

基于硼酸邻苯二酚酯键的硼替佐米 pH 敏感型 可控释放模型的研究*

杨伯涵¹ 赵外鸥² 李采金¹ 李亚鹏^{1**} 王静媛¹

(¹ 吉林大学麦克德尔米德实验室 化学学院 长春 130012)

(² 吉林大学第一医院 长春 130012)

摘 要 通过硼酸邻苯二酚酯键将抗癌药物硼替佐米(bortezomib, BTZ)连接到两亲型梳状聚衣康酸接枝共聚物(PIA-PEG-DDA-DPA)上,制备 pH 敏感型载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ. 通过核磁共振(NMR)表征了该聚合物的结构. DLS 和 AFM 测试结果表明,该聚合物流体力学直径较小约为 25 ~ 38 nm; 茈荧光法测定表明,其临界胶束浓度(CMC)为 2.54×10^{-3} mg/mL. 利用硼替佐米位于 310 nm 处的紫外特征吸收峰,分别在模拟生理 pH 值(7.4)及溶酶体和内涵体 pH 值(5.0)的条件下,研究聚合物的释药行为,结果表明,该体系在生理 pH 环境下基本无释药行为,在溶酶体和内涵体 pH 环境下,BTZ 的累计释放率随时间变化曲线符合一级动力学方程 $Q = 61.65866 - 62.13481e^{-0.32544t}$. 相关的细胞实验表明,该种载药聚合物体系对癌细胞的抑制作用明显,接近硼替佐米纯品的效果.

关键词 硼替佐米, 硼酸邻苯二酚酯键, pH 敏感, 释药方程

pH 敏感型纳米载药胶束进入生物体内后,由于 EPR 效应的影响,在肿瘤组织处具有高通透性和滞留性,易于在肿瘤组织处富集^[1~4]. 这些粒子最终通过内吞作用进入到癌细胞的溶酶体和内涵体,并在溶酶体和内涵体的酸性环境中(pH = 5.0)释放药物,从而杀灭癌细胞^[5~7].

硼酸邻苯二酚酯键是指硼酸基团 $B(OH)_2$ 与邻苯二酚基团 $ph(OH)_2$ 在弱碱性条件下脱水形成的共价键^[8],其特点是碱性条件下稳定,酸性条件下发生可逆性水解. 近年来,硼酸邻苯二酚酯键以其优异的 pH 敏感性^[9],越来越受到研究者的青睐,并被广泛应用于功能胶束的制备中^[10,11]. 硼替佐米,即哺乳动物细胞中 26s 蛋白酶体糜蛋白酶抑制剂^[12,13]. 体外实验表明,其对多种类型的癌细胞具有毒性. 临床用注射剂(万珂)主要用于多发性骨髓瘤及套细胞淋巴瘤的治疗^[14,15],为 FDA 近年批准的新型抗癌药物. 其结构中含有硼酸基团,可与邻苯二酚基团相互作用,从而形成具有 pH 敏感性的硼酸邻苯二酚酯键.

本文以酰胺化的方式,将多巴胺(dopamine, DPA)连接至两亲型梳状聚合物 PIA-PEG-DDA 中,从而在聚合物中引入邻苯二酚功能基团;进一步,将其与抗癌药物硼替佐米作用,通过硼酸邻苯二酚酯键形成了 pH 敏感的功能型载药聚合物胶束 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ. 利用紫外-可见吸收光谱分析,研究了其释放特性;同时,细胞毒性试验表明,该种功能聚合物对癌细胞有较为明显的抑制作用.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

衣康酸(IA),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;过硫酸钾,分析纯,北京化学试剂有限公司;十二胺(DDA),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;单侧氨基聚乙二醇(PEG),分析纯, Sigma-Aldrich 公司;二甲基亚砜(DMSO),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),化学纯,国

* 2013-09-22 收稿,2013-11-04 修稿;国家自然科学基金(基金号 20904014)、吉林省科技厅青年基金(基金号 20080119)和教育部青年基金(基金号 2070310)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: liyapeng@jlu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2014.13336

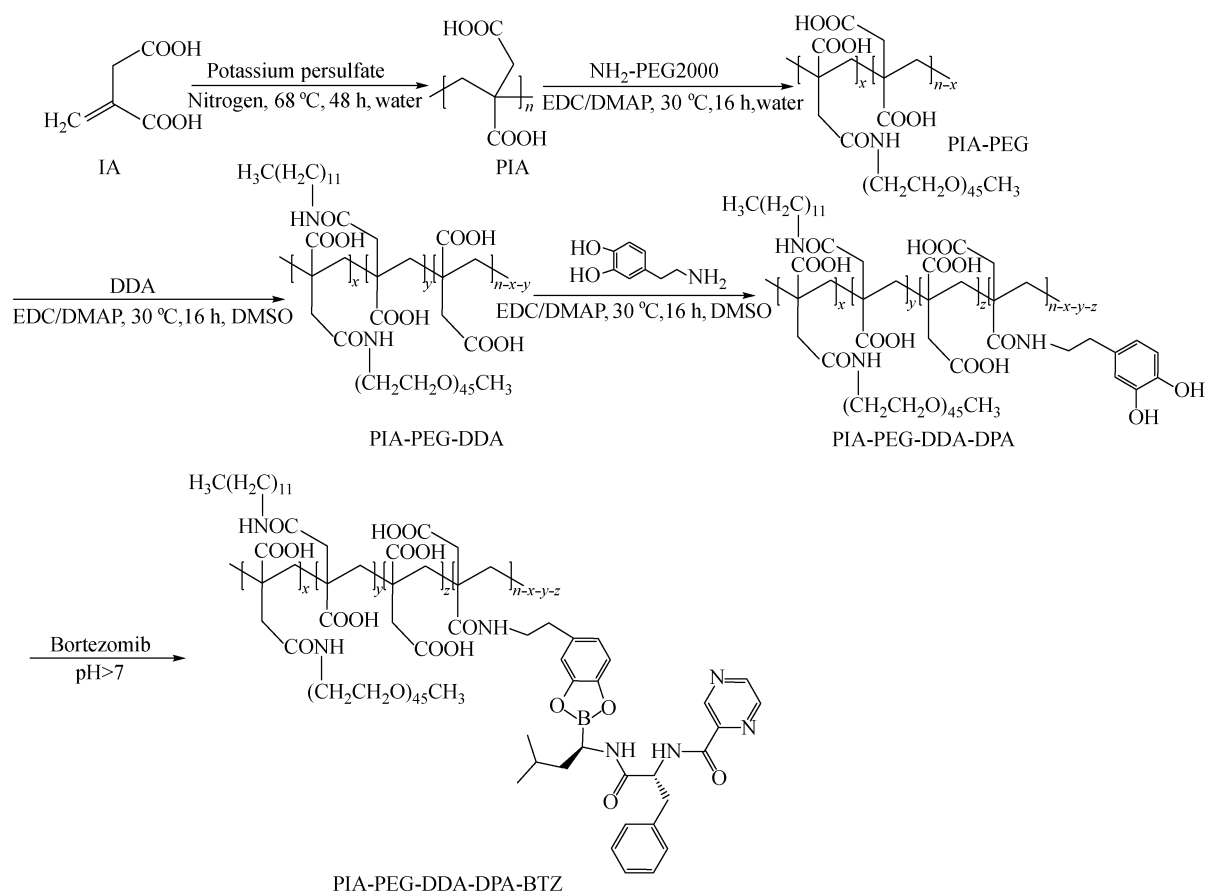
药集团化学试剂有限公司;4-二甲基氨基吡啶(DMAP),化学纯,Sigma-Aldrich 公司;多巴胺(DPA),化学纯,阿法埃莎(天津)化学有限公司;注射用硼替佐米(BTZ),BenVenue Laboratories, Inc.

核磁共振测试采用氘代 DMSO/重水作溶剂,用 ARX-500 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)进行;动态光散射(DLS)通过 zeta 电位分析仪(Brookhaven Instruments Corporation);紫外测试采用 ShimadzuUV-2450 UV-Visible spectrophotometer;原子力扫描电镜采用 Digital Instrument, Nanoscope IIIa, Multimode.

1.2 制备两亲型载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ

1.2.1 两亲型聚合物 PIA-PEG-DDA 的合成

如示意图 1 所示,通过自由基聚合的方式在水相中,氮气保护,以过硫酸钾为引发剂合成聚合物主链聚衣康酸(PIA);由于 PIA 仅能溶解于水,故在水相中,以 EDC/DMAP 为催化剂,通过酰胺化反应,将单侧氨基聚乙二醇(PEG)连接到聚合物主链上生成 PIA-PEG;进一步,以 DMSO 为溶剂,EDC/DMAP 为催化剂,将十二胺(DDA)连接至聚合物中,生成 PIA-PEG-DDA;上述反应产物均经 0 °C 丙酮反复洗涤,并使用截留分子量为



Scheme 1 Synthetic route of drug polymer conjugate: PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ

8000 ~ 14000 的透析袋透析一周除去未反应的物质后,再经过大量丙酮反复洗涤除去水分后,放入真空烘箱干燥至粉末状态.

1.2.2 载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 的合成

经质量法测算,上述产物 PIA-PEG-DDA 中,PEG 与 DDA 配体分别占 PIA 中羧基总数的 20.5% 和 21.6%. 取 PIA-PEG-DDA 固体 500 mg,

溶于 5 mL DMSO 中,加入 0.06 g DMAP,0.06 g EDC 活化 40 min 后加入 75.0 mg (0.49 mmol) DPA,30 °C 条件下反应 16 h 后,以与上述反应相同方式提纯处理,得到白色粉末状固体 PIA-PEG-DDA-DPA.

取 PIA-PEG-DDA-DPA 固体 300 mg,溶于 5 mL DMSO 中,加入 185 mg (0.49 mmol) BTZ 后,滴加若干滴 25% 四甲基氢氧化铵溶液调节 pH 至

微碱性,搅拌 24 h 后装入截留分子量为 8000 ~ 14000 的透析袋内,在弱碱性环境(1% 氨水)下透析 1 周,除去杂质,以丙酮洗涤数次除去水分,放入真空烘箱干燥至粉末状态.

1.3 聚合物胶束的溶液性质

将 10 mg PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 在一定量的 THF 中超声溶解,在此过程中,逐滴加入 10 mL 去离子水,挥发除去 THF,制备聚合物胶束.通过 DLS 及 AFM 测试其流体力学直径及形貌.取 11 只干燥的 10 mL 容量瓶,向每只容量瓶中注入 20 μL 芘(浓度为 $4.75 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)的丙酮溶液,待丙酮挥发后,将该胶束溶液在上述 11 个容量瓶中稀释成不同浓度梯度的溶液,通过芘荧光法测试其临界胶束浓度(CMC).

1.4 聚合物的光学性质研究

对 BTZ 进行紫外-可见吸收光谱测试,并以 BTZ 浓度为横坐标,BTZ 的紫外-可见吸收光谱第一吸收峰处吸光度为纵坐标,绘制纯 BTZ 的浓度-吸光度标准曲线.

1.5 载药聚合物的释药行为研究

配制不同浓度的硼替佐米水溶液并进行紫外-可见吸收光谱的测定,得到其浓度-吸光度标准曲线.

配制 1 mg/mL 浓度的聚合物胶束,取 5 mL 该胶束溶液装于截留分子量为 8000 ~ 14000 的透析袋内,并将透析袋置于内含 95 mL 磷酸缓冲溶液的 100 mL 圆底烧瓶内进行透析,每隔 1 h 抽取 5 mL 含有游离 BTZ 的缓冲溶液进行紫外-可见吸收光谱测定,得到释放率,绘制 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 的累计释放率随时间变化曲线,并利用 Origin 软件按照相关的药物释放模型进行释放方程拟合.

1.6 载药聚合物的细胞毒性研究

通过 MTT 法检测 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 胶束溶液对 HepG2 细胞的细胞毒性.向含 5000 细胞/孔的 96 孔板中加入含有 DMEM 的 FBS 细胞培养液,培养 24 h 后,分别加入浓度不同的 BTZ 溶液,PIA-PEG-DDA-DPA 胶束溶液和 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 胶束溶液并加入 PBS 缓冲溶液调节 pH 值至 7.4.经过 24 h 的培养后,将 20 μL 的 MTT(5 mg/mL)加入到孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 h.去除培养基质,将细胞中产生的蓝色甲臢晶体溶解在 100 μL 的 DMSO 中,使用 BioTexElx800 在 490 nm 处记录吸收值.

2 结果与讨论

2.1 聚合物的核磁表征

通过 GPC 测试,水相自由基聚合合法合成的 PIA 分子量(M_n)为 1.52×10^4 ,分子量分布指数(M_w/M_n)为 1.68.图 1 给出了 PIA 的核磁谱图,由于其仅溶于水,无法使用非水溶剂进行核磁表征,且聚合物内活泼氢过多,因而采用 ^{13}C -NMR 对 PIA 结构进行表征,如图 1.位于 $\delta = 180.54$ 与 $\delta = 180.17$ 处峰位为 PIA 季碳上羧基的等规排列和间规排列特征峰;位于 $\delta = 176.07$ 与 $\delta = 175.82$ 处峰位为 PIA 侧链上的仲碳上羧基等规排列和间规排列特征峰.位于 $\delta = 47.63$ 处峰位为主链上亚甲基特征峰,位于 $\delta = 45.28$ 处峰位为侧链上亚甲基特征峰,位于 $\delta = 36.60$ 处峰位为主链上季碳的特征峰.

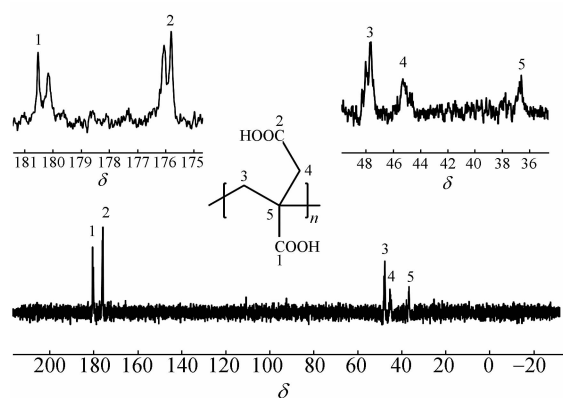


Fig. 1 ^{13}C -NMR spectra of PIA

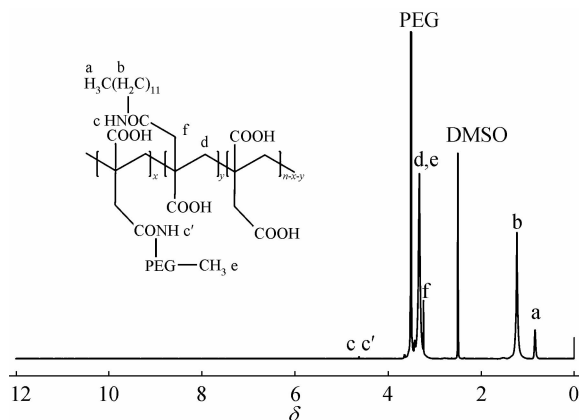


Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of PIA-PEG-DDA

图 2 给出了 PIA-PEG-DDA 的核磁谱图,以 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂,进行 ^1H -NMR 表征.图中 $\delta = 0.84$ 及 $\delta = 1.23$ 处峰位为 DDA 特征峰; $\delta = 3.50$ 处峰位为 PEG 中亚甲基特征峰; $\delta = 3.33$ 处的较

宽峰由 PEG 端基甲基及 PIA 主链中亚甲基合并而成; $\delta=3.24$ 处峰位为 PIA 侧链中亚甲基峰位; $\delta=4.62$ 处峰位为酰胺键特征峰位。

图 3 给出了 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 的核磁谱图,以 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂,进行 ^1H -NMR 表征。核

磁结果显示 BTZ 分子中各特征氢原子均可在谱图中得到清晰明确的归属。同时,通过对不同 BTZ 接入量的聚合物进行核磁积分测算,得到该载药聚合物中 BTZ 的最大含量为 46.0 mg/g (每克 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 含 BTZ 46.0 mg)。

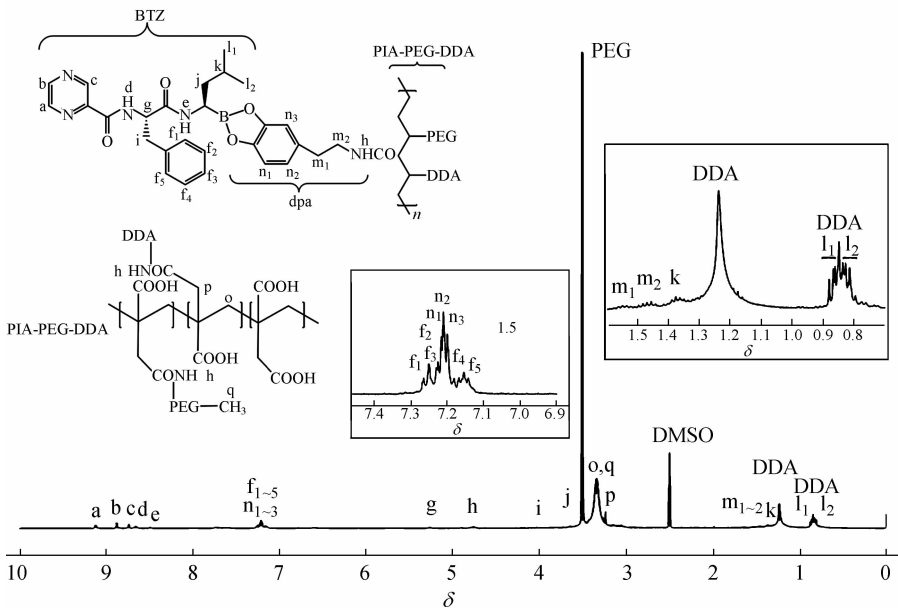


Fig. 3 ^1H -NMR spectra of PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ

2.2 聚合物胶束溶液的溶液性质

利用动态光散射(DLS)对 1 mg/mL 的胶束溶液进行了粒度测试,结果如图 4 所示,其流体力学直径约为 38.3 nm 。利用原子力扫描电镜(AFM)对同样浓度的胶束溶液进行测试,结果如图 5 所示,其形貌为较为规整的球形,粒径约为 25 nm ,较 DLS 测试所得结果偏小,这是由于 DLS 测试是在溶液状态下进行的,此时胶束处于溶胀

状态,即聚合物中亲水的 PEG 链段处于舒展状态,而 AFM 测试的是在干燥状态下的胶束,故而其值比 DLS 测定值偏小^[16]。

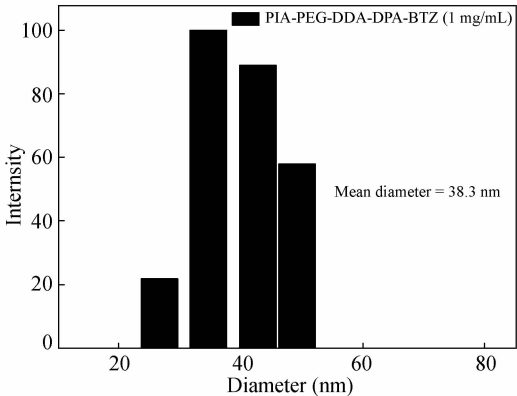


Fig. 4 Size of PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ micelles determined by dynamic light scattering test

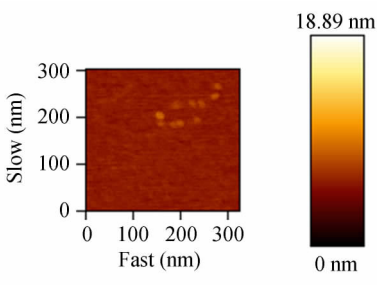


Fig. 5 AFM image of micelles formed by PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ

利用芘作为荧光探针来表征 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 的临界胶束浓度^[17,18]。测定 11 个不同浓度梯度的含芘的胶束溶液的荧光光谱,表 1 列出了不同浓度下芘荧光光谱中 I_{382}/I_{392} (I_3/I_2) 的值,以 I_3/I_2 为纵坐标,lgc 为横坐标作图如图 6,得到其临界胶束浓度为 $2.54 \times 10^{-3}\text{ mg/mL}$ 。

Table 1 Ratio of I_3 and I_2 of pyrene in different concentrations of polymer micelle

Concentration of micelle (mg/mL)	I_3/I_2
0.26	0.96550
0.676×10^{-1}	0.82179
0.457×10^{-2}	0.70109
0.119×10^{-2}	0.67347
3.089×10^{-4}	0.66282
8.032×10^{-5}	0.73937
2.089×10^{-5}	0.74414
5.429×10^{-6}	0.74541
1.412×10^{-6}	0.74133
3.670×10^{-7}	0.75618
9.543×10^{-8}	0.76362

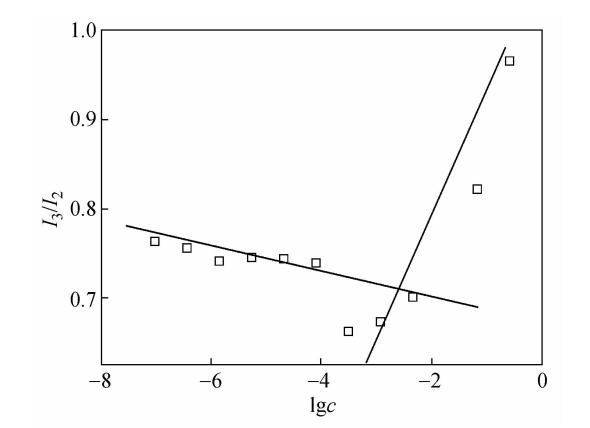


Fig. 6 Plot of intensity versus $\lg c$ for PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ

2.3 聚合物胶束溶液的光学性质

分别对纯 BTZ 和载药胶束进行紫外-可见吸收光谱分析如图 7,可知 BTZ 在 310 nm 处有明显的紫外特征吸收峰,将其连接到聚合物后,聚合物基本保持了原有的 BTZ 的峰型,峰位轻微蓝移至 300 nm 处,这是由于连接至聚合物后,BTZ 分子之间的偶极矩减小,导致 Stokes 位移减小,从而引发特征峰位蓝移,这也从侧面说明了载药聚合物的成功合成.

依据 BTZ 纯品的紫外-可见吸收光谱,以其位于 310 nm 处的特征吸收峰做浓度-吸光度标准曲线,结果如图 8,其相关系数 (R) 为 0.99995,符合定量测量要求.

2.4 载药胶束的释药行为研究

分别利用 pH 为 5.0 及 7.4 的缓冲溶液模拟肿瘤组织环境及正常组织环境.考察 pH 对 BTZ 释放的影响,通过对比标准曲线,绘制累计释放率曲线如图 9.由图 9 中可以看出,载药聚合物在模

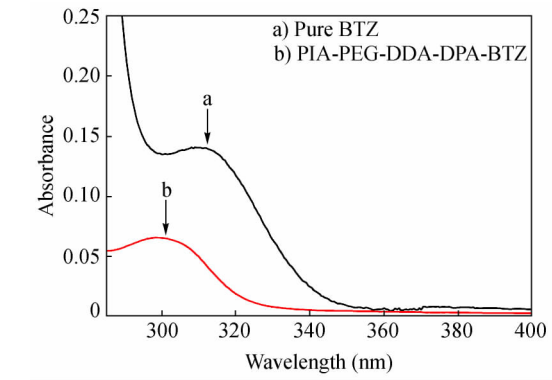


Fig. 7 UV spectra of (a) pure BTZ and (b) PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ

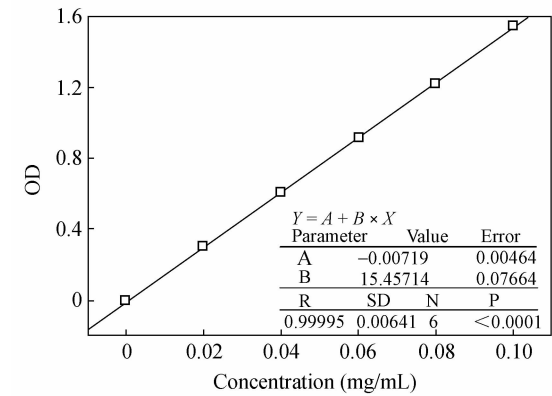


Fig. 8 Standard curve of BTZ in water solution

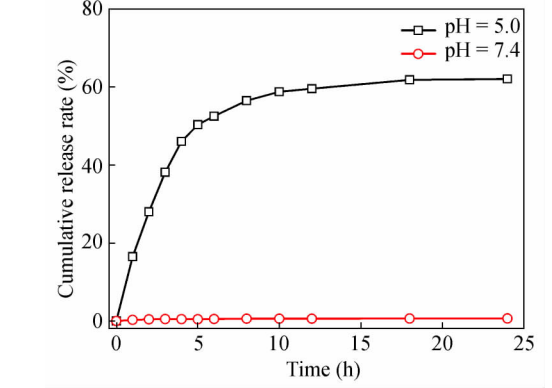


Fig. 9 Cumulative release rate of the BTZ conjugates in a releasing environment with pH values of 5.0 and 7.4

拟人体正常组织的环境中(即 $\text{pH} = 7.4$)基本无释药行为,其累计释放率不足 1%.在模拟肿瘤组织环境中(即 $\text{pH} = 5.0$)药物得到缓释,24 h 后,其累计释放量约为 62%.由于正常组织基本处于 $\text{pH} = 7.4$ 的环境中,载药聚合物将极大地减少 BTZ 对正常组织器官的副作用.同时,由于肿瘤部位组织异常,渗透压等体内微环境改变,载药胶束将遵循 EPR 效应,自主富集在肿瘤部位,从而实

现被动靶向,降低副作用,长效治疗的目的。

为进一步研究载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-DPA-BTZ 在 pH = 5.0 时的释药行为,利用 Origin 软件分别对累计释放率曲线进行了一级动力学方程,Higuchi 方程以及 Korsmeyer-Peppas 方程的拟

合,拟合结果如表 2 所示。可以看出,累计释放率-时间曲线较为完美地符合了一级动力学方程,其相关系数为 0.99798,这可为未来的临床治疗提供参考和依据。

Table 2 Fitting result of the drug release with different kinetics models in aqueous solution at pH5.0

Model	Equation	Adj. R-Square
First order model	$Q = 61.65866 - 62.13481e^{-0.32544t}$	0.99798
Higuchi model	$Q = 16.93004 \times t^{0.5}$	0.44605
Korsmeyer-Peppas model	$Q = 27.27438 \times t^{0.29312}$	0.78613

2.5 载药胶束的细胞毒性研究

图 10 给出了 BTZ,PIA-PEG-DDA-DPA 及载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 对 HepG2 细胞的毒性测试结果。从图 10 中可以看出,经过 24 h 的混合培养后,PIA-PEG-DDA-DPA 所有浓度组的细胞存活率均在 80% 以上,证明聚合物本身对细胞基本无抑制作用;同时,随着载药聚合物浓度的提高,PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 组细胞存活率呈

显著下降趋势,在较高浓度下,其对癌细胞的抑制作用可近似达到 BTZ 纯品的水平。这一实验结果充分的说明了载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ 达到了预期的设计目的,即在溶酶体和内涵体的酸性环境下释放药物,抑制癌细胞。

3 结论

通过引入硼酸邻苯二酚酯键,得到了 pH 敏感型载药聚合物 PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ,其在生理 pH 环境中基本无释药行为,在模拟溶酶体和内涵体的较低 pH 环境中具有明显的释药行为。细胞毒性实验同时表明,其对癌细胞的抑制作用可近似达到硼替佐米纯品的效果。此外,该种聚合物所形成的胶束粒径较小,在进一步的实验中,已选用该种胶束对量子点及氧化铁进行包覆,并进行相关的体外实验及动物实验,以期达到诊疗一体的目的,并取得了一定的成果。可以预计,利用硼酸邻苯二酚酯键将硼替佐米修饰到聚合物并制成载药胶束这一模型将在生物医学领域得到广泛的应用。

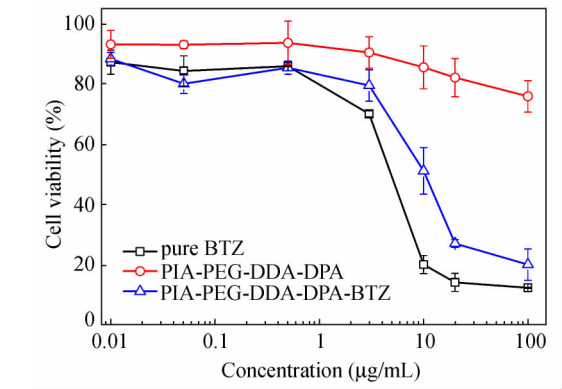


Fig. 10 Cell viability of pure BTZ, PIA-PEG-DDA-DPA and PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ in pH = 7.4 with different concentrations after 24 h

REFERENCES

1 Zhao Z H, Huang D T, Yin Z Y, Chi X Q, Wang X M, Gao J H. J Mater Chem, 2012, 22: 15717 ~ 15725
2 Teng Z G, Zhu X G, Zheng G F, Zhang F, Deng Y H, Xiu L C, Li W, Yang Q, Zhao D Y. J Mater Chem, 2012, 22: 17677 ~ 17684
3 Yu S J, He C L, Ding J X, Cheng Y L, Song W T, Zhuang X L, Chen X S. Soft Matter, 2013, 9: 2637 ~ 2645
4 Cheng K, Sun Z Y, Zhou Y M, Zhong H, Kong X K, Xia P, Guo Z, Chen Q W. Biomater Sci, 2013, 1: 965 ~ 974
5 Li Y, Xiao W, Xiao K, Berti L, Luo J, Tseng H P, Fung G, Lam K S. Angew Chem, 2012, 124: 2918 ~ 2923
6 Jain R K. J Control Release, 2001, 74: 7 ~ 25
7 Kwon G S; Kataoka K. Adv Drug Delivery Rev, 1995, 16: 295 ~ 309
8 Fang H, Kaur G, Wang B. J Fluoresc, 2004, 14: 481 ~ 489
9 Paugam M F, Valencia L S, Boggess B, Smith B D. J Am Chem Soc, 1994, 116: 11203 ~ 11204
10 He L H, Fullenkamp D E, Rivera J G, Messersmith P B. Chem Commun, 2011, 47: 7497 ~ 7499
11 Chen W X, Cheng Y F, Wang B H. Angew Chem Int Ed, 2012, 51: 5293 ~ 5295

- 12 Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank A A, Dick L R, Grenier L, Klunder J M, Ma Y T, Plamondon L, Stein R L. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 333 ~ 338
- 13 Groll M, Berkers C R, Ploegh H L, Ova H. *Structure*, 2006, 14: 451 ~ 456
- 14 Su J, Chen F, Cryns V L, Messersmith P B. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 11850 ~ 11853
- 15 Zhang L, Littlejohn J E, Cui Y, Cao X, Peddaboina C, Smythe W R. *Mol Cancer*, 2010, 9: 110 ~ 118
- 16 Jiang Ming(江明), Eisenberg A, Liu Guojun(刘国军), Zhang Xi(张希). *Macromolecular Self-Assembly (大分子自组装)(第一版)*. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2006. 310 ~ 312
- 17 Li Kun(李昆), Sun Ting(孙婷), Sun Yuan(孙媛), Yang Bohan(杨伯涵), Meng Xinlei(孟新蕾), Li Yapeng(李亚鹏), Wang Jingyuan(王静媛). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2012, (2): 180 ~ 186
- 18 Sun Ting(孙婷), Yang Bohan(杨伯涵), Li Kun(李昆), Li Yapeng(李亚鹏), Wang Jingyuan(王静媛). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2011, (10): 1138 ~ 1143

A pH-Sensitive Controlled Release Model for Bortezomib based on the Catechol Borate Ester Bond

Bo-han Yang¹, Wai-ou Zhao², Cai-jin Li¹, Ya-peng Li^{1*}, Jing-yuan Wang¹

(¹Alan G. MacDiarmid Institute, College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012)

(²The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130012)

Abstract A pH-responsive controlled release model for bortezomib (BTZ) based on catechol borate ester bond has been constructed successfully by poly(ethylene glycol) (PEG), dodecylamine (DDA) and dopamine (DPA)-modified poly itaconic acid (PIA) (PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ). Its structure was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR). The result showed that the targeted products were prepared successfully. The PIA-PEG-DDA-DPA-BTZ was then made into micelles. The sizes of the micelles formed by the polymer were tested by dynamic light scattering (DLS), and observed under atomic force microscope (AFM). According to the test, the micelles showed a spherical and monodispersed construct with very small diameter of about 35 nm. The critical micelle concentration (CMC) value was 2.54×10^{-3} mg/mL *via* pyrene fluorescence method. The standard curve of BTZ was portrayed based on the characteristic absorption peak of BTZ at 300 nm in UV-Vis absorption. The cumulative release rates of BTZ conjugates were then studied at pH 5.0 and pH 7.4, and the release behavior at pH 5.0 fits the first order kinetics model, $Q = 61.65866 - 62.13481e^{-0.32544t}$, the coefficient of determination was 0.99798. The cell viability studies showed that the micelles had a quite significant inhibitory effect on cancer cells which is close to that of the pure bortezomib. The pH-responsive controlled release model has the potential of becoming a promising diagnostic tool in clinical application for cancer treatment.

Keywords Bortezomib, Catechol borate ester bond, pH-sensitive, Model of drug release

* Corresponding author: Ya-peng Li, E-mail: liyapeng@jlu.edu.cn