



新型生物医用材料: 肽类树枝状大分子及其生物医学应用

顾忠伟*, 罗奎, 余汶川, 吴尧, 何斌

四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心, 成都 610064

* 通讯作者, E-mail: zwgu@scu.edu.cn

收稿日期: 2009-12-02; 接受日期: 2009-12-16

摘要 肽类树枝状大分子是近年来发展起来的一类新型生物医用高分子材料, 它在具有普通树枝状大分子的特征如规整性、高度支化、表面呈现高密度功能团、尺度为纳米级、通过可控制备可得到单一分子量等之外, 同时还具有类似蛋白一样的球状结构、好的生物相容性、水溶性、耐蛋白酶水解、生物降解等独特的性能. 肽类树枝状大分子的上述特点, 使其在生物医学应用中显示出诱人的前景. 本综述从肽类树枝状大分子的制备出发, 详尽介绍了肽类树枝状大分子的功能化及其在疾病诊断和治疗中的应用等方面的研究进展, 藉此推动肽类树枝状大分子在生物医学领域的研究与开发.

关键词

肽类树枝状大分子
分子探针
药物载体
基因载体

1 引言

树枝状大分子是近年来蓬勃发展起来的一类经有序组装构建的具有三维规整结构、高度支化和纳米尺度的单分散性高分子材料^[1]. 树枝状大分子通过分子设计可以获得特定的尺寸、形状及结构, 其内部具有空腔, 外围(或称表面)呈现高密度功能团. Flory^[2]1952 年首次提出由具有多个反应性官能团的单体(AB_x, A, B 为可反应的基团, $x>1$)制备高度支化聚合物的可能性. 1978 年 Vögtle^[3]首次尝试用多步重复的手段合成了类似于树枝状被称为“cascade molecules”的多臂多胺化合物. 1985 年 Tomalia 等人^[4]与 Newkome 研究小组^[5]几乎同时分别独立报道了通过从一个中心分子向外逐级扩散的方法合成了一类各具特色但本质相同、被称为“星散式树状物”(Starburst dendrimers)的分子. 这些研究工作为树枝状大分子的合成与发展奠定了基础. 树枝状大分子以其独特的分子结构和性能, 在分子生物模拟、催

化剂、表面活性剂、免疫诊断试剂、药物及基因载体、显影剂等方面显示出潜在的重要用途. 目前已经有两种商品化的树枝状大分子, 即聚酰胺-胺型树枝状大分子(PAMAM)和聚丙烯亚胺(PPI).

许多学者对各种结构和性能不同的树枝状大分子进行了深入的研究. 近几年发展起来的肽类树枝状大分子, 以其优异的性能已迅速成为一类新型的生物医用高分子材料^[6]. 肽类树枝状大分子是指以氨基酸为原料, 或分子外围经多肽修饰, 分子结构中含有肽键的树枝状大分子^[6,7]. 肽类树枝状大分子具有如下的特点: 类似蛋白一样的球状结构(globular structure), 多价结构(polyvalent structure)产生的功能放大(amplification of function), 优异的生物相容性, 低细胞毒性、水溶性、耐蛋白酶水解、生物降解等^[7]. 肽类树枝状大分子的上述特点, 奠定了它当之无愧成为一类新型生物医用高分子材料的基础. 目前, 肽类树枝状大分子作为生物材料除了应用于癌症、HIV-1 感染、炎症、自体免疫性疾病的抑制剂^[8], 仿生胶

原^[9], 主-客体识别^[10]等方面外, 在疾病早期诊断的 MRI 分子探针以及药物/基因传递系统中的应用在国际上也越来越受到重视. 本文从肽类树枝状大分子的制备方法出发、全面介绍了肽类树枝状大分子的功能化及其在疾病诊断和治疗中应用的研究进展, 最后讨论了肽类树枝状大分子在生物医学应用存在的问题及其发展前景.

2 肽类树枝状大分子及其功能化

2.1 肽类树枝状大分子定义

肽类树枝状大分子从广义上是指在分子结构中含有肽键的树枝状大分子, 根据多肽和氨基酸在分子中形成的方式, 肽类树状大分子可以分为^[6]共价键合肽类树枝状大分子和非共价键合肽类树枝状大分子.

共价键合肽类树枝状大分子中, 氨基酸以共价键的方式连接, 可构成具有三种不同特点的结构: (a) 氨基酸在树枝状大分子中作为核或支化单元, 如图 1(a); (b) 氨基酸作为树枝状大分子中多肽支化单元的组件, 如图 1(b); (c) 氨基酸或多肽片段以共价键方式结合到非肽类树枝状大分子的表面, 如图 1(c). 非共价键合肽类树枝状大分子中, 氨基酸或多肽与非肽类树枝状大分子通过氢键或离子间作用相连接, 如图 1(d). 本文主要讨论以共价键合方式连接的肽类树枝状大分子.

2.2 肽类树枝状大分子的结构特点

肽类树枝状大分子是从核心基元出发, 重复进行氨基酸的支化反应而得到树枝状结构的聚多肽大分子. 肽类树枝状大分子具有以下特征^[4,6]: (1) 核心基元的官能团数目($N_c \geq 1$)决定分子的主支链数; (2) 支化单元的多重性($N_b > 1$)决定重复单元的支化数; (3)

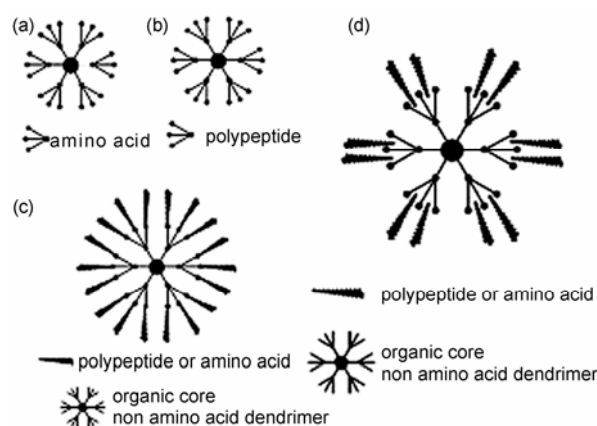


图 1 共价肽类树枝状大分子和非共价肽类树枝状大分子^[6]

重复反应的次数即为分支增长的次数或为树枝状大分子的代数; (4) 支化单元的长度决定了分子尺寸大小; (5) 核心基元、支化单元的分子结构以及末端官能团对肽类树枝状大分子的性能产生重要影响. 传统高分子的结构一般为线型(图 2(a))和支链型(图 2(b)), 树枝状大分子具有规整的结构(图 2(c)). 从图 2(c)可以看出, 肽类树枝状大分子的结构是由核心基元(Core)、支化单元(Branching unit)、末端(或称表面或称外围)官能团(Surface/peripheral functionalities)三部分组成, 整个分子具有空腔结构(Cavity). 这三个组成部分都直接影响着肽类树枝状大分子的结构. 例如控制核心基元的官能团数目可以调控肽类树枝状大分子的形状为球形^[11]、半球形^[12]、哑铃形^[13]等.

2.3 肽类树枝状大分子的合成方法

从多肽合成的角度上来讲, 肽类树枝状大分子的合成可以分为液相法^[14-16]和固相法^[17]. 固相合成法(SPPS)自 60 年代初 Merrifield^[18]首次提出至今, 经过四十多年多肽化学工作者的改进和完善, 已经成

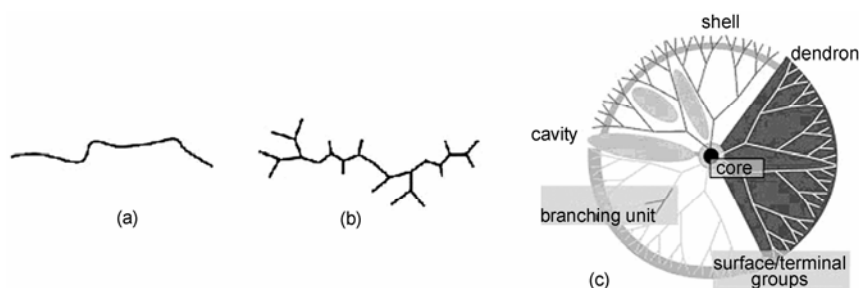


图 2 传统高分子与树枝状大分子

为一种常用和重要的合成方法. 固相法合成肽类树枝状大分子的合成步骤与合成线型多肽类似, 通常以 Boc 或 Fmoc 保护的氨基酸进行重复的偶联-脱保护反应. 肽类树枝状大分子合成后, 再将其从树脂上断开. 固相法操作方便、效率高, 反应中过量的保护氨基酸、偶联剂以及副产物等可以通过反复的洗涤除去. 但是, 固相合成的中间产物不能进行提纯与表征, 只能在最终产物从树脂上断开后才能进行. 由于每一步偶联过程中均会出现不完全反应, 导致产物中含有与目标分子结构相似的缺陷分子, 从而加大了分离提纯的难度^[19]. 并且固相合成中羧基的组成大过量, 这也增加了发生副反应的可能性^[20]并增加了成本; 其次, 反应是在溶液和溶胀的树脂间非均相地进行, 对反应速度有不利影响. 固相法一般用于合成低代数肽类树枝状大分子. Laia^[21]等人用固相收敛法合成出了以顺式-4 氨基-L 脯氨酸(Amp)为支化单元的肽类树枝状大分子, 随后的研究发现, 固相合成脯氨酸树枝状大分子时随着合成代数的增高, 固定相树脂的形态从球形变得越来越不规整, 有的甚至破裂、塌陷. 他们将其归因于球形树脂产生的张力^[22].

液相法一般用于合成高代数的肽类树枝状大分子, 是现在肽类树枝状大分子合成的主要方法. Denkwalter^[23]于 1981 年最早通过液相发散法合成半球状赖氨酸肽类树枝状大分子; Ohsaki^[24]等以己二胺为核, 通过液相发散法合成了第六代球形赖氨酸肽类树枝状大分子. 因为能够对每一步产物都进行分离与表征, 所以液相法很容易控制和检测反应的进程、脱保护以及偶联反应中副反应. 由于中间产物的分离提纯与表征需要花费大量的时间和精力, 而且保护中间体的溶解性差也加大了合成与分离难度, 于是产生了非保护肽连接方法^[25]. 非保护肽连接法又称化学选择连接法(Chemoselective ligation)、正交连接法(orthogonal ligation). 该法借助外围多肽和树状核心多肽末端的特异性化学反应, 通常是亲核和亲电反应, 或形成酰胺键的反应. 采用这种方法可以消除保护中间体溶解性差的问题. 目前报道的非保护肽连接法主要通过形成酯键、硫酯键、亚胺和酰亚胺等连接. Tam 等^[26]对这类非保护连接法进行了总结.

近几年兴起的“Click reaction”合成法, 以其反应条件温和、简单, 产率高等特点成为树枝状大分子合成的又一方法^[27-29]. “Click reaction”化学是指铜催化炔和叠氮环加成形成 1,2,3-三唑环的反应.

Sharppless^[30]首次利用这个反应合成三唑环的树枝状大分子. 在传统树枝状大分子合成中, 特别是高代数树枝状大分子的合成, 要得到纯的目标分子, 通过长时间的色谱分离会同时产生大量的副产物, 例如在利用 Willanson 醚合成和卤化反应合成聚醚类树枝状大分子^[31]中, 纯化过程十分繁琐. Lee^[32, 33]等采用“Click reaction”法合成出对称和不对称的 PAMAM 树枝状大分子, 结果表明这种方法反应条件简单、温和、产率高、副产物少. Liskamp^[34]等人将具有肿瘤靶向功能、分子量及空间位阻较大的环肽通过“Click reaction”合成方法成功偶联到树枝状大分子上, 制备出多功能肽类树枝状大分子, 并完成了小鼠体内竞争实验. “Click reaction”是一个原子经济型反应, 特别在将两个高代数的树枝状大分子连接起来时更显示出其优势^[32], 例如反应效率高、无副反应, 而且形成的三唑与酰胺键是电子等排物^[35]等. 这些将使得“Click reaction”合成法有可能应用于肽类树枝状大分子的合成.

肽类树枝状大分子和传统树枝状大分子的合成策略相同, 也可分为发散法^[36]、收敛法^[37-39]、发散-收敛法^[40], 如图 3 所示.

2.3.1 发散法

发散法是指从树枝状大分子的中心核开始, 将保护的支化单元通过高效的化学反应连接到中心核上, 经分离纯化去掉保护基团后, 再重复前步反应, 最终形成高度支化的树枝状大分子.

随着树枝状大分子代数的增加, 参加反应的官能团数目呈几何级数增加. Kantchev 等^[41]用固相发散法, 合成了以赖氨酸为支化单元, 外围用甘露糖修饰的糖肽树枝状大分子(如图 4). 发散法具有速度快、效率高等特点, 适合分子量较小、易从副产物中分离的肽类树枝状大分子的合成. 当支化单元不能进行逐步合成, 或者所合成的树枝状大分子的分子量太大而不易分离时, 总产率将随肽类树枝状大分子代

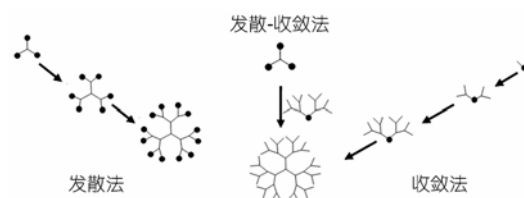
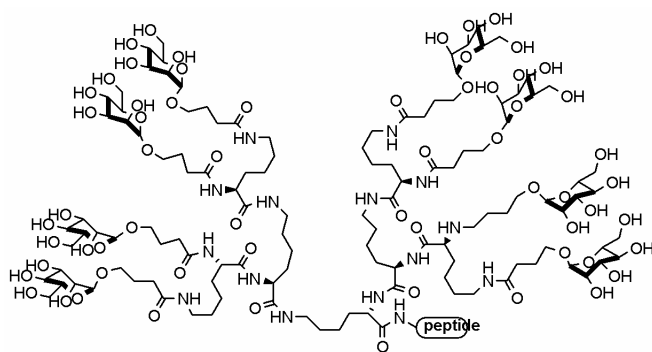


图 3 传统树枝状大分子的合成方法

图4 甘露糖修饰的糖肽树枝状大分子^[41]

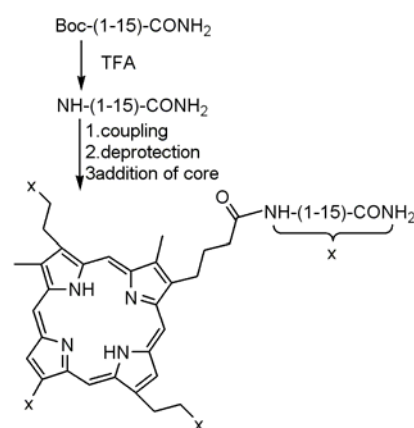
数的增加而下降; 树枝状大分子代数较高时, 外围基团的紧密堆积给下一步反应带来很大困难, 会使反应不完全, 导致树枝状大分子结构上的缺陷和产物分离与纯化的困难. 因此, 发散法对反应的要求高: 即反应转化率很高(>99%), 且过量单体易于分离. 当树枝状大分子的分子量大于2万时, 产物很难与副产物分离^[42], 此时多采用收敛法和发散收敛法.

2.3.2 收敛法

收敛法合成肽类树枝状大分子主要取决于目标分子核心基元的复杂程度. 由于收敛法中每一次增长反应的反应物和产物的性质差别较大, 易于分离提纯, 因而收敛法放宽了反应条件的限制, 这对于构建结构新颖的树枝状大分子十分有利. Sasaki 等^[43]用此法合成了亚铁血红素蛋白(如图5). 用收敛法合成肽类树枝状大分子时分子量增长较慢, 达到一定分子量所需反应步骤并不比发散法少, 同时在合成较高代数的肽类树枝状大分子时会有严重的空间位阻影响, 导致反应转化率急剧下降. 另外, 使用官能团保护的多肽时, 多肽中间体的溶解性差, 也是收敛法面临的又一大难题.

2.3.3 发散法-收敛法

肽类树枝状大分子合成过程中, 有时采用发散-收敛法. 先用发散法制得低代数的肽类树枝状大分子, 称为超核, 再用收敛法制得高代数的扇形结构肽类树枝状大分子(Dendron), 然后将其接到超核上. Vinogradov 等^[44]就利用了这种方法, 先合成以谷氨酸为构架的第二代产物(Glu^2OEt), 再将第二代产物直接通过收敛法与卟啉衍生物缩合得 $\text{H}_2\text{P-Glu}^2\text{OH}$, 最后再通过发散法得到目标产物(如图6).



1-15: Ala-Glu-Gla-Leu-Leu-Gla-Glu-Ala-Glu-Gla-Leu-Gla-Glu-Leu-amide

图5 收敛法合成亚铁血红素蛋白^[43]

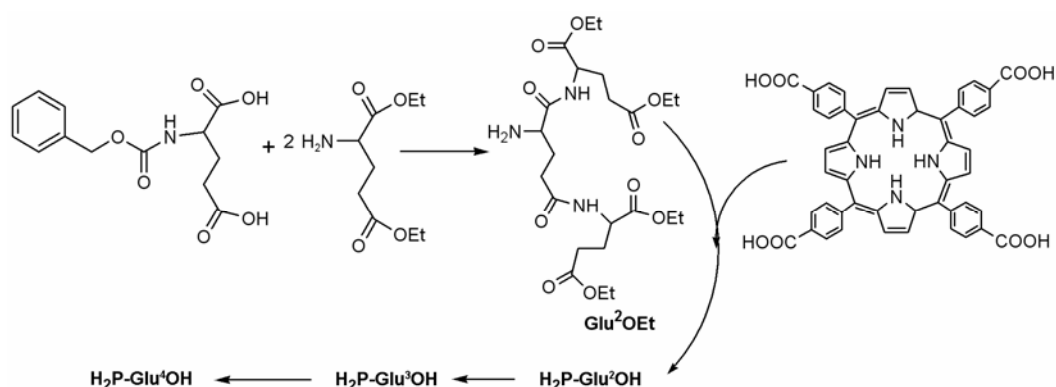
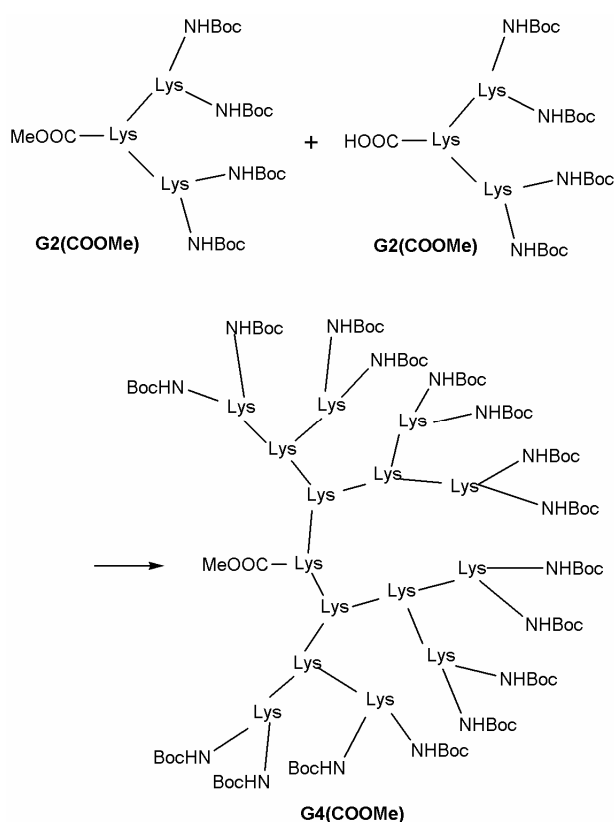
Smith 等人^[12]以赖氨酸为原料, 首先合成第二代分子, 然后用二代分子与二代分子进行缩合, 得到第四代肽类树枝状大分子(如图7). 由于此类分子空间位阻较小, 缩合反应完全, 易于分离提纯, 所得产物纯度较高.

2.4 肽类树枝状大分子的功能化

随着树枝状大分子研究的不断深入, 人们的注意力已经从合成各种不同类型的树枝状大分子逐步转移到树枝状大分子的功能化和应用上^[45], 并取得了很好的进展. 肽类树枝状大分子的功能化, 能够获得更多优良的性能. 从肽类树枝状大分子功能化的位置可分为: 核的功能化、支化单元的功能化和肽类树枝状大分子外围的功能化. 目前研究得最多的是对肽类树枝状大分子外围的功能化.

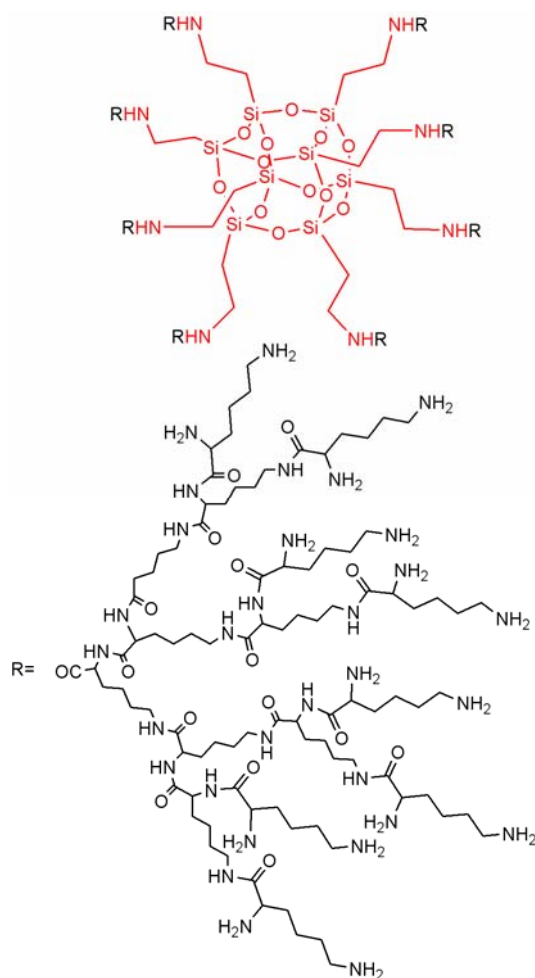
2.4.1 肽类树枝状大分子核的功能化

肽类树枝状大分子的核功能化一般指单一功能

图6 发散-收敛法合成 H_2P-Glu^4OH 肽类树枝状大分子^[44]图7 发散-收敛法合成 $G_4(COOMe)$ 肽类树枝状大分子^[12]

化,即将已知的肽类树枝状大分子接到带有功能基团的化合物的核上,或通过肽类树枝状大分子核上的化学反应而获得.如用卟啉衍生物作为中心核,使肽类树枝状大分子具有光活性,可作为人工模拟酶的模型等^[44, 46]. Park^[13, 47]等合成了以 $m-PEG-NH_2$ 和 $NH_2-PEG-NH_2$ 为中心核、赖氨酸为骨架的肽类树枝状大分子,引入 PEG 以降低了树枝状大分子的细胞

毒性. Lu^[11]等人用多支化的 POSS 为核合成了 G1-G4 的赖氨酸球形树枝状大分子(如图 8). 基因转染实验表明这种球形的肽类树枝状大分子在低的 N/P 条件

图8 POSS 为核赖氨酸球形肽类树枝状大分子^[11]

下能有效的将质粒 DNA 运输到 MDA-MB-231 细胞. Chapman^[48]等以 $\text{H}_3\text{CO-PEO-Gly-OH}$ 为引发核, 合成了未脱掉 Boc 保护基团的赖氨酸肽类树枝状大分子, 外围的 Boc 保护基团是疏水性基团, 核 PEO 是亲水性高分子, 形成了一种两亲性树枝状大分子, 通过对其表面活性研究表明这种分子能成为一种具有生物相容性的表面活性剂.

2.4.2 肽类树枝状大分子的支化单元功能化

肽类树枝状大分子的支化单元可以是单一的氨基酸, 也可以根据需要引入功能基团, 如其他氨基酸、小分子药物等, 从而达到使之多功能的目的. Hirsch^[49] 等人从酒石酸出发, 合成了含多个氨基酸的手性肽类树枝状大分子(如图 9). 这些氨基酸, 如甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸等通过成酯或酰胺键缩合, 得到的大分子有望在手性分子识别、药物自组装等方面应用.

2.4.3 肽类树枝状大分子的外围功能化

树枝状大分子外围端基功能化通常是利用树枝状大分子的外围端基反应, 进一步引入各种功能性基团, 由于每个树枝状大分子含有多个端基, 只有选择性和反应活性很高的情况下功能化反应才有实际意义. 树枝状大分子外围端基功能化也可通过把预先功能化的支化单元与得到的树枝状大分子外围端基经特定反应连接来实现. 功能化基团或分子主要

有以下几大类: PEG、PEO 等生物相容性高分子、靶向功能基团、小分子药物、用于显影的顺磁分子螯合物等. 我们尝试用这两种不同的方法, 都成功地可控制备了带有半乳糖靶向基团和 Gd 螯合物的肽类树枝状大分子的 MRI 分子探针, 并进行了磁共振扫描、细胞标记、毒性等一系列动物试验, 结果表明, 这类新型的 MRI 分子探针比临床应用的 Gd 螯合物具有肝组织靶向、血液中长循环、信号增强等特点, 显示出较好的应用前景.

在树枝状大分子上引入环境敏感的化学键或分子, 可以使其具有环境敏感功能^[50]. 树枝状大分子的支链或内腔为疏水性, 为进一步改善其水溶性和生物相容性, 提高在血液中的循环时间, 可对树枝状大分子进行 PEG 化修饰(如图 10). 在对树枝状大分子 PEG 化过程中, PEG 链长的选择对修饰后的分子的性质影响较大^[51]. 低分子量 PEG 对高代数的树枝状大分子的性质改变不明显; 而高分子量 PEG(>1 万)可以很好的改善其水溶性, 获得血液中的长循环; 当 PEG 分子量为 4.4 万时, 其血液中的半衰期可达到 40 小时以上^[52], 但整个树枝状大分子在体内的毒性也将增大; 当 PEG 的分子量为 2000 左右的时候, 树枝状大分子可以表现出很好的生物相容性. 另外, Florence^[53]还合成了外围带烷基链(C12)的含脂的赖氨酸树枝状大分子, 并对其口服后的吸收和体内分布进行了研究.

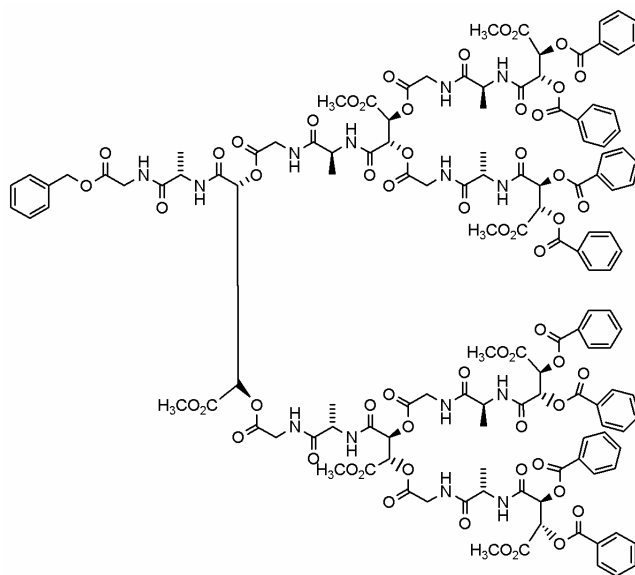


图 9 含多种氨基酸的手性肽类树枝状大分子^[50]

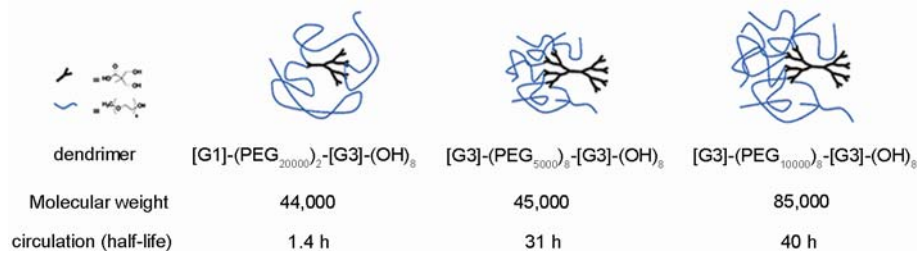


图 10 不同分子量的 PEG 对树枝状大分子进行外围功能化^[54]

随着对肽类树枝状大分子研究的深入,研究者合成一类新的肽类树枝状大分子—糖肽树枝状大分子,即肽类树枝状大分子表面与单糖或寡糖通过共价键结合。这类糖肽树枝状大分子与一般的糖簇分子相比,其分子量较大、价数较高,具有更高的亲和力,可以提高糖与糖受体的结合力。研究者利用肽类树枝状大分子与糖化合物的优势,设计合成了多元 N-乙酰氨基半乳糖、半乳糖和乳糖的糖肽树枝状大分子^[55-58]。Uryu 等人^[59]合成了以赖氨酸为骨架的糖肽树枝状大分子(如图 11)。

Brasch 等人^[60]以 PEG(3400)为核,赖氨酸为支化单元,用发散法合成了水溶性较好的肽类树枝状大分子,并在其外围偶联一定数目的具有放射性的碘化合物,得到肽类树枝状大分子的 CT 分子探针。Galande 等人^[61]用固相法合成赖氨酸树枝状大分子,在其外围偶联短肽,得到多抗原肽(MAPs),然后对抗原进行 PEG 修饰和荧光标记,得到多抗原肽的荧光

探针,其荧光强度和探针的半衰期均有显著提高。

2.4.4 树枝状大分子的多功能化

肽类树枝状大分子的单一功能化已不能满足生物医学的需要,多功能修饰已成为目前研究的重点和热点。具有纳米尺度的树枝状大分子,其多功能化日益受到人们关注^[62-64]。多功能化肽类树枝状大分子有极大的应用潜力(如图 12),如在树枝状大分子的外围同时偶联靶向基团、小分子药物、MRI 分子探针和亲水性高分子等,并在其空腔容纳小分子药物等^[65]。这种多功能化树枝状大分子可作为靶向药物传递系统、靶向基因载体、靶向 MRI 分子探针等。

3 功能化肽类树枝状大分子在疾病诊断中的应用

3.1 肽类树枝状大分子在 CT 中的应用

目前所用的 CT 分子探针通常是一些含碘的离子

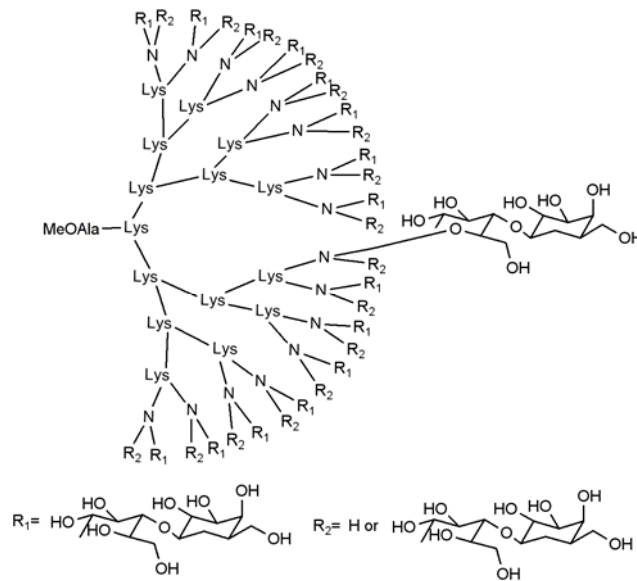


图 11 外围被乳糖修饰的肽类树枝状大分子^[59]

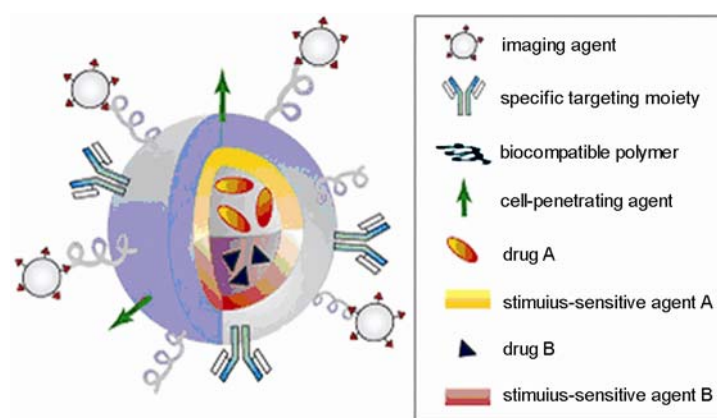


图 12 用于疾病诊断和治疗的多功能肽类树枝状大分子^[66]

或非离子的小分子有机化合物，这些小分子在体内很快地被清除，使得药物浓度在检测前就已经降到很低，从而影响诊断效果，加大剂量又会增加毒副作用。为了解决这个问题，研究者用合成的水溶性线性高分子或者多糖修饰碘化的 CT 分子探针，提高其在血液中循环时间从而提高其效能^[67-69]。但是由于这类分子的分子量不均一和合成过程的重现性差等缺点，在临床应用上受到限制。Yordanov^[69]等利用树枝状大分子具有的精确结构，可控的分子量和外围官能团数量，合成了外围部分用碘化 CT 分子探针修饰的 PAMAM 树枝状大分子。G4-PAMAM 外围偶联上 CT 分子探针后，分子量约为 37 Kda，碘的含量达到 33.06%。Schering AG^[70]用含 2,4,6-三碘基苯的 CT 分子探针分别修饰 PAMAM、PPI、赖氨酸树枝状大分子

子，由于非肠胃吸收的药物要经过高压灭菌处理，结果发现 PAMAM 不稳定，CT 分子探针修饰的赖氨酸树枝状大分子的毒性低于 PPI，同时也显示出低的体内积蓄量。由于 CT 分子探针所需的剂量大，其显影优势并不强于 MRI，因此文献报道的肽类树枝状大分子在 CT 方面的应用研究很少。Fu^[60]等人以 PEG(3400)、PEG(6000)、PEG(12000)作为核，赖氨酸为支化单元合成了 G3~G5 不同代数的哑铃状肽类树枝状大分子，将临床上用的 CT 分子探针碘比醇羧基化后偶联到肽类树枝状大分子外围，得到了一类肽类树枝状结构的 CT 分子探针，其中 PEG(12000)-G4 如图 13 所示，外围用碘比醇修饰的赖氨酸树枝状大分子的碘含量达到 27%，分子量近似于 143 kDa 的蛋白质，显示出了长的血液半衰期(约 35 min)、良好的

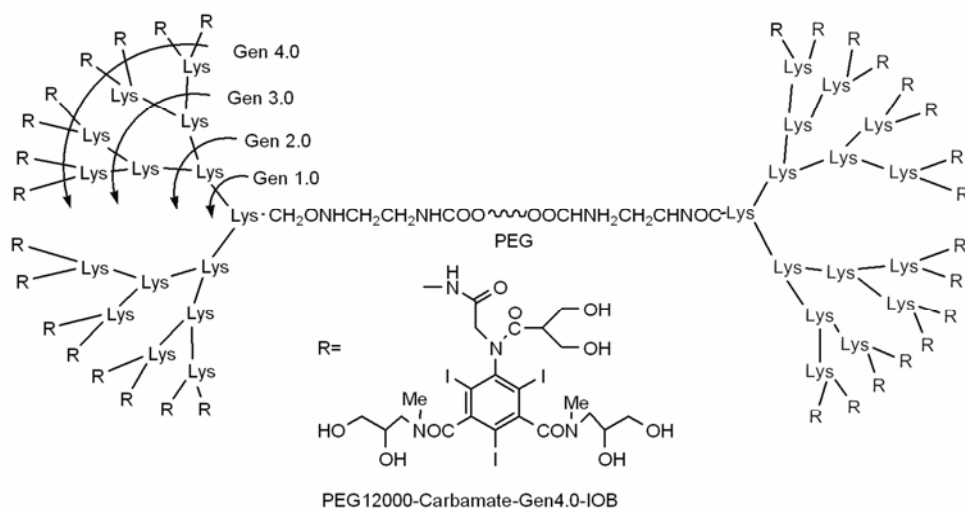


图 13 以 PEG 为核的赖氨酸树枝状大分子 CT 分子探针^[60]

水溶性、在高压灭菌条件下稳定等性能. 低剂量(450 mg 碘/千克体重)的 PEG(12000)-G4 CT 造影剂经静脉注射小鼠体内后, 在 32 分钟时, 仍可在其肝脏部分观察到较强的信号(如图 14 所示), 表明此类肽类树枝状大分子可用于肝脏 CT 造影, 具有一定的价值.

3.2 肽类树枝状大分子在核磁共振成像(MRI)分子探针中的应用

目前广泛使用的 MRI 分子探针主要有两类, 一类是钆(Gd^{3+})、 Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 等顺磁性分子, 另一类是氧化铁纳米粒的超顺磁性分子. Gd^{3+} 离子有严重毒性, 但与 DTPA 或 DOTA 螯合后稳定性高, 在活体内不分解出有毒的 Gd^{3+} 离子, 毒性大大降低. Gd -DTPA/ Gd -DOTA 通过改变周围氢核的磁性起作用, 且具有亲水性、分子量小的特点, 注入血管后迅速向周围组织间隙分布, 由肾脏排泄, 对各系统的病变如肿瘤、感染、术后、放疗后, 以及血管病变等都具有诊断与鉴别诊断的价值, 是目前应用最广泛的 MRI 分子探针. 目前用于临床的 MRI 分子探针均为小分子钆螯合物(如图 15). 这些分子探针在体内呈非特异性分布, 适用于脑、肾和血液系统的成像.

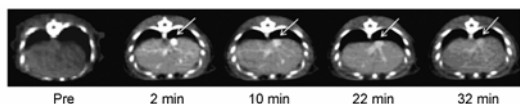


图 14 PEG(12000)修饰的碘化肽类树枝状大分子在小鼠肝脏部位的 CT 成像^[60]

用于临床的 Gd^{3+} 类特异性 MRI 分子探针的优点是它们具有良好的生物相容性, 与相应的金属盐相比, 具有较低的毒性、较高的弛豫率、极好的溶解性、低剂量以及较高的热力学和动力学稳定性, 并能以金属离子复合物形式排出体外. 但这些低分子量 MRI 分子探针的一个主要缺点是它们能快速扩散到细胞外基质中, 因此在血液循环中停留时间很短, 这就要求相对高的注射剂量和注射频率. 克服低分子量 MRI 分子探针的上述不足最好的方法就是将多个造影单元连接到同一分子骨架上, 得到高分子 MRI 分子探针.

把低分子量的 Gd^{3+} 螯合物连接到高分子化合物上, 如线性大分子(聚乙烯、聚乙二醇或多聚糖), 其体内应用得到了美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)的认可. 但是这些聚合物由于分子链可以随意改变形状和位置, 造成了弛豫率较低, 磁共振扫描的相对强度弱等弊端^[70]. 目前, 报道的同一直链上含有多个低分子量的 Gd^{3+} 螯合物的高分子 MRI 分子探针, 都未能通过临床实验, 其主要原因是这类化合物不能较好地通过肾排除体外而造成较大的毒性. Bhujwalla 等^[71]将 DOTA 通过酰胺键连接到聚赖氨酸 PLL 高分子直链上, 再与 Gd^{3+} 螯合, 得到的高分子 MRI 分子探针尽管具有较高的弛豫率, 但细胞实验显示此临床应用的 MRI 分子探针仍具有较大的毒性. 同时, 他将多个低分子量的 Gd^{3+} 螯合物连接到多支化高分子聚合物上, 得到高分子 MRI 分子探针, 但由于此类化合物的尺寸大小的不确定性, 阻碍了其在医药领域中的应用.

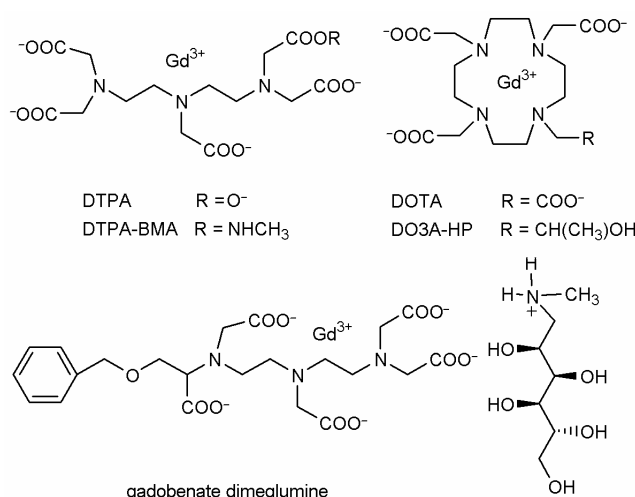


图 15 目前临床所用的几种 Gd^{3+} MRI 分子探针

树枝状大分子具有非常规整、精致的结构, 其体积、形状和功能可以在分子水平进行精确调控. 将 Gd^{3+} 螯合物偶联到树枝状大分子上(如图 16), 所得大分子 MRI 分子探针可有效克服上述不足. 研究表明, 相对小分子 MRI 分子探针, 树枝状大分子 MRI 分子探针在血管中保留的时间较长, 很少进入血管外组织, 这主要是由于它具有较大的尺寸, 难以扩散到细胞外基质中(如图 17)^[72].

Wiener^[73, 74]等首次在 PAMAM 树枝状大分子表面通过共价键结合 DTPA, 与 Gd^{3+} 螯合用于磁共振成像研究, 发现这类化合物根据 PAMAM 树枝状大分子的分子量的不同, 其血液循环半衰期从 40~200 分钟不等. Kobayashi^[75, 76]等对树枝状大分子外围用 DTPA-Gd 功能化得到(G2~G4)PPI、PAMAM 树枝状大分子, 并对其药物代谢动力学进行研究, 发现同代数 PPI-DTPA-Gd 树枝状大分子比 PAMAM-DTPA-Gd 树枝状大分子更快排除体外, 同类型树枝状大分子的分子量小更易排除体外. 更有趣的现象是同代数 PPI-DTPA-Gd 树枝状大分子比 PAMAM-DTPA-Gd 树枝状大分子具有更高的弛豫效率. 他们认为这是因为 PPI 比 PAMAM 具有更加规整的球形, 而产生了更高的 T1 弛豫效率.

肽类树枝状大分子具有一般树枝状大分子的普遍特性, 它相对于线性多肽具有更好的水溶性、更强的耐水解酶能力和更低的细胞毒性^[70, 77], 其分子外

围众多的结合位点可以连接多个功能性基团. 肽类树枝状大分子用于磁共振成像研究的报道甚少, 主要是肽类树枝状大分子还没有商业化产品, 合成难度和成本相对于其他大分子(如 PAMAM)较高^[78]. Schering AG^[79]开发出了第一个商业化的以赖氨酸为支化单元、其外围用 DOTA 修饰的肽类树枝状大分子显影剂 Gadomer-17(如图 18).

在此基础上, Fu^[79]等人用不同分子量的 PEG 为核, 合成出外围连接不同数量 DTPA-Gd 的肽类树枝状大分子的 MRI 分子探针(如图 19). 它们显示出很窄的分散度和相对较高 T1 弛豫效率. 小鼠体内成像实验显示, 此种肽类树枝状大分子形成的探针具有较好的 MRI 成像效果, 即使在注射 60 分钟后, 肝脏部位仍显示了较强的对比强度(如图 20 所示). 进一步研究发现分子量越大、代数越高的 DTPA-Gd 的肽类树枝状大分子具有越长的血液循环时间, 如 PEG1200-G4-(Gd-DTPA)8 的血液半衰期为 36 min, 而 PEG1200-G5-(Gd-DTPA)13 达到 73 min, 表明可以通过肽类树枝状大分子的代数调控 MRI 分子探针的药代动力学.

具有靶向功能的 MRI 分子探针可有效提高选择性、降低使用剂量、增强显影质量, 但是有关靶向树枝状大分子的 MRI 分子探针的报道很少, 还处于研究初期^[80, 81]. Wiener 等^[82, 83]用第四代 PAMAM 经荧光物质标记并与叶酸连接, 然后与 DTPA-Gd 螯合物共价偶联, 得到叶酸修饰的 PAMAM 树枝状大分子的 MRI 分子探针. 结果表明此类分子探针可靶向肿瘤细胞表面的叶酸受体; 小鼠体内磁共振扫描显示其弛豫增强强度比无叶酸的 PAMAM 树枝状大分子探针要提高很多. 目前, 将靶向基团引入到树枝状大分子的外围已有研究报道, 这些靶向基团包括糖和多糖^[84-88]、短肽^[89, 90]、蛋白^[91]、抗体^[92]、寡核苷酸^[93]、叶酸^[82, 94-96]、生物素^[97, 98]等.

靶向树枝状大分子 MRI 分子探针面临许多困难, 如分子结构复杂, 合成难度大, 表征困难等. 目前, 虽有人合成了含不同靶向基团的树枝状大分子 MRI 分子探针(如图 21)^[84, 98], 但体内实验结果表明均未能达到有效靶向效果. 为提高探针弛豫率, 需要将一定量的显影分子偶联到树枝状大分子上; 同时, 为了增强靶向效果, 提高探针与靶向部位的亲和力, 需要一定数量的靶向基团. 因此, 如何调控同一树枝状大分子上显影分子与靶向基团的相对数量是设计合

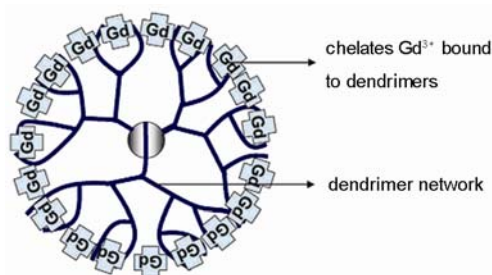


图 16 树枝状 MRI 分子探针示意图

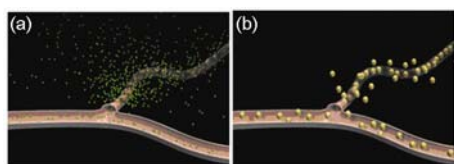


图 17 小分子 MRI 分子探针(A), 树枝状大分子 MRI 分子探针(B) 进入血管外组织示意图^[72]

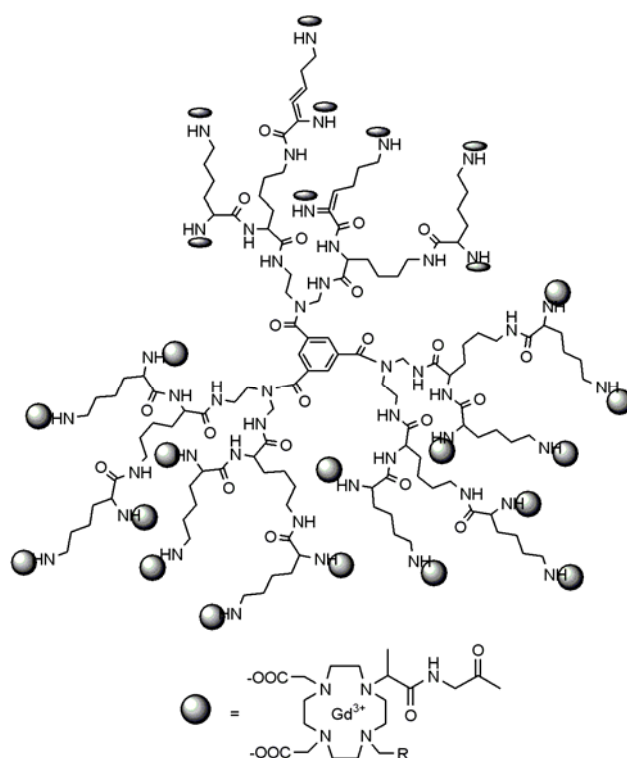


图 18 Gadomer-17 肽类树枝状大分子显影剂^[70]

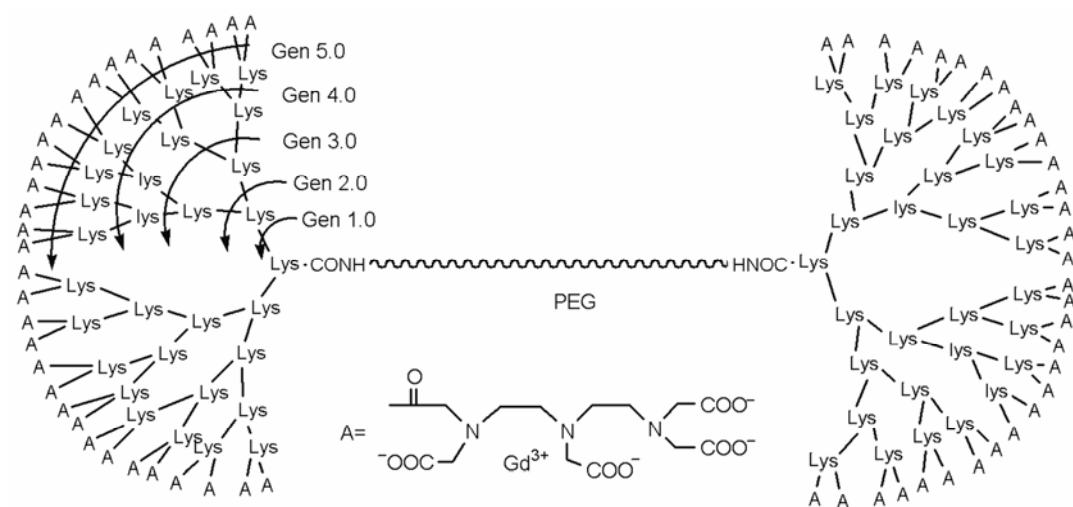


图 19 以 PEG 为核的赖氨酸肽类树枝状大分子 MRI 分子探针^[79]

成靶向功能的树枝状大分子的 MRI 分子探针的又一难点^[99].

目前有关功能化肽类树枝状大分子 MRI 分子探针研究处于起步阶段, 对肽类树状大分子作为靶向 MRI 分子探针的系统研究甚少. 我们设计合成了一

系列以赖氨酸为骨架、外围含不同反应性官能团、不同代数的肽类树枝状大分子, 并将硫代半乳糖与显影分子 Gd-DTPA 以精确、可控的比例偶联到树枝状大分子上, 得到了新型肽类树枝状大分子的 MRI 分子探针(如图 22 所示)^[100]. 细胞试验及动物体内 MRI

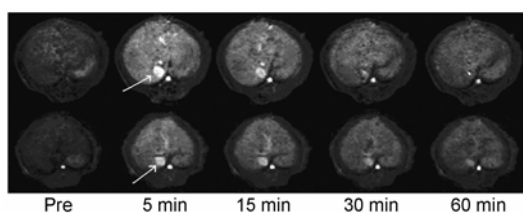


图 20 肽类树枝状大分子 PEG1200-G4-(Gd-DTPA)8 (上排) 与 PEG1200-G5-(Gd-DTPA)13 (下排) 的 MRI 分子探针在小鼠体内成像^[79]

成像研究表明, 此类分子探针在水中具有很好的弛豫率, 特别是高代数的分子探针, 如 G4 的弛豫率 r_1 达到了 $12.62 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 是临床应用 Gd-DTPA ($4.37 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 的 3 倍. MTT 实验显示所有的肽类树枝状大分子的 MRI 分子探针在使用剂量范围内无细胞毒性, 小鼠经静脉注射后也无不良反应, 可长期存活, 充分表明了肽类树状大分子的无毒及无免疫原性. 细胞吞噬实验、小鼠体内临床实验和小鼠肝组织切片实验结果显示, 具有硫代半乳糖基团的树枝状大分子的 MRI 分子探针对于肝细胞受体具有优良的亲和性, 体内肝组织成像质量高、相对增强信号强度高、

血液循环时间长, 即使在 60 min 后, 仍在肝组织显示出较强的信号, 其相对信号增强强度较非靶向的和分子的 MRI 分子探针要强得多(如图 23). 含半乳糖基团的肽类树枝状大分子的 MRI 分子探针具有糖簇分子的特点, 可发挥树枝状大分子特殊的“多价效应”, 具有进一步探索价值, 可望进入临床前期研究.

3.3 肽类树枝状大分子在其他医学诊断中的应用

树枝状大分子在荧光探针方面也有一定的应用, Striebel^[101]等利用树枝状大分子的表面的多价态, 增强了人类疱疹检测的灵敏度. McIntyre^[102]和 Bradley^[103]用具有标记物的树枝状大分子实现了肿瘤相关酶(matrix metalloproteinase-7)的检测, 他们把 FITC 标记的肽(RPLALWRS)和 TMR(四甲基罗丹明)接到 PAMAM 树枝状大分子上(如图 24). 当这两种荧光分子接在一个分子上时, 只有 TMR(四甲基罗丹明)的荧光能被检测到, 而无法实现 FITC 的荧光检测, 当(RPLALWRS)肽被 matrix metalloproteinase-7 降解后, FITC 标记的肽远离 TMR 标记的 PAMAM 树枝状大分子, FITC 的荧光就可以被检测到, 成为一种具有特

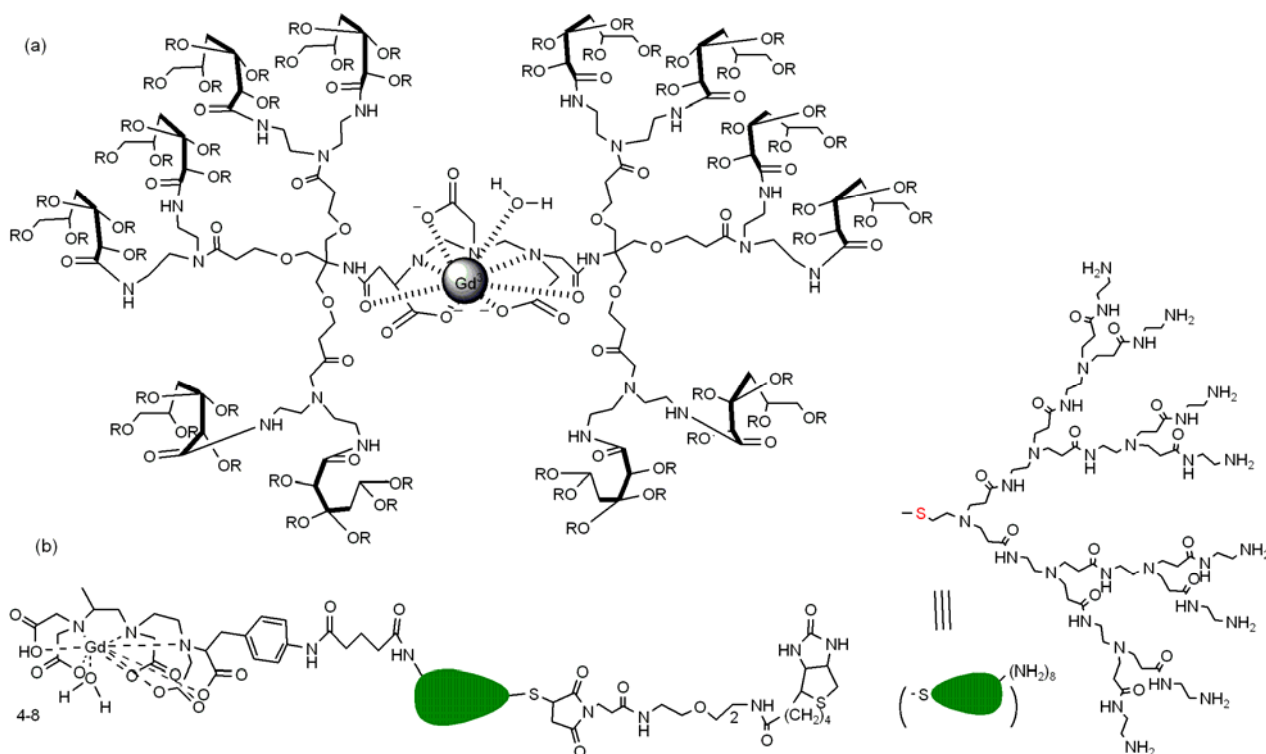


图 21 含不同靶向基团的树枝状大分子 MRI 分子探针^[84, 98]

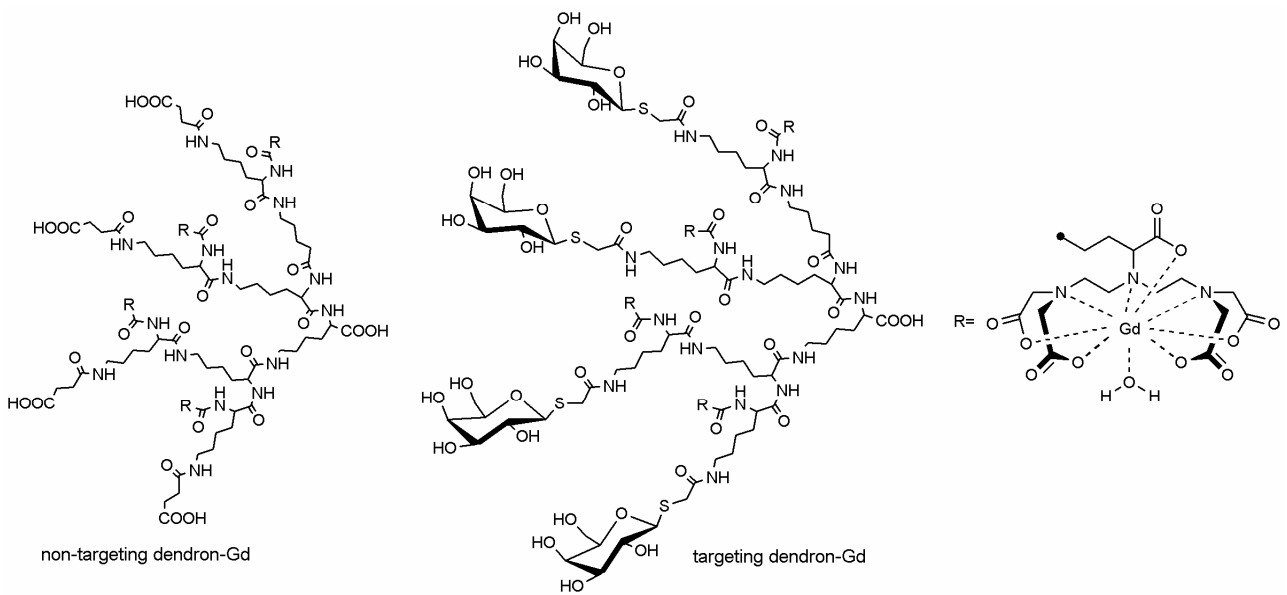


图 22 外围含不同官能团的肽类树枝状 MRI 分子探针^[100]

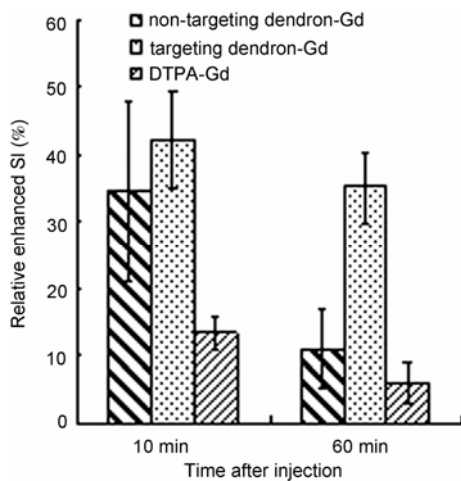


图 23 靶向、非靶向肽类树枝状 MRI 分子探针和小分子 DTPA-Gd 在小鼠体内成像的相对信号增强强度^[100]

异性检测的荧光探针。

肽类树枝状大分子在血清诊断方面也应用比较广泛^[7], 由于其多抗原肽的性质, 可以提高血清中抗体检测的灵敏度, 有利于检测早期感染产生的抗体。

4 功能化肽类树枝状大分子在疾病治疗中的应用

4.1 功能化肽类树枝状大分子作为药物载体

肽类树枝状大分子不仅具有类球蛋白的球状结

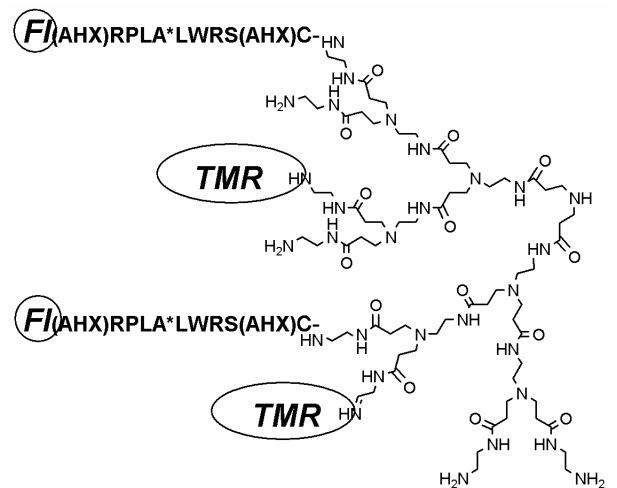


图 24 外围接有 FITC 标记的肽和 TMR 的树枝状大分子^[102]

构、良好的水溶性和生物相容性等特点, 同时也还具有 EPR 效应^[104], 其通过内吞作用进入细胞. 肽类树枝状大分子的结构精确可控, 是一种单分散的大分子, 在药物代谢动力学上具有很好的重现性. 肽类树枝状大分子作为药物传递系统能够降低药物不良反应, 提高治疗指数, 具有增溶、增效、缓释、控释的功能^[105], 因此, 其具有很强的吸引力^[106].

肽类树枝状大分子作为药物载体与药物结合的方式可分为两类^[106]: 一是非共价键合, 药物通过物理作用包裹在肽类树枝状大分子中, 药物通过环境

条件(PH、温度等)的变化而释放, 或者通过扩散释放; 二是肽类树枝状大分子与药物通过共价键方式结合, 药物通过体内的酶催化降解连接键释放药物, 或者通过一些环境敏感性化学键的断裂释放.

4.1.1 肽类树枝状大分子与药物的非共价键结合

肽类树枝状大分子具有空腔结构, 由于受到外围官能团的保护, 空腔里是一个比较稳定的微环境. Meijer^[107]等利用脲和硫脲修饰的 PPI 树枝状大分子作为主体分子去包裹含有脲基甘氨酸的小分子(如图 25(a)), 发现小分子与树枝状大分子之间有离子键和氢键作用, 离子键将小分子引入到树枝状大分子之中, 氢键作用使小分子附着在树枝状大分子上面. 基于含脲基甘氨酸与多肽的相似结构, 他们又利用树枝状大分子与 Boc 保护的短肽相互作用(如图 25(b))^[108], 发现树枝状大分子能包裹多种短肽, 通过调控 pH 可以使短肽从树枝状大分子中释放出来, 表明这种功能化的树枝状大分子能够作为一种 pH 敏感的多肽药物释放载体. Crespo^[21]等合成了具有顺式 4-氨基-L-脯氨酸(Amp)支化单元的肽类树枝状大分子. 脯氨酸分子中的环状结构和亚胺使其具有独特的空间化学性质. 在有机溶剂中, 聚脯氨酸呈右旋螺旋链结构(PPI); 在水溶液中, 聚脯氨酸呈左旋螺旋链结构(PPII). 基于这种特性, 以聚脯氨酸来构建的肽类树枝状大分子, 有望成为一种功能性药物载体. 药物在有机溶剂中包裹并处于 PPI 构象的螺旋链中, 当进入人体环境时, 寡聚脯氨酸的构象从 PPI 转向 PPII, 从而使药物得以释放. Agrawal^[109]报道了以 PEG-

1000 为核, 赖氨酸为支化单元的肽类树枝状大分子 G3、G4, 外围用半乳糖功能化, 用这四种肽类树枝状大分子包裹磷酸氯喹啉, 研究其释放情况. 结果显示半乳糖修饰的肽类树枝状大分子对药物具有稳定持续释放的作用, 还能降低了肽类树枝状大分子的溶血性. 这说明在对肽类树枝状大分子进行某些功能化后可以得到更安全的药物载体.

4.1.2 肽类树枝状大分子与药物的共价键结合

肽类树枝状大分子通过非共价作用包裹的药物在一定的环境条件下能够释放出来, 然而这种方式载药量较低, 这也是药物传递系统面临的一个主要问题之一. 肽类树枝状大分子的多价表面上丰富的反应位点能够大量键合药物, 使载药量得以提高. 通常肽类树枝状大分子与药物共价键合有两种类型^[110-112]: (1)药物与肽类树枝状大分子直接共价结合; (2)药物与肽类树枝状大分子之间通过连接分子共价键合. 连接分子的功能为或转化药物上与肽类树枝状大分子不能直接反应的官能团, 或改善药物的溶解性, 或控制药物的释放速度(通常是含有胺键或二硫键的连接分子), 或减小药物与肽类树枝状大分子间的空间位阻, 以提高肽类树枝状大分子的载药量.

目前以天然氨基酸为支化单元的肽类树枝状大分子与药物通过共价键结合的报道比较少, PAMAM 树枝状大分子研究的比较多^[111, 113]. Kannan^[114]等通过共价键把 methylprednisolone 连接到 PAMAM 树枝状大分子上, 并用 FITC 标记后进行了生物学评价. 结果表明 PAMAM-methylprednisolone 与 methylprednisolone

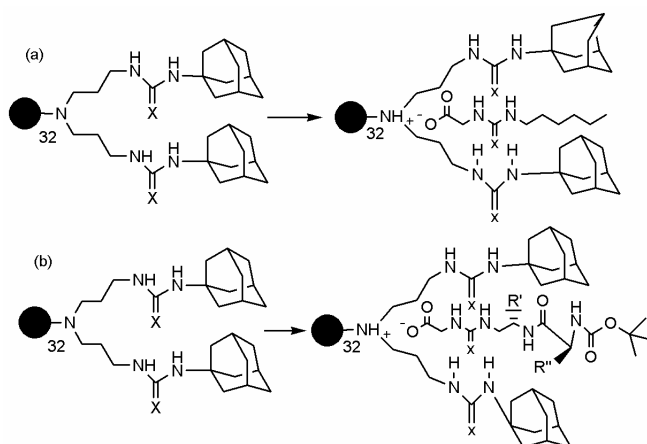


图 25 (a) 树枝状大分子同含有脲基甘氨酸的小分子作用^[107]; (b) 树枝状大分子同 Boc 保护的短肽作用^[108]

一样具有药理活性, 药物大部分集中在 A549 人类肺癌细胞的细胞液中. 同时发现, 当采取两种不同的合成策略时, 由于 methylprednisolone 的立体位阻, 得到的载药量两者相差较大.

药物与树枝状大分子通过共价键结合形成分子量确定的载药树枝状大分子, 在药物代谢动力学上有很好的重现性, 也达到了高的载药量, 但也存在一些问题, 如每一种药物的治疗效果都与它的化学结构相关, 共价键合方式改变了药物分子的结构, 有可能改变药效. Gurdag^[115]等人用外围为羧基的 G2.5 的 PAMAM 树枝状大分子同氨甲喋呤(MTX)上的氨基共价键合, 同时用外围为氨基的 G3 的 PAMAM 同 MTX 上的羧基共价键结合, 结果发现氨甲喋呤上氨基与树枝状大分子结合后的药物活性远高于另外一种.

共价键合药物面临的另外一个难点是如何使药物有效地从树状大分子上释放出来. Zhuo^[116]等人以 1,4,7,10-四氮杂环十二烷为核、合成外围为伯胺的树枝状大分子, 通过与 1-溴乙酰基-5-氟尿嘧啶反应, 形成酰亚胺键, 在 PBS(pH=7.4, 37℃)条件下 5-氟尿嘧啶从树枝状大分子上断裂释放出来(如图 26). Yunus^[112]用二硫键作为树枝状大分子 PAMAM 和乙酰半胱氨酸的连接物, 在一定浓度的谷胱甘肽(GSH)作用下, 药物和树枝状大分子间的二硫键会断裂, 释放出乙酰半胱氨酸. pH 敏感性的化学键常作为抗肿瘤药物与树枝状大分子的连接. Lee^[117]等用脲键连接抗肿瘤药物阿霉素与树枝状大分子, 发现在 pH=7.4 条件

下药物的累积释放量小于 10%, 而在 pH = 5.0, 48 小时后, 阿霉素基本完全释放出来, 并且具有显著的抗癌活性.

载有药物的树枝状大分子在体内需具有长的循环时间, 才能够使其达到病变部位取得治疗效果, 但同时也要避免长时期积累而产生的毒性. Okuda^[118]现 PEG 修饰的赖氨酸树枝状大分子(KG6)比未用 PEG 修饰的 KG6 在血液中有较长的循环时间, 同时在体内的积累量也较低. 并且 PEG 化的程度越高, KG6 通过 EPR 效应在肿瘤细胞中积累量越显著, 说明 PEG 化的赖氨酸肽类树枝状大分子具有被动靶向的功能. Porter^[119, 120]研究了赖氨酸树枝状大分子、PEG 化的赖氨酸树枝状大分子的体内药代动力学和体内分布情况, 认为可以通过控制 PEG 化的赖氨酸树枝状大分子的大小来优化其药代动力学、生物体内降解和生物吸收等情况. 2009 年^[121], 他们又把 PEG 化的赖氨酸树枝状大分子与抗肿瘤药物氨甲喋呤(MTX)通过共价键结合, 进一步研究这种载药的树枝状大分子在动物体内的分布代谢情况. Szoka^[122]等人也同时将抗肿瘤药物喜树碱和 PEG 偶联到赖氨酸肽类树枝状大分子上, 其血液半衰期达到了(30.9 ± 8.8) h, 在肿瘤部位的药物量占注射总量的 4.2% ± 2.3%, 而自由喜树碱的血液半衰期只有 30 min, 在肿瘤部分的药物量只有注射总量的 0.29% ± 0.04%, 此结果进一步说明 PEG 化的赖氨酸树枝状大分子具有长循环和被动靶向作用.

为了提高药物达到病变细胞的总量, 人们还将

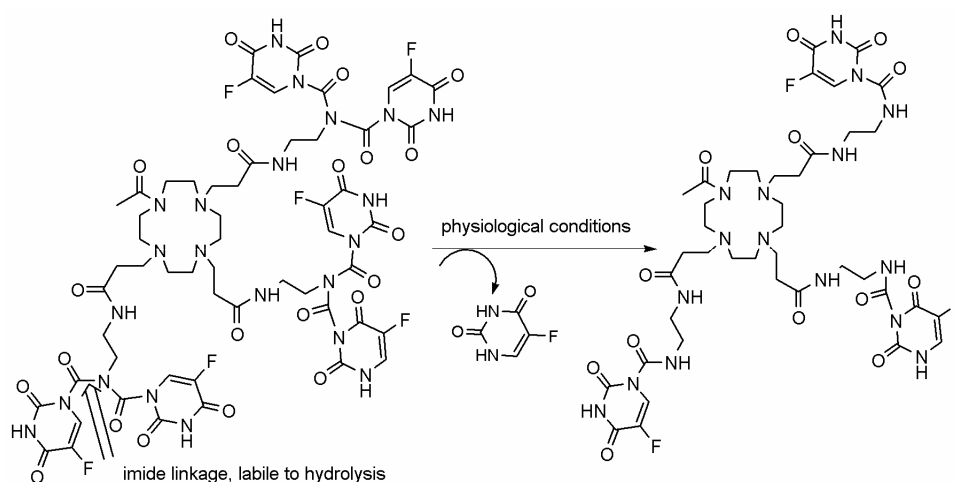


图 26 酰亚胺键不稳定水解药物从树枝状大分子上释放出来^[116]

具有特异性的配体偶联到树枝状大分子上, 得到了具有主动靶向功能的药物控释系统^[123~127].

4.2 功能化肽类树枝状大分子作为药物

肽类树枝状大分子除了作为药物载体外, 其本身也有某些间接生物效应, 在疫苗、抗病毒、抗细菌等方面有一定的应用.

传统的抗原肽为了诱导免疫反应, 需要接一个比较大的多肽或蛋白. 但这种免疫抗原决定簇低, 载体蛋白可能会诱导其他免疫反应, 而树状免疫原可很好地克服这个缺点. 1988 年 Tam^[128]首先提出了多肽抗原(multiple antigen peptide, MAPs), 如图 27(a). MAPs 是一个由赖氨酸树枝状大分子和多个抗原肽组成. 由于分子中的多个抗原肽, 抗原的免疫性显著提高. 他们又合成了具有多抗原决定簇的 MAPs(如图 27(b))^[129], 加强了分子的免疫原性. 1990 年 Tam 等^[130]合成了具有连续 T 细胞 B 细胞抗原决定簇的 MAP, 用作疟疾疫苗. 在 Tam 工作的启发下, Oliveira^[131]合成具有赖氨酸核心和四个环状二硫肽的 MAPs 作为口蹄疫疫苗. Baigude^[132]合成了具有多

糖外层的 MAPs, 用作 AIDS 疫苗(如图 28(a)). 现在 MAPs 已经被应用在制造抗体和毒性免疫反应研究方面^[7]. MAPs 比通常多肽-蛋白质聚合物有更高的效能和更快的诱导免疫速度.

肽类树枝状大分子除了在疫苗方面研究得较多外, 其作为抗病毒药物也受到人们的关注. 有文章报道^[133]第三代赖氨酸肽类树枝状大分子外围用磺酸基萘修饰后, 得到的聚阴离子树枝状大分子能够干扰病毒感染, 在体外能抑制人合胞体病毒的黏附. Jiang^[134]等利用这类阴离子树状大分子作为微生物杀灭剂阻止 SHIV89.6P 在猕猴体内传播.

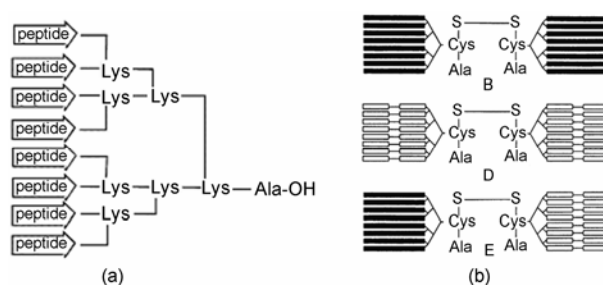


图 27 以赖氨酸树枝状大分子为骨架的多肽抗原^[128, 129]

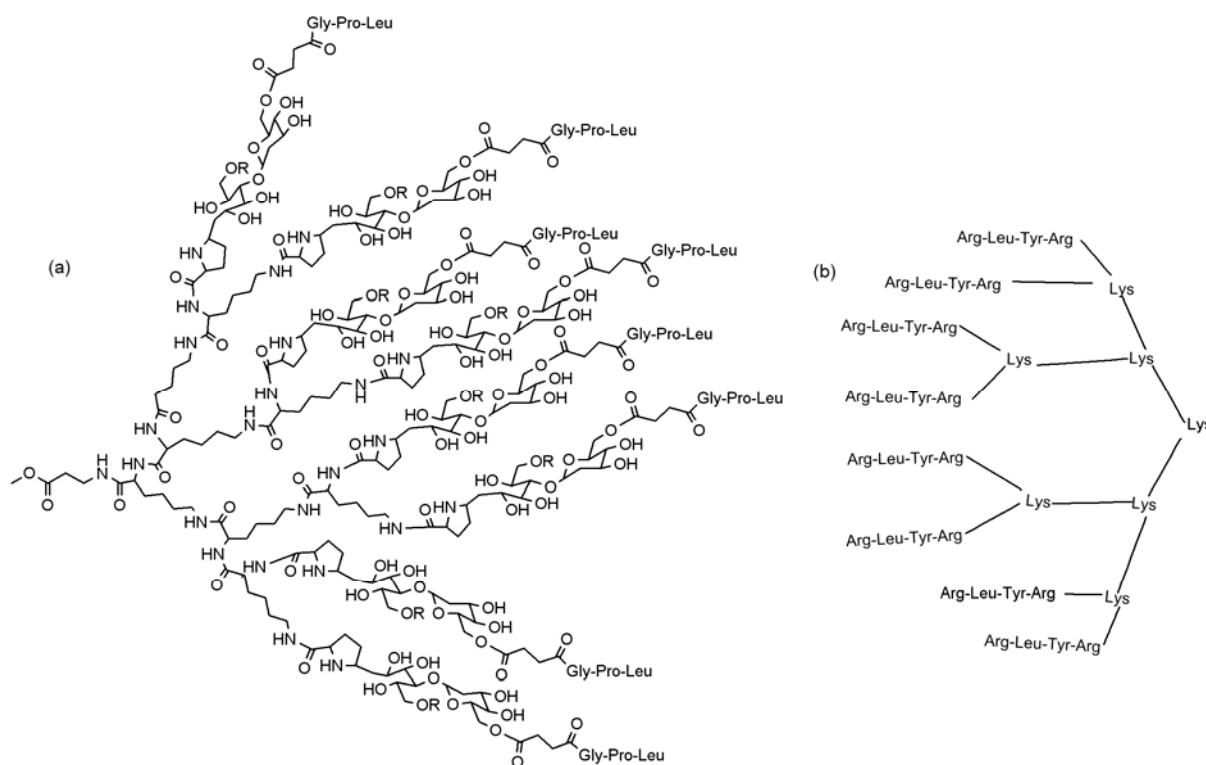


图 28 (a) 具有多糖外层的多肽抗原^[139]; (b) 含有 8 个抗菌肽(RLYR)的肽类树枝状大分子^[135]

传统的抗菌素在治疗和控制细菌感染中发挥了重要作用,但随着抗菌素的广泛使用,人和动物体内细菌的抗药性也随之增强.一些新发现的带有正电荷双亲性的短肽具有抗菌作用,称为天然抗菌肽. Tam^[135]将 RLYR 四肽和 RLYRKVYG 八肽偶联到 G1、G2、G3 赖氨酸树枝状大分子上,发现这两种短肽与 G2、G3 赖氨酸树枝状大分子结合后,显示出高的抗菌活性,但与 G1 偶联后抗菌活性也很低(如图 28(b)),而单独的 RLYR 四肽和 RLYRKVYG 八肽则没有抗菌活性. Nagahori^[136]等用甘露糖修饰的赖氨酸树枝状大分子能够抑制 I 型大肠杆菌对马血细胞的黏附,起到一定的抗菌作用.

Kasai^[137]等用精氨酸修饰的赖氨酸树枝状大分子模拟内皮他丁(endostatin),发现这种肽类树枝状大分子在体内有较强的抑制血管生成的作用,并且和肝素有很强的结合力,能够抑制肺癌内皮细胞的生长,这有可能作为一种肿瘤血管发生抑制剂用于癌症的治疗.

4.3 肽类树枝状大分子基因载体

基因治疗是近几十年发展起来的在分子水平上的疾病治疗方法,它利用遗传工程的方法,通过适当的载体将目标遗传物质导入患者特定组织细胞(靶细胞),使其在细胞内得到一定的表达,替代或纠正人自身基因结构或功能上的错乱,杀灭病变细胞或增强机体清除病变细胞的能力等,产生正常的基因产物以补偿或修正突变基因的功能,恢复细胞、组织和器官的生理功能,从而达到治疗目的.基因治疗要解决的三个重要问题是:治疗基因、基因载体系统和基因的可控表达^[138, 139].

目前应用于基因转染的载体主要有病毒载体(viral vector)和非病毒载体(non-viral vector)两种.病毒载体由于充分利用了病毒高度进化所具有的感染和寄生特性,转染效率高且对大多数细胞都有靶向作用,但由于临床试验中出现导致患者死亡的病例,使其安全性受到广泛的质疑.此外,病毒载体所运载基因的数量有限且制备复杂及费用较高等都限制了其应用.因此非病毒载体的研究愈来愈受到人们的重视.

载体/基因复合物进入细胞并在胞内转染的一般过程为^[140]: (1)载体压缩 DNA 形成复合物; (2)载体-DNA 复合物作用于细胞表面并进入细胞; (3)DNA 从溶酶体逃逸出来,到达细胞核; (4)DNA 在细胞核内

通过转录和翻译最终产生目标基因编码的蛋白质.近几十年来,研究者们已设计了多种类型且各有特点的非病毒基因载体,主要包括阳离子脂质体(cationic liposome)及阳离子聚合物(cationic polymer),如聚左旋赖氨酸(PLL)^[141, 142]、聚谷氨酸及其衍生物^[143];多聚胺类:聚乙烯亚胺(PED)^[144-151]、聚丙烯亚胺树状物(PPI)^[152, 153];阳离子聚磷酸酯(PPE)^[154];聚乙烯吡啶盐^[155];脱乙酰壳聚糖(Chitosan)^[156, 157]、明胶(gelatin)^[158, 159]等.

树枝状大分子由于规整的结构和单分散性,作为基因载体具有转染效率高、细胞毒性低等优点.1993 年,Haensler 和 Szoka 首次尝试将 PAMAM 作为非病毒载体用于体外基因转染^[160].在生理条件下,大分子支链上的带正电的氨基与 DNA 质粒和寡核苷酸中带负电的磷酸基团通过静电相互作用形成纳米粒子(如图 29 所示),能有效防止核酸降解^[161-163].树枝状大分子/DNA 复合物进入细胞和在胞内转运的过程如图 30 所示^[164].树枝状大分子由于尺寸较小,与

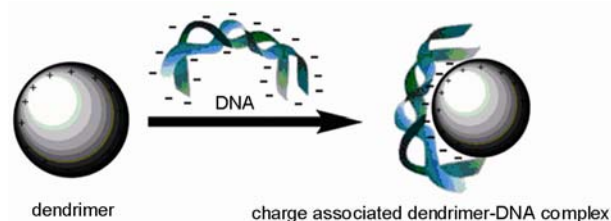


图 29 树枝状大分子与 DNA 复合复合^[110]

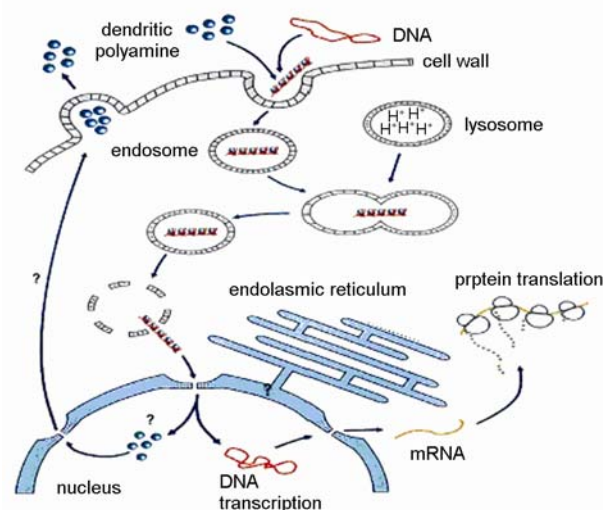


图 30 基于树枝状大分子为载体的 DNA 转染机理^[164]

DNA 复合成纳米粒子后, 更易进入细胞. 到目前为止, 树枝状大分子/DNA 复合物进入细胞核的机制及这些大分子的排除途径还不完全清楚.

近年来, 基于肽类树枝状大分子基因载体的研究已取得了初步进展. Park 等^[13, 47]以 PEG(2000)为核, L-赖氨酸为骨架, 用发散法合成了具有良好生物相容性的肽类树枝状大分子(如图 31). 这类分子在水中具有良好的溶解性, 外围为电正性的氨基. 凝胶阻滞实验显示, 当氮磷比为 1 时, 树枝状大分子即可与 DNA 质粒复合(如图 32), 并自组装成为 50~150 nm 的颗粒.

Niudome 等^[165]对肽类树枝状大分子与直链聚赖氨酸(PLL)的基因转染效率进行比较(如图 33), 发现肽类树枝状大分子与 DNA 复合后形成的粒径较大, 同时与 DNA 之间的相互作用力较弱, 便于复合物进入细胞后的有效分离, 实现较高的转染效率. 这一研究表明赖氨酸树枝状大分子的特殊分子结构对基因转染效率的贡献较大. Toth 等人^[166]将直链的多肽片段与第三代赖氨酸树枝状大分子偶联, 所得的肽类树枝状大分子可以与 DNA 很好地复合, 但其体外细胞转染效率并不高. 这可能是由于低代数树枝状大分子的粒径太小, 与 DNA 之间的静电作用力太弱, 或形成的复合物粒径太小导致复合物不能有效进入细胞内, 导致 DNA 转染效率低.

Niudome 等^[24, 167]以己二胺为核, 通过液相发散法合成了第六代赖氨酸树枝状大分子(如图 34). 为了

考察外围末端基团对基因转染的影响, 通过液相发散法合成了末端为赖氨酸、精氨酸或组氨酸的肽类树枝状大分子. 结果表明: 末端为赖氨酸或精氨酸的肽类树枝状大分子与 DNA 质粒的缩合力相当. 通过对 CHO 细胞(图 35(a)), HeLa 细胞(图 35(b))和 COS-7 细胞(图 35(c))转染的比较发现, 末端为精氨酸的肽类树枝状大分子的转染效率最高, 末端为组氨酸的肽类树枝状大分子与 DNA 的缩合能力较低, 但在酸性环境中能与 DNA 形成复合体. Park^[168]等人同样发现树枝状大分子外围经精氨酸修饰后其转染效率大为提高. 此研究结果进一步表明肽类树枝状大分子的外围功能团对转染效率有很大的影响.

高代数的树枝状大分子有一定的细胞毒性, 当代数大于 5 时, 显示出明显的细胞毒性^[105, 169, 170]. 这主要是由于高代数的树枝状大分子带有过多的阳离子造成. 如 PAMAM 的伯、仲、叔胺均可与 DNA 发生作用, 氨基越多, 毒性越大, 但低代数的树枝状大分子又不能与 DNA 很好地复合. 因此转染效率和细胞毒性间的平衡是树枝状大分子基因载体需要解决的一个难题.

Cao^[171]等人以聚左旋乳酸为核、赖氨酸为支架, 成功合成了两亲性肽类树枝状大分子(如图 36), 用于转染人肝癌细胞. 此类肽类树枝状大分子相对于直链的聚赖氨酸(PLL-23K)和支化的 PEI-2K, 其细胞毒性大为降低, 并且可与 DNA 很好地复合, 提高基因转染效率. 不同代数的树枝状大分子与 DNA 质粒以

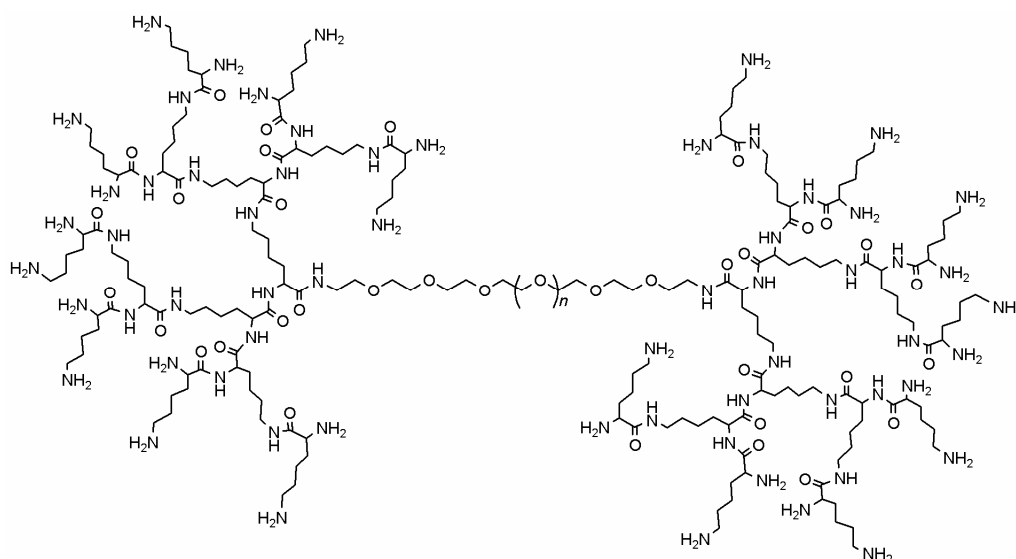


图 31 以 PEG 为核的哑铃形肽类状树枝状大分子^[13]

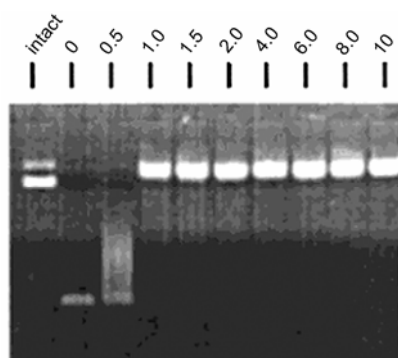


图 32 哑铃形肽类树枝状大分子与 NDA 质粒复合的凝胶阻滞实验^[13]

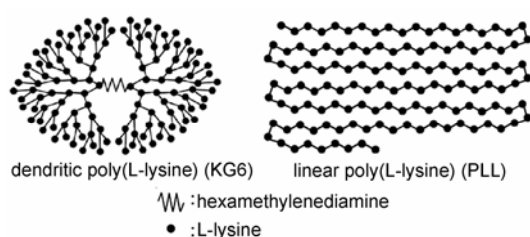


图 33 赖氨酸树枝状大分子与直链聚赖氨酸高分子^[165]

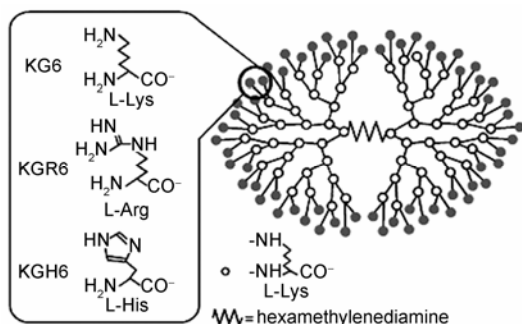


图 34 外围为赖氨酸、精氨酸、组氨酸肽类树枝状大分子^[167]

不同的 N/P 比复合后, 细胞转染结果表明, 当 N/P 为 10 时, 第四代树枝状大分子的转染效率(如图 37)较

高. 相对于转染效率高的 PLL-23K, 这类肽类树枝状大分子同时表现出了转染效率高和低毒性的特点.

我们设计合成了以三(2-氨基-乙基)胺为核的、代数分别为三代 (G3)、四代 (G4)和五代 (G5) 的肽类树枝状大分子. 这种肽类树枝状大分子是内部为亲酯性, 外围为亲水性的双亲性化合物. 不同代数的树状大分子外围含有不同数目的氨基, 尺寸大小各异, 细胞毒性低, 当氮磷比为 1 的时候就可以很好与 DNA 复合, 第五代肽类树枝状分子的基因转染率很高, 且不受血清的影响. 这类肽类树枝状大分子有望作为新型基因载体用于基因治疗.

5 展望

肽类树枝状大分子由于其独特的分子结构和性能, 特别是优异的生物相容性, 使之成为一类新型的生物医用材料, 其潜在的生物医学应用前景倍受关注. 然而, 需要指出的是, 肽类树枝状大分子的临床应用还在极大程度上依赖于可控制备、功能化以及生物学响应等相关研究的发展.

高度规整性的单分散性肽类树枝状大分子的可控制备存在难度大、成本高等问题, 特别是高代数的大分子. 因此, 研发简捷、低成本的规模化制备技术依然是肽类树枝状大分子面临的挑战. 肽类树枝状大分子的特殊结构催生了多种类型的功能化, 近年来已成为这一领域的研究方向和前沿, 并正在形成一个新的有吸引力的化学分支科学^[172]. 肽类树枝状大分子功能化研究必将赋予其新的生命力, 也是发展临床应用的关键. 作为医学诊断或分子诊断的微系统以及药物/基因传递系统的载体材料——肽类树枝状大分子对其生物学响应的影响至关重要, 肽类树枝状大分子结构的特殊性为构建多功能的诊断及治疗系统创造了条件. 对于诊断微系统来说, 着重发

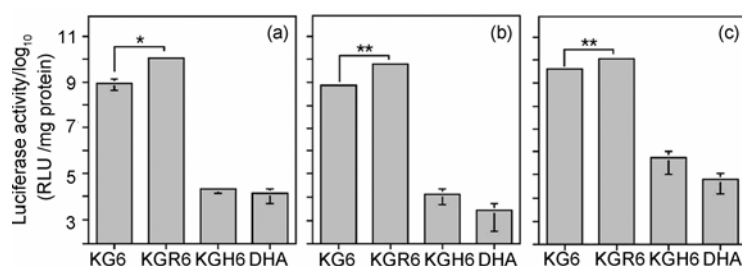
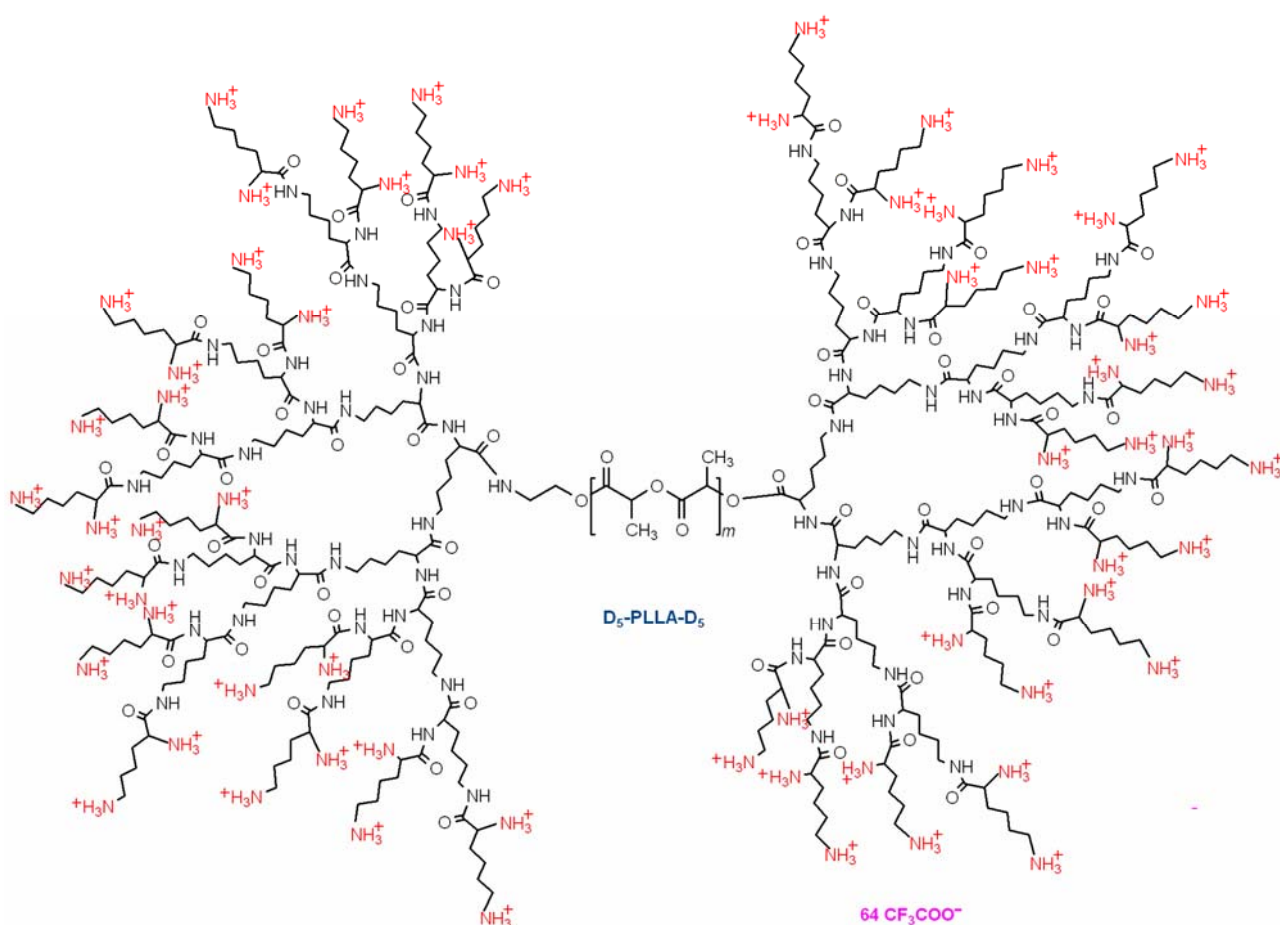
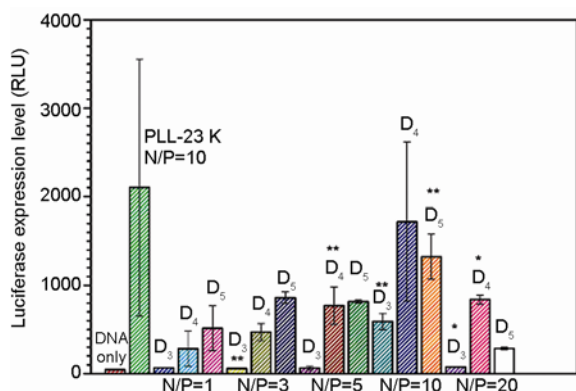


图 35 末端经不同氨基酸修饰的肽类树枝状大分子作为 DNA 载体的细胞转染效率比较^[167]

图 36 以聚左旋乳酸为核的肽类树枝状大分子^[171]图 37 不同代数的肽类树枝状大分子或 PLL-23K 与 DNA 以不同氮磷比复合后的细胞转染^[171]

展能克服各种生物传递屏障(如血管、细胞间隙、细胞膜等)到达目标分子/细胞、并具有信号放大功能的对靶分子或靶细胞具有高亲和力的诊断并兼具治疗功能的多功能纳米分子探针, 以及可调控纳米粒子

形状的高性能分子探针。对于以肽类树枝状大分子为载体的治疗系统来说, 研究重点主要集中于: 适合于靶向和/或智能型药物控释/传递系统, 同时兼具长循环特性、靶向性、环境响应性等多功能的药物控释/传递系统, 能靶向高效输送核酸类药物(包括 DNA、SiRNA 等)的传递系统。基于肽类树枝状大分子的新型诊断和治疗系统的研究, 将有助于揭示肽类树枝状大分子的结构和多功能化与高效能系统的相互作用机制, 推动肽类树枝状大分子的研究及其在生物医学领域中的应用。肽类树枝状大分子的研究是一个崭新的领域, 具有很大的发展和应用空间。通过不同学科如有机化学、材料科学、临床医学、生物化学、分子生物学、化学生物学、生物医药等多学科领域的互相交叉、融合与渗透, 在不久的将来, 肽类树枝状大分子作为一类具有特殊拓扑结构的高分子材料, 必将给临床诊断和治疗提供新途径, 在医学乃至整个生命科学中发挥极其重要的作用。

致谢 本工作得到国家自然科学基金(批准号: 50633020)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2005CB623903)资助, 特此一并致谢。

参考文献

- 1 Bosman AW, Janssen HM, Meijer EW. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chem Rev*, 1999, 99: 1665—1688
- 2 Flory PJ. Molecular size distribution in three dimensional polymers. VI. Branched polymers containing A-R-Bf-1 type units. *J Am Chem Soc*, 1952, 74: 2718—2723
- 3 Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. Cascade and nonskid-chain-like syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*, 1978, 155—158
- 4 Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polymer J*, 1985, 17: 117—132
- 5 Newkome GR, Yao ZQ, Baker GR, Gupta VK. Micelles part 1, cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *J Org Chem*, 1985, 50: 2003—2004
- 6 Crespo L, Sanclimens G, Pons M, Giralt E, Royo M. Peptide and amide bond-containing dendrimers. *Chem Rev*, 2005, 105: 1663—1681
- 7 Sadler K, Tam JP. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Reviews in Molecular Biotechnology*. 2002, 90: 195—229
- 8 Kensinger RD, Catalone BJ, Krebs FC, Wigdahl B, Schengrund CL. Novel polysulfated galactose-derivatized dendrimers as binding antagonists of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, 48: 1614—1623
- 9 Kinberger GA, Cai WB, Goodman M. Collagen mimetic dendrimers. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 15162—15163
- 10 Zeng F, Zimmerman SC. Dendrimers in supramolecular chemistry: from molecular recognition to self-assembly. *Chem Rev*, 1997, 97: 1681—1712
- 11 Kaneshiro TL, Wang XL, Lu ZR. Synthesis, characterization and gene delivery of poly-L-lysine octa(3-aminopropyl) silsesquioxane dendrimers: nanoglobular drug carriers with precisely defined molecular architectures. *Mol Pharmaceutics*, 2007, 4: 759—768
- 12 Dykes GM, Brierley LJ, Smith DK, McGrail PT, Seeley GJ. Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chem Eur J*, 2001, 7: 4730—4739
- 13 Choi JS, Lee EJ, Choi YH, Jeong YJ, Park JS. Poly(ethyleneglycol)-block-poly(L-lysine) dendrimer: novel linear polymer/dendrimer block copolymer forming a spherical water-soluble polyionic complex with DNA. *Bioconjugate Chem*, 1999, 10: 62—65
- 14 Bodanzky M, Bodanzky A, Bailey P. *The Practice Of Peptide Synthesis*. New York: Springer, 1984
- 15 Sakakibara S. Synthesis of large peptides in solution. *Biopolymers*, 1995, 37: 17—28
- 16 Sakakibara S. Chemical synthesis of proteins in solution. *Biopolymers*, 1999, 51: 279—296
- 17 Kates SA, Albericio F. *Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*. New York: Marcel Dekker, 2000
- 18 Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 1963, 85: 2149—2154
- 19 曾世通, 杨永, 原续波, 常津. 多肽树枝状大分子的合成研究进展. *高分子通报*, 2006, 10: 1—9
- 20 田少雷, 蔡孟深. 固相肽合成中的接肽方法. *化学通报*, 1992, 2: 17—22
- 21 Crespo L, Sanclimens G, Montaner B, Pérez-Tomás R, Royo M, Pons M, Albericio F, Giralt E. Peptide dendrimers based on polyproline Helices. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 8876—8883
- 22 Sanclimens G, Crespo L, Pons M, Giralt E, Albericio F, Royo M. Saturated resins or stress of the resin. *Tetrahedron Letters*, 2003, 44: 1751—1754
- 23 Denkwalter RG, Kole J, Lukasavage WJ. Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units. US Patent 4289872, 1981-09-16
- 24 Ohsaki M, Okuda T, Wada A, Hirayama T, Niidome T, Aoyagi H. *In vitro* gene transfection using dendritic poly(L-lysine). *Bioconjugate Chem*, 2002, 13: 510—517
- 25 何骏, 麻远, 赵玉芬. 树状多肽合成及应用. *化学进展*, 2005, 17(3): 468—476
- 26 Tam JP, Xu J, Eom KD. Methods and strategies of peptide ligation. *Biopolymers*, 2001, 60: 194—209
- 27 Medina SH, El-Sayed MEH. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chem Rev*, 2009, 109: 3141—3157
- 28 Wu P, Feldman AK, Nugent AK, Hawker CJ, Scheel A, Voit B, Pyun J, Fréchet JMJ, Sharpless KB, Fokin VV. Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 3928—3932

- 29 Wu P, Malkochb M, Huntb JN, Vestbergb R, Kaltgrada E, Finn MG, Fokin VV, Sharpless KB, Hawker CJ. Multivalent bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. *J Chem Commun*, 2005, 46: 5775—5777
- 30 Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40: 2004—2021
- 31 Grayson SM, Fréchet JMJ. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem Rev*, 2001, 101: 3819—3968
- 32 Lee JW, Kim JH, Kim HL, Han SC, Kim JH, Shin WS, Jin SH. Synthesis of symmetrical and unsymmetrical PAMAM dendrimers by fusion between azide and alkyne functionalized PAMAM Dendrons. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 579—584
- 33 Lee JW, Kim JH, Kim BK, Kim JH, Shin WS, Jin SH. Convergent synthesis of PAMAM dendrimers using click chemistry of azide-functionalized PAMAM dendrons. *Tetrahedron*, 2006, 62: 9193—9200
- 34 Yim CB, Boerman OC, Visser MD, Jong MD, Dechesne AC, Rijkers DTS, Liskamp RMJ. Versatile conjugation of octreotide to dendrimers by cycloaddition“click”chemistry to yield high-affinity multivalent cyclic peptide dendrimers. *Bioconjugate Chem*, 2009, 20: 1323—1331
- 35 Kuijpers BHM, Groothuys S, Soede AC, Laverman P, Boerman OC, Delft FLV, Rutjes FPJT. Preparation and evaluation of glycosylated arginine-glycine-aspartate (RGD) derivatives for integrin targeting. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1847—1854
- 36 Ellen MM, Brander-van DB, Meijer EW. Poly(propylene imine) dendrimers: Large-scale synthesis by heterogeneously catalyzed hydrogenations. *Angew Chem Int Ed*, 1993, 32: 1308—1311
- 37 Hawker CJ, Fréchet JMJ. A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules. *J Chem Soc Chem Commun*, 1990, 15: 1010—1013
- 38 Hawker CJ, Fréchet JMJ. Preparation of polymers with controlled molecular architecture A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 7638—7647
- 39 Hawker CJ, Wooley KL, Fréchet JMJ. Unimolecular micelles and globular amphiphiles:dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1993, 1287—1297
- 40 Kawaguchi T, Walker KL, Wilkins CL, Moore JS. Double exponential dendrimer growth. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 2159—2165
- 41 Kantchev EAB, Chang CC, Chang DK. Direct Fmoc/tert-Bu solid phase synthesis of octamannosyl polylysine dendrimer-peptide conjugates. *Biopolymers*, 2006, 84: 232—240
- 42 Shao J, Tam JP. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 3893—3899
- 43 Sasaki T, Kaiser ET. Helichrome: synthesis and enzymic activity of a designed hemeprotein. *J Am Chem Soc*, 1989, 111: 380—381
- 44 Finikova O, Galkin A, Rozhkov V, Cordero M, Hägerhäll C, Vinogradov S. Porphyrin and tetrabenzoporphyrin dendrimers: tunable membrane-impermeable fluorescent pH nanosensors. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 4882—4893
- 45 徐敏, 谭克, 张韬, 余学海. 树状高分子功能进展. 功能高分子学报, 2001, 14: 481—487
- 46 Leiding T, Görecki, K, Kjellman T, Vinogradov SA, Hägerhäll C, Årsköld SP. Precise detection of pH inside large unilamellar vesicles using membrane-impermeable dendritic porphyrin-based nanoprobes. *Anal Biochem*, 2009, 2: 296—305
- 47 Choi JS, Joo DH, Kim CH, Kim K, Park JS. Synthesis of a Barbell-like triblock copolymer, poly(l-lysine) dendrimer-block-poly(ethyleneglycol)-block-poly(l-lysine) dendrimer, and its self-assembly with plasmid DNA. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 474—480
- 48 Chapman TM, Hillyer GL, Mahan EJ, Shaffer KA. Hydraamphiphiles: Novel linear dendritic block copolymer surfactants. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 11195—11196
- 49 Kress J, Rosner A, Hirsch A. Depsipeptide dendrimers. *Chem Eur J*, 2000, 6: 247—257
- 50 Kim YS, Gil ES, Lowe TL. Synthesis and characterization of thermoresponsive co-biodegradable linear-dendritic copolymers. *Macromolecules*, 2006, 39: 7805—7811
- 51 Kaminskas LM, Boyd BJ, Karellas P, Krippner GY, Lessene R, Kelly B, Porter CJH. The impact of molecular weight and PEG chain length on the systemic pharmacokinetics of PEGylated poly L-Lysine dendrimers. *Mol Pharmaceutics*, 2008, 5: 449—463
- 52 Gillies ER, Dy E, Fréchet JMJ, Szoka FC. Biological evaluation of polyester dendrimer: Poly(ethylene oxide) bow-tie hybrids with tunable molecular weight and architecture. *Mol Pharm*, 2005, 2: 129—138
- 53 Florence AT, Sakthivel T, Toth I. Oral uptake and translocation of a polylysine dendrimer with a lipid surface. *J Control Release*, 2000, 65: 253—259
- 54 Wolinsky JB, Grinstaff MW. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1037—1055
- 55 Sashima H, Shigemasa Y, Roy R. Chemical modification of chitosan hyperbranched chitosan-sialic acid dendrimer hybrid with

- tetraethylene glycol spacer. *Macromolecules*, 2000, 33: 6913—6915
- 56 Niederhafner P, Sebestika J, Jezeka J. Glycopeptide dendrimers. Part I. *J Pept Sci*, 2008, 14: 2—43
- 57 Niederhafner P, Sebestika J, Jezeka J. Glycopeptide dendrimers. Part II. *J Pept Sci*, 2008, 14: 44—65
- 58 Niederhafner P, Sebestika J, Jezeka J. Glycopeptide dendrimers. Part III-a review: Use of glycopeptide dendrimers in immunotherapy and diagnosis of cancer and viral diseases. *J Pept Sci*, 2008, 14: 556—587
- 59 Baigude H, Katsuraya K, Okuyama K, Yachi Y, Sato S, Uryu T. Synthesis of dicarboxylate oligosaccharide multilayer terminal functionality upon poly(lysine) dendrimer scaffolding. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem*. 2002, 40: 3622—3633
- 60 Fu YJ, Nitecki DE, Maltby D, Simon GH, Berejnoi K, Raatschen HJ, Yeh BM, Shames DM, Brasch RC. Dendritic iodinated contrast agents with PEG-Cores for CT imaging: synthesis and preliminary characterization. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17: 1043—1056
- 61 Galande AK, Hilderbrand SA, Weissleder R, Tung CH. Enzyme-targeted fluorescent imaging probes on a multiple antigenic peptide core. *J Med Chem*, 2006, 49: 4715—4720
- 62 Hong S, Leroueil PR, Majoros IJ, Orr BG, Baker JR, Holl MMB. The binding avidity of nanoparticle-base multivalent targeted drug delivery platform. *Chemistry & Biology*, 2007, 14:107—115
- 63 Majoros IJ, Thomas TP, Mehta CB, Baker JR. Poly(amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy. *J Med Chem*, 2005, 48: 5892—5899
- 64 Singh P, Gupta U, Asthana A, Jain NK. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 2239—2252
- 65 Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58: 1532—1555
- 66 Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for use in human medicine. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26: 425-433
- 67 Bogdanov AA, Weissleder R, Brady TJ. Long-circulating blood pool imaging agents. *Adv Drug Deliver Rew*, 1995,16: 335—348
- 68 Sachse A, Leike JUD, Thomas S, Wagner SED, Roling GL, Krause W, Brandl M. Biodistribution and computed tomography blood-pool imaging properties of polyethylene glycol-coated iopromide-carrying liposomes. *Invest Radiol*, 1997, 32: 44—50
- 69 Yordanov AT, Lodder AL, Woller EK, Cloninger MJ, Patronas N, Milenic D, Brechbiel MW. Novel iodinated dendritic nanoparticles for computed tomography (CT) imaging. *Nano Letters*, 2002, 2: 595—599
- 70 Krause W, Hackmann-Schlichter N, Maier FK, Müller R. *Dendrimers in diagnostics*. (in: *Top Curr Chem*). Heidelberg Springer, 2000, 210: 261—308
- 71 Li C, Winnard PT, Takagi T, Artemov D, Bhujwalla ZM. Multimodal image-guided enzyme/prodrug cancer therapy. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 15072—15073
- 72 Daldrup-Link HE, Brasch RC. Breast MR imaging contrast medium macromolecular contrast medium Eur Radiol, 2003, 13: 354—365
- 73 Wiener EC, Auteri FP, Chen JW, Brechbiel MW, Gansow OA, Schneider DS, Belford RL, Clarkson RB, Lauterbur PC. Molecular dynamics of ion-chelate complexes attached to dendrimers. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 7774—7782
- 74 Wiener EC, Brechbiel MW, Brothers H, Magin RL, Gansow OA, Tomalia DA, Lauterbur PC. Dendrimer-based metal chelates: A new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn Reson Med*, 1994, 31: 1—8
- 75 Kobayashi H, Kawamoto S, Jo SK, Bryant HL, Brechbiel MW, Star RA. Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers: Pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 388—394
- 76 Sato N, Kobayashi H, Hiraga A, Saga T, Togashi K, Konishi J, Brechbiel MW. Pharmacokinetics and enhancement patterns of macromolecular MR contrast agents with various sizes of polyamidoamine dendrimer cores. *Mag Res Med*, 2001, 46: 1169—1173
- 77 Cloninger MJ. Biological applications of dendrimers. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6: 742—748
- 78 罗奎 新一代生物医用材料—功能化肽类树枝状分子及其生物医药应用. 成都: 四川大学博士学位论文, 2009
- 79 Fu YJ, Raatschen HJ, Nitecki DE, Wendland MF, Novikov V, Fournier LS, Cyran C, Victor R, Shames DM, Brasch RC. Cascade polymeric MRI contrast media derived from poly(ethylene glycol) cores: Initial syntheses and characterizations. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1519—1529
- 80 刘敏, 郭佑民, 王鹏, 郭小娟, 杨军乐. 基质金属蛋白酶 2 靶向穿膜肽表针分析及体外显像研究. 中华医学杂志, 2007, (4), 233—239
- 81 Boutry S, Burtea C, Laurent S, Toubreau G, Elst LV, Muller RN. Magnetic resonance imaging of inflammation with a specific selectin-targeted contrast agent. *Magne Reson Med*, 2005, 53: 800—807
- 82 Wiener EC, Konda S, Shadron A, Brechbiel M, Gansow O. Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol*, 1997, 32: 748—754
- 83 Konda SD, Aref M, Brechbiel M, Wiener EC. Development of a tumor-targeting MR contrast agent using the high-affinity folate receptor -

work in progress. *Invest Radiol*, 2000, 35:50—57

- 84 Takahashi M, Hara Y, Aoshima K, Kurihara H, Oshikawa T, Yamashita M. Utilization of dendritic framework as a multivalent ligand: a functionalized gadolinium(III) carrier with glycoside cluster periphery. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41: 8485—8488
- 85 Woller EK, Walter ED, Morgan JR, Singel DJ, Cloninger MJ. Altering the strength of lectin binding interactions and controlling the amount of lectin clustering using mannose/hydroxyl-functionalized dendrimers. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 8820—8826
- 86 Wolfenden ML, Cloninger MJ. Mannose/glucose-functionalized dendrimers to investigate the predictable tunability of multivalent interactions. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12168—12169
- 87 Zanini D, Roy R. Synthesis of new α -thiosialodendrimers and their binding properties to the sialic acid specific lectin from limax flavus. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 2088—2095
- 88 Zanini D, Roy R. Practical synthesis of starburst PAMAM α -thiosialodendrimers for probing multivalent carbohydrate-lectin binding properties. *J Org Chem*, 1998, 63: 3486—3491
- 89 Baal I, Malda H, Synowsky SA, van Dongen JIJ, Hackeng TM, Merkx M, Meijer EW. Multivalent peptide and protein dendrimers using native chemical ligation. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 5052—5057
- 90 Rijkers DTS, Esse GW, Merkx R, Brouwer AJ, Jacobs HJF, Pieters RJ, Liskamp RMJ. Efficient microwave-assisted synthesis of multivalent dendrimeric peptides using cycloaddition reaction (click) chemistry. *Chem Commun*, 2005, 4581—4583
- 91 Kluger R, Zhang J. Hemoglobin dendrimers: Functional protein clusters. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6070—6071
- 92 Wu CC, Brechbiel MW, Kozak RW, Gansow OA. Metal-chelate-dendrimer-antibody constructs for use in radioimmunotherapy and imaging. *Bioorg Med Chem Lett*, 1994, 4: 449—454
- 93 Choi YS, Mecke A, Orr BG, Holl MMB, Baker JR. DNA-directed synthesis of generation 7 and 5 PAMAM dendrimer nanoclusters. *Nano Letters*, 2004, 4: 391—397
- 94 Konda SD, Aref M, Wang S, Brechbiel M, Wiener EC. Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumor xenografts. Magnetic resonance materials in physics, *Biology and Medicine*, 2001, 12: 104—113
- 95 Konda SD, Wang S, Brechbiel M, Wiener EC. Biodistribution of a Gd-153-folate dendrimer, generation=4, in mice with folate-receptor positive and negative ovarian tumor xenografts. *Invest Radiol*, 2002, 37: 199—204
- 96 Swanson SD, Kukowska-Latallo JF, Patri AK, Chen CY, Ge S, Cao ZY, Kotlyar A, East AT, Baker JR. Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3(2): 201—210
- 97 Dirksen A, Langereis S, Waal BFM, Genderen MHP, Hackeng TM, Meijer EW. A supramolecular approach to multivalent target-specific MRI contrast agents for angiogenesis. *Chem Commun*, 2005, 22: 2811—2813
- 98 Xu H, Regino CAS, Koyama Y, Hama Y, Gunn AJ, Bernardo M, Kobayashi H, Choyke PL, Brechbiel MW. Preparation and preliminary evaluation of a biotin-targeted, lectin-targeted dendrimer-based probe for dual-modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1474—1482
- 99 Anderson SA, Rader RK, Westlin WF, Null C, Jackson D, Lanza GM, Wickline SA, Kotyk JJ. Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted nanoparticles. *Magn Reson Med*, 2000, 44: 433—439
- 100 Luo K, Liu G, Zhang XW, She WC, He B, Nie Y, Li L, Wu Y, Zhang ZR, Gong QY, Gao FB, Song B, Ai H, Gu ZW. Functional L-lysine dendritic macromolecules as liver imaging probes. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 1227—1236
- 101 Striebel HM, Hirschfeld EB, Egerer R, Földes-Papp Z, Tilz GP, Stelzner A. Enhancing sensitivity of human herpes virus diagnosis with DNA microarrays using dendrimers. *Exp Mol Pathol*, 2004, 77: 89—97
- 102 McIntyre JO, Fingleton B, Wells KS, Piston DW, Lynch CC, Gautam S, Matrisian LM. Development of a novel fluorogenic proteolytic beacon for *in vivo* detection and imaging of tumour-associated matrix metalloproteinase-7 activity. *Biochem J*, 2004, 377: 617—628
- 103 Ternon M, Díaz-Mochón JJ, Belsom A, Bradley M. Dendrimers and combinatorial chemistry-tools for fluorescent enhancement in protease assays. *Tetrahedron*, 2004, 60: 8721—8728
- 104 Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today*, 2006, 11: 812—818
- 105 Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, Emanuele AD. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*, 2003, 252: 263—266
- 106 Boas U, Christensen JB, Heegaard PMH. *Dendrimers in Medicine and Biotechnology*. London: Roy Soc Chem, 2006
- 107 Boas U, Karlsson AJ, Waal BFMD, Meijer EW. Synthesis and properties of new Thiourea-functionalized poly(propylene imine) dendrimers and their role as hosts for urea functionalized guests. *J Org Chem*, 2001, 66: 2136—2145
- 108 Boas U, Söntjens SH, Jensen KJ, Christensen JB, Meijer EW. New dendrimer-peptide host-guest complexes: towards dendrimers as

- peptide carriers. *ChemBioChem*, 2002, 3: 433—439
- 109 Agrawal P, Umesh Gupta U, Jain NK. Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate. *Biomaterials*, 2007, 28: 3349—3359
- 110 Tekade RK, Kumar PV, Jain NK. Dendrimers in oncology: An expanding horizon. *Chem Rev*, 2009, 109: 49—87
- 111 Kolhe P, Khandare J, Pillai O, Kannan S, Lieh-Lai M, Kannan RM. Preparation, cellular transport, and activity of polyamidoamine-based dendritic nanodevices with a high drug payload. *Biomaterials*, 2006, 27: 660—669
- 112 Kurtoglu YE, Navath RS, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan RM. Poly(amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials*, 2009, 30: 2112—2121
- 113 Khandare JJ, Jayant S, Singh A, Chandna P, Wang Y, Vorsa N, Minko T. Dendrimer versus linear conjugate: Influence of polymeric architecture on the delivery and anticancer effect of paclitaxel. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17: 1464—1472
- 114 Khandare J, Kolhe P, Pillai O, Kannan S, Lieh-Lai M, Kannan RM. Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 330—337
- 115 Gurdag S, Khandare J, Stapels S, Matherly LH, Kannan RM. Activity of dendrimer-methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and resistant cell lines. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17: 275—283
- 116 Zhuo RX, Du B, Lu ZR. In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J Control Release*, 1999, 57: 249—257
- 117 Lee CC, Gillies ER, Fox ME, Guillaudeu SJ, Fréchet JM, Dy EE, Szoka FC. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16649—16654
- 118 Okuda T, Kawakami S, Aimoto N, Niidome T, Yamashita F, Hashida M. PEGylated lysine dendrimers for tumor-selective targeting after intravenous injection in tumor-bearing mice. *J Control Release*, 2006, 116: 330—336
- 119 Boyd JB, Kaminskas LM, Karellas P, Krippner G, Lessene R, Porter CJH. Cationic poly-L-lysine dendrimers: pharmacokinetics, biodistribution, and evidence for metabolism and bioresorption after intravenous administration to rats. *Mol Pharmaceutics*, 2006, 3: 614—627
- 120 Kaminskas LM, Boyd BJ, Karellas P, Kelly GY, Lessene R, Kelly B, Porter CJH. The impact of molecular weight and PEG chain length on the systemic pharmacokinetics of PEGylated poly L-lysine dendrimers. *Mol Pharmaceutics*, 2008, 5: 449—463
- 121 Kaminskas LM, Kelly BD, McLeod VM, Boyd BJ, Krippner GY, Williams ED, Porter CJH. Pharmacokinetics and tumor disposition of PEGylated, methotrexate conjugated poly-L-lysine dendrimers. *Mol Pharmaceutics*, 2009, 6: 1190—1204
- 122 Fox ME, Guillaudeu S, Fréchet JMJ, Jerger K, Macaraeg N, Szoka FC. Synthesis and *in vivo* antitumor efficacy of PEGylated poly(L-lysine) dendrimer-camptothecin conjugates. *Mol Pharmaceutics*, 2009, 6: 1562—1572
- 123 Shukla S, Wu G, Chatterjee M, Yang WL, Sekido M, Diop LA, Müller R, Sudimack JJ, Lee RJ, Barth RF, Tjarks W. Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 158—167
- 124 Patri AK, Myc A, Beals J, Thomas TP, Bander NH, Baker JR. Synthesis and *in vitro* testing of J591 antibody-dendrimer conjugates for targeted prostate cancer therapy. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15: 1174—1181
- 125 Lesniak WG, Kariapper MST, Nair BM, Tan W, Huston A, Balogh LP, Khan MK. Synthesis and characterization of PAMAM dendrimer-based multifunctional nanodevices for targeting $\alpha\beta 3$ Integrins. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1148—1154
- 126 Chandrasekar D, Sistla R, Ahmad FJ, Khar RK, Diwan PV. The development of folate-PAMAM dendrimer conjugates for targeted delivery of anti-arthritis drugs and their pharmacokinetics and biodistribution in arthritic rats. *Biomaterials*, 2007, 28: 504—512
- 127 Chandrasekar D, Sistla R, Ahmad FJ, Khar RK, Diwan PV. Folate coupled poly(ethyleneglycol) conjugates of anionic poly(amidoamine) dendrimer for inflammatory tissue specific drug delivery. *J Biomed Mater Res Part A*, 2007, 82A: 92—103
- 128 Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5409—5413
- 129 Tam JP, Lu YA. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9084—9088
- 130 Tam JP, Clavijo P, Lu YA, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Zavala F. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J Exp Med*, 1990, 171: 299—306
- 131 Oliveira ED, Villén J, Giralte E, Andreu D. Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 144—152
- 132 Baigude H, Katsuraya K, Okuyama K, Uryu T. Synthesis of structurally-controlled AIDS vaccine model with glyco-peptide dendrimer scaffolds. *Macromol Chem Phys*, 2004, 205: 684—691

- 133 Gong Y, Matthews B, Cheung D, Tam T, Gadawski I, Leung D, Holan G, Raff J, Sacks S. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus. *Antiviral Res*, 2002, 55: 319—329
- 134 Jiang YH, Emau P, Cairns JS, Flanary L, Morton WR, McCarthy TD. SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21: 207—213
- 135 Tam JP, Lu YA, Yang JL. Antimicrobial dendrimeric peptides. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 923—932
- 136 Nagahori N, Lee RT, Nishimura SI, Pagé D, Roy R, Lee YC. Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to highly mannosylated ligands. *Chembiochem*, 2002, 3: 836—844
- 137 Kasai S, Nagasawa H, Shimamura M, Uto Y, Hori H. Design and synthesis of antiangiogenic heparin-binding arginine dendrimer mimicking the surface of endostatin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2002, 12: 951—954
- 138 Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*, 1993, 260: 926—932
- 139 顾建人, 曹雪涛. 基因治疗. 北京: 科学出版社, 2001
- 140 Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, 2008, 29: 3477—3496
- 141 Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 1987, 262: 4429—4432
- 142 Mousazadeh M, Palizban A, Salehi R, Salehi M. Gene delivery to brain cells with apoprotein E derived peptide conjugated to polylysine (apoE_{dp}-PLL). *J Drug Target*, 2007, 15: 226—230
- 143 Dekie L, Toncheva V, Dubrue P, Schacht EH, Barrett L, Seymour LW. Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy. *J Control Release*, 2000, 65: 187—202
- 144 Fischer D, Bieber T, Li YX, Elsässer HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*, 1999, 16: 1273—1279
- 145 Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 1999, 6: 595—605
- 146 Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, Fontanari C, Klar J, Kurtz A, Blunk T, Goepferich A. Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines. *J Gene Med*, 2005, 7: 1287—1298
- 147 Bousif O, Lezoualch F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7297—7301
- 148 Gosselin MA, Guo WJ, Lee RJ. Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12: 989—994
- 149 Jeon O, Yang HS, Lee TJ, Kim BS. Heparin-conjugated polyethylenimine for gene delivery. *J Control Release*, 2008, 132: 236—242
- 150 Swami A, Aggarwal A, Pathak A, Patnaik S, Kumar P, Singh Y, Gupta KC. Imidazolyl-PEI modified nanoparticles for enhanced gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 335: 180—192
- 151 Ahn HH, Lee JH, Kim KS, Lee JY, Kim MS, Khang G, Lee IW, Lee HB. Polyethyleneimine-mediated gene delivery into human adipose derived stem cells. *Biomaterials*, 2008, 29: 2415—2422
- 152 Zinselmeyer BH, Mackay SP, Schatzlein AG, Uchegbu IF. The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm Res*, 2002, 19: 960—967
- 153 Russ V, Günther M, Halama A, Ogris M, Wagner E. Oligoethylenimine-grafted polypropylenimine dendrimers as degradable and biocompatible synthetic vectors for gene delivery. *J Control Release*, 2008, 132: 131—140
- 154 Wang J, Mao HQ, Leong KW. A novel biodegradable gene carrier based on polyphosphoester. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 9480—9481
- 155 Kabanov AV, Astafieva IV, Maksimova IV, Lukanidin EM, Georgiev GP, Kabanov VA. Efficient transformation of mammalian cells using DNA interpolyelectrolyte complexes with carbon chain polycations. *Bioconjugate Chem*, 1993, 4: 448—454
- 156 Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 52: 145—150
- 157 Strand SP, Issa MM, Christensen BE, Vårum KM, Artursson P. Tailoring of chitosans for gene delivery: Novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 3268—3276
- 158 Leong KW, Mao HQ, Truong-Le VL, Roy K, Walsh SM, August JT. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J Control Release*, 1998, 53: 183—193
- 159 Wang ZY, Zhao Y, Ren L, Jin LH, Sun LP, Yin P, Zhang YF, Zhang QQ. Novel gelatin-siloxane nanoparticles decorated by Tat peptide as vectors for gene therapy. *Nanotechnology*, 2008, 19: 445103
- 160 Haensler J, Szoka FC. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem*, 1993, 4: 372—379

- 161 Bielinska A, Kukowska-Latallo JF, Johnson J, Tomalia DA, Baker JR. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 2176—2182
- 162 Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther*, 1997, 4: 823—832
- 163 Chen W, Turro NJ, Tomalia DA. Using ethidium bromide to probe the interactions between DNA and dendrimers. *Langmuir*, 2000, 16: 15—19
- 164 Stiriba SE, Frey H, Haag R. Dendritic polymers in biomedical applications: From potential to clinical use in diagnostics and therapy. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 1329—1334
- 165 Yamagata M, Kawano T, Shiba K, Mori T, Katayama T, Niidome T. Structural advantage of dendritic poly(L-lysine) for gene delivery into cells. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 526—532
- 166 Coles DJ, Yang S, Esposito A, Mitchell D, Minchin RF, Toth I. The synthesis and characterisation of a novel dendritic system for gene delivery. *Tetrahedron*, 2007, 63: 12207—12214
- 167 Okuda T, Sugiyama A, Niidome T, Aoyagi H. Characters of dendritic poly((L)-lysine) analogues with the terminal lysines replaced with arginines and histidines as gene carriers *in vitro*. *Biomaterials*, 2004, 25: 537—544
- 168 Kim TI, Baek JU, Bai CZ, Park JS. Arginine-conjugated polypropylenimine dendrimer as a non-toxic and efficient gene delivery carrier. *Biomaterials*, 2007, 28: 2061—2067
- 169 Choi JS, Nam K, Park JY, Kim JB, Lee JK, Park JS. Enhanced transfection efficiency of PAMAM dendrimer by surface modification with L-arginine. *J Control Release*, 2004, 99: 445—456
- 170 Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Delivery Rev*, 2005, 57: 2215—2237
- 171 Li Y, Zhu YD, Xia KJ, Sheng RL, Jia L, Hou XD, Xu YH, Cao A. Dendritic poly(l-lysine)-b-poly(l-lactide)-b-dendritic poly(l-lysine) amphiphilic gene delivery vectors: Roles of PLL dendritic generation and enhanced transgene efficacies via termini modification. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 2284—2293
- 172 Vögtle F, Gestermann S, Hesse R, Schwierz H, Windisch B. Functional dendrimers. *Prog Polym Sci*, 2000, 25: 987—1041

New-generation biomedical materials: peptide dendrimers and their application in biomedicine

GU ZhongWei, LUO Kui, SHE WenChuan, WU Yao & HE Bin

National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: Peptide dendrimers are attractive synthetic polymers and have been widely used as a new generation of biomaterials in recent years. Peptide dendrimers, as well as general dendrimers, may be synthesized to reach nano sizes, and display well-defined architectures, highly-branched structures, high density of functional terminal groups, and controllable molecular weights. On the other hand, peptide dendrimers have properties similar to proteins and some special characteristics, such as good biocompatibility, water solubility and resistance to proteolytic digestion. Due to these advantages, peptide dendrimers have received considerable attention in biomedicine. This review focuses on the development of peptide dendrimers with emphasis on their applications both in diagnostics and in therapy.

Keywords: peptide dendrimers, molecular probes, drug delivery, gene delivery