

· 研究简报 ·

可聚合脂质体的研究

III. 可缩聚氨基酸类双亲分子的合成及其脂质体*

何 巍 李子臣 李福绵

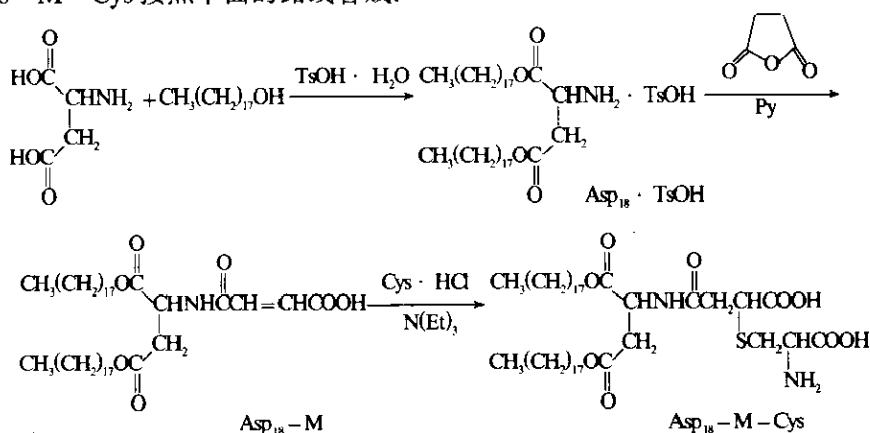
(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

关键词 氨基酸, 双亲分子, 脂质体, 缩聚, 相转变温度

随着脂质体作为药物载体研究的发展,多肽型脂质体以其表面众多的游离活性官能团,良好的生物相容及体内降解性,成为一种理想的抗体载体^[1,2]。1982年,Folda等人首次报道了利用氨基酸酯的氨解反应,使氨基酸在脂质体表面进行缩聚,得到经缩合聚合后表面为多肽的脂质体,但由于缩聚后亲水性降低,脂质体易沉淀下来^[3]。Neumann等合成了一系列氨基二羧酸化合物,形成脂质体后用缩水剂缩合,余下的另一羧基可作为亲水基团,得到稳定的多肽型脂质体^[4]。本文主要报道以天冬氨酸为骨架的可缩聚氨基酸双亲分子S-[马来酸单酰胺(N-天冬氨酸双十八酯)]半胱氨酸(Asp18-M-Cys)的合成,它在水中形成稳定脂质体的缩聚及其缩聚前后相转变温度的变化。

1 单体的合成

Asp18-M-Cys 按照下面的路线合成.



Asp18-M-Cys: m.p.138 ~ 139 °C , FT-IR 和 ¹H-NMR 光谱与结构相符.

元素分析(%)C: 65.82(65.85), H: 10.04(10.35), N: 3.13(3.27), S: 3.47(3.74). 括号内为计算值.

2 脂质体的形成

Asp18-M-Cys 为含有两个疏水长链的双亲分子, 其亲水性及水合能力与氨基酸基

* 1994-11-18 收稿, 1995-02-16 修稿。高等学校博士学科点专项科研基金资助课题

团的解离程度有关, 因此它在水中的聚集形态也直接受 pH 的影响. 我们用超声法在三种 pH 值(6.5、7.4、8.5)的缓冲溶液中制备了 Asp18-M-Cys 的脂质体悬浮液, 经凝胶柱(Sephadex G-50, 18×1cm)过滤后, 用 JEOL-100CXII 透射电子显微镜观察. 在三种 pH 值下, 均可看到清晰的脂质体结构, Fig.1 给出的是在 pH=6.5 时的典型电镜照片, 脂质体的直径大小为 100 ~ 300nm.

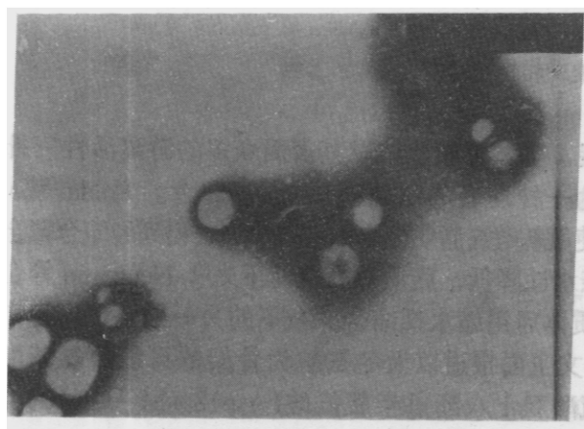


Fig.1 Electron microphotograph of Asp18-M-Cys liposomes in 0.067mol/l phosphate buffer (pH6.5) (Mag. 24,000)

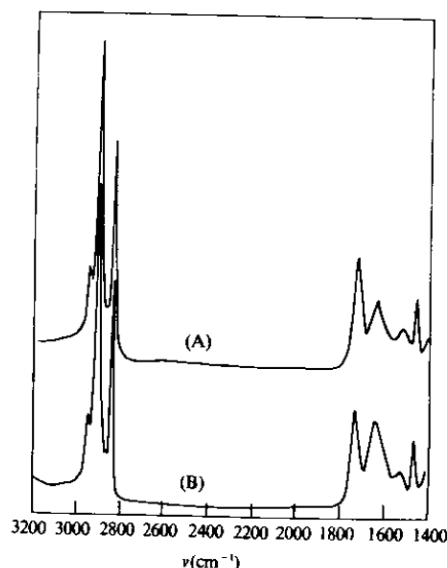


Fig.2 FT-IR spectra of (A) Asp18-M-Cys and (B) peptide obtained from polymerization of Asp18-M-Cys in liposomes

3 脂质体的缩聚

氨基酸的缩合通常采用羧基或氨基活化法, 酶促合成法等; 但是氨基酸在脂质体表面的缩合却有自己的特点: 首先是水相反应, 其次是氨基酸分子排列相对整齐, 我们选择水溶性碳二酰亚胺 N-Cyclohexyl-N'-[β-(N-methyl-morpholino)ethyl]carbodiimide-p-toluenesulfonate (WSD) 作为缩水剂, 与 Asp18-M-Cys 一起(摩尔比, WSD/Asp18-M-Cys=1.5:1)在缓冲溶液中混合超声, 形成脂质体后原位缩聚. 在 37℃ 时, 跟踪脂质体在 400nm 处光吸收强度随聚合时间的变化, 发现在 48h 内, 脂质体的光吸收强度的变化很小, 实际上即使在室温放置一周, 也看不到明显的沉淀产生, 并且在电镜下仍可看到大小均匀的脂质体存在, 这说明 WSD 加入并不影响脂质体的形成及稳定性, 关于聚合前后脂质体的通透性及稳定性研究将另文发表. 由于 Asp18-M-Cys 的亲水基团有两个羧基, 一个氨基, 即使脂质体上缩聚反应进行的相当完全, 也要剩余一个当量的 COOH 基, 因而保持了脂质体表面的亲水能力, 不会由于聚合后形成酰胺键降低亲水能力而立刻沉淀下来, 并且使脂质体表面的进一步修饰成为可能.

将在室温下聚合一周后的脂质体悬浮液中加入稀盐酸(2mol/L), 经高速离心(20000 转/s)后, 用蒸馏水反复洗涤沉淀下来的多肽, 真空干燥, 以 Nicolet-750 测定红外光谱(KBr 压片), 结果如 Fig.2 所示.

可以看出: 由于 Asp18-M-Cys 本身 (Fig. 2A) 酰胺键 $C=O$ 的振动吸收峰 (1650 cm^{-1}), 与缩聚生成的肽键的 $C=O$ 振动吸收 (Fig. 2B), 相互重叠, 没有新峰的出现; 但是 $\nu C=O$ 与 $\nu C-H$ 的峰面积比变大, 由 0.108 增为 0.423, 表明有新的酰胺键生成; 此外, 在红外谱图中所有酰胺键的吸收带都在 $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ 和 1530 cm^{-1} , 表明了线型肽上反式酰胺键的存在, 而没有内酰胺和 2,5-piperazinedione 的生成, 也没有残余的脲, 这些都证明发生了氨基酸的缩聚反应^[4,5].

为了便于用 GPC 测定所生成多肽的分子量, 我们将多肽上大量的羧基部分转变成甲酯, 以期增加它在 THF 中的溶解度. 具体方法是将沉淀下来的多肽, 经彻底干燥后溶于无水氯仿, 然后加入等体积的无水甲醇, 通入干燥氯化氢至饱和, 室温反应两天, 减压旋干, 加入甲醇旋干数次带走氯化氢, 真空干燥, 用 THF 溶解, 在 Waters 208 型凝胶渗透色谱仪上测定分子量 (单分散聚苯乙烯为标准, 淋洗剂为 THF). 测定结果表明, 这样聚合所得多肽的聚合度最高可达 15 左右, 主要是聚合度为 3~5 的多肽.

4 缩聚前后脂质体的相转变温度 (T_c)

脂质体的 T_c 是脂质体从规整排列的凝胶态到液晶态转变时的温度, 它不仅与形成脂质体的双亲分子结构有关, 还受它们在脂质体上排列形态的影响. 为了考察缩聚对 Asp18-M-Cys 脂质体 T_c 的影响, 我们用 DuPont 1090 型 DSC 测定了脂质体聚合前后的 T_c ([Asp18-M-Cys]=1wt%, 升温速度为 $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). 结果表明缩聚后, Asp18-M-Cys 脂质体的 T_c 由 $62.5\text{ }^\circ\text{C}$ 降为 $49.1\text{ }^\circ\text{C}$. 造成 T_c 下降的原因主要是由于缩合形成肽键后, 造成脂质体表面体积收缩, 脂质膜上疏水长链排列的规整性下降, 但由于聚合是发生在脂质体表面, 因此聚合后 T_c 仍存在.

致 谢 电镜测试得到北京大学分析测试基金资助, 谨致谢忱.

参 考 文 献

- [1] 李子臣, 何巍, 李福绵. 高分子学报, 1995, (2): 238
- [2] Nojima S. Sunamoto J. Inoue K. "The Liposomes", Tokyo: Nankodo, 1988
- [3] Folda T. Gros L. Ringsdorf H. *Makromol Chem Rapid Commun.* 1982, 3: 167
- [4] Neumann R. Ringsdorf H. *J Am Chem Soc.* 1986, 108: 487
- [5] Neumann R. Ringsdorf H. Patton E V. et al. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 898: 338

POLYMERIZABLE LIPOSOMES

III. SYNTHESIS OF A NOVEL KIND LIPOSOMES OF AMPHIPHILIC AMINO ACID

HE Wei, LI Zichen, LI Fumian

(*Department of Chemistry, Peking University, Beijing 100871*)

Abstract A double-chain amphiphilic amino acid, S-[1-carboxy-2-([N-(1,2-bisoctadecyloxycarbonyl) ethyl] carbamoyl) ethyl]cysteine (Asp18-M-Cys) was synthesized by Michael addition of cysteine with maleic acid derivative. The stable liposome formed from Asp18-M-Cys in buffer solutions of different pH (6.5, 7.4, 8.5) was confirmed by electron microscopy. When co-dispersed with water soluble N-Cyclohexyl-N'-[β -(N-methyl-morpholino) ethyl] carbodiimide-p-toluenesulfonate (WSD), Asp18-M-Cys could be polymerized as stable liposomes and the polymerization was followed by FT-IR, GPC and DSC.

Key words Amino acid, Amphiphilic molecule, Condensation polymerization, Liposomes, Phase transition temperature