

TỔNG HỢP DENDRIME POLYAMIDOAMIN LAI HÓA VỚI POLYETYLEN GLYCOL

Nguyễn Cửu Khoa¹, Lý Tú Uyên¹, Đỗ Như Quỳnh²

¹Phòng Công nghệ Hóa Hữu cơ polyme – Viện Công nghệ Hóa học

²Trường Đại học Cần Thơ

Đến Tòa soạn 24-11-2010

Abstract

PEGylated polyamidoamine dendrimer was designed as a novel drug carrier which possessed an interior for encapsulation of drugs and a biocompatible surface. This paper describes the synthesis of PEGylated polyamidoamine dendrimer, in which monomethoxy polyethylene glycol (MPEG) with the average molecular weight of 5000D was attached to the surface groups of polyamidoamine (PAMAM) dendrimer of the second and third generations. The structures of these products were confirmed by FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and Gel Permeation Chromatography (GPC).

1. MỞ ĐẦU

Dendrime là một polyme có dạng hình cầu, cấu trúc nhánh, bên trong có nhiều hốc lỗ, nên được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt làm chất mang thuốc trong ngành y dược [2]. Khả năng mang thuốc của dendrime đã được biết đến từ những năm 80. Những phân tử thuốc có thể kết hợp với dendrime qua liên kết hóa trị hay liên kết không hóa trị [3]. Một số dendrime với nhóm NH₂ bên ngoài có khả năng mang thuốc rất tốt nhưng có hoạt tính độc khá cao và thời gian lưu trong máu khá ngắn [4].

Việc thay thế nguyên tử hydrogen của nhóm NH₂ ở bề mặt PAMAM bằng polyetylen glycol (PEG) sẽ khắc phục được những nhược điểm trên của PAMAM. Ngoài ra PEG hóa dendrime còn làm tăng khả năng hòa tan thuốc, tăng sự tương hợp sinh học, tăng khoảng trống bên trong của dendrime. Điều này giúp hạn chế được sự phá hủy hồng cầu, kiểm soát được sự giải phóng thuốc và kéo dài thời gian bán thải của thuốc [4].

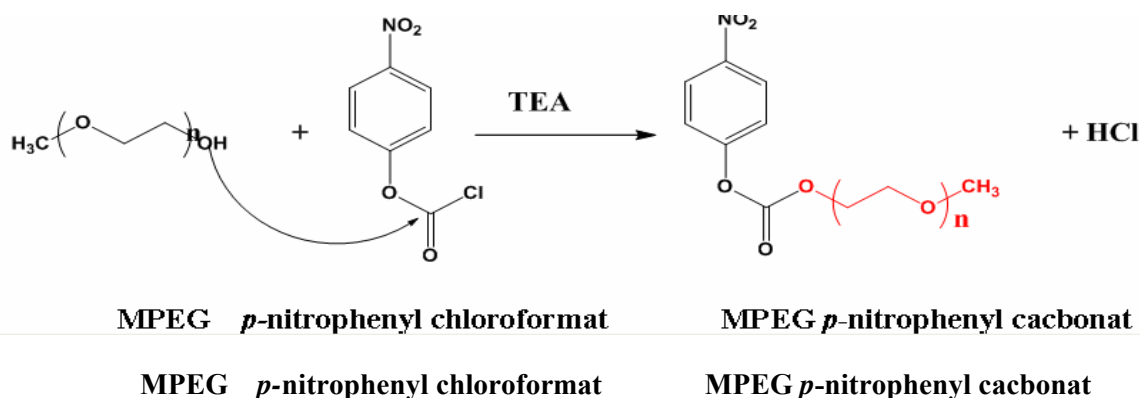
Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày quá trình tổng hợp hợp chất trung gian monomethoxy polyetylen glycol (MPEG) *p*-nitrophenyl cacbonat và tổng hợp dendrime polyamidoamin lai hóa với monomethoxy polyetylen glycol (MPEG-PAMAM). Cấu trúc của các sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phân tích hiện đại như NMR, FT-IR và sắc ký gel GPC. Kết quả này sẽ là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm sử dụng PAMAM lai hóa MPEG làm chất mang thuốc chống ung thư.

2. THỰC NGHIỆM

Monomethoxy polyetylen glycol (MPEG) (khối lượng phân tử 5000D), *p*-nitrophenyl chloroformat (NPC), triethylamine (TEA) được mua từ Công ty Sigma-Aldrich và Acros. Túi thẩm tách Por 7 Regenerated Cellulose Membrane, MWCO 10.000D được mua từ Spectrum Laboratories. PAMAM thế hệ G2.0 và G3.0 được tổng hợp theo quy trình trong tài liệu [1]. Các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích. Phổ FT-IR được đo trên máy Vector 22 Bruker. Phổ NMR được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR. Sắc ký gel được tiến hành trên máy Agilent 1100-GPC, tốc độ dòng 1 ml/phút, cột Ultrahydrogel. Phân tích nhiệt TGA và DSC được tiến hành trên máy DTG-60, Shimadzu.

2.1. Tổng hợp MPEG *p*-nitrophenyl cacbonat (MPEG-NPC)

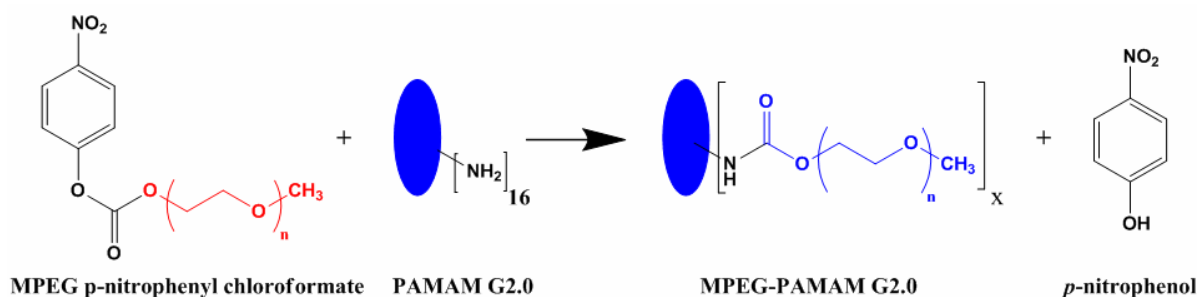
Hòa tan 2,00 g (0,40 mmol) MPEG trong 20 ml dichlorometan và 60 μl TEA trong bình cầu. Khuấy đều hỗn hợp trên trong 30 phút. Sau đó cho 0,16 g (0,79 mmol) NPC rắn vào hỗn hợp trên. Giữ lạnh và khuấy đều hỗn hợp 12 giờ trong môi trường khí nitrogen. Cất đuổi dung môi CH₂Cl₂, thu được chất rắn màu vàng nhạt. Hòa tan chất rắn trong 10 ml tetrahydrofuran và lọc bỏ phần cặn trắng. Đem nước lọc thu được kết tủa trong dietyl ete, lọc hút chân không để thu lấy kết tủa, rửa kết tủa nhiều lần với dietyl ete đến khi kết tủa trắng hoàn toàn. Sau đó sấy khô sản phẩm trong chân không.

Hình 2: Sơ đồ phản ứng tổng hợp MPEG *p*-nitrophenyl carbonate

2.2. Tổng hợp PAMAM thế hệ G2.0 lai hóa với PEG

Hòa tan 0,0876 g (0,0269 mmol) PAMAM G2.0 trong 10 ml dimethylformamid (DMF) trong bình cầu. Sau đó cho 2,78 g (0,538 mmol) MPEG *p*-nitrophenyl carbonate rắn vào hỗn hợp trên. Khuấy đều hỗn hợp 12 ngày trong môi trường khí nitrogen.

Dung dịch sau phản ứng được kết tủa trong diethylene, lọc hút chân không để thu lấy kết tủa. Sấy khô kết tủa trong chân không. Hòa tan kết tủa trong 10 ml nước cất, rồi cho vào túi thẩm tách MWCO 10000D, thẩm tách trong 1000 ml nước để loại bỏ những tạp chất có trọng lượng phân tử dưới 10000D. Đông cô dung dịch sau thẩm thu được chất bột rắn màu trắng.

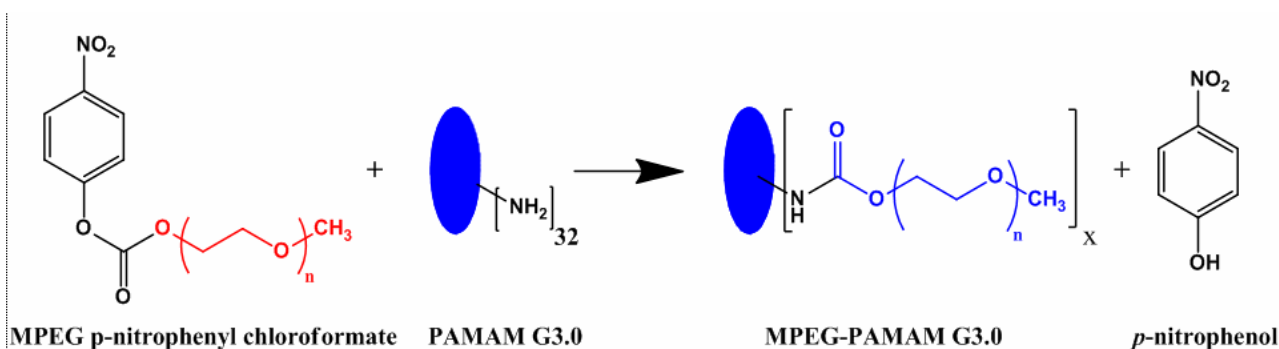


Hình 3: Sơ đồ phản ứng tổng hợp MPEG-PAMAM G2.0

2.3. Tổng hợp PAMAM thế hệ G3.0 lai hóa với PEG

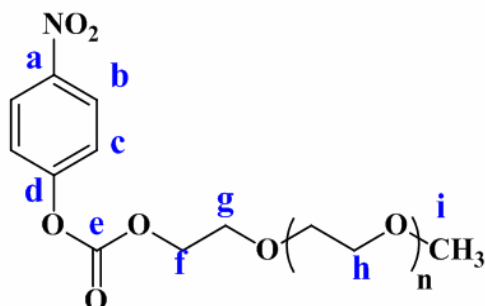
Hòa tan 0,173 g (0,0251 mmol) PAMAM G3.0 trong 10 ml dung dịch DMF trong bình cầu. Sau đó cho 5,18 g (1,00 mmol) MPEG *p*-nitrophenyl carbonate rắn vào hỗn hợp trên. Khuấy đều hỗn hợp 26 ngày trong môi trường khí nitrogen. Dung dịch

sau phản ứng được kết tủa trong diethylene, lọc hút chân không để thu lấy kết tủa. Sấy khô kết tủa trong chân không. Hòa tan kết tủa trong 10 ml nước cất, rồi cho vào túi thẩm tách MWCO 10000D, thẩm tách trong 1000 ml nước để loại bỏ những tạp chất có trọng lượng phân tử dưới 10000D. Đông cô dung dịch sau thẩm thu được chất bột rắn màu trắng.



Hình 4: Sơ đồ phản ứng tổng hợp MPEG-PAMAM G3.0

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tổng hợp MPEG *p*-nitrophenyl cacbonat (MPEG-NPC)

FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1769 (C=O); 1113 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 8,28, d, (b); 7,39, d (c); 4,44, m (f); 3,81, m (g); 3,65, m (h); 3,38, s (i). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 145,38 (a); 121,79 (b); 125,29 (c); 152,46 (d); 155,51 (e); 68,30 - 71,94 (f, g, h); 59,01 (i).

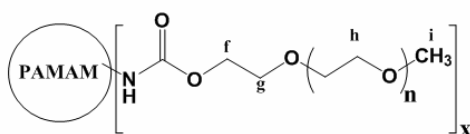
Trước khi lai hóa, nhóm hydroxyl cuối mạch

MPEG cần được hoạt hóa với tác nhân *p*-nitrophenyl chloroformat. Đây là một phương pháp rất phổ biến trong tổng hợp vật liệu sinh học nhằm chuyển nhóm hydroxyl thành nhóm *p*-nitrophenyl cacbonat có độ phản ứng cao, dễ dàng tác dụng với các nhóm amin trên bề mặt của PAMAM. Khi kết hợp nhóm *p*-nitrophenyl cacbonat vào cuối mạch polyetylen glycol sẽ làm dịch chuyển tín hiệu của proton H_f của nhóm metylen cuối mạch từ vị trí 3,65 ppm đến vùng từ trường thấp hơn 4,44 ppm, và đồng thời làm xuất hiện thêm các tín hiệu của proton H_b và H_c của nhân phenyl. Dựa trên tỉ số tích phân giữa tín hiệu H_b và H_c của nhân phenyl và tín hiệu H_i của nhóm metoxy cuối mạch MPEG, ta có thể tính được độ chuyển hóa của phản ứng là khoảng 92% (bảng 1). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả phân tích nhiệt của sản phẩm thu được (bảng 2). So với tác chất MPEG ban đầu, sản phẩm thu được có nhiệt độ nóng chảy thấp hơn khoảng 3 - 4°C, phân hủy ở khoảng nhiệt độ tương đối cao hơn (300 - 462°C). Đường cong TGA của sản phẩm chỉ có một bước giảm khối lượng ứng với 98,21%, cho thấy sự tinh khiết của mẫu phân tích.

Kết quả TGA và DSC của MPEG-NPC

STT	Mẫu	Nhiệt độ nóng chảy T_m , °C	% khối lượng giảm, %	Khoảng nhiệt độ phân hủy, °C
1	MPEG	61,25	99,08	225 - 450
2	MPEG- NPC	57,82	98,21	300 - 462

3.2. Tổng hợp PAMAM thế hệ G2.0 và 3.0 lai hóa MPEG



MPEG-PAMAM G2.0: FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1709 (-O-C=O-N), 1654 (C=O), 1112 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 4,19, m (f); 3,77, m (g); 3,65 m (h); 3,38, s (i); 3,29, 2,71, 2,49, 2,35 (PAMAM).

GPC ($M_n = 21.964$, $M_w = 29.567$, $D = 1,35$), dựa vào khối lượng phân tử của PAMAM G2.0 là 3252D và MPEG-NPC là 5165D, tính toán đã gắn được 5 nhóm MPEG vào các nhóm NH_2 của PAMAM.

MPEG-PAMAM G3.0: FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1707 (-O-C=O-N); 1655 (C=O) 1111 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 4,18, m (f); 3,79, m (g); 3,65 m (h); 3,38; s (i); 3,12; 2,71; 2,35 (PAMAM).

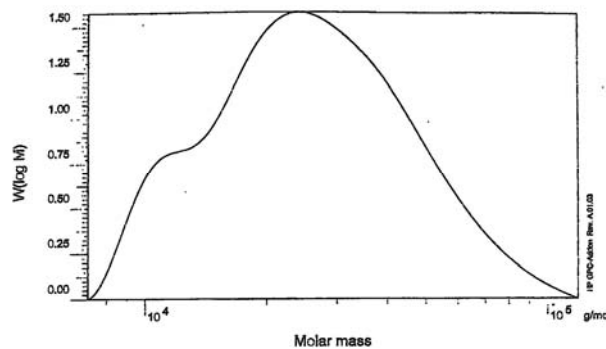
GPC ($M_n = 39.044$, $M_w = 57.807$, $D = 1,40$), dựa vào khối lượng phân tử của PAMAM G3.0 là 6900D và MPEG-NPC là 5165D, tính toán đã gắn được 10 nhóm MPEG vào các nhóm NH_2 của PAMAM.

Đối với các vật liệu sinh học cũng như thuốc điều trị bệnh, trước khi được đưa vào cơ thể sinh vật thường được lai hóa với PEG. Sự kết hợp với các chuỗi polyetylen glycol ái nước, trung hòa về điện tích và có khối lượng phân tử lớn nhằm làm tăng độ hòa tan, giảm sự tấn công của hệ thống miễn dịch và kéo dài thời gian lưu của vật liệu hay thuốc trong tuần hoàn máu, từ đó làm tăng hiệu quả điều trị.

Trong nghiên cứu này, sau khi hoạt hóa, các chuỗi MPEG mang nhóm *p*-nitrophenyl cacbonat cuối mạch sẽ dễ dàng phản ứng với các nhóm amin bậc một trên bề mặt của PAMAM, dẫn đến hình thành liên kết cacbamat, giải phóng phân tử *p*-nitrophenol (hình 3 và 4). Điều này một lần nữa làm dịch chuyển tín hiệu của proton H_f ngay sau vị trí liên kết từ 4,44 ppm về vùng từ trường cao hơn 4,19 - 4,18 ppm. Đồng thời với sự dịch chuyển tín hiệu H_f là sự biến mất các tín hiệu của proton nhân thơm và sự xuất hiện các tín hiệu của PAMAM trong khoảng 2,35 - 3,30 ppm trên phổ sản phẩm thu được. Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp thẩm tách MWCO 10.000D, các tác chất dư thừa và tạp chất có khối lượng phân tử nhỏ hơn 10.000D được loại bỏ, thu được sản phẩm lai hóa tinh khiết.

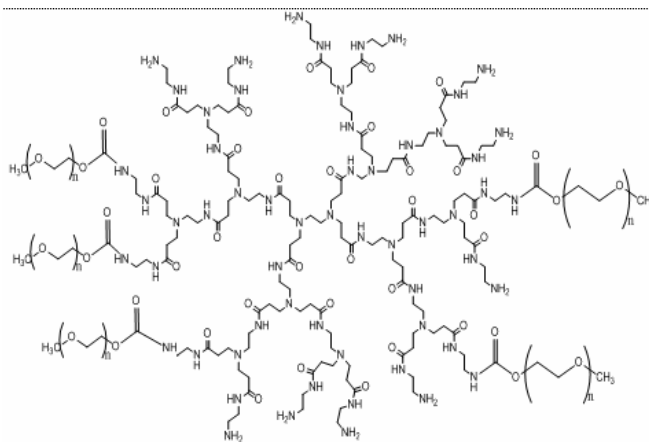
Mức độ PEG hóa được tính toán từ giá trị khối lượng phân tử của sản phẩm xác định bằng phương pháp GPC, khối lượng phân tử của MPEG-NPC 5.165D, PAMAM G2.0 (MW 3.252D) và G3.0

(MW 6.900D) ban đầu. Kết quả cho thấy tỉ lệ lai hóa đạt được lần lượt là 5/16 nhóm amin và 10/32 nhóm amine cho sản phẩm MPEG-PAMAM G2.0 và G3.0.

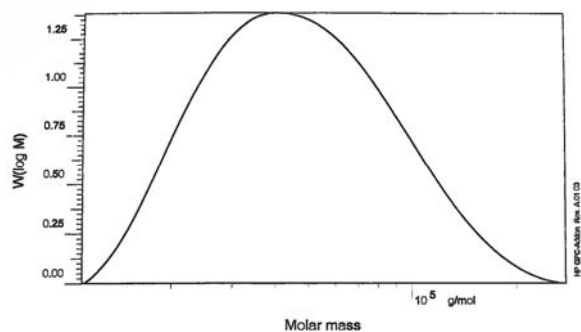


(a)

Hình 4: Phổ GPC (a) và công thức (b) của MPEG-PAMAM G2.0

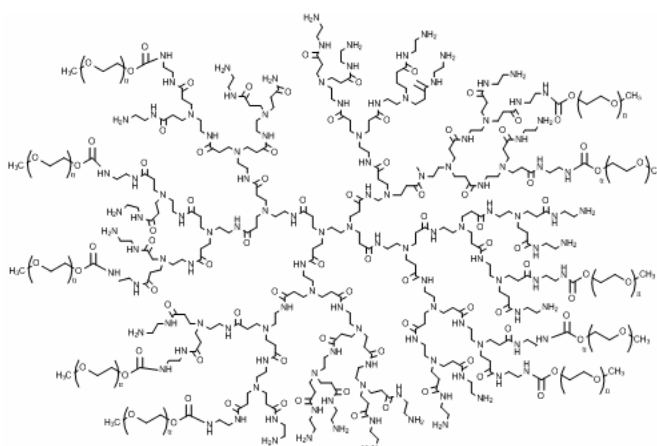


(b)



(a)

Hình 5: Phổ GPC (a) và công thức (b) của MPEG-PAMAM G3.0



(b)

4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả phân tích trên cho thấy đã tổng hợp được PAMAM thế hệ G2.0 và G3.0 lai hóa PEG. Cấu trúc của các sản phẩm được xác định bởi các phổ FT-IR, ¹H-NMR và ¹³C-NMR. Kết quả đo GPC của thế hệ 2 và 3 sau khi sử dụng màng thẩm tách cho thấy độ lai hoá PEG tương ứng là 5 và 10 đơn vị PEG. Thành công từ nghiên cứu này có thể cho phép các nghiên cứu ứng dụng sản phẩm làm chất mang thuốc có tương hợp sinh học cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Cửu Khoa, Hoàng Thị Kim Dung, Nguyễn Công Trục. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, T. 47(4A), 166 - 171 (2008).
2. Jean M. J. Frechet, Donald. A. Tomalia. Dendrimer and other Dendritic polymers, 239 - 356, John Wiley and Sons Ltd., London (2001).
3. U. Boas, J. B. Christensen, P. M. H. Heegaard. Dendrimer in Medicine and biotechnology New Molecular Tools, 62-85, The Royal Society of Chemistry (2006).
4. Vinu Krishnan. Design and synthesis of nanoparticle "paint-brush" like multi-hydroxyl capped poly (ethylene glycol) conjugate for cancer nanotherapy, The University of Akron (2008).
5. D. Bhadra, S. Bhadra, S. Jain, N. K. Jain. International Journal of Pharmaceutics, **257**, 111 - 124 (2003).
6. Kenji Kono, Chie Kojima, Nobuyuki Hayashi, Eiko Nishisaka, Katsuyuki Kiura, Shinobu Watarai, Atsushi Harada, Bionaterials, **29**, 1664 - 1675 (2008).
7. Rong Qi, Yu Gao, Yin Tang, Rui-Rui He, Tao-Le Liu, Yun He, Sheng Sun, Bo-Yu Li, Yang-Bing Li, George Liu. The AAPS journal, **11**, 395 - 405 (2009).
8. Shuhua Bai, Fakhru Ahsan. Pharmaceutical research, **26**, 539 - 548 (2008).
9. Chie Kojima, Kenji Kono, Kazuo Maruyama, Toru Takagishi. Bioconjugate Chem., **11**, 910 - 917 (2000).

