

國立交通大學應用化學系

碩士論文

類磷脂質高分子團聯共聚物之製備與其
在癌症治療之應用

Preparation of lipid-like block copolymer and its
applications for cancer therapy



研 究 生 : 鄭經豪
學 號 : 9225554
指 導 教 授 : 莊祚敏 教授
共 同 指 導 教 授 : 薛敬和 教授

中 華 民 國 九 十 四 年 十 月

摘要

近幾年來類磷脂質高分子在生醫科技的應用上具有舉足輕重的地位，其優異的生物相容性以及類似於生物細胞膜的組成等特性都是備受矚目的。MPC 高分子抗凝血的特性在各應用上都有不錯的研究成果，如生物晶片、人工血管、組織修復、藥物控制釋放等等。本論文主要是要研究以聚 PLA-PMPC 雙團聯共聚物，以作為治療癌症之奈米藥物載體。

在一系列的實驗中，聚乳酸(PLA)與MPC以原子轉移自由基聚合法合成 PLA-PMPC。以透析法製備成高分子微胞，探討溶劑與粒徑的關係，改變溶劑組成比來獲得不同粒徑的微胞。利用¹H-NMR、AFM、以及界面電位等測定出微胞的型態與結構。以HFW與Hela兩株細胞測試材料以及高分子微胞之細胞毒性，證實材料具有優異之生物相容性以及安全性。包覆疏水性抗癌藥物 Doxorubicin，將其包覆情形、藥物釋放的行為、以及毒殺的效果等結果進行比較，探討此合成之高分子材料在治療癌症之藥物控制釋放系統上之應用價值。

Abstract

In the recent years, lipid-like polymers play an important role in the application of bio- and medical-technologies. It provides excellent biocompatibility and biomembrane-like surface, which was paid much attention to. The MPC polymers show antithrombogenicity and have successful achievement in many applications, such as biosensor, artificial vessel, tissue recovery, and drug delivery system. This work focused on the PLA-PMPC diblock copolymer as drug carrier for cancer therapy.

In the preliminary study, PLA-PMPC was synthesized with PLA and MPC by atom transfer radical polymerization. Polymeric micelle was prepared by dialysis. The relation between solvents and particle sizes was discussed. Solvent ratio was changed to give the different particle sizes. The shape and formation was determined by $^1\text{H-NMR}$, AFM and zeta-potential. The low cell toxicity of materials and micelles to HFW and Hela proved excellent biocompatibility and safety. Doxorubicin was loaded into micelle as anticancer drugs. Its loading condition release of drugs, and effect of growth inhibition was studied, and discussed the potential on controlled release system for cancer therapy.

誌謝

本篇論文得以完成，最要感謝的是共同指導老師薛敬和教授，這兩年來不論是在課業上、研究上、生活上等等各種方面的指導，都讓我受益良多，對於實驗上的疑問以及困難，都給予我許多解答與建議，讓我更能全心全力的做研究。再來要感謝的是指導老師莊祚敏教授，感謝您給予我這個機會能夠參與這個研究以及其他許多的實驗計畫。同時也感謝朱一民與劉英麟教授在口試期間對本論文提供的許多寶貴意見與想法，使得本論文更趨完善。以及 NMR 的譚小姐與 AFM 的蕭博士，在實驗上的檢測上給予協助，使得本研究得以順利進行。

尤其感謝俊良學長在實驗上給予的意見與幫助，使我得以解決許多研究上的疑惑及困難，感謝協致、立文、博荀、哲平學長們在實驗上的討論。感謝竣鴻、克閩、厚任、一成、聖傑、俊凱、慶芳與大全平日的幫忙，有你們的鼓勵與支持，讓我在低潮的時候能夠立刻就振作起來，度過難關。這兩年與各位相處的種種日子將是我一輩子珍貴的回憶。

最後，我要感謝我的父親，您就如同是我最好的朋友一般，總是在我最需要幫助的時候，給予我精神上的支持，讓我的心中永遠充滿著力量。還有就是我的女友伊玲，沒有妳就沒有這一篇論文，是妳給我最後的勇氣，讓我在最後那充滿著絕望的時刻又重新站了起來，我真心的將完成這篇論文的成就與妳分享。其他包括我的家人，以及我的朋友們，感謝你們在我生活上的種種幫助與關懷，並以本論文獻給所有關心我的人。

目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
圖索引	vi
表索引	viii
第一章 研究背景與動機	1
第二章 相關理論與文獻	4
2.1 含磷脂質材料簡介	4
2.1.1 MPC 單體	4
2.1.2 含磷脂質單體—MPC 之特性	4
2.2 含磷脂質高分子具有優異生物相容性之機制	7
2.2.1 高分子含水之結構	7
2.2.2 磷脂質吸附於高分子表面	7
2.2.3 蛋白質吸附於高分子表面	7
2.2.4 蛋白質吸附數量	7
2.2.5 高分子自由水含量和蛋白質吸附的關係	7
2.2.6 高分子表面吸附磷脂質和蛋白質之關係	8
2.3 生物可降解性高分子	9
2.3.1 生物可降解定義	9
2.3.2 生物可降解機制	9
2.3.3 生物可降解性高分子簡介	10
2.4 高分子微胞在藥物釋放上的應用	12
2.5 陰離子聚合反應原理	14
2.5.1 起始劑之種類	14
2.5.2 起始反應之方式	14
2.5.3 成長反應	15
2.5.4 無終止反應與其特色	15
2.6 原子轉移自由基聚合(ATRP)	16
2.6.1 起始反應機制	16
2.6.2 適用之單體	16
2.6.3 觸媒與配位基	17
2.6.4 多元的聚合法與其特性	18
第三章 實驗方法	21
3.1 實驗藥品	21
3.2 實驗儀器與裝置	21

3.3	合成 PLA-PMPC 雙團聯共聚物	22
3.4	鑑定與分析	23
3.5	臨界微胞濃度	23
3.6	製備 PLA-PMPC 高分子微胞	23
3.7	粒徑與介面電位分析	24
3.8	體外藥物釋放模擬	24
3.9	細胞存活率與細胞毒殺實驗	25
第四章	結果與討論	26
4.1	合成 PLA-PMPC 兩團聯共聚物	26
4.2	臨界微胞濃度	30
4.3	粒徑與介面電位分析	32
4.3.1	透析法製備高分子微胞	32
4.3.2	表面電位分析	38
4.4	細胞存活率	39
4.5	體外藥物釋放模擬	41
4.6	細胞毒殺實驗	44
第五章	結論	45
	參考文獻	46



圖索引

圖 1-1. 奈米高分子微胞累積在腫瘤組織之機制	1
圖 1-2. 高分子微胞藥物載體	2
圖 1-3. MPC 單體之結構式	2
圖 2-1. MPC 合成步驟(1978 年)	4
圖 2-2. 磷脂質分子吸附至高分子表面形成類似生物膜之結構	5
圖 2-3. MPC 高分子的結構近似於生物細胞膜	5
圖 2-4. 一般高分子表面鍵結水之結構對蛋白質吸附的影響	8
圖 2-5. MPC 高分子表面具生物相容性之示意圖	9
圖 2-6. 高分子微胞的解離	13
圖 2-7. ATRP 之反應機制	16
圖 2-8. ATRP 適用之單體	17
圖 2-9. ATRP 適用的過渡金屬錯合物	17
圖 2-10. ATRP 中以亞銅金屬作為觸媒的配位基	18
圖 2-11. 高分子末端的修飾	19
圖 2-12. 利用 ATRP 製備的代表性高分子	19
圖 2-13. 研究設計	20
圖 3-1. PLA-PMPC 雙團聯共聚物合成示意圖	22
圖 4-1. Poly(lactic acid)(PLA)之 ¹ H-NMR光譜	27
圖 4-2. PLA-PMPC雙團聯共聚物之 ¹ H-NMR光譜	28
圖 4-3. PLA-PMPC 之 GPC 圖譜	29
圖 4-4. PLA-PMPC 雙團聯共聚物之 FT-IR 光譜	29
圖 4-5. 不同高分子濃度下 pyrene 在 337 nm 與 335 nm 兩波長吸收度變化之情形	31
圖 4-6. 不同高分子濃度下 pyrene 在 337 nm 與 335 nm 兩波長吸收度的比值，兩直線外插的交叉點為臨界微胞濃度 CMC	31
圖 4-7. 高分子微胞包覆藥物的方法(a)透析法(b)乳化法	32
圖 4-8. 所使用的溶劑與形成微胞之粒徑範圍	34
圖 4-9. EtOH 與 DMSO 之混合比例與所形成微胞粒徑的關係	35
圖 4-10. PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄ 高分子微胞平均粒徑 120nm	35
圖 4-11. PLA-PMPC製備微胞前後 ¹ H-NMR光譜之差異	36
圖 4-12. PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄ 高分子微胞之AFM圖	37
圖 4-13. PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄ 微胞之界面電位圖	38
圖 4-14. PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄ (a)高分子與(b)微胞在各種濃度下與HFW正常人類纖維母細胞培養 1 天與 3 天之細胞存活率(n=6)	39
圖 4-15. PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄ 高分子與微胞在各種濃度下與Hela人類子宮頸癌細胞培養 24 小時之細胞存活率(n=6)	40
圖 4-16. Doxorubicin hydrochloride 之化學結構	41

圖 4-17. (a)包覆 DOX 前平均粒徑 120 nm (b)包覆 DOX 後平均粒徑約 400 nm.....42

圖 4-18. Doxorubicin hydrochloride 在 485nm 之檢量線.....43

圖 4-19. 藥物微胞在 pH7.4 緩衝溶液下之體外釋放模擬.....44

圖 4-20. DOX 與藥物微胞在不同濃度與不同時間下對 HeLa 人類子宮頸癌細胞的生長抑制效果(n=6)44



表索引

表 2-1. 近十年含磷脂質高分子之相關研究	6
表 2-2. 降解性高分子之種類	11
表 4-1. PLA-Br 之性質分析	27
表 4-2. PLA-PMPC 之性質分析	27
表 4-3. 不同組成 PLA-PMPC 之臨界微胞濃度	30
表 4-4. 不同組成 PLA-PMPC 與粒徑大小的關係	33
表 4-5. 不同組成 PLA-PMPC 包覆藥物前後之比較	41



第一章、研究背景與動機

在台灣地區，癌症是十大死因之首位。每年有 22000 人以上死於癌症，佔整體死亡數的 20% 以上。而癌症無法根治的原因大多為全身轉移，因此化學治療成為治癒癌症唯一的選擇。但由於化學藥物也會傷害正常細胞，造成病人的不良反應，使得癌症在治療上無法密集、長期及大劑量的給藥而錯失短時間內的控制。

二十世紀初，Erhlich 提出魔術子彈(magic bullet) 的構想，將識別分子與抗癌藥物製成奈米乳劑載體，進入體內後可隨血液尋找癌細胞，而不損傷其他細胞【1】。往後便有許多不同的模型被提出以做為攜帶抗癌藥物之載體，例如前驅藥物(prodrugs)【2】、微脂粒(liposomes)【3】、或奈米粒子(nanoparticles)【4-6】等。這些載體在傳遞藥物上各有其優缺點，其中尤以奈米粒子兼具其他兩者所欠缺的穩定性與藥物載乘性，此外，奈米尺寸的微胞具有延長體內循環時間、躲避巨噬細胞(mononuclear phagocyte system, MPS)【7】與內質網(reticular epithelial system, RES)【8】的功能，成為現今癌症治療上備受矚目的明星載體(圖 1-1)。

一般常見的奈米微胞由兩性團聯共聚物(amphiphilic copolymer)構成。在水相環境下，高分子鏈段因為親疏水性的不同會排列形成核殼

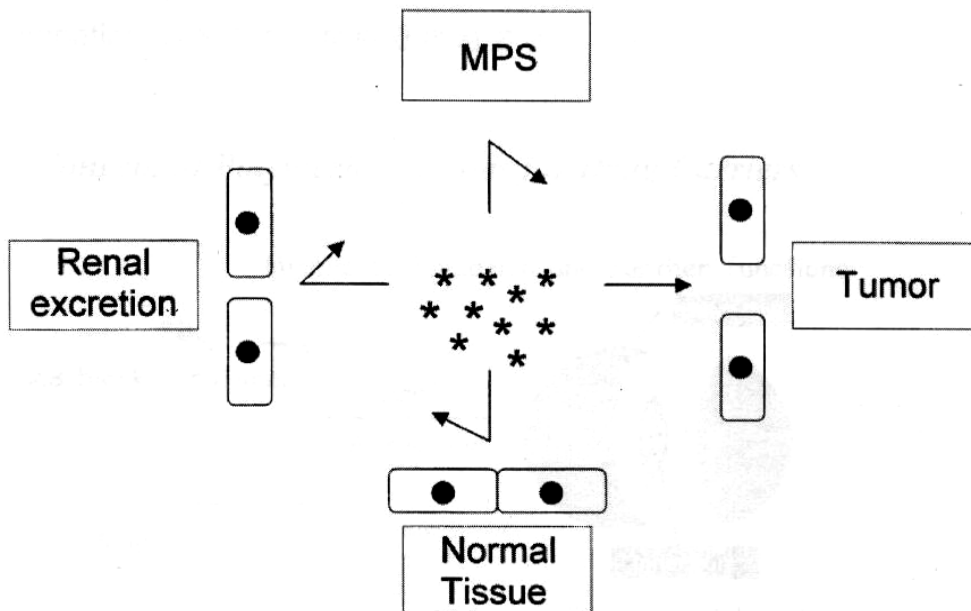


圖 1-1. 奈米高分子微胞累積在腫瘤組織之機制

結構(core-shell structure)微胞，因此提供了疏水性藥物絕佳的保護環境，以往的研究亦證實以高分子微胞攜帶抗癌藥物可以有效提高藥物的安定性與效率(圖 1-2)【9-10】。

當材料植入人體或是接觸到生物環境時，生理環境中的蛋白質會自然的吸附，引發生物防禦系統(biological defense system)，造成發炎現象(inflammatory response)、外體反應(foreign body response)、血液凝結(blood coagulation)、血栓形成(thrombus formation)等現象。生物體之免疫反應原是為了維護生物之健康狀態，但對於接受醫療的病人來說卻是許多負面的作用。對於生醫材料來說，生物相容性(biocompatibility)為其中一項極重要的需求。

Concept of Polymeric Micelles for Drug Carriers

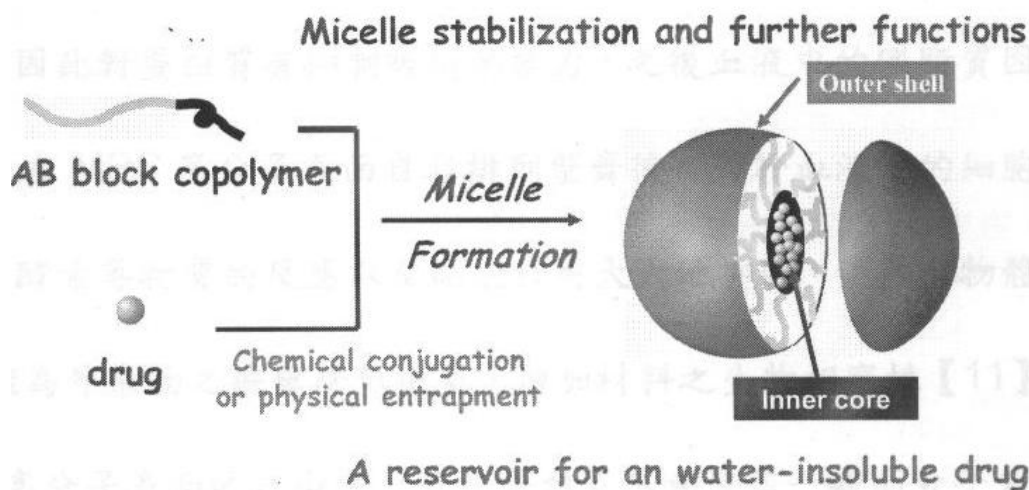


圖 1-2. 高分子微胞藥物載體

Poly(lactide)-b-poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PLA-PMPC) AB 兩團聯共聚物所包含 A 鏈段的 PLA，為常見的疏水性與生分解性聚酯類高分子。PLA 降解後可形成乳酸，可被人體吸收並代謝於體外，並且是美國食品藥物管理局(FDA)所核准的生醫材料。B 鏈段 PMPC 為 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)所聚合而成，單體結構如圖 1-3。

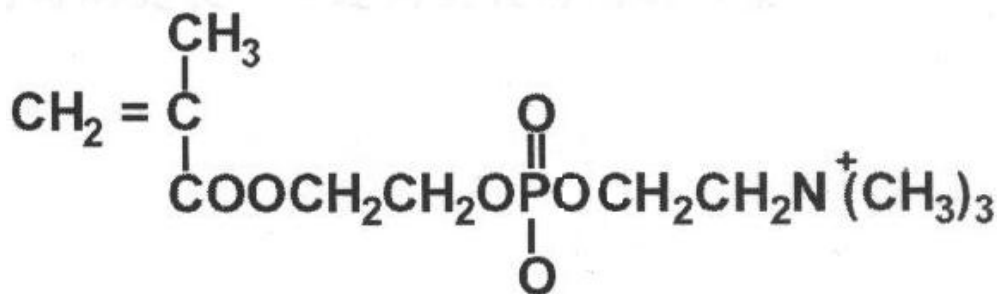


圖 1-3. MPC 單體之結構式

MPC 分子的結構中具有磷脂質極性基之尾端，是高度親水性的分子，對於血漿成分中的磷脂質也有極佳的吸引力，故能吸引血液或組織中的磷脂質分子排列至 MPC 高分子表面而形成類似生物膜雙層結構，因此對蛋白質有抑制吸附的

能力，之後血液中的磷脂質西為吸引力而在 MPC 高分子表面自我排列整齊後，對於血液中的細胞、血小板、酵素等物質的反應以及貼附作用大大地抑制，使得生物體對材料辨識為外來物之機會降低很多，增加材料之生物相容性【11】；而 MPC 高分子表面的自由水，可使蛋白質不會像與一般高分子直接鍵結於表面，因此不會造成蛋白質吸附，即使吸附上去也可在不改變形態以及本質的狀態下脫離【12-13】。

本研究利用高分子結構本身自組裝成奈米粒子，且其核的部位可以包覆大量的疏水性藥物。並利用具生物分解性及生物相容性之材料作為抗癌藥物載體，PLA-PMPC 具有生物可分解性，因此可被身體所排除，且其可有效地抑制蛋白質及血小板的吸附而具有良好的血液穩定性，可有效避免體內免疫系統的吞噬使高分子奈米微粒滯留在體內的時間更長，而達到更長時間的治療。



第二章、 相關理論與文獻

2.1 含磷脂質材料簡介

2.1.1 MPC 單體

1978 年， Nakabayashi 【 14 】， 設計出含磷脂質單體 MPC(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)，其合成步驟如圖 2-1。MPC 分子結構為含甲基丙烯酸主體，帶有一磷脂質之極性基。

磷脂質分子具有自我組織(self-organizing)的特性，磷脂質分子彼此之間會相互作用形成雙層膜的構造。此一概念可應用至改質高分子，使高分子本身具有磷脂質的極性團基，此磷脂質的極性基對磷脂質分子具有極佳吸引力，磷脂質分子會吸附至高分子表面排列成一類似生物膜的雙層構造(圖 2-2)【15】，這就是含磷脂質高分子具有生物相容性的論點。

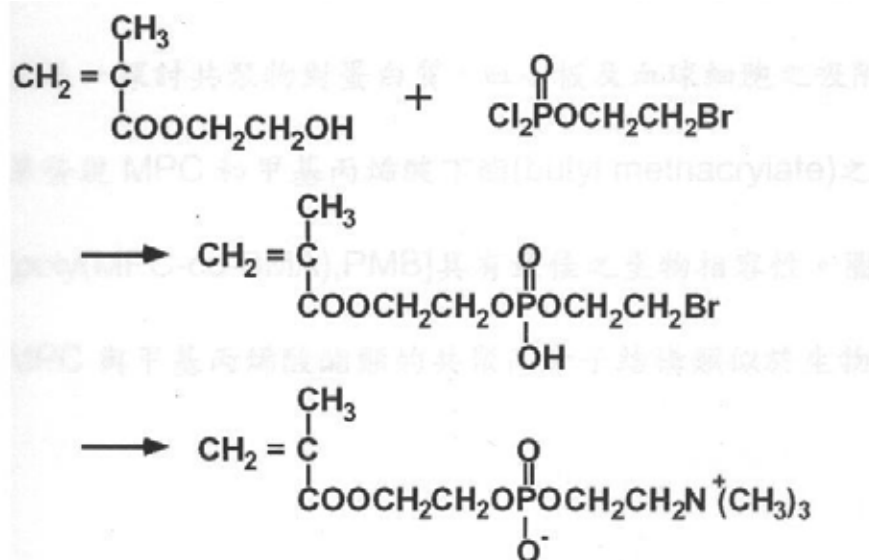


圖 2-1. MPC 合成步驟(1978 年)

2.1.2 含磷脂質單體 -- MPC 之特性

1990 年，Ishihara 等學者【16-17】改進合成 MPC 之方法，並利用 MPC 分子結構中之甲基丙烯酸具有烯類 C=C 雙鍵，是一極易進行加成聚合的結構之特性，和各種含雙鍵單體進行加成聚合並逐一探討共聚物對蛋白質、血小板及血球細胞之吸附性。其研究結果發現 MPC 和甲基丙烯酸丁酯(butyl methacrylate)之共聚物[poly(MPC-to-BMA),PMB]具有最佳之生物相容性。圖 2-3 說明了 MPC 與甲基丙烯酸丁酯的共聚高分子結構類似於生物細胞膜。

MPC 可溶於乙醇，只要使用一般的起始劑如 AIBN，就可以很容易地和其他含烯類雙鍵單體(vinyl monomer)進行一般的自由基聚合反應；或是與末端溴化的巨單體(macromonomer)進行原子轉移自由基聚合(ATRP)。可藉由調整 MPC 單體的比例使其共聚物(copolymer)可溶於乙醇或其他有機溶劑而不溶於水。上

述 MPC 之特性，使得 MPC 更易於對各種材料之高分子進行修飾，無論是經由自由基聚合反應、高分子摻混或接枝聚合等，皆可增加材料之生物相容性，大幅提高其應用範圍，表 2-1 列出近十年研究含磷脂質高分子之學者研究成果。

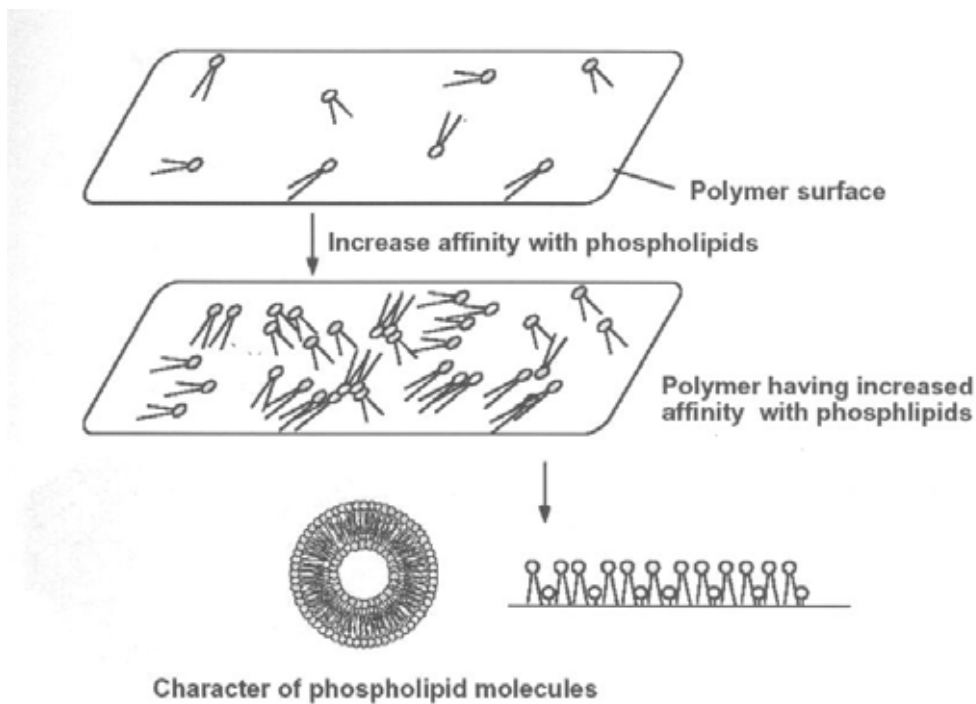


圖 2-2. 磷脂質分子吸附至高分子表面形成類似生物膜之結構

Molecular design of MPC polymer

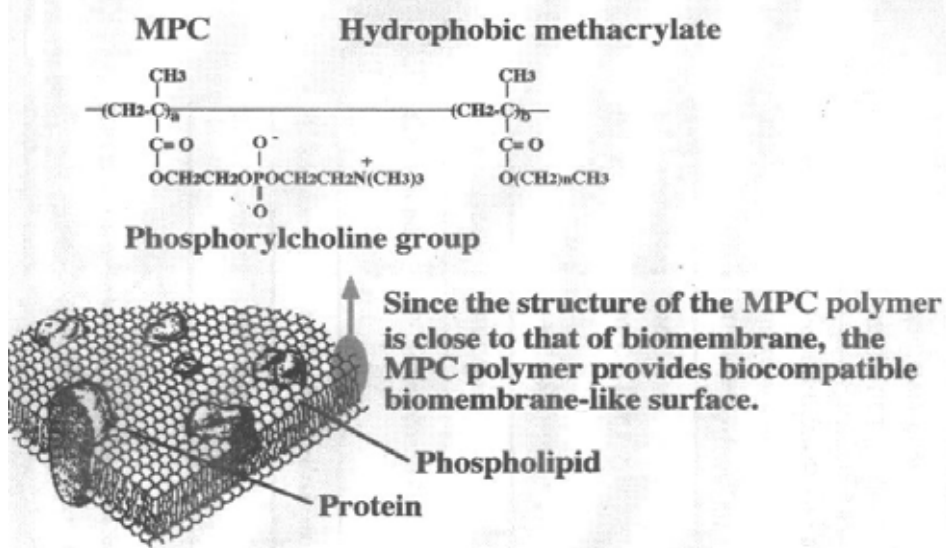


圖 2-3. MPC 高分子的結構近似於生物細胞膜

表 2-1. 近十年含磷脂質高分子之相關研究

K. Sugiyama	MP C/MMA microsphere	Protein adsorption	Poly.J.(1994)
	APC/MMA microsphere	Protein adsorption	Macromol. Chem.(1995)
	MP C/BMA-g-PU MP C-g-PET	Cell adhesion Cell adhesion	Kobunshi Ronbunshu(1996) Macromol. Chem.(1998)
T.Oishi	Poly(umarimate with PC microsphere	Protein adsorption	Polymer(1997)
	TPM/MMA microsphere	Protein adsorption	Poly.J.(1998)
Biocompatibles	MP C/DMA	Platelet adhesion	ASAIO J.(1994)
	MP C-g-PVDF MP C/DMA	Stability of membrane performance Protein adsorption	J. Membrane Sci.(1995) Langmuir(1999)
H. J. Mathieu	APC/MMA	Cell adhesion	Biomaterials(1998)
S. L. Cooper	PC immobilized PU	Bacterial adhesion	Biomaterials(1997)
		Cell adhesion	J. Biomed. Mater. Res.(1998)
H. J. Hsiue	MP C-g-silicone rubber	Cell adhesion	J. Biomed. Mater. Res.(1998)
S. F. Zhang	MP C/BMA	Stability of sensor	Biosensor. Bioelectro.(1996)

MP C:2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MMA: methyl methacrylate, APC:2-acryloyloxyethyl phosphorylcholine, PU: polyurethane, BMA:n-butyl methacrylate, PET: poly(ethylene terephthalate), DMA:n-dodecyl methacrylate, TPM:2-[3-(trimethylammonium)propyl]phosphoryl methacrylate, PVDF: polyvinylidene fluoride, PC: phosphorylcholine group

(Ishihara, K.(2000)Sixth world biomaterials congress)

2.2 含磷脂質高分子具有優異生物相容性之機制

2.2.1 高分子含水之結構

一般非離子性高分子水膠如 poly(HEMA)其含水量會隨著溫度升高而遞減，那是因為溫度升高時，分子內疏水基團之間的作用力加強而使分子收縮的緣故；反觀 MPC 高分子所包含的水其狀態與一般非離子性高分子有差異性存在。

1988 年，Ishihara【18】等學者研究高分子水膠所包含之水的結構，由微差掃描熱分析儀(DSC)分析結果發現一般高分子水膠所包含的水為非自然狀態的水，表示高分子和水的作用力影響了水的結構。而含磷脂質高分子所包含的水非常類似自由水(free water)。

2.2.2 磷脂質吸附於高分子表面

1992 年，Endo 等學者【19-20】比較血漿成分中之磷脂質和蛋白質在不同高分子表面之吸附量，Oshida【21】和 Iwasaki【22】亦相繼發表微脂粒(liposome)和磷脂質吸附至高分子表面對血小板吸附量的影響。

結果指出含磷脂質吸附至高分子表面會吸附較多的磷脂質、較少的蛋白質，當 MPC 莫耳分率增加，所吸附的磷脂質數量亦提高，印證了含磷脂質高分子的確對於血漿中的磷脂質有吸附作用。由原子力顯微鏡(AFM)可看出 MPC 高分子表面吸附了大量的磷脂質而有大片隆起。

2.2.3 蛋白質吸附於高分子表面

許多文獻指出【18-22】，蛋白質吸附和凝血機制的引發有很大的關聯性，而高分子所包含的自由水含量及表面吸附磷脂質多寡又決定吸附蛋白質的構形及數量，進一步決定高分子材料之生物相容性，值得深入探討。

2.2.4 蛋白質吸附數量

1998 年，Ishihara【18-19】研究蛋白及血纖維蛋白(fibrinogen)吸附至高分子表面的數量和高分子含水結構的關係。結果指出，此兩種蛋白質在 poly(HEMA)等非離子性水膠表面的吸附量皆大於在 MPC 高分子的吸附量，且隨著 MPC 的莫耳比率增加，蛋白質的吸附量減少，亦即高分子的自由含水量提高，蛋白質的吸附量有減少的趨勢。

2.2.5 高分子自由水含量和蛋白質吸附的關係

水分子和高分子疏水部的作用是經由凡得瓦力，就是所謂的“疏水性水合(hydrophobic hydration)”，這些鍵結在高分子表面的非自由水會經由疏水作用招

致蛋白質的吸附，當蛋白質分子吸附在高分子表面，原本所吸附的水分子便會被取代而出。此時，蛋白質分子失去了原來的鍵結水，蛋白質分子直接曝露於高分子表面，其疏水基部份會與高分子表面鍵結而導致蛋白質分子產生型態的改變。圖 2-4 說明蛋白質吸附不可逆過程。

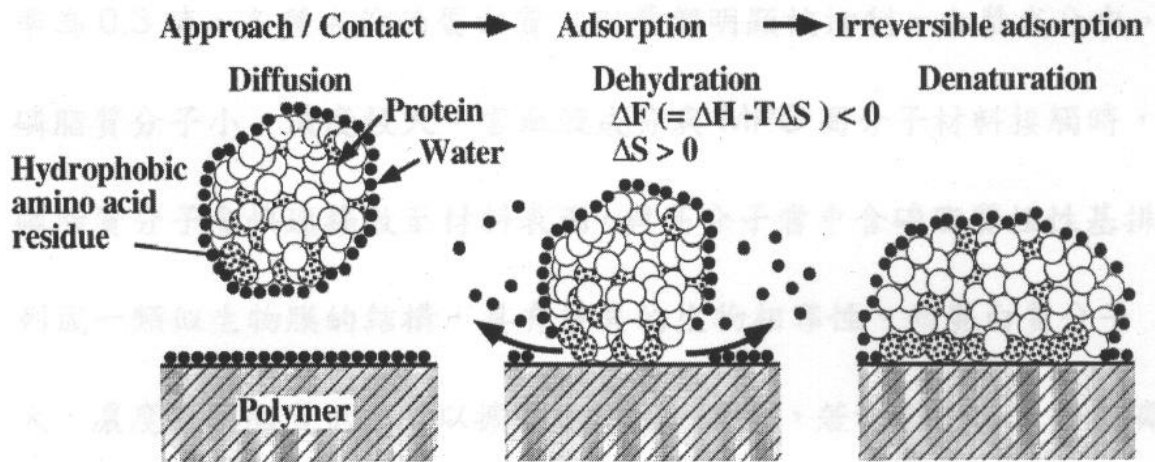


圖 2-4. 一般高分子表面鍵結水之結構對蛋白質吸附的影響
(Ishihara, K. (2000) The Sixth World Biomaterial Congress)

若高分子表面之含水結構和在水溶液當中的自由水分子相似，則蛋白質分子靠近甚至吸附至高分子表面時並不會釋出蛋白質表面之鍵結水，也就是所謂的疏水作用並不存在，所以蛋白質分子吸附至含自由水之高分子表面時其型態不會產生變化，而且蛋白質的吸附過程變成可逆的。換言之，由於 MPC 高分子表面和蛋白質分子的作用力小，故能有效抑制蛋白質吸附於材料表面。

2.2.6 高分子表面吸附磷脂質和蛋白質之關係

當高分子表面與血液成份接觸時，蛋白質的吸附數量、型態及分布決定凝血機制的產生，在各種蛋白質成分中，血纖維蛋白對凝血機制的引發尤佔舉足輕重的地位。

1998 年，Ishihara【19】等學者對一系列血漿成分中蛋白質在 MPC 高分子表面吸附作探討，發現當 MPC 佔共聚高分子之莫耳分率為 0.3 時，各種成分的蛋白質吸附量都明顯被抑制。血漿成分中，磷脂質分子小，濃度較大，當血液成分與 MPC 高分子材料接觸時，磷脂質分子會快速擴散至材料表面，與高分子當中含磷脂質極性基排列成一類似生物膜的結構，具有優異的生物相容性。而蛋白質分子大，濃度較磷脂質低，所以擴散速率慢。反之，若材料表面未含有磷脂質成分，如 poly(HEMA) 等高分子，雖說水膠含水量高，但因為對於血液中磷脂質的吸引力不大，最終蛋白質會慢慢吸附至材料上，引發血小板粘著。Iwasaki【23】等學者從實驗得到材料表面磷脂質吸附量與蛋白質吸附量成相反趨勢的關係。

總體來說，MPC 高分子具有相當優異之生物相容性，其表面自由含水量、

磷脂質吸附與蛋白質吸附之間的關聯，可由圖 2-5 來說明。

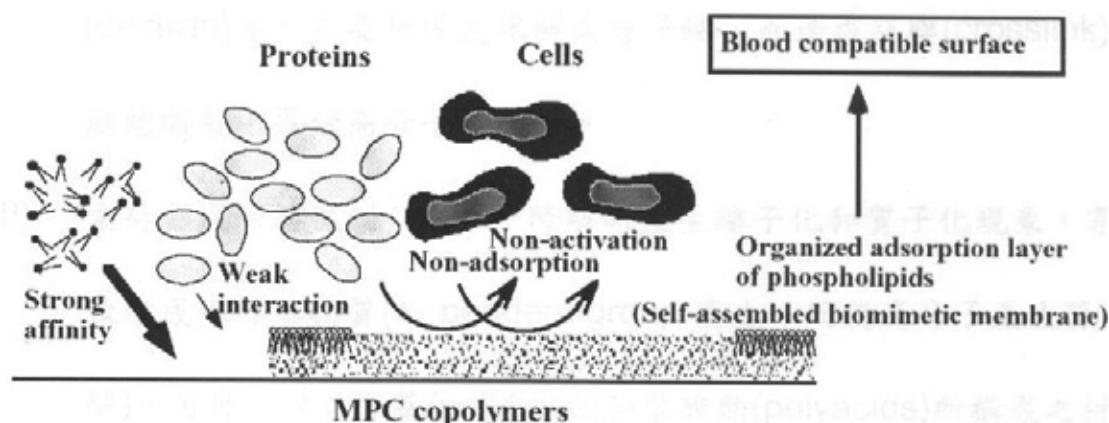


圖 2-5. MPC 高分子表面具生物相容性之示意圖

2.3 生物可降解性高分子

2.3.1 生物可降解定義

生物降解(biodegradable)廣泛的定義為材料因溶解(solubilization)、水解(hydrolysis)或是由具生物活性的物質(像是酵素)，而分解產生小分子量中間產物的過程。

2.3.2 生物可降解機制

高分子生物降解機制可分為四部分。溶解、降解電荷形成、水解與酵素催化降解等【24】。生物降解機制主要是以水合(hydration)作用為主。水合作用會使得高分子鏈(chain)轉換成水可溶性，或是高分子骨幹(backbone)因化學或酵素催化水解而斷裂，因此使得高分子強度減弱和質量上的損失。

- (I) 溶解機制：大部分自然高分子和一些合成高分子能夠溶於水中。極性高分子：如聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯氧化物(PEO)與代糖(dextran)等。主要原因是水解高分子鏈，而造成交聯(crosslink)鏈結斷裂，導致高分子的降解。
- (II) 電荷形成降解機制：高分子降解時產生離子化和質子化現象，導致形成水可溶物質(如 pendent group)產生，而使高分子產生降解。另外，以混合基(polybase)和聚酸類(polyacids)所構成之材料，其本身離子化或質子化受到溶液 pH 值影響很大。
- (III) 水解機制：主要是高分子隨著低分子量之節片溶解，而造成高分子骨幹上不穩定的鏈結斷裂，導致高分子的降解現象產生。
- (IV) 酵素催化降解機制：大部分植入生物體內(in vivo)之高分子材料，需遭受特定酵素之攻擊導致其主體降解的產生。影響酵素催化降解的因子包含降解模式(surface 或 bulk 降解)、高分子結晶結構與高分子鏈長等。舉例來說：水溶性合成高分子如聚乙烯醇(PVA)和聚乙二醇(PEG)其體內降解

機制是其高分子骨幹上之碳—碳鍵是由細菌酵素(bacterial enzymes)分解所致。

2.3.3 生物可降解性高分子簡介

生物可降解性高分子具有多種類型，包括聚脂類、聚醚類和聚胺類(表 2-2)。其中以聚酯類高分子材料最常被應用於醫學界，其應用如：可吸收縫線、藥物釋放控制基質、骨骼取代物等。

高分子本身的降解指的是高分子鏈斷裂而導致寡聚合物(oligomers)游移離出，最後導致單體(monomer)出現。降解最後會引起溶蝕現象產生，溶蝕乃指物質從高分子主體(bulk)消失的過程，原因是降解的產物、寡聚合體及單體會被水分解掉所致。而每一種高分子其實都會降解，只是降解時間長短的不同，若發生降解時間很長如 poly(amide)需要數年的時間，則將其定義為“非降解性高分子”，若發生降解時間很短如 poly(anhydrides)只需數小時便發生降解，則將其定義為“降解性高分子”。

溶解介質的 pH 值於高分子的降解中，扮演一個重要角色。例如 poly(ortho esters)在鹼性環境中是呈現穩定的狀態，在酸性環境中則會加速降解，如添加 carboxylic acid anhydrides，則會因水解成 carboxylic acid 促使 pH 值降低，導致 poly(ortho)降解速度加快。又如 poly(lactic acid)，其本身即由乳酸單體構成，所以 poly(lactic acid)降解時間愈久則產生的乳酸量相對愈多，pH 值則愈低，促使降解速度愈快。【25】

對共聚物(copolymer)而言，共聚合對於高分子骨架之降解有很大的影響，共聚合反應會使得原來高分子的物性發生改變，如結晶度改變、玻璃轉移溫度偏移及水合能力改變，這些都會影響高分子降解速率。如 PLGA 共聚物，如果提升聚乳酸的聚合比例，則 PLGA 共聚物的水合能力會降低，原因是聚乳酸較為疏水的性質。

表 2-2. 降解性高分子之種類

人工合成之高分子	高分子單體
Polyamide 聚胺類 Polyamino acid Polypeptides	$* \left(\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N---C---} \\ \\ \text{O} \end{array} \right)_n *$
Polyester 聚脂類 Poly(glycolide) Poly(D,L-lactide) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Poly(ϵ -caprolactone) Poly(dioxanone)	$* \left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---O---R---C---} \\ \\ \text{O} \end{array} \right)_n *$
Polyanhydride 聚酸甘 Poly(carboxyphenoxypropane-co-sebecic acid)	$\left(\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{---C---R---C---O---} \end{array} \right)_n$
Polyorthoester 聚原脂類	$\left(\begin{array}{c} \text{O-R}_2 \\ \\ \text{---R}_1\text{---O---C---O---} \\ \\ \text{H} \end{array} \right)_n *$
Polyether 聚醚類	$\left(\text{---O---R---} \right)_n$

2.4 高分子微胞在藥物釋放上的應用

具有親水基及疏水基之雙性高分子(amphiphilic block(or graft) copolymer)溶於水中時，由於疏水端在水中的溶解度很低，因此疏水基可以互相聚集以減少具高自由能表面的區域，這個作用稱為疏水作用(hydrophobic interaction)。而雙性高分子所具有之親水基，在加入水中時可與水互溶，但其疏水基必須避免與水接觸，因此雙性高分子在水中可以形成疏水基向內聚集而親水基向外伸展的結構，這種聚集體即稱為高分子微胞(polymeric micelle)。就熱力學的觀點而言，雙性高分子在水中從原本就是高自由度(亂度)的狀態變成包圍在其中的水洞(water cages)狀態，使整個系統的自由度減小，原本是不利於雙性高分子進入水中，但由於親水基部分與水分子具有極強的作用力，故疏水基被迫相互聚集，被親水基所遮蔽，以達到與水分子的接觸面積為最小的目的，使系統的自由能降低，達到熱力學上的穩定狀態【26】。在水溶液當中，形成微胞所需要的最低高分子濃度，稱之為臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)。

1984年 Ringsdorf 等人【27-28】提出將高分子微胞應用於藥物控制釋放的初步概念。在動物體實驗中也發現高分子微胞藥物明顯減少了腫瘤組織體積，這正說明了高分子微胞藥物在癌症治療上是一個重要的突破。

大部分的藥物都具有疏水性質，微胞因具有核-殼結構，而可將藥物包藏於微胞核心內，不論是以共價鍵或是非共價鍵結(如疏水作用及離子鍵)，再加上可與血液循環系統隔離，避免和非作用部位接觸以減少藥物之毒性，因此以高分子微胞當作藥物的載體，好處在於不但可以延長藥物停留在血液循環系統的時間，亦可提升藥物在腫瘤組織的累積(細胞內吞或 RES 攝取作用)。而微胞進入體內後，因為會解離成單一高分子而可順利地排出體外，故不會發生在體內長期累積的情形。所以無論在藥物的組織分布、提升藥物在目標組織的吸收以及降低藥物自體內移除方面均有正面的效果。

將高分子微胞應用在藥物釋放系統上之優點如下【29】

- (1) 在血液中具有較長之半衰期(half-life)
- (2) 不會長期累積在人體內
- (3) 水溶解性高
- (4) 結構穩定性高
- (5) 疏水核心為一微胞儲藏庫
- (6) 有較多的性質可供控制釋服用

由於微胞具有很大的分子量(因為由數個高分子集結而成)而可避開腎臟的排泄作用(腎臟排泄的分子量上限為四萬)【30】，而且微胞具有較小的粒徑(數十至數百 nm)可避免被 RES 攝取(RES 無法吞噬粒徑小於 100nm 之外來顆粒【31-33】，且粒徑小於 200nm 時，被 RES 吞噬之機率可明顯地降低【34】)，因此能延長藥物於血液中的循環。此外，當微胞解離成單一高分子時，由於單一

高分子具有較低的分子量，所以能順利地自腎臟排除。傳統的高分子載體在和藥物結合時，常引起低水溶解度的問題【35】，因為大多數藥物為疏水性，在和高分子結合後會使鏈上疏水之局部濃度增加，而產生沉澱現象。高分子微胞因具有核-殼結構，不論核中的疏水性多高，都可將其限制在疏水的核心中，而可維持微胞的水溶性。

組成高分子微胞的團聯高分子，其臨界微胞濃度比一般具有低分子量的界面活性劑來的低【36】，這是由於團聯高分子之間呈現較強的疏水性交互作用，因此更易於集結在一起。微胞可因其組成高分子的游離(dissociation)而發生解離(圖 2-6【37】)，而團聯高分子由於分子之間具有較強的交互作用力，所以其解離成單一高分子的速度也較緩慢，一般低分子量界面活性劑的解離速度十分快速(約 10^{-3} 秒)，而團聯高分子之解離速度則為十數小時至數天之久。血液循環系統環境可視為無限稀釋之環境，而高分子微胞所具低CMC之特性使其在血液中的結構顯得較穩定。另外，疏水環境會影響藥物的釋放速率(大部分情形是降低釋放速率)。換言之，藥物自載體釋放至水相之速率是由微胞結構之穩定度、疏水核心性質及藥物結合至高分子骨幹種類等多種因素所影響。

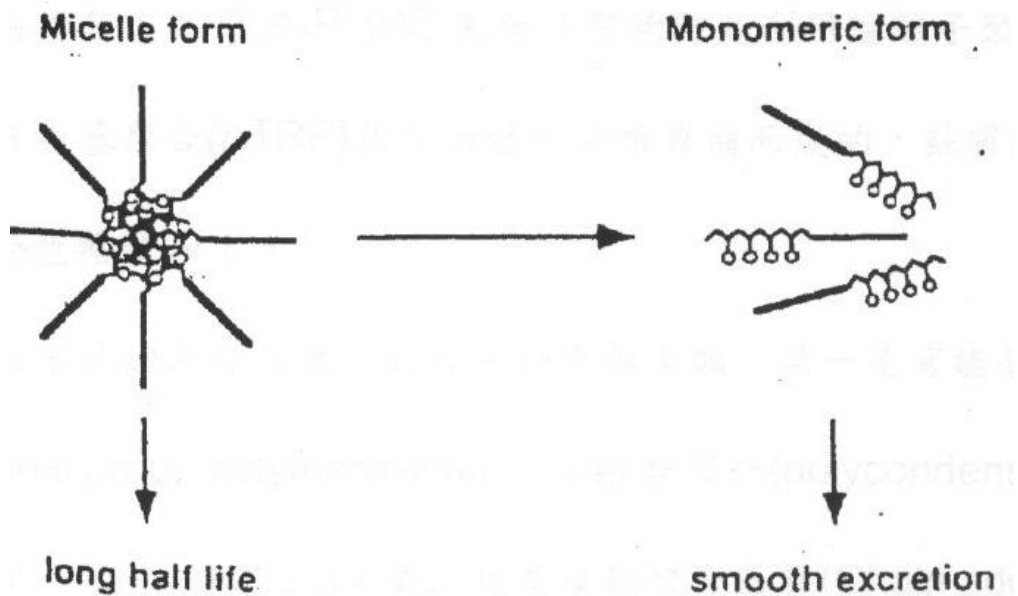


圖 2-6. 高分子微胞的解離

高分子微胞藥物(polymeric micelle drug)作用的方式可能有三種【38】，第一種為直接與細胞作用(direct interaction with cells)；第二種為藥物自微胞中釋放出來(drug release from micelles)，並進行一般的藥物反應；第三種則為游離控制(dissociation control)，亦即微胞解離成單一高分子—藥物結合體後，再與細胞進行藥物反應。

2.5 陰離子聚合反應原理

本論文合成之 PLA-PMPC 團聯共聚物即是利用陰離子聚合及金屬轉移自由基聚合(ATRP)集合兩種方法所製備而成的，茲將其反應機制及特色略述如下。

一般常見的聚合反應方式可區分為兩大類：第一是官能基聚合(Functional group polymerization)，如縮合聚合(polycondensation)與加成聚合(polyaddition)；第二種是連鎖聚合反應(Chain addition polymerization)，其中又可分為三種；(1)自由基連鎖聚合反應(Free radical chain polymerization)、(2)陽離子聚合反應(Cationic chain polymerization)、(3)陰離子聚合反應(Anionic chain polymerization)。

一般可行陰離子聚合的單體可分為三種：

- (1) 有碳-碳雙鍵(carbon-carbon double bond)的單體
- (2) 雜環(heterocyclic)的單體
- (3) 有碳-異於碳(carbon-heteroatom)雙(參)鍵之單體

起始劑種類與起始反應

2.5.1 起始劑之種類

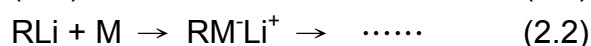
對於碳-碳雙鍵的聚合反應，陰離子起始劑的種類大致可以分為三種：

- (1) 鹼金屬(alkali metals)：如鋰、鈉、鉀等。
- (2) 鹼金屬之芳香族錯合物(aromatic complexes of alkali metals)：如 Naphthysodium($\text{NaC}_{10}\text{H}_7$)即是
- (3) 有機鹼金屬化合物(organoalkali compounds)：如最長被使用的正丁基鋰($n\text{-C}_4\text{H}_9\text{Li}$)即是。

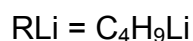
2.5.2 起始反應之方式

- (1) 陰離子直接攻擊單體的雙鍵

這種起始反應的難易決定於鹼金屬的強度與單體的反應性，若單體上有拉電子基如 NO_2 、 CN 、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ ，則反應性較高。舉本實驗系統為例，以正丁基鋰為起始劑鎖又發的起始反應如下：



其中



Eq(2.1)所呈現的是締合(association) – 解離(dissociation)的平衡關係， k_c 表示其平衡常數，若 k_c 太小，則起始速率便很差。然則實際上的起始反應並不如Eq(2.2)所描述的如此簡單，因為其忽略了起始劑的成長鏈(RM^+Li^+)的交叉締合(cross-association)效應；若考慮此效應的話，則整個起始反應的真實機構便十分複雜了。話雖如此，由於數十年來對這方面的研究未曾間斷，各種起始反應的趨勢大致都已確定了。例如，針對起始劑上的R-group的不同，在各起始單體的反應性方面，發現如下的趨勢：

Isoprene : methyl > s-butyl > i-propyl > n-butyl > t-butyl

Diene : methyl > s-butyl > i-propyl > t-butyl

而溶劑效應方面則發現：

Solvent : toluene > benzene > n-hexane > cyclohexane

(2)電子的轉移；電子的轉移又細分為兩種：

(I) 直接電子轉移，如丁二烯的鈉起始反應；形成雙陰離子。

(II) 間接電子轉移，如鈉和 Naphthalene 形成自由基陰離子。

2.5.3 成長反應

由 Eq.(2.2)便可簡單說明陰離子聚合的成長反應；較為特別的是：

(I) 成長反應與起始劑的種類、型式無關。

(II) 成長鏈末端的金屬離子(Counterion)，其相互之間的締合行為會影響成長反應的速率

(III) 溶劑的種類會影響成長末端的活性。

對(II)而言，尾端金屬離子愈離子化、愈正電化、愈趨鹼性，則成長速率愈快；對(III)來搓，在極性溶劑中會比非極性溶劑中成長鏈更不易有締合的現象，因此成長速率會較快【39】。

2.5.4 無終止反應與其特色

由於陰離子聚合反應的特性在於其無終止反應，使得聚合程序中的聚合物仍保有活性，故有活性聚合物(living polymeric chain end)之稱，因此具有以下特色：

(I) 聚合物的平均分子量可由起始劑定量得知。

(II) 分子量分布近似於 Poisson distribution， $X_w/X_n \sim 1+1/X_n$ ，成長鏈越長，分子量分布越小。一般而言， $M_w/M_n < 1.1$ 。

(III) 陰離子聚合為合成 block copolymer 的絕佳選擇。

(IV) 藉由終止劑的選擇，可以將成長鏈末端 capping 上所希望的官能基。

2.6 原子轉移自由基聚合(ATRP)

利用活性聚合(living polymerization)合成官能性與特殊結構高分子研究近年來頗受重視，因為在活性聚合中，缺乏不可逆的鏈轉移(chain transfer)與鏈終止反應(chain termination)【40-42】，可以有效地控制聚合物的分子量與組成，之中可控制/活性自由基聚合(controlled/living radical polymerization, CRP)近年來發展快速，由於自由基聚合適用的單體範圍較廣，在工業中大量採用自由基反應製備高分子【43】，所以不論業界與學界都積極發展新的 CRP 方法【44-45】，並且試圖了解其中的機制。

2.6.1 起始反應機制

於 1995 年 Matyjaszewski 和 Sawamoto 兩個研究組發現利用過渡金屬催化的原子轉移自由基聚合(atom transfer radical polymerization, ATRP)也是屬於 CRP 中的一種，其反應機制如圖 2-7，起始劑(initiator, R-X)上的鹵素原子轉移至過渡金屬錯合物(M_t^n -Y/Ligand, Y 代表另一個配位基或對離子)，使得金屬氧化，產生具有活性的自由基，此為可逆的平衡反應，且活性自由基的失活(deactivation)反應速率遠高於休眠種(dormant species)的活化反應速率，因此系統中的自由基濃度很低，不可逆的鏈轉移與鏈終止反應得到有效的抑制，可成功地實現活性聚合【46】。

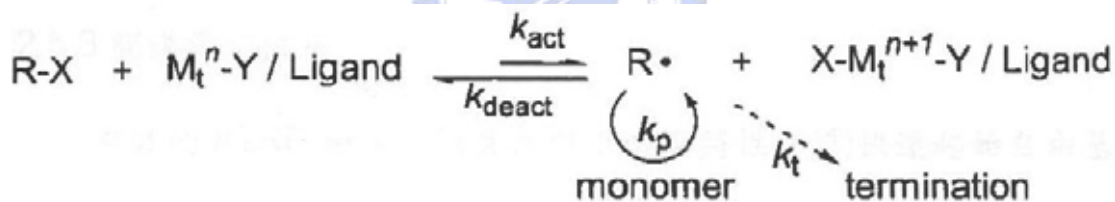


圖 2-7. ATRP 之反應機制【47】

2.6.2 適用之單體

與其他 CRP 方法相比，ATRP 適用的單體範圍非常廣泛，主要包括四大類：苯乙烯(styrene)【48-49】、丙烯腈(acrylonitrile)【50】、丙烯酸酯(acrylate)【51】、甲基丙烯酸酯(methacrylate)【52】及其具有不同官能基的衍生物，如圖 2-8。

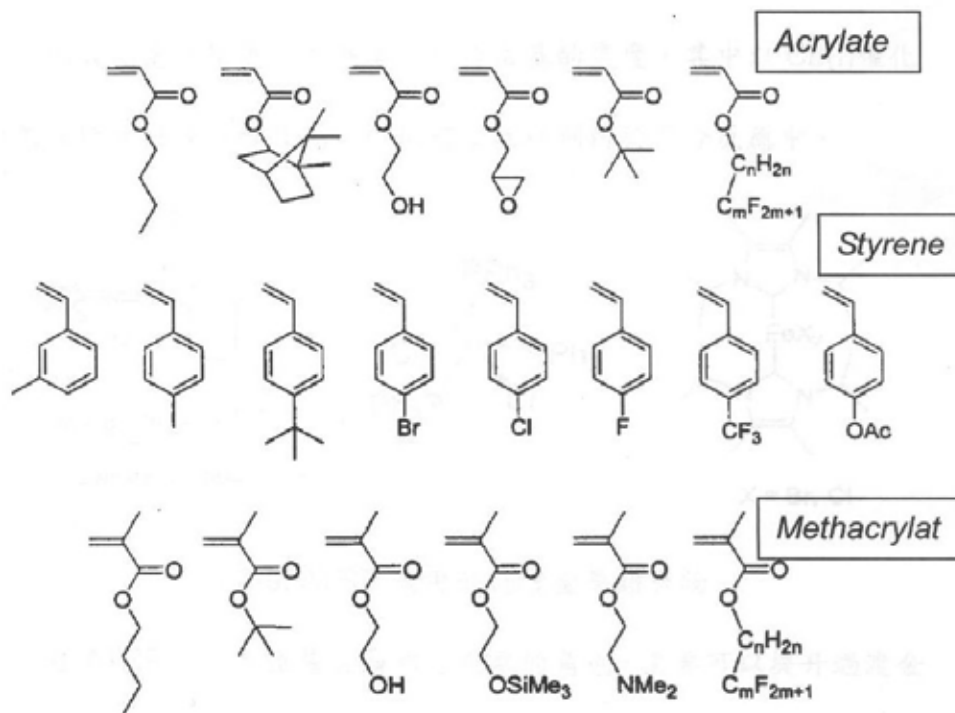


圖 2-8. ATRP 適用之單體

2.6.3 觸媒與配位基

有效的 ATRP 觸媒必須具備以下四點特性：(1)快速起始自由基的生成，確保所有高分子鏈瞬間開始聚合(2)活性自由基與休眠種間的可逆平衡反應要趨向休眠種，降低自由基的濃度(3)藉由鹵素原子轉移使得活性自由基快速失活，確保所有高分子鏈具有相同的聚合速率，才能得到分子量分布狹窄的高分子(4)所使用的觸媒不會導致其他副反應的發生，例如自由基的氧化還原。許多的過渡金屬錯合物曾被應用於 ATRP，例如 Ru(II)【53】、Ni(II)【54】、Fe(II)【55】、Rh(I)【56】、Cu(I)【57】等，如圖 2-9，這些金屬錯合物都能經由可逆的氧化還原反應來控制溶液中自由基的濃度，其中以 Cu(I)催化效果最佳且最符合經濟效應，所以被廣泛地利用於聚合反應中。

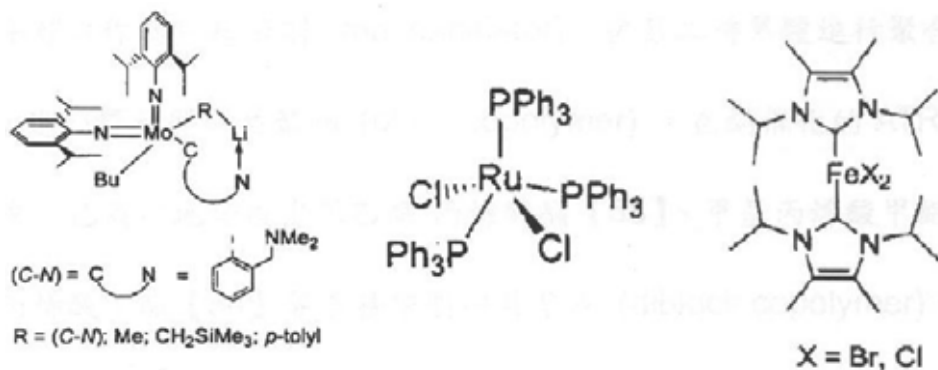


圖 2-9. ATRP 適用的過渡金屬錯合物

在 ATRP 中，配位基扮演相當重要的角色，主要可以提昇過渡金屬鹽類在有機溶液中的溶解度，使的非均相(heterogeneous)轉成均相(homogeneous)反應，並且可以調整中心金屬氧化還原電位，進而影響觸媒的活性；亞銅鹽類與含氮的配位基錯合後具有相當不錯的活性，一些常被使用的配位基列於圖 2-10 中。

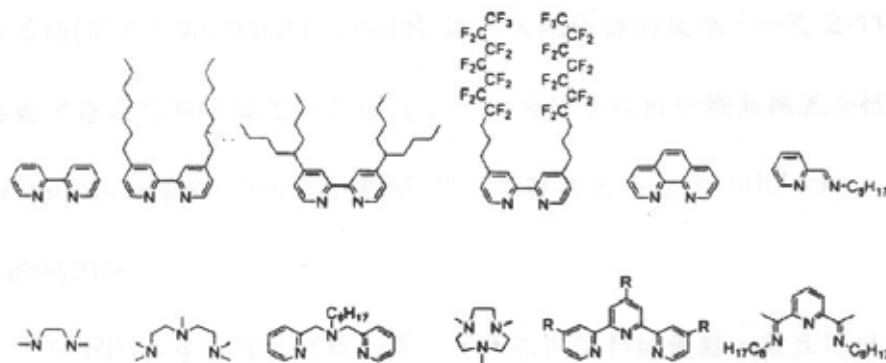


圖 2-10. ATRP 中以亞銅金屬作為觸媒的配位基

2.6.4 多元的聚合法與其特性

根據 ATRP 的反應機制，所得的聚合物一端為起始劑 $RX(X=Cl$ 或 $Br)$ 的碎片 R ，而另一端為鹵素原子，因此經由 ATRP 合成出的高分子可以作為巨起始劑 (macroinitiator)，與第二種單體進行聚合反應，進而得到團聯共聚物 (block copolymer)。在銅催化的 ATRP 系統中，以成功地合成出苯乙烯-丙烯酸酯【58】、甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸丁酯【54】等多種雙團聯共聚物 (diblock copolymer)。

某些單體不能進行 ATRP，甚至不能進行自由基聚合反應，此時可在帶有特定官能基團的聚合物末端引入可以引發 ATRP 聚合反應的活性鹵素原子，作為巨起始劑，利用此類高分子末端的修飾，擴展了 ATRP 在製備團聯共聚物的應用性。Matyjaszewski 等人【59】利用兩端為 Si-H 鍵的聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 與氯甲基苯乙烯 (4-vinylbenzyl chloride) 或 2-溴異丁烯酸丙基酯 (allyl 2-bromoisobutyrate) 進行末端修飾的反應，如圖 2-11，再與甲基丙烯酸甲酯進行聚合反應，成功的合成出有機無機混合性 (organic/inorganic hybrids) ABA 型三團聯共聚高分子 (triblock copolymer)。

ATRP 具有單體範圍廣、反應條件溫和的優點，並且可以用來製備分子量大小可控、分子量分布狹窄的官能基共聚物、大分子單體、梯度共聚物 (gradient copolymer)、團聯共聚物、接枝共聚物 (graft copolymer) 以及特殊構型的星型聚合物 (star polymer)、樹枝狀 (hyperbranched) 聚合物等，如圖 2-12。對於合成與設計新型的高分子材料上，ATRP 是一個強而有力的方法，因此本篇論文中採用 ATRP 來製備不同種類的兩性 (amphiphilic) 團聯共聚物。

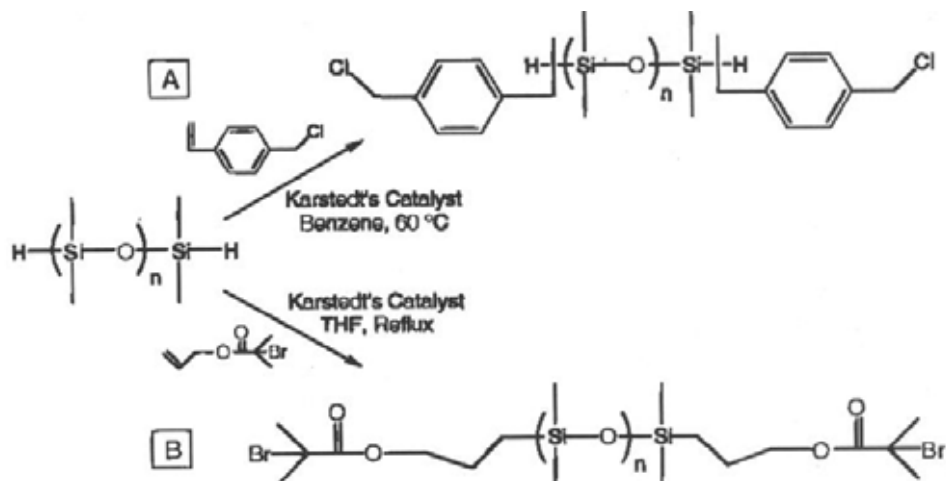


圖 2-11. 高分子末端的修飾

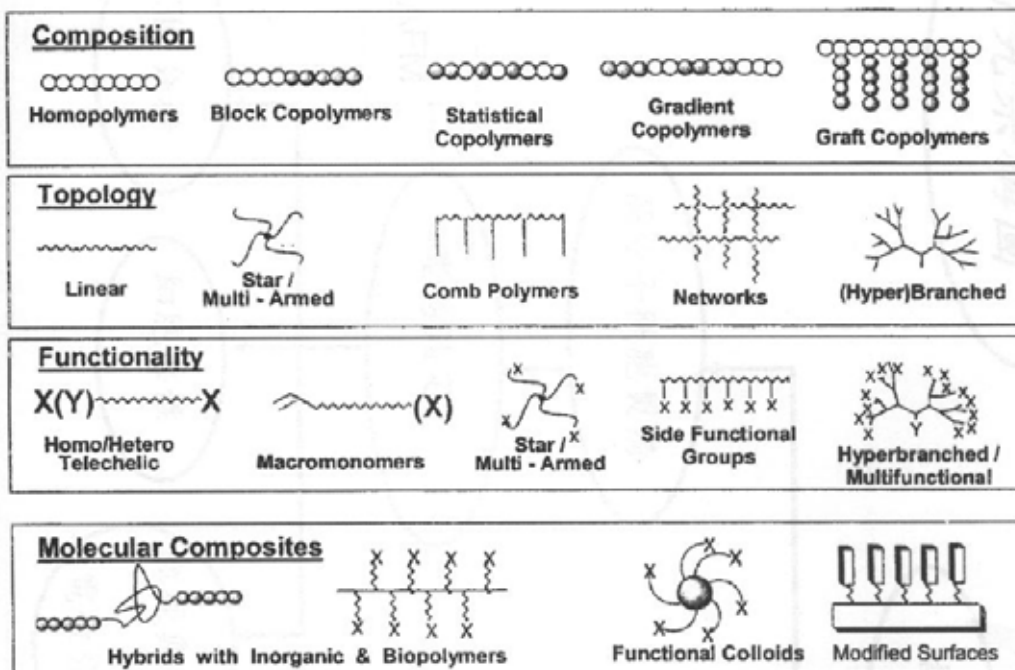


圖 2-12. 利用 ATRP 製備的代表性高分子

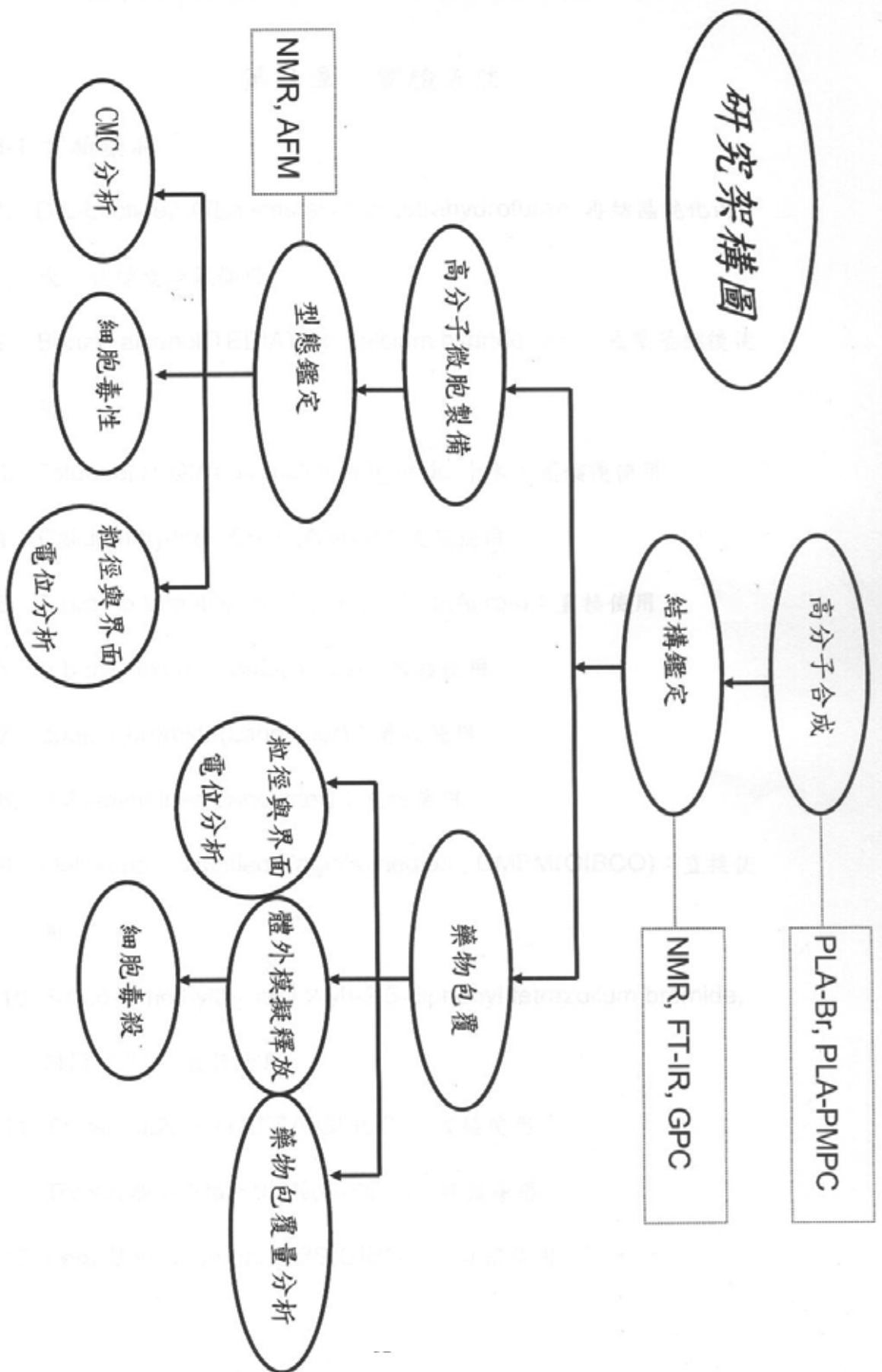


圖 2-13. 研究設計

第三章、實驗方法

3-1 實驗藥品

1. D,L-Lactide,LA(Lancaster)：以 tetrahydrofuran 再結晶純化兩次，乾燥後冷藏備用
2. Benzyl alcohol(TEDIA)：以 calcium hydride 除水，減壓蒸餾後使用
3. Toluene(TEDIA)：除水，蒸餾後使用
4. Calcium hydride,CaH₂(Acros)：直接使用
5. 2-bromo 2-methylpropionyl bromide(Acros)：直接使用
6. n-butyl lithium,n-BuLi(Acros)：直接使用
7. copper bromide(Lancaster)：直接使用
8. 2,2'bipyridines(Lancaster)：直接使用
9. Delbecco's modified Eagle's medium, DMEM(GIBCO)：直接使用
10. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT(ICN)：直接使用
11. Trypsin 0.25% in EDTA(GIBCO)：直接使用
12. Trypan Blue Stain 0.4%(GIBCO)：直接使用
13. Fetal Bovine Serum, FBS(GIBCO)：直接使用
14. Doxorubicin(東洋)：直接使用
15. MPC(日本石原教授提供)：直接使用

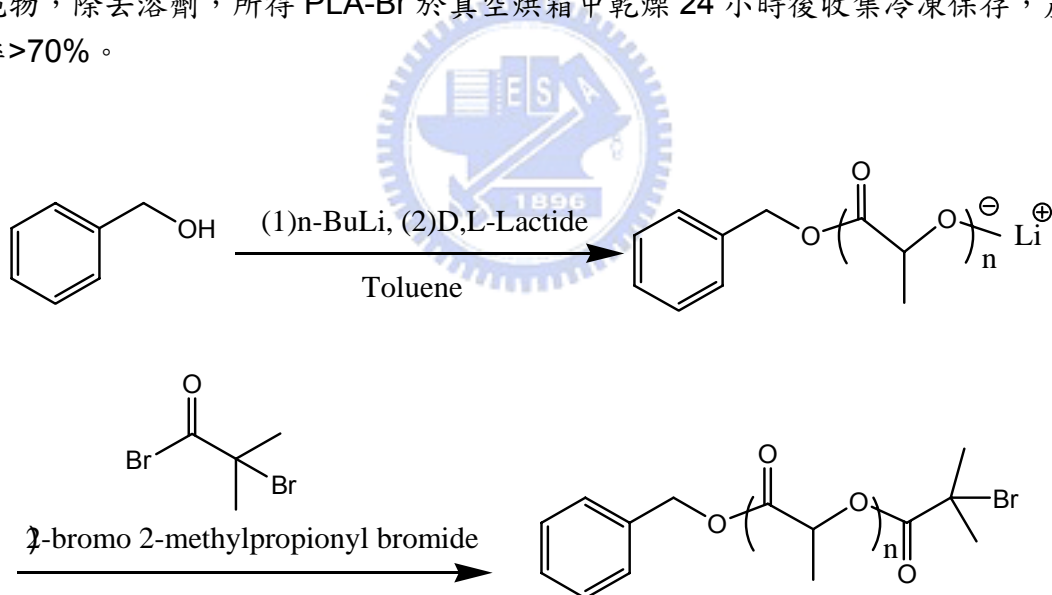
3-2 實驗儀器與裝置

1. 核磁共振光譜儀(Nuclear magnetic resonance spectrophotometer, NMR : Bruker AM-500 NMR)
2. 傅立葉紅外線光譜儀(Fourier transfer infrared spectrophotometer, FT-IR : FTS-155, Bio-Rad)
3. 凝膠滲透層析儀(Gel permeation chromatography, GPC : Machery-Nagel NUCLEOGEL)
4. 粒徑分析儀與界面電位儀(Zetasizer 3000 : Malvern)
5. 紫外光\可見光光譜儀(UV/Vis spectrophotometer, UV/Vis : Perkin Elmer Lamda 2S)
6. 原子力顯微鏡(Atomic force microscope : Digital Instruments)
7. 超過濾裝置(Stirred ultrafiltration cell : Millipore MWCO 1,000)
8. 96 孔盤酵素判讀儀(Elisa Reader : Awareness Star Fax 2100)
9. 無菌抽風櫥(Laminar flow : 海天)
10. 恆溫培養箱(Incubator : NAPAC Model 6100 CO₂)

11. 倒立式相位差顯微鏡(Phase contract microscopy : Wild MPS 51S)
12. 離心機(Centrifuge : KA-1000, KUBOTA)
13. 高溫滅菌釜(Autoclave : Tomin, Tomin Medical Equipment LTD)
14. 血球計數盤

3-3 合成 PMPC-PLA 雙團聯共聚物

圖 3-1 為合成 PMPC-PLA 之示意圖。將分別已除水之 benzyl alcohol 0.259ml(2.5 mmol)以及甲苯(toluene)10 ml 加入一雙頸安瓶(ampoule)中。實驗裝置連接真空管線進行除氣三次導入無氧無水之乾燥氮氣，已乾淨針頭加入 n-Butyl Lithium 1.563 ml(2.5 mmol)，並加熱至 70 反應十分鐘。再以乾淨針頭取出反應後的甲苯溶液並加入另一放有已純化 D,L-Lactide 且已除氣三次的安瓶，熔封此安瓶並在室溫下反應 12 小時。反應終止後在冰浴下加入溶於甲苯 5 ml 的 2-bromo 2-methylpropionyl bromide 0.312 ml(2.5 mmol)攪拌一小時以導入官能基在 PLA 末端。產物再沉澱於正己烷(n-Hexane)與乙醚(diethyl ether)比例 9:1 的混合溶液中，放入-4 冷凍。待產物充分析出後，倒掉並除去剩餘溶劑。底部沉澱物以 dichloromethane(DCM)溶解，通過 0.2 μ m 之 Filter 除去鹽類與不純物，除去溶劑，所得 PLA-Br 於真空烘箱中乾燥 24 小時後收集冷凍保存，產率>70%。



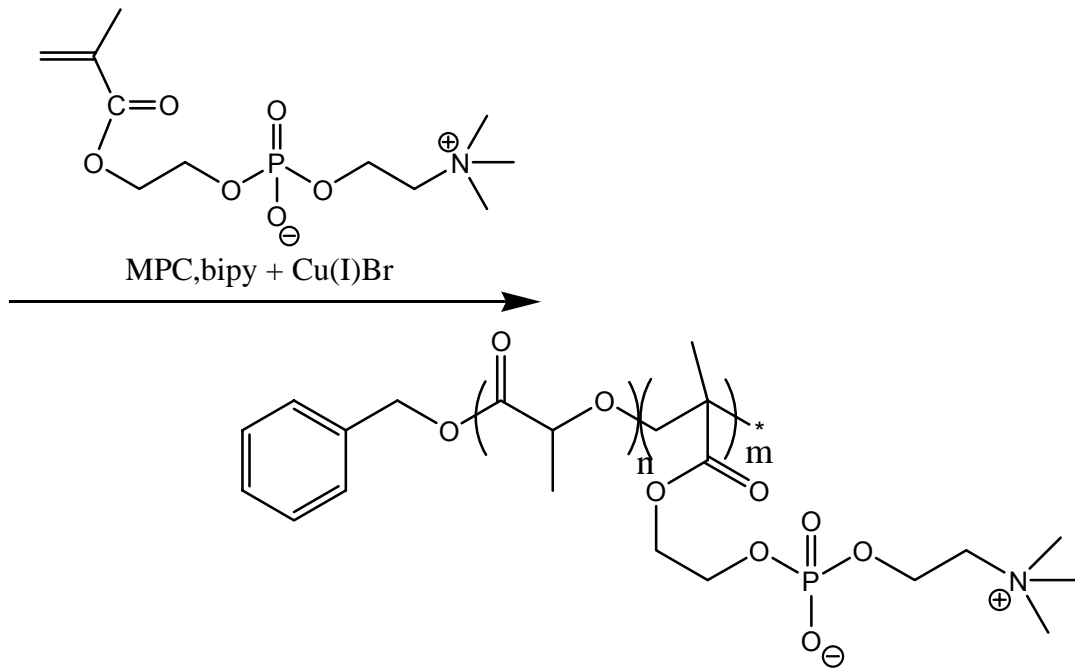


圖 3-1. PLA-PMPC 雙團聯共聚物合成示意圖

將不同莫耳進料比之 2-methacryloyloxy ethylphosphoryl choline(MPC)以及 PLA-Br 分別溶於甲醇(Methanol)與 DMSO 中，至於兩雙頸安瓶中。連接真空裝置與血清塞，進行除氣三次導入無氧無水之乾燥氮氣，以乾淨針頭取出並加入含有 copper bromide 以及 bipyridines 之安瓶，熔封此安瓶並反應了兩天。反應完成以氧氣終止，溶於甲醇稀釋後通過矽膠層析管柱除去觸媒與鹽類，以真空濃縮機濃縮，先後再沉澱於乙醚與 THF 之中，除去剩餘溶劑，所得之 PMPC-PLA 雙團聯共聚物於真空烘箱中乾燥 24 小時後收集冷凍保存，產率>90%。

3-4 鑑定與分析

分子量及分子量分布

將 PLA-Br 溶解於 dimethylformamide(DMF)配成 0.5wt.%的溶液注入 GPC 中，可得重量平均分子量(weight-average molecular weight, M_w)、數目平均分子量(number-average molecular weight, M_n)及分子量分佈(polydispersity index, PDI)，流動相為 DMF，流速 1mL/min(40°C)，標準品為 poly(methyl methacrylate)(PMMA)。

將 PLA-PMPC 溶解於去離子水配成 0.5wt.%的溶液注入水相 GPC 中，可得分子量分布，流動相為去離子水，流速 1mL/min(40°C)。

$^1\text{H-NMR}$ 與 FT-IR 光譜分析

將產物溶解於 CD_3OD 中，經核磁共振儀分析，得到樣品的 $^1\text{H-NMR}$ 光譜。

將產物溶解於甲醇，滴在 KBr 鹽片上，乾燥後經傅立葉紅外線光譜儀分析，得到樣品的紅外線光譜。

3-5 臨界微胞濃度分析

取高分子溶解於去離子水(Millipore Milli-Q water),調整濃度範圍由 10 mg/L 至 1000 mg/L。將濃度 $6 \times 10^{-7} \text{M}$ 之 pyrene 配入各濃度之高分子溶液,置於 65 °C 下避光反應 3 小時,之後冷卻放置室溫下 12 小時後,利用螢光光譜儀紀錄溶液 270-450 nm 之吸收光譜。以 337nm 與 335nm 兩波長吸收度的比值對濃度的指數座標作圖,曲線底部與反曲點兩直線外插交叉點相對濃度定義為臨界微胞濃度。

3-6 製備 PMPC-PLA 高分子微胞

取 25 mg 高分子溶解於 5 mL Ethanol 與 DMSO 體積比例 1:2 的混合溶液中,置於透析膜(Mwco=6000~8000)以 RO 水進行透析並攪拌之,每兩小時換一次水,如此進行透析兩天。之後冷凍乾燥收集產物。

3-7 粒徑與介面電位分析

高分子微胞的粒徑與界面電位可利用粒徑與界面電位分析儀量測。

3-8 體外藥物釋放模擬

取 10mg 抗癌藥物 doxorubicin(DOX)溶解於 4mL DMSO 後,加入 5 mL L-TEA 使 doxorubicin 變成疏水性以利高分子微胞攜帶。取 20mg 高分子溶於 2mL 乙醇後,加入之前溶有抗癌藥物的 DMSO 溶液,並充分攪拌混合,再以透析膜(Mwco= 6000~8000)將溶液透析,充分除去未包覆成功之藥物,冷凍乾燥後可得暗紅色粉狀奈米微胞。藥物包覆率(drug loading efficiency)的計算方式為:

$$\text{藥物包覆率(\%)} = \frac{\text{包覆的藥物重量}}{\text{包藥微胞總重量}} \times 100\%$$

以 ethanol/DMSO(1:2 v/v)溶解定量之微胞,測量波長 485nm 之吸收峰,比對藥物在 DMSO 之校正線可計算出包覆的藥物重量。

體外藥物釋放部分,取 5mg 包藥奈米微胞溶解於 10mL pH 7.4 磷酸鹽緩衝溶液(I=0.01)。將溶液置於分子量 1,000 之超過濾裝置內,控制溫度在 37 °C 並定時取樣,釋放出的藥物經由超過濾薄膜分離出來,以 UV/Vis 測量波長 485nm 之吸收,對照藥物在緩衝溶液下之校正線計算釋放的藥量。

$$\text{藥物釋放率(\%)} = \frac{\text{釋放的藥物重量}}{\text{微胞內藥物總重量}} \times 100\%$$

HeLa 人類子宮頸癌細胞與 HFW 正常人類纖維母細胞培養基的配製方法是將 DMEM 粉末以 900 mL RO 水溶解,加入 3.7g NaHCO_3 ,以 CO_2 調整 pH 值至 7.4,移入無菌操作台以 0.22 μm 無菌過濾設備過濾 DMEM 溶液至已滅菌之血清瓶中,加入 100 mL FBS、1% 的抗生素(Penicillin/streptomycin)、2mM 的 L-glutamin 與 2mM 的非必須氨基酸(non essential amino acid)置於 4 °C 冰箱保存。

磷酸鹽緩衝溶液(PBS)的配製方法係將 0.2 g KCl、8 g NaCl、1.44 g Na_2HPO_4 與 0.2 g KH_2PO_4 溶於 1 L RO 水,高溫高壓滅菌 (121 °C, 30 min) 後,置於 4 °C 冰箱保存。

將HeLa與HFW以DMEM培養基培養在 37 °C，5%CO₂的恆溫培養箱中，以倒立式顯微鏡觀察其生長情形。等細胞長至八分滿，以 0.25% trypsin-EDTA將培養皿中細胞洗下，混合trypan blue，在顯微鏡下以細胞計數器計算細胞數目。於 96 孔培養盤中每孔種植 2x10⁴個細胞。24 小時後，移除培養基並加入含有不同高分子濃度之培養液。再過 24 小時，更換新鮮培養基 100μL並加入 10μL MTT(5mg/mL in PBS) 反應 3 小時。移除培養基，加入 100μL DMSO/EtOH(1:1 v/v)溶解產生之結晶物，室溫反應 12 小時以 96 孔盤酵素判讀儀讀取波長 570nm 之吸收，波長 630nm為背景扣除值。實驗重複 6 次(n=6)，細胞存活率(cell viability)的計算方式：

$$\text{細胞存活率(\%)} = \frac{\text{吸收度 sample}}{\text{吸收度 positive control}}$$

3-9 細胞毒殺

細胞毒殺實驗則是分別加入藥物與含藥奈米微胞，藥物濃度介於 1-1000 μg/mL，計算不同時間與濃度下細胞的存活率，比較藥物與含藥微胞之間 HeLa 癌細胞毒殺的效果。實驗重複 6 次(n=6)。



第四章、結果與討論

4.1 合成 PLA-b-PMPC 兩團聯共聚物

PLA是常見的生分解性材料，其合成方法有許多不同之處。傳統的縮合聚合得到的產物分子量小，分布也較廣。因此發展出利用如stannous octoate($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)，利用配位的方式，間接造成R-OH官能基形成起始劑，再攻擊D,L-Lactide進行開環聚合。在本研究中，因為要在高分子鏈末端導入-Br官能基以利下步驟ATRP反應的進行，因此利用苯甲醇(benzyl alcohol)為起始劑，在乾燥氮氣下以正丁基鋰(n-butyllithium)活化並進行聚合反應，降溫後加入定量的2-bromo 2-methylpropionyl bromide 甲苯溶液會使-Br連接上高分子末端。由於未反應的2-bromo 2-methylpropionyl bromide會使下一步驟的ATRP反應失敗，因此在正己烷中加入少許乙醚進行再沉澱，會使PLA的產率減少一些。純化後的PLA-Br以 $^1\text{H-NMR}$ (圖 1)光譜顯示PLA-Br主要有四個波峰。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.53(broad, 3H $\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{O}$), 5.11(s, $\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{O}$), 1.93(d, 6H $(\text{CH}_3)_2\text{Br}$), 7.3(broad, 5H Ar-H)。PLA之數目平均分子量可由PLA甲基(δ 1.54)與苯甲醇苯環(δ 7.35)積分值的比值計算而得，溴化之轉化率可由溴化劑(δ 1.9)與苯環(δ 7.35)積分值的比值計算而得，以GPC分析其分子量分佈指數(polydispersity index, PDI) 進而得知重量平均分子量。

PMPC 是相當新穎且具生物相容性的材料，一般性的合成方法是利用自由基聚合將烯類雙鍵打開來進行聚合，可得到單一的 PMPC 或是與其他材料形成隨機共聚物(random copolymer)。ATRP 可使 MPC 聚合的範圍更加廣泛，可使一般無烯類雙鍵的材料如 PEO、PPO，末端引入活性鹵素原子作為巨起始劑，與 MPC 形成團聯共聚物【60】。本研究 PLA-PMPC 雙團聯共聚物則是以 PLA 末端溴化，與 MPC 單體進行 ATRP 之聚合反應。

以 $^1\text{H-NMR}$ 光譜計算其分子量與鏈段比例。其 $^1\text{H-NMR}$ 光譜如圖 2 所示，(CD_3OD): δ 1.53(broad, 3H $\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{O}$), 5.11(s, $\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{O}$), 1.83(broad, 3H $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)$), 3.1(broad, 9H $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.5(broad, 2H $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 4.0(broad, 2H PO_4CH_2), 4.2(broad, 2H CH_2PO_4), 4.28(broad, 2H COOCH_2)。親疏水鏈段之莫耳比則以PLA甲基(δ 1.53)與PMPC親水基上的 CH_2 (δ 3.5, 4.0, 4.2, 4.28)積分值平均的比值計算而得。由圖 4-3 GPC圖譜可得知產物為單一波峰並可得知其分子量分布。從圖 4-2 可發現MPC單體 $\text{C}=\text{C}$ 雙鍵的波峰(δ 5.6, δ 6.0)已經消失，表示單體已完全反應。FT-IR光譜如圖 4-4 所示， 1758 cm^{-1} 附近的吸收為PLA上酯類 $\text{C}=\text{O}$ 的特性波峰， 1720 cm^{-1} 附近的吸收為PMPC甲基丙烯酸酯 $\text{C}=\text{O}$ 的特性波峰，可以看的出來有一些重疊的部分； 970 cm^{-1} 的吸收為PMPC上 $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 的特性波峰。表 4-2 列出每個高分子不同親疏水鏈段的比例及其分子量。

表 4-1. PLA-Br 之性質分析

Polymer code	\overline{M}_w	\overline{M}_n^a	PDI ^b	Conversion(%)
PLA ₁₁ -Br	1020	815	1.25	74
PLA ₂₀ -Br	1790	1460	1.23	85
PLA ₂₆ -Br	2240	1900	1.18	77.5
PLA ₃₀ -Br	2610	2160	1.21	70

^a由¹H-NMR所計算出 ^b由GPC所檢測出

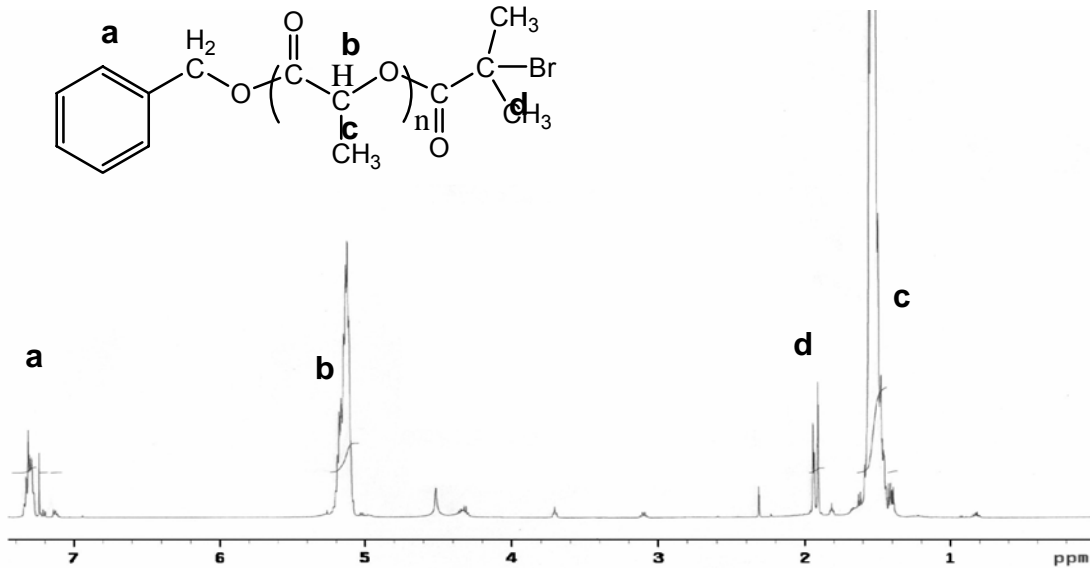


圖 4-1. Poly(lactic acid)(PLA)之¹H-NMR光譜

表 4-2. PLA-PMPC 之性質分析

Polymer code	Feed molar ratio(LA/MPC)	Molar composition(L A/MPC)	\overline{DP}_{PLA}	\overline{DP}_{PMPC}	\overline{M}_n^a	PDI ^b
PLA ₁₁ -PMPC ₅₀	0.33	0.22	11	50	15800	1.52
PLA ₂₀ -PMPC ₆₇	0.33	0.25	20	67	21500	1.47
PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄	0.33	0.29	26	104	33000	1.5
PLA ₃₀ -PMPC ₁₅₀	0.33	0.2	30	150	47000	1.48

^a由¹H-NMR所計算出 ^b由GPC所檢測出

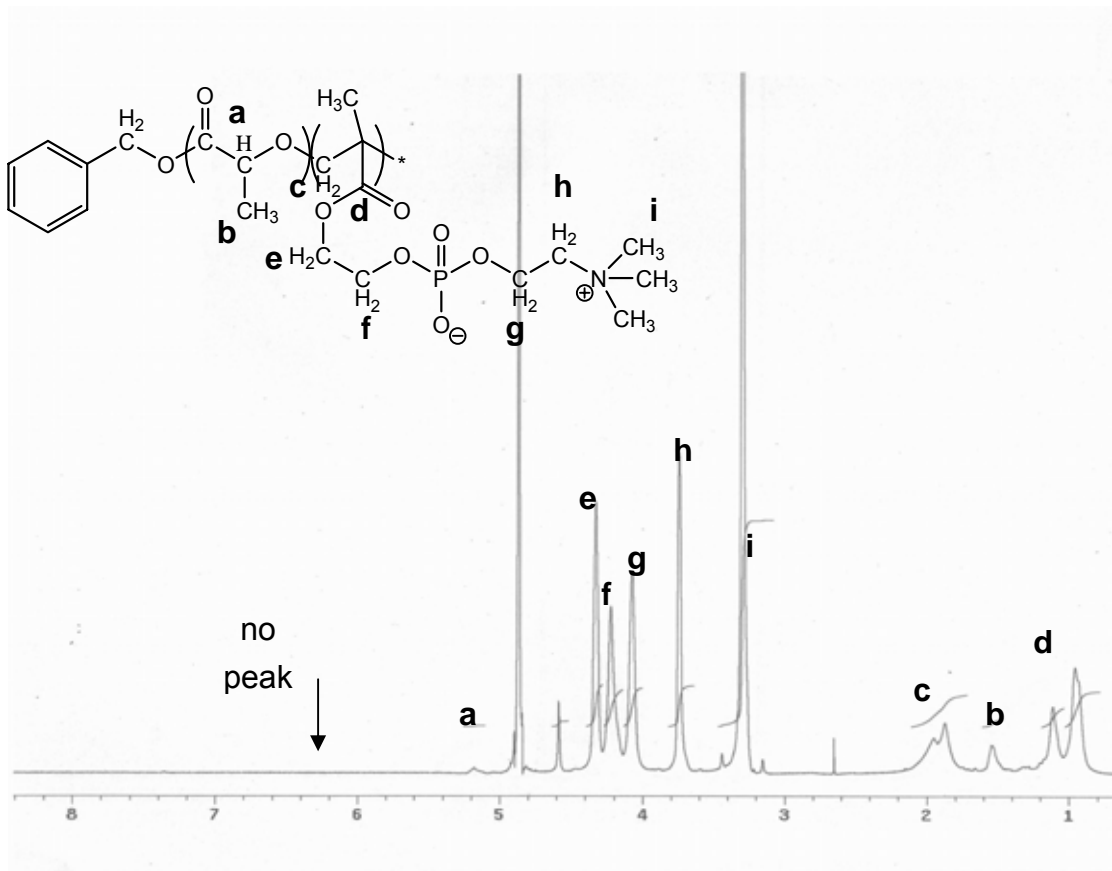


圖 4-2. PLA-PMPC 雙團聯共聚物之¹H-NMR 光譜

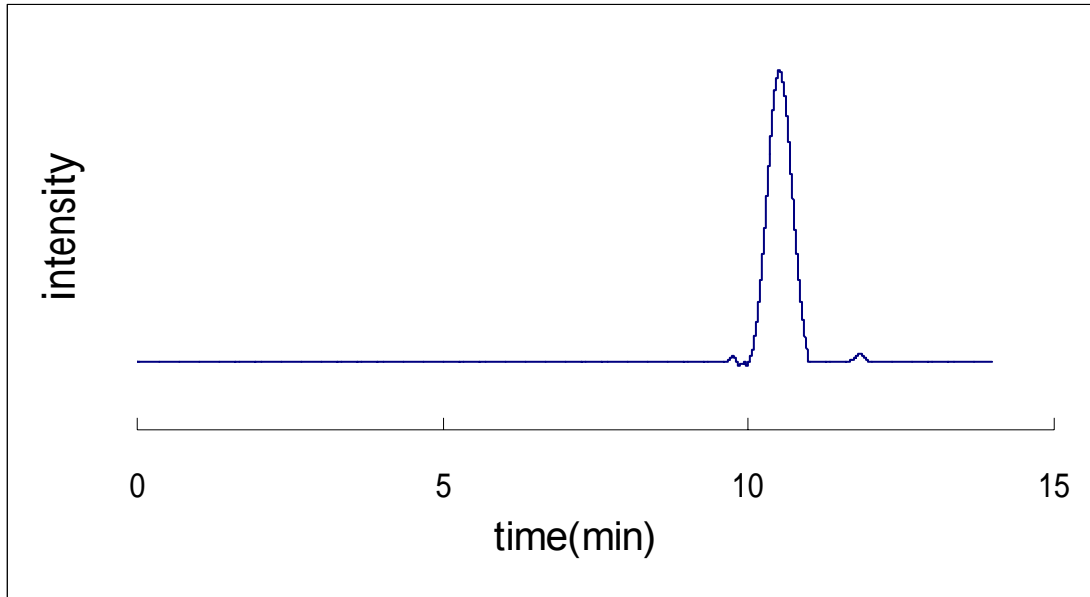


圖 4-3. PLA-PMPC 之 GPC 圖譜

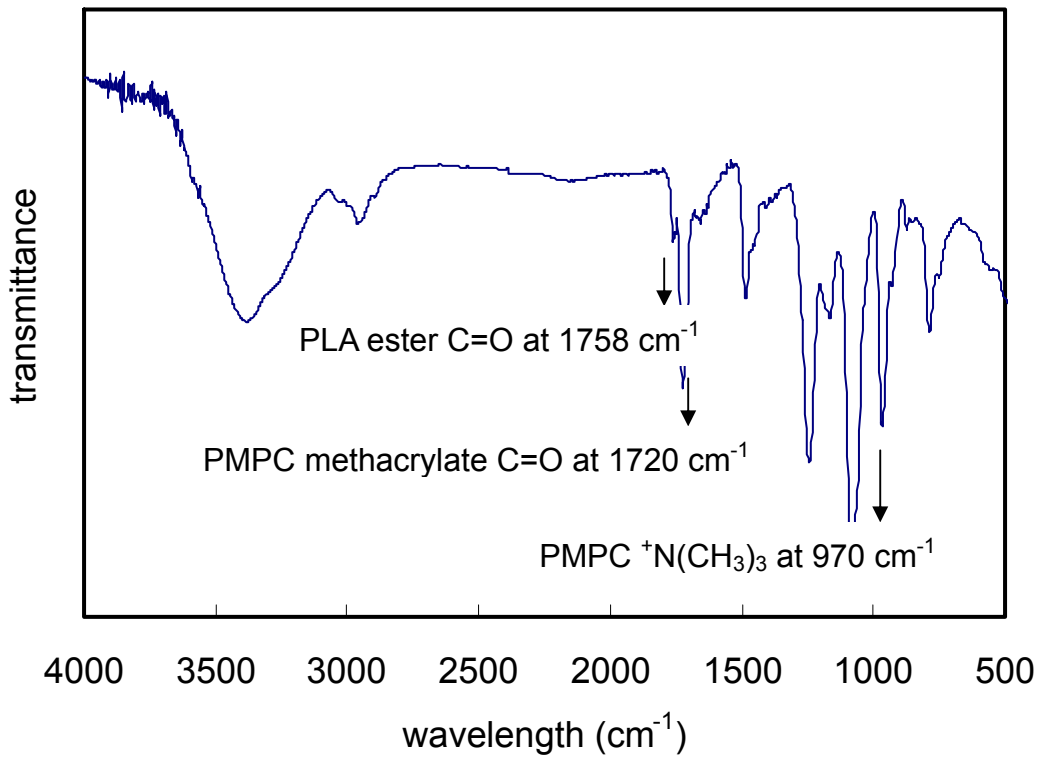


圖 4-4. PLA-PMPC 雙團聯共聚物之 FT-IR 光譜

4.2 臨界微胞濃度

合成 PLA-PMPC 高分子的目的在於製備藥物以應用於藥物釋放，因此臨界微胞濃度的測量可以得知微胞形成的安定性。CMC 太高的微胞安定性不佳，容易被稀釋後解離，在應用上會受較大的限制。CMC 的測量可以添加疏水性染劑 pyrene，其水溶液的環境下之吸收波長相對於在疏水的環境下 335nm 之吸收波長會有紅位移的情形【61-63】。兩性高分子形成微胞的過程中，疏水鏈段的聚集使得 pyrene 包埋在微胞中，因此波長 335nm 的吸收會逐漸偏移至 337nm。

如圖 4-5 所示，當高分子濃度逐漸增高，pyrene 在 337nm 的吸收峰逐漸增高，當濃度高於 CMC 時，pyrene 大量進入 PLA 的疏水區域中，吸收強度由 335nm 紅位移至 337nm 開始呈線性成長。將 337 nm 與 335 nm 兩波長吸收度的比值對濃度的指數座標作圖，兩直線外插交叉點可以得到臨界微胞濃度。(圖 4-6)

表 4-3. 不同組成 PLA-PMPC 之臨界微胞濃度

Polymer code	Molar composition(LA/MPC)	CMC(mg/L)
PLA ₁₁ -PMPC ₅₀	0.22	66
PLA ₂₀ -PMPC ₆₇	0.29	86
PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄	0.25	89
PLA ₃₀ -PMPC ₁₅₀	0.2	85

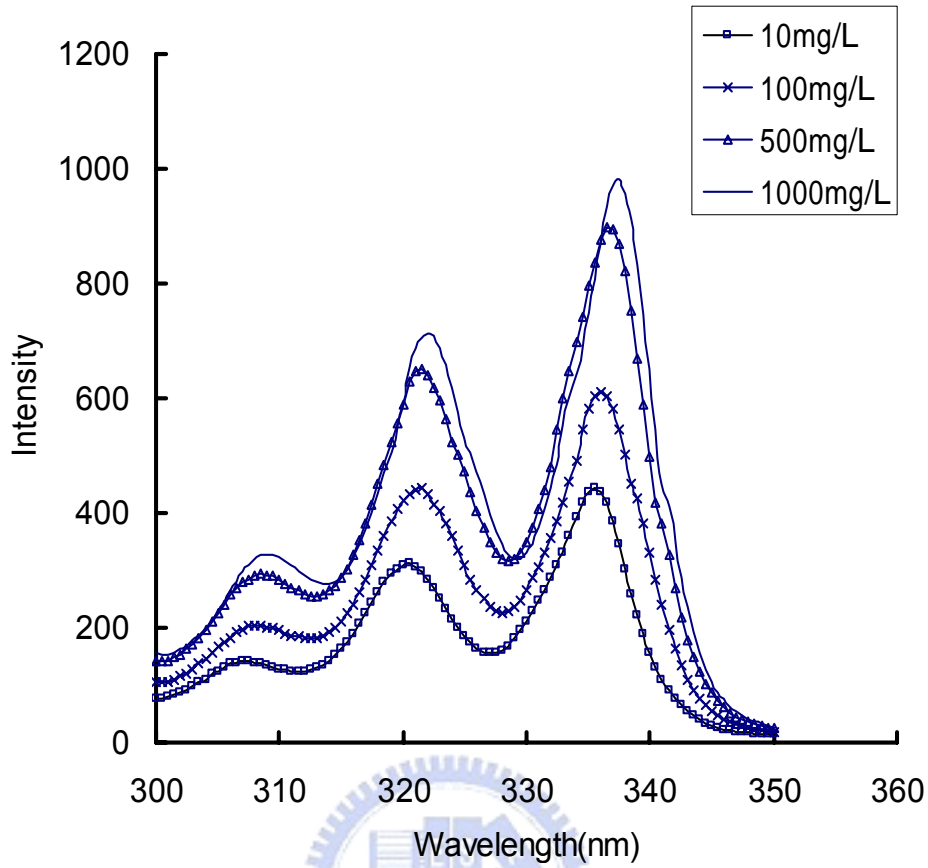


圖 4-5. 不同高分子濃度下 pyrene 在 337 nm 與 335 nm 兩波長吸收度變化之情形

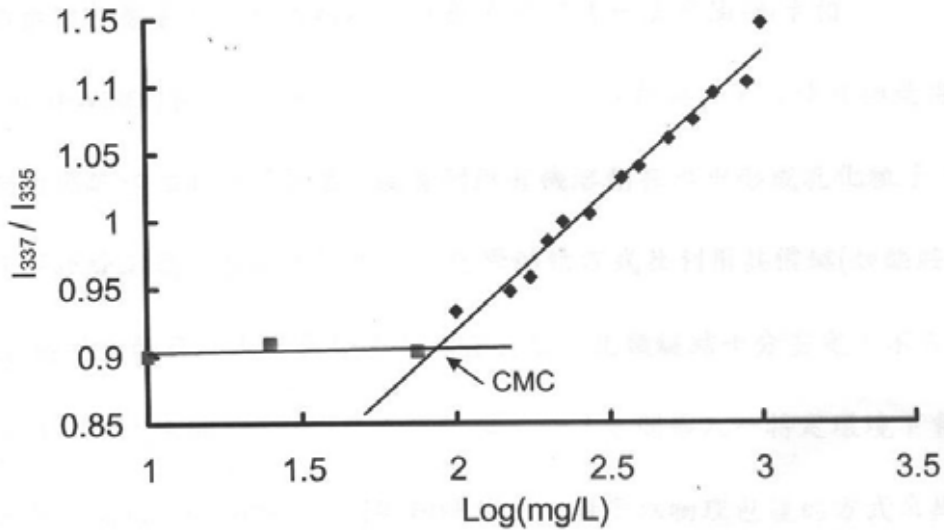


圖 4-6. 不同高分子濃度下 pyrene 在 337 nm 與 335 nm 兩波長吸收度的比值，兩直線外插的交叉點為臨界微胞濃度 CMC

4.3 粒徑與界面電位分析

利用化學鍵結或物理包覆的方式可以將疏水性藥物負載至高分子微胞上。單純利用藥物與高分子在水中的疏水性聚集很難提高微胞的藥物包覆量。常見的物理性包覆方式有透析法及油相/水相(oil-in-water)乳化法(圖 4-7)。前者利用有機溶劑與水的緩慢交換使得藥物與疏水性高分子聚集；後者利用有機溶劑在水中形成乳化粒子，緩慢揮發溶劑包覆疏水性藥物。化學鍵結方式及利用共價鍵(如醯胺鍵)鍵結藥物與疏水性高分子上之官能基。此類鍵結十分安定，不容易被酵素或水解，因此必須在藥物與高分子之間導入一特定環境下會斷裂之間格物(spacer)以利藥物釋放。一般多以物理包覆的方式來提高藥物包覆量。

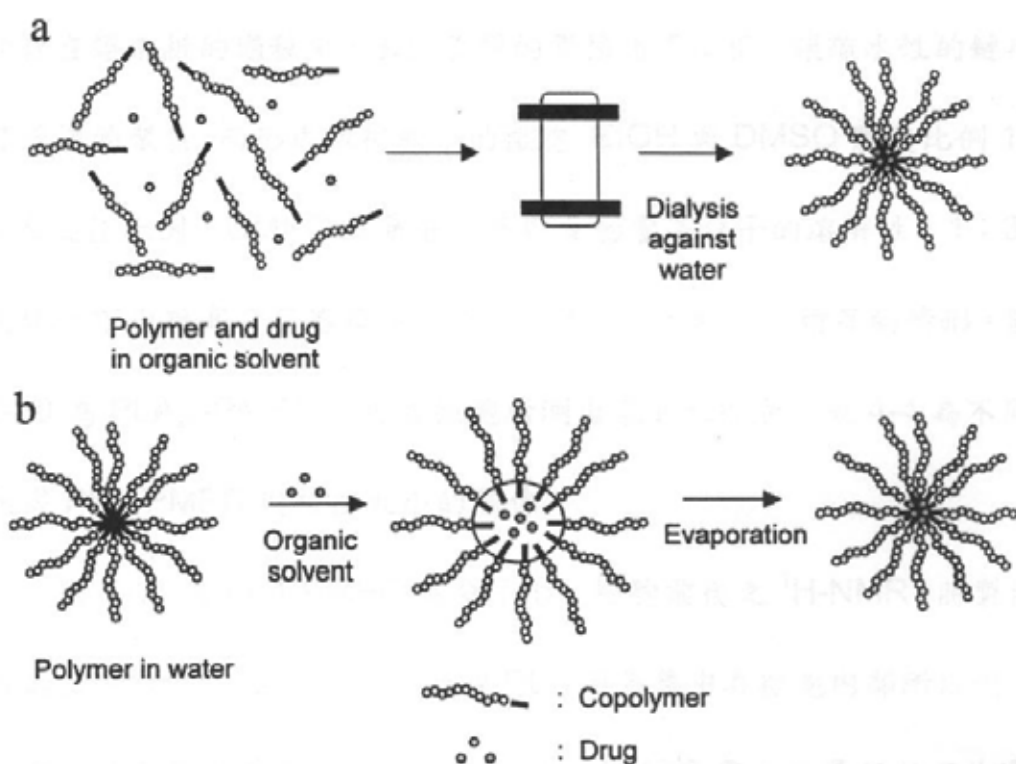


圖 4-7. 高分子微胞包覆藥物的方法(a)透析法(b)乳化法

4.3.1 透析法製備高分子微胞

利用透析法來製備PLA-PMPC的高分子微胞，PMPC只溶於醇類，但是只利用醇類所形成的微胞其粒徑無法達到預期的大小，因此搭配其他一些有機溶劑的測試(圖 4-8)，發現以Ethanol與DMSO之混合溶液所形成的高分子微胞粒徑微最小。利用所選取的溶劑，嘗試不同的比例以獲得最小的粒徑，圖 4-9 表示EtOH與DMSO之混合比例與所形成微胞粒徑的關係。發現在乙醇中慢慢增加DMSO的含量，則粒徑逐漸減小，這是由於DMSO的存在讓透析的過程中，水與乙醇的置換速率降低，可讓疏水性鏈段緩慢的聚集，形成粒徑較小的微胞。EtOH與

DMSO體積比例 1:2 為最佳比例，DMSO含量若太多則會影響高分子的溶解性，1:3 的條件下出現高分子溶解不完全的現象，造成粒徑有增高的情形。圖 4-10 為PLA₂₆-PMPC₁₀₄形成微胞所測出來的粒徑圖。表 4-4 為不同組成PLA-PMPC 與粒徑大小的關係。

圖 4-11 為PLA-PMPC高分子形成微胞前後之¹H-NMR。將製備好的微胞懸浮於D₂O中，可以發現PLA因為集中在微胞內部所以吸收峰強度明顯降低甚至已經消失，相對地PMPC露在外層所以吸收峰強度依然相當高。這可以證實PLA-PMPC微胞之結構屬於PMPC在外PLA在內之核殼結構。從圖 4-12 的AFM圖也可看出，PLA-PMPC微胞大致上為圓形的結構，並且大小都維持在100-200nm之間。

表 4-4. 不同組成 PLA-PMPC 與粒徑大小的關係

Polymer code	Molar composition(LA/MPC)	Particle size(nm) ^a	Poly index
PLA ₁₁ -PMPC ₅₀	0.22	—	—
PLA ₂₀ -PMPC ₆₇	0.29	118	0.364
PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄	0.25	120	0.251
PLA ₃₀ -PMPC ₁₅₀	0.2	156	0.380

^a由溶劑EtOH : DMSO=1 : 2(v/v)進行透析製備

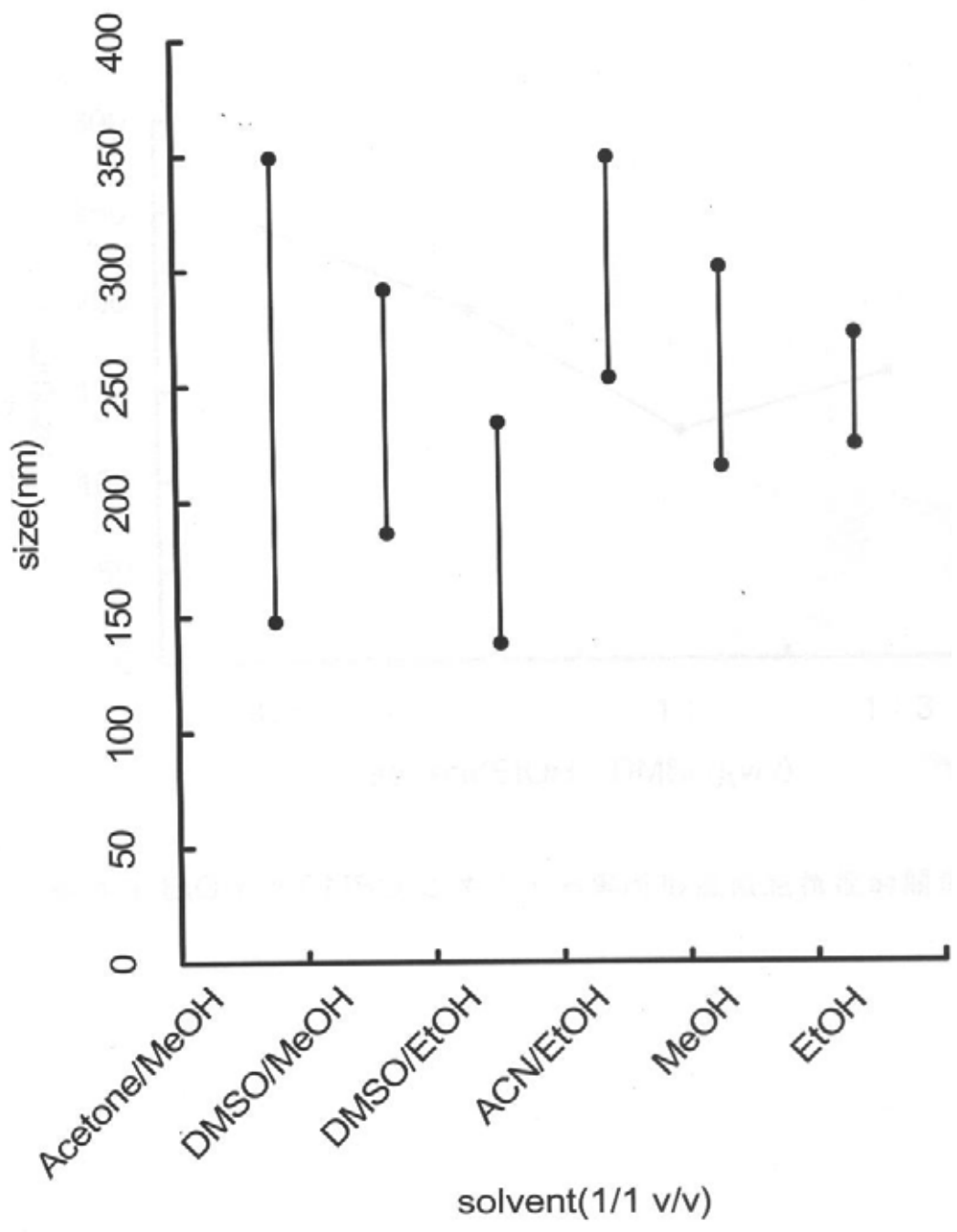


圖 4-8. 所使用的溶劑與形成微胞之粒徑範圍

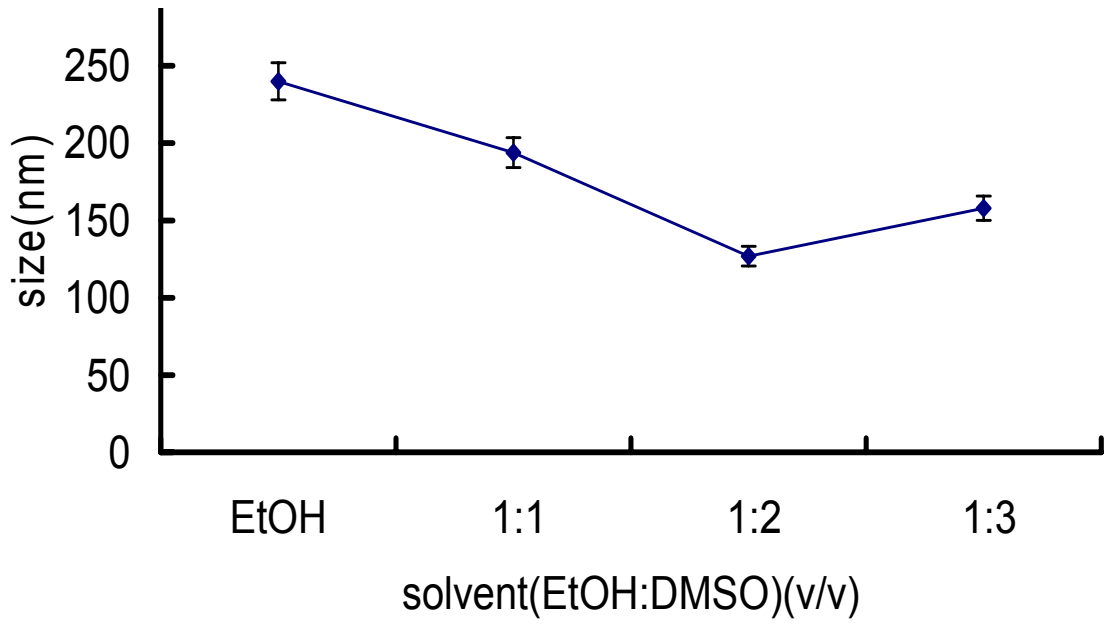


圖 4-9. EtOH 與 DMSO 之混合比例與所形成微胞粒徑的關係

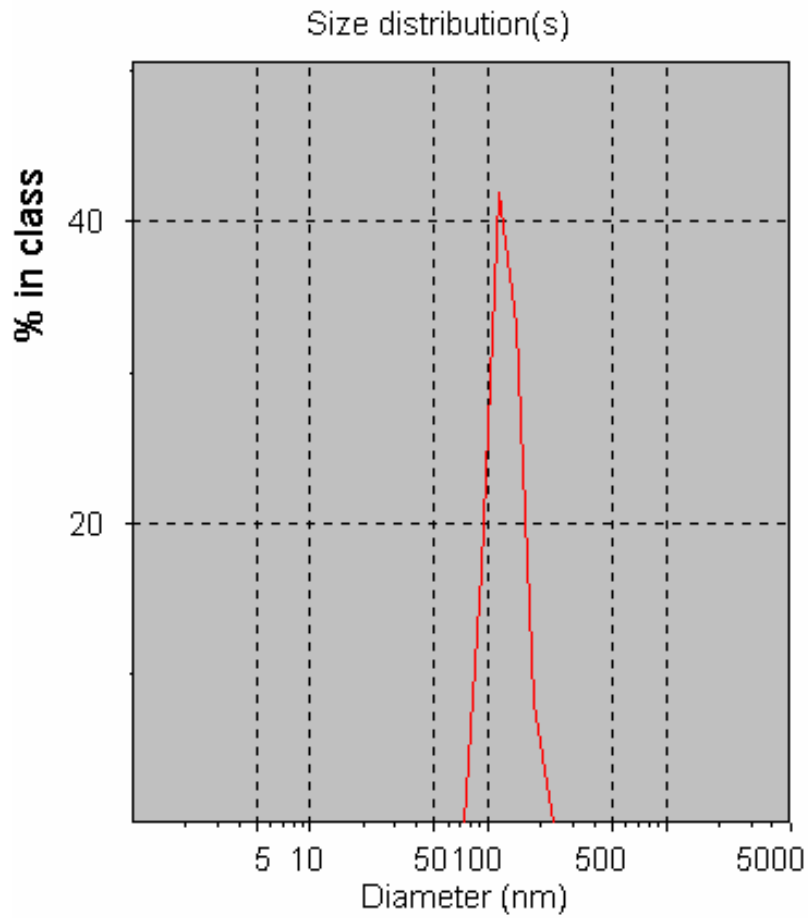


圖 4-10. PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 高分子微胞平均粒徑 120nm

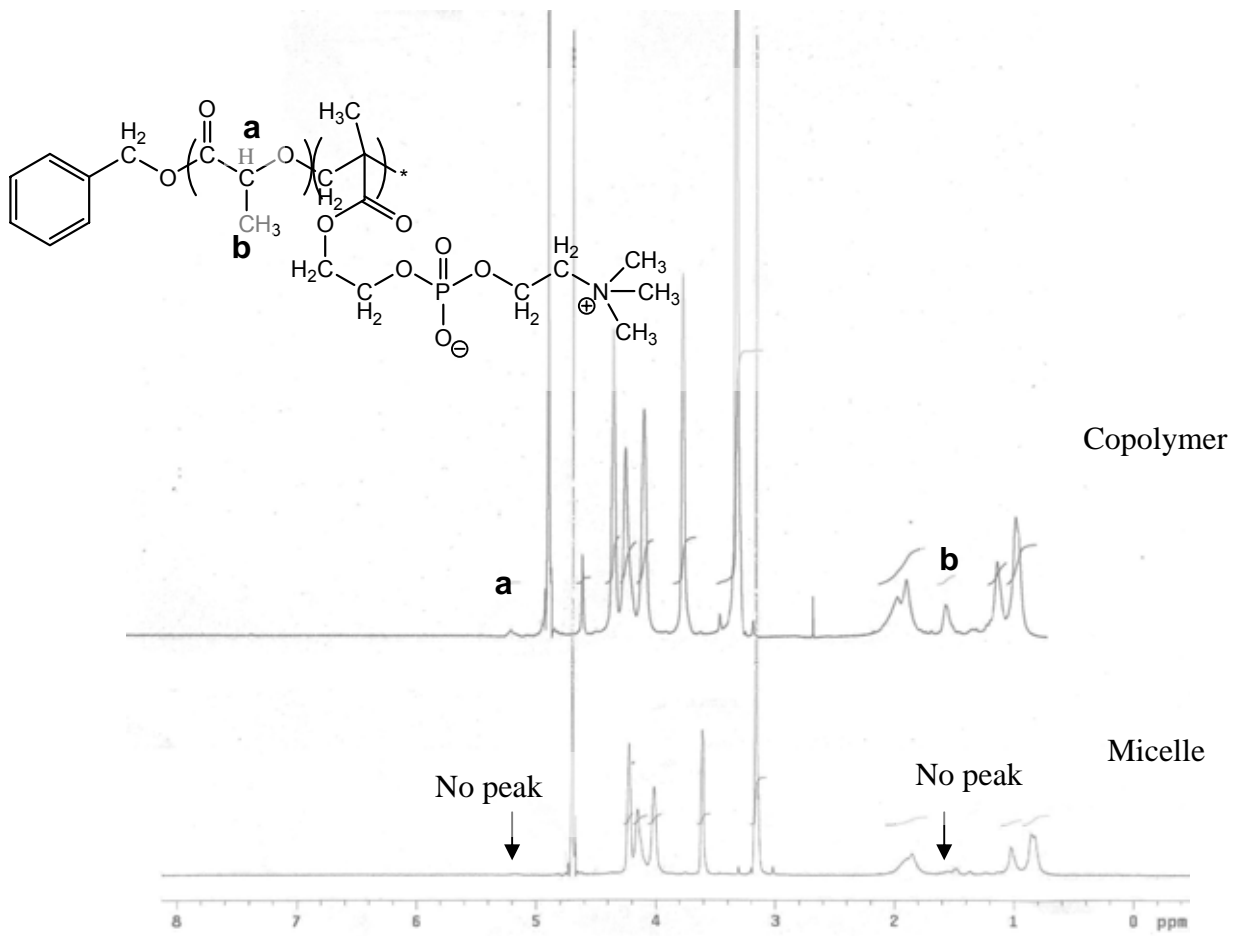


圖 4-11. PLA-PMPC 製備微胞前後 $^1\text{H-NMR}$ 光譜之差異

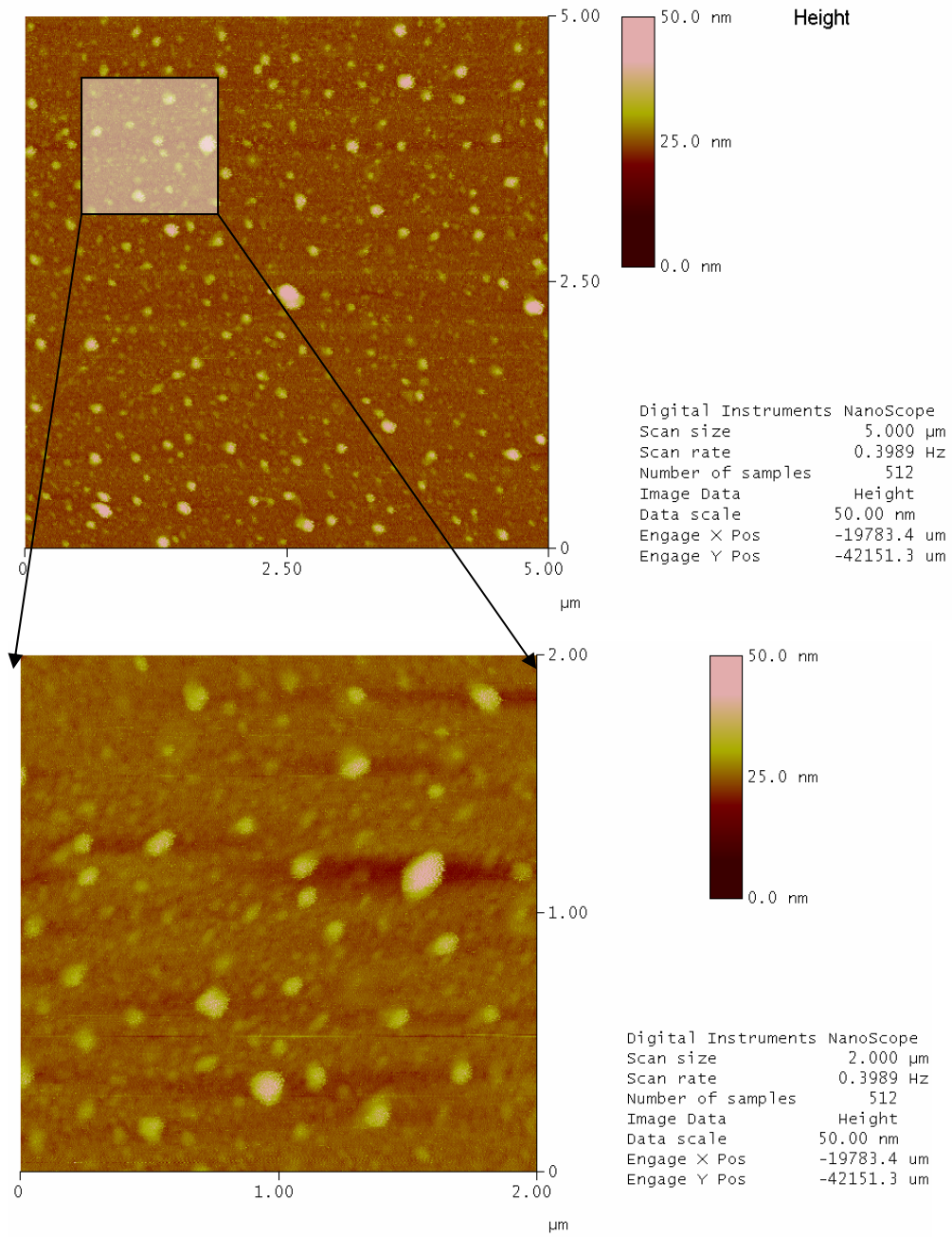


圖 4-12. PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 高分子微胞之AFM圖

4.3.2 表面電位分析

PMPC 為類磷脂質高分子，其界面電位為略帶負電而接近中性；PLA 為聚酯類高分子，界面電位在中性環境下為-30mV 左右。從圖 4-13 可看出來所測出 PLA-PMPC 微胞的界面電位呈現略帶負電的情形，這也證實了 PMPC 在外層，帶有負電的 PLA 被包覆在內層中。

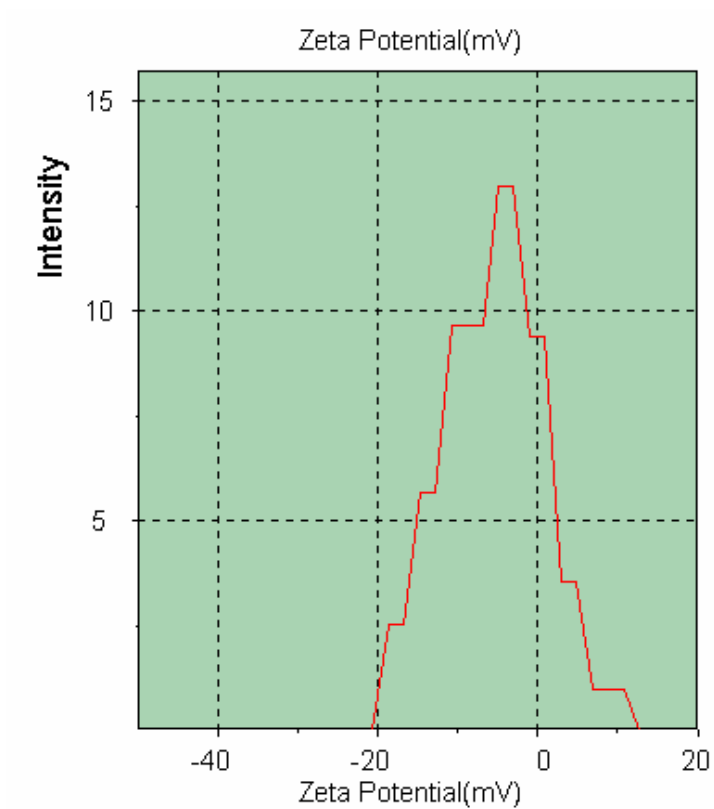


圖 4-13. PLA₂₆-PMPC₁₀₄微胞之界面電位圖

4.4 細胞存活率

PLA-PMPC的細胞毒性以HFW正常人類纖維母細胞株測試。如圖 4-14 所示，粒徑分布較小的高分子 PLA_{26} - $PMPC_{104}$ 本身材料的細胞毒性非常小，在 1 mg/mL時細胞存活率亦高達 90%以上；製備成高分子微胞之後的細胞毒性測試更是良好。

另一細胞株HeLa人類子宮頸癌細胞的毒性測試結果也相似。圖 4-15 為 PLA_{26} - $PMPC_{104}$ 在各種高分子濃度下HeLa細胞的存活率。即使在 10 mg/mL的濃度下細胞存活率仍然大於 80%；高分子微胞的細胞毒性亦相當的小，在 10 mg/mL的存活率甚至接近 90%。這證實了PLA-PMPC具有非常低的細胞毒性，證實有優異的生物相容性以及安全性，因此有應用之價值。

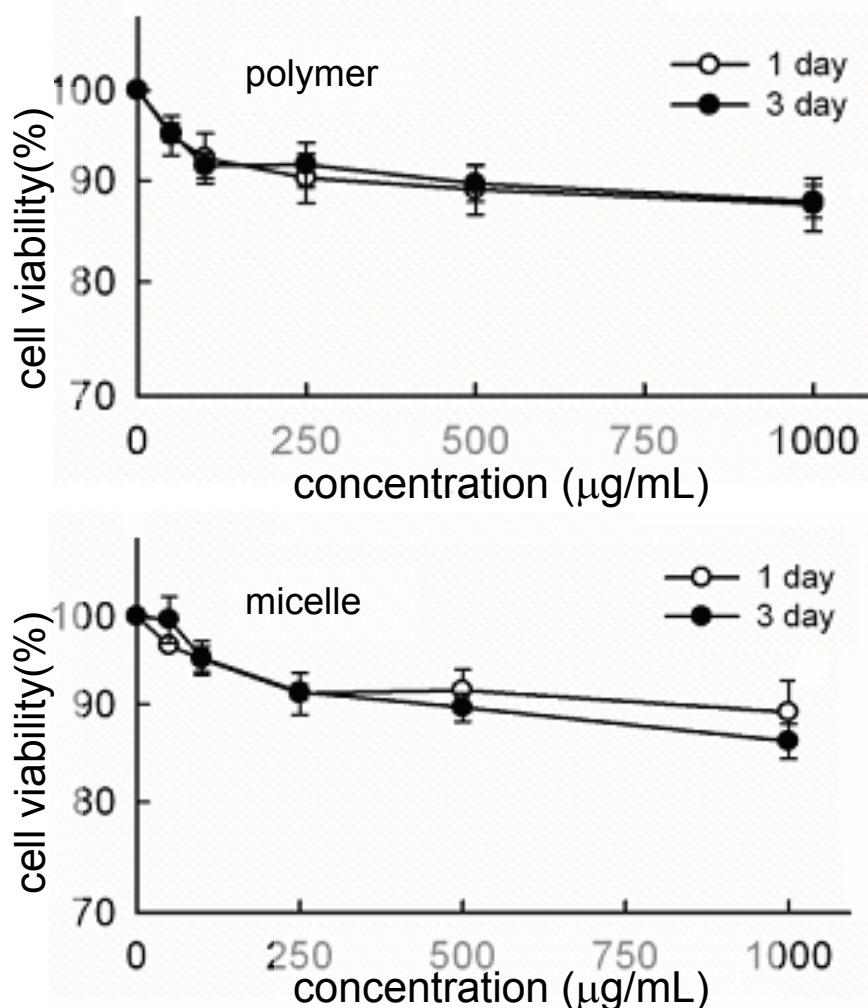


圖 4-14. PLA_{30} - $PMPC_{150}$ (a)高分子與(b)微胞在各種濃度下與HFW正常人類纖維母細胞培養 1 天與 3 天之細胞存活率(n=6)

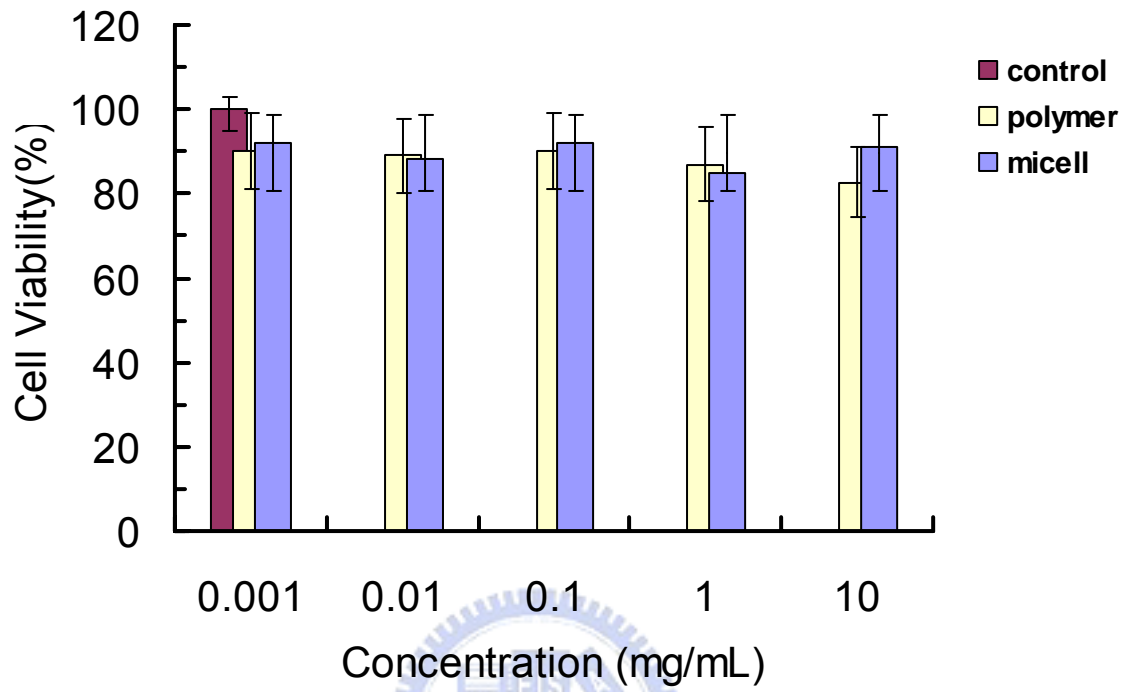


圖 4-15. PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 高分子與微胞在各種濃度下與Hela人類子宮頸癌細胞培養 24 小時之細胞存活率(n=6)

4.5 體外藥物釋放模擬

Doxorubicin hydrochloride(DOX)是一種對多種癌症均有治療效果的抗癌藥物(圖 4-16)，主要作用機制是透過共價結合插入 DNA 和烷化 DNA 造成 DNA 交互鍵結而抑制其合成。

Doxorubicin hydrochloride 為水溶性，加入有機鹼 TEA 去除 HCl 後不溶於水，可以在製備微胞時溶入 PLA 核中。如圖 4-17，包覆前最小平均粒徑為 120nm，包覆藥物之後平均粒徑卻增加到約 400nm 左右，這可能是藥物與 PLA 透析的過程中，產生了異常的聚集，造成粒徑比預期大出了許多。將微胞溶解於 EtOH/DMSO(1:2 v/v)以 UV/Vis 測量波長 485nm 的吸收度可以計算 DOX 之包覆量。藥物包覆率為 3~4 wt%，這可能也是透析過程中異常的聚集產生不必要的沉澱，使得藥物無法順利地作疏水性的聚集，造成包覆量無法提高。藥物在 EtOH/DMSO(1:2 v/v)、pH7.4 下的檢量線如圖 4-18 所示。

表 4-5. 不同組成 PLA-PMPC 包覆藥物前後之比較

Polymer code	Molar composition (LA/MPC)	Before loading drug size(nm)	After loading drug size(nm)	DOX loading ^a (wt%)
PLA ₂₀ -PMPC ₆₇	0.29	118	—	—
PLA ₂₆ -PMPC ₁₀₄	0.25	120	380	3.5
PLA ₃₀ -PMPC ₁₅₀	0.2	156	585	3

^a 藥物包覆率(%) = 包覆藥物重量/包藥微胞總重量 × 100%

圖 4-19 為 pH7.4 水溶液下藥物微胞釋放模擬。在一開始由於冷凍乾燥將微胞內的 DOX 擠出造成暴衝(initial burst)現象。之後都是以緩慢擴散的方式進行釋放，藥物微胞到了第 25 天釋放了約 70%的藥物，並且仍持續緩慢的釋放中。由以上可得知 PLA-PMPC 藥物微胞可進行緩慢的藥物釋放，並可持續釋放 20 天以上。

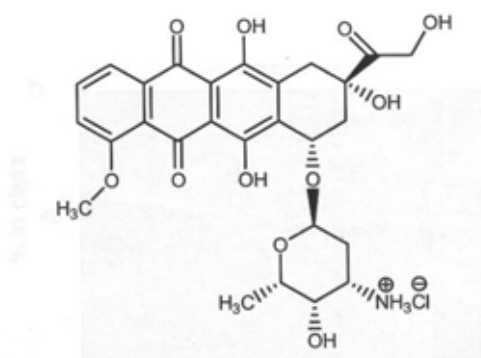


圖 4-16. Doxorubicin hydrochloride 之化學結構

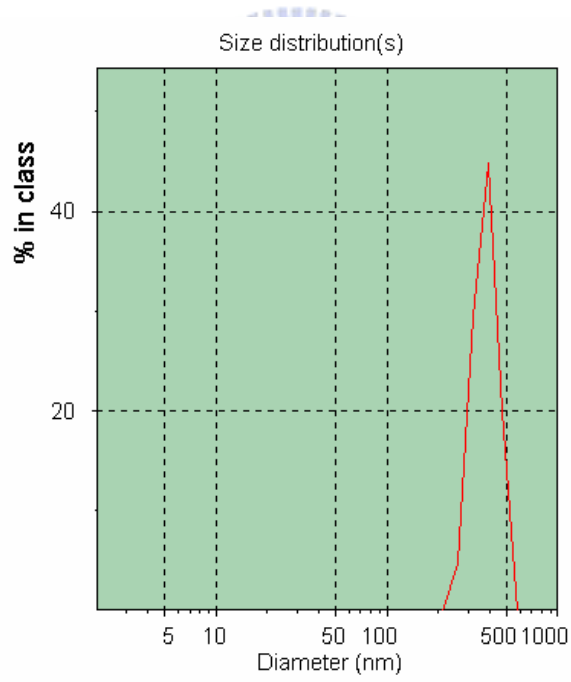
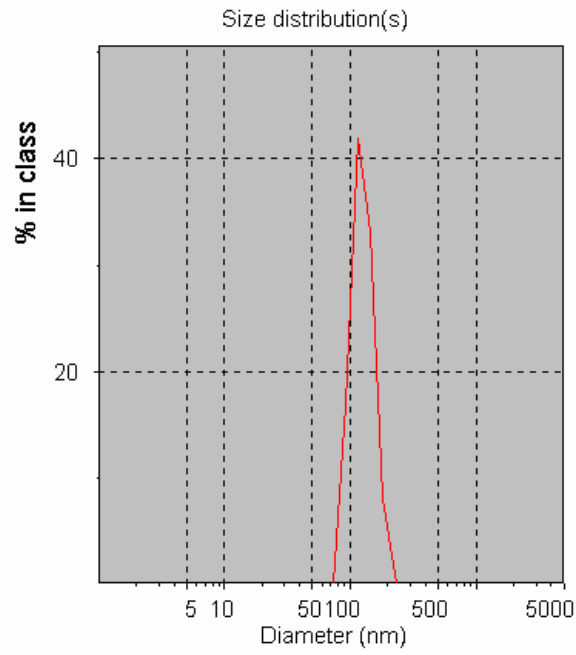


圖 4-17. (a)包覆 DOX 前平均粒徑 120 nm (b)包覆 DOX 後平均粒徑約 400 nm

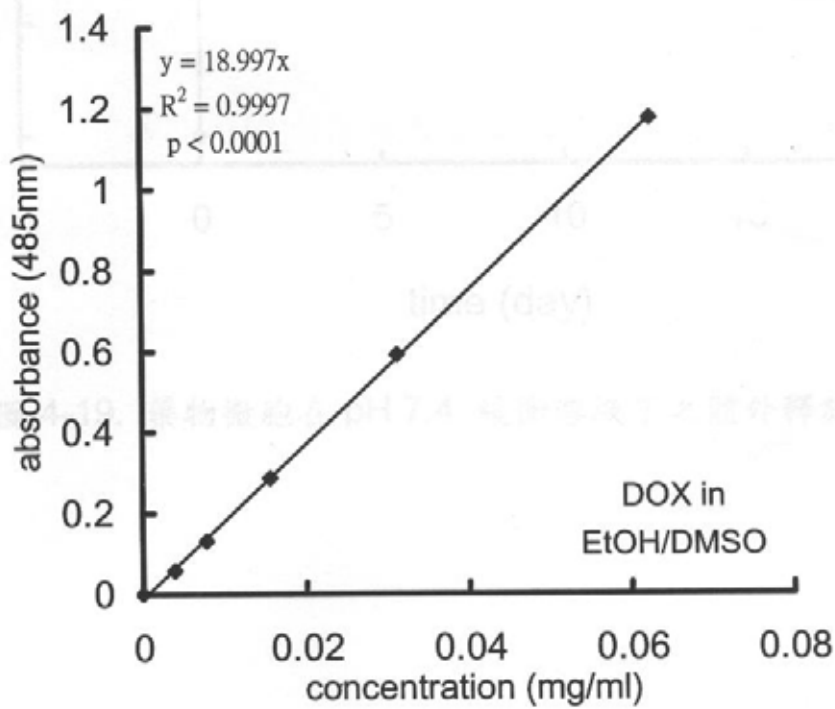
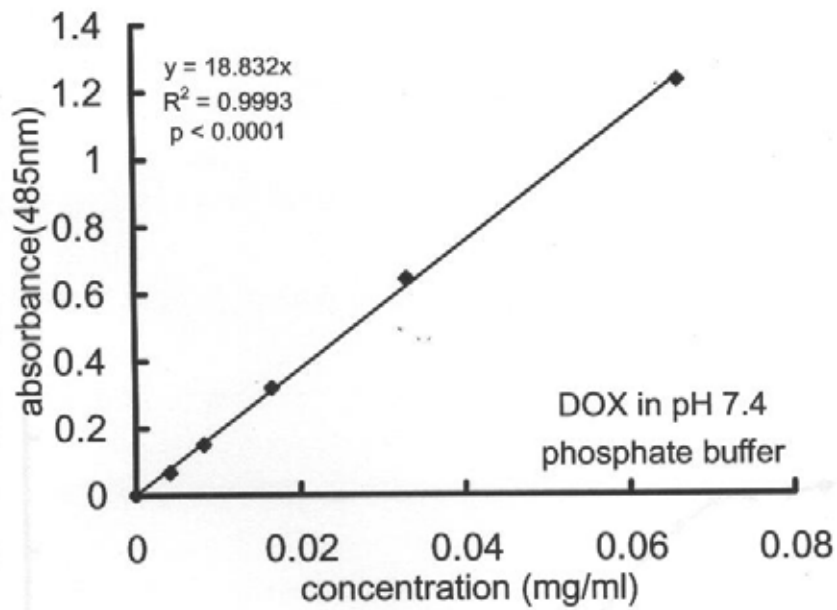


圖 4-18. Doxorubicin hydrochloride 在 485nm 之檢量線

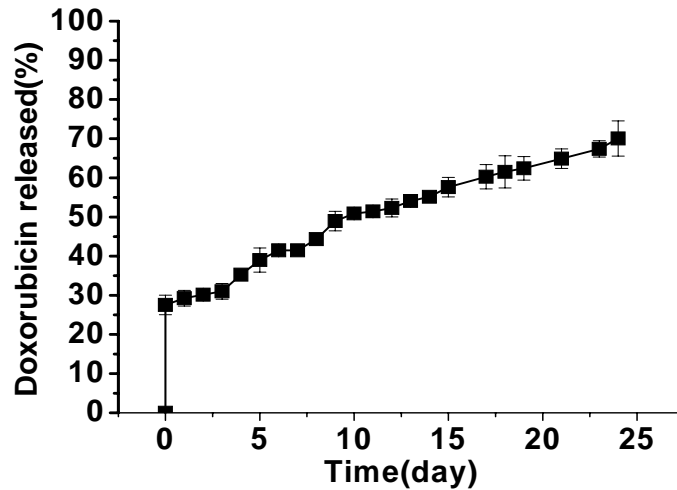


圖 4-19. 藥物微胞在 pH7.4 緩衝溶液下之體外釋放模擬

4.6 細胞毒殺實驗

細胞毒殺實驗用以判斷藥物以及藥物微胞對癌細胞生長的抑制效果。將不同濃度的DOX以及PLA₂₆-PMPC₁₀₄藥物微胞分別與 2×10^4 HeLa子宮頸癌細胞共同培養，觀察細胞死亡的情形。實驗結果如圖 4-20，在 24 小時的實驗中，可發現各濃度下以DOX處理的HeLa細胞存活率都偏低，這是因為DOX小分子擴散速度很快，24 小時之中除了最低濃度的 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以外，細胞幾乎都死亡。而藥物微胞在濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上細胞存活率都偏低，這可能是藥物一開始暴衝的量過多，造成藥物直接與細胞作用而使細胞死亡。

在藥物微胞方面 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以及 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 來看，在 24 小時細胞存活率在約在 40%~50%之間，皆比 DOX 來的高，而到了 72 小時之後兩者的細胞存活率都有了明顯的下降，這也看的出來藥物藉由高分子的包覆後可降低藥物直接對細胞的毒性，並藉由緩慢的釋放來達到抑制癌細胞的生長。

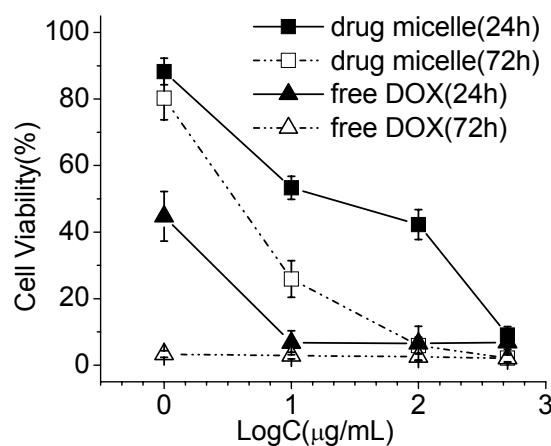


圖 4-20. DOX 與藥物微胞在不同濃度與不同時間下對 HeLa 人類子宮頸癌細胞的生長抑制效果(n=6)

第五章 結論

1. 利用陰離子開環聚合可以合成低分子量的 PLA，此活性聚合法在反應製終止時加入溴化劑可以導入 -Br 以利接下來之 ATRP 反應。由於必須以乙醚除去多餘之溴化劑，產率會略為下降。
2. 末端溴化的 PLA 與帶有烯類雙鍵的 MPC 單體可以 ATRP 反應聚合形成 PLA-PMPC 雙團聯共聚物。由 $^1\text{H-NMR}$ 可得知 MPC 單體已反應完全，並可由鏈段比得之其分子量。
3. 利用 pyrene 在 335nm 紅位移至 337nm 之特性可求得 PLA-PMPC 之臨界微胞濃度，其分布在 50~100mg/L 之間。
4. PLA-PMPC 可利用透析法形成高分子微胞，發現以 EtOH 與 DMSO 體積比 1 : 2 為溶劑所形成微胞平均粒徑最小可達 120nm 左右。
5. PLA-PMPC 所形成的微胞經由 $^1\text{H-NMR}$ 、AFM 以及表面電位觀察可發現是 PLA 在內，PMPC 在外呈現圓形的核殼結構。
6. PLA-PMPC 以 HFW 以及 HeLa 兩株細胞測試，發現材料與微胞的細胞毒性都相當的低，其良好的生物相容性以及安全性是有應用價值的。
7. 高分子微胞在包覆藥物前後，由於 PLA 與藥物的聚集粒徑從平均 120nm 增加到約 400nm，藥物包覆量為 3~4%。
8. 體外藥物釋放模擬顯示微胞可緩慢持續的釋放，並且可持續釋放 20 天以上。
9. 在藥物微胞 10 $\mu\text{g/mL}$ 與 100 $\mu\text{g/mL}$ 比較 24 小時與 72 小時之細胞存活率，證明藥物藉由高分子的包覆後可降低藥物直接對細胞的毒性，並藉由緩慢的釋放來達到抑制癌細胞的生長。

綜合以上之結論可知，PLA-PMPC 雙團聯共聚物包覆藥物後微胞的粒徑大小雖然增加到 400nm 左右，可能不太適合於靜脈注射，但利用其長時間並且緩慢釋放的特性，可應用於水膠型的皮下注射治療，再加上材料具有相當低的細胞毒性以及本身優異的生物相容性，可避免其他材料所會產生的發炎或是不良的影響，顯示此一高分子在生醫材料應用上具有相當大的潛力。

參考文獻

1. P. Ehrlich, Collected study on immunology, John Wiley, New York, pp.441 (1906).
2. C. J. T. Hoes, J. Grootenok, J. Feijen, P. J. Boon, and F. Kaspersen, Synthesis and biodistribution of immunoconjugates of a human IgM and polymeric drug carriers, *J. Controlled Release*, 1992; 19: 59
3. Y. Sadzuka, S. Nakai, A. Miyagishima, Y. Nozawa, and S. Hirota, Effects of administered route on tissue distribution and antitumor activity of polyethyleneglycol-coated liposomes containing adriamycin, *Cancer Letters*, 1997; 111: 77
4. J. C. Leroux, E. Allémann, F. De Jaeghere, E. Doelker, and R. Gurny, Biodegradable nanoparticles – From sustained release formulations to improved site specific drug delivery, *J. Controlled Release*, 1996; 39: 339
5. E. ALL, R. Emann, and E. D. Gurny, Drug loaded nanoparticles-Preparation method and drug targeting issues, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1993; 39: 173
6. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002; 54: 631
7. M. C. Jones, J. C. Leroux, “Polymeric micelles – A new generation of colloidal drug carriers” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1999, 48, 101
8. N. Oku, Y. Namba, S. Okada, “Tumor accumulation of novel RES-avoiding liposomes *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1126, 255
9. M Yokoyama, M Miyauchi, N Yamada, T Okano, Y Sakurai, K Kataoka, and S Inoue, “Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer ” *Cancer Res* 1990 50: 1693-1700.
10. M Yokoyama, T Okano, Y Sakurai, H Ekimoto, C Shibasaki, and K Kataoka, “Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood.” *Cancer Res* 1991 51: 3229-3236.
11. K. Ishihara, T. Ueda, N. Nakabayashi, Preparation of phospholipids polymer as polymer hydrogel membrane, *Polymer Journal*, 1990; 22: 355
12. Ishihara K, Oshida H, Endo Y, Ueda T, Watanabe A, Nakabayashi N. Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1543-52
13. Ishihara K, Nomura H, Nhhara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Why do phospholipid polymers reduce proteinadsorption? *J Biomed Mater Res*

- 1998; 39: 323-30
14. Kadoma Y, Nakabayashi N, Masuhara E, Yamauchi J. Synthesis and hemolysis of the polymer containing phosphorylcholine groups. *Kobunshi Ronbunshu* 1978; 35: 423-7
 15. Nakabayashi N, Williams D F. Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials* 2003; 24: 2431-2435
 16. Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. preparation of phospholipids polymers and their properties as polymer hydrogel membrane. *Polym. J.* 1990; 22: 355-60
 17. Sugiyama, K. and Aoki, H. "Surface modified polymer microspheres obtained by the emulsion copolymerization of 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine with various vinyl monomers" *Polym. J.* 1994, 26, 561
 18. Ishihara K, Nomura H, Nhhara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Why do phospholipid polymers reduce proteinadsorption? *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 323-30
 19. Ishihara K, Iwasaki Y, and Nakabayashi N,"Novel biomedical polymers for regulating serious biological reactions"(1998) *Mater. Sci. Eng. C6*,253.
 20. Ishihara K, Oshida H, and Endo Y,"Henocompatibility of human whole blood on polymers with phospholipids polar group and its mechanism."(1992) *J. Biomed. Mater. Res.* 26,1543.
 21. Ishihara K, Oshida H, and Endo Y,"Effects of phospholipid adsorption on nonthrombogenicity of polymer with phospholipid polar group."(1993) *J. Biomed. Mater. Res.* 27,1309.
 22. Iwasaki Y, Tanaka S, and Hara M,"Stabilization of liposomes attached to polymer surfaces having phosphorylcholine groups."(1997) *J. Colloid Interface Sci.* 192,432.
 23. Iwasaki Y, Ishihara K, and Nakabayashi N,"Newly designed polymers for artificial organs."(1997) *Recent Res. Devel. In polym. Sci.* 1,37.
 24. Rosen H, Kohn J, Leong K, Langer R, "Biodegradable polymers for controlled release system." *Controlled Released System*(1998),83.
 25. Li S, Cathy S M, "Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide)." *Biomaterials*,(1999) 20:35-44.
 26. Bader H, Ringsdorf H, Schmidt B, *Angew. Chem.*,123/124,457(1984)
 27. Pratten M K, Liyod J B, Horpel G, Ringsdorf H, "Micelle-forming block copolymers: Pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes" *Makromol. Chem.* 186,725(1985)
 28. Kwon G S, Natio M, Kataoka K, Yokoyama M, Sakurai Y, Okano T, "Block

- copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drugs" *Colloids and surfaces B:Biointerfaces*, 2,429(1994).
29. Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Ekimoto H, Shibazaki C, and Kataoka K, "Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood." *Cancer Research*,51 3229-3236.
 30. Granath K A, Kvist B E, "Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on sephadex" *Chromatogr J*,28,69(1967).
 31. Gregoriadis G, Ryman B E, "Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases" *Eur. J. Biochem.* ,24,485(1972).
 32. Senior J H, "Fate and behaviour of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors." *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* ,3:123(1987).
 33. Lin D, Mori A, and Huang L, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1104,95(1992).
 34. Cao T, Munk P, Ramireddy C, Tuzar Z, Webber S E, " Fluorescence studies of amphiphilic poly(methacrylic acid)-block-polystyrene-block-poly(methacrylic acid) micelles" *Macromolecules*, 24,6300(1991).
 35. Duncan R, Kopekova-Rejmanova P, Strohal J, Hume I, Cable H C, Pohl J, Lloyd B, Kopecek J, "Anticancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. I. Evaluation of daunomycin and puromycin conjugates *in vitro*." *Br. J. Cancer*,55,165-174(1987).
 36. Kataoka K, Kwon G, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, "Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery" *J. Controlled Release*,24,119-132(1993).
 37. Kataoka K, " Design of nanoscopic vehicles for drug targeting based on micellization of amphiphilic block copolymers" *J.M.S.— Pure Appl. Chem.*,A31(11),1759(1994).
 38. Dunn S E, Birndley A, Davis S S, Dacies M C, and Illum L, "Polystyrene-poly (ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the *in vitro* cell interaction and *in vivo* biodistribution." *Pharmaceutical Research*,11,1016 (1994).
 39. D. Decker and P. Rempp, *CR Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. C* 261 1977
 40. Szwarc M. " Living Polymers" *Nature* 1956,178,1168.
 41. Szwarc M, Levy M, Milkovich R, " Polymerization initiated by electron

- transfer to monomer: A new method of preparation of block polymers." J. Am. Chem. Soc. 1956,78,2657.
42. Webster O W, " Living polymerization methods." Science 1991,251,887.
 43. Matyjaszewski K, Gaynor S G, In Applied Polymer Science; Craver C D, Carracher C E, Jr. Eds. Pergamon Press:Oxford,Uk,2000;929.
 44. Matyjaszewski K "Controlled Radical polymerization." American Chemical Society: Washington, DC, 1998; Vol.685.
 45. Matyjaszewski K, "Controlled/Living Radical Polymerization: Progress in ATRP, NMP, and RAFT." American Chemical Society: Washington, DC, 2000; Vol.768.
 46. Wang J S, Matyjaszewski K , "Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes" J. Am. Chem. Soc. 1995,117,5614.
 47. Kato M, Kamigaito M, Sawamoto M, Higashimura, T, "Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization" Macromolecules 1995, 28, 1721.
 48. Wang J S, Matyjaszewski K, "Controlled/"Living" Radical Polymerization. Halogen Atom Transfer Radical Polymerization Promoted by a Cu(I)/Cu(II) Redox Process" Macromolecules 1995,28,7901.
 49. Percec V, Barboiu B, " "Living" Radical Polymerization of Styrene Initiated by Arenesulfonyl Chlorides and CuI(bpy)_nCl" Macromolecules 1995,28,7970.
 50. Matyjaszewski K, Jo S M, Paik H J, Shipp D A, "An Investigation into the CuX/2,2'-Bipyridine (X = Br or Cl) Mediated Atom Transfer Radical Polymerization of Acrylonitrile" Macromolecules 1999,32,6431.
 51. Davis K, Paik H J, Matyjaszewski K, "Kinetic Investigation of the Atom Transfer Radical Polymerization of Methyl Acrylate" Macromolecules 1999,32,1767.
 52. Grimaud T, Matyjaszewski K, "Controlled/"Living" Radical Polymerization of Methyl Methacrylate by Atom Transfer Radical Polymerization" Macromolecules 1997,30,2216.
 53. Kotani Y, Kato M, Kamigaito M, Sawamoto M, "Living Radical Polymerization of Alkyl Methacrylates with Ruthenium Complex and Synthesis of Their Block Copolymers" Macromolecules 1996,29,6979.
 54. Granel C, Dubois P, Jérôme R, Teyssié P, "Controlled Radical Polymerization of Methacrylic Monomers in the Presence of a

- Bis(ortho-chelated) Arylnickel(II) Complex and Different Activated Alkyl Halides" *Macromolecules* 1996,29,8576.
55. Louie J, Grubbs R H, "Highly active iron imidazolyidene catalysts for atom transfer radical polymerization." *Chem. Commun.* 2000,1479.
56. Pecec V, Barbois B, Neumann A, Ronda J C, Zhao M, "Metal-Catalyzed "Living" Radical Polymerization of Styrene Initiated with Arenesulfonyl Chlorides. From Heterogeneous to Homogeneous Catalysis" *Macromolecules* 1996,29,3665.
57. Patten T E, Matyjaszewski K, "Copper(I)-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerization" *Acc. Chem. Res.* 1999,32,895.
58. Cassebras M, Pascual S, Polton A, Tardi M, Vairon J P, "Synthesis of di- and triblock copolymers of styrene and butyl acrylate by controlled atom transfer radical polymerization" *Macromol. Rapid Commun.* 1999,20,261.
59. Miller P J, Matyjaszewski K, "Atom Transfer Radical Polymerization of (Meth)acrylates from Poly(dimethylsiloxane) Macroinitiators" *Macromolecules* 1999,32,8760.
60. Yinghua M, Yiqing T, Norman C B, and Steven P A, "Well-Defined Biocompatible Block Copolymers via Atom Transfer Radical Polymerization of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine in Protic Media" *Macromolecules* 2003,36,3475.
61. Kalyanasundaram K, Thomas J K, "Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems" *J. Am. Chem. Soc.* 1977 99,2039.
62. Wihelm M, Zhao C L, Wang Y, Xu R, Winnik M A, Mura J L, Riess G, Croucher M D, "Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study" *Macromolecules* 1991,24,1033.
63. Nagarajan R, Ganesh K, "Block copolymer self-assembly in selective solvents: Spherical micelles with segregated cores" *J. Chem. Phys.* 1989,90,5843