

HPLC 测定叶酸-青霉素 G 酰化酶对 N-苯乙酰化阿霉素的催化活性

张 奇, 项光亚*, 龙 娜, 吴继洲

(华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030)

【摘 要】 目的: 利用高效液相色谱法测定叶酸-青霉素 G 酰化酶(PGA)对 N-苯乙酰化阿霉素(DOXP)的催化活性, 为叶酸导向的酶催化前体药物的肿瘤治疗(FDEPT)研究奠定理论基础。方法: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 用 85% 磷酸调节 pH 至 2.4; 梯度程序: 0~3 min 为 24% 乙腈, 3~15 min 为 80% 乙腈; 紫外检测波长: 495 nm; 流速: 1 mL/min。结果: DOXP 和酶解产物阿霉素的 *t_R* 分别为 5.5 min 和 12.3 min, 原酶 PGA 和叶酸-PGA 偶联酶对 DOXP 的 *K_m* 和 *v_{max}* 分别为 15 μmol/mL, 0.094 μmol/(min·mg) 和 19 μmol/mL, 0.086 μmol/(min·mg)。结论: DOXP 为 PGA 的较好底物, 叶酸与 PGA 偶联对酶的催化活性的影响较小。

【关键词】 叶酸; 青霉素 G 酰化酶; N-苯乙酰化阿霉素; 催化活性; 高效液相色谱法

【中图分类号】 Q563.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)06-0535-03

维生素叶酸能高度特异性结合肿瘤相关抗原——叶酸受体(FR)^[1,2]。以叶酸导向的酶催化前体药物的肿瘤治疗(FDEPT)是以叶酸替代抗体靶向酶催化的前体药物治疗(ADEPT)中起靶向作用的抗体, 将叶酸与前药的专一性活化酶偶联, 酶选择性靶向于 FR 阳性肿瘤, 使前药特异性地在肿瘤组织内转化为活性细胞毒分子。与抗体导向酶相比, 叶酸导向酶对肿瘤细胞的亲和力更强, 且叶酸导向酶的体积小, 免疫原性低, 且容易制备和保存^[1]。

青霉素 G 酰化酶(penicillin-G acylase, PGA, EC 3.5.1.11)对苯乙酰基具有高度选择性, 不仅可以催化 β 内酰胺环上的苯乙酰基解离, 还可以催化苯乙酰基从其他胺、醇或者肽链上酶解。青霉素 G 酰化酶为非人类酶, 因此常作为前药活化酶应用于 ADEPT 的研究中^[3-5]。前药活化酶对底物的特异性和催化速度是导向酶的药物前体治疗的关键^[3]。因此本实验通过高效液相色谱法测定了叶酸-PGA 偶联酶催化 N-苯乙酰化阿霉素[N-(phenylacetyl)doxorubicin, DOXP, 图 1] 释放阿霉素(doxorubicin, DOX)的活性, 为叶酸-PGA 联合阿霉素前药的肿瘤治疗研究奠定了理论基础。

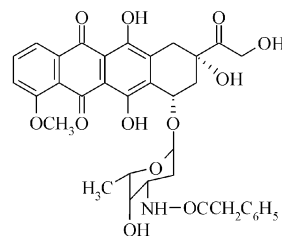


Fig. 1 Chemical structure of N-(phenylacetyl) doxorubicin

1 材 料

青霉素 G 酰化酶(PGA, *M_r* 约 70 000 Da, 56 mg/mL)、青霉素 G 钾盐(PeniG-K)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC) (Sigma 公司); BCA (Bicinchonine acid assay) 蛋白定量试剂盒和无水 DMSO (Pierce 公司); Sephadex G-25 (Amersham Biosciences 公司)。聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL, 巴斯夫公司); 阿霉素(DOX, 浙江海正药业股份有限公司); N-苯乙酰化阿霉素(DOXP, 参考文献[5]制备, 纯度大于 99%)。756 型紫外可见分光光度计(北京瑞利仪器厂); Waters 600 高效液相色谱仪, 配有 2996 型二极管阵列检测器, 717 自动进样器和 Empower PDA 数据处理工作站。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

* 【收稿日期】 2005-06-15 【* 通讯作者】 Tel: 027-67156611 E-mail: youjiti@mails.tjnu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(No. 30300430)

2 实验方法

2.1 叶酸-PGA 的制备

取适量叶酸溶于无水 DMSO 中, 加入 5 倍的 EDC, 23 °C 于暗处搅拌 1 h 得叶酸活化酯。将 2.8 mg/mL 的 PGA 加入到 30 倍的叶酸活化酯中, 在 pH 8.5 的磷酸盐缓冲液中, 23 °C 于暗处搅拌 30 min 后用 G-25 柱纯化。以牛血清白蛋白为标准, 按 BCA 法测定酶含量。根据测定的酶含量以及叶酸在 363 nm 处的摩尔吸收系数 $6197^{[6]}$, 计算叶酸与 PGA 的偶联比。

2.2 叶酸-PGA 催化酶解 DOXP 的 HPLC 测定

色谱条件 流动相: 乙腈-水, 85% 磷酸调节 pH 为 2.4^[7]。梯度程序: 0~3 min 为 24% 乙腈, 3~15 min 为 80% 乙腈。检测波长 495 nm, 流速 1 mL/min, 进样量 10 μ L。

活性测定 取 50 μ g/mL 叶酸-PGA, 加入 DOXP [50~500 μ g/mL, 用 1% cremophor EL/PBS (*w:v*) 溶解], 37 °C 下反应, 振荡 15 min, 取样, 用乙腈稀释, 离心, 取上清液进样。

以每分钟生成 DOX 的量来表示初速度, 以不同浓度的底物 DOXP 和初速度的双倒数作图, 计算 K_m 值及 v_{max} 。

3 结果与讨论

3.1 叶酸-PGA 酶解 DOXP 的反应介质

DOXP 在含 10% DMSO 的 PBS 溶液中溶解度较低(小于 10^{-5} mol/L)^[5], 因此本文选用 cremophor EL 溶解 DOXP, 再用 PBS 稀释后与酶混合。按 MIT 法检测 cremophor EL 对叶酸受体阳性细胞 HeLa 细胞和 SKOV3 细胞的毒性。结果显示: cremophor EL 在浓度高于 10 mg/mL (培养液稀释) 时均无细胞毒性。

3.2 工作曲线的制备

配制 1.7, 0.85, 0.17, 0.085, 0.017 mmol/L 的阿霉素标准溶液, 以阿霉素的峰面积(*A*)对浓度(*c*, mmol/L)作工作曲线, 测得回归方程为: $A = 2.448 \times 10^2 + 1.879 \times 10^4 c$, $r = 0.9998$ 。

3.3 叶酸-PGA 酶解 DOXP 的色谱分析

阿霉素和 DOXP 的紫外吸收光谱显示两者的最大吸收波长和特征波长一致, 因此不宜采用紫外分光光度法进行测定。利用高效液相色谱法, 当检

测波长为 495 nm, 采用梯度程序: 0~3 min 为 24% 乙腈, 3~15 min 为 80% 乙腈, DOX 和 DOXP 的保留时间分别为 5.5 min 和 12.3 min(图 2)。将叶酸-PGA 偶联酶和原酶 PGA 与 DOXP 反应 1 h 后进行高效液相色谱分析(图 3), DOX 的峰出现在 6 min 左右, DOXP 的峰在 12 min 左右。

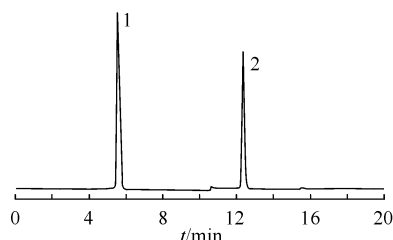


Fig. 2 Chromatogram of (1) doxorubicin and (2) *N*-phenylacetyl doxorubicin (DOXP)

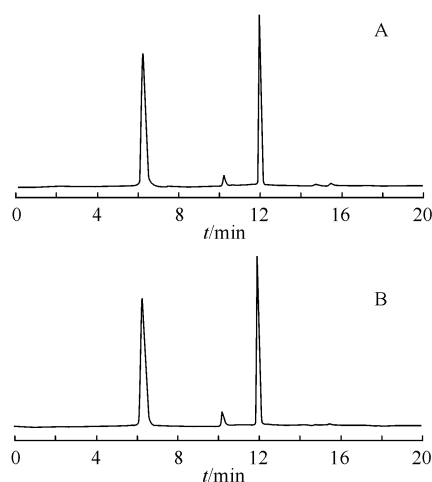


Fig. 3 Chromatograms of 100 μ g/mL DOXP catalyzed by 50 μ g/mL penicillin-G acylase

A. Parent enzyme; B. Folate conjugated enzyme

3.4 叶酸-PGA 酶解 DOXP 的动力学

PGA 或叶酸-PGA (50 μ g/mL) 与适量底物 DOXP 作用, 反应 2 h, 以酶解产生的 DOX 或消耗的 DOXP 的峰面积对时间作图。图 4 表明, 底物的减少和产物的增加基本上是一致的, 可见酶对 DOXP 有较高的催化活性。偶联酶催化酶解 DOXP 释放 DOX 的量在 1 h 前较原酶慢, 但 1 h 后两者变化趋于一致, 2 h 内均能将 DOXP 完全酶解, 1 h 的转化率均达到 90% 左右, $t_{1/2}$ 分别为 20 min 和 30 min。

叶酸-PGA 酶解 DOXP 的反应初速度以每分钟生成 DOX 的量来表示。以不同浓度的底物 DOXP 和初速度的双倒数作图, 原酶 PGA 和叶酸-PGA 偶联酶 K_m 和 v_{max} 分别为 15 μ mol/mL, 0.094 μ mol/

(min•mg) 和 19 μmol/ mL, 0.086 μmol/ (min•mg)。可见 DOXP 为 PGA 的一个较好底物, 且偶联酶和原酶对 DOXP 的催化活性相似, 叶酸的修饰对 PGA 的影响不大。

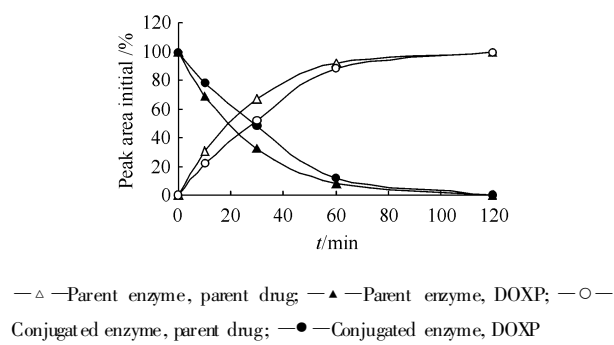


Fig.4 Enzymatic hydrolysis of 100 μg/mL N-(phenylacetyl) doxorubicin (DOXP) by 50 μg/mL parent enzyme or 50 μg/mL conjugated enzyme as determined by reversed-phase HPLC

【参考文献】

[1] Lu Y, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer

therapeutic agents[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, **54**(5): 675- 693.
[2] Low PS, Antony AC. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56**(8): 1 055- 1 058.
[3] Rooseboom M. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, **56**(1): 53- 102.
[4] Bignami GS, Senter PD, Grothaus PG, et al. N-(4-Hydroxyphenylacetyl) palytoxin: a palytoxin prodrug that can be activated by a monoclonal antibody-penicillin G amidase conjugate[J]. *Cancer Res*, 1992, **52**(20): 5 759- 5 764.
[5] Vrudehula VM, Senter PD, Fisher KJ, et al. Prodrug of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody penicillin G amidase conjugate[J]. *J Med Chem*, 1993, **36**(7): 919- 928.
[6] Leamon CP, Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, **88**(13): 5 572- 5 576.
[7] 蔡美明(Cai MM), 周帼雄(Zhou GX), 殷璐(Yin L). 高效液相色谱法测定注射用盐酸表阿霉素的含量[J]. *中国药科大学学报(J China Pharm Univ)*, 1997, **28**(4): 252- 254.

HPLC Determination of Enzymatic Hydrolysis of N-(Phenylacetyl) Doxorubicin Catalyzed by Folate-conjugated Penicillin-G Acylase

ZHANG Qi, XIANG Guang-Ya, LONG Na, WU Ji-Zhou
(School of Pharmacy, Tongji Medical College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

【ABSTRACT】 AIM: To investigate enzymatic hydrolysis of N-(phenylacetyl) doxorubicin (DOXP) catalyzed by folate-conjugated penicillin-G acylase (PGA). **METHODS:** The determination of prodrug DOXP and cleavage product doxorubicin was monitored by HPLC. A Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with 1 mL/min flow rate of 85% phosphoric acid in water (pH 2.4) with a gradient of acetonitrile created according to the following scheme: 24% for 3 min and then constant at 80% for 12 min. **RESULTS:** PGA effected the hydrolysis of DOXP, and HPLC analysis confirmed that doxorubicin was formed. The K_m and v_{max} were 15 μmol/mL, 0.094 μmol/(min•mg) and 19 μmol/mL, 0.086 μmol/(min•mg) for the parent enzyme or for the conjugate enzyme, respectively. **CONCLUSION:** DOXP was a good substrate for PGA. Folate-conjugated PGA did not significantly compromise PGA catalytic activity.

【KEY WORDS】 Folate; Penicillin-G acylase; N-(Phenylacetyl) doxorubicin; Catalytic activity; HPLC