

甲氨蝶呤-聚乙二醇偶联物的合成及其体外抗肿瘤活性

张剑锋^{1*}, 魏东芝², 周雄¹, 江峰¹

- (1. 新型功能材料及其制备科学国家重点实验室培育基地, 宁波大学材料科学与化学工程学院, 浙江宁波 315211;
2. 生物反应器工程国家重点实验室, 华东理工大学生物化学研究所, 上海 200237)

摘要: 为了改善甲氨蝶呤的溶解性能和生物学性能, 本工作在合成甲氨蝶呤-聚乙二醇偶联物的基础上, 考察了该偶联物的溶解性和体外抗肿瘤活性。通过采用微波催化与化学催化相结合的方法, 制备了新型甲氨蝶呤-聚乙二醇偶联物, 其结构得到了紫外、红外和核磁共振谱的确证。测定了偶联物在水中的溶解度及其在辛醇/水中的分配系数, 测得偶联物的水溶性和脂溶性均有明显增加, 在纯水中的溶解度提高了 128 倍, 分配系数提高了近 5 倍。以小鼠 L₁₂₁₀ 白血病细胞作为研究对象, 测定该偶联物的体外抗肿瘤活性, 结果表明, 偶联物的抗肿瘤活性与甲氨蝶呤基本接近。与文献相比, 该甲氨蝶呤的聚乙二醇修饰方法具有快捷、方便的特点。

关键词: 甲氨蝶呤; 聚乙二醇; 偶联物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)06-0607-04

Synthesis of methotrexate-poly(ethylene glycol) conjugate and their anti-tumor activity *in vitro*

ZHANG Jian-feng^{1*}, WEI Dong-zhi², ZHOU Xiong¹, JIANG Feng¹

- (1. State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Faculty of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Research Institute of Biochemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: To improve the physical property and bioactivity of methotrexate, this paper investigated the new formation of conjugate methotrexate-poly(ethylene glycol) and *in vitro* anti-tumor activity of the synthesized conjugate. The conjugate of methotrexate-poly(ethylene glycol), which was verified by the spectroscopy analysis of UV, IR and ¹³C NMR, was synthesized by chemical catalysis and micro-wave irradiation. The determination for the conjugate of solubility in water and distribution coefficient in octanol-water system of the conjugate was done to examine its deliquescence property. The solubility in water and the distribution coefficient of the conjugate was greatly improved, which was increased by 128 folds and 5 folds, respectively. The *in vitro* anti-tumor activity of the conjugate was tested by mouse L₁₂₁₀ leukaemia cells, and the synthesized conjugate showed the same anti-tumor activity as the original methotrexate. Compared to the reported literature, the modification of methotrexate by poly(ethylene glycol) is more rapid and convenient.

Key words: methotrexate; poly(ethylene glycol); conjugate; *in vitro* anti-tumor activity

收稿日期: 2006-09-13.

基金项目: 宁波市青年科学基金(2005A620015); 浙江省 2005 年高校青年教师资助计划; 浙江省教育厅高校科研计划(20051780).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 574 - 87600745,
E-mail: zjf@nbu.edu.cn

药物的聚乙二醇(PEG)修饰是改善药物理化性能和生物学性能的重要途径, 已引起了国内外学者的共同关注^[1-3]。但目前 PEG 主要用于修饰蛋白质, 而用于小分子有机药物的修饰并不多见, 迄今为止, PEG 修饰的有机小分子药物尚没有一个上市的产品。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是临床上

治疗绒毛膜上皮癌等最常用的抗肿瘤药物,但存在肝功能损害等毒副作用。为了降低 MTX 的毒副作用,人们对 MTX 的修饰进行了大量研究^[4-8],其中聚乙二醇(PEG)修饰是最有前途的修饰方法^[7,8],但往往需要使用活性较好的 PEG 活泼酯作修饰剂,这样使修饰变得复杂而繁琐。本文通过微波催化与化学催化相结合的方法,直接用单甲氧基聚乙二醇(mPEG)作偶联剂,一步合成了甲氨蝶呤-聚乙二醇偶联物,并对其体外抗肿瘤活性进行了初步探讨。

材料与方 法

材料与仪器 甲氨蝶呤(MTX)由岭南制药厂提供,纯度 99.8%;mPEG(M_r 5 000)购于 Fluka 公司;二环己基碳二亚胺(DCC)、对-*N,N*-二甲基氨基吡啶(DMAP)均为分析纯。噻唑蓝购于上海思吉公司;小鼠 L_{1210} 白血病细胞株购自中国科学院上海细胞研究所;1640 培养基为 Gibco 产品;小牛血清购于杭州四季青公司。其他试剂均为分析纯。

微波炉为惠而浦双重微波炉系统;红外光谱仪为美国 Nicolet Magan IR 550;核磁共振仪为德国 Bruker 公司 Avance 500;紫外光谱仪为美国 Varian Cary 500,紫外吸光度在 UV-7504 紫外可见分光光度计上测量。

MTX-mPEG 偶联物的合成与表征 在 25 mL 三角瓶中加入 2.50 g mPEG, 0.34 g MTX, 0.21 g DCC 和 0.12 g DMAP,充分摇动使反应物混合均匀,然后置于微波炉中,在 510 W 的功率下加热 20~30 min。将反应后的混合物置于真空干燥箱中干燥、冷却后,加入 40 mL 无水二氯甲烷,充分摇动,过滤,滤液蒸去部分二氯甲烷后,加入 80 mL 无水乙醚,析出黄色沉淀。将上述样品置于 4~10 °C 的冰箱中冷却,抽滤,干燥,得黄色粉末状粗产品。在上述粗品中,加入 40 mL 二氯甲烷溶解后,加入 10% AcOH/THF 20 mL 分解过量的 DCC,10 min 后用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 20 mL 洗涤,加入无水硫酸钠干燥,除去干燥剂,滤液浓缩后用异丙醇重结晶,过滤得黄色固体,真空干燥,得黄色粉末状的 MTX-mPEG 偶联物 2.37 g。

分别采用紫外光谱、红外光谱和核磁共振谱对 MTX-mPEG 偶联物进行表征。取产物用无水乙醇配成溶液,在 200~400 nm 波长范围内进行扫描,具有明显的紫外吸收,得到其最大吸收波长。红外光谱显示产物中有酯键的特征峰,核磁共振谱显示有羰基碳的吸收峰。

MTX-mPEG 偶联物的溶解性能测试 分别取原料 MTX 和产物 MTX-mPEG 偶联物的过饱和水溶液,离心后取上清液,稀释至合适的浓度后,在 306 nm 下测定其紫外吸收值,再对照 MTX 的工作曲线得出它们饱和水溶液的浓度,并折算出 MTX 修饰前后在水中的溶解度。

对 MTX 及 MTX-mPEG 的分配系数测定如下:称取 2.0 mg MTX 或 MTX-mPEG,溶解在 10 mL 被辛醇饱和的水里,置于 50 mL 分液漏斗中,加入 10 mL 被水饱和的辛醇,充分振荡后静置使分层清晰,分别测定两液层在 306 nm 处的吸收度,计算 MTX 和 MTX-mPEG 在水-辛醇中的分配系数。

MTX-mPEG 偶联物抗肿瘤活性测试 采用 MTT 比色法测定小鼠 L_{1210} 白血病细胞的存活率。精确称取样品,用 DMSO 溶解后加 PBS 稀释(DMSO 终浓度均 $\leq 0.5\%$),将各浓度组的样品加入 96 孔培养板各孔内,每孔加试液 10 μ L,每个样品设 6 个浓度,对照组加相应稀释液,每组 3 孔。取对数生长期的 L_{1210} 细胞,用 RPMI 1640 培养液稀释后每孔加入 1×10^5 悬浮细胞,置于 37 °C 含 5% 二氧化碳的培养箱中培养。48 h 后每孔加入 MTT 液。继续培养 4 h 后吸干培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,在培养箱中放置 10 min,待紫色结晶物完全溶解后用酶联免疫检测仪测各孔 A_{570} 值。

结果与讨论

1 MTX-mPEG 偶联物的合成

聚乙二醇的端羟基反应活性很低,一般情况下较难与羧基形成酯键,实验发现,在不加任何催化剂的条件下,MTX 的羧基与 mPEG 的羟基很难发生酯化反应,而且因为 MTX 的溶解性太差,即使加入溶剂,反应仍不是在均相中进行,故反应不仅进行得很慢而且很不完全。如果加入 DCC 作脱水剂,DMAP 作催化剂,搅拌反应 72 h 后,PEG-MTX 偶联物的产率仍只有 36.5% (按修饰物中 MTX 的相对含量进行计算)。微波是一种清洁能源,对许多有机反应具有良好的催化作用,为了找到一种实现 MTX 与 mPEG 酯化反应的方法,本工作探讨了微波对该酯化反应的催化作用。实验发现,微波对 MTX 与 mPEG 的酯化反应具有明显的催化作用,即使不加 DCC 和 DMAP,只需催化反应 30 min,MTX-mPEG 偶联物的产率即可提高到 74.8%,但因反应过程中热量的聚积使得 MTX 容易被氧化而明显变焦,产率偏低。当使用微波催化并同时加入 DCC 和 DMAP 时,

反应结果明显改善,得到的偶联物中 MTX 相对含量提高到 99% 以上,说明微波催化和常规催化的协同作用可以促使 MTX 与 mPEG 反应完全。在此酯化反应中,为了保证 mPEG 反应完全、不给后续的分离纯化带来麻烦,反应时使 MTX 与 mPEG 两者之间物质的量之比为 1.2:1,未反应完的 MTX 在加入 CH_2Cl_2 后可以过滤除去。故选用“微波催化 + 化学催化”相结合的方法,作为合成 MTX 与 mPEG 偶联物的方法。

2 MTX-mPEG 偶联物的结构表征

对 MTX-mPEG 偶联物的无水乙醇溶液进行紫外扫描,在 303 nm 处具有最大吸收波长,摩尔吸光系数 $\epsilon = 1.56 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,这说明偶联物中已引入了 MTX 的共轭结构。偶联物的红外光谱分析如下 (cm^{-1}): 3 402 (-NH₂ 的 N-H 伸缩振动), 2 887 (mPEG 的 -CH₂ 伸缩振动), 1 735 (酯键的羰基伸缩振动), 1 600 (苯环骨架), 1 468 (mPEG 的 -CH₂ 弯曲振动), 1 280 (C-O-C 伸缩振动)。核磁共振碳谱 (¹³C NMR) 主要特征峰如下: 25.96 (伯碳), 39.98 (仲碳), 59.64, 62.34 (C-O), 69.46 ~ 71.43 (mPEG), 112.09 (苯环), 163.05, 167.83 (羰基)。以上的结构分析表明,产物确实为 MTX-mPEG 偶联物,同时结合反应物的配比情况,由于 MTX 过量,生成双酯的可能性非常小,生成的偶联物应为单酯。

3 紫外分光光度法测定 MTX-mPEG 偶联物的含量

按中国药典(2000年版) MTX 的分析方法配制 MTX 标准溶液,在 Varian Cary 500 紫外光谱仪上扫描,确定 MTX 标准品在 306 nm 处有最大吸收波长,然后绘制其标准工作曲线。实验结果表明,实验测量的线性范围为 2 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其摩尔吸光系数 $\epsilon = 2.20 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,MTX 的吸收度与浓度呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9997$)。因此,用紫外吸光度法测定 MTX 的含量是可行的。另外,考虑到 MTX 在 306 nm 下的紫外吸收来源于其分子中的共轭结构,MTX-mPEG 中的其他结构如 mPEG 在测定范围内不会产生紫外吸收,所以 MTX-mPEG 在该波长下的吸收可认为仅仅由其中的 MTX 共轭结构引起,吸收度大小与 MTX 的含量成正比。事实上,实验测量了 MTX-mPEG 偶联物的最大吸收波长为 303 nm,与 MTX 最大吸收波长 306 nm 非常接近,因此测定 306 nm 波长下的吸收度所得出的产物含量不会产生太大的误差。由此方法测得产物中 MTX-mPEG 偶联物的含量为 99.1%。

4 MTX-mPEG 偶联物的溶解性

参照文献 [9] 的方法,分别测定 MTX 及 MTX-mPEG 在纯水中的溶解度以及它们在辛醇/水中的分配系数。实验结果表明,MTX 在纯水中的溶解度为 54.116 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,MTX-mPEG 偶联物的溶解度为 6 915.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,MTX-mPEG 偶联物在纯水中的溶解度提高了 128 倍;MTX 的分配系数为 0.437,而 MTX-mPEG 偶联物的分配系数为 1.985,即分配系数提高了近 5 倍。溶解性实验充分说明了将 MTX 变为 MTX-mPEG 后,其溶解性得到了显著改善,其水溶性和脂溶性均有很大程度的提高,从而更有利于 MTX 在生物体内的吸收和代谢,这对提高 MTX 的生物学性能,改变药物的给药方式和途径提供了新的可能。

5 MTX-mPEG 偶联物的抗肿瘤活性

设置空白对照,用 MTT 法测定 MTX 和 MTX-mPEG 对小鼠 L₁₂₁₀ 白血病细胞生长的抑制作用,以细胞存活率 (570 nm 吸收度值) 对 MTX 及 MTX-mPEG 浓度作图,结果见图 1。由图 1 可知,MTX-mPEG 对小鼠 L₁₂₁₀ 白血病细胞生长的抑制作用与 MTX 相当,说明药物经 mPEG 修饰后没有明显改变其抗肿瘤活性。

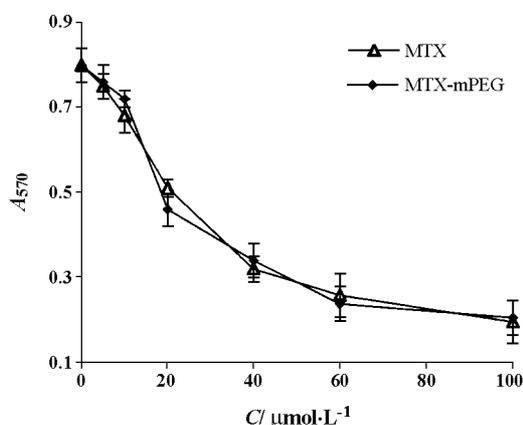


Figure 1 Growth inhibition of L₁₂₁₀ cells at different concentrations of MTX and MTX-mPEG ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$)

References

- [1] Reddy KR. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs [J]. Ann Pharmacother, 2000, 34: 915 - 918.
- [2] Crawford J. Pegfilgrastim administered once per cycle reduces incidence of chemotherapy-induced neutropenia [J]. Drugs, 2002, 62: 89.

- [3] Li Y, Kwon GS. Micelle-like structures of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl aspartamide)-methotrexate conjugates [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 1999, 16: 217 - 226.
- [4] Ye YQ, Hu FQ, Yuan H. Preparation and characterization of stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide polymeric micelles [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2004, 39: 467 - 471.
- [5] Mehvar R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents [J]. J Control Release, 2000, 69: 1 - 25.
- [6] Hoste K, Schacht EH, Seymour LW. New derivatives of polyglutamic acid as drug carrier systems [J]. J Control Release, 2000, 64: 53 - 61.
- [7] Riebeseel K, Biedemann E, Loser R, et al. Polyethylene glycol conjugates of methotrexate varying in their molecular weight from MW 750 to MW 40 000: synthesis, characterization, and structure-activity relationships *in vitro* and *in vivo* [J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13: 773 - 785.
- [8] Kratz F. Antineoplastic conjugates of transferrin, albumin and polyethylene glycol: US, 6 709 679 [P], 2004-03-23.
- [9] Feng X, Liang S, Li X, et al. Preparation and antitumor effect of drug delivery system of taxol conjugated to polyethylene glycol [J]. J Chem Ind Eng (化工学报), 2003, 54: 209 - 214.