

文章编号 :1001 - 2486(2006)03 - 0037 - 03

## 一种核—壳结构的枝化聚乙二醇大分子的合成\*

王孝杰<sup>1</sup>,李效东<sup>1</sup>,刘东华<sup>2</sup>,刘克良<sup>3</sup>(1. 国防科技大学 航天与材料工程学院,湖南 长沙 410073; 2. 湖南师范大学 化学化工学院,湖南 长沙 410081;  
3. 军事医学科学院 毒物药物研究所,北京 100850)

**摘要** 选择以三羟甲基氨基甲烷(Tris)为核,以单甲氧基聚乙二醇(mPEG)为外层分子,通过官能团反应,合成出一种核—壳型枝化 PEG 衍生物,利用叔丁氧羰基酸酐((Boc)<sub>2</sub>O)对 Tris 上的氨基进行保护,对 mPEG 端羟基依次进行羧基化、酰氯化等活化处理,通过酰氯与羟基的官能团反应合成出目标分子。产物分子保留了活性官能团氨基,为其进一步的修饰反应提供了保障。通过红外光谱分析、元素分析及分子量测定,证实了产物与目标分子的结构相吻合。

**关键词** 氨基保护;枝化聚乙二醇;核—壳结构;合成

中图分类号:TB324 文献标识码:A

A Novel Method for Synthesis of Core-shell Type  
Branched PEG MacromoleculeWANG Xiao-jie<sup>1</sup>, LI Xiao-dong<sup>1</sup>, LIU Dong-hua<sup>2</sup>, LIU Ke-liang<sup>3</sup>(1. College of Aerospace and Material Engineering, National Univ. of Defense Technology, Changsha 410073, China;  
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;  
3. Institute of Pharmacology & Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**Abstract** A novel core-shell type branched macromolecule was synthesized from the tri(s-hydroxymethyl) aminomethane(Tris) and the monomethoxypoly(ethylene glycol)(mPEG). The first step was to protect the amino group of Tris by using t-butyloxycarbonyl anhydride((Boc)<sub>2</sub>O), then mPEG was activated by changing hydroxide terminal into acid chloride and carboxylation of mPEG was fulfilled before. The amino group was reserved so that it could be used as functional radical to modify the protein later. The product was confirmed to inosculate with FT-IR, EA and M.W. through infrared spectroscopic analysis, element analysis and mensuration of molecular weight.

**Key words** protection of amino group; branched PEG; core-shell; synthesis

蛋白质及多肽药物的生物利用度很低,很多还会引起严重的免疫反应,通过对药物进行化学修饰可以有效地改善这些问题。在常用的化学修饰剂中,聚乙二醇(PEG)及其衍生物因其所具有的两亲性、生物相容性、无免疫原性、无毒副作用等<sup>[1-2]</sup>特点,而成为备受关注的化学修饰剂。人们已经在这方面开展了很多工作,也取得了一些成果。目前,在利用 PEG 作为修饰剂的研究中,基本都是采用线形结构的聚乙二醇修饰剂<sup>[3-4]</sup>,例如,mPEG 琥珀酸基琥珀酸酐(mPEG-SS),mPEG 琥珀酸基碳酸酐(mPEG-SC)等。

近来有研究表明,使用枝化 PEG 修饰剂比使用线形 PEG 修饰剂可使酶的活性保持得更好<sup>[5]</sup>,例如在对尿酸酶的化学修饰研究中发现,如果用枝化 PEG 作为修饰剂,聚乙二醇化后酶活性为未修饰酶活性的 32%,而使用线形 PEG,聚乙二醇化后酶活性仅为未修饰酶活性的 2.5%。另外,使用枝化的修饰剂可以大大降低修饰产物的结构分散性,这在干扰素聚乙二醇化过程中得到很好的证明,用线形聚合物修饰,产生 11 种位置同分异构体,而用枝化聚合物只有一个或两个赖氨酸残基能被聚乙二醇化<sup>[6]</sup>。

因此,枝化的 PEG 衍生物在药物修饰领域具有重大的应用价值。本文以多官能团的化合物为核,以活化的 mPEG 为外层分子,通过官能团反应,合成出一种具有核-壳结构的枝化 PEG 衍生物。由于合成的枝化 PEG 衍生物在修饰药物时需要活性位点,本文选择三羟甲基氨基甲烷(Tris)作为核材料,

\* 收稿日期:2005-12-09

作者简介:王孝杰(1970—),男,博士生,讲师。

并通过氨基保护使产物分子保留了活性官能团,为其进一步的修饰反应提供了保障。产物分子通过红外光谱分析、元素分析及分子量测定,结果表明产物为目标分子。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

单甲氧基聚乙二醇(mPEG,  $M_n = 750$ ), ACROS公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris), ACROS公司;叔丁氧羰基酸酐( $(Boc)_2O$ ), 吉尔生化;二氯亚砷、二甲基甲酰胺、二氯甲烷、无水乙醇、甲醇、无水乙醚等均为国产分析纯试剂,使用前均进行了干燥处理。红外光谱仪, Nicolet Magna IR-550型, KBr压片;元素分析仪, USA PE-2400II型 CHN元素分析仪;液质联用仪, Agilent 1100 series LC-MSD;核磁共振仪, VarianINOVA-300, TMS为内标,  $CDCl_3$ 为溶剂。

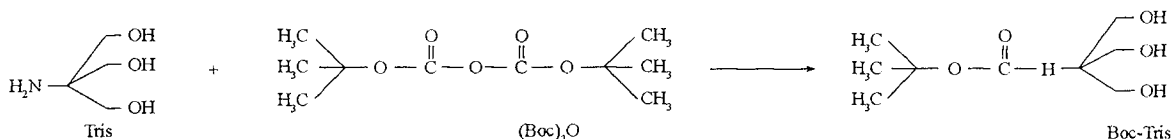
### 1.2 合成方法

#### 1.2.1 单甲氧基聚乙二醇酰氯(mPEG-COCl)的制备

称取羧基化单甲氧基聚乙二醇(mPEG-COOH) 0.5g(自制),加入到装有球形冷凝管的三口烧瓶中。用滴液漏斗滴加二氯亚砷至过量,用氢氧化钠吸收氯化氢气体,室温搅拌反应1h。水泵减压蒸馏除去过量的二氯亚砷,得到黄棕色固体,用无水乙醚洗涤3次,除去残余的二氯亚砷,置干燥器中干燥以备下面实验。

#### 1.2.2 三羟甲基氨基甲烷的氨基保护

反应式如下:



称取 1.2g (0.01mol) Tris, 加入到 250ml 三口烧瓶中, 加 60ml 无水甲醇搅拌溶解后, 再加 2.2g (0.01mol)  $(Boc)_2O$ 。50℃下回流、搅拌反应 10h, 旋转蒸发完溶剂, 得到白色固体, 在水中重结晶, 得到产物 1.8g, 产率为 81.8%。

#### 1.2.3 核-壳型枝化大分子的合成

反应式如下:



将 mPEG-COCl 溶于 30ml 二甲基甲酰胺中, 加入 Boc-Tris (mPEG-COCl 与 Boc-Tris 的摩尔比为 3:1), 用氢氧化钠吸收反应产生的氯化氢尾气, 在 50℃下反应 5h, 减压蒸馏溶剂, 至溶液体积约 10ml 左右停止加热, 冷却至室温, 用无水乙醚沉淀, 色谱柱分离得到淡黄色固体 0.3g, 产率为 55%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三羟甲基氨基甲烷的氨基保护(Boc-Tris)

#### 2.1.1 Boc-Tris 的红外表征

Boc-Tris 的红外光谱如图 1 所示, 在 2500 ~ 3560  $cm^{-1}$  处, 原料 Tris 的氨基、羟基的宽强吸收峰消失, 同时 Tris 的伯胺基的面内弯曲振动峰 1588  $cm^{-1}$  消失, 说明原料参与了反应, 出现了氨基甲酸酯的组合特征峰 3421  $cm^{-1}$  为 N-H 伸缩振动峰, 1715  $cm^{-1}$  为 C=O 伸缩振动峰, 1650  $cm^{-1}$  为 N-H 面内弯曲振动峰, 1250  $cm^{-1}$  为 N-CO-O 反对称伸缩振动峰。

#### 2.1.2 Boc-Tris 的核磁共振表征

Boc-Tris 的  $^1H$ NMR 分析结果如图 2 所示  $\delta = 1.44$  (9H, Boc) 3.70 (6H,  $-(CH_2OH)_3$ ) 5.32 (3H, OH), 7.92 (-CONH)。

#### 2.1.3 Boc-Tris 的 LC-MSD 的表征

Boc-Tris 的液质联用谱如图 3 所示, 白色晶体经液相色谱分离后, 在  $t = 2.201$  min 处出现单峰, 说明

该晶体为纯净物,  $m/z = 221$  处为分子离子峰而没有其他杂质峰, 质谱仪采用常压化学电离(APCI)法, 得到的就是分子离子峰, 几乎没有碎片离子峰。

通过红外、液质联用及核磁共振分析, 表明得到的产物是目标产物。

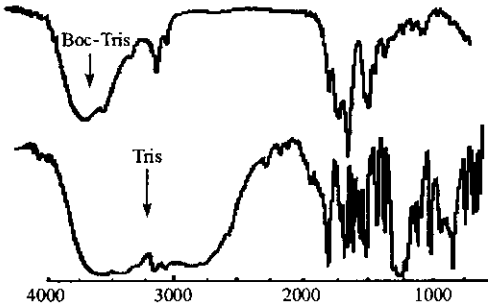


图1 Boc-Tris 的红外谱图  
Fig.1 FT-IR spectra of Boc-Tris

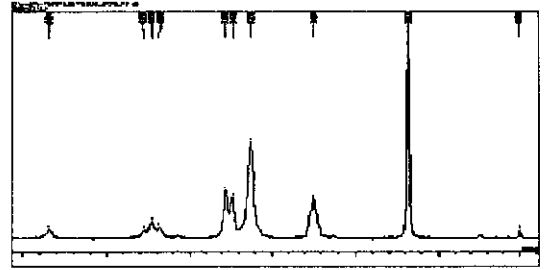


图2 Boc-Tris 的<sup>1</sup>H NMR 谱图  
Fig.2 <sup>1</sup>H NMR spectra of Boc-Tris

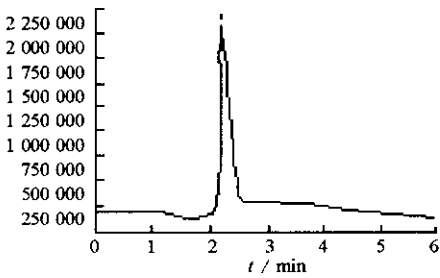
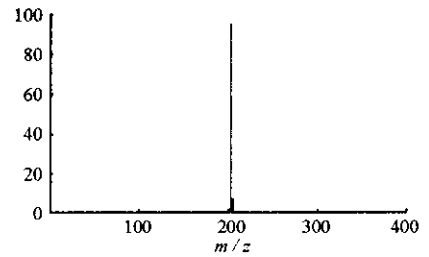


图3 Boc-Tris 的液质联用谱图  
Fig.3 LC-MSD spectra of Boc-Tris



## 2.2 核—壳型枝化大分子(CSBM)的合成

### 2.2.1 CSBM 的纯化

由于 CSBM 的分子量是聚乙二醇的 3 倍多, 它的分子体积较大, 极性基团也较多, 因而硅胶对它的吸附作用强于对聚乙二醇的吸附, 薄层色谱结果显示, 聚乙二醇的  $R_f = 0.80$ , CSBM 的  $R_f = 0.5$ 。比移值的差别表明, 产物中未反应的 mPEG 可以通过色谱柱分离法除去。

实验以 80~100 目的硅胶为填充剂, 无水乙醚—无水甲醇(30:50)为展开剂, 进行色谱柱分离。合并含产物的淋下液, 旋转蒸发, 至少量溶液时, 加无水乙醚沉淀, 得到白色固体, 干燥贮藏。

### 2.2.2 CSBM 的红外表征

CSBM 的红外光谱如图 4 所示,  $1745\text{cm}^{-1}$  处出现较强的酯键特征吸收峰,  $1110\text{cm}^{-1}$  为聚乙二醇链段醚键伸缩振动吸收峰, 说明 mPEG 通过生成的酯键接上了。 $1360\text{cm}^{-1}$  为叔丁基面内弯曲震动峰,  $2888\text{cm}^{-1}$  为链骨架 C-H 伸缩振动吸收峰。

表 1 CSBM 的元素分析结果

Tab.1 The result of element analysis about CSBM

	C	H	N	O
理论%	54.2	8.8	0.6	36.4
实测%	51.5	8.4	1.0	39.1

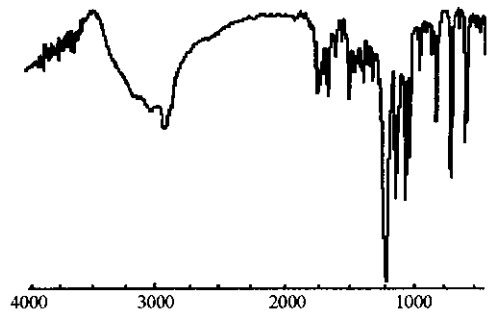


图4 CSBM 的红外谱图  
Fig.4 FT-IR spectra of CSBM

201 - 214.

[16] Valiant L G. The Complexity of Enumeration and Reliability Problems[J]. SIAM Journal of Computing, 1979(8):410 - 421.

(上接第39页)

### 2.2.3 CSBM 的元素分析

产物的元素分析结果如表1所示。由于采用CHN元素分析仪,所以表中氧的数据为计算所得。实测值与理论值稍有偏差,可能是由于产物不是纯净物,核上连接的mPEG链不完全是三条,而是几种链数的混合物。

### 2.2.4 CSBM 的分子量测定

本文应用凝固点降低法测定CSBM的分子量。以水作溶剂,  $\Delta T_f$  值为  $0.017^\circ\text{C}$ , 计算出平均分子量为2188。

理论计算CSBM含三条链的分子量为2591,含两条链的分子量为1801,含一条链的分子量为1011,实测值为2188,可以推断所得产物是含三条链和两条链的混合物,可能还含有少量一条链的。

## 3 结论

以Tris为核,以酰氯化的mPEG为外层分子,通过官能团反应,合成出一种具有核-壳结构的枝化PEG衍生物,并通过Boc保护Tris的氨基,使产物分子保留了活性官能团,为其进一步的修饰反应提供了保障。产物分子通过红外光谱分析、元素分析及分子量测定,结果表明产物为目标分子。

## 参考文献:

- [1] Zalipsky S. Functionalized Poly(Ethylene Glycol) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates[J]. Bioconjugate Chem., 1995, 6:150 - 165.
- [2] Roberts M J, Bentley M D, Harris J M. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54:459 - 476.
- [3] Palaparthi R, Wang H, Gulati A. Current Aspects in Pharmacology of Modified Hemoglobins[J]. Adv. Drug Deliv. Rev., 2000, 40(2):185 - 198.
- [4] Zalipsky S. Alkyl Succinimidyl Carbonates Undergo Lossen Rearrangement in Basic Buffers[J]. Chem. Commun., 1998, (1):69 - 70.
- [5] Lee K C, Tak K K, Park M O, et al. Preparation and Characterization of Polyethylene Glycol Modified Salmon Calcitonins[J]. Pharm. Dev. Technol., 1999, 4(4):269 - 275.
- [6] Hinds K, Koh J J, Joss L et al. Synthesis and Characterization of Poly(Ethylene Glycol)-insulin Conjugates[J]. Bioconjugate Chem., 2000, 11(3):195 - 201.

