

# МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ МОЛЕКУЛЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

Н.Г. Яббаров<sup>1</sup>, Г.А. Посыпанова<sup>2</sup>, кандидат химических наук,  
Е.А. Воронцов<sup>2</sup>, кандидат химических наук

<sup>1</sup>Центр «Биоинженерия» РАН;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

E-mail: marvint@inbox.ru

Дендримеры – это рутинно синтезируемые полимеры со строго регулируемыми физическими и химическими параметрами. Дендримеры обладают уникальными свойствами, такими как радиальная симметрия молекул с высокоупорядоченной, гомогенной, монодисперсной структурой и древоподобным ветвлением высокой степени, имеющих размеры от 1,1 нм и строго фиксированную молекулярную массу. Это делает их применение многообещающим в нанобиотехнологии в качестве носителей – для направленного транспорта (активного или пассивного) различных биологически активных молекул. Введение термина «дендример» способствовало усилению интереса к такого рода наноструктурам: сначала лишь с точки зрения синтеза, а позднее – также применения, развития их практического и коммерческого использования в нанобиотехнологии. Значительное число публикаций посвящено методам синтеза различных видов дендримеров и их поведению в тех или иных физико-химических условиях, позволяющих предсказать свойства дендримеров в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Такие фундаментальные знания в сочетании с практическими методами ковалентного и нековалентного присоединения биологически активных лигандов к молекулам дендримеров делают эти соединения потенциально мощным, перспективным, безопасным и селективным средством для контролируемой доставки лекарственных препаратов. При этом с помощью дендримеров, благодаря их структуре и свойствам, можно изменять биодоступность, стабильность, скорость высвобождения переносимых лекарственных препаратов, что может позволить снизить системную токсичность и достигнуть желаемого терапевтического эффекта при пониженных дозах применяемого препарата. Для препаратов на основе дендримеров неоднократно продемонстрированы более высокая эффективность, изменение фармакокинетики, пониженная токсичность и избирательность транспорта по сравнению с исходными лекарственными формами. В данном обзоре обсуждаются современное состояние и перспективы применения дендримеров в нанобиотехнологии, противоопухолевой терапии с подробным обсуждением полиамидамин-дендримеров.

**Ключевые слова:** дендримеры, направленная доставка, биосовместимость, модификация поверхности, эндоцитоз, инкапсуляция препарата, ковалентное конъюгирование

## APPLICATION PROSPECTS OF MULTIFUNCTIONAL DENDRITIC MOLECULES IN MEDICINE AND BIOLOGY

N.G. Yabbarov<sup>1</sup>, G.A. Posypanova<sup>2</sup>, E.A. Vorontsov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Russian Academy of Sciences Centre Bioengineering,

<sup>2</sup>National Research Center «Kurchatov Institute»

Dendrimers are routinely synthesized as tuneable nanostructures that may be designed and regulated as a function of their size, shape, surface chemistry and interior void space. Dendrimers are hyperbranched polymers with unique physical and chemical properties. They have the radial symmetry of molecules with highly ordered, homogeneous, monodisperse branched tree-like structure. Their size and molecular weight are strictly fixed. Due to these properties dendrimers can be used as carrying agents for active or passive drugs targeting in nanobiotechnology. The term «dendrimer» was introduced in the second half of the twentieth century. Afterwards the interest in these polymer types has increased dramatically, at first – as interest in solving the synthesis problem, at second – as the question of practical and commercial dendrimers applications in biomedicine and biotechnology. A significant number of articles devoted to the synthesis methods of different types of dendrimers and their behavior in various physical and chemical conditions. Based on these data we could predict the properties of dendrimers in *in vivo* and *in vitro* experiments. These fundamental scientific advances combined with practical methods of bioactive molecules covalently conjugation and non-covalent encapsulate them as guest molecules into dendrimers void spaces, provide a highly versatile and potentially extremely powerful technological platform for drug delivery. Dendrimer as a drug delivery agent is a promising, safe and selective drug delivery option. It has highly selective nature for targeting the desired tissue is the most essential property and holds a promising future for the treatment of several disorders. Dendrimers help in achieving increased bioavailability, sustained, controlled as well as targeted release of drug. There is reduction in the amount of drug and systemic toxicity while the therapeutic efficacy increases. This approach as a drug delivery system certainly promises a reliable, safe, selective and precise method of drug delivery. Higher efficiency, changes in pharmacokinetics, reduced toxicity and targeted delivery have been shown for drugs conjugated or incorporated in dendrimers in comparison with the original drug forms more than once. The current and future prospects for the nanoparticles and conjugates based on dendrimers in nanobiotechnology and anticancer therapy application are discussed in this review.

**Key words:** dendrimers, targeted delivery, biocompatibility, surface modification, endocytosis, drug encapsulation, covalent conjugation.

## ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное развитие химии полимеров во второй половине XX века позволило создавать композиции с новой архитектурой и уникальными физико-химическими свойствами. Исходя из строения, синтетические полимеры можно подразделить на 3 группы: линейные, кросс-линкерные и разветвленные (рис. 1). Самый простой состав у линейных полимеров, в которых все мономерные звенья образуют единственную длинную цепь. Обычно такие полимеры являются легко растворимыми и термопластичными. Молекулы кросс-линкерных полимеров также состоят из длинных цепей, но, в отличие от линейных, эти цепи связаны между собой ковалентными связями. Благодаря такому строению полимеры плохо растворимы и термореактивны. Промежуточные по строению между линейными и кросс-линкерными – разветвленные полимеры, состоящие из главных цепей, от которых отходят более короткие второстепенные полимерные цепи. Родственные этому классу полимеров – дендримеры обладают очень высокой степенью ветвления.

В последние годы дендримерам уделяется особое внимание. Благодаря уникальному строению и свойствам эти полимеры находят широкое применение в различных областях химии, биологии и медицины.

## СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ДЕНДРИМЕРОВ

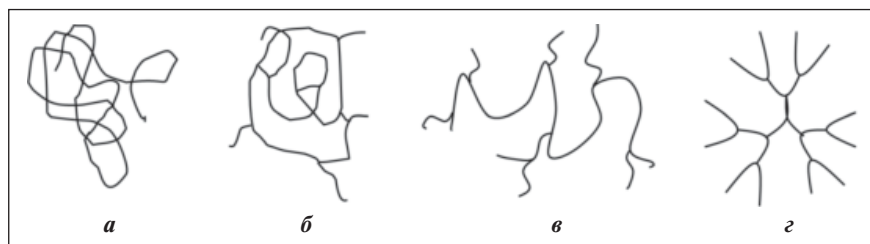
Чаще всего дендример представляет собой разветвленную сферическую симметричную или несимметричную макромолекулу (рис. 2) [16]. Количество тер-

минальных ветвей находится в прямой зависимости от поколения молекулы дендримера, например, 2-е поколение полиамидамин (РАМАМ)-дендримеров содержит 16 терминальных первичных аминогрупп, 3-е поколение – 32, 4-е – 64; 2-е поколение полипропиленимин (РРІ)-дендримеров содержит 8 таких аминогрупп, 3-е – 16 и т.д.

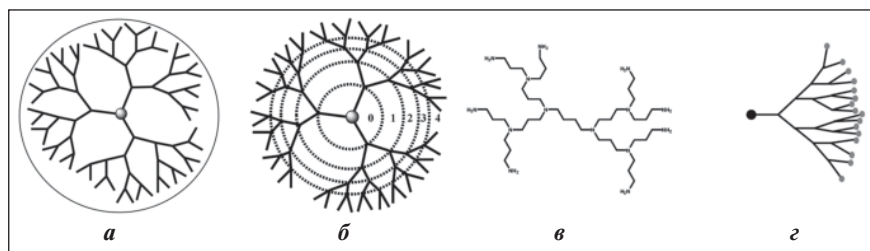
Первые сообщения о синтезе полимеров с дендритной структурой были опубликованы в 70–80-х годах прошлого века группами ученых под руководством F. Vogtle и D. Tomalia [38, 40]. Синтезированные дендримеры отличались от обычных линейных полимеров строго контролируемой структурой, определенной молекулярной массой, монодисперсностью, биосовместимостью, а также возможностью контроля их биоразложения. Указанные свойства достигаются за счет пошаговой стратегии синтеза, в котором в качестве структурных компонентов используются небольшие органические молекулы, при этом каждый последующий шаг влияет на молекулярную массу, размер, плотность, полярность и растворимость [41]. Дендримеры обладают древовидно-ветвящейся структурой и состоят из таких четко различимых компонентов, как ядро (центр молекулы), отдельных ветвей и концевых химических групп.

При синтезе дендримеров применяются 2 подхода: дивергентный и конвергентный (рис. 3). Суть дивергентного метода состоит в том, что сначала синтезируют отдельные ветви, которые затем конденсируются в одну молекулу. Впервые о таком методе синтеза сообщили D. Tomalia и соавт. в начале 80-х, применившие его для синтеза РАМАМ-дендримеров. Позже, в 1990 г. С. Hawker и соавт. предложили конвергентный способ синтеза дендримеров, когда на инициаторной молекуле последовательно конденсируются небольшие молекулы, ветвящиеся по направлению к поверхности (при дивергентном методе синтез начинается с поверхностных групп).

Благодаря своему необычному строению дендримеры обладают рядом отличительных физических свойств. Они имеют внутренние полости, которые хорошо выражены у дендримеров старших поколений (G4-G10), в отличие от младших (G0-G3) [41]. Они также обладают сферической формой и в зависимости от условий (концентрации солей и pH) могут увеличивать или снижать свою плотность [42]. Вязкость РАМАМ-дендримеров зависит не от размера молекулы (как это характерно для



**Рис. 1.** Схематическое строение 4 групп синтетических полимеров: линейного (а), кросс-линкерного (б), разветвленного (в), дендритного (г)



**Рис. 2.** Строение дендритных полимеров: а – общая схема строения симметричных дендритных полимеров; б – схематическое представление дендримеров различных поколений (от 1-го до 4-го); в – строение коммерчески доступного полипропиленимин (РРІ)-дендримера 3-го поколения (generation 3 или G3) (описание – ниже); г – схема строения асимметричных дендритных полимеров

линейных полимеров), а главным образом от конформационного состояния молекулы и плотности ее упаковки, даже для старших поколений [3].

В дендритных полимерах благодаря их древовидной архитектуре количество терминальных групп может быть очень высоким. Степень ионизации этих групп в водных растворах зависит от pH, в результате чего дендримеры при определенных условиях могут образовывать интерполиэлектролитные комплексы с противоположно заряженными молекулами. Это позволяет использовать дендримеры в качестве молекулярных наноконтейнеров для доставки лекарственных препаратов (ЛП) и генетических конструкций в клетки [9].

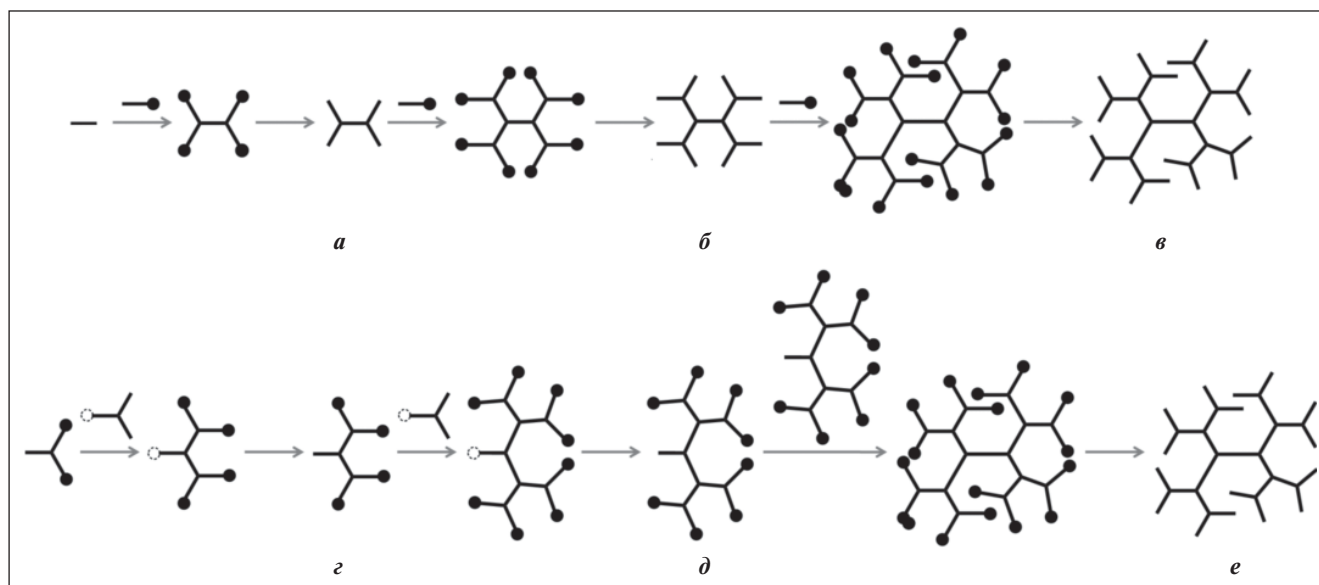
На данный момент в биомедицинских исследованиях широко применяются симметричные (см. рис. 2, а) и асимметричные (рис. 2, г) дендритные молекулы, преимущественно РАМАМ- и РРІ-дендримеры (рис. 2, в) [20]. РАМАМ-дендримеры имеют симметричное строение, которое обусловлено конденсацией мономеров на терминальных первичных аминогруппах предшествующего поколения, которые после этого становятся третичными. РАМАМ-дендримеры характеризуются регулярным древовидным ветвлением с радиальной симметрией. Плотная звездобразная топология достигается упорядоченной сборкой органических мономеров в концентрические дендритные ряды вокруг ядра.

РАМАМ-дендримеры – один из наиболее изученных на сегодняшний день классов. Их размеры в зависимости от поколения колеблются от 1,1 нм (для G1) до 12,4 нм (для G10) [37, 41]. РАМАМ-дендримеры обладают хорошей растворимостью в полярных растворителях. Наличие относительно неполярных внутренних полостей в сочетании с полярной гидрофильной

поверхностью (рис. 4) позволяет включать в эти полости гидрофобные ЛП, тем самым повышая их растворимость и стабильность в водных растворах [13]. Помимо этого, присутствие на поверхности дендримеров большого количества функциональных групп (NH<sub>2</sub>-, COOH- и OH-), предоставляет широкие возможности для таких модификаций, как ковалентное конъюгирование с ЛП или изменение биологических свойств путем введения тех или иных группировок [7, 9, 12]. Поскольку терминальных функциональных групп очень много (от 8 NH<sub>2</sub>-групп для РАМАМ-дендримеров 1-го поколения, до 512 – у 7-го поколения), к одной молекуле дендримера можно присоединить значительное количество молекул ЛП или других биологически активных соединений. РАМАМ-дендримеры не иммуногенны [38] и способны проникать через гематоэнцефалический барьер [18]. Благодаря таким свойствам, дендримеры являются хорошей альтернативой традиционным полимерам в качестве биосовместимых систем доставки ЛП [14, 28, 29].

### БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕНДРИМЕРОВ

Одним из главных условий, которым должны удовлетворять создаваемые на основе дендримеров препараты, – это отсутствие неспецифической токсичности, которую проявляют многие полимеры. Для ее снижения при синтезе дендримеров можно использовать природные биологические материалы, такие как углеводы [33], аминокислоты, пептиды, нуклеиновые кислоты и липиды [1], которые в целом считаются безопасными и биосовместимыми. Кроме того, некоторые виды дендримеров на основе синтетических материалов (в частности, РАМАМ-дендримеры с 1-го по 5-е поколение) оказались малотоксичными.

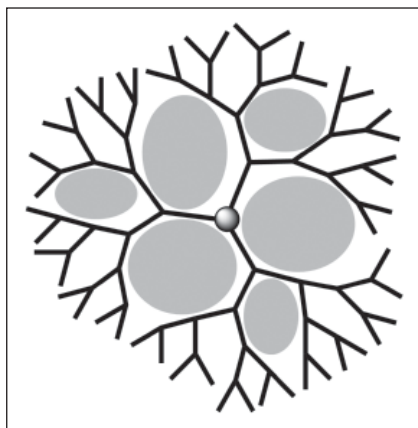


**Рис. 3.** Схемы конвергентного (а–в) и дивергентного (г–е) синтеза дендримеров. Последовательность поколений, увеличивающихся при каждом цикле синтеза: а, г – 1-е поколение, б, д – 2-е, в, е – 3-е; 1-е – защищенные, 2-е поколение – неактивные химические группы

Считается, что основную роль в проявлении токсичности играют не столько природа вещества, сколько размер и структура молекулы. Так, высокомолекулярные дендримеры, построенные на основе аминокислот, могут проявлять высокую токсичность за счет общего заряда молекулы [32]. Кроме того, подобные молекулы потенциально иммуногенны, так как напоминают по строению белки. Хотя использование дендримеров начальных поколений (1–3-е) более безопасно, для увеличения полезной нагрузки препарата, введения векторных молекул и модификации комплексов чаще используют дендримеры старших (5–7-е) поколений, содержащие большое количество активных групп на поверхности. Для снижения токсичности можно модифицировать поверхностные активные группы дендримеров либо использовать биосовместимые материалы для создания схожих с РАММ-дендримерами структур.

#### ДЕНДРИМЕРЫ КАК УНИВЕРСАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛП

В работах последних лет доказано, что свойства дендримеров позволяют изменять характер фармакокинетики препарата путем его инкапсулирования внутрь, а также ковалентной или нековалентной сорбции препарата непосредственно на поверхности молекулы дендримера [6, 27]. Инкапсулируя низкомолекулярные соединения в дендримеры, можно добиться повышения растворимости этих соединений и стабильности при физиологических условиях. С другой стороны, для ковалентного связывания препарата с поверхностью дендримеров можно использовать множество различных линкеров, которые позволят контролировать высвобождение ЛП. И в том, и в другом случае фармакокинетика препарата сильно меняется. В такие комплексы, помимо препарата, за счет большого количества терминальных химических групп можно вводить векторные молекулы, флуоресцентные метки, магнитно-контрастные вещества для обеспечения дополнительных функций. Это делает



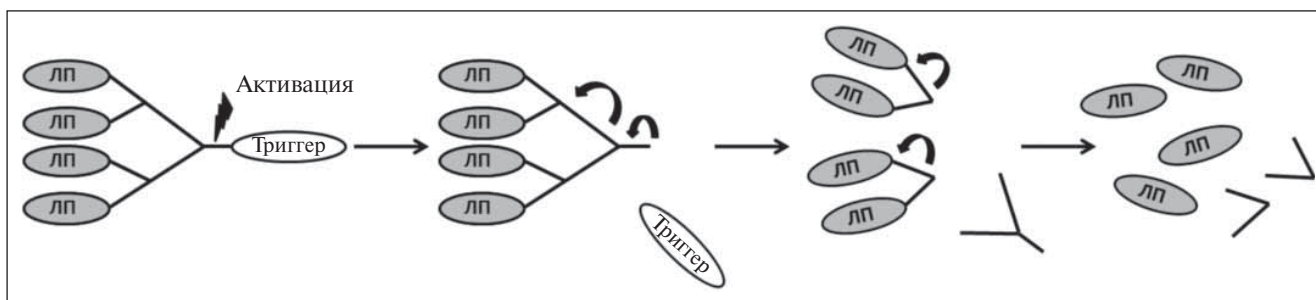
**Рис. 4.** Схематическое изображение внутренних полостей дендримера

дендримеры универсальными переносчиками, которые могут быть использованы для решения широкого круга задач. К тому же путем введения в молекулу дендримера полярных лигандов (таких как белки, пептиды, ЛП с полярными группами)

можно повысить общую гидрофильность комплекса; однако, в некоторых случаях это может привести к повышению иммуногенности комплекса [38].

В то же время, несмотря на очевидные преимущества дендримеров по сравнению с традиционными полимерами, полностью не выяснено, как проявляют себя дендримеры при различных способах введения в организм. Множество работ посвящено пероральному введению комплексов ЛП с дендримерами. Благодаря биоадгезивным свойствам они обладают высоким сродством к слизистым оболочкам, а также хорошо преодолевают кишечную мембрану. Было доказано, что инкапсуляцией ЛП в дендримеры можно добиться повышения их всасываемости и увеличения их стабильности в физиологических условиях. Однако уровень всасывания препарата зависит от свойств дендримера. Было показано, что всасывание дендримеров происходит преимущественно в тонкой кишке, после чего они попадают в лимфоидные ткани, почти не проникая в другие. Немаловажную роль играют также размеры и заряд молекулы дендримера. Так, РАММ-дендримеры 2, 5-го и 3, 5-го поколений, имея размеры <3 нм, (способны всасываться интра- и парацеллюлярным путем в тонкой кишке), всасывались хуже, чем РАММ-дендримеры 4-го поколения, которые подвергались специфическому и неспецифическому эндоцитозу. К тому же отрицательно заряженная плазматическая мембрана клеток лучше взаимодействует с катионными дендримерами (в отличие от анионных), обеспечивая высокое накопление таких дендримеров в тканях и более низкую скорость их транспорта. Это говорит о том, что процесс всасывания дендримеров во многом зависит от физико-химических свойств комплекса [45].

В отличие от перорального при внутривенном введении препаратов удается быстро доставить препарат к органу-мишени. При этом серьезной проблемой остается быстрое выведение ЛП почками. Так как дендримеры имеют относительно низкую молекулярную массу, они могут подвергаться фильтрации почками, и в дополнение к этому деградировать в печени и селезенке. Так, катионные РАММ-дендримеры 3, 5, 7-го и анионные 3, 5-го поколения при внутривенном введении мышам и крысам в дозе до 1,3 г на 1 кг массы тела очень быстро выводились почками (в течение 1 ч). Дендримеры на основе природных материалов (L-лизин и L-орнитин) выводились с такой же скоростью, при этом около 50% их абсорбировалось в печени и селезенке, не нарушая их функций. После конъюгирования тех же дендримеров (на основе L-лизина и L-орнитина) с полиэтиленгликолем время их циркуляции в кровяном русле увеличивалось до 24 ч, в то же время такие дендримеры не абсорбировались печенью и селезенкой [15, 45]. Эти результаты свидетельствуют о том, что на биораспределение дендримеров в большой степени влияют их размеры, состав, а также наличие различных поверхностных химических групп [19, 25].



**Рис. 5.** Схематическое изображение активации и разложения саморазрушающейся дендритной молекулы, конъюгированной с ЛП. После отщепления триггера специфической молекулой начинается цепная реакция, в результате которой высвобождается свободный препарат

### ОСОБЕННОСТИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛП ИЗ КОМПЛЕКСОВ И КОНЪЮГАТОВ С ДЕНДРИМЕРАМИ

Для проявления своей биологической активности инкапсулированный препарат должен высвободиться из комплекса или конъюгата с дендримером (релиз препарата).

Преимуществом систем доставки на основе дендримеров является медленное и постепенное высвобождение ЛП из состава комплекса. В то время как комплексы аналогичных препаратов с линейными полимерами (например, полимер молочной кислоты) характеризуются первоначальным скачкообразным релизом препарата с дальнейшим резким снижением скорости высвобождения, в комплексах препаратов с дендримерами релиз проходит постепенно, в линейной зависимости от времени инкубации, плавно снижаясь после высвобождения инкапсулированного препарата на 70–80%. Считается, что это связано с особенностями 3-мерной структуры дендримеров и воздействием на молекулу дендримера растворителя.

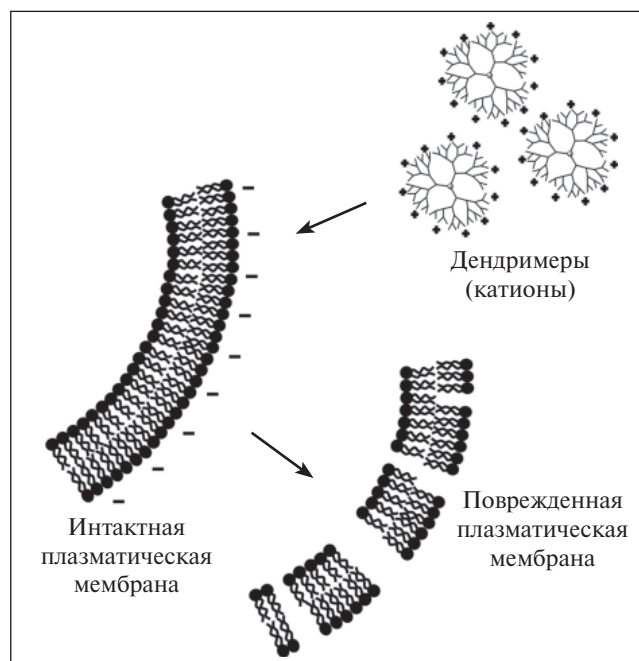
В настоящее время значительное внимание уделяется контролируемым системам высвобождения инкапсулированного препарата. Показано, что скорость высвобождения может варьировать в зависимости от плотности упаковки терминальных ветвей (чем выше поколение, тем плотнее расположены терминальные группы, что затрудняет релиз препарата) и от скорости гидролиза молекул дендримера в физиологических условиях.

Интересным направлением исследований является разработка дендримеров с саморазрушающейся структурой (рис. 5), что позволяет добиться полного высвобождения конъюгированного препарата. Для получения таких дендримеров при синтезе дендритных цепей в их состав вводили молекулы камптотецина и доксорубина. Разложение конъюгата индуцировали с помощью каталитических антител, что приводило к быстрому высвобождению ЛП. В эксперименте было продемонстрировано резкое увеличение цитотоксичности комплекса после его активации антителами. На данный момент описанные дендримеры проходят испытания *in vivo* [38].

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕНДРИМЕРОВ С КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ

Для успешного применения дендримеров в качестве переносчиков биологически-активных соединений в клетки-мишени необходимо понимание механизмов взаимодействия дендримеров с клеточной мембраной. Данные механизмы подробно описаны I. Majoros и S. Hong и соавт. [22, 36].

Широко применяемые для создания конъюгатов и других конструкций РАМАМ- и РР1-дендримеры взаимодействуют с липидным бислоем (рис. 6). Такое взаимодействие обеспечивается за счет положительного заряда терминальных аминогрупп с кислотными и спиртовыми группами амфифильных липидов и возникновению нековалентных комплексов. Это взаимодействие приводит к образованию пор в липидной мембране клетки, размер которых зависит от величины положительного заряда поверхности и,



**Рис. 6.** Схематическое изображение взаимодействия дендримеров, несущих терминальные катионные химические группы с плазматической мембраной клетки.

следовательно, поколения дендримера. Показано, что, как и другие катионные полимеры, дендримеры, содержащие терминальные аминогруппы, образуя такие поры, оказывают неспецифическое токсическое воздействие, которое особенно характерно для РАМAM-дендримеров 5–7-го поколения, образующих поры от 5 до 40 нм. При этом РАМAM-дендримеры ранних поколений (1–3-е) указанными свойствами не обладают.

Механизм поступления дендримеров в клетки во многом определяется зарядом поверхностных групп. РАМAM-дендримеры, содержащие анионные группы, интернализируются путем кавеолинзависимого эндоцитоза, в то время как интернализация нейтральных и катионных дендримеров происходит посредством клатрин- кавеолин-независимого эндоцитоза [31].

Образование пор и, следовательно, неспецифический токсический эффект могут быть снижены путем модификации части аминогрупп, к примеру, переводом их в ацетамидные группы. Но, с другой стороны, в случае искусственной трансфекции клеток образование таких пор в клеточной мембране необходимо для успешного переноса генетического материала. Таким образом, благодаря модификации поверхностных групп дендримеров можно контролировать их свойства в зависимости от конкретной области приложения.

#### **ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ ТКАНИ**

Опухолевая ткань имеет значительные отличия от здоровой. К ним относятся гипervasкуляризация, ограниченный лимфодренаж, а также формирование сосудов с неплотными контактами между клетками (размер пор 400–800 нм), что особенно характерно для роста и развития солидных опухолей [37]. Проникнув в капиллярную сеть опухоли, ЛП сохраняются в ней довольно продолжительное время благодаря низкой скорости тока крови и плохому дренажу лимфатической системы (рис. 7).

Описанные выше свойства опухолевой ткани часто используются при пассивной доставке наночастиц и липосом [10, 30]. Действие таких препаратов напрямую зависит от размеров частиц и от физико-химических свойств полимера. Уровень поглощения таких частиц может снижаться за счет того, что распределение синтезируемых наночастиц и липосом по размерам обычно характеризуется широким размахом. В отличие от этого размеры дендримеров варьируют в очень узких диапазонах, а наличие большого количества терминальных химических групп предоставляет широкие возможности для модификации. Это может повысить терапевтический эффект и свойства композиций для пассивного транспорта, который часто используется, особенно в диагностических целях.

#### **НЕКОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ЛП С ДЕНДРИМЕРАМИ**

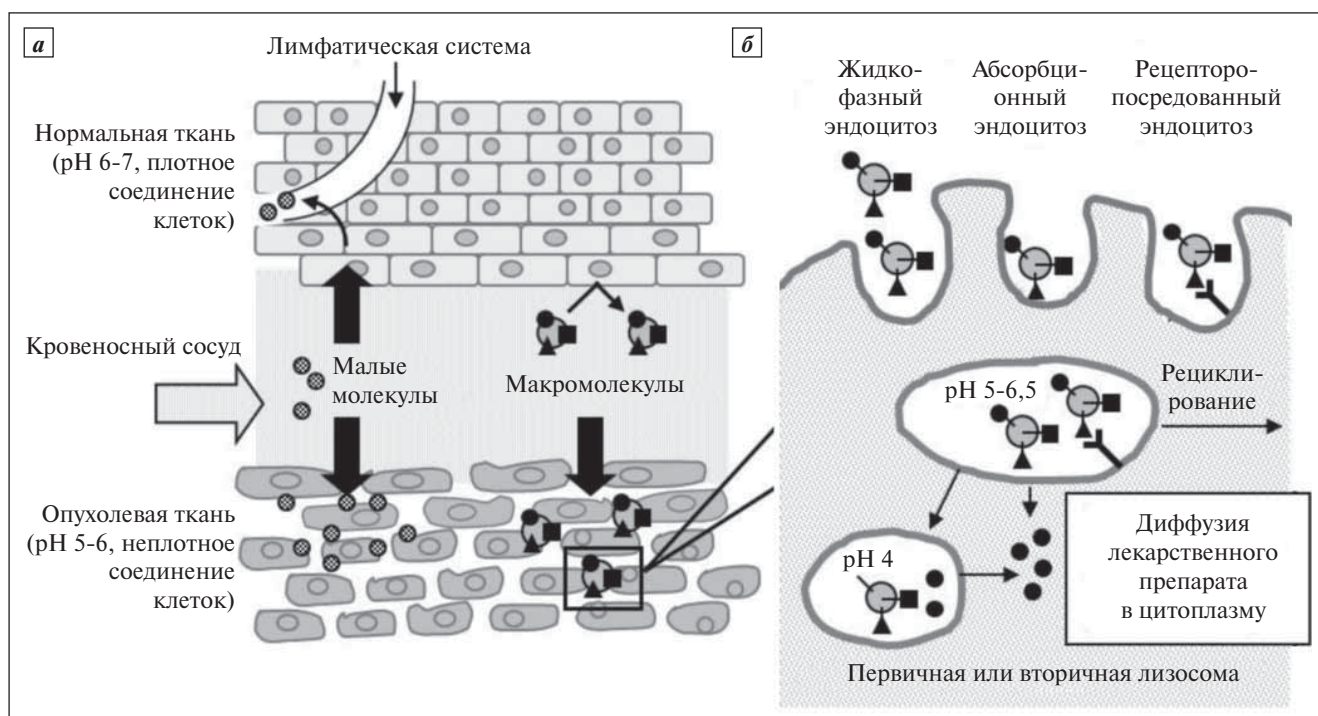
Как уже указывалось, дендримеры имеют внутренние полости, отграниченные от внешней среды, куда физически могут быть помещены другие молекулы. Инкапсуляция молекул может быть повышена также за счет образования водородных связей, ионных и гидрофобных взаимодействий. Показана возможность инкапсуляции таких ЛП, как доцетаксел, паклитаксел, диклофенак, 5-фторурацил. Инкапсуляция препаратов приводила к пролонгации действия, увеличению растворимости и повышению стабильности в физиологических условиях вследствие постепенного высвобождения препарата из молекулы дендримера. Таким образом, инкапсуляция в дендримеры может эффективно использоваться для транспортировки в клетки низкомолекулярных соединений.

#### **КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ЛП С ДЕНДРИМЕРАМИ**

В многочисленных публикациях описано успешное применение в качестве носителей различных видов полимеров. Однако ряд свойств линейных полимеров (такие как полидисперсность, низкая полезная нагрузка препарата) осложняют их применение в качестве носителей — в отличие от дендримеров. Благодаря описанным выше свойствам дендримеров значительно расширяются возможности синтеза конъюгатов как с низкомолекулярными соединениями (такими как флюоресцентные и радиоактивные метки, олигонуклеотиды, олигосахариды и пептиды), так и высокомолекулярными (например, с антителами) [2, 5, 17, 23, 24, 26, 43, 44]. При ковалентном связывании необходимо учитывать не только особенности конъюгируемого препарата, но и задачи, которые должен выполнять полученный конъюгат. Если целью являются доставка и высвобождение ЛП в целевых клетках, то связь между ним и дендримером должна быть достаточно лабильной. В качестве векторов для конъюгирования с дендримерами часто используют антитела и опухолеспецифические белки. При этом неоднократно показаны специфическое связывание и направленный транспорт конъюгатов дендримеров с флюоресцентными и радиоактивными метками, содержащих векторы (например, антитела к антигенам на поверхности целевых клеток).

#### **НАПРАВЛЕННЫЙ ТРАНСПОРТ КОНЪЮГАТОВ И КОМПЛЕКСОВ ДЕНДРИМЕРОВ С ЛП ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ В ИХ СОСТАВ ВЕКТОРНЫХ МОЛЕКУЛ**

Присутствие различных активных групп на поверхности дендримера позволяет вводить ряд векторных молекул в зависимости от целевых рецепторов или антигенов, представленных на поверхности клетки-мишени. Показано, что при взаимодействии комплекса, содержащего векторную молекулу, с целевой мишенью дендример способен варьировать свою



**Рис. 7.** Схемы механизмов проникновения ЛП из кровяного русла: а – в опухолевые ткани; б – в клетки опухоли

структуру, изменяя при этом конформацию внутренних полостей, что теоретически может способствовать высвобождению включенного препарата [35].

В зависимости от типа клеток-мишеней, при конструировании лекарственных комплексов нужно отталкиваться от присутствия специфических лигандов на поверхности клеток. Несмотря на широкий спектр таких лигандов, чаще всего в качестве векторов используют остатки фолиевой кислоты либо трансферрин, либо моноклональные антитела к поверхностным антигенам клеток-мишеней.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Рецептор фолиевой кислоты присутствует на мембранах клеток широкого спектра опухолей, таких как карциномы легких, яичника, молочной железы, некоторые виды глиом и т. д. Поэтому фолиевая кислота – привлекательный объект для использования в качестве вектора. Эта небольшая молекула хорошо растворима в воде, не обладает иммуногенностью и имеет высокое сродство к своему рецептору. Фолиевую кислоту используют для доставки в клетки-мишени антител, антисмысловых олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков и пептидов, радиоактивных и контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ). После связывания с рецептором такой комплекс проникает в клетку посредством рецепторопосредованного эндоцитоза. Аналогичные системы доставки созданы с использованием дендримеров в качестве носителей для транспорта нуклеиновых кислот, нуклеотидов, а также противоопухолевых препаратов в целевые клетки.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Из векторных молекул, которые можно использовать для адресной доставки ЛП, самыми специфическими векторами, пожалуй, можно назвать моноклональные антитела, которые могут распознавать и связываться с опухолеспецифическими антигенами. Такие антитела использовали для доставки дендримеров, ковалентно конъюгированных с молекулами противоопухолевых препаратов, цитокинов, контрастных, радиоактивных и флуоресцентных меток [38]. С одной стороны, такой подход оправдывает себя при визуализации или фотодинамической терапии, когда не требуется интернализации препарата клеткой-мишенью. С другой стороны, при противоопухолевой терапии необходим высокий уровень проникновения противоопухолевого препарата внутрь клетки (исключение составляют активация апоптотических мембранных рецепторов TNF и Fas), который не всегда может обеспечиваться антителами. В некоторых случаях для преодоления множественной лекарственной устойчивости конъюгат должен быть поглощен клеткой-мишенью, избежав диффузии ЛП через плазматическую мембрану клетки, из которой он может быть удален MDR (multiple drug resistance)-насосом. Поэтому для преодоления множественной лекарственной устойчивости необходимо использовать те векторы (фолиевая кислота, опухолеспецифические белки), которые после контакта с рецептором на поверхности клетки-мишени подвергаются рецепторопосредованному эндоцитозу и вместе с ЛП интернализуются клетками, попадая затем в эндосомы.

## ПРИМЕНЕНИЕ ДЕНДРИМЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ

Использование векторных молекул для доставки дендримеров, несущих различные агенты, представляет собой потенциально мощную платформу для использования в диагностических целях. Для исследования их биораспределения, связывания с поверхностью целевых клеток, поглощения и внутриклеточной локализации применяют комплексы, в состав которых входят определенные маркеры. В качестве таких маркеров используют флуоресцентные метки и радиоактивные изотопы  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{125}\text{I}$  [4, 38]. Такой подход на сегодняшний день более развит для использования в МРТ. Сейчас проходят испытания много таких комплексов, но чтобы ввести их в клиническую практику, необходимо подтвердить их безопасность и эффективность.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕНДРИМЕРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ В КЛЕТКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Помимо транспортировки низкомолекулярных препаратов, дендримеры также активно используют для доставки в клетки нуклеиновых кислот, в том числе для трансфекции клеток *in vitro* и генной терапии. По сравнению с природными полиаминами, полилизин или липосомами дендримеры значительно лучше взаимодействуют с ДНК. РАМАМ-дендримеры образуют комплексы с ДНК путем электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновых кислот и протонированными (положительно заряженными) первичными аминогруппами на поверхности дендримера, что приводит к образованию комплекса, называемого «дендриплексом» (рис. 8). Характер комплекса зависит не только от стехиометрии и концентрации фосфатов ДНК и аминов дендримера, но и от свойств растворителя (таких как pH, концентрация солей, буферная емкость), и даже от динамики смешивания [8]. РАМАМ-дендримеры связывают ДНК со стехиометрическим соотношением первич-

ных аминов и фосфатов 1:1 [39], но это соотношение дендримеров и ДНК не обязательно является идеальным: как и в других полимерных системах, более стабильные и эффективные комплексы, как правило, формируются только при более высоких соотношениях полимер/ДНК. С каждым увеличением поколения дендримеров удваивается число поверхностных аминогрупп, способных связываться с ДНК; таким образом, с увеличением поколения связывание дендримера с ДНК также увеличивается. Благодаря способности дендримеров старших поколений (G5–G7) формировать поры в плазматической мембране, дендримеры транспортируют ДНК непосредственно в цитоплазму и далее в ядро клетки, избегая эндосом. Хотя эффективность трансфекции с использованием дендримеров варьирует в зависимости от линии клеток, тем не менее, она достаточно высока и на 3 порядка превышает эффективность линейных полимеров [11].

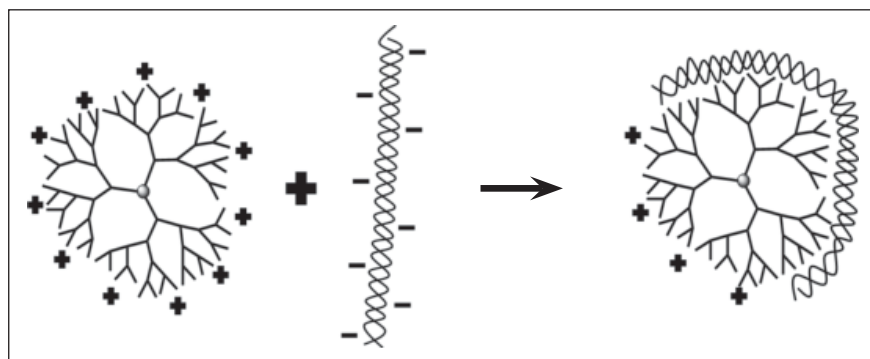
Дендримеры успешно используют не только для транспорта в клетки плазмид, но и для трансфекции антисмысловыми олигонуклеотидами [46]. При этом эффективность поглощения клетками тиофосфатных олигонуклеотидов возрастает в 50 раз и более. Однако несмотря на высокий потенциал подобных систем доставки и то, что трансфицирующие агенты на основе дендримеров достаточно широко используются молекулярными и клеточными биологами, проблема их терапевтического применения пока не решена.

## ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ

Как известно, получение антител к низкомолекулярным соединениям сопровождается их предварительным конъюгированием с высокомолекулярными соединениями — например, белками. В последнее время появились попытки использовать вместо белков дендримеры, которые в немодифицированном виде не вызывают иммунного ответа. Были получены антитела к ВИЧ-специфическим антигенам, пенициллину и некоторым специфическим олигосахаридам [34]. Эти результаты могут быть использованы при создании диагностических систем для определения ряда вирусов, аллергенов и даже для получения терапевтических антител.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Слияние нанотехнологии и медицины, которое мы сегодня наблюдаем, позволяет развиваться новым технологиям, о существовании и применении которых ранее не задумывались. Одним из таких новшеств являются дендримеры — уникальные полимерные структуры, находящие применение в раз-



**Рис. 8.** Формирование нековалентного комплекса между положительно заряженными терминальными химическими группами дендримера и отрицательно заряженной молекулой ДНК



личных областях науки благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам.

На сегодняшний день исследовательские коллективы добились значительного прогресса в диагностике и лечении рака, используя разнообразные полимерные носители, в том числе и дендримеры. Общая задача таких комплексов состоит в том, чтобы, не затрачивая ни одну из множества типов здоровых тканей

организма, избирательно доставить ЛП в опухолевую ткань и обеспечить реализацию токсического противоопухолевого эффекта. И какими бы преимуществами не обладали дендримеры как носители, это всего лишь носители, на основе которых, однако, может быть сконструирован сложный комплекс, обладающий минимальными побочными действиями и оказывающий направленное воздействие.

## ЛИТЕРАТУРА

- Al-Jamal K., Sakthivel T., Florence A. Dendrimers: Vesicular structures derived from a cationic lipidic dendron // *J. Pharm. Sci.* – 2005; 94 (1): 102–13.
- Arima H., Yamashita S., Mori Y. et al. In vitro and in vivo gene delivery mediated by lactosylated dendrimer/ $\alpha$ -cyclodextrin conjugates (G2) into hepatocytes // *J. of Controlled Release.* – 2010; 146 (1): 106–17.
- Aulenta F., Hayes W., Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices // *Eur. Polym. J.* – 2003; 39 (9): 1741–71.
- Baffah S., Balaratnam S., Casas A. et al. Macromolecular delivery of 5-aminolævulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates // *Mol. Cancer Ther.* – 2007; 6 (3): 876–85.
- Chandrasekar D., Sistla R., Ahmad F. et al. 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 (3): 504–12.
- Cheng Y., Wang J., Rao T. et al. Pharmaceutical applications of dendrimers: promising nanocarriers for drug delivery // *Frontiers in Bioscience.* – 2008; 1 (13): 1447–71.
- Cheng Y., Xu Z., Ma M. et al. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration // *J. Pharm. Sci.* – 2008; 97 (1): 123–43.
- Dufes C., Uchegbu I., Schatzlein A. Dendrimers in gene delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2005; 57 (15): 2177–202.
- Emanuele A., Attwood D. Dendrimer-drug interactions // *Adv. Drug. Delivery Rev.* – 2005; 57 (15): 2147–62.
- Gaur U., Sahoo S., De T. et al. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system // *Int. J. Pharm.* – 2000; 202 (1–2): 1–10.
- Gebhart C., Kabanov A. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents // *J. Control. Release.* – 2001; 73 (2–3): 401–16.
- Gillies E., Frechet J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery // *Drug Discovery Today.* – 2005; 10 (1): 35–43.
- Gupta U., Agashe H., Asthana A. et al. Dendrimers: novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement // *Biomacromolecules.* – 2006; 7 (3): 649–58.
- Haba Y., Harada A., Takagishi T. et al. Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups // *Polymer.* – 2005; 46 (6): 1813–20.
- He H., Li Y., Jia X. et al. PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors // *Biomaterials.* – 2011; 32 (2): 478–87.
- Hua C., Peng S., Dong C. Synthesis and characterization of linear-dendron-like poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene oxide) copolymers via the combination of ring-opening polymerization and click chemistry // *Macromolecules.* – 2008; 41 (18): 6686–95.
- Inapagolla R., Guru R., Kurtoglu Y. et al. In vivo efficacy of dendrimer-methylprednisolone conjugate formulation for the treatment of lung inflammation // *Int. J. of Pharm.* – 2010; 399 (1–2): 140–7.
- Kannan S., Dai H., Raghavendra S. et al. Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model // *Sci. Transl. Med.* – 2012; 4 (130): 130–46.
- Kaul G., Amiji M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery // *Pharm. Res.* – 2002; 19 (7): 1061–7.
- Kim Y., Zimmerman S. Applications of dendrimers in bio-organic chemistry // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1998; 2 (6): 733–42.
- Kwon G., Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 1996; 21 (2): 107–16.
- Majoros I., Williams C., Becker A. et al. Surface interaction and behavior of poly(amidoamine) dendrimers: deformability and lipid bilayer disruption // *J. Comput. Theor. Nanosci.* – 2009; 6 (7): 1430–6.
- Mayorga C., Torres M., Perez-Inestrosa E. et al. Importance of dendrimer size in the hapten density in a conjugate for in vitro testing to determine IgE antibody in patients allergic to betalactams // *J. of Allergy and Clin. Immun.* – 2003; 111 (1): 334.
- Menjoge A., Kannan R., Tomalia D. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications // *Drug Discovery Today.* – 2010; 15 (5–6): 171–85.
- Michallet M., Maloisel F., Delain M. et al. Pegylated recombinant interferon alpha 2b vs recombinant interferon alpha n2b for the initial treatment of chronic phase chronic myelogenous leukemia: a phase III study // *Leukemia.* – 2004; 18 (2): 309–15.
- Mishra M., Kotta K., Hali M. et al. PAMAM dendrimer-azithromycin conjugate nanodevices for the treatment of Chlamydia trachomatis infections // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2011; 7 (6): 935–44.
- Monika W., Rainer H. A convergent approach to biocompatible polyglycerol «click» dendrons for the synthesis of modular core-shell architectures and their transport behavior // *Chemistry.* – 2008; 14 (30): 9202–14.
- Orive G., Hernandez R., Gascon A. et al. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy // *Cancer Therapy.* – 2005; 3: 131–8.
- Patri A., Majoros I., Baker J. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2002; 6 (4): 466–71.
- Peppas L., Blanchette J. Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2004; 56 (11): 1649–59.
- Perumal O., Inapagolla R., Kannan S. et al. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers // *Biomaterials.* – 2008; 29 (24–25): 3469–76.
- Pisal D., Yellepeddi K., Kumar A. et al. Permeability of surface-modified polyamidoamine (PAMAM) dendrimers across caco-2 cell monolayers // *Int. J. Pharm.* – 2008; 350 (1–2): 113–21.
- Rockendorf N., Lindhorst T. Glycodendrimers // *Top. Curr. Chem.* – 2001; 217: 201–38.
- Sanchez-Sancho F., Perez-Inestrosa E., Suau R. et al. Dendrimers as carrier protein mimetics for IgE antibody recognition. Synthesis and characterization of densely penicilloylated dendrimers // *Bioconjugate Chem.* – 2002; 13 (3): 647–53.
- Schluter A., Rabe J. Dendronized polymers: Synthesis, characterization, assembly at interfaces, and manipulation // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2000; 39 (5): 864–83.
- Seib F., Jones, A., Duncan R. Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells // *J. Controlled Release.* – 2007; 117 (3): 291–300.
- Svenson S., Tomalia D. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2005; 57 (15): 2106–29.
- Srinivasa-Gopalan S., Yarema K. Dendrimers in Cancer Treatment and Diagnosis // *Nanotechnologies for the Life Sciences.* – 2007; 7: 1–43.
- Tomalia D. Architecturally driven properties based on the dendritic state // *High Perform. Polym.* – 2001; 13 (2): 1–10.
- Tomalia D., Baker H., Dewald J. et al. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules // *Polym. J.* – 1985; 17 (1): 117–32.
- Tomalia D. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry // *Prog. Polym. Sci.* – 2005; 30 (3–4): 294–324.
- Welch P., Muthukumar M. Tuning the density profile of dendritic polyelectrolytes // *Macromolecules.* – 1998; 31 (17) 5892–7.
- Wu C., Brechbiel M., Kozak R. et al. Metal-chelate-dendrimer-antibody constructs for use in radioimmunotherapy and imaging // *Bioorg. & Med. Chemistry Letters.* – 1994; 4 (3): 449–54.
- Yanga W., Chenga Y., Xub T. et al. Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates // *Eur. J. of Med. Chem.* – 2009; 44 (2): 862–8.
- Yiyun C., Zhenhua X., Minglu M. et al. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration // *J. of Pharm. Sci.* – 2008; 97 (1): 123–43.
- Yoo H., Sazani P., Juliano R. PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides // *Pharm. Res.* – 1999; 16 (12) 1799–804.