

· 快报 ·

可还原降解梳形阳离子聚合物的合成*

孙 平² 杜 红¹ 高利龙¹ 朱蔚璞^{1**} 李晓东² 沈之荃¹

(¹ 高分子合成与功能构造教育部重点实验室 浙江大学高分子科学与工程学系 杭州 310027)

(² 浙江大学医学院附属口腔医院 杭州 310068)

摘 要 通过缩合聚合和可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)合成了一种新型可还原降解的梳形聚阳离子. 首先,以具有化学选择性的三氟甲磺酸铑催化苹果酸、二硫二丙酸、癸二醇的三元缩合聚合得到了含多个侧羟基的聚(苹果酸-co-二硫二丙酸)癸二酯;将羟基酯化修饰为双硫酯后,通过甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)的RAFT聚合制备了梳型聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(PDMAEMA). 采用¹H-NMR和GPC等测试方法对该聚合物进行结构表征. 该梳形阳离子聚合物在还原性环境中可通过双硫键的断裂降解成为小分子量PDMAEMA低聚物.

关键词 阳离子聚合物, 梳形聚合物, 双硫键, 还原降解, 聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯

安全、高效的基因载体对于基因治疗的成功实现至关重要. 一个成功的基因传递系统需要克服很多的生物障碍,如血液循环,细胞摄取,内涵体逃离,有效的表达基因等等^[1]. 近年来,将阳离子聚合物作为基因传递载体得到了越来越多的关注,因其不仅能与带负电荷的DNA通过静电相互作用结合成紧密结构,而且能够减少DNA与细胞表面的静电排斥作用,进而提高了基因转染效率^[2]. 目前常见的聚阳离子载体有聚乙烯亚胺(PEI)^[3],聚酰胺-胺树形高分子(polyamidoamine dendrimers)^[4]、聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(PDMAEMA)^[5]等,但这些聚合物的非生物降解性,造成其在人体细胞和组织内累积,对身体产生不可预计的生理毒性. 因此,很多研究者将目光转向了生物可降解的聚阳离子基因载体^[6-8].

由于细胞质和细胞内涵体中还原性的谷胱甘肽的浓度远高于血浆中谷胱甘肽的浓度(一般认为细胞内环境和外环境谷胱甘肽的浓度分别为0.5~10 mmol/L和2~20 μ mol/L)^[9],这种细胞内外谷胱甘肽的浓度梯度使得容易可逆断裂的二硫键对细胞的氧化还原环境表现出良好的响应性. 含有双硫键的生物可还原性聚合物已被证明在传递多种核酸时具有较高的转染率和低的细胞

毒性^[10,11]. 除了聚合物的化学组成对基因传递系统的高效性产生重要影响外,传递载体的拓扑结构也是一个不可忽视的因素^[12]. 相比于同分子量线性结构的阳离子聚合物,带有支化结构的聚阳离子,如梳形聚合物,表现出更高的转染率,这可能是由于梳形结构有助于提高载体与DNA复合物的热力学稳定性^[13].

本文设计合成了一种新型可还原降解的梳形阳离子聚合物. 首先采用直接缩合聚合法合成了含多个双硫键的共聚酯主链——聚(苹果酸-co-二硫二丙酸)癸二酯;然后将苹果酸单元上的羟基修饰为双硫酯基团,通过可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)合成聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(PDMAEMA)梳型聚合物,其具体合成路线如示意图1所示. 该新型梳形聚阳离子可通过双硫键的断裂降解成为线性低聚物,具有还原响应性,有望作为基因载体在基因治疗领域得到应用.

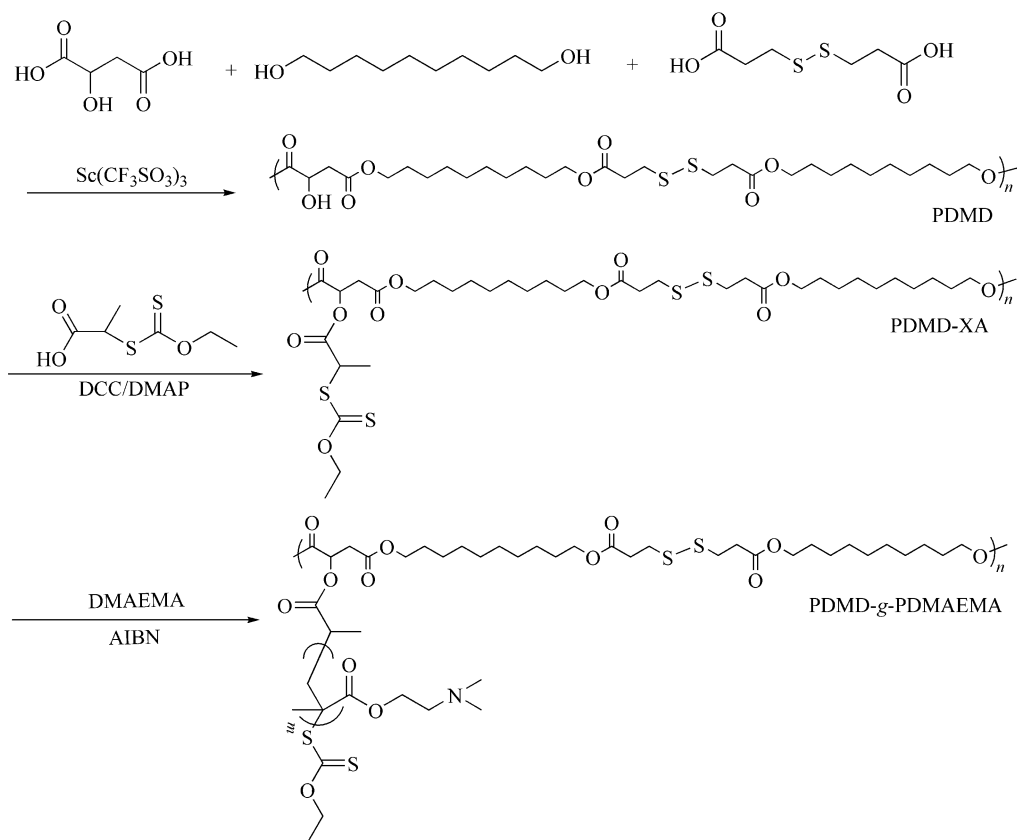
1 实验原料

癸二醇、苹果酸、二硫二丙酸、乙基黄原酸钾、2-溴丙酸、二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、偶氮二异丁腈(AIBN)和三丁基膦(Bu_3P)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司,直接使用;甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)过碱

* 2012-05-25 收稿,2012-06-15 修稿;国家自然科学基金(基金号 51173163)、国家重点基础研究发展计划项目基金号(973 计划,项目号 2011CB606001)和浙江省教育厅科研项目(基金号 Y201121828)资助.

** 通讯联系人, E-mail: zhuwp@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.12163



Scheme 1 Synthetic procedures of PDMD-g-PDMAEMA

性氧化铝柱提纯后使用;三氟甲磺酸铈^[14]和黄原酸^[15]按文献方法合成。

2 实验仪器

Bruker Avance DMX500 超导核磁共振仪,以 CDCl_3 为溶剂,TMS 为内标;Waters 1515 凝胶渗透色谱仪,以 THF 为淋洗液,温度为 40°C ,流速 1.0 mL/min 。

3 实验步骤

3.1 聚(苹果酸-co-二硫二丙酸)癸二酯(PDMD)的合成

在 250 mL 三口烧瓶中,依次加入苹果酸 (11.53 g , 0.086 mol),二硫二丙酸 (18.08 g , 0.086 mol),癸二醇 (29.97 g , 0.172 mol),以三氟甲磺酸铈 (0.635 g , 1.3 mmol) 作为催化剂,在氮气氛围下, 80°C 常压下机械搅拌反应至均一相,之后减压至 40 Pa 继续反应 12 h ;反应结束后,将所得产物溶于二氯甲烷中,用饱和氯化钠溶液洗涤 3 次并用无水硫酸镁干燥;过滤后,旋转蒸发除去大部分二氯甲烷,在搅拌下倒入大量冷乙醚,静置,沉淀,过滤,置于真空烘箱中室温下干燥 24 h ,得到目标产物聚(苹果酸-co-二硫二丙酸)癸二酯 54 g ,收率为 90% 。

3.2 大分子链转移剂(PDMD-XA)的合成

取 PDMD 聚酯 (2.12 g , 3.5 mmol 羟基),二环己基碳二亚胺(DCC, 1.44 g , 7 mmol),4-二甲氨基吡啶(DMAP, 0.086 g , 0.7 mmol) 加入 100 mL 烧瓶中,用 30 mL DMF 将其溶解;将黄原酸 XA (1.36 g , 7 mmol) 溶于 10 mL DMF,在冰浴条件下,缓慢滴加到烧瓶中;反应在冰浴下进行 1 h 后,逐渐恢复到室温,继续反应 72 h 。将反应后的溶液过滤,除去大部分的二环己基脲(DCU);旋蒸除去 DMF 溶剂,粗产物用二氯甲烷溶解,依次用饱和 NaHCO_3 溶液、 HCl 水溶液 (1.0 mol/L) 和饱和氯化钠溶液洗涤,除去过量的黄原酸、DCC 及 DMAP。洗涤后的溶液经无水硫酸镁干燥后,过滤并旋转蒸发除去大部分二氯甲烷,然后在搅拌下用大量冷乙醚沉淀;将沉淀所得产物置于真空烘箱中干燥至恒重,得到大分子链转移剂 PDMD-XA 1.48 g ,收率为 53% 。

3.3 梳形聚合物(PDMD-g-PDMAEMA)的合成

梳型聚合物通过可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)合成,具体步骤如下:在 50 mL 聚合瓶中,加入大分子链转移剂 PDMD-XA (0.52 g , 0.65 mmol 双硫酯基团),AIBN (0.021 g , 0.13 mmol),

甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)(5.5 mL, 32.5 mmol), 20 mL THF, 经冷冻—抽真空—解冻循环3次除氧后, 将聚合瓶放入60℃油浴中反应11 h. 将反应后溶液旋转蒸发, 除去大部分THF, 在搅拌下加入大量正己烷沉淀; 沉淀产物经真空干燥后, 得到以聚酯为主链, PDMAEMA为侧链的梳形阳离子聚合物3.6 g, 收率为64%.

3.4 梳形阳离子聚合物的还原性降解

取0.2 g PDMD-*g*-PDMAEMA 加入到8 mL 三丁基膦(Bu_3P)的THF溶液中(0.5 mol/L), 室温下搅拌48 h, 然后将THF蒸干, 将所得固体用石油醚洗涤3次除去 Bu_3P , 真空干燥后, 进行GPC测试.

4 聚合物的合成与表征

图1为PDMD, XA及PDMD-XA的核磁谱图. 从PDMD的谱图(图1(A))中可以看到, $\delta = 4.47$ 和2.80的a峰和b峰分别对应于苹果酸单元的次甲基氢和亚甲基氢; 同时 $\delta = 5.5$ 处没有出现仲羟基酯化后的信号峰, 说明了该缩聚反应具有很好的化学选择性, 苹果酸中的仲羟基未参与酯化缩聚反应. $\delta = 2.74$ 及2.92处的2个三重峰f峰和g峰分别归属于二硫二丙酸中与二硫键相连的4个亚甲基氢. 通过核磁谱图中b峰和

g峰的相对积分面积, 计算出该共聚酯中苹果酸与二硫二丙酸的摩尔比例为1:1, 与投料比相符. 由此可见, 带有大量侧羟基的线性聚(苹果酸-*co*-二硫二丙酸)癸二酯(PDMD)被合成.

图1(B)为黄原酸的核磁表征, 各个峰皆有正确归属, 与文献报道的结果一致. 图1(C)即为PDMD与黄原酸酯化后得到的大分子链转移剂PDMD-XA的核磁谱图. 从图中可以明显看到, $\delta = 5.5$ 处出现新的信号峰(a'), 为苹果酸仲羟基被酯化后, 与之相连的次甲基氢特征峰; 同时, 黄原酸上相应的各个氢原子的信号峰m峰($\delta = 4.65$)、k峰($\delta = 4.48$)、i峰($\delta = 1.28$)及j峰($\delta = 1.50$)出现在了谱图中, 证明了大分子链转移剂PDMD-XA的合成.

以PDMD-XA为链转移剂, DMAEMA为单体, 通过RAFT聚合得到的梳形聚合物进行核磁表征后的谱图如图2所示. 与图1(C)相比, 图中出现了单体DMAEMA上的信号峰: q峰($\delta = 2.3$)、r峰($\delta = 2.6$)、t峰($\delta = 1.9$)、u峰($\delta = 1.0$). 根据谱图中r峰(DMAEMA单元)与e峰(癸二醇单元)的相对积分面积, 计算得出PDMAEMA侧链的平均聚合度为40.

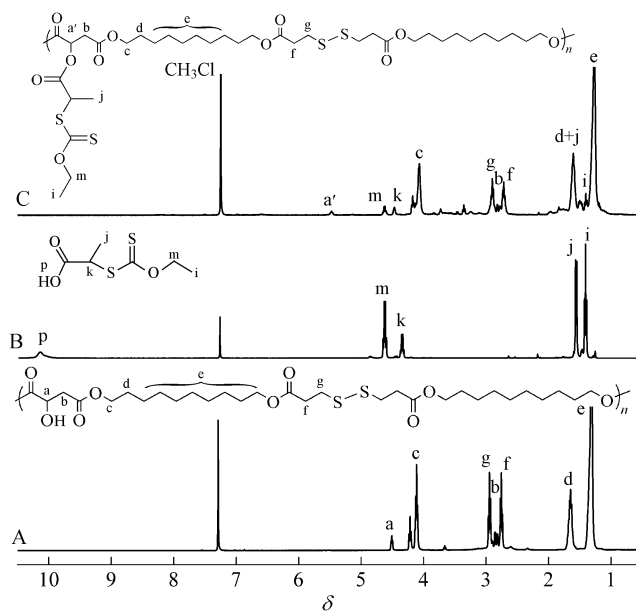


Fig. 1 ^1H -NMR spectra of (A) PDMD, (B) XA and (C) PDMD-XA (in CDCl_3)

采用GPC表征所得聚合物的分子量及分子量分布, 结果如图3所示. PDMD-XA与PDMD相比, 分子量变化不大, 且保持单峰分布; 以PDMD-XA为链转移剂进行RAFT聚合后, 所得聚合物分

子量明显增大, 也保持对称的单峰分布, 证明了梳形聚合物的合成. 由于梳形阳离子聚合物主链含有可还原的双硫键, 用三丁基膦将双硫键还原后, 聚合物的分子量从51100降至2300, 且具

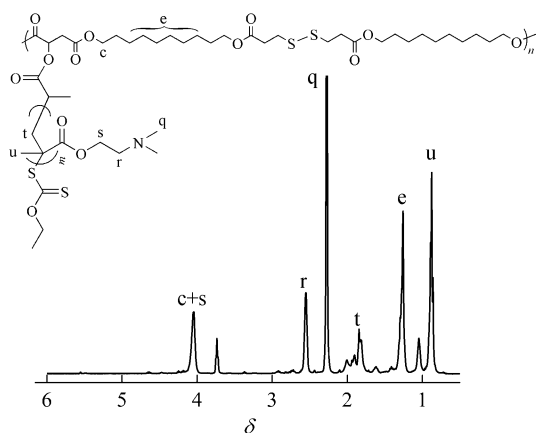


Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of PDMD-g-PDMAEMA (in CDCl_3)

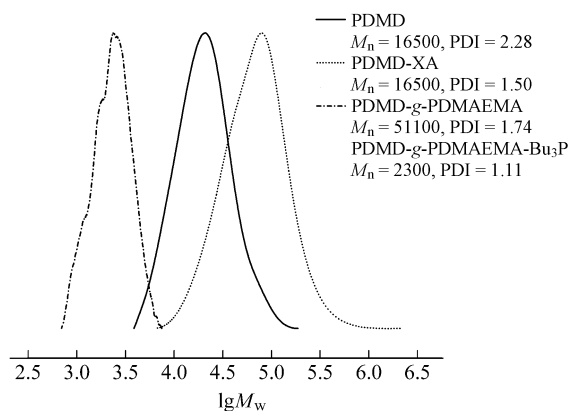


Fig. 3 GPC traces of PDMD-g-PDMAEMA, as well as its precursors and degradation product (THF as eluent, calibrated with PS standards)

有很窄的分布,说明该梳形聚合物具有可还原降解性。

5 结论

通过缩聚反应及 RAFT 聚合制备了以含双硫键聚酯为主链,PDMAEMA 为侧链的新型梳形阳

离子聚合物。降解测试结果表明,该梳形聚合物具有还原响应的可降解性。由于该聚合物侧链为阳离子的 PDMAEMA,故可以用作基因传递载体,此方面的应用研究正在进行中。

REFERENCES

- Xu C H, Sui M H, Tang J B, Shen Y Q. Chinese J Polym Sci, 2011, 29(3): 274 ~ 287
- Wei X W, Gong C Y, Gou M L, Fu S Z, Guo Q F, Shi S, Luo F, Guo G, Qiu L Y, Qian Z Y. Int J Pharm, 2009, 381(1): 1 ~ 18
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer H P, Kissel T. Pharm Res, 1999, 16(8): 1273 ~ 1279
- KukowskaLatallo J F, Bielinska A U, Johnson J, Spindler R, Tomalia D A, Baker J R. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(10): 4897 ~ 4902
- Schallon A, Jérôme V, Walther A, Synatschke C V, Müller A H E, Freitag R. React Funct Polym, 2010, 70(1): 1 ~ 10
- Dong X, Tian H Y, Chen L, Chen J, Chen X S. J Control Release, 2011, 152(1): 135 ~ 142
- Luten J, Van Steenis J, Van Someren R, Kemmink J, Schuurmans-Nieuwenbroek N, Koning G, Crommelin D, van Nostrum C, Hennink W. J Control Release, 2003, 89(3): 483 ~ 497
- Xu P S, Li S Y, Li Q, Ren J, van Kirk E A, Murdoch W J, Radosz M, Shen Y Q. Biotechnol Bioeng, 2006, 95(5): 893 ~ 903
- Wu G, Fang Y Z, Yang S, Lupton J R, Turner N D. J Nutr, 2004, 134(3): 489 ~ 492
- Manickam D S, Oupicky D. Bioconjugate Chem, 2006, 17(6): 1395 ~ 1403
- Wang Z H, Zhu Y, Chai M Y, Yang W T, Xu F J. Biomaterials, 2011, 33(6): 1873 ~ 1883
- Tang M X, Szoka F C. Gene Ther, 1997, 4(8): 823 ~ 832
- Maruyama A, Ohnishi Y, Watanabe H, Torigoe H, Ferdous A, bAkaike T. Colloid Surf B-Biointerfaces, 1999, 16(1-4): 273 ~ 280
- Zhu W P, Tong X W, Xie W H, Shen Z Q. J Appl Polym Sci, 2010, 118(4): 1943 ~ 1948
- Nese A, Kwak Y, Nicolay R, Barrett M, Sheiko S S, Matyjaszewski K. Macromolecules, 2010, 43(9): 4016 ~ 4019

SYNTHESIS OF REDUCTIVELY DEGRADABLE COMB-LIKE CATIONIC POLYMER

Ping Sun², Hong Du¹, Li-long Gao¹, Wei-pu Zhu¹, Xiao-dong Li², Zhi-quan Shen¹

(¹ MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization,

Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(² The Affiliated Stomatology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310068)

Abstract A reductively degradable cationic polymer with comb-like architecture was synthesized by a combination of polycondensation and reversible addition and fragmentation chain transfer radical polymerization (RAFT). First, the direct polycondensation of decanediol, 3,3'-dithiodipeopionic acid and malic acid was carried out using scandium triflate as catalyst. Due to the chemoselectivity of scandium triflate for esterification, the secondary hydroxyl groups of malic units were not esterified during the polycondensation process, resulting in functional polyester with numerous disulfide bonds and hydroxyl groups. Then the pendant hydroxyl groups were modified into dithioester form in the presence of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP), to give a macromolecular chain transfer agent, which could be used as multifunctional backbone to prepare comb-like polymer by "grafting from" method. Finally, the poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) side chains were attached to the backbone *via* RAFT polymerization of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate. The comb-like architecture of the copolymer was characterized by ¹H-NMR and GPC. The reducible degradation of the comb-like polycation was studied in the presence of tributylphosphane as reducing agent, which demonstrated the cleavage of disulfide bonds in the backbone under reductive environment, resulting in low molecular weight PDMAEMA oligomers. This comb-like cationic polymer may have potential applications in gene delivery, which is being investigated in our research group.

Keywords Cationic polymer, Comb-like polymer, Disulfide bond, Reductive degradation, PDMAEMA