

综 述

生物材料聚酰胺-胺树状大分子在医学领域研究进展

叶 玲^{*}, 顾 微, 周玉兰

(首都医科大学化学教研室, 北京 100054)

摘要: 聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子是一类新型纳米生物材料, 这类分子可通过有机合成的方法精确控制分子的结构和相对分子质量。其独特的分子结构使之在许多领域获得广泛应用。本文着重介绍了 PAMAM 树状大分子作为基因载体、药物载体、磁共振造影剂和硼中子俘获治疗试剂等在医学领域中的研究进展。

关键词: 聚酰胺-胺; 树状大分子; 药物载体

聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子是一类由中心向外对称发散而高度分枝的新型纳米大分子化合物, 通过反复的 Michael 加成和酰胺化反应可得到不同代数(0~10代)的树状大分子。PAMAM 树状大分子一般具有三个明显结构特征(图1): 初始核(氨或乙二胺等)、枝(代数)、末端基团。树状大分子的大小随代数增加而增加, 范围为1nm~10nm^[1,2]。PAMAM 树状大分子结构和相对分子质量可被严格控制, 呈单分散性。其内部具有空腔, 可以包裹药物分子, 末端基团通过修饰可连接基因和抗体等生物活性物质, 致密的末端基团允许每个树状大分子结合更多的活性物质。与目前的脂质体药物载体相比, 树状大分子具有稳定、无免疫原性、在使用剂量下不存在毒性^[3,4]、对生物活性剂的转运效率高等优点, 已成为生物医学领域的研究热点之一。目前国外对树状大分子的应用潜力进行了极其广泛的研究, 其中在医学领域的研究主要集中在基因载体、药物载体、磁共振造影剂和硼中子俘获治疗试剂等。国内医学对该领域的研究尚不多见。

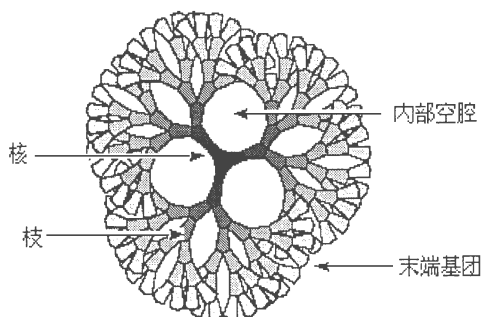


图1 PAMAM 树状大分子

1 基因载体

目前常用的基因载体主要有病毒和脂质体两类。用逆转录病毒作为基因转染载体, 虽有很高的转染效率, 但由于其体积小, 所运载基因的数量有限。脂质体能运载更多数量的基因, 但脂质体-基因体系不稳定, 组织特异性较差。近年来, 单分散性、稳定性好的 PAMAM 树状大分子作为基因载体的研究蓬勃发展。1993 年 Haensler 和 Szoka^[5] 首先报道了 PAMAM 树状大分子用作基因转染剂。5.0G 以上的 PAMAM 树状大分子能将 DNA 高效转染到不同的哺乳动物细胞中, 转染效率高于

基金项目: 北京市科技新星计划(954812000)和北京市教委科技发展计划资助(00KJ-107);

作者简介: 叶玲(1963—), 女, 副教授, 北京理工大学博士毕业, 现从事树状大分子的合成与应用研究。

脂质体。转染效率主要取决于树状大分子与 DNA 比例及树状大分子的大小。树状大分子的转染效率还与其 pK_a (树状大分子的酸性解离常数) 有关。在生理 pH 条件下, 阳离子的树状大分子与阴离子的寡核苷酸以静电作用结合显示出很强的转运活性, 并且在不同的 pH 条件和离子强度下都非常稳定^[10]。只有当采用离子清洁剂 SDS (十二烷基硫酸钠) 时才能解离 DNA-树状大分子复合物^[11]。DNA-树状大分子复合物对限制性核酸内切酶也很稳定, 这就使得 DNA 在体内的存活时间延长。如果设计不同的树状大分子, 使其在进入靶向细胞时既发生降解又失去电荷, 这样就可避免转录活性的减低。一个出人意料的发现是在水中或丁醇中加热回流树状大分子 5~15h 后可大大提高 DNA 转染效率^[9], 这主要是由于碎片树状大分子柔韧性较高, 使得碎片树状大分子在与 DNA 结合时呈现出紧密的形状, 而在释放 DNA 时发生膨胀。此外, 树状大分子在转运寡核苷酸方面也优于脂质体, 并具有转运反义核苷酸的能力^[7~9]。Attia 等人^[12] 用荧光标记树状大分子-寡核苷酸复合物并观察其进入分支杆菌和肺结核菌, 结果如预期所料, 在细菌细胞内观察到了荧光的增加, 即表明有更多的寡核苷酸与细胞壁结合了。若用中性右旋糖苷代替树状大分子则没有相同的效果, 采用阳离子脂质体也没有使荧光增加。Manyama 等^[13] 报道了树状大分子作为自杀基因载体在体内实验的有效性。

树状大分子除单独作为基因载体以外, 还能与其他基因转染系统结合以提高基因转染效率, 如用作逆病毒转染系统的增强剂^[14] 以及基因枪^[15] 技术。

2 药物载体

PAMAM 树状大分子表面大量的氨基官能团(5.0G 有 64 个氨基, 6.0G 有 128 个氨基)和内部的空腔使其与多个分子结合成为可能。树状大分子化学家通过各种技术, 包括荧光和光学吸收探针、EPR(电子顺磁共振)技术以及分子模拟等研究分子的形状、大小、表面性质及小分子在内腔和外表面的吸附行为。研究主要集中在树状分子的表面和内部空腔与小分子键合实验及其机理研究上。

PAMAM 树状大分子是聚电解质。在水中末端基的一级胺和内腔中的三级胺均可质子化, 质子化的程度取决于溶液的 pH。聚电解质的质子化强烈地影响其构象。Chen 等人^[16] 用荧光光谱法研究了 6.0G PAMAM 树状大分子与探针分子 DNS(5-二甲胺基-1-萘酚磺酸)结合的机理。发现在带正电荷的树状大分子与带负电的 DNS 之间是靠静电作用结合的。PAMAM 树状大分子的酸性解离一级常数、二级常数分别为 $pK_{a1}=10$ 和 $pK_{a2}=4.5$ 。当 $pH>10$ 时, PAMAM 表面的一级胺很少被质子化。因而不易发生静电作用。随着 pH 降低, 一级胺的表面开始质子化, 到 pH 为 8.3 时, 三级胺也开始质子化。因此, 在 $5.5<pH<10$ 时, PAMAM 树状大分子与 DNS 发生静电结合作用。Watkins 等人^[17] 也证明了 PAMAM 树状大分子在 $pH=7$ 时, 对染料 Nile red 的结合量最大。这与 Chen 等人的研究结果是一致的。Watkins 研究小组还发现将乙二胺的亚甲基键增长到 12 个碳, 其包裹量将远高于乙二胺为核的树状大分子。这是由于在 $pH=7$ 时, 相连的两个带电楔形物相互排斥, 形成一个拉长的树状大分子。这样的结构特点特别利于更多的染料分子阴离子对亲脂性核的接近以发生静电作用。利用这种静电作用, Milhem 等人^[18] 将树状大分子用作脂溶性弱酸性药物布洛芬的增溶剂研究。发现比传统的增溶剂 SDS 具有更大的增溶效果。

在应用研究方面, Malik 等人^[19] 用铂修饰 PAMAM 树状大分子(20%~25%(wt)铂), 这种高度水溶的树状大分子-铂复合物显示了抗肿瘤活性而单独的铂却没有这种活性, 而且这种复合物的毒性比顺氯铂要低 3~15 倍。Kojima 等人^[20] 用 PEG 修饰树状大分子, 不仅在适当条件下可以释放阿

霉素和甲氨蝶呤,而且同时加强了载体的生物相容性。Zhuo 等人^[21]合成了具有环状核的 PAMAM 树状大分子,在 37℃、pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液中成功缓释出游离的 5-氟脲嘧啶。上述研究表明, PAMAM 树状大分子有希望成为抗癌药物可控释放的运载体系。此外,将具有抗病毒(如 HIV)活性的磺酸盐多糖化合物复合到 PAMAM 树状大分子上,不仅增强抗 HIV 1、HIV 2、CMVH 和 HSV 等病毒活性,而且克服原药的抗凝血特性、不稳定、量大等缺陷。因此抗病毒树状大分子非常适合人类用作预防 and 治疗的抗病毒试剂^[22]。

不仅整代 PAMAM 树状大分子具有运载药物分子的能力,半代也同样具有包裹能力。如果将半代的 PAMAM 树状大分子在碱性条件下水解,则这种具有羧酸端基表面和烷基链内腔的树状大分子表现出单分子胶束的性质^[23]。Tomalia^[24]用自旋晶格弛豫的方法证明了这种特性,并在一定的 pH 水溶液中用树状大分子成功地进行包裹和释放伪麻黄碱的实验。Twyman 等人^[25]在碳酸钾溶液中加入三(羟甲基)胺基甲烷,用此溶液处理 PAMAM 树状大分子得到端基为多羟基的与水互溶的树状大分子。这种类胶束的载体可包裹某些酸性脂溶性小分子。Wiwattanapatapee 等人^[26]用鼠外翻肠囊泡系统在体外研究了树状大分子的大小、电荷和浓度对成年鼠肠穿透和摄取的影响。结果发现阴离子 PAMAM 树状大分子显示出比其他合成或天然大分子更快的绒膜转运速率,因此有可能成为口服药物的运载体系。

Kleinman 等人^[27]用荧光光谱和激光闪烁光裂解进行了三重激发态的 2-萘酚与树状大分子非共价结合复合物的超分子动力学研究。通过改变溶液的酸度和树状大分子的大小,发现 PAMAM 树状大分子具有非特异性和特异性的键合特性。2-萘酚更易与内腔的三级胺结合,这种结合是通过氢键结合而非静电作用。说明树状大分子与小药物分子的相互作用不仅限于静电作用。

树状大分子作为小分子药物载体的研究已经取得了长足的进展。但研究仍处于探索阶段。人们在对树状分子进行不同方法模拟的同时,不断用实验探索树状大分子在表面和内部结合各种分子的可能性以及寻找可控制释放的条件。由 pH 决定的树状大分子的构象行为仍是研究的重点之一。

3 磁共振成像造影剂

磁共振成像造影剂与螯合剂相连可对靶器官进行成像,以检查脑或器官血池中血流的变化。Wiener 等人^[28]通过硫脲键把螯合剂 DTPA 连接到 2.0G 和 6.0GPAMAM 树状大分子上(PAMAM-DTPA),再螯合造影剂钆(Gd^{3+})。每个 6.0G PAMAM-DTPA 大约能结合 170 个 Gd^{3+} ,这大大超过其它大分子复合 Gd^{3+} 的数目。具有大量螯合位点的树状大分子结合造影剂作为磁共振造影剂具有组织特异性,增加了金属-离子运输到靶向位点的能力。 Gd^{3+} 螯合到树状大分子上增加了造影剂的弛豫时间,增强了造影效果。与单聚体 Gd -DTPA 相比,树状大分子-造影剂复合物在血池中的循环时间得到增加。若在树状大分子-造影剂复合物中的树状大分子表面再接上叶酸,肿瘤表面的叶酸受体就能够特异地高亲和结合树状大分子-叶酸复合物,这使得树状大分子-造影剂复合物对肿瘤细胞更具有靶向性^[29]。

4 硼中子俘获治疗剂

硼中子俘获治疗(BNCT)可选择性地破坏恶性肿瘤细胞,而对正常细胞没有影响。BNCT 建立在俘获反应的基础上,当¹⁰B(硼的稳定同位素)受到低能热中子($\leq 0.025\text{eV}$)激发时发生核裂变,产生 $\alpha(^4\text{He})$ 粒子和⁷Li核($^{10}\text{B} + \text{热中子} \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow ^4\text{He} + ^7\text{Li} + 2.79\text{MeV}$)。BNCT 能否有效治疗肿瘤依赖

于将足够数量的 ^{10}B (约 10^9 个)送抵癌细胞,产生持续的对癌细胞致死性的核反应^[30,31]。一个树状大分子大约可结合250~400个 ^{10}B 形成硼化的树状大分子。Yang^[32]等人通过双功能试剂将硼化的树状大分子与肿瘤的靶向剂表皮生长因子(EGF)相连,然后在肿瘤内注射 ^{130}I 标记的EGF-树状大分子,通过闪烁扫描法和自动射线照相术等方法发现硼化的EGF-树状大分子被选择性地输送到神经胶质瘤,这说明硼化的EGF-树状大分子复合物可作为肿瘤靶向的硼中子捕获治疗剂。

5 免疫佐剂及免疫测定

免疫佐剂可提高抗原或疫苗在人体内产生抗体反应的能力。然而使用氢氧化铝作为免疫佐剂对于一些疫苗存在毒性问题,特别对于流感疫苗,毒性问题就更加明显。用树状大分子作为流感疫苗的免疫佐剂可避免毒性问题。树状大分子另一优势在于它们带有正电荷,因此抗原形式的流感病毒与树状大分子可通过静电结合。试验结果表明,树状大分子是流感疫苗良好的免疫佐剂,6.0G树状大分子最适合作为免疫佐剂。其它带负电的病毒等也可采用树状大分子作为免疫佐剂^[33]。5.0G树状大分子具有球状外形,其溶解性和分子大小也与IgG抗体的Fc区相似,因此被用于免疫测定。树状大分子-抗体用于免疫测定能克服一般免疫测定方法中的一些缺点,如强的背景信号或较长的培养时间。Singh等人^[34]的实验结果证实树状大分子-抗体用于肌氨酸激酶MB同工酶(CK-MB)等的免疫测定增强了测定灵敏度且缩短了测定时间。更为优越的是树状大分子-抗体复合物用于免疫测定,整个过程都能在溶液中进行。

6 结论与展望

树状大分子是一类新型的漂亮迷人的大分子。初始的研究主要集中在合成上。现在研究兴趣已转向性能和应用上。树状大分子新型结构可用作内-外受体基质(主-客)相互作用的多功能平台。例如,在设计新型包裹剂和用作蛋白质作用的模型时可研究内受体特点,而在设计人工基因转染材料、多质粒测试和磁共振成像造影剂时,外受体可被研究。此外,树状大分子已被用作几个更大纳米和中型结构的建筑模板,包括单层和多层,胶束聚集体,不连续的氢键超结构。对聚合物进行的超分子体系的合理设计是一个新出现的领域,具有发展潜力。

树状大分子化学现在处于爆炸性生长阶段。重要应用可能出现在几年后的许多领域包括材料科学和生物医药科学。尽管研究注意力转向性能开发和应用,但在工业规模廉价生产前,研究新的合成方法仍然是重要的。

PAMAM树状大分子因其独特的分子结构而显示出特殊的性质,极有可能成为基因、药物、磁共振造影剂和硼中子俘获治疗试剂等的新一代运载工具。尽管如此,在实际应用前仍有一些问题(如毒性)需进一步深入研究。树状大分子毒性与代数和浓度有关,若在树状大分子表面接上一些生物相容性的基团(如PEG)则可减少其细胞毒性。此外,另一个需要考虑的因素是树状大分子在体内的生物分布,树状复合物有足够的血液循环时间,这使得树状复合物具备一定治疗效果又可在靶位(如肿瘤)处积累。但为了避免不必要的长期积累,必须考虑树状复合物能及时被排出体外。

参考文献:

[1] Tomalia D A, Baker H, Dewald J. 1985, 17(1): 117~132.

[2] Tomalia D A, Naylor A M, Goddard W A. *Angew Chem, Int Ed Engl*. 1990, 29: 138~175.

- [3] Malik N, Wivattanataptee R, Klopsch R, et al. J Controlled Release, 2000 65; 133 ~ 148.
- [4] Roberts J C, Bhagat M K, Zera R T. J Biomed Mater Res, 1996 30(1): 53 ~ 65.
- [5] Haensler J, Szoka F C Jr. Bioconjug Chem, 1993, 4(5): 372 ~ 379.
- [6] Tang M X, Redemann C T, Szoka F C Jr. Bioconjug Chem, 1996, 7(6): 703 ~ 714.
- [7] Yoo H, Sazani P, Juliano R L. Pharm Res, 1999, 16(12): 1799 ~ 1804.
- [8] Yoo H, Juliano, R L. Nucleic Acids Res, 2000, 28; 4225 ~ 4231.
- [9] Helin V, Gottikh M, Mishal Z, et al. Biochem Pharmacol, 1999, 1, 58(1): 95 ~ 107.
- [10] DeLong R, Stephenson K, Loftus T, et al. J Pharm Sci, 1997, Jun; 86(6): 762 ~ 764.
- [11] Bielinska A, Kukowska Latallo J F, Johnson J, et al. Nucleic Acids Res, 1996, 24(11): 2176 ~ 2182.
- [12] Attia S A, Shepherd V E, Rosenblatt M N, et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1998, 8(3): 207 ~ 214.
- [13] Maruyama Tabata H, Harada Y, Matsumura T, et al. Gene Ther, 2000, 7(1): 53 ~ 60.
- [14] Hodgson C P, Xu G, Solomon F, et al. J Mol Med, 1997, 75; 249 ~ 258.
- [15] Tomalia D A. USA, WO9934908, 1999.
- [16] Chen W, Tomalia D A, Tomas J L. Macromolecules 2000, 33; 9169 ~ 9172.
- [17] Watkins D M. Langmuir, 1997, 13; 3136 ~ 3141.
- [18] Milhem O M, Myles C, McKeown N B, et al. Int. J of Pharm, 2000, 197; 239 ~ 241.
- [19] Malik N, Evagorou E G, Duncan R. Anticancer Drugs, 1999, 10(8): 767 ~ 776.
- [20] Kojima C, Kono K, Maruyama K, et al. Bioconjug Chem, 2000, 11(6): 910 ~ 917.
- [21] Zhuo R X, Du B, Lu Z R. J Controlled Release, 1999, 22; 57(3): 249 ~ 257.
- [22] Matthews B R, Holan G. AUS, WO9534595, 1995.
- [23] Newkome G R. Angew Chem Int Ed Engl, 1991, 30; 1178 ~ 1180.
- [24] Tomalia D A, USA, USP5, 714, 166, 1998.
- [25] Lance J Twyman. Tetrahedron Letters, 1999, 40; 1743 ~ 1746.
- [26] Wivattanataptee R, Carreno-Gomez B, Malik N, et al. Pharm Res, 2000, 17(8): 991 ~ 998.
- [27] Kleinman M H, Flory, J H. Tomalia D A, et al. J Phys Chem B, 2000, 104; 11472 ~ 11479.
- [28] Wiener E C, Brechbiel M W, Brothers H, et al. Magn Reson Med, 1994, 31(1): 1 ~ 8.
- [29] Wiener E C, Konda S, Shadron A, et al. Invest. Radiol, 1997, 32(12): 748 ~ 754.
- [30] Barth R F, Soloway A H. Mol Chem Neuropathol, 1994, 21(2-3): 139 ~ 154.
- [31] Capala J, Barth R F, Bendayan M, et al. Bioconjug Chem, 1996, 7(1): 7 ~ 15.
- [32] Yang W, Barth R F, Adams D M, et al. Cancer Res, 1997, 57(19): 4333 ~ 4339.
- [33] Wright D. USA, WO9728809, 1997.
- [34] Singh P, Mol F 3rd, Lin S H, et al. Clin Chem, 1994, 40(9): 1845 ~ 1849.

Applications of Biomaterial Polyamidoamine Dendrimers in Medicine

YE Ling, GU Wei, ZHOU Yu-lan

(Department of Chemistry and pharmacology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

Abstract: Polyamidoamine(PAMAM) dendrimers are a class of new nanoscale dendritic macromolecules, they are synthesized by reiterative Michale addition and amidation reactions. Their structure and molecular weight can be accurately controlled. Therefore, these unique features have made their potential applications in many areas. This review is emphasis on PAMAM dendrimers' advances in applications especially in medicine such as gene carriers, drug delivery, MRI and BNCT.

Key words: Polyamidoamine; Dendrimers; Drug delivery