

·研究简报·

含环状原酸酯侧基的两亲性嵌段共聚物及其酸敏感胶束状聚集体^{*}

黄潇楠 杜福胜^{**} 杨 俊 李子臣

(北京分子科学国家实验室 高分子化学与物理教育部重点实验室 北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘 要 合成了含有环状原酸酯基团的单体, 甲基丙烯酸 5-(5-甲基-2-乙氧基-1,3-二氧六环) 甲酯 (EDMM), 以 PEO 大分子引发剂引发, 通过原子转移自由基聚合方法制备了两个疏水链段 (PEDMM) 长度不同的酸敏感两亲性嵌段共聚物, PEO-*b*-PEDMM₁₇ 和 PEO-*b*-PEDMM₃₄. 两个聚合物在水溶液中形成粒径约为 60 ~ 200 nm 的球型聚集体, 通过动态光散射、透射电镜、荧光探针等手段表征了所得聚集体. 结果显示, 疏水链段较短的共聚物的临界聚集浓度较高, 形成的聚集体尺寸较小. 核磁和荧光探针结果表明, 胶束状聚集体在中性 (pH 7.4) 水溶液中比较稳定, 在酸性水溶液中其疏水核的极性因原酸酯的水解而增加. 该类酸敏感胶束状聚集体有望用于肿瘤、细胞内给药等药物传递体系.

关键词 原酸酯, 聚乙二醇, 嵌段共聚物, 酸敏感, 胶束状聚集体

基于刺激响应性高分子的胶束状药物运输体系是实现药物定时、定点、定量释放的有效途径之一. 目前有多种环境响应性高分子或其聚集体系可望用于药物传递^[1,2], 其中, pH 敏感高分子在肿瘤、细胞内或胃肠道给药方面最具应用前景^[3,4]. 最近, Frechet 及合作者将疏水性三甲氧基苯基通过环状缩醛结构连接到聚乙二醇-聚天冬氨酸嵌段共聚物的侧基上或含聚乙二醇 (PEO) 的嵌段型树枝状分子外围, 得到了酸敏感两亲性共聚物并制备了一类新型酸敏感高分子胶束, 考察了该类胶束用于阿霉素的控制释放行为^[5-7]. 原酸酯是一类在碱性或中性环境中较稳定, 在酸性条件下易发生水解的有机官能团^[8]. Heller 等的研究结果显示聚原酸酯有良好的生物相容性, 作为高分子生物医用材料已用于二期临床试验^[9]. 近年来, 原酸酯作为酸裂解型连接基团被用于制备 pH 敏感的脂类化合物, 相应的 pH 敏感脂质体在药物释放、基因输送等方面表现出潜在的应用价值^[10]. 本文通过 ATRP 方法合成了一类酸敏感两亲性嵌段共聚物 (示意式 1), 其中, 亲水段为 PEO, 疏水段为含原酸酯侧基的聚甲基丙烯酸酯衍生物. 疏水段长度可通过改变投料比方便地调控. 由这类共聚物形成的胶束状聚集体在中性水溶液中比较稳定, 但在弱酸条件下随原酸酯侧基的水解, 产生亲水性羟基, 使聚集体疏水核的亲水性增加, 导致聚集体膨胀或解散. 该类胶束状聚集

体可望用作酸敏感型疏水药物载体, 在肿瘤治疗或细胞内给药方面发挥作用.

1 试剂和原料

2-甲基-2-羟甲基-1,3-丙二醇 (Acros)、原甲酸三乙酯 (Acros)、单端甲氧基聚乙二醇 (分子量约 2000, Fluka)、溴化亚铜 (CuBr, Aldrich), *N,N,N',N'',N''*-五甲基二亚乙基三胺 (PMDTA, Aldrich), 2-溴异丁酰溴 (Aldrich)、Nile Red (Acros) 直接使用. 氯苯和四氢呋喃 (THF) 使用前经钠处理重蒸. CDCl₃ 用 Na₂CO₃ 处理以除去其中微量酸. 甲基丙烯酰氯由甲基丙烯酸和苯甲酰氯按文献方法合成^[11]. 甲基丙烯酸 (2,2-二羟甲基) 丙酯由甲基丙烯酰氯和 2-甲基-2-羟甲基-1,3-丙二醇按文献合成^[12]. PEO 大分子引发剂由单端甲氧基聚乙二醇和 2-溴异丁酰溴制备^[13].

2 仪器及测试

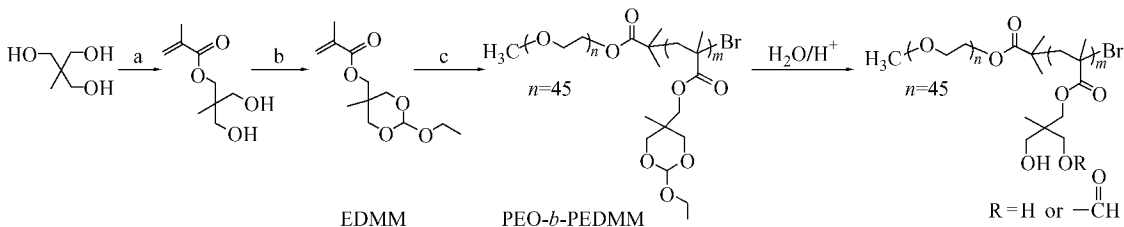
单体和嵌段共聚物的 ¹H-NMR 谱用 Bruker-ARX 400 MHz 核磁共振谱仪测定, TMS 为内标. 嵌段共聚物的分子量及其分布用凝胶渗透色谱 (GPC) 方法测量 (Waters 515 泵, 2410 示差检测器, Styragel 色谱柱 (HT2, HT3, HT4), 35 °C, THF, 1 mL/min). 动态光散射用 ALV-5000/CGS-5022F 测定, 波长 632.8 nm. 用 JEM-100CX 透射电子显微镜 (JEOL Co.) 观察胶束状聚集体的形态 (80 ~ 100 kV). Nile Red 的荧光用 Hitachi F-4500 荧光光谱仪测定, 激发与发射狭缝宽度均为 5 nm, 激发波长

为 545 nm.

3 单体和嵌段聚合物的合成、表征

单体和嵌段共聚物的合成方法见示意图 1. 单体甲基丙烯酸 5-(5-甲基-2-乙氧基-1,3-二氧六环)甲酯(EDMM)由甲基丙烯酸(2,2-二羟甲基)丙酯和原甲酸三乙酯按文献方法合成. 经柱分离纯化后产物为顺式和反式异构体的混合物,顺反比例约为 1:1.¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 6.11, 5.58 (2H,

$\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 5.39, 5.27 (ds, 1H, CH_2O_3 , trans/cis), 4.26, 4.23 (ds, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2-$), 4.02 ~ 3.51 (m, 4H, $-\text{OC}(\text{CH}_2)_2$), 3.73, 3.60 (dq, 2H, $-\text{OCCH}_2\text{CH}_3$), 1.96 (s, 3H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 1.26 (m, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 0.92, 0.90 (ds, 3H, $-\text{CCH}_3$). MS 243. 元素分析, 计算值 :C 59.00%, H 8.25%; 测量值 :C 58.91%, H 8.36%.



Scheme 1 Synthetic routes of EDMM and PEO-*b*-PEDMM, and acid-triggered hydrolysis of the block copolymer

a) Methacryloyl chloride, triethylamine, 50°C, 1 h; b) Triethyl orthoformate, TsOH, r. t., 4 h; c) CuBr, PMDETA, 30°C, 10 h in chlorobenzene

用原子转移自由基聚合(ATRP)方法合成嵌段共聚物^[14], 引发剂为 PEO 大分子引发剂, 催化剂和配体分别为 CuBr 和 PMDETA. 改变单体和引发剂的投料比, 得到两个疏水链段长度不同的嵌段共聚物, 具体的反应条件及所得聚合物的表征

结果见表 1. 图 1 为嵌段共聚物 PEO-*b*-PEDMM₃₄ 的¹H-NMR 谱. 根据 PEO 端甲基峰(e)和原酸酯基团的 k 峰的比值可以计算出 PEDMM 段的平均聚合度(表 1).

Table 1 ATRP conditions and characterization results of the obtained block copolymers^{*}

	[EDMM] : initiator : CuBr : PMDETA	Yield (%)	<i>m</i> ^a	<i>M</i> _{n,NMR} ^a	<i>M</i> _{n,GPC} ^b	PDI ^b	<i>cac</i> ^c (mg/mL)
PEO- <i>b</i> -PEDMM ₁₇	15 : 1 : 1 : 1	60	17	6100	5000	1.19	0.047
PEO- <i>b</i> -PEDMM ₃₄	30 : 1 : 1 : 1	61	34	10300	9100	1.21	0.022

^{*} 30°C in chlorobenzene for 10 h; ^a DP of PEDMM and the molecular weight of PEO-*b*-PEDMM determined by ¹H-NMR; ^b Determined by GPC (THF, polystyrene standards); ^c Critical aggregation concentration determined by fluorescence method with NR as a probe

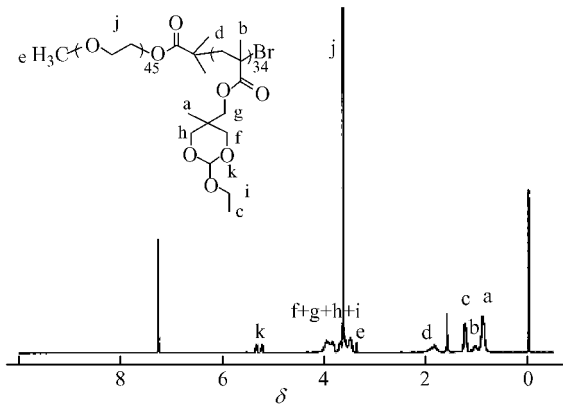


Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of PEO-*b*-PEDMM₃₄ in CDCl₃

4 胶束状聚集体的制备与表征

PEO-*b*-PEDMM 含有亲水的 PEO 段和疏水的

EDMM 段, 在水溶液中能够形成具有核-壳结构的胶束状聚集体. 由于 EDMM 段具有较强的疏水性, 两个嵌段共聚物都不溶于水, 即使超声也不能使其直接在水中形成聚集体. 因此, 本文先将共聚物溶于 THF, 逐渐滴加过量的磷酸缓冲液(PB, pH 7.4, 10 mmol/L), 然后将 THF 挥发制备聚集体. 临界聚集浓度(*cac*)是评价两亲性嵌段共聚物在水溶液中聚集行为的一个重要参数, 本文用 Nile Red (NR) 荧光探针的方法测定了两个嵌段共聚物在磷酸缓冲液中的临界聚集浓度. NR 是一种疏水染料, 在水溶液中的荧光强度很弱(峰值约为 660 nm), 但在疏水的微环境中(如脂质体膜或胶束内核)荧光强度大增且发生蓝移, 因此被用作荧光探针研究两亲性聚合物的聚集行为或微环境变

化^[6]. 由图 2 可见,随着聚合物浓度的增加,NR 荧光强度开始几乎不变,但在某一浓度附近迅速增加. 根据拐点处的值,可以测出两种嵌段共聚物的 cac(表 1). 共聚物中疏水链段增加使聚合物的 cac 值降低,与文献中有关其它两亲性嵌段共聚物的结果一致^[15],可以理解为疏水段越长,疏水作用力越大,嵌段共聚物更容易聚集.

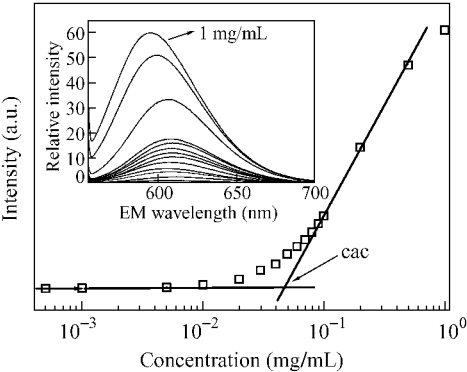


Fig. 2 Fluorescence intensity of NR at 620 nm versus the logarithmic concentration of PEO-*b*-PEDMM₁₇ in 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4)
The inset figure shows fluorescence spectra of NR in the solutions with various polymer concentrations; $\lambda_{ex} = 545$ nm; Concentration of NR 5.0×10^{-7} mol/L

图 3 是两个聚合物在 10 mmol/L PB 中形成的聚集体经醋酸双氧铀染色的透射电镜 (TEM) 照片. 可以看到,两个聚合物都能形成比较均匀的聚集体,其粒径在 60 ~ 200 nm 间. 疏水段较短的 PEO-*b*-PEDMM₁₇ 形成的聚集体尺寸略小. 动态光散射 (DLS) 测量结果表明 PEO-*b*-PEDMM₁₇ 形成的胶束状聚集体的表现 R_h 约为 70 nm,比 PEO-*b*-PEDMM₃₄ 形成的聚集体的表现 R_h (约 110 nm) 小 (图 4),与 TEM 观察的趋势相符. 较大的聚集体估计是复合型胶束或囊泡. 据报道,THF 与水在一定比例范围内会产生微相分离^[16],这可能影响所得聚集体的微观形态及尺寸,有关样品制备条件对聚集体形态的影响的研究正在进行中.

5 胶束状聚集体的 pH 响应性水解

PEO-*b*-PEDMM 嵌段共聚物的特点在于其 PEDMM 段的酸敏感性. 本文中以 NR 为荧光探针考察了两个嵌段共聚物形成的聚集体在不同 pH 水溶液中的水解行为. 胶束状聚集体首先在含有 NR 的 pH 7.4 的 PB(10 mmol/L) 中室温搅拌过夜,使 NR 扩散到聚集体疏水相中. 用 5 mol/L 的乙酸缓冲液将 pH 值调至 4.0 和 5.0,37℃ 下搅拌不同

时间,测 620 nm 处的荧光强度. 对于 pH 为 7.4 的

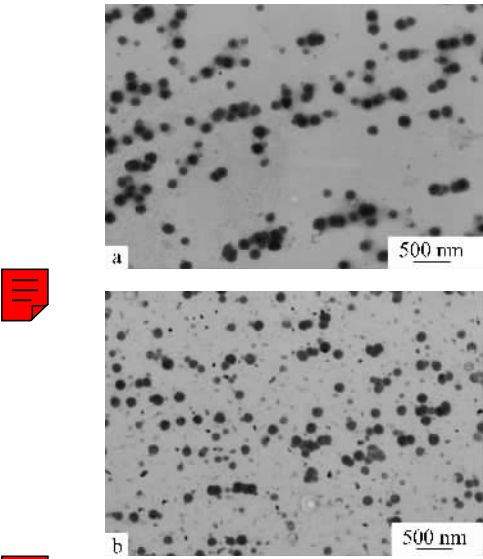


Fig. 3 TEM photographs of PEO-*b*-PEDMM micellar aggregates with PEO-*b*-PEDMM₃₄ (a) and PEO-*b*-EDMM₁₇ (b)
The polymer concentration was 1 mg/mL in 10 mmol/L PB (pH 7.4).

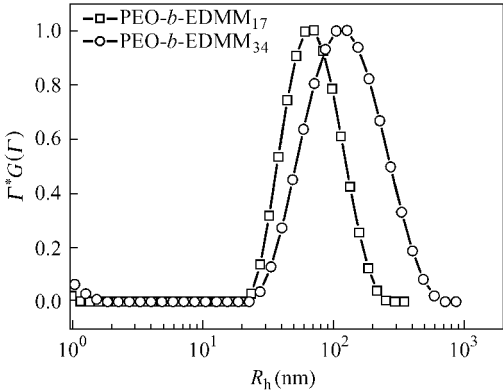


Fig. 4 Apparent hydrodynamic radius (R_h) distribution of PEO-*b*-PEDMM in phosphate buffer solutions (10 mmol/L pH 7.4) detected at the scattering angle of 90°

样品,用 0.2 mol/L 的 PB 缓冲液稀释聚集体溶液. 由图 5 可以看到 NR 的荧光强度随时间的变化表现出很强的 pH 依赖性. 与 pH 7.4 的溶液相比,在弱酸性溶液中,NR 的荧光强度随时间明显降低且下降程度随 pH 降低而增大,表明在弱酸性环境中聚集体疏水核中的原酸酯发生部分水解,产生羟基,NR 所处的微环境极性增加. 进一步的核磁氢谱结果表明 37℃ 时在 pH 7.4 的氘代水溶液中,180 h 内没有观察到明显的水解. 在 pH 5.0 的溶液中,12 h 后就可以看到因原酸酯水解产生的小分子乙醇和甲酸乙酯质子峰,水解程度随时间延长而增加.

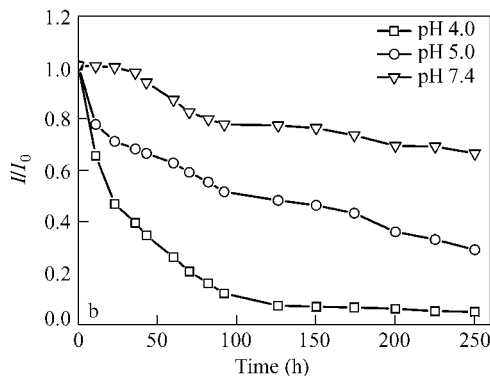
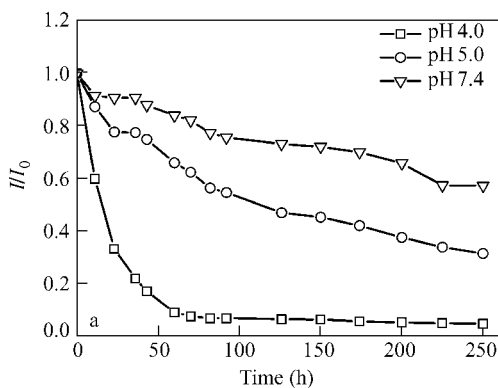


Fig. 5 pH-Dependent change of NR fluorescence intensity in the micellar aggregates of PEO-*b*-PEDMM₁₇ (a) and PEO-*b*-PEDMM₃₄ (b) in phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 mol/L) and acetate buffers (pH 4.0 or 5.0, 0.1 mol/L)

$\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$; NR concentration $10 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; Polymer concentration 1.0 mg/mL

6 结论

本文合成了含 PEO 及原酸酯侧基的两亲性嵌段共聚物并制备了酸敏感型纳米胶束状聚集体, 其尺寸和 ζ 受疏水链段的长度影响. 聚集体在中性水溶液中比较稳定, 但在弱酸条件下可

部分水解, 使疏水核或微区的极性增大. 但由于疏水链段的疏水性较强, 即使在 pH 4.0 的水溶液中水解也很慢. 可以通过调节疏水段的结构改善聚合物的亲水性及酸催化水解行为, 相关的研究正在进行中.

REFERENCES

- Rijcken C J F, Soga O, Hennink W E, van Nostrum C F. J Control Release, 2007, 120: 131 ~ 148
- Gil E S, Hudson S A. Prog Polym Sci, 2004, 29: 1173 ~ 1222
- Lee E S, Na K, Bae Y H. Nano Lett, 2005, 5: 325 ~ 329
- Henry S M, El-Sayed M E H, Pirie C M, Hoffman A S, Stayton P S. Biomacromolecules, 2006, 7: 2407 ~ 2414
- Gillies E R, Frechet J M J. Chem Commun, 2003, 1640 ~ 1641
- Gillies E R, Jonsson T B, Frechet J M J. J Am Chem Soc, 2004, 126: 11936 ~ 11943
- Gillies E R, Frechet J M J. Bioconjugate Chem, 2005, 16: 361 ~ 368
- Cordes E H, Bull H G. Chem Rev, 1974, 74: 581 ~ 603
- Heller J, Barr J, Ng S Y, Abdellauoi K S, Gurny R. Adv Drug Del Rev, 2002, 54: 1015 ~ 1039
- Chen H G, Zhang H Z, McCallum C M, Szoka F C, Guo X. J Med Chem, 2007, 50: 4269 ~ 4278
- Stempel G H, Cross R P, Mariella R P. J Am Chem Soc, 1950, 72: 2299 ~ 2300
- Huang X N, Du F S, Ju R, Li Z C. Macromol Rapid Commun, 2007, 28: 597 ~ 603
- Lin S, Du F S, Wang Y, Ji S P, Liang D H, Yu L, Li Z C. Biomacromolecules, 2008, 9: 109 ~ 115
- Jiang J Q, Tong X, Morris D, Zhao Y. Macromolecules, 2006, 39: 4633 ~ 4640
- Yasugi K, Nagasaki Y, Kato M, Kataoka K. J Control Release, 1999, 62: 89 ~ 100
- Yang C, Li W, Wu C. J Phys Chem B, 2004, 108: 11866 ~ 11870

ACID SENSITIVE MICELLAR AGGREGATES BASED ON AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMERS WITH PENDANT CYCLIC ORTHOESTER

HUANG Xiaonan, DU Fusheng, YANG Jun, LI Zichen

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Polymer Chemistry and Physics of Ministry of Education,
College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Acid-sensitive polymeric micelles have great potential as carriers for target drug delivery systems. In this work, a methacrylate monomer with cyclic orthoester group, (2-ethoxy-5-methyl-1,3-dioxan-5-yl) methyl methacrylate (EDMM), was synthesized. Two acid-sensitive amphiphilic block copolymers, PEO-*b*-PEDMM₁₇ and PEO-*b*-PEDMM₃₄, were prepared by the atom transfer radical polymerization of EDMM using a PEO macroinitiator (molecular weight *ca.* 2000 Da). The compositions and molecular weights of the two block copolymers were measured by using ¹H-NMR and GPC, respectively. Both polymers are not water soluble due to the hydrophobicity of PEDMM segments. However, micellar aggregates with sizes of 60 ~ 200 nm were obtained by slowly adding excessive phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4) to the polymer solutions in tetrahydrofuran (THF) and then evaporating THF. The micellar aggregates were characterized by dynamic light scattering, transmission electronic microscopy and Nile Red fluorescence probe. PEO-*b*-PEDMM₁₇, the polymer with a shorter hydrophobic chain length, had a lower critical aggregation concentration (*cac*) and formed micellar aggregates with smaller size compared with PEO-*b*-PEDMM₃₄. pH-Dependent hydrolysis of the aggregates were monitored by Nile Red (NR) probe and ¹H-NMR approaches, showing that the polymer aggregates were stable at pH 7.4, but the polarity of the micellar core increased with time at pH 5.0 due to the acid-triggered hydrolysis of the orthoester groups. This type of acid sensitive micellar aggregates may find applications as carriers for tumor tissue and/or intracellular drug delivery.

Keywords Orthoester, PEO, Block copolymer, Acid-sensitive, Micellar aggregate