

·快报·

结肠酶特异响应性两亲高分子载体的合成和表征^{*}

方 瑞¹ 赖俊英² 王红军¹ 蒋宏亮¹ 涂克华^{1**} 王利群^{1**}

(¹ 浙江大学高分子科学与工程学系 高分子合成与功能构造教育部重点实验室 杭州 310027)

(² 浙江大学建筑工程学院 杭州 310058)

摘 要 合成了一种可在结肠部位被特异酶解的两亲性嵌段高分子,由聚丙交酯(PLA)疏水嵌段和聚乙二醇(PEG)亲水嵌段组成,两者通过5,5'-偶氮二水杨酸(OLZ)偶联,其中的偶氮键可被结肠部位的偶氮还原酶特异酶解.利用FTIR、NMR和GPC等方法表征了共聚物的结构,并通过透射电镜(TEM)和动态光散射(DLS)等方法研究了该高分子载体在水溶液中的组装行为.结果表明 MPEG-OLZ-*b*-PLA 可在水介质中形成尺寸在30 nm左右的球形胶束,并在大鼠全盲肠提取液中被特异性酶解.

关键词 结肠靶向, 奥沙拉素, 聚乙二醇, 聚丙交酯, 两亲嵌段聚合物

由于胃肠道的生理屏障效应,通常生物活性大分子药物口服生物利用度较低.要使得活性大分子药物被有效吸收,必须通过两道生物屏障:肠道表面的亲水性黏膜层和上皮细胞表面的疏水脂层^[1,2].理想的大分子药物口服传输载体必须具备两种功能,既能与亲水黏膜层有很好的亲和性,从而提高在肠道的停留时间,又能穿越上皮细胞的疏水层,进入血液循环系统^[3].我们设想制备一种高分子药物载体,表面覆盖亲水层,具有良好的黏膜黏附性;在到达特定部位时,脱去表面亲水层变为疏水粒子,有利于穿越上皮细胞脂层.经由这种转变,高分子药物载体就可以克服两种生物屏障,将活性药物分子通过胃肠道传输至血液系统,提高药物分子的生物利用度.

在之前的工作中^[4],我们研究了亲水性高分子 PEG-OLZ 的合成和降解特性,发现该聚合物在大鼠全盲肠提取液中呈现了特异的降解行为.然而 PEG-OLZ 缩聚物仅有亲水性,不具备克服两道生物屏障的性能,同时,该聚合物很难作为生物活性大分子药物的载体.在本研究中,设计了一种新型两亲嵌段共聚物,利用 OLZ 将 PEG 亲水嵌段和 PLA 疏水嵌段连接起来,形成同样可以在结肠中被特异性酶解的高分子载体.与 PEG-OLZ 相比, MPEG-OLZ-*b*-PLA 两亲嵌段共聚物可通过自组装在水中形成胶束,并将大分子药物包载在胶束内;当胶束口服后到达结肠部位,在偶氮还原酶的作用

下,脱去亲水性外壳,变成疏水性纳米粒子,携带药物穿越肠壁到达血液系统,从而具有穿越亲水和疏水性生物屏障的能力.

本文报道了这种新型酶响应两亲嵌段共聚物的合成(示意图1)、胶束化行为以及生物降解性能.

1 MPEG-OLZ-*b*-PLA 两亲嵌段聚合物的合成

根据文献[4~6]合成5,5'-偶氮二水杨酸乙二醇酯(I)、端羧基聚乙二醇(MPEG-COOH, II)、端羧基聚丙交酯(PLA-COOH, III)和 MPEG-OLZ 偶氮聚合物(IV).

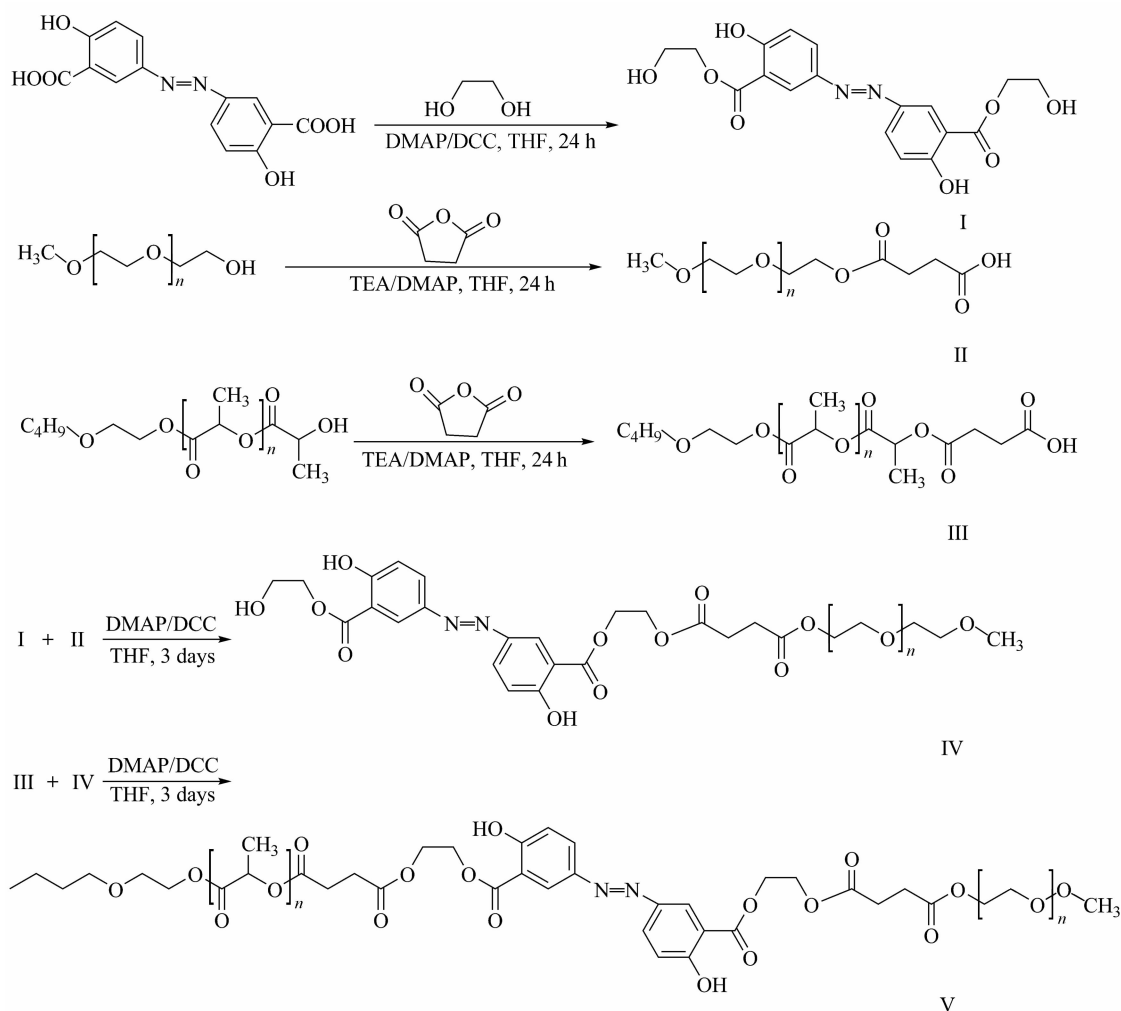
将0.001 mol MPEG-OLZ(IV)与0.001 mol PLA-COOH 溶解在无水 THF 中,加入0.0002 mol 4-二甲氨基吡啶(DMAP).室温下搅拌滴加 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)的 THF 溶液.氮气保护下室温搅拌反应3天.反应结束后过滤除去固体 *N,N'*-二环己基脲(DCU),滤液经过二次沉淀,透析.透析液冷冻干燥,得到粉末状 MPEG-OLZ-*b*-PLA 共聚物.

2 偶氮嵌段共聚物的胶束化行为及其表征

将一定量的偶氮共聚物 MPEG-OLZ-*b*-PLA 加入到 THF 溶液中,使其完全溶解.然后在剧烈搅拌下,将适量的二次蒸馏水以1滴/10min的滴加速度,加入到嵌段共聚物的 THF 溶液中.滴加二次蒸馏水持续到体系变浑浊.随后将溶液移入透析袋(MWCO 3500)中,在二次蒸馏水中4℃下透

* 2010-02-23 收稿,2010-03-23 修稿;国家自然科学基金(基金号 20674069)资助项目;** 通讯联系人,E-mail:tukh@zju.edu.cn;

lqwang@zju.edu.cn

Scheme 1 Synthetic route of MPEG-OLZ-*b*-PLA

析 72 h, 前 12 h 每隔 3 h 换水 1 次, 后 60 h 每隔 6 h 换水 1 次. 用于荧光测试临界胶束浓度的胶束溶液起始浓度约为 0.56 g/L, 用于透射电镜观察和动态光散射测试的胶束浓度约为 0.1 g/L. 利用荧光光谱测定胶束的临界胶束浓度 (CMC)^[7]; 透射电镜 (TEM) 观察胶束的形貌; 动态光散射 (DLS) 测定胶束的粒径及其分布.

3 偶氮嵌段共聚物的体外降解及表征

根据文献[8,9]的方法, 提取大鼠盲肠液中的偶氮还原酶. 取出冷冻的酶液解冻, 加入 α -D-葡萄糖、苜蓿紫精及偶氮嵌段共聚物溶液. 酶解实验的溶液中各物质的浓度分别为全细胞盲肠酶液浓度为 0.025 g/mL, 偶氮浓度为 1×10^{-5} mol/L, 苜蓿紫精浓度为 6.25×10^{-5} mol/L, α -D-葡萄糖为 1.25 g/L. 溶液通入氮气, 在预设定的时间点, 在氮气保护下取出降解液, 利用紫外光谱仪, 测定 361 nm 处偶氮吸光度的变化.

4 讨论

4.1 MPEG-OLZ-*b*-PLA 的表征 以 OLZ, PEG 和 PLA 为起始反应物, 通过端基改性和偶联合成得到 MPEG-OLZ-*b*-PLA 嵌段共聚物 (示意图 1). 在合成 MPEG-OLZ (IV) 中, 由于 5,5'-偶氮二水杨酸乙二醇酯结构对称, 两侧醇羟基与端羧基聚乙二醇反应概率相同, 尽管反应采用了过量法, 但最终仍会形成两种高分子. 一种是 MPEG-OLZ, 为目标产物, 产物仍留有一个未反应的醇羟基, 可以继续与端羧基聚丙交酯反应; 另一种是 MPEG-OLZ-MPEG 大分子. 由于这两种产物的溶解性相似, 无法用简单的方法分离, 此步不做进一步的处理. 以混合物为反应物, 继续与 PLA-COOH 反应; 提纯过程中, 由于 MPEG-OLZ-MPEG 溶于甲醇, 可方便地除去, 而未反应的 PLA-COOH 可通过透析的方法除去, 从而得到 MPEG-OLZ-*b*-PLA.

图 1 是 MPEG-OLZ-*b*-PLA 的核磁谱图. 反应

所用的 PEG 分子量为 2000,PLA 分子量为 5000,对 H^1 和 H^2 的积分面积计算得知,PLA 与 PEG 的聚合度约比为 1.8,通过 PEG 的分子量计算可得 PLA 的分子量在 5800 左右,与所用的原料 PLA 分子量

基本吻合,说明透析法可以除去大部分未反应的 PLA,得到纯净的 MPEG-OLZ-*b*-PLA 共聚物. GPC 结果也表明了 MPEG-OLZ-*b*-PLA 共聚物不含杂质,其 M_n 为 8600,分子量分布指数为 1.21.

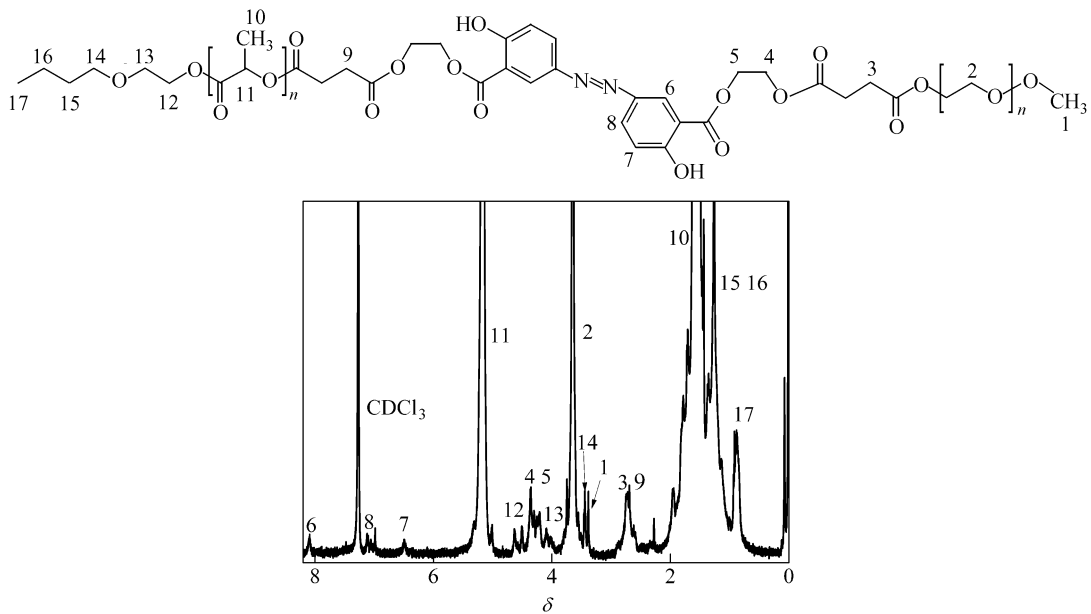


Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of MPEG-OLZ-*b*-PLA copolymer in CDCl_3

4.2 偶氮嵌段共聚物的胶束化行为 利用荧光探针技术对共聚物在水溶液中的临界胶束浓度进行了测定. 当浓度到达临界胶束浓度时,水溶液中的两亲嵌段共聚物开始产生胶束,此时荧光探针芘会在胶束内核聚集. 从荧光光谱上可以观察到明显的胶束化行为. 绘制荧光强度比值 (I_{339}/I_{335}) 与共聚物浓度关系曲线,以低浓度水平曲线的切线与曲线急剧转折处切线的交叉点所对应的浓度为临界胶束浓度. 结果表明,临界胶束浓度为 $2.69 \times 10^{-3} \text{ g/L}$,与常规 PEG-*b*-PLA 胶束的 CMC 相似^[10,11],说明引入 OLZ 后不会降低 PEG-PLA 共聚物的热力学稳定性.

图 2 为 MPEG-OLZ-*b*-PLA 胶束的 TEM 照片. 可以看到该嵌段共聚物在水介质中形成球形胶束,且粒子尺寸分布均匀.

利用动态光散射技术(DLS)可以定量地测定胶束的直径和尺寸分布. 由动态光散射的结果(图 3)可以得知,MPEG-OLZ-*b*-PLA 共聚物能够形成直径在 38 nm 左右的胶束,并且粒径分布较窄,与 TEM 观察所得的结果基本一致.

4.3 偶氮嵌段共聚物的降解行为 图 4 为 MPEG-OLZ-*b*-PLA 与 OLZ 的降解曲线,随着降解

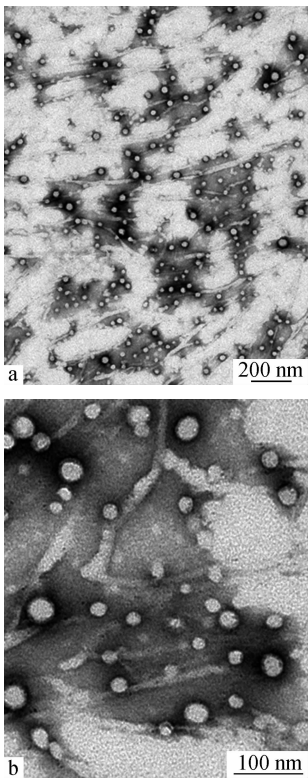


Fig. 2 Transmission electron micrograph of MPEG-OLZ-*b*-PLA micelles
a) Scale bar is 200 nm; b) Scale bar is 100 nm

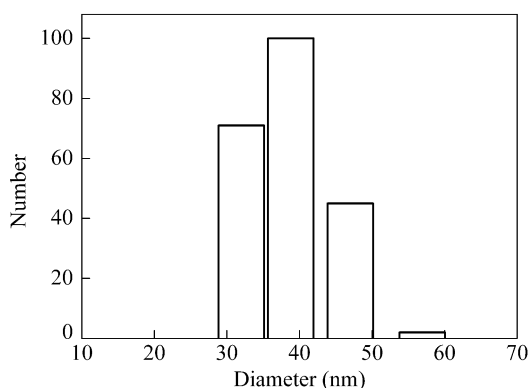


Fig. 3 Diameter of MPEG-OLZ-*b*-PLA micelles

的进行,可在紫外光谱中观察到位于 361 nm 处的特征吸收峰最大吸收波长没有发生明显移动,而吸收值逐渐下降,直到完全消失.降解介质中未添加酶液时,MPEG-OLZ-*b*-PLA 中偶氮含量没有明显地减少(图 4a),可见在没有偶氮还原酶,共聚物中的偶氮键保持稳定,共聚物几乎不能降解.当降解介质为全盲肠提取液时,MPEG-OLZ-*b*-PLA 偶氮共聚物的降解曲线存在两个平台期,之后偶氮含量迅速下降(图 4b).其中,前 11 h 的第一平台期是全酶液培养期,这是由于刚加入到体系中的酶液需要一定时间培养才有足够的酶活性,这个阶段体系中的偶氮还原酶含量很少,偶氮共聚物几乎不能被降解,表现为降解曲线几乎与未加酶液的曲线相持平.培养期后,偶氮共聚物被迅速酶解少部分,约为 20%,之后降解曲线又出现了第二个平台.由于胶束水溶液存在着胶束与单分子链动态平衡,该时期的降解可能是主要是未形成胶束的共聚物单分子链的酶解反应.同时,由于 OLZ 具有一定的疏水性,位于胶束疏水内核表面或被包埋入疏水内核,而偶氮还原酶需要一定时间才能进入胶束内部,这也会导致第二个平台期的出现.在第二平台期之后偶氮键降解迅速,直到约 30 h 后,酶解反应趋于平缓.曲线(c)是 OLZ

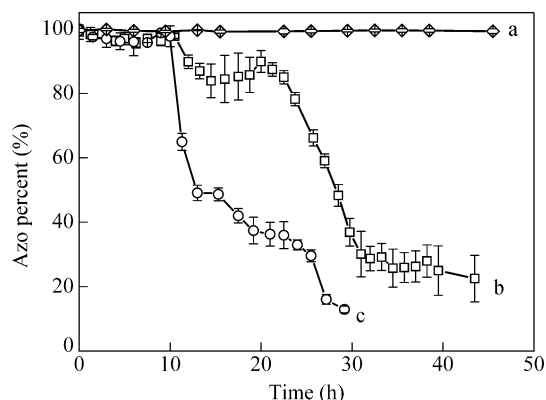


Fig. 4 Diminishing behavior of azo bonds in the MPEG-OLZ-*b*-PLA micelles in pH 6.8 PBS solution in present of benzyl viologen and α -D-glucose as the control group (a); in rat cecum contents in the present of benzyl viologen and α -D-glucose (b); OLZ in rat cecum contents in the present of benzyl viologen and α -D-glucose (c)

小分子在相同条件下的降解曲线,可以看出,由于偶氮还原酶很容易接近 OLZ 的偶氮键,因此偶氮含量很快降低.以上结果表明,提取液中的偶氮还原酶能够特异性地酶解共聚物主链上的偶氮键.与 MPEG-OLZ 相比,MPEG-OLZ-*b*-PLA 初期的降解速度较慢,适当延长胶束表面亲疏水的转变时间,可能更有利于载药系统在结肠部位的富集,提高药物系统的生物利用度.该现象将在进一步的深入研究中探讨.

5 结论

以 5,5'-偶氮二水杨酸为偶联剂,可将 PLA 疏水嵌段与 PEG 亲水嵌段通过偶氮键链接,形成一种新型两亲性嵌段共聚物.在水介质中,MPEG-OLZ-*b*-PLA 组装成尺寸约为 30 nm 的球形胶束.该嵌段共聚物能够在结肠提取物的作用下迅速降解,具有较好的偶氮还原酶敏感性,是一种潜在的结肠定位药物控释载体.

REFERENCES

- Dario S, Jerrold R T, Randall J M. *Adv Drug Deli Rev*, 2005, 57: 219 ~ 235
- Josias H H, Gill M E, Awie F K. *Biodrugs*, 2005, 19: 165 ~ 177
- Robert L, David A T. *Nature*, 2004, 428: 487 ~ 492
- Lai Junying (赖俊英), Li Wenjing (李文静), Wang Hongjun (王红军), Tu Kehua (涂克华), Wang Liquan (王利群). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2007, (1): 8 ~ 13
- Zalipsky S, Gilon C, Zilkha A. *Eur Polym J*, 1983, 19: 1177 ~ 1183
- Bea Y H, Huh K M, Kim Y, Park K H. *J Control Release*, 2000, 64: 3 ~ 13
- Astafieva I, Zhong X F, Eisenberg A. *Macromolecules*, 1993, 26: 7339 ~ 7352

8 Kopecekova P,Kopecek J. Makromol Chem,1990,191:2037 ~ 2045

9 Kopecekova P,Rathi R,Takada S,Rihova B,Berenson M M,Kopecek J. J Control Release,1994,28:211 ~ 222

10 Ji Dongying(季冬英) ,Wu Qiongzhu(吴琼珠) ,Ping Qineng(平其能) . J China Pharm Uni(中国药科大学学报) ,2008,39:223 ~ 227

11 Pan J,Subbu S V,Feng M,Boey Y C F,Gan L H. J Control Release,2005,110:20 ~ 33

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A ENZYME
SPECIFIC DEGRADED AMPHIPHILIC COPOLYMER

FANG Rui¹, LAI Junying², WANG Hongjun¹, JIANG Hongliang¹, TU Kehua¹, WANG Liquan¹

(¹ MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering,
Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(² College of Civil Engineering & Architecture, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract A novel enzyme responsive amphiphilic copolymer was synthesized. The copolymer was composed of hydrophobic polylactide (PLA) and hydrophilic α -methoxy-poly(ethyl glycol) (MPEG) block. The two blocks were conjugated through 5,5'-azodisalylic acid (OLZ) (MPEG-OLZ-*b*-PLA). The chemical structure of the copolymer was verified by FTIR,NMR and GPC. The NMR characterization demonstrated that the copolymers could be synthesized by esterification and purified by precipitation and dialysis. The micellization behavior of the copolymer in aqueous media was studied with transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). The results showed that MPEG-OLZ-*b*-PLA self-assembled into spherical micelles with diameter at about 30 nm. The critical micelle concentration (CMC) of the copolymer was 2.69×10^{-3} g/L. The enzyme-degradation experiment demonstrated that the MPEG-OLZ-*b*-PLA micelles could be specifically degraded in rat cecum contents. And the degradation curve had two time platform with no change in azo content. The first platform phase resulted from the induction period of the enzyme so that desirable concentration of the enzyme could be achieved for initialing the degradation of the copolymers. The second could be attributed to the slow dynamic process for azoreductase to migrate into the micelles. Such degradation behavior of the copolymers suggested of potential usefulness to colon-site specific delivery.

Keywords Colon specific delivery, 5,5'-Azodisalylic acid (OLZ), PEG, PLA, Amphiphilic copolymer