

· 快报 ·

## 药物包载对两亲嵌段共聚物胶束形态的影响<sup>\*</sup>

关 咏<sup>1</sup> 林 辉<sup>2</sup> 蔡秀军<sup>2\*\*</sup> 蒋宏亮<sup>1</sup> 涂克华<sup>1</sup> 王利群<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>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)

(<sup>2</sup>浙江大学医学院附属邵逸夫医院 杭州 310016)

**摘 要** 以聚( $\epsilon$ -己内酯-*b*-L-丙交酯)/聚乙二醇单甲醚(P(CL-*b*-LLA)-*b*-mPEG)和聚( $\epsilon$ -己内酯-*b*-D,L-丙交酯)/聚乙二醇单甲醚(P(CL-*b*-DLLA)-*b*-mPEG)两种两亲嵌段共聚物为载体,选择了物理状态完全不同、而疏水性相近的吲哚美辛和维生素E为模型药物,研究了药物包载对高分子胶束形态的影响.发现两种药物在分子胶束内部的增溶均会导致胶束形态发生显著改变,变化行为与胶束内核的结晶性和药物疏水性有关.另外,还研究了两种嵌段共聚物的载药性能,发现非结晶性疏水内核共聚物的药物包载率明显大于可结晶疏水内核的共聚物.

**关键词** 共聚物胶束, 药物, 形态, 载药性能

近年来,药物传输系统(drug delivery system, DDS)在药剂学、组织工程、临床医学与肿瘤治疗等领域受到了广泛关注<sup>[1~7]</sup>,而高分子胶束由于在肿瘤靶向给药等方面具有广阔的应用前景,成为该领域的研究热点.高分子胶束一般是由两亲性嵌段共聚物在水介质中自组装形成,疏水链段通过疏水作用形成胶束内核,亲水链段则构成胶束外壳.疏水内核可增溶疏水性药物,亲水性外壳则阻止胶束聚集,保持胶束稳定<sup>[8]</sup>.

两亲性嵌段共聚物在水介质中可组装成不同尺寸与形态的胶束.目前,胶束尺寸与结构对药物传递行为的影响已经有充分的研究<sup>[9~11]</sup>,而胶束形态的影响则很少有报道关注,相关工作主要集中在干粉吸入剂给药体系中. Martin 等研究了以 $\alpha$ -乳糖一水合物微粒对硫酸沙丁胺醇的包载与释放行为,发现微粒的形态对药物的分布、解聚和沉积有着重要影响,细长形载体与球形载体相比,对药物的分散效果更好,且便于移动<sup>[12]</sup>;而载体的伸长率越高,越有利于药物的沉积,对肺部组织的穿透性就越好<sup>[13]</sup>.最近, DeSimon 等<sup>[14]</sup>研究了微粒形态对细胞内化行为的影响,发现微粒细胞内化的速率与其形态和尺寸密切相关,非球状微粒更容易被 Hela 细胞内化.因此,除了药物微粒载体系统的尺寸外,载体形态对药物传递的行为同样具有重要影响.

我们在先前的工作中<sup>[15]</sup>,制备了聚( $\epsilon$ -己内酯-*b*-L-丙交酯)/聚乙二醇单甲醚(P(CL-*b*-LLA)-*b*-mPEG)和聚( $\epsilon$ -己内酯-*b*-D,L-丙交酯)/聚乙二醇单甲醚(P(CL-*b*-DLLA)-*b*-mPEG)两亲嵌段共聚物,考察了它们在水溶液中胶束化行为.发现以不能结晶的聚( $\epsilon$ -己内酯-*b*-D,L-丙交酯)(P(CL-*b*-DLLA))为内核的两亲性高分子形成典型的球形胶束,而具有可结晶内核聚( $\epsilon$ -己内酯-*b*-L-丙交酯)(P(CL-*b*-LLA))的两亲性共聚物形成的胶束为圆柱状,并提出了具有结晶内核圆柱状胶束的形成机理.在此基础上,本工作以常温下为晶态的吲哚美辛和液态的 $\alpha$ -生育酚为模型药物,研究了上述两类共聚物胶束载药后的形态变化,发现包载药物后,两亲性胶束的形态进一步发生显著变化.因此,除了构成成胶束的高分子化学结构的特性以及外界溶液参数外,药物的载入也对载体系统的形态有显著的影响,是高分子药物传输系统研究中十分值得关注的问题.

### 1 原料与仪器

P(CL-*b*-LLA)-*b*-mPEG<sub>20</sub>和P(CL-*b*-DLLA)-*b*-mPEG<sub>20</sub>两亲性嵌段共聚物<sup>[15]</sup>(以下分别简称为(C-L)-E<sub>20</sub>和(C-DL)-E<sub>20</sub>,下标中20代表mPEG嵌段的分子量为2000);吲哚美辛(IMC,浙江海正药业股份有限公司); $\alpha$ -生育酚(VE,杭州华东

<sup>\*</sup> 2009-12-11 收稿,2009-12-24 修稿;国家自然科学基金(基金号 20674069)和国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2007AA02Z446)资助; \*\* 通讯联系人, E-mail: cxjzu@hotmail.com; lqwang@zju.edu.cn

医药股份有限公司);*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF, 国药集团化学试剂有限公司);透析袋(MWCO = 3500, 杭州华东医药股份有限公司);透射电子显微镜(JEOL JEM-1230);动/静态激光光散射仪(Brooken Haven BI-200SM, solid-state laser; Mini L-30, output power = 400 MW,  $\lambda$  = 636 nm);紫外-可见光谱仪(CARY 100Bio).

## 2 胶束的制备与表征

将嵌段共聚物与 IMC(或 VE)按一定比例共溶于 DMF 中,待完全溶解后,强烈搅拌下缓慢逐滴加入去离子水,直至体系呈现乳液状.随后将混合溶液移入截留分子量(MWCO)为 3500 的透析袋中,在 4℃ 下,去离子水中透析 48 h 除去有机溶剂.前 12 h 每 3 h 换水 1 次,之后每 6 h 换水 1 次.透析结束后在 4000 r/min 下离心 20 min,除去未载入的药物.上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后得到载药胶束溶液.空白胶束按照同样的方法,仅用共聚物而不加入药物制得.

通过透射电镜表征胶束形貌,电流加速电压为 80 kV.样品制备是将胶束溶液滴在表面附着碳膜的铜网上,自然干燥,磷钨酸负染色后进行观察.

动态光散射(DLS)测试分别在 6 个入射角度下(45°、60°、75°、90°、105°、120°)进行,静态光散射(SLS)的测试角度范围是 30° ~ 120°,间隔角度 10°.每个实验数据为 3 次测量值的平均.

将载药胶束冷冻干燥后,取出一定量溶解于 DMF 中,并配制成合适浓度的 DMF 溶液,利用紫外光谱仪测定样品在药物特征吸收处的吸光度(IMC, 319 nm; VE, 289 nm).根据在上述两个波长的标准曲线,可计算出胶束中所含药物的含量.

载药率(DLC)和药包封率(DEE),由以下公式(1),(2)计算得出.

Drug loading content (DLC) (%) =

$$\frac{\text{The amount of drug in micelles}}{\text{The amount of drug-loaded micells}} \times 100 \quad (1)$$

Drug entrapment efficiency (DEE) (%) =

$$\frac{\text{The amount of drug in micelles}}{\text{The amount of drug added initially}} \times 100 \quad (2)$$

## 3 载药前后胶束的形态变化

胶束的形态通过透射电镜与激光光散射两种测试相结合的方式考察.由前者可观测到直观的二维形貌,后者则从宏观上反映了动态下的胶束尺寸和聚集形态.在多角度的动态光散射测试中,如果不同的入射角度下测量得到的粒径值基本一致,则粒子为球形;反之,测试粒径对入射光角度有依赖性,则粒子为非球形<sup>[16]</sup>.此外,通过 DLS 还可得到光散射的特性衰减时间  $\tau_c$ ,进而求得溶质分子或粒子的平动扩散系数  $D$  和与之对应的流体力学半径  $\langle R_h \rangle$ <sup>[17]</sup>.而在静态光散射中,通过测定时间平均散射光强的角度和浓度的依赖性,可以得到粒子的根均方旋转半径  $\langle R_g \rangle$ <sup>[18,19]</sup>.  $\langle R_g \rangle$  与  $\langle R_h \rangle$  的比值( $\langle R_g \rangle / \langle R_h \rangle$ )也可作为微粒形态的判断依据, $\langle R_g \rangle / \langle R_h \rangle$  值为 0.774 是实心球;1.0 为薄壁中空球,即囊泡;1.0 ~ 1.3 属于支化结构;1.5 是良溶剂中的线性无规线团;大于 2 的则呈棒状或蠕虫状<sup>[20]</sup>.

图 1 为嵌段共聚物(C-L)-E<sub>20</sub>空白和载药胶束的 TEM 图像.该共聚物胶束具有结晶内核<sup>[15]</sup>,在药物负载前后基本呈现圆柱状形态.但载药后,胶束长度出现显著的延伸,达到几百个纳米,发生了从短棒状到蠕虫状的变化.如图 1(a)中,载药前的(C-L)-E<sub>20</sub>共聚物胶束为长为 100 ~ 300 nm 的棒状,但包载了 IMC(图 1b)和 VE(图 1c)之后,转变成长度在 500 nm 以上的蠕虫状.

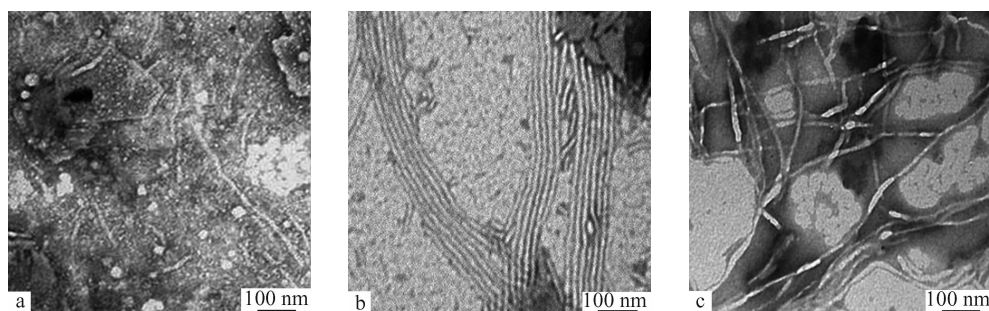


Fig. 1 TEM images of blank (C-L)-E<sub>20</sub>micelles (a), IMC-loaded (C-L)-E<sub>20</sub> micelles (b), and VE-loaded (C-L)-E<sub>20</sub>micelles(c)

对原本呈典型球状形态的非晶内核嵌段共聚物(C-DL)-E<sub>20</sub><sup>[15]</sup>,载入药物后,出现了从球形向

球形-圆柱形共存的形态转变.如图 2(a)所示,载药前该共聚物胶束呈球状,直径约为 20 nm.载入

IMC(图 2b) 和 VE(图 2c) 后, 胶束转变为以长蠕虫状为主的形态. 因此, 药物的载入可显著地改变高分子胶束的形态. 由于常温下吡啶美辛为晶态

药物,  $\alpha$ -生育酚为液态药物, 因此药物的疏水性的影响明显大于药物的凝聚状态. 该现象将在今后进一步的系统研究中加以印证.

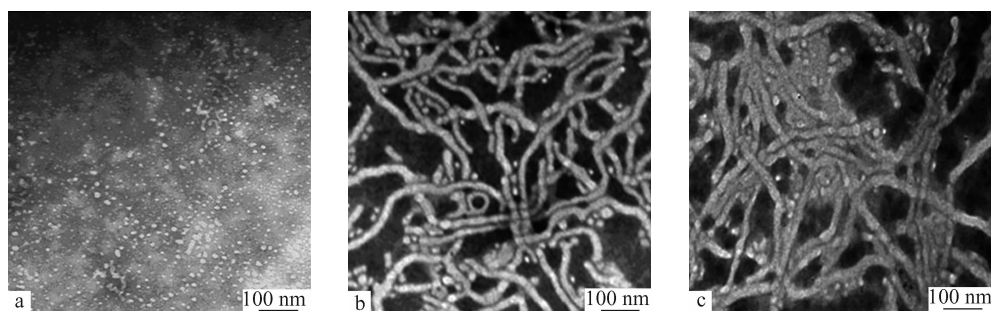


Fig. 2 TEM images of blank (C-DL)-E<sub>20</sub> micelles (a), IMC-loaded (C-DL)-E<sub>20</sub> micelles (b), and VE-loaded (C-DL)-E<sub>20</sub> micelles (c)

图 3 是高分子胶束的平均粒径随散射矢量平方( $K^2$ )的变化. 由图可见, 载药前的 (C-DL)-E<sub>20</sub> 型胶束在不同的  $K^2$  下测得的平均粒径基本一致, 说明其为球形; 而其它所有样品的粒径值与入射角度均存在相关性, 故为非球形. 同样地, 在表 1 中, 只有 (C-L)-E<sub>20</sub>-blank 的  $\langle R_g \rangle / \langle R_h \rangle$  值小于 1, 且接近球形的 0.774; 其余空白和载药胶束的  $\langle R_g \rangle / \langle R_h \rangle$  值都大于 2, 属于棒状或蠕虫状的范畴. TEM 和 LLS 测试结果一致.

#### 4 聚合物的载药性

以超过胶束饱和增溶量的初始投药量 (IMC, 5 mg; VE, 10 mg) 投药, 考察共聚物胶束的最大载药率和包封率. 表 2 所示为两种聚合物胶束对两种药物的载药率和包封率.

由表 2 可知内核为非晶的 P(CL-DLLA) 链段的胶束比内核为结晶性的 P(CL-LLA) 链段的胶束载药能力更强; 同一种聚合物胶束, 对 VE 的包载量较 IMC 大. 聚合物胶束的载药性能与载体与

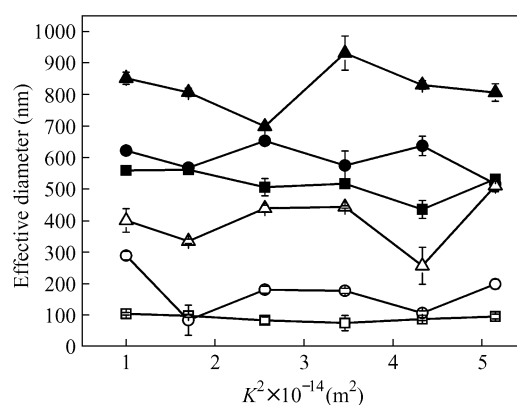


Fig. 3 Change of the micelle diameter with the magnitude of  $K^2$

The micelles were formed from (C-L)-E<sub>20</sub>-blank (■); (C-L)-E<sub>20</sub>-IMC (●); (C-L)-E<sub>20</sub>-VE (▲); (C-DL)-E<sub>20</sub>-blank (□); (C-DL)-E<sub>20</sub>-IMC (○); and (C-DL)-E<sub>20</sub>-VE (△); The detection angles altered from 45° ~ 120°, ( $n=3$ )

Table 1 Laser light scattering characterization of blank and drug-loaded micelles formed from (C-L)-E<sub>20</sub> and (C-DL)-E<sub>20</sub> copolymers

| Block copolymer               | $R_g$ | $R_h$ | $R_g/R_h$ |
|-------------------------------|-------|-------|-----------|
| (C-L)-E <sub>20</sub> -blank  | 95    | 26    | 3.66      |
| (C-L)-E <sub>20</sub> -IMC    | 104   | 25    | 4.54      |
| (C-L)-E <sub>20</sub> -VE     | 112   | 28    | 3.98      |
| (C-DL)-E <sub>20</sub> -blank | 49    | 56    | 0.87      |
| (C-DL)-E <sub>20</sub> -IMC   | 58    | 27    | 2.12      |
| (C-DL)-E <sub>20</sub> -VE    | 65    | 25    | 2.56      |

Table 2 Drug loading efficiency and drug entrapment efficiency of IMC and VE loaded P(CL-co-LA)-b-mPEG block copolymer micelles

| Block copolymer        | Drug loading efficiency |      | Drug entrapment efficiency |      |
|------------------------|-------------------------|------|----------------------------|------|
|                        | IMC                     | VE   | IMC                        | VE   |
| (C-L)-E <sub>20</sub>  | 12.2                    | 19.7 | 22.6                       | 43.7 |
| (C-DL)-E <sub>20</sub> | 18.5                    | 20.8 | 48.7                       | 50.5 |

药物间的相容性相关,相容性越高,载药量越大.内核致密、规整的结晶结构抑制了药物在内核中的分散;而非晶内核类液状(liquid-like)的结构与药物之间的具有较好的相容性.VE作为无定形的油状物,相比结晶固体颗粒的IMC,便于在内核中有效分布,与载体的相容性更好.

## 5 结论

本研究表明,药物在聚合物胶束内部的增溶会导致胶束形态的显著改变.物理状态完全不同、疏水性相近的药物(IMC为结晶性固体颗粒;VE

为无定形油状物)对胶束形态的影响基本相同,表明药物的亲疏水特性的影响大于药物物理状态对高分子载药胶束形态的影响,而非结晶性疏水内核两亲性共聚物对药物的包载率更大.由于胶束的形态对药物的释放、胞吞、药物代谢动力学和生物利用度等方面具有重要的影响,本工作对于胶束在药物控释中的研究具有重要指导意义.我们将在后续工作中详细研究相关现象,得到更系统性结论.

## REFERENCES

- 1 Robinson J R, Lee V H L. Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications. 5<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker Press, 1987. 213 ~ 241
- 2 Kydonieus A F. Treatise on Controlled Drug Delivery: Fundamentals, Optimization, Application. 6<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker Press, 1992. 225 ~ 231
- 3 Ahmed A, Bonner C, Desai T A. J Control Release, 2002, 81: 291 ~ 306
- 4 Saltzman W M, Olbricht W L. Nat Rev Drug Discovery, 2002, 1: 177 ~ 186
- 5 Kataoka K, Harada A, Nagasakib Y. Adv Drug Delivery Rev, 2001, 47: 113 ~ 131
- 6 Majeti N V, Kumar R. J Pharm Pharm Sci, 2000, 3: 234 ~ 258
- 7 Langer R. Science, 1990, 249: 1527 ~ 1533
- 8 Dong H Q, Xu Q, Li Y Y, Mo S B, Cai S J, Liu L J. Colloids Surf, B, 2008, 66: 26 ~ 33
- 9 Nagarajan R, Ganesh K. J Chem Phys, 1989, 90: 5843 ~ 5856
- 10 Klibanov A L, Maruyama K, Beckerleg A M, Tetchily V P, Huang L. Biochim Biophys Acta, 1991, 1062: 142 ~ 148
- 11 Litzinger D C, Buiting A M, van Rooijen N, Huang L. Biochim Biophys Acta-Biomembr, 1994, 1190: 99 ~ 107
- 12 Zeng X M, Martin G P, Marriott C, Pritchard J. Int J Pharm, 2000, 200: 93 ~ 106
- 13 Larhrib H, Martin G P, Marriott C, Prime D. Int J Pharm, 2003, 257: 283 ~ 296
- 14 Gratton S E A, Ropp P A, Pohlhaus P D, Luft J C, Madden V J, Napier M E, DeSimone J M. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105: 11613 ~ 11618
- 15 Zhang J, Wang L Q, Wang H J, Tu K H. Biomacromolecules, 2006, 7: 2492 ~ 2500
- 16 Elsabahy M, Perron M V, Bertrand N, Yu G E, Leroux J C. Biomacromolecules, 2007, 8: 2250 ~ 2257
- 17 Müller A, Burchard W. Colloid Polym Sci, 1995, 273: 866 ~ 875
- 18 Nie T, Zhao Y, Xie Z W, Wu C. Macromolecules, 2003, 36: 8825 ~ 8829
- 19 Zuo Ju (左渠), Niu Aizhen (牛爱珍), An Yingli (安英丽), He Binglin (何炳林), Ran Shaofeng (冉少峰), Liang Dehai (梁德海). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 1998, (4): 419 ~ 423
- 20 Liu T, Zhou Z, Wu C, Chu B, Schneider D K, Nace V M. J Phys Chem B, 1997, 101: 8808 ~ 8815

## EFFECT OF DRUG INCORPORATION ON THE MORPHOLOGY OF AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMER MICELLES

GUAN Yang<sup>1</sup>, LIN Hui<sup>2</sup>, CAI Xiujun<sup>2</sup>, JIANG Hongliang<sup>1</sup>, TU Kehua<sup>1</sup>, WANG Liquan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Polymer Science and Engineering, Key Laboratory of Macromolecule Synthesis and Functionalization, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(<sup>2</sup> Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016)

**Abstract** Two model drugs, indomethacin and vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), which have different physical states and similar hydrophobicity, were incorporated respectively into polymeric micelles in aqueous media by dialysis method. The micelles were formed from two types of biodegradable amphiphilic block copolymers based on methoxy poly(ethylene glycol) (mPEG) as a hydrophilic block and either crystalline poly( $\epsilon$ -caprolactone-*b*-L-lactide) (P(CL-*b*-LLA)) or amorphous poly( $\epsilon$ -caprolactone-*b*-D,L-lactide) (P(CL-*b*-DLLA)) as a hydrophobic block. The morphology and drug loading property of the polymeric micelles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), laser light scattering (LLS), ultraviolet (UV) spectroscopy measurements. It was found that incorporating drugs into the micelles resulted in significant changes of the micellar morphologies. The different behaviors of the morphological change depended mainly on the crystalline property of the core-forming blocks. The morphology of micelles formed with P(CL-*b*-LLA)-*b*-mPEG changed from short rod-like cylinders to wormlike ones; whereas those formed with P(CL-*b*-DLLA)-*b*-mPEG changed from spheres to cylinders. In addition, the transformation of the micellar morphologies upon the drug entrapment was influenced by the hydrophobicity of the drugs more significantly than by the physical state of the drugs, while the drug loading amount was affected by the compatibility between carriers and drugs. Much more liquid-like drugs were entrapped in the amphiphilic copolymers with non-crystalline core.

**Keywords** Block copolymer micelles, Drug, Morphology, Drug loading property