

温敏性 PCL-PEG-PCL 水凝胶的合成、 表征及蛋白药物释放

苗博龙, 马桂蕾, 宋存先

(中国医学科学院、北京协和医学院生物医学工程研究所, 天津 300192)

摘要 考察了温敏性 PCL-PEG-PCL 水凝胶中聚乙二醇(PEG)及聚己内酯(PCL)不同嵌段组成对其溶胶-凝胶相转变温度以及亲水性药物(牛血清白蛋白, BSA)释放速率的影响. 采用开环聚合法, 以辛酸亚锡为催化剂、PEG1500/PEG1000 为引发剂, 与己内酯单体发生开环共聚, 合成了一系列具有不同 PEG 和 PCL 嵌段长度的 PCL-PEG-PCL 型三嵌段共聚物. 通过核磁共振氢谱及凝胶渗透色谱对其组成、结构及分子量进行了表征. 共聚物的溶胶-凝胶相变温度由翻转试管法测定. 利用透射电镜、核磁共振氢谱及荧光探针技术证实了该材料在水溶液中胶束的形成. 以 BSA 为模型蛋白药物, 制备载药水凝胶, 利用 microBCA 法测定药物在释放介质中的浓度, 研究其体外释放行为. 实验结果表明, 共聚物的溶胶-凝胶相变温度与 PCL 及 PEG 嵌段长度紧密相关, 即在给定共聚物浓度情况下, 固定 PEG 嵌段长度而增加 PCL 嵌段长度, 会导致相变温度降低; 而固定 PCL 嵌段长度而增加 PEG 嵌段长度, 其相变温度相应升高. 水凝胶中蛋白药物的释放速率与疏水的 PCL 嵌段长度无关, 而与亲水的 PEG 嵌段长度密切相关, 即 PEG 嵌段越长, 蛋白药物释放越快.

关键词 PCL-PEG-PCL 共聚物; 温度敏感; 水凝胶; 凝胶相变温度; 蛋白药物释放

中图分类号 O631.1⁺1

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)12-2508-06

近年来, 由于生物技术的快速发展和人类基因组测序的完成, 大量可用于治疗疾病的蛋白类药物的发展前景广阔. 于是蛋白药物在体内经肝脏代谢可导致其血浆半衰期较短, 目前临床上把皮下注射作为其主要的给药方式. 但这种方法的最大缺陷在于需要频繁注射以确保药物疗效^[1,2]. 因此, 有必要设计并合成出一种新型材料作为蛋白药物的缓释给药体系, 使得药物活性免受外界条件影响, 保持理想的疗效, 提高蛋白药物的临床应用价值.

温敏性水凝胶是一种亲水的聚合物网络, 对其大量的研究发现, 其在凝胶形成过程中不涉及化学反应, 分子链间的交联通过分子间相互作用力(范德华力、疏水相互作用及氢键等)形成. 通过改变温度就可以影响并改变这些疏水相互作用以及氢键作用, 在水中经过简单的可逆性相转变(溶胶-凝胶)即可形成水凝胶. 因此温敏性水凝胶的制备过程更为简单, 且不需要有机溶剂, 将更有利于蛋白类药物的传递^[3]. 目前一些研究表明, 温敏性 PLGA/PEG 水凝胶具有比较理想的凝胶特性, 可在温度低于 30 °C 时装载蛋白药物, 在体温条件下发生溶胶-凝胶相变, 并由于其良好的生物可降解性和安全性而受到广泛的关注. 但这种给药体系仍存在一些尚未解决的问题, 如载药时须在较低温度下操作, 且蛋白药物的缓释周期较短(仅为 7 d), 给临床应用带来了不便和局限. 另外, 从材料角度看, 提高疏水的 PLGA 嵌段长度会引起蛋白药物的聚集^[4].

众所周知, 聚己内酯(PCL)是一种被广泛研究的可生物降解的结晶聚合物, 共聚物可呈粉末状形态, 相比于其它材料在临床使用时更易于处理, 而且, 聚己内酯具有良好的生物相容性、低毒性、疏水性且药物通透性好; 而聚乙二醇(PEG)也由于其良好的理化性质, 如低毒性、低免疫原性及低抗原性等, 已得到美国食品药品监督管理局的批准用于人体内使用^[5,6]. 基于上述优点, PCL 和 PEG 的共聚物被认为安全无毒、生物相容性好且生物降解速度可调, 在生物医用材料领域具有广阔的应用前景.

收稿日期: 2009-03-18.

基金项目: 教育部博士点新教师基金(批准号: 200800231138)资助.

联系人简介: 宋存先, 女, 研究员, 主要从事医用高分子材料和药物缓控释放的研究. E-mail: scxian@tom.com

Hwang 等^[7]合成了温敏性 PEG-PCL-PEG 型水凝胶; Gong 等^[8]考察了 PEG-PCL-PEG 型水凝胶在昆明鼠体内凝胶的形成、体外药物的释放及材料的细胞毒性. 尽管 PEG-PCL-PEG 型共聚物具有良好的应用前景, 但其合成及纯化过程较为繁琐. 本文采用一步开环共聚法合成了温敏性 PCL-PEG-PCL 型可降解水凝胶共聚物, 减少了己二异氰酸酯偶联步骤, 合成方法更为简单, 且具有理想的理化性质; 同时着重探讨了不同疏水嵌段(PCL)及亲水嵌段(PEG)长度及组成对水凝胶温敏性能及药物释放行为的影响, 以期筛选出适合作为蛋白类药物缓控释的新型给药载体.

1 实验部分

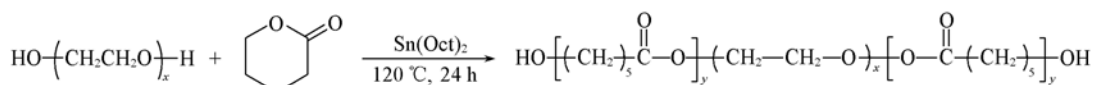
1.1 试剂与仪器

己内酯单体(ϵ -CL)购自 Aldrich 公司, 在氮气保护下, 经氯化钙减压蒸馏除水; 聚乙二醇(PEG, $M_w = 1000, 1500$)购自 Fluka 公司; 辛酸亚锡[Sn(Oct)₂, 分析纯]、牛血清白蛋白(BSA)和 Pluronic F127 均购自 Sigma 公司; 芘(Pyrene, 分析纯)购自天津阳光允能生物技术开发有限公司; 二氯甲烷和石油醚均为分析纯.

Bruker AM300 核磁共振仪; Waters ALC/GPC 244 GPC 仪; Hitachi F4500 荧光光谱仪; JEOL JEM-100S 透射电镜(TEM); Spectra Plus 384(Molecular Devices)紫外-可见分光光度仪.

1.2 合成

分别将干燥的 PEG ($M_w = 1000, 1500$) 和 ϵ -CL 按不同比例加入到封管中, 用注射器加入一滴 Sn(Oct)₂, 抽真空, 通氮气, 置换 5 次, 排尽管中氧气. 喷枪封管后, 置于 120 °C 油浴中搅拌反应 24 h. 反应结束后, 将产物溶于二氯甲烷中, 用石油醚沉淀纯化 2 次, 真空干燥过夜, 密封后于 4 °C 冷藏保存. 具体合成路线见 Scheme 1.



Scheme 1 Synthetic route of PCL-PEG-PCL

1.3 ¹H NMR 和 GPC 测试

在 25 °C 下, 核磁共振氢谱(¹H NMR)由 Bruker AM300 核磁共振仪测定, 溶剂为 CDCl₃, TMS 为内标. 在 35 °C 下, 凝胶渗透色谱(GPC)由 Waters ALC/GPC 244 GPC 仪测定, 溶剂为 THF, 流速为 1.0 mL/min, PS 为标准物.

1.4 Sol-gel 转变相图测定

材料的 Sol-gel 转变相图采用翻转试管法测定. 在室温下, 分别将一定量的不同材料置于 4 mL 试管中, 加入 1 mL 双蒸水, 完全溶解, 浸没到恒温水浴中, 每步升温速率为 1 °C/10 min, 达到指定温度后稳定 20 min, 根据流动(Sol)-不流动(Gel)的原则进行判断, 绘制 Sol-gel 转变相图, 精确度为 ± 1 °C^[7,9].

1.5 胶束的形成

将 1 滴含有质量分数为 0.1% 磷钨酸的纳米粒混悬液置于包有碳膜的铜网上, 然后用电镜观察^[10]. 将材料配制成一系列浓度(0.1 ~ 1 × 10⁻⁶ g/L), 以芘(6.0 × 10⁻⁷ mol/L)为荧光探针, 固定发射波长 $\lambda_{em} = 390$ nm, 利用 Hitachi F4500 荧光光谱仪测定荧光强度, 通过计算得到该材料的临界胶束浓度(cmc)^[11,12]. 为证实共聚物可在水中形成核-壳结构的胶束, 采用 Bruker AM300 核磁共振仪测定其 ¹H NMR 谱, 溶剂为 CDCl₃ 和 D₂O, TMS 为内标.

1.6 体外药物释放实验

以 pH = 7.4 的 PBS 缓冲液作为释放介质, 在 37 °C 的恒温空气浴振荡器中进行凝胶的体外药物释放实验. 包药过程如下: 将材料(0.25 mg)置于 10 mL 试管中, 加入 1 mL 双蒸水, 完全溶解后, 加入一定量的 BSA, 混合均匀. 释放过程如下: 将试管置于 37 °C 的振荡培养箱中, 形成凝胶状态, 加入 5 mL 释放液(PBS, pH = 7.4), 恒温振荡(60 r/min). 定时取样时, 将释放液全部取出用于测定药物释放量,

并补充上新鲜的空白 PBS 液. 采用 microBCA 法测定牛血清白蛋白(BSA)在凝胶中的释放速率, 工作曲线为 $\rho = (A - 0.0082)/0.0014$, 计算并绘制药物累积释放曲线图, 质量浓度单位为 mg/mL.

2 结果与讨论

2.1 材料的 ^1H NMR 和 GPC 表征

以辛酸亚锡为催化剂, 分别以 PEG1500 和 PEG1000 为引发剂, 与 ε -CL 发生开环共聚反应. 所得材料的物理参数列于表 1.

Table 1 Physical parameters of the synthesized PCL-PEG-PCL triblock copolymers

Sample	PCL-PEG-PCL ^a	$n(\text{EG})/n(\text{CL})^a$	M_n^a	M_n^b	PDI ^b
A1	(CL) _{7.0} -(EG) _{22.7} -(CL) _{7.0}	1.6	800-1000-800	2650	1.1
A2	(CL) _{9.8} -(EG) _{22.7} -(CL) _{9.8}	1.3	1120-1000-1120	3400	1.3
B1	(CL) _{11.0} -(EG) _{34.1} -(CL) _{11.0}	1.6	1250-1500-1250	4100	1.2
B2	(CL) _{11.8} -(EG) _{34.1} -(CL) _{11.8}	1.4	1350-1500-1350	4350	1.3

a. Calculated from ^1H NMR of EG(4H, 3.63) and CL(2H, 4.04); *b.* calculated from GPC.

图 1 是材料的 300 MHz ^1H NMR 谱. 各吸收峰对应的质子归属如下: δ 3.63 (图 1 峰 e) 为 PEG 链段上的 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 的特征峰, δ 4.04 (图 1 中峰 d), δ 2.36 (图 1 峰 a), δ 1.68 (图 1 峰 b) 及 δ 1.36 (图 1 峰 c) 则分别对应 PCL 链段上的 $-\text{CH}_2-$ 质子. 由于 PEG 链段分子量已知, 因此 PCL 链段的分子量可通过 PEG 嵌段中 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 基团的特征峰 e 与 PCL 嵌段中 $-\text{CH}_2-$ 基团的特征峰 d 的峰强度比值计算得出.

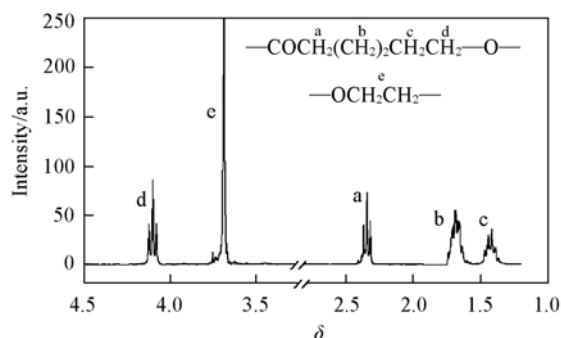


Fig. 1 ^1H NMR of triblock copolymer in CDCl_3

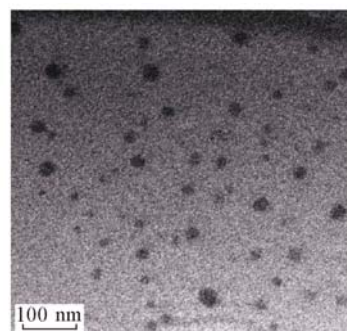


Fig. 2 TEM image of 0.1% sample A2 in water

2.2 材料胶束的形成

图 2 为温敏性 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物的透射电镜(TEM)照片, 可见共聚物在溶液中形成了胶束.

图 3(A) 和(B) 分别为共聚物在 D_2O 和 CDCl_3 中的 ^1H NMR 谱, 可确证 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物在水中形成了具有核-壳结构的胶束. 这是由于 PCL 和 PEG 嵌段均溶于 CDCl_3 , 二者以液态形式存在, 不形成胶束, 因此二者的质子特征峰在 CDCl_3 中全部出现[图 3(B)]. 在 D_2O 中[图 3(A)], PCL 嵌段不溶形成胶束的内核, 而 PEG 嵌段溶解形成胶束的外壳, 所以 PCL 嵌段特征峰(图 1 a, b, c, d)全部消失, 而 PEG 嵌段特征峰(图 1e)则得到保留^[13].

图 4 是以芘为荧光探针的样品 B1 水溶液的荧光光谱图, 可见共聚物的质量浓度依次增加(自下而上, 范围是 $1 \times 10^{-6} \sim 0.1$ g/L), 荧光强度也依次增加. 当质量浓度增加到一定值时, 荧光光谱的最大吸收峰发生红移, 即从 333.5 nm 处转移到 335.5 nm 处. 这说明芘先是分配到疏水区域, 其最

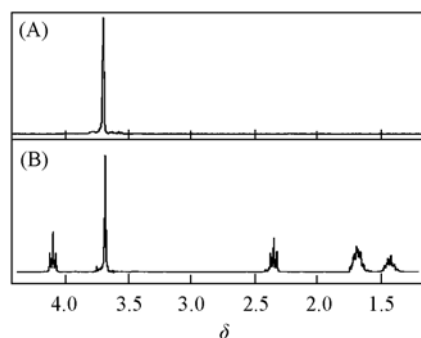


Fig. 3 ^1H NMR of triblock copolymer in D_2O (A) and CDCl_3 (B)

大吸收峰位于 333.5 nm. 随着胶束的形成, 苾从水环境中转移到胶束的疏水内核中, 其最大吸收峰位于 335.5 nm, 这一荧光红移现象进一步证明了样品在水中胶束的形成. 将 333.5 和 335.5 nm 处荧光激发光谱强度之比与溶液质量浓度对数作图, 可得到样品 A1, A2, B1 和 B2 的临界胶束浓度 (cmc) 分别为 5×10^{-4} , 3×10^{-4} , 6.0×10^{-4} 及 3.0×10^{-4} g/L^[11]. 证明当亲水嵌段长度一致时, 疏水嵌段越长, 材料在水中越易胶束化, 即 cmc 值越小.

以上 3 种方法证实了 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物可在水中形成具有核-壳结构胶束的能力, 为凝胶的胶束机理研究提供了实验依据.

2.3 材料的 Sol-gel 转变相图

PCL-PEG-PCL 型三嵌段共聚物在水中均呈现可逆的温敏性 Sol-gel 相变能力. 温敏凝胶的 Sol-gel 转变相图可以反映凝胶转变温度和浓度之间的关系. 图 5 是利用翻转试管法测定的 4 种材料的 Sol-gel 转变相图.

在考察的温度范围 (20 ~ 55 °C) 内, 所有的水凝胶均呈 3 种基本的物理形态, 即溶胶、凝胶以及浑浊的沉淀 (图 6). 随着温度的变化, 共聚物由溶胶状态 [图 6(A)] 转变为水凝胶状态 [图 6(B)], 并最终形成沉淀状态 [图 6(C)]. 温敏性 PCL-PEG-PCL 型共聚物由疏水的 PCL 嵌段和亲水的 PEG 嵌段组成, 其中 PCL 嵌段起到交联形成的作用, 而 PEG 嵌段则发挥使共聚物分子保留于水中的作用. 在较低温度时, 亲水的 PEG 嵌段和水分子之间形成的氢键起主要作用, 导致共聚物溶于水; 当温度升高时, 氢键作用减弱, 疏水的 PCL 嵌段间的疏水作用力增强, 从而发生 Sol-gel 相变^[14]. 如图 5 所示, 共聚物的嵌段组成对相变温度影响显著. 当材料质量分数为 15% ~ 30% 时, 随着 PCL 嵌段长度分别由分子量 1120 (B1) 增大到 1250 (B2), 或由 800 (A1) 增大到 1000 (A2), 共聚物的凝胶相变温度规律地下降. 这说明在固定 PEG 嵌段长度的条件下, 增大 PCL 嵌段的长度会提高共聚物中该嵌段的疏水性, 增强其聚集趋势, 使共聚物在水溶液中更早地形成水凝胶. 而共聚物 B1 的 Sol-gel 相变温度高于共聚物 A2, 则表明当疏水 PCL 嵌段长度相近时, 增大 PEG 嵌段长度, 共聚物的亲水性会得到提高.

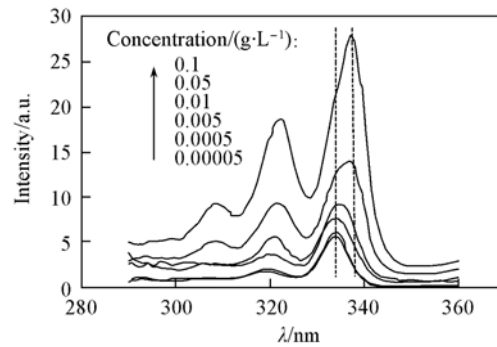


Fig. 4 Fluorescent spectra of sample B1 solution

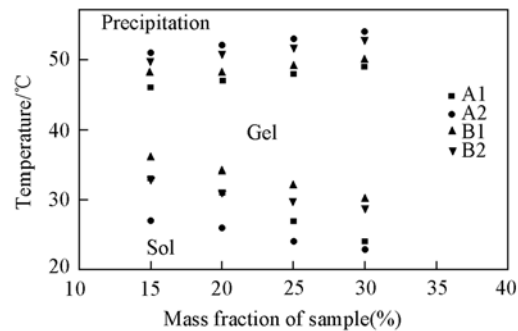


Fig. 5 Sol-gel transition phase diagram

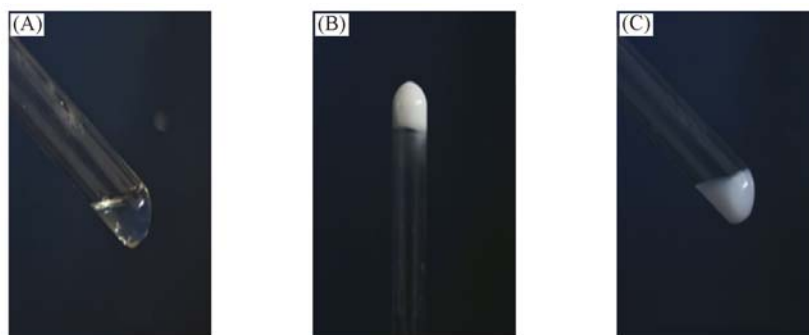


Fig. 6 Optical images of sample A1

(A) Clear sol, 25 °C; (B) opaque gel, 31 °C; (C) precipitation, 47 °C.

进一步观察到共聚物 B1 和 B2 (PEG 分子量为 1500) 的凝胶窗口由两部分组成, 在温度相对较低下呈透明凝胶状态, 而在温度相对较高下呈不透明凝胶状态. 根据 Yu 等^[15] 的报道, 凝胶相变的发生是由于胶束的聚集, 而驱动胶束聚集的原因是胶束间的疏水相互作用.

综上所述,我们认为共聚物的凝胶过程可能包括如下4个步骤:(1)两亲性共聚物在水中通过自组装形成胶束,此时体系呈澄清的溶胶状态[图7(A)];(2)随着温度的升高,胶束间的疏水相互作用增强,胶束由不均一的介观胶束网络进一步聚集形成宏观的凝胶.相比于共聚物A1和A2,共聚物B1和B2中亲水的PEG嵌段较大,不易发生大规模的胶束聚集,而是形成相对“稀疏”的胶束网络,即透明凝胶[图7(B)];(3)随着温度进一步升高,胶束网络会发生糙化(Coarsening effect),形成相对“致密”的胶束簇.当胶束簇尺寸或胶束簇间隔的大小进入可见光波长范围内时,便形成了肉眼可见的不透明凝胶[图7(C)];(4)当温度过高时,由于共聚物的疏水性过大,导致胶束结构破坏,从而形成浑浊的沉淀[图7(D)].

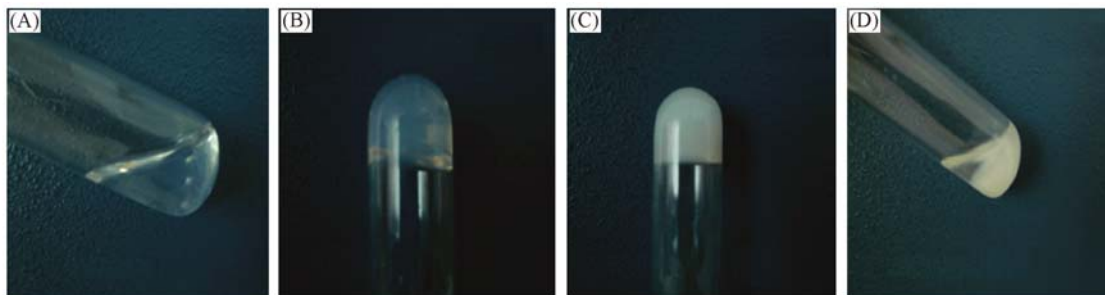


Fig. 7 Optical images of copolymer B1 solutions in the test tube at tested temperatures

(A) Clear sol, 25 °C; (B) transparent gel, 34 °C; (C) opaque gel, 37 °C; (D) precipitation, 51 °C.

另外,当材料的质量分数在15%~30%范围时,这4种材料Sol-gel相变温度位于23~37 °C区间,符合人体37 °C模拟药物缓释及保持蛋白药物活性的要求.

2.4 材料的体外药物释放

图8所示为模型蛋白药物BSA在合成的PCL-PEG-PCL型温敏水凝胶及对照用Pluronic F127中的体外释放曲线.由图8可见,Pluronic F127在1 d内将全部药物释放完毕,而本文合成的材料对于BSA的释放时间分别达到18 d和32 d,起到了对蛋白药物的控制释放的作用.

在图8中,药物在前24 h的释放速率较高,自24 h起释放速率有所减缓且趋于平稳.这主要是因为PCL-PEG-PCL共聚物在水中形成了胶束,疏水性的PCL嵌段形成胶束的内核,而亲水性的PEG形成胶束的外壳.亲水性药物BSA会分布在亲水性PEG区域,并与胶束最外层负责连接PEG与PCL的C=O基团形成氢键.当外层的作用位点饱和时,水凝胶中游离药物的含量增加.此时,游离的BSA分子更易以较高的速率从凝胶的亲水通道扩散并释放出去.当游离药物释放完毕时,其余的结合药物便会以较低的速率释放^[14].

另外,从图8还可观察到,在PEG嵌段长度一定的情况下,PCL嵌段的长度对于药物释放速率无明显影响,但PEG嵌段的长度直接决定了药物释放的速率(如材料A1, A2与B1).综上可以得到如下结论:(1)由于疏水的PCL嵌段居于胶束的内部,不与BSA分子发生作用,故其嵌段长度对药物释放速率影响不大;(2)亲水性嵌段PEG处于胶束外部,直接与亲水性药物BSA发生相互作用.随着增加PEG嵌段的长度,聚合物中PEG区域的亲水性提高,从而使BSA与PEG嵌段之间的相互作用加强,进而减缓药物释放速率.这充分解释了A1和A2亲水药物释放速率高于B1和B2的现象.值得注意的是,尽管Pluronic F127中的PEG含量远高于本文合成的材料,但其凝胶的机械性能较差,其结构在1 d内全部破坏,这直接导致了药物的快速释放;而PCL-PEG-PCL水凝胶则在30 d内仍保持了完整的结构.以上事实证明,共聚物中合理的PEG嵌段长度和良好的凝胶机械性能是保证达到药物缓控释效果的关键.

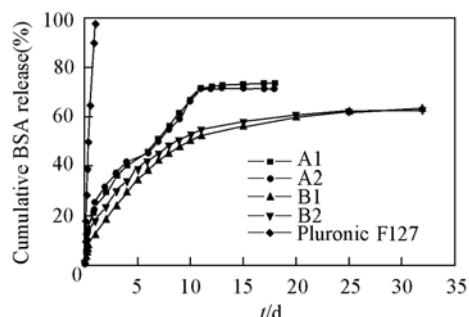


Fig. 8 Cumulative release profile of BSA from hydrogels

参 考 文 献

- [1] Sanders L. M. . Eur. J. Drug Metab Pharmacokinet[J], 1990, **15**(2): 95—102
- [2] Singh S. , Webster D. C. , Singh J. . International Journal of Pharmaceutics[J], 2007, **341**: 68—77
- [3] Ruel-Gariépy E. , Leroux J. C. . European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics[J], 2004, **58**(2): 409—426
- [4] Yu T. , Singh J. . International Journal of Pharmaceutics[J], 2009, **365**: 34—43
- [5] Richter A. W. , Akerblom E. . Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. [J], 1983, **70**(2): 124—131
- [6] Marcotte N. , Polk A. , Goosen M. F. . J. Pharm. Sci. [J], 1990, **79**(5): 407—410
- [7] Hwang M. J. , Suh J. M. , Bae Y. H. , *et al.* . Biomacromolecules[J], 2005, **6**: 885—890
- [8] Gong C. Y. , Shi S. , Dong P. W. , *et al.* . International Journal of Pharmaceutics[J], 2009, **365**: 89—99
- [9] Loh X. J. , Goh S. H. , Li J. . Biomacromolecules[J], 2007, **8**: 585—593
- [10] Ge H. X. , Hu Y. , Jiang X. Q. , *et al.* . Journal of Pharmaceutical Sciences[J], 2002, **91**(6): 1463—1473
- [11] Wilhelm M. , Zhao C. L. , Wang Y. C. , *et al.* . Macromolecules[J], 1991, **24**: 1033—1040
- [12] LIN Hao(林浩) , TIAN Hua-Yu(田华雨) , SUN Jing-Ru(孙敬茹) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(7): 1385—1388
- [13] Ryu J. G. , Jeong Y. I. , Kim I. S. , *et al.* . International Journal of Pharmaceutics[J], 2000, **200**(2): 231—242
- [14] Qiao M. X. , Chen D. W. , Hao T. N. , *et al.* . International Journal of Pharmaceutics[J], 2007, **345**(1/2): 116—124
- [15] Yu L. , Chang G. T. , Zhang H. , *et al.* . Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry[J], 2007, **45**(6): 1122—1133

Synthesis, Characterization and Protein Drug Release of Temperature-Sensitive PCL-PEG-PCL Hydrogel

MIAO Bo-Long, MA Gui-Lei, SONG Cun-Xian*

(Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Institute of Biomedical Engineering, Tianjin 300192, China)

Abstract The effect of PEG and PCL composition of thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogels on Sol-gel transition temperature and release rate of bovine serum albumin(BSA) were investigated. A series of thermosensitive PCL-PEG-PCL triblock copolymers with different PEG and PCL block lengths were synthesized *via* ring-opening polymerization of ϵ -CL using PEG1500/PEG1000 as the initiator and Sn(Oct)₂ as the catalyst. Their composition, structure, and molecular weight were characterized *via* ¹H NMR and GPC techniques. The Sol-gel transition temperature was determined with the test tube inverting method. TEM, ¹H NMR, and fluorescence probe technique were employed to identify formation of micelles of the triblock copolymers in aqueous solution. BSA was used as a model protein drug. Hydrogels of these PCL-PEG-PCL triblock copolymers loaded with BSA were prepared for *in vitro* release study, and BSA concentration in the released sample was determined with microBCA method. The effect of PCL and PEG block lengths on Sol-gel transition temperature and release rate of BSA was also discussed. The results obtained indicated that the Sol-gel transition temperature of copolymers was related to block lengths of PCL and PEG, increasing the PCL length at a fixed PEG central block led to a lower transition temperature at a given copolymer concentration, while with the enhancement of the PEG length at a similar hydrophobic PCL length, the transition temperature increases. And the protein release rate was independent of the hydrophobic PCL length, whereas the longer PEG length, the lower protein release rate.

Keywords PCL-PEG-PCL copolymer; Temperature-sensitive; Hydrogel; Sol-gel transition temperature; Controlled release of protein drug

(Ed. : H, J, Z)