

PPEGMEA-*g*-PBLG 两亲性接枝共聚物的合成及其
作为阿霉素输送载体的研究蔡晓冰^a 胡薇^{*,b} 陆国林^c 黄晓宇^{*,c}^(a) 同济大学附属上海第十人民医院骨科 上海 200072)^(b) 第二军医大学附属长海医院普四科 上海 200433)^(c) 中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

摘要 首先利用单电子转移活性自由基聚合(SET-LRP)制备了聚甲基醚聚乙二醇丙烯酸酯(PPEGMEA)主链,再通过二异丙基氨基锂(LDA)攫取羰基 α -位活泼氢合成了含溴的 PPEGMEA-Br,通过亲核取代反应和还原反应两步制备得到了大分子开环聚合引发剂 PPEGMEA-NH₂。然后采用 grafting-from 策略, PPEGMEA-NH₂ 引发 γ -苄基-L-谷氨酸酯五元环酐(BLG-NCA)的开环聚合,合成了结构规整的两亲性接枝共聚物 PPEGMEA-*g*-PBLG。接着,以 PPEGMEA-*g*-PBLG 为药物载体,负载了阿霉素(DOX)。利用紫外吸收光谱法测定了载药胶束的载药量,载药胶束的载药量最高可达到 32.3%,载药胶束的体外药物释放具有很好的药物缓释特性。

关键词 两亲性接枝共聚物; 单电子转移活性自由基聚合; 阿霉素; 药物载体

Synthesis of PPEGMEA-*g*-PBLG Amphiphilic Graft Copolymer and
Its Research as Doxorubicin Delivery VectorsCai, Xiaobing^a Hu, Wei^{*,b} Lu, Guolin^c Huang, Xiaoyu^{*,c}^(a) Department of Orthopedics, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072)^(b) Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)^(c) Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract The poly[poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate] (PPEGMEA) backbone was first prepared by single electron transfer-living radical polymerization (SET-LRP). The backbone was treated with lithium diisopropylamide (LDA) and 2-bromoisobutryl bromide at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ to give Br-containing PPEGMEA-Br. PPEGMEA-NH₂ macroinitiator was then prepared by successive substitution and reduction reactions. A series of well-defined PPEGMEA-*g*-PBLG graft copolymers were synthesized by ring-opening graft polymerization of γ -benzyl-L-glutamate-*N*-carboxyanhydride (BLG-NCA) via grafting-from technique. A series of doxorubicin (DOX)-loaded polymeric micelles based on PPEGMEA-*g*-PBLG amphiphilic graft copolymers were prepared. The drug loading content (DLC) was measured by UV and the DLC of polymeric micelles was found to be as high as 32.3%. The drug release *in vitro* showed good delayed drug release feature.

Keywords amphiphilic graft copolymer; single electron transfer-living radical polymerization; doxorubicin; drug carrier

在疏水作用、氢键、范德华力、 π - π 堆积效应、金属配位、静电效应等^[1~3]驱动力的作用下,两亲性共聚物在选择性溶剂或水中可以自组装形成形貌丰富的纳米胶束结构,这些结构在药物输送和靶向载体、纳米反应器、污水处理、环境净化、电子信息学、催化和生物模拟等诸多领域^[4~13]具有潜在的应用前景。其中聚合物

胶束作为药物纳米载体在药物传输和控释等方面得到了广泛的研究^[14~20]。这是因为通过两亲性共聚物自组装得到的药物纳米载体除具有低毒、长效稳定、缓释、副作用小等优点外,还可具有主动和被动靶向性的能力,这恰好可以解决小分子药物存在的诸多缺点,如小分子药物,尤其是抗癌药物存在溶解性差,毒副作用大,

* E-mail: huweicj@163.com, xyhuang@mail.sioc.ac.cn

Received October 26, 2013; revised November 11, 2013; published online November 14, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81171737, 21174158).

国家自然科学基金(Nos. 81171737, 21174158)资助项目。

药物在体内稳定性差, 药代动力学不理想和体内分布选择性差等问题^[21]。聚合物载体通常包括亲水和疏水两部分, 疏水部分的疏水环境可增溶药物, 提高药物的溶解性; 亲水部分包封在疏水部分的外围, 使药物免受水解和酶解, 延长药物在血液中的循环时间, 提高药物的生物利用度。通过改变聚合物载体的分子量或在药物载体上接入靶向基团, 可实现肿瘤组织靶向性。

为了制备生物相容性的药物载体, 聚合物胶束主要由具有生物相容性和可降解的链段组成。其中, 亲水链段常用的砌块是 PEG 链段, 亲水链段 PEG 的引入不仅提高了聚合物生物相容性, 而且使聚合物胶束在体内不易被身体的免疫系统排除, 提高了水溶性, 并延长了体内循环周期, 可见含有 PEG 链段的两亲性聚合物的胶束是很好的药物载体^[22~26]。Kim 小组^[22]利用聚(L-谷氨酸)-*b*-聚乙二醇(PBLG-*b*-PEG)嵌段共聚物的胶束作为药物载体, 采用物理包封法包裹亚德里亚霉素, 研究表明 PBLG-*b*-PEG 纳米胶束药物载体延长了亚德里亚霉素在体内的循环时间, 改善了药物在体内的分布并且避免了因局部给药浓度过高而造成的细胞毒性。而人工合成的聚肽具有与蛋白质相类似的性质^[27], 有很多优点: 有良好生物相容性和生物可降解性; 通过控制侧链基团的性质可改变聚肽的亲水性; 改变条件可实现聚肽在多种构象间的转变; 含聚肽的两亲性聚合物在选择性溶剂中可形成比一般的两亲性共聚物更复杂的自组装形态。因此, 聚肽的特性决定了其在生物材料领域的广泛应用, 且其丰富的自组装行为使其在药物载体、生物检测和生物模拟等诸多领域具有重要的应用前景^[28~31]。如合成的聚谷氨酸苄酯均聚物(PBLG)有良好的生物相容性、无抗原问题、可降解且降解产物无毒、易吸收等优点^[32]。

与线性共聚物相比, 接枝共聚物的侧链是通过化学键连接到线性主链上的, 高分子侧链被局限于一定区域内, 因而, 接枝共聚物具有高度密集的分子结构, 分子结构的差异使得接枝共聚物表现出很多不同的性质^[33~35]。例如, 可以通过分子内相互作用形成稳定性较好的, 尺寸更易于控制的单分子胶束^[34]。而且, 接枝共聚物多分子胶束形成的过程与线性共聚物的不同, 接枝共聚物的多分子胶束是由单分子胶束分子间发生聚集而得到的, 而线性共聚物的多分子胶束是由单分子聚集而得到的^[35]。此外, 接枝共聚物结构复杂性的增大影响多分子胶束形貌和尺寸的因素增多。相对于嵌段共聚物已经系统化的自组装行为研究, 接枝共聚物的自组装研究比较滞后, 这是因为结构规整的接枝共聚物的合成一直是高分子化学上的一道难题。近 20 年来, 随着各种活性聚合技术的快速发展, 接枝共聚物的研究获得了很大的发展, 不同化学组成和结构规整的接枝共聚物被相

继合成出来, 其自组装行为研究成果也越来越丰富, 并带动接枝共聚物在各个领域的应用研究。

目前, 文献[36]报道的接枝共聚物制备方法主要有以下 3 种: 直接接枝法(*grafting through*)、偶合接枝法(*grafting onto*)和从主干接枝法(*grafting from*)。在合成复杂结构的接枝共聚物时, 所用到的策略可能不仅仅局限于其中的一种, 可能会将这几种策略组合使用^[37~40]。本文将单电子转移活性自由基聚合(SET-LRP)和开环聚合(ROP)聚合技术结合起来, 采用 *grafting through* 和 *grafting-from* 的策略制备了结构规整的以含 PEG 链段的 PPEGMA 为亲水侧链、以 PBLG 为疏水侧链的两亲性接枝共聚物 PPEGMEA-*g*-PBLG (Scheme 1), 能在选择性溶剂中自组装形成以 PBLG 为核、PPEGMEA 为壳的纳米胶束。聚肽 PBLG 如上所述, 具有很好的生物相容性和生物可降解性; PPEGMEA 链段有极小的免疫原性及抗原性, 可被身体排除, 生物相容性好、体内不易被蛋白质吸附, 在生理条件和绝大多数化学反应条件下稳定。因此, 接枝共聚物 PPEGMEA-*g*-PBLG 可望成为很好的生物医用材料, 我们以其为载体, 进行阿霉素(doxorubicin, DOX)的载药试验。阿霉素是临床常用的抗肿瘤药物, 可直接作用于 DNA, 抑制 RNA 和 DNA 的合成, 抗癌谱广, 对多种肿瘤均有作用, 属周期非特异性药物, 对各种生长周期的肿瘤细胞都有杀灭作用。但是, DOX 作为广谱抗肿瘤药, 对机体可产生广泛的生物化学效应, 具有强烈的细胞毒性^[41,42]。主要表现为: 抑制骨髓造血功能, 表现为血小板及白细胞减少; 心脏毒性, 严重时可出现心力衰竭; 可见到恶心、呕吐、口腔炎、脱发、高热、静脉炎及皮肤色素沉着等; 少数患者有发热、出血性红斑及肝功能损害。为了提高 DOX 的药物针对性和选择性, 提高治疗效率, 降低毒副作用, 临床上一直在寻找降低毒副作用的有效方法, 如调整给药方案, 研制心脏毒性低的阿霉素类似物、联合用药以及改变药物剂型等, 以期能减轻其毒性。但最终认为剂型的改变, 特别是使用控释给药系统是最为有效的途径^[43~49], 即使用药物载体改变药物进入人体的方式和在体内的分布, 控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官。

在我们以前的工作中, 将原子转移自由基聚合(ATRP)技术和从主干接枝(*grafting-from*)策略相结合, 合成了全亲水接枝共聚物 PPEGMEA-*g*-PMAA 和 PPEGMEA-*g*-PDEAEMA (Scheme 1), 分别以这两种接枝共聚物为载体材料, 以甲氨喋呤(MTX)为模型药物, 制备 MTX 药物缓释体系, 并探讨了 pH 值、制备方法 etc 对载药量、包埋率和释药行为等的影响^[50,51]。本文中我们用生物相容性的 PPEGMEA-*g*-PBLG 实现对 DOX 的

高负载, 并进行了载药体系的释放试验.

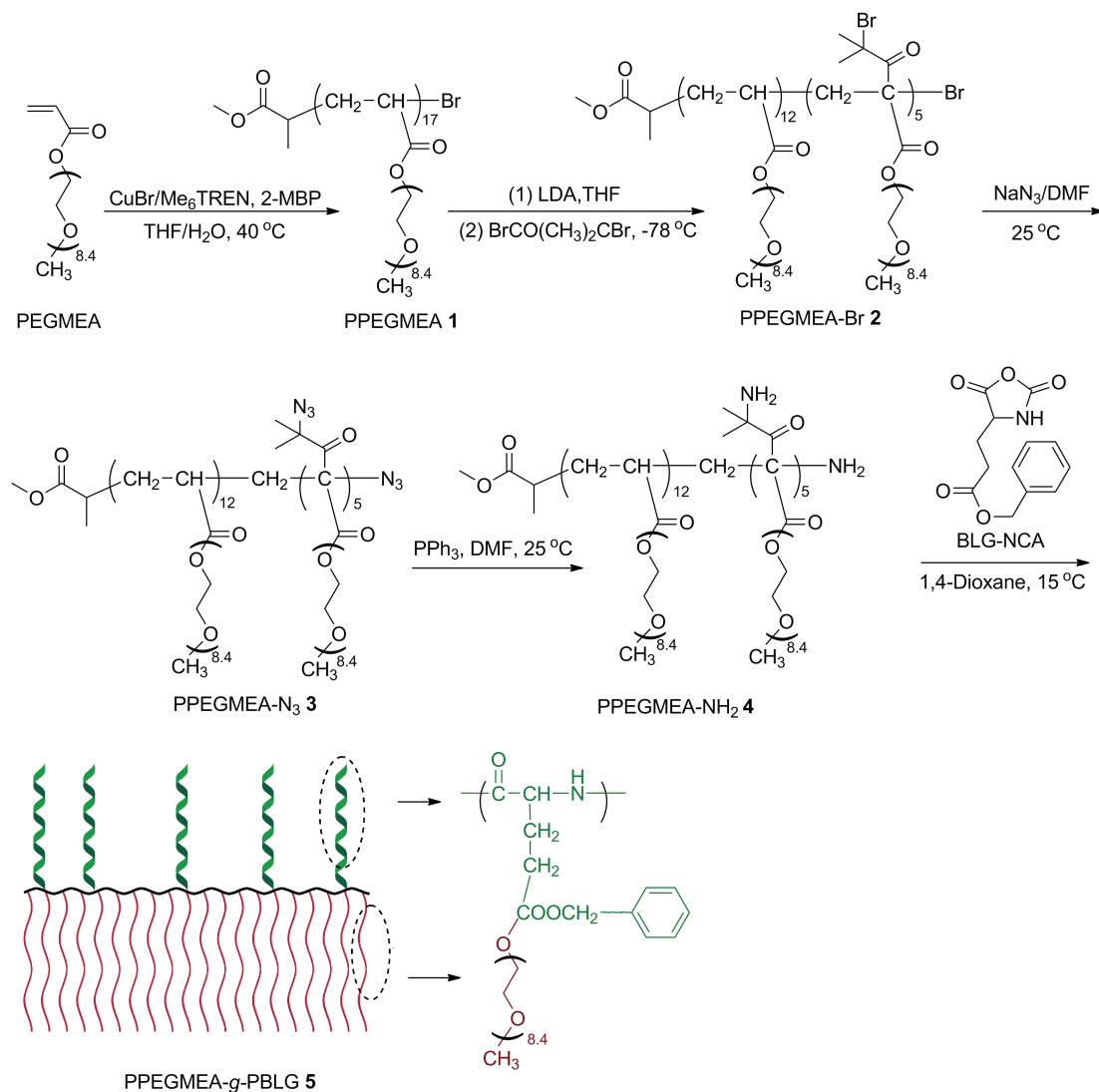
1 结果与讨论

1.1 接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG 的合成

大分子单体甲基醚聚乙二醇丙烯酸酯(PEGMEA)自身的粘度较大, 为了实现其可控活性聚合, 往往采用溶液聚合. 我们以 $V(\text{H}_2\text{O}) : V(\text{THF}) = 10 : 1$ 混合溶剂为聚合溶剂, 以 $\text{CuBr}/\text{Me}_6\text{TREN}$ 为催化体系, 以 2-溴代丙酸甲酯(2-MBP)为引发剂, 在 40°C 下制备 PPEGMEA 均聚物. 在 PPEGMEA (1) 的 ^1H NMR 谱图(图 1A), δ 3.38 处的峰“e”是 PEGMEA 的末端甲基(OCH_3)的 3 个质子的信号; 峰“f”(δ 3.65)是 OCH_2CH_2 中的 4 个质子的信号; 峰“e”(δ 3.88)是聚合物链末端 SET-LRP 引发基团中甲酯基(CO_2CH_3)的 3 个质子的信号; 峰“h”(δ 4.17)是 PEGMEA 酯基 $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 中的 2 个质子的信号. 根据核磁氢谱中大分子单体的特征峰“e”(δ 3.38)与

SET-LRP 引发基团的特征峰“g”(δ 3.88)的积分面积比值, 可计算出主链上 PEGMEA 的重复单元数, 其值为 17, 进而算出 PPEGMEA (1) 的分子量 $M_{n,\text{NMR}}$ 为 7700. 由凝胶渗透色谱(GPC)测得的分子量分布 M_w/M_n 为 1.03, 相对分子量 $M_{n,\text{GPC}}$ 为 4100, 该值远小于由 ^1H NMR 计算得到的分子量, 这一结果与文献[52]报道是相一致的.

接着, 通过二异丙基氨基锂(LDA)攫取 PPEGMEA (1) 主链酯羰基 α -位的活泼氢, 再与 2-溴异丁酰溴反应得到 PPEGMEA-Br (2). 依据 PPEGMEA-Br (2) 的 C 和 Br 元素分析的结果, 计算得到聚合物链上含溴基团的接入密度为 26.3%. 从 PPEGMEA-Br (2) 出发, 通过 $\text{S}_\text{N}2$ 取代反应和还原两步反应制备了大分子开环聚合引发剂 PPEGMEA- NH_2 (4). 在 PPEGMEA-Br (2), PPEGMEA- N_3 (3) 以及 PPEGMEA- NH_2 (4) 的红外谱图(图 2) 中, 可以看到 PPEGMEA-Br (2) 发生 $\text{S}_\text{N}2$ 取代反应后, PPEGMEA- N_3 (3) 谱图中 2111 cm^{-1} 处叠氮的特征峰清



Scheme 1

晰可见; 元素分析测试结果显示 **2** 中的溴含量为 1.47%, 与叠氮化钠反应后, 溴含量降低到 0.041%, 说明了亲核取代反应的成功, 且转化率几乎为 100%. 从 PPEGMEA-NH₂ (**4**) 和 PPEGMEA-N₃ (**3**) 的红外谱图对比可见, PPh₃ 还原后对应于 **3** 中 2111 cm⁻¹ 处叠氮的特征峰消失, 而且 PPEGMEA-NH₂ (**4**) 的核磁氢谱(图 1B)中出现氨基上质子的特征峰(δ 4.64), 说明我们成功地将含有叠氮基团的 PPEGMEA-N₃ (**3**) 还原为 PPEGMEA-NH₂ (**4**). 以上测试结果表明, PPEGMEA-Br (**2**) 成功地被转化为 PPEGMEA-NH₂ **4**, 由核磁氢谱可以推算出 PPEGMEA-NH₂ (**4**) 的分子量为 $8100 = 7700 + 17 \times 26.3\% \times (86 - 1)$ (86 为接入的含有氨基的基团的分子量).

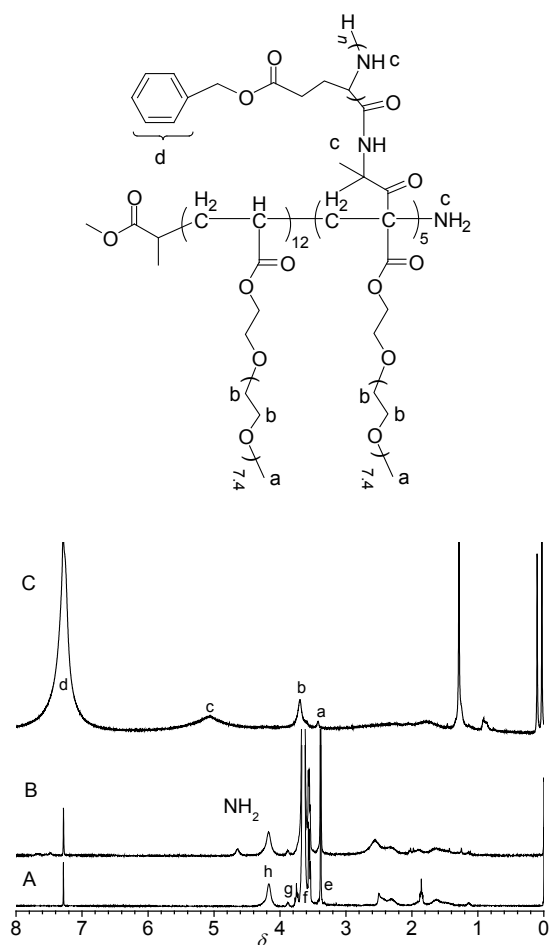


图 1 PPEGMEA (**1**) (A), PPEGMEA-NH₂ (**4**) (B) 和 PPEGMEA-g-PBLG (**5**) (C) 的核磁谱图(CDCl₃)

Figure 1 ¹H NMR spectra of PPEGMEA (**1**) (A), PPEGMEA-NH₂ (**4**) (B) and PPEGMEA-g-PBLG (**5**) (C) in CDCl₃

接着, 通过 grafting-from 的方法, 以 PPEGMEA-NH₂ (**4**) 为大分子引发剂, 在 1,4-二氧六环中进行 γ -苄基-L-谷氨酸酯五元环酸酐(BLG-NCA)单体的开环聚合制备接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG. 为了控制反应速

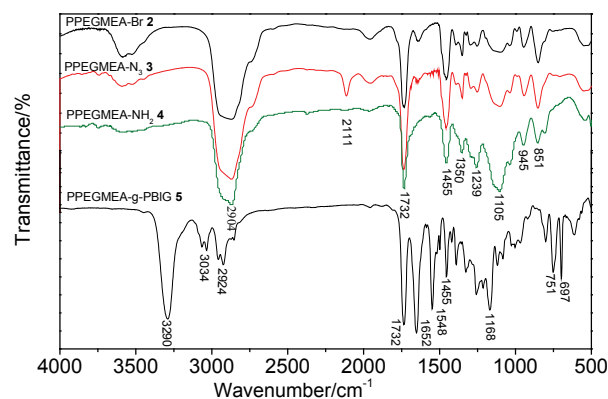


图 2 PPEGMEA-Br (**2**), PPEGMEA-N₃ (**3**), PPEGMEA-NH₂ (**4**) 和 PPEGMEA-g-PBLG (**5**) 的红外谱图

Figure 2 FT-IR spectra of PPEGMEA-Br (**2**), PPEGMEA-N₃ (**3**), PPEGMEA-NH₂ (**4**), and PPEGMEA-g-PBLG (**5**)

率及获得结构规整的接枝共聚物, 我们选择在稀溶液中进行接枝聚合, 控制单体的浓度 < 3%, 通过改变大分子引发剂 **4** 与单体 BLG-NCA 的投料比, 合成了一系列接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG (**5**), 结果列于表 1 中. 由表 1 中数据可以发现, 所有接枝共聚物的相对分子量远大于大分子引发剂 **4** 的相对分子量, 说明 BLG-NCA 成功被引发接枝聚合. 接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG (**5**) 的 GPC 流出曲线, 均显示了对称分布的单峰, 而且分子量分布都很窄($M_w/M_n \leq 1.21$), 并且其分子量随投料比的增大而逐渐增加的, 说明由 PPEGMEA-NH₂ (**4**) 引发的 BLG-NCA 开环聚合是可控的.

从接枝共聚物 **5** 的 ¹H NMR 图(图 1C)可以看到, 峰“a”(δ 3.41)和峰“b”(δ 3.67)分别是主链上末端 OCH₃ 3 个 H 的信号和 OCH₂CH₂ 四个 H 的信号. 峰“c”(δ 5.04)和峰“d”(δ 7.20)分别是 PBLG 侧链上氨基和苯环的特征质子峰. 新的质子信号峰“c”和“d”的出现及原有质子信号峰“a”和“b”的保留证明了 PBLG 侧链成功地被接枝到 PPEGMEA 主链上. 在 PPEGMEA-g-PBLG (**5**) 的红外谱图(图 2)中 3290, 1652, 1548, 751 和 697 cm⁻¹ 处出现了 PBLG 侧链的特征峰, 且主链 PPEGMEA 的特征峰依旧存在, 进一步证明成功地合成了 PPEGMEA-g-PBLG (**5**) 接枝共聚物.

1.2 接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG 对 DOX 的负载

为了测试接枝共聚物对阿霉素 DOX 包封及释放的效果, 我们首先测定了 DOX 在 DMF 中的标准曲线. 精确配制 0.5~100 mg/L DOX 的 DMF(含有微量三乙胺)溶液, 利用紫外分光光度计扫描不同 DOX 浓度的 DMF 溶液, 在 480 nm 处测定其吸光度(图 3, 插图). 以测得的数据绘制吸光度-浓度曲线(图 3), 在 0.5~100 mg/L

表 1 接枝共聚物 PEGMEA-g-PBLG 5 的合成及其载药量^a

Table 1 Synthesis of PEGMEA-g-PBLG 5 graft copolymers and their drug-loading contents

PEGMEA-g-PBLG	[BLG-NCA]/[NH ₂ group]	<i>M_n</i> , GPC ^b /kDa	<i>M_w</i> / <i>M_n</i> ^b	<i>W_p</i> ^c /mg	Drug carrier	DLC/%
5a	60 : 1	66.0	1.09	20	6a	32.3
5b	90 : 1	85.6	1.21	20	6b	31.2
5c	120 : 1	97.5	1.06	40	6c	14.5
				20	6d	29.5
5d	150 : 1	104.5	1.15	20	6e	15.0

^a Initiated by PEGMEA-NH₂ 4 macroinitiator. ^b Measured by GPC in DMF. ^c The weight of used copolymer.

的浓度范围内, DOX 在 480 nm 处的吸光度与浓度成线性关系. 按回归法处理得到标准曲线方程(式 1), 该曲线有高的相关系数($R = 0.99999$)和低的标准偏差($SD = 0.00453$), 说明得到的是一条有效的吸光度-浓度标准曲线.

$$\text{Abs} = 0.00622 + 0.01811 C_{\text{DOX}} \quad (1)$$

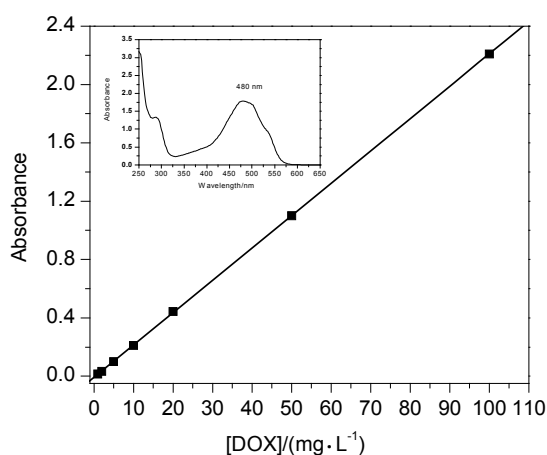
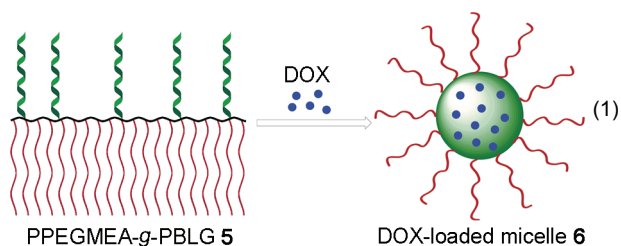


图 3 DOX 的紫外光谱(插图)和 DOX 在 480 nm 的吸光度-浓度标准曲线

Figure 3 UV spectrum of DOX (inset) and standard concentration curve of DOX at 480 nm

利用两亲性接枝共聚物 PEGMEA-g-PBLG (5) 的胶束负载 DOX, 制备了载药胶束 6 (Eq. 1). 向接枝共聚物 5 的 $V(\text{THF}) : V(\text{DMF}) = 1 : 1$ 溶液中加入盐酸盐阿霉素和三乙胺, 搅拌 2 h 后, 然后透析以除去未封装的药物和其它小分子, 得到的载药胶束溶液经冷冻干燥就能得到 DOX 负载的载药胶束 6. 以 DMF 溶解一定量的载药胶束 6 配制成一定浓度的 DMF 溶液, 测试其在 480



nm 的吸光度, 对照标准曲线计算其浓度, 可按式 2 算出聚合物胶束的载药量(Drug Loading Content, DLC), 结果列于表 1 中. 可以看到, 载药胶束 6 的载药量都很高, 最高可达到 32.3%. 对比载药胶束 6c 和 6d 的载药量可以发现, 聚合物用量越少, 载药量越高. 此外还可以观察到, 随着疏水链段 PBLG 长度的增大, 载药胶束 6 的载药量逐渐降低. 用动态光散射测得载药胶束 6 的粒径在 100~180 nm 之间, 正好处于 50~200 nm 这个增强渗透和停留效应(EPR, enhanced permeability and retention effect)范围内, 是一种很适合用于肿瘤治疗的载药胶束.

$$\text{载药量} = \frac{\text{载入胶束的药物量}}{\text{载入胶束的药物量} + \text{胶束载体重量}} \quad (2)$$

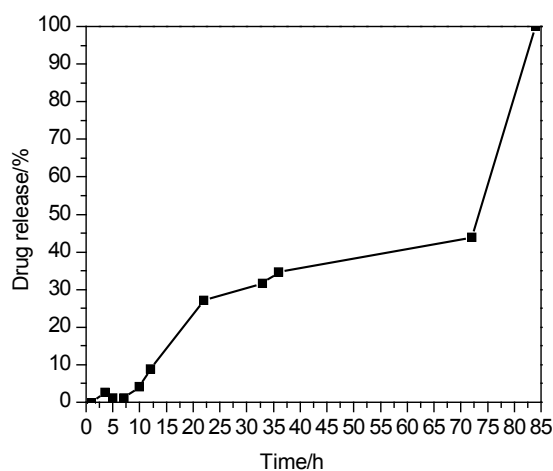


图 4 载药胶束 6c 在 pH=6.5 时的 DOX 体外释放曲线(37 °C)
Figure 4 DOX release profiles *in vitro* of drug carrier 6c under pH 6.5 at 37 °C

接着, 我们在模拟肿瘤细胞液酸性环境的磷酸缓冲溶液(pH=6.5)中, 进行了载药胶束 6 的释放. 图 4 为载药胶束在磷酸缓冲溶液中 DOX 的释放曲线. 从图 4 可以看出, 由 5c 所得的载药胶束 6c 存在突释阶段和缓释阶段, 在 36 h 内释药量约为 36.7%, 说明该药物胶束具有较好的缓释过程.

2 结论

将不同的聚合方法(SET-LRP 和 ROP)结合起来, 采

用 grafting-through 和 grafting-from 的策略制备了具有生物可降解性的结构规整的两亲性接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG。以两亲性接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG 为药物载体负载抗癌药物阿霉素, 载药胶束的载药量都很高, 最高可达到 32.3%, 并且聚合物用量越少, 载药量越高; 随着疏水链段 PBLG 长度的增大, 载药胶束的载药量逐渐降低。在磷酸缓冲溶液 (pH=6.5) 中载药胶束的释放试验表明该载药胶束具有较好的缓释过程。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振: 超导核磁共振仪, 在 Varian MERCURY 300, Bruker AM-300 和 DPX 300 上完成。溶剂为氘代氯仿, 四甲基硅(TMS)为内标。红外光谱: 傅立叶变换红外光谱仪, Nicolet AVATAR-360。所有红外谱图累加 32 次, 分辨率为 4.0 cm^{-1} 。元素分析: 元素分析仪, Elementar VARIOEL, Heraeus 1106, Carlo-erba 1108。气相色谱: HP6890, SE-54 柱。凝胶色谱法测定聚合物分子量及分子量分布: 实验仪器为 Waters 1515 凝胶色谱仪 (HR3, HR4, HR5), 采用 Waters 2410 示差折光检测器和 Waters 2487 紫外检测器。用 THF 将聚合物配成 1 mg/mL 的溶液, 淋洗剂为 THF, 流速为 1 mL/min , 采用线性聚苯乙烯标样对分子量进行校正。动态光散射粒径仪: Marlven Nano-ZS90 Zetasizer, 溶液过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下平衡 2 min , 采集粒径数据。紫外分光光度计: Cary 100, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下扫描阿霉素(DOX)的 $200\sim 800\text{ nm}$ 的全谱, 测定 480 nm 处的吸收强度。

四氢呋喃(THF)、1,4-二氧六环和甲苯, 氮气保护下, 经钠丝在二苯甲酮存在下回流除水至呈紫色后蒸出, 现蒸现用。二异丙基胺先经 KOH 干燥数天, 在 CaH_2 存在下回流蒸出, 现蒸现用。 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)先经 NaOH 处理 10 h , 然后在无水 CaSO_4 存在下减压蒸出。溴化亚铜(CuBr)经乙酸搅拌过夜后, 再经乙醇, 乙醚, 丙酮等依次洗涤数次至淡黄色, 真空烘箱 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压干燥 24 h , 避光保存备用。 $n\text{-BuLi}$ (1.6 mol/L , Aldrich), α -溴代丙酸甲酯(2-MBP, Acros, 99.0%), α -溴代异丁酰溴 (Aldrich, 98.0%) 未经纯化直接使用。甲基醚聚乙二醇丙烯酸酯(PEGMEA, $M_n=454$, Aldrich, 99.9%) 过中性 Al_2O_3 柱除去阻聚剂, 低温保存备用。 $\text{Me}_6\text{TREN}^{[53]}$ 和 $\text{BLG-NCA}^{[54]}$ 按照文献中的方法合成。

3.2 实验方法

3.2.1 PPEGMEA (1) 的合成

将催化剂 CuBr (115.2 mg , 0.8 mmol) 加入到预置搅拌子的 Schlenk 反应管中, 用橡皮塞封口。经过 3 次抽真

空通氮气后, 用针筒依次加入 PEGMEA 大分子单体 ($M_n=454$, 6.68 mL , 16 mmol), 配体 Me_6TREN (0.108 mL , 0.8 mmol) 和溶剂 $V(\text{THF}):V(\text{H}_2\text{O})=1:10$, 6.68 mL), 经 3 次冷冻-抽真空-溶解通 N_2 循环以除去反应液中的氧气后, 加入引发剂 2-MBP ($89\text{ }\mu\text{L}$, 0.8 mmol), 在室温下搅拌 10 min , 溶液呈透明浅绿色。将反应管置于恒温的 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 油浴中加热, 氮气保护下反应 5 h , 用液氮淬冷终止反应。反应粗产物用 THF 稀释, 加无水硫酸钠干燥。过中性 Al_2O_3 柱除去催化剂, 滤液浓缩后在冷正己烷中沉淀, 反复 3 次抽真空至恒重, 得到 3.7001 g 无色粘稠液体 PPEGMEA (1), 收率 50.9%。GPC (THF): $M_n=4100\text{ g/mol}$, $M_w/M_n=1.03$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.13 (3H, CH_3CH), 1.26, 1.65 (2H, CH_2CH), 1.95 [1H, $\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$], 2.15, 2.45 (1H, CH_2CH), 3.38 (3H, OCH_3), 3.65 (4H, OCH_2CH_2), 3.88 (3H, CO_2CH_3), 4.17 (2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.21 (1H, CHBr)。

3.2.3 PPEGMEA-Br (2) 的合成

抽真空状态下将 500 mL 三颈瓶火焰烘烤充换 N_2 3 次, 冷至室温后用针筒依次加入新蒸二异丙基胺 (1.2 mL , 8.2 mmol) 和 THF (300 mL), 通过干冰-丙酮浴降温至 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 然后加入 $n\text{-BuLi}$ (1.6 mol/L 正己烷溶液, 5.1 mL , 8.2 mmol), 低温搅拌反应 1 h 制备 LDA。将装有 PPEGMEA (1) (3.7001 g , $M_n=4100$, $M_w/M_n=1.03$, 8.2 mmol PEGMEA) 的蛋形瓶抽真空通 N_2 反复 3 次, 加入 100 mL 新蒸 THF 溶解聚合物, 再鼓泡 10 min , 干冰-丙酮浴冷至 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$; 然后用双头针在鼓 N_2 的状态下, 将此溶液转移入 LDA 溶液中, 并继续保持 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温反应 3 h 。将 2-溴异丁酰溴 (1.0 mL , 8.2 mmol) 加入到反应瓶中, 继续保持低温反应 3 h 后, 恢复到室温搅拌过夜。加入蒸馏水终止反应, 溶液浓缩后透析 3 d 除盐。再用 CHCl_3 多次萃取至水层无色, 无水硫酸钠干燥过夜。过滤干燥剂, 滤液浓缩, 在冷的正己烷中沉淀, 弃去上层清液, 溶解沉淀反复 3 次, 抽真空至恒重, 得到 2.2905 g 棕褐色粘稠液体 PPEGMEA-Br (2), 产率 61.9%。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.25, 1.65 (2H, CH_2CH), 1.90 [3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Br}$], 2.30 (1H, CH_2CH), 3.42 (3H, OCH_3), 3.55, 3.65 (4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.88 (3H, COOCH_3), 4.17 (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); FT-IR (KBr) ν : 2870, 1736, 1458, 1350, 1109, 940, 850 cm^{-1} ; GPC (THF): $M_n=4400\text{ g/mol}$, $M_w/M_n=1.08$ 。Anal. found C 53.45, H 8.67, Br 1.47。

3.2.3 PPEGMEA-NH₂ (4) 的合成

将 50 mL 三颈瓶用火焰烘烤抽换 N_2 3 次后, 在 N_2 保护下加入 2.2905 g 上述合成的 PPEGMEA-Br (2) ($M_n=4400$, $D_{\text{ini}}=26.3\%$ (D_{ini} 为接枝密度); NaN_3 (1.7252 g , $20\text{ equiv.}[\text{Br}]$) 和 15 mL DMF, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h , 加水

终止反应。用 CHCl_3 萃取 3 次, 合并有机相, 用 35 °C 饱和食盐水洗涤 3 次后, 用无水硫酸钠干燥过夜, 过滤干燥剂浓缩滤液, 用真空泵抽除残留的 DMF, 得到 1.9703 g 棕黄色粘稠液体 PPEGMEA- N_3 (**3**)。将得到的 PPEGMEA- N_3 (**3**) 转移到 50 mL 三颈瓶中, 加入 2.98 g 三苯基膦(10 equiv. $[\text{N}_3]$)和 35 mL DMF, 25 °C 下搅拌反应 12 h。加入氨水至体系转变为乳浊状悬浮体系, 继续搅拌 12 h, 50 °C 减压蒸馏除去 DMF 和水。粗产品柱层析提纯[V(甲醇): V(三乙胺) = 5: 1], 得到 1.3000 g 棕褐色粘稠液体 PPEGMEA- NH_2 (**4**), 产率 56.8%。PPEGMEA- N_3 (**3**): FT-IR (KBr) ν : 2904, 2111 ($\text{N}\equiv\text{N}$), 1721, 1453, 1342, 1102, 947, 855. PPEGMEA- NH_2 (**4**): ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.25 [3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$], 1.25, 1.65 (2H, CH_2CH), 2.30 (1H, CH_2CH), 3.42 (3H, OCH_3), 3.55, 3.65 (4H, OCH_2CH_2), 3.88 (3H, CO_2CH_3), 4.17 (2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.64 [2H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$]; FT-IR (KBr) ν : 3431, 3338 ($\text{N}-\text{H}$), 2871, 1736, 1459, 1350, 1109, 947, 853 cm^{-1} . Anal. found C 54.53, H 9.23, N 0.50.

3.2.4 PPEGMEA-g-PBLG (**5**)的合成

500 mL 的三颈瓶烘烤抽换 N_2 3 次, 加入 1.056 g 单体 BLG-NCA, 抽换 N_2 3 次, 注入 200 mL 精制 1,4-二氧六环(保证单体的浓度 < 3%)。单体 BLG-NCA 全部溶解后, 加入 0.052 g 大分子引发剂 PPEGMEA- NH_2 (**4**) (溶于 20 mL 精制 1,4-二氧六环中), 15 °C 下密封剧烈搅拌, 反应 3 d。然后将反应液倒入 800 mL 乙醇中, 以除去残余的 NCA 单体和聚胺齐聚物, 然后干燥产物。将粗产物溶于 CHCl_2 中, 用甲醇进行沉淀提纯, 过滤干燥得到 0.4012 g 白色固体 PPEGMEA-g-PBLG (**5d**)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.25, 1.65 (2H, CH_2CH), 2.22 (1H, CH_2CH), 3.41 (3H, OCH_3), 3.67 (4H, OCH_2CH_2), 5.04 (2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.20 (5H, C_6H_5); FT-IR (KBr) ν : 3290, 3034 ($\text{N}-\text{H}$), 2960, 1732, 1652 ($\text{HNC}=\text{O}$), 1548, 1455, 1392, 1327, 1259, 1167, 1084, 1021, 801, 751, 697 cm^{-1} ; GPC (DMF): $M_n = 104500$ g/mol, $M_w/M_n = 1.15$. Anal. found C 64.99, H 6.29, N 5.98.

3.2.5 载药胶束 **6** 的制备

典型的制备过程如下: 将 20 mg 接枝共聚物 PPEGMEA-g-PBLG (**5c**)溶于 10 mL V(THF): V(DMF) = 1: 1 中, 搅拌溶解, 然后加入 25 mg 阿霉素和 11 mg 三乙胺, 搅拌 2 h 后将上述溶液转移到透析袋中, 置入 400 mL 高纯水中透析, 每隔 3 h 更换 1 次水。1 d 后将袋中溶液转移到表面皿中, 冷冻干燥得到载体胶束 **6d**。由 UV-Vis 测得的载体胶束 **6d** 的载药量(DLC)为 29.5%。

用动态光散射粒径仪测试载药胶束的粒径: 取 1 mg 载药胶束 **6** 用 5 mL 高纯水溶解分散, 溶液过 0.45 μm

滤膜, 25 °C 下平衡 2 min, 采集粒径数据, 测得载药胶束 **6** 的粒径。

3.2.6 紫外光谱测试

精确称取 25.7 mg 阿霉素盐酸盐和 9.3 mg 三乙胺, DMF 溶解后转移至 50 mL 容量瓶中, 加 DMF 定容至 50 mL, 得 500 $\mu\text{g/mL}$ 的阿霉素溶液。用上述溶液分别配制浓度为 100, 50, 20, 10, 5, 2 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 测试其在 480 nm 处的吸光度, 绘出吸光度-浓度曲线。

典型的测试载药胶束载药量的过程如下: 精确称取 5 mg 载药胶束 **6c**, DMF 溶解后定容至 25 mL, 放置 1 d 后, 测试其在 480 nm 处的吸光度, 在吸光度-浓度标准曲线上推算阿霉素的含量, 算得载药量为 14.5%。

References

- [1] Ryu, S. W.; Asada, H.; Hirao, A. *Macromolecules* **2002**, *35*, 7191.
- [2] Li, A.; Lu, Z.; Zhou, Q.; Qiu, F.; Yang Y. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2006**, *44*, 3942.
- [3] Segalman, R. A. *Science* **2008**, *321*, 919.
- [4] Tang, C. B.; Lennon, E. M.; Fredrickson, G. H.; Kramer, E. J.; Hawker, C. J. *Science* **2008**, *322*, 429.
- [5] Xi, C. B.; Yang, D.; Li, J.; Yan, J. J.; Hu, J. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 2166 (in Chinese). (席陈彬, 杨东, 李静, 晏建军, 胡建华, 有机化学, **2012**, *32*, 2166.)
- [6] Taton, K. S.; Guire, P. E. *Biointerfaces* **2002**, *24*, 123.
- [7] Liu, T.; Zhang, Y. F.; Liu, S. Y. *Chin. J. Polym. Sci.* **2013**, *31*, 924.
- [8] Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113.
- [9] Moeser, G. D.; Green, W. H.; Laibinis, P. E.; Linse, P.; Hatton, T. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 5223.
- [10] Zhang, M. F.; Estourne, C.; Bietsch, W.; Muller, A. H. E. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 871.
- [11] Lutz, J. F.; Stiller, S.; Hoth, A.; Kaufner, L.; Pison, U.; Cartier, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3132.
- [12] Gu, L. N.; Shen, Z.; Feng, C.; Li, Y. G.; Lu, G. L.; Huang, X. Y.; Wang, G. W.; Huang, J. L. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4332.
- [13] Zheng, X. L.; Gao, H. S.; Ding, A. S.; Li, Y. J. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1509 (in Chinese). (郑兴良, 高鸿盛, 丁爱顺, 李永军, 有机化学, **2013**, *33*, 1509.)
- [14] Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *16*, 295.
- [15] Kwon, G. S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **1998**, *15*, 481.
- [16] Lee, E. S.; Na, K.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2003**, *91*, 103.
- [17] Lee, E. S.; Shin, H. J.; Na, K.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2003**, *90*, 363.
- [18] Lee, E. S.; Oh, K. T.; Kim, T.; Youn, Y. S.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 19.
- [19] Wang, C. H.; Wang, C. H.; Hsiue, G. H. *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 140.
- [20] Lo, C. L.; Huang, C. K.; Lin, K. M.; Hsiue, G. H. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1225.
- [21] Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818.
- [22] Oh, I.; Lee, K.; Kowon, H. Y.; Lee, Y. B.; Shin, S. C.; Cho, C. S.; Kim, C. K. *Int. J. Pharm.* **1999**, *181*, 107.
- [23] Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113.
- [24] Torchil, I. N. V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 235.
- [25] Hu, Y.; Jiang, X.; Ding, Y. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2395.

- [26] Yokoyama, M.; Kataoka, K.; Inoue, S. *J. Controlled Release* **1990**, *11*, 269.
- [27] Hayashi, T.; Iizuka, Y.; Oya, M.; Iwatsuki, M. *Polym. J.* **1993**, *25*, 481.
- [28] Genove, E.; Shen, C.; Zhang, S. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3341.
- [29] Wang, H. Y.; Xu, K. J.; Liu, L. H. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2874.
- [30] Lesley, W. C.; Wang, L. J.; Dixon, B. K. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6154.
- [31] He, P.; Zhao, C. W.; Xiao, C. S.; Tang, Z. H.; Chen, X. S. *Chin. J. Polym. Sci.* **2013**, *31*, 318.
- [32] Pan, S. R.; Shi, F.; Huang, N. F. *Chin. J. Biomed. Eng.* **1993**, *12*, 161 (in Chinese).
(潘仕荣, 施锋, 黄宁芳, 中国生物医学工程学报, **1993**, *12*, 161.)
- [33] Mori, H.; Müller, A. H. E. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1403.
- [34] Guyot, A.; Tauer, K. *Adv. Polym. Sci.* **1994**, *111*, 43.
- [35] Kikuchi, A.; Nose, T. *Macromolecules* **1997**, *30*, 896.
- [36] Zhang, M. F.; Breiner, T.; Mori, H.; Müller, A. H. E. *Polymer* **2003**, *44*, 1449.
- [37] Li, C. H.; Ge, Z. S.; Fang, J.; Liu, S. Y. *Macromolecules* **2009**, *42*, 2916.
- [38] Yuan, W. Z.; Yuan, J. Y.; Zhang, F. B.; Xie, X. M.; Pan, C. Y. *Macromolecules* **2007**, *40*, 9094.
- [39] Huang, K.; Rzaev, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6880.
- [40] Yuan, Y. Y.; Du, Q.; Wang, Y. C.; Wang, J. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1739.
- [41] Park, J. H.; Kwon, S.; Nam, J. O. *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 579.
- [42] Gao, Z. G.; Lee, D. H.; Kim, D. I. *J. Drug Targeting* **2005**, *13*, 391.
- [43] Yoo, H. S.; Park, T. G. *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 63.
- [44] Marin, A.; Sun, H.; Hussein, G. *J. Controlled Release* **2002**, *84*, 39.
- [45] Yoo, H. S.; Park, T. G. *J. Controlled Release* **2004**, *96*, 273.
- [46] Wang, C. H.; Hsiue, G. H. *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 140.
- [47] Liu, C. Y.; Hu, J. h.; Yang, D.; Yang, W. L. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 843 (in Chinese).
(刘聪颖, 胡建华, 杨东, 杨武利, 化学学报, **2009**, *67*, 843.)
- [48] Zheng, X. L.; Ding, A. S.; Luo, D.; Gao, H. S. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 92 (in Chinese).
(郑兴良, 丁爱顺, 罗丹, 高鸿盛, 化学学报, **2012**, *70*, 92.)
- [49] Yuan, L.; Wang, P. D.; Tang, Q. Q.; Zhang, X. H.; Zhang, X. H.; Yang, D.; Hu, J. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 640 (in Chinese).
(袁丽, 王蓓娣, 唐倩倩, 张晓鸿, 张晓环, 杨东, 胡建华, 有机化学, **2010**, *30*, 640.)
- [50] Huang, X. W.; Gu, L. N.; Lu, G. L.; Huang, X.; Zhang, Y. L.; Huang, X. Y. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 2653 (in Chinese).
(黄晓炜, 顾丽娜, 陆国林, 黄啸, 张亚琴, 黄晓宇, 化学学报, **2008**, *66*, 2653.)
- [51] Huang, X. W.; Gu, L. N.; Lu, G. L.; Huang, X.; Zhang, Y. L.; Huang, X. Y. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 1363 (in Chinese).
(黄晓炜, 顾丽娜, 陆国林, 黄啸, 张亚琴, 黄晓宇, 化学学报, **2009**, *67*, 1363.)
- [52] Jia, Z. F.; Fu, Q.; Huang, J. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 5190.
- [53] Queffelec, J.; Gaynor, S. G.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 8629.
- [54] Cai, C. H.; Wang, L. Q.; Lin, J. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11189.

(Qin, X.)