

特约专栏

## 肽类树状大分子及其生物医学应用

余汶川, 徐翔晖, 王刚, 罗奎, 顾忠伟

(四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心, 四川 成都 610064)

**摘要:** 肽类树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, 它除了具有普通树枝状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、单一分子量等之外, 同时还具有类似蛋白一样的球状结构、优良的生物相容性、水溶性、耐蛋白酶水解、生物降解等独特的性能。肽类树状大分子的上述特点, 使它在生物医学应用中显示出诱人的前景。系统论述了肽类树状大分子的合成方法、以及在疾病诊断与治疗等生物医学领域中的应用。如作为 MRI (磁共振成像) 分子探针、诊断试剂以及基因治疗试剂等。将造影官能团偶联到肽类树枝状分子上, 即得肽类树枝状 MRI 分子探针, 该类 MRI 分子探针具有优良的生物相容性, 纳米级尺寸结构。含氨基的肽类树枝状分子与基因 (DNA) 复合成纳米尺寸的粒子, 可有效进入细胞, 将 DNA 转移到目标部位, 达到基因转染的目的。

**关键词:** 肽类树状大分子、分子探针、药物载体、基因载体

**中图分类号:** R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2012)05-0020-10

## Preparation of Peptide Dendrimers and Their Applications in Biomedicine

SHE Wenchuan, XU Xianghui, WANG Gang, LUO Kui, GU Zhongwei

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

**Abstract:** Peptide dendrimers are attractive synthetic polymers which have been widely used as a new generation of biomaterials. Peptide dendrimers can be prepared via organic synthesis, showing nano sizes, and display well-defined architectures, highly-branched structures, high density of functional terminal groups, and controllable molecular weights. Peptide dendrimers have received considerable attention in biomedicine due to their properties similar to proteins and some special characteristics, such as good biocompatibility, water solubility and resistance to proteolytic digestion. In this paper, we review the synthesis of peptide dendrimers and their applications in diagnostics as well as therapy. Those characteristics can be used in biomedical application, focuses on the application of peptide dendrimers both in diagnostics as well as in therapy. In diagnostics, peptide dendrimers that bear gadolinium ( $Gd^{3+}$ ) complexes are used as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). The dendrimers MRI contrast agents have been found to be excellent blood pool agents. Peptide dendrimers are also being investigated for therapeutics, for example, as carriers in gene transfection. Peptide dendrimers bear primary amine groups at their surface that participate in DNA binding, compacting it into nanoscale particles and promoting its cellular uptake. The size and diameter of peptide dendrimers have an influence on their transfection efficiency. The development of peptide dendrimers with different size and diameter as efficient and safe gene delivery carriers that can transfer DNA into the nuclei of target cells is a key factor for success of gene therapy.

**Key words:** peptide dendrimers; molecular probes; drug delivery; gene delivery

### 1 前言

树枝状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<sup>[1]</sup>。近几年发展起来的肽类树状大分子, 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。肽类树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。目前, 肽类树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, 仿生胶原<sup>[2]</sup>, 主-客体识别<sup>[3]</sup>等方面外, 作为用于疾病早期诊断的 MRI 分子探针以及药物/基因传递系统, 已在国际上受到广泛关注。

### 2 肽类树状大分子的合成方法

肽类树状大分子从广义上是指在分子结构中含有肽键的树枝状分子, 根据多肽和氨基酸在分子中形成的方

收稿日期: 2012-04-02

基金项目: 国家“973 计划”项目 (2011CB606206); 国家自然科学基金项目 (51133004, 81101099, 30970730)

作者简介: 余汶川, 男, 1983 年生, 博士

通信作者: 顾忠伟, 男, 1949 年生, 教授, 博士生导师

式, 肽类树状大分子可以分为共价键合肽类树状大分子和非共价键合肽类树状大分子<sup>[4]</sup> (图1)。

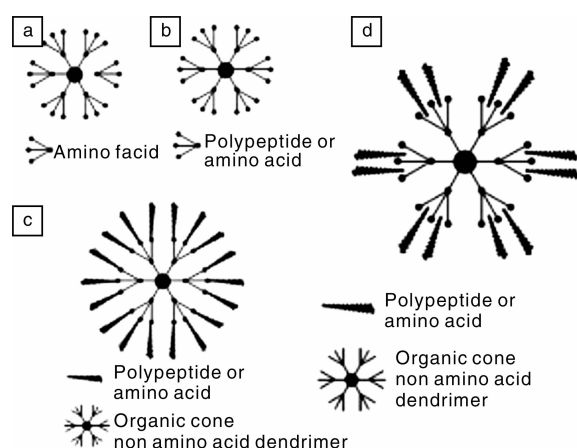


图1 共价肽类树状大分子和非共价肽类树状大分子

Fig. 1 Covalent and noncovalent peptide dendrimers

从多肽合成的角度来讲, 肽类树状大分子可通过液相法和固相法合成。固相合成法<sup>[5]</sup> (SPPS) 自20世纪60年代初 Merrifield 首次提出至今, 经过五十多年多肽化学工作者的改进和完善, 已经成为一种常用和重要的合成方法。固相法合成肽类树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。Laia creso<sup>[6]</sup> 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状大分子。液相法一般用于合成高代数的肽类树状大分子, 是现在肽类树状大分子合成的主要方法。Denk-walter<sup>[7]</sup> 于1981年最早通过液相发散法合成

半球状赖氨酸肽类树状大分子; Ohsaki<sup>[8]</sup> 等用己二胺为核, 通过液相发散法合成了第六代球形赖氨酸肽类树状大分子。

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分子合成的又一方法。Liskamp<sup>[9]</sup> 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分子上, 制备出多功能肽类树状大分子, 并完成了小鼠体内竞争实验。

肽类树状大分子和传统树枝状分子的合成策略相同, 也可分为发散法、收敛法、发散-收敛法 (图2)。

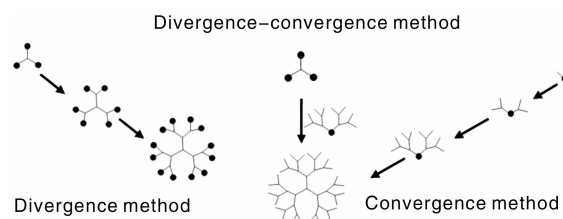


图2 传统树枝状分子的合成方法

Fig. 2 Three traditional approaches for the preparation of dendrimers

发散法是指从中心核开始, 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分子。Kantchev<sup>[10]</sup> 等用固相发散法, 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分子 (图3)。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状大分子的合成。

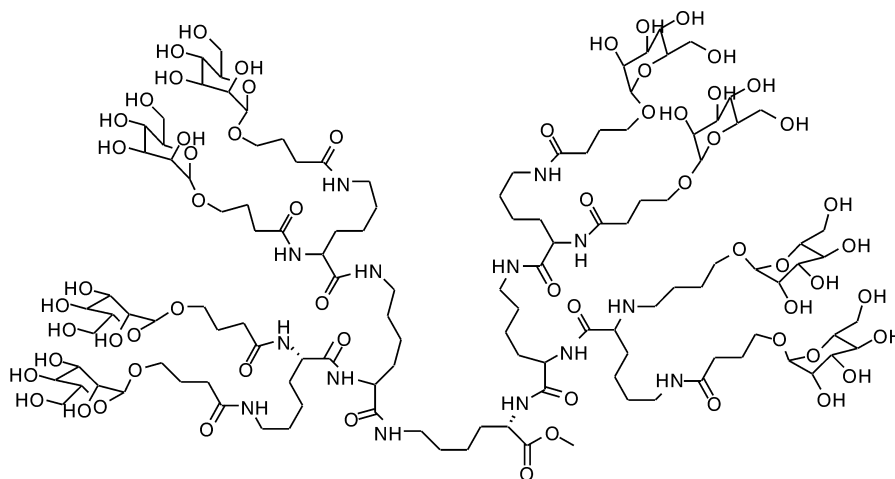


图3 甘露糖修饰的糖肽树枝状分子

Fig. 3 Peptide dendrimers bearing mannose ligands at the surface

采用收敛法合成肽类树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

树枝状分子十分有利。Sasaki<sup>[11]</sup>等用此法合成了亚铁血红素蛋白(图4)。用收敛法合成肽类树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。

肽类树状大分子合成过程中,有时也采用发散-收敛法。先用发散法制得低代数的肽类树状大分子,称为超核,再用收敛法制得高代数的扇形结构肽类树状大分子(Dendron),然后将其接到超核上。Vinogradov<sup>[12]</sup>等就利用了这种方法,先合成以谷氨酸为骨架的第二代产物(Glu<sup>2</sup>OEt),再将第二代产物直接通过收敛法与卟啉衍生物缩合得H<sub>2</sub>P-Glu<sup>2</sup>OH,最后再通过发散法得到目标产物。

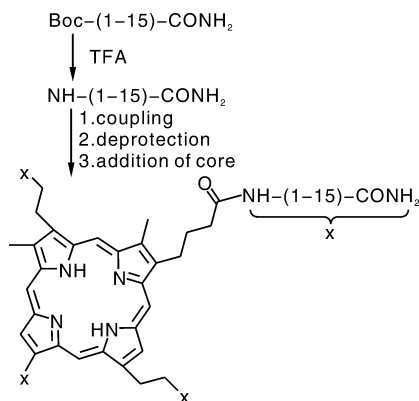


图4 收敛法合成亚铁血红素蛋白

Fig. 4 Synthesis of hemeprotein dendrimer by convergent approach

### 3 肽类树状分子自组装

当前,通过合成制备的树状分子的粒径小于10 nm,还不能满足其生物医用需要。自组装在新型功能材料的构筑中已显示出巨大的潜力,树状分子通过修饰后,可自组装成不同粒径的纳米粒子,可望为其应用带来较大突破<sup>[13-14]</sup>。基于肽类树状大分子双亲性嵌段共聚物自组装构建的胶束与传统的线形双亲性嵌段共聚物自组装形成的高分子胶束相比,不仅具有更高的稳定性,而且其外围具有更多可供修饰的官能团。Xu等<sup>[15]</sup>以三代聚谷氨酸肽类树状大分子(G3-Glu)为大分子引发剂,引发N-羧基-L-苯丙氨酸-环内酸酐(NCA-Phe)的开环聚合反应,制备聚谷氨酸树枝状分子-聚苯丙氨酸嵌段共聚物。嵌段共聚物通过自组装形成以聚苯丙氨酸为核,聚谷氨酸树枝状分子为壳的胶束(如图5)。抗肿瘤药物阿霉素负载到高分子胶束中,研究了其药物释放性能及体外抗肿瘤效果。结果表明,共聚物胶束具有良好的生物

相容性。载药胶束具有药物缓释效果,药物持续释放时间可达60 h。同时对肝癌细胞HepG2具有很好的杀灭效果。

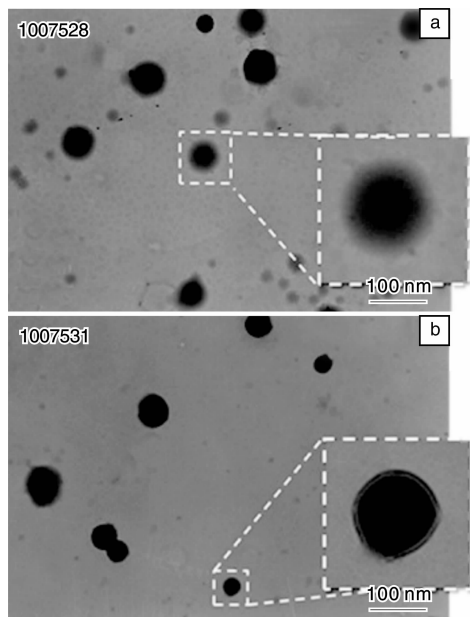


图5 空白(a)和载药胶束(b)的TEM照片

Fig. 5 TEM of micelle (a) and drug loaded micelle (b)

目前,单个的肽类树状大分子作为基因载体,已经有了较多研究,但将分散的肽类树状分子组装成一个规整有序的纳米结构并考察它的作为基因传递系统的研究还十分少。针对这一系列的研究现状,Xu等<sup>[16]</sup>将协同自组装的理念应用到了肽类树状大分子的制备上,利用肽类树状大分子和线型多肽自组装成类病毒的纳米结构(图6)。利用氢键,这一“可滑动的”弱键巧妙地克服了一个化学上的矛盾:化学键的刚性,使第二阶段的自组装成为了现实。通过SEM,AFM,TEM等形态学表征方式深入地研究了最终产物的纳米结构,发现其纳米结构规则有序,尺寸200 nm左右,并通过改变肽类树状大分子和线型多肽的质量比例研究了成型规律,说明可以通过改变浓度比例来改变最终产物的形态。利用这种纳米颗粒进行了基因传递的研究,发现其入核效果良好,且毒性较小,很有希望成为一种新型的生物材料。

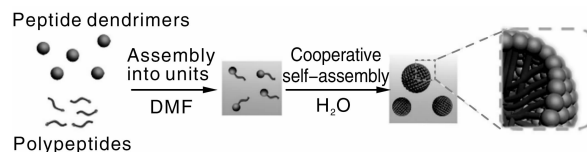


图6 赖氨酸树状大分子与线性聚亮氨酸的系统自组装过程

Fig. 6 Schematic illustration of the cooperative self-assembly of poly(L-lysine) dendrimers and linear poly(L-leucine) into hierarchical peptidesomes

## 4 肽类树状大分子在疾病诊断中的应用

### 4.1 肽类树状大分子在 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<sup>[17]</sup>。然而, 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。Fu<sup>[18]</sup>等人利用树枝状分子具有的精确结构, 可控的分子量和外围官能团数量, 以 PEG (Poly-

ethylene Glycol) (3400), PEG (6000), PEG (12000) 作为核, 赖氨酸为支化单元合成了不同代数 (G3 ~ G5) 的哑铃状肽类树状大分子, 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 7 所示, 外围用碘比醇修饰的赖氨酸树枝状分子的碘含量达到 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), 良好的水溶性, 在高压灭菌条件下稳定等性能。低剂量的 PEG (12000)-G4 CT 造影剂经静脉注射小鼠体内后, 在 32 min 时, 仍可在其肝脏部分观察到较强的信号, 表明此类肽类树状大分子可用于肝脏 CT 造影, 具有一定的价值。

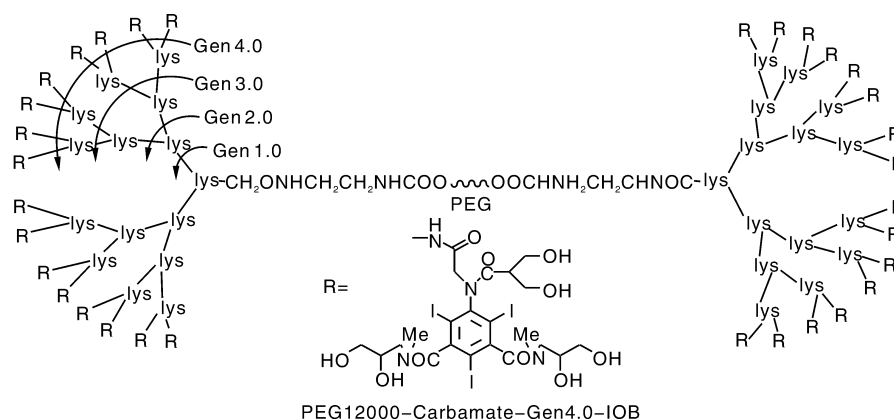


图 7 以 PEG 为核的赖氨酸树枝状分子 CT 分子探针

Fig. 7 PEG-core dendrimer with multiple triiodophthalamide moieties as macromolecular contrast agents for computed tomography (CT)

### 4.2 肽类树状大分子在核磁共振成像 (MRI) 中的应用

目前广泛使用的 MRI 分子探针主要有 2 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。目前用于临床的  $Gd^{3+}$  类 MRI 分子探针均为小分子钆螯合物 (图 8)。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。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。

Lu<sup>[19]</sup>等人以 POSS (Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane) 为核, 赖氨酸为支化单元合成了 G1-G3 的纳米球状 MRI 分子探针 (图 9), 发现其造影对比强度随分子探针的代数增加而增强, 可以通过肾脏滤过排成体外, 并且发现 G3 分子探针的大小略小于肾滤过的阈值, 所以在血管和肿瘤造影对比度增强。

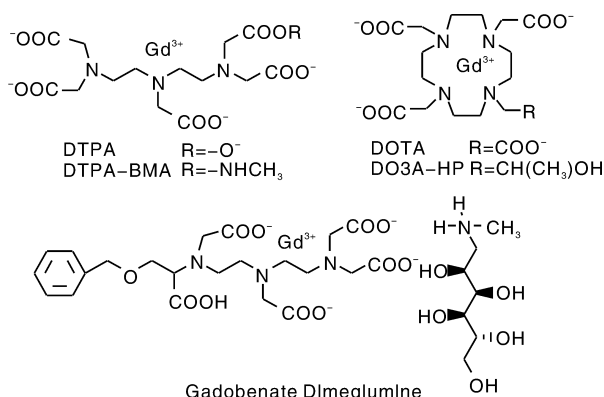


图 8 目前临床所用的几种  $Gd^{3+}$  MRI 分子探针

Fig. 8 Structures of gadolinium chelates used in clinical applications

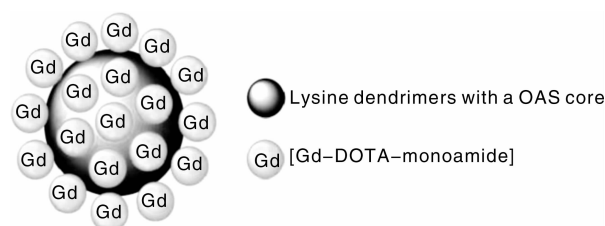


图 9 G3 纳米球状 MRI 显影剂

Fig. 9 Generation 3 Nanoglobule MRI Contrast Agent

Luo 等<sup>[20]</sup>以赖氨酸为原料,制备了一系列肾靶向,表面功能团含 Gd(III) 的复合物(Gd-DTPA/Gd-DOTA)的,可控的,单一分子量的肽类树状大分子显影剂。

Luo 首先合成外围含不同氨基保护基的第三代肽类树状大分子。该系列树枝状分子的外围氨基保护基 Boc 基团与 Cbz 基团的比例分别为 24:0, 18:12, 12:12 和 18:6。该系列树状分子围氨基保护基团经选择性脱保护后,与 DTPA 的衍生物偶联,再次选择性脱保护,对树状聚体外围的氨基进行其它官能团修饰,如与丁二酸酐、环氧丙醇以及不同链长的 m-PEG 等反应达到树状 MRI 分子探针的多功能修饰(如图 10)。体外水相弛豫效率测试发现含 m-PEG 链段的 MRI 分子探针表现最好,最高弛豫率( $r_1$ )为  $39.2 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,达到临床试剂的 10 倍。MTT 实验结果表明所有的 MRI 分子探针在使用的剂量下无细胞毒性。小鼠体内肾脏磁共振增强扫描显示, m-PEG (2 kDa) 修饰的肽类树状 MRI 分子探针表现出了可观的相对增强强度。小鼠体内切片以及血液实验结果显示, m-PEG 修饰的造影剂在肝、肾脏组织均具有较高的  $\text{Gd}^{3+}$  含量,其在血液中表现更佳,即使在注射 60 min 后, m-PEG 修饰的造影剂在血液中仍达到  $37.7 \mu\text{g Gd}^{3+}/\text{g}$  组织。研究同时发现, m-PEG 修饰的造影剂在血液中的含量随时间的增长而降低,在满足造影

剂在体内血液长循环外的同时,可被排除体外,预示着良好的造影效能和低毒性。

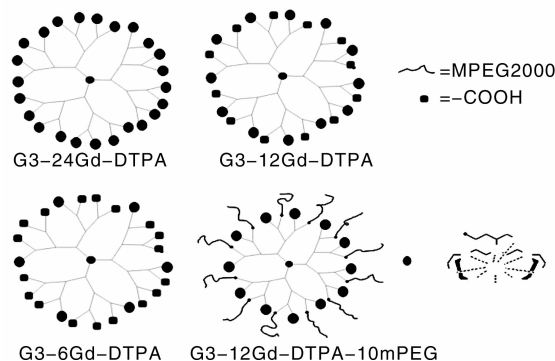


图 10 含不同官能团的肽类树枝状 MRI 分子探针结构式

Fig. 10 The structures for gadolinium-based peptide dendrimers

目前肽类树状大分子作为靶向 MRI 分子探针的系统研究甚少。Luo 等<sup>[21-22]</sup>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、不同代数的肽类树状大分子(G2-G4),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分子上,得到了新型肽类树状大分子的 MRI 分子探针(图 11)。细胞试验及动物体内 MRI 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

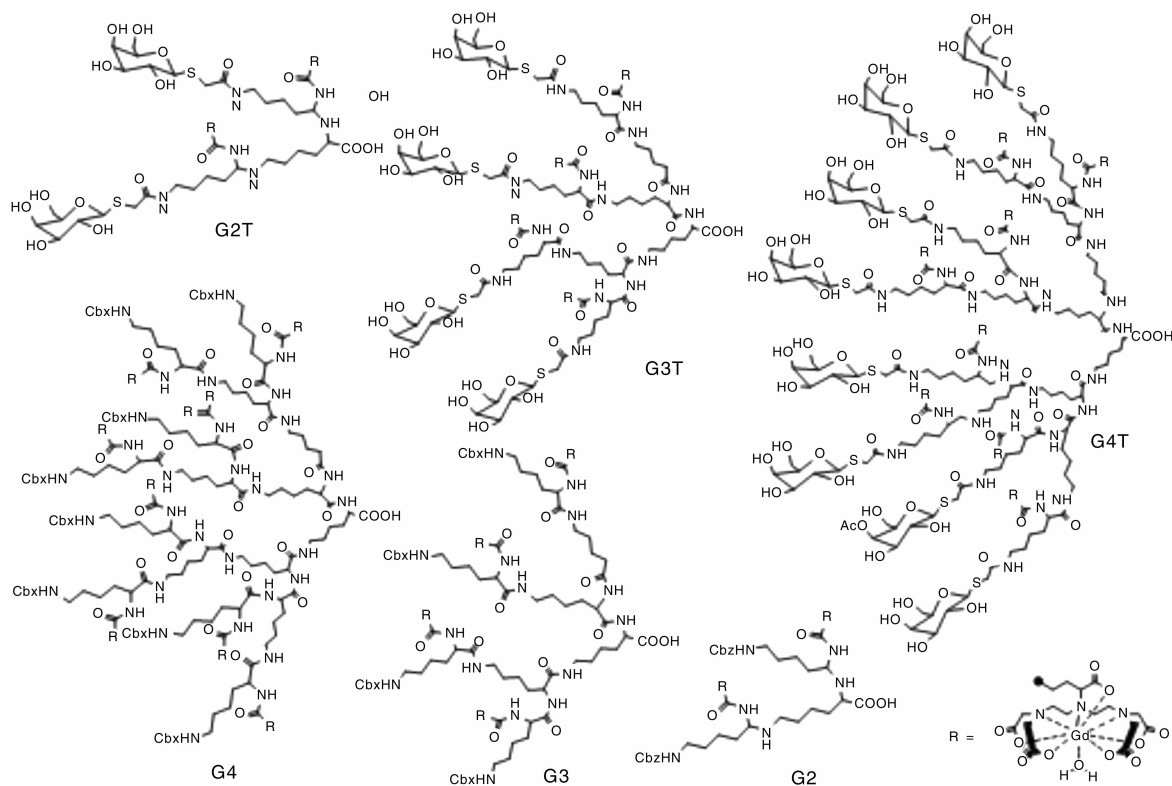


图 11 含有靶向和无靶向基团的 G2-G4 Gd(III) 肽类树状大分子探针的结构式

Fig. 11 The molecular structures of different generation peptide Gd(III)-based dendrimers (G2T, G3T, G4T, G2, G3 and G4)

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低毒性。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 12)。含半乳糖基团的肽类树状大分子的 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。

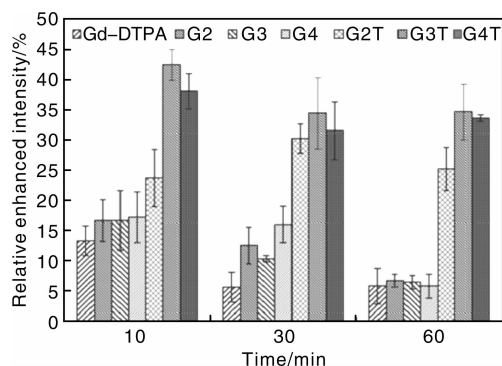


图 12 靶向、非靶向肽类树枝状 MRI 分子探针和小分子 DTPA-Gd 在小鼠体内成像的相对信号增强强度

Fig. 12 Relative enhanced signal intensity (SI) of liver at different time points after injection of non-targeting dendron-Gd, targeting dendron-Gd and DTPA-Gd

研究发现 Gd (III) 类的 MRI 显影剂的毒副作用可以引起病人肾功能受损, 为此 Lu 等<sup>[23]</sup> 在其研究的基础上设计合成了一类 Mn (II) 球状肽类树状大分子显影剂, G2, G3, G4 Mn (II)-DOTA。Mn (II) 有相对高的电子自旋和快的水交换率, Mn (II) 也是细胞的组成成分, 是细胞内某些酶和受体的辅助因子。他们又将一种靶向肽-CLT1 偶联到 G3 球形肽类树枝状分子上得到具有靶向功能的 P-G3-Mn 分子探针<sup>[24]</sup>。动物实验表明, 这类 Mn (II) 螯合物在体内稳定, 在肝脏和心脏没有非特异性的增强。具有靶向肽 CLT1 的分子探针 P-G3-Mn 在相对低的剂量下比没有靶向的 G3-Mn 分子探针在肿瘤部位有明显的造影增强效果 (如图 13)。

## 5 肽类树状大分子在疾病治疗中的应用

### 5.1 肽类树状大分子作为药物载体

肽类树状大分子不仅具有类蛋白的球状结构, 良

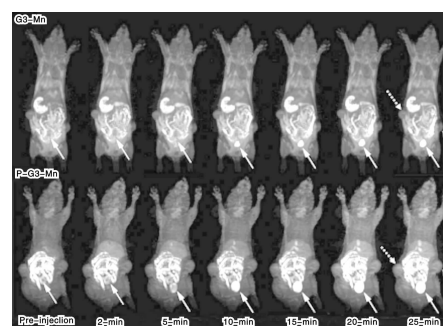


图 13 G3-Mn、P-G3-Mn MRI 分子探针在小鼠体内成像

Fig. 13 A tumor bearing mouse injected with G3-Mn and P-G3-Mn nanoglobular MRI contrast agent

好的水溶性和生物相容性等特点, 而且还具有 EPR 效应。肽类树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, 因此, 具有很强的吸引力。

肽类树状大分子作为药物载体与药物结合的方式可分为 2 类: 一是非共价键合, 药物通过物理作用包裹在肽类树状大分子中, 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。

#### 5.1.1 肽类树状大分子与药物非共价键合

Crespo<sup>[25]</sup> 等合成了具有顺式 4-氨基-L-脯氨酸 (Amp) 支化单元的肽类树状大分子。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, 聚脯氨酸呈右螺旋链结构 (PPI); 在水溶液中, 聚脯氨酸呈左螺旋链结构 (PPII)。基于这种特性, 以聚脯氨酸构建的肽类树状大分子, 有望成为一种功能性药物载体。Agrawal<sup>[26]</sup> 报道了以 PEG-1000 为核, 赖氨酸为支化单元的肽类树状大分子 G3, G4, 外围用半乳糖功能化, 用这 4 种肽类树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状大分子对药物具有稳定持续释放的作用, 还能降低肽类树状大分子的溶血性。这说明在对肽类树状大分子进行某些功能化后可以得到更安全的药物载体。

#### 5.1.2 肽类树状大分子与药物共价键结合

肽类树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。

载有药物的肽类树状大分子在体内需要长的循环时间,才能使其达到病变部位取得治疗效果,但同时也要避免由于长时期积累而产生的毒性。Okuda 等<sup>[27]</sup>发现 PEG 修饰的赖氨酸树枝状分子(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 化的赖氨酸肽类树状大分子具有被动靶向的功能。Porter 等<sup>[28]</sup>研究了赖氨酸树枝状分子,PEG 化的赖氨酸树枝状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<sup>[29]</sup>,他们又把 PEG 化的赖氨酸树枝状分子与抗肿瘤药物甲氨喋呤(MTX)通过共价键结合,进一步研究这种载药的树枝状分子在动物体内的分布代谢情况。Szoka 等人<sup>[30]</sup>也同时将抗肿瘤药物喜树碱和 PEG 偶联到赖氨酸肽类树状大分子上,其血液半衰期达到了( $30.9 \pm 8.8$ )h,在肿瘤部位的药量占注射总量的( $4.2 \pm 2.3$ )%,而自由喜树碱的血液半衰期只有 30 min,在肿瘤部分的药量只有注射总量的( $0.29 \pm 0.04$ )%,此结果进一步说明 PEG 化的赖氨酸树枝状分子具有长循环和被动靶向作用。

Porter 等人<sup>[31]</sup>合成了 PEG(1100)修饰的 G5 赖氨酸树枝状分子,通过 pH 敏感的脲键将抗癌药物偶联到肽类树状大分子上,实验表明 PEG 修饰的肽类树枝状分子比未用 PEG 修饰的能降低代谢的不稳定性,增加进入内皮网状系统器官。动物体内实验也表明 PEG(1100)修饰的 G5 赖氨酸树枝状分子其药物在肿瘤中的含量是肌肉中的 8 倍,是心脏中的 3 倍。说明这种 PEG 化的赖氨酸树枝状分子具有把药物传输到肿瘤中的靶向功能。Porter 等<sup>[32]</sup>又评价了 PEG 化的赖氨酸树枝状分子和 PEG 化的脂质体作为阿霉素的传递系统的药物代谢动力学、抗肿瘤活性和系统毒性。3 种形式的阿霉素都能抑制肿瘤的生长。同阿霉素相比,体内分布表明 PEG 化的赖氨酸树枝状分子和 PEG 化的脂质体都能增强阿霉素在肿瘤中的累积。但有关系统毒性的一些数据,如脾脏的重量、白细胞数目、体重和心脏毒性表明,PEG 化的赖氨酸树枝状分子比 PEG 化的脂质体在作为阿霉素的载体时具有更低的系统毒性。这些都说明 PEG 化的肽类树状大分子是一类很有前景的抗肿瘤药物载体材料。

为了提高药物达到病变细胞的总量,人们还将具有特异性的配体偶联到肽类树状大分子上。Yuan 等<sup>[33]</sup>设计合成了以 POSS 为核,谷氨酸为支化单元的 G3 肽类树状大分子上,将靶向分子生物素偶联到肽类树状大分子上,再通过具有 pH 敏感的脲键将抗癌药物阿霉素连

接到树枝状分子,得到既具有抗癌药物,又有靶向分子的 pH 敏感型的多功能药物传递系统,体外实验显示了良好的 pH 敏感性和好的抗肿瘤效果。细胞内吞实验也表明连接靶向分子的 G3-[DOX]-[biotin] 比未连接靶向分子的 G3-[DOX] 更加容易进入细胞(如图 14)也与 G3-[DOX]-[biotin] 有更高的杀灭肿瘤细胞的毒性实验相符合。表明通过靶向分子修饰的作为药物载体的肽类树状大分子可以提高药物的选择性,降低药物的使用剂量,增强药物的治疗效果。二硫键作为一种氧化还原敏感型键,也被广泛用于药物和基因传递系统。在一定浓度的谷胱甘肽(GSH)作用下,药物和树枝状分子间的二硫键会断裂,释放出药物。Lu 等<sup>[34]</sup>也已以 POSS 为核,赖氨酸为支化单元的 G3 肽类树状分子,将抗癌药物阿霉素通过二硫键连接到树枝状分子上面,再将含有多肽 c(RGDfK)的 PEG 偶联到树枝状分子上,得到 G3-[PEG-RGD]-[DOX] 这种多功能化的肽类树枝分子。G3-[PEG-RGD]-[DOX] 对肿瘤细胞 U87 的毒性比自由的 DOX 高。G3-[PEG-RGD]-[DOX] 与 siRNA 的复合物与其对照物 G3-[DOX] 相比,可以更好的进入 U87 细胞。

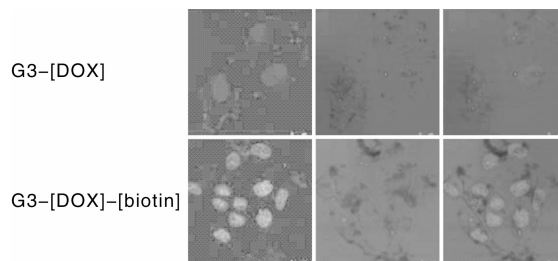


图 14 G3-[DOX] 和 G3-[DOX]-[biotin] 与 HeLa 细胞共培养 2 h 的激光共聚焦照片

Fig. 14 CLSM images of HeLa cells. The cells were incubated with G3-[DOX] and G3-[DOX]-[biotin] for 2 h

## 5.2 肽类树状大分子作为基因载体

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。

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)2 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,但由于临床试验中曾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。

近年来,基于肽类树状大分子基因载体的研究已取得了初步进展。Park 等<sup>[35]</sup>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状大分子。凝胶阻滞实验显示,当氮磷比为 1 时,树枝状分子即可与 DNA 质粒复合,并自组装成为 50 ~ 150 nm 纳米的颗粒。Niidome<sup>[36]</sup>等以己二胺为核,通过液相发散法合成了第六代赖氨酸树枝状分子。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状大分子。研究结果表明,末端为赖氨酸或精氨酸的肽类树状大分子与 DNA 质粒的复合能力相当。通过对 CHO 细胞、HeLa 细胞和 COS-7 细胞转染的比较发现,末端为精氨酸的肽类树状大分子的转染效率最高,末端为组氨酸的肽类树状大分子与 DNA 的复合能力较低,但在酸性环境中能与 DNA 形成复合体。Park<sup>[37]</sup>和 Luo<sup>[38]</sup>等人同样发现树枝状分子外围经精氨酸修饰后其转染效率大为提高。

Luo 等<sup>[39]</sup>合成了不同代数的肽类树状分子(G3, G4 和 G5)。以苯丙氨酸为原料合成了含咪唑环的化合物,并将其偶联到肽类树状分子上,到得新型的,外围含多个正电荷的,咪唑鎓盐的肽类树状分子(G3Im)。凝胶阻滞实验显示所有的树状聚体都能与 DNA 形成稳定的复合物,能防止 pDNA 被核酸酶催化降解。尤其是代数较高的第四、五代。外围为单一氨基的第三代树状聚体

几乎不表现转染基因的性能,第四代表现出较弱的转染效率。随着代数的增高,第五代树状分子介导的基因的转染率比金标准的非病毒载体 PEI (Poly (Ethylenimine)) 还高,且不受血清的影响。外围用咪唑鎓盐修饰的第三代树状分子表现出了与外围是氨基的第四代分子相当,甚至更好的转染效率。Luo 等<sup>[38]</sup>同时发现,随着代数的增加,虽然转染效率大幅提高,但细胞毒性显著增加,当肽类树状分子的分子量为两万时,可表现最佳转染效率和细胞毒性。

Lu 等人<sup>[40]</sup>用多支化的 POSS 为核合成了 G1-G4 的赖氨酸球形树枝状分子。基因转染实验表明这种球形的肽类树状大分子在低的 N/P (氮磷比) 条件下能有效地将质粒 DNA 运输到 MDA-MB-231 细胞。当前联合治疗作为一种新的癌症治疗方法,利用不同的治疗方法的协同作用来有效地治疗癌症。Lu 等<sup>[40]</sup>在其工作基础上合成了一系列的以硅氧烷立方体为核的 G3 赖氨酸肽类树状分子,将抗癌药物阿霉素通过二硫键连接到树枝状分子上,再将含有多肽 c(RGDfK) 的 PEG 偶联到树枝状分子上,得到 G3-[PEG-RGD]-[DOX] (图 15)。G3-[PEG-RGD]-[DOX] 对肿瘤细胞 U87 的毒性比自由的 DOX 高。激光共聚焦实验表明,当 G3-[PEG-RGD]-[DOX] 与 siRNA 复合后,可以很好地进入 U87 细胞。体外转染实验表明 G3-[PEG-RGD]-[DOX] 与 siRNA 的复合物与其对照组 G3-[PEG-RGD] 和 G3-[DOX] 相比,可以更有效地沉默 U87-Luc (持续表达荧光素酶的 U87) 细胞的荧光素酶的表达。这种纳米球形肽类树状分子可作为一种很有前景的核酸和化疗药物的双载体系统。

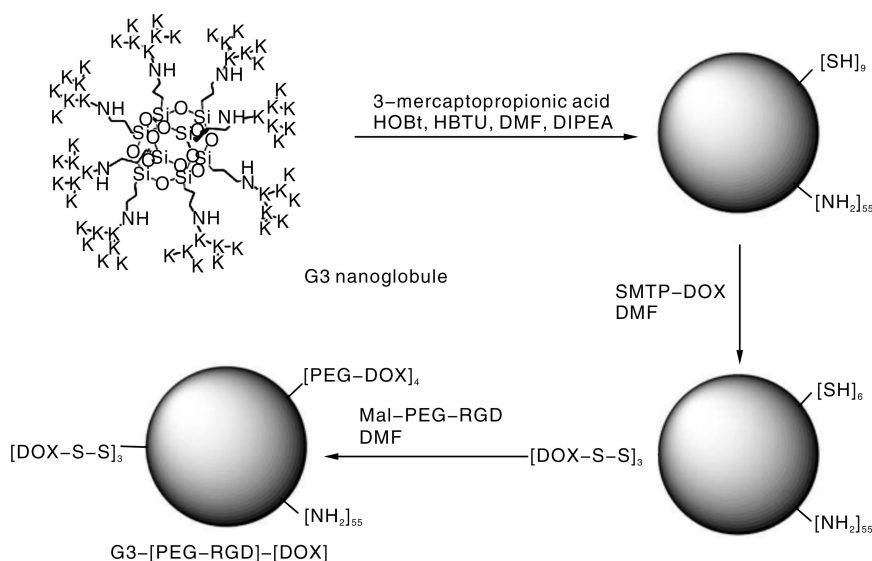


图 15 G3-[PEG-RGD]-[DOX] 的合成步骤

Fig. 15 Synthetic procedure of RGD targeted nanoglobular doxorubicin conjugate G3-[PEG-RGD]-[DOX]



## 6 结 语

由于肽类树状大分子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,肽类树状大分子的临床应用,在极大程度上还依赖于可控制备、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状大分子面临的挑战。肽类树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<sup>[39]</sup>。肽类树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——肽类树状大分子对其生物学响应的影响至关重要,肽类树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,应该着重发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。对于以肽类树状大分子为载体的治疗系统来说,研究重点主要集中在适合于靶向和/或智能型药物控释/传递系统,同时兼具长循环特性和环境响应性等多功能的药物控释/传递系统。肽类树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,推动肽类树状大分子的研究及其在生物医学领域中的应用。作为一个崭新的研究领域,肽类树状大分子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。

## 参考文献 References

- [1] Bosman A W, Janssen H M, Meijer E W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications[J]. *Chem Rev*, 1999(99): 1 665 – 1 688.
- [2] Kinberger G A, Cai W, Goodman M. Collagen Mimetic Dendrimers[J]. *J Am Chem Soc*, 2002(124): 15 162 – 15 163.
- [3] Zeng F, Zimmerman S C. Dendrimers in Supramolecular Chemistry: from Molecular Recognition to Self-Assembly[J]. *Chem Rev*, 1997(97): 1 681 – 1 712.
- [4] Laia C, Gloria S, Miquel P, et al. Peptide and Amide Bond-Containing Dendrimers[J]. *Chem Rev*, 2005(105): 1 663 – 1 681.
- [5] Merrifield R B. Solid Phase Peptide Synthesis I. the Synthesis of a Tetrapeptide[J]. *J Am Chem Soc*, 1963(85): 2 149 – 2 154.
- [6] Laia C, Glòria S, Beatriz M, et al. Peptide Dendrimers Based on Polyproline Helices[J]. *J Am Chem Soc*, 2002(124): 8 876 – 8 883.
- [7] Denkwalter R G, Kole J, Lukasavage W J. *Macromolecular Highly Branched Homogeneous Compound Based on Lysine Units*: USA, USP 1981 – 4289872[P]. 1981.
- [8] Mio O, Tatsuya O, Akihiro W, et al. In Vitro Gene Transfection Using Dendritic Poly (l-lysine) [J]. *Biconjugate Chem*, 2002(13): 510 – 517.
- [9] Cheng B Y, Otto C B, Monique de V, et al. Versatile Conjugation of Octreotide to Dendrimers by Cycloaddition “Click Chemistry” to Yield High-Affinity Multivalent Cyclic Peptide Dendrimers [J]. *Biconjugate Chem*, 2009(20): 1 323 – 1 331.
- [10] Eric A B, Kantchev, Chang C C, Chang D K. Direct Fmoc/tert-Bu Solid Phase Synthesis of Octamannosyl Polylysine Dendrimer-Peptide Conjugates[J]. *Biopolymers*, 2006(84): 232 – 240.
- [11] Tomikazu S, Emil T Ka. Helichrome: Synthesis and Enzymic Activity of a Designed Hemeprotein[J]. *J Am Chem Soc*, 1989(111): 380 – 381.
- [12] Olga F, Alexander G, Vladimir R, et al. Porphyrin and Tetra-benzoporphyrin Dendrimers: Tunable Membrane-Impermeable Fluorescent pH Nanosensors[J]. *J Am Chem Soc*, 2003(125): 4 882 – 4 893.
- [13] Perumal OP, Inapagolla R, et al. The Effect of Surface Functionality on Cellular Trafficking of Dendrimers [J]. *Biomaterials*, 2008(29): 3 469 – 3 476.
- [14] Criscione J, Le B, Stern E, et al. Selfassembly of pH-Responsive Fluorinated Dendrimer-Based Particulates for Drug Delivery and Noninvasive Imaging[J]. *Biomaterials*, 2009(30): 3 946 – 3 955.
- [15] Xu Xianghui(徐翔晖), Li Caixia(李彩侠), Li Haiping(李海平), et al. 肽类树状大分子: 自组装胶束及药物释放研究[J]. *Science in China(中国科学)*, 2011(41): 359 – 367.
- [16] Xu X H, Yuan H, Chang J, et al. Cooperative Hierarchical Self-Assembly of Peptide Dendrimers and Linear Polypeptides into Nanoarchitectures Mimicking Viral Capsids[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2012(51): 3 130 – 3 133.
- [17] Alexei A B J. Ralph W, Thomas J B. Long-Circulating Blood Pool Imaging Agents [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 1995(16): 335 – 348.
- [18] Fu Y J, Danute E N, David M, et al. Dendritic Iodinated Contrast Agents with PEG-Cores for CT Imaging: Synthesis and Pre-

- liminary Characterization[J]. *Bioconjugate Chem*, 2006(17): 1 043 – 1 056.
- [19] Kaneshiro T L, Jeong E K, Morrell G, *et al.* Synthesis and Evaluation of Globular Gd-DOTA-Monoamide Conjugates with Precisely Controlled Nanosizes for Magnetic Resonance Angiography[J]. *Biomacromolecules*, 2008(9): 2 742 – 2 748.
- [20] Luo K, Liu G, She W C, *et al.* Gadolinium-Labeled Peptide Dendrimers with Controlled Structures as Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents[J]. *Biomaterials*, 2011 (32): 7 951 – 7 960.
- [21] Luo K, Liu G, He B, *et al.* Multifunctional Gadolinium-Based Dendritic Macromolecules as Liver Targeting Imaging Probes[J]. *Biomaterials*, 2011(32): 2 575 – 2 585.
- [22] Luo K, Liu G, Zhang X W, *et al.* Functional L-Lysine Dendritic Macromolecules as Liver Imaging Probes[J]. *Macromol Biosci*, 2009(9): 1 227 – 1 236.
- [23] Tan M Q, Ye Z, Jeong E K, *et al.* Synthesis and Evaluation of Nanoglobular Macrocyclic Mn(II) Chelate Conjugates as Non-Gadolinium(III) MRI Contrast Agents[J]. *Bioconjugate chem*, 2011(22): 931 – 937.
- [24] Tan M Q, Wu X M, Jeong E K, *et al.* An Effective Targeted Nanoglobular Manganese(II) Chelate Conjugate for Magnetic Resonance Molecular Imaging of Tumor Extracellular Matrix[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2010(7): 936 – 943.
- [25] Laia C, Glòria S, Beatriz M, *et al.* Peptide Dendrimers Based on Polyproline Helices[J]. *J Am Chem Soc*, 2002 (124): 8 876 – 8 883.
- [26] Payal A, Umesh G, Jain N K. Glycoconjugated Peptide Dendrimers-Based Nanoparticulate System for the Delivery of Chloroquine Phosphate[J]. *Biomaterials*, 2007(28): 3 349 – 3 359.
- [27] Tatsuya O, Shigeru K, Naomi A, *et al.* PEGylated Lysine Dendrimers for Tumor-Selective Targeting after Intravenous Injection in Tumor-Bearing Mice[J]. *J Controll Release*, 2006 (116): 330 – 336.
- [28] Ben J B, Lisa M K, Peter K, *et al.* Cationic Poly-L-Lysine Dendrimers: Pharmacokinetics, Biodistribution, and Evidence for Metabolism and Bioresorption after Intravenous Administration to Rats[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2006(3): 614 – 627.
- [29] Lisa M K, Brian D K, Victoria M M, *et al.* Pharmacokinetics and Tumor Disposition of PEGylated, Methotrexate Conjugated Poly-L-Lysine Dendrimers [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2009, (6): 1 190 – 1 204.
- [30] Megan E F, Steve G, Jean M J F, *et al.* Synthesis and in Vivo Antitumor Efficacy of PEGylated Poly(L-Lysine) Dendrimer-Camptothecin Conjugates. *Mol Pharmaceutics*, 2009(6): 1 562 – 1 572.
- [31] Kaminskas L M, Kelly B D, McLeod V M, *et al.* Characterisation and Tumour Targeting of PEGylated Polylysine Dendrimers Bearing Doxorubicin via a pH Labile Linker[J]. *J Controll Release*, 2011 (152): 241 – 248.
- [32] Kaminskas L M, McLeod V M, Kelly B D, *et al.* Doxorubicin-Conjugated PEGylated Dendrimers Show Similar Tumoricidal Activity but Lower Systemic Toxicity when Compared to PEGylated Liposome and Solution Formulations in Mouse and Rat Tumor Models[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2012(9): 422 – 432.
- [33] Yuan H, Luo K, Lai Y S, *et al.* A Novel Poly(L-Glutamic Acid) Dendrimer Based Drug Delivery System with Both pH-Sensitive and Targeting Functions[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2010 (7): 953 – 962.
- [34] Kaneshiro T L, Lu Z R. Targeted Intracellular Codelivery of Chemotherapeutics and Nucleic Acid with a Well-Defined Dendrimer-Based Nanoglobular Carrier[J]. *Biomaterials*, 2009 (30): 5 660 – 5 666.
- [35] Choi J S, Joo D H, Kim C H, *et al.* 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]. *J Am Chem Soc*, 2000 (122): 474 – 480.
- [36] Okuda T, Sugiyama A, Niidome T, *et al.* Characters of Dendritic Poly(L-Lysine) Analogues with the Terminal Lysines Replaced with Arginines and Histidines as Gene Carriers in Vitro[J]. *Biomaterials*, 2004, (25): 537 – 544.
- [37] Kim T, Baek J, Cheng Z B, *et al.* Arginine-Conjugated Polypropylenimine Dendrimer as a Non-Toxic and Efficient Gene Delivery Carrier[J]. *Biomaterials*, 2007(28): 2 061 – 2 067.
- [38] Luo K, Li C X, Li I, *et al.* Arginine Functionalized Peptide Dendrimers as Potential Gene Delivery Vehicles[J]. *Biomaterials*, 2012, in press, 10.1016/j.biomaterials.2012.03.030.
- [39] Luo K, Li C X, Wang G, *et al.* Peptide Dendrimers as Efficient and Biocompatible Gene Delivery Vectors; Synthesis and in Vitro Characterization[J]. *J Controll Release*, 2011(155): 77 – 87.
- [40] Kaneshiro T L, Wang X L, Lu Z R. Synthesis, Characterization and Gene Delivery of Poly-L-Lysine Octa(3-Aminopropyl) Silsesquioxane Dendrimers: Nanoglobular Drug Carriers with Precisely Defined Molecular Architectures[J]. *Mol Pharmaceutics*, 2007 (4): 759 – 768.