



PEG 的分散性及结构对 PEG 化胶束在 BSA 溶液中稳定性的影响

林超^{1,2}, 袁于民²

(1. 浙江理工大学, a. 材料科学与工程学院; b. 智能生物材料研究所, 杭州 310018;

2. 浙江博美生物技术有限公司, 浙江嘉兴 314001)

摘要: 聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)化胶束在体外的稳定性是其作为纳米药物载体的重要参考指标。将不同分散性和结构的 PEG, 与十八烷酸、十四烷酸、1,2-二硬脂酸-3-磷脂酰乙醇、胆固醇、维生素 E 琥珀酸酯、N,N-双十四烷基胺和抗癌药物紫杉醇等合成一系列两亲性聚合物; 分析在相同疏水段的条件下, PEG 的分散性和结构对其胶束临界胶束浓度(Critical micelle concentration, CMC)、粒径以及在牛血清白蛋白(BSA)溶液中的稳定性的影响。结果显示: PEG 的分散性对线形 PEG 化胶束的 CMC 和粒径影响不明显, 分支结构的 PEG 化胶束在 CMC 和粒径上均显著小于线形 PEG 化胶束; 在 BSA 溶液中, 分支结构的 PEG 化胶束的稳定性显著优于线形单分散的, 多分散 PEG 化胶束的稳定性最差, PEG 结构和分散性影响胶束的体外稳定性。该文结果为开发单分散 PEG 化胶束的药物递送系统提供了重要的理论依据。

关键词: 单分散 PEG; 胶束; 分支结构; 牛血清白蛋白; 体外稳定性

中图分类号: TQ432.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2024)11-0743-10

引文格式: 林超, 袁于民. PEG 的分散性及结构对 PEG 化胶束在 BSA 溶液中稳定性的影响[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2024, 51(6): 743-752.

Reference Format: LIN Chao, YUAN Yumin. Effect of PEG dispersity and structure on the stability of PEG micelles in BSA solutions[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2024, 51(6): 743-752.

Effect of PEG dispersity and structure on the stability of PEG micelles in BSA solutions

LIN Chao^{1,2}, YUAN Yumin²

(1a. School of Materials Science & Engineering; 1b. Institute of Smart Biomedical Materials, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Biomatrik Inc., Jiaxing 314001, China)

Abstract: The in vitro stability of polyethylene glycol (PEG)-modified micelles is a crucial factor for their application as nanocarriers for drug delivery. A series of amphiphilic polymers were synthesized by using PEGs with different dispersities and structures, combined with octadecanoic acid, tetradecanoic acid, 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, cholesterol, vitamin E succinate, N, N-ditetradecylamine, and the anticancer drug paclitaxel. The study investigated the effects of PEG's dispersity and structure on the critical micelle concentration (CMC), particle size, and stability in bovine serum albumin (BSA) solutions under the same hydrophobic segment conditions. The results show that the dispersion of PEG has little effect on the CMC and particle size of linear PEGylated micelles, while the branched PEGylated micelles are significantly smaller in CMC and particle size than linear PEGylated micelles; the stability of branched PEGylated micelles in BSA solutions is superior to that of their linear monodisperse counterparts, while the stability of polydisperse PEGylated micelles is unsatisfactory. PEG structure and dispersity affect the

in vitro stability of micelles. The results of this paper provide important reference for the development of drug delivery systems with monodisperse PEG micelles.

Key words: monodisperse PEG; micelles; branch structure; bovine serum albumin; in vitro stability

0 引言

利用两亲性分子在水溶液中自组装以形成由疏水核和亲水冠组成的胶束,是药物递送中的常用载体。疏水核通常为可生物降解的聚合物或小分子药物,如聚丙交酯(PLA)^[1]、小分子脂肪酸^[2-3]、胆固醇(Chol)^[4]、维生素 E(VE)^[5-6]、N,N-双十四烷基胺^[7]和抗癌药物紫杉醇(PTX)^[8]等,并通过亲水基团与疏水基团的相互作用来稳定胶束结构、促进疏水性药物的溶解,且亲水链段在外层形成电晕,提供水环境中的稳定性。聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)作为比较常用的亲水性聚合物,在体内具备“隐形”特性,在胶束药物递送系统中占据主导地位。在体内环境中,胶束的 PEG 冠可以减少血液中的蛋白质吸附^[9],从而避免被单核吞噬细胞系统(Mononuclear phagocyte system, MPS)和网状内皮系统(Reticuloendothelial system, RES)快速清除,增加循环时间,并通过增强渗透性和保留效应促进胶束在肿瘤部位的积累^[10-11]。因此,PEG 化胶束在疏水药物的靶向递送领域被广泛研究,封装疏水性 PTX 的 PEG 化胶束(mPEG-PLA)制剂已在亚洲上市^[12]。

通过对 PEG 化胶束的临界胶束浓度(Critical micelle concentration, CMC)和蛋白吸附实验来研究胶束在体外的稳定性,从而为 PEG 化胶束在体内稳定性研究提供参考依据。CMC 是胶束形成能力和保持完整性的主要关键指标,与两亲性分子的结构和亲水亲油平衡值密切相关。一方面随着 PEG 链长的增加,其亲水亲油平衡值增加,CMC 增加,胶束的尺寸也随之增加^[13-15];另一方面随着 PEG 链长的增加,其抵御蛋白吸附的能力增强,使胶束在蛋白溶液中的稳定性增加^[12]。目前多分散 PEG 是纳米药物(脂质纳米颗粒、脂质体、胶束和其他形式的纳米颗粒)中使用最广泛的亲水性材料,它为不同链长的 PEG 所组成的同系混合物,而单分散则是由相同链长的 PEG 组成。迄今为止关于 PEG 的分散性对胶束稳定性影响研究的报道较少。郝祖杭等^[13]通过对比多分散与单分散甲氧基聚乙二醇-四苯乙烯(mPEG-TPE)胶束在牛血清白蛋白(BSA)溶液中稳定性发现,单分散 mPEG-TPE 胶束比多分散胶束具有更好的稳定性。此外,PEG 结构的变化也会对其

胶束的稳定性产生影响,分支结构的 PEG 化胶束比线形的 PEG 化胶束具有更小的胶束粒径和更好的屏蔽非特异性蛋白的吸附^[16-18],在体内有更好的“隐身效果”、更长的半衰期和更好的生物利用度^[19-21]。

本文选择十八烷酸、十四烷酸、硬脂酸、Chol、VES、N,N-双十四烷基胺和抗癌药物 PTX 疏水性化合物,研究其与线形 PEG 键合后的具有相同疏水核但分散性不同的衍生物,测定 PEG 化胶束粒径在 BSA 溶液中的变化来判断胶束的稳定性;并合成以赖氨酸为节点的分支 PEG,分别与 N,N-双十四烷基胺和 PTX 合成分支结构的 PEG 衍生物,将其与对应的线形 PEG 化胶束进行比较。本文结果为开发单分散 PEG 胶束在药物递送领域应用提供了重要的参考意义。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 材料

线形多分散($M_w = 2000$ Da)与单分散($n = 45$)的甲氧基聚乙二醇-双琥珀酰亚胺戊二酸酯(mPEG-DSG)、甲氧基聚乙二醇-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油(mPEG-DMG)、甲氧基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE)、甲氧基聚乙二醇-胆固醇(mPEG-Chol)、甲氧基聚乙二醇-维生素 E 琥珀酸酯(TPGS)、甲氧基聚乙二醇-双十四烷基乙酰胺(ALC-0159)、甲氧基聚乙二醇-紫杉醇(mPEG-PTX)以及分支($mPEG_{23}$)₂-Lys-COOH 和($mPEG_{23}$)₂-Lys-COONHS 由浙江博美生物技术有限公司提供,N,N-双十四烷基胺、PTX、磷酸盐缓冲液(PBS)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)和二环己基碳二亚胺(DCC)购自上海阿拉丁生化技术有限公司,二氯甲烷(DCM)、乙酸乙酯(EA)、盐酸(HCl)、四氢呋喃(THF)、氘代氯仿($CDCl_3$)、乙腈(ACN)、无水硫酸镁($MgSO_4$)和氢氧化钠(NaOH)购自湖州双林化学科技有限公司,BSA 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 仪器

纳米粒度电位分析仪(BeNano 180 Zeta Pro,丹东百特);透射电子显微镜(TEM, Hitachi ht7800, 日本);基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF, 德国布鲁克);核磁共振氢谱仪(1H

NMR, 600 MHz, 德国布鲁克); 表面张力仪 (OT-60, 宁波新边界); 高效液相色谱-电喷雾检测器 (HPLC, UltiMate3000, 美国赛默飞世尔)。

1.2 样品的制备

1.2.1 两亲性化合物的合成

a) 分支 ALC-0159 的合成。分支 ALC-0159 的合成路线如图 1 所示, 具体如下: 将 $(\text{mPEG}_{23})_2\text{-Lys-COONHS}$ (1.00 g, 0.414 mmol)、N,N-双十四烷基胺 (0.34 g, 0.829 mmol) 加入到 DCM (20 mL) 溶液中, 常温状态下搅拌 6 h, 通过层析硅胶板监测反应液中原料反应完后, 使用清水 (20 mL) 对反应进行淬灭。对有机相用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液 (25 mL \times 3) 萃洗杂质, 无水 MgSO_4 干燥有机相, 减

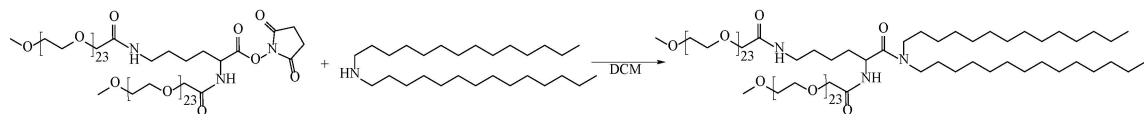


图 1 ALC-0159($\text{mPEG}_{23 \times 2}$)的合成路线

b) 分支 mPEG-PTX 的合成。分支 mPEG-PTX 的制备方法如图 2 所示, 具体如下: 将 $(\text{mPEG}_{23})_2\text{-Lys-COOH}$ (1.00 g, 0.432 mmol)、PTX (0.55 g, 0.647 mmol)、DCC (0.25 g, 1.197 mmol) 和 DMAP (3.00 mg, 0.025 mmol) 加入 DCM (20 mL) 的溶液中, 常温状态下搅拌 6 h, 层析硅胶板监测反应液中原料反应完后, 使用清水 (20 mL) 对反应进行淬灭。对有机相用 0.1 mol/L 的 NaOH 水溶液 (25 mL \times 3) 萃洗杂质, 无水 MgSO_4 干燥有机相, 减压蒸干有机溶剂得到 $(\text{mPEG}_{23})_2\text{-Lys-PTX}$ 的粗产物, 再经柱层析纯化, 最后用 EA (10 mL) 重结晶, 减压蒸干有机溶剂得白色粉末状 (1.13 g, 产率 83%, HPLC: 93.51%)。 ^1H NMR (600 MHz, Chloroform- d) δ 8.17-8.12 (m, 2H), 7.90-7.82 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.49-7.45 (m, 3H), 7.40 (td, $J = 7.5, 5.8$ Hz, 3H), 7.30 (d, $J =$

压蒸干有机溶剂得到 ALC-0159($\text{mPEG}_{23 \times 2}$)的粗产物, 再经柱层析纯化, 最后用 EA (10 mL) 重结晶, 减压蒸干有机溶剂得白色粉末状 ALC-0159 ($\text{mPEG}_{23 \times 2}$) (0.86 g, 产率 77%, HPLC: 94.17%)。 ^1H NMR (600 MHz, Chloroform- d) δ 7.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.89 (td, $J = 8.5, 4.8$ Hz, 1H), 4.07-3.94 (m, 4H), 3.64 (s, 180H), 3.55 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.38 (s, 6H), 3.33-3.19 (m, 4H), 3.05 (dt, $J = 14.0, 7.6$ Hz, 1H), 1.76-1.69 (m, 1H), 1.59 (m, $J = 29.4, 15.0, 7.2$ Hz, 4H), 1.50 (p, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.36 (q, $J = 8.1$ Hz, 2H), 1.32-1.22 (m, 44H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H)。

7.4 Hz, 1H), 7.05 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 6.18 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 5.98 (dd, $J = 9.0, 4.4$ Hz, 1H), 5.67 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.47 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 5.00-4.96 (m, 1H), 4.68 (td, $J = 8.1, 5.5$ Hz, 1H), 4.44 (m, $J = 10.9, 6.5, 4.1$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J = 15.7$ Hz, 2H), 3.87 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.82-3.73 (m, 3H), 3.64 (d, $J = 3.5$ Hz, 180H), 3.56-3.54 (m, 4H), 3.38 (s, 6H), 3.14 (dt, $J = 11.5, 5.4$ Hz, 2H), 2.61-2.52 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.91 (d, $J = 1.5$ Hz, 4H), 1.83 (d, $J = 5.0$ Hz, 6H), 1.78 (s, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.62-1.54 (m, 1H), 1.43 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.28-1.24 (m, 1H), 1.22 (d, $J = 11.0$ Hz, 3H), 1.13 (d, $J = 9.2$ Hz, 3H)。

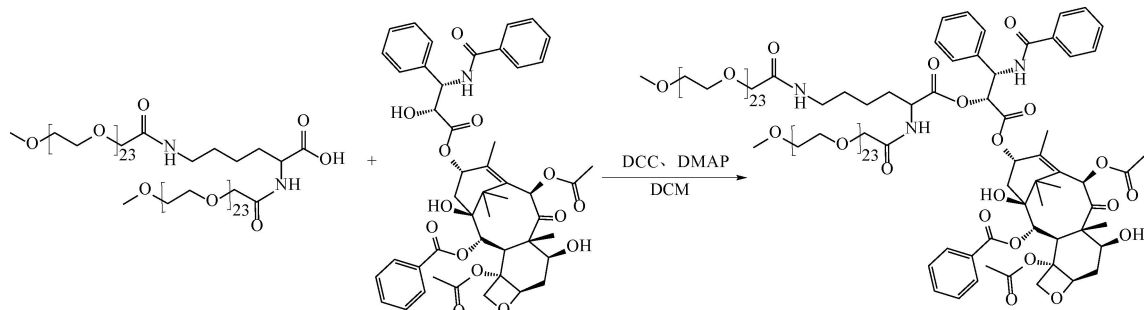


图 2 $(\text{mPEG}_{23})_2\text{-Lys-PTX}$ 的合成路线

1.2.2 胶束溶液的制备

对于 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol、TPGS 和 ALC-0159 两亲性聚合物采用直接水溶法制备胶束溶液;对于 mPEG-PTX 两亲性聚合物,由于其通过直接水溶法制备的胶束粒径分布为双峰,为了保证胶束粒径分布为单峰,采用溶剂旋干法制备胶束溶液。

直接水溶法:将 3 mg 样品加入到 1.5 mL 的 PBS 溶液中,通过超声波处理 20 min,使之在 PBS 缓冲中形成均匀的胶束溶液。

溶剂旋干法:将 3 mg 样品溶解在 300 μL 的 THF 中,再将其缓慢滴入 1.5 mL 的 PBS 溶液中,磁力搅拌 1 h,减压浓缩去除溶液中的 THF,获得聚合物样品的胶束溶液。

1.3 测试与表征

1.3.1 两亲性聚合物 MALDI-TOF 和 ^1H NMR 的表征

采用 MALDI-TOF 对单分散分支 ALC-0159 ($\text{mPEG}_{23\times 2}$)和(mPEG_{23})₂-Lys-PTX 进行表征。以 ACN 作为流动相,反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-丙烯]丙二腈为检测基质,扫描的范围为 $m/z=1000\sim 3000$ 。分支 ALC-0159 和 mPEG-PTX 的 ^1H NMR 使用溶剂均采用 CDCl_3 。

1.3.2 高效液相色谱测试

分别称取 ALC-0159($\text{mPEG}_{23\times 2}$)和(mPEG_{23})₂-Lys-PTX 样品 10 mg,加入 1 mL 的色谱级 ACN,摇晃使其充分溶解,用孔径为 0.45 μm 有机系滤膜过滤灰尘,用高效液相色谱仪自动吸取 10 μL 进行 HPLC 分析。

1.3.3 两亲性聚合物的 CMC 测试

两亲性聚合物的 CMC 是通过聚合物溶液的表面张力-浓度对数图确定,超纯水配制一系列该聚合物不同浓度的溶液(1000.0、500.0、100.0、50.0、10.0、5.0、2.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$),使用表面张力仪测量聚合物在不同浓度下对应的表面张力。制作表面张力与浓度对数的曲线图,将曲线图转折点两侧的线段部分进行延长,延长线的交点浓度即为此聚合物的 CMC。

1.3.4 两亲性聚合物的粒径分布和 TEM 测试

胶束粒径和粒径分布指数(Polymer dispersity index, PDI)由纳米粒度电位分析仪测定,纳米粒度电位仪采用 173° 光路,测试温度为 25°C ,激光的波长长度为 671 nm。样品测试前进行超声处理 20 min,用水系 0.45 μm 的滤头对胶束溶液进行过滤去除杂质,每个样品平衡时间为 120 s,单次测试

的子测试时间为 2.1 s,子测试数量为 60 次,重复测试 3 次。配制各种两亲性聚合物水溶液(1 mmol/L),超声波处理 5 min 使样品充分溶解,吸取样品 10 μL 滴加于铜网上,放于 37°C 恒温箱中干燥 6 h,吸取磷钨酸染色液 10 μL 滴加于铜网上,干燥 6 h,于 80 kV 下进行透射电镜成像。

1.3.5 两亲性聚合物胶束在 BSA 溶液中稳定性测试

配制质量浓度为 4 mg/mL 的两亲性聚合物胶束溶液,配制 BSA 溶液(4、20 mg/mL 和 40 mg/mL),超声波处理 5 min 混合均匀;取等体积的胶束溶液与 BSA 溶液混合(mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE 和 mPEG-Chol 的 BSA 质量浓度为 40 mg/mL;TPGS 和 ALC-0159 的 BSA 质量浓度为 20 mg/mL;mPEG-PTX 的 BSA 质量浓度为 4 mg/mL),通过 0.45 μm 的滤头对胶束溶液进行过滤去除杂质,每个样品制备 3 组,放入 37°C 的恒温培养箱中,在不同时间段测试其粒径,并绘制粒径-时间曲线图。

2 结果与讨论

2.1 分支 ALC-0159($\text{mPEG}_{23\times 2}$)和(mPEG_{23})₂-Lys-PTX 的质谱

赖氨酸(Lys)具有 3 个官能团,常用来构建分支结构的 PEG 衍生物^[21],多分散 PEG2000 相当于 45 个 PEG 重复单元,因此,选用 $\text{mPEG}_{23}-\text{CH}_2\text{COOH}$ 与赖氨酸的 2 个氨基反应来构建分支状(mPEG_{23})₂-Lys-COOH 以消除分子量不同带来的影响。利用(mPEG_{23})₂-Lys-COOH 或其活化酯分别与 N,N-双十四烷基胺和 PTX 反应得到分支状的 ALC-0159($\text{mPEG}_{23\times 2}$)和(mPEG_{23})₂-Lys-PTX,并对其分子量进行表征,结果如图 3 所示。图 3 显示:分支结构 ALC-0159($\text{mPEG}_{23\times 2}$)和(mPEG_{23})₂-Lys-PTX 分子离子峰 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的质荷比分别为 2730.6 和 3174.6,与理论 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 分子质量 2729.9 和 3174.7 相一致,表明成功制备目标化合物 ALC-0159($\text{mPEG}_{23\times 2}$)和(mPEG_{23})₂-Lys-PTX,且都为单一分子量分布。

2.2 临界胶束浓度、粒径和 TEM

具有较小 CMC 和粒径的胶束,其疏水内核通过相互作用使胶束更加稳定^[22],而较小的粒径有利于通过 EPR 效应增加药物在肿瘤组织的积累^[23]。为此,通过表面张力仪、动态光散射法(Dynamic light scattering, DLS)和 TEM 考察了 PEG 的分散性与结构对 PEG 化胶束的 CMC 和粒径影响。

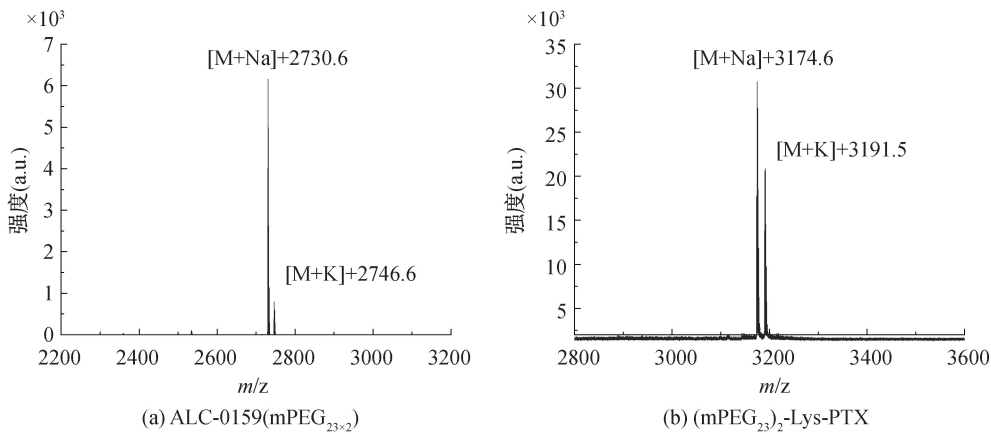


图 3 2 种分支结构两性性聚合物的 MALDI-TOF 图

2. 2. 1 线形单分散与多分散 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 胶束的 CMC、粒径与 TEM 的分析

线形 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 胶束的 CMC 与粒径数值见表 1。表 1 显示：mPEG2000-DSPE 和 mPEG2000-

Chol 胶束的 CMC 值与文献报道值^[15,24-25]接近，对各自单分散与多分散 PEG 化胶束的 CMC 进行对比，两者之间相差不明显，但大部分单分散 PEG 化胶束的 CMC 要小于多分散的，单分散与多分散 PEG 化胶束的粒径与 PDI 也相差甚小。因此，PEG 的分散性对其 CMC、粒径及 PDI 影响较小。

表 1 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 胶束的 CMC、粒径、PDI 和制备方法

名称	CMC/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	粒径/nm	PDI	胶束制备方法
mPEG2000-DSG	4.22	18.4	0.056	水溶法
mPEG ₄₅ -DSG	4.08	18.4	0.012	水溶法
mPEG2000-DMG	5.99	15.3	0.030	水溶法
mPEG ₄₅ -DMG	5.40	15.6	0.054	水溶法
mPEG2000-DSPE	13.21	16.2	0.074	水溶法
mPEG ₄₅ -DSPE	13.87	16.2	0.102	水溶法
mPEG2000-Chol	12.83	14.9	0.005	水溶法
mPEG ₄₅ -Chol	12.71	14.6	0.038	水溶法
TPGS(mPEG2000)	10.34	15.7	0.128	水溶法
TPGS(mPEG ₄₅)	10.01	15.8	0.080	水溶法

图 4 为 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 胶束的 TEM 图。由图 4 可知：聚合物胶束大小较均匀，分散性较好，胶束颗粒之间基本无黏连，平均粒径约为 10 nm；同时也可以看出，胶束疏水基团相同时，单分散胶束粒径与多分散胶束大小无太大差异。

2. 2. 2 线形及分支状 ALC-0159 和 mPEG-PTX 胶束的 CMC、粒径与 TEM 的分析

线形及分支状 ALC-0159 和 mPEG-PTX 胶束的 CMC 与粒径数值见表 2。由表 2 可知：线形单分散 ALC-0159 的 CMC 比多分散的略小，粒径均为 15.2 nm；分支状 ALC-0159 (mPEG₂₃×₂) 的 CMC 与胶束粒径则明显小于线形状；在 mPEG-PTX 胶束的 CMC 与粒径数据中观察到，分支状 (mPEG₂₃)₂-Lys-PTX 胶束的 CMC 与粒径也明显

小于线形的，主要是由于 PEG 的分支结构可通过 PEG 链的相互缠结^[26]，使得胶束的稳定性增强，所以胶束的 CMC 和粒径都比线形胶束明显要小，与 Hsu 等^[18]所报道的两组树突分支状 PEG 化胶束的 CMC 与粒径均小于对应线形胶束的结果相一致。

图 5 为 ALC-0159 和 mPEG-PTX 胶束的 TEM 图。图 5(a)—(c)显示：ALC-0159 胶束大小较均匀，分散性较好，胶束颗粒之间基本无黏连，平均粒径约为 10 nm。由图 5(d)—(f)可知：胶束大小较均匀，分散性较好，颗粒之间无黏连，其中 mPEG2000-PTX 和 mPEG₄₄-PTX 粒径大小约为 100 nm，(mPEG₂₃)₂-Lys-PTX 粒径大小约为 70 nm，分支状胶束大的粒径小于线形胶束粒径，与通过 DLS 法测定的结论相一致。

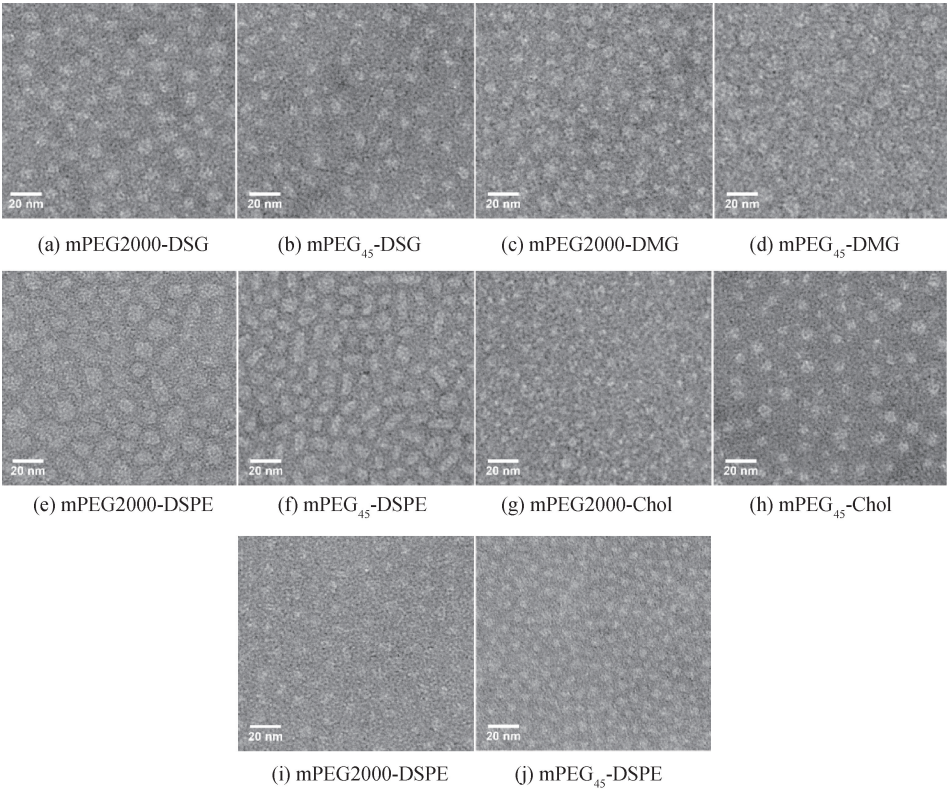


图 4 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 胶束的 TEM 图

表 2 ALC-0159 和 mPEG-PTX 的 CMC、粒径、PDI 和制备方法

名称	CMC/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	粒径/nm	PDI	胶束制备方法
ALC-0159(mPEG2000)	5.25	15.2	0.194	水溶法
ALC-0159(mPEG ₄₄)	5.16	15.2	0.197	水溶法
ALC-0159(mPEG _{23×2})	4.89	11.3	0.209	水溶法
mPEG2000-PTX	5.32	119.8	0.149	溶剂旋干法
mPEG ₄₄ -PTX	5.22	114.8	0.133	溶剂旋干法
(mPEG ₂₃) ₂ -Lys-PTX	4.33	75.5	0.144	溶剂旋干法

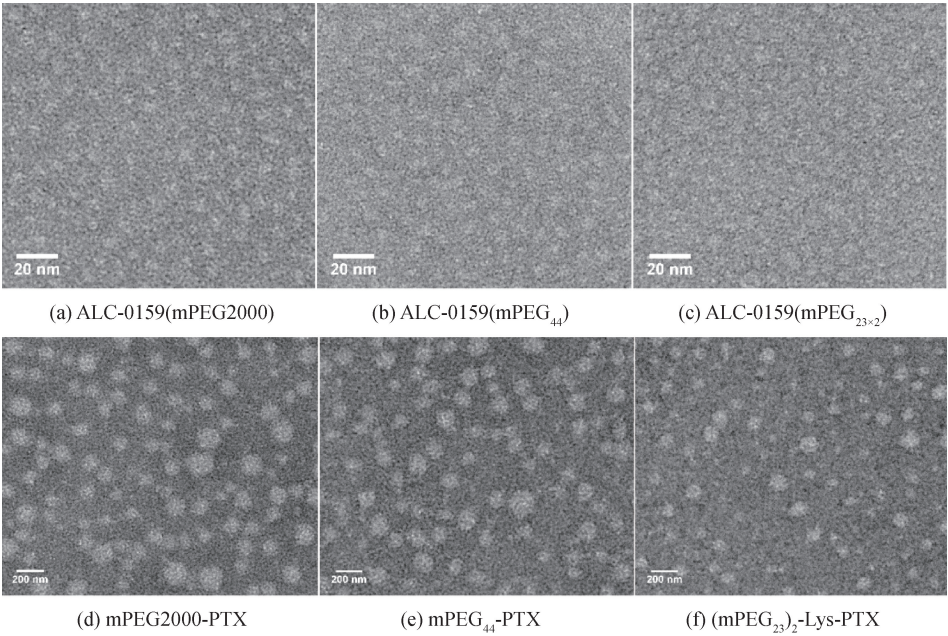


图 5 ALC-0159 和 mPEG-PTX 的 TEM 图

2.3 PEG 化胶束在 BSA 溶液中的稳定性分析

PEG 化胶束在体内稳定性还受到血液中蛋白质的影响^[22,27-28],蛋白质吸附在胶束的表面时,导致胶束的粒径增大,而吸附了蛋白质的胶束之间还会融合,致使其粒径进一步的增大,以至于被免疫细胞识别而遭清除^[29]。对上述 7 种线形和 2 种分支状 PEG 化胶束分别在 BSA 的 PBS 缓冲溶液进行混合孵育,利用 DLS 法监测胶束粒径的变化情况,通过胶束粒径随时间的变化来评估 PEG 的分散性和结构对胶束体外稳定性的影响。

2.3.1 线形单分散与多分散 mPEG-DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 胶束在 BSA 溶液中稳定性

在 BSA 溶液中,线形单分散与多分散 mPEG-

DSG、mPEG-DMG、mPEG-DSPE、mPEG-Chol 和 TPGS 的 5 种胶束粒径随时间变化结果如图 6 所示。由图 6(a)可知:mPEG2000-DSG 粒径在第 3 天的时候略微变大,第 9 天时,mPEG2000-DSG 的粒径增加到~100 nm,与初始对比变化较大,而对于 mPEG₄₅-DSG,从开始至第 9 天,其粒径基本不变。图 6(b)的 mPEG-DMG 胶束粒径变化趋势与 mPEG-DSG 相类似。图 6(c)的 mPEG2000-DSPE 和 mPEG₄₅-DSPE 胶束溶液的粒径的变化分别由第 3 天和第 4 天开始逐渐增加,mPEG₄₅-DSPE 初始稳定时间较长,mPEG₄₅-DSPE 的粒径变化幅度明显小于 mPEG2000-DSPE。图 6(d)的 mPEG2000-Chol 和 mPEG₄₅-Chol 胶束溶液的粒径的变化分别由第 4 天和第 6 天开始逐渐增加,mPEG₄₅-Chol 初

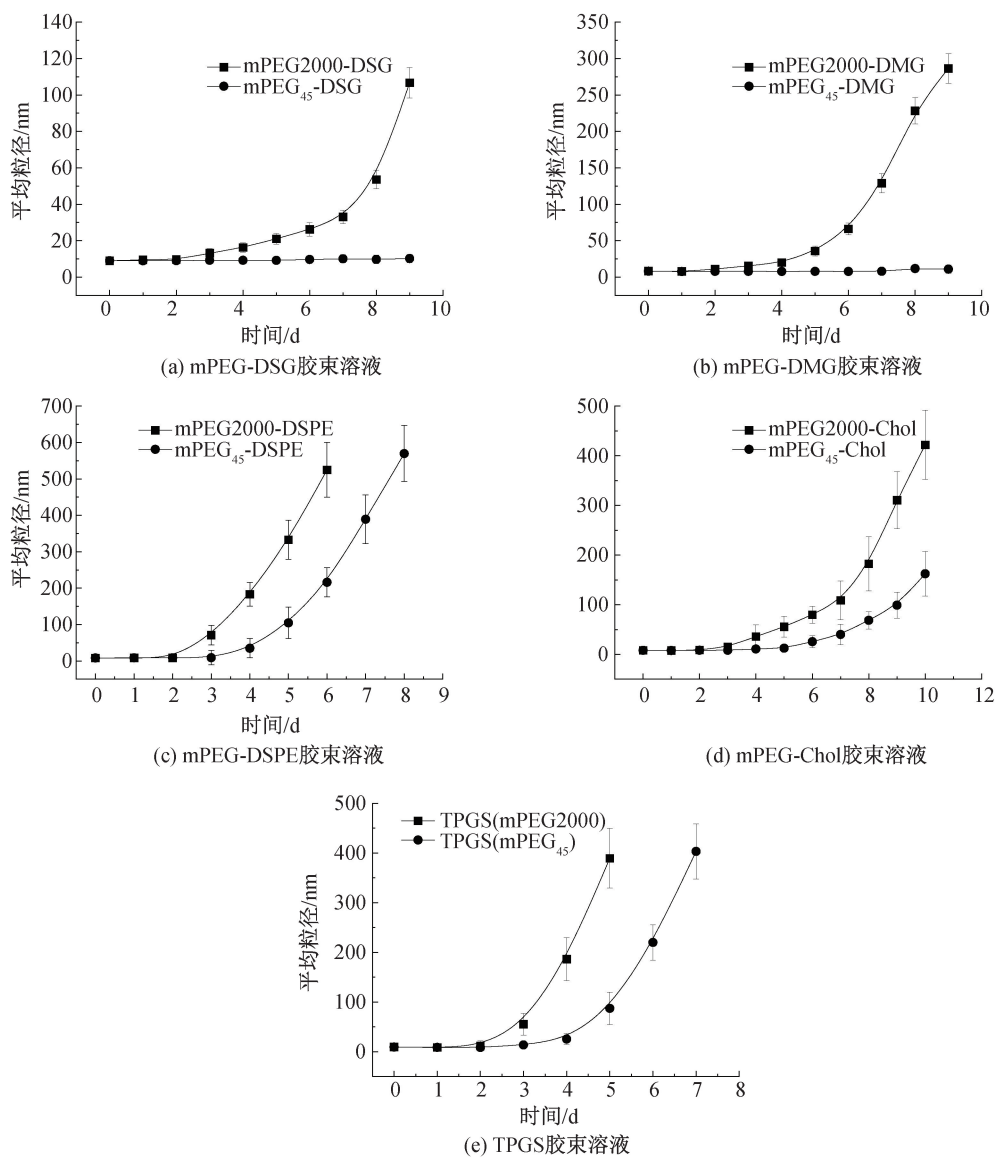


图 6 BSA 溶液中 5 种两亲性聚合物胶束溶液粒径随时间的变化曲线

始稳定时间较长,且粒径变化幅度小于 mPEG2000-Chol。从图 6(e)观察 TPGS 与 mPEG-DSPE 胶束粒径变化有相同趋势,TPGS(mPEG₄₅)的胶束稳定性优于 TPGS(mPEG2000)。以上结果表明:在 BSA 溶液中,当 PEG 链长相同时,单分散的胶束的稳定性优于多分散胶束,是由于多分散 PEG 的胶束表面的 PEG 分布不均,短链 PEG 抵御 BSA 吸附的能力较差,对胶束表面不能起到足够的保护作用,是 BSA 吸附的薄弱环节;单分散胶束的 PEG 长度都是均一的,稳定性较好,与 Teramura 等^[8]研究的 PEG5000 聚合物比 PEG1000 聚合物有更好的抵抗蛋白质吸附结论相一致。

2.3.2 线形及分支状 ALC-0159 和 mPEG-PTX 胶束在 BSA 溶液中稳定性

在 BSA 溶液中,线形单分散、多分散及分支状的 ALC-0159 和 mPEG-PTX 胶束粒径随时间变化结果如图 7 所示。图 7(a)显示:线形多分散 ALC-0159(mPEG2000)的粒径在第 2 天就开始显著增大,线形单分散 ALC-0159(mPEG₄₄)的胶束粒径则从第 3 天起开始缓慢增加,而分支状单分散 ALC-

0159(mPEG_{23×2})在测试的第 10 天内粒径几乎没有变化,稳定性好。图 7(b)表明:线形多分散 mPEG2000-PTX 在 BSA 溶液中,4 h 出现胶束粒径增大的现象,10 h 后粒径急剧增大到~450 nm,线形单分散 mPEG₄₄-PTX 在 6 h 后粒径开始缓慢增加,这种缓慢增加的趋势延续到 14 h;(mPEG₂₃)₂-Lys-PTX 在 10 h 内胶束粒径几乎没有变化,之后其粒径则随时间缓慢增加。ALC-0159 的稳定性远远好于 mPEG-PTX,这是由于 mPEG-PTX 在 BSA 的 PBS 缓冲液中,其酯基可快速水解,导致胶束解离。分支状的胶束在 BSA 溶液中的稳定性远远大于线形单分散的,线形单分散胶束的稳定性又大于其线形多分散的,这主要是由于分支状的 PEG 在胶束表面具有更高的 PEG 密度,且相互缠结^[28],抵御 BSA 吸附的能力增强,从而分支状的 PEG 化胶束在 BSA 溶液中有更好的稳定性。因此,使用单分散 PEG 化胶束尤其是分支结构 PEG 化胶束作为药物纳米载体时,具有更好的体外稳定性。这有利于提高胶束在体内的稳定性并延长药物的体内循环半衰期,以获得更好的治疗效果。

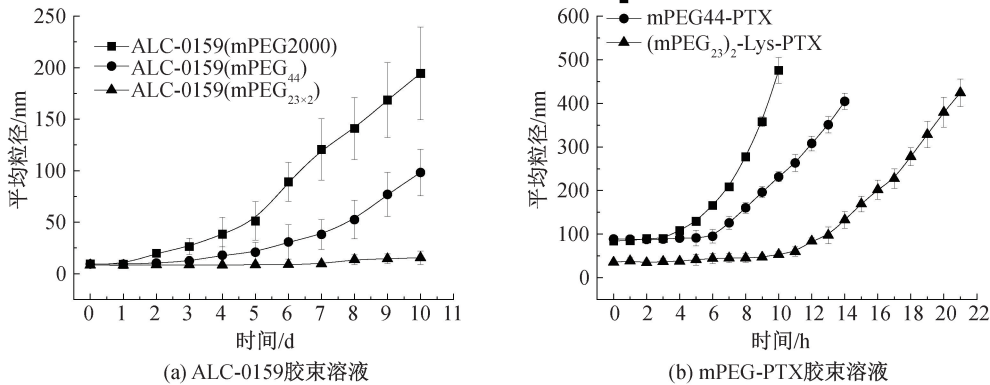


图 7 BSA 溶液中 2 种两亲性聚合物胶束溶液粒径随时间的变化曲线图

3 结 论

本文通过 7 种不同疏水基团的两亲性 PEG 化胶束,研究了 PEG 分散性和结构对 PEG 化胶束的理化特性的影响,主要结论如下:

a)线形单分散和多分散 PEG 化胶束的 CMC 及粒径之间的差异可忽略,但线形单分散 PEG 化胶束在 BSA 溶液中展现出更好的稳定性。

b)对于分子量相近但结构不同的 ALC-0159 和 mPEG-PTX,分支状的 PEG 化胶束比对应的线形胶束均具有更低的 CMC 和更小的粒径,并且在 BSA 溶液中展现出更强的稳定性。

目前,纳米医学领域中的研究均采用多分散

PEG 化胶束,依据本文研究显示,线形及分支单分散 PEG 化胶束在 BSA 溶液中稳定性更好,为开发单分散 PEG 化胶束药物递送系统提供重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Mundel R, Thakur T, Chatterjee M. Emerging uses of PLA-PEG copolymer in cancer drug delivery [J]. 3 Biotech, 2022, 12(2):41-52.
- [2] Feng Y, Wang J, Zhang S, et al. Preparation of amentoflavone-loaded DSPE-PEG2000 micelles with improved bioavailability and in vitro antitumor efficacy [J]. Biomedical Chromatography: BMC, 2023, 37(9):

- 5690-5699.
- [3] Hattori Y, Tamaki K, Sakasai S, et al. Effects of PEG anchors in PEGylated siRNA lipoplexes on in vitro gene-silencing effects and siRNA biodistribution in mice[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(5): 4183-4196.
- [4] Sugiyama I, Sonobe T, Sadzuka Y. Effect of hybridized liposome by novel modification with some polyethyleneglycol-lipids[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 372(1): 177-183.
- [5] Mu L, Feng S S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 86(1): 33-48.
- [6] Zhao Y, Neuzil J, Wu K. Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: from the bench to the bedside? [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53(1): 129-139.
- [7] Fortner A, Schumacher D. First COVID-19 vaccines receiving the US FDA and EMA emergency use authorization[J]. *Discoveries (Craiova, Romania)*, 2021, 9(1): 122-130.
- [8] Lu J, Chuan X, Zhang H, et al. Free paclitaxel loaded PEGylated-paclitaxel nanoparticles: Preparation and comparison with other paclitaxel systems in vitro and in vivo[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 471(1): 525-535.
- [9] Teramura Y, Kuroyama K, Takai M. Influence of molecular weight of PEG chain on interaction between streptavidin and biotin-PEG-conjugated phospholipids studied with QCM-D[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 30: 135-143.
- [10] Chaudhari K R, Ukawala M, Manjappa A S, et al. Opsonization, biodistribution, cellular uptake and apoptosis study of PEGylated PBCA nanoparticle as potential drug delivery carrier [J]. *Pharmaceutical Research*, 2012, 29(1): 53-68.
- [11] Caprificio A E, Foot P J S, Polycarpou E, et al. Overcoming the protein corona in chitosan-based nanoparticles[J]. *Drug Discovery Today*, 2021, 26(8): 1825-1840.
- [12] Sofias A M, Dunne M, Storm G, et al. The battle of "nano" paclitaxel [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 122: 20-30.
- [13] 郝祖杭, 袁于民. mPEG 链长及分散性对 mPEG-TPE 胶束行为影响[J]. *浙江理工大学学报(自然科学)*, 2023, 49(3): 365-373.
- [14] 戴江东, 李会鹏, 孙敏捷. 不同链长聚乙二醇修饰的香豆素 6 脂质纳米粒对口服吸收的影响[J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(3): 293-300.
- [15] Su Y, Liu M, Xiong Y, et al. Effects of stability of PEGylated micelles on the accelerated blood clearance phenomenon [J]. *Drug Delivery Translational Research*, 2019, 9(1): 66-75.
- [16] Xu Z, Li Q, Huang Y, et al. Blocking nonspecific interactions using Y-shape poly(ethylene glycol) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15): 12414-12426.
- [17] Wang J, Rosario L S, Demirdirek B, et al. Comparison of PEG chain length and density on amphiphilic macromolecular nanocarriers: self-assembled and unimolecular micelles [J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(3): 883-892.
- [18] Hsu H J, Han Y, Cheong M, et al. Dendritic PEG outer shells enhance serum stability of polymeric micelles[J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(6): 1879-1889.
- [19] Sim S L, He T, Tscheliessnig A, et al. Branched polyethylene glycol for protein precipitation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(3): 736-746.
- [20] Vugmeyster Y, Entrican C A, Joyce A P, et al. Pharmacokinetic, biodistribution, and biophysical profiles of TNF nanobodies conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol) [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23(7): 1452-1462.
- [21] Li X Q, Lei J D, Su Z G, et al. Comparison of bioactivities of monopegylated rhG-CSF with branched and linear mPEG[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(12): 1625-1631.
- [22] Garg S M, Vakili M R, Lavasanifar A. Polymeric micelles based on poly(ethylene oxide) and α -carbon substituted poly(ϵ -caprolactone): An in vitro study on the effect of core forming block on polymeric micellar stability, biocompatibility, and immunogenicity [J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2015, 132: 161-170.
- [23] McNelles S A, Knight S D, Janzen N, et al. Synthesis, radiolabeling, and in vivo imaging of PEGylated high-generation polyester dendrimers [J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(9): 3033-3041.
- [24] Lukyanov A N, Torchilin V P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(9): 1273-1289.
- [25] He Z Y, Chu B Y, Wei X W, et al. Recent development of poly(ethylene glycol)-cholesterol conjugates as drug delivery systems[J]. *International*

Journal of Pharmaceutics, 2014, 469(1): 168-178.

[26] Orienti I, Zuccari G, Falconi M, et al. Novel micelles based on amphiphilic branched PEG as carriers for fenretinide[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2012, 8(6): 880-890.

[27] Li S, Garreau H, Pauvert B, et al. Enzymatic degradation of block copolymers prepared from epsilon-caprolactone and poly(ethylene glycol)[J]. Biomacromolecules, 2002, 3(3): 525-530.

[28] Chen H, Kim S, He W, et al. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo forster resonance energy transfer imaging [J]. Langmuir, 2008, 24(10): 5213-5217.

[29] Lin W J, Juang L W, Lin C C. Stability and release performance of a series of pegylated copolymeric micelles [J]. Pharmaceutical Research, 2003, 20(4): 668-673.

(责任编辑:廖乾生)