

聚酰胺-胺树状大分子靶向给药系统的研究进展

丁荣敏¹, 何 华^{1,2*}, 李 娟³

(1. 中国药科大学分析化学教研室, 2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室,
3. 中国药科大学药剂教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 靶向给药系统 (targeting drug delivery system, TDDS) 能够选择性作用于病变部位, 控制药物的分布与释放, 提高药效和降低毒副作用, 已成为癌症治疗领域的研究热点之一。聚酰胺-胺树状大分子 (polyamidoamine dendrimer, PAMAMD) 是一种新近发展起来的纳米级药物载体, 多分枝、单分散性、三维结构和主-客体包裹能力使其可作为药物基因载体和影像试剂。PAMAMD 丰富的末端功能团能同时连接各种具有特异选择性的靶向配基, 再通过包裹作用或化学偶联作用将药物或治疗基因载入, 最后将药物和治疗基因带到病变部位释放从而实现靶向治疗。这种以 PAMAMD 为基础制备的纳米靶向给药系统具有较小的粒径, 强的高通透高滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应和低毒性等特点。本文概述了各种靶向配基修饰的 PAMAMD 的应用研究进展, 并展望了今后的研究方向。

关键词: 聚酰胺-胺; 树状大分子; 靶向给药系统; 药物载体; 配基

中图分类号: O633.22; R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0493-09

Research progress of polyamidoamine dendrimer in targeting drug delivery system

DING Rong-min¹, HE Hua^{1,2*}, LI Juan³

(1. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University,
2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education,
3. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Targeting drug delivery system (TDDS) is one of the most concerned research fields in cancer treatment because it can bind selectively and react with the target diseased sites at the cellular or sub-cellular level, making distribution and release of drugs in a controlled manner, thus enhance therapeutic effects and reduce toxic and side-effects on normal cells. Polyamidoamine dendrimer (PAMAMD) is a kind of newly developed polymer in nanometer degree. Hyper-branched, monodispersity, three-dimensional structure and host-guest entrapment ability make it used as drug carrier, gene delivery system and imaging agent. Various targeting ligands, which have high affinity to specific organs, tissues or cells in human body, can be linked to surface functional groups of PAMAMD. And drugs and theoretical gene are carried by encapsulation or chemical conjugation. Finally, PAMAMD targeting drug delivery system can carry drugs and theoretical gene to diseased sites and then release them for targeted therapy. The PAMAMD-based conjugates have small size, high permeability and retention effect (EPR), low toxicity and so on. The research progress of PAMAMD modified by different ligands in targeting drug delivery system is reviewed, and research direction of the PAMAMD targeting delivery system in the future is also suggested.

Key words: polyamidoamine; dendrimer; targeting drug delivery system; drug carrier; ligand

收稿日期: 2010-12-29.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-006); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JKY092009059).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271505, E-mail: dochehua@163.com

由于环境因素、生活习惯、工作压力等各种内在和外在因素的影响,癌症越来越威胁着人类的健康。据统计,全世界每年的肿瘤发病患者都在1 000万人以上,死于恶性肿瘤的人数达到600万。目前,临床常用的抗肿瘤药有80多种,已进入临床试验的抗肿瘤药有500多种,这些药大多数以杀死肿瘤细胞为目的,但缺乏对肿瘤细胞的特异性,在治疗剂量下对正常组织器官产生明显的毒副作用,故靶向治疗药物受到越来越多的关注^[1,2]。

靶向给药系统(targeting drug delivery system, TDDS)是指能将药物选择性地运输并释放于病变部位以降低其对正常组织的毒副作用,使病变组织的药物浓度增大,从而提高药物利用率的一种药物载体系统。最优的TDDS需要一个能装载多重组分(如一种药物,一种靶向配基和一种荧光传感介质)的平台。这个平台要求具有良好的生物相容性、溶解性和稳定性,能载入大量的目标药物并很好地与靶向配基结合^[3]。大分子载体被认为是一种理想的靶向药物传递系统平台^[4],它能够增强EPR效应,与多种靶向配基结合^[5]。

树状大分子(dendrimer)是一类类似树枝状的人工合成的三维立体大分子^[6]。常见的树状大分子有聚丙烯亚胺(polypropylene imine, PPI)树状大分子、聚乙烯亚胺(polyethylene imine, PEI)树状大分子、聚酰胺-胺树状大分子(polyamidoamine dendrimer, PAMAMD)、硅烷树状大分子、聚芳醚树状大分子和聚苯乙炔树状大分子等。这些树状大分子因其结构的规整精致、分子大小形状可控、单分散性等特点,成为纳米杂化金属材料、催化剂、分子自组装和液晶高分子等领域研究的热点,在生物医药领域也呈现出诱人的应用前景。但大部分树状大分子因结构中存在硅卤原子、芳香环,末端基团难修饰或结构开放等缺点,生物相容性低,限制了其在生物医药领域的应用。而以乙二胺为核,采用发散法通过迭代的Michael加成和酰胺化反应合成的PAMAMD(图1),除具有高密度表面功能团、高度几何对称性、内部空腔可调节性等特点外,还具有无免疫原性、低毒性、可通过尿和粪便排出等特性,成为目前生物医药领域研究及应用最广泛的一类树状大分子。PAMAMD表面高密度功能团(氨基和酯基)的存在使其能够被各种客体分子修饰或结合^[7,8]。同时,能使包埋或与之结合的生物活性大分子降低毒性,提高溶解性和延长血浆清除率^[3,9]。近年,PAMAMD作为靶向载体在癌症治疗和诊断中的应用受到越来越多的关注^[10]。

据报道,靶向配基-PAMAMD复合物能够优先分布在肿瘤组织和细胞中。这些特殊的靶向配基有糖类^[11],叶酸(folic acid, FA)^[7,12-14],抗体^[15,16],血管内皮生长因子^[17]等。本文将重点介绍相关靶向配基修饰的PAMAMD复合物在靶向给药系统领域的研究进展。

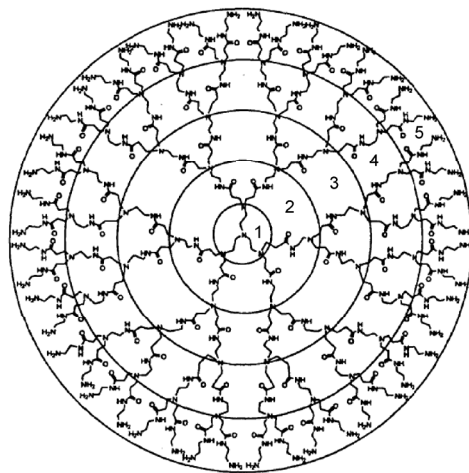


Figure 1 Structure of G5 polyamidoamine dendrimer (PAMAMD)

1 PAMAMD 靶向给药系统的制备

PAMAMD 表面具有高密度的功能团,整代树状大分子表面为氨基,半代树状大分子表面为酯基。这些表面功能团能被乙酰化或酰胺化,故各种配体要连接到PAMAMD上,通常需使用三乙胺、琥珀酰氯等偶联剂。如合成PEG-PAMAMD时采用了2,2,2-三氟乙基磺酸基活化的MPEG,氨基被活泼的磺酸基夺去一个氢后与MPEG通过乙酰基结合^[18]。叔丁氧羰基聚乙二醇琥珀酰亚胺酯(NHS-PEG-tBOC)的-NHS端与表面氨基共价结合为稳定的酰胺键^[19]。叶酸通过碳二亚胺反应偶联到表面氨基上^[20]。组氨酸乙酸盐的酯基与表面伯胺基发生氨解反应连接到PAMAMD上^[21]。也有一些靶向配基不能直接和PAMAMD结合,通过一个中介分子将两者联系起来。选择具有双功能团的中介分子,一端与PAMAMD连接,另一端与靶向配基相连。如 α -maleimidyl- ω -N-hydroxysuccinimidyl polyethyleneglycol (NHS-PEG-MAL),其-NHS端可与PAMAMD发生主胺特异反应,-MAL端与巯基化的转铁蛋白(Tf)发生巯基特异性反应^[22]。-MAL端也可与精-甘-天冬多肽序列(Arg-Gly-Asp, RGD)反应,合成RGD-PEG-PAMAMD给药系统^[23]。

靶向给药系统中的另一重要部分就是治疗药物,PAMAMD作为载体与治疗药物的结合分为两种方式:物理包埋和化学偶联。PAMAMD内部结构有由

疏水基团形成的空腔, 可将药物包裹在其中。这是一种简单的物理包埋, 药物分子与树状大分子之间为非化学键合的相互作用。该载药系统可通过简单的搅拌包埋药物, 避免化学合成, 药物通过扩散作用从树状大分子内部释放出来。Cheng 等^[24]制备了那氟沙星-G4 PAMAMD 包合物, 那氟沙星分子被包裹于内部空腔并与表面氨基产生静电作用。树状大分子表面众多的功能团能够与各种药物分子进行化学偶联。与物理包埋相比, 化学偶联将药物和树状大分子以共价键连接, 稳定性非常好, 药物释放要通过偶联物的化学降解或酶解来实现。有的偶联物保留药物的全部或部分生物活性, 有的则需将药物释放出来才能发挥治疗作用。研究发现含有羧基的灯盏花素可与 PAMAMD 的伯胺和叔胺发生静电作用, 从而实现载药^[25]。巴洛沙星的羰基氧原子上有一对孤对电子 (n 电子), 可发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 与 PAMAMD 表面氨基作用生成氢键^[26]。

为了便于观察合成的 PAMAMD 靶向给药系统是否具有靶向性, 通常会在给药系统中加入发光分子, 如异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、荧光素 Alexa Fluor 488 等。这些分子的载入与靶向配基的载入方法类似, 都是利用 PAMAMD 表面功能团的乙酰化或酰胺化。这样, 以 PAMAMD 为载体, 连接靶向配基和标记分子, 制备载入治疗药物的靶向给药系统。

2 PEG-PAMAMD 靶向给药系统

PEG 修饰可以改善 PAMAMD 的表面性质, 降低毒性、提高水溶性同时还具有被动靶向作用。PEG-PAMAMD 给药系统主要利用炎症细胞和肿瘤细胞生长快速, 血管通透性升高等特点进入病变部位发挥作用。孔淑仪等^[27]分别考察了 PAMAMD/甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 和 PAMAMD-PEG/MTX 两种复合物的大鼠体内药动学及对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。经 PEG 修饰的 PAMAMD 不仅降低了溶血毒性^[19], 还有效地避免了网状内皮系统对复合物的吞噬作用。PAMAMD-PEG/MTX 复合物在体内的循环时间延长, 半衰期变长, AUC 明显增大, 有利于提高肿瘤组织的 EPR 效应, 使药物富集在肿瘤部位, 对肿瘤抑制率分别是原料药和 PAMAMD/MTX 的 2.1 倍和 1.8 倍。Zhu 等^[28]用酸敏感的顺式乌头酸酐 (*cis*-aconitic anhydride, CA) 和非酸敏感的丁二酸酐 (succinic anhydride, SA) 共价连接阿霉素 (doxorubicin, DOX) 到 PEG-PAMAMD 上制备了 PEG-PAMAMD-CA-DOX (PPCD) 和 PEG-PAMAMD-SA-DOX (PPSD)。

较 PPCD 的细胞毒性更低, 肿瘤累积作用更强, 但 PPCD 能在溶酶体弱酸环境下释放 DOX 进入细胞核, 在肿瘤部位 DOX 的含量较大而表现出更强的抗肿瘤活性。

在细胞摄取和基因转染方面, PEG-PAMAMD 也表现出作为基因载体的应用前景。王薇^[29]研究发现, 相对分子质量较小的 PEG 修饰不影响细胞对 PAMAMD 的快速摄取, 且 PEG-PAMAMD 被细胞摄取后有靶向细胞核功能, 能将质粒 DNA 转运至鼠成纤维细胞 (NIH 3T3) 中并表达。

虽然 PEG 修饰在降低 PAMAMD 的毒性, 提高生物相容性方面起到很好的作用, 但作为被动靶向系统缺乏高特异性识别作用, 因此靶向效果不是很高, 对正常细胞和组织有明显的毒副作用, 这也是被动靶向系统的一大缺陷。

3 维生素类-PAMAMD 靶向给药系统

3.1 FA-PAMAMD 靶向给药系统

目前研究者们探索了许多新颖的递送药物至病理性细胞的方法, 且这些方法能够避免对健康细胞的继发性破坏。FA 作为研究对象之一受到广泛关注。FA 是一种水溶性 B 族维生素, 一般通过两种转运机制进入细胞: 一种通过跨膜蛋白转运二氢叶酸、四氢叶酸进入细胞; 另一种通过高亲和力的叶酸受体 (folate receptor, FR) 介导细胞内吞, 这也是 FA 作为靶向配基递送药物进入靶细胞的主要途径。研究发现, FR 在癌细胞中过度表达^[30], 超过正常组织的 100~300 倍, 这一特性使 FA 被认为是靶向药物传递系统中最佳的靶向配基之一。即使通过 γ -羧基与载体结合后, FA 对 FR 仍有高的亲和力^[31, 32]。

1997 年, Wiener 等^[33]首次将 FA 偶联到 G4 PAMAMD 上, 再将 FA-PAMAMD 复合物通过末端氨基与一种螯合剂结合, 最后与钆离子结合, 得到了一种以 FA-PAMAMD 为载体的新型肿瘤靶向磁共振造影剂。Singh 等^[13]合成的 FA-PAMAMD-PEG, 在提高载体的水溶性, 降低免疫原性的基础上, 对 5-氟尿嘧啶的增溶和缓释效果也均强于 PAMAMD。

在基因治疗方面, 李瑞等^[34]用 hTERT-siRNA 作为治疗基因, 以 FA-PAMAMD 为基因运载体, 体外研究发现 FA-PAMAMD 对人脑胶质瘤细胞 U251 的转染效率达到 67.36%, 比商业化 oligofectamine 的转染率高出 1 倍。FA-PAMAMD/hTERT-siRNA 在癌细胞中富集, 抑制 U251 细胞的增殖。在肿瘤诊断方面, Zhao 等^[35]设计合成了以 FA-PAMAMD-PEG 为载体的 CdSe/ZnS 量子点, 其中量子点作为造影剂。在 HeLa

细胞中,包埋在 FA-PAMAMD-PEG 中的量子点在癌细胞表面可以慢慢释放出来进入癌细胞,具有更好的成像效果,为纳米材料在癌症诊断中的应用提供理论依据。

以上研究实例证明,FA 修饰的 PAMAMD 能有效介导抗肿瘤药靶向高表达 FR 的肿瘤细胞,同时降低了药物对非靶向目标细胞的毒性。但由于 FR 不仅仅对 FA 有特异性亲和力,还对 5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、磺胺、甲氨蝶呤和 5,10-亚甲基四氢叶酸等叶酸类似物也具有很高的亲和力和特异性,因此外源性或内源性的叶酸类似物都可能干扰 FA-PAMAMD 靶向给药系统对肿瘤细胞的特异性结合。另外在原癌细胞中过度表达的 FR 的循环利用问题也需进一步探究。

3.2 生物素-PAMAMD 靶向给药系统 生物素 (biotin),又称为维生素 H、辅酶 R,是一种细胞生长促进剂。肿瘤细胞的快速增生需要额外的生物素,所以这些癌细胞通常在细胞表面过度表达生物素特异性受体。近来,一些研究人员阐明与生物素结合的大分子载体能够提高细胞摄取率^[36]。因此,生物素与其受体之间的特殊反应可被用来作为靶向传递药物。

Yang 等^[37]将靶向配基生物素和显像分子 FITC 结合到 G5 PAMAMD 上,最终形成复合物 Ac₈₂-G5-FITC₉、Ac₈₂-G5-biotin₉-FITC₉。在 HeLa 细胞中 Ac₈₂-G5-biotin₉-FITC₉ 的荧光强度高于 Ac₈₂-G5-FITC₉,且表现为浓度依赖型。由此可知,Ac₈₂-G5-biotin₉-FITC₉ 对 HeLa 细胞的靶向性明显强于 Ac₈₂-G5-FITC₉。Yellepeddi 等^[36]研究还发现该复合物主要通过受体介导内摄作用和电荷介导吸附性入胞作用进入细胞,在卵巢癌细胞系中的摄取率高于人胚肾细胞系 12%,但游离的生物素和秋水仙碱阻碍细胞对其的摄取。由此可见,这种具有良好生物相容性的生物素-PAMAMD 复合物在癌症治疗和诊断方面有着不可限量的应用前景。但这一复合物进入细胞同样是在受体介导下完成的,因此受体的循环利用问题必须考虑。另外这只是“概念证明 (proof-of-concept)”的研究,应用到临床实践中还有很长的路要走。

4 蛋白质类-PAMAMD 靶向给药系统

4.1 转铁蛋白 (Transferrin, Tf) Tf 是一种非血红素结合铁的 β -球蛋白,广泛分布于人体的体液和细胞中。转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 是一种跨膜糖蛋白,在人体内广泛表达,但肿瘤细胞表面的 TfR 是正常细胞的 2~7 倍,与 Tf 的亲和力也是正常细胞的 10~100 倍。唐国涛等^[38]合成了主动靶向

给药系统 Tf-PEG-PAMAMD-CPT (喜树碱),并发现 PEG 的修饰可避免单核吞噬细胞系统的吞噬;这一靶向给药系统在体外能提高肿瘤细胞的摄取,增加药物诱导肿瘤细胞凋亡的作用;在体内可延长药物在血液循环系统中的滞留时间,增强 EPR 效应,增加药物在荷瘤小鼠肿瘤部位的累积,提高抗肿瘤活性。

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 在保护大脑的同时却使治疗脑部肿瘤以及其他神经退行性疾病受到了限制,因此脑内靶向给药系统正成为研究热点。利用 TfR 在脑微血管内皮细胞表面和恶性细胞中的高表达现象,黄蓉琴等^[22]合成了载体高分子 PAMAMD-PEG-Tf,并证实了其具有较好的脑毛细管内皮细胞 (brain capillary endothelial cells, BCECs) 摄取效率和脑靶向性;载入 DNA 后,经 Tf 修饰的纳米粒在 BCECs 和脑内的表达均明显高于未修饰的纳米粒。He 等^[39]在 PAMAMD-PEG-Tf 的基础上又连接了另一个新发现的脑靶向配基——麦胚凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA),合成了二元靶向给药载体 (PAMAMD-PEG-WGA-Tf),测得其粒径范围为 14~20 nm,对 C6 神经胶质瘤细胞和脑微血管内皮细胞 (BMVECs) 无明显毒性。载入 DOX 后,该靶向给药系统不但降低了 DOX 的细胞毒性,对 C6 神经胶质瘤细胞也显示出稍高于 DOX 的抑制作用。BBB 转运分析实验显示 PAMAMD-PEG-WGA-Tf 明显提高了药物的转运率,使 DOX 在肿瘤部位的累积量增加。

但 Tf 作为靶向配基存在缺陷,TfR 是一类双向跨细胞功能的受体,可能会降低通过 TfR 进入脑内的药物的浓集量;其次生理状态下内源性 Tf 会占据 TfR,且 TfR 在全身其他器官的基因表达较高,这些都影响靶向效率。

4.2 乳铁蛋白 (Lactoferrin, Lf) Ji 等^[40]对比了 Lf、Tf 和 OX26 的脑内摄取,发现 Lf 具有最高的脑内转运效率,证明了 Lf 作为脑靶向配基的潜在性。Huang 等^[41]以帕金森病 (PD) 为疾病模型,评价了非病毒载体高分子 PAMAMD-PEG-Lf 包载治疗基因 (hGDNF) 的纳米粒在慢性 PD 模型大鼠上的药效。结果表明 PAMAMD-PEG-Lf/hGDNF 纳米粒的脑部基因表达最高,且多次给予该纳米粒优于单次给药的疗效,证明了 PAMAMD-PEG-Lf/DNA 纳米粒是一种高效的非病毒载基因系统,可持续提高脑内基因表达。但 Lf 在肿瘤细胞结合的特异性、限制与非肿瘤细胞的结合、对广谱肿瘤的杀伤作用等方面的问题都没有很好的解决。这也是通过受体介导细胞摄入的所有配基

的不足之处。

5 多肽-PAMAMD 靶向给药系统

Huang 等^[42]以 PAMAMD 为载体, 用果蝇转录因子 Antp (一种穿膜多肽) 修饰载基因纳米粒, 研究其对 BCECs 的转染, 并与壳聚糖, PEI 为载体的载基因纳米粒比较, 发现 PAMAMD/DNA 能进入脑毛细血管内皮细胞, 经 Antp 修饰后转染和表达效率最高。Kang 等^[43]用穿膜多肽 Tat 修饰的 PAMAMD 载入反义寡核苷酸和 siRNA, 发现 Tat-PAMAMD/反义寡核苷酸对 MDRI 基因表达有部分抑制作用, 而 Tat-PAMAMD/siRNA 对该基因表达的抑制作用很弱。

肿瘤细胞或新生血管特异表达的一些整合素与 RGD 肽之间存在一定的亲和力, 使其成为肿瘤治疗和诊断的新靶点。Shukla 等^[44]将 RGD 肽连接到被荧光素 Alexa Fluor 488 标记的 G5 PAMAMD 上, 通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 实现对肿瘤新生血管系统的靶向性。PAMAMD 和 RGD 肽在细胞结合上发挥协同作用, 增加癌细胞对药物的摄取时间, 进而提高摄取率。朱赛杰^[23]在 RGD-PAMAMD 复合物的基础上偶联 CA 和 Dox, 制备成 RGD-PPCD 载体。肿瘤新生血管内皮细胞系、肿瘤细胞系对 RGD-PPCD 的摄取率显著高于 PPCD; RGD-PPCD 在肿瘤部位的蓄积量和释药量均高于 PPCD, 进一步证实了 RGD-PPCD 主动靶向肿瘤的能力。在合成过程中, RGD 与 PAMAMD 之间的连接基团 (通常是 PEG) 的分子大小可能对 RGD 的活性产生影响, 如何选择合适的连接基团又保证 RGD 的活性是一个很有意义的研究方向。

近年来新发现两种多肽: 氯代毒素 (chlorotoxin, CTX) 和 angiopep-2。CTX 通过胶质瘤细胞表达的基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 与肿瘤细胞结合, 而 angiopep-2 通过低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low density lipoprotein receptor-related protein, LRP) 介导高效进入脑胶质细胞。用 CTX 和 angiopep-2 分别修饰 PAMAMD 构建了脑靶向载基因纳米递药系统^[45, 46]。与未修饰的 PAMAMD 相比, PAMAMD-PEG-CTX 在 C6 胶质瘤细胞中的摄取效率明显提高, 而 PAMAMD-PEG-angiopep/DNA 通过 LRP 介导和各种内吞途径在 BCECs 上的摄取增加。在荷脑胶质瘤模型小鼠上, 这两种载基因纳米粒都能有效增加基因在肿瘤部位的分布, 有效诱导脑胶质瘤细胞凋亡, 延长小鼠存活时间。这两者的发现扩充了脑靶向配基的种类, 且克服了 Tf 作为脑靶向配基的缺陷。

在肿瘤治疗中, 癌细胞通常对一种化学治疗药

物会产生严重的耐药现象, 因此单一的药物不能得到最好的治疗效果^[47]。联合药物治疗有望克服这一缺点, 它能够通过不同的机制作用于不同的靶点以达到协同治疗的效果^[48]。Han 等^[49]通过 PEG 将多肽 HAIYPRH (T7) 连接到 PAMAMD 上, 并载入治疗基因编码 (pORF-hTRAIL) 和 DOX。T7 修饰的联合给药系统对人肝癌细胞 Bel-7402 表现出高的细胞摄取率和基因表达率, 在动物体内也有高的蓄积作用, 更有效地引起细胞凋亡和抑制肿瘤生长。这种联合给药系统扩大了肿瘤的治疗窗, 使对癌细胞的选择性破坏研究又进了一步。而 PAMAMD 表面数目众多的功能团, 为联合给药系统的制备提供了有利平台, 显示其作为靶向给药系统载体的优越性。

6 氨基酸类-PAMAMD 靶向给药系统

氨基酸类-PAMAMD 靶向给药系统主要被应用在基因治疗中。氨基酸能够增加靶向系统的表面电荷密度, 从而增强细胞吞噬能力, 有利于基因药物在靶点累积从而发挥治疗作用。在最新发表的研究报告中, 组氨酸的咪唑环由于其独特的质子化机制使其成为靶向给药系统中一种很有潜力的靶向配基。组氨酸-PAMAMD 复合物对 Bel 7402 和 HeLa 细胞的毒性显著低于未经修饰的 PAMAMD, 血清转染效率却有大幅度提高, 并显著高于阳离子聚合物 PEI 和市售商品阳离子脂质体 Lipofectamine^[21]。Kumar 等^[50]研究显示鸟氨酸-PAMAMD 能使质粒 DNA 免受核酸酶的降解, 在 HEK 293T (人肾胚细胞)、GM7373 (牛大动脉内皮细胞) 和 NCIH157G (人非小细胞性肺癌细胞) 3 种细胞系中的转染效率也均高于 PAMAMD/DNA, 即使在很难被转染的 GM7373 细胞系中, 也有 17.5% 的转染率, 但游离鸟氨酸因为利用相同的转运途径会影响复合物在细胞中的转染率。

靶向给药系统的靶向性和转染率与配基的种类有关, 但配基的数目对其也有影响。Kim 等^[51]合成了一元和二元精氨酸-PAMAMD (G = 3 或 4), 分别为 PAMAMD3-R、PAMAMD4-R、PAMAMD3-R2 和 PAMAMD4-R2。与一元精氨酸-PAMAMD 相比, 二元复合物具有更高稳定性和精确地内部核定位能力, PAMAMD3-R2 比 PAMAMD3-R 显示出更高的转染率。

众所周知, 树状大分子的细胞毒性受表面基团的影响, 阳离子树状大分子具有较好的转染率, 但毒性也比表面基团为酯基或羟基的阴离子树状大分子大。为降低树状大分子的毒性, Nam 等^[52, 53]考虑对 PAMAMD-OH 进行精氨酸和赖氨酸修饰 (e-PAM-R,

e-PAM-K)。载入质粒 DNA 后, e-PAM-R G4 的转染能力与 PAMAMD-R G4 相似, 但强于 G3 和 G2, 说明甲基修饰不影响 PAMAMD 的转染率。在生理环境中, e-PAM-K 显示出比 e-PAM-R 稳定的降解能力、良好的释药能力和更低的毒副作用, 但转染能力没有得到提高, 这可能是由于精氨酸具有更好的膜渗透性和核定位能力。所以并不是所有的氨基酸都能被应用在靶向给药系统中, 还要考虑各氨基酸的结构、细胞特性等。

7 单克隆抗体-PAMAMD 靶向给药系统

将单克隆抗体连接到 PAMAMD 上, 可以靶向表面过度表达相应抗原的肿瘤细胞上, 从而达到靶向给药的功能。前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 在前列腺癌、非前列腺肿瘤新生血管和大部分固体肉瘤和肿瘤的血管内皮细胞上大量表达^[54]。Patri 等^[15]用抗 PSMA 抗体 J591 修饰 PAMAMD, 发现抗体 J591-PAMAMD 能特异性地与 PSMA 阳性细胞结合, 与阴性细胞无作用。Wangler 等^[55]研究发现抗 EGFR 的抗体 hMAb425 与 PAMAMD 结合后, 抗体数目影响免疫反应而粒径对免疫反应没有显著作用。研究还发现充分表达人生长因子受体 2 (HER2) 的乳腺癌细胞和卵巢癌细胞, 能与抗 HER2-PAMAMD 复合物特异性结合 (图 2)^[16]。

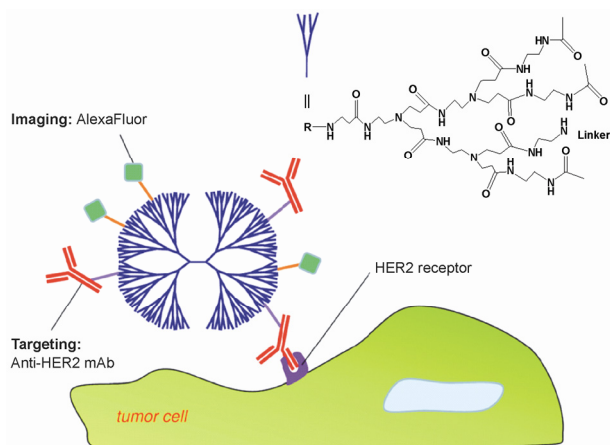


Figure 2 Mechanism of active targeting via an antibody-dendrimer conjugate^[16]

西妥昔单抗是一种表皮生长因子受体抑制剂, 可以作为治疗细胞直肠癌和头颈癌的药物。Wu 等^[56]将西妥昔单抗连接到 G5 PAMAMD 上, 并载入抗癌药物 MTX 制备成西妥昔单抗-PAMAMD/MTX 复合物, 可靶向和递送药物至神经胶质瘤, 但在动物实验中并没有表现出比游离 MTX 更好的治疗效果, 可能是由于药物不能从 PAMAMD 支架中很好的释放出来。

另外昂贵的价格限制了单克隆抗体的研究和应用。

8 小结与展望

自 1985 年 PAMAMD 被合成以来, 独特的理化性质和生物学特性使其在各研究领域受到越来越多的关注, 如拟生态学^[57]、组合化学^[58]及废水处理^[59]等领域, 也包括本文中所讨论的在靶向给药系统中的应用。PAMAMD 末端众多的功能团可同时与靶向配基和药物分子偶联, 且形成的复合物粒径通常较小且较易人为控制, 有利于以 PAMAMD 为基础制备的复合物靶向肿瘤组织, 即使是最难通过的血脑屏障, 这是脂质体、微球等其他纳米靶向系统所无法比拟的。除了本文中介绍的一些靶向给药系统, 还有一些靶向给药系统也受到关注, 如 (VEGF)-PAMAMD^[17]、VEGF-PAMAMD^[60]、糖皮质激素-PAMAMD^[61]等给药系统。与传统给药相比, PAMAMD 靶向给药系统显示出了生物利用度高, 生物相容性好, EPR 效应强和毒副作用低等优势。但目前绝大部分 PAMAMD 靶向给药系统处于实验室研究阶段, 这是因为给药系统还存在一些待解决的问题, 如商业化的 PAMAMD 价格偏高; PAMAMD 的纯度还有待提高; PAMAMD 的长期毒性、体内蓄积性有待深入研究; 体内代谢动力学模型缺乏完整的质量评价和标准; 主动靶向受体在一些正常细胞中也有少量表达, 有可能引起其他不良反应; PAMAMD 与靶向配基和药物偶联后可能会降低偶联物的水溶性等。

目前作者所在实验室正在尝试研究 PAMAMD 及相关修饰后的 PAMAMD 对药物的增溶和缓释作用, 以及蛋白和金属离子存在时对药物运输的影响。初步研究显示金属离子存在时对 PAMAMD 及其修饰物的载药均有影响。作者认为今后 PAMAMD 靶向给药系统的应用研究重点: ① 考察 PAMAMD 对蛋白和 DNA 构象的影响, 系统探究 PAMAMD 的体内代谢过程和作用机制, 促进改善载体的表面性质, 降低毒性, 增强靶向性。② 深入了解相关疾病的发病机制及病变部位的特殊生理生化变化, 以利于寻找新的靶向配基, 进一步设计并制备出新型的 PAMAMD 靶向给药系统。③ 建立完善的 PAMAMD 靶向给药系统的质量标准和评价, 为 PAMAMD 靶向给药系统的临床应用提供理论基础, 以期该靶向系统给肿瘤患者带来希望。

References

- [1] Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71: 445-462.

- [2] Sun Y, Yu F, Sun BW. Antibody-drug conjugates as targeted cancer therapeutics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 943–952.
- [3] Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 2215–2237.
- [4] Khandare J, Minko T. Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs [J]. *Prog Polym Sci*, 2006, 31: 359–397.
- [5] Gillies ER, Frechet MJM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 35–43.
- [6] Cheng YY, Xu ZH, Ma ML, et al. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 123–143.
- [7] Majoros IJ, Myc A, Thomas TP, et al. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 572–579.
- [8] Kurtoglu YE, Mishra MK, Kannan S, et al. Drug release characteristics of PAMAM dendrimer-drug conjugates with different linkers [J]. *Int J Pharm*, 2010, 384: 189–194.
- [9] Lee CC, MacKay JA, Fréchet MJM, et al. Designing dendrimer for biological applications [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1517–1526.
- [10] Wolinsky JB, Grinstaff MW. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1037–1055.
- [11] Bhadra D, Yadav AK, Bhadra S, et al. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting [J]. *Int J Pharm*, 2005, 295: 221–233.
- [12] Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao ZY, et al. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 5317–5324.
- [13] Singh P, Gupta U, Asthana A, et al. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 2239–2252.
- [14] Choi Y, Thomas T, Kotlyar A, et al. Synthesis and functional evaluation of DNA-assembled polyamidoamine dendrimer clusters for cancer cell-specific targeting [J]. *Chem Biol*, 2005, 12: 35–43.
- [15] Patri AK, Myc A, Beals J, et al. Synthesis and *in vitro* testing of J591 antibody dendrimer conjugates for targeted prostate cancer therapy [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15: 1174–1181.
- [16] Shukla R, Thomas TP, Peters JL, et al. HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17: 1109–1115.
- [17] Wang P, Zhao XH, Wang ZY, et al. Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2010, 298: 34–49.
- [18] Yu PL, Li ST, Ye L, et al. Synthesis of PEGylated PAMAM dendrimer as a drug carrier [J]. *Chin J Biomed Eng (中国生物医学工程学报)*, 2007, 26: 921–925.
- [19] Kong SY, Tang GT, Pei YY, 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.
- [20] Chandrasekar D, Sistla R, Ahmad FJ. The development of folate-PAMAM dendrimer conjugates for targeted delivery of anti-arthritis drugs and their pharmacokinetics and biodistribution in arthritic rats [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 504–512.
- [21] Wen YT, Pan SR, Guo ZH, et al. Histidine modified PAMAM as gene vector for enhancing gene transfection efficiency in serum [J]. *Chin J Biomed Eng (中国生物医学工程学报)*, 2010, 29: 129–136.
- [22] Huang RQ, Qu YH, Ke WL, et al. Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethylene glycol-modified polyamidoamine dendrimer [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 1117–1125.
- [23] Zhu SJ. Studies on Tumor Targeting of RGD Modified Doxorubicin Loaded PEG-PAMAM Conjugates (整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导的阿霉素-树枝状聚合物纳米载药系统的肿瘤靶向研究) [D]. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [24] Cheng YY, Qu HO, Ma ML, et al. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: an *in vitro* study [J]. *Eur J Med Chem*, 2007, 42: 1032–1038.
- [25] Lu JJ, Wu ZH, Ping QN. The effect of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the solubility and pharmacokinetics of breviscapine [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 197–202.
- [26] Tang Y, Ma LF, Dai HZ, et al. *In vitro* test of PAMAM dendrimer as a drug carrier in solubilization and sustained release [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2009, 20: 21–24.
- [27] Kong SY, Tang GT, Pei YY, et al. PEGylated polyamidoamine dendrimer/methotrexate complex: pharmacokinetics and anti-tumor activity in normal and tumor-bearing rodents [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 85–90.
- [28] Zhu SJ, Hong MH, Tang GT, et al. Partly PEGylated polyamidoamine dendrimer for tumor-selective targeting of doxorubicin: the effects of PEGylation degree and drug conjugation style [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 1360–1371.

- [29] Wang W. Protective Effect of PEGylation Against Poly (amidoamine) Dendrimers Induced Toxicity (PEG 修饰对 PAMAM 树状大分子导致细胞损伤的保护作用及其机制) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2009.
- [30] Chen Y, Chen HY. Expression of folate receptor in nasopharyngeal carcinoma cell line and in nasopharyngeal carcinoma tissue [J]. *J Oncol*, 2009, 15: 627–628.
- [31] Low PS, Hene WA, Doorneweerd DD. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 120–129.
- [32] Salazar MD, Ratnam M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26: 141–152.
- [33] Wiener EC, Konda S, Shadron A, et al. Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor [J]. *Invest Radiol*, 1997, 32: 748–754.
- [34] Li R, Zhang JX, Shi L, et al. Study on the inhibitory effect of a new ultramicrocarrier FA-PAMAM-mediated hTERT-siRNA on human cerebral glioma cell line U251 *in vitro* [J]. *Chin J Contemp Neurol Neurosur* (中国现代神经疾病杂志), 2008, 8: 339–344.
- [35] Zhao YL, Liu S, Li YP, et al. Synthesis and grafting of folate-PEG-PAMAM conjugates onto quantum dots for selective targeting of folate-receptor-positive tumor cells [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2010, 350: 44–50.
- [36] Yellepeddi VK, Kumar A, Palakurthi S. Biotinylated poly (amido) amine (PAMAM) dendrimers as carriers for drug delivery to ovarian cancer cells *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29: 2933–2944.
- [37] Yang WJ, Cheng YY, Xu TW, et al. Targeting cancer cells with biotinedendrimer conjugates [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 862–868.
- [38] Tang GT, Zhu SJ, Hong MH, et al. Proceeding of the 2009 Chinese Pharmaceutical Conference and the Ninth China Pharmacist Week (2009 年中国药学会大会暨第九届中国药师周论文集) [C]. Changsha: Chinese Pharmaceutical Association Press, 2009, 2570–2580.
- [39] He H, Li Y, Jia XR, et al. PEGylated poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 478–487.
- [40] Ji B, Maeda J, Higuchi M, et al. Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 851–855.
- [41] Huang RQ, Ke WL, Liu Y, et al. The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 238–246.
- [42] Huang RQ, Yang WL, Jiang C, et al. Gene delivery into brain capillary endothelial cells using antp-modified DNA-loaded nanoparticles [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54: 1254–1258.
- [43] Kang H, De LR, Fisher MH, et al. Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides [J]. *Pharm Res*, 2005, 22: 2099–2106.
- [44] Shukla R, Thomas TP, Peters J, et al. Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer-RGD conjugates [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2005, 46: 5739–5741.
- [45] Ke WL, Shao K, Huang RQ, et al. Gene delivery targeted to the brain using an angiopep-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 6976–6985.
- [46] Huang RQ, Ke WL, Jiang C. Targeted delivery of chlorotoxin-modified DNA-loaded nanoparticles to glioma *via* intravenous administration [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 2399–2406.
- [47] Wang C, Chen T, Zhang N, et al. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)- induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B kinase-NF κ B [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 3804–3813.
- [48] Wiradharma N, Tong YW, Yang YY. Self-assembled oligopeptide nanostructures for co-delivery of drug and gene with synergistic therapeutic effect [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 3100–3109.
- [49] Han L, Huang RQ, Li JF, et al. Plasmid pORF-hTRAIL and doxorubicin co-delivery targeting to tumor using peptide-conjugated polyamidoamine dendrimer [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 1242–1252.
- [50] Kumar A, Yellepeddi VK, Davies GE, et al. Enhanced gene transfection efficiency by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers modified with ornithine residues [J]. *Int J Pharm*, 2010, 392: 294–303.
- [51] Kim TI, Bai CZ, Nam KH, et al. Comparison between arginine conjugated PAMAM dendrimers with structural diversity for gene delivery systems [J]. *J Control Release*, 2009, 136: 132–139.
- [52] Nam HY, Hahn HJ, Nam K, et al. Evaluation of generations 2, 3 and 4 arginine modified PAMAM dendrimers for gene delivery [J]. *Int J Pharm*, 2008, 363: 199–205.
- [53] Nam HY, Nam KH, Hahn HJ, et al. Biodegradable PAMAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 665–673.
- [54] Chang SS, O'Keefe DS, Bacich DJ, et al. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 2674–2681.

- [55] Wangler C, Moldenhauer G, Eisenhut M, et al. Antibody dendrimer conjugates: the number, not the size of the dendrimers, determines the immunoreactivity [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 813–820.
- [56] Wu G, Barth RF, Yang W, et al. Targeted delivery of methotrexate to epidermal growth factor receptorpositive brain tumors by means of cetuximab (IMC-C225) dendrimer bioconjugates [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 52–59.
- [57] Oliveira JM, Kotobuki N, Tadokoro M, et al. *Ex vivo* culturing of stromal cells with dexamethasone-loaded carboxymethyl-chitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles promotes ectopic bone formation [J]. *Bone*, 2010, 46: 1424–1435.
- [58] Huang BH, Tomalia DA. Dendronization of gold and CdSe/CdS (core-shell) quantum dots with tomalia type, thiol core, functionalized poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons [J]. *J Lumin*, 2005, 111: 215–223.
- [59] Shcharbin D, Mazur J, Szwedzka M, et al. Interaction between PAMAM 4.5 dendrimer, cadmium and bovine serum albumin: a study using equilibrium dialysis, isothermal titration calorimetry, zeta-potential and fluorescence [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 58: 286–289.
- [60] Thomas TP, Choi SK, Li MH, et al. Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 5191–5194.
- [61] Ma K, Hu MX, Qi Y, et al. PAMAM-Triamcinolone acetone conjugate as a nucleus-targeting gene carrier for enhanced transfer activity [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 6109–6118.

《药学报》英文刊定于 2011 年 6 月正式出版

《药学报》英文刊 (*Acta Pharmaceutica Sinica B*) 由中国医学科学院药物研究所、中国药学会和荷兰 Elsevier 出版公司合作出版, 是《药学报》中文刊的国际化延伸, 出版内容与风格将与《药学报》保持一致, 力争打造一本具有一定国际影响力的药学综合性学术期刊。药理学家蒋建东教授出任主编。目前, 副主编、编委会已按照国际期刊的标准组织完成, Elsevier 公司提供的更符合国际期刊投稿流程的投审稿系统即将启用。该刊定于 2011 年 6 月正式出版。出版周期为双月刊。论文将在 Elsevier 期刊数据库 ScienceDirect 平台以 OA 方式刊出, 便于广大读者免费阅读和下载。

目前投稿暂投至 <http://www.yxxb.com.cn>, 从 6 月份开始投稿方式和论文格式参见 <http://ees.elsevier.com/apsb>, 目前暂不收取审稿费、版面费, 也不支付稿费。

欢迎国内外药学研究工作者积极投稿。

《药学报》编辑部