

主动靶向 PAMAM 给药系统的应用进展

陈振林^{1,2}, 解丽娟^{1,2*}

(1. 华侨大学分子药理学研究院, 泉州 362000; 2. 华侨大学生物医学学院, 泉州 362000)

摘要:聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)树状大分子是一类新型的三维结构高分子材料, 具有粒径大小可控、单分散性、无免疫原性、低毒性、生物可降解等特点, 其作为药物载体具有粒径小、高通透高滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应强、稳定性好、载药量高等优点, 通过靶向分子修饰能主动靶向于特定的组织、细胞或某些特定的靶点, 达到增效减毒的效果。本文就主动靶向 PAMAM 给药系统作为药物主动传递平台的优势及其最新研究进展给以综述。

关键词:聚酰胺-胺; 靶向分子; 靶向药物传递系统

主动靶向聚酰胺-胺树状聚合物给药系统是目前靶向给药系统(targeting drug delivery system, TDDS)中研究比较热门的一类靶向药物传递系统, 它主要由大分子载体聚酰胺-胺树状聚合物、靶向分子和药物三部分组成。大多数药物, 尤其是化疗药, 因其缺乏靶向性而对正常组织细胞产生很大的损伤。选择一种药物载体如脂质体, 将其与药物结合形成大分子或纳米粒, 通过增强药物的高通透高滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR effect)可起到增效减毒的效果。虽然药量在病变部位有所提高, 疗效增强, 但载药脂质体仍然缺乏高特异性识别作用, 对正常细胞仍有一定的毒副作用^[1]。而药物载体偶联靶向分子形成体系后, 除了对药物具有增溶、缓释的作用, 更重要的是该体系可以特异性地将药物带到病变细胞释放从而实现靶向治疗, 与正常细胞的结合大大降低, 毒副作用也明显下降^[2~4]。目前, 设计并制备主动靶向给药系统的研究有很多, 如主动靶向脂质体^[5]、主动靶向聚乳酸-羟基乙酸微球^[6,7]、主动靶向二氧化硅纳米颗粒^[8]等, 与它们相比, 主动靶向聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)给药系统具有稳定性强、载药量高、粒径较小且较易人为控制等优点。基于这些优势, 主动靶向 PAMAM 给药系统越来越受到科研工作者的青睐。

1 主动靶向 PAMAM 给药系统的优势

主动靶向 PAMAM 给药系统在医药学领域的优势越来越突出, 原因是该给药系统在设计上越来越合理、成熟, 具体表现在以下几个方面:

(1) PAMAM 聚合物主要是以乙二胺为核, 采用发散法^[9]与丙烯酸甲酯通过迭代的 Michael 加成和酰胺化反应合成(如图 1 所示)每增加一层, 就在已形成的聚合物上增长一“代”(generation, G)。合成的 PAMAM 具有低毒性、无免疫原性、可通过尿和粪便排出等特性;

(2) PAMAM 内部空腔结构中具有的氮、氧原子, 可通过静电、疏水或氢键作用包载药物分子, 表面上的氨基或羧基又可通过静电、共价作用与药物分子或靶向功能团形成复合物, 提高药物的稳定性和增加其在血浆中的溶解度^[10,11];

(3) PAMAM 本身粒径很小, 范围从 G0 代到 G10 代不超过 20nm, PAMAM 可同时与靶向分子和药物偶联, 复合物粒径较小且易人为控制, 有利于以 PAMAM 为基础构建的给药系统靶向肿瘤组织, 甚至

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.04.002

收稿:2014-04-23;修回:2014-11-01;

基金项目:福建省科技厅社会发展重点项目“氨茶非特增效减毒新方法研究”(2013Y0066);

作者简介:陈振林(1988—),男,硕士研究生,主要从事药物合成、靶向给药治疗的研究;

* 通讯联系人, E-mail: xielijuan@hqu.edu.cn.

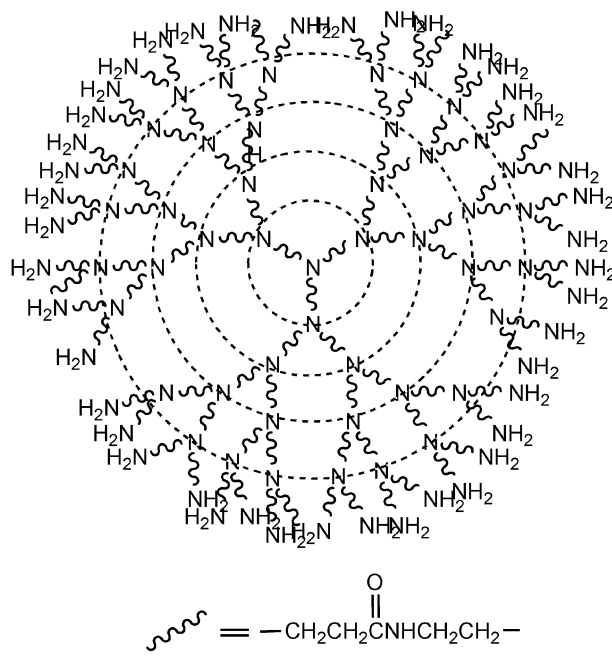


图 1 G4.0 PAMAM 树状大分子的结构示意图
Figure 1 Structure sketch of G4.0 PAMAM dendrimers

是很难通过的
血脑屏障^[12]；

(4)选择具有特异性的靶向分子与 PAMAM 树状聚合物可通过酰胺键^[13]、胺键^[14]或二硫键^[15]等偶联,偶联物定向富集到病变细胞后,受温度、酶、pH 等环境因素影响而响应,可缓慢释放药物。

2 聚酰胺-胺树状聚合物的主动靶向应用研究

靶向分子在主动靶向给药系统中起着重要的作用,它能够特异性地与病变细胞如肿瘤细胞表面过度表达的受体反应。主动靶向 PAMAM 给药系统中的靶向分子众多,如维生素类(包括叶酸、生物素)、蛋白质类(包括转铁蛋白、乳铁蛋白)、糖类、氨基酸、血管内皮生长因子、多肽、抗体及适体核苷酸等。下面重点介绍在近几年里以叶酸、生物素、多肽、抗体和适体核苷酸为靶向分子的主动靶向 PAMAM 给药系统的最新研究进展,并简述它们各自可能存在的问题。

2.1 PAMAM-叶酸素结合体

叶酸(Folic acid,FA)是由喋啶、对氨基苯甲酸和谷氨酸残基组成的人体中必需的一种水溶性 B 族维生素,其作为靶向配基的研究已有十几年了,并取得了很大的进展^[16]。叶酸能够与在大部分晚期及高度恶性肿瘤细胞表面过度表达、而在正常细胞表达数量相对较少的叶酸受体(Folate receptor,FR)以高亲和力方式结合,可较大地减少药物对正常细胞的毒副作用。

Zhang 等^[17]将粒径约为 5nm 的 G5 PAMAM 表面伯胺基部分乙酰化,剩余的伯胺基再分别通过酰胺键和酯键与叶酸和成像剂荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate,FITC)结合,所得的双功能树状聚合物再包载抗肿瘤药物考布他汀(CA4),该载药体系稳定,最大粒径不超过 50nm,且将 CA4 的水溶性从 11.8μg/mL 提高到了 240μg/mL,对叶酸受体阳性细胞有高选择性,细胞毒性与游离的 CA4 相同。Mullen 等^[18]通过炔基和叠氨基之间的 1.3-加成反应将分别用叶酸修饰的和用 FITC 修饰的 PAMAM 连接起来,并以此作为载药体系,离体实验表明该体系可通过叶酸受体介导作用实现肿瘤靶向性。但是,Zong 等^[19]发现,将叶酸和氨甲喋呤依次与 PAMAM 连接时,难以确定连接聚合物上的叶酸和氨甲喋呤的数目及两者比例,从而导致每批次产品生物活性的不可重复性,有时甚至失活。除此之外,由于在正常

组织细胞也存在 FR, 导致其靶向作用并不理想^[20], 只有当上述问题得到满意的解决, FA-PAMAM 药物载体才会真正为广大疾病患者带来福音。

2.2 PAMAM-生物素结合体

生物素(Biotin), 又称维生素 H、辅酶 R, 同叶酸一样属于维生素类, 在众多的维生素导向物中, 生物素抗癌活性最强^[21]。近几年来, 以生物素作为靶向配基来特异性靶向肿瘤细胞的研究取得了很大进展^[22]。

Yellepeddi 等^[21]将 sulfo-NHS-LC-biotin(生物素修饰的 N-羟基琥珀酰亚胺)与 FITC-G4 PAMAM 偶联, 经 NMR 结构鉴定, 确定生物素化的 FITC-G4 PAMAM 复合物成功合成, 并研究了该复合物与卵巢癌 OVCAR-3 细胞(实验组)和人胚肾 HEK 293T 细胞(对照组)的体外作用。荧光显微镜及流式细胞仪分析显示 OVCAR-3 细胞摄取该复合物的能力比 HEK 293T 细胞高 12%, 复合物的细胞毒性也较未生物素化的 FITC-G4 PAMAM 要高。同时实验表明, 生物素化的 PAMAM 之所以易进入肿瘤细胞, 是因为生物素受体介导的内化和电荷介导的吸附内吞作用。Yang 等^[23]采用生物素偶联的部分乙酰化 G5 PAMAM 分子作用于宫颈癌 HeLa 细胞得到了相似的结果, 同时细胞摄取存在能量和剂量依赖性, 该课题组准备将 biotin-PAMAM 复合物应用于临床实践中。可见, biotin-PAMAM 复合物在作为抗肿瘤药物的新载体方面有着良好的应用前景。

2.3 PAMAM-多肽结合体

多肽是 α -氨基酸以肽键连接在一起而形成的化合物, 它也是蛋白质水解的中间产物。随着噬菌体展示技术的发展, 许多功能肽被研制出来, 如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)^[24]、angiopep-2^[25]等, 由于结构相对简单、合成方便、价格便宜等优点, 这些功能肽逐渐被用于载体的靶向技术研究。

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是一种在某些肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞表面高度表达, 而在正常组织和成熟血管表面几乎不表达的细胞黏附分子, 可与其天然配体中的 RGD 多肽序列相互识别进行细胞内外的信号传导。Zhu 等^[26]用 RGD 序列缩合而成的环五肽 RGD 修饰聚乙二醇(PEG)化的 PAMAM, 并偶联化疗药物阿霉素(DOX)形成复合物, 对其进行抗肿瘤活性的研究。结果显示, RGD-PEG-PAMAM 比 PEG-PAMAM 具有更高的细胞摄取量和细胞毒性, 细胞内定位研究证实了 RGD-PEG-PAMAM 在溶酶体弱酸性环境下释放阿霉素, 并进入细胞核。RGD-PEG-PAMAM 在肿瘤部位蓄积以总 DOX 计算以及游离 DOX 计算均高于 PEG-PAMAM, 且表现出更高的体内抗肿瘤活性。免疫组化的结果表明, RGD-PEG-PAMAM 具有更强的诱导肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞凋亡的能力。然而, 目前所采用的靶向多肽分子几乎全部为 L 型多肽, 易被多肽酶降解, 导致失去靶向性能^[27], 还易造成脾脏功能的损害和发挥药效的不确定性等缺点, 因此多肽介导的靶向递药系统仍有待进一步研究, 以提高其靶向效率。

2.4 PAMAM-抗体结合体

抗体(antibody, Ab)能够特异性地与肿瘤细胞表面过度表达的相应抗原结合, 将抗体修饰到 PAMAM 上, 可达到靶向给药的功能^[28]。

Wu 等^[29]通过 PEG 将 YPSMA-1 单克隆抗体(针对前列腺特异性膜抗原细胞膜外部分重组蛋白特异性单克隆抗体, mAb)和 PAMAM 连接, 合成了一种新型的前列腺靶向基因载体 PAMAM-PEG-mAb。细胞摄取实验表明, PAMAM-PEG-mAb 的细胞摄取效率呈浓度依赖性。载基因药物后的体外实验发现, PAMAM 转染效率和前列腺癌靶向性无明显变化, 再经 mAb 修饰后, 阳性前列腺癌细胞(LNCaP 细胞)摄取量及转染率显著增加, 而阴性前列腺癌细胞(PC3 细胞)反而有下降。PAMAM-PEG-mAb 载体是一种有潜力的前列腺癌靶向基因转运载体。但存在抗体价格昂贵、体积较大、潜在的免疫原性等问题。同时, Wu 等^[30]通过动物实验还发现药物不能从载药体系中得到很好的释放, 这些使其在作为靶向配体研究中受到一定的限制。

2.5 PAMAM-适体核苷酸结合体

核酸适体(aptamer, Apt)可描述为化学抗体, 是用配体指数富集法系统进化技术^[31~33](Systematic

Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX),从随机单链寡聚核苷酸文库中筛选得到的能特异结合许多生物大分子或细胞的单链 DNA 或 RNA。核酸适体能够对细胞表面过度表达的靶标分子特异性识别、结合并随之内化,具有结合靶分子广、亲和力高、易修饰等特点。与抗体相比特异性强、无明显的免疫原性、体积小、制备方便。近几年,核酸适体介导的主动靶向给药研究逐渐成为研究热点。表 1 总结了目前常见的核酸适体作为主动靶向配体的研究及其靶点。

表 1 适体和它们的靶点
Table 1 Aptamers and their targets

适体	靶点	参考文献
MUC1 适体	MUC1 蛋白	Van ^[34]
Sgc8c	PTK7	Zhou ^[35]
5TR1	MUC1 串联反复多肽	Huang ^[36]
5TRG2	TN 抗原	Ferreira ^[37]
AS1411	核仁蛋白	Cao ^[38]
HER2 适体	HER2 表位肽	Liu ^[39]

Lee 等^[40]将双链脱氧核苷酸 dODNs 与修饰的聚酰胺-胺树状聚合物通过酰胺键连接制备了一种新颖的纳米靶向载体 dODNs-PAMAM,同时将药物阿霉素嵌入到 dODNs 中。研究发现,每个 dODNs-PAMAM 复合物分子能够稳定包载 184 个阿霉素(Dox)分子,并能够在体外缓慢释放。药代动力学研究显示 Dox-loaded dODNs-PAMAM 复合体在血浆中清除时间为 5.3h,相对游离药物(0.65h)慢了很多。在小鼠动物肿瘤细胞中,同剂量下复合体相对于游离阿霉素表现出更高的细胞毒性,观察正常小鼠的体重改变和心脏组织,未表现出心脏毒性。这些发现表明 dODNs-PAMAM 复合物拥有改进传统药物阿霉素的药代动力学、降低细胞毒性和增加药物浓度的优点。在此基础之上, Lee 等^[41]用单链 DNA-A9 PSMA RNA(PSMA 为前列腺特异性膜抗原)适体代替了脱氧核苷酸,成功制备了 Apt•dONT-PAMAM 纳米载药体系,研究发现每个 Apt•dONT-PAMAM 分子可包载163 个阿霉素分子。包载药物的体系在血清中表现出很好的稳定性。流式细胞仪结果显示,细胞摄取 Dox@Apt•dONT-PAMAM(94% for 极多 PSMA 表达的 22RV1 细胞;57% for 较多 PSMA 表达的 LNCaP 细胞)明显高于适体上无 GC 碱基配对修饰的 Dox@scApt•dONT-PAMAM(35% for 22RV1; 7% for LNCaP),更重要的是,相对于极少 PSMA 表达的 PC3 和 DU145 细胞,Dox@Apt•dONT-PAMAM 在 PSMA 过度表达的 LNCap 和22RV1 细胞上表现出更大的细胞毒性。由此可见,Apt-PAMAM 作为一种新颖的纳米载药体系能够有效地装载药物,特异性地靶向肿瘤细胞,这种纳米载药体系为提高肿瘤组合治疗提供了一个崭新的载体平台。

3 小结和展望

主动靶向 PAMAM 树状大分子作为药物载体具有良好的释放功效、高靶向性、低毒副作用,尤其是 Apt-PAMAM 的试验研究,使我们在考虑主动靶向给药中又多了一种选择。但是,在实际发展中,主动靶向 PAMAM 给药系统还有许多方面亟待改进,例如:

- (1)商业化的 PAMAM 价格昂贵,纯度还有待提高,因此需要研究出简单、易操作、可大规模合成的新方法;
- (2)虽然 PAMAM 大分子的毒性很低,但毒性依然存在,尤其是高代 PAMAM^[42],可考虑采用化学修饰的方法,如乙酰化等来进一步减少或解决毒性问题;
- (3)靶向配基偶联 PAMAM 时,仍出现很多问题,如抗体作为靶向分子时药物不能得到很好的释放、叶酸-PAMAM 结合比例无法确定、多肽和适体易酶解使得药物不能很好地到达病变部位等,必须结合

PAMAM 的结构和功能特性及相关疾病的发病机制和病变部位的特殊生理生化变化,选择合适的靶向配基,设计和制备出结构和性能清晰的载药体系;

(4)主动靶向 PAMAM 给药系统现处于实验室研究阶段,需对其体内外稳定性、药物释放、作用机制、毒理学(主要包括细胞毒性、溶血活性、遗传毒性)等进行深入研究,尤其是需要对递药系统在体内循环系统、疾病组织和靶细胞三个传递过程进行全面考察。

尽管绝大部分 PAMAM 靶向给药系统中有很多问题没有得到解决,但随着多学科的交融、设计和制备方法的不断完善以及体内外研究的不断深入,相信在不久的将来会有丰富的多功能新型主动靶向聚酰胺-胺载药体系被研制并应用于临床。

参考文献:

- [1] Han L, Huang R, Liu S H, Huang S X, Jiang C. *Mol Pharm*, 2010, 7(6): 2156~2165.
- [2] Pednekar P P, Jadhv K R, Kadam V J. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(10): 1273~1288.
- [3] Zong H, Thomas T P, Lee K, Desai A M, Li M, Kotlyar A, Zhang Y, Leroueil P R, Gam J J, Banaszak-Holl M M, Baker J R. *Biomacromolecules*, 2012, 13(4): 982~991.
- [4] Wang L, Li M, Zhang N. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7:3281.
- [5] Mathew A, Aravind A, Brahatheeswaran D, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Iwai S, Morimoto H, Yoshida Y, Maekawa T. *Bio Nano Sci*, 2012, 2(2): 83~93.
- [6] Aravind A, Jevamohan P, Nair R, Veerananarayanan S, Nagaoka Y, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar D S. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(11):2920~2931.
- [7] Cai L, Chen Z, Chen M, Tang H, Pang D. *Biomaterials*, 2013, 34(2):371~81.
- [8] Nanjwade B K, Bechra H M, Derkar G K, Manvi F V, Nanjwade V K. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 38(3): 185~196.
- [9] Tomalia D A, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Roeck J, Ryder J, Smith P. *Polym J*, 1985, 17(1): 117~132.
- [10] Cheng Y, Xu Z, Ma M, Xu T. *J Pharm Sci*, 2008, 97(1): 123~143.
- [11] Manchun S, Dass C R, Sriamornsak P. *Life Sci*, 2012, 90(11):381~387.
- [12] Hemmer R, Hall A, Spaulding R, Rossow B, Hester M, Caroway M, Haskamp A, Wall S, Bullen H, Morris, Haik K. *Molecules*, 2013, 18(9): 11537~11552.
- [13] Zhu S, Hong M, Tang G, Qian L, Jiang Y, Pei Y. *Biomaterials*, 2010, 31(6):1360~1371.
- [14] Najlah M, Freeman S, Attwood D, Antony D. *Int J Pharm*, 2006, 308(1):175~182.
- [15] Kurtoglu Y E, Navath R S, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan R. *Biomaterials*, 2009, 30(11): 2112~2121.
- [16] Choi S K, Thomas T P, Li M, Desai A, Kotlyar A, James R. *Photoch Photobio Sci*, 2012, 11(4): 653~663.
- [17] Zhang M, Guo R, Wang Y, Cao X, Shen M, Shi X. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2337~2349.
- [18] Mullen D G, McNernv D Q, Desai A, Cheng X, DiMaggio S C, Kotlyar A, Zhong Y, Qin S, Kelly C, Thomas T, Majoros I, Orr B, Baker J, Holl B. *Bioconjug Chem*, 2011, 22(4):679~689.
- [19] Zong H, Thomas T P, Lee K, Desai A M, Li M, Kotlyar A, Zhang Y, Leroueil P R, Gam J J, Holl B, Baker J. *Biomacromolecules*, 2012, 13(4):982~991.
- [20] Yuan Y, Nymoen D A, Dong H P, Bjorang O, Shih L, Low P, Trope C, Davidson B. *Hum Pathol*, 2009, 40(10): 1453~1460.
- [21] Yellepeddi V K, Kumar A, Palakurthi S. *Anticancer Res*, 2009, 29(8): 2933~2943.
- [22] Yellepeddi V K, Vangara K K, Palakurthi S. *J Nanopart Res*, 2013, 15(9):1~15.
- [23] Yang W, Cheng Y, Xu T, Wang X, Wen L. *Euro J Med Chem*, 2009, 44(2):862~868.
- [24] Jiang L, Lv B, Luo Y. *Biomaterials*, 2013, 34(11): 2665~2673.
- [25] Kim J, Choi W I, Kim Y H, Tae G. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1170~1178.
- [26] Zhu S, Qian L, Hong M, Zhang L, Pei Y, Jiang Y. *Adv Mater*, 2011, 23(12): H84~H89.
- [27] Zhan C, Zhao L, Wei X, Wu X, Chen X, Yuan W, Lu W, Pazgier M. *J Med Chem*, 2012, 55(13): 6237~6241.
- [28] Patri A K, Simanek E, Guest E. *Mol Pharm*, 2012, 9(3): 341.
- [29] Wu X, Cai Z, Zhu Q, Wang X, Ye L, Liu J, Ding X, Gao S. *Chin J Pharma*, 2012, 6: 7.
- [30] Wu G, Barth R F, Yang W, Kawabata S, Zhang L, Kari G. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(1):52~59.
- [31] Raddatz M Z, Dolf A, Endl E, Prof P K, Prof M F, Mayer G. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47(28):5190~5193.
- [32] Shangguan D, Meng L, Cao Z C, Xiao Z, Fang X, Li Y, Cardona D, Witek R, Liu C, Tan W. *Anal Chem*, 2008, 80(3): 721~

728.

- [33] Lou X, Qian J, Xiao Y, Viel L, Gerdon A E, Lagally E, Atzberger P, Tarasow T M, Heeger A, Soh H T. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(9):2989~2994.
- [34] Van D J, Wafa T, Tian B, Nunes A, Fabbro C, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. *Chem Commun*, 2010, 46(39): 7379~7381.
- [35] Zhou J, Soontornworajit B, Martin J, Sullenger B, Gilboa, Wang Y. *Wang Y. Macromol Biosci*, 2009, 9(9): 831~835.
- [36] Ray P, Viles K D, Soule E E, Woodruff. *Arch Immunol Ther Exp*, 2013, 61(4): 255~271.
- [37] Scaggiante B, Dapas B, Farra R, Grassi M, Pozzato G, Giansante C, Fiotti N, Tamai E, Tonon F, Grassi G. *Curr Drug Metab*, 2013, 14(5): 565~582.
- [38] Cao Z, Tong R, Mishra A, Xu W, Wong G W, Cheng J, Prof Y. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(35): 6494~6498.
- [39] Liu Z, Duan J, Song Y, Ma J, Wang F, Lu X, Yang X, J *Transl Med*, 2012, 10: 148.
- [40] Lee I, Yu M K, Kim I H, Lee J, Park T G, Jon S. *J Control Release*, 2011, 155(1): 88~95.
- [41] Lee I, An S, Yu M K, Kwon H, Im S, Jon S. *J Control Release*, 2011, 155(3): 435~441.
- [42] Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, Mckeown NB, DEmanuele A. *Int J Pharm*, 2003, 252(122): 263~266.

Application Progress of Active Targeting PAMAM Drug Delivery System

CHEN Zhen-lin^{1,2}, XIE Li-juan^{1,2*}

(1. *Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362000, China;*

2. *School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362000, China*)

Abstract: Dendrimer polyamide amine (PAMAM) is a new three-dimensional polymer material which possesses properties of controlled particle size, monodispersion, non-immunogenicity, low cytotoxicity and biodegradation. As drug carriers, it has some advantages of small size, high permeability and retention (EPR) effect, good stability, high drug loading and so on, which can actively target specific tissues, cells or some certain targets through modification of targeting molecules, to improve therapeutic effect and decrease toxicity. The advantages and the latest research progress of active targeting PAMAM drug delivery system (ATPDDS) as drug active delivery platform is reviewed.

Key words: PAMAM; Targeting molecule; Targeting drug delivery system