

普魯蘭多糖接枝共聚物作為藥物載體的研究進展

黃麗萍, 涂家生*

(中國藥科大學藥劑學教研室, 南京 210009)

摘要 接枝共聚改性是提高普魯蘭多糖性能的一种常用方法。通过改性修饰,能够扩展其应用范围,发挥产业化优势。本文从共聚材料的种类、普魯蘭多糖接枝共聚物的类型等角度,分别介绍了近年来作为药物载体的接枝改性普魯蘭多糖共聚物合成及在药物释放系统中的应用,对该领域未来的发展方向进行了展望,对产业化应用中应注意的问题提出了建议。

关键词 普魯蘭多糖; 共聚物; 接枝; 药物释放; 进展

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0488-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150417

Advances of the graft copolymers of pullulan as pharmaceutical carriers

HUANG Liping, TU Jiasheng*

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Graft copolymerization is one of the most effective methods to improve the performance of pullulan and extend its applications. This paper attempts to review the recent progresses in the preparation and application of graft copolymers of pullulan as pharmaceutical carriers from different synthesized polymers and the properties of graft copolymers of pullulan. The problems of pullulan based graft copolymers in drug release system are expounded, and the future development in this field direction is presented.

Key words pullulan; copolymer; graft; drug release; advances

接枝共聚是指通过化学反应,在大分子的主链上通过化学键结合适当的支链或功能性侧基,形成的产物称作接枝共聚物。通过共聚,可将两种性质不同的聚合物接枝在一起,形成性能特殊的接枝物。因此,聚合物的接枝改性,已成为扩大聚合物应用领域、改善高分子材料性能的一种简单又行之有效的方法。接枝法中接枝点和支链的产生方式可分为下列3类:长出支链(graft from)、嫁接上支链(graft onto)以及大分子单体共聚嫁接(graft through)。

普魯蘭多糖是一种由出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)发酵得到的单一胞外水溶性多糖,其结构为3个葡萄糖单元通过 α -1,4糖苷键缩合而成的麦芽三糖经 α -1,6糖苷键聚合得到的中性线性分子。普魯蘭多糖是一种白色至类白色的粉末,无嗅无味、无毒、可食用。其水溶液黏度较低,不受

温度、pH、金属离子等的影响^[1]。相对分子质量约 $4.8 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^6$,具有良好的成膜性、黏附性、酶降解性、吸水性及抗氧化性。由于普魯蘭多糖良好的水溶性、结构的灵活性、可生物降解性以及生物相容性等特点,可作为药物载体控制药物的释放^[2-3]。近年来,为了扩展普魯蘭多糖在药物释放系统中的应用范围,关于普魯蘭多糖的改性研究报告也越来越多,最常见的方法就是共聚改性,其中接枝共聚是一种比较常见的共聚改性手段。本文介绍了近年来普魯蘭多糖接枝共聚物合成及其在药物释放系统上的应用。

1 疏水性/两亲性接枝共聚物

普魯蘭多糖具有良好的水溶性,但其用于药物载体领域时,通常需要改善其疏水性。普魯蘭多糖

分子链上有大量的羟基,可通过酯化、醚化、胺酯化、羧甲基化等多种反应将疏水性的支链连接到主链上,形成疏水化改性的普鲁兰多糖^[4]或者具有两亲性的接枝共聚物^[5]。Junia 等^[6]利用四甲基哌啶氧化物(TEMPO)和 NaOCl/NaBr 作为氧化剂将普鲁兰多糖氧化成水溶性更好的 6-羧基普鲁兰(CO_2HPull),然后将四丁基氯化铵(TBA)与 6-羧基普鲁兰反应得到 6-羧基普鲁兰 TBA 盐($\text{CO}_2\text{TBAPull}$),最后通过醚化反应分别将甲基、乙基、丙基、丁基接枝到 CO_2HPull 主干的羟基上,得到了 4 种两亲性的 6-羧基普鲁兰多糖醚。试验分别考察了反应时间,温度等对卤代烷基链取代度的影响。研究发现,所合成的 6-羧基普鲁兰多糖醚几乎在所有溶液中均可自组装形成胶束。在药物传输系统中具有很好的应用前景。Punna 等^[7]通过乙酰化作用将普鲁兰多糖疏水化改性,得到含有羧甲基的普鲁兰多糖(PA),并采用乳剂溶剂挥发法将洛匹那韦(LP)装载入 PA 形成的纳米粒中。研究发现,所形成的载药纳米粒具有粒径小(197 nm),包封率高(75%),单分散性($\text{PDI} < 0.2$)等特点,且药代动力学表明洛匹那韦纳米粒具有一定的淋巴器官靶向性,其口服生物利用度是游离洛匹那韦的 2 倍。Yang 等^[8]通过酯化反应将生物素接枝于疏水化改性的胆甾醇基普鲁兰多糖链上,获得不同取代度的生物素化胆甾醇基普鲁兰多糖(Bio-CHSP)衍生物。Bio-CHSP 材料在水中表现出良好的自聚集特性,其临界聚集浓度(CAC)随生物素取代度的增大而减小,研究表明该载体材料有望成为一种新型抗肿瘤药物的纳米载体。

2 温敏性接枝共聚物

温敏性接枝共聚物是一种刺激响应性的智能材料,被广泛应用于药物控制释放、分离、酶固定化等诸多领域。其中,聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)由于在水溶液中有较低的临界溶液温度,其相变温度接近人体的生理温度,相转变明显且过程可逆,成为近年来研究较多的一类温敏性高分子材料。Gheorghie 等^[9]先将普鲁兰多糖制成微球,然后将具有温敏性质的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酰胺共聚物和具有 pH 敏感性质的琥珀酸酐分别接枝到普鲁兰多糖上,制备了既具有温敏性质又具有 pH 敏感性质的普鲁兰多糖接枝共聚物 NIPAAM-co-

AAm。该共聚物的体积相转变温度(VPTT)接近人的体温,同时以溶菌酶为模型药物,以该共聚物为药物载体,结果发现在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中,当温度高于或低于低临界溶解温度时,溶菌酶的释放均会减少,而当溶液中氯化钠的浓度增加时,溶菌酶的释放速率也相应增加,说明此共聚物是一类理想的可用于控制药物释放的温敏性/pH 敏感性的高分子载体。Mocanu 等^[10]通过高碘酸氧化羧甲基普鲁兰多糖,使普鲁兰多糖主链开环,将邻二羟基基团转化为两个羰基基团,从而与聚醚胺末端的氨基反应,制备了 ED-600 和 ED-2003 为侧链的温敏性接枝共聚物。研究发现,这种共聚物形成的纳米粒子分别能保留酸性药物(双氯芬酸钠:40~80 mg/g)、疏水性药物(α -生育酚:220~350 mg/g)和碱性药物(亚甲蓝:70~125 mg/g),且对药物的释放均具有控释作用。

3 离子型接枝共聚物

离子型聚合物是一类在酸性或碱性介质中可产生解离,形成带正电荷或负电荷的高分子材料,又称“聚电解质”。根据离子电荷的不同又可分为阳离子聚合物、阴离子聚合物以及两性离子聚合物 3 种。离子型聚合物较多用作絮凝剂,但近年来,pH 敏感性离子型智能材料由于可随环境 pH 或离子强度的变化,引起体积的不连续溶胀变化,从而可以起到控制药物的释放作用,故在缓控释药物剂型、免疫隔离细胞移植方面、多肽蛋白给药系统及基因治疗方面得到广泛应用^[11~15]。以普鲁兰多糖为主链的离子型接枝共聚物作为药物载体的研究报道也越来越多。Guo 等^[16]先将尿刊酸的羧基与普鲁兰多糖的羟基反应,得到带羧基侧链的疏水性普鲁兰多糖(URPA),再通过酯键将甲氨蝶呤(MTX)接枝到疏水化改性的普鲁兰多糖主链上,合成了阳离子型聚合前药 MTX-URPA,MTX-URPA 具有两亲性,并通过尿刊酸与 MTX 的疏水化作用形成纳米粒子。由于 URPA 含有阳离子咪唑基团具有 pH 敏感性质,研究发现将康普瑞丁(com-bretastatin A4, CA4)装载入 URPA 纳米粒,在微酸性的环境中 CA4 可被快速的释放;另外研究还发现,URPA 纳米粒对阿霉素具有较高的载药量,可以增加阿霉素在 MCF-7/ADR 细胞中的累积滞留量,并可将阿霉素成功递送到细胞核中。Dulong

等^[17]先通过羧甲基化作用将羧基引入到普鲁兰多糖上,得到羧甲基化的普鲁兰多糖,然后与 1-乙基-[3-(3-二甲基氨基丙基)] 碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行酯化反应,将辛基链接枝到普鲁兰上,合成了具有 pH 敏感性的两亲性阴离子型 HMCMPs 共聚物。研究发现,CMP 水凝胶在水中的膨胀速率与辛基链的取代度呈负相关,同时由于 HMCMPs 共聚物含有阴离子的羧基基团,在酸性环境中可质子化,所形成的凝胶膨胀度在 pH 小于 5 时随溶液 pH 降低而逐渐减小,在 pH 5~8 保持稳定,而当 pH 大于 10 时,凝胶的膨胀度则显著增大。Marieta 等^[18]以过硫酸钾作为氧化还原引发剂,以(3-丙烯酰胺丙基)三甲基氯化铵(APTAC)为单体,通过自由基共聚合作用,将 APTAC 接到普鲁兰多糖主链上,制备了可作为污水处理絮凝剂以及药物传递载体的阳离子化接枝共聚物 Pul-g-pAPTAC。本文对合成的共聚物在作为药物载体方面并未进行深入的研究,但对合成的 3 种 Pul-g-pAPTAC 共聚物的物理化学性质以及抗菌性展开了较全面的研究,发现该共聚物对葡萄球菌具有较明显的抑制作用^[19]。

4 聚酯类接枝共聚物

聚酯类接枝共聚物是一类新型的生物可降解材料,具有良好的热稳定性,机械性能及物理性能,生物相容性等特点,因此用途十分广泛,目前主要同于服装、产业和医疗卫生等领域^[20~22]。在药物载体方面,将聚酯类材料接枝到普鲁兰多糖上,可同时克服两者的缺点,获得功能性更强,用途更广的普鲁兰接枝共聚物。Lizebona 等^[23]将 3 种不同相对分子质量的聚对苯二甲酸乙二醇酯(PEI)接枝于普鲁兰多糖,得到 PPEI 共聚物,然后再将两性离子型的甜菜碱接枝到 PPEI 共聚物上,制备了可作为基因载体的普鲁兰多糖-PEI-甜菜碱共聚物。实验发现,该聚合物比 PEI 具有较低的细胞毒性和较高的血液相容性,并具有较高的转染率。Young 等^[24]利用普鲁兰多糖的亲水性质,将疏水性的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)接枝到普鲁兰多糖主链上,制备了以普鲁兰多糖为亲水外壳,PLGA 为疏水内核的可生物降解的两亲性纳米球递药系统 PuLG。研究发现:随着 PuLG 相对分子质量的增大,药物释放速率降低,并且随着 PLGA 接枝率

的增大,PuLG 的降解速率随之减慢,体内存留时间超过一个月,故得出药物在体内的释放是扩散机制而非降解机制。Seo 等^[25]以普鲁兰多糖作为大分子引发剂,在三乙胺中将丙交酯接枝到普鲁兰多糖上,制备了温敏型自组装的聚(L-丙交酯)-普鲁兰(PLP)纳米凝胶用于抗肿瘤药物的长期释放系统。研究发现,载有阿霉素的 PLP 纳米凝胶具有较高效率的长期药物释放性能,且在相对较高的温度下,在细胞中能促进其内化,从而有效的杀死肿瘤细胞。Tang 等^[26]则采用微波辅助法,用辛酸亚锡为催化剂,使聚 D,L-丙交酯开环聚合接枝于普鲁兰多糖上,制备了聚乳酸-普鲁兰(PL)接枝共聚物,并研究了微波功率,投料比等对丙交酯取代度的影响。研究表明 PL 共聚物制备的载药纳米粒可增大姜黄素的溶解度。

5 聚氨基酸类共聚物

聚氨基酸类共聚物是一类新型的生物可降解高分子材料。由于聚氨基酸在降解过程中能释放出天然的小分子氨基酸,因此具有良好的生物相容性,容易被机体吸收和代谢,故该类材料在药物载体及药物控制释放等方面具有很好的应用前景^[27]。Park 等^[28]通过氧化开环聚合反应(ROP)将聚 Z-L-赖氨酸接枝于普鲁兰多糖上,合成了 PULZPLL 接枝共聚物,并对 PULZPLL 纳米粒作为安全的基因载体进行了相关研究。Scomparin 等^[29]用高碘酸钠为引发剂将普鲁兰多糖主链氧化开环,得到含有两个羰基的氧化普鲁兰,再通过与氧化普鲁兰的羰基反应依次将胱氨酸(Cyst)和二氨基聚乙二醇[PEG(NH₂)₂]接枝到普鲁兰多糖主链上,制备了可作为抗肿瘤药物载体的接枝共聚物(NH₂PEG)-Pull-Cyst。研究中以阿霉素为模型药物,通过一个 pH 敏感的腙键将阿霉素连在半胱氨酸支链上,并将叶酸受体接枝到 PEG 支链的氨基上,从而得到了两种阿霉素-普鲁兰多糖的生物大分子聚合前药(NH₂PEG)-Pull-(Cyst-Dox)和(FA-PEG)-Pull-(Cyst-Dox)。两种生物大分子聚合前药均能自组装成粒径为 100~150 nm 的 pH 敏感的纳米粒药物递送系统,试验发现,两者的释药性能相似,即在 pH 7.4 的缓冲液和血浆中 3 d 释放的阿霉素低于 20%,而在 pH 5.5 的溶液中 40 h 内即可将药物全部释放。另外发现,两种阿霉素-普鲁兰生物

聚合前药均具有被动肿瘤靶向作用,且由叶酸受体介导的共聚物能增强肿瘤靶向效率,对细胞选择性摄取具有一定的影响。Yang 等^[30]也通过原子转移自由基聚合(ATRP)和开环聚合(ROP)结合的方法,将胱氨酸与聚甲基丙烯酸缩水甘油酯(PGMA)通过二硫键接枝到普鲁兰多糖上,设计合成了具有阳离子型侧链和非离子型普鲁兰多糖主链的肝靶向基因载体共聚物PuPGEA。实验表明,PuPGEA 具有较高的基因转染率和良好的血液相容性,且 PuPGEA 载体在 HepG2 细胞系中比 HeLa 细胞系中有更高的细胞摄取率。

6 侧基功能化的共聚物

为了获得疏水性和靶向性等更好的生物材料,利用侧基连接各种功能分子改性普鲁兰多糖的研究也日益受到重视。Wang 等^[31]将琥珀酸酐开环聚合接枝到普鲁兰多糖上,形成带有羧基侧链的 P-COOH 聚合物,然后将低相对分子质量文化聚乙烯亚胺(PEI, 相对分子质量 1 000)氨基与 P-COOH 反应,合成了新型基因载体 P-PEI, 并同时将叶酸(FA)导入到 P-PEI 载体上,形成了具有靶向性的基因载体 P-PEI-FA 接枝共聚物。实验发现,载体 P-PEI-FA 在体外可以通过静电相互作用稳定结合 pDNA, 并能有效抑制 DNA 水解酶及血清成分对 pDNA 的降解。同时评价其细胞毒性和作为基因载体对 HeLa 细胞的转染效率。随后,Wang 等^[32]又利用 4-二甲氨基吡啶(DMAP)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)作为催化剂,将 α -生育酚琥珀酸酯(α -TOS)连接到普鲁兰多糖上合成了两亲性聚合物 PUTC。通过改变反应液中 α -TOS 与普鲁兰多糖的物质的量比得到 3 种取代度不同的产物 PUTC1、PUTC2 和 PUTC3, 可用作抗癌药物的载体。且研究发现,PUCT 具有一定的 pH 敏感性和肝靶向性。

7 结语

普鲁兰多糖是一类天然水溶性好的均聚多糖,具有无毒、可塑性强、成膜性好、可生物降解等优点,广泛应用于食品、医药、石油、建材等工业中,其良好的生物相容性以及易于改性的特点也使其在药物载体领域备受关注。通过接枝共聚改性技术,不仅能明显改善普鲁兰多糖的性能,也能极大地拓

宽其应用领域,有着广阔的研究和应用前景。目前,国内外在普鲁兰多糖接枝共聚改性方面已经取得了相当多的成果,特别引人关注的是这些载体材料表现出的良好的生物安全性,有望成为一类优良的药物载体材料。与此同时,也要注意到这些材料制备中的成本问题,今后将尝试用功能性的新材料和新技术对普鲁兰多糖进行改性,在努力提高普鲁兰材料使用性能的同时,也应注重普鲁兰多糖在应用上的研究和开发,同时还要考虑降低生产成本,扩大应用范围,在成本及应用方面凸显优势,才有利于普鲁兰多糖材料在医药领域的推广以及在产业化中的应用。

参考文献

- [1] Kimoto T,Shibuya T,Shiobara S. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 1997, **35**(3/4):323-329.
- [2] Vipul DP,Jani GK,Khanda SM . Pullulan; an exopolysaccharide and its various applications[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, **95**(1): 540-549.
- [3] Kirill IS. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan [J]. *Carbohydr Res*, 2004, **339**(3):447-460.
- [4] Masako FK, Masato SO, Asako S, et al. Cholestryl group-and acryloyl group-bearing pullulan nanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(30):7613-7620.
- [5] Kazunari A, Seiichi K, Shozo S, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin [J]. *J Control Release*, 1998, **54**(3):313-320.
- [6] Junia MP,Michelle M,Kevin JE. Synthesis of amphiphilic 6-carboxypullulan ethers[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **100**:65-73.
- [7] Punna RR,Rahul V,Jagadeesh B,et al. Modified pullulan nanoparticles for oral delivery of lopinavir: Formulation and pharmacokinetic evaluation[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **110**:320-328.
- [8] Yang WZ,Wang MM,Ma LL,et al. Synthesis and characterization of biotin modified cholestryl pullulan as a novel anticancer drug carrier[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **99**:720-727.
- [9] Gheorghe F,Marieta C,Paolo A. Preparation and characterization of pH-and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs[J]. *Biomaterials*, 2008, **29**(18):2767-2775.
- [10] Mocanu G,Nichifor M,Picton L,et al. Preparation and characterization of anionic pullulan thermoassociative nanoparticles for drug delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **111**:892-900.
- [11] Luminita G,Marieta C,Gheorghe F. Novel biodegradable floccu-

- lanting agents based on pullulan [J]. *J Hazard Mater*, 2010, **181** (1/2/3):351–358.
- [12] Rekha MR, Chandra P, Sharma H. Pullulan-polyethyleneimine conjugates for liver cell gene delivery; *in vitro* evaluation of cellular uptake, intracellular trafficking and transfection efficiency [J]. *Acta Biomater*, 2011, **7**(1):370–379.
- [13] Louiza BT, Jacek L, Kwang SK, et al. Gene delivery by pullulan derivatives in brain capillary endothelial cells for protein secretion [J]. *J Control Release*, 2011, **151**(1):45–50.
- [14] Hu Y, Wang JS, Zhang H, et al. Synthesis and characterization of monodispersed P(St-co-DMAEMA) nanoparticles as pH-sensitive drug delivery system [J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, **45**:1–7.
- [15] Yan HX, Jin B, Gao SH, et al. Equilibrium swelling and electrochemistry of polyampholytic pH-sensitive hydrogel [J]. *Int J Solids Struct*, 2014, **51**(23/24):4149–4156.
- [16] Guo H, Liu YY, Wang Y, et al. pH-sensitive pullulan-based nanoparticle carrier for adriamycin to overcome drug-resistance of cancer cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **111**:908–917.
- [17] Dulong V, Mocanu G, Cerf DL. A novel amphiphilic pH-sensitive hydrogel based on pullulan [J]. *Colloid Polym Sci*, 2007, **285**(10):1085–1091.
- [18] Marieta C, Ionut M, Ionela O, et al. Studies on graft copolymerization of 3-acrylamidopropyl trimethylammonium chloride on pullulan [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, **84**(3):926–932.
- [19] Anca GG, Marieta C, Vasile CG, et al. Studies on physico-chemical and antibacterial properties of graftedpullulans solutions [J]. *React Funct Polym*, 2013, **73**(9):1249–1254.
- [20] Cohn D, Lando G, Sosnik A. PEO-PPO-PEO-based poly(ether ester urethane)s as degradable reverse thermo-responsive multiblock copolymers [J]. *Biomaterials*, 2006, **27**(9):1718–1727.
- [21] Paquet O, Krouit M, Bras J, et al. Surface modification of cellulose by PCL grafts [J]. *Acta Mater*, 2010, **58**(3):792–801.
- [22] Guo YZ, Wang XH, Shen ZG, et al. Preparation of cellulose-graft-poly(ϵ -caprolactone) nanomicelles by homogeneous ROP in ionic liquid [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, **92**(1):77–83.
- [23] Lizebona AA, Rekh MR. Betaine conjugated cationic pullulan as effective gene carrier [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, **72**:819–826.
- [24] Young IJ, Hee SN, Jong SO, et al. Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(dl-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan [J]. *Int J Pharm*, 2006, **322**(1/2):154–160.
- [25] Seo S, Lee CS, Jung YS, et al. Thermo-sensitivity and triggered drug release of polysaccharide nanogels derived from pullulan-g-poly(1-lactide) copolymers [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, **87**(2):1105–1111.
- [26] Tang XJ, Huang J, Xu LY, et al. Microwave-assisted rapid synthesis, characterization and application of poly(d,L-lactide)-graft-pullulan [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **107**:7–15.
- [27] Li JB, Ren J. Progress of the graft copolymers of poly(lactic acid) [J]. *Mater Rev* (材料报道), 2010, **24**(12):86–90.
- [28] Park JS, Park JK, Nam JP, et al. Preparation of pullulan-g-poly(L-lysine) and its evaluation as a gene carrier [J]. *Macromol Res*, 2012, **20**(7):667–672.
- [29] Scomparin A, Salmaso S, Bersani S, et al. Novel folated and non-folated pullulan bioconjugates for anticancer drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, **42**(5):547–558.
- [30] Yang XC, Niub YL, Zhao NN, et al. A biocleavable pullulan-based vector via ATRP for liver cell-targeting gene delivery [J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(12):3873–3884.
- [31] Wang JY, Dou BR, Bao YM. Efficient targeted pDNA/siRNA delivery with folate-low-molecular-weight polyethyleneimine-modified pullulan as non-viral carrier [J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, **34**:98–109.
- [32] Wang JY, Cui S, Bao YM, et al. Tocopheryl pullulan-based self-assembling nanomicelles for anti-cancer drug delivery [J]. *Mater Sci Eng C*, 2014, **43**:614–621.