

· 综述 ·

糖聚肽高分子的合成、自组装及生物医学应用*

肖春生 丁建勋 贺超良 陈学思**

(中国科学院长春应用化学研究所 中国科学院生态环境高分子重点实验室 长春 130022)

摘 要 糖聚肽高分子是一类由聚肽(也称聚氨基酸)和糖类化合物(包括单糖、寡糖和多糖)构成的生物可降解高分子。糖聚肽高分子具有与天然糖蛋白分子类似的化学组成,能够在一定程度上模拟天然糖蛋白的结构和性能,近年来引起了学术界的广泛研究兴趣。本文总结了糖聚肽高分子的合成方法及其在水溶液中的自组装行为,并着重评述了糖聚肽高分子在生物分子识别、靶向基因/药物传输和组织工程支架等生物医学领域中的应用。

关键词 糖聚肽, 聚氨基酸, 开环聚合, 自组装, 生物医学应用

蛋白质在酶的作用下与糖化合物结合形成糖蛋白的过程称为糖基化,是一种重要的翻译后修饰过程。糖基化不仅可以促使蛋白质发生折叠,增加蛋白质的热稳定性和酶解稳定性,更重要的是赋予蛋白质更多的与生命活动息息相关的生物学功能,如调控细胞黏附、生物分子输运、受体激活、信号传导和细胞内吞等^[1-3]。因此,通过化学方法构建糖蛋白类似物,不仅可以为深入研究糖蛋白的糖基化过程及其结构与性能之间的关系提供模型分子,而且有望发展一种具有生物活性功能的新型生物医用材料。有机化学合成糖蛋白(包括固相合成法、选择性化学修饰法、酶催化糖基化法以及生物半合成法等)是最直接也是最有效的构建天然糖蛋白类似物的方法,但该方法存在合成步骤繁琐、产量较低等局限性^[4-6]。通过高分子化学的方法合成糖聚肽高分子,是另外一种构建糖蛋白类似物的有效方法。与有机化学合成糖蛋白相比,糖聚肽高分子结构均一、合成简便、可批量化制备,不仅可以用作糖蛋白结构和性能研究的模型分子,而且已经发展成为一种新兴的生物医用高分子材料^[7-11]。

糖聚肽高分子是一类在聚氨基酸侧链或末端键合糖化合物的高分子。聚氨基酸的骨架结构

使得糖聚肽高分子具有良好的生物可降解性以及类似天然蛋白质的二级结构;而侧基或末端的糖化合物则赋予糖聚肽高分子诸多的生物活性功能,如生物分子识别、调控细胞黏附或介导细胞内吞等,从而使其有望在靶向药物传输和诱导组织再生等生物医用领域获得广泛应用^[8, 10, 11]。糖聚肽高分子的合成可以追溯到60年前。Rude等首先合成了多种基于丝氨酸的含糖N-羧基内酰胺(NCA)单体,再利用多肽末端的氨基引发该含糖丝氨酸NCA单体开环聚合,获得多种“糖基化”修饰的多肽高分子,并进一步研究了这类“糖基化”对多肽免疫原性的影响^[12, 13]。然而,糖聚肽高分子的合成长期以来受限于含糖NCA单体的纯度,难以获得高分子量的糖聚肽高分子。近年来,随着含糖NCA单体制备技术的提高,以及“点击化学”合成技术在聚合后修饰中的应用推广,糖聚肽高分子的可控制备获得了巨大的进步,并推动了糖聚肽高分子在仿生自组装和生物医学领域的应用。本文总结了近年来糖聚肽高分子合成方法的最新进展,探讨了其在水溶液中的自组装行为,并着重评述了糖聚肽高分子在生物分子识别、靶向基因/药物传输和组织工程支架等生物医学领域的应用。

* 聚氨基酸专辑; 2017-10-07收稿, 2017-11-12修稿; 国家自然科学基金(基金号51773196, 51573184, 51390484, 51520105004)和中国科学院青年创新促进会项目(项目号 2017266)资助。

** 通讯联系人, E-mail: xschen@ciac.ac.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2018.17282

1 糖聚肽高分子的合成

目前,糖聚肽高分子的合成方法主要可以分为2种:含糖氨基酸单体聚合法和聚合后糖基修饰法.其中,含糖氨基酸单体聚合法具体包括含糖NCA单体的开环聚合法和含糖氨基酸单体的逐步聚合法.如前所述,含糖NCA单体的制备和应用可以追溯到60年前,Rude等合成了含葡萄糖分子的丝氨酸NCA单体(图1, **M1**),并通过多肽分子末端的氨基引发开环聚合获得了多种糖聚肽高分子^[12].之后,Rude等进一步将半乳糖、乳糖、纤维二糖、鼠李糖和N-乙酰氨基葡萄糖等分子引入到丝氨酸NCA单体中(图1, **M1**);遗憾的是,这些含糖NCA单体都存在一定的杂质,使其仅适用于修饰多肽分子,而不能用于开环聚合获得高分子量的糖聚肽高分子^[13].20世纪90年代,Okada等报道了利用不同氨基引发剂(包括大分子引发剂)引发含葡萄糖或N-乙酰氨基葡萄糖分子的丝氨酸NCA单体(图1, **M1**)开环聚合,获得一系列均聚、嵌段、梳型接枝以及“球形”结构的糖聚肽高分子^[14-18].然而,受限于含糖NCA单体的纯度,这些糖聚肽高分子的聚合度一般在40以下.2007年,Cameron等发表了一种可以提高含糖NCA单体制备效率的方法,并开发了如图1所示**M2**和**M3**结构的新型含糖NCA单体,但是含糖NCA单体的纯度问题依然没有得到解决.

2010年,Deming等报道了一种利用快速柱层析法(flash chromatography)对所制备的含糖赖氨酸NCA单体(图1, **M4**)进行纯化的方法,首次解决了含糖NCA单体纯度较低的问题^[19].柱层析

纯化后的含糖NCA单体经 $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$ 引发开环聚合可获得高分子量的糖聚肽高分子(聚合度 > 300)以及高分子量的嵌段糖聚肽高分子.随后,Gupta等^[20, 21](图1, **M5**)和Wenz等^[22](图1, **M6**)分别发展了一种基于赖氨酸的含糖NCA单体,所得单体分别通过重结晶和冰水/ NaHCO_3 水溶液洗涤的方法进行纯化,再经开环聚合后获得高分子量的糖聚肽高分子.2012年,Deming等又报道了一种以L-半胱氨酸或L-高半胱氨酸为起始原料的含糖NCA单体(图1, **M7**和**M8**)的制备方法^[23].该方法不仅可以通过“thiol-ene”点击化学方法将不同糖化合物高效地键合到氨基酸上形成氨基酸-糖缀合物,进而获得不同糖分子键合的NCA单体;更有意思的是,基于此类含糖NCA开环聚合的糖聚肽高分子在水溶液中表现出明显的氧化响应二级结构转变性质.2014年,Schlaad等进一步发展了一种基于“thiol-ene”点击化学的原位合成含糖NCA单体(图1, **M9**)的方法^[24].该方法可以大大简化含糖NCA的制备过程,直接在烯丙基甘氨酸NCA上通过“thiol-ene”点击化学键合糖分子原位合成含糖NCA单体,再经开环聚合获得侧基同时含有烯丙基和糖分子的糖聚肽高分子.2016年,Gupta等将甘露糖-6-磷酸结构引入到NCA单体中(图1, **M4**),所得含糖NCA单体经开环聚合并脱除保护基团后获得侧基为甘露糖-6-磷酸结构的糖聚肽高分子;该糖聚肽高分子能够与肿瘤细胞膜表面的甘露糖-6-磷酸受体结合,实现高效的细胞内吞^[25].

与含糖NCA单体的开环聚合法相比,利用含糖氨基酸单体的逐步聚合法制备糖聚肽高分子

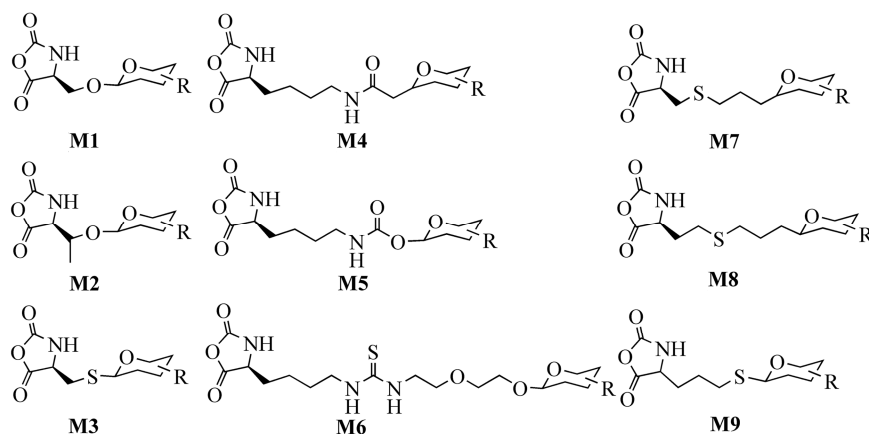


Fig. 1 Chemical structures of sugar-substituted NCA monomers

的报道相对较少. Nishimura等报道了一种在叠氮磷酸二苯酯(DPPA)和三乙胺(TEA)催化作用下含糖三肽单体直接缩合聚合制备糖聚肽高分子的方法,并成功应用于制备结构类似于抗冻蛋白和黏液素蛋白的糖聚肽高分子^[26~29]. Takasu等则发展了一种N端为盐酸盐钝化、C端为1-羟基-7-叠氮苯并三唑(HOAt)活化的含糖三肽单体,在经三乙胺活化后发生逐步聚合制备一种具有稳定二级结构的糖聚肽高分子^[30].

聚合后糖基修饰法是另外一种合成糖聚肽高分子的有效途径,它是通过化学键合方法在已合成的聚氨基酸侧链或末端进行糖基修饰来实现糖聚肽高分子的高效制备.利用聚赖氨酸侧链氨基或聚谷氨酸侧链羧基直接化学键合糖分子是最早、也是最直接的聚合后修饰制备糖聚肽高分子的方法.然而,这种直接在聚赖氨酸或聚谷氨酸侧链进行化学修饰的方法其糖基修饰程度往往较低,一般低于90%,甚至大多低于60%^[31~38].为了提高侧基的糖基修饰效率,Thoma等首先在聚赖氨酸的侧链氨基上修饰氯乙酰基,再将巯基化的糖分子与氯乙酰基反应(可归类于“thiol-helogen”亲核取代点击化学反应^[39]),制得侧基糖基修饰率超过95%的糖聚肽高分子^[40].

近年来,随着“点击化学”反应在分子科学中的应用推广,一系列具有可“点击”反应侧基的聚氨基酸被相继开发,并应用于制备侧链高糖基化的糖聚肽高分子^[41, 42]. Chen等首先报道了通过Cu(I)催化叠氮-炔环加成(CuAAC)反应将叠氮化的糖分子键合到聚(γ -炔丙基-L-谷氨酸酯)(PPLG)侧链上获得一系列糖基修饰效率接近100%的糖聚肽高分子(图2(a))^[43]. 随后, Heise等为了提高糖聚肽高分子侧链的水解稳定性发展了一种聚(炔丙基甘氨酸),并同样通过CuAAC反应键合叠氮功能化糖分子获得具有水解稳定性的糖聚肽高分子^[44]. 同时, Zhang等制备了一种聚(γ -氯丙基-L-谷氨酸酯)(PCPLG),该聚合物经过叠氮化钠处理后可获得侧链叠氮基功能化的聚(γ -叠氮丙基-L-谷氨酸酯)(图2(b)),再通过CuAAC反应键合炔基功能化糖分子获得糖聚肽高分子^[45]. 利用同样的方法, Tang等进一步构建了一系列在醇或醇/水混合溶液中具有UCST(upper critical solution temperature, 高临界溶解温

度)性质的糖聚肽高分子^[46, 47]. Deming等同样报道了一种侧链不含有可水解酯键的叠氮基功能化的聚氨基酸(图2(b)),并用于CuAAC反应键合糖分子制备糖聚肽高分子^[48]. 除CuAAC反应外,自由基介导的“thiol-ene”和“thiol-yne”反应也被报道应用于制备糖聚肽高分子. Schlaad等首先合成了一种聚(烯丙基甘氨酸),并通过“thiol-ene”点击化学反应获得侧链糖基化效率接近100%的糖聚肽高分子(图2(c)). 随后, Schlaad等进一步研究了通过“thiol-yne”反应将巯基功能化糖分子键合到聚(炔丙基甘氨酸)侧链上制备糖聚肽高分子的方法(图2(d));结果表明在炔基上键合第1个巯基功能化糖分子的效率可以达到100%,但由于空间位阻的限制,第2个巯基功能化糖分子难以实现对聚氨基酸侧基的完全键合^[49, 50]. 最近, Chen等首先通过逐步聚合合成了一系列侧链含有氨基的聚氨基酸,再通过氨基-醛点击化学反应将还原型寡糖分子键合到聚氨基酸侧链形成糖聚肽高分子^[51].

除上述通过在聚氨基酸侧链引入可“点击”反应基团用于制备糖聚肽高分子的方法外, Deming等最近还报道了直接利用天然氨基酸——甲硫氨酸为原料制备聚(L-甲硫氨酸),并在其侧链通过一种类似于点击反应的“甲硫氨酸烷基化”反应将含有碘基、三氟甲磺酸酯基或环氧基功能化的糖分子键合到聚氨基酸侧链上形成糖聚肽高分子的方法(图2(e)和2(f))^[52~54].

利用“点击化学”反应在疏水的聚氨基酸末端键合亲水的糖分子是构建糖聚肽高分子的另一种聚合后糖基修饰方法. Lecommandoux等首先利用3-叠氮丙胺引发 γ -苄基-L-谷氨酸酯-NCA单体开环聚合获得末端具有叠氮基团的聚(γ -苄基-L-谷氨酸酯)(PBLG),再通过CuAAC反应将末端具有炔基功能化的葡聚糖、透明质酸或半乳糖键合到疏水的PBLG末端,形成一系列具有两亲性嵌段结构的糖聚肽高分子^[55~58]. Li等则首先合成了末端含有叠氮基团的聚($N(\epsilon)$ -苄氧羰基-L-赖氨酸)(PZLL),并同样利用CuAAC反应键合甘露糖分子合成末端含有1个或2个甘露糖分子的糖聚肽高分子^[59].

综上,含糖NCA单体的开环聚合法和利用“点击化学”进行聚合后糖基修饰的方法是目

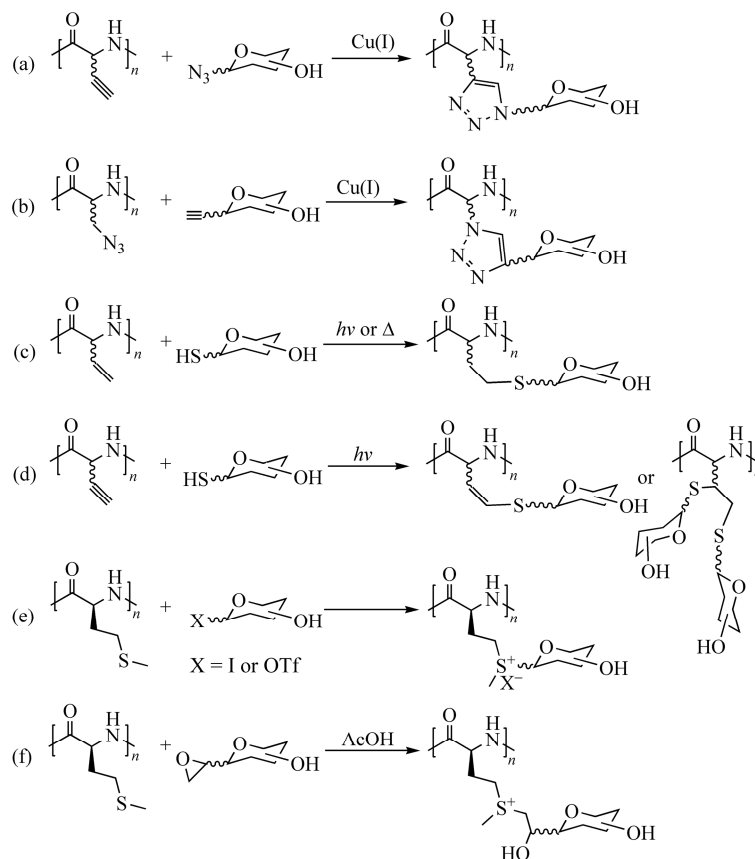


Fig. 2 Synthesis of glycopolypeptides via “click” glycosylation

制备高分子量且结构可控的糖聚肽高分子的最直接、最高效的方法；但这2种方法的最大缺陷在于其难于获得具有一定序列结构的糖聚肽高分子。与此相反，利用含糖氨基酸单体的逐步聚合法则可以获得具有一定序列结构的糖聚肽高分子，从而较大程度上模拟天然糖蛋白的结构和性能；而其缺点则在于单体制备步骤较多、难以获得高分子量以及结构可控的糖聚肽高分子。因此，发展新的高分子合成方法用于制备具有一定序列结构且结构可控的高分子量糖聚肽高分子已成为高分子科学领域面临的一大挑战。

2 糖聚肽高分子的自组装

由糖聚肽高分子构建的组装体，其表面含有丰富的糖化合物，能够在一定程度上模仿表面含糖缀合物的细胞或细胞器结构，这使得其在生物医学领域，特别是药物传输领域有着重要的应用前景。因此，近年来糖聚肽高分子的自组装研究备受关注^[7, 10]。例如，Lecommandoux等通过Cu-AAC反应合成了一种含葡聚糖和PBLG的两嵌段

糖聚肽高分子(dxtran-*b*-PBLG)，所得两亲性嵌段共聚物可以在水溶液中组装成流体动力学半径为45 nm，壁厚约为20 nm的类“病毒衣壳”结构的囊泡组装体^[55]。Li等则通过聚合后糖基修饰法制备了一种甘露糖修饰的聚赖氨酸分子，该糖聚肽高分子具有pH响应性，直接溶于酸性水溶液(pH = 4.0)可自组装成纳米胶束，而当将溶液pH值调整到10.0后，胶束会转化成囊泡结构^[60]。同样，Lecommandoux等通过聚合后糖基修饰法制备了一种“树形”的两亲性糖聚肽高分子，所得高分子直接分散在水中即可获得粒径小于50 nm且粒径分布较窄的纳米胶束^[61]。Lecommandoux和Heise等制备了一系列以糖基化聚(炔丙基甘氨酸)为亲水链段、以PBLG为疏水链段的两亲性糖聚肽高分子，进一步通过调控亲疏水链段的比例，可以获得囊泡以及蠕虫状胶束的自组装结构^[62]。Deming等则研究了糖聚肽高分子的二级结构对自组装的影响^[63]。结果表明，在具有相同疏水链结构情况下，亲水的糖聚肽高分子链段如果是无规结构，将形成囊泡结构；而如果是 α -螺旋结构，

将形成无规则的片状组装体。Gupta等将不同种类的疏水链段(包括树突状高分子、Y型聚己内酯和聚氧丙烯等)与亲水的糖聚肽高分子键合形成含糖聚肽高分子的两亲性杂化高分子。通过调控疏水链段的结构以及亲疏水链段的比例,所得高分子能够在水溶液中组装成胶束、囊泡、棒状胶束

甚至中空纳米管状结构(图3)^[64-66]。

与上述糖聚肽高分子所形成的传统组装体相比,自然界的糖蛋白等糖缀合物往往采用更复杂、更高级的组装结构。因此,为了更深入地模拟自然,获得高层级的复杂组装结构,Chen和Jiang等最近合成了一系列以聚氨基酸为主链,侧

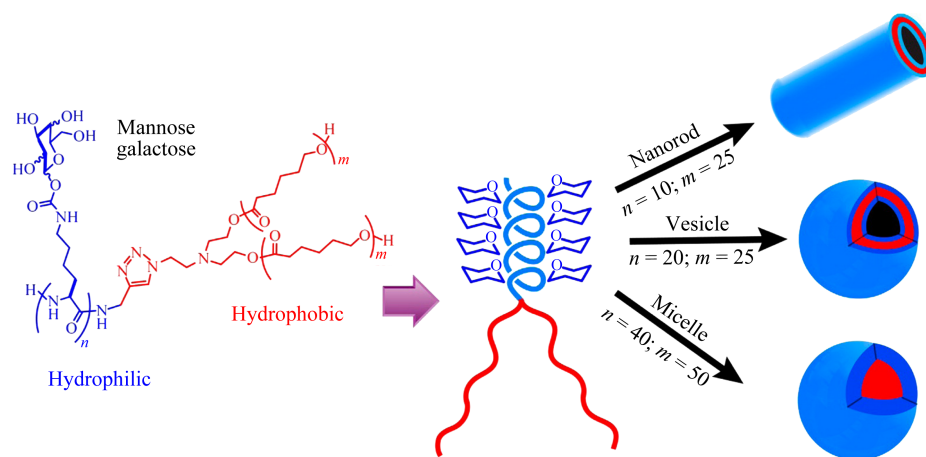


Fig. 3 General structure of glycopolypeptides-*b*-(PCL)₂ Y-shape block copolymer and their self-assembled nanostructures obtained by tuning the hydrophilic and hydrophobic length (Reprinted with permission from Ref.[64]; Copyright (2016) American Chemical Society)

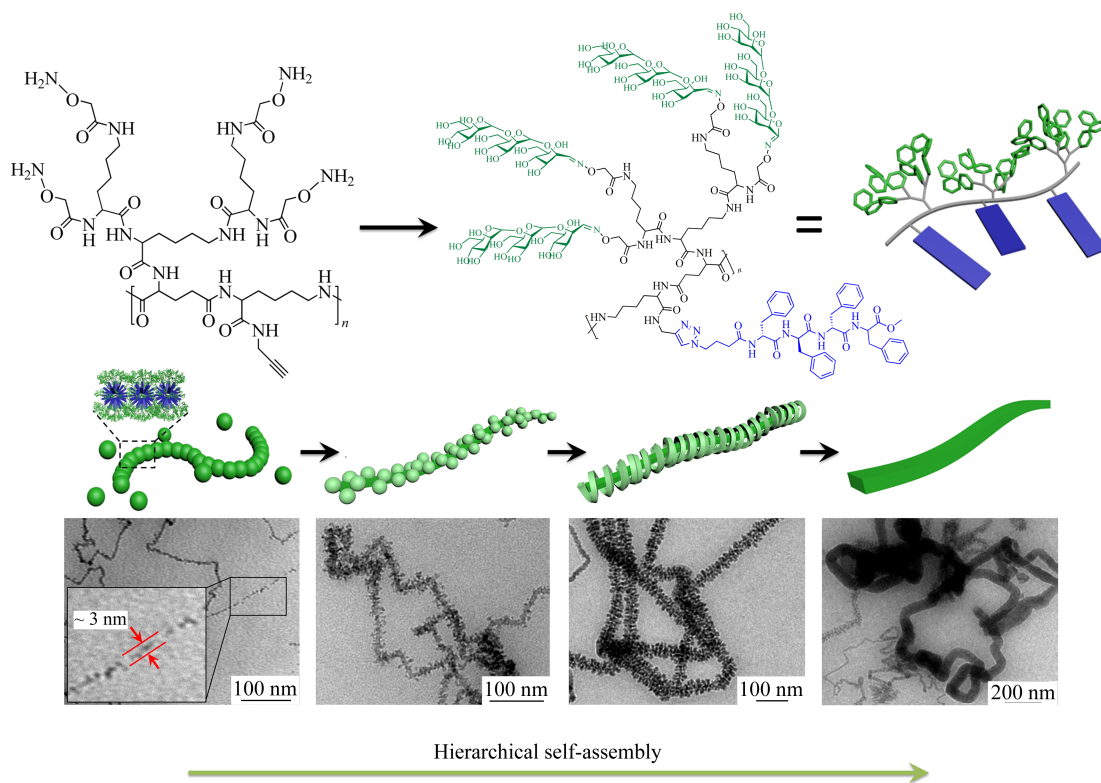


Fig. 4 Chemical structure of alternating amphiphilic glycopolypeptide brushes with glycodendron and short peptide pendants, and their schematic illustration as well as TEM characterization of the hierarchical self-assembly process (Reprinted with permission from Ref.[51]; Copyright (2016) American Chemical Society)

链含有亲水的树突状甘露寡糖和疏水的寡聚苯丙氨酸的交替型两亲性刷状高分子(图4)^[51, 67]. 研究发现这类糖聚肽高分子具有程序化分级组装的特征: 聚合物首先自组装形成纳米胶束, 随后纳米胶束逐渐融合形成纳米丝, 进一步在纳米丝上长出规整的螺旋缠绕结构, 最后融合形成致密的纳米线结构(图4). 此外, 研究人员还发现通过调整侧链上甘露寡糖和寡聚苯丙氨酸的结构和比例, 能够获得胶束、纳米线甚至纳米带等不同的组装结构. 该工作是目前唯一报道的利用糖聚肽高分子进行分级自组装的例子.

3 糖聚肽高分子的生物医学应用

糖与蛋白质的相互作用是糖生物学的基础. 对糖分子具有特异识别功能的蛋白质称为糖结合蛋白. 除一些酶和免疫球蛋白外, 其他所有的糖结合蛋白统称为凝集素(Lectins)^[68]. 凝集素广泛存在于各种生命体如病毒、细菌和动植物, 一般具有2个及以上的糖识别位点^[69]. 凝集素与糖的特异性识别作用是一些生物学过程(如细胞-细胞相互作用、细胞黏附以及免疫应答等)的分子结构基础^[68, 69]. 因此, 研究凝集素与合成的糖聚肽高分子之间的特异性识别作用将有助于开发具有生物活性功能的新一代生物医用高分子材料. 目前, 常用于研究糖聚肽高分子蛋白质结合能力的凝集素有2种: 一种是与甘露糖或葡萄糖分子具有特异结合能力的伴刀豆球蛋白A (concanavalin A, ConA); 另外一种是与半乳糖分子具有特异结合能力的蓖麻凝集素(*ricinus communis agglutinin*, RCA₁₂₀)^[10, 21, 37, 43, 49, 63, 65, 70~74]. 研究表明当将糖分子键合到聚氨基酸侧链形成糖聚肽高分子后, 其与凝集素的结合能力相对于原来的糖分子将有很程度的提高, 这种现象称为“簇集效应”(cluster effect)^[21, 32, 35]. 由于“簇集效应”的存在, 糖聚肽高分子与凝集素的结合能力还受侧链糖基密度的影响, 即侧链具有凝集素结合功能的糖基密度越大, 其结合能力越强^[37, 43, 49, 65, 71, 72]. 此外, Heise等在研究多臂糖聚肽高分子(含葡萄糖侧基)与凝集素ConA结合能力时发现, 在具有同样的糖基修饰率的情况下, 糖聚肽高分子的臂数越多, 其与凝集素的结合能力越强^[72]. Lecommandoux等则研究发现, 对于糖聚肽高

分子(含半乳糖或乳糖侧基)构建的两亲性嵌段高分子, 其亲水的糖聚肽高分子链段比例越大, 其与凝集素RCA₁₂₀的结合能力越强^[73]. 进一步地, Heise等构建了3种不同嵌段结构(两嵌段、四嵌段和八嵌段)和1种无规结构的亲水性糖聚肽高分子(含半乳糖侧基). 研究表明, 对于RCA₁₂₀, 八嵌段结构的糖聚肽高分子结合能力最强, 两嵌段结构的糖聚肽高分子结合能力最弱; 而对于Galectin-3, 四嵌段结构的糖聚肽高分子结合能力最强, 无规结构的糖聚肽高分子结合能力最弱^[74]. 这表明糖分子在糖聚肽高分子中的空间分布对其生物识别能力起到至关重要的作用; 同时, 不同凝集素分子对糖分子的空间分布要求也是不同的.

20世纪70年代, 科学家们在兔子的肝脏中首次发现了一种对半乳糖或N-乙酰半乳糖胺分子有识别作用的凝集素^[69]. 这种凝集素也被称为去唾液酸糖蛋白受体(ASG-R), 是一种内吞型凝集素, 主要分布在肝实质细胞膜上, 其功能是从血液中捕获脱离唾液酸分子并暴露甘露糖分子的糖蛋白^[68, 69]. 基于这一发现, 大量的含有半乳糖或N-乙酰半乳糖胺基团的糖聚肽高分子被相继开发, 并用作肝细胞靶向的基因/药物传输载体^[8, 75]. 在20世纪90年代初, Midoux等首先报道了利用乳糖分子修饰的聚赖氨酸分子担载质粒DNA, 所得复合物能够通过HepG-2肝癌细胞表面的ASG-R介导内吞进入细胞内部, 从而实现了对HepG-2肝癌细胞的选择性DNA转染^[31, 76]. 随后, Hashida等利用核素标记的含半乳糖侧基的聚赖氨酸分子(Gal-PLL)作为基因传输载体, 并进行小鼠体内分布实验; 结果表明, 经尾静脉注射后这种含半乳糖分子的糖聚肽高分子载体能够选择性靶向肝实质细胞/肝癌细胞, 实现基因药物在肝脏/肝癌组织的靶向富集^[33, 77, 78]. 同样, Hashida等利用半乳糖修饰的聚谷氨酸(Gal-PLGA)作为小分子药物的载体, 用于肝细胞靶向传输小分子药物维他命K5和前列腺素E1; 实验结果表明, 超过60%的药物可被靶向输运至肝实质细胞^[79~81]. 与此同时, Fiume等将抗病毒药物单磷酸阿糖腺苷和利巴韦林等键合到乳糖修饰的聚赖氨酸分子上制备具有肝细胞靶向的高分子键合药; 实验结果表明所得高分子键合药能够在肝脏组织有

效富集,从而大大提高其抗病毒治疗效果^[82-85].在2001年,Fiume等进一步将抗肿瘤药物5-氟-2'-脱氧尿苷键合到乳糖修饰的聚赖氨酸分子上获得抗肿瘤高分子前药,该前药分子能够被小鼠肝细胞高效摄取,并能有效抑制转移至肝脏组织的结肠癌细胞的增殖^[86].

近年来,利用糖聚肽高分子构建的高分子纳米胶束载体也被广泛开发并应用于肝癌细胞靶向药物传输.例如,Sung等首先合成了聚(γ -谷氨酸)和聚乳酸(PLA)的嵌段共聚物,并在聚(γ -谷氨酸)侧链键合半乳糖胺分子,所得嵌段共聚物能够在水溶液中组装成以半乳糖键合聚(γ -谷氨酸)链为亲水壳层的纳米胶束.进一步利用该糖聚肽胶束担载抗肿瘤药物紫杉醇,所得载药纳米胶束可以通过半乳糖分子的靶向作用实现肿瘤部分的高效富集,从而达到有效抑制肿瘤生长的目的^[87,88].最近,Chen等合成了一种含半乳糖侧基的聚谷氨酸酯和聚谷氨酸的嵌段共聚物(PGLG-*b*-PLGA),该嵌段共聚物能够高效担载DOX药物,形成流体动力学半径为50 nm左右的纳米药物(图5)^[89].该纳米药物具有pH响应药物释放性能,而且能够被HepG-2肝癌细胞高效摄取,具有良好的肿瘤细胞靶向效果;体内抑瘤实验表明该纳米药物能够有效抑制肿瘤生长,且对正常器官具有较低的毒副作用.

除应用于肝细胞靶向基因/药物传输外,糖聚肽高分子还被广泛应用于其他细胞的靶向基因/药物传输.例如,Scanlin课题组和Midoux课题组分别系统研究了不同糖基修饰的聚赖氨酸分子应用于针对囊性纤维化呼吸道上皮细胞(CFAEC)的选择性基因转染.实验结果表明,乳糖修饰的聚赖氨酸分子具有最高的基因转染效率,这是因

为CFAEC的细胞膜和核膜表面都存在具有识别半乳糖分子的凝集素分子,从而使得乳糖修饰的聚赖氨酸分子与DNA复合物不仅能够通过受体介导内吞作用高效进入CFAEC,还能够将DNA分子高效输运到细胞核内,进而实现高效的基因转染^[90-95].Lecommandoux等合成了透明质酸和聚(L-谷氨酸苄酯)(PBLG)的两亲性嵌段共聚物,并利用该嵌段共聚物担载抗癌药物阿霉素或紫杉醇,形成囊泡结构的纳米药物;所得纳米药物能够选择性靶向具有CD44过表达的肿瘤细胞,如大鼠胶质瘤细胞C6、人胶质瘤细胞U87以及人乳腺癌细胞MCF-7等^[57,58].此外,Midoux等还将甘露糖修饰的聚赖氨酸分子用于选择性基因转染人血来源的巨噬细胞^[96];Gupta等则研究发现,利用含甘露糖侧基的糖聚肽高分子自组装而成的聚合物囊泡可以被表面含甘露糖受体MRC2的MDA-MB-231细胞选择性内吞^[60];Wenz等合成了一种含有半乳糖侧基的糖聚肽高分子,并发现其具有靶向识别T淋巴细胞表面的L选择素CD26L的能力^[22];Heise等制备了一种表面含半乳糖分子的糖聚肽高分子的纳米乳胶粒子,研究发现该纳米乳胶粒子能够选择性吸附在含凝集素Galctn1的CHO细胞表面^[70].然而,需要指出的是,上述这些已报道的利用糖聚肽高分子进行药物靶向运输的研究,还大多集中在细胞层面,尚需更深入的动物实验研究.

与方兴未艾的靶向药物传输应用相比,糖聚肽高分子在组织工程领域中的应用报道还相对较少.Chen等首先制备了一种基于PEG和聚(γ -烯丙基-L-谷氨酸酯)(PPLG)嵌段共聚物的可注射性温敏水凝胶,并进一步在PPLG侧链键合半乳糖分子形成糖聚肽高分子,所得糖聚肽高分子水凝

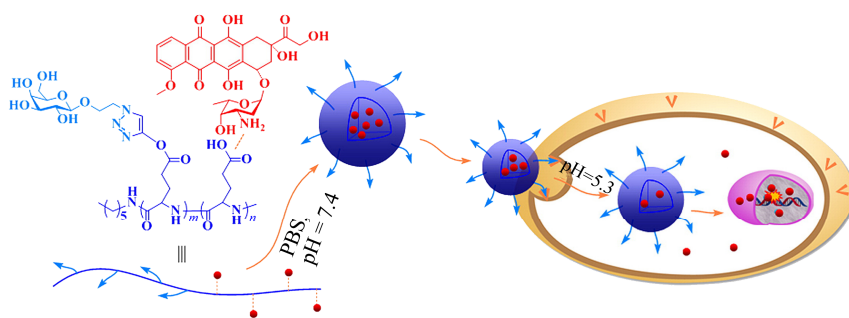


Fig. 5 Schematic illustration of hepatoma-targeted delivery of nanomedicine prepared from galactosylated block copolypeptides and DOX (Reprinted with permission from Ref.[89]; Copyright (2013) Elsevier)

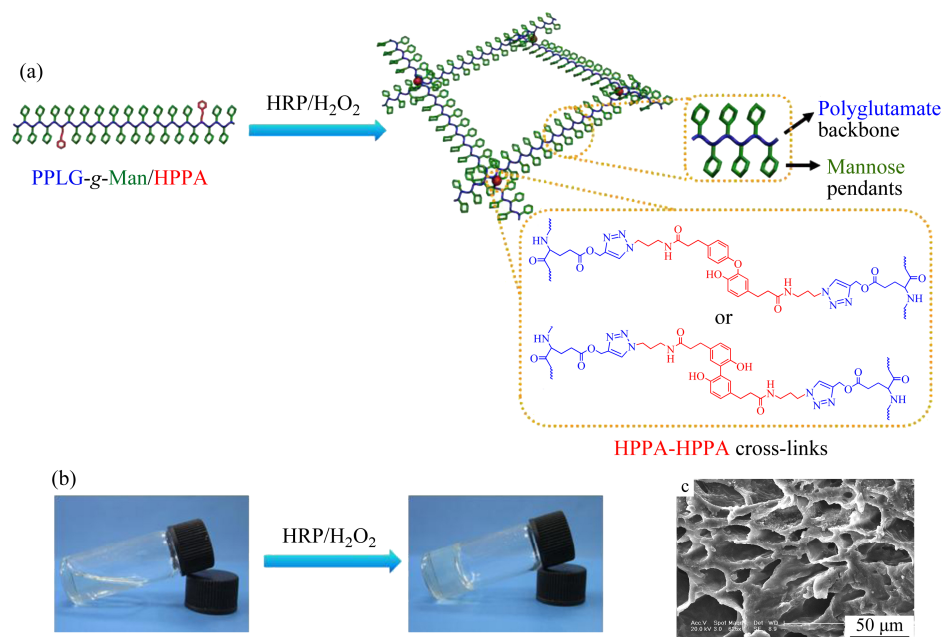


Fig. 6 (a) Schematic illustration of enzyme-catalyzed cross-linking of glycopolypeptides; (b) Photographs of the enzyme-catalyzed formation of glycopolypeptides hydrogel; (c) SEM image of the lyophilized glycopolypeptides hydrogel (Reprinted with permission from Ref.[98]; Copyright (2015) Elsevier)

胶表现出明显增强的细胞黏附作用^[97]。最近, He 等发展了一种可注射性酶交联的糖聚肽高分子水凝胶, 并系统评价其在软骨组织工程中的应用潜力(图6)。研究表明, 在体外3D培养和裸鼠皮下模型中, 仿生糖聚肽高分子水凝胶皆有利于软骨细胞的存活和增殖, 能够促进软骨细胞在糖聚肽高分子水凝胶中的再分化, 并维持软骨细胞的表型, 表达并分泌软骨特异性细胞外基质, 如II型胶原、糖胺聚糖等^[98]。

当然, 除上述应用外, 糖聚肽高分子在其他生物医学领域也有着一定的应用前景。例如, Nishimura等发展了一种缩合聚合的方法, 制备了一系列具有类似抗冻蛋白结构的糖聚肽高分子, 并详细研究了聚合物结构与抗冻性能之间的关系^[26, 28]; Brougham等通过“grafting from”的方法制备了一种表面含有高密度糖聚肽高分子的磁性纳米粒子, 所得纳米粒子在水溶液中能够稳定分散, 具有良好的生物相容性, 有望用作磁共振成像造影剂^[99]; 最近, Deming等研究发现糖基化修饰后的聚(L-甲硫氨酸)具有与细胞穿膜肽类似的细胞穿透功能, 是一类高效低毒的新型细胞穿透材料^[100]; Bertozzi等则通过含糖NCA开环聚合获得了一种模拟黏液素蛋白结构的糖聚肽高

分子, 并将其应用于活细胞膜的定点修饰^[101]。

4 总结与展望

作为一种具有仿生结构的高分子材料, 糖聚肽高分子是目前为数不多的具有生物活性功能的高分子材料之一。近年来, 随着含糖NCA单体制备技术的发展, 以及“点击化学”反应在聚合后糖基修饰中的应用, 糖聚肽高分子的合成已经取得了巨大的进步, 并在一定程度上推进了糖聚肽高分子在生物医学领域的应用。然而, 关于糖聚肽高分子的合成、自组装性能以及生物医学应用研究仍然存在诸多挑战。其中最关键的是, 如何合成具有一定序列结构的糖聚肽高分子, 以及如何实现高层级的糖聚肽高分子的自组装, 使其在化学结构和空间结构上更接近于天然糖蛋白分子。而这些更仿生、更深入模拟自然的糖聚肽高分子的获得, 将为糖蛋白结构和生物学功能的研究提供可靠的模型分子; 同时, 也将进一步促进糖聚肽高分子在生物医学领域的应用, 特别是用于生物活性物质的识别、检测、分离和提纯, 靶向药物/基因传输和疾病诊断, 以及具有调控细胞黏附、诱导细胞增殖分化、启动机体再生等“生物活性”功能的组织工程支架的制备等。

REFERENCES

- 1 Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W. *Cells Tissues Organs*, 1998, 161(1-4): 36 – 78
- 2 Rudd P M, Elliott T, Cresswell P, Wilson I A, Dwek R A. *Science*, 2001, 291(5512): 2370 – 2376
- 3 Ohtsubo K, Marth J D. *Cell*, 2006, 126(5): 855 – 867
- 4 Davis B G. *Chem Rev*, 2002, 102(2): 579 – 601
- 5 Pratt M R, Bertozzi C R. *Chem Soc Rev*, 2005, 34(1): 58 – 68
- 6 Gamblin D P, Scanlan E M, Davis B G. *Chem Rev*, 2009, 109(1): 131 – 163
- 7 Bonduelle C, Lecommandoux S. *Biomacromolecules*, 2013, 14(9): 2973 – 2983
- 8 Deng C, Wu J, Cheng R, Meng F, Klok H A, Zhong Z. *Prog Polym Sci*, 2014, 39(2): 330 – 364
- 9 Kramer J R, Deming T J. *Polym Chem*, 2014, 5(3): 671 – 682
- 10 Krannig K S, Schlaad H. *Soft Matter*, 2014, 10(24): 4228 – 4235
- 11 Wang Mingzhi(王明智), Du Jianzhong(杜建忠). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2014, (9): 1183 – 1194
- 12 Rude E, Westphal O, Hurwitz E, Fuchs S, Sela M. *Immunochemistry*, 1966, 3(2): 137 – 151
- 13 Rude E, Meyerdel M. *Carbohydr Res*, 1968, 8(2): 219 – 232
- 14 Aoi K, Tsutsumiuchi K, Okada M. *Macromolecules*, 1994, 27(3): 875 – 877
- 15 Aoi K, Tsutsumiuchi K, Aoki E, Okada M. *Macromolecules*, 1996, 29(12): 4456 – 4458
- 16 Aoi K, Tsutsumiuchi K, Yamamoto A, Okada M. *Tetrahedron*, 1997, 53(45): 15415 – 15427
- 17 Tsutsumiuchi K, Aoi K, Okada M. *Macromolecules*, 1997, 30(14): 4013 – 4017
- 18 Aoi K, Tsutsumiuchi K, Yamamoto A, Okada M. *Macromol Rapid Commun*, 1998, 19(1): 5 – 9
- 19 Kramer J R, Deming T J. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(42): 15068 – 15071
- 20 Pati D, Shaikh A Y, Hotha S, Sen Gupta S. *Polym Chem*, 2011, 2(4): 805 – 811
- 21 Pati D, Shaikh A Y, Das S, Nareddy P K, Swamy M J, Hotha S, Sen Gupta S. *Biomacromolecules*, 2012, 13(5): 1287 – 1295
- 22 Stoehr T, Blaudszun A-R, Steinfeld U, Wenz G. *Polym Chem*, 2011, 2(10): 2239 – 2248
- 23 Kramer J R, Deming T J. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(9): 4112 – 4115
- 24 Krannig K S, Doriti A, Schlaad H. *Macromolecules*, 2014, 47(7): 2536 – 2539
- 25 Das S, Parekh N, Mondal B, Gupta S S. *ACS Macro Lett*, 2016, 5(7): 809 – 813
- 26 Tsuda T, Nishimura S I. *Chem Commun*, 1996, (24): 2779 – 2780
- 27 Tachibana Y, Matsubara N, Nakajima F, Tsuda T, Tsuda S, Monde K, Nishimura S I. *Tetrahedron*, 2002, 58(51): 10213 – 10224
- 28 Tachibana Y, Fletcher G L, Fujitani N, Tsuda S, Monde K, Nishimura S I. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43(7): 856 – 862
- 29 Tachibana Y, Monde K, Nishimura S-I. *Macromolecules*, 2004, 37(18): 6771 – 6779
- 30 Takasu A, Horikoshi S, Hirabayashi T. *Biomacromolecules*, 2005, 6(4): 2334 – 2342
- 31 Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche A C. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(4): 871 – 878
- 32 Kobayashi K, Tawada E, Akaike T, Usui T. *BBA - General Subjects*, 1997, 1336(2): 117 – 122
- 33 Mahato R I, Takemura S, Akamatsu K, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53(6): 887 – 895
- 34 Zeng X, Murata T, Kawagishi H, Usui T, Kobayashi K. *Carbohydr Res*, 1998, 312(4): 209 – 217
- 35 Zeng X, Murata T, Kawagishi H, Usui T, Kobayashi K. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(6): 1171 – 1178
- 36 Tian Z, Wang M, Zhang A Y, Feng Z G. *Polymer*, 2008, 49(2): 446 – 454
- 37 Mildner R, Menzel H. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem*, 2013, 51(18): 3925 – 3931
- 38 Perdih P, Cebasek S, Mozir A, Zagar E. *Molecules*, 2014, 19(12): 19751 – 19768
- 39 Hoyle C E, Lowe A B, Bowman C N. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(4): 1355 – 1387
- 40 Thoma G, Patton J T, Magnani J L, Ernst B, Ohrlein R, Duthaler R O. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(25): 5919 – 5929
- 41 Quadir M A, Martin M, Hammond P T. *Chem Mater*, 2013, 26(1): 461 – 476
- 42 Deming T J. *Chem Rev*, 2016, 116(3): 786 – 808
- 43 Xiao C, Zhao C, He P, Tang Z, Chen X, Jing X. *Macromol Rapid Commun*, 2010, 31(11): 991 – 997
- 44 Huang J, Habraken G, Audouin F, Heise A. *Macromolecules*, 2010, 43(14): 6050 – 6057
- 45 Tang H, Zhang D. *Biomacromolecules*, 2010, 11(6): 1585 – 1592

- 46 Wang X, Ge C L, Ling Y, Tang H Y. *RSC Adv*, 2015, 5(130): 108023 – 108029
- 47 Li M J, Wang X, Xu Y Z, Ling Y, Tang H Y. *Polym Int*, 2016, 65(12): 1493 – 1500
- 48 Rhodes A J, Deming T J. *ACS Macro Lett*, 2013, 2(5): 351 – 354
- 49 Krannig K S, Schlaad H. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(45): 18542 – 18545
- 50 Krannig K S, Huang J, Heise A, Schlaad H. *Polym Chem*, 2013, 4(14): 3981 – 3986
- 51 Liu Y J, Zhang Y F, Wang Z Y, Wang J, Wei K C, Chen G S, Jiang M. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(38): 12387 – 12394
- 52 Kramer J R, Deming T J. *Biomacromolecules*, 2012, 13(6): 1719 – 1723
- 53 Kramer J R, Deming T J. *Chem Commun*, 2013, 49(45): 5144 – 5146
- 54 Gharakhanian E G, Deming T J. *Biomacromolecules*, 2015, 16(6): 1802 – 1806
- 55 Schatz C, Louguet S, Le Meins J F, Lecommandoux S. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48(14): 2572 – 2575
- 56 Bonduelle C, Oliveira H, Gauche C, Huang J, Heise A, Lecommandoux S. *Chem Commun*, 2016, 52(75): 11251 – 11254
- 57 Upadhyay K K, Meins J F L, Misra A, Voisin P, Bouchaud V, Ibarboure E, Schatz C, Lecommandoux S. *Biomacromolecules*, 2009, 10(10): 2802 – 2808
- 58 Upadhyay K K, Bhatt A N, Castro E, Mishra A K, Chuttani K, Dwarakanath B S, Schatz C, Le Meins J F, Misra A, Lecommandoux S. *Macromol Biosci*, 2010, 10(5): 503 – 512
- 59 Wang Rui(王睿), Xu Ning(徐宁), Du Fusheng(杜福胜), Li Zichen(李子臣). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2013, (6): 774 – 780
- 60 Wang R, Xu N, Du F S, Li Z C. *Chem Commun*, 2010, 46(22): 3902 – 3904
- 61 Bonduelle C, Huang J, Ibarboure E, Heise A, Lecommandoux S. *Chem Commun*, 2012, 48(67): 8353 – 8355
- 62 Huang J, Bonduelle C, Thevenot J, Lecommandoux S, Heise A. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(1): 119 – 122
- 63 Kramer J R, Rodriguez A R, Choe U J, Kamei D T, Deming T J. *Soft Matter*, 2013, 9(12): 3389 – 3395
- 64 Pati D, Das S, Patil N G, Parekh N, Anjum D H, Dhaware V, Ambade A V, Sen Gupta S. *Biomacromolecules*, 2016, 17(2): 466 – 475
- 65 Pati D, Kalva N, Das S, Kumaraswamy G, Sen Gupta S, Ambade A V. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(18): 7796 – 7802
- 66 Das S, Sharma D K, Chakrabarty S, Chowdhury A, Sen Gupta S. *Langmuir*, 2015, 31(11): 3402 – 3412
- 67 Qiu H B. *Sci China Chem*, 2016, 59(12): 1621 – 1622
- 68 Lee Y C, Lee R T. *Acc Chem Res*, 1995, 28(8): 321 – 327
- 69 Lis H, Sharon N. *Chem Rev*, 1998, 98(2): 637 – 674
- 70 Jacobs J, Byrne A, Gathergood N, Keyes T E, Heuts J P A, Heise A. *Macromolecules*, 2014, 47(21): 7303 – 7310
- 71 Mildner R, Menzel H. *Biomacromolecules*, 2014, 15(12): 4528 – 4533
- 72 Byrne M, Mildner R, Menzel H, Heise A. *Macromol Biosci*, 2015, 15(1): 74 – 81
- 73 Gauche C, Lecommandoux S. *Polymer*, 2016, 107474 – 107484
- 74 Lavilla C, Yilmaz G, Uzunova V, Napier R, Becer C R, Heise A. *Biomacromolecules*, 2017, 18(6): 1928 – 1936
- 75 D'Souza A A, Devarajan P V. *J Control Release*, 2015, 203(Supplement C): 126 – 139
- 76 Erbacher P, Roche A C, Monsigny M, Midoux P. *Bioconjugate Chem*, 1995, 6(4): 401 – 410
- 77 Hashida M, Takemura S, Nishikawa M, Takakura Y. *J Control Release*, 1998, 53(1): 301 – 310
- 78 Nishikawa M, Takemura S, Takakura Y, Hashida M. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 287(1): 408 – 415
- 79 Hirabayashi H, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. *Pharm Res*, 1996, 13(6): 880 – 884
- 80 Akamatsu K, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. *Int J Pharm*, 1997, 155(1): 65 – 74
- 81 Hashida M, Hirabayashi H, Nishikawa M, Takakura Y. *J Control Release*, 1997, 46(1): 129 – 137
- 82 Distefano G, Busi C, Mattioli A, Fiume L. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49(12): 1769 – 1775
- 83 Fiume L, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Rapicetta M, Giuseppetti R, Ciccaglione A R, Argentini C. *Hepatology*, 1995, 22(4, Part 1): 1072 – 1077
- 84 Fiume L, Stefano G D, Busi C, Mattioli A, Gervasi G B, Bertini M, Bartoli C, Catalani R, Caccia G, Farina C, Fissi A, Pieroni O, Giuseppetti R, D'Ugo E, Rapicetta M. *J Hepatol*, 1997, 26(2): 253 – 259
- 85 Stefano G D, Colonna F P, Bongini A, Busi C, Mattioli A, Fiume L. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54(3): 357 – 363
- 86 Di Stefano G, Busi C, Camerino A, Derenzini M, Trerè D, Fiume L. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(4): 459 – 465
- 87 Liang H F, Yang T F, Huang C T, Chen M C, Sung H W. *J Control Release*, 2005, 105(3): 213 – 225
- 88 Liang H F, Chen C T, Chen S C, Kulkarni A R, Chiu Y L, Chen M C, Sung H W. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 2051 – 2059
- 89 Ding J, Xiao C, Li Y, Cheng Y, Wang N, He C, Zhuang X, Zhu X, Chen X. *J Control Release*, 2013, 169(3): 193 – 203
- 90 Kollen W J W, Midoux P, Erbacher P, Yip A, Roche A C, Monsigny M, Glick M C, Scanlin T F. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(13): 1577 – 1586

- 91 Fajac I, Briand P, Monsigny M, Midoux P. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(3): 395 – 406
- 92 Kollen W J W, Schembri F M, Gerwig G J, Vliegthart J F G, Glick M C, Scanlin T F. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20(5): 1081 – 1086
- 93 Klink D T, Chao S, Glick M C, Scanlin T F. *Molecular Therapy*, 2001, 3(6): 831 – 841
- 94 Grosse S, Tremeau-Bravard A, Aron Y, Briand P, Fajac I. *Gene Therapy*, 2002, 9(15): 1000 – 1007
- 95 Klink D, Yu Q C, Glick M C, Scanlin T. *Molecular Therapy*, 2003, 7(1): 73 – 80
- 96 Erbacher P, Bousser M T, Raimond J, Monsigny M, Midoux P, Roche A C. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(6): 721 – 729
- 97 Cheng Y, He C, Xiao C, Ding J, Cui H, Zhuang X, Chen X. *Biomacromolecules*, 2013, 14(2): 468 – 475
- 98 Ren K X, He C L, Xiao C S, Li G, Chen X S. *Biomaterials*, 2015, 51: 238 – 249
- 99 Borase T, Ninjabdar T, Kapetanakis A, Roche S, O'Connor R, Kerskens C, Heise A, Brougham D F. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(11): 3164 – 3167
- 100 Kramer J R, Schmidt N W, Mayle K M, Kamei D T, Wong G C L, Deming T J. *ACS Cent Sci*, 2015, 1(2): 83 – 88
- 101 Kramer J R, Onoa B, Bustamante C, Bertozzi C R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(41): 12574 – 12579

Glycopolypeptides: Synthesis, Self-assembly and Biomedical Applications

Chun-sheng Xiao, Jian-xun Ding, Chao-liang He, Xue-si Chen*

(Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract Glycopolypeptides are a kind of biodegradable polymers consisting of polypeptides (polyamino acid) and carbohydrates (such as monosaccharide, oligosaccharides and polysaccharides). Owing to their chemical similarity to glycoproteins, glycopolypeptides can, to some extent, mimic the structure and function of natural glycoproteins, and have attracted broad attention recently. Two general strategies have been developed for the synthesis of glycopolypeptides, *i.e.* direct polymerization of glycosylated monomers and post-polymerization glycosylation of reactive polypeptides. Although the synthesis of glycopolypeptides can be traced back to sixty years ago, the synthesis of glycopolypeptides with Control architectures and high molecular weights can be achieved when high purified sugar-substituted amino acid *N*-carboxyanhydride (NCA) monomers for Control ring-opening polymerization and “clickable” polypeptides for “click” glycosylation have been extensively developed. Based on these advances on Control synthesis of glycopolypeptides, many efforts are devoted to studying the self-assembly of amphiphilic glycopolypeptide (co)polymers into various nano-structures, such as micelles, vesicles and nanorods. More interestingly, hierarchical self-assembly of an alternating amphiphilic glycopolypeptide to mimic the complex structure of natural glycoconjugates also has been achieved. In addition, as a kind of structural mimics of natural glycoproteins, the synthetic glycopolypeptides are capable of binding selectively to various carbohydrate-binding proteins, such as lectins. And the lectin-binding ability is confirmed to be dependent on the type, composition, density and distribution pattern of the sugar residues on the polypeptide backbone. Also, due to the presence of carbohydrate-binding proteins on cell surfaces, especially on the surface of cancer cells, glycopolypeptides have been widely investigated as biocompatible nanocarriers for targeted drug/gene delivery. Most recently, glycopolypeptides-based hydrogels are receiving increasing attention for tissue engineering applications because of their ability to enhance cell adhesion and proliferation in 3D cell culture. In this article, we summarize recent advances in the synthesis and self-assembly of glycopolypeptides, and their applications in biomedical fields, such as biomolecular recognitions, targeted gene/drug delivery and scaffolds for tissue engineering, are also emphatically reviewed and discussed.

Keywords Glycopolypeptides, Polypeptides, Ring-opening polymerization, Self-assembly, Biomedical applications

*Corresponding author: Xue-si Chen, E-mail: xschen@ciac.ac.cn