

叶酸介导的普鲁兰多糖 - 阿霉素聚合物前药的制备及生物学性能初探 *

张海涛 李 飞 范 黎 乔有备 陶阳春 成 冲 吴 红[△]

(第四军医大学药学院化学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 制备叶酸介导的普鲁兰多糖 - 阿霉素聚合物前药 (FA-MP-DOX), 实现阿霉素药物的靶向控制释放。方法 将普鲁兰多糖用马来酸酐进行修饰后, 通过酰胺键键合阿霉素制备得到普鲁兰多糖 - 阿霉素 (MP-DOX), 继而酯键键合叶酸制备得到叶酸介导的普鲁兰多糖 - 阿霉素聚合物前药 (FA-MP-DOX)。红外光谱、核磁共振光谱表征聚合物药物的结构, 动态透析法模拟体外释药特性, 监测不同 pH 值聚合物药物中阿霉素的释药特性, 同时采用人口腔表皮样癌细胞 (KB 细胞) 测定聚合物药物体系的细胞毒性。结果 ①经核磁共振表征 FA-MP-DOX 聚合物合成完成。②在 pH 2.5、pH 5.0 及 pH 7.4 的 PBS 缓冲体系 16h 中, 阿霉素药物累积释放率分别为 49.1%、30.3%和 15.3%, 证实 FA-MP-DOX 中阿霉素的释放具有 pH 依赖性。③细胞实验证实 FA-MP-DOX 的细胞毒性高于阿霉素和 MP-DOX。结论 FA-MP-DOX 聚合物药物有望成为阿霉素智能型控释和靶向性药物载体。

关键词 聚合物药物 阿霉素 叶酸 主动靶向

中图分类号 R944.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 09-1634-05

Prodrug of Folate-mediated Pullulan - doxorubicin Polymer: Preparation, Characterization and Biological Evaluation*

ZHANG Hai-tao, LI Fei, FAN Li, QIAO You-bei, TAO Yang-chun, CHENG Chong, WU Hong[△]

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

ABSTRACT Objective: To prepare A novel folate-decorated maleilated pullulan-doxorubicin conjugate (abbreviated as FA-MP-DOX) for targeted releasing. **Methods:** The structure of this conjugate was confirmed by 1H-NMR. Furthermore, the conjugation efficiency, drug release property and stability of the conjugate were determined. The cellular uptake and cytotoxicity were assessed by using human oral epidermoid carcinoma KB cells as in vitro cell model. **Results:** ① The conjugates were prepared successfully. ② In vitro DOX release from FA-MP-DOX conjugate occurred at a faster rate at acidic pH compared with neutral pH (7.4), the released free DOX after 16 h of incubation at pH 2.5, 5.0 and 7.4 was 49.1%, 30.3% and 15.3%, respectively. ③The FA-MP-DOX conjugates were much more toxic against KB cells, compared with either free DOX or MP-DOX conjugate(P<0.05). **Conclusion:** FA-MP-DOX conjugate could be used as a promising doxorubicin carrier for its targeted and intracellular delivery.

Key words: Polymeric drug; Doxorubicin; Folic acid; Active targeting

Chinese Library Classification:R944.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)09-1634-05

前言

1975 年, Ringsdorf H 首次提出聚合物前药及聚合物 - 药物复合物的概念, 并在此基础上确立了 "Piggy back 细胞摄粒" 导向机理^[1]。近来, 研究者通过在同一载体上键合多个靶向基团的方法, 减少载体药物对正常组织的影响, 使药物只在病患处释放 (图 1)。在聚合物骨架上通过引入适宜的基团键合上一些难溶性的药物, 以增加其溶解度。在间隔臂作用下, 使药物达到缓释的效果^[2-4]。靶向给药系统能在特异组织或细胞内释放药物。低分子量药物可通过扩散进入细胞, 而高分子聚合物药物通过胞饮作用进入细胞。因为它可以改变与蛋白质的结合以及细胞的特异相互作用, 从而改变了药物的体内分布^[5-6]。本研究采用马来酰化普鲁兰多糖 (Maleilated Pullulan; MP) 为聚合物主链, 通过酰胺键键合阿霉素 (Doxorubicin; DOX), 改善其溶解

性能, 再通过键合叶酸 (Folic Acid; FA) 提高聚合物药物的主动靶向性, 探讨该聚合物药物 FA-MP-DOX 体系的智能释药特性, 为开发抗肿瘤药物的靶向释药系统奠定理论基础。

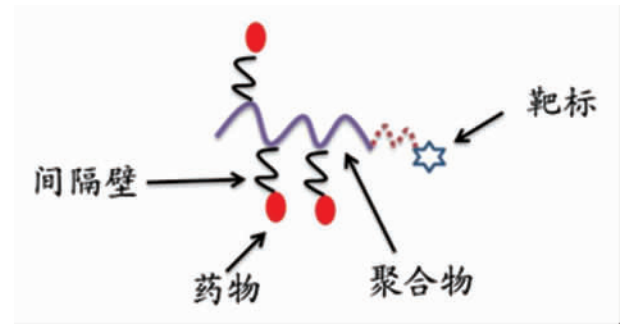


图 1 聚合物药物模型
Fig.1 The model of polymer-drug

* 基金项目 国家自然科学基金 (No 30770573, No.30970788)

作者简介 张海涛 (1983), 男, 硕士研究生, 主要研究方向 聚合物药物载体。Tel:15102972629, E-mail: zht119zht@126.com

[△]通讯作者 吴红, 电话 029-84774473, E-mail: hongwuxa@hotmail.com

(收稿日期 2010-12-28 接受日期 2011-01-23)

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

普鲁兰多糖 MW 120 000，由上海普奥生物科技有限公司提供；叶酸、阿霉素、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳酰二胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N-二甲氨基吡啶(DMAP)，马来酸酐等均购自 Sigma 和 Acros；三乙胺(TEA)由天津市博迪化工有限公司提供；其他试剂均由西安试剂厂提供；紫外分光光度计(BECKMAN DU640)、冻干机(Virtis SP TechCare)、油电二用恒温培养箱、真空干燥箱(大连第四仪表厂)、恒温水浴锅、DF-II 型集热式磁力搅拌器(江苏金坛)；核磁共振仪(Avance DMX500, Bruker 公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 马来酸化普鲁兰多糖(MP)的合成^[7]

(1) 反应时间的影响 称 1.62g (0.03mol-OH) 普鲁兰多糖溶于 20ml 10%的 LiCl/DMF,通氮,90℃溶解,降温至 40℃,依次加入 43μL (0.0003mol) 三乙胺,2.94g (0.03mol) 马来酸酐,反应时间分别为 2h、8h、16h、20h 和 24h。反应结束后,用异丙醇重结晶,抽滤得到白色沉淀。用少量蒸馏水溶解后,透析除去杂质,经冷冻干燥得白色固体。酸碱中和滴定法测定马来酸酐取代度(Degree of Substitution ;DS,每一百个葡萄糖单元中被马来酸酐取代的数目)。

(2) 反应温度的影响 按 1.2.1.1,将反应温度分别控制在 50℃、60℃ 和 70℃,反应时间为 20h。其它步骤不变测马来酸酐取代度。

(3) 催化剂三乙胺用量的影响 按 1.2.1.1 中的表述,将催化剂用量依次改为 0.0006mol、0.0009mol 和 0.0012mol,温度为 60℃,其他条件和步骤相同。

(4) 马来酸酐用量的影响 称取 1.62g (0.03mol-OH) 普鲁兰多糖,分别与 5.88g (0.06mol)、8.82g (0.09mol) 和 11.76g (0.12mol) 马来酸酐反应,三乙胺用量为马来酸酐的 3%,温度为 60℃,其它步骤与 1.2.1.1 相同。

1.2.2 马来酰化普鲁兰多糖-阿霉素(MP-DOX)的制备 称取 0.0212gMP (含 0.0001mol-COOH) 和 0.0543g (0.0001mol) DOX 溶于 10ml 无水 DMSO 中,然后依次加入 0.023g NHS,0.038gEDC oHCl 和 27.7μL TEA,氮气保护室温下避光反应 24h。反应后的溶液在 DMSO 中透析 24h 除去未反应的阿霉素,然后再用蒸馏水透析 24h 除去 DMSO 和其它杂质。最后将透析后的溶液冷冻干燥,得红色固体。用荧光光度法测定所得产品中阿霉素的含量。

1.2.3 叶酸-普鲁兰多糖-阿霉素(FA-MP-DOX)的制备 将 2.22g (0.005mol) FA 和 1.13g (0.005mol) MP-DOX 溶于 15ml 无水 DMSO 中,然后依次加入 1.15g (0.01mol) NHS、1.92g

(0.01mol)EDC oHCl 和 0.72ml(0.005mol) TEA,氮气保护,室温下避光反应 24h。反应后的溶液用蒸馏水透析两天,将透析袋内的溶液冷冻干燥。并将透析外液收集,用紫外分光光度计在 280nm 处测定透析液中叶酸的含量^[8,9],通过以下公式计算 FA-MP-DOX 中叶酸的含量:

$$wt\% = \frac{W_{\text{叶酸总质量}} - W_{\text{未键合叶酸的质量}}}{W_{\text{FA-MP-DOX}}} \times 100\%$$

1.2.4 结构表征 以 DMSO-d6 为溶剂,通过 1H-NMR 表征 MP、MP-DOX 和 FA-MP-DOX 的结构。

1.2.5 FA-MP-DOX 的体外释药研究 准确称量三份 20mg FA-MP-DOX 溶于透析袋内,分别以 200ml pH 为 2.5、5.0、7.4 的缓冲液为释放介质,100 rpm 搅拌。设定的时间间隔内用移液管取出 3.0 mL,同时补进同体积的相应缓冲溶液。释放出的药物浓度用荧光分光光度计在波长 480nm 处测定。

1.2.6 FA-MP-DOX 细胞毒性研究 将对数生长期的 KB 细胞制成 1×10⁴/mL 的细胞悬液,按每孔 200μL 接种到 96 孔板上,分别加入不同药物浓度 (0.01mg/L-75mg/L) 的阿霉素和 FA-MP-DOX 溶液,每种浓度设 3 个复孔,并设空白对照。48h 后用 MTT 法测定不同浓度的药物对细胞的抑制率:细胞抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准差(̄X±S)表示,用 SPSS13.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 α=0.05,P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 马来酸化普鲁兰多糖(MP)的合成

酸碱中和滴定法测定马来酸酐取代度,并以此作为判断最佳反应条件的标准。反应时间为 20h 时,取代度为 27,延长至 24h,取代度仅增加到 28,继续延长反应时间,取代度没有很大的变化(表 1)。反应温度由 40℃升至 60℃时,DS 随温度升高而增大。但是当温度继续升高至 70℃时,产物的取代度降低,推测是由于三乙胺的沸点较低(80℃),温度过高导致三乙胺挥发,从而影响催化效率(表 2)。同时实验中还监测了催化剂的量对产物的影响。从表 3 数据可以看出,当三乙胺用量有 1%增到 3%时,取代度由 33 升到 42 明显增大。但是催化剂用量高于 3%时,DS 并没有显著变化。表 4 是反应配比对取代度的影响,其研究结果表明普鲁兰多糖中的羟基与马来酸酐的摩尔比为 1:3 时取代度最大为 51,继续增大马来酸酐用量 DS 没有显著增大。因此综合反应时间、反应温度、催化剂及反应配比等各方面的因素,确定最佳反应条件为普鲁兰多糖的羟基与马来酸酐的物质的量比为 1:3,催化剂为 MA 物质的量的 3%,反应温度 60℃,反应时间为 24 小时(表 1-4)。

表 1 反应时间对取代度的影响

Table 1 The effect of reaction time on DS

n(-OH)/mol	n(MA)/mol	反应时间(小时)	取代度(DS)
0.03	0.03	8	12
0.03	0.03	16	23
0.03	0.03	20	27
0.03	0.03	24	28

表 2 反应温度对取代度的影响

Table 2 The effect of reaction temperature on DS

n(-OH)/mol	n(MA)/mol	反应温度	取代度 (DS)
0.03	0.03	40	27
0.03	0.03	50	31
0.03	0.03	60	33
0.03	0.03	70	30

表 3 催化剂用量对取代度的影响

Table 3 The effect of amount of catalyst on DS

n(-OH)/mol	n(MA)/mol	TEA/mol	取代度 (DS)
0.03	0.03	0.0003	33
0.03	0.03	0.0006	38
0.03	0.03	0.0009	42
0.03	0.03	0.0012	42

表 4 反应配比对取代度的影响

Table 4 The effect of molar ratio of maleic anhydride to hydroxyl group of pullulan on DS

n(-OH)/mol	n(MA)/mol	TEA/mol	取代度 (DS)
0.03	0.03	0.0009	42
0.03	0.06	0.0018	47
0.03	0.09	0.0027	51
0.03	0.12	0.0036	51

为了提高载药率，本研究中选择 DS 最大的 MP 为原料。之后在 EDC/NHS 的催化作用下，通过酰胺键键合上阿霉素，利用酯键将叶酸键合在改性的普鲁兰多糖的主链上得到 FA-MP-DOX 聚合物药物。荧光法测定该体系中阿霉素含量分别为 8.9%。紫外分光光度计测定叶酸的含量为 1.7%。具体合成路线如图 2 所示。

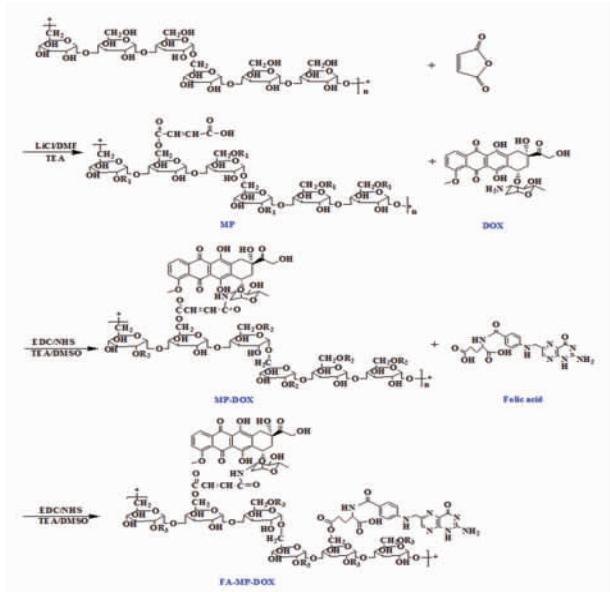


图 2 FA-MP-DOX 的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of FA-MP-DOX

2.2 结构表征

马来酰化普鲁兰多糖 (MP) 1HNMR 图谱中，图 3 b 中 6-7ppm 的峰对应于 MP 中双键上的氢,4.5-6.0ppm 对应马来酰化普鲁兰多糖上的羟基氢峰。图 3c 的 13.01ppm 和 14.00ppm 处和图 3d 的 6.7-8.5ppm 处中分别出现了阿霉素和叶酸的吸收峰,证实一系列目标产物的生成。

制备的 FA-MP-DOX 是水溶性的，并且放置在 4℃ 的 pH 7.4 的缓冲液中 24h 后,仅有约 1% 的阿霉素释放,三个月后测定,游离阿霉素的含量仅为 10%,证实该体系的稳定性良好。

2.3 FA-MP-DOX 的体外释药研究

FA-MP-DOX 在不同 pH、温度为 37℃ 的释药曲线如图 4 所示。在 pH 2.5、pH 5.0 及 pH 7.4 的 PBS 缓冲体系 16h 中,阿霉素药物累积释放率分别为 49.1%,30.3%和 15.3%,随着 pH 的增大,释药率有明显差异,且逐渐变小。表明该体系的释药具有 pH 依赖性 在生理 pH (pH7.4) 时,药物释放很少,能够很好的保护药物。一旦外界环境中的 pH 发生变化 (减小),可以有选择性的释放药物或发生降解,基于这种作用,可以用于抗肿瘤药物的靶向释放。

2.4 FA-MP-DOX 的细胞毒性研究

图 5 所示,MP-DOX 和 DOX 的细胞毒性相似，但其 IC50 值偏大,这是因为大分子入胞遵循内吞机制,相较于阿霉素的扩散较慢。但是 FA-MP-DOX 由于叶酸的存在,使其能够更多的被叶酸受体高表达的肿瘤细胞所吸附,进入细胞内阿霉素的药物浓度较大,因此相对于前两者,入胞效率最高,细胞毒性最

大。同时,研究中对 FA-MP 的细胞毒性进行了同样的 MTT 实验,结果显示,该载体没有明显的毒性(数据略)。因此证实 FA-MP-DOX 确实增强了阿霉素药物细胞毒性,但是这种效用的产生并不是来自于 FA-MP 载体。

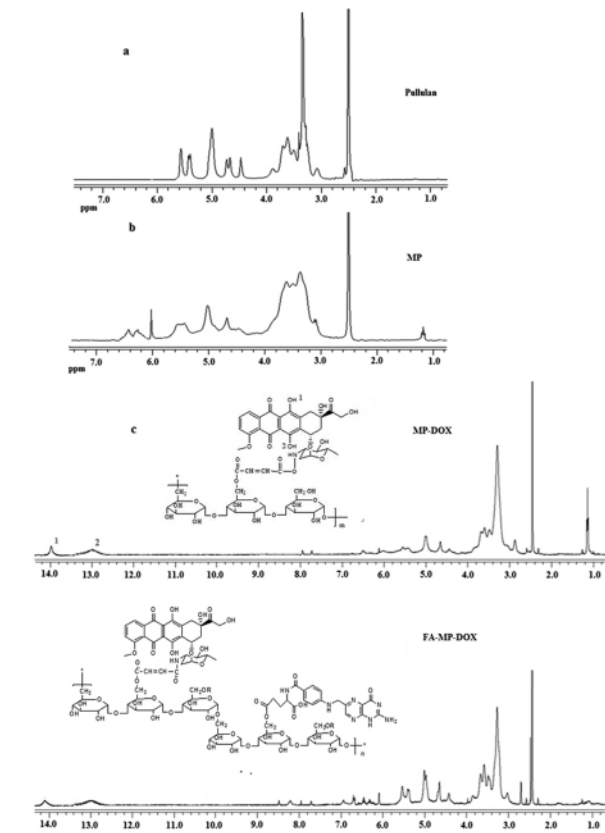


图 3 Pullulan (a),MP(b),MP-DOX(c) and FA-MP-DOX (d)的核磁图
Fig. 3 ¹H-NMR spectrum of pullulan (a),MP(b),MP-DOX(c) and FA-MP-DOX (d)

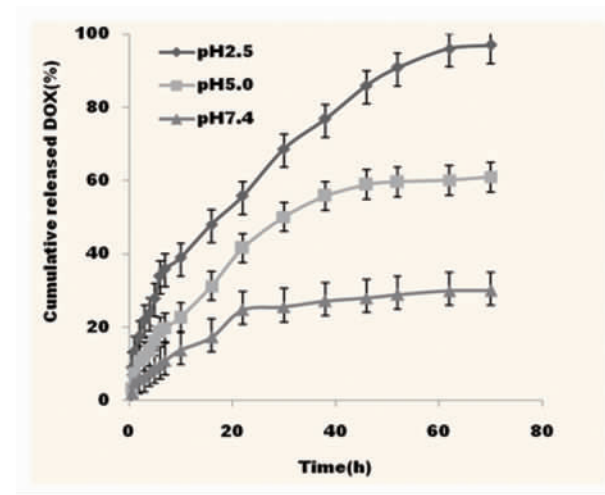


图 4 在 37℃不同缓冲液中的释药曲线
Fig.4 Cumulate release profile of FA-MP-DOX under different buffer at 37℃

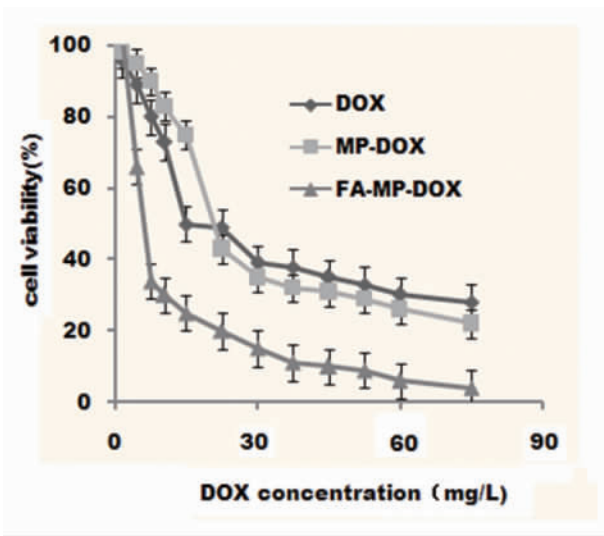


图 5 DOX, MP-DOX, and FA-MP-DOX 的细胞毒性
Fig.5 Viability of KB cells after exposure to free DOX, MP-DOX, and FA-MP-DOX conjugate at various drug concentrations at 37°C for 48h (p<0.05)

3 讨论

在过去的十年中,随着生命科学和高分子科学的交叉发展,越来越多的具有良好生物相容性和降解性的高分子聚合物出现并被应用到药物研发领域,高分子材料已逐渐由辅助作用向主导地位转变,形成具有特征的高分子聚合物药,为药物的发展提供了更为广阔的空间。一些传统的小分子药物和蛋白类药物,以抗肿瘤药物为例,如紫杉醇、喜树碱、L-天门冬酰胺酶等,具有优良的抗肿瘤活性,但由于水溶性差,毒性高,在人体内易被酶代谢失活等不足,使得这些药物在临床应用中受到了一定的限制。聚合物药物的出现,为这些药物的临床应用带来了新的契机^[10]。目前研究最多的聚合物载体为取代的丙烯酸,N-(2-羟基)异丁烯酰胺(HPMA)等,其中以HPMA为载体制备的DOX-HPMA聚合物药物在动物体内已经表现出了良好的控释和缓释性^[11-13]。但是这类载体同样存在着体内不能降解等缺点。近年来,天然高分子多糖作为药物载体的研究得到了人们的广泛关注^[14],多糖(如葡聚糖、普鲁兰多糖和壳聚糖等)具有良好的生物相容性、降解性、无免疫原性等优点。国内已有用普鲁兰多糖为载体制备纳米胶束包裹抗癌药物的报道^[15-16],但存在封装率低以及在体内运输过程中药物易渗漏等缺点。因此本研究中采用普鲁兰多糖为载体,酰胺键键合上抗肿瘤药物阿霉素制备成聚合物药物MP-DOX,继而将叶酸与聚合物药物键合,提高聚合物药的靶向性,降低药物的对正常组织的毒副作用,以期达到控释和靶向双重目的。通过体外释药和细胞毒性研究,我们发现阿霉素释放具有pH依赖性,在生理pH时能够较少的释放药物,而在更酸性的环境下(pH2.5或pH5.0),阿霉素释放的较快,这种特性非常适用于抗肿瘤药物的靶向释放,因为实体瘤内部存在不同的酸性环境,包括细胞间质中的弱酸性环境(extracellular pH, pH_E)、癌细胞中内溶体和溶酶体中更强的酸性环境。肿瘤细胞中早期内溶体的pH值在6.0左右^[17,18],有的甚至低于5.4^[19],而晚期内溶体的pH值一般在5.0左右^[20],而

溶酶体(lysosome)的 pH 值(pHL)更低(4.0-5.0)^[21]。但是由于多药耐药性的存在,使得这种 pH 响应的释药体系入胞效率较低,因此通过键合叶酸等配体,可主动靶向到其受体高表达的肿瘤细胞表面,提高其入胞效率,发挥抗肿瘤药物的药效。细胞毒性试验表明 FA-MP-DOX 聚合物药物能够提高内吞效率,细胞抑制率明显增大,可有望成为一种阿霉素智能型控释和靶向性药物载体。

参考文献(References)

- [1] Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers [J]. Polym. Sci. Symp. 1975,5(1):135-153
- [2] Nogusa H, Yano T, Okuno S, Hamana H, Inoue K. Synthesis of carboxymethylpullulan-peptide-doxorubicin conjugates and their properties [J]. Chem Pharm Bull 1995, 43(11):1931-1936
- [3] Cao N, Feng SS. Doxorubicin conjugated to d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): Conjugation chemistry, characterization, in vitro and in vivo evaluation. Biomaterials 2008, 29:3856-3865
- [4] Chun C, Lee SM, Kim CW, Hong KY, Kim SY, Yang HK, et al. Doxorubicin-polyphosphazene conjugate hydrogels for locally controlled delivery of cancer therapeutics. Biomaterials, 2009; 30: 4752-4762
- [5] Sunamoto J, Ushio K, Lai DT. Folate-modified Cholesterolbearing Pullulan, a New Cancer-targeted Nanoparticle Drug Carrier [J]. Synthesis and their In Vitro Application [J]. Bioact. Compat. Pol, 2006, 21(6):603-617
- [6] Takakura Y, Mahoto RI, Hashida M. Extravasation of macromolecules [J]. Adv. Drug Deliv. Rev, 1998, 34: 93-108
- [7] Li F, Wu H, Fan L, et al. Study of dual responsive poly[(maleilated dextran)-graft- (N-isopropylacrylamide)] hydrogel nanoparticles: preparation, characterization and biological evaluation[J]. Polym. Int, 2009,58 (9):1023-1033
- [8] Zhang ZP, SH Lee, Feng SS. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. Biomaterials, 2007, 28:1889-1899
- [9] Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis [J]. Trends Food Sci Tech, 2005,16: 253-266
- [10] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream [J]. Science, 2004,303:1818-1822
- [11] Etrych T, Jelí nková M, Rí hová B, et al. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. J Control Release, 2001,73: 89-102
- [12] Sakuma S, Lu ZR, Kopeckova P, Kopecek J. Biorecognizable HPMA Copolymer-Drug Conjugates for Colon-Specific Delivery of 9-Aminocamptothecin. J Controlled Release, 2001,75:365-379
- [13] Chytil P, Etrych T, Konak C, Sirova M, Mrkvan T, Rihova B, et al. Properties of HPMA copolymer-doxorubicin conjugates with pH-controlled activation: effect of polymer chain modification. J Controlled Release, 2006, 115(1):26-36
- [14] Azzam T, Eliyahu H, Shapira L, Linial M, Barenholz Y, Domb AJ. Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery [J]. Med Chem, 2002,45(9):1817-1824
- [15] Zhang HZ, Gao FP, Liu LR, Li XM, Zhou ZM, Yang XD, Zhang QQ. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. Colloids and Surfaces B [J]. Biointerfaces, 2009,71: 19-26
- [16] Na, K., Lee, K. H., and Bae, Y. H. pH-Sensitivity and pH-dependent interior structure change of Self-assembled hydrogel nanoparticles of pullulan acetate/oligo-sulfonamide conjugate [J]. Journal of Controlled Release, 2004,97:513- 525
- [17] Stubbs M, McSheehy PMJ, Griffiths JR, et al. Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment [J]. Mol Med Today, 2000, 6: 15-19
- [18] Martin GR, Jain RK. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy [J]. Cancer Res, 1994, 54: 5670-5674
- [19] Murphy RF, Powers S, Cantor CR. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6 [J]. J Cell Biol, 1984, 98:1757-1762
- [20] Killisch I, Steinlein P, Romisch K, et al. Characterization of early and late endocytic compartments of the transferrin cycle: transferrin receptor antibody blocks erythroid differentiation by trapping the receptor in the early endosome [J]. J Cell Sci, 1992, 103: 211-232
- [21] Schmid S, Fuchs R, Kielian M, et al. Acidification of endosome subpopulations in wild-type Chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants [J]. J Cell Biol, 1989, 108: 1291-1300