

Dendrymery w naukach biomedycznych



prof. dr hab. ZOFIA URBAŃCZYK-LIPKOWSKA
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

Streszczenie:

Według wielu opinii, wielofunkcyjne makrocząsteczki o wymiarach nanometrycznych będą w przyszłości podstawą medycyny i w wielu przypadkach zastąpią obecnie stosowane leki. W artykule przedstawiono aktualny stan badań nad farmaceutycznymi zastosowaniami dendrymerów – nowej klasy polimerycznych cząsteczek o precyzyjnie zdefiniowanej strukturze.

Słowa kluczowe:

dendrymery, rozgałęzione cząsteczki, polifunkcyjne cząsteczki

Summary:

According to common opinion nanosize polyfunctional macromolecules will add new values to medical procedures of the future and in many cases will substitute today's medicines. Article presents actual state of research on pharmaceutical application of dendrimers – new class of polymeric compounds with precisely defined structure.

Keywords:

dendrimers, branched molecules, polyfunctional molecules

Dendrymery, czyli związki organiczne o strukturze rozgałęzionej są nową klasą polimerów, obecnie szeroko badaną pod kątem zastosowań biomedycznych. Dzięki opracowaniu nowych metod syntezy dendrymery, w przeciwieństwie do klasycznych polimerów, mają dobrze zdefiniowaną strukturę i są homogenne pod względem masy cząsteczkowej. Ich centrum stanowi na ogół mała cząsteczka organiczna zwana rdzeniem, która umożliwia przeprowadzenie dowolnych reakcji chemicznych jednocześnie na kilku centrach do powstania koncentrycznie umieszczonych gałęzi. Cechą szczególną tych cząsteczek jest ściśle określona liczba i rodzaj grup funkcyjnych, znajdujących się na obrzeżu dendrymeru oraz możliwość zaprojektowania wnętrza dendrymeru (charakter hydrofobowy, hydrofilowy, itp.). Taka polivalentna struktura determinuje najważniejsze zastosowanie dendrymerów jako nośników związanych kowalencyjnie lub supramolekularnie wielu układów farmakoforowych.

Przełomowe w tej dziedzinie były prace zespołów F. Vögtle [2], Hawker'a i Freche-

t'a [3,4] oraz przede wszystkim D.A. Tomalia (Dow Chemicals Company) nad syntezą pierwszych wysokocząsteczkowych dendrymerów poli(amidoaminowych) typu PAMAM, PPI i innych [5,6]. Tomalia zaproponował również używanie terminu „dendrymer” na określenie tej nowej grupy związków (z greckiego *dendros* – drzewo, *meros* – część). Prace te zaowocowały opracowaniem pierwszej iteracyjnej metody syntezy dendrymerów, nazywanej „metodą rozbieżną” (*divergent*), polegającej na dodawaniu kolejnych warstw – generacji dendrymeru do wielofunkcyjnego rdzenia. Głównym problemem pojawiającym się podczas syntezy dendrymerów jest zatłoczenie terminalnych grup funkcyjnych powodujące niereaktywność niektórych z nich oraz nagromadzenie cząsteczek o różnych defektach struktury i mniejszych, niż założona, masach. Zagadnienie to opracował od strony teoretycznej w 1982 roku Polak, M. Maciejewski [7] a później de Gennes [8]. Próba rozwiązania tego zagadnienia jest zaproponowana przez zespół Frechet'a alternatywna procedura zwana **syntezą zbieżną** (*convergent*). Polega ona na tym, że najpierw wykonuje się syntezę fragmentu gałęzi posiadającego tylko jedną grupę reaktywną (*dendron*), która reaguje z innymi, identycznie wykonanymi podjednostkami dendrymeru lub rdzeniem. Daje to lepszą kontrolę procesu i większą czystość produktu.

Uważa się, że dendrymery będą w przyszłości podstawą chemii nanoskopowej, pozwalającej na projektowanie i syntezę złożonych cząsteczek, które mogą zarówno kształtem jak i funkcją naśladować układy biologiczne, a co za tym idzie lepiej spełniać różnorodne cele farmakologiczne.

Poniżej przedstawiono kilka cech dendrymerów, szczególnie ważnych ze względu na możliwość ich zastosowania w farmacji:

Efekt dendrytyczny

Unikalna struktura dendrymerów o znacznym rozwinięciu powierzchni peryferyjnej, zwłaszcza przy wyższych generacjach, pozwala na umieszczenie

na nich wielu identycznych, aktywnych elementów, co umożliwia równoczesne oddziaływanie ligandów z wieloma centrami aktywnymi. Bardzo często obserwuje się gwałtowny, synergistyczny wzrost efektu działania, znacznie przewyższający zwykłe zsumowanie takiej samej ilości pojedynczych oddziaływań ligand-receptor (Rys.). Takie zjawisko określa się mianem *efektu dendrytycznego* (*klasterowego*).

Biokompatybilność dendrymerów

Własności biologiczne dendrymerów zależą przede wszystkim od rodzaju grup peryferyjnych i rozmiarów konkretnego dendrymeru. Struktury wewnętrzne i rdzeń (o ile nie są zaprojektowane do specjalnych celów) odgrywają daleko mniejszą rolę. Uważa się, że ze względu na globularną strukturę powinny mieć duże powinowactwo do struktur biologicznych, co, jak wykazano, nie zawsze jest cechą pożądaną. Oprócz pełnionej funkcji muszą być one także nietoksyczne, nieimmunogeniczne. Powinny, jeśli to niezbędne, posiadać zdolność przekraczania barier biologicznych (np.: jelitowych, naczyń krwionośno-tkanki, błony komórkowe eukariotyczne i bakteryjne), winny także posiadać odpowiedni czas półtrwania we krwi, stosowny do zamierzonego efektu klinicznego. Ponadto muszą być zdolne do selektywnego oddziaływania na specyficzne struktury biologiczne, z jak najmniejszą liczbą oddziaływań ubocznych. Te cechy można osiągnąć przez kontrolowane modyfikacje chemiczne dendrymerów w sposób łatwiejszy niż w przypadku innych grup związków.

Cytotoksyczność dendrymerów *in vitro* i *in vivo*.

Cytotoksyczność *in vitro* handlowo dostępnych i dlatego najczęściej badanych dendrymerów typu PAMAM lub PPI zależy od generacji, a wyniki badań nie zawsze są jednoznaczne. Najczęściej stosowane w badaniach biomedycznych

dendrymery, pochodzące z tych dwóch podgrup, mają charakter kationowy. Ze względu na duże powinowactwo do membran biologicznych takie pochodne mają wysoką hemotoksyczność. Dlatego ostatnio podjęto udane próby częściowego pokrywania dodatnio naładowanych powierzchni dendrymerów PAMAM przez reszty glikolu polietylenowego (PEG) [10], umieszczania na peryferiach dendrymeru grup hydroksylowych, karboksylowych lub poddawania ich częściowej termicznej fragmentacji lub solwolizacji [11,12]. Jak stwierdzono, najmniejszą cytotoxyczność osiąga się dla częściowo zabezpieczonych PEG dendrymerów PAMAM do 4. generacji [13]. Choć dendrymery w niskich dawkach nie wykazują istotnej toksyczności *in vivo*, to rośnie ona jednak ze wzrostem generacji i stężenia, zwłaszcza dla dendrymerów

larnego oraz lepszego wykorzystania leków o znanych własnościach. Podejście drugie umożliwia poszukiwanie nowych leków, w których rozgałęziona struktura oferuje nowe możliwości.

Obecnie szczególnym celem pracy wielu laboratoriów na świecie jest zwiększenie efektywności i zniesienie skutków ubocznych w terapii nowotworów. Wielofunkcyjna uniwersalna cząsteczka proleku z wykorzystaniem dendrymeru selektywnie łączy się z membraną komórki nowotworowej, uwalnia w sposób kontrolowany lek, którego farmakodynamikę można śledzić wykorzystując fragment zawierający radioligand lub czynnik kontrastujący niezbędny do obrazowania metodami rezonansu magnetycznego.

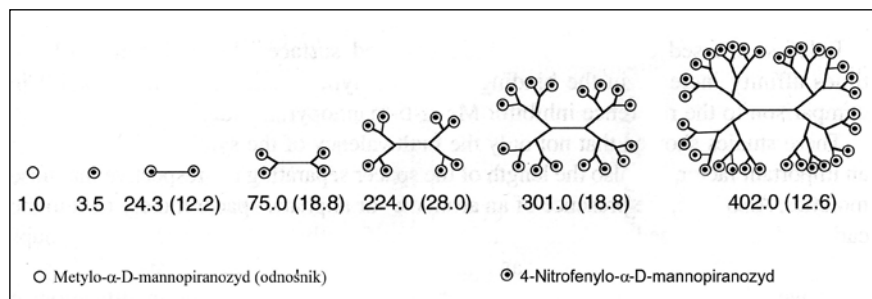
Takie koniugaty są na ogół tworzone w sposób kowalencyjny poprzez biodegradowalne układy, które w środowisku

wymi micellami [14]. Zastosowanie dendrymerów jako jednocząsteczkowych micelli dostarczających niekowalencyjnie związane leki napotyka na trudności, spowodowane tym, że obecnie kontrolowane uwalnianie cząsteczek leków jest trudne do osiągnięcia. Jednakże i na tym polu postęp jest widoczny. Umieszczenie na powierzchni dendrymeru w sposób statystyczny reszt glikoli polietylenowych (PEG) umożliwiło zastosowanie takich dendrytycznych micelli do uwalniania methotrexatu, doxorubicyny [15] lub 5-fluorouracylu [16], leków przeciwnowotworowych o dużej toksyczności. Dendrymer typu PAMAM, zawierający zainkludowaną kamptotecynę, inny stosowany w terapii nowotworowej związek, nie tylko zwiększył jej rozpuszczalność ale także pozwolił osiągnąć lepsze działanie na poziomie komórkowym (lepsza lokalizacja w komórkach nowotworowych, dłuższy czas retencji oraz podwyższona aktywność przeciwnowotworowa *in vitro*) [17].

Szczepionki dendrymerowe

Szczepionki mogą być krótko zdefiniowane jako niepatogenne elementy naśladujące występujące w przyrodzie patogeny, skłaniające organizm do produkcji selektywnych krótko- lub najlepiej długożyjących przeciwciał. Mianem antygenów określa się substancje wiążące się selektywnie do przeciwciał i wywołujące odpowiedź immunologiczną. Nośnikami antygenów są w tradycyjnych szczepionkach naturalne, łatwo dostępne, nieimmunogeniczne (nie dla wszystkich pacjentów) białka, np.: owoalbumina czy hemocyjanina. Dendrymery dają możliwość umieszczenia wielu kopii antygenów, przez co immunogeniczność takich związków powinna być znacznie wyższa. Dają również możliwość pominięcia tradycyjnych nośników białkowych, będących w rzadszych przypadkach czynnikami silnie uczulającymi.

Jednym z pionierów stosowania dendrymerów jako szczepionek był Tam i współpracownicy, twórca dendronów typu MAP (*Multiple Antigenic Peptide*, opublikowanych po raz pierwszy w 1988 roku [18]). Do dziś przeprowadzono wielką liczbę badań nad tego typu strukturami, jeden ze związków – szczepionka typu MAP na malarię – jest w trakcie I fazy badań klinicznych na ludziach [19]. Dendrony typu MAP stosuje się także z powodzeniem w rozmaitych testach diagnostycznych do wykrywania specyficznych przeciwciał [20].



Rys. Efekt dendrytyczny. Wzrost siły wiązania mannozylowanego dendrymeru poli(glicynolizynowego) do konkanawaliny A (Con A) w zależności od generacji. W nawiasach podano odpowiednik wzrostu siły wiązania w przeliczeniu na jednostkę mannozową [9].

z kationowymi grupami na powierzchni. Innym problemem w przypadku dendrymerów wyższych generacji jest ich bardzo słaba przenikalność przez bariery biologiczne, co hamuje procesy detoksykacji i wydalania, powoduje akumulację związków w miejscu podania i związane z tym silne objawy toksyczne.

Dendrymery jako nośniki substancji leczniczych

Polimery, a wśród nich dendrymery, są obecnie główną grupą nanomateriałów badanych pod kątem zastosowania w farmacji. Badania prowadzone są w dwóch kierunkach: jeden – to zastosowanie dendrymerów do kontrolowanego uwalniania leków, np. transferu słabo rozpuszczalnych lub cytotoxycznych, używanych w leczeniu związków wprost do miejsca chorobowo zmienionego. Drugie – to tworzenie nowych leków o strukturze dendrymerycznej. Pierwsze podejście, bardziej obecnie popularne, pozwala na uniknięcie kosztów i ryzyka związanego z wprowadzeniem do klinik nowego układu makromoleku-

fizjologicznym rozkładają się na właściwy lek oraz proste cząsteczki wydalone przez nerki, wątrobę itp. i/lub jako związany niekowalencyjnie kompleks molekularny dendrymer-lek. W wykorzystaniu dendrymerów jako nośników substancji leczniczych sprzyja ich unikalna budowa przestrzenna. Cząsteczka biologicznie aktywna zastosowana jako rdzeń może być osłaniana przez gałęzie i powierzchnię dendrymeru, a więc mniej toksyczna lub lepiej rozpuszczalna. Istnienie luk wewnątrzcząsteczkowych, zaprojektowanych tak, aby mieściły się tam niekowalencyjnie związane niewielkie cząsteczki leków, daje możliwość ich kontrolowanego uwalniania. Ostatnie podejście było w ciągu zeszłych 20 lat intensywnie eksplorowane i zaowocowało wieloma ciekawymi publikacjami na temat chemii układów „gość-gospodarz” z udziałem dendrymerów. Ciekawym przykładem są badane w grupie Newkome’a na początku lat 90. ub. wieku. dendrymery z niepolarnym alifatycznym wnętrzem i polarnymi grupami karboksylowymi na powierzchni zwane też jednocząsteczko-

Dendrymery jako niewirusowe transportery genów

Łatwość przechodzenia dendrymerów przez ściany komórkowe zapoczątkowała badania nad użyciem ich jako niewirusowych modułów w procesie transfekcji. Np. dodatnio naładowane dendrymery PAMAM mogą tworzyć związane siłami elektrostatycznymi kompleksy z DNA (tzw. dendripleksy), które łatwo przechodzą do komórki mogąc w ten sposób transportować materiał genetyczny. Takie kompleksy są trwałe w dużym zakresie pH, nietoksyczne i mogą zabezpieczać DNA przed działaniem enzymów proteolitycznych. Wiązane są do cząsteczek albumin w plazmie, co może sugerować ich drogę transportu w organizmie [21]. Mechanizmy przechodzenia dendripleksów przez biomembrany, kluczowe do zrozumienia procesu transfekcji są obecnie intensywnie badane. Jedną z potwierdzonych dróg jest internalizacja poprzez znajdujące się w membranach komórkowych wyspy zawierające cholesterol [22]. W świetle najnowszych badań i komercyjnej dostępności dendrymerów typu PAMAM różnych generacji wydaje się, że mogą się one stać wartościowym czynnikiem w terapii genowej zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Prace aplikacyjne

Pomimo że zastosowanie dendrymerów w medycynie napotyka na poważne bariery w postaci wysokich kosztów ich syntezy i oczyszczania, trwają intensywne prace nad ich komercjalizacją. W maju 2008 zakończono I etap badań klinicznych związku o nazwie VivaGel, australijskiej firmy Starpharma – który ma być stosowany w prewencji zakażeń wirusem HIV [23]. Ogromne nadzieje pokłada się również w zastosowaniu związków dendrymerycznych w diagnostyce medycznej. Berlińska gałąź firmy Shering AG posiada w badaniach kli-

nicznych związków o nazwie Gadomer-17, służący jako czynnik kontrastujący w metodach NMR. Jest on dendrymerem lizynowym posiadającym na powierzchni jednostki eteru koronowego zawierającego jony Gd(III). Amerykańska firma Dendritic Nano Technologies do tych samych celów chce wykorzystać dendrymer typu PAMAM jako kapsułę zawierającą obecnie szeroko stosowany w diagnostyce, małowcząsteczkowy kompleks Gd(III) o nazwie Magnevist. Dendrymery zawiera również zestaw do szybkiego diagnozowania chorób serca, produkowany przez amerykańską firmę Dade Behring. Umożliwia on potwierdzenie lub wykluczenie możliwości zawału w ciągu kilku zaledwie minut.

Powyżej przedstawiono tylko niektóre kierunki badań nad zastosowaniem dendrymerów w medycynie. Naukowcy uważają, że w porównaniu z innymi nanozwiązkami tzn. fulerenami lub nanorurkami (co do których ostatnio są podejrzenia o indukowanie procesu nowotworzenia), a które ze względu na swoją budowę uważane były za perspektywiczne nośniki leków nowych generacji, nanochemia dendrymerów jest znacznie bardziej zaawansowana i bliższa zastosowań praktycznych. Przyjmuje się, że w ciągu najbliższych 10-20 lat nanomedycyna z udziałem rozgałęzionych cząsteczek zastąpi wiele konwencjonalnych metod leczenia.

prof. dr hab.

ZOFIA URBAŃCZYK-LIPKOWSKA

Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

e-mail: OCRYST@icho.edu.pl

Piśmiennictwo:

1. J.M.J. Frechet, D.A. Tomalia (editors); Dendrimers and other dendritic polymers, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
2. E. Buhleier, W. Wehner, F. Voegtler; Synthesis, 1978, 55.
3. J.M.J. Frechet, Y. Jiang, C.J. Hawker, A.E. Philippides; Preprints of the IUPAC.
4. C.J. Hawker, J.M.J. Frechet; JACS, 1990, 112, 7638.
5. Tomalia D.A., Ewald J.R., Hall M.J., Martin S.J., Smith P.B.; Preprints of the 1st SpSJ International Polymer Conference, Soc. Of Polym. Sci, Japan, Kyoto, 1984, 65.
6. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P.; Polym. J., Tokyo, 1985, 17, 117.

7. Maciejewski M.; Macromol. Sci., A-Chem., 1982, 17, 689.
8. de Gennes P.G., Hevret H.J.; J.Physique-Lett.(Paris), 1983, 44, 351.
9. D. Page, D. Zanini, R. Roy; Bioorg. Med. Chem., 1996, 4, 1949.
10. X.-Q. Hang, X.-L. Wang, S.-W. Huang, R.-X. Zhuo, Z.-L. Liu, H.-Q. Mao, K.W. Leong; Biomacromolecules, 2005, 6, 341.
11. M.X. Tang, C.T. Redemann, F.C. Szoka Jr; Bioconjugate Chem., 1996, 7, 703.
12. Pan G., Lemmouchi Y., Akala E.O.; J. of Bioact. and Compatible Polym., 2005, 20, 113-128.
13. Yang H., Lopina S.T., DiPersio L.P., Schmidt S.P.; J. Mat. Sci.: Materials in Medicine. 2008, 19, 1991-1997.
14. Newkome G.R., Moorefield C.N., Baker G.R., Johnson A.L., Behera R.K.; Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1991, 30, 1176.
15. Kojima C. Kono K., Maruyama K., Takagishi T.; Bioconjug. Chem. 2000, 11, 910.
16. D. Bhadra, S. Bhadra, S. Jain, N.K. Jain; Int. J. Pharm., 2003, 257, 111.
17. Morgan M.T., Nakanishi Y., Kroll D.J., Griset A. P., Carnahan M.A., Wathier M., Oberlies N.H., Manikumar G., Wani M.C., Grinstaff M.W.; Cancer Res. 2006, 66, 11913-11921.
18. J.P. Tam; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 5409.
19. C.A. Moreno, R. Rodriguez, G.A. Oliveira, V. Ferreira, R.S. Nussenzweig, Z.R.M. Castro, J.M. Calvo-Calle, E. Nardin; Vaccine, 2000, 18, 89.
20. J.P. Brand, C. Barin, M.H. van Regenmortel, S. Muller; J. Immunol. Meth., 1992, 156, 255.
21. Zhong H, He ZG, Li Z, Li GY, Shen SR, Li XL, J Biomater Appl. 2008, 22, 527-544.
22. M. Manunta, P. H. Tan, P. Sagoo, K. Kashefi and A. J. T. George, Nucleic Acids Res., 2004, 32, 2730-2739.
23. Rupp R., Rosenthal S.L., Stanberry L.R.; Int. J. Nanomedicine, 2007, 2, 561.

Pytania testowe

(Zaznacz jedną prawidłową odpowiedź)

1. Struktura dendrymeru jest:

- a. Statystycznie rozgałęziona
- b. Precyzyjnie zdefiniowana

2. Efekt dendrytyczny to:

- a. synergistyczny wzrost efektu działania ligand-receptor
- b. pojedyncze oddziaływanie ligand-receptor
- c. oddziaływanie ligandów z wieloma centrami aktywnymi

3. Dendrymery w szczepionkach mogą być nośnikami:

- a. jednego antygeny
- b. wielu kopii antygenów

(Odpowiedzi szukaj w numerze)

Zasady publikowania artykułów naukowych w „Gazecie Farmaceutycznej”

- Publikowane są artykuły z zakresu farmacji i medycyny
- Prace zgłaszane do druku winny zawierać: cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz piśmiennictwa
- Prace powinny być zaopatrzone w krótkie streszczenie i zbiór podstawowych słów kluczowych w języku polskim i angielskim
- Objętość pracy nie może przekraczać 20 tys. znaków, łącznie z tabelami, wykresami i piśmiennictwem
- Piśmiennictwo może zawierać co najwyżej 20 pozycji najistotniejszych dla publikowanej pracy, ułożonych wg kolejności cytowań z odpowiednio ponumerowanymi odsyłaczami, zgodnymi z zamieszczonymi w tekście
- Prace (tekst, tabele, rysunki, fotografie) powinny być przesłane w formie elektronicznej, opatrzone następującymi danymi: nazwisko i imię, stopień naukowy i stanowisko, miejsce pracy, nr telefonu/faksu/e-mail, adres do korespondencji. Ponadto powinna być załączona zgoda autorów na opublikowanie pracy w wersji elektronicznej „Gazety Farmaceutycznej”
- Nadesłane prace recenzowane są anonimowo przez niezależnych ekspertów
- Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania srodtytułów, niezbędnych poprawek stylistycznych i ew. zmniejszania objętości lub niepublikowania nadesłanych materiałów.