

带有功能性多肽的光敏剂及其应用*

陈宏伟^{1, 2)} 陈锦灿¹⁾ 陈耐生³⁾ 黄金陵³⁾ 王俊东³⁾ 黄明东^{1)**}

⁽¹⁾中国科学院福建物质结构研究所结构化学国家重点实验室, 福州 350002; ⁽²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049;

⁽³⁾福州大学功能材料研究所, 福州 350002)

摘要 光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是光敏剂在特定波长光源的激发下、在氧分子存在下产生细胞毒性物质的一种治疗方法, 主要用于抗肿瘤治疗。目前临床应用的光敏剂对肿瘤细胞的靶向性比较有限, 近来的一个热门研究方向是靶向性光敏剂。结合作者多年来在该方向的工作, 综合近年来光敏剂研究的发展, 比较全面地阐述了带有功能性多肽的靶向性光敏剂及其在光动力治疗中的应用。阐述多肽作为靶向基团的优势, 总结了包括透膜多肽、血管靶向多肽、细胞受体靶向多肽等功能多肽与光敏剂偶合物的生物效应, 说明了多肽能够实现光敏剂的靶向作用。

关键词 光动力治疗, 光敏剂, 肿瘤, 靶向性, 多肽

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00080

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是基于光敏剂、光源、氧气和组织间的相互作用。光敏剂在肿瘤组织中有效聚集, 之后以适当波长的光照射, 激发光敏剂与组织中的氧气产生单线态氧或自由基氧, 它们是高活性的、亚稳态的化学物质, 能够对周围的细胞产生毒性。PDT 在多种肿瘤治疗中效果显著, 如皮肤癌^[1]、食道癌^[2]、支气管癌^[3]、膀胱癌^[4]等, 尤其对于许多放化疗治疗无效的晚期癌症患者, 光动力治疗能有效地减轻病痛、提高生活质量。

20 世纪 70 年代末, Dougherty 等^[5]报道了 PDT 在皮肤癌中的显著疗效, 包括鳞状上皮细胞、基细胞及由其他恶性肿瘤引起的影响皮肤的症状。在 Dougherty 的努力下, 光敏剂 Photofrin 在 1996 年成为第一个被正式批准用于临床的光敏剂。Photofrin 是基于血卟啉的混合物, 近 30 年来, Photofrin 被用于数以千计的病人, 且没有出现长期的安全问题。可是, Photofrin 的问题在于它有较长时间的皮肤光毒性, 且对肿瘤组织的选择性很低^[6]。Foscan 是另外一种光敏剂, 叶绿素家族成员之一, 光动力治疗时所需光剂量较低, 只需几秒的时间^[7, 8]。Foscan 对头颈部肿瘤的缓解治疗有效, 并于 2001 年在欧洲被批准用于此病症。然而, 和 Photofrin 一样, Foscan 也有显著的皮肤光毒性, 且对肿瘤组织的选择性弱。第三个被广泛应用的光敏剂是 5-氨基酮戊酸(5-ALA), 它是一种前药, 在细

胞内经过代谢成为它的活性形式——原卟啉 IX^[9]。ALA 适用于表面的、局部的治疗, 1999 年 11 月美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准其用于治疗光化性角化病。ALA 无法渗透至深层, 其作用范围仅仅是皮肤表层以下的几个毫米。此外, 卟啉衍生物 Verteporfin 被广泛用于眼底湿性黄斑病变的治疗, 其半衰期短且能高度聚集在新生血管组织中。虽然这种光动力治疗方法无法恢复视力, 但视觉丧失的速度明显减慢, 且皮肤光敏性时间也大大缩短至 1~2 天^[10]。人们一般把 Photofrin 称为第一代光敏剂, 而另外 3 种为第二代光敏剂。

目前, 中国市场上经国家食品药品监督管理局批准应用于临床光动力治疗的光敏剂仅有两种^[11], 一种是血卟啉类多组分衍生物 HiPorfin, 主要用于肿瘤治疗, 另一种是 5-ALA, 用于光动力治疗尿道外尖锐湿疣, 效果与药物治疗相当, 但复发率低, 病人耐受性好。除此之外, Hemoporfin, 又称血卟啉单甲醚, 已进入临床三期试验, 用于光动力治疗鲜红斑痣, 同时发现其对年龄相关的黄斑病变及角膜血管增生等血管疾病有潜在疗效。本文的福州大学作者发展了我国第一个具有自主知识产权的

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A313)及国家自然科学基金青年科学基金(30625011)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0591-83704996, E-mail: mhuang@fjirsm.ac.cn

收稿日期: 2009-02-15, 接受日期: 2009-05-18

酞菁类光敏剂 I.I 类新药——Photocyanine(福大赛因, ZnPcS_2P_2 , 图 1), 这是一个非对称的、两亲性酞菁锌, 目前已经被批准进行抗肿瘤的第一期临床试验. Deuteporfin, 是一种组成稳定、各成分对实验性动物肿瘤光动力杀伤作用已知的新的卟啉类肿瘤光动力治疗药物, 目前正在进行临床研究.

光动力治疗的选择性主要依赖两个方面, 一是光照区域的可选择性, 二是肿瘤组织对光敏剂的优先摄取. 目前临床应用的光敏剂中, 对肿瘤细胞的靶向性比较有限. 具有肿瘤细胞靶向功能、分子识别功能的光敏药物是正在研究的下一代光敏剂, 它们是在第二代光敏剂的基础上偶联上具有生物特性的“靶向装置”, 从而提高对靶组织的选择性. 蛋白质是这种靶向装置之一, 许多的工作将蛋白质偶联到光敏剂上, 包括血清蛋白、表皮生长因子、单克隆抗体等^[12]. 血清蛋白包括了白蛋白、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白, 这些蛋白质通过氢键、范德华力、疏水作用等非共价键与光敏剂相互作用. 低密度脂蛋白是憎水性光敏剂在体内运输的重要载体, 而白蛋白对光敏剂的运输也起到了一定的作用^[13]. 在肿瘤组织表面过量表达的受体, 如表皮生长因子受体是实现光敏剂靶向性的一个重要目标. 表皮生长因子与光敏剂(如酞菁铝^[14])偶合后能够与肿瘤组织选择性结合, 并通过由受体调节的胞吞作

用进入细胞, 从而使光敏剂能在细胞内富集. 单克隆抗体主要利用其与肿瘤表面抗原相互作用的特异性, 实现光敏剂的靶向运输, 但有一些主要的局限: 抗体分子大, 较难穿过肿瘤细胞, 且肝脏和网状内皮系统对抗体分子存在非特异性吸收^[15]. 蛋白质作为光敏剂的靶向基团的另一问题是不容易得到组成均一、组分确定的单一化合物.

多肽作为靶向装置有其独特的优势. 多肽是由几个氨基酸通过酰胺键相连而成的分子, 多肽与蛋白质的分界线约在 50 个氨基酸左右, 一般最小的蛋白质有 50 个以上的氨基酸. 多肽靶向基团有诸多的优点: a. 合成和修饰都比较简单, 能够得到组成确定的化合物. b. 某些多肽能特异地与肿瘤组织中的受体相结合, 作为载体将光敏剂运至靶细胞. c. 与蛋白质靶向装置相比, 光敏剂-多肽偶合物分子质量较小, 能有效地穿过组织, 与肿瘤细胞的靶位选择性地结合并被内吞入细胞内. d. 多肽偶联能改变光敏剂的亲水/疏水平衡, 调节在体内的摄取和输运等药物代谢特性.

大部分光敏剂含有平面的、较大的共轭芳香环(图 1). 芳香环疏水性强, 在水系溶液中, 大环平面间的疏水作用导致了光敏剂较强的聚集倾向, 这不仅给光敏剂的分离纯化带来困难, 而且一般产生聚集的光敏剂的光动力效果较差, 从而影响了其光

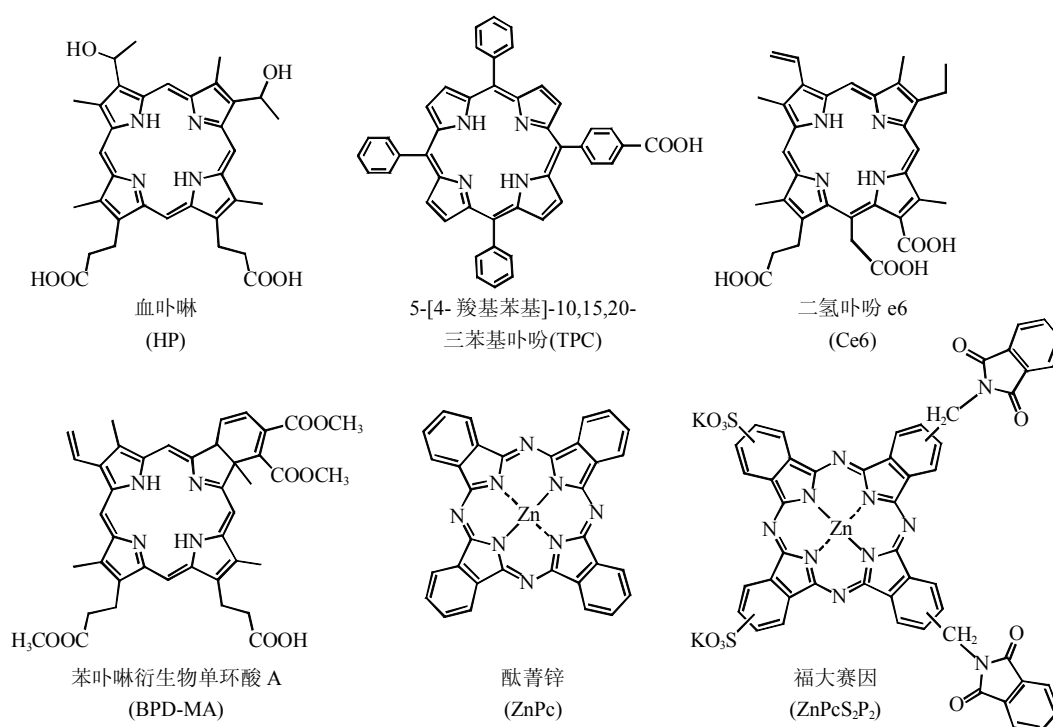


Fig. 1 Structures of photosensitizers, most of them are hydrophobic with a plane, conjugated aromatic cycle

图 1 目前常用各光敏剂结构示意图, 大部分含平面、共轭芳香环, 疏水性强

化学性质及在体内的功效. 在光敏剂分子上引入多肽, 能够使光敏剂带上电荷, 增强其水溶性.

当然, 多肽作为靶向基团也有一些潜在的缺点, 例如, 它可能被大部分组织中存在的多肽外切酶/内切酶所降解. 为此, 可以对多肽进行化学修饰, 如引入右旋氨基酸、拟氨基酸, 或对多肽进行环化等, 以增加多肽的稳定性^[16].

光敏剂-多肽的偶合可通过经典的固相合成方法获得, 偶合物的设计有几种思路: a. 多肽直接连在光敏剂上, 之间以一个小分子作为连接物^[17]; b. 以一聚合物为骨架, 在其侧端分别偶合光敏剂及功能多肽^[18]; c. 以多肽修饰包被有光敏剂的介质, 如纳米颗粒、脂质体^[19, 20]. 需要注意的是, 使用对受体有特异性的多肽, 偶合时应尽量不影响多肽与受体结合能力.

本文将集中评述数种多肽靶向基团与光敏剂的偶合物, 及其偶合物的光动力效果.

1 光敏剂-多肽偶合物中多肽序列对光动力效果的影响

1.1 带正电荷的透膜多肽

赖氨酸和精氨酸在生理 pH 下带正电荷, 而大部分肿瘤细胞表面所带为净负电荷, 因而, 带正电荷的多聚赖氨酸和多聚精氨酸能有效地富集到肿瘤细胞上、并能穿过细胞膜进入到肿瘤细胞中.

多聚赖氨酸已被广泛用于抗微生物及肿瘤的治疗. 聚合度为 20 的聚赖氨酸在浓度低到 0.3~3 mg/L 时就能有效地透过细胞外部膜^[21]. Hasan 小组研究了 Ce6-聚赖氨酸(聚合度约 20)对微生物的光动力灭活作用^[22]. 他们合成了带正电荷的偶合物 pL-Ce6(pL: 聚赖氨酸), 同时, 将其与乙酸酐反应得到不带电荷的中性偶合物 pL-Ce6-ac, 另外, 与琥珀酸作用得到带负电荷的 pL-Ce6-succ. 实验结果表明, 偶合了多肽的光敏剂在细菌上的富集量比没有偶合的光敏剂高了 5~20 倍, 阳离子偶合物在细菌(牙龈卟啉菌、黏放线菌)上的摄取是其他化合物的 2~4 倍. 光敏剂在细菌上的摄取比在正常口腔上皮细胞(HCPC-1)上的摄取高 20~100 倍. 光毒性检测中, 细菌和正常口腔上皮细胞分别与 5 $\mu\text{mol/L}$ 光敏剂培育 1 min, 红光照射 10 min, 对于革兰氏阴性的牙龈卟啉菌, 阳离子偶合物可杀死 99% 的细菌, 而中性和阴性光敏剂偶合物分别杀死 91% 和 76% 的细菌. 对于革兰氏阳性细菌, 阳离子偶合物的杀菌率同样也达到了 99% 以上, 而对正

常口腔上皮细胞几乎无损伤.

Rovaldi 等^[23]使用相同的 Ce6 与五聚赖氨酸(5K)相连, 以期获得与细菌表面的强亲和力. Ce6 本身对革兰氏阳性菌(如 *A. viscosus*、*S. mitis*)杀伤力较好, 而对革兰氏阴性菌作用较弱. 五聚赖氨酸在 Ce6 上的偶合能有效提高光敏剂的效果, 在相同的药物浓度下, Ce6-5K 能有效杀灭革兰氏阳性和革兰氏阴性口腔细菌. 以口腔阴性细菌 *B. forsythus* ATCC 43047 为例, 在相同的药物浓度下, Ce6 对其抑制率仅为 4%, 而偶合物 Ce6-5K 的抑制率则要高于 99%.

我们课题小组通过固相环合的方法, 得到 2-单羧基取代酞菁锌^[24], 并使之与五聚赖氨酸偶联, 得到一种新型光敏剂: 五聚赖氨酸 2-羧基酞菁锌(2-ZnPc-5K)^[25]. 该偶合物水溶性好, 结构单一, 终产物纯度可达到 99%, 克服了光敏剂纯化难的问题(图 2). 研究了 2-ZnPc-5K 在体外光照条件下对 3 种肿瘤细胞(人源肝癌细胞 Bel7402、人源胃癌细胞 BGC823、人源白血病细胞 K562)及 1 种正常细胞(人源胚肺成纤维细胞 HELF)的杀灭活性. 以 670 nm 激光照射, 当光剂量为 1.5 J/cm² 时, 偶合物对几种肿瘤细胞系有明显的抑制作用, 而对正常细胞抑制较弱, 其 IC_{50} 值分别为 1.95 $\mu\text{mol/L}$ (Bel7402)、3.05 $\mu\text{mol/L}$ (BGC823)、0.34 $\mu\text{mol/L}$ (K562)、11.27 $\mu\text{mol/L}$ (HELF), 显示了一定的选择性. 此外我们还发现, 2-ZnPc-5K 与细胞的相互作用使在水系溶液中原本聚集的偶合物发生解聚.

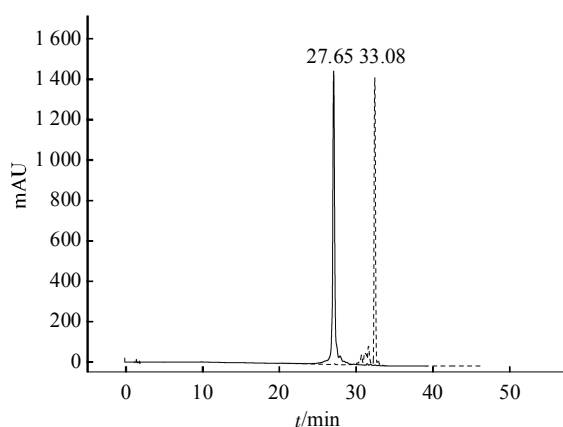


Fig. 2 HPLC of pentalysine 2-carboxylphthalocyanine zinc and 2-carboxylphthalocyanine zinc^[24]

图 2 五聚赖氨酸 2-羧基酞菁锌及 2-单羧基取代酞菁锌的高效液相色谱(HPLC)图^[24]

图片表明二者能够被纯化到较高纯度. —: 五聚赖氨酸 2-羧基酞菁锌; ---: 2-单羧基取代酞菁锌.

5-[4-羧基苯基]-10, 15, 20-三苯基-2, 3-二羟基卟吩(TPC)是一种光敏化合物, 但因其完全不溶于水而无法直接应用于临床. Choi 等^[26]将 TPC 与寡聚多肽(七聚精氨酸, R7)偶联(结构式如图 3), 旨在利用 R7 的水溶性和细胞穿透性, 增加光敏剂 TPC 的水溶性, 改善其在体内的输送和光动力治疗效率. 实验证明, TPC-R7 在 pH7.4 缓冲溶液中的溶解度大于 10 mmol/L. 与 MDA-MB-468 细胞对无偶合光敏剂 Ce6 的微量摄取不一样的是, 细胞对 TPC-R7 的摄取随温育时间增加成线性增长, 培养 4 h 后摄取量为 Ce6 的 8 倍. 光毒性检测中, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的偶合物与细胞共同培养 30 min 后, 650 nm 激光照射达到 10 J/cm² 的光剂量, 即可抑制约 70% 细胞的生长, 而此条件下的 Ce6 未显示抑制效果. 1 $\mu\text{mol/L}$ 时二者均无暗毒性. 培养时间在 30 min 以内, 偶合物主要在内体中聚集, 随着培养时间的增长, 发现核膜上明显附有光敏剂.

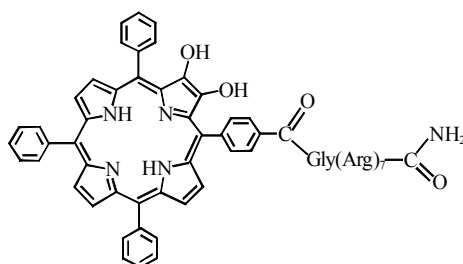


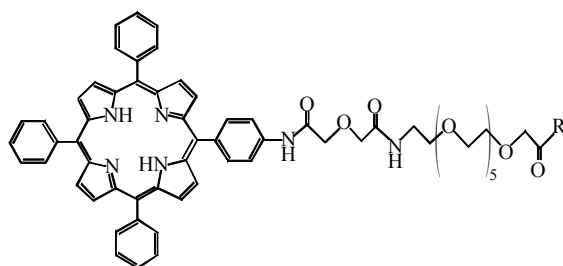
Fig. 3 Structure of TPC-R7

图 3 TPC-R7 的化学结构

七聚精氨酸的偶合增加了 TPC 的水溶性和靶向性.

Sibrian-Vazquez 等^[27]合成了 14 种卟啉偶合物, 由卟啉或金属卟啉分别与带电荷的、组成不同的多肽偶合, 并将它们与无偶合的卟啉比较, 评价它们的细胞毒性、细胞摄取及在人 HEp2 细胞中的定位. 偶合物所含的多肽序列有: K-OH, KK-OH, KKK-OH, KKK-NH₂, RRKR-NH₂, KRRR-NH₂. 所得偶合物均无异构体, 并以各种分析方法进行表征. 结果表明, 多肽的带电量、性质、氨基酸序列、螯合金属离子的存在以及多肽链的 C 端(OH 或 NH₂)都影响偶合物的细胞摄取. 共同培育 4 h, HEp2 细胞对含精氨酸偶合物的摄取多于含赖氨酸的偶合物(> 50%), 25 h 后, 在细胞内积聚最多的是多肽序列为 KRRR-NH₂ 的卟啉偶合物, 反之, 带有 3 个赖氨酸的卟啉锡偶合物积聚最少(约为前者的 1/10). 值得注意的是, 螯合金属离子的偶合物在 2 h 内摄取率即达到饱和. 所有的化合物显示低的暗毒性(IC₅₀ > 250 $\mu\text{mol/L}$), 并主要定位在细胞的溶酶体和小泡上, 当作为运载工具的脂质存在时, 主要的亚细胞定位则是线粒体. 文中未对所得化合物的光动力治疗效率进行检测.

Sibrian-Vazquez 等^[28]最近合成了 4 个卟啉-多肽偶合物, 并研究了多肽序列对偶合物光动力效果的影响. 4 种偶合物结构如图 4 所示, 其中 1、4 的多肽序列为 NLS-CPP, 这里的 NLS 为细胞核定位信号, CPP(cell penetrating peptide, 透膜多肽)为 HIV-1 Tat 48~60 膜融合序列, 2、3 的多肽序列为 CPP-NLS.



1: NLS-CPP, R=SV40 - HIV-1 Tat 48~60 (APPKKKKRKVEDPRKKRRQRRRPPQG)

2: CPP-NLS, R=amphiphatic peptide (MGLGLHLLVLAALQGAWSQAPPKKKKRKVG)

3: CPP-NLS, R=penetratin - SV40 (RQIKIWFQNRRMKWKKAPPKKKKRKVG)

4: NLS-CPP, R=nucleoplasmin - HIV-1 Tat 48~60 (KRPAATKKAGQAKKKLEDPRKKRRQRRRPPQG)

Fig. 4 Peptides functionalized porphyrins prepared by Sibrian-Vazquez et al.

图 4 Sibrian-Vazquez 等合成的 4 个卟啉-多肽偶合物

光动力活性随着偶合物亲水性的增加而增强, 多肽序列为 NLS-CPP 及含 HIV-1 Tat 48~60 的偶合物最有效.

使用 HPLC 分析 4 种偶合物, 疏水性 2>3>1>4. 细胞摄取实验发现, 多肽序列为 NLS-CPP 的偶合

物细胞积累量最多, 积累量 4>1>3, 而细胞中 2 的量仅为前三者的 1/3. 由于 2 摄取率低, 故其在检

测浓度下不显示细胞毒性. 1、3、4 的光毒性 IC_{50} 值分别为 7.5、9.3、6.9 $\mu\text{mol/L}$ (相应暗毒性 IC_{50} 依次为 34、53、27 $\mu\text{mol/L}$), 其光毒性强弱与细胞摄取量多少顺序相同 $4>1>3$, 亦与其疏水性顺序相反, 偶合物 4 亲水性最强, 细胞积累最多, 细胞光毒性最强. 作者指出, 偶合物的亚细胞定位取决于自身总的电荷数及细胞摄取机制. 荧光检测结果表明, 所有偶合物优先在溶酶体中定位, 1 也在内质网中聚集.

1.2 血管靶向多肽

诱导新生血管形成是肿瘤生长的一大特点. 以血管为靶向的光敏剂, 其导向多肽分子能特异性地结合在肿瘤组织的微血管上, 所偶联的光敏剂分子直接发挥光动力作用, 造成血管的完全封闭, 使肿瘤组织缺乏营养枯竭而亡.

Ichikawa 以聚乙二醇(PEG)修饰被脂质体包被的光敏剂苯并卟啉衍生物单环酸 A(Lip BPD-MA), 再偶合对血管新生内皮细胞有特异性的 APRPG 五肽^[20]. 作者利用移植了 Meth-A 癌细胞的 BALB/C 鼠, 研究了该偶合物 APRPG-PEG-Lip BPD-MA 的光动力效果, 并与没有偶合多肽的光敏剂(PEG-Lip BPD-MA)进行比较. 结果显示, 虽然两种药物注射 3 h 后在肿瘤组织中的聚集量相当, 但是光照后, 多肽偶合物明显抑制肿瘤的生长(治疗 13 天后体积增大 1 cm^3), 有效延长了实验鼠的寿命(42 天有 50%存活), 而 PEG-Lip BPD-MA 效果轻微(治疗 13 天后体积增大 5 cm^3 , 42 天实验鼠全部死亡), 与只使用盐溶液的空白对照组几乎无差别. 在血管增生动物模型中, 仅仅偶合了多肽的光敏剂显示明显的效果. 作者解释可能无偶合的光敏剂只停留在间质组织中, 无法与肿瘤细胞或内皮细胞有效作用, 而偶合上五肽后, 主动靶向作用使部分光敏剂能被肿瘤组织吸收, 在细胞内产生反应, 大大提高了治疗效果.

血管内皮生长因子(VEGF)被认为是血管生长的关键调节者, 涉及内皮细胞的增殖和转移. 它有 2 个受体, VEGFR-1(Flt-1)和 VEGFR-2(Flk-1/KDR), 在内皮细胞中专一表达. 而其中, KDR 主要调节 VEGF 的生物活性, 在新生血管中过量表达, 在与肿瘤相关的血管新生中起重要作用^[29]. Neuropilins (NRP)也被确认为血管内皮生长因子亚型(VEGF₁₆₅)的受体, 它能在内皮细胞和部分肿瘤细胞表面表达^[30]. 一个通过噬菌体表面文库筛选出的七肽(ATWLPPR)能够与 KDR 特异结合^[31]. 在 KDR 过

量表达的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中, 该七肽能与 VEGF₁₆₅ 竞争和受体 KDR 的结合, 且无论在体外或体内, ATWLPPR 都显示出抗血管新生特性.

Renno 等^[18]评价了基于光敏剂 verteporfin 的靶向光动力治疗对眼睛脉络膜血管增生疾病(choroidal neovascularization, CNV)的治疗效率及选择性. 作者用修饰过的聚乙烯醇(PVA)与 verteporfin 及 ATWLPPR 多肽偶联, 分别与无偶联的 verteporfin 和仅仅偶联 PVA 的 verteporfin 比较. 这里, 作者认为该偶合物的多肽部分与 VEGFR-2 特异结合. 结果显示, 偶合的 verteporfin 光动力效果整体优于无偶合的 verteporfin. Verteporfin-PVA 与 verteporfin-PVA-ATWLPPR 的光动力活性相当, 但后者的治疗条件相对温和. 在给药量相同(3 mg/m^2)的情况下, 注射 1 h 后进行光照, 欲达到 100%的新生血管关闭, verteporfin-PVA-ATWLPPR 所需光剂量仅为 verteporfin-PVA 的 40%. 偶合上多肽的光敏剂能更有效地聚集在新生血管中, 对视网膜色素内皮的影响极小, 不引起感光器的伤害, 提高了治疗的选择性.

Tirand 等^[17]报道了 ATWLPPR 与 TPC 的偶合物(TPC-Ahx-ATWLPPR, 其中 Ahx 为 6-氨基己酸). ELISA 实验显示, 该化合物中的七肽与内皮细胞受体专一性结合. 尽管多肽与光敏剂偶合后降低了它与受体的亲和力, 但与 TPC 相比, 人体内皮细胞对偶合物的摄取及其光动力活性都比未偶合光敏剂显著增强(增强倍数分别接近 25 倍和 10 倍). 之后, 作者在对移植了神经胶质瘤细胞的裸鼠进行药代动力学研究时发现, 静脉注射 TPC-Ahx-ATWLPPR 后, 在不同器官中, 该偶合物的降解速率不同, 且其主要代谢产物为 TPC-Ahx-A, 即体内降解主要发生在多肽部分^[32].

1.3 细胞受体靶向多肽

$\alpha_v\beta_3$ -整合素是一种异源二聚体的跨膜糖蛋白受体, 在许多肿瘤细胞或内皮细胞中过量表达. 三肽 RGD(H-Arg-Gly-Asp-OH)是 $\alpha_v\beta_3$ -整合素的配体, 它对一定的肿瘤和肿瘤内皮细胞有靶向作用. Frochot 等^[33]将光敏剂 5-[4-羧基苯基]-10, 15, 20-三苯基卟吩(TPC)分别与含 RGD 序列的线性及环状多肽偶合, 并与无偶合的光敏剂四苯基卟吩(TPP)进行体外光动力活性比较. 与 $\alpha_v\beta_3$ -整合素过量表达的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)共同培养 24 h 后, 细胞对线性和环状 TPC-RGD 的摄取率明显高于 TPP, 增加幅度分别为 98 倍和 80 倍. 光毒性方

面, $1 \mu\text{mol/L}$ 的药物与 HUVEC 细胞共同培养 24 h 后, 以红光激发, 光剂量 $1.0 \sim 11.0 \text{ J/cm}^2$, 结果表明, TPP 对细胞几乎无抑制, 而 TPC-RGD 则随着光剂量的增大, 抑制率不断提高, 当光剂量为 11 J/cm^2 时即可抑制 90% 的细胞活性. 对药物的亚细胞定位未做报道. 有趣的是, 实验发现, 不含 RGD 受体的 EMT-6 细胞对偶合物的摄取也优于 TPP, 推测由于多肽部分增加了光敏剂的亲水性, 引起非特异性细胞摄取的增加.

Conway 等^[34]研究了原卟啉 IX- 环状 RGD 多肽偶合物的体外和体内特性, 以无偶合的原卟啉 IX 为对照. 体外摄取实验中, 2 种化合物(各 $1 \mu\text{mol/L}$) 分别与可表达 $\alpha_v\beta_3$ - 整合素的人子宫颈癌(SiHa) 细胞培养 1 h 后, 发现细胞中每毫克蛋白质含 $(0.54 \pm 0.03) \text{ nmol}$ 原卟啉 IX, 偶合物含量则有 $(0.92 \pm 0.22) \text{ nmol}$, 这主要由于偶合物中的多肽对整合素受体的特异结合. 荧光显微镜观察其亚细胞定位, 发现偶合物荧光斑点较为集中, 且主要聚集在溶酶体(或内体)上, 而对于无偶合的原卟啉 IX, 其荧光斑点分散, 推测其主要在细胞质或一般的膜上聚集. 然而, 体外及体内光活性实验中, 2 种化合物未见明显差别, 均可导致肿瘤细胞坏死.

蛙皮素是一种有广泛生物学效应的神经激素, 它与人体中的胃泌素释放肽相似, 对肿瘤生长和细胞繁殖有影响. 在早期前列腺癌中, 发现有胃泌素释放肽受体(GRPR)的表达, 且与肿瘤的浸润性有关. Dubuc 等^[35]将 AlPcS_4 与蛙皮素偶合, 旨在利用蛙皮素对 GRPR 的靶向性, 来提高光动力治疗前列腺癌的效率. 结果显示, 偶合物的光毒性明显高于无偶合的 AlPcS_4 , 在较低的药物浓度和光剂量下, 偶合物的光动力效果比 AlPcS_4 高 2~3 倍, 当以 3 J/cm^2 的光照射时, AlPcS_4 - 蛙皮素的半数抑制浓度(IC_{50})不到 AlPcS_4 的 20%. 关于此药物的亚细胞定位及杀死细胞机制尚未报道.

Stefflova 等^[36]设计合成了一种以叶酸受体为靶向的水溶性光敏剂, 它能选择性地探测并破坏肿瘤细胞, 其主要结构为脱镁叶绿酸 a- 多肽 - 叶酸(PPF), 多肽序列为 GDEVDGSGK. 在这里, 多肽序列作为稳定的连接物和调节分子, 有效提高了药物分子的输送效率. 作者以单个赖氨酸替换多肽序列, 得到脱镁叶绿酸 a- 赖氨酸 - 叶酸(PKF), 以该光敏剂作为阴性对照, 与 PPF 进行比较. 很明显, PKF 的憎水性更强, 含叶酸受体的 KB 细胞对 PKF 的摄取仅为 PPF 的一半. 体内定位研究发现, PKF

较多地聚集在肝、脾等器官, 且注射 6.5 h 后仍有较多残留, 在肿瘤组织分布甚少, 而 PPF 则能在肿瘤组织中有效聚集, 其在肝、脾中的含量仅为 PKF 的 1/50. 由此作者推断, 多肽序列的存在不仅提高了偶合物的水溶性, 还有效减少了药物的非特异性吸收, 使其能在体内快速清除.

2 光敏剂结构对光动力效应的影响

如前所述, 光敏剂偶合不同功能的多肽, 会使其具有不同的靶向作用, 并显著影响偶合物的细胞摄取及光动力治疗效果. 除此之外, 研究人员还发现, 光敏剂母环结构的差异, 如取代基的不同, 也在一定程度上影响偶合物的亚细胞定位、光动力治疗效果等.

Sibrian-Vazquez 等^[37]发现, 卟啉-多肽偶合物的亚细胞定位与卟啉环上取代基的性质有关. 作者使用 2 种含不同取代基的卟啉为母体, 分别与 3 类多肽序列偶联(结构式如图 5): a. 卟啉与 SV40 大 T 抗原的 NLS(GPKKKRKV-NH₂)相连; b. 卟啉与精氨酸八聚物(GRRRRRRR-OH)相连, 精氨酸八聚物能增强细胞摄取; c. 卟啉与透核膜多肽

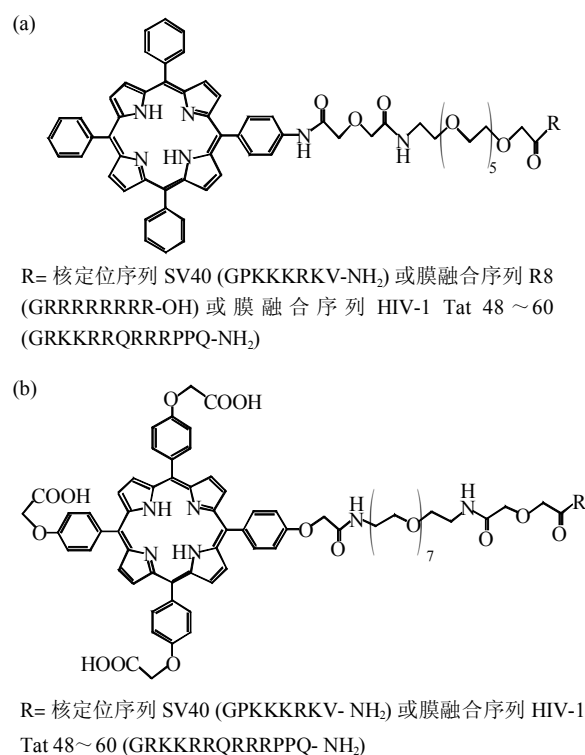


Fig. 5 Porphyrin-peptide conjugates developed by Sibrian-Vazquez *et al.*

图 5 Sibrian-Vazquez 等制备的两种卟啉-多肽偶合物 (a)第一种偶合物. (b)第二种偶合物. 结果显示, 第一种偶合物光动力学效应优于第二种偶合物.

HIV-1 Tat 48~60(GRKKRRQRRRPPQ-NH₂)相连.

这里, 低分子质量的 PEGs 被用来连接卟啉和多肽部分, 以增强偶合物的水溶性, 并减少光敏剂在水溶液中的聚集. 得到的结果显示, 膜融合序列 HIV-1 Tat 48~60 和八聚精氨酸在将偶合物运至细胞时最为有效. 此外, 第一种偶合物与第二种相比, 更易被细胞吸收, 且第一种偶合物优先定位在内质网上, 而第二种偶合物主要在溶酶体中. 在人 HEP2 细胞中检测的光毒性结果显示, 带有疏水卟啉的第一种偶合物比第二种羧基功能化的卟啉偶合物更有效. 而在第一种偶合物中, 光毒性最强的是带有 NLS 多肽的化合物($IC_{50}=1.5 \mu\text{mol/L}$).

3 结 语

综上所述, 近几年多肽在靶向光敏剂中的应用研究十分活跃, 这主要在于多肽的细胞毒性低、渗透性和选择性好, 合成和修饰都较简单. 更重要的是, 多肽对一些在肿瘤组织中过量表达的受体具有靶向性, 尤其是肿瘤新生血管系统. 多肽的这些特点增加了光敏剂的靶向治疗效果, 并且降低了光敏剂的副作用. 然而, 这个领域还有许多问题需要解决. a. 光敏剂和多肽之间的最佳连接长度是多少? 连接长度太小, 有可能影响多肽和其细胞表面受体的结合. 当然, 不同的靶向多肽可能需要使用不同的连接长度. b. 多肽对光敏剂在水溶液中聚集行为的影响. 聚集的光敏剂(如酞菁), 其光动力效果大大降低. c. 除了细胞靶向外, 如何使光敏剂能够在细胞内的敏感部位(如线粒体)有效积累? 这样可以达到特定的杀伤模式, 如产生细胞凋亡, 而不是组织坏死. d. 如何使用多肽调节光敏剂在体内的药代动力学特性和药代动力学分布?

总之, 为了使光动力治疗完全发挥它的潜能, 我们需要不同的光敏剂和多种功能性、靶向性多肽, 以达到选择性破坏肿瘤组织、减少对正常组织副作用的目的.

参 考 文 献

- Dougherty T J, Kaufman J E, Goldfarb A, *et al.* Photoradiation therapy for treatment of malignant-tumors. *Cancer Research*, 1978, **38** (8): 2628~2635
- Radu A, Wagnieres G, van den Bergh H, *et al.* Photodynamic therapy of early squamous cell cancers of the esophagus. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2000, **10** (3): 439~460
- Savary J F, Monnier P, Fontollet C, *et al.* Photodynamic therapy for early squamous cell carcinomas of the esophagus, bronchi, and mouth with m-tetra (hydroxyphenyl) chlorin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1997, **123** (2): 162~168
- Guillemin F, Cosserat-Gerardin I, Notter D, *et al.* Diagnosis and treatment of bladder tumors by photodynamic therapy. *Pathol Biol (Paris)*, 2001, **49** (10): 815~823
- Gilson D, Ash D, Driver I, *et al.* Therapeutic ratio of photodynamic therapy in the treatment of superficial tumours of skin and subcutaneous tissues in man. *Br J Cancer*, 1988, **58** (5): 665~667
- Moriwaki S I, Misawa J, Yoshinari Y, *et al.* Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2001, **17** (5): 241~243
- Ris H B, Altermatt H J, Inderbitzi R, *et al.* Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. *Br J Cancer*, 1991, **64** (6): 1116~1120
- Sharman W M, Allen C M, van Lier J E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*, 1999, **4** (11): 507~517
- Kennedy J C, Pottier R H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 1992, **14** (4): 275~292
- Azab M, Boyer D S, Bressler N M, *et al.* Verteporfin therapy of subfoveal minimally classic choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: 2-year results of a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol*, 2005, **123** (4): 448~457
- Huang Z. An update on the regulatory status of PDT photosensitizers in China. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2008, **5** (4): 285~287
- Taquet J P, Frochet C, Manneville V, *et al.* Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, **14** (15): 1673~1687
- Sharman W M, van Lier J E, Allen C M. Targeted photodynamic therapy *via* receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, **56** (1): 53~76
- Lutsenko S V, Feldman N B, Finakova G V, *et al.* Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates. *Tumour Biol*, 1999, **20** (4): 218~224
- Aina O H, Sroka T C, Chen M L, *et al.* Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*, 2002, **66** (3): 184~199
- Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem*, 2002, **9** (9): 963~978
- Tirand L, Frochet C, Vanderesse R, *et al.* A peptide competing with VEGF (165) binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Controlled Release*, 2006, **111** (1~2): 153~164
- Renno R Z, Terada Y, Haddadin M J, *et al.* Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Archives of Ophthalmology*, 2004, **122** (7): 1002~1011
- Reddy G R, Bhojani M S, McConville P, *et al.* Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin Cancer Res*, 2006, **12** (22): 6677~6686
- Ichikawa K, Hikita T, Maeda N, *et al.* Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2005, **1669** (1): 69~74
- Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer-membrane. *Microbiological Reviews*, 1992, **56** (3): 395~411

- 22 Soukos N S, Ximenez-Fyvie L A, Hamblin M R, *et al.* Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, **42** (10): 2595~2601
- 23 Rovaldi C R, Pievsky A, Sole N A, *et al.* Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, **44** (12): 3364~3367
- 24 Chen J C, Chen N S, Huang J F, *et al.* Derivatizable phthalocyanine with single carboxyl group: Synthesis and purification. *Inorganic Chemistry Communications*, 2006, **9** (3): 313~315
- 25 陈锦灿, 陈宏伟, 李永东, 等. 新型单取代两亲性酞菁锌的制备及其光动力活性研究. *高等学校化学学报*, 2008, **29** (11): 2131~2137
Chen J C, Chen H W, Li Y D, *et al.* *Chemical J Chin Universities*, 2008, **29** (11): 2131~2137
- 26 Choi Y, McCarthy J R, Weissleder R, *et al.* Conjugation of a photosensitizer to an oligoarginine-based cell-penetrating peptide increases the efficacy of photodynamic therapy. *Chemmedchem*, 2006, **1** (4): 458~463
- 27 Sibrian-Vazquez M, Jensen T J, Fronczek F R, *et al.* Synthesis and characterization of positively charged porphyrin-peptide conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 2005, **16** (4): 852-863
- 28 Sibrian-Vazquez M, Jensen T J, Vicente M G. Synthesis, characterization, and metabolic stability of porphyrin-peptide conjugates bearing bifunctional signaling sequences. *J Med Chem*, 2008, **51** (10): 2915~2923
- 29 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb Journal*, 1999, **13** (1): 9~22
- 30 Miao H Q, Lee P, Lin H, *et al.* Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J*, 2000, **14** (15): 2532~2539
- 31 Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, *et al.* Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J*, 2000, **19** (7): 1525~1533
- 32 Tirand L, Thomas N, Dodeller M, *et al.* Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: An *in vivo* and *in vitro* study. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, **35** (5): 806~813
- 33 Frochot C, Di Stasio B, Vanderesse R, *et al.* Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorganic Chemistry*, 2007, **35**(3): 205~220
- 34 Conway C L, Walker I, Bell A, *et al.* *In vivo* and *in vitro* characterisation of a protoporphyrin IX -cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2008, **7** (3): 290~298
- 35 Dubuc C, Langlois R, Benard F, *et al.* Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine-bombesin conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, **18** (7): 2424~2427
- 36 Stefflova K, Chen J, Marotta D, *et al.* Photodynamic therapy agent with a built-in apoptosis sensor for evaluating its own therapeutic outcome *in situ*. *J Medicinal Chemistry*, 2006, **49** (13): 3850~3856
- 37 Sibrian-Vazquez M, Jensen T J, Hammer R P, *et al.* Peptide-mediated cell transport of water soluble porphyrin conjugates. *J Medicinal Chemistry*, 2006, **49** (4): 1364~1372

Applications of Peptide Conjugated Photosensitizers in Photodynamic Therapy*

CHEN Hong-Wei^{1,2)}, CHEN Jin-Can¹⁾, CHEN Nai-Sheng³⁾, HUANG Jin-Ling³⁾,
WANG Jun-Dong³⁾, HUANG Ming-Dong^{1)**}

⁽¹⁾State Key Laboratory of Structural Chemistry, Fujian Institute of Research on the Structure of Matter,
The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China;

⁽²⁾Graduate University of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

⁽³⁾Institute of Functional Materials, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract Photodynamic therapy (PDT) relies on the interaction of light, photosensitizer, and the presence of oxygen, leading to cytotoxicity to the tissue containing the photosensitizer. The tissue specificity of photosensitizer is thus one of the key factors in photodynamic therapy. The limited targeting capability of current photosensitizers that are in the clinical applications has led to the active development of the new generation of photosensitizer. Another approach-peptide conjugation-to enhance the tissue specificity of photosensitizers were reviewed. The cell penetrating peptides, vasculature targeting peptides, and peptides targeting cell surface receptors were reviewed. The current research indicates that the effectiveness of peptide conjugation to confer the tissue specificity to photosensitizers.

Key words photodynamic therapy, photosensitizer, cancer, targeted, peptide

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00080

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A313) and The National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar(30625011).

**Corresponding author. Tel: 86-591-83704996, E-mail: mhuang@fjirsm.ac.cn

Received: February 15, 2009 Accepted: May 18, 2009