DOI: 10.16016/j.1000-5404.202001169

自组装法构建的疏水药物新型口服递送系统及其体内外评价

赵 阳,刘仁凤,窦 寅,郭嘉伟,张建祥 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系药剂学教研室

[**摘要**] **目的** 新设计并合成一种亲水性天冬氨酸多肽衍生物聚(异丙基)天冬酰胺(PIPAA),考察 PIPAA 能否有效负载含羧基疏水药物形成 pH 响应性微球,增加其在肠道 pH 条件下的溶出,并提高其口服生物利用度。**方法** 以浓磷酸催化 *D*,*L*-天冬氨酸在高温条件下聚合成聚琥珀酰亚胺(PSI),并用异丙胺氨解 PSI 得到 PIPAA;PSI 和 PIPAA 结构经红外(FT-IR)和核磁(^{1}H NMR)进行谱学表征。采用透析法制备负载吲哚美辛(IND)的 IND/PIPAA 微球,并对其形态、粒径、载药量和包封率进行表征;利用 FT-IR、^{1}H NMR、差示扫描量热法(DSC)和 X 射线衍射法(XRD)分析 IND 与 PIPAA 分子间的相互作用及 IND 分子在微球中的存在形式;体外评价了微球的 pH 响应性释药行为;灌胃给予大鼠载药微球后,高效液相色谱(HPLC)法测定不同时间点血样中的 IND 含量;利用角叉菜胶诱导的大鼠足跖肿胀模型评价 IND/PIPAA 微球的抗炎效果。**结果** FT-IR 和^{1}H NMR 图谱证明 PSI 和 PIPAA 的成功合成。IND 和 PIPAA 可以通过静电力、氢键和疏水作用自组装形成形态规整、粒径均一的载药微球,其中 IND 载药量和载药效率高,且 IND 以无定型形式存在于微球中。该微球在体外表现出良好的 pH 响应性释药行为。大鼠体内药动学研究表明 IND/PIPAA 微球组的药时曲线下面积(AUC)为 IND 组的 2.4 倍。在急性足跖肿胀模型中,与生理盐水和 IND 相比,IND/PIPAA 微球可以显著减轻足跖部位的炎症程度($P=0.046$,$P=0.002$)。**结论** 含羧基小分子疏水药物 IND 与亲水性天冬氨酸多肽衍生物 PIPAA 可以通过多重非共价键作用自组装形成形态规整、粒径均一的 IND/PIPAA 微球,该递送系统可有效增加 IND 在肠道环境的溶出速率,并提高其口服生物利用度和疗效。

[**关键词**] 聚(异丙基)天冬酰胺;自组装;肠道靶向;难溶性药物;pH 响应性

[**中图法分类号**] R914.2; R944.9; R965 [**文献标志码**] A

In vitro and *in vivo* evaluation of a novel self-assembled oral delivery system for hydrophobic drugs

ZHAO Yang, LIU Renfeng, DOU Yin, GUO Jiawei, ZHANG Jianxiang Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To design and synthesize a new hydrophilic aspartic acid peptide derivative, poly(isopropyl-*D*,*L*-aspartamide) (PIPAA), and investigate its efficiency to self-assemble with carboxy-containing therapeutics into pH-sensitive microspheres to enhance the dissolution and oral bioavailability of hydrophobic drugs. **Methods** With phosphoric acid as the catalyst, *D*,*L*-aspartic acid was polymerized into polysuccinimide (PSI) at 180 ℃ followed by ring-opening reaction with isopropylamine to form PIPAA. The successful synthesis of PSI and PIPAA was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81971727);陆军军医大学杰青人才库项目(2017 年度)

[**通信作者**] 张建祥,E-mail: jxzhang1980@gmail.com

and ^{1}H NMR spectroscopy. The morphology, size, drug loading content and loading efficiency of IND/PIPAA microspheres were characterized. FT-IR and ^{1}H NMR spectroscopy were used to determine non-covalent forces between IND and PIPAA in IND/PIPAA microspheres, and the existence form of IND in IND/PIPAA microspheres was examined by differential scanning calorimetry (DSC) and Xray diffraction (XRD) measurement. We carried out *in vitro* tests to investigate pH-responsive release profiles of IND/PIPAA microspheres. We also examined plasma concentrations of IND using high-performance liquid chromatogrpahy (HPLC) in rats after oral administration of IND/PIPAA microspheres, and evaluated the anti-inflammatory efficacy of IND/PIPAA microspheres in rats with carrageen-induced paw edema. **Results** FT-IR and ^{1}H NMR spectra demonstrated successful synthsis of PSI and PIPAA. Morphological observation and size determination revealed a spherical shape and uniform particle size of the IND/PIPAA microspheres, which were self-assembled through electrostatic force, hydrogen bonding, and hydrophobic interactions between IND and PIPAA as confimred by FT-IR and ^{1}H NMR spectra. DSC and XRD measurements indicated that IND molecules entrapped in the microspheres were essentially amorphous. While drug release was almost completely suppressed at a gastric pH level, rapid IND release from the microspheres in vitro was observed at pH 7.4. After oral administration in rats, IND/PIPAA microspheres, as compard with raw IND, obviously enhanced plasma concentrations of IND with a 2.4-fold higher AUC. In rats with carrageen-induced acute inflammation in the paws, IND/PIPAA microspheres exhibited much stronger anti-inflammatory activity than saline ($P=0.046$) and raw IND ($P=0.002$). **Conclusion** The carboxyl-containing hydrophobic drug IND and the hydrophilic aspartic acid peptide derivative PIPAA can self-assemble into well-defined microspheres with a uniform size to serve as an efficient drug delivery system that increases intestinal dissolution of IND to enhance its oral bioavailability and efficacy.

[**Key words**] poly(isopropyl-*D*,*L*-aspartamide); self-assembly; intestinal targeting; insoluble drugs; pH-sensitivity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81971727) and the Program for Distinguished Young Scholars of Army Medical Unirersity (2017). Corresponding author: ZHANG Jianxiang. E-mail: jxzhang1980@gmail.com

现代医学治疗时,常根据疾病的病理生理学特点、患者的年龄和疾病状态以及患者用药依从性等因素来确定合适的给药途径。常见的给药途径有口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、直肠给药、经皮给药等;其中口服给药凭借其安全简便、经济有效、患者依从性好等优点,成为临床上最常用的给药途径[1-3]。然而,目前临床使用的大量小分子药物的溶解度极低,导致其口服生物利用度较低,最终影响疗效,故难以实现口服应用。提高难溶性药物的溶出是改善其口服生物利用度的重要手段。药剂学领域,常把难溶性药物制成固体分散体、微球、纳米粒等不同递送系统,以解决该问题;而设计并开发高效的口服微粒是当前先进药物递送系统研发的热点和前沿[4-5]。大量研究表明,微球递送系统可以显著增加难溶性药物的溶出速率,进而大大提高其口服生物利用度[6]。然而,胃肠道的生理和物理屏障是阻碍微粒递送系统吸收的一大难题,因为这些屏障会明显影响微粒中所负载药物的口服吸收,导致血药浓度无法满足治疗需要[7-8]。广泛的研究表明,通过调整微球的理化性质,如粒径[9]、载体材料性质(pH 响应性、生物可降解性以及黏膜粘附性等)[10-11]、表面物理化学特性(如表面疏水性和电荷)[12],微球表面修饰靶向基团[13-15]和仿生化修饰微球[15-18],都可以改善微球释药系统的口服吸收。在生物药剂学分类系统中,大部分疏水药物属于 BCSⅡ类。因此,递送疏水药物的微粒系统只需增加药物在吸收部位的溶出即可提高其口服生物利用度。基于这一考虑,我们课题组尝试构建可在小肠部位选择性释放疏水药物的 pH 响应性微球递送系统。

寡聚天冬氨酸是一种氨基酸均聚物,其在生物体内可以被酶解成天冬氨酸和小肽,进而被清除或作为营养物质重新利用;因此,天冬氨酸多肽具有良好的生物可降解性和相容性,常用作构建不同递送系统的载

体材料[19]。未开环的聚天冬氨酸即聚琥珀酰亚胺是一种活性较强的聚酰亚胺,很容易被氨解开环生成胺基取代的聚天冬酰胺[20]。利用聚酰亚胺这一特殊的开环活性,结合课题组前期研究[6],本研究拟通过异丙胺氨解聚琥珀酰亚胺合成载体材料,并考察其与羧基药物的自组装特性和载药性能。

本研究以疏水性药物吲哚美辛为模型药物,选用亲水性天冬氨酸多肽衍生物(PIPAA)作为载体材料,通过其与羧基小分子药物间的多重非共价键作用进行自组装,以构建 pH 响应性微球,并探讨其对疏水药物口服生物利用度和疗效的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

D,*L*-天冬氨酸(D1514002)、熊去氧胆酸(UDCA,E1715044)购自 Aladdin 公司;吲哚美辛(IND,BCBK0293V)、异丙胺、甲灭酸(Mef)和角叉菜胶购自 Sigma 公司;鲁米诺(L810O01)购自 J&K Scientific 公司;Eudragit S 100(S100)来源于 Evonik Industries 公司;聚乙烯醇(PVA,L780R17)购自 Acros Organics 公司。

1.2 方法

1.2.1 聚(异丙基)天冬酰胺(PIPAA)的合成及表征

20 g *D*,*L*-天冬氨酸置于 50 mL 圆底烧瓶中,其中加 85%磷酸 7.5 mL 溶解,180 ℃油浴加热回流、常压搅拌 4 h。用适量的二甲基甲酰胺(DMF)溶解反应产物,过滤除去不溶物;将得到的滤液逐渐加入到大量的去离子水中沉淀产物,抽滤后用去离子水洗涤至中性,最终得到的固体于 60 ℃真空烘干,得到聚琥珀酰亚胺(PSI)。然后,将 5 mL 异丙胺(CaH_2 除水)和 260 mg 干燥的 PSI 分别溶解于 5 mL DMF 中,将 PSI 的 DMF 溶液缓慢加入到溶有异丙胺的 DMF 溶液中,常温常压下搅拌 12 h;之后将反应液转移至透析袋中,于去离子水中透析 72 h,透析液离心后取上清冻干得终产物 PIPAA。

中间产物 PSI 和终产物 PIPAA 分别溶解于氘代二甲基亚砜(DMSO-d_6)和 D_2O 后,于 Avance-500 Spectrometer 型核磁共振仪上进行^{1}H NMR 光谱分析。同时,取 *D*,*L*-天冬氨酸、PSI 和 PIPAA 粉末于 Perkin Elmer Spectrum 100 型傅里叶变换红外光谱仪上进行红外光谱分析。

1.2.2 IND/PIPAA 微球的制备及表征 按照不同的质量比(IND∶PIPAA=10∶10、15∶10、20∶10、30∶10)分别称量一定量的 IND 和 PIPAA,各自溶解于 1 mL DMSO 后混匀,置于透析袋中透析 24 h 得到不同质量比的 IND/PIPAA 微球。取 1 mL 含微球的水溶液,采用马尔文 Nano ZS90 粒度分析仪测定不同质量比的 IND/PIPAA 微球的粒径及其分布。将不同质量比的 IND/PIPAA 微球分散液分别滴于云母片和铜网上,室温干燥后,利用扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)观察微球形态。

按照 20∶10 的质量比分别称取一定量的 UDCA 和 PIPAA,各自溶解于 1 mL DMSO 后混匀,置于透析袋中透析 24 h 得到 UDCA/PIPAA 微球;同样采用 SEM 观察微球形态。

1.2.3 IND/PIPAA 微球载药量和包封率的测定

准确配制一系列浓度梯度的 IND 乙醇溶液,以乙醇为空白对照,于紫外-可见光谱仪在 310 nm 处测定 IND 的紫外吸收,绘制 IND 的标准曲线。

精密称量一定量的不同质量比的 IND/PIPAA 微球溶解于 3 mL 乙醇中,以乙醇为空白对照,测定 310 nm 处 IND 的光密度值。根据 IND 标准曲线,计算相应的 IND 的浓度、载药量和包封率。计算公式如下:

载药量(%)=微粒中药物质量/微粒的质量×100%

包封率(%)=微粒中药物含量/理论药物含量×100%

1.2.4 IND/PIPAA 微球中分子间相互作用力的表征

分别取少量 IND、PIPAA 和 IND/PIPAA 微球(20∶10)样品,利用傅里叶变换红外光谱仪测定波数 800~4 000 cm^{-1} 之间样品的红外光谱图。另取一定量的 IND、PIPAA 以及二者的物理混合物分别溶解于 DMSO-d_6 中,使用 Avance-500 Spectrometer 型核磁共振谱仪测定不同样品的^{1}H NMR 谱图。

称取一定量的 IND、PIPAA 以及质量比分别为 5∶10、10∶10、15∶10、20∶10 和 30∶10 的 IND/PIPAA 微球进行差示扫描量热(DSC)分析。另外,取一定量的 IND、IND 与 PIPAA 物理混合物和 IND/PIPAA 微球,进行 X 射线衍射(XRD)分析。通过 DSC 和 XRD 测定考察 IND 在 IND/PIPAA 微球中的存在形式。

1.2.5 IND/PIPAA 微球的体外释药行为研究 采用透析法,分别在 pH=7.4 的 PBS 和模拟胃肠 pH 值的释放介质中考察 IND、IND/S100 微球和 IND/PIPAA 微球的释药行为。其中 IND/S100 微球为阳性微球对照组,S100 是美国 FDA 批准的肠溶包衣材料,它是一种 pH 敏感性丙烯酸聚合物。IND/S100 微球制备方法如下:40 mg S100 和 10 mg IND 分别溶于 1 mL 无水乙

醇和 3 mL 二氯甲烷后缓慢混匀作为油相;配制 2% PVA 溶液(PVA 为乳化剂)作为水相。冰浴条件下迅速将油相加入 20 mL 水相,并立即探头超声,每超声 3 s 停 1 s,重复 5 次,功率为 70%。得到的水包油乳液在室温下搅拌 4 h,溶剂挥发后 16 000 r/min 离心 10 min 收集 IND/S100 微球,去离子水清洗 3 次。

准确配制一系列浓度梯度的溶有 IND 的 PBS(pH=7.4)溶液,以 PBS 溶液为空白对照,测定 310 nm 处 IND 的紫外吸收,并绘制 IND 在 PBS 溶液中的标准曲线。按照前述方法测定 IND/S100 和 IND/PIPAA 微球的载药量,根据载药量计算释放实验所需微球的量,使 3 组的 IND 含量保持一致。

将 IND、IND/S100 微球和 IND/PIPAA 微球分散于 300 μL 去离子水中后加入透析袋中,在 pH=7.4 的 PBS 中释放 18 h 或在人工胃液中释放 2 h 后转移到 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中继续释放至 48 h。整个释放过程中,在特定的时间点取出 4 mL 释放介质,测定其在 310 nm 处的光密度值,同时补充 4 mL 新鲜释放介质。根据标准曲线计算不同时间点,释放介质中 IND 的含量,并计算累积释放量和累积释放百分比,绘制累计释放曲线。

1.2.6 IND/PIPAA 微球体内药动学研究 体质量(250±10)g 的 SD 雄性大鼠 9 只,按随机数字表法分为 3 组,每组 3 只,分别灌胃给予 IND、IND/S100 微球和 IND/PIPAA 微球,给药剂量为 5 mg/kg(按 IND 含量计)。灌胃后不同时间点取血,置于肝素钠抗凝管中。根据文献[21]处理血样,以甲灭酸作为内标,HPLC 测定 IND 的血药浓度,色谱条件如下:流动相为乙腈-6 μmol/L H_3PO_4 水溶液(55∶45,体积比);流速 1 mL/min;柱温 40 ℃;检测波长 245 nm;进样量 20 μL。进而以时间为横轴,IND 血药浓度为纵轴绘制 IND 药时曲线,并利用 DAS 3.2.8 软件计算药-时曲线下面积 AUC。其中,IND/S100 微球为阳性微球对照组,其制备方法如前所述。

1.2.7 IND/PIPAA 微球在角叉菜胶诱导的大鼠足跖肿胀模型中的抗炎效果评价 体质量(250±10)g 的 SD 雄性大鼠 20 只,按随机数字表法分为 4 组,分别为模型组、Raw IND 组、IND/S100 微球组和 IND/PIPAA 微球组,每组 5 只。大鼠麻醉后右后肢足跖部位注射 0.1 mL 角叉菜胶生理盐水溶液(2%),诱导足跖肿胀模型。造模 0.5 h 后,分别给大鼠灌胃 IND、IND/S100 微球和 IND/PIPAA 微球,给药剂量为 5 mg/kg(按 IND 含量计),对照组给予相同体积的生理盐水。6 h 后在肿胀部位注射 50 μL 鲁米诺溶液,以 IVIS Spectrum 小动物活体成像系统进行成像,统计足跖部位自发光强度。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,不同组间差异用单因素方差分析,药-时曲线不同组间差异用重复度量的方法进行统计,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 PIPAA 的制备与表征

PIPAA 的合成路线如图 1 所示,以浓磷酸为催化剂催化 *D*,*L*-天冬氨酸在高温条件下聚合成聚琥珀酰亚胺(PSI),并用异丙胺氨解 PSI 得到 PIPAA。

中间产物 PSI 与原料 *D*,*L*-天冬氨酸的 FT-IR 图谱(图 2A)对比可以看出,在合成的 PSI 红外图谱中,2 970 cm^{-1} 处的次甲基峰和 2 926 cm^{-1}、2 853 cm^{-1} 处的亚甲基峰大大减弱,而 1 799 cm^{-1}、1 712 cm^{-1} 处环上羰基的伸缩振动峰明显出现,证明 PSI 成功合成。同样,PSI 的 ^{1}H NMR 图谱(图 2B)也佐证了这一结论,5.3 ppm 是 PSI 的次甲基质子峰,2.7 和 3.2 ppm 处是 PSI 亚甲基的质子峰。此外,8~10 ppm 之间几乎无质子峰出现,表明中间产物几乎没有支化结构或者未成环的结构,从而说明合成的 PSI 线性结构较好。

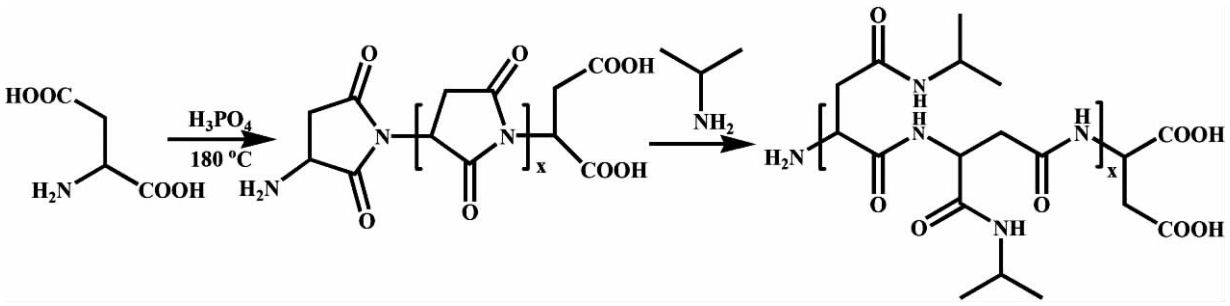


图 1 PIPAA 的合成路线图

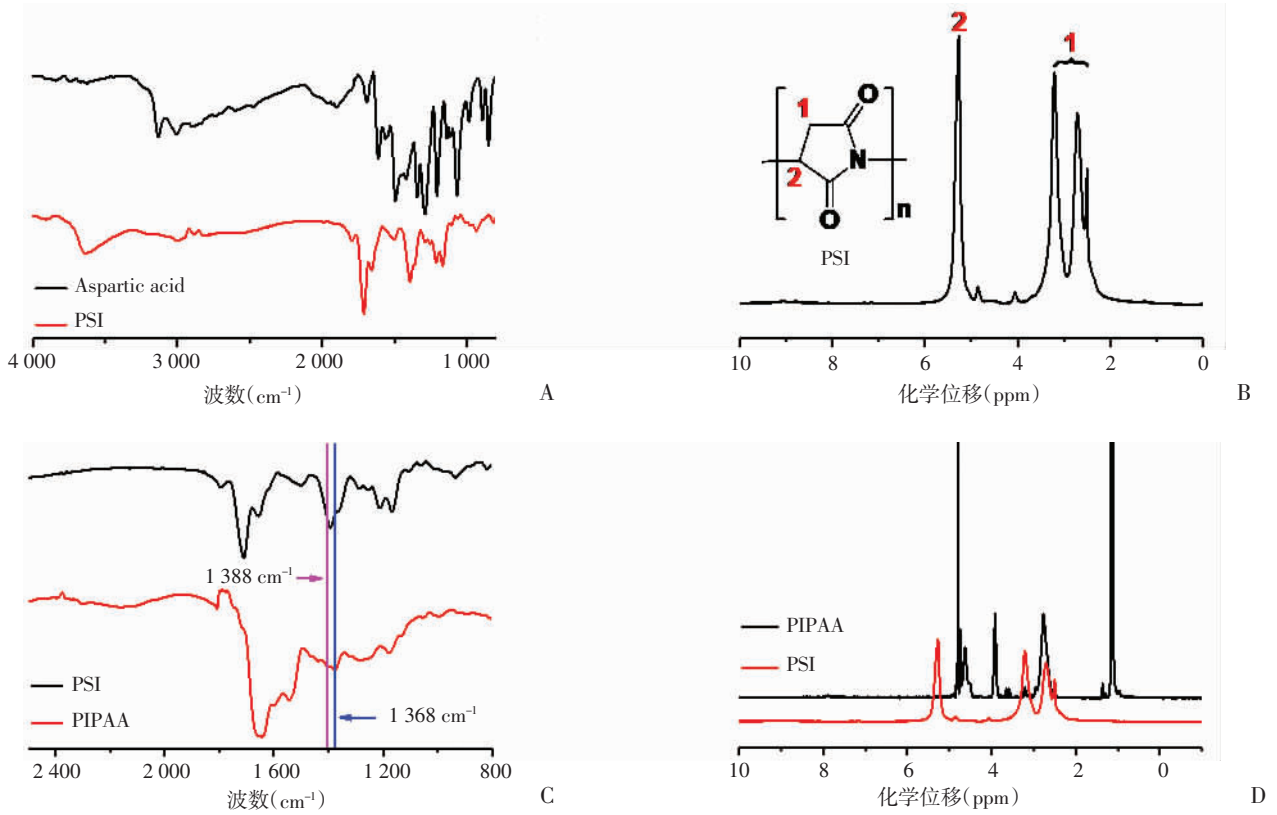
图 2C 所示为异丙基胺氨解 PSI 后得到的 PIPAA 的 FT-IR 图谱,与 PSI 的谱图相比,在 1 368 和 1 388 cm^{-1} 处出现了明显的异丙基特征峰,说明 PSI 经异丙基胺氨解后成功合成了 PIPAA。同样地,PIPAA 的 ^1H NMR 谱图(图 2D)也出现了异丙基的质子峰(1.0 对应与异丙基中 1、3 位碳相连的氢),而在 PSI 核磁谱图的相应位置未见该质子峰,这一结果佐证了红外结论。

2.2　IND/PIPAA 微球的制备与表征

为考察所合成的亲水性聚合物 PIPAA 能否包载含羧基小分子疏水药物形成微球,我们以 IND 为模型药物,通过透析法制备了不同质量比(M_{IND} : M_{PIPAA} = 10:10、15:10、20:10 和 30:10)的 IND/PIPAA 微球。

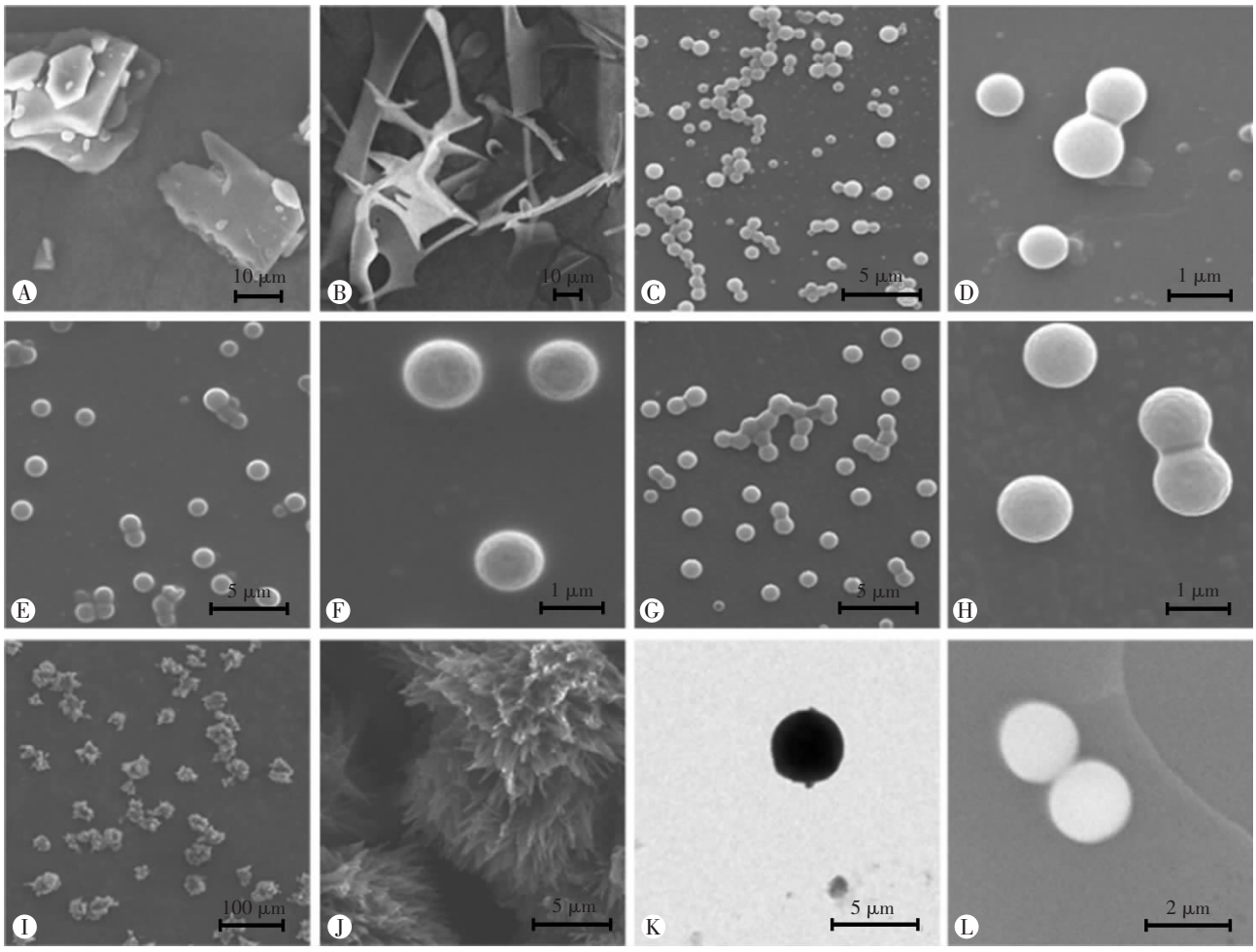
本研究使用的 IND 原料的晶型主要为 γ 型,扫描电镜下表现为片状晶体(图 3A)。IND 溶解于 DMSO 并在去离子水中透析后,SEM 观察为针状晶体(图 3B)。SEM 表征显示 IND 和 PIPAA 质量比分别为 10:10、15:10、20:10 的 IND/PIPAA 微球呈现规整的球形,粒径较为均一,且未见 IND 针状晶体(图 3C~H,M),表明小分子疏水药物 IND 几乎完全和 PIPAA 自组装形成微球。而当 IND 和 PIPAA 的质量比提高至 30:10 时,SEM 观察发现 IND 针状晶体的存在(图 3I,J),提示 PIPAA 并不能无限制地与 IND 自组装;当 IND 增加到一定量后,它更倾向于自身分子堆砌成晶体而非与 PIPAA 共组装形成微球。另外,高 IND 投料比(20:10)的 IND/PIPAA 微球的 TEM 结果(图 3K)显示该微球结构较紧实。当 UDCA 作为小分子疏水药物时,它与 PIPAA 也可以通过自组装得到形态良好的微球(图 3L),说明 PIPAA 可以作为通用型亲水载体材料,与多种羧基小分子疏水药物自组装形成微球释药系统。

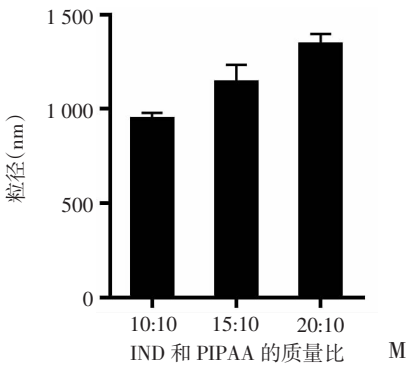
为了定量分析自组装微球对 IND 的负载能力,通过紫外法检测了不同 IND 投料比的微球的载药量和包封率。结果显示其载药量随着 IND 投料比的增加而增加,最高可达 58.71%,而包封率均在 80%以上,最高可达 90.33%(图 3N),说明 PIPAA 对 IND 具有极其优异的负载性能。

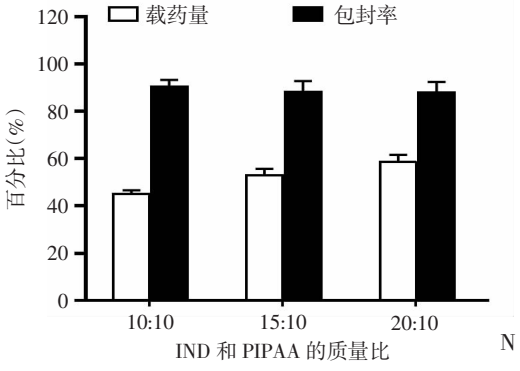


A:中间产物 PSI 与原料 D,L-天冬氨酸的 FT-IR 图谱;B: PSI 的 ^1H NMR 图谱;C:异丙基胺氨解 PSI 后得到的 PIPAA 的 FT-IR 图谱;D:PIPAA 的 ^1H NMR 谱图

图 2　PSI、PIPAA 的 FT-IR 图谱和 ^1H NMR 图谱







A、B:透析前和透析后 IND 的 SEM 观察;C~J:不同投料比的 IND/PIPAA 微球的 SEM 观察;C、D:M_{IND}:M_{PIPAA}=10:10,E、F:15:10,G、H:20:10,I、J:30:10;K:投料比为 20:10 的 IND/PIPAA 微球的 TEM 观察;L:UDCA/PIPAA(20:10)微球的 SEM 观察;M、N:不同投料比的 IND/PIPAA 微球的平均粒径和载药量与包封率

图 3 不同投料比的微球的表征

2.3 IND/PIPAA 微球中分子间相互作用力的表征

为了进一步考察 IND 和 PIPAA 是通过何种分子间相互作用力介导自组装形成微球,我们利用 FT-IR、^{1}H NMR、DSC 和 XRD 进行了表征。由 IND 和 IND/PIPAA 微球的 FT-IR 谱图(图 4A)可以看出:由于羧基阴离子的对称伸缩振动和不对称伸缩振动,IND 在 1 604 cm^{-1} 和 1 399 cm^{-1} 处有较强的吸收峰;而在微球中该吸收峰明显减弱,说明 IND 和 PIPAA 之间存在静电力,该静电力大大减弱了羧基阴离子的对称伸缩振动和不对称伸缩振动。同时,微球中缺少了 IND 的羰基基团的反对称伸缩振动峰和对称伸缩振动峰(1 712 cm^{-1} 和 1 690 cm^{-1}),仅在 1 674 cm^{-1} 处存在

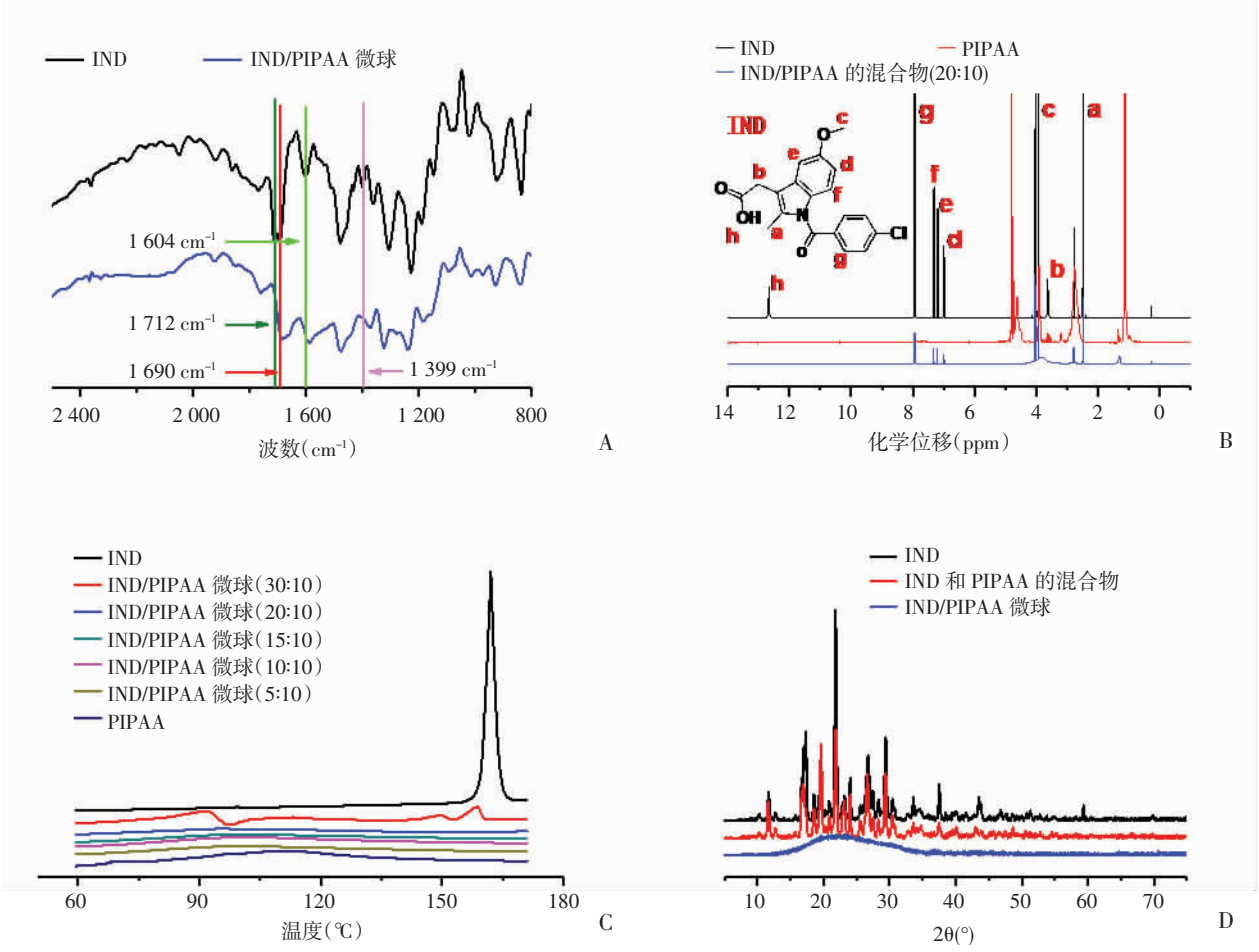
一个吸收峰,这可能由于 IND 中的羰基与 PIPAA 的酰胺之间形成了氢键,从而降低了羰基的吸收。另外,IND、PIPAA 和二者的物理混合物的^{1}H NMR 谱图(图 4B)显示,混合物中 IND 的信号明显减弱,羧基的质子峰几乎完全消失,而 PIPAA 部分的信号有所增强,这说明在 DMSO-d_6 中 IND 与 PIPAA 间仍存在较强的非共价键相互作用。

进一步通过 DSC 和 XRD 检测了 IND 在微球中的存在形式。DSC 结果(图 4C)显示 IND 在 162 ℃左右有一明显的吸热峰;然而,在 PIPAA 和投料比为 10∶10、15∶10、20∶10 的 IND/PIPAA 微球的 DSC 曲线中未见吸热峰,这表明 IND 主要以无定型的分子形式而非微晶形态存在于微球中;而疏水药物的无定型态有利于其快速溶出,从而提高口服生物利用度。另外,DSC 检测发现投料比为 30∶10 的 IND/PIPAA 微球在 160 ℃左右存在一可见的吸热峰,表明该投料比时,部分 IND 无法与 PIPAA 自组装于微球中,而以结晶形式存在。并且,IND 和 IND/PIPAA 微球(投料比为 30∶10)二者的 IND 晶体吸热峰的位置不同,可能源于 IND 的不同晶型,这与扫描电镜结果相吻合。而在 XRD 检测中观察到了相同的结果(图 4D)。综合上述结果,我们选择投料比为 20∶10 的 IND/PIPAA 微球用于后续研究。

2.4　IND/PIPAA 微球的体外药物释放行为

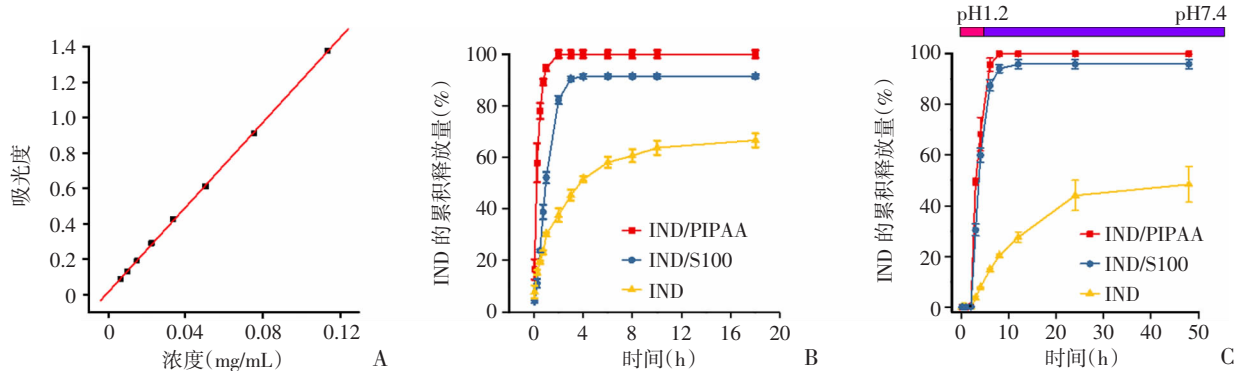
为了考察 IND/PIPAA 微球能否提高 IND 溶出,我们分别在 pH=7.4 的 PBS 和模拟胃肠 pH 值的释放介质中考察了 IND 原料、IND/PIPAA 和 IND/S100 微球的释药行为。

IND 在 PBS 中的标准曲线(图 5A)的拟合方程为 y=11.970 34x+0.015 11(R^2=0.999 9,mg/mL)。在 pH=7.4 的 PBS 中,IND/PIPAA 和 IND/S100 微球可以迅速释放 IND,几乎在 2 h 内完全释放(图 5B)。IND 原料则呈现出典型的药物溶解曲线,并且仅有约 66%的 IND 溶出,而含有等量 IND 的 IND/PIPAA 微球可以实现 100%的 IND 溶出;表明 IND/PIPAA 微球可以有效提高小分子疏水药物的溶出速率。在模拟胃肠



A:FT-IR 图谱;B:^{1}H NMR 图谱;C:DSC 曲线;D:XRD 谱

图 4　IND/PIPAA 微球中分子间相互作用的表征



A:IND 在 pH=7.4 PBS 中的标准曲线;B、C:IND、IND/PIPAA 和 IND/S100 微球在 pH=7.4 PBS 缓冲溶液和模拟胃肠 pH 环境的释放介质中的累积释放曲线

图 5 IND/PIPAA 微球的体外释药行为

pH 值的释放介质中,最初 2 h(pH=1.2,模拟胃液)IND/PIPAA 和 IND/S100 微球几乎均无 IND 释放,这主要由于 IND 在该 pH 条件下质子化,溶解度极低。当 pH 值从 1.2 变为 7.4 后,IND 迅速从 IND/PIPAA 和 IND/S100 微球中释放,在 8 h 内几乎完全释放(图 5C);而 IND 原料在 48 h 时仅有约 48%溶出。这些结果表明 IND/PIPAA 微球除了可以提高小分子疏水药物的溶出之外,还具有良好的 pH 响应性释药特性,其与 FDA 批准的肠溶包衣材料 S100 具有相近的效果。此外,可以看出 IND/PIPAA 微球的 pH 响应性与 IND 的解离特性有关。IND 的 pKa 约为 4.5,在 pH=1.2 时,IND 羧基质子化从而导致极低的溶解度;而在 pH=7.4 时,IND 的解离可以显著增加其溶解度。因此,在 pH=7.4 时,IND 的解离会导致 IND/PIPAA 微球的侵蚀和瓦解,实现 pH 响应性药物释放。

2.5 IND/PIPAA 微球的体内药动学研究

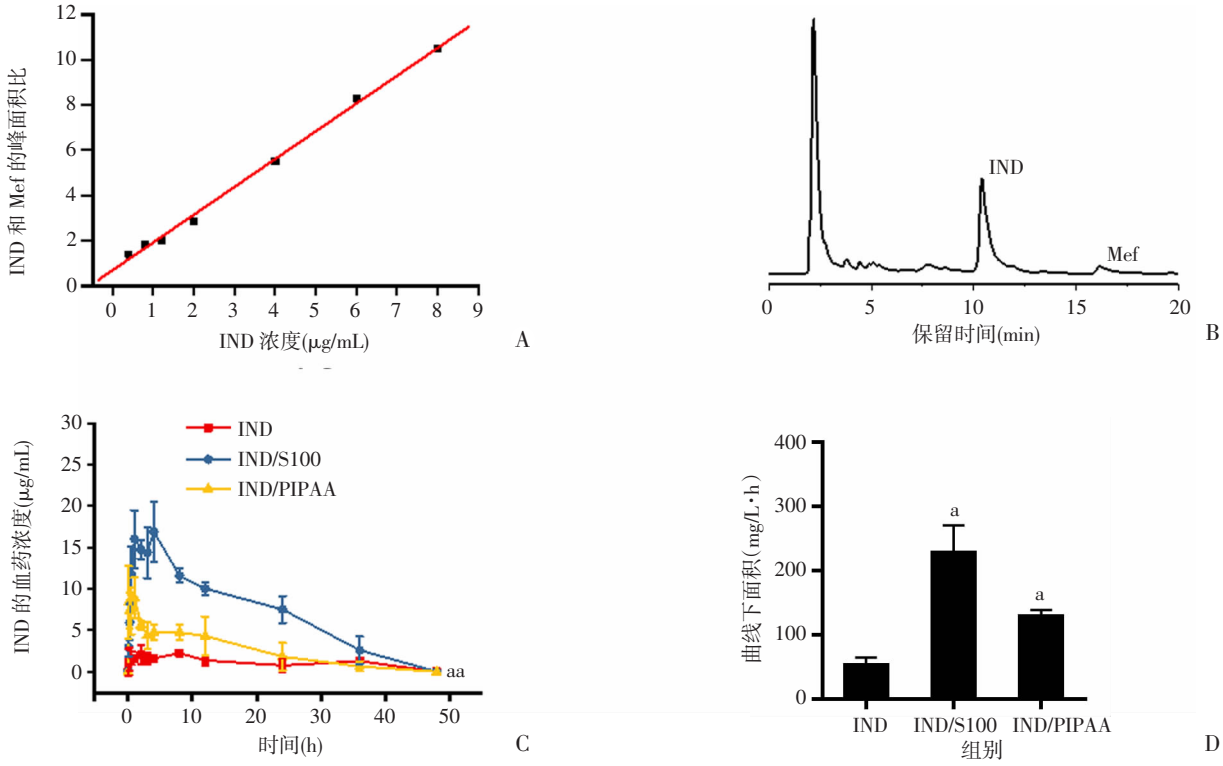
体外释药实验证明 IND/PIPAA 微球可以提高小分子疏水药物的溶出和释放,我们进而通过大鼠体内药动学实验进一步考察 IND/PIPAA 微球能否提高 IND 的口服生物利用度。

以甲灭酸为内标,采用内标法,利用 HPLC 定量分析了灌胃给予 IND 原料药、IND/S100 和 IND/PIPAA 微球后,不同时间点大鼠血样中 IND 的含量,并绘制药-时曲线,计算药-时曲线下面积(AUC)。图 6A 为 IND 在血样中的标准曲线,其拟合方程为 A_{IND}/A_{Mef} = 1.233 68C+0.674 15(R^2=0.998 45,μg/mL)。图 6B 为 IND 在血样中的典型 HPLC 谱图(IND 浓度 8 μg/mL),可以看出 IND 和甲灭酸出峰时间分别为 10 min 和 16 min,二者能够完全分离且无其他干扰。

大鼠体内药动学实验结果表明:灌胃给予 IND 原料药、IND/PIPAA 和 IND/S100 微球后,与 IND 原料药相比,IND/PIPAA 和 IND/S100 微球可以显著提高 IND 的口服生物利用度(P=0.001, P=0.000)(图 6C)。与此一致,二者与 IND 原料药的 AUC 值的差异具有统计学意义(P=0.01, P=0.000);IND/PIPAA 微球组的 AUC 值为 IND 原料药组的 2.4 倍(图 6D)。不过,IND/PIPAA 微球的口服生物利用度低于 IND/S100 微球。

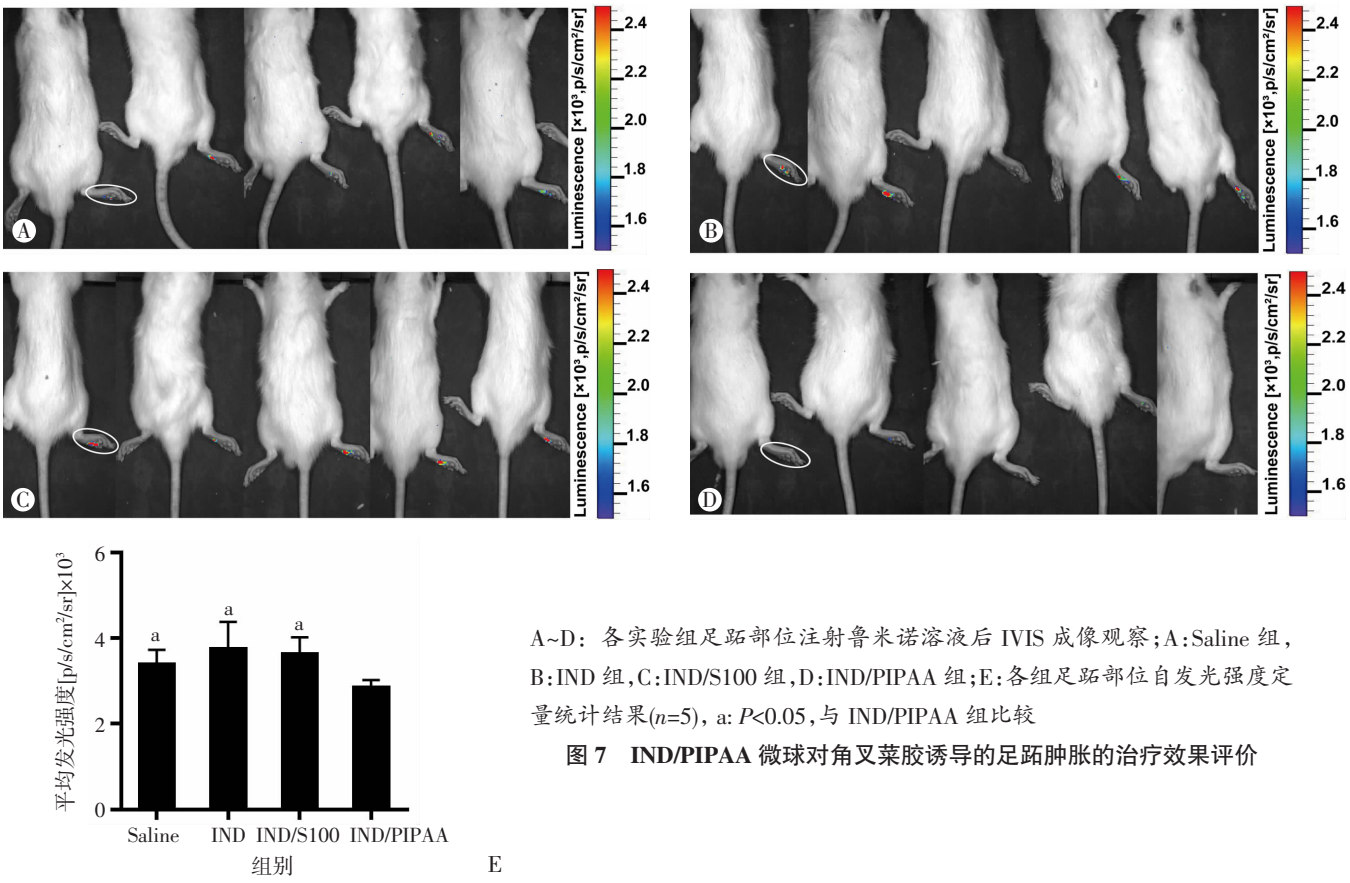
2.6 IND/PIPAA 微球的体内药效学评价

鲁米诺可以被炎症局部的活性氧氧化转变成激发态氨基邻苯二甲酸,发出较强的自发光。利用鲁米诺的发光特性,我们在造模 6 h 后大鼠右后足跖部位注射鲁米诺进行 IVIS 成像,以考察足趾部位的炎症情况。IVIS 成像结果如图 7A~D 所示,可以观察到 4 组大鼠右后足跖部位均有不同程度的发光,表明足跖部位出现了炎性反应,急性足跖肿胀模型成功建立。将各组的发光强度进行量化统计(图 7E),与生理盐水对照组相比,灌胃给予 IND/PIPAA 微球治疗的大鼠足跖部位的发光强度显著减弱(P=0.046)。此外,IND/PIPAA 微球组足跖部位的发光强度也明显弱于 IND 原料药和 IND/S100 微球治疗组(P=0.002, P=0.007),表明在大鼠急性足趾肿胀模型中,IND/PIPAA 微球可显著减轻炎症局部的炎性反应,其效果明显优于 IND 原料药和 IND/S100 微球治疗组。



A:IND 在血浆中的标准曲线;B:IND 和甲灭酸在血浆中的代表性 HPLC 谱图;C:药-时曲线;D:不同样品的 AUC 值;a: $P<0.05$,与 IND 组比较

图 6 IND/PIPAA 微球的体内药动学研究



A~D: 各实验组足跖部位注射鲁米诺溶液后 IVIS 成像观察;A:Saline 组,B:IND 组,C:IND/S100 组,D:IND/PIPAA 组;E:各组足跖部位自发光强度定量统计结果(n=5), a: $P<0.05$,与 IND/PIPAA 组比较

图 7 IND/PIPAA 微球对角叉菜胶诱导的足跖肿胀的治疗效果评价

3 讨论

目前,作为药物递送系统研究的聚合物组装体大多是由非共价键作用力介导两亲性共聚物的自组装制备,疏水药物主要通过疏水作用负载其中。但是共聚物较为复杂的分子结构往往会导致其合成复杂、批次重复性不好、结构表征困难、难以规模化制备等一系列问题。针对这些问题,基于我们在小分子药物介导的亲水性聚合物自组装构建高效药物递送系统方面的前期发现,本研究中我们设计并合成了一种新型的亲水性载体材料 PIPAA。PIPAA 中酰胺、异丙基等基团与羧基小分子药物之间存在氢键、静电和疏水作用等多重非共价键作用力,从而介导自组装微球的形成。与常用的两亲性共聚物相比,PIPAA 由单一的天冬氨酸聚合而成,其结构简单、生物相容性较好,且合成容易、过程易于重复。此外,PIPAA 与羧基小分子药物通过多重非共价键作用力介导的自组装形成的微球较传统聚合物自组装体大幅度提高了疏水药物的载药量和包封率,从而可以减少因载体材料过多而导致的潜在毒副作用。

IND/PIPAA 微球的体外释药行为表现出明显的 pH 响应特性,与 IND/S100 微球相近,但是二者 pH 响应性的机制不同。IND/S100 乳化微球的 pH 响应性归因于 S100 的 pH 敏感性,而 IND/PIPAA 微球的 pH 响应性与 IND 的解离特性有关。IND 的酸度系数约为 4.5,在 pH=1.2 的介质中,IND/PIPAA 微球中的 IND 羧基呈现质子化状态,导致其溶解度极低。而在 pH=7.4 的介质中,IND 羧基迅速离子化,其溶解度大大增加;另一方面,IND 中羧基的解离极大地削弱了药物与 PIPAA 的分子间作用力,从而导致 IND/PIPAA 微球的侵蚀和瓦解,加速药物释放。另外,IND/PIPAA 微球中 IND 主要以无定型态存在。因此,口服 IND/PIPAA 微球后,在肠道 pH 条件下微球崩解,其中负载的 IND 以分子形式直接游离出来,无须经过药物晶体的溶解过程,从而可以显著增加 IND 的溶出速率,提高 IND 的口服生物利用度。这对于降低 IND 微球释药系统的给药剂量,减少 IND 引起的胃肠出血事件有重要的作用。

综上所述,本研究合成了一种新型的亲水性多肽衍生物载体材料 PIPAA,其结构简单,易于合成,且可以通过多重非共价键作用力与 IND 自组装形成微球。IND/PIPAA 微球可以显著增加所负载小分子疏水药物的溶出,提高口服生物利用度,进而增强其疗效,并有望减少 IND 引起的胃肠出血事件的发生。此外,PIPAA 可作为一种通用型载体材料,通过自组装负载不同结构的含羧基小分子疏水药物,实现多种疾病的有效口服治疗。

参考文献:

[1] AL-HILAL T A, ALAM F, BYUN Y. Oral drug delivery systems using chemical conjugates or physical complexes[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(6): 845-864. DOI: 10.1016/j.addr.2012.11.002.

[2] BAKHRU S H, FURTADO S, MORELLO A P, *et al*. Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(6): 811-821. DOI: 10.1016/j.addr.2013.04.006.

[3] PORTER C J, TREVASKIS N L, CHARMAN W N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(3): 231-248. DOI: 10.1038/nrd2197.

[4] LU Y, CHEN S C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(11): 1621-1633. DOI: 10.1016/j.addr.2004.05.002.

[5] ZHANG J X, LI X D, LI X H. Stimuli-triggered structural engineering of synthetic and biological polymeric assemblies[J]. Prog Polym Sci, 2012, 37(8): 1130-1176. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.11.005.

[6] ZHOU X, ZHAO Y, CHEN S Y, *et al*. Self-assembly of pH-responsive microspheres for intestinal delivery of diverse lipophilic therapeutics[J]. Biomacromolecules, 2016, 17(8): 2540-2554. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00512.

[7] GOLDBERG M, GOMEZ-ORELLANA I. Challenges for the oral delivery of macromolecules[J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(4): 289-295. DOI: 10.1038/nrd1067.

[8] NORRIS D A, PURI N, SINKO P J. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 34(2/3): 135-154. DOI: 10.1016/s0169-409x(98)00037-4.

[9] SANT S, TAO S L, FISHER O Z, *et al*. Microfabrication technologies for oral drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64(6): 496-507. DOI: 10.1016/j.addr.2011.11.013.

[10] SINHA V R, TREHAN A. Biodegradable microspheres for protein delivery[J]. J Control Release, 2003, 90(3): 261-280. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00194-9.

[11] TAKEUCHI H, THONGBORISUTE J, MATSUI Y, *et al*. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery sys-

tems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(11): 1583-1594. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.008.

[12] CHEN H, LANGER R. Oral particulate delivery: status and future trends[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 34(2/3): 339-350. DOI: 10.1016/s0169-409x(98)00047-7.

[13] FOSTER N, HIRST B H. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(3): 431-450. DOI: 10.1016/j.addr.2004.09.009.

[14] KHAFAGY E L S, MORISHITA M. Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64(6): 531-539. DOI: 10.1016/j.addr.2011.12.014.

[15] KUNISAWA J, KURASHIMA Y, KIYONO H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64(6): 523-530. DOI: 10.1016/j.addr.2011.07.003.

[16] AOUADI M, TESZ G J, NICOLORO S M, *et al*. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation[J]. Nature, 2009, 458(7242): 1180-1184. DOI: 10.1038/nature07774.

[17] KWON K C, VERMA D, SINGH N D, *et al*. Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(6): 782-799. DOI: 10.1016/j.addr.2012.10.005.

[18] YOO J W, IRVINE D J, DISCHER D E, *et al*. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(7): 521-535. DOI: 10.1038/nrd3499.

[19] YAMAKAWA I, KAWAHARA M, WATANABE S, *et al*. Sustained release of insulin by double-layered implant using poly(D, L-lactic acid)[J]. J Pharm Sci, 1990, 79(6): 505-509. DOI: 10.1002/jps.2600790610.

[20] XU W, LI L, YANG W L, *et al*. Amphiphilic hexylamine modified polysuccinimide: synthesis, characterization, and formation of nanoparticles in aqueous medium[J]. J Macromol Sci Part A, 2003, 40(5): 511-523. DOI: 10.1081/ma-120019889.

[21] ZHANG S Y, BELLINGER A M, GLETTIG D L, *et al*. A pH-responsive supramolecular polymer gel as an enteric elastomer for use in gastric devices[J]. Nat Mater, 2015, 14(10): 1065-1071. DOI: 10.1038/nmat4355.

(**收稿**:2020-01-19;**修回**:2020-02-19)

(编辑 张 维)