

PAMAM-PEG/甲氨蝶呤复合物在正常及荷瘤鼠体内的药动学和抗肿瘤活性

孔淑仪, 唐国涛, 裴元英, 姜嫣嫣*

(复旦大学药学院, 上海 200032)

摘要: 第 4 代聚酰胺-胺 (polyamidoamine, PAMAM) 树枝状聚合物与平均分子质量 5 000 的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 通过酰胺键共价结合得 PAMAM-PEG。分别以 PAMAM 和 PAMAM-PEG 为抗肿瘤药物甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 的纳米载体, 制备了 PAMAM/MTX 和 PAMAM-PEG/MTX 复合物, 考察复合物在大鼠体内药动学行为及对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。采用高效液相色谱法测定大鼠血浆样品中 MTX 浓度并计算药动学参数; S180 荷瘤小鼠连续给药后第 17 天测定瘤重并计算肿瘤抑制率。结果显示, 两种复合物的大鼠血浆半衰期 (plasma half-life, $t_{1/2}$) 和平均滞留时间 (mean retention time, MRT) 均较原药组显著延长 ($P < 0.01$); PAMAM-PEG/MTX 复合物的血药浓度-时间曲线下面积 (area under the plasma concentration vs. time curve, AUC) 比原药组和 PAMAM/MTX 组显著增大 ($P < 0.01$)。PAMAM-PEG/MTX 复合物的肿瘤抑制率分别是原药组和 PAMAM/MTX 的 2.1 和 1.8 倍。可见, 以 PEG 化 PAMAM 为载体制备的 MTX 复合物在体内滞留时间延长, 抗肿瘤活性提高, 有望成为一种新型抗肿瘤药物载体材料。

关键词: 聚酰胺-胺树枝状聚合物; 甲氨蝶呤; 药代动力学; 体内抗肿瘤活性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2009)01-0085-06

PEGylated polyamidoamine dendrimer/methotrexate complex: pharmacokinetics and anti-tumor activity in normal and tumor-bearing rodents

KONG Shu-yi, TANG Guo-tao, PEI Yuan-ying, JIANG Yan-yan*

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Generation 4 polyamidoamine (PAMAM) dendrimer was PEGylated with polyethylene glycol (PEG) at an average molecular weight 5 000 via amide bond. PAMAM and PEGylated PAMAM (PAMAM-PEG) dendrimer were used as drug nanocarriers. Methotrexate (MTX), an antineoplastic agent, was selected as a model drug. PAMAM/MTX and PAMAM-PEG/MTX complexes were prepared. The pharmacokinetic characters and anti-tumor activity of the PAMAM-PEG/MTX complex were studied as compared with MTX injection and PAMAM/MTX complex by intravenous injection in rats and S180 tumor bearing mice, separately. The plasma samples from normal rats were analyzed by HPLC method, and concentration-time data were analyzed using a non-compartmental analysis. Their anti-tumor effects *in vivo* were evaluated against S180 solid tumors in mice by measuring average tumor weight and calculating the inhibitory rate of tumor on day 17 after successive injections. The results showed that both plasma half-life and mean retention time (MRT) of the complexes were longer than that of MTX injection ($P < 0.01$), while the area under the plasma concentration vs time curve (AUC) of PAMAM-PEG/MTX was the largest as compared with that of free drug and PAMAM/MTX complex ($P < 0.01$). The inhibitory rate of tumor of PAMAM-PEG/MTX complex enhanced 2.1 and 1.8 times over that of free drug and PAMAM/MTX complex, respectively, indicating that PAMAM-PEG/MTX exhibited the

收稿日期: 2008-07-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672543).

*通讯作者 Tel: 86-21-54237671, E-mail: yanyanjiang@shmu.edu.cn

highest antitumor activity. In summary, PEGylated PAMAM could be useful as a potential drug delivery carrier.

Key words: polyamidoamine dendrimer; methotrexate; pharmacokinetics; *in vivo* anti-tumor effect

聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)树枝状聚合物是一种人工合成的新型纳米级大分子化合物,呈辐射状对称的刚性球体结构,PAMAM的合成可以在纳米水平上严格控制分子的大小、结构、外周基团的数量和分子质量,得到高纯度、均一分布的产物,每增加一次分枝,PAMAM的分子就增长一代(generation, G),外层端基基团数目则增长一倍。与传统高分子相比,PAMAM具有高度对称、高度支化、单分散、精确的分子结构、易控的纳米尺寸等多种独特性质^[1,2]。近年来PAMAM作为药物载体已经显示出越来越大的应用潜力^[3],其纳米结构内部有空腔,可以包埋药物分子^[4];表面具有大量氨基,在生理条件下完全质子化形成带正电荷的 $-NH_3^+$,能与该条件下带负电荷的物质发生静电作用,形成复合物^[5,6];此外,药物也可以化学反应连接到PAMAM表面,形成PAMAM-药物偶联物,若同时在PAMAM表面连接靶向头基对其进行修饰,可以提高药物在特定部位的浓度,实现定向药物治疗^[7]。实验发现,PAMAM无免疫原性,对生物活性物质的转运效率高,但其表面氨基基团既有细胞毒作用又易从循环系统快速清除,采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰PAMAM表面的氨基可降低细胞毒作用,并增加载体的生物相容性和改变其生物分布^[7]。

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)作为一种临床抗叶酸制剂,在1948年就已开始用于肿瘤治疗,对白血病和实体瘤都有效,为临床基本抗肿瘤药物之一。但临床应用达50多年的MTX已对不少癌细胞产生耐药性,使其在临床应用中需要大剂量长期用药,进而导致许多不良反应的发生^[8]。因此,如何在保证药物疗效的基础上降低毒副作用是一亟待探讨的问题。叶玲等^[9]以G4和G5 PAMAM为载体制备了PAMAM/MTX复合物,研究了复合物体外释药行为,复合物在pH 7.4, 10 mmol·L⁻¹的Tris-HCl表现出明显的缓释效果,但随溶液中的离子强度增加,复合物缓释作用部分或全部丧失。Kojima等^[4]分别以PEG 550和2000对G3和G4 PAMAM进行修饰,并以此为载体制备了PAMAM-PEG/MTX复合物,发现PAMAM对MTX的复合量随PAMAM的代数和PEG链长的增加而增大,体外释药行为同样表现出在低离子强度的释放介质中具有一定的缓释作用,而在高离子强度下药物从载体中的释放速度与原药接近,表明复合

物的缓释效果丧失。Pan等^[10]以PEG 2000对G3 PAMAM进行了不同程度的PEG化修饰,考察了PAMAM的PEG化修饰程度对MTX的复合量以及体外释药行为的影响。结果显示不同PEG化程度的PAMAM复合MTX的量以及体外释放速度无显著差异。

尽管国内外对PAMAM以及PAMAM-PEG复合MTX已有研究报道,但仅有体外研究,尚未见复合物体内行为的研究报道。本文以甲氨蝶呤为模型药物,采用PEG5000对G4 PAMAM进行共价修饰并制备PAMAM-PEG/MTX复合物,与原药和未PEG化的PAMAM/MTX复合物比较、考察其在大鼠体内的药物动力学行为及对S180荷瘤小鼠的抗肿瘤活性,进一步探讨PEG化PAMAM作为MTX抗肿瘤给药载体的可能性。

材料与方法

药品和试剂 G₄ PAMAM(Dendritech, Inc.), NHS-PEG₅₀₀₀-tBoc(NEKTAR), MTX 原料药和注射用甲氨蝶呤(上海医药(集团)有限公司华联制药厂),乙腈(Tedia, 色谱纯),肝素钠(上海冠亚科技发展有限公司),PAMAM-PEG/MTX和PAMAM/MTX复合物(自制),生理盐水(四川科伦药业有限公司),5-氟尿嘧啶(上海旭东海普药业有限公司)。

仪器 岛津高效液相色谱仪(Shimadzu公司),包括AT-350柱温箱(Auto Science公司)、SPD-6AV紫外检测器与LC-10ATVP泵,Amicon Ultra-4超滤管(MWCO=50 000,美国Millipore公司),透析袋(上海绿鸟科技有限公司, MWCO=14 000)。

实验动物与瘤株 Sprague-Dawley大鼠,雄性,体重(200±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。昆明种小鼠,雌性,体重(18±1)g,42±2日龄,由复旦大学实验动物中心提供。瘤株为小鼠S180荷瘤腹水型细胞,由中国科学院上海药物研究所提供。

色谱条件 色谱柱为Hypersill ODS (250 mm×4.6 mm, D, 5 μm)及保护柱(Phenomenex公司),流动相:40 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲液(pH 4.5)/乙腈=88:12,检测波长:303 nm,流速:1.0 mL·min⁻¹,进样量:20 μL。

生物样品处理 取大鼠血浆0.2 mL,加入同体积7%高氯酸沉淀血浆蛋白,漩涡混合器强烈振荡2 min,

质子峰。每个 G₄ PAMAM 分子中有 996 个亚甲基质子(-CH₂), 每个 PEG5000 分子中有 455 个亚甲基质子(-CH₂), 根据 ¹H NMR 图谱中两者的峰面积比计算每个 PAMAM 分子上连接的 PEG 数为 29。

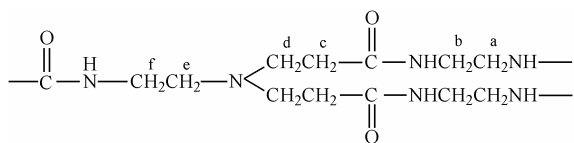


Figure 2 Chemical structure of outer-part of PAMAM dendrimer

2 PAMAM/MTX 与 PAMAM-PEG/MTX 复合物的制备

MTX 几乎不溶于水, 故可忽略其在水中的溶解度; PAMAM 本身在水中的溶解度良好, 经过 PEG 化后 PAMAM 的溶解度进一步增加, 其作为载体可以提高难溶性药物在水中的溶解度^[7]。因此测到的 MTX 可以认为是那些仅与 PAMAM-PEG 复合的 MTX 量。从图 3 看出, 随着 MTX 投料量的增加, PAMAM、PAMAM-PEG 复合 MTX 的量也相应增大, 当投料比超过一定量时, 继续增加投料量, 所复合的 MTX 量基本不变, 说明 PAMAM、PAMAM-PEG 与 MTX 之

间存在一个最大复合量。实验发现, 每分子 PAMAM 及 PAMAM-PEG 分别最多能够复合 22 和 77 分子 MTX。

3 HPLC 方法专属性

在本研究建立的色谱条件下, MTX 在血浆中分离良好, 保留时间为 7.4 min, 无杂质峰干扰 (图 4)。以 MTX 的峰面积 (*A*) 对其质量浓度 (*C*, μg·mL⁻¹) 进行线性回归, 得标准曲线方程: $A=21361C+341.52$ ($r=0.9999$, $n=5$), 线性范围 0.05~5 μg·mL⁻¹。

4 精密度和回收率

低、中、高 3 个浓度的日内及日间 RSD 均小于 5%, 方法重现性良好。3 个浓度的平均相对回收率分别为 106.9%、94.6%和 101.1%。提取回收率平均大于 85% (RSD≤5%)。

5 复合物大鼠体内药动力学考察

大鼠体内不同时间的血药浓度-时间曲线见图 5, 数据经 3P87 药动力学程序进行处理符合二室开放模型, 主要药动力学参数比较见表 1。药动力学实验中, 以 PAMAM、PAMAM-PEG 为载体的复合物分别将 MTX 的半衰期从 1 h 延长到 1.86 h 和 2.06 h ($P<0.01$), AUC 分别由 MTX 组的 5.32 μg·h·mL⁻¹ 增大到 6.99 μg·h·mL⁻¹ ($P<0.05$)和 12.98 μg·h·mL⁻¹ ($P<0.01$)。

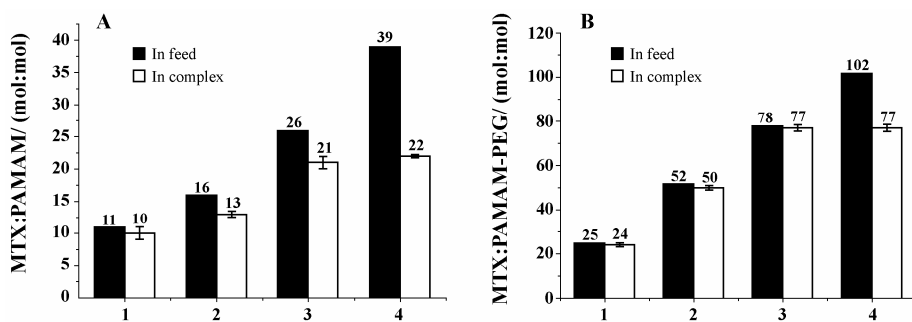


Figure 3 Methotrexate (MTX) incorporation data for PAMAM (A) and PAMAM-PEG (B)

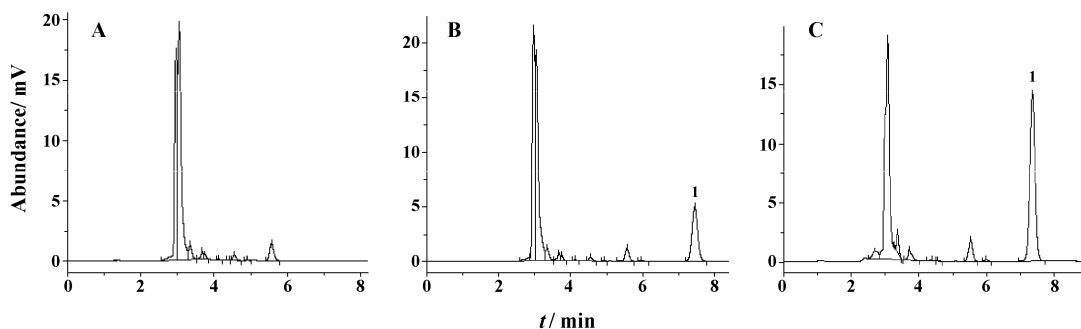


Figure 4 Chromatography of MTX in rat plasma by HPLC. A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with MTX; C: Plasma sample after administration of MTX injection; Peak 1: MTX (retention time at 7.4 min)

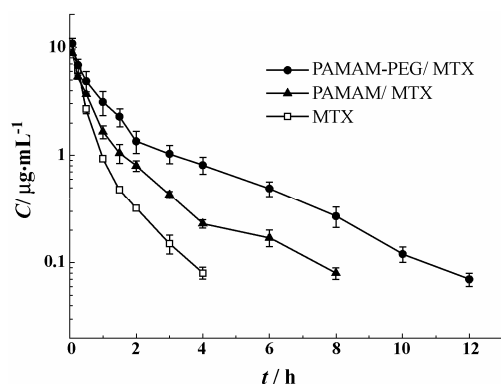


Figure 5 Concentration-time curve of MTX injection, PAMAM/MTX and PAMAM-PEG/MTX complex in rat plasma after iv administration ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The main pharmacokinetic parameters of methotrexate in rat after iv MTX, PAMAM/MTX and PAMAM-PEG/MTX complex ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Sample	$t_{1/2}/h$	$AUC_{0 \rightarrow \infty} / \mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	MRT/h
MTX	1.00 ± 0.10	5.32 ± 0.33	0.66 ± 0.05
PAMAM/MTX	1.86 ± 0.10	6.99 ± 0.95	1.69 ± 0.11
PAMAM-PEG/MTX	2.06 ± 0.07	12.98 ± 2.38	2.35 ± 0.08

6 复合物对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用

采用 S180 荷瘤小鼠为模型动物, 尾静脉注射给药 MTX 注射剂、PAMAM/MTX 和 PAMAM-PEG/MTX 复合物, 以生理盐水为阴性对照, 于接种后第 7~17 天内测量肿瘤体积, 其变化曲线见图 6。由图 6 可见, 于接种 13 d 后, PAMAM/MTX 和 PAMAM-PEG/MTX 复合物抑制肿瘤生长的作用显著大于原药, 其中 PAMAM-PEG/MTX 复合物的肿瘤抑制作用又显著大于 PAMAM/MTX 复合物。

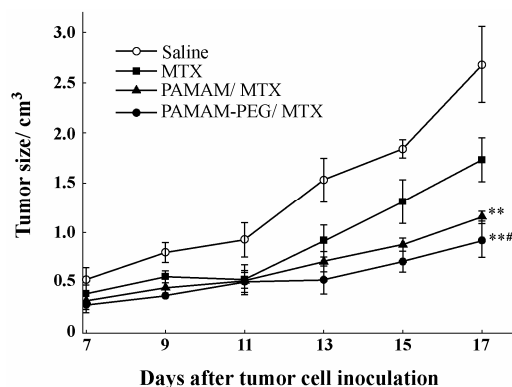


Figure 6 Tumor growth curve after administrating MTX injection, PAMAM/MTX and PAMAM-PEG/MTX in S180 tumor bearing mice. ** $P < 0.01$ vs MTX; # $P < 0.05$ vs PAMAM/MTX

荷瘤小鼠给予 MTX、PAMAM/MTX 和 PAMAM-PEG/MTX 后第 17 天取出的平均瘤重分别为 (1.83 ± 0.18) 、 (1.36 ± 0.16) 及 (1.16 ± 0.17) g, 肿瘤抑制率分别为 25.06%、44.33% 和 52.63% (表 2), 两种复合物的抗肿瘤活性与 MTX 注射液相比均显著提高, 且以经过 PEG 化修饰后的 PAMAM 为载体制备的复合物的抗肿瘤效果最好。

Table 2 The inhibitory rate of tumor (IRT) after the systemic application of MTX, PAMAM/MTX and PAMAM-PEG/MTX complex

Sample	Body weight/g		Tumor weight/g	IRT/%
	Beginning	End		
Saline	19.92 ± 0.58	28.03 ± 2.19	2.44 ± 0.62	—
MTX	19.68 ± 1.37	20.49 ± 3.57	1.83 ± 0.18	25.06
PAMAM/MTX	18.27 ± 1.13	16.55 ± 1.31	$1.36 \pm 0.16^{**}$	44.33
PAMAM-PEG/MTX	18.65 ± 0.88	22.78 ± 1.76	$1.16 \pm 0.17^{**\#}$	52.63

** $P < 0.01$ vs MTX; # $P < 0.05$ vs PAMAM/MTX

讨论

本实验制备了 PAMAM/MTX 和 PAMAM-PEG/MTX 两种复合物, 在合成 PAMAM-PEG 过程中, 虽然 PAMAM 与 PEG 的起始反应摩尔比为 1:64 (相当于 $-NH_2 : PEG = 1 : 1 \text{ mol/mol}$), 但在实际反应过程中, 只有 45% PEG 与 PAMAM 表面的 $-NH_2$ 发生反应, 出现该现象的原因可能与 PEG 链的空间位阻有关^[11], 即一部分先连接到 PAMAM 上的 PEG 由于链较长, “屏蔽”了 PAMAM 表面未反应的氨基, 从而阻碍了 PAMAM 被进一步 PEG 化。

本研究合成的 PEG 化 PAMAM 对 MTX 的载药能力明显高于未 PEG 化的 PAMAM, 此结果与文献报道一致^[4]。产生这一现象的原因可能与 PAMAM 和 PEG 化 PAMAM 复合药物的机制不同有关。PAMAM 复合 MTX 的机制^[12]: 在中性介质中, 载体表面 $-NH_2$ 完全质子化成为带正电荷的 $-NH_3^+$, 能够与 MTX 的两个 $-COO^-$ 发生静电作用, 形成复合物。Kojima 等^[4]认为长链 PEG 修饰 PAMAM 后导致树枝状聚合物的内部空间更大进而提高了聚合物的载药能力, 或 PAMAM 表面 PEG 链区域提高了难溶性药物 MTX 的水溶性。但 Pan 等^[10]认为 PAMAM-PEG 与 MTX 形成复合物的机制是通过 PAMAM 分子内部酰胺键中羰基与 MTX 分子以氢键复合。本文认为 PAMAM-PEG 与 MTX 分子之间可能同时存在静电作用和表面水溶性 PEG 链对药物的增溶作用, 即在制备复合物的中性介质中, PAMAM 表面未被 PEG 占据

的伯氨基及内部的叔氨基能质子化形成聚阳离子,与部分带有阴离子的 MTX 通过静电相互作用形成复合物;同时, PAMAM 表面被分子质量 5 000 的长链 PEG 修饰后可进一步增加药物的水溶性。综合两种可能因素导致 PEG 化 PAMAM 的载药能力显著大于未 PEG 化的 PAMAM。

具有阳离子端基的 PAMAM 经 29 个 PEG 分子修饰后,不仅可降低 PAMAM 的溶血毒性改善其表面性质^[12, 13],而且可以保护复合物有效避免网状内皮系统的吞噬,延长其在体内的循环时间。因此与原药和 PAMAM/MTX 相比, PAMAM-PEG/MTX 复合物的体内半衰期显著延长, AUC 显著增大。同时,这种平均理论分子质量接近 16 万的 PAMAM-PEG/MTX 长循环复合物,在体内更有利于提高肿瘤组织的 EPR 效应(enhanced permeability and retention effect, EPR),使药物富集于肿瘤部位,因此该复合物对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤效果最好,表明具有一定的肿瘤靶向作用。

此外,由表 2 可见,与生理盐水组相比,各给药组荷瘤小鼠体重均显著抑制。相对于原药组, PAMAM/MTX 组体重显著下降,这可能是由于 PAMAM 的毒性以及其分子质量仅有 1.4 万与药物形成的复合物肿瘤靶向效果不显著的共同作用造成的。而 PAMAM-PEG/MTX 组药效增加,动物体重高于原药组但明显低于生理盐水组,本文认为产生此现象的可能原因:一方面 PAMAM-PEG/MTX 是一个被动靶向给药系统,对肿瘤组织的选择性不够高,导致药物在正常组织也有一定分布,表现出一定的毒性;另一方面以静电结合的 PAMAM-PEG/MTX 复合物通过 EPR 效应进入肿瘤组织后,可能因环境离子强度的改变导致部分药物在未进入肿瘤细胞前就从载体中释放出来,部分小分子的药物重新进入循环系统,分布于全身而产生毒性。详细的机制有待进一步研究探讨。

综上所述,尽管 PEG 化 PAMAM 与药物形成的复合物存在一定的缺点,但本研究的结果提示功能化的 PAMAM 树枝状聚合物作为新型纳米靶向给药系统的载体材料具有独特的优越性,相信随着研究的不断深入,PEG 化 PAMAM 树枝状聚合物有望在药剂学领域得到更广泛的应用。

References

- [1] Elizabeth RG, Jean MJF. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 35-43.
- [2] Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications — reflections on the field [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 2106-2129.
- [3] Cheng Y, Xu Z, Ma M, et al. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 123-143.
- [4] Kojima C, Kono K, Maruyama K, et al. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs [J]. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11: 910-917.
- [5] Chen W, Tomalia DA, Thomas JL. Unusual pH-dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes [J]. *Macromolecules*, 2000, 33: 9169-9172.
- [6] Kolhe P, Misra E, Kanana RM, et al. Drug complexation, *in vitro* release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers [J]. *Int J Pharm*, 2003, 259: 143-160.
- [7] D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 2147-2162.
- [8] Garrett AP, Garner EO, Goldstein DP, et al. Methotrexate infusion and folinic acid as primary therapy for nonmetastatic and low-risk metastatic gestational trophoblastic tumors 15 years of experience [J]. *J Reprod Med*, 2002, 47: 355-362.
- [9] Ye L, Yang H, He M, et al. Investigation of PAMAM dendrimer-MTX complex: formation and *in vitro* release [J]. *Acta Polym Sin (高分子学报)*, 2006, 1: 32-36.
- [10] Pan G, Lemmouchi Y, O.Akala E, et al. Studies on PEGylated and drug-loaded PAMAM dendrimers [J]. *J Bioact Compatible Polym*, 2005, 20: 113-128.
- [11] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, et al. Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible high-efficiency DNA delivery [J]. *Macromolecules*, 2002, 35: 3456-3462.
- [12] Kong S, Tang G, Pei Y, et al. Preparation and *in vitro* release of methotrexate complexation with PEGylated dendrimers [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2008, 43: 1085-1091.
- [13] Chen HT, Neerman MF, Parrish AR, et al. Cytotoxicity, hemolysis, and acute *in vivo* toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 10044-10048.