

生物可降解聚酯用作蛋白质药物控释载体

卢婷利, 陈 涛, 胡惠静

(西北工业大学生命科学院, 西安 710072)

摘要:聚乳酸 PLA 及乳酸与羟基乙酸的共聚物 PLGA, 由于其良好的生物相容性以及生物降解性, 可用作蛋白质类药物控释体系的载体材料, 同时可延长蛋白质药物的释放。本文综述了几种生物相容性聚酯及其衍生物以及它们的形成方法: (1) 在 PLGA 的分子链中引入亲水性的含醚键的分子如 PEO、PEG, 来提高聚合物的亲水性, 形成 PLGA 嵌段共聚物; (2) 将细胞可接受的片段或多肽固定在聚合物支架表面, 来增强 PLGA 与细胞间的粘附力, 得到靶向的 PLGA 衍生物; (3) 改变 PLGA 载体内的酸性环境, 提高蛋白质药物在载体中的稳定性, 发展了支化聚酯 PVA-*g*-PLGA, 并得到均速的药物释放。以上这些方法所得到的聚酯及其衍生物, 均可作为蛋白质类药物安全、可靠的载体材料。

关键词:生物降解聚酯; 线性 PLGA; 靶向 PLGA; 支化 PVA-*g*-PLGA

药物载体是药物缓、控释放体系的重要组成部分, 是影响药效的主要因素。脂肪族聚酯如聚乳酸 PLA、聚羟基乙酸 PGA 及其共聚物 PLGA, 具有低毒性、良好的生物相容性、可生物降解性以及降解产物无毒等优点, 广泛用作药物载体材料^[1,2]。然而对于亲水性药物如蛋白质, PLGA 作为载体却不理想, 主要原因是 PLGA 降解产生酸性的载体内环境 (pH~2), 易引起蛋白质变性或失活, 丧失药效和治疗效果^[3,4]。因此需要对 PLGA 进行改性, 提高其作为蛋白质药物载体的使用效果。目前主要有两种改性方法, 一是增加聚酯的亲水性, 使材料吸水性增加, 聚合物溶胀, 影响药物释放的孔洞扩散阶段; 二是影响聚酯的降解性, 形成新型的以 PLGA 为侧链的接枝聚合物, 加快聚合物的表面熔蚀降解行为。

1 PLGA 改性

1.1 共混改性

共混修饰是把 PLGA 与其它亲水性的聚合物或辅药共混, 以增加 PLGA 的亲水性。Zheng 等^[5]以藻酸盐、壳聚糖与 PLGA 共混作为载体材料, 制备 BSA 微囊, 发现微囊的包封率由单一 PLGA 的 61%~65% 增加到 81%~87%, 同时微囊的突释情况降低, 且通过调节载体材料中乳酸(LA)与羟基乙酸(GA)的比例可以调整 BSA 的释放曲线。Liu 等^[6]将 PLGA 与胶质共混作为载体材料, PLGA 为材料提供良好的机械性能, 而胶质的存在则增加了材料的亲水性。Mi 等^[7,8]用甲壳素与 PLGA 共混作为 BSA 的载体, 通过控制共混物中二者的比例较好地控制了 BAS 的释放速率。Wang 等^[9]用 POE 与 PLGA 共混作为毒扁豆碱的载体, 发现药物的释放速率随载体中 PLGA 的增加而增加, POE 的加入有效地控制了药物的突释现象。共混改性较好地提高了 PLGA 的亲水性, 提高了蛋白质的载药量以及药物的扩散作用, 改善了药物的释放性能。

1.2 PLGA 的衍生物

1.2.1 嵌段共聚物 在改变 PLGA 分子结构增加其亲水性时, 首先得到的是嵌段共聚物, 即在 PLGA 疏水性的分子链段中引入亲水性如含醚键的分子如 PEO^[10]、PEG^[11] 等, 形成二嵌段如 PLGA-PEG^[12]、三嵌段如 PLGA-PEO-PLGA^[13]、PLGA-PEG-PLGA、PEG-PLGA-PEG^[14] 等。

(1) α -二嵌段共聚物

Jeong 等^[15]用 PLGA 与不同分子量的 *m*PEG 共聚得到二嵌段共聚物及其薄膜材料, 发现 PEG 链段倾

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2006B12); 中国博士后基金资助项目(20060390322);

作者简介:卢婷利, 女, 讲师, 主要进行新型药物载体材料的研究, E-mail: lutinglixin@nwpu.edu.cn.

向于聚集于膜的表面,且膜材料对蛋白质的吸附作用随 *m*PEG 分子量的增加而增大。Yoo 等^[16]用阿霉素的氨基与二嵌段共聚物 PLGA-PEG 的端—OH 反应,形成阿霉素胶囊,发现该胶囊对抗 HepG2 细胞的细胞毒素活性远远高于未修饰的阿霉素,且具有较稳定的释放曲线。Luu 等^[17]用 PLGA/DNA、二嵌段共聚物 PLA-PEG/DNA 用作组织工程中的基团转移,嵌段共聚物对 DNA 的释放速率影响较大,但却不影响 DNA 的活性。Nam 等^[18]将 PLGA 联接到聚乙烯亚胺(PEI)低聚物的端羧基上,形成了两性的二嵌段共聚物 PEI-PLGA,用共聚焦显微镜研究了聚合物对细胞的吸附情况,发现相对于单一 PLGA,PEI-PLGA 可以迅速地吸附在细胞的表面并能转移到细胞质上,表明这种嵌段共聚物可用作药物载体。

(2) *b*-三嵌段共聚物

Chen 等^[19]通过 *D, L*-LA 和 GA 与 PEG 在辛酸亚锡 Sn(Oct)₂ 的作用下,开环聚合形成了热敏性的三嵌段聚合物 PLGA-PEG-PLGA,以溶解酵素作为模型蛋白,形成热敏性凝胶,考查了蛋白质的体外释放性能以及蛋白质在聚合物中的浓度和生物活性,表明增加嵌段共聚物中 PLGA 链段的长度,蛋白质的突释从 $41.2 \pm 5.4\%$ 降低到 $16.1 \pm 3.9\%$,增加聚合物的浓度则降低蛋白质药物的释放速率,且在 4 周后,蛋白质药物仍具有一定的生物活性($>80\%$),说明通过调节三嵌段共聚物中各嵌段的长度和浓度可以在蛋白质药物输送过程中有效地保持药物活性。Ronneberger 等^[20]用 PLGA、PEO 形成三嵌段共聚物 PLGA-PEO-PLGA,将其肌肉注射到老鼠体内,56 天时间周期内,老鼠未出现炎症,且注射部位周围组织细胞完好,说明此三嵌段共聚物生物相容性良好,可作为药物载体。Kissel^[21]将 PLGA-PEO-PLGA 三嵌段共聚物作为破伤风类毒素微囊的载体,发现药物释放连续且与聚合物的降解速率相一致。

1.2.2 靶向性 PLGA 衍生物 事实上,对于 PLGA 的修饰,我们不仅需要提高被包裹药物的稳定性,改变药物的释放速率,更为重要的是希望药物能够靶向于细胞或组织受体上,提高载体与受体间的粘接力以及粘附时间,这就需要对 PLGA 载体表面进行修饰^[22],因而发展了带有靶向性基团的 PLGA 载体。

在二嵌段共聚物 PLGA-PEG 中,亲水性的 PEG 链段位于共聚物的表面,因而在水溶液中,亲水性的 PEG 链段向外排列形成胶束,人们利用这一特点,将那些可以被细胞识别的基团联接到 PEG 链段上而被固定在聚合物表面,达到靶向细胞的目的^[23,24]。Yoon^[25]将半乳糖甘化的 PLGA 与 PLGA 共混来修饰 PLGA 的表面,PLGA 的端功能基为半乳糖,半乳糖可为肝细胞所接受,通过适当的制备工艺,可以得到 PLGA 表面带有半乳糖的聚合物载体,能够提高细胞的生物活性以及与载体粘附性^[26]。Yoon^[27]还用 PLGA-NH₂ 与 PLGA 共混形成多孔载体骨架,后将与细胞具有较好粘附性的多肽如 RGD、GRGDY (Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr) 与多孔载体联接,发现细胞与载体的粘附程度以及细胞的识别都比单一 PLGA 载体有不同程度的提高。Yoo 等^[28]将叶酸(HA)受体与 PLGA 共混来形成靶向 PLGA,作为阿霉素的载体靶向于肿瘤细胞表面。同时他们还通过 HA 表面暴露的自由氨基团,将 HA 化学固定在大孔氨基终端的 PLGA-PEG-NH₂ 与 PLGA 共混物的表面上,制备了 poly(*L*-lysine)-*g*-PLGA 微囊^[29],研究表明粘附基团在 PLGA 载体表面的稳定性良好。

然而仅有靶向是远远不够的,我们还需要提高药物载体在病灶组织部位的停留时间,其中的一个方法就是在药物载体 PLGA 表面接枝血凝素如小麦微生物血凝素^[30](WGA),血凝素与细胞膜表面的碳水化合物具有较大的粘合力,研究表明在聚合物表面接枝血凝素,不仅能够提高载体与病灶组织的粘附时间,而且提高了细胞的药物吸收量。Bivas-Benita^[31]将阳离子聚合物 PEI 引入到 PLGA 分子链中,提高了 PLGA 与肺部上皮细胞的粘附性,可见在 PLGA 表面接枝带正电荷的基团,也可以提高 PLGA 载体与细胞粘附力。Eniola 等^[32]研究发现将白细胞粘附在聚合物载体表面,能提高聚合物载体与细胞的粘附力。而将碳水化合物 biotinylated-Sialyl LewisX (sLeX)粘附于聚合物载体表面,也可以起到类似于白细胞的粘附作用,提高聚合物载体与细胞的接合力以及载体在病灶部位的停留时间^[33]。

2 新型支化聚酯

新型 PLGA 衍生物,尽管从一定程度上改善了药物的释放速率,但仍不能很好地保证被包裹药物,尤其是蛋白质类药物的生物活性。Breitenbach 等^[34]合成了以 PLGA 为侧链,亲水性 PVA 为主链的支化聚酯,形成第一代支化中性聚酯 PVA-*g*-PLGA。在这种聚合物分子中,主链 PVA 是亲水性的,侧链 PLGA 是

疏水性的,所以材料表面的物化性能可以通过调节侧链 PLGA 分子链的长短来改变。与线性聚合物 PLGA 相比,这种支化聚合物具有较低的突释率,且可通过改变分子结构和分子量来调整药物的释放速率,材料的亲水性增强,因而适合于包裹敏感性药物如蛋白质、多肽以及 DNA,另一个优点其释放机理由聚合物整体降解转变为聚合物的表面溶蚀^[35]。支化聚酯的这—种结构,可以进一步地修饰成带有负电荷的磺酸基和带正电荷的胺基^[36]。

2.1 第一代支化中性聚酯 PVA-g-PLGA:蛋白质注射用药物载体

中性支化聚酯 PVA-g-PLGA 的合成是丙交酸 LA、乙交酯 GA 在辛酸亚锡 Sn(Oct)₂ 催化作用下,130℃ 开环聚合得到,机理是催化剂 Sn(II)Oct₂ 与 PVA 上的一OH 发生作用,形成了一个活性中间体,后丙交酯与乙交酯开环形成第二个活性点,插入到 PVA 骨架上,随后分子链开始增长。

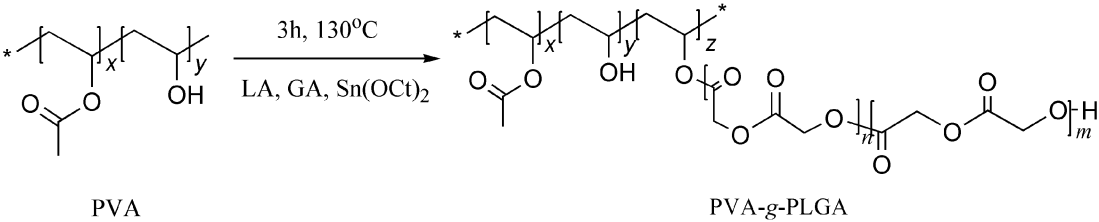


图 1 中性支化聚酯 PVA-g-PLGA 的合成
Figure 1 Synthesis of the neutral branched polyesters, PVA-g-PLGA

用这种支化聚酯作为蛋白质微囊的载体材料,发现短 PLGA 侧链的微囊具有较高的包封率以及较小的突释率,以及在溶蚀阶段较高的蛋白质释放速率^[37]。Pistel 等^[38]以 PVA-g-PLGA 为载体材料,采用 W/O/W 复乳法,0~4℃ 形成牛血清蛋白 BSA、卵清蛋白 OVA、细胞色素以及荧光标定的右旋糖苷(FITC-dextran)等亲水性生物大分子微囊,微囊的包封率 70%~90%。通过调节主链 PVA 以及侧链 PLGA 的长短,得到不同分子量的聚酯,发现包封率、突释率均依赖于聚合物的玻璃化转变温度 *T_g*,而体外蛋白质药物释放动力学则取决于 PVA-g-PLGA 的组成与结构。与单一的 PLGA 微囊相比,聚酯微囊的释放过程是连续的,且突释率较低。对侧链 PLGA 长度的考查表明,短 PLGA 侧链可以增加溶蚀阶段的药物释放,而

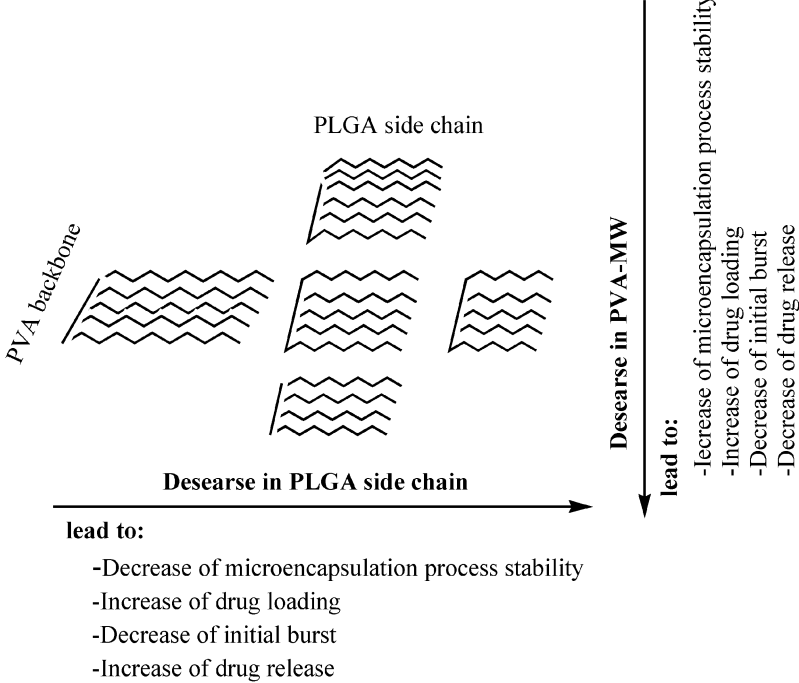


图 2 不同结构的 PVAL-g-PLGA 对微球性能的影响
Figure 2 Schematic illustration of the structure variations of PVAL-g-PLGA

and its influence on microsphere characteristics

最初的孔洞扩散释放则受主链 PVA 分子量的影响。分子主链 PVA 与侧链 PLGA 的长短不同,对药物的释放的影响规律可用图 2 表示。

2.2 第二代支化聚酯 SB-PVA-g-PLGA:破伤风类毒素疫苗的纳米粒子辅药

带负电的磺化丁基支化聚酯的合成过程如图 3 所示,二甲基亚砜先在 NaH 中质子化,后点滴加入到 PVA(M_w 15000Da)中激活其分子链上的一OH 基团,再加入 1,4-丁烷磺内酯,磺内酯开环在 PVA 与丁烷磺酸之间形成醚键,得 Sulfobutyl-PVA, Sulfobutyl-PVA 再与 LA、GA 并在 $Sn(Oct)_2$ 的催化下开环聚合,得到磺化丁基支化聚酯 SB-PVA-g-PLGA。

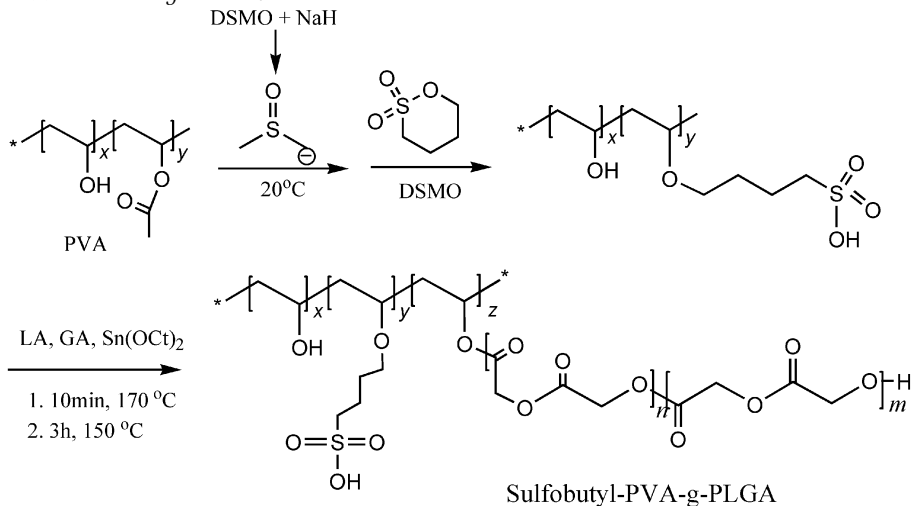


图 3 带负电荷磺化丁基支化聚酯 SB-PVA-g-PLGA 的合成

Figure 3 Synthesis of the negatively charged, sulfobutylated branched polyesters, SB-PVA-g-PLGA

将纳米微粒装载于疫苗上是免疫学上一个很重要的学术观点,而最大的问题在于抗原在纳米辅料上的载药量太少,而采用负电的磺化丁基支化聚酯 SB-PVA-g-PLGA 可以很好地解决这一问题,其表面亲水性的磺化丁基带有负电荷,在水溶液中,亲水性的基团向水相排列,形成冠状胶束结构,而胶束的外表面带有负电荷,因而较容易地吸附阳离子抗原如破伤风类毒素 TT。研究发现,当用最大磺化度的 SB-PVA-g-PLGA 时,TT 在载体表面的吸附速率快、吸附量大,且同时可保证 TT 的生物活性。

2.3 第三代支化聚酯 Amine-PVA-g-PLGA

第三代支化聚酯是在 PVA-g-PLGA 的主链上引入带正电荷的胺基如 DMAPA、DEAEA、DEAPA,制备过程如图 4 所示。对 Amine-PVA-g-PLGA 溶解性的研究表明,其溶解性介于亲脂性与亲水性之间,当侧链 PLGA 较短且胺化度较高时,聚酯的亲水性好,为水溶性聚酯。反之,长侧链 PLGA 以及较低的胺化度则得到亲酯性的聚酯。材料的 T_g 依赖于侧链 PLGA 的长度,无侧链的 PVA 具有最高的 T_g ,有侧链时 T_g 下降,长侧链比短侧链具有较高的 T_g 。

2.3.1 DEAPA-PVA-g-PLGA: DNA 疫苗的纳米辅料 微粒辅料($<10\mu m$)稳定性好,当应用于 DNA 给药时,可以维持 DNA 释放的平稳性,预见 DNA 药物的释放情况,并能靶向于带抗原的细胞,提高 DNA 在生物环境中的稳定性^[39]。采用生物降解高分子 PLGA 作为载体材料,制备方法如干法喷雾法、双层乳液法等均采用超声高速均质,产生较高的剪切力,造成颗粒破坏以及生物活性大分子失活。若采用胺修饰的支化聚酯可以很好地避免这些问题,两性聚酯通过静电作用与 DNA 之间形成纳米颗粒而不再需要高速均质过程,避免了对 DNA 分子的破坏^[40]。

2.3.2 DEAPA-g-PVA-PLGA: 肺部给药体系的纳米辅料 对于肺部给药系统辅料的一个要求就是聚合物制备过程不能选用表面活性剂,且雾化过程稳定,具有良好的生物相容性,并在指定的时间内能达到对所包裹药物的可控释放。由于胺化支化聚酯是两性的,在其纳米粒子的制备过程中不需要添加表面活性剂,在空气喷雾、超声雾化过程中均不会产生团聚,所以可以作为肺部给药系统的辅料^[41]。

2.3.3 DEAPA-g-PLA: 短侧链、水溶性聚合物用于蛋白质的载体体系 蛋白质、多肽类药物的载体体系一直是药剂技术中的一个难点,制备技术如高能量、温度、剪切力、pH 值以及有机溶剂都可能使蛋白质产

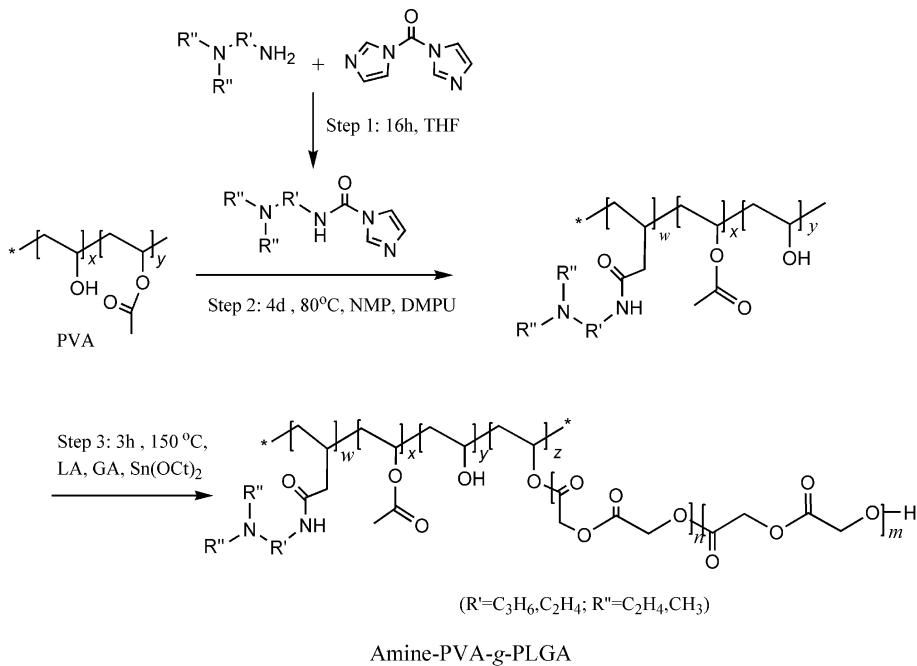


图 4 带负电荷胺取代的支化聚酯的合成

Figure 4 Synthesis of the positively charged, amine-substituted branched polyesters

生变性或失活。采用水溶性胺改性的短侧链支化聚酯 DEAPA-PVA-g-PLGA，制备过程在水中进行，条件温和，且聚合物表面的阳离子可与蛋白质形成聚电解质体系，稳定性好且无需外加稳定剂，所以对保护蛋白质的稳定性非常有利^[42]。

3 结束语

随着病理生理学以及疾病细胞机理的深入研究，靶向以及细胞特效药的递药技术成为目前研究的热点，PLGA 及其衍生物在靶向递药方向表现了很好的潜力。而要靶向于特定细胞，就需要载体表面有特定的配体，提高载体与细胞的接合力。也就是说，使现有的生物降解聚合物具有生物粘附性、细胞特异性以及其它特殊的性能，无疑是提高载体药物靶向以及治疗效果的一个好的思路，而聚合物中存在功能性的基团则是这一思想能够实现的必要条件。支化聚酯^[43]在药物载体方面表现出了优良的性能，但对于这种聚合物结构与性能的关系、聚合物载体与被包裹药物之间的相互作用、药物的释放动力学以及聚合物的生物降解机理还需要深入的研究与探索。而新型降解性载体材料的研究，对蛋白质类药物的高效利用以及疾病的治疗，无疑是让人欣慰的事情，但仍需要广大科研工作者做大量的工作。

参考文献：

[1] Wang J, Wang B M, Schwendeman S P. J Control Rel, 2002, 82: 289~307.
[2] Singha L, Kumara V, Ratner B D. Biomater, 2004, 25: 2611~2617.
[3] Li L, Schwendeman S P. J Control Rel, 2005, 101: 163~173.
[4] Anderson J M, Shive M S. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28: 5~24.
[5] Zheng C H, Gao J Q, Zhang Y P, et al. Biochem Biophys Res Communications, 2004, 323: 1321~1327.
[6] Liu L S, Won Y J, Cooke P H, et al. Biomater, 2004, 25: 3201~3210.
[7] Mi F L, Lin Y M, Wu Y B, et al. Biomater, 2002, 23: 3257~3267.
[8] Mi F L, Shyu S S, Lin Y M, et al. Biomaterial, 2003, 24: 5023~5036.
[9] Wang L, Chaw C S, Yang Y Y, et al. Biomater, 2004, 25: 3275~3282.
[10] Luck M, Pistel K F, Li Y X, et al. J Control Rel, 1998, 55: 107~120.
[11] Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55: 403~419.
[12] Mallardé D, Boutignon F, Moine F, et al. Int J Pharm, 2003, 261: 69~80.
[13] Kissel T, Li Y X, Unger F. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54: 99~134.

- [14] Eong B, Bae Y H, Kim S W. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, 16, 185~193.
- [15] Jeong J H, Lim D W, Han D K, et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, 18, 371~379.
- [16] Yoo H S, Park T G. *J Control Rel*, 2001, 70, 63~70.
- [17] Luu Y K, Kim K, Hsiao B S, et al. *J Control Rel*, 2003, 89, 341~353.
- [18] Nam Y S, Kang H S, Park J Y, et al. *Biomater*, 2003, 24, 2053~2059.
- [19] Chen S, Pieper R, Webster D C, et al. *Int J Pharm*, 2005, 288, 207~218.
- [20] Ronneberger R, Kissel T, Anderson J M. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 43, 19~28.
- [21] Kissel T, Li Y X, Volland C, et al. *J Control Rel*, 1996, 39, 315~326.
- [22] Quirk R A, Davies M C, Tendler S J B, et al. *Macromolecules*, 2000, 33, 258~260.
- [23] Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. *Biomacromolecules*, 2000, 1, 39~48.
- [24] Yasugi K, Nakamura T, Nagasaki Y, et al. *Macromolecules*, 1999, 32, 8024~8032.
- [25] Yoon J J, Nam Y S, Park T G. *Biotech Bioeng*, 2002, 78, 1~10.
- [26] Park T G. *J Biomed Mater Res*, 2002, 59, 127~135.
- [27] Yoon J J, Song S H, Lee D S, et al. *Biomater*, 2004, 25, 5613~5620.
- [28] Yoo H S, Park T G. *J Control Rel*, 2004, 96, 273~283.
- [29] Yoo H S, Lee E A, Yoon J J, et al. *Biomater*, 2005, 26, 1925~1933.
- [30] Weissenbock A, Wirth M, Gabor F. *J Control Rel*, 2004, 99, 383~392.
- [31] Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger H E, et al. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 1~6.
- [32] Eniola A O, Rodgers S D, Hammer D A. *Biomater*, 2002, 23(10), 2167~2177.
- [33] Eniola A O, Hammer D A. *Biomaterials*, 2005, 26, 661~670.
- [34] Breitenbach A, Kissel T. *Polymer*, 1998, 39, 3261~3271.
- [35] Pistel K F, Breitenbach A, Zange-Volland R, et al. *J Control Rel*, 2001, 73, 7~20.
- [36] Dailey L A, Wittmar M, Kissel T. *J Control Rel*, 2005, 101, 137~149.
- [37] Blasi P, D'Souza S S, Selminc F, et al. *J Control Rel*, 2005, 108, 1~9.
- [38] Breitenbach A, Pistel K F, Kissel T. *Polymer*, 2000, 41, 4781~4792.
- [39] Jilek S, Merkle H P, Walter E. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 377~390.
- [40] Tinsley-Brown A M, Fretwell R, Dowsett A B, et al. *J Control Rel*, 2000, 66, 229~241.
- [41] Dailey L A, Schmehl T, Gessler T, et al. *J Control Rel*, 2003, 86, 131~144.
- [42] Simon M. *Bioconjug Chem*, 2004, 15, 841~849.
- [43] Nadeau V, Leclair G, Sant S, et al. *Polymer*, 2005, 46, 11263~11272.

Biodegradable Polyesters and Their Derivatives for Protein Delivery

LU Ting-li, CHEN Tao, HU Hui-jing

(*Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China*)

Abstract: Biodegradable polyesters, such as PLA and PLGA, have proven to be very useful protein delivery sustained release vehicle material and can provide prolonged protein release thanks to their good biocompatibility and biodegradability. This review provides an applicable summary of different formulation routes to forming polyesters and their derivatives for the purpose of (1) improving the hydrophilic property of PLGA through introducing molecule having ether bond, such as PEO, PEG, in PLGA and forming PLGA block copolymer; (2) enhancing the adhesion of vehicle and cell by immobilizing the cell-recognizable ligand moiety and/or peptide onto the surface of biodegradable polymer scaffolds and achieving targeted PLGA derivatives; and (3) developing novel branched polyesters PVA-g-PLGA and obtaining zero-order drug release kinetics through changing the acid microclimate in PLGA vehicle and improving the stability of protein inner the vehicle. All of the above PLGA and their derivatives can produce safe, qualified and efficacious vehicle for protein and peptide drug delivery system.

Key words: Biodegradable polyesters; Linear PLGA; Targeted PLGA; Branched PVA-g-PLGA