

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

類磷脂質高分子團聯共聚物之製備與其在癌症治療與組織
修復之應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2213-E-009-065-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立交通大學應用化學研究所

計畫主持人：莊祚敏

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 12 月 14 日

一、研究目的

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。

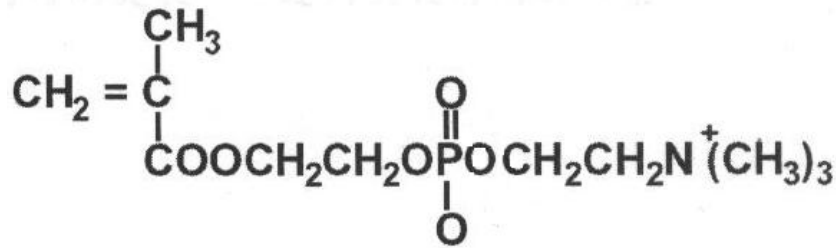


圖 1-3. MPC 單體之結構式

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【1】；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【2-3】。

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。

二、結果與討論

2.1 合成 PLA-b-PMPC 兩團聯共聚物

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。

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。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。表 2-1 列出每個高分子不同親疏水鏈段的比例及其分子量，其 $^1\text{H-NMR}$ 光譜如圖 2-1 所示。

表 2-1. PLA-PMPC 之性質分析

Polymer code	Feed molar ratio(LA/MPC)	Molar composition(L A/MPC)	$\overline{DP}_{\text{PLA}}$	$\overline{DP}_{\text{PMPC}}$	\overline{Mn}^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 $^1\text{H-NMR}$ 所計算出 ^b 由 GPC 所檢測出

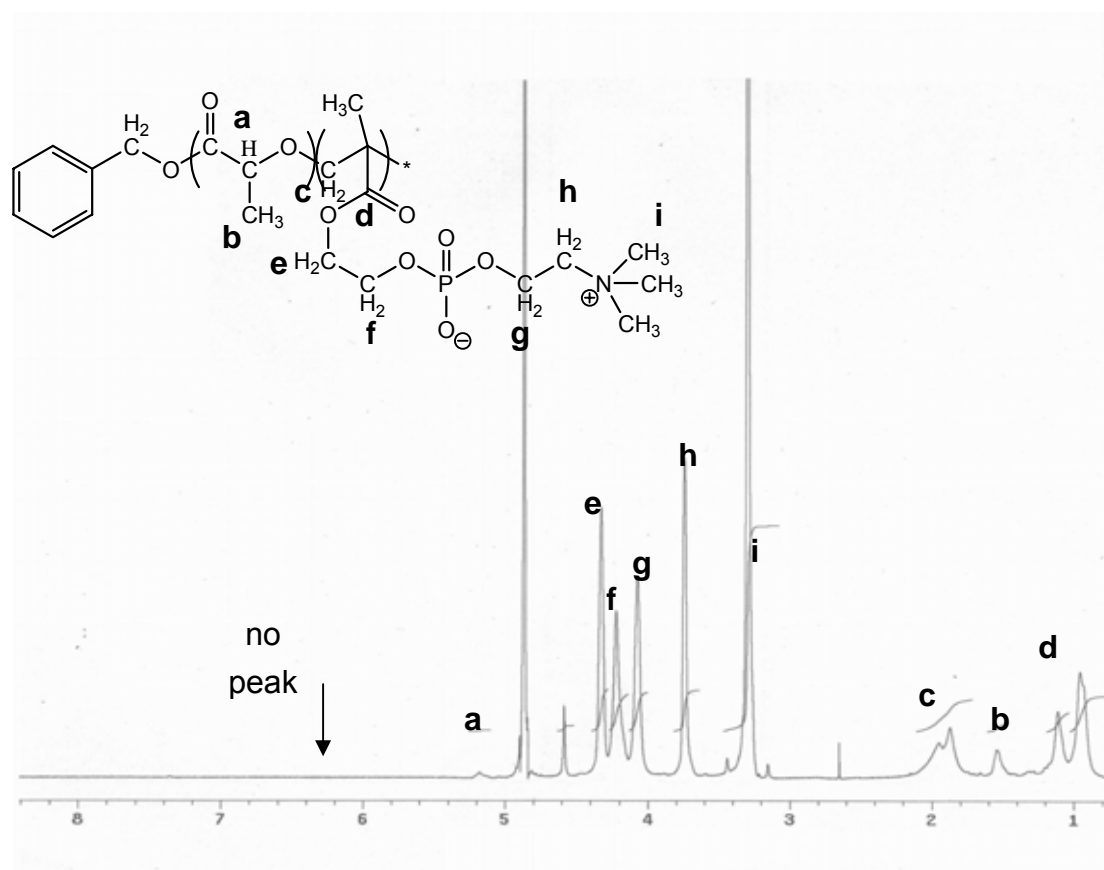


圖 2-1. PLA-PMPC 雙團聯共聚物之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜

2.2 粒徑與界面電位分析

2.2.1 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，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，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。表 2-2 為不同組成 PLA-PMPC 與粒徑大小的關係。

圖 2-2 為 PLA-PMPC 高分子形成微胞前後之 $^1\text{H-NMR}$ 。將製備好的微胞懸浮於 D_2O 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 2-3 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。

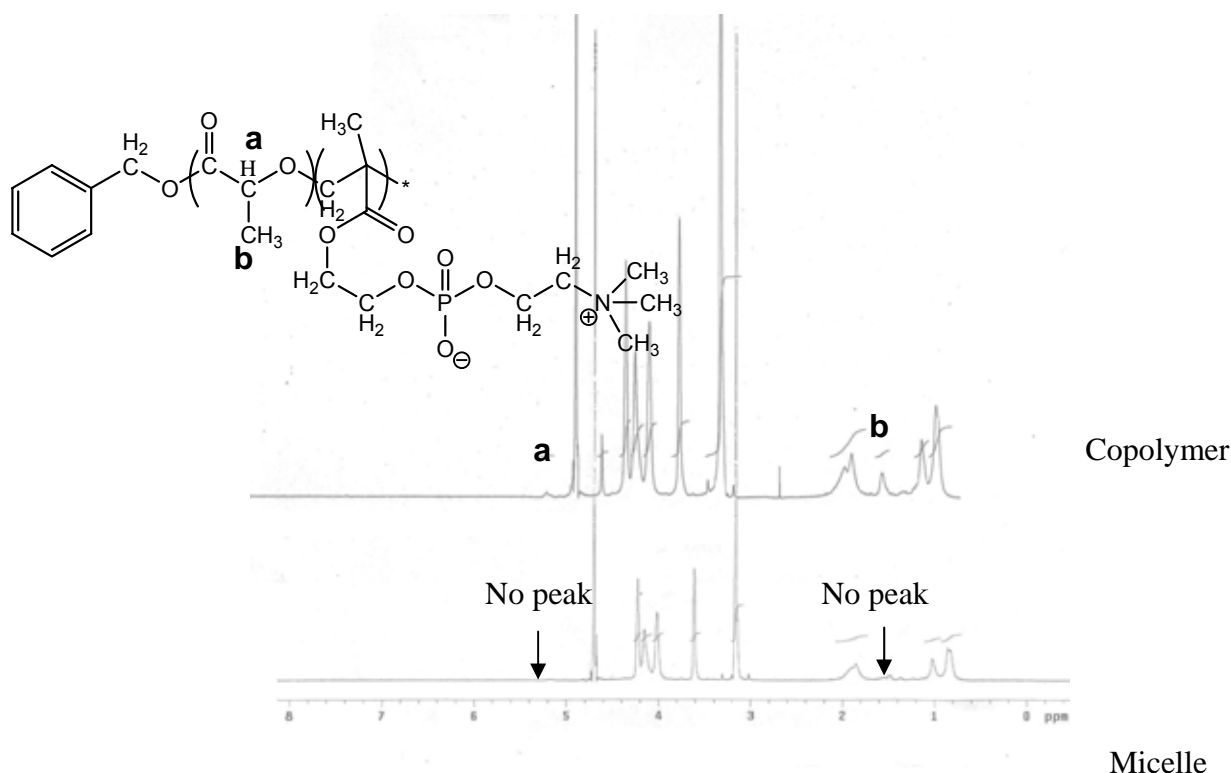


圖 2-2. PLA-PMPC 製備微胞前後 $^1\text{H-NMR}$ 光譜之差異

表 2-2. 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

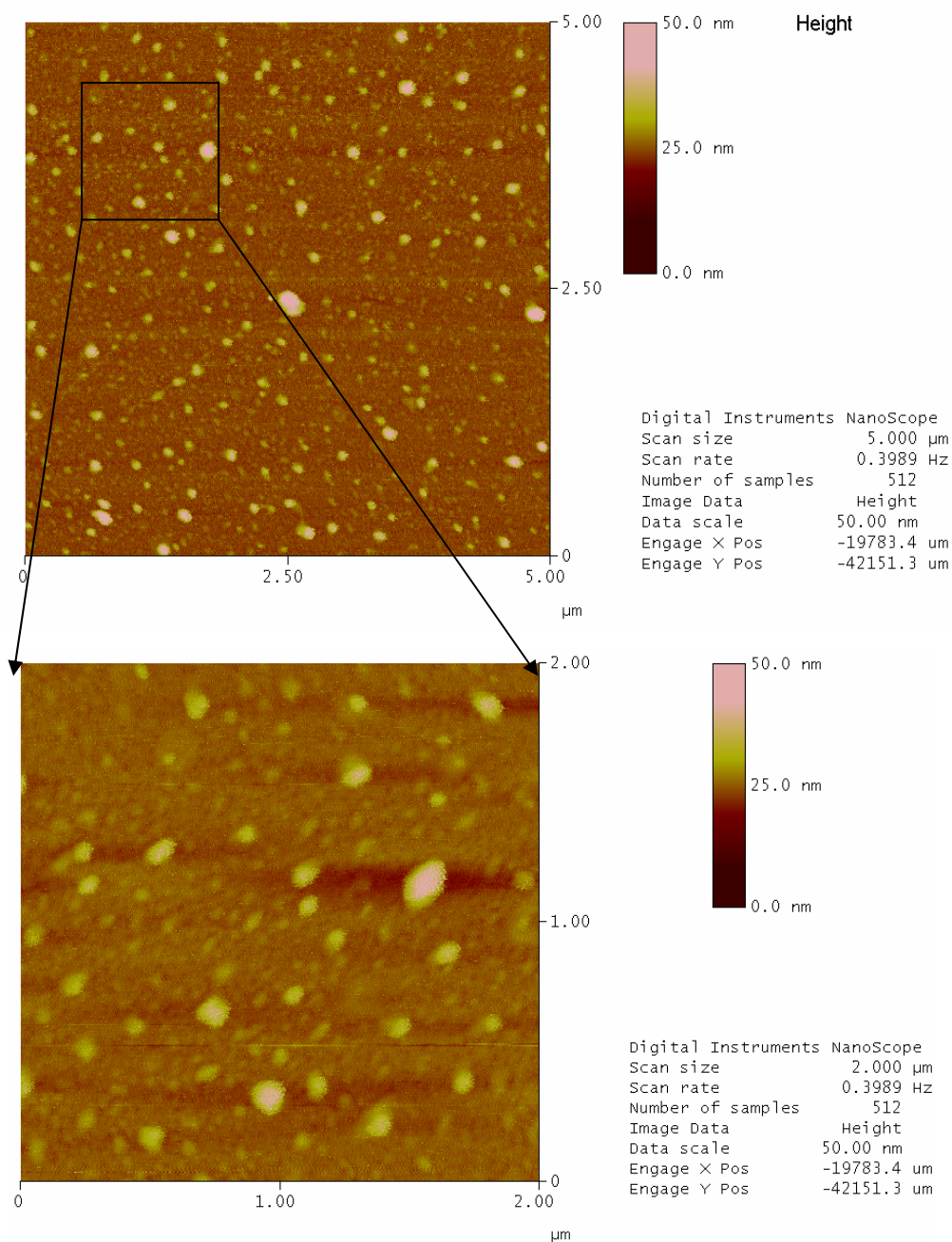


圖 2-3. PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 高分子微胞之 AFM 圖

2.2.2 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 2-4 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。

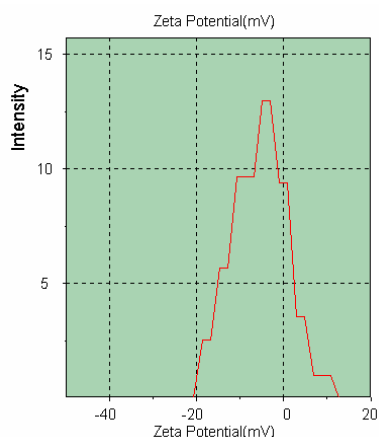
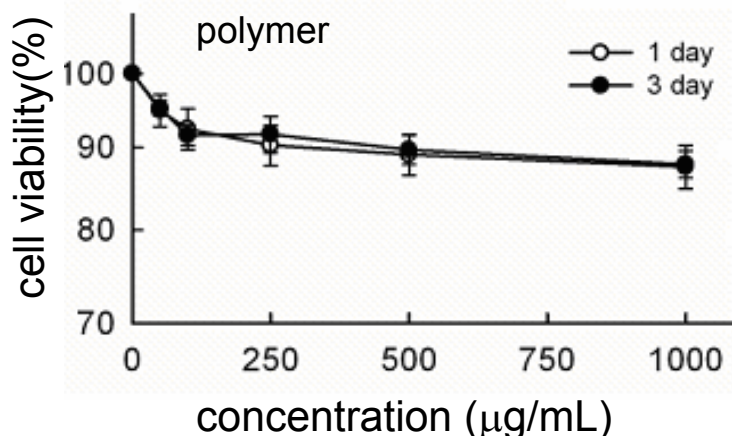


圖 2-4. PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 微胞之界面電位圖

2.3 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 2-5 所示，粒徑分布較小的高分子 PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 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 2-6 為 PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 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。



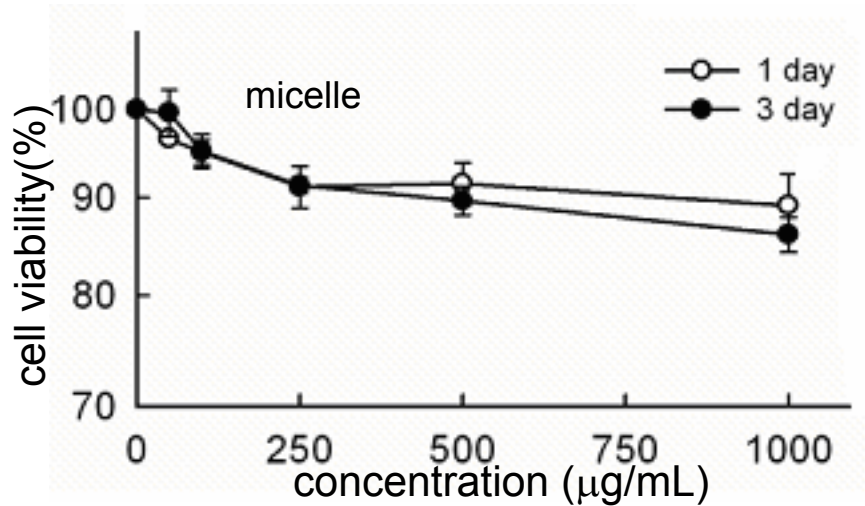


圖 2-5. PLA₃₀-PMPC₁₅₀ (a)高分子與(b)微胞在各種濃度下與 HFW 正常人類纖維母細胞培養 1 天與 3 天之細胞存活率(n=6)

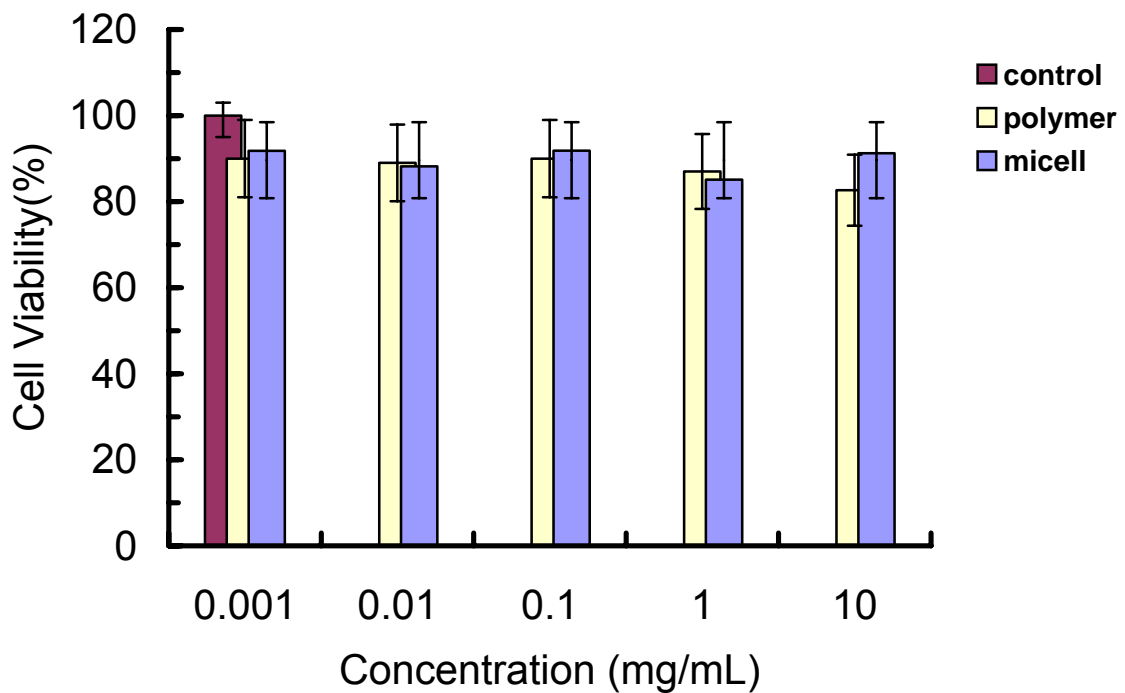


圖 2-6. PLA₂₆-PMPC₁₀₄ 高分子與微胞在各種濃度下與 Hela 人類子宮頸癌細胞培養 24 小時之細胞存活率(n=6)

2.4 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 2-7)，主要作用機制是特過共價結合插入 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。如表 2-3 所示，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。

表 2-3. 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 x 100%

圖 2-8 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。

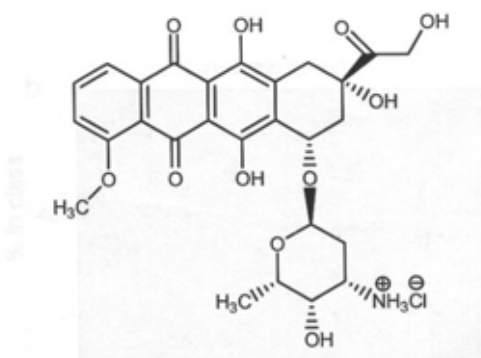


圖 2-7. Doxorubicin hydrochloride 之化學結構

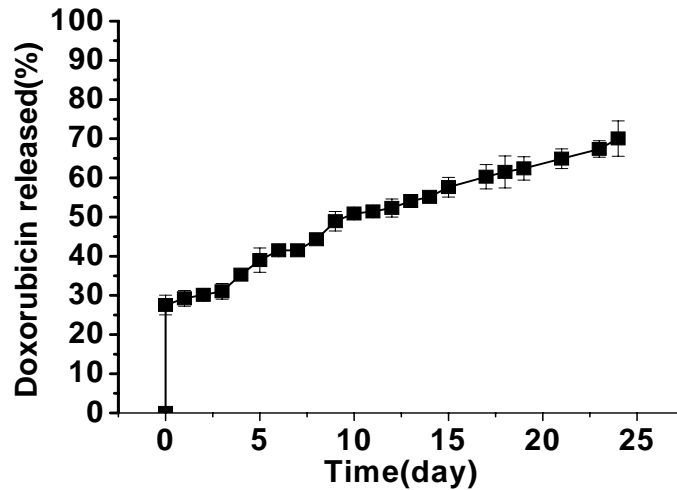


圖 2-8. 藥物微胞在 pH7.4 緩衝溶液下之體外釋放模擬

2.5 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 2-9，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 $1 \mu\text{g/mL}$ 以外，細胞幾乎都死亡。而藥物微胞在濃度 $100 \mu\text{g/mL}$ 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 $10 \mu\text{g/mL}$ 以及 $100 \mu\text{g/mL}$ 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。

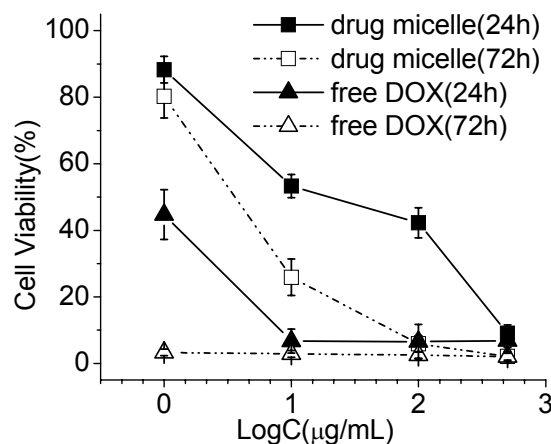


圖 2-9. DOX 與藥物微胞在不同濃度與不同時間下對 HeLa 人類子宮頸癌細胞的生長抑制效果(n=6)

三、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。

四、參考文獻

1. P. Ehrlich, Collected study on immunology, John Wiley, New York, pp.441 (1906).
2. C. J. T. Hoes, J. Grootoink, 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