

·研究简报·

两亲性聚(*L*-谷氨酸 γ -苄基酯)-聚乙二醇接枝共聚物的 自组装行为和载药性能研究*

章苏宁 陈 涛 林嘉平** 董秀斌 林绍梁

(华东理工大学材料科学与工程学院 超细材料制备与应用教育部重点实验室 上海 200237)

关键词 聚(*L*-谷氨酸 γ -苄基酯), 自组装, 药物载体

由氨基酸及其衍生物聚合形成的聚肽,因其独特的结构和性能,近年来在蛋白质结构模拟、分子链构象研究、生物医学等领域备受关注^[1-4].其中两亲性聚肽共聚物的自组装行为,为开发具有生物相容性、可控释、可降解性的新型药物载体创造了条件^[5-8].目前对聚肽共聚物自组装及载药性能研究主要集中于聚肽嵌段共聚物胶束^[9,10],对聚肽接枝共聚物的自组装行为以及在药物控释载体方面的研究还鲜有报道.本文通过荧光光谱、透射电镜(TEM)、紫外光谱等手段探讨了两亲性聚(*L*-谷氨酸 γ -苄基酯)-聚乙二醇接枝共聚物(PBLG-*g*-PEG)的自组装行为及其作为药物载体的性能.实验结果表明,聚肽接枝共聚物在水中自组装形成的胶束形态与聚肽嵌段共聚物球形胶束不同,疏水链段的相对含量影响着聚集体的尺寸和形态,并进一步影响到内核药物的负载量和释放速率.

1 聚合物的合成与表征

PBLG 根据文献[11,12]方法合成,以二氯醋酸为溶剂,用粘度法测定分子量^[13];聚乙二醇甲基醚($M_n = 350$)和苄购于 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯. PBLG-*g*-PEG 接枝共聚物采用酯交换方法制备^[12],由¹H-NMR(Avance 550 核磁共振分析仪)谱图,按式(1)计算接枝率,并由此计算得到共聚物中疏水链段 PBLG 的相对含量.

Grafting percentage =

$$\frac{A_{\delta=3.64}}{4 \times \overline{DP}_{\text{PEG}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\frac{A_{\delta=5.10}}{2} + \frac{A_{\delta=3.64}}{4 \times \overline{DP}_{\text{PEG}}}$$

式中 $A_{\delta=3.64}$ 为 PEG 亚甲基质子特征峰面积, $A_{\delta=5.10}$ 为 PBLG 侧链苄亚甲基质子特征峰面积. 实验中制备了 3 种 PBLG-*g*-PEG 接枝共聚物,其特性见表 1.

Table 1 Characteristics of polypeptide graft copolymers

Sample	PBLG- <i>g</i> - PEG1 #	PBLG- <i>g</i> - PEG2 #	PBLG- <i>g</i> - PEG3 #
M_n of original polypeptide	20000	60000	110000
M_n of PEG side chain	350	350	350
Grafting percentage (%)	43.86	27.42	20.05
PBLG content in the copolymer (mol %)	22.29	31.45	38.55

2 自组装胶束的制备与表征

室温下将 PBLG-*g*-PEG 接枝共聚物溶于二甲基甲酰胺(DMF)/四氢呋喃(THF)(7/3, V/V)混合溶剂中,完全溶解后放入透析袋(截留分子量 ≥ 3500),在去离子水流中透析 72 h,并每 3 h 替换一次新鲜去离子水,除去有机溶剂使共聚物胶束化. 本文选用解热镇痛药萘普生(Naproxen)作为疏水性模型药物,用于载药性能及释药性能的研究. 将一定比例的 PBLG-*g*-PEG 和萘普生混合物溶于上述混合溶剂中,在去离子水中透析后,离心分离除去未包埋药物,上层清液用直径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤,得到载药胶束溶液.

以苄为荧光探针(浓度为 $6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$),在

* 2005-03-18 收稿,2005-06-22 修稿;国家自然科学基金(基金号 50273011)、上海市曙光计划(项目号 02SG025)和上海市科委纳米专项基金(基金号 0352nm109)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: jplnlab@online.edu.cn

室温下扫描其在共聚物水溶液中的荧光激发光谱 (Cary Eclipse 荧光光谱仪), 根据谱图的变化确定胶束形成的临界浓度. 发射波长为 390 nm, 激发缝宽为 5 nm. 胶束溶液经磷钨酸染色, 通过透射电镜 (JEM-GSX-500 透射电镜) 表征胶束形貌, 电流加速电压为 120 kV. 在环境温度 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, (94 ± 4) 次/分振荡器中, 将一定量的奈普生/PBLG-*g*-PEG 载药胶束溶液放在密封的透析袋中, 在 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中释药, 定时更换介质, 更换的介质用紫外光谱 (UV-2102PCS 紫外分光光度计) 测定 331 nm 处的吸光度 (此波长下奈普生摩尔吸光系数为 $2.10 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$), 按同

等条件下测定的奈普生浓度标准曲线方程计算载药量及释药速率.

3 PBLG-*g*-PEG 的自组装行为

PBLG-*g*-PEG 在水中自组装形成胶束的 TEM 照片如图 1 所示. 1 #、2 #、3 # 接枝共聚物对应的自组装胶束形状依次为近球形 (粒径在 20 ~ 30 nm)、近似菱形 (长径在 80 nm 左右)、纺锤状 (长径在 100 ~ 150 nm). 由于 PBLG 具有刚性棒状分子链构象, 当 PBLG 主链长度变大时, 有可能在胶束的核中发生一定的取向排列, 从而产生近似菱形、纺锤状的胶束形态.

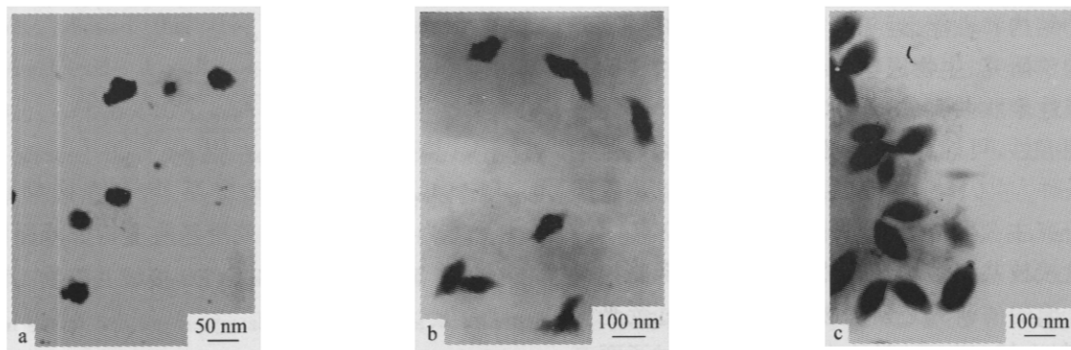


Fig. 1 TEM photographs of micelles formed by PBLG-*g*-PEG1 # (a), PBLG-*g*-PEG2 # (b), PBLG-*g*-PEG3 # (c)
The concentrations of micelles are 0.25 g/L.

图 2 为芘在不同浓度的接枝共聚物水溶液中典型的荧光激发光谱. 随着共聚物浓度的增加, 激发光谱中荧光强度有明显增高, (0,0) 谱带发生了红移^[14], 由低浓度时的 333 nm 移至高浓度时的 338 nm. 这主要是因为聚合物达到一定浓度以后, 体系中出现胶束, 形成疏水微区, 芘开始进入该疏水微区, 其所处环境由极性变为非极性, 导致芘分子光物理性能发生了变化.

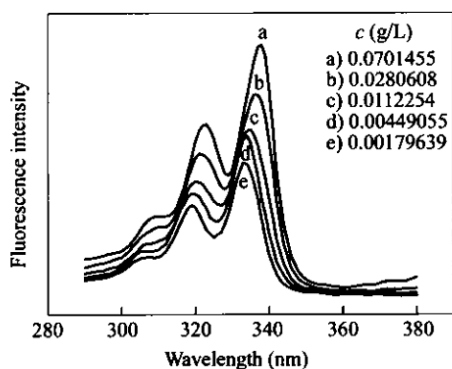


Fig. 2 Excitation spectra of pyrene as a function of PBLG-*g*-PEG3 # concentrations in deionized water

利用荧光激发光谱提供的信息, 可求得接枝共聚物溶液的临界胶束浓度 (CMC)^[14,15], 1 #、2 #、3 # 的 CMC 依次为 0.01786 g/L、0.002483 g/L、0.002398 g/L. 从 CMC 测试结果可以发现, 当共聚物中疏水的 PBLG 链段含量较少时, 接枝共聚物所形成胶束的 CMC 值较大, 随着 PBLG 含量的增加, 临界胶束浓度变小, 自组装能力变大, 但进一步增加 PBLG 的含量, 临界胶束浓度的变化趋势不再明显.

4 PBLG-*g*-PEG 胶束的载药及释药性能

上述自组装形成的聚肽接枝共聚物胶束, 核由疏水性 PBLG 链构成, 亲水性 PEG 链段形成水合性外壳掩蔽内核, 形成热力学稳定系统. 药物可以通过物理吸附存在于核中, 并随外界条件的改变逐步释放. 图 3(a)、(b)、(c) 分别为 PBLG-*g*-PEG1 #, PBLG-*g*-PEG2 #, PBLG-*g*-PEG3 # 载药胶束的透射电镜照片. 通过分子间的相互作用, 疏水性的药物会增溶到疏水的胶束核中, 进入取向排列的 PBLG 刚性链段之间, 使近似菱形或纺锤形胶束的短径增加, 从而胶束变为球形, 其尺寸也相应增加.

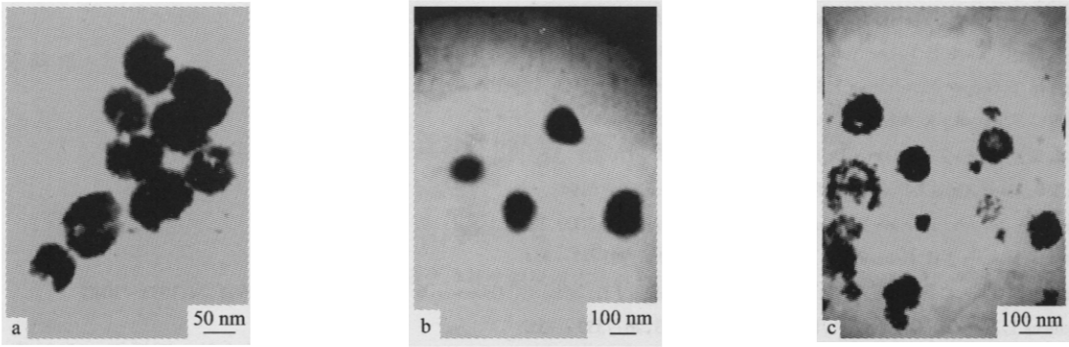


Fig.3 TEM photographs of drug-loaded micelles formed by PBLG-*g*-PEG1 # (a), PBLG-*g*-PEG2 # (b), PBLG-*g*-PEG 3 # (c)
The concentrations of drug-loaded micelles are 0.26, 0.27 and 0.34 g/L, respectively.

紫外光谱对载药胶束的载药量表征的结果如表 2 所示.从表中可以看出,胶束的载药量及载药效率与共聚物中肽链含量成正比,肽链的含量增加,对药物的物理吸附作用增加,包埋的药物量也随之增加.

Table 2 Drug-loading content of micelles formed by PBLG graft copolymers

Sample	Final Drug Conc. (mg drug/ 7 mg polymer)	Loading contents (wt%)	Loading efficiency (%)
PBLG- <i>g</i> -PEG1 #	0.242	3.34	6.05
PBLG- <i>g</i> -PEG2 #	0.546	7.24	13.65
PBLG- <i>g</i> -PEG3 #	2.466	26.05	61.65

The loading efficiency was defined as the ratio of the weight of loaded drug to the initially added drug.

图 4 为 37℃ 下 pH 值为 7.4 的缓释体系中,不同接枝共聚物载药胶束的体外缓释曲线.3 种不同接枝共聚物载药胶束,具有相似的累积释放曲线,在 5 h 之内存在突释,然后缓慢释放.另外,随 PBLG 含量的增加,药物释放速度减缓,相同时间内的累积释放量随之减小.这与文献中 PBLG 嵌段共聚物载药性能研究的结果相同^[6-8].初步研究还表明,对于聚肽接枝共聚物载药胶束,水介质 pH 值升高,释药速率增加.这是因为,药物在水介质中的扩散速率是决定其释药速率的一个重要因

素.不同 pH 值会影响药物的扩散速率,从而影响药物释放速率.

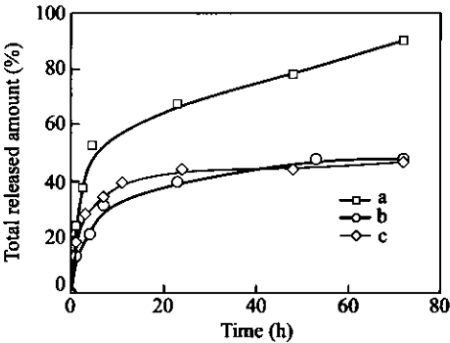


Fig. 4 Release of naproxen from micelles formed by PBLG-*g*-PEG1 # (a), PBLG-*g*-PEG2 # (b), PBLG-*g*-PEG3 # (c)
The pH value of releasing medium is 7.4.

以上实验结果表明,两亲性聚肽接枝共聚物在水中可以自组装成具有核壳结构的聚集体.和其它嵌段共聚物药物载体相比,聚肽本身具有生物相容性、可生物降解性、无毒性、无免疫原性等优点.与嵌段共聚物相比,聚肽接枝共聚物的化学结构更具有可变性,如疏水链段的比率、接枝率的变化等.这样使其形成的胶束结构和形态更具多样性(如纺锤形、球形等,而嵌段共聚物一般呈球形),从而能比较容易地调控载药量和药物释放速率.

REFERENCES

1 Cho C S, Park I K, Nah J W, Akaike T. *Macromolecular Research*, 2003, 11: 2 ~ 8
2 Förster S, Plantenberg T. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 688 ~ 714
3 Lin J P, Lin S L, Chen T, Tian X H. *Macromolecules*, 2004, 37: 5461 ~ 5467
4 Chen Tao (陈涛), Lin Jiaping (林嘉平), Tian Xiaohui (田晓慧), Liu Peihai (刘培海), Lin Shaoliang (林绍梁), Lu Xiwen (鲁习文), Zhou Dafei (周达飞). *Acta Polymeric Sinica (高分子学报)*, 2004, (1): 145 ~ 148
5 Lavasanifar A, Samuel J, Kwon G S. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54: 169 ~ 190

- 6 Jeong Y H, Nah J W, Lee H C, Kim S H, Cho C S. *Int J Pharm*, 1999, 188: 49 ~ 58
- 7 Oh I, Lee K, Kwon H Y, Lee Y B, Shin S C, Cho C S, Kim C K. *Int J Pharm*, 1999, 181: 107 ~ 115
- 8 Lee T A T, Cooper A, Apkarian R P, Conticello V P. *Adv Mater*, 2000, 12: 1105 ~ 1110.
- 9 Kwon G S, Kataoka K. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16: 295 ~ 309
- 10 Kwon G S, Okano T. *Adv Drug Deliv Rev*, 1996, 21: 107 ~ 116
- 11 Lin J P, Liu N, Chen J D, Zhou D F. *Polymer*, 2000, 41: 6189 ~ 6194
- 12 Inomata K, Shimizu H, Nose T. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 2000, 38: 1331 ~ 1340
- 13 Doty P, Bradbury J H, Holtzer A M. *J Am Chem Soc*, 1956, 78: 947 ~ 954
- 14 Wilhelm M, Zhao C L, Wang Y, Xu R, Winnik M A, Mura J L, Riess G, Croucher M D. *Macromolecules*, 1991, 24: 1033 ~ 1040
- 15 Astafieva I, Zhong X, Eisenberg A. *Macromolecules*, 1993, 26: 7339 ~ 7352

STUDIES OF SELF-ASSEMBLY BEHAVIOR AND DRUG-LOADING PROPERTIES FOR AMPHIPHILIC POLY(γ -BENZYL *L*-GLUTAMATE)- POLY(ETHYLENE GLYCOL)GRAFT COPOLYMERS

ZHANG Suning, CHEN Tao, LIN Jiaping, DONG Xiubin, LIN Shaoliang

(Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract Self-association behavior of an amphiphilic polypeptide graft copolymer, poly(γ -benzyl *L*-glutamate)-*g*-poly(ethylene glycol), and the drug carrier capability of the formed micelles were examined by fluorescence spectroscopy, transmission electron microscopy and UV spectroscopy. It was found that the hydrophobic inner core of the micelles formed by poly(γ -benzyl *L*-glutamate) (PBLG) segments can act as an incorporation site for hydrophobic drugs. The drug-loading content of the graft copolymer micelles tends to be larger when the content of the PBLG segments in the copolymer increases. The results obtained from the drug-release studies showed that the drug-release rates were dependent on the chemical nature of the graft copolymer.

Key words poly(γ -benzyl *L*-glutamate), Self-assembly, Drug carrier