

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.009

聚苹果酸合成新方法及其聚苹果酸苄基酯用作药物载体的研究*

张 雨 乔友备 周 青 余 喆 吴 红[△]

(第四军医大学药学院药物分析教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:优化 β -聚苹果酸(PMLA)的合成路线,制备部分氢化的聚苹果酸苄基酯(PMLABz),为构建载药纳米胶束提供两亲性聚合物载体。**方法:**分别以 L-天冬氨酸和 L-苹果酸为原料,合成单体 β -苄氧羰基- β -丙内酯,再通过阴离子开环聚合制备 PMLABz,最终氢化制备 PMLA。X 射线衍射仪、差示扫描量热仪等对材料的性质进行表征,L929 成纤维细胞测定聚合物的细胞毒性,透析法制备部分氢化的聚苹果酸苄基酯空白胶束。**结果:**通过优化反应条件,以 L-苹果酸为原料合成关键中间体 β -苄氧羰基- β -丙内酯的终产率为 31.5%,对比文献报道的 L-天冬氨酸合成路线,产率提高近 7 倍。X-RD 结果表明以 L-苹果酸为原料制备的 PMLABz 有明显的衍射峰,结晶度高,熔点随之升高,MTT 实验证实 PMLABz 无毒性。部分氢化的 PMLABz 可在水中自组装成一定粒径的胶束,氢化 77% 的 PMLABz 可得到粒径均匀、形态良好的纳米胶束。**结论:**分别以 L-天冬氨酸和 L-苹果酸为原料合成聚苹果酸,优化合成路线,提高终产率,得到了新晶型 PMLABz,并通过部分氢化 PMLABz 制备两亲性聚合物进而得到纳米胶束,为后期纳米释药体系研究提供优良载体。

关键词:聚苹果酸苄基酯;阴离子开环聚合;聚苹果酸;纳米胶束

中图分类号:R-33;R944.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1849-05

Synthesis of Poly (β -malic acid) and Study on Poly (β -malic Acid benzyl ester) as Drug Carrier*

ZHANG Yu, QIAO You-bei, ZHOU Qing, YU Zhe, WU Hong[△]

(Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the synthesis route of PMLA and prepare the partially hydrogenated poly (β -malic acid benzyl ester) which is to provide the amphiphilic polymer carrier for the drug-loaded nanomicelles. **Methods:** Benzyl- β -malolactonate (MLABz) was prepared from L-aspartic acid and L-malic acid, respectively. The properties of the polymers were characterized by X-RD and DSC. The cytotoxicity of PMLABz was assessed by using L929 fibroblasts. The partial hydrogenation of PMLABz was prepared by controlling the hydrogenation time to obtain an amphiphilic block copolymer. **Results:** The yield of MLABz from L-malic acid was 31.5% nearly seven times as much as the L-aspartic acid by optimizing the reaction conditions. The X-RD patterns revealed that the PM- LABz-2 had obvious diffraction peaks. The melting temperature was increased due to the high crystallinity. MTT test confirmed that the PMLABz was nontoxic. The partial hydrogenation of PMLABz could form the certain size of the nanomicelles by self-assembling in water. It was confirmed that a hydrogenation degree was 77% of PMLABz which would obtain the well-formed nanomicelles. **Conclusions:** MLABz was prepared from L-aspartic acid and L-malic acid, respectively. The synthesis routes of PMLA from L-malic acid had the short route and high yield. Meanwhile, a novel crystalline PMLABz that polymerized by MLABz starting from L-malic acid was discovered. An amphiphilic block polymer was obtained by partial hydrogenolysis of PMLABz which would provide an excellent nanocarrier for drug delivery system.

Key words: Poly (β -malic acid benzyl ester); Ring-opening polymerization; Poly (β -malic acid); Nanomicelle

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R944.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1849-05

前言

聚酯是生物医学领域研究最广泛的合成聚合物^[1]。聚苹果酸(PMLA)是一种与生物相容、无毒且非免疫原性的聚酯,相比于聚丙交酯或聚己内酯具有很好的水溶性^[2,3]。PMLA 的代谢

产物苹果酸是三羧酸循环的一种中间体,在体内可完全降解,同时,PMLA 是一种功能性聚合物,羧基侧基有利于将生物活性分子或药物分子固定在其表面,制得具有靶向效果的药物载体进而在生物医学领域发挥它的作用^[4,5]。

聚苹果酸可通过生物发酵法和化学合成法来制备,由于生

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81571786; 31771087);陕西省科技统筹创新工程项目(2015KTCL03-12)

作者简介:张雨(1993-),女,硕士研究生,主要研究方向:聚合物药物载体,E-mail: yuzhang1114@163.com

[△] 通讯作者:吴红(1971-),女,博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤靶向纳米药物,E-mail: wuhong@fmmu.edu.cn,电话:029-84776823

(收稿日期:2017-12-25 接受日期:2018-01-18)

物发酵法合成的分子量低且不可控^[6],我们选择化学合成法来制备聚苹果酸^[7]。大量文献报道聚苹果酸的制备都是以 L- 天冬氨酸为原料,总产率较低。本试验分别以 L- 天冬氨酸和 L- 苹果酸为原料合成聚苹果酸,优化合成路线,提高总产率,在合成过程中制备出结晶度高的 PMLABz, 对材料的毒性进行检测。在聚苹果酸的应用上,研究者往往忽略了它的前体聚苹果酸苄基酯自身优越的性能,我们通过部分氢化 PMLABz 改善其亲水性,为其作为药物载体包载疏水性药物提供工作基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

L- 天冬氨酸,购自上海楷洋生物技术有限公司;L- 苹果酸,购自 sigma-aldrich 公司;三氟乙酸酐,购自济南万兴达化工有限公司;柱层析硅胶 200-300 目、三苯基膦(化学纯)、偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)、分析纯硫酸、乙醚、苯甲醇、四氢呋喃、二氯甲烷和二氧六环,购自国药集团化学试剂有限公司;L-929 成纤维细胞由中国科学院细胞库提供;核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司,400MHz,1H-NMR);Hei-VAPI 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);RCT 型磁力搅拌器(德国 IKA 公司);FTIR8400S 傅里叶红外光谱仪(日本岛津公司);D8 ADVANCE X 射线衍射仪(德国 Bruker);DSC 214 差示扫描量热仪(德国耐驰公司);Bio-tek ELx800 酶联检测仪(美国宝特);Vario EL III Element 元素分析仪;Tecnai Spirit (100KV TEM) 显微镜(FEI 公司)。

1.2 试验方法和步骤

1.2.1 β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯的合成 分别采用 L- 天冬氨酸和 L- 苹果酸为原料制备。方法 1:参考课题组的前期工作并改进,将 L- 天冬氨酸和溴化钠溶解于 2 mol/L 硫酸,加入亚硝酸钠溶液生成溴代丁二酸;将溴代丁二酸溶解于无水四氢呋喃中,滴加三氟乙酸酐室温反应 3 h 生成溴代丁二酸酐;加入苄醇 45 °C 油浴中搅拌 12 h, 加入 2 mol/L NaOH 调至 pH 7.5,加入二氯甲烷 45 °C 下冷凝回流 24 h,5 % NaHCO₃ 水溶液洗涤,无水 MgSO₄ 干燥,浓缩滤液后经硅胶柱纯化(V_{石油醚}:V_{二氯甲烷}:V_{乙酸乙酯} =20:20:1), 浓缩得 β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯 (MLABz-1),总收率为 4.5 %。方法 2:向 L- 苹果酸中加入三氟乙酸酐,0 °C 下搅拌 3 h,产物溶于苄醇中,室温下搅拌 4 h,乙酸乙酯稀释,10 % NaCO₃ 溶液萃取,1 mol/L HCl 调至 pH 7.0,用乙酸乙酯萃取合并水层,1 mol/L HCl 调至 pH 2.0,乙酸乙酯萃取水层,合并有机相,浓缩得苹果酸苄基单酯。将苹果酸苄基单酯加至充满 N₂ 的三口瓶中,加入三苯基膦和 DIAD 的 THF 溶液,0 °C 密闭搅拌 30 min,20 °C 反应 12 h,冷乙醚中研磨,浓缩滤液后经硅胶柱纯化(V_{石油醚}:V_{二氯甲烷}:V_{乙酸乙酯} =6:6:1), 浓缩得 β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯(MLABz-2),总收率为 31.5 %^[7,8]。

1.2.2 β - 聚苹果酸苄基酯的合成 向三口瓶中加入一定量引发剂苯甲酸四乙基铵,抽真空至白色固体析出,在充 N₂ 的条件下加入纯化后的 β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯,抽真空后封管,聚合 3 天,聚合物溶于丙酮,加入 20 倍丙酮体积的乙醇沉淀出固体,真空干燥即得 β - 聚苹果酸苄基酯。以 L- 天冬氨酸为原料制得的聚合物为 PMLABz-1, 以 L- 苹果酸为原料制得的聚合物为 PMLABz-2。

1.2.3 β - 聚苹果酸的合成 β - 聚苹果酸苄基酯溶于二氧六环后,加入 10 % 钯碳通氢气脱苄基,反应 24 h 后过滤钯碳,浓缩滤液,用乙醚沉淀出 β - 聚苹果酸,真空干燥后得终产物。

1.2.4 聚合物结构与性质表征 采用红外光谱和核磁共振图谱对化合物结构进行表征;利用 X 射线衍射仪和差示扫描量热仪对材料的性质进行表征。

1.2.5 PMLABz 的降解研究 分别称取 1 g PMLABz-1 和 PMLABz-2 样品于透析袋中, 以 pH 7.4 的缓冲盐为介质,在 37 °C、50 °C 下恒温搅拌, 一定时间间隔下称量样品的质量并计算它的降解率。

1.2.6 PMLABz 的细胞毒性研究 将制备好的聚苹果酸苄基酯材料浸泡于培养液中,放置于 37 °C 恒温箱,将对数生长期的 L929 细胞种到 96 孔板中, 在恒温箱中培育 12 h 后除去培养基,加入不同浓度(0.2 mg/mL-2 mg/mL)的浸出液至培养板中,每孔 100 μ L,每孔设三个复孔并设空白对照,继续培养 48 h,每孔加入 MTT (5 mg/mL)继续培养 4 h,再加入 150 μ L DM-SO,用酶标仪在 490 nm 的波长下测每孔 OD 值,存活率(%)=[实验组 OD 值 / 对照组 OD 值] $\times$ 100 %。

1.2.7 部分氢化产物 PMLABe_{100-x}H_x 的制备 干燥好的 1 g 聚苹果酸苄基酯溶于 20 mL 二氧六环,加入 0.4 g 5 % 钯碳,消耗一定体积的氢气后,过滤除去钯碳,浓缩后加乙醚沉淀,干燥得产物,制备了 PMLABe₄₅H₅₅、PMLABe₂₃H₇₇ 和 PMLABe₁₇H₈₃ 三种聚合物。

1.2.8 部分氢化产物 PMLABe_{100-x}H_x 的结构表征 通过 1H NMR 表征 PMLABz 的结构和氢化程度。

1.2.9 PMLABe_{100-x}H_x 纳米粒的制备与表征 分别称取 PMLABe₄₅H₅₅、PMLABe₂₃H₇₇ 和 PMLABe₁₇H₈₃ 各 1 mg 溶于 1 mL DMSO 中,在冰水浴中,磁力搅拌下滴加等体积的去离子水,然后将其转移到分子量为 1000 的透析袋中,去离子水中透析 24 h,制备空白胶束。动态光散射测定纳米粒的粒径,透射电镜观察纳米粒的形态。

1.2.10 统计学分析 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,组间比较 t 检验。在 PMLABz 的降解研究中,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$,有统计学意义。PMLABz 的细胞毒性研究中,数据无统计学差异,但有生物学意义。

2 结果

2.1 β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯与 β - 聚苹果酸的制备

本试验通过 L- 天冬氨酸和 L- 苹果酸两种原料成功合成关键中间产物 β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯,参考课题组前期工作和文献报道的合成方法加以改进, β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯作为单体在引发剂苯甲酸四乙基铵的作用下通过阴离子开环聚合反应制备 β - 聚苹果酸苄基酯。 β - 聚苹果酸苄基酯在钯碳作为催化剂的条件下氢化脱苄基制备 β - 聚苹果酸。合成路线如图 1。

2.2 结构表征

β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯的红外及核磁图谱表明单体的成功合成, 红外图谱中 1840 cm⁻¹ 为内酯 C=O 的伸缩振动峰,见图 2A。核磁氢谱中 3.55-3.80 ppm m 为内酯环中亚甲基质子峰,4.85-4.9 ppm m 为内酯环中次甲基质子峰,5.28 ppm s 为

甲基的亚甲基质子峰, 7.47 ppm m 为苯环的质子峰, 见图 2B。图 2C 中对比 PMLABz 和 PMLA 的红外图谱, 均在 1743 cm^{-1} 处出现羰基的特征峰, PMLA 的红外图谱中位于 600-800 cm^{-1} 间苯环上的特征吸收消失, 3451 cm^{-1} 附近的羧基的振动峰明显增强, 说明目标物成功合成。图 2D 中 2.8-3.1 ppm m 处为 PMLA 主链上亚甲基质子峰, 5.2-5.4 ppm m 为主链上次甲基质子峰。单体旋光度的测定: MLABz-1 $\alpha_{25}^D = +0.024$ ($c = 1 \text{ g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$, 二氧六环); MLABz-2 $\alpha_{25}^D = +5.8$ ($c = 1 \text{ g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$, 二氧六环)。

2.3 PMLABz 的性质表征

X 射线衍射结果如图 3A 所示,PMLABz-1 内部原子或分子的排列无周期性,是一个无定形体,PMLABz-2 有明显的衍射峰,内部分子排列更加规整,外观为坚硬固体。差示扫描量热结果如图 3B 所示,PMLABz-1 与 PMLABz-2 的熔点分别为 74 °C 和 190 °C,热分解温度均在 300 °C 左右。利用元素分析仪分析试样中 C、H、O 三种元素所占的比重,结果如表 1 所示。

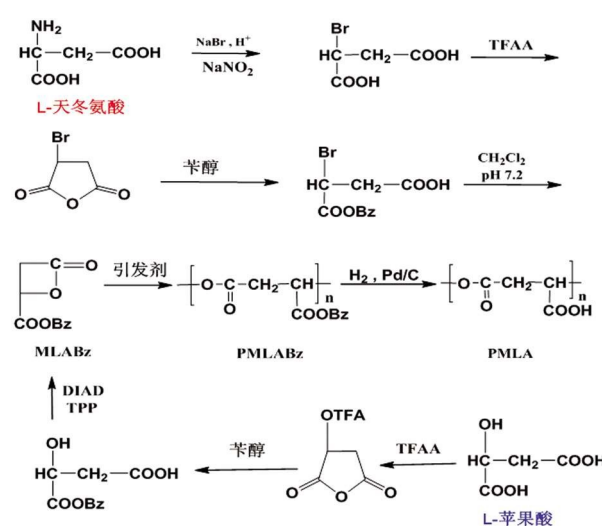


图 1 β -聚苹果酸的合成路线
Fig.1 Synthesis routes of PMLA

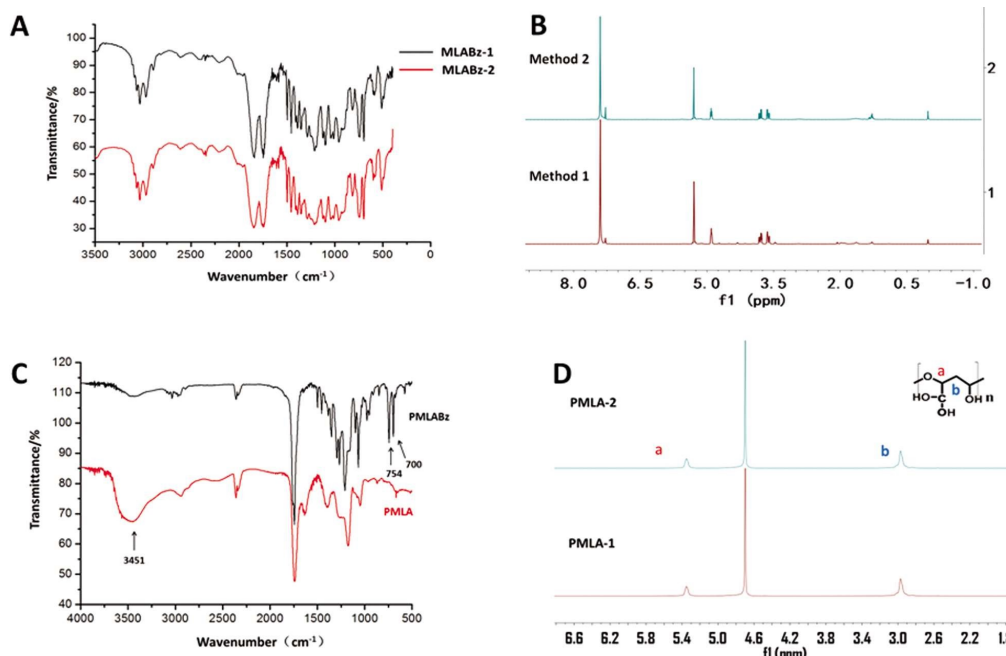


图 2 化合物结构表征 (A. β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯红外图谱 B. β - 苄氧羰基 - β - 丙内酯核磁共振氢谱 C. PMLA 和 PMLABz 红外图谱 D. PMLA 核磁共振氢谱)

Fig. 2 Structural characterization for compounds (A. FTIR spectrum of MLABz, B. ¹H NMR spectrum of MLABz, C. FTIR spectrum of PMLA and PMLABz, D. ¹H NMR spectrum of PMLA)

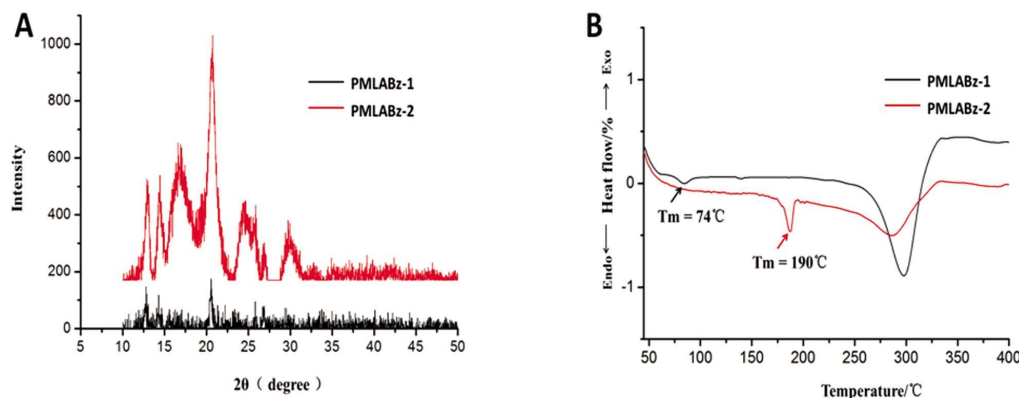


图 3 PMLABz 的 X-RD 图谱(A)和 DSC 曲线(B)

Fig. 3 A. X-Ray Diffraction spectrum of PMABz, B. DSC spectrum of PMLABz

表 1 聚苹果酸苄基酯元素组成分析

Table 1 The composition of C, H and O in PMLABz

样品	质量(mg)	C(%)	H(%)	O(%)
PMLABz-1	3.12	62.74	4.90	32.36
PMLABz-2	2.22	63.76	4.97	31.27

2.4 PMLABz 的降解研究

PMLABz 的降解在 37℃ 和 50℃ 的 PBS 缓冲体系中分别进行,降解曲线如图 4 所示,降解 100 天后,37℃ 下 PMLABz-1 和 PMLABz-2 的降解速率分别为 40.4 % 和 8.3 %,50℃ 下 PM-

LABz-1 和 PMLABz-2 的降解速率分别为 71.9 % 和 15.3 %,结果表明由于结晶度的提高,PMLABz-2 在生理环境下的降解明显慢于 PMLABz-1,降解速率随温度的升高而加快($P < 0.05$)。

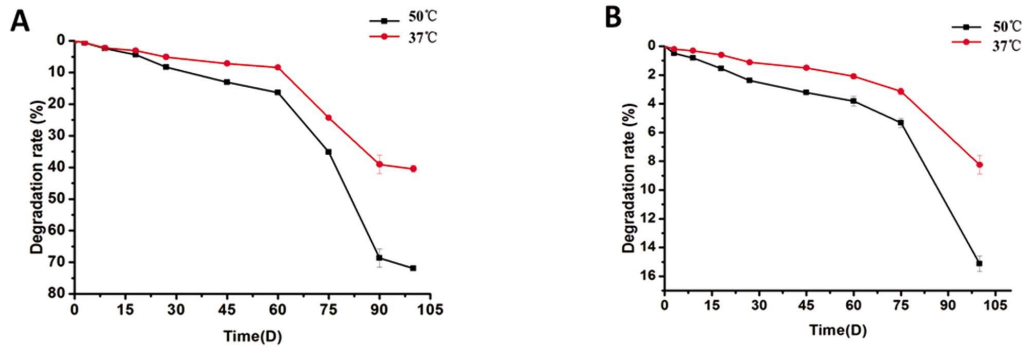


图 4 37℃ 和 50℃ 缓冲液中 PMLABz 的降解曲线(A. PMLABz-1 B. PMLABz-2)

Fig.4 Degradation of PMLABz at different temperature (A. PMLABz-1 B. PMLABz-2)

2.5 PMLABz 的细胞毒性研究

MTT 实验检测 PMLABz 的细胞毒性(如图 5),结果表明该聚合物没有明显的细胞毒性($P > 0.05$),表明其可作为抗肿瘤药物载体。

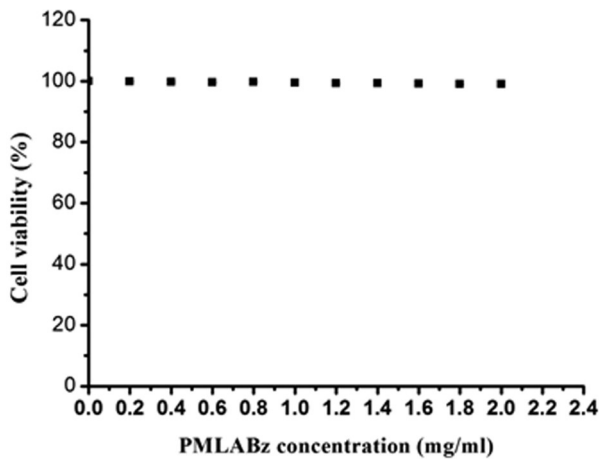


图 5 PMLABz 的细胞毒性实验

Fig. 5 Cell viability after exposure to PMLABz at various concentrations

2.6 PMLABe_{100-x}H_x 纳米胶束性质

通过核磁图谱上苄基的亚甲基氢与主链亚甲基氢的比值来确定氢化程度,用氢化程度分别为 55 %、77 % 和 83 % 的三种不同聚合物通过透析法制备纳米胶束,其形貌与粒径分布如图 6 所示。结果表明部分氢化的 PMLABz 具有两亲性,可在水中自组装成一定粒径的纳米胶束,采用动态光散射测得三组纳米胶束粒径分别为 177.6 nm、111.6 nm 和 127.3 nm,透射电镜结果表明 PMLABz 氢化程度为 77 % 左右时,形成的纳米粒形态良好,分布较均匀,为包载疏水性药物提供可能。

3 讨论

近年来,应用于生物医学领域的生物可降解高分子聚合物不断涌现^[9],聚乳酸、聚谷氨酸、聚乙二醇等已被大量文献报道可作为药物载体来提高药物的生物利用度^[10-13],但在实际使用中上述载体材料出现了水溶性差、可修饰基团少等缺点,限制了它们在药物载体领域的应用。聚苹果酸是水溶性脂肪族聚酯,具有良好的生物相容性和生物降解性^[2],其在生理条件下的相对高自发降解速率和免疫惰性使它成为优于上述高分子材

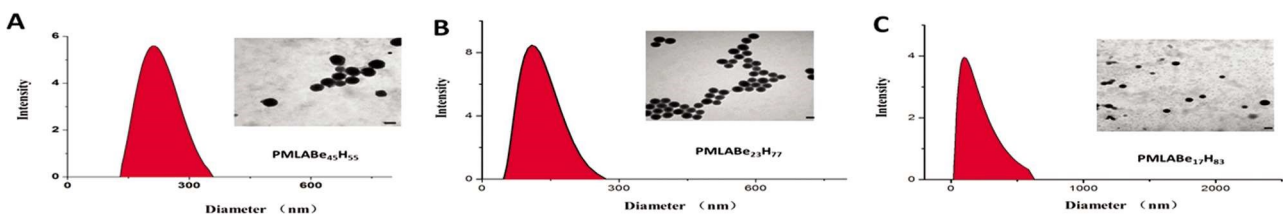


图 6 PMLABe_{100-x}H_x 纳米粒的表征(标尺为 100 nm)

注:A. PMLABe₄₅H₅₅, B. PMLABe₂₃H₇₇, C. PMLABe₁₇H₈₃。

Fig. 6 DLS and TEM results of partial hydrogenolysis for PMLABz (the scale bar is 100 nm)

Note: A. PMLABe₄₅H₅₅, B. PMLABe₂₃H₇₇, C. PMLABe₁₇H₈₃.

料的新型药物载体^[14-17],此外,聚苹果酸侧链上具有悬挂羧基,可同时携带多种生物活性分子^[18-21]。同时,合成聚苹果酸的中间体 β - 苄氧羰基- β - 丙内酯可与不同的单体共聚得到改性共聚物^[22,23],如与己内酯共聚可制得功能化可曝光成像的材料^[24],与丙交酯共聚可制得可生物降解的组织工程材料等^[3]。

尽管聚苹果酸具有很多优越的性能,但其合成研究的很少,大量文献报道的都是以 L- 天冬氨酸为原料制备聚苹果酸,路线长、产率低,限制了它的应用。本研究以 L- 苹果酸为原料合成关键中间体 β - 苄氧羰基- β - 丙内酯的终产率为 31.5 %,对比 L- 天冬氨酸的合成路线,产率提高近 7 倍,单体进一步通过阴离子开环聚合反应制备 PMLABz,结果发现通过两种不同方法合成的单体聚合后的 PMLABz 有明显的性质差异,X-RD 结果表明以 L- 苹果酸为原料得到的 PMLABz-2 有明显的衍射峰,DSC 图谱表明随着结晶度的提高,聚合物的熔点也提高,MTT 实验结果表明该聚合物没有明显的毒性。在制备 PMLA 时,由于 PMLABz-2 的溶解性差,氢化时需升高温度反应。聚苹果酸的降解、载药性能等已被文献报道,对于它的中间体聚苹果酸苄基酯的研究却很少,所以本试验对聚苹果酸苄基酯的纳米载药性能进行了评价。通过部分氢化 PMLABz 制备两亲性聚合物,结果表明该聚合物可在水中自组装成一定粒径的胶束,氢化 77 %的 PMLABz 可得到粒径均匀、形态良好的纳米胶束,为包封疏水性药物提供可能,且保留的苯环还可与携带苯环的药物分子进行 π - π 堆积作用,提高药物的生物利用度。综上所述,本研究以 L- 苹果酸为原料制备聚苹果酸步骤短,产率高,更快速经济,部分氢化的聚苹果酸苄基酯的研究为其在纳米药物载体上的应用提供了重要的工作基础。

参考文献(References)

- [1] Wang L, Neoh, KG, Kang ET, et al. Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/ poly (dl-lactic acid-co- α , β -malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(13): 3502-3511
- [2] Ding H, Gustavo H, José A. R, et al. Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer [J]. *J Controlled Release*, 2013, 171(3): 322-329
- [3] He B, Wan YQ, Bei JZ. et al. Synthesis and cell affinity of functionalized poly (l-lactide-co- β -malic acid) with high molecular weight[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(22): 5239-5247
- [4] Huang ZW, Véronique L, Ghizlane C, et al. New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly (malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2012, 423(1): 84-92
- [5] Loyer P, Cammas-Marion. Natural and synthetic poly (malic acid)-based derivatives: a family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers[J]. *J Drug Target*, 2014, 22(7): 556-575
- [6] Pennapa M, Christopher D. S, Stephen W. P, et al. Poly(β -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(1): 125-132
- [7] Sandrine C, Isabelle R, Valérie L, et al. Poly (β -malic acid): obtaining high molecular weights by improvement of the synthesis route [J]. *Polymer*, 1996, 37(18): 4215-4220
- [8] Qiao YB, Duan X, Fan L, et al. Synthesis of controlled molecular weight poly (β -malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier[J]. *J Polym Res*, 2014, 21(4): 397-405
- [9] Ruairi P. B, Andrew P. D. Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates[J]. *Biomater Sci*, 2016, 5(1): 9-21
- [10] Taghavi S, Ramezani M, Alibolandi M, et al. Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery[J]. *Cancer Lett*, 2017, 400: 1-8
- [11] Giarra S, Serri C, Russo L, et al. Spontaneous arrangement of a tumor targeting hyaluronic acid shell on irinotecan loaded PLGA nanoparticles[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 140: 400-407
- [12] Jelonek K, Li SM, Kaczmarczyk B, et al. Multidrug PLA-PEG filomicelles for concurrent delivery of anticancer drugs-The influence of drug-drug and drug-polymer interactions on drug loading and release properties[J]. *Int J Pharm*, 2016, 510(1): 365-374
- [13] Tan F, Mo XH, Zhao J, et al. A novel delivery vector for targeted delivery of the antiangiogenic drug paclitaxel to angiogenic blood vessels: TLTYTWS-conjugated PEG-PLA nanoparticles [J]. *J Nanopart Res*, 2017, 19(2): 1388-0764
- [14] Ljubimova JY, Portilla-Arias J, Patil R, et al. Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment [J]. *J Drug Targets*, 2013, 21: 956-967
- [15] Zhou Q, Hou YL, Zhang L, et al. Dual-pH Sensitive Charge-reversal Nanocomplex for Tumor-targeted Drug Delivery with Enhanced Anti-cancer Activity[J]. *Theranostics*, 2017, 7(7): 1806-1819
- [16] Zhou Q, Yang TH, Qiao YB, et al. Preparation of poly(β -L-malic acid)-based charge-conversional nanoconjugates for tumor-specific uptake and cellular delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 1941-1952
- [17] Ding H, Portilla-Arias J, Patil R, et al. Distinct mechanisms of membrane permeation induced by two poly malic acid copolymers[J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 217-225
- [18] Nivishna V, Pascal L, Sandrine CM, et al. Poly (malic acid) bearing Doxorubicin and N-Acetyl Galactosamine as a site-specific prodrug for targeting hepatocellular carcinoma [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2017, 28(10-12): 1140-1157
- [19] Caruelle, JP, Barritault D, Jeanbat-Mimaud V, et al. Bioactive functionalized polymer of malic acid for bone repair and muscle regeneration[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2000, 11(9): 979-991
- [20] Patil R, Portilla-Arias J, Ding H, et al. Temozolomide delivery to tumor cells by a multifunctional nano vehicle based on poly(β -L-malic acid)[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(11): 2317-2329
- [21] Yang TH, Li W, Duan X. Preparation of Two Types of Polymeric Micelles Based on Poly (β -L-Malic Acid) for Antitumor Drug Delivery [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(9): 1-18
- [22] Wang J, Zhang YN, Zhang M, et al. Preparation and pH controlled release of polyelectrolyte complex of poly (l-malic acid-co-d,l-lactic acid) and chitosan [J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2014, 115: 275-279
- [23] 崔明凤,郭松岩,周青,等.新型生物材料聚(β - 苹果酸 -co- β - 羟基丁酸酯)的合成和结构表征[J]. *材料导报*, 2015, 2: 224-228
- [24] Cui Ming-feng, Guo Song-Yan, Zhou Qing, et al. Synthesis and Structural Characterization of New Biological Materials Poly (β -malic acid-co- β -butyrolactone)[J]. *Materials Review*, 2015, 2: 224-228
- [24] He B, M.B. Chan-Park. Synthesis and Characterization of Functionalizable and Photopatternable Poly (ϵ -caprolactone-co-RS- β -malic acid) [J]. *Macromolecules*, 2005, 38(20): 8227-8234