

• 研究论文 •

乙二醇-聚(咪唑丙基-天冬酰胺)-聚丙氨酸三嵌段共聚物的合成及其 pH-响应性药物控制释放性能的研究

于树芳^a 顾鑫^a 伍国琳^{*,a} 王铮^a
王亦农^a 高辉^b 马建标^b

(^a 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)

(^b 化学化工学院 天津理工大学 天津 300191)

摘要 聚天冬氨酸及其衍生物是一种具有良好生物相容性和可生物降解性的高分子材料,被广泛应用于生物医药领域.本研究通过大分子引发剂 ω -胺基- 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 *N*-(3-氨基丙基)咪唑侧基改性,制备了一种侧链含有咪唑丙基的聚乙二醇-聚(咪唑丙基-天冬酰胺)-聚丙氨酸三嵌段共聚物.在水溶液中,此聚合物可自组装形成一种核-壳-冠型的三层共聚物胶束,其中疏水性的聚丙氨酸链段自聚集形成胶束的核,聚(咪唑丙基-天冬酰胺)链段形成具有 pH-响应性的壳层,用于包埋和释放药物,外围的聚乙二醇链段可以提供一个稳定的水合冠层,延长药物的体内循环时间.利用咪唑环与游离阿霉素之间的 π - π 相互作用和疏水相互作用可以在自组装的过程中将阿霉素包埋到胶束内.研究发现,载药胶束随环境 pH 值的降低药物的释放速率显著增加.这主要是由于咪唑环在酸性条件下的质子化导致链段亲疏水性质发生明显变化.

关键词 聚天冬氨酸;咪唑;阿霉素;pH-响应性;药物释放

Preparation and pH-Sensitive Drug Delivery Study of *m*PEG- poly(Imidazole Propyl-Asparagine)-poly(*L*-Alanine)

Yu, Shufang^a Gu, Xin^a Wu, Guolin^{*,a} Wang, Zheng^a
Wang, Yinong^a Gao, Hui^b Ma, Jianbiao^b

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

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

Abstract Stimuli-sensitive drug delivery systems have attracted considerable interest in recent years for biomaterials scientists. It is well known that the pH value drops from physiologically 7.4 to that lower than 6.5 in tumor tissues, and such difference can be used as a trigger for drug releasing. Poly(amino acid)s (PAAs) have been studied for decades in the fields of drug delivery system due to their biocompatibility, biodegradability, precise secondary conformation and structural versatility. In this study, a novel biodegradable ABC type triblock copolymer *m*PEG-poly(benzyl *L*-aspartate)-poly(*L*-Alanine) (*m*PEG-PBLA-PLA) was synthesized by *N*-carboxyl anhydride ring-opening polymerization. Imidazole groups were tethered to the side chains of poly(*L*-Asparagine) segments by aminolysis. It was found that this tri-block copolymer can form nano-scale core-shell-corona trilayer micelles in aqueous solution. The PLA, Poly(*L*-Asparagine)

* E-mail: guolinwu@hotmail.com

Received September 8, 2011; revised October 8, 2011; accepted November 30, 2011.

Project supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (Nos. 09JCYBJC03400, 10JCYBJC26800), the Ph.D. Programs Foundation for New Teachers of Education Ministry of China (No. 20090031120012) and Fundamental Research Funds for the Central Universities.

天津市自然科学基金(Nos. 09JCYBJC03400, 10JCYBJC26800)、高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20090031120012)和中央高校基本科研业务费专项基金资助项目.

and *m*PEG segments serve as a hydrophobic core, a pH-sensitive shell, and a hydrophilic corona, respectively. An antitumor agent, doxorubicin (DOX), was successfully loaded into the nanocarrier via combined actions of hydrophobic and π - π interaction. The drug release profiles displayed a pH-dependent behavior. DOX release rate increased significantly as the solution pH dropped from the physiological pH to acidic. This is most likely due to protonation and a change in hydrophilicity of the imidazole groups in the poly(*L*-Asparagine).

Keywords poly(aspartic acid); imidazole; DOX; pH-responsive; drug delivery

恶性肿瘤是当今世界严重威胁人类生命健康的疾病之一。其发病率逐年增加,且每年呈递增趋势。由于肿瘤组织与正常组织之间环境 pH 的差异,环境 pH 刺激响应性抗肿瘤载药体系应运而生。抗肿瘤药物需要面对的环境是肿瘤细胞的大量增殖造成肿瘤组织的厌氧和低 pH 环境。肿瘤细胞外的 pH 值(pH 6.8~7.2)和细胞内的内涵体(pH 5.5~6.0)、溶酶体(pH=4.5)明显低于周围组织和血液中的 pH 值(pH=7.4)。因此,人们研究利用肿瘤细胞和正常组织之间存在的 pH 的变化,来设计药物载体,使其对较小的 pH 改变产生响应,达到靶向控制释放药物,改善癌症治疗效果的目的^[1~3]。目前研究的 pH-响应性高分子药物载体主要通过两种策略构建:(1) 利用 pH-响应性化学键,如脲键、缩醛和原酸酯等酸敏感共价键来键合小分子药物,达到一个在酸性环境下化学键断裂释放药物的目的。这些共价键在酸性环境中会发生水解,广泛用于细胞内释放体系。Prabaharan 等^[4]将阿霉素(DOX)通过脲键连接到多臂双亲嵌段共聚物上,制备了具有 pH-响应性的肿瘤靶向载药体系。在弱酸性介质中(pH<6.6),DOX 可快速释放;而在 pH=7.4 的中性介质中,DOX 很少释放。但是由于正常生理条件 pH(7.4)与肿瘤细胞外 pH(6.8)之间的差异很小,通常要进入更低 pH 值的肿瘤细胞内,才能发生刺激响应,实现药物的释放,所以载药体系还是以细胞内吞的形式进入肿瘤细胞的。(2) 聚电解质。高分子链上带有一定的酸碱基团,环境 pH 值改变,造成酸碱基团的质子化或去质子化,发生电荷转换,使高分子链段的亲疏水性发生变化,从而引起整个高分子聚集态结构发生变化,达到控制释放药物的目的。例如,聚组氨酸与聚乙二醇形成的嵌段共聚物在 pH=7.4 时具有两亲性,可自组装形成载药纳米胶束。当环境 pH 值降低时,聚组氨酸上的咪唑环发生质子化,聚组氨酸链段由疏水性变为亲水性,胶束结构发生解离,达到释放药物的目的^[5]。咪唑基的 pKa 在 6.0 左右,当环境 pH 值小于 6.0 时,使用含有咪唑基的聚电解质亲疏水性会发生变化。此外,研究表明,当此类载体包裹阿霉素(DOX)等大环共轭类疏水性药物时,咪唑基和阿霉素药物分子间会产生 π - π 相

互作用,可以有效提高药物的包封率和药物载体在体内运输过程中的稳定性^[6]。氨解反应是常用的高分子侧链改性方法之一。Kataoka 等^[7~9]使用乙二醇或其衍生物对聚天冬氨酸苄酯进行氨解改性,此类反应条件温和,氨解效率高,不影响产物分子量和分子量分布。使用 3-氨丙基咪唑作为氨解试剂,可将聚天冬氨酸苄酯转变为含有咪唑基的聚天冬酰胺衍生物,从而赋予其一定的 pH-响应性能。

本文利用端氨基聚乙二醇单甲醚作为大分子引发剂,通过 NCA 开环聚合的方法制备了 ABC 型聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯-聚丙氨酸三嵌段共聚物,再通过氨丙基咪唑对其侧基进行氨解,赋予其 pH 响应性。文章系统研究了聚合物的结构、性能和 pH 响应性。利用阿霉素作为模型药物,研究了此类聚合物作为药物载体的体外释放性能。

1 实验部分

1.1 主要原料

*m*PEG-NH₂ (*M_n* = 5000)(自制^[10]),天冬氨酸苄酯(BLA),参照文献^[11]制备,白色片状固体,产率 24.3%,m.p.为 172~173 °C (文献值^[12]173~175 °C)。天冬氨酸苄酯-*N*-羧酸酐(BLA-NCA)与丙氨酸-NCA(A-NCA),参照文献^[13]制备。BLA-NCA 产率 86%,m.p.为 125~126 °C, A-NCA 产率 48%,m.p.为 90.6 °C。结果显示两种物质的熔点与文献中的基本一致^[11,14]。*N*-(3-氨丙基)咪唑(98%)购于阿拉丁试剂公司,DOX 盐酸盐(分析纯,北京华联博科技有限公司)。

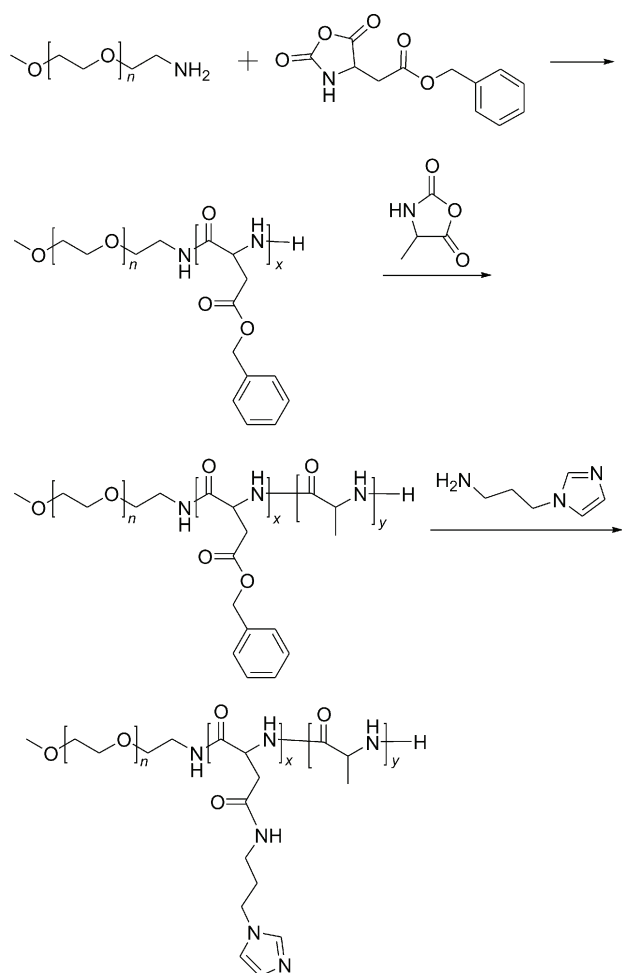
1.2 聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯-聚丙氨酸(*m*PEG-PBLA-PLA)三嵌段共聚物的合成

采用自行合成的引发剂(*m*PEG-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 *m*PBLA。设计聚合度 113 : 15 : 5,根据核磁计算得到实际聚合度为 113 : 8 : 3。

1.3 三嵌段共聚物的 *N*-(3-氨丙基)咪唑氨解改性

在 50 mL 双口瓶中依次加入 0.23 g *m*PEG-PBLA-

PLA, 1.8 mL *N*-(3-氨基丙基)咪唑(相对苯基摩尔量 15 倍过量), 以及 7.5 mL 无水 DMF (3% w/V), 氮气保护下 35 °C 反应 1 h. 向反应液中滴加 15 mL 乙酸水溶液(10% V/V), 并在 0 °C 下搅拌 1 h 后转入透析袋. 在 pH=3 的盐酸水溶液中透析 12 h、蒸馏水中透析 1 d. 透析液冻干得到白色粉末状固体 *m*PLMZA. 反应路线如图式 1 所示.



图式 1 带有咪唑侧基三嵌段共聚物 *m*PLMZA 的合成路线图
Scheme 1 Synthesis of *m*PLMZA triblock copolymer

1.4 药物的包埋和释放

采用透析法制备载药共聚物胶束. 将 100 mg 的聚合物 *m*PLMZA 和 20 mg DOX·HCl, 16 μL 三乙胺加入到 4 mL 的 DMSO 中, 避光、磁力搅拌 24 h 使之完全溶解, 之后缓慢滴加 16 mL 的二次蒸馏水并继续搅拌 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, 避光状态下以二次蒸馏水透析 1 d. 透析液冻干后得红色粉末状固体即载药胶束. 计算三嵌段聚合物载药胶束的包封率为 67%, 负载量为 13.5%.

将载药胶束溶解于二次蒸馏水中, 配制成 5 mg/L 溶液, 分别取 4 mL 于透析袋中置于盛有 16 mL 不同 pH 值(pH 5.5, 6.5 和 7.4)的缓冲溶液中, 每隔一定时间取 4

mL 溶液, 然后加入 4 mL 相应缓冲溶液, 使用紫外-可见分光光度计检测溶液在 479 nm 波长处的透光度, 通过 DOX 的标准曲线计算药物浓度和累计药物释放量.

1.5 细胞试验

通过 MTT 法研究了载药粒子对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响. 以每孔 20000 个的密度将 MDA-MB-231 细胞种植在含 10%胎牛血清(FBS)的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养基中. 在 96 孔板的每个孔洞中加入 0.2 mL 培养基, 37 °C 下于 5%的 CO₂ 培养箱中培养 24 h. 将含有不同阿霉素浓度的纯阿霉素溶液和载药胶束溶液灭菌后加入到上述培养基介质中, 继续培养 48 h. 再将 100 μL MTT 溶液加入到 MDA-MB-231 细胞中, 继续培养 4 h. 加入 200 μL 缓冲液[45% (V/V) DMF in distilled water, 10% (w/V) 十二烷基硫酸钠(SDS)]培养 12 h. 用酶标仪(Bio-Rad, Model 550)测定 590 nm 波长处的吸光强度, 计算细胞存活率.

1.6 测试与表征

红外光谱, 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. 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. UV-Vis 使用岛津 2540 紫外-可见分光光度计测试. 将透析得到的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胶束的形态结构, 加速电压为 200 kV. 聚合物胶束的粒径使用 Malvern Nano-ZS90 动态光散射仪在水相测试, 测试前使用孔径 0.45 μm Millipore 过滤膜除尘.

2 结果与讨论

图 1A 是 3-氨基丙基咪唑改性前的聚合物 *m*PBLA,

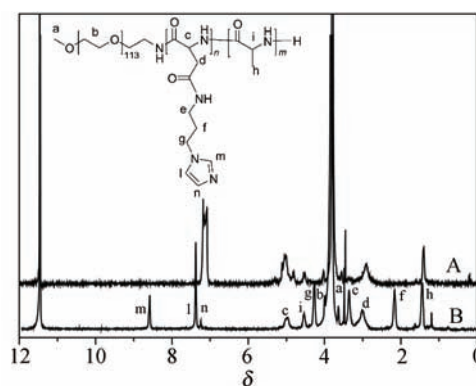


图 1 *m*PBLA 和 *m*PLMZA 的 ¹H NMR 谱图(CF₃COOD)
Figure 1 ¹H NMR spectra of *m*PBLA and *m*PLMZA triblock copolymers in CF₃COOD

苄基质子信号峰在用咪唑改性后消失, 咪唑的特征质子信号峰(m, n, l)出现, 表明改性成功. 图 1B 中 *m*PLMZA 的各峰归属清晰. 根据聚乙二醇单甲醚的端甲基质子信号峰 a 和 PLMZA 的 γ 位亚甲基质子的信号峰 d 以及 PLAla 的 β 位甲基质子信号峰 h 积分面积, 计算得到 *m*PLMZA 各链段聚合度为 113 : 10 : 3, 说明在氨解过程中未发生明显的断链.

为探索聚合物各链段的溶剂性质, 如图 2 将 *m*PLMZA 溶于氘代三氟乙酸和不同 pH 值的氘代水溶液中, 研究其核磁共振信号. 聚合物 *m*PLMZA 在强极性溶剂氘代三氟乙酸中各链段完全溶解(C), PEG、咪唑改性聚天冬氨酸和聚丙氨酸链段的质子信号峰按照链段比例完全展现. 在碱性水溶液中(A), 丙氨酸链段不溶解, 咪唑改性聚天冬氨酸的侧基咪唑基在碱性溶液中去质子化, 侧基不带电荷, 链段溶解性较差; 聚氨基酸链段在溶液中运动受限, 其质子信号峰强度较低. 当溶液的 pH 值由碱性变为酸性时(B), 天冬氨酸氨基酸链段由于侧基咪唑基的质子化而带正电荷, 水溶性增加, 链段由疏水转化为亲水, 其对应的质子信号增强, 但丙氨酸在酸性环境中仍然不溶, 对应的质子信号峰无变化. 在两种 pH 条件下的氘代水溶液中, PEG 链段始终处于良好的溶解和伸展状态, 相对应的质子信号峰没有发现明显变化. 通过不同 pH 之条件下各链段质子核磁信号峰的变化, 可以得出结论, 三嵌段共聚物 *m*PLMZA 中, 聚乙二醇链段为亲水链段, 聚丙氨酸链段为疏水链段, 聚(咪唑丙基-天冬酰胺)链段为 pH 响应性链段, 其亲疏水性随环境 pH 值会发生变化.

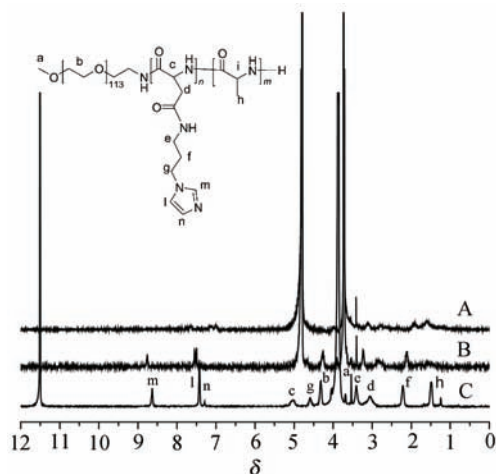


图 2 *m*PLMZA 在 CF_3COOD (C) 和不同 pH 值的重水((A) pH = 8.4; (B) pH = 5.5) 中的 ^1H NMR 谱图

Figure 2 ^1H NMR spectra of *m*PLMZA triblock copolymer in CF_3COOD (C) and D_2O at different pHs [(A) pH = 8.4; (B) pH = 5.5]

三嵌段聚合物 *m*PLMZA 的 pH 滴定曲线如图 3 所示. 三嵌段共聚物 *m*PLMZA 的中间链段侧基为咪唑基, 在酸性条件下质子化, 在碱性条件下去质子化. pH 滴定曲线表明, 聚合物具有 pH 响应性, pKa 在 6.7 附近.

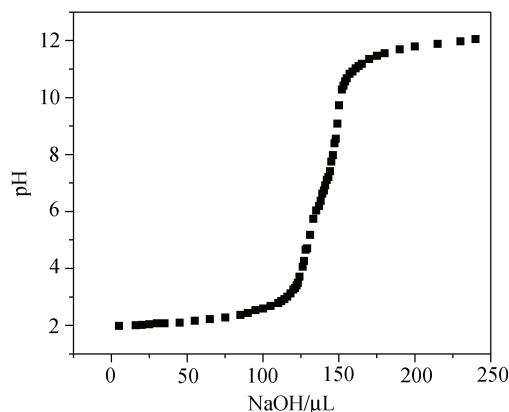


图 3 *m*PLMZA 的 pH 滴定曲线

Figure 3 pH titration curve of *m*PLMZA triblock copolymer

图 4 是咪唑改性前后及 *m*PLMZA 载药后的红外谱图. 对比谱图 4a 和图 4b, 图 4a 中位于 1733 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 而图 4b 中位于 1658 cm^{-1} 处的酰胺键的 C—O 的吸收峰增加, 说明聚合物改性后, 聚氨基酸侧基由苄氧羰基转变为酰胺键, 证明了氨基咪唑侧基改性的发生. 图 4c 中, 在 1722 cm^{-1} 处出现阿霉素中的 13-C 羰基的 C—O 振动峰, 1626 cm^{-1} 是阿霉素共轭结构的振动峰, 证明了聚合物中包埋有一定量的阿霉素.

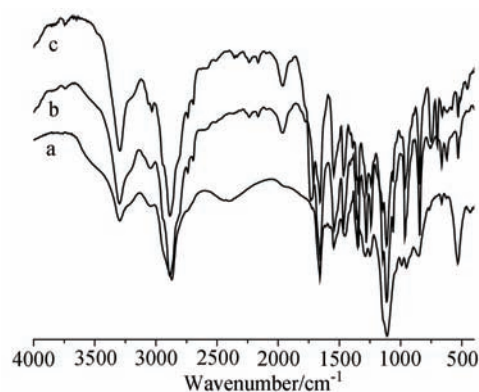
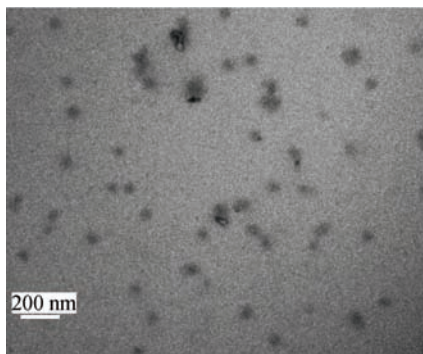
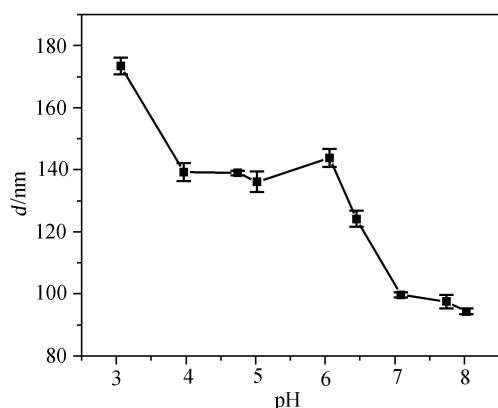


图 4 *m*PBLA (a), *m*PLMZA (b) 和 *m*PLMZA-DOX (c) 的 IR 谱图

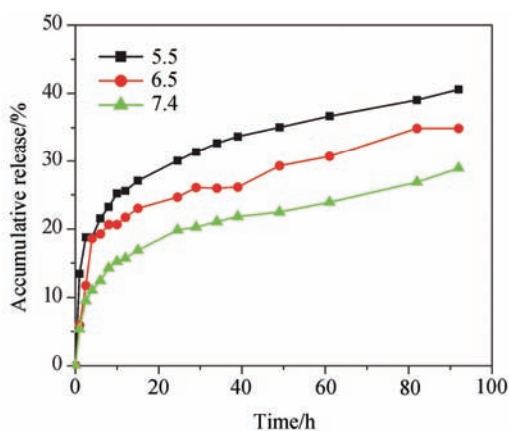
Figure 4 IR spectra of *m*PBLA (a), *m*PLMZA (b) and *m*PLMZA-DOX (c)

三嵌段共聚物 *m*PLMZA 由于亲水链段(*m*PEG)和疏水链段(聚丙氨酸)的存在, 在选择性溶剂中可以自组装形成胶束. *m*PLMZA 在水溶液中形成胶束的透射电镜照片见图 5. 胶束平均粒径为 80 nm 左右. 图 6 是随 pH 变化 *m*PLMZA 胶束粒径的光散射数据. 碱性条件下, 胶

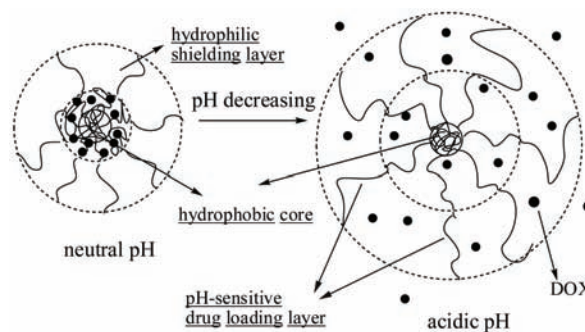
图5 *mPLMZA* 纳米粒子的透射电镜照片Figure 5 TEM images of *mPLMZA* nanoparticles图6 不同 pH 条件下 *mPLMZA* 胶束的粒径变化Figure 6 Mean diameter of *mPLMZA* micelles at different pH values measured by DLS

束粒径较小, 随着 pH 值的下降, 咪唑基发生质子化, 此链段亲水性增强并逐渐从胶束核心转换为胶束壳层, 表现为胶束粒径增大。

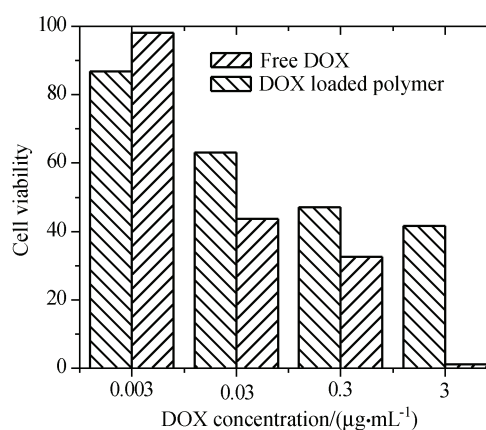
图 7 为载药胶束在不同 pH 环境下的药物释放情况。在 pH 7.4 的生理条件下, 复合体系药物释放速率较慢,

图7 *mPLMZA*-DOX 在不同 pH 下的药物释放曲线Figure 7 Drug release profiles of *mPLMZA*-DOX at different pHs

累积量较低, 90 h 后累积释放量在 25% 左右。这是由于此 pH 值条件下聚合物的咪唑基、DOX 的胺基均为去质子化, 聚氨基酸链段呈疏水性, 药物分子与链段侧基咪唑环疏水相互作用较强, 且链段排列紧密, 药物的扩散受到限制。随着环境 pH 值的降低, 胶束的药物释放速度和累积释放量明显增加, 在 pH 5.5 条件下, 90 h 后 40% 以上药物得到释放。这是由于酸性条件下咪唑基部分质子化, 聚天冬酰胺链段由疏水变为亲水, 链段逐步打开, 同时药物和聚合物之间存在静电排斥, 导致包埋药物的扩散和释放速率增加。药物释放过程可表示为图式 2。

图式 2 咪唑改性的天冬氨酸三嵌段共聚物 *mPLMZA* 的 pH 响应性药物释放示意图Scheme 2 Schematic of drug release behavior of DOX loaded *mPLMZA* complex based upon pH

本文考察了不同浓度载药胶束溶液对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响。如图 8 所示, 对比纯阿霉素药物, 相同药物浓度情况下, 载药胶束具有良好的药物缓释效果。细胞存活率随载药浓度的增大而降低。

图8 *mPLMZA*-DOX 在不同载药浓度下的细胞毒性与纯阿霉素药物的对比Figure 8 The *in vitro*-tumor effect of DOX loaded polymer at various concentrations

3 结论

用 *N*-(3-氨基)咪唑对聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯-聚丙烯氨酸三嵌段进行氨解改性, 得到具有 pH 响应性的三嵌段核-壳-冠型三层结构聚合物胶束. 其中, 聚丙烯氨酸链段为胶束提供一个稳定的疏水内核, 保证胶束在运输过程中的稳定性. 外层的聚乙二醇链段为胶束提供一个水合层, 可以有效延长药物的体内循环时间, 保护内部负载的药物. 中间层为具有 pH-响应性的侧链带有咪唑环的聚天冬酰胺链段. 以阿霉素作为模型药物, 研究了三嵌段共聚物在不同 pH 条件下的药物释放能力. 碱性条件下聚天冬酰胺链段侧链的咪唑基发生去质子化, 链段表现为疏水, 链段排列紧密, 药物的扩散受到限制; 酸性条件下咪唑基质子化, 导致聚氨基酸链段亲水性提高、链段更为舒展, 同时药物和聚合物之间存在静电排斥, 导致了药物释放速率和释放量不同程度的增加.

References

- 1 Gao, W.; Chan, J. M.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharm.* **2010**, 7(6), 1913.
- 2 Yuan, L.; Tang, Q. Q.; Yang, D.; Zhang, J. Z.; Zhang, F. Y.; Hu, J. H. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 9926.
- 3 Yuan, L.; Wang, B. D.; Tang, Q. Q.; Zhang, X. H.; Yang, D.; Hu, J. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, 30, 640 (in Chinese).
- 4 Prabakaran, M.; Grailer, J. J.; Pilla, S. *Biomaterials* **2009**, 30(29), 5757.
- 5 Bae, Y. H.; Yin, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 71, 223.
- 6 Zhang, L.; Eisenberg, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3168.
- 7 Fukushima, S.; Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kanayama, N.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2810.
- 8 Koide, A.; Kishimura, A.; Osada, K.; Jang, W.-D.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5988.
- 9 Yang, D.; Zhang, X. H.; Yuan, L.; Hu, J. H. *Prog. Nat. Sci.* **2009**, 19, 1305.
- 10 Zhang, G.-L.; Ma, J.-B.; Li, Y.-H.; Wang, Y.-N. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2003**, 14(12), 1389.
- 11 Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 941.
- 12 Tang, G.-P.; Chen, Q.-Q. *J. Biomed. Eng.* **1997**, 14(2), 99 (in Chinese).
- 13 William, H. D.; Drew, P. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29(46), 5859.
- 14 Zhu, K.-L.; Tang, G.-P.; Chen, Q.-Q. *Acta Pharmaceutica Sinica* **1998**, 33(12), 906 (in Chinese).

(汤谷平, 陈启琪, 生物医学工程学杂志, **1997**, 14(2), 99.)
(朱卡琳, 汤谷平, 陈启琪, 药学报, **1998**, 33(12), 906.)

(A1109081 Cheng, F.)