

具有 pH-响应性的聚天冬氨酸类载药胶束的 制备和释放能力研究*

于树芳¹ 王 铮¹ 伍国琳^{1**} 王亦农¹ 高 辉² 马建标²

(¹功能高分子材料教育部重点实验室 南开大学高分子化学研究所 天津 300071)

(²天津理工大学化学化工学院 天津 300191)

摘 要 通过大分子引发剂 ω -氨基- α -甲氧基聚乙二醇引发 *N*-羧基- α -氨基环内酸酐开环聚合和水合肼侧基改性,制备了一系列聚乙二醇-聚氨基酸类三嵌段共聚物.其中聚氨基酸链段包括具有酰胺基的聚天冬氨酸衍生物(PAHy),以及疏水性的聚丙烯酰胺链段.引入具有 pH 响应性的脲键键合阿霉素,利用键合阿霉素与游离阿霉素之间的 π - π 叠合作用,在聚合物自组装形成胶束过程中通过化学键合+物理包埋的方式充分负载药物.该胶束以聚丙烯酰胺链段为核心,以 PEG 链段为冠层,以 PAHy 链段为包裹药物的壳层.载药胶束的粒径在 170 nm 左右.研究不同 pH 值条件下载药胶束的药物释放能力,随环境 pH 值的降低药物的释放速率显著增加.

关键词 聚天冬氨酸,脲键,阿霉素, pH-响应性

传统化疗药物在正常组织和肿瘤组织之间缺乏特异性,使其临床应用受到很大限制.如何减少非靶器官的药物浓度、增强疗效、减轻毒副作用,已成为临床抗癌药物应用的一个热门课题.利用肿瘤细胞外、细胞内和正常组织 pH 环境的差异,设计根据环境 pH 值变化自动调节结构和形态的聚合物载药纳米粒子、实现肿瘤靶向药物释放,是目前抗癌药物载体研究的一个重要方面.聚氨基酸类材料具有良好的生物相容性、生物可降解性和特殊的二级结构,广泛应用于药物载体领域.通过与亲水性聚合物(如聚乙二醇)共聚,得到的两亲性聚氨基酸类材料能够自组装形成纳米尺度的胶束粒子,可用作抗癌药物载体.另外,聚氨基酸具有丰富的侧链基团,可通过侧基改性调节其 pH-响应性,从而智能地识别癌症病灶区,提高药物的生物利用率,降低对正常组织的伤害.

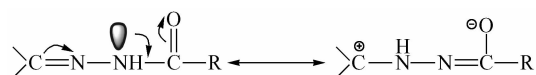
聚合物载药胶束按载药方式可分为物理包埋、共价键合、共价键合+物理包埋等几种,其中高分子载体除了包埋或键合的基本功能外,还可能有 pH 响应性和还原响应性,以便实现在肿瘤细胞内的快速释放.共价键合式载药胶束结构稳定,但药物负载量较低.物理包埋方式可以大大提

高聚合物胶束的载药量,但由于药物与胶束内核通过疏水相互作用等弱相互作用力结合,胶束结构稳定性差,药物输送过程中容易导致药物的渗漏.共价键合+物理包埋方式可通过键合药物和游离药物之间的相互作用有效提高药物的负载率和胶束稳定性.传统药物键合使用较多的是酰胺键和酯键.研究发现键合的药物分子不具有活性,仅当化学键断裂还原出小分子药物才具有活性.酰胺键在酸性条件下较为稳定,键合的药物分子在体内难以释放.酯键连接的大分子药物在体内酯酶作用下断裂而快释放药物,但酯酶的分布不具有特异性,难以实现肿瘤靶向药物释放的目的.理想的连接体是在转运过程中应该保持稳定、在转运到肿瘤部位时则以适宜的速度释放药物.亚胺键在弱酸性条件下会迅速水解,然而很少用于药物释放系统,因为亚胺键在生理 pH 条件下不稳定. pH-响应性脲键是一种较为理想的共价键连接体^[1],与传统的酰胺键和酯键不同,脲键对酸性环境敏感、键的断裂不需要溶酶体酶.相对于亚胺键来说,脲键具有更加稳定的特点,可存在于中性或者碱性环境,这主要是由于酰胺氮原子的孤对电子通过与双键 π 电子形成 p- π 共轭(中介

* 2011-07-12 收稿,2011-09-01 修稿;天津市自然科学基金(基金号 09JCYBJC03400,10JCYBJC26800)、973 计划前期研究专项(项目号 2009CB626612)、高等学校博士学科点专项科研基金(基金号 20090031120012)和中央高校基本科研业务费专项基金资助;** 通讯联系人, E-mail: guolinwu@hotmail.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11222

效应)得以稳定:



只有在酸性溶液或者在高温催化下,脲键的水解和转胺速率才会得到显著的提高.

在生理 pH 值下(7.4),脲键非常稳定,而当 pH 值降到 5~6 之间时(对应内涵体及溶酶体的环境 pH),脲键迅速裂解并释放药物^[2].有报道表明通过键合阿霉素(DOX)和游离 DOX 之间的 π - π 叠合作用可显著提高高分子与药物分子间的结合力,从而提高药物的包封率. Kataoka 等将阿霉素通过酰胺键键连到聚乙二醇-聚天冬氨酸的侧链上,可以有效地提高包封率(包封率可以由 10% 提高到 65%^[3]).本文使用水合肼对聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯-聚丙氨酸进行胺解改性从而引入酰肼基,并使之与 DOX 上的羰基反应,通过 pH-响应性脲键链接药物.再利用此键合药物的大分子作为载体来负载药物,研究其药物负载和释放能力.

1 实验部分

1.1 主要原料

mPEG-NH₂ ($M_n = 5000$) (自制^[4]),天冬氨酸苄酯(BLA),参照文献[5]制备,白色片状固体,产率 24.3%,mp 为 172~173℃(文献值 173~175℃^[6]).天冬氨酸苄酯-N-羧酸酐(BLA-NCA)与丙氨酸-NCA(A-NCA),参照文献[7]制备. BLA-NCA 产率 86%,mp 为 125~126℃,A-NCA 产率 48%,mp 为 90.6℃.结果显示 2 种物质的熔点与文献中的基本一致^[5,8].水合肼(85%)(分析纯,天津光复化学试剂公司),DOX 盐酸盐(分析纯,北京华奉联博科技有限公司).

1.2 聚乙二醇-聚天冬酰肼-聚丙氨酸(mPEG-PAHy-PLA)三嵌段共聚物的合成

采用自行合成的引发剂(mPEG-NH₂)逐步引发 N-羧酸酐(NCA)开环聚合,合成聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯-聚丙氨酸三嵌段共聚物.设计聚合度 113:15:5,实际聚合度为 113:8:3.参照文献[9],0.36 g mPEG-*b*-PBLA-*b*-PLA、1.56 g 水合肼和 12 mL DMF 依次加入到 50 mL 双口瓶中,避光、50℃ 搅拌反应 48 h.反应液转移到透析袋(截留分子量 3500)中,以蒸馏水透析 2 天,透析液冻干得白色粉末状固体,产率 85%.

1.3 聚乙二醇-聚天冬酰肼(阿霉素)-聚丙氨酸(mPEG-PAHy(DOX)-PLA)三嵌段共聚物的合成

参照文献[10],0.15 g mPEG-*b*-PAHy-*b*-PLA、0.29 mg DOX 盐酸盐(相对酰肼基 1.2 倍摩尔过量)和 15 mL DMSO 依次加入 50 mL 双口瓶中,避光状态下室温反应 24 h,将反应液转移到透析袋中(截留分子量 3500),以 pH=7.4 的磷酸缓冲溶液透析 2 天后冻干得 0.05 g 红色粉末状固体 mPEG-*b*-PAHy(DOX)-*b*-PLA,产率 33%.利用紫外分光光度检测 DOX 含量,计算出 DOX 盐酸盐偶联率为 4%,具体合成步骤见图 1.

1.4 载药胶束的制备

采用透析法制备载药共聚物胶束.将一定质量量的 mPEG-PAHy(DOX)-PLA(50 mg)和 DOX·HCl(10 mg)、三乙胺(8 μ L)加入到 DMSO(2 mL)中,避光、磁力搅拌 24 h 使之完全溶解,之后缓慢滴加二次蒸馏水(8 mL)并继续搅拌 24 h 使载药胶束稳定.载药胶束溶液转入截留分子量为 3500 的透析袋中,避光状态下以 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液透析 24 h.透析液冻干后得红色粉末状固体即载药胶束.计算 mPEG-PAHy(DOX)-PLA 三嵌段共聚物载药胶束的药物包封率为 33%,负载量为 6.2%.

1.5 药物释放试验

载药胶束的粒径使用 Malvern Nano-ZS90 动态光散射仪在水相测试,测试前使用孔径 0.45 μ m Millipore 过滤膜除尘.

称取 10 mg 的载药胶束,以 2 mL 指定 pH 值缓冲溶液溶解后转入截留分子量为 3500 的透析袋中,放在 8 mL 相同 pH 值缓冲溶液中,在 37℃、120 r/min 恒温水浴摇床中振荡放药.每隔一定时间取出 3 mL 袋外缓冲液,利用紫外分光光度计检测释药量,并同时补充 3 mL 同 pH 缓冲液.

1.6 测试与表征

1.6.1 红外光谱测定

样品与 KBr 粉末研磨制片,采用 Bio-Rad FTS 6000 傅立叶红外光谱仪测定.

1.6.2 ¹H-NMR 测定

使用 Varian UNITY Plus-400 核磁共振谱仪,以 CF₃COOD 为溶剂,室温下测定¹H-NMR 谱.

1.6.3 透射电子显微镜(TEM)测定

将透析得到的载药胶束的水溶液滴在铜网上,在 Tecnai G220 Stwin 透射电子显微镜上观测

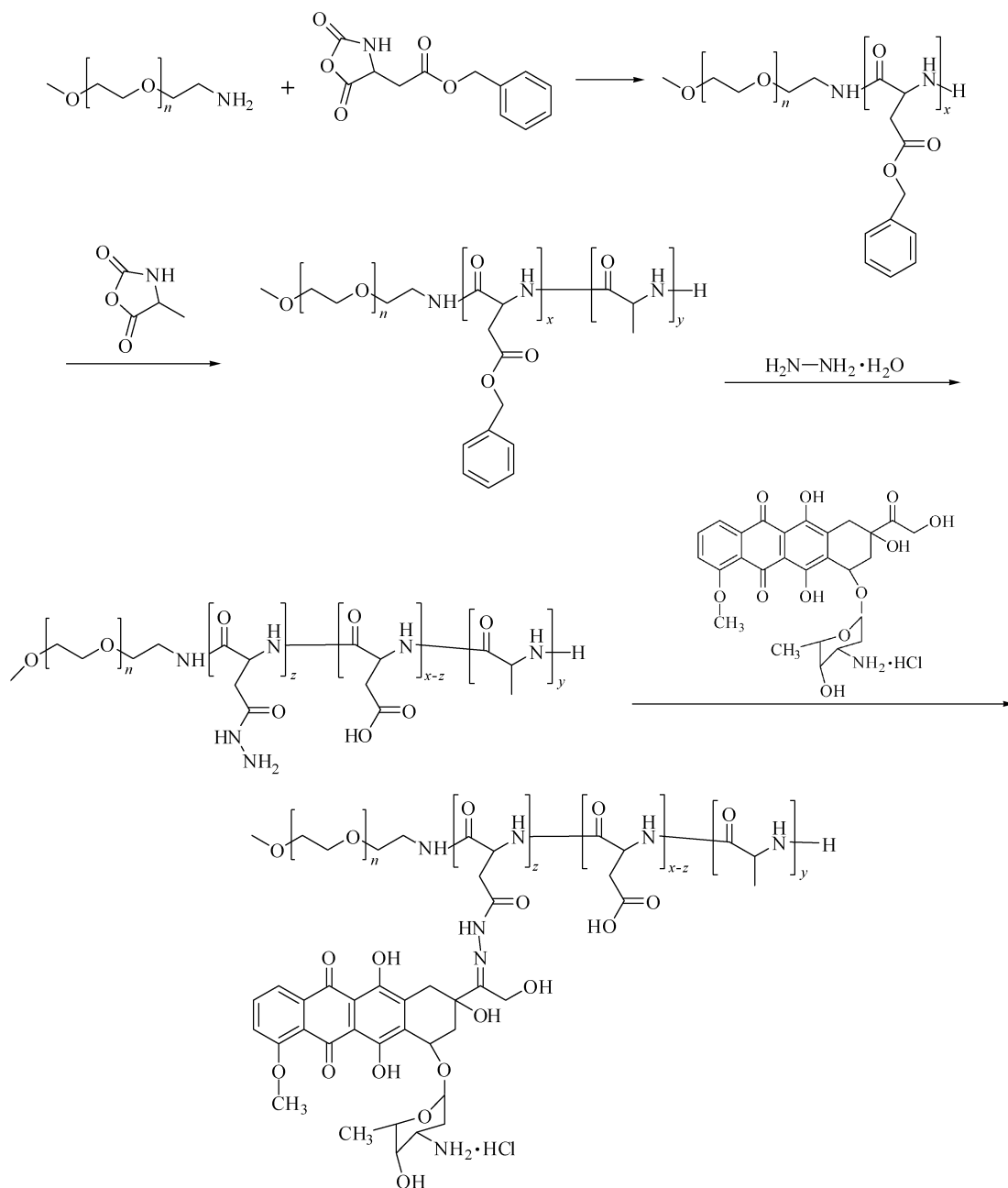


Fig. 1 Synthesis of mPEG-PAHy (DOX)-PLA triblock copolymer

胶束的形态结构,加速电压为 200 kV.

2 结果与讨论

2.1 水合肼的胺解改性

水合肼胺解改性前后的 IR 谱图见图 2.

从图中可以看出,改性后位于 1548 和 1448 cm^{-1} 的苯环 C=C 振动峰和位于 757、676 cm^{-1} 的单取代苯环特征峰消失;1628 cm^{-1} 的酰肼 C—N 振动信号峰出现,证明生成了酰肼化合物.

文献报道对 PBLA 侧基改性引入酰肼基的方法大致有 4 种:使用水合肼、*N*-叔丁氧基羰基肼

(Boc-肼)或纯肼直接胺解,以及先对 PBLA 酸性水解、再利用羧基和氨基的缩合连接肼基.使用水合肼作为肼解试剂,产物中同时含有酰肼基和羧基^[11].Boc-肼和纯肼胺解产物的取代度较高、不会生成羧基等基团.受 Boc 基团强吸电子作用影响,Boc-肼伯胺孤对电子亲核进攻能力较差,胺解反应效率较低;纯肼的反应活性较高,产物后处理简单,但纯肼本身不稳定,实验危险性较大.羧基-氨基缩合路线受酰胺化反应效率影响,肼基转化率较低.

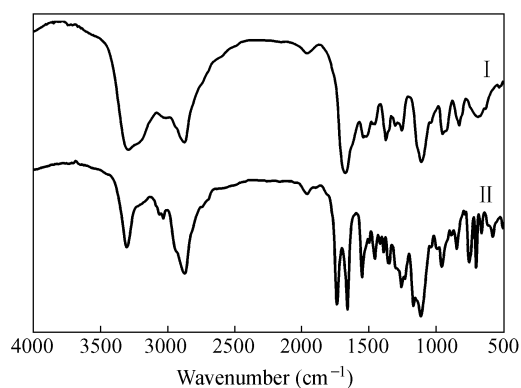


Fig. 2 IR spectra of triblock copolymer mPEG-PAHy-PLA1a (I) and mPEG-PBLA-PLA1a (II)

2.2 脲键的生成

三嵌段共聚物 mPEG-PAHy-PLA1a 键合 DOX 前后及 DOX·HCl 的 IR 谱图如图3所示。

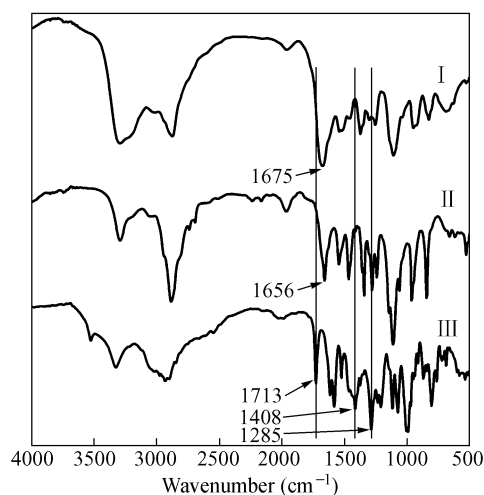


Fig. 3 IR spectra of triblock copolymer mPEG-PAHy-PLA1a (I), mPEG-PAHy (DOX)-PLA1a (II) and DOX·HCl (III)

DOX 中的酮 $C=O$ 振动和蒽环特征吸收峰分别位于 1408 和 1285 cm^{-1} [12]。聚合物 mPEG-PAHy-PLA1a 与 DOX 结合后,产物的 IR 谱图(II)在上述位置出现吸收峰;而位于 1731 cm^{-1} 的 DOX 13-C 羰基 $C=O$ 伸缩振动峰消失. I 中位于 1675 cm^{-1} 的峰是单酰肼基 $C=O$ 伸缩振动,结合 DOX 后(II)由于 $p-\pi$ 共轭作用,这一特征吸收峰向低波数移动(1656 cm^{-1}) [13],说明 DOX 通过脲键结合到聚合物链上。

以脲键连接 DOX 后,共聚物的 PAHy 链段疏水性增加. 键合 DOX 可通过 $\pi-\pi$ 叠合作用有效吸附游离 DOX,提高药物包封率和载药量. 当环境 pH 值降低脲键断裂,键合 DOX 脱落,导致

PAHy 链段恢复亲水性,链段伸展,药物扩散速度增加,同时释放出化学键合和物理包埋的 DOX,有效提高药物的生物利用度 [14]。

2.3 载药粒子的药物释放研究

结合阿霉素后,PAHy (DOX) 链段疏水性增加,与 PLA1a 链段共同作为胶束的疏水内核,胶束平均粒径为 $(170.0 \pm 6.6)\text{ nm}$, $PDI = 0.314$. 胶束粒径分布和透射电镜照片见图 4 和图 5。

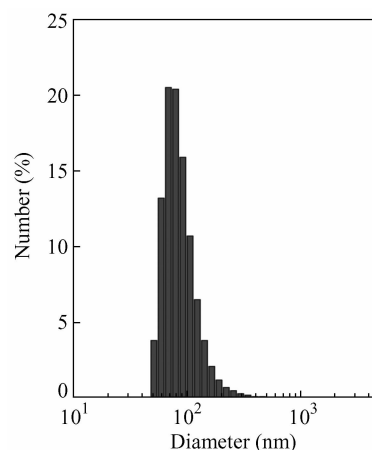


Fig. 4 Number distribution of drug loaded mPEG-PAHy (DOX)-PLA1a micelles

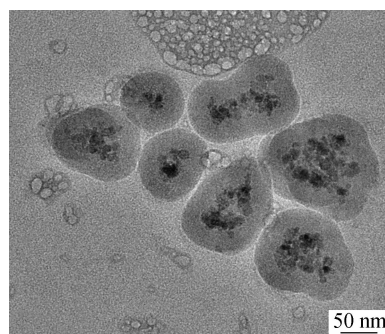


Fig. 5 TEM images of drug loaded mPEG-PAHy (DOX)-PLA1a micelles

载药胶束在不同 pH 值下的药物释放曲线见图 6。

随着体系 pH 值的下降,胶束的药物释放速度和累积释放量明显增加;在 pH 4.5 条件下,60 h 后药物趋近完全释放, pH 6.5 (肿瘤细胞外环境)条件下,60 h 后 60% 以上药物得到释放. 这是由于酸性条件下脲键水解,键合的 DOX 脱落;同时,聚天冬氨酸链段由疏水变为亲水、链段伸展,包埋药物的扩散和释放速率增加. 在 pH 7.4 条件下,脲键比较稳定,但是聚天冬氨酸链段的羧基在此 pH 值下去质子化而使聚合物链段亲水性增加,也造成了一定量的 DOX 释放. 药物释放过程

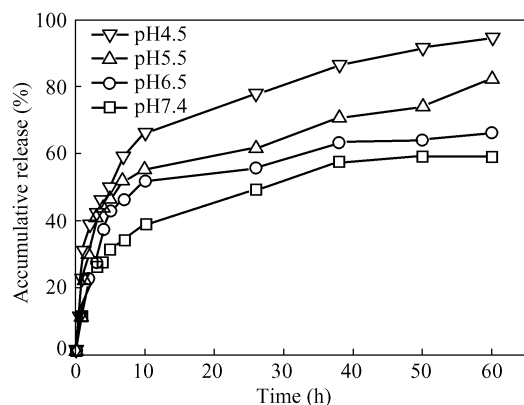


Fig. 6 Accumulative drug release curves of triblock copolymer mPEG-PAHy (DOX)-PLA at different pH

可表示为图 7.

3 结论

使用水合肼对聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯-聚丙氨酸三嵌段共聚物进行改性,引入酰肼基.酰肼基和 DOX 的羰基反应,得到具有 pH-响应性脰键键合阿霉素的聚乙二醇-聚天冬酰肼(阿霉素)-聚丙氨酸三嵌段共聚物,在水相自组装形成核-壳-冠三层胶束,其中 PLAla 链段作为胶束的核心,PEG 链段作为胶束的冠层. PAHy (DOX) 链段作为胶束的壳层,利用键合 DOX 与游离 DOX 之间的 $\pi-\pi$ 叠合作用,通过化学键合 + 物理包埋的方

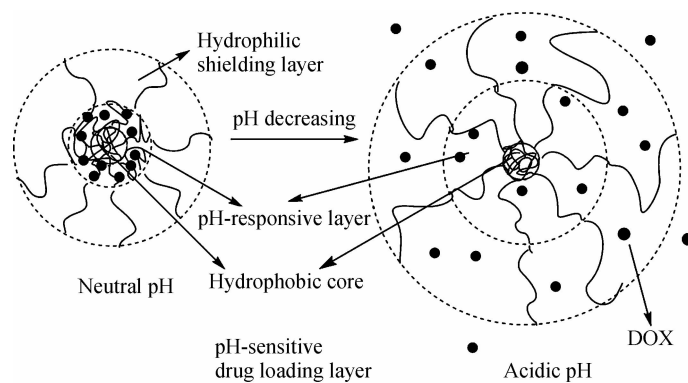


Fig. 7 Structure of drug loaded mPEG-PAHy(DOX)-PLA triblock copolymer micelle and its drug releasing behavior

式充分负载药物.随着环境 pH 值降低造成酰脰键断裂,PAHy 链段亲水性增加,链段伸展,药物释放速率得以提高.

REFERENCES

- 1 Prabakaran M, Grailer J J, Pilla S. Biomaterials, 2009, 30(29): 5757 ~ 5766
- 2 Ponta A, Bae Y. Pharm Res, 2010, 27: 2330 ~ 2342
- 3 Bae Y H, Kataoka K. Adv Drug Delivery Rev, 2009, 61: 768 ~ 784
- 4 Zhang G L, Ma J B, Li Y H, Wang Y N. J Biomater Sci, Polym Ed, 2003, 14(12): 1389 ~ 1400
- 5 Blout E R. J Am Chem Soc, 1956, 78: 941 ~ 946
- 6 Tang Guping(汤谷平), Chen Qiqi(陈启琪). J Biomed Eng(生物医学工程学杂志), 1997, 14(2): 99 ~ 100
- 7 William H D, Drew P. Tetrahedron Lett, 1988, 29(46): 5859 ~ 5862
- 8 Zhu Kalin(朱卡琳), Tang Guping(汤谷平), Chen Qiqi(陈启琪). Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 1998, 33(12): 906 ~ 909
- 9 Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M. Biochem Pharmacol, 2001, 62: 1531 ~ 1536
- 10 Bae Y, Jang W D, Nishiyama N. Mol Bio Syst, 2005, 1: 242 ~ 250
- 11 Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M. Biochem Pharmacol, 2001, 62(11): 1531 ~ 1536
- 12 Peng M L, Liu Y H, Zhang H. Chin J Chem, 2010, 28: 1291 ~ 1295
- 13 Lu D X, Wen X T, Liang J. Chinese J Polym Sci, 2008, 26(3): 369 ~ 374
- 14 Bae Y, Fukushima S, Harada A. Angew Chem Int Ed, 2003, 42: 4640 ~ 4643

ANTI-TUMOR DRUG DELIVERY OF A pH-SENSITIVE POLY(ASPARTIC ACID)-CONTAINING BLOCK COPOLYMER

Shu-fang Yu¹, Zheng Wang¹, Guo-lin Wu¹, Yi-nong Wang¹, Hui Gao², Jian-biao Ma²

(¹ Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

(² School of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300191)

Abstract A novel biodegradable ABC type triblock copolymer was synthesized by *N*-carboxyl anhydride ring-opening polymerization. Triblock copolymer mPEG-poly(asparthyl hydrazide)-PLA_la (mPEG-PAHy-PLA_la) was synthesized by hydrazine aminolysis. DOX was conjugated to the polymer through a pH-sensitive hydrazone bond. High drug-loaded polymeric micelles were obtained *via* the π - π interaction between conjugated and free DOX molecules. FTIR, dynamic light scattering, UV and TEM were used in the characterization and measurements. It was found that this polymer/drug complex could form nano-scaled core-shell-corona trilayer particles in aqueous solution. PLA_la, PAHy(DOX) and PEG blocks served as the hydrophobic core, pH-sensitive shell and hydrophilic corona, respectively. The drug release experiments displayed a pH-dependent behavior that DOX release rate increased significantly as the environmental pH value dropped from physiologically 7.4 to acidic values resulted from the cleavage of hydrazone bonds and the increasing of hydrophilicity of PAHy segments at lower pH values. This new platform represents a promising candidate in the formulation of targeted drug delivery systems to the low pH tumor tissues.

Keywords Poly(aspartic acid), Hydrazone bond, DOX, pH-responsive