

基因载体 PEG 化壳聚糖的制备及其表征

魏晓红,梁文权(浙江大学药学院,浙江 杭州 310031)

摘要:目的 用亲水性的聚乙二醇对壳聚糖进行改性,制备适用于基因转染的非病毒类载体。方法 合成步骤共分三步。首先通过有机合成,将甲氧基聚乙二醇(mPEG)的羟基末端依次活化成为羧基和琥珀酰亚胺端基,形成 mPEG-COOH 活化物和 mPEG-COONSu 活化物;然后将亲水性的 mPEG-COONSu 活化物接枝到壳聚糖的氨基侧链上,得到改性的了的壳聚糖-聚乙二醇接枝产物,应用波谱技术 FTIR,¹H-NMR,¹³C-NMR 对中间产物和最终产物进行了表征。结果 在 FTIR 谱图上基本找到 mPEG-COOH, mPEG-COONSu 的特征峰;¹H-NMR 再一次确认 mPEG-COONSu 的合成;¹³C-NMR 确认了壳聚糖-聚乙二醇接枝产物的存在。结论 mPEG-COONSu 活化物通过接枝反应对壳聚糖进行改性,得到了 PEG 化壳聚糖。

关键词:聚乙二醇活化物;壳聚糖;基因载体;制备;表征

中图分类号:R282.74;R927.13

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2003)05-0383-03

The preparation and characterization of mPEGylated chitosan as gene vector

WEI Xiaohong, LIANG Wenquan (Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Modify the physical properties of chitosan in order to let it more suitable for non-viral delivery system for gene therapy. **METHOD** By the way of organic synthesis, mPEG was activated; through the way of macromolecular polymerization, the modified mPEGylated chitosan was obtained through grafting hydrophilic mPEG spacer to the amino group of chitosan. The structures of the activated mPEG and mPEGylated chitosan were determined by modern spectrum technology, such as FTIR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. **RESULTS** The activated mPEG-COOH, mPEG-COONSu and mPEGylated chitosan were prepared. Their structures were confirmed through a series of spectrum technologies. **CONCLUSION** mPEGylated chitosan can be obtained through grafting activated mPEG spacer to the amino group of chitosan.

KEY WORDS: activated mPEG; chitosan; gene vector; prepare; character

基因治疗作为一个崭新的治疗手段受到人们极大的关注。而将基因导入体内必须借助于载体,其中非病毒载体因其安全性而备受关注^[1]。而非病毒类载体中的阳离子聚合物因其更稳定,能大规模生产而受到重视。

壳聚糖是唯一天然存在的、阳离子的、可生物降解多糖,具有无毒、相容性、低免疫排斥性。但是,由于壳聚糖分子间氢键的存在,使它不溶于一般的有机溶剂和水^[2]。为了改进

其溶解性,抑制其作为载体时被 MPS 系统的识别,可通过接枝的方法将亲水的聚乙二醇链段引入壳聚糖链段中。本实验报道了基因载体——壳聚糖-聚乙二醇的合成和表征。

1 试剂和主要仪器

1.1 试剂

聚乙二醇 5000(Aldrich Chemical Company, Inc);壳聚糖 (low molecular weight, Aldrich Chemical Company, Inc);N-羟

致谢:本实验中合成路线的确定、谱图的分析 and 产物的确认等工作都得到了本院药物化学教研室胡永洲教授的悉心指导和帮助,在此表示深深的谢意!

基琥珀酰亚胺 (HNOSu) [中国医药(集团)上海化学试剂公司]; 琥珀酸酐(分析纯 江苏巨山市年沙助剂厂); *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)(上海松江茶花胶黏剂厂); 透析袋(膜截留分子量 MWCO = 3500, 10000, Germany); 吡啶、苯、正己烷、氢氧化钠、乙醚等其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

红外分光光度计(Shimadzu IR-460, Japan); 核磁共振仪(AVANCE DMX500)。

2 方法

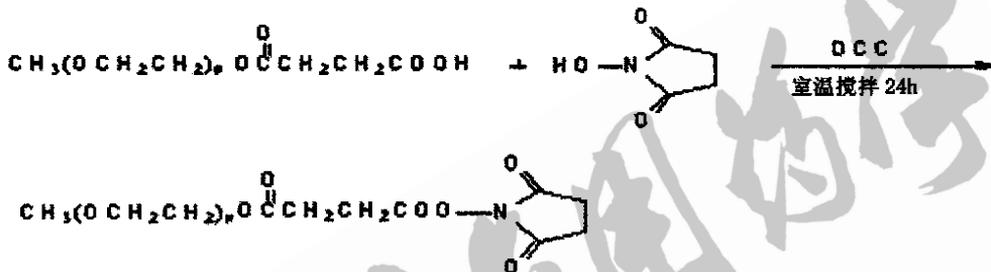
2.1 mPEG-COOH 的合成



称取 100g, 20 mmol/L mPEG5(分子量为 5000), 放入圆底烧瓶中, 用 500 mL 吡啶溶解, 再加入琥珀酸酐(4g, 40 mmol/L), 反应后, 蒸去大部分吡啶, 所得固体用双蒸水透析提纯, 去除 mPEG 及其未反应完全的反应物。然后将透析

所得物质冷冻干燥即得产物 mPEG-COOH(37.23g, 36.5%)。

2.2 mPEG-COONSu 的合成



称取 mPEG-COOH(5g, 1 mmol) 置于磨口锥形瓶内, 加入乙腈 100 mL, 溶解后加入 *N*-羟基琥珀酰亚胺, 室温搅拌过夜, 得到乳白色混浊液, 过滤除去沉淀物, 滤液所得残渣用乙醚洗涤, 干燥。

COONSu 除了具有 mPEG-COOH 的特征峰外, 还可见以下特征峰: 1740 cm^{-1} (C=O, 羰基), 1780 cm^{-1} , 1812 cm^{-1} (琥珀酰亚胺), 可以初步说明接上了活化基团琥珀酰亚胺。而以 CDCl_3 为溶剂对 mPEG-COONSu 所做的核磁共振谱图(^{13}C -NMR)表明, 826.47 ~ 25.07(-ONSu 环上的- CH_2CH_2 -), 33.99(接上去的酸酐部分的- CH_2CH_2 -), 49.39(mPEG 头上的甲基), 72.12 ~ 69.10(mPEG 中的重复单元- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -); 167.83(-ONSu 环上的羰基); 169.04, 167.83(接上去的酸酐部分的羰基)。从中大致可以找到产物各个基团的对应峰, 说明接上了活化基团琥珀酰亚胺。

2.3 壳聚糖-聚乙二醇的合成

将称取的壳聚糖用适量醋酸溶液溶解后, 加入 mPEG-COONSu, 使 mPEG-COONSu 的摩尔数是壳聚糖上氨基摩尔数的 40%。反应后, 将所得产物倒入透析袋(MWCO = 10000)内透析, 冷冻干燥, 干燥器内保存。

2.4 产物的表征

产物的红外谱图在 BRUKER VECTOR22 上以 KBr 压片法或溶液涂膜法测得。产物的核磁共振谱图根据溶解性的不同采用 CDCl_3 , 氘代 DMSO 作为溶剂在 AVANCE DMX500 上测得。

PEG 化壳聚糖的接枝率测定: 在 2.3 步骤中, 壳聚糖的投料量为 W_0 , 其中 -NH_2 - 的摩尔数为 N_0 , 反应后得到的 PEG 化壳聚糖为 W , ($W - W_0$) 为接枝上去的 PEG 部分, N_1 为这部分接枝上去的 PEG 的摩尔数, 接枝率为 N_1 / N_0 。

3.3 壳聚糖-聚乙二醇共聚物的表征

得到的 mPEG-CO(-NH-Chitosan) 以 KBr 压片进行红外分析。为了比较, 将 mPEG-COONSu 和 Chitosan 按 10:1:2:1:1:10 的比例混合, 也进行红外分析。通过比较可知, 在 mPEG-COON-Chitosan 的红外谱图中 1780 cm^{-1} , 1812 cm^{-1} (琥珀酰亚胺) 的峰消失。由于接上去酸酐部分的羰基部分所占的比例减少, 1740 cm^{-1} (C=O, 羰基) 峰较小, 而在 1650 ~ 1700 处出现了壳聚糖的酰胺基特征峰 1662 cm^{-1} 、1586 cm^{-1} 。此产物既有壳聚糖的特征峰, 又有聚乙二醇的特征峰。而且是经过透析的壳聚糖-聚乙二醇的接枝产物, 而非混合物。

3 结果与讨论

3.1 mPEG-COOH 的表征

得到的 mPEG-COOH 以 KBr 压片进行红外分析, 从谱可知, 除了具有 mPEG 的特征峰(3400 cm^{-1} , 宽峰, 羟基; 2900 cm^{-1} 饱和碳 C-H; 1650 cm^{-1} , 钝峰, 羰基, 1110 cm^{-1} (CH_2OCH_2)) 外, 还有如下特征峰: 1738 cm^{-1} (C=O, 尖峰, 羰基)。反映出 mPEG-COOH 的结构特征, 说明 mPEG 的另一端已接上琥珀酸酐并未端羧酸化。

以 DMSO 为溶剂的 mPEG-COON-Chitosan 核磁共振谱图表明: ^1H -NMR 8.24(mPEG 头上的甲基); 3.24 ~ 3.68(mPEG 中的重复单元- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -); 5.55(壳聚糖环上氧旁 α 位碳上的氢); 8.3(壳聚糖环上的酰胺基的 H)。

3.2 mPEG-COONSu 的表征

得到的 mPEG-COONSu 红外谱表明了, 产物 mPEG-

按照 2.4 中测定 PEG 化壳聚糖接枝率方法, 测得 PEG 化壳聚糖的接枝率为 16.71% (mol/mol), 也就是说壳聚糖主链上的氨基中, 有 16.71% 接枝上了 PEG。

从以上的图谱分析表明, mPEG 已被接枝到 Chitosan 的氨基上。

参考文献

[1] Pouton C W, Seymour L W. Key issues in non-viral gene delivery

[J]. Adv Deliv Rev. 1998, 34(1) :3 .

[2] 蒋挺大.壳聚糖[M].北京:化学工业出版社,2001 :12 .

收稿日期 :2002-10-23