酸敏感连接单元的合成及其在两亲性嵌段共聚物中的应用

朱方霞^a 庄园^{a,b} 黎庆^{a,b} 杨晴来^a 伍新燕^b
邵志峰^{a,c} 龚兵^{*,d,e} 沈玉梅^{*,a}

(^a 上海交通大学系统生物医学研究院 Bio-ID 研究中心 系统生物医学教育部重点实验室 上海 200240)

(^b 华东理工大学化学与分子工程学院 精细化工研究所 上海 200237)

(^c 上海交通大学生物医学工程学院 Bio-ID 研究中心 上海 200240)

(^d 北京师范大学化学学院 北京 100875)

(^e 布法罗纽约州立大学化学系 纽约 14260 美国)

摘要 合成了一类基于四氢吡喃/四氢呋喃醚结构的酸敏感连接单元 **1a** 和 **1b**, 该连接单元的两端均为易反应的活性官能团, 其结构经 ¹H NMR、¹³C NMR、IR 和 HRMS 表征, 并合成了一种含四氢吡喃醚结构的模型化合物以及含四氢呋喃醚结构的亲水性嵌段共聚物, 其中聚乙二醇(PEG)为亲水片段, 聚乳酸(PLA)为疏水片段, 其结构经 ¹H NMR、IR 以及 GPC 的表征, 并测定了该嵌段共聚物自组装胶束的粒径大小、临界胶束浓度(CMC)以及常温下的稳定性. 实验结果表明该类酸敏感嵌段共聚物自组装胶束具有良好的发展前景.

关键词 四氢吡喃醚/四氢呋喃醚酸敏感连接单元; 两亲性嵌段共聚物; 自组装胶束

Synthesis and Application of pH-Sensitive Linkers in Amphiphilic Block Copolymer

Zhu, Fangxia^a Zhuang, Yuan^{a,b} Li, Qing^{a,b} Yang, Qinglai^a Wu, Xinyan^b
Shao, Zhifeng^{a,c} Gong, Bing^{*,d,e} Shen, Yumei^{*,a}

(^a Shanghai Center for Systems Biomedicine, Key Laboratory of Systems Biomedicine and Bio-ID Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

(^b Key Laboratory for Advanced Materials and Institute of Fine Chemicals, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

(^c School of Biomedical Engineering, Bio-ID Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

(^d College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875)

(^e Department of Chemistry, University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, NY 14260, USA)

Abstract A series of acid cleavable linkers based on tetrahydropyran/tetrahydrofuran (THP/THF) ether were synthesized, in which both of the two terminals are active group which is easy to react with other compounds. The structures for these linkers **1a** and **1b** were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS, and IR. Model compound containing THP linkage was synthesized. Furthermore a pH-responsive amphiphilic diblock copolymer containing tetrahydrofuran (THF) linkage in which hydrophilic segment was poly(ethylene glycol) (PEG) and hydrophobic segment was hydrophobic polylactic acid (PLA) was synthesized and characterized by ¹H NMR, IR and gel permeation chromatography (GPC). The size, stability and critical micelle concentration (CMC) of diblock copolymer micelle were also evaluated. The preliminary experimental results show that the acid sensitive amphiphilic diblock copolymer micelle is a potential alternative for future drug delivery.

Keywords THP/THF acid cleavable linker; amphiphilic diblock copolymer, self-assembled micelle

* E-mail: yumeishen@sjtu.edu.cn; bgong@buffalo.edu

Received March 12, 2014; revised April 28, 2014; published online May 7, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81071250, 91227109), and the Major Projects in National Science and Technology, "Creation of Major New Drugs" (No. 2011ZX09501-001-05).

国家自然科学基金(Nos. 81071250, 91227109)和新药创制重大专项(No. 2011ZX09501-001-05)资助项目.

连接单元(cleavable linker)最早是在固相合成中提出来的,是指连接固相载体与目标化合物之间的结构片段,通常含双功能团并且在适当的条件下能够特异性断裂.在药物传递体系^[1]、蛋白质组学^[2]、影像学^[3,4]、DNA测序^[5]等化学生物学领域有重要的应用前景.

很多药物存在水溶性差、在体内分布无选择性以及给药后容易失活等问题,为了解决这些问题通常选择药物载体进行包裹^[6~10].目前的研究热点为智能载药体系,特别是酸敏感载药体系引起了广泛的关注.研究表明,在正常和病理生理条件下 pH 值存在梯度变化^[11,12].肿瘤和炎症组织比血液和正常组织偏酸性.此外,尽管细胞的内吞作用在接近生理 pH 7.4 开始,但是在核内体中 pH 为 5.5~6.0 而在溶酶体中 pH 降低到 4.5~5.0 时内吞作用才开始.因此酸敏感药物运输载体有望实现抗癌药物的靶向输送,它们在温和的酸性环境中,酸敏感结构破坏,引发载药体系降解从而释放出包裹的药物.目前研究得较多的酸敏感结构主要有原甲酸酯类、缩醛类、缩酮类、胺类、亚胺类、三苯甲基类、脞等^[13~17],然而关于四氢吡喃醚(THP)和四氢呋喃醚(THF)结构用于酸敏感嵌段共聚物载药体系的研究却很少. Takahashi 等^[18]合成低聚糖时,利用 THP 作为保护基,在温和的酸性条件下,去保护而得到最终产物. Thayumanavan 等^[19]使用 THP 保护 2-羟基乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)的羟基基团合成了三重敏感的嵌段共聚物,其中 THP 仍然是作为保护基. Fréchet 等^[20]以 THF 为酸敏感连接单元,合成了 podophyllotoxin-PEO 共聚物.

本文设计合成了四氢吡喃醚、四氢呋喃醚连接单元,并合成了基于 THP 酸敏感结构的模型化合物以及基于 THF 的嵌段共聚物,在此基础上考察了嵌段共聚物自组装胶束的基本性质.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

2-羟甲基-3,4-二氢吡喃、氢化钠、三乙胺溴化苄、对甲苯磺酸、对硝基苯甲酰氯、10% Pd-C、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、四丁基氟化铵石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、四氢呋喃、*N,N*-二甲基甲酰胺、氯化铵、碳酸钾、氯化钠、无水硫酸钠、醋酸钠等分别购自百灵威、阿拉丁以及中国医药集团试剂公司.

所用的测试仪器包括 AVANCE III 400 型核磁共振波谱仪; EQUINOX55 型傅立叶红外光谱分析仪; Q-ToF Premier 型超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪; 安捷伦 1260 型 GPC 分析色谱; JEOL JEM-100CX-II 透射电子显微镜; Malvern Zetasizer Nano S 激光纳米粒

度仪; F97 荧光分光光度计.

1.2 连接单元 1a 的合成与表征

1.2.1 2-苯甲氧基-3,4-2H-吡喃(3)的合成

在冰水浴中, N_2 保护下, 将 0.6 g 氢化钠(15 mmol) (60%油中)溶解在 10 mL DMF 中, 将 1.71 g (15 mmol) 2-羟甲基-3,4-二氢吡喃(2)缓慢滴加到 DMF 中, 0 °C 下搅拌 1 h, 将 2.64 g 溴化苄(15 mmol)滴加到反应液中, 撤去冰水浴, 继续搅拌 8 h. 用 10 mL 饱和氯化铵水溶液洗涤, 乙醚萃取(50 mL $\times$ 2), 有机相分别用水、饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 减压旋去溶剂, 柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=60:1] 得产品无色油状液体^[21] 2.54 g, 产率 83%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.40~7.26 (m, 5H), 6.43 (d, J =8.4 Hz, 1H), 4.73~4.68 (m, 1H), 4.62~4.60 (m, 2H), 4.08~4.01 (m, 1H), 3.61 (dd, J =13.6, 8.0 Hz, 1H), 3.54 (dd, J =13.6, 5.6 Hz, 1H), 2.18~2.05 (m, 1H), 2.04~1.93 (m, 1H), 1.90~1.83 (m, 1H), 1.78~1.64 (m, 1H).

1.2.2 [6-(2-溴乙氧基)四氢-2H-吡喃-2-基]-甲醇(4)的合成

0.625 g 2-溴乙醇(5 mmol)溶于 5 mL 二氯甲烷, 加入 0.25 g 吡啶对甲苯磺酸盐(1 mmol), 搅拌 5 min 后, 再加入 1.02 g 化合物 3 (5 mmol), 室温下搅拌 6 h. 减压旋去溶剂, 然后加入适量水, 用乙酸乙酯萃取, 有机相分别用水、饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=60:1] 得产品无色油状液体 1.5 g, 产率 91%. 核磁共振谱图显示产物为柱层析无法分离的两种非对映异构体^[22]. Major Isomer (*trans*-4): 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.35~7.26 (m, 5H), 4.93 (d, J =2.3 Hz, 1H), 4.61~4.54 (m, 2H), 4.05~3.96 (m, 2H), 3.87~3.76 (m, 1H), 3.58~3.41 (m, 4H), 1.91~1.79 (m, 1H), 1.75~1.67 (m, 1H), 1.67~1.54 (m, 3H), 1.51~1.37 (m, 1H). Minor Isomer (*cis*-4): 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, distinctive peaks) δ : 4.48 (dd, J =9.2, 2.0 Hz, 1H), 4.14 (ddd, J =12.8, 8.8, 5.6 Hz, 1H), 3.70~3.63 (m, 1H).

1.2.3 [6-(2-溴乙氧基)四氢-2H-吡喃-2-基]-甲醇(5)的合成

0.11 g 化合物 4 (0.34 mmol)溶于 4 mL 甲醇, 加入 15 mg 10%钯/碳, 通入氢气, 室温下反应 1 h. 过滤, 减压旋去溶剂, 得 78 mg 无色油状液体, 产率 97%. 核磁共振谱图显示产物为柱层析无法分离的两种非对映异构体^[22]. Major Isomer (*trans*-5): 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.89 (d, J =2.0 Hz, 1H), 4.01~3.95 (m, 1H), 3.89~3.79 (m, 1H), 3.79~3.73 (m, 1H), 3.60~3.45 (m, 4H), 1.93~1.82 (m, 1H), 1.79~1.66 (m, 1H), 1.66~1.51 (m, 3H), 1.38~1.27 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz,

CD₃OD) δ : 97.31, 69.80, 67.02, 65.16, 30.47, 29.27, 26.72, 17.24. Minor Isomer (*cis*-**5**): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, distinctive peaks) δ : 4.51 (dd, J =9.6, 2.0 Hz, 1H), 4.16~4.09 (m, 1H), 3.60~3.45 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 102.38, 76.87, 68.54, 64.76, 30.73, 30.20, 26.44, 21.26; IR (KBr) ν : 3427, 2943, 1719, 1640, 1451, 1361, 1276, 1198, 1125, 1084, 1033, 977, 890, 856, 787, 662, 570, 471 cm⁻¹. HRMS (ESI) calcd for C₈H₁₅O₃BrNa (M+Na)⁺ 261.0102, found 261.0093.

1.2.4 [6-(2-氨基乙氧基)四氢-2H-吡喃-2-基]-甲醇 (**1a**)的合成

70 mg 化合物 **5** (0.29 mmol)溶于 3 mL 氨水, 室温下反应 3 天. 加适量乙醇, 减压旋去溶剂, 得无色油状液体 49 mg **1a**, 产率 96%. 核磁共振谱图显示产物为柱层析无法分离的两种非对映异构体^[22]. Major Isomer (*trans*-**1a**): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 4.88 (d, J =2.0 Hz, 1H), 3.96~3.90 (m, 1H), 3.84~3.78 (m, 1H), 3.69~3.64 (m, 1H), 3.54~3.47 (m, 2H), 3.18 (t, J =4.8 Hz, 2H), 1.96~1.73 (m, 2H), 1.69~1.49 (m, 2H), 1.43~1.28 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 97.66, 70.02, 65.07, 63.03, 39.46, 28.98, 26.49, 17.14. Minor Isomer (*cis*-**1a**): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, distinctive peaks) δ : 4.51 (dd, J =9.2, 2.0 Hz, 1H), 4.01~3.97 (m, 1H), 3.62~3.60 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 102.52, 77.04, 65.08, 64.59, 39.89, 30.55, 26.08, 21.17; IR (KBr) ν : 3391, 2942, 1614, 1452, 1398, 1125, 1077, 1026 cm⁻¹. HRMS (ESI) calcd for C₈H₁₈NO₃ (M+H)⁺ 176.1287, found 176.1288.

1.3 连接单元 **1b** 的合成与表征

1.3.1 (*S*)-5-氧代四氢呋喃-2-羧酸(**7**)的合成

取 15.00 g *L*-谷氨酸 **6** (102 mmol), 加入 21 mL 浓盐酸和 42 mL 水的混合溶剂溶解, 0 °C 下搅拌. 用 45 mL 水溶解 10.50 g 亚硝酸钠 (150 mmol), 将其缓慢滴加到反应瓶中, 在 0 °C 继续反应 3 h, 室温下 12 h. 然后停止反应, 旋出溶剂, 加入 100 mL 乙酸乙酯溶解, 过滤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋除溶剂, 得粗产物 14.28 g, 为淡黄色油状液体. 该化合物未经纯化直接使用^[23].

1.3.2 (*S*)-5-(羟甲基)二氢呋喃-2(3*H*)-酮的合成

将 14.28 g 化合物 **7** (110 mmol)置于 250 mL 反应瓶中, 抽真空通氮气置换 3 次, 加入 100 mL 无水四氢呋喃搅拌使之溶解. 将反应液冷至 -20 °C 并搅拌 30 min, 再将 13 mL 10 mol·L⁻¹ 硼烷/二甲硫醚溶液缓慢滴加到反应瓶中. 滴加完毕后, 继续搅拌 4 h, 加入 75 mL 甲醇淬灭反应. 分出有机相, 再经无水硫酸钠干燥、过滤, 旋去溶剂, 得到 12.45 g 淡黄色油状液体^[23]. ¹H NMR

(CDCl₃, 300 MHz) δ : 4.58~4.66 (m, 1H), 3.89 (dd, J =12.6, 3.0 Hz, 1H), 3.63 (dd, J =12.6, 4.5 Hz, 1H), 2.46~2.68 (m, 2H), 2.11~2.29 (m, 2H).

1.3.3 (*S*)-5-[(叔丁基二甲基硅氧基)甲基]二氢呋喃-2(3*H*)-酮(**9**)的合成

将 12.45 g 化合物 **8** (107 mmol)置于 250 mL 反应瓶中, 加入 8.90 g 咪唑 (129 mmol), 然后加入 50 mL 二氯甲烷. 再用 50 mL 二氯甲烷溶解 17.85 g 二甲基叔丁基氯硅烷 (118 mmol), 将其溶液缓慢滴加到反应瓶中, 滴加完毕后, 室温下继续搅拌 15 h 后停止反应, 分别用 2 mol·L⁻¹ 稀盐酸、水和饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋去溶剂. 残余液在 200~300 目硅胶上柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=15:1], 得到 6.48 g 淡黄色液体 **9**^[23], 从化合物 **7** 到化合物 **9** 总收率为 28%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 4.54~4.59 (m, 1H), 3.84 (dd, J =11.2, 3.2 Hz, 1H), 3.67 (dd, J =11.2, 3.2 Hz, 1H), 2.40~2.61 (m, 2H), 2.14~2.26 (m, 2H), 0.87 (s, 9H), 0.05 (d, J =4.0 Hz, 6H).

1.3.4 (2*R*,5*S*)-5-[(叔丁基二甲基硅氧基)甲基]四氢呋喃-2-醇和(2*S*,5*S*)-5-[(叔丁基二甲基硅氧基)甲基]四氢呋喃-2-醇(**10**)的合成

取 6.48 g 化合物 **9** (28 mmol)加入 60 mL 二氯甲烷, -78 °C 下搅拌 15 min, 将 35 mL 二异丁基氢化铝 (1 mol·L⁻¹ in hexanes, 35 mmol) 缓慢滴加入反应瓶. -78 °C 下继续搅拌 2 h. 待反应完毕后, 向体系中加入 100 mL 0.1 mol·L⁻¹ 稀盐酸淬灭, 用二氯甲烷萃取 (125 mL×3), 有机相用饱和 NaHCO₃ 水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋去溶剂, 得到无色液体 (2*R*,5*S*)-5-[(叔丁基二甲基硅氧基)甲基]四氢呋喃-2-醇和 (2*S*,5*S*)-5-[(叔丁基二甲基硅氧基)甲基]四氢呋喃-2-醇两种顺反异构体^[23], 共 5.16 g, 产率 78%. ¹H NMR 表明该化合物以反式异构体为主, 含少量顺式异构体, 在硅胶板上无法分离. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.38~5.56 (m, 1H), 4.25~4.29 (m, 1H), 3.80 (dd, J =10.4, 2.8 Hz, 1H), 3.57 (dd, J =10.8, 2.8 Hz, 1H), 2.16 (s, 2H), 1.92~1.98 (m, 2H), 0.92 (s, 9H), 0.11 (s, 6H).

1.3.5 化合物 **11** 的合成

取 232 mg 化合物 **10** (1 mmol), 加入 15 mL 二氯甲烷溶解, 再依次加入 250 mg 2-溴乙醇 (2 mmol)和 50 mg Amberlyst A-15, 50 °C 回流 2 h. 待反应完毕后, 滤去 A-15, 减压蒸去溶剂, 得到淡黄色油状液体^[24]. 柱层析分离, [以 *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=100:1]为淋洗剂, 在硅胶板上两种非对映异构体可以分离, 得到反式异构体 85 mg **11a**, 顺式异构体 66 mg **11b**, 两种异构体总 151 mg, 总收率 45%.

(2*R*,5*S*)-{[5-(2-溴乙氧基)四氢呋喃-2-基]甲氧基}叔丁基二甲氧基硅烷(**11a**): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.18 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.16~4.19 (m, 1H), 3.92~3.96 (m, 1H), 3.73~3.76 (m, 1H), 3.61 (d, $J=4.4$ Hz, 2H), 3.46~3.50 (m, 2H), 1.89~2.08 (m, 3H), 1.69~1.73 (m, 1H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (d, $J=2.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 104.67, 79.02, 67.29, 65.41, 32.08, 31.10, 25.93, 25.31, 18.36, -5.26, -5.31; IR (KBr) ν : 2954, 2929, 2858, 1465, 1254, 1102, 839, 777 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{SiBrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 361.0811, found 361.0835.

(2*S*,5*S*)-{[5-(2-溴乙氧基)四氢呋喃-2-基]甲氧基}叔丁基二甲氧基硅烷(**11b**): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.13 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 4.11~4.14 (m, 1H), 3.92~3.97 (m, 1H), 3.68~3.75 (m, 2H), 3.57~3.61 (m, 1H), 3.44~3.50 (m, 2H), 1.93~2.01 (m, 3H), 1.78~1.80 (m, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.07 (s, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 104.36, 81.26, 67.21, 67.19, 32.82, 30.97, 26.24, 25.93, 18.36, -5.25, -5.28; IR (KBr) ν : 2928, 2858, 1465, 1254, 1098, 840, 777 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{SiBrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 361.0811, found 361.0836.

1.3.6 化合物 **12** 的合成

取 220 mg 化合物 **11a** (*trans*) (0.64 mmol), 加入 10 mL 四氢呋喃, 加入 1.3 mL 四丁基氟化铵溶液(1.3 mmol, 1 mol·L $^{-1}$ in THF). 室温搅拌反应 60 min. 旋去溶剂, 残余物以 200~300 目硅胶柱层析分离纯化[V (石油醚): V (乙酸乙酯)=5:1], 得 120 mg 无色油状液体(2*R*,5*S*)-[5-(2-溴乙氧基)四氢呋喃-2-基]甲醇(**12a**). 产率 83%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.19 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.20~4.26 (m, 1H), 3.93~3.96 (m, 1H), 3.69~3.76 (m, 2H), 3.44~3.52 (m, 3H), 1.95~2.06 (m, 3H), 1.64~1.68 (m, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 104.59, 78.62, 67.34, 64.78, 32.41, 30.94, 24.87; IR (KBr) ν : 3449, 2924, 1189, 1104, 1028 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{BrO}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 246.9946, found 246.9929; 同理可得顺式异构体(2*S*,5*S*)-[5-(2-溴乙氧基)四氢呋喃-2-基]甲醇(**12b**).

1.3.7 连接单元 **1b** 的合成

取 80 mg 化合物 **12b** (*cis*) (0.36 mmol), 加入 3 mL 氨水, 室温下搅拌 3 d. 旋去溶剂, 得到 56 mg 无色油状液体化合物(2*S*,5*S*)-[5-(2-溴乙氧基)四氢呋喃-2-基]甲醇(**1b**), 产率 97%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.15 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 4.26~4.32 (m, 1H), 3.99~4.02 (m, 1H), 3.74~3.81 (m, 2H), 3.55 (dd, $J=12.0, 5.2$ Hz, 1H), 3.49 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 1.92~2.07 (m, 4H); ^{13}C NMR (CDCl_3 ,

100 MHz) δ : 104.74, 81.55, 67.93, 65.61, 33.25, 30.79, 24.33; IR (KBr) ν : 3448, 2930, 1197, 1058, 1028 cm^{-1} . HRMS calcd for $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{BrO}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 246.9946, found 246.9938. 同理可得反式异构体(2*R*,5*S*)-[5-(2-溴乙氧基)四氢呋喃-2-基]甲醇.

1.4 基于 THP 的模型化合物的合成(block cooligomer)

1.4.1 2-(苄氧甲基)-6-{2-[2-(2-甲氧基乙氧基)-乙氧基]乙氧基}四氢化-2*H*-吡喃(**13**)的合成

在冰水中将 715 mg (4.35 mmol)三乙二醇单甲醚, 153 mg (0.80 mmol)对甲苯磺酸(TsOH)溶于 15 mL 二氯甲烷中, 搅拌 1 h. 将 466 mg (2.28 mmol)化合物 **3** 溶于 3 mL 二氯甲烷, 然后缓慢滴加到反应液中, 反应 1 h 后撤去冰水浴, 室温下继续反应 20 h. 旋去溶剂, 得到米色液体. 柱层析[V (石油醚): V (乙酸乙酯)=6:1, 2:1]得到 680 mg 白色固体, 产率 80.9%. ^1H NMR 谱图表明产物含有两种在硅胶板上无法分离的非对映异构体. Major Isomer (*trans*-**13a**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.35~7.30 (m, 5H), 4.89 (s, 1H), 4.56 (s, 2H), 3.99~3.92 (m, 1H), 3.86~3.80 (m, 1H), 3.71~3.40 (m, 13H), 3.36 (s, 3H), 1.95~1.81 (m, 2H), 1.75~1.55 (m, 4H). Minor Isomer (*cis*-**13b**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , distinctive peaks) δ : 3.95 (dd, $J_1=5.6, J_2=4.0$ Hz, 1H).

1.4.2 {6-[2-[2-(2-甲基乙氧基)乙氧基]乙氧基]-四氢化-2*H*-吡喃-2-基}甲醇(**14**)的合成

将 680 mg 化合物 **13** 溶于 20 mL 甲醇中, 加入 137 mg 10%钯/碳, 通入氢气, 反应液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 6 h 后过滤, 旋去溶剂得到 423 mg 淡黄色液体, 产率 77%. ^1H NMR 谱图表明产物含有两种在硅胶板上无法分离的非对映异构体. Major Isomer (*trans*-**14a**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.88 (s, 1H), 4.04~3.95 (m, 1H), 3.72~3.50 (m, 14H), 3.37 (s, 3H), 1.91~1.82 (m, 1H), 1.81~1.74 (m, 1H), 1.73~1.53 (m, 3H), 1.53~1.49 (m, 1H). Minor Isomer (*cis*-**14b**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , distinctive peaks) δ : 4.49 (dd, $J=1.6, 1.6$ Hz, 1H).

1.4.3 {6-[2-[2-(2-甲基乙氧基)乙氧基]乙氧基]-四氢化-2*H*-吡喃-2-基}甲基-4-硝基苯甲酸酯(**15**)的合成

将 278 mg (0.62 mmol)化合物 **14** 溶于 15 mL 二氯甲烷中. 在冰水中, 加入 0.1 mL 三乙胺, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 20 min. 加入 288 mg (1.55 mmol)对硝基苯甲酰氯, 反应 1 h 后撤去冰浴, 继续在常温下搅拌 8 h, 反应液用饱和碳酸氢钠溶液洗, 二氯甲烷萃取, 有机相依次用水、饱和食盐水洗、无水硫酸钠干燥, 旋去溶剂. 柱层析分离[V (石油醚): V (乙酸乙酯)=1:1]得到 200 mg 淡黄色固体, 产率 75%. ^1H NMR 谱图表明产物含有两种在硅胶板上无法分离的非对映异构体. Major Isomer (*trans*-

15a): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.30~8.19 (m, 4H), 4.89 (s, 1H), 4.54~4.48 (m, 1H), 4.37~4.28 (m, 1H), 4.18~4.10 (m, 1H), 3.87~3.50 (m, 12H), 3.35 (s, 3H), 1.99~1.84 (m, 1H), 1.81~1.70 (m, 1H), 1.70~1.50 (m, 3H), 1.50~1.40 (m, 1H). Minor Isomer (*cis*-**15-b**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , distinctive peaks) δ : 4.50 (dd, $J=2.4$, 2.0 Hz, 1H).

1.4.4 {6-[2-[2-(2-甲基乙氧基)乙氧基]乙氧基]-四氢化-2H-吡喃-2-基}甲基-4-氨基苯甲酸酯(**16**)的合成

将 400 mg 化合物 **15** 溶于 15 mL 甲醇中, 加入 55 mg 10%钯/碳催化剂, 通入氢气, 在 35 °C 下搅拌 6 h, 反应液过滤, 旋去溶剂得到 250 mg 黄色液体, 产率 66%. ^1H NMR 谱图表明产物含有两种在硅胶板上无法分离的非对映异构体. Major Isomer (*trans*-**16a**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.82 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.60 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.88 (s, 1H), 4.23~4.18 (m, 2H), 4.11~4.03 (m, 1H), 3.84~3.78 (m, 1H), 3.71~3.49 (m, 11H), 3.35 (s, 3H), 1.95~1.81 (m, 1H), 1.75~1.69 (m, 1H), 1.69~1.57 (m, 3H), 1.48~1.37 (m, 1H). Minor Isomer (*cis*-**16b**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , distinctive peaks) δ : 4.44 (dd, $J=2.0$, 1.6 Hz, 1H).

1.4.5 {6-[2-[2-(2-甲基乙氧基)乙氧基]乙氧基]-四氢化-2H-吡喃-2-基}甲基-4-(2-(叔丁基二甲基硅氧烷基)丙酰氧基)丙酰胺苯甲酸酯(**17**)的合成

将 121 mg 2-(2-(叔丁基二甲基硅氧烷基)丙酰氧基)丙酸(**2c**) (0.44 mmol)和 330 mg HATU (0.87 mmol)溶于 2 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, N_2 保护下, 在冰水浴条件下, 加入 0.1 mL *N*-甲基吗啉, 在 0 °C 下搅拌 1 h. 将 397.5 mg 化合物 **16** (0.35 mmol) 溶于 1.5 mL DMF 中加入反应液中, 撤去冰浴, 在室温下搅拌 40 h. 反应液中加入几滴盐酸, 二氯甲烷萃取, 有机相依次用水、饱和食盐水洗、无水硫酸钠干燥, 旋去溶剂得到深黄色液体 130 mg. 薄层层析[V (石油醚): V (乙酸乙酯)=1:1.5]得到 160 mg 浅黄色液体, 产率 70%. ^1H NMR 谱图表明产物含有两种在硅胶板上无法分离的非对映异构体. Major Isomer (*trans*-**17-a**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.98~7.93 (m, 2H), 7.60~7.55 (m, 2H), 5.32~5.22 (m, 1H), 4.84 (s, 1H), 4.48~4.36 (m, 2H), 4.22~4.19 (m, 1H), 4.10~4.02 (m, 1H), 3.78~3.73 (m, 1H), 3.68~3.46 (m, 11H), 3.30 (s, 3H), 1.95~1.74 (m, 1H), 1.73~1.67 (m, 1H), 1.67~1.55 (m, 3H), 1.52 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.42 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.46~1.35 (m, 1H), 0.87~0.84 (m, 9H), 0.08~0.04 (m, 6H). Minor Isomer (*cis*-**17-b**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , distinctive peaks) δ : 4.47 (dd, $J=2.0$, 2.0 Hz, 1H).

1.4.6 {6-[2-[2-(2-甲基乙氧基)乙氧基]乙氧基]-四氢化-2H-吡喃-2-基}甲基-4-(2-(2-羟基丙酰氧基)丙酰胺)苯甲酸酯(**18**)的合成

在氮气保护下, 将 80 mg 化合物 **17** (0.12 mmol)溶于 5 mL 无水四氢呋喃并加入 0.05 mL NEt_3 , 加入 0.18 mL TBAF (1 mol·L⁻¹ solution in THF, 0.18 mmol), 然后在室温条件下搅拌 1.5 h 后停止反应. 旋蒸除去溶剂, 薄层层析[V (二氯甲烷): V (乙酸乙酯)=1:1]得到 46.6 mg 浅黄色液体, 产率 70.6%. ^1H NMR 谱图表明产物含有两种在硅胶板上无法分离的非对映异构体. Major Isomer (*trans*-**18a**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.97~7.90 (m, 2H), 7.96 (s, 2H), 7.66~7.56 (m, 2H), 4.84 (s, 1H), 4.42~4.37 (m, 1H), 4.34~4.26 (m, 1H), 4.24~4.19 (m, 2H), 4.10~4.02 (m, 1H), 3.80~3.73 (m, 2H), 3.70~3.45 (m, 12H), 3.30 (s, 3H), 1.92~1.80 (m, 2H), 1.79~1.44 (m, 8H), 1.41~1.20 (m, 2H). Minor Isomer (*cis*-**18b**): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , distinctive peaks) δ : 4.45 (dd, $J=2.4$, 2.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.3, 166.1, 141.9, 130.9, 125.7, 119.0, 102.5, 73.9, 71.9, 70.6, 70.5, 68.9, 67.9, 67.1, 59.0, 30.9, 27.1, 21.6, 21.1.

1.5 基于 THF 的两亲性嵌段共聚物的合成

1.5.1 5-(羟甲基)二氢呋喃-2(3H)-酮(**19**)的合成

将 20 mL 88%的甲酸溶液和 7.7 mL 30%的双氧水加入反应瓶中, 升温至 50 °C, 然后将 5.0096 g 4-戊烯酸(50 mmol) 溶于 10 mL 88%的甲酸, 再缓慢滴加到反应瓶中(15 min 滴完), 继续在 50 °C 下搅拌 10 h 后, 反应液旋干后加入 0.35 mL 浓盐酸和 17 mL 甲醇, 在室温下搅拌 4 h, 旋除溶剂得纯品为黄色液体 5.8 g, 产率 100%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.65~4.56 (m, 1H), 3.89~3.81 (m, 1H), 3.65~3.57 (m, 1H), 2.65~2.45 (m, 2H), 2.30~2.18 (m, 1H), 2.18~2.06 (m, 1H).

1.5.2 (5-氧代四氢呋喃-2-基)甲基-4-对甲苯磺酸酯(**20**)的合成

将 6.6 g 化合物 **19** (56.9 mmol)溶于 80 mL 二氯甲烷中, 加入 10 mL 三乙胺、560 mg DMAP (4.6 mmol)和 10.86 g TsCl (56.9 mmol), 常温下搅拌 4 h, 有机相用水、饱和食盐水洗、无水硫酸钠干燥, 旋去溶剂得到棕黄色固体. 柱层析分离[V (石油醚): V (二氯甲烷)=2:1, 1:2], 得到纯产物 13.5 g, 产率 87.7%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.78 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 4.72~4.65 (m, 1H), 4.21~4.11 (m, 2H), 2.64~2.48 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.40~2.30 (m, 1H), 2.17~2.07 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 176.1, 145.5, 132.3, 130.2, 128.1, 76.5, 70.1, 28.0, 23.6, 21.8; IR (KBr) ν : 3437, 2924, 1779, 1598, 1495, 1458,

1358, 1266, 1190, 1176, 1095, 1003, 957, 860, 812, 740, 665, 569, 554 cm^{-1} .

1.5.3 5-[(4-硝基苯氧基)甲基]二氢呋喃-2(3H)-酮 (21)的合成

将 9.057 g 化合物 20 (33.5 mmol) 和 5.09 g K_2CO_3 (36.8 mmol) 加入瓶中, 称取 6.65 g 4-硝基苯酚 (47.8 mmol) 溶于 60 mL DMF 后再加入反应瓶中, N_2 保护下, 80 $^\circ\text{C}$ 反应 5 h, 二氯甲烷萃取, 有机相依次用水、饱和食盐水洗两次, 无水 NaSO_4 干燥, 旋去溶剂得黄色固体, 柱色谱分离得 7.67 g 纯品, 产率 95.8%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.13 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 4.94~4.86 (m, 1H), 4.31~4.26 (m, 1H), 4.19~4.13 (m, 1H), 2.73~2.54 (m, 2H), 2.49~2.39 (m, 1H), 2.29~2.19 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 176.9, 163.1, 142.0, 125.9, 114.6, 69.9, 28.3, 23.8; IR (KBr) ν : 3446, 2924, 1771, 1647, 1607, 1593, 1557, 1542, 1509, 1497, 1456, 1384, 1340, 1298, 1261, 1160, 1111, 1073, 983, 944, 919, 846, 751, 689, 668 cm^{-1} .

1.5.4 5-[(4-硝基苯氧基)甲基]二氢呋喃-2(3H)-醇 (22)的合成

称取 6 g 化合物 21 (25.3 mmol) 加入反应瓶中, N_2 保护下, 加入 40 mL 二氯甲烷, 冷却至 -78 $^\circ\text{C}$, 缓慢滴加 20 mL 二异丁基氢化铝 (DIBAL-H) ($1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Toluene, 30 mmol), 反应 4 h 后. 有机相依次用水、饱和食盐水洗、无水硫酸钠干燥, 旋去溶剂得到棕黄色固体 4.1 g, 产率为 67%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.21~8.16 (m, 2H), 7.01~6.95 (m, 2H), 5.65~5.55 (m, 1H), 4.67~4.60 (m, 1H), 4.16~4.13 (m, 1H), 4.10~4.00 (m, 1H), 2.32~2.03 (m, 2H), 2.02~1.76 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.7, 141.9, 126.1, 114.7, 72.9, 69.9, 62.9, 30.6, 28.9; IR (KBr) ν : 3411, 3115, 3084, 2929, 1607, 1593, 1510, 1453, 1342, 1299, 1264, 1174, 1112, 1070, 1025, 967, 890, 847, 752, 691, 650, 500 cm^{-1} .

1.5.5 化合物 23 (modified PEG₁₉₀₀)的合成

称取 686 mg 化合物 22 (2.87 mmol)、3.23 g PEG₁₉₀₀ (1.7 mmol) 和 600 mg Amberlyst A-15 溶于 60 mL 甲苯中, 在 100 $^\circ\text{C}$ 下回流 10 h 后停止反应, 反应液硅藻土过滤除去 A-15, 旋干后得到黄色固体. 柱色谱分离得到 1.6 g 较纯品, 产率 44%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.18~8.13 (m, 2H), 6.99~6.92 (m, 2H), 5.22~5.12 (m, 1H), 4.49~4.40 (m, 1H), 4.14~3.97 (m, 2H), 3.87~3.39 (m, 195H), 3.34 (s, 4H), 2.22~1.70 (m, 4H); IR (KBr) ν : 3446, 2920, 2867, 1647, 1592, 1509, 1456, 1384, 1341, 1260, 1108, 950, 850, 669 cm^{-1} .

1.5.6 化合物 24 (modified PEG₁₉₀₀)的合成

将 1.8 g 化合物 23 和 360 mg 10% Pd/C 溶于 80 mL 甲醇中, 在 35 $^\circ\text{C}$ 常压氢化、搅拌 12 h 后停止反应, 反应液过滤, 旋干得浅紫色固体 1.64 g, 产率 80%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.88~6.70 (m, 4H), 5.22~5.10 (m, 1H), 4.45~4.36 (m, 1H), 3.97~3.85 (m, 2H), 3.89~3.40 (m, 403H), 3.35 (s, 3H), 2.17~1.91 (m, 4H); IR (KBr) ν : 3446, 2954, 2859, 1647, 1509, 1456, 1384, 1348, 1246, 1100, 947, 669 cm^{-1} .

1.5.7 最终产物嵌段共聚物 25 [PLA-THF-PEG ($m=42$, $n=43$)]的合成

将 300 mg 一端连接丁二酸酐的 PLA₃₀₀₀ (0.1 mmol) 和 77 mg HATU (0.2 mmol) 溶于 15 mL DMF 中, 氮气保护下, 冰水浴中加入 0.017 mL DIPEA (0.1 mmol), 0 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 0.5 h. 将 106 mg 化合物 24 (0.05 mmol) 溶于 2 mL DMF, 然后加入反应瓶中并撤去冰浴, 在常温下继续搅拌 24 h 后停止反应, 反应液依次用水、饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 旋蒸除去溶剂得到黄色液体. 柱层析 [V (二氯甲烷): V (甲醇)=50:1, 40:1, 20:1] 得到浅黄色固体, 产率 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.55~7.36 (m, 2H), 6.86~6.66 (m, 2H), 5.35~5.26 (m, 1H), 5.22~5.05 (m, 30H), 4.45~4.38 (m, 1H), 3.99~3.86 (m, 2H), 3.84~3.40 (m, 168H), 3.35 (s, 3H), 2.77~2.50 (m, 6H), 2.21~1.80 (m, 4H), 1.61~1.40 (m, 90H); IR (KBr) ν : 3446, 2932, 2870, 1756, 1696, 1511, 1455, 1351, 1187, 1097, 952, 862 cm^{-1} .

1.6 嵌段共聚物分子量的测定

采用 GPC 测定嵌段共聚物 PLA-THF-PEG ($m=42$, $n=43$) 的分子量; 仪器: Agilent 1260 型凝胶渗透色谱仪, GPC 柱: 7.5 mm $\times$ 300 mm、10 μm 的凝胶色谱柱, 溶剂: 四氢呋喃, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 35 $^\circ\text{C}$, 标样: 聚苯乙烯.

1.7 胶束的制备及表征

1.7.1 空白胶束的制备

准确称取 10 mg 合成的嵌段共聚物, 溶于 1 mL DMSO (也可用 DMF 或 THF) 然后缓慢滴入 8 mL 搅拌的纯净水 (也可用 PBS 缓冲溶液或生理盐水) 中 (10 min/mL), 搅拌 60 min 后转入透析袋中, 用纯净水透析 48 h, 4 h 换水 1 次, 透析除去 DMSO, 即得自组装胶束.

1.7.2 胶束粒径分布的测定

共聚物胶束在水介质中的直径大小及分布采用纳米激光粒度仪 (PCS) 测定, 取 1 mL 胶束, 置入激光粒度仪测量粒径, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤. 测定温度: 25 $^\circ\text{C}$, 平衡时间为 3 min, 激光光源: He-Ne 激光, 波长为

633 nm. 实验样本数大于 3, 所有粒径测试结果均采用平均值.

1.7.3 空白胶束的稳定性试验

空白胶束稳定性实验采用纳米粒度激光粒度仪 (PCS) 测定, 取 2 mL 制备好的空白胶束于 5 mL 的离心管中, 隔一段时间测定胶束粒径的变化, 直至粒径发生明显变化, 说明胶束发生改变. 测定温度: 25 °C, 平衡时间为 3 min, 激光光源: He-Ne 激光, 波长为 633 nm.

1.7.4 最低聚集浓度或临界胶束浓度 CMC 的测定

以芘为荧光分子探针(芘溶液的荧光发射光谱有 5 个荧光峰, 分别在 373, 379, 384, 394, 480 nm 附近)测定 CMC 值, 取 10 支 10 mL 的 EP 管, 每支管中加入 100 μL $6.4 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芘/丙酮溶液, 待丙酮挥发干后, 每支管中分别加入不同浓度(浓度范围: 0.5, 0.25 mg/mL, 0.1, 0.05, 0.025, 5×10^{-3} , 1×10^{-3} , 0.25×10^{-3} , 0.05×10^{-3} , 0×10^{-3} mg/mL)的胶束溶液 2 mL, 室温下搅拌 12 h 分别测定荧光强度. 荧光扫描的激发波长为 334 nm, 激发狭缝设置为 5.0 nm, 发射狭缝设置为 2.0 nm, 扫描速度为 300 nm/min. 以胶束浓度为横坐标, 荧光强度 I_1/I_3 (I_1 对应的荧光发射波长 λ_1 为 373 nm; I_3 对应的荧光发射波长 λ_3 为 384 nm) 的比值为纵坐标作曲线图, 通过荧光强度 I_1/I_3 的比值递增的突跃点来确定最低聚集浓度 CMC.

2 结果与讨论

2.1 化学合成部分

酸敏感 THP 连接单元 **1a** 的合成路线见图 1, 从图 1 可知, 首先对(3,4-二氢-2H-吡喃-2-基)甲醇(**2**)的羟基进行保护, 2-溴乙醇在酸性条件下与之继续反应, 得 2-苯甲氧基-6-(2-溴乙氧基)四氢-2H-吡喃(**4**), 从 ^1H NMR 可知该化合物含顺反异构体, 其中反式异构体为主要产物, 并且这两个异构体在硅胶板上无法分离^[22]. 化合物 **4** 去保护基苄基之后, 在浓氨水作用下, 室温下将溴高产率地转化为氨基, 得到预期的连接单元[6-(2-氨基乙氧基)四氢-2H-吡喃-2-基]-甲醇(**1a**).

在该合成路线中, 如果将化合物 **4** 中的溴先转换为氨基, 或者直接用 2-氨基乙醇与化合物 **3** 反应, 最后再试着去掉苄基保护基, 令人意外的是该反应很难进行, 无法得到预期产物 **1a**.

酸敏感连接单元 **1b** 的合成路线见图 2, 选择 *L*-谷氨酸为起始原料, 经过 4 步文献报道的方法得到化合物 **10**^[23], 然后与 2-溴乙醇反应, 得化合物 **11**, 该化合物的两个非对映异构体在硅胶板上可以分离从而得到纯的以得到的这两个非对映异构体 **11** 实际上是两个手性化顺反异构体, 因为 5 位的构型已经由 *L*-谷氨酸确定, 所

图 1 连接单元 **1a** 的合成

Figure 1 The synthetic route of linker **1a**

合物. 如果从 *D*-谷氨酸出发, 则可以得到另外两个手性异构体, 在将该连接单元用于其它化合物生物学领域, 并且需要考虑对映异构体影响时, 就可以采用这种方法, 顺利得到构型相反的对映异构体.

图 2 连接单元 **1b** 的合成

Figure 2 The synthetic route of linker **1b**

拿到这样两个酸敏感连接单元, 我们试着将其应用于嵌段共聚物的合成, 首先合成含 THP 结构的模型化合物(model compound), 其合成路线见图 3, 在酸性条件下三聚乙二醇与化合物 **3** 反应, 然后去掉苄基保护基, 为了更好地跟踪监测反应的进行, 引进了苯环结构, 将苯环上的硝基还原为氨基之后, 与二聚乳酸反应, 得小分子的嵌段共聚物 **18**. 根据 ^1H NMR 谱图从化合物 **13** 开始, 每一步得到的产物都是在硅胶板上无法分离的顺反异构体混合物, 并且以反式为主.

作为药物运输载体, 所用的嵌段共聚物分子量不能太小, 否则形成的胶束很不稳定, 为此我们合成了分子量较大的基于 THF 结构的酸敏感嵌段共聚物, 其合成路线见图 4. 为了进一步简化反应过程, 我们从 4-戊

图3 模型化合物的合成

Figure 3 The synthetic route of model compound

烯酸出发, 经过七步反应得到预期的酸敏感两亲性嵌段共聚物. 从理论上讲, 从化合物 **23** 开始就存在顺/反式异构体, 但是在 ^1H NMR 谱图中由于高分子化合物很多峰重叠在一起, 没有观察到顺反式异构体的特征峰.

2.2 嵌段共聚物分子量测定及溶解性

为了进一步确认所合成的嵌段共聚物, 对其分子量以及分布范围进行了测定, 图 5 为凝胶渗透色谱(GPC)

曲线, GPC 测定的平均分子量以及分子量分布(PDI)如表 1 所示, 这些数据包括嵌段共聚物 PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)、反应原料 PLA₃₀₀₀ 以及中间体 **24**. 从图 5、表 1 可知, 最终产物嵌段共聚物的分子量相比原料及中间体的分子量明显增大且为单峰, 其分子量分布范围 PDI 较小. 该实验结果进一步表明所得到的嵌段共聚物的合成方法是正确的, 所用的分离纯化方法也比较合

图4 两亲性嵌段共聚物 PLA-THF-PEG 的合成

Figure 4 Synthesis of amphiphilic block copolymer PLA-THF-PEG

适,得到的产物纯度较高,分子量分布较窄.该嵌段共聚物在常规的有机溶剂中表现出了很好的溶解性,例如 THF, DMF 和 DMSO 等.另外,两亲性嵌段共聚物由于其本身特性可以在水溶液中自发聚集,形成自组装胶束.

图 5 PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)的 GPC 图

Figure 5 GPC curves of PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)

表 1 嵌段共聚物的分子量及分子量分布范围

Table 1 Molecular weight and PDI of block copolymers

Polymer ^a	M_{NMR}^a	M_n^b	M_w^b	PDI ^b
PLA ₃₀₀₀	1000	1200	3400	1.28
Intermediate 24	1900	2000	2000	1.03
Terminal 25	3600	4300	4800	1.12

^a Molecular weights determined by ¹H NMR spectroscopy; ^b Molecular weights and polydispersity determined by GPC and SM (starting material).

2.3 胶束的制备与表征

2.3.1 胶束粒径分布的测定

自组装胶束的粒径分布如图 6 所示.从图 6 可知,所制备的胶束是单分散的, PDI 较小, 分布较窄.自组装胶束的大小是一个重要的参数, $8 \text{ nm} < \text{粒径} < 200 \text{ nm}$ 的胶束对肿瘤组织有一种被动靶向作用(EPR effect)^[26].包裹抗癌药物以后,随着体内循环时间的延长而会自发地浓集于肿瘤部位.

图 6 嵌段共聚物 PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)胶束的粒径图

Figure 6 Measurement of the hydrodynamic diameter of PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$) micelles

2.3.2 空白胶束的稳定性试验

从动态光散射(DLS)实验结果(图 7)可以看出,空白胶束在常温下比较稳定,直到第 10 d 粒径分布才由单峰变成双峰.说明此时胶束已经开始解体,部分疏水片段聚集在一起,从而观察到溶液中形成了粒径较大的胶束.如果继续延长反应时间,将会形成粒径更大的胶束^[27].

图 7 嵌段共聚物 PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)胶束的稳定性

Figure 7 The stability of PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$) micelles

2.3.3 最低聚集浓度 CMC 的测定

最低聚集浓度(CMC)是胶束最重要的参数之一,从图 8 可知嵌段共聚物 PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)的最低聚集浓度为 0.0295 mg/mL ,说明胶束在生理环境下能够比较稳定地存在,是一类具有发展潜力的载药胶束.该实验结果与粒径的稳定性实验结果一致.

图 8 嵌段共聚物 PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$)胶束的 CMC

Figure 8 The CMC of PLA-THF-PEG ($m=42, n=43$) block copolymer micelle

3 结论

合成了一类基于四氢吡喃/四氢呋喃醚(THP/THF)结构且两端均为活性官能团的酸敏感连接单元,并用 ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS 和 IR 对其进行了表征.并合成了基于 THP 的模型化合物(model compound)/THF 的酸敏感两亲性嵌段共聚物(block copolymer),其结构经

^1H NMR 和 GPC 表征, 并探讨了嵌段共聚物自主装胶束的基本性质. 从实验结果可知, 所合成的酸敏感嵌段共聚物分子量分布较窄, GPC 测定的分子量与核磁共振测定的结果比较一致, 自组装胶束大小合适、分布较窄, 在常温下比较稳定. 因此基于四氢吡喃/四氢呋喃醚结构的嵌段共聚物自组装胶束具有较好的作为药物运输载体的研究价值.

References

- [1] Murthy, N.; Thng, Y. X.; Schuck, S. M.; Xu, C. J.; Fréchet, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12398.
- [2] Barton, V.; S. Ward, A.; Chadwick, J.; Hill, A.; O'Neill, P. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4555.
- [3] Olson, E. S.; Jiang, T.; Aguilera, T. A.; Nguyen, Q. T.; Ellies, L. G.; Scadeng, M.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4311.
- [4] Louie, A. Y.; Hüber, M. M.; Ahrens, E. T.; Rothbächer, U.; Moats, R.; Jacobs, R. E.; Fraser, S. E.; Meade, T. J. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 321.
- [5] Knapp, D. C.; Serva, S.; D'Onofrio, J.; Keller, A.; Lubys, A.; Kurg, A.; Remm, M.; Engels, J. W. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2903.
- [6] Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991.
- [7] Cai, X. B.; Hu, W.; Lu, W. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 2520 (in Chinese).
(蔡晓冰, 胡薇, 陆国林, 有机化学, **2013**, *33*, 2520.)
- [8] Zhang, Q.; Re Ko, N.; Kwon Oh, J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7542.
- [9] Xi, C. B.; Yang, D.; Li, J.; Yan, J. J.; Hu, J. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 2166 (in Chinese).
(席陈彬, 杨东, 李静, 晏建军, 胡建华, 有机化学, **2012**, *32*, 2166.)
- [10] DiLauro, A. M.; Abbaspourrad, A.; Weitz, D. A.; Phillips, S. T. *Macromolecules* **2013**, *46*, 3309.
- [11] Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373.
- [12] Stubbs, M.; McSheehy, P. M. J.; Griffiths, J. R.; Bashford, C. L. *Mol. Med. Today* **2000**, *6*, 15.
- [13] Huang, X. *Macromolecules* **2009**, *42*, 783.
- [14] Zhou, L.; Yu, L.; Ding, M.; Li, J.; Tan, H.; Wang, Z.; Fu, Q. *Macromolecules* **2011**, *44*, 857.
- [15] Jackson, A. W.; Stakes, C.; Fulton, D. A. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2500.
- [16] Prabakaran, M.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5757.
- [17] Jin, Y.; Song, L.; Su, Y.; Zhu, L. J.; Pang, Y.; Qiu, F.; Tong, G. S.; Yan, D. Y.; Zhu, B. S.; Zhu, X. Y. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3460.
- [18] Tanaka, H.; Ishida, T.; Matoba, N.; Tsukamoto, H.; Yamada, H.; Takahashi, T. *Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6349.
- [19] Klaiherd, A.; Nagamani, C.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4830.
- [20] Gillies, E. R.; Goodwin, A. P.; Fréchet, J. M. J. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1254.
- [21] Carceller, E.; Merlos, M.; Giral, M.; Bartroli, J.; Garcia-Rafanell, J.; Forn, J. J. *Med. Chem.* **1992**, *35*, 676.
- [22] Beaver, M. G.; Woerpel, K. A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1107.
- [23] (a) Cai, X.; Chorghade, M. S.; Fura, A.; Grewal, G. S.; Jauregui, K. A.; Lounsbury, H. A.; Scannell, R. T.; Yeh, C. G.; Young, M. A.; Yu, S. *Org. Process Res. Dev.* **1999**, *3*, 73.
(b) Pilli, R. A.; Victor, M. M.; de Meijere, A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5910.
(c) Shiro, Y.; Kato, K.; Fujii, M.; Ida, Y.; Akita, H. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8687.
(d) Hamamoto, H.; Suzuki, Y.; Takahashi, H.; Ikegami, S. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2685.
(e) Montagnat, O. D.; Lessene, G.; Hughes, A. B. *J. Org. Chem.* **2009**, *75*, 390.
- [24] Dixon, D. J.; Ley, S. V.; Reynolds, D. J. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1621.
- [25] Nguyen-Ba, N.; Quimpere, M.; Kong, L. C. C.; Brown, W. L.; Dionne, G. *US 5789394*, **1998** [*Chem. Abstr.* **1998**, *129*, 161816].
- [26] Chow, E. K.-H.; Ho, D. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*(216), 216rv4; Schmalenberg, K. E.; Frauchiger, L.; Nikkhoy-Albers, L.; Uhrich, K. E. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 851.
- [27] Wang, D. L.; Su, Y.; Zhu, B. S.; Pang, Y.; Zhu, L. J.; Liu, J. Y.; Tu, C. L.; Yan, D. Y.; Zhu, X. Y. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1370.

(Li, L.; Fan, Y.)