相合成方法进行. 但其造成产物的分离繁琐并影响到产物的收率^[13]. 基于合成产物的不同, 在合成过程中引入聚合物分子为载体可以在一定程度上简化分离步骤^[6]. 考虑到固相多肽合成法便捷的后处理过程, 因此本文用该方法合成 3 代树枝状聚赖氨酸, 从而使各步产物的合成更加简单. 各次缩合反应结束后, 直接洗涤 Wang 树脂以除去反应的副产物和过量的原料. 实验过程中, 树脂的洗涤和氨基脱保护步骤与文献 [11] 一致. 操作过程中, 溶液中残留氨基酸和 Fmoc 采用紫外分光光度计分别于 267 和 300 nm 下检测.

反应合成的 Fmoc-PL dendrimer G3 从树脂上切割后,直接进行¹H-NMR 分析,结果如图 4(a)所示.图中所对应的质子峰的位置分别为 1.0~1.7(γ -H, δ -H, β -H, Lys), 2.97(ϵ -H, Lys), 3.78(α -H, Gly), 3.9(α -H, Lys), 4.2~4.3 及 7.3~7.9(Fmoc-



H).该聚合物所对应的 MALDI-TOF 质谱检测结果如图 5(a)所示,其中 m/z 值为 2776.68 和 2791.62 处分别对应为 $[M + Na]^+$ 及 $[M + K]^+$ 峰.从质谱的分析中,可以看出 Fmoc-PL dendrimer G3 分子只有一单一的峰,说明该聚合物是单分散性的.

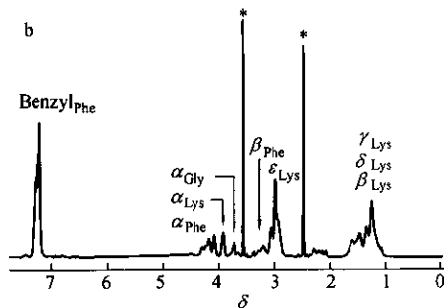


Fig. 4 ¹H-NMR spectra for (a) Fmoc-PL dendrimer G3 and (b) Phe-PL dendrimer G3 in DMSO-*d*₆

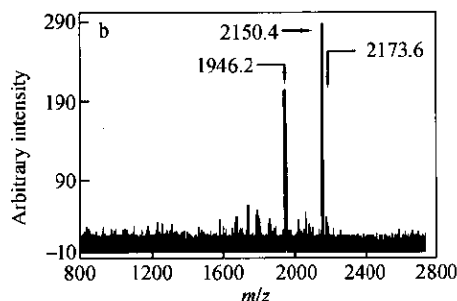
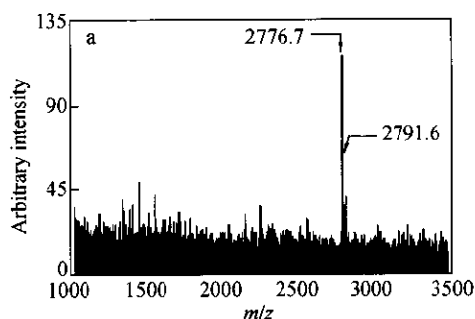


Fig. 5 MALDI-TOF spectra of (a) Fmoc-PL dendrimer G3 and (b) Phe-PL dendrimer G3 with CCA as a matrix

在 Wang 树脂上合成的 Fmoc-PL dendrimer G3 经过脱保护后,进而与 Fmoc-Phe 反应合成产物 Phe-PL dendrimer G3.位于树脂上的该产物经脱保护和切割后得到产品. Phe-PL dendrimer G3 的¹H-NMR 结果如图 4(b)所示.图中所对应的质子峰的位置分别为 1.0~1.7(γ -H, δ -H, β -H), 2.97(ϵ -H), 3.21(β -H, Phe), 3.78(α -H, Gly), 3.9(α -H, Lys), 4.08~4.29(α -H, Phe), 7.2~7.4(Benz-H, Phe).图中苯丙氨酸的化学位移是与文献相吻合的.产物该所对应的 MALDI-TOF 质谱检测结果如图 5(b)所示,其中 m/z 值为 2150.4 和 2173.6 处分别对应为 $[M + H]^+$ 及 $[M + Na]^+$ 峰.而 m/z 值为 1946.2 所对应的是产物缺失了 Gly 和 Phe 各一

个所引起的.从 MALDI-TOF 质谱结果可以判断, Phe-PL dendrimer G3 产物亦具有非常窄的分子量分布.这就为 Phe-PL dendrimer G3 作为基因治疗载体提供了较好的前提.

综上所述,本文以苄甲氧羰基赖氨酸作为支化单元采用固相多肽合成法制备出树枝状聚赖氨酸,并在此基础上通过表面功能化获得了 Phe-PL dendrimer G3.该产物的制备过程反应条件温和,操作简便且后续处理便捷,产物收率较高(达到 50%以上).合成的产物采用¹H-NMR 以及 MALDI-TOF 质谱进行了表征.质谱的结果表明利用该方法得到的产物分子量单一,是一种潜在的理想非病毒治疗载体.

REFERENCES

- 1 Nishikawa M, Huang L. *Human Gene Therapy*, 2001, 12: 861 ~ 870
- 2 Ferber D. *Science*, 2001, 294(5547): 1638 ~ 1642
- 3 Schmidt-Wolf G D, Schmidt-Wolf I G H. *Trends in Molecular Med*, 2003, 9(2): 67 ~ 72
- 4 Duan Haifeng(段海峰), Jiang Zhonghua(蒋中华), Wu Zuze(吴祖泽). *Bull Acad Military Med Sci (军事医学科学院院刊)*, 2003, 27(4): 302 ~ 305
- 5 Denkwalter R G, Kolc J F, Lukasavage W J. US patent, C08g, 4410688. 1983-10-18
- 6 Choi J S, Lee E J, Choi Y H, Jeong Y J, Park J S. *Bioconjugate Chem*, 1999, 10: 62 ~ 65
- 7 Frankel A D, Young J A T. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 1 ~ 15
- 8 Huang S W, Wang J, Zhang P C, Mao H Q, Zhuo R X, Leong K W. *Biomacromolecules*, 2004, 5(2): 306 ~ 311
- 9 Liu W G, Zhang X, Sun S J, Sun G J, Yao K D, Liang D C, Guo G, Zhang J Y. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14 (4): 782 ~ 789
- 10 Lim Y B, Kim T, Lee J W, Kim S M, Kim H J, Kim K, Park J S. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13: 1181 ~ 1185
- 11 Gan Y R(甘一如), Huang Y D(黄永东), Liu J S(刘晋生), Zhang X Z(张雪竹), Zhang G F(张贵峰). *Chin J Chem Eng(化工学报)*, 2004, 55 (2): 305 ~ 308
- 12 Baidude H, Katsuraya K, Okuyama K, Tokunaga S, Uryu T. *Macromolecules*, 2003, 36: 7100 ~ 7106
- 13 Mong T K K, Niu A Z, Chow H F, Wu C, Li L, Chen R. *Chem Eur J*, 2001, 7(3): 686 ~ 698

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PHENYLALANINE-MODIFIED POLY(LYSINE) DENDRIMER

HAO Huihong, SHI Qinghong, Zhang Meng, QIN Ming, SUN Yan

(*Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072*)

Abstract A tree-type full substituted phenylalanine-poly(lysine) dendrimer (Phe-PL dendrimer) was synthesized. Poly(lysine) dendrimer (generation 3) (PL dendrimer G3) was prepared using *N,N'*-di(flourenylmethoxy-carbonyloxy)-*L*-Lysine as both the branching agent and the dendritic branch by solid phase peptide coupling method on 1% cross-linked polystyrene bead functionalized with Fmoc-glycine. Then Phenylalanine was bound to PL dendrimer G3 to form full substituted Phe-PL dendrimer. The product was characterized with MALDI-TOF MS and NMR. The results of MS demonstrated that they both Fmoc-PL and Phe-PL dendrimers G3 have exclusive molecular weights, indicating that they could be developed as a potential ideal nonviral vector.

Key words Nonviral vector, Dendrimer, Poly(lysine), Surface modification