

树状大分子研究在医学中的应用展望

白进发 顾 微 叶 玲*

(首都医科大学化学教研室 北京 100054)

摘 要 树状大分子是近几年来人工合成的一种新型纳米级高分子,它具有非常规整、精致的结构并且呈现出单分散性,受到人们越来越多的重视。本文主要介绍了树状大分子在医学研究中的应用,展望了该领域的发展趋势及临床意义。

关键词 树状大分子 药物载体 造影剂 基因治疗 硼中子捕获疗法

The Potential Application of Dendrimers in Medicine

BAI Jinfa, GU Wei, YE Ling*

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

Abstract Dendrimers are a new class of nanoscopic macromolecules which have been synthesized in recent years. There is an increasing interest in dendrimers worldwide because they possess a well defined globular structure and display monodispersity. In this review, application of dendrimers in medicine is presented in detail and potential clinical significance is discussed.

Key words Dendrimer, Drug carrier, Contrast agent, Gene therapy, Boron neutron capture therapy

树状大分子(Dendrimer)是近几年来人工合成的一种新型纳米级高分子^[1~5],它的高度枝化、单分散性、球形表面及分子内部大量的空腔使其具有独特的性质和特点。这类新型树状大分子在合成过程中,可在分子水平上严格控制其分子的大小、形状和结构等特征,使其具有非常规整、精细的结构,因而在许多领域显示出令人激动的应用前景,特别是在医药学领域。

一般地,树状大分子是有三个明显结构特征的单分子聚合物^[1,6],即有(1)一个引发核心,这个引发核心具有 N_c 个反应官能团,例如对于 NH_3 , $N_c=3$; 对于季戊四醇 $\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_4$, $N_c=4$, 等等;(2)内层(代, G),它是由重复单元组成并且径向连接到引发核心。一般由反应试剂不断加成到核心上形成,这个反应试剂具有 N_b ($N_b>1$) 个新反应基团;(3)外表面层,它具有终端官能团并且连接到最外面一代(见图 1)。一个树状大分子所带基团的数目与单体支化官能团数 N_b 和引发核的反应官能团数 N_c 以及代的数目(G)都有关, G 代树状物所具有的端基数 $Z=N_c N_b^G$ 。

树状大分子的核心和表面层经过修饰可以连接抗体或基因等物质,其内层空腔可以包裹药物分子,因而在医药学中显示出广泛的应用前景。本文主要介绍了树状大分子在药物载体、蛋白分离、基因治疗和硼中子捕获疗法研究中的应用,展望了这些领域的临床发展趋势及意义。

1 树状大分子作为药物载体

树状大分子能够被制备成分子大小和形状一致、分子每单位表面积有更多数量官能团并且

白进发 30 岁,男,讲师,硕士,现从事树状大分子作为抗癌药物载体的研究。*联系人
北京市教委资助项目(00KJ-107)
2000-12-28 收稿,2001-03-13 修回

相对分子质量相同的高度均一的化合物。树状大分子的高官能团密度可允许每个树状物携带较大数量的物质。树状大分子内部大量的空腔使其具备运载药物分子的潜能。既然在合成时能在表面和内层控制树状大分子上官能团的数目,这就提供了一种方式控制每个树状大分子需要运输的被携带物质的数量。树状大分子经过修饰可以做生物活性物质的定向载体,它能够运输生物活性物质到目标有机体中特定的位置。

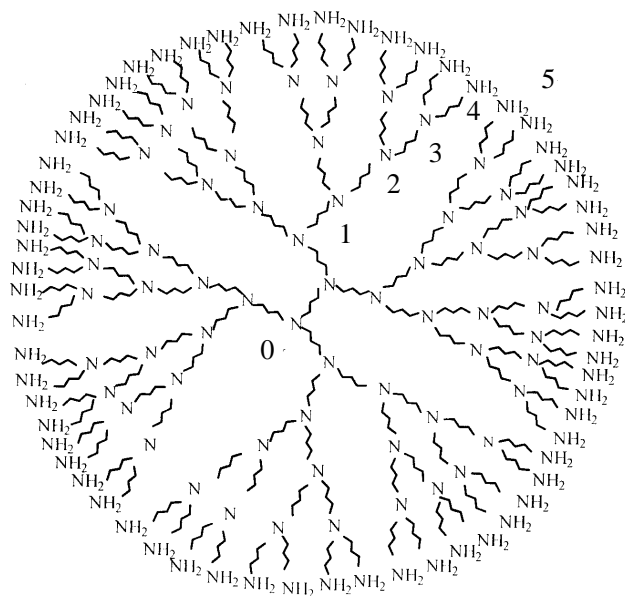


图 1 乙二胺为核的树状大分子
0 引发核心; 1、2、3、4 代数; 5 外表面层

1.1 一般药物载体

由于能够控制树状大分子的质量、大小、表面价和表面方向性^[7],并且能够根据不同的目的进行修饰^[8],树状大分子很适合在定向药物运输中做载体。

Meijer 等曾报道了一类端基为伯胺,内层有亚胺支化的树状大分子,将其第 5 代同各种被保护的氨基酸反应得到一种分子容器^[9]。每个分子容器至少可容纳 1 个刚果红或 8 个 4-硝基苯甲酸分子,因而具有药物运输及荧光标记等功能。后来 Meijer 等又进一步研究了封闭在分子容器中的客体分子的形状选择性释放,结果发现客体分子在一定条件下可以分步释放。因此,这些体系具备发展药物运输手段的潜能。

Roberts 等成功地用聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子通过共价键将卟啉与抗体分子连接起来^[10]。这种结合物可提高放射性标记抗体的特异性,因此在肿瘤治疗和诊断中具有很大潜能。Delong 等发现这类树状大分子还可作为寡核苷酸的一种潜在运输工具^[11]。使用树状大分子使细胞对寡核苷酸的吸收提高了 50 倍,而且增加了细胞溶质的和细胞核的可利用性。另外,使用树状大分子作运输辅助剂能提高寡核苷酸与分支杆菌的相互作用^[12]。

最近, Zhuo 等报道了在体外用环状物做核合成的树状大分子对抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶的包裹与释放的研究^[13]。研究结果显示树状大分子在抗肿瘤药物的可控制释放中是一种有希望的载体。

适合用在树状大分子中的药物包括在体内或体外用于诊断或治疗哺乳动物疾病的任何物质,在不明显破坏树状大分子的物理完整性情况下它们能与树状物结合在一起。这些药物可以是抗体、抗癌药、止痛药、高血压药、强心剂和类似药物。Schengrund 等通过将寡糖连接到树状大分子上,合成了治疗和预防细菌和病毒性疾病的化合物^[14]。

1.2 造影剂

以螯合剂为基底磁共振成像(MRI)造影剂可被用作成像目标器官或者检测大脑或器官血管中血液流动的变化。Wiener 等通过将聚酰胺-胺树状大分子中端氨基配合到螯合剂 2-(4-异硫氰酸根苄基)-6-甲基二亚乙基三胺五乙酸上,再与金属离子结合,发展了一种新型的有很大的质子松弛提高和高的分子松弛性的磁共振成像造影剂^[15]。这些以树状大分子为基底金属螯合物提高了传统磁共振成像和 3D 飞行时间磁共振血管造影照片的效果,而且半衰期延长。Wiener 等后来发展了一种运输造影剂到肿瘤和肿瘤细胞的新方法^[16]。他们将叶酸连接到以氨为核的第 4 代聚酰胺-胺树状大分子上,再与 2-(4-异硫氰酸根苄基)-6-甲基二亚乙基三胺五乙酸反应生成聚合的螯合物 f-PAMAM-TU-DTPA。研究结果表明细胞在受体特异性的方式下积累叶酸盐结合的树状大分子。用叶酸盐结合的聚合螯合物的钆配合物治疗表达高亲和力叶酸盐受体的肿瘤细胞增加了纵向松弛速率 110%。这些数据说明叶酸盐结合的磁共振成像造影剂代表了一种充满希望的肿瘤定位的新方法。此后 Bulte 等研究了镝[Dy]-DOTA-PAMAM 配合物作为新型造影剂的可能性^[17]。

使用树状大分子作 MRI 造影剂不但能减少有效剂量而且提高了血管结构的造影效果^[18]。

1.3 免疫增强剂 (immuno-potentiating agent)

树状大分子运输的被携带物质除了上面提到的一般药物外,还可以是免疫增强剂^[6]。这些物质包括提高免疫反应的任何抗原、半抗原、有机或无机化合物。例如,被携带物质可以是用于产生抗疟疾,霍乱和尿道感染疫苗的合成肽,用于产生抗细菌疫苗的细菌多糖和为了预防如 AIDS 和肝炎这样的疾病而用于产生抗病毒疫苗的病毒蛋白质或病毒粒子。

树状大分子作为免疫增强剂的载体,避免了传统的高分子聚合物在容量和结构方面不确定的缺点。树状大分子的独有特性允许抗原最优化地到达一种有机体,产生的抗体比使用传统辅助剂具有更大的选择性和更高的亲和性。也可以将多种抗原肽或基团(如 T-和 B-细胞抗原决定基两者)同时连接到树状大分子,这样的设计将增加疫苗的功能。

2 用树状大分子分离蛋白质

糖类-蛋白质间相互作用在生物界中非常普遍,出现在许多重要的生命过程中,如细胞识别、粘附过程、感染等。Page 等合成了甘露糖化的聚酰胺-胺树状大分子^[19],并且通过辐射状双向免疫扩散和浊度分析确定了它们连接和形成不溶性糖类——植物血凝素配合物的能力。这些甘露糖化的树状大分子能从一种原始的植物血凝素混合物中选择性地沉淀一种甘露糖连接的蛋白质。因此这些多价的拟糖结合物组成了高亲和力的新型生物色谱物质,它们能方便地分离糖类连接的蛋白质。另外,美国 Rensselaer 理工学院的 Moore 教授和 Cramer 教授认为经离子化的树状大分子由于其高密度的官能团,是一种分离医用蛋白质的良好的置换剂。

3 在基因方面的应用

3.1 作核酸探针

Shchepinov 等用一种新型磷酰胺合成元合成了寡核苷酸树状大分子^[20], 当用多标记的寡核苷酸树状大分子做寡核苷酸系探针时信号有规律增加。一种树状大分子的寡核苷酸被成功地用在聚合酶链式反应 (PCR) 中做一种引发剂。含有树状大分子的这个链不被 T7 Gene6 外切核酸酶降解, 这使 PCR 的双链产物很容易转变成多标记的单链探针。Wang 等报道了用树状核酸探针做 DNA 生物传感器^[21]。树状大分子为基底生物传感器显示出较高的灵敏性和较宽的线性范围, 这是因为它比传统的石英晶体微观平衡生物传感器有更高的杂交能力。

3.2 基因治疗

聚阳离子和聚阴离子的静电相互作用产生的电中性对制备人造基因转移载体非常有用。在基因疗法中为了治愈遗传病, 需用载体将遗传物质运输进入真核生物细胞。末端为胺基的 PAMAM 在生理 pH 条件下为聚阳离子, 非常适合作为 DNA 的载体, 从而避免了使用病毒作为遗传物质载体的危险性。研究结果表明 PAMAM 的基因转移效率高于聚赖氨酸类。

Bielinska 小组报道了用 PAMAM 树状大分子将基因物质有效转移至哺乳动物细胞的研究^[22]。他们用 DNA-树状大分子配合物以最小的胞毒性高度有效地转染了很宽范围的真核生物细胞和细胞系。少数细胞系在加入氯喹时显示出转染力增加, 表明配合物在核内体定位。一种树状大分子转染细胞的能力与这种树状物的大小、形状和表面伯氨基团的数目有关。这些研究说明树状大分子能在体外转染多种细胞类型并且提供了产生永久转染细胞系的有效方法。随后, Bielinska 等研究了 PAMAM 树状大分子在体外转运反义寡核苷酸和“反义表达质粒”的能力, 这种运输系统可用作基因表达的定向调制^[23]。通过静电相互作用将树状大分子连接到各种形式的核酸上, 这种 DNA-树状大分子配合物能够转移寡核苷酸和质粒 DNA 从而具有调节反义抑制的能力。将磷酸二酯寡核苷酸连接到树状大分子也延长了它们在细胞内的存在时间。这些结果说明树状大分子是引进调节核酸的有效载体并且促进特异性基因表达的抑制。近来, Qin 等报道了用 PAMAM 树状大分子有效转移基因进入鼠的心脏移植体^[24]。结果发现, 使用树状大分子显著提高了质粒调节的基因转移和表达的效率。免疫抑制细胞因子大量长时间在组织中较大的范围产生提高了免疫抑制效果并且进一步延长了移植体存活时间。

树状大分子作为信号放大工具和作为药物 (反义的) 运输工具对核酸诊断的发展可能极其有用。由于核酸分子相对较大, 因此用各种荧光物质和/或蛋白质组分以有限的空间阻碍和/或抑制很容易标记核酸树状大分子。

4 在硼中子捕获疗法 (BNCT) 中的应用

硼中子捕获疗法提供了一种定位破坏肿瘤细胞的潜在方法, 它以稳定的同位素硼-10 被低能 (0.025eV) 热中子 (nth) 照射产生 α 粒子 (^4He) 和 ^7Li 原子核 ($^{10}\text{B} + \text{nth} \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow ^4\text{He} + ^7\text{Li} + 2.79\text{MeV}$) 为基础。BNCT 成功杀死肿瘤依靠运输一种足够数量的 ^{10}B 和 nth 到单个癌细胞以维持一种致死的 $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$ 反应。硼运输剂包括多种化合物, 如 $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, 硼卟啉, 硼苯丙氨酸和硼化的单克隆抗体 (MAb) 等。如果用单克隆抗体做硼-10 的定向剂, 则它们识别在肿瘤细胞上高度表达的一种表面膜抗原决定基和大量硼-10 原子连接到每个抗体分子上是很重要的。Barth 等用 PAMAM 树状大分子大量硼化 Mabs, 最终制备出稳定的免疫结合物^[25]。在此基础上进一

步用硼中子捕获疗法研究了初期的和转移的脑肿瘤^[26]。结果发现 BNCT 治疗的动物与对照组相比生存时间延长, 说明治疗的有效性。Barth 小组又报道了树状大分子结合的双特异性抗体(BsAb)作为治疗脑肿瘤的定向剂^[27]。

大多数高级别神经胶质瘤表达一种放大的表皮生长因子受体(EGFR)基因, 而且在细胞表面 EGFR 数目增加。如果将足够大量的 ^{10}B 原子连接到 EGF, 则该结合物可用于治疗脑肿瘤。Barth 小组用电子能谱证实树状大分子-EGF 生物结合物被细胞内吞^[28,29], 并且硼在溶酶体中积累。这说明硼化树状大分子-EGF 生物结合物有可能发展成为治疗脑肿瘤的一种新型定向剂。

各种抗体以及表皮生长因子已经被用做研究受体调节的硼运输, 可是在体内研究中已经显示仅有全部给药剂量的一小部分在肿瘤中积累而大部分在肝中积累。在正常细胞和癌细胞两者中, 许多酶的路径需要低分子量维生素, 叶酸。调节叶酸的胞吞运输到细胞的细胞膜受体在多种人类肿瘤中过度表达。叶酸与大分子(如毒素、酶、抗体、基因和脂质体)的结合物(叶酸盐)已经显示被纳入到过度表达叶酸盐受体的肿瘤细胞。后来报道了用叶酸盐取代的含硼树状大分子选择性定向固体肿瘤具有很大的潜能。

由于树状大分子是新型的水溶性高分子化合物, 具有明确的组成和结构, 除了上面提到的应用外, 它们还可以用在免疫测定中提高免疫测定的性能和灵活性^[30]。

5 讨论与展望

树状大分子在临床诊断和治疗中显示出广泛的应用前景。目前有关树状大分子本身的毒性和其在动物体内的生物学分布的研究仅有少数报道^[31,32]。从报道结果来看, 树状大分子在低代($G \leq 5$)和使用剂量下没有胞毒性并且没有显示出任何免疫原性。这些结果说明树状大分子在生物学应用中具有很大潜力。已经发现一种硅为基底树状大分子能在它们的枝中捕获氧分子, 将来这有望被用做制造人工血液。树状大分子作为药物载体在临床治疗和诊断方面有重要的理论和应用意义。树状大分子作为高度选择性或特异性的药物运输工具, 可以有效攻击目标区域, 如癌细胞, 以减少毒副作用; 作为造影剂的载体可以增强诊断的准确性和灵敏度; 作为基因转移载体, 可以避免病毒作为遗传物质载体的危险性。树状大分子高密度的官能团在硼中子捕获疗法还可用做制备硼运输剂, 从而提高治疗脑肿瘤的效果。在免疫测定方面树状大分子可以提高测定的灵敏性和减少测定的仪器分析时间。随着合成和分析手段的提高, 树状大分子在不久的将来必然给临床诊断和治疗提供一种新途径。

参考文献

- [1] Tomalia D A, Naylor A M, Goddard III W A. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1990, 29:138~175.
- [2] Tomalia D A, Durst H D. Top. Curr. Chem., 1993, 165:193~313.
- [3] Hawker C J, Frechet J M J. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112:7638~7647.
- [4] 李于飞. 高分子通报, 1993, 3: 155~164.
- [5] 崔光磊, 李于飞. 大学化学, 1999, 14(3):29~38.
- [6] Tomalia D A, Baker J R, Cheng R C et al. US P:5,714,166, 1998.
- [7] Jain N K, Jain S, Khopade A J. Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater., 1998, 25: 846~847.
- [8] Florence A T, Sakthivel T, Wilderspin A F et al. EP:884,327, 1998.
- [9] Jansen J F G A, de Brabander-van den berg E M M, Meijer E W. Science, 1994, 266:1226~1229.
- [10] Roberts J C, Adams Y E, Tomalia D et al. Bioconj. Chem., 1990, 1(5): 305~308.
- [11] DeLong R, Stephenson K, Loftus T et al. J. Pharm. Sci., 1997, 86(6): 762~764.
- [12] Attia S A, Shepherd V E, Rosenblatt M N et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 1998, 8(3): 207~214.

- [13] Zhuo R X, Du B, Lu Z R. J. Controlled Release, 1999, 57(3): 249~257.
- [14] Schengrund C-L, Thompson J. PCT Int. Appl. wo:98 26,662, 1998.
- [15] Wiener E C, Brechbiel M W, Brothers H et al. Magn. Reson. Med., 1994, 31(1): 1~8.
- [16] Wiener E C, Konda S, Shadron A et al. Invest. Radiol., 1997, 32(12): 748~754.
- [17] Bulte J W, Wu C, Brechbiel M W et al. Invest. Radiol., 1998, 33(11): 841~845.
- [18] Bourne M W, Margerun L, Hylton N et al. J. Magn. Reson. Imaging, 1996, 6(2): 305~310.
- [19] Page D, Roy R. Bioconjug. Chem., 1997, 8(5): 714~723.
- [20] Shchepinov M S, Udalova I A, Bridgman A J et al. Nucleic Acids Res., 1997, 25(22): 4447~4454.
- [21] Wang J, Jiang M, Nilsen, T W et al. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120(32): 8281~8282.
- [22] Kukowska L J F, Bielinska A U, Johnson J et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(10): 4897~4902.
- [23] Bielinska A, Kukowska L J F, Johnson J et al. Nucleic Acids Res., 1996, 24(11): 2176~2182.
- [24] Qin L, Pahud D R, Ding Y et al. Hum. Gene Ther., 1998, 9(4): 553~560.
- [25] Barth R F, Adams D M, Soloway A H et al. Bioconjug. Chem., 1994, 5(1): 58~66.
- [26] Barth R F, Soloway A H. Mol. Chem. Neuropathol., 1994, 21(2-3): 139~154.
- [27] Liu L, Barth R F, Adams D M et al. J. Hematother., 1995, 4(5): 477~483.
- [28] Capala J, Barth R F, Bendayan M et al. Bioconjug. Chem., 1996, 7(1): 7~15.
- [29] Yang W, Barth R F, Adams D M et al. Cancer Res., 1997, 57(19): 4333~4339.
- [30] Singh P, Moll III F, Lin S H et al. Clin. Chem., 1994, 40(9): 1845~1849.
- [31] Roberts J C, Bhalgat M K, Zera R T. J. Biomed. Mater. Res., 1996, 30(1): 53~65.
- [32] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R et al. J. Controlled Release, 2000, 65:133~148.