

自组装型树形分子在生物医学领域的研究进展

史康洁¹, 陈家轩^{1,2}, 刘潇璇^{1*}, 彭玲^{2**}

(¹中国药科大学,天然药物活性组分与药效国家重点实验室,药物科学研究院高端药物制剂与材料研究中心,南京 210009;

²法国国家科学院马赛纳米交叉科学研究中心,艾克斯马赛大学,法国马赛 13188)

摘要 树形分子因其具有独特的树枝状分子结构以及多价协同作用等特性在生物医学领域具有广阔的应用前景。然而树形分子合成繁琐费时、纯化困难,使得大规模制备高代无缺陷的树形分子困难重重。为了克服这一困难,研究人员提出了一种基于自组装的方法构建树形分子的策略,即利用低代的两亲性树形分子自组装构建非共价超分子树形分子,用以模拟高代共价树形分子。本文介绍超分子树形分子的研究及其在生物医学领域的应用,例如输送小分子抗肿瘤药物、核酸治疗试剂和分子造影剂等,并通过一些代表性的实例展现超分子树形分子的应用前景与挑战。

关键词 聚酰胺-胺类树形分子; 自组装型树形分子; 树形分子合成; 药物递送; 基因递送

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)01-0020-11

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20210103

引用本文 史康洁,陈家轩,刘潇璇,等.自组装型树形分子在生物医学领域的研究进展[J].中国药科大学学报,2021,52(1):20–30.

Cite this article as: SHI Kangjie, CHEN Jiaxuan, LIU Xiaoxuan, et al. Self-assembling dendrimers for biomedical applications[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(1): 20–30.

Self-assembling dendrimers for biomedical applications

SHI Kangjie¹, CHEN Jiaxuan^{1,2}, LIU Xiaoxuan^{1*}, PENG Ling^{2**}

¹State Key Laboratory of Natural Medicines, Center of Advanced Pharmaceuticals and Biomaterials, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ²Interdisciplinary Center of Nanoscience of Marseille, Aix-Marseille University, CNRS, Marseille 13188, France

Abstract Dendrimers, a special class of synthetic polymers known for their well-defined ramified structures and unique multivalent cooperativity, hold great promise for various biomedical applications. However, preparation of defect-free dendrimers of high-generation on a large scale remains challenging because of the tedious and time-consuming synthesis as well as difficult purification. To overcome these limitations, an alternative strategy based on self-assembling approach has been developed to construct supramolecular dendrimers using small amphiphilic dendrimer-building units. By virtue of the amphiphilic nature, these small dendrimer-building units self-assemble and form large non-covalent supramolecular dendritic structures that mimic high-generation covalent dendrimers. Here, we present a brief overview of the supramolecular dendrimers developed in our group for the delivery of nucleic acid therapeutics, anticancer drug and imaging agents.

Key words poly(amidoamine) dendrimer; self-assembling dendrimers; dendrimer synthesis; drug delivery; gene delivery

收稿日期 2020-06-02 通信作者 *Tel:025-83171175 E-mail:xiaoxuanliucpu@163.com

**Tel:0033-6-17248164 E-mail:ling.peng@univ-amu.fr

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 50773127, No. 81701815);国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作/港澳台科技创新合作”重点专项资助项目(No. 2018YFE0117800);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20170734);江苏省“高层次创新创业人才引进计划”资助项目;中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室资助项目(No. SKLN-MZZ202007);法国外交部埃菲尔奖学金、法国国家癌症防治联盟资助项目

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50773127, No. 81701815), the Key Program for International S&T Cooperation Projects of China (No. 2018YFE0117800), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20170734), the Program for Jiangsu Province Innovative Research Talents, the State Key Laboratory of Natural Medicines at China Pharmaceutical University (No. SKLMZ202007), Bourse d'Excellence Eiffel and Ligue Nationale Contre le Cancer

1 树形分子

1978 年, Buhleier 等^[1]第一次合成了树枝状分子, 又称为“级联分子”。尽管这些都是小分子, 并不属于高分子, 但它们的出现标志着树形分子概念的开始。1985 年, Tomalia 等^[2]成功制备了第 1 代到第 7 代的聚酰胺-胺类树形分子 (PAMAM), 这是第一个完整系列的树形分子。这项开创性的工作激发了科学界对树形分子研究的极大兴趣, 包括树形分子的化学合成、结构表征和功能评估及应用^[2-6]。

树形分子是一类具有独特的树枝状结构的合成高分子(图 1)。“树形分子”一词起源于希腊语“dendron”和“mer”, 分别指“树”和“部分”, 用来描述具有树状树突特征的分子^[2, 7]。树形分子具有 3 个明确的结构组成单元:(1)中心核, 它是树形分子开始生长的起点;(2)重复的分支单元, 它是使树形分子在径向层中生长的结构单元, 每一层称为树形分子的一代(generation, G);(3)众多的末端官能团。这些特殊的结构特征使树形分子有别于传统的线性、交化和超支化聚合物, 同时也赋予了树形分子独特的功能特性和多价协同作用。

由于树形分子特殊的分子结构和多价协同作用, 它们在生物医学领域有着广泛的应用前景, 例

如诊断、药物和药物递送以及基因递送^[8-15]。树形分子的生物医学应用是否能成功转化很大程度上取决于其可及性。传统的树形分子制备过程相当繁琐和耗时, 而且制备过程中产生的树形分子的杂质与目标树形分子具有相似的化学组成和物理性质, 使得树形分子的纯化通常非常困难^[16]。为了克服这一局限, Peng 课题组提出了一种基于自组装策略合成树形分子^[17-18], 即将低代的两亲树形分子组装成非共价超分子树形分子, 用以模拟传统的树形分子。该团队利用这一策略成功地构建了不同的超分子树形分子, 并将其用于递送各类药物, 如小分子抗肿瘤药物、核酸药物和分子造影剂^[19-25]。本文介绍近年来自组装超分子树形分子领域的研究进展, 包括树形分子及其常用的合成策略以及超分子树形分子的制备方法, 并用一些代表性实例重点介绍超分子树形分子相关的生物医学应用。

2 树形分子的合成

不同于传统高分子“一锅煮”的制备方法, 树形分子是通过逐步合成法来构建的, 这一方法使树形分子具有精确的结构和优异的单分散性。树形分子的合成策略一般可分为发散法、收敛法或发散/收敛组合法(图 2)^[3, 5-6, 26]。发散法的策略是从多功能中心核出发, 通过一系列交替重复反应向外延伸来合成树形分子(图 2-A)。而收敛法则与之相反, 树形分子的制备始于树形分子表面的小结构单元, 再将其通过一系列向内的反应最终附着在树形分子的核心上(图 2-B)^[27]。在发散/收敛组合法(亦称为双阶段收敛法)中(图 2-C), 树形分子物的制备可兼具发散和收敛两种方法的优势, 并且通过减少反应步骤进一步加快和改善制备过程^[27-28]。

通过发散法可以制备高达 10 代的树形分子, 但高代树形分子常伴有结构缺陷。随着树形分子代数的增长, 空间位阻的增加会不可避免地引起反应不完全以及各种副反应, 从而产生结构缺

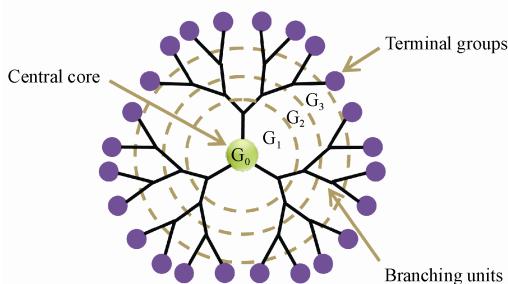


Figure 1 Illustration of the structure of a dendrimer composed of a central core, the repetitive branching units which form the generations, and the terminal groups on the dendrimer surface. The central core itself is generation 0 (G_0); generation 1 (G_1), generation 2 (G_2) and generation 3 (G_3) refer to dendrimers with the first, second and third levels of branching, respectively

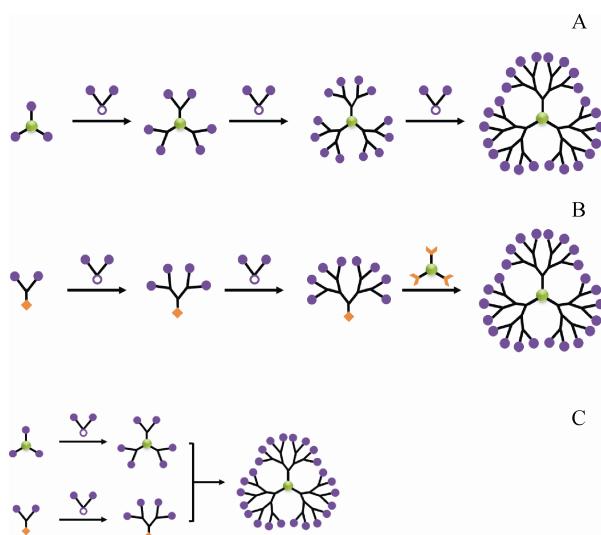


Figure 2 Cartoon presentation of the different approaches for dendrimer synthesis
A:Divergent approach; B:Convergent approach; C:Combined divergent and convergent approach

陷^[17, 26]。结构缺陷的树形分子通常具有与结构完整的树形分子相似的化学组成和物理性质,因此难以分离除去。相比之下,使用收敛法可以更好的控制树形分子的合成,减少甚至抑制结构缺失。在收敛法合成过程中产生的杂质,由于与目标树形分子的大小、结构和物理性质都有很大的区别,因此很容易被分离除去。然而,随着树形分子代数的增长,其空间位阻也随之增大,导致连接到中心核时的反应活性显著降低,因此,收敛法常用于制备代数不高的树形分子。

发散/收敛组合法集发散法和收敛法的优势于一身。这一策略首先通过发散法合成树形分子所需的各种结构单元,然后通过收敛法将结构单元

组合成目标树形分子^[27–28]。利用这一方法构建树形分子时,反应数量和纯化工作都相对减少,使得合成效率较单独的发散法或收敛法而言更高^[26–27]。这一方法的另一优点在于可以在合成中对结构单元进行修饰改造,从而赋予树形分子丰富多样的结构。

不同于传统树形分子合成方法,Peng课题组提出了自组装的方法构建非共价自组装超分子树形分子的策略,即利用低代的两亲性树形分子组装成超分子树形分子来模拟的高代共价树形分子(图3)^[17–22, 25, 29]。自组装是通过多种非共价相互作用的累积效应,将各种分子结构单元进行可逆、可控且具有特异性的组装^[30–32]。同时,利用这种策略制备超分子树形分子所需的合成工作量相对较少。例如,Chen等^[20]合成的两亲性树形分子是由亲水和疏水两个模块组成:以烷基链为疏水模块,以低代的树枝状结构为亲水模块;亲水和疏水模块可以同时进行合成和各种功能化修饰,然后将两者通过条件温和、反应高效且产率较高的点击反应进行偶联,得到两亲性树形分子,最后通过简单的自组装制备所需的超分子树形分子。超分子树形分子的整个制备周期相对于传统树形分子大大缩短,且两亲性树形分子的相对分子质量仅为高代的传统树形分子的相对分子质量的十分之一,制备难度也大大降低。因此,利用自组装技术制备超分子树形分子的策略为构建具有全新特性的树形分子提供了一个既简便又经济的途径。这一全新的合成策略简单易行且极具吸引力,为树形分子的合成及其相关应用提供了新的思路。

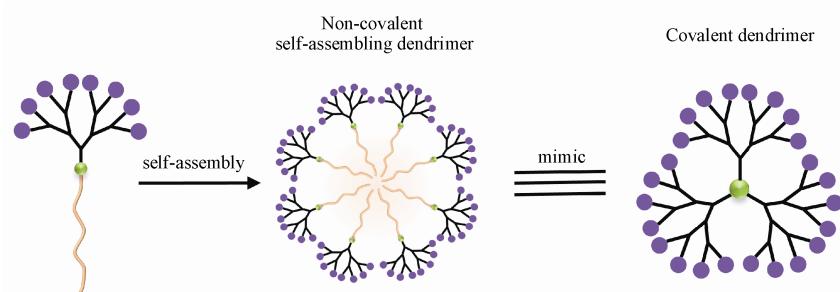


Figure 3 Illustration of the self-assembly approach for constructing the non-covalent self-assembling dendrimer to mimic the covalent dendrimer of high-generation^[17]

3 聚酰胺-胺类(PAMAM)树形分子

聚酰胺-胺类(PAMAM)树形分子是迄今为止研究得最为广泛和深入的一类树形分子。PAMAM 树形分子具有与多肽相似的化学结构和组成:其内部有大量的酰胺骨架和叔胺结构,表面有众多的伯胺结构,因此有“人造蛋白质”的美誉^[2]。PAMAM 的这些结构特征使得它具有优异的生物相容性和水溶性,因此相较于其他树形分子而言被更广泛地用于生物医学领域,例如作为药物,或是作为载体输送药物、核酸和造影剂,以实现治疗和诊断疾病的目的^[15, 17, 33]。

Tomalia 等^[2, 7]在 1985 年第一次报道了利用反复交替的迈克尔加成和酰胺化两步反应制备

PAMAM 树形分子。他们以氨或乙二胺为起始原料,将其与丙烯酸甲酯通过迈克尔加成反应得到酯基末端的树形分子,随后与大量过量的乙二胺进行酰胺化反应生成氨基末端的树形分子,通过重复这一反应过程得到了高达 7 代的树形分子(图 4)。整个树形分子的制备过程均在温和的条件下进行且能以高产率得到目标树形分子。然而,在制备高代的树形分子时容易出现严重的结构缺失问题;而且结构缺失的树形分子在化学组成和理化性质上与完整树形分子相差甚小,因而难以分离。为了得到高质量的 PAMAM 树形分子,常用透析法除去低代数的树形分子杂质,用高效液相色谱或凝胶渗透色谱除去结构缺失的树形分子^[17, 34]。

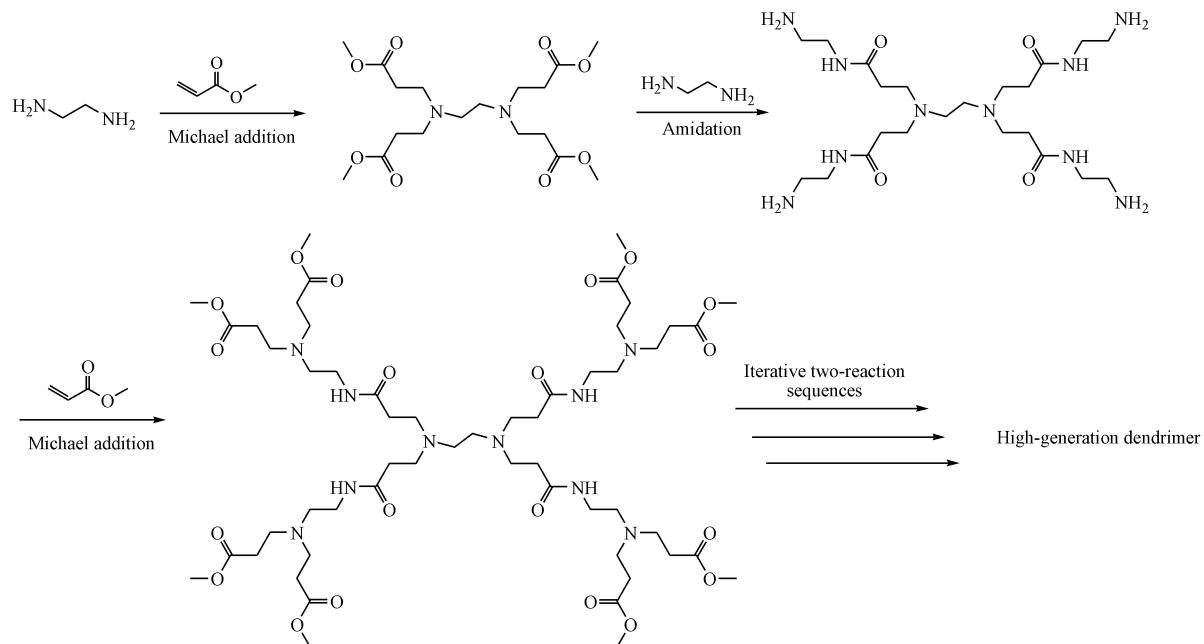


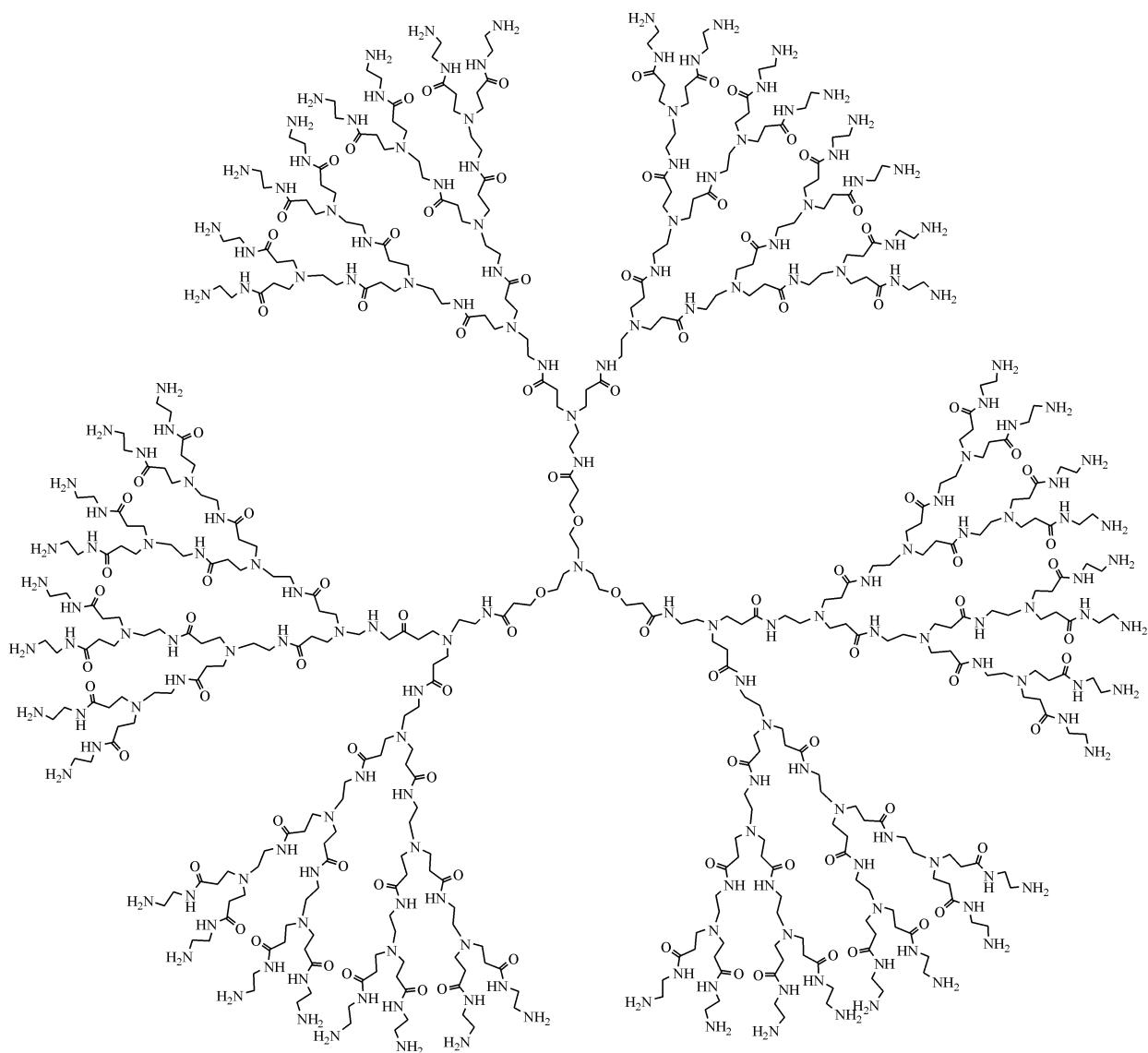
Figure 4 Synthesis of PAMAM dendrimers via the iterative two-reaction sequences consisting of Michael addition and subsequent amidation^[2, 7]

尽管 PAMAM 树形分子也可以使用收敛法和固相合成法来制备^[17],但 Tomalia 等^[2, 7]发明的合成方法因条件温和,易于操作且收率高,所以仍是制备 PAMAM 树形分子的首选方法。Peng 课题组利用上述制备方法合成了以三乙醇胺(TEA)为核,结构柔顺的 PAMAM 树形分子 1(图 5),并用它模拟组蛋白(DNA 的结合蛋白)用于核酸递送^[35-38]。其中第 5 代的树形分子在输送各种小核酸药物方面表现尤其出色^[36, 38-47],因而曾计划将其递送的小活化核酸药物(saRNA)推向临床以治疗晚期肝癌^[45]。

遗憾的是,由于缺乏符合 GMP(良好生产规范)标准的树形分子,临床试验最终使用了脂质载体 Smarticles^[48]。此树形分子在临床转化上的失败也反映了目前树形分子在生物医学领域应用的现状,即树形分子在生物医学中具有广阔的应用前景,但是其临床转化在很大程度上受制于其合成的困难^[16]。

4 自组装型超分子 PAMAM 树形分子

虽然树形分子在生物医学领域的学术研究中



1

Figure 5 Chemical structure of a 4th generation of poly(amido)amine (PAMAM) dendrimer bearing a triethanolamine-core^[35]

有着广泛的应用,但其临床转化方面仍然面临着巨大的挑战,究其原因主要是无法大规模生产高质量且无缺陷的高代树形分子。在此背景下,研究人员提出了利用自组装的方法将低代的两亲性树形分子组装成超分子树形分子的这一个全新的树形分子合成策略(图3)^[18–25]。这些低代的两亲性树形分子是由疏水性长烷基链和低代的亲水性PAMAM树枝状结构通过点击化学反应偶联而合成的^[19–25, 49–52];它们能够自组装并形成稳定的超分子树形分子^[19–25, 53]。通过改变两亲性树形分子的疏水链的长度和性质以及亲水性PAMAM树枝状结构的代数和末端的官能团的种类,可以调控超

分子树形分子的大小和形状^[19–22],并应用于输送小分子抗肿瘤药物、核酸治疗试剂和分子造影剂等^[19–23, 50–52]。以下通过几个代表性的实例介绍本课题组在这个方向上的研究工作。

4.1 药物递送

与共价构建的树形分子不同,由低代两亲性树形分子自组装构建的超分子树形分子在其核心中具有较大的疏水性空腔,可用于装载疏水性药物以进行药物递送。因此,Wei等^[19]利用两亲性树形分子2自组装构建了超分子树形分子药物递送系统(图6)。树形分子2是由两条疏水烷基链和一个低代的亲水性PAMAM树枝状结构组成。它能

够自组装形成均一且稳定的超分子树形分子, 并高效装载抗肿瘤药物阿霉素(DOX)。得益于独特的树枝状结构, 两亲性树形分子 $\mathbf{2}$ 所形成的超分子树形分子具有独特且庞大的疏水空腔, 能够容纳大量 DOX, 其载药量可高达 39% 以上。载有 DOX 的超分子树形分子通过巨胞饮作用进入细胞, 显著提高了药物在肿瘤细胞中的摄取, 同时避免了

细胞对药物的外排作用, 改善了肿瘤细胞对药物的耐药性; 同时, 在乳腺癌荷瘤小鼠模型中, 该载药系统展现出明显高于游离药物 DOX 和临床纳米药物 Doxil 的抗肿瘤效果, 且消除了与药物相关的毒性, 增加了用药的安全性。研究结果显示, 超分子树形分子是一类非常新颖而有效的药物输送系统。

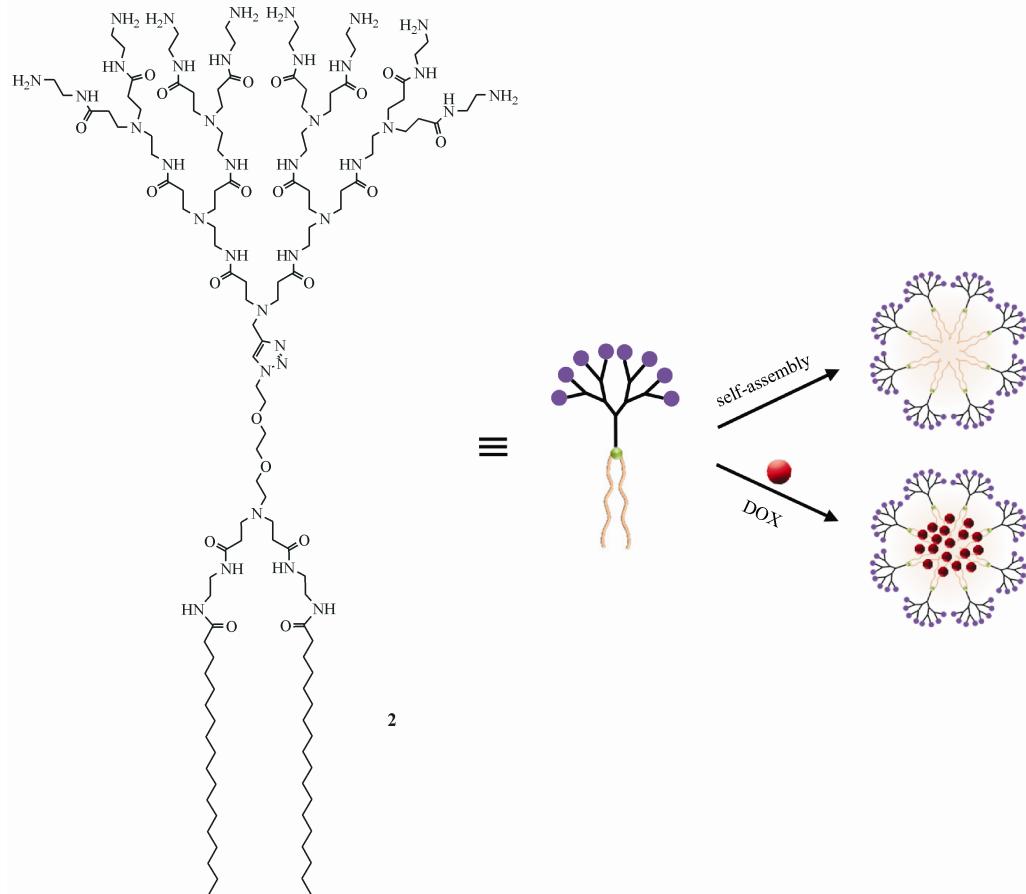


Figure 6 Self-assembling supramolecular PAMAM dendrimers for drug delivery by physical encapsulation of drug molecules within the interior^[19]

此外, 两亲树形分子的末端也可用于共价缀合多个生物活性分子, 随后其自组装形成超分子树形分子进行药物递送。基于此设想, Zhou 等^[52]尝试将核苷药物类似物通过酯键连接到树形分子的末端, 得到两亲树形分子 $\mathbf{3}$ (图 7), 拟通过酶促水解释放核苷药物类似物。然而在考察药物释放的过程中, 发现树形分子代数与树形分子药物缀合物 $\mathbf{3}$ 的酶促水解效率却呈现出反向关系: 随着代数的增加, 酶促水解的速度明显降低。这种有趣的负面树状效应可以用于指导构建具有特殊稳定性树形分子药物缀合物, 以实现可控的药物释放。

4.2 核酸递送

图 8 是 Yu 等^[51]合成的第一个用于构建超分子树形分子的两亲性树形分子。该两亲性树形分子 $\mathbf{4}$ 是由一个 C₁₈ 的疏水烷基链和一个具有 8 个胺基末端的亲水性 PAMAM 树枝状结构组成。它可以自组装成尺寸约为 7.0 nm 的超分子树形分子, 该尺寸与 Liu 等^[37]前期制备的高代的 TEA 为核的共价 PAMAM 树形分子的尺寸相似。同时, 这种超分子树形分子能够模拟第 5 代的 TEA 为核的 PAMAM 树形分子, 成功将 siRNA 递送到不同类型的细胞中, 在体外和体内均能产生显著的基因沉

默效果^[20]。这是成功利用超分子树形分子递送功能性 siRNA 药物的首次报道,同时也证实了超分

子树形分子在大小、形状和 siRNA 递送能力方面都能成功的模拟共价构建的高代树形分子。

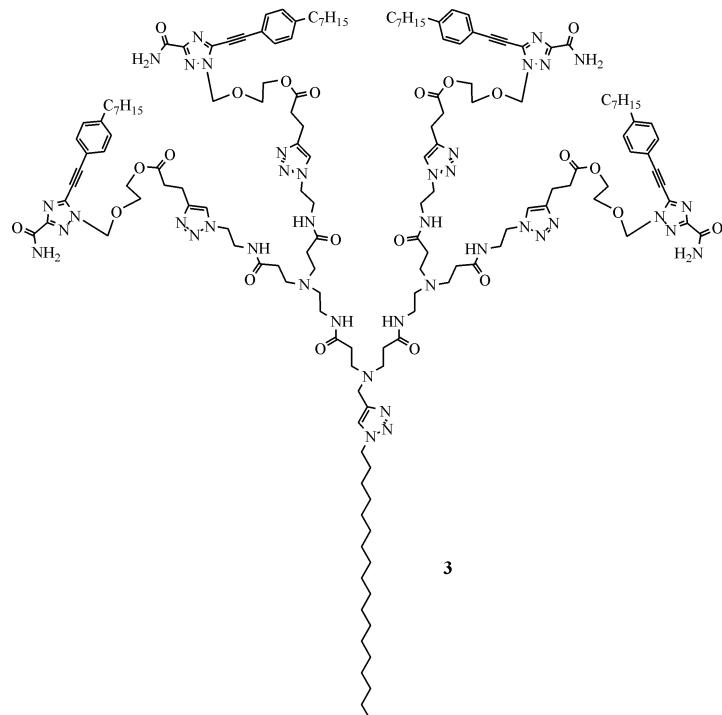


Figure 7 Enzyme-responsive amphiphilic dendrimer **3** bearing bioactive nucleoside analogues at the terminals for drug delivery^[52]

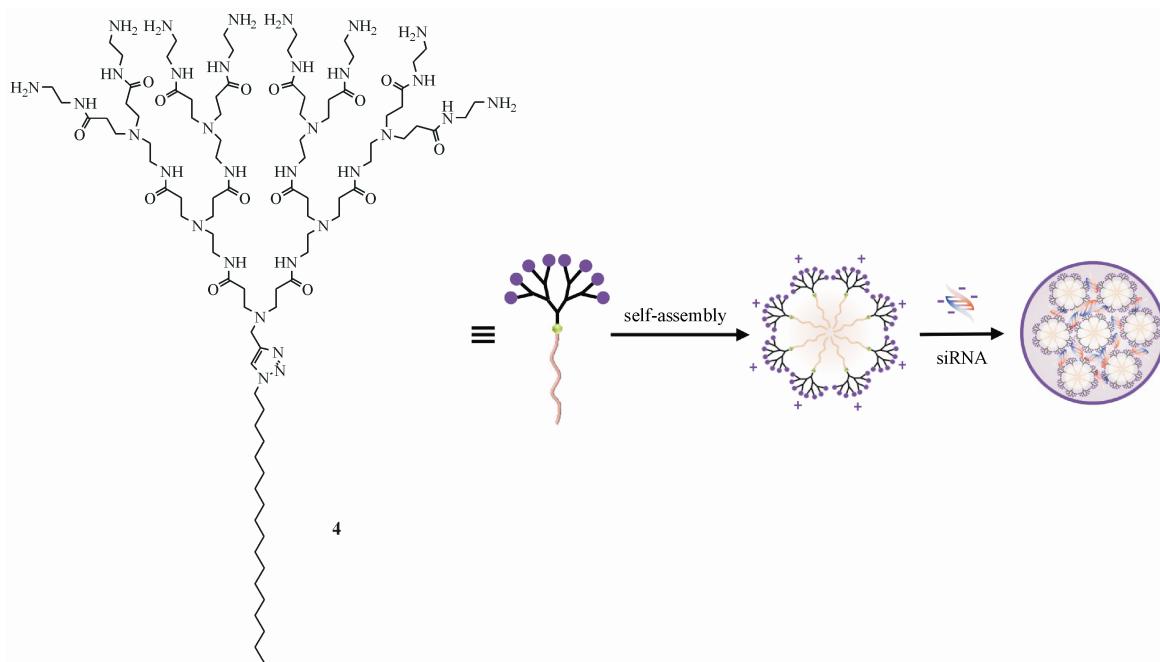


Figure 8 Supramolecular dendrimers constructed via self-assembly of small amphiphilic dendrimer **4** bearing a hydrophobic C₁₈ alkyl chain and a hydrophilic PAMAM dendron with 8 amine-terminals for siRNA delivery^[20, 51]

为了进一步提高载体的递送能力,Liu 等^[50]在两亲性树形分子**4**的表面修饰上精氨酸残基,得到

了两亲性树形分子**5**(图9)。研究人员期望基于**5**的超分子树形分子能够模拟富含精氨酸的多肽并

具有细胞穿透优势^[54], 以提高递送 siRNA 的效率。富含精氨酸的细胞穿膜肽的每个精氨酸残基在生理条件下(pH 7.4)都有一个带正电荷的伯胺和一个带正电荷的胍基, 因此可与细胞膜中带有负电荷组分相互作用, 促进其膜渗透。另外, 精氨酸残基可通过其结构中的胍基与细胞膜表面的磷酸

根、羧酸根和硫酸根等基团产生氢键进而与细胞膜发生相互作用。因此, 表面带有精氨酸残基的两亲性树形分子 5 能显著提高 siRNA 在不同类型的人源细胞(例如人源前列腺癌细胞 PC-3 和人源造血 CD33⁺干细胞)中的摄取, 从而进一步提高 siRNA 的递送效率和基因沉默效果^[50]。

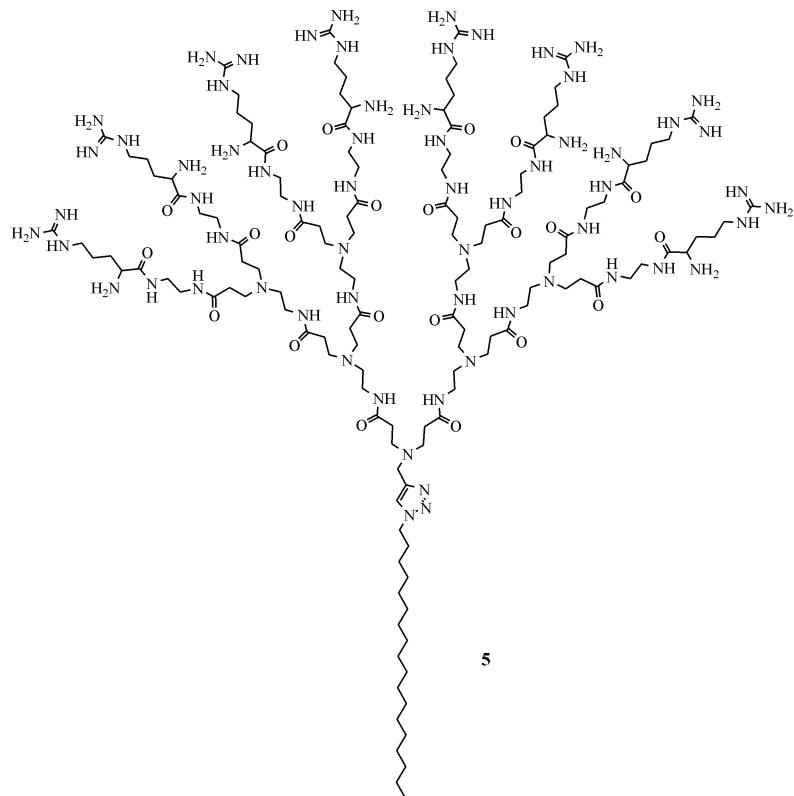


Figure 9 Chemical structure of the small amphiphilic dendrimer 5 bearing a hydrophobic C₁₈ alkyl chain and a hydrophilic PAMAM dendron with 8 arginine-terminals for siRNA delivery^[50]

4.3 生物成像

两亲性树形分子的树枝状末端也可以与造影剂偶联, 然后自组装成为超分子树形分子用于生物成像。例如, 基于两亲性树形分子 6, Garrigue 等^[21]得到了一种用于正电子发射断层扫描(PET)成像的超分子树形分子探针(图 10)。PET 成像通常用于评估病理生理功能。由于其具有灵敏度高、可定量分析及不受组织穿透力限制等优势, 因此被广泛应用于各种疾病的诊断, 包括许多肿瘤、心脏病和脑部疾病。Garrigue 等^[21]设计的两亲性树形分子 6 是由一个疏水烷基链 C₁₈ 和一个带有 4 个 PET 造影剂单元的亲水性 PAMAM 树枝状结构组成, 它能自组装形成均一的纳米球状超分子探针。得益于树形分子的多价特性及其肿瘤的高通透性

和滞留效应(EPR 效应), 该探针能够特异性富集在肿瘤部位进行 PET 成像, 并且展现出卓越的成像灵敏度。与临幊上使用的金标准 [¹⁸F]FDG(2-氟脱氧葡萄糖)相比, 该超分子探针的信号强度提高了 14 倍。最重要的是, 该超分子探针能成功检测到 [¹⁸F]FDG 难以发现的肿瘤, 如胰腺癌, 这也进一步证明了超分子树形分子探针的优异性能。此外, 该探针还具有非常有利的药代动力学特性和安全性。以上结果显示这种超分子树形分子探针的确是一种极具前途的肿瘤成像策略。同时, 这也是第一个成功将自组装超分子树形分子用作生物成像的研究实例。

在此基础上, Ding 等^[22]进一步构建了超分子树形分子探针 7 用于单光子发射计算机断层扫描

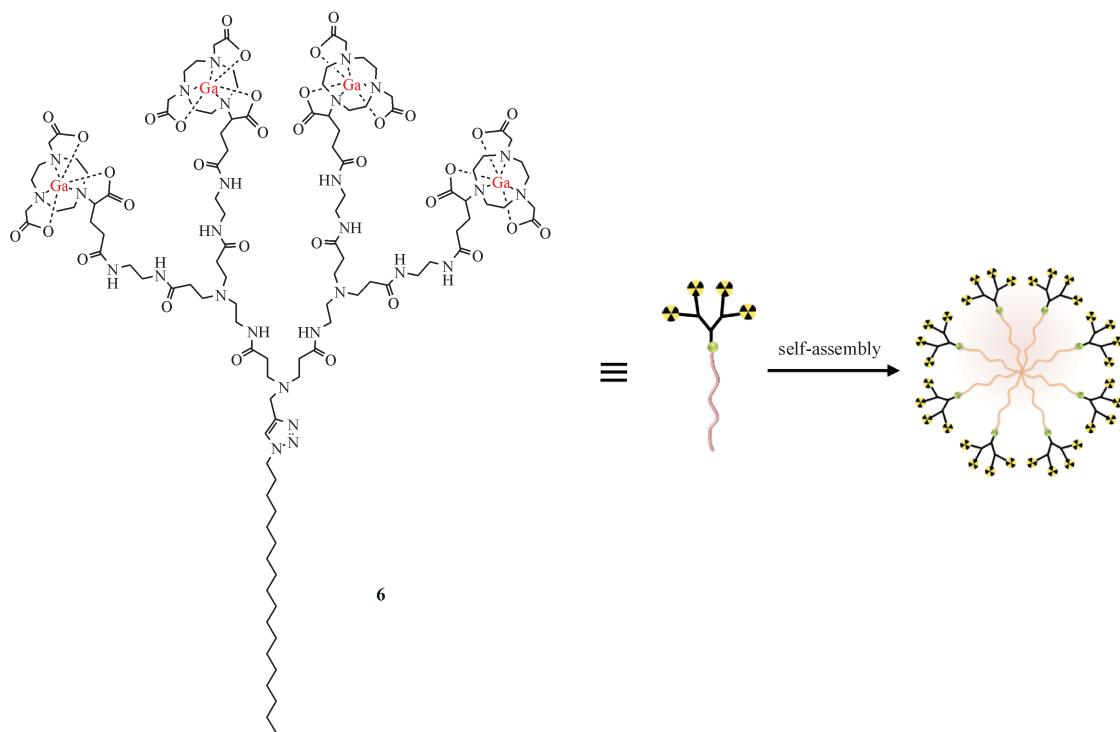


Figure 10 Supramolecular dendrimers constructed via self-assembly of small amphiphilic dendrimer **6** bearing a hydrophobic alkyl chain and a hydrophilic PAMAM dendron with 4 terminals carrying the radioactive Ga³⁺/NOTA-entities for PET imaging^[21]

(SPECT)成像(图11)。与PET相比,SPECT在临床上的应用更加广泛,这是因为它有更高的性价比,尽管它的灵敏度和分辨率不及PET。而且,SPECT能同时使用不同能量的放射性核素进行成像。此外,SPECT放射性示踪剂通常具有较长的半衰期,从而可以表征耗时较长的(如数小时或数天)的生理病理过程。在此研究中,放射性核素 [¹¹¹In]In被选用为SPECT成像的示踪剂,用于肿瘤的检测。Ding等^[22]成功地合成了由C₁₈的疏水烷基链和亲水的PAMAM树枝状结构组成的两亲树形分子**7**,其PAMAM树枝状结构的4个末端带有由In³⁺/DOTA配合物组成的SPECT成像报告单元。与预期一致,在异种移植和原位肿瘤小鼠模型中,由树形分子**7**自组装形成的纳米尺寸均一的超分子树形分子探针可对肿瘤进行有效的SPECT成像。

5 总结与展望

本文介绍了构建树形分子的不同策略,特别是基于自组装的方法构建超分子树形分子的策

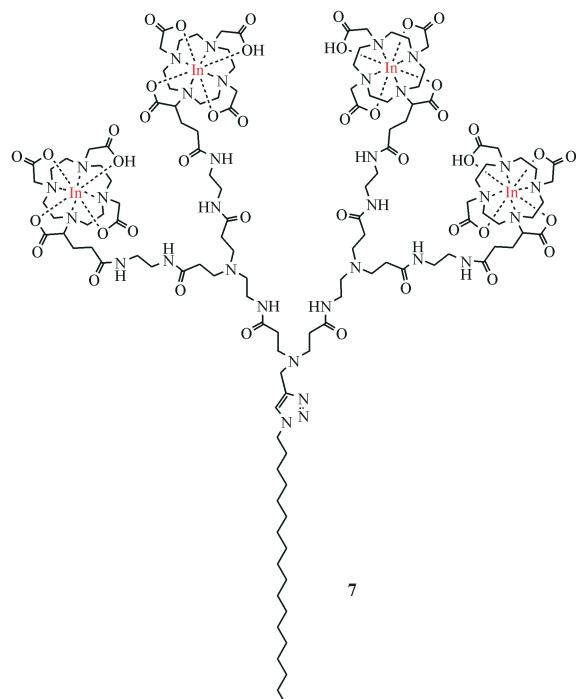


Figure 11 Chemical structure of the small amphiphilic dendrimer **7** bearing a hydrophobic alkyl chain and a hydrophilic PAMAM dendron with 4 terminals carrying the radioactive In³⁺/DOTA-entities for SPECT imaging^[22]

略。研究者们提出了利用低代的且易于合成的两亲树形分子自组装构筑超分子树形分子这一全新的树形分子合成理念, 并用此策略成功地构建了一系列超分子树形分子^[17]。这些超分子树形分子能模拟共价结构的高代 PAMAM 树形分子, 成功用于输送抗肿瘤药物、核酸药物以及造影剂, 为创建新颖和多功能性的树形分子提供了新的视角^[18]。这种基于自组装技术构建超分子树形分子的合成策略预计会给树形分子的研究带来新的变革, 同时也能为 PAMAM 树形分子以及其他类型的树形分子在生物医学领域的应用提供新的推动力。

References

- [1] Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. "Cascade" and "nonskid-chain-like" syntheses of molecular cavity topologies [J]. *Synthesis-Stuttgart*, 1978, **2**: 155-158.
- [2] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, et al. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules[J]. *Polym J*, 1985, **17**(1): 117-132.
- [3] Tomalia DA, Fréchet JMJ. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: a brief historical perspective [J]. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2002, **40**(16): 2719-2728.
- [4] Tomalia DA, Naylor AM, Goddard III WA, GW. Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1990, **29**(2): 138-175.
- [5] Vögtle F, Richardt G, Werner N. Dendrimer chemistry: concepts, synthesis, properties, applications [M]. Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [6] Tomalia DA, Christensen JB, Boas U. *Dendrimers, dendrons, and dendritic polymers* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- [7] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers [J]. *Macromolecules*, 1986, **19**(9): 2466-2468.
- [8] Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial[J]. *Chem Soc Rev*, 2011, **40**(1): 173-190.
- [9] Cheng Y, Zhao L, Li Y, et al. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, **40**(5): 2673-2703.
- [10] Menjoge AR, Kannan RM, Tomalia DA. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nano-medical applications[J]. *Drug Discov Today*, 2010, **15**(5/6): 171-185.
- [11] Medina SH, El-Sayed MEH. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents [J]. *Chem Rev*, 2009, **109** (7): 3141-3157.
- [12] Tekade RK, Kumar PV, Jain NK. Dendrimers in oncology: an expanding horizon[J]. *Chem Rev*, 2009, **109**(1): 49-87.
- [13] Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, et al. Designing dendrimers for biological applications [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(12): 1517-1526.
- [14] Cai G, Chen Y, Lin S, et al. Application of dendrimer-based siRNA delivery systems[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2019, **50**(3): 274-288.
- [15] Kannan RM, Nance E, Kannan S, et al. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications[J]. *J Intern Med*, 2014, **276**(6): 579-617.
- [16] Svenson S. The dendrimer paradox: high medical expectations but poor clinical translation [J]. *Chem Soc Rev*, 2015, **44**(12): 4131-4144.
- [17] Lyu Z, Ding L, Huang AYT, et al. Poly (amidoamine) dendrimers: covalent and supramolecular synthesis [J]. *Mater Today Chem*, 2019, **13**: 34-48.
- [18] Lyu Z, Ding L, Tintaru A, et al. Self-assembling supramolecular dendrimers for biomedical applications: lessons learned from poly (amidoamine) dendrimers [J]. *Acc Chem Res*, 2020. doi: 10.1021/acs.accounts.0c00589.
- [19] Wei T, Chen C, Liu J, et al. Anticancer drug nanomicelles formed by self-assembling amphiphilic dendrimer to combat cancer drug resistance [J]. *PNAS*, 2015, **112** (10) : 2978-2983.
- [20] Chen C, Posocco P, Liu X, et al. Mastering dendrimer self-assembly for efficient siRNA delivery: from conceptual design to *in vivo* efficient gene silencing[J]. *Small*, 2016, **12**(27) : 3667-3676.
- [21] Garrigue P, Tang J, Ding L, et al. Self-assembling supramolecular dendrimer nanosystem for PET imaging of tumors [J]. *PNAS*, 2018, **115**(45): 11454-11459.
- [22] Ding L, Lyu Z, Tintaru A, et al. A self-assembling amphiphilic dendrimer nanotracer for SPECT imaging [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, **56**(2): 301-304.
- [23] Dong YW, Yu TZ, Ding L, et al. A dual targeting dendrimer-mediated siRNA delivery system for effective gene silencing in cancer therapy[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(47): 16264-16274.
- [24] Liu XX, Zhou JH, Yu TZ, et al. Adaptive amphiphilic dendrimer-based nanoassemblies as robust and versatile siRNA delivery systems [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(44): 11822-11827.
- [25] Dhumal D, Lan W, Ding L, et al. An ionizable supramolecular dendrimer nanosystem for effective siRNA delivery with a favourable toxicity profile [J]. *Nano Research*, 2020. doi: 10.1007/s12274-020-3216-8.
- [26] Walter MV, Malkoch M. Simplifying the synthesis of dendrimers: accelerated approaches[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**

- (13): 4593-4609.
- [27] Grayson SM, Fréchet JM. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications [J]. *Chem Rev*, 2001, **101**(12): 3819-3868.
- [28] Wooley KL, Hawker CJ, Fréchet JM. Hyperbranched macromolecules via a novel double-stage convergent growth approach [J]. *J Am Chem Soc*, 1991, **113**(11): 4252-4261.
- [29] Cao Y, Liu X, Peng L. Molecular engineering of dendrimer nanovectors for siRNA delivery and gene silencing [J]. *Front Chem Sci Eng*, 2017, **11**(4): 663-675.
- [30] Lehn JM. Toward self-organization and complex matter [J]. *Science*, 2002, **295**(5564): 2400-2403.
- [31] Webber MJ, Appel EA, Meijer EW, et al. Supramolecular biomaterials [J]. *Nat Mater*, 2016, **15**(1): 13-26.
- [32] Aida T, Meijer EW, Stupp SI. Functional supramolecular polymers [J]. *Science*, 2012, **335**(6070): 813-817.
- [33] Lyu Z, Ding L, Dhumal D, et al. CHAPTER 4 Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: synthesis and biological applications [M]// The Royal Society of Chemistry. Dendrimer Chemistry: Synthetic Approaches Towards Complex Architectures, 2020: 85-113.
- [34] Mullen DG, Desai A, van Dongen MA, et al. Best practices for purification and characterization of PAMAM dendrimer [J]. *Macromolecules*, 2012, **45**(12): 5316-5320.
- [35] Wu JY, Zhou JH, Qu FQ, et al. Polycationic dendrimers interact with RNA molecules: polyamine dendrimers inhibit the catalytic activity of *Candida* ribozymes [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2005(3): 313-315.
- [36] Zhou JH, Wu JY, Hafdi N, et al. PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2006(22): 2362-2364.
- [37] Liu XX, Wu JY, Yammine M, et al. Structurally flexible triethanolamine core PAMAM dendrimers are effective nanovectors for DNA transfection *in vitro* and *in vivo* to the mouse *Thymus* [J]. *Bioconjug Chem*, 2011, **22**(12): 2461-2473.
- [38] Ma J, Kala S, Yung S, et al. Blocking stemness and metastatic properties of ovarian cancer cells by targeting p70^{S6K} with dendrimer nanovector-based siRNA delivery [J]. *Mol Ther*, 2018, **26**(1): 70-83.
- [39] Liu XX, Rocchi P, Qu FQ, et al. PAMAM dendrimers mediate siRNA delivery to target Hsp27 and produce potent antiproliferative effects on prostate cancer cells [J]. *ChemMedChem*, 2009, **4**(8): 1302-1310.
- [40] Zhou JH, Neff CP, Liu XX, et al. Systemic administration of combinatorial dsRNAs via nanoparticles efficiently suppresses HIV-1 infection in humanized mice [J]. *Mol Ther*, 2011, **19**(12): 2228-2238.
- [41] Liu XX, Liu C, Laurini E, et al. Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer [J]. *Mol Pharm*, 2012, **9**(3): 470-481.
- [42] Posocco P, Liu XX, Laurini E, et al. Impact of siRNA overhangs for dendrimer-mediated siRNA delivery and gene silencing [J]. *Mol Pharm*, 2013, **10**(8): 3262-3273.
- [43] Kala S, Mak AS, Liu XX, et al. Combination of dendrimer-nanovector-mediated small interfering RNA delivery to target Akt with the clinical anticancer drug paclitaxel for effective and potent anticancer activity in treating ovarian cancer [J]. *J Med Chem*, 2014, **57**(6): 2634-2642.
- [44] Liu XX, Liu C, Chen C, et al. Targeted delivery of dicer-substrate siRNAs using a dual targeting peptide decorated dendrimer delivery system [J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2014, **10**(8): 1627-1636.
- [45] Reebye V, Sætrom P, Mintz PJ, et al. Novel RNA oligonucleotide improves liver function and inhibits liver carcinogenesis *in vivo* [J]. *Hepatology*, 2014, **59**(1): 216-227.
- [46] Cui Q, Yang S, Ye P, et al. Downregulation of TLX induces TET3 expression and inhibits glioblastoma stem cell self-renewal and tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10637.
- [47] Huang KW, Reebye V, Czysz K, et al. Liver activation of hepatocellular nuclear factor-4 α by small activating RNA rescues dyslipidemia and improves metabolic profile [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, **19**: 361-370.
- [48] First-in-human safety and tolerability study of MTL-CEBPA in patients with advanced liver cancer [EB/OL]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02716012>.
- [49] Liu X, Wang Y, Chen C, et al. A fluorinated bola-amphiphilic dendrimer for on-demand delivery of siRNA, via specific response to reactive oxygen species [J]. *Adv Funct Mater*, 2016, **26**(47): 8594-8603.
- [50] Liu XX, Liu C, Zhou JH, et al. Promoting siRNA delivery via enhanced cellular uptake using an arginine-decorated amphiphilic dendrimer [J]. *Nanoscale*, 2015, **7**(9): 3867-3875.
- [51] Yu TZ, Liu XX, Bolcato-Bellemin AL, et al. An amphiphilic dendrimer for effective delivery of small interfering RNA and gene silencing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(34): 8478-8484.
- [52] Zhou ZW, Cong M, Li MY, et al. Negative dendritic effect on enzymatic hydrolysis of dendrimer conjugates [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, **54**(47): 5956-5959.
- [53] Ding L, Lyu Z, Louis B, Tintaru A, et al. Surface charge of supramolecular nanosystems for *in vivo* biodistribution: a microSPECT/CT imaging study [J]. *Small*, 2020, **16**(37): e2003290.
- [54] Nakase I, Akita H, Kogure K, et al. Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides [J]. *Acc Chem Res*, 2012, **45**(7): 1132-1139.