

· 专论 ·

蛋白质-聚氨基酸偶联物的高效合成与应用*

张冲 吕华**

(北京分子科学国家实验室 高分子化学与物理教育部重点实验室 软物质科学与工程中心
北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 蛋白质-高分子偶联物是重要的临床药物,可用于多种疾病的治疗。寻找新的生物可降解高分子材料来替代传统的聚乙二醇和发展高效、位点特异性的偶联方法是该领域目前所面临的2个重要挑战。聚氨基酸是一类具有较好生物相容性、可生物降解、含有丰富侧链官能团的仿生功能高分子,在蛋白质修饰方面具有突出的优势,是有较大潜力的聚乙二醇替代物。本专论主要从新型 α -氨基酸-N-羧基酐(N-carboxyanhydrides, NCA)可控开环聚合方法、聚氨基酸原位官能化制备位点特异性蛋白质偶联物、扩展功能聚氨基酸分子库调控蛋白质功能等3个方面详细介绍蛋白质-聚氨基酸领域的研究进展,并对这类新型偶联物的发展进行了简单的评述和展望。

关键词 蛋白质偶联物, 聚氨基酸, 模拟蛋白翻译后修饰, 拓扑结构, 刺激响应性

1 蛋白质-高分子偶联物概述

蛋白质是一类具有特定结构和功能的生物大分子,其较高的生物活性、较强的特异性使其作为临床药物(如胰岛素、干扰素、白介素等)用于疾病的预防、诊断和治疗^[1]。然而由于蛋白质自身复杂的多级结构,使其存在溶解性差、热/酶稳定性低、体内循环半衰期较短、肾清除速率快、生物利用度低和具有免疫原性等不足,限制了蛋白类药物的发展和广泛应用。合成高分子具有合成简便、性质丰富、易设计加工、来源广泛以及较高的热和化学稳定性等优点。利用蛋白质和聚合物在化学结构、物理性质和生物功能上的互补性,蛋白质-高分子偶联物不仅能克服蛋白质自身存在的缺点,还可以产生协同作用,赋予蛋白质全新的功能和用途。因此利用高分子对蛋白质进行修饰在生物技术和生物医学领域具有极其重要的研究意义。

自从1977年Abuchowski等^[2]首次报道聚乙二醇(PEG)对蛋白的修饰可以降低其免疫原性,PEG被广泛应用于蛋白质的改性。PEG修饰增加

了蛋白质溶解性和水合半径,降低肾清除率,从而延长体内循环时间。目前已有超过十多种蛋白质-PEG偶联物被美国FDA所批准,用于治疗包括痛风、肝炎、贫血、癌症、免疫缺陷等多种疾病^[3]。然而PEG存在难以生物降解、难修饰、性质单一等局限性,并且有研究表明,PEG会导致过敏反应和免疫应答以及加速药物的血液清除等缺陷^[4]。此外,传统的PEG链修饰大多是与蛋白质的赖氨酸或半胱氨酸残基连接,PEG链数目不可控且不具备位点特异性,导致产物的成分复杂,结构异质化严重,难以分离提纯,生物活性降低等^[5]。为此,亟需发展位点特异的蛋白修饰方法,以避免对活性位点的影响,得到结构规整、性质均一、可重复性好和蛋白质活性保留高的偶联物^[6]。可见,寻找潜在的PEG替代物和发展具有位点特异性的蛋白质修饰方法是该领域2个重点研究方向^[7,8]。

由于烯烃类单体可控聚合方法的快速发展与成熟,使得各类烯烃聚合物被广泛用于蛋白质改性。如Maynard^[9]、Chilkoti^[10]和Barner-Kowollik^[11]分别将原子转移自由基聚合(ATRP)引发剂和可

* 聚氨基酸专辑; 2017-07-28收稿, 2017-09-22修稿; 国家自然科学基金(基金号 21474004, 21434008)资助项目。

** 通讯联系人, E-mail: chemhualu@pku.edu.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2018.17204

逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)链转移剂引入到蛋白质表面,采用“grafting-from”方法原位引发烯烃单体聚合得到偶联物;清华大学高卫平等^[12]通过在 α -干扰素(IFN- α)的C端引入ATRP引发位点,同样采用“grafting-from”得到位点特异的蛋白质偶联物,并在小鼠体内验证了该系列偶联物优异的药学性质,因此此类偶联物具有较大的药用前景.自由基聚合的优点在于方法较为成熟,单体结构丰富且简单易得.而其不足之处在于:ATRP使用的Cu(I)催化剂和有机配体,需要额外的步骤去除;RAFT聚合的链转移剂在蛋白修饰过程中易发生水解或胺解^[7].此外,由于蛋白质难以浓缩至普通聚合所需的高浓度,并且大部分实验室级别的蛋白质反应在1~100 mg量级,使得“grafting-from”方法往往存在自由基浓度偏低,引发效率低,单体损耗大,聚合过程可控性差和重复性不好等不足.近年来,科学家们又分别发展出了基于胺氧-羰基、钯催化的Suzuki-Miyaura偶联、炔-叠氮“点击化学”等高效化学反应的“grafting-to”方法来实现蛋白质的聚合物修饰^[13~16].如Scripps研究所Schultz^[13]和北京大学周德敏^[16]等采用基因编码扩展技术在蛋白质上定点引入带有羰基或叠氮基团的氨基酸,之后与胺氧或环辛炔功能化的PEG反应得到蛋白质偶联物;剑桥大学Scherman^[17]和苏州大学陈红^[18]则分别利用主客体相互作用构建了蛋白质-高分子偶联物.“Grafting-to”修饰方法中聚合物的结构和分子量更为可控,但是为了实现偶联,需要在蛋白质和聚氨基酸中分别引入生物偶联所需要的活泼官能团,过程较为繁琐.虽然烯烃类聚合物在蛋白质的改性方面取得了较大进展,但因其生物体内难以降解,这极大地限制了其在生物材料领域的应用.

在众多可降解生物材料中,聚氨基酸(poly(α -amino acid), P α AA)是一类由 α -氨基酸以多肽为主链的仿生高分子.其在生物体内酶的作用下水解,最终降解成氨基酸,具有良好的生物相容性和生物可降解性.此外,构成聚氨基酸的单体种类多样,来源丰富,可以是天然氨基酸,也可以是非天然的氨基酸衍生物,这极大地丰富了聚氨基酸的侧链化学结构和可修饰性.聚氨基酸的另一个显著特性是具有与蛋白质类似的丰富

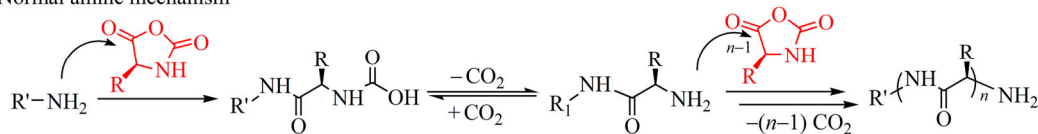
的多层级(hierarchical)结构:氨基酸序列构成了聚氨基酸链的一级结构;聚氨基酸链可通过主链氢键有规则的卷曲折叠形成具有 α -螺旋、 β -折叠等规整有序的二级结构;聚氨基酸的不同侧基之间还可以通过多种非共价相互作用使链段进一步折叠形成特定的三级结构.聚氨基酸的以上特性使其成为极具潜力的PEG替代物^[8, 19],在蛋白质的修饰上具有突出的优势.本专论归纳总结了本课题组和同行近年来在聚氨基酸可控制备、蛋白质-聚氨基酸偶联物合成以及功能化等方面的研究进展.

2 NCA开环聚合制备聚氨基酸

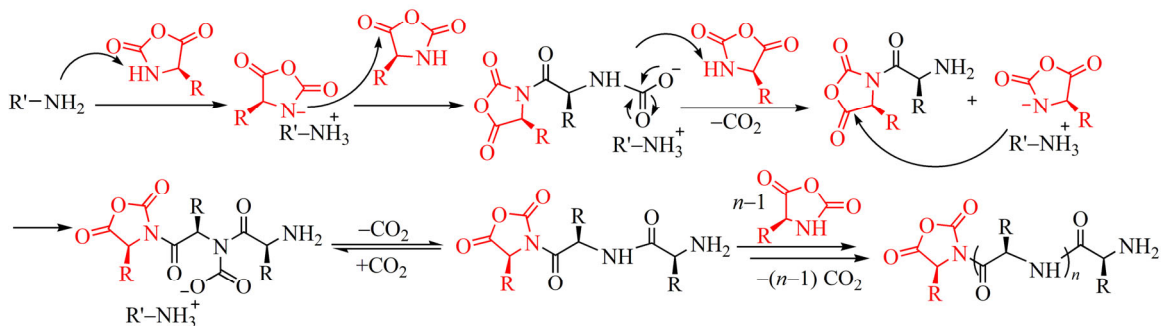
聚氨基酸的合成包括传统的固相合成法和内酰胺(lactam)、 α -氨基酸-*N*-羧基酐(*N*-carboxyanhydrides, NCA)的开环聚合法等.虽然固相合成法得到的聚氨基酸材料结构序列明确,但是该方法存在步骤繁琐,成本高,产物分离纯化难等缺陷,难以大量制备^[20].由于三元内酰胺单体难以稳定存在,内酰胺的开环聚合常用来制备除 α -聚氨基酸之外的 β -、 γ -、 δ -及 ϵ -聚氨基酸^[21].NCA开环聚合法能够在短时间内大量制备高分子量的聚 α -氨基酸,具有简单、高效等明显优势,因此成为目前制备聚氨基酸最为常用的方法^[22~24].

NCA的合成和开环聚合最早由Leuchs于1906年提出^[25].此后,人们对NCA的聚合进行了细致的研究,发展出一系列NCA聚合的引发剂.早期认为NCA聚合主要包括基于一级胺引发剂的常规胺引发机理(normal amine mechanism, NAM)和基于碱性引发剂的活化单体机理(activated monomer mechanism, AMM) 2种^[22](图1(a)). Deming等^[26, 27]采用零价钴和镍的络合物作为催化剂,该引发体系首先将NCA单体活化,生成螯合的金属环状中间体,然后引发聚合得到具有分子量可控和分散度较低的聚氨基酸,第一次真正实现了NCA的活性开环聚合(图1(b)).对NCA可控开环聚合的研究,还包括:Schlaad^[28]和Vicent^[29]分别报道的伯胺盐酸盐和四氟硼酸盐引发体系、Lin等^[30]采用的Pt(II)复合物、浙江大学凌君等^[31]开发的稀土金属引发剂. Hadjichristidis等^[32~34]提出采用高真空环境引发NCA聚合、二级

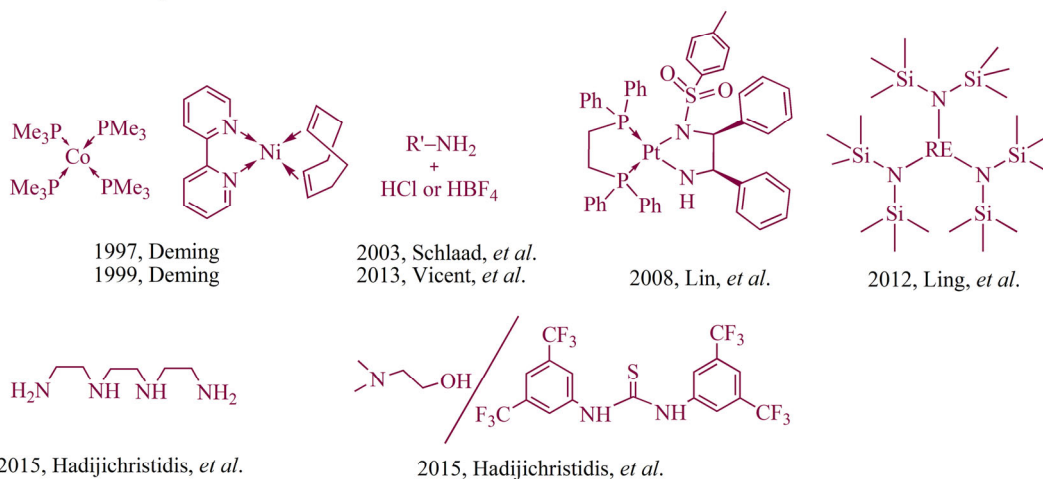
(a) Normal amine mechanism



Active monomer mechanism

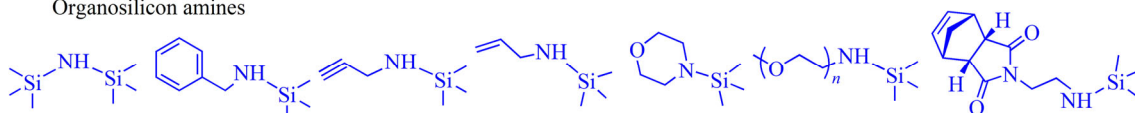


(b)

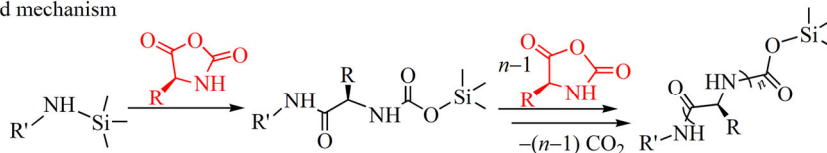


(c)

Organosilicon amines



Proposed mechanism



(d)

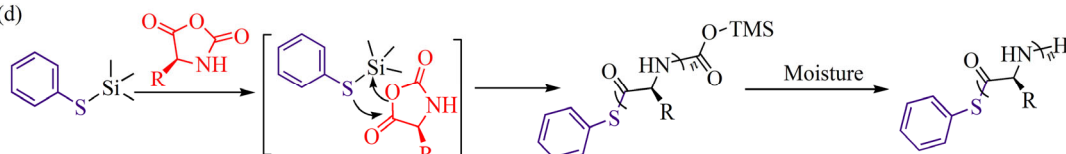


Fig. 1 (a) Two general ring-opening polymerization (ROP) mechanisms of α -amino acid NCAs; (b) Examples of reported initiation systems successfully used in controlled ROP of NCAs; (c) Structures of organosilicon amines and proposed mechanisms; (d) PhS-TMS mediated NCA polymerization (Adapted with permission from Ref.[41]; Copyright (2016) American Chemical Society)

胺或三级胺通过氢键作用活化单体来辅助一级胺的引发体系以及通过硫脲衍生物活化单体来辅助氨基醇类引发剂(图1(b)). 此外, 上海交通大学董常明等^[35]利用邻硝基苄保护赖氨酸NCA在紫外光照下的脱保护得到侧链氨基游离的引发剂型单体(inimer)赖氨酸NCA. 作者通过调节紫外光照时间和强度可得到线型或具有不同支化度的超支化型聚氨基酸.

Lu和Cheng^[36]在2007年发现六甲基二硅氮烷(HMDS)作为引发剂具有非常好的NCA单体耐受性并且能有效地控制聚氨基酸的分子量及分布(图1(c)). 在此基础上, 作者进一步发展了有机硅胺类引发剂来调控NCA聚合^[37]. 作者在机理研究过程中发现了不同聚合度的含三甲基硅基氨基甲酸酯结构的寡聚物中间体, 表明TMS基团从引发剂转移到聚合物链的末端, 并调控其活性, 实现活性开环聚合. 该聚合体系具有较好的官能团耐受性和兼容性, 能够与开环易位聚合联合使用, 方便地制备各种刷状与嵌段杂化聚氨基酸^[38-40].

然而, 由于有机硅胺类化合物较慢的引发速度, 其聚合活性和可控性仍有改善空间. 另一方面, 为了实现聚氨基酸C-端官能团化, 需在严格的无水条件下合成含有特定官能团的有机硅胺引发剂, 效率较低且不适于后续与蛋白质进行偶联. 近期, 我们课题组发展了苯硫酚三甲基硅烷(PhS-TMS)作为NCA可控开环聚合的新型引发剂^[41](图1(d)). 由于巯基相对于氨基更强的亲核性, 以及S—Si键的活泼性, 该引发剂极大提高了链引发速度, 从而更有利于实现活性聚合. PhS-TMS对多种侧链的NCA单体都表现出较好的分子量控制, 且分子量分布窄. 最为重要的是, 该引发剂可在聚氨基酸的C端原位引入一个活性较高的苯硫酯结构, 使得到的聚氨基酸材料方便实现端基官能团的转换, 可用于后续蛋白质-聚氨基酸偶联. 不过该方法的局限性在于当单体与引发剂比例较高时($M/I > 200$), 其分子量控制不够理想.

3 蛋白质-聚氨基酸偶联物的合成

目前关于蛋白质-聚氨基酸偶联物的研究尚处于起始和探索阶段. 2011年, Walde等^[42]在聚赖

氨酸侧链修饰上苯肼基团, 再使其与带有醛基的糜蛋白酶或辣根过氧化物酶反应, 得到侧链带有多个酶蛋白的偶联物, 并较好地保留了酶活性. Vicent等^[43]在聚谷氨酸侧链引入二硫吡啶基团, 然而与修饰上巯基的溶菌酶进行二硫键交换反应, 得到二硫键相连的具有还原响应性的溶菌酶-聚谷氨酸偶联物.

为了实现高效且位点特异的蛋白质-聚氨基酸偶联, 提高偶联效率, 需要简化官能团引入和修饰步骤, 为此我们提出了原位官能团化策略. 利用PhS-TMS引发NCA开环聚合, 原位得到端基含有苯硫酯活性基团的聚氨基酸链, 然后通过自然化学连接反应(NCL)将其与N端带有半胱氨酸(N-Cys)的蛋白质反应, 成功得到N端特异修饰的蛋白质-聚氨基酸偶联物(图2(a))^[44]. 该方法能够在近中性水溶液和室温下反应, 条件温和, 选择性好, 产率高. 另一方面, 我们成功地将分选酶介导的转肽反应(sortase A-mediated ligation, SML)应用于蛋白质-聚氨基酸偶联中(图2(b)). 分选酶(sortase A)是一个转肽酶, 其催化反应的2个底物分别含有C-端LPXTG (其中X为任意氨基酸)和N-端寡聚甘氨酸($\text{NH}_2\text{-G}_n$). 研究表明该酶对其中的寡聚甘氨酸底物有较高的容忍性, 具体表现为不同长度($n = 1 \sim 5$)的寡聚甘氨酸均可参与反应. 基于该特性, 我们用甘氨酸-NCA开环聚合原位得到寡聚甘氨酸片段; 研究发现用聚合方法所制备的寡聚甘氨酸尽管长度分布不均一, 但仍可以与含有LPETG序列的蛋白质发生SML, 从而得到C端位点特异的蛋白质-聚氨基酸偶联物. 由于SML的底物构建通常只能由固相多肽合成或基因编码来获得, 限制了其使用范围; 而我们所发展的这一方法可以方便地将该反应的底物适用范围拓展到各类合成高分子. 通过采用原位无痕的方式引入可进行正交反应的位点, 避免了传统制备方法中的官能团转化、聚合前/后修饰、以及保护/脱保护等步骤, 是一种简洁而经济的合成策略.

更有趣的是, 以上2种原位官能团化策略可以在同一个聚合过程中以一锅两步的方式联合使用, 制备末端分别含有苯硫酯和寡聚甘氨酸的异遥爪(hetero-telechelic)聚氨基酸(图2(c)). 利用这一特性, 我们通过连续的NCL和SML, 高效构

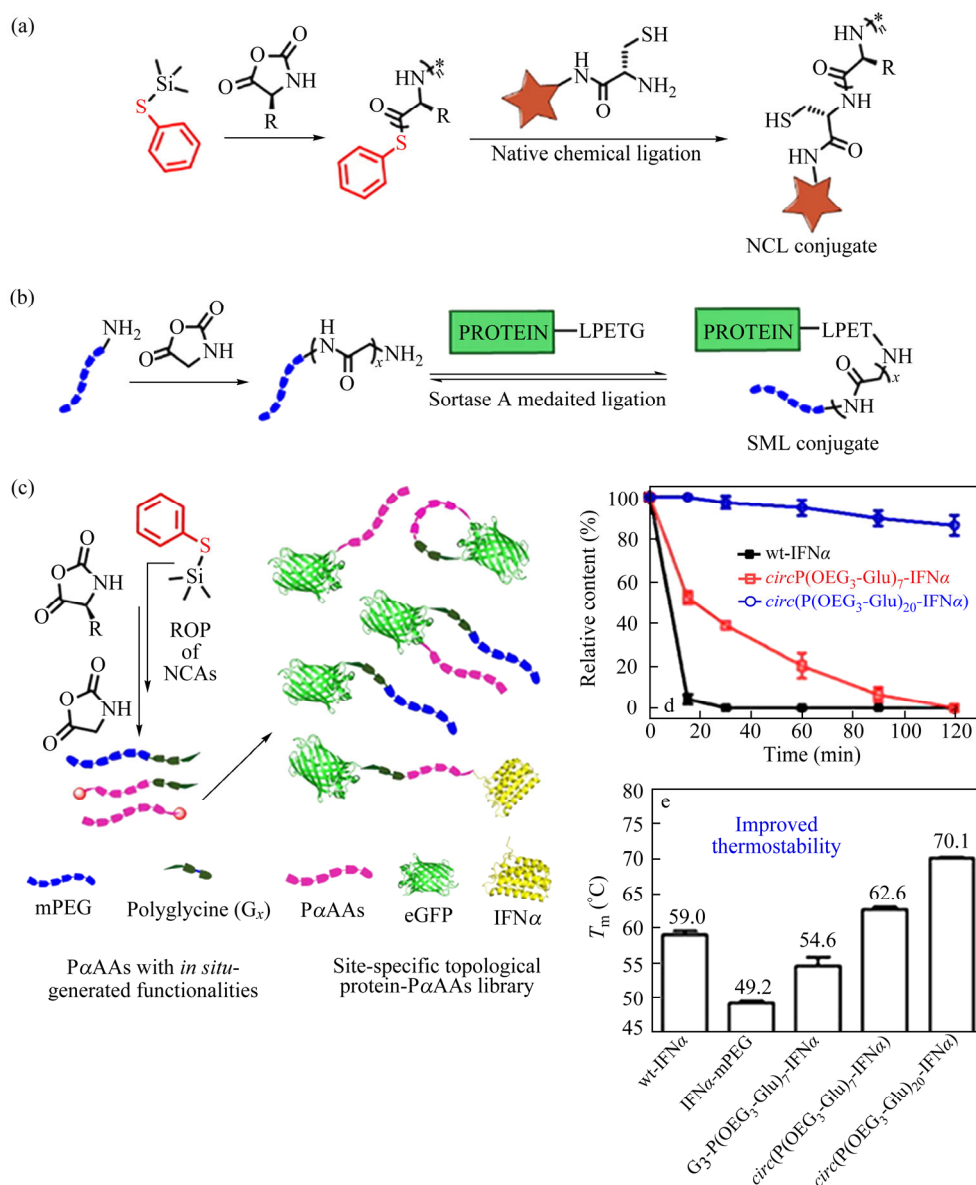


Fig. 2 (a) Synthesis of poly(α -amino acid)s (P α AAs) by PhS-TMS-mediated controlled ring of NCAs (A thioester was installed to the C-terminus of the P α AA and serves as a chemical handle for NCL reaction); (b) A polyglycine (G_x) nucleophile generated by ROP of glycine NCA as a substrate for SML reaction; Combinatorial application of NCL and SML facilely generated various protein-polymer conjugates with novel topology (c), which exhibited excellent protease resistance (d) and thermostability (e) (Adapted with permission from Ref.[44]; Copyright (2016) American Chemical Society)

筑了拓扑结构各异的蛋白质-聚氨基酸偶联物, 包括得到头-尾相接的环化偶联物。以干扰素(IFN- α)为模型蛋白, 我们初步研究了不同拓扑结构的干扰素-聚氨基酸偶联物的物理和生化性质。结果表明, 环化IFN α 偶联物相对于线型IFN α 和野生型IFN α , 其酶耐受性显著增加(图2(d))。环状偶联物将IFN α 的熔点提高了约11 °C, 表明了环状拓扑结构在提高蛋白质热稳定性上的巨大潜力(图2(e))。预期该类偶联物今后在蛋白质药物领域有

广阔的应用前景。

4 功能化聚氨基酸的制备

目前蛋白质-高分子偶联物中高分子的性质及其对蛋白质的调控作用模式较为单一。利用聚氨基酸侧链结构多样的性质, 设计和合成结构新颖的功能化聚氨基酸^[45, 46], 将有可能极大地丰富蛋白质-聚氨基酸偶联物性质, 实现具有多种影响模式和动态可调控的蛋白质偶联物。

4.1 模拟蛋白翻译后修饰聚氨基酸

蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTM)增加了蛋白质结构和功能的多样性,对细胞的信号传导、分化、迁移等活动发挥着重要的调控作用.常见的PTM有甲基化、乙酰化、泛素化、磷酸化、糖基化、磺酸化等^[47].模拟此类翻译后修饰结构有助于进一步了解蛋白质生物活性的开关和发展具有生物功能的新材料.聚氨基酸作为一类蛋白质模拟物,在模拟蛋白翻译后修饰方面有着天然的优势.目前,研究较多的是通过模拟蛋白质糖基化制备含糖侧链的聚氨基酸^[48-50].

蛋白质的磷酸化在细胞信号转导过程中起到关键作用,控制着细胞的增殖、凋亡和分化,是一类至关重要的翻译后修饰^[51].为了模拟磷酸化后修饰,我们课题组合成了具有磷酸二乙酯侧基的酪氨酸NCA (pOEt-TyrNCA),之后采用HMDS作为引发剂实现了pOEt-TyrNCA的活性开环聚合,脱保护后得到聚磷酸化酪氨酸(PpY)^[52](图3(a)).细胞实验表明PpY具有较低的细胞毒性.有意思的是,PpY保留了磷酸化酪氨酸的磷酸酶响应性.在碱性磷酸酶(ALP)催化作用下,PpY被去磷酸化(dephosphorylation),得到水溶性较差的聚酪氨酸,并通过物理交联构筑水凝胶.基于聚磷酸化酪氨酸的ALP响应性,我们将带有负电荷的PEG-*b*-PpY嵌段高分子与含有Pt(IV)抗癌前药的阳离子聚合物通过静电作用形成聚离子复合胶束(Pt-PIC)^[53](图3(b)).研究发现,该复合胶束Pt-PIC的细胞毒性和细胞内吞与胞外酶的ALP表达水平有关,从而实现具有细胞选择性抗癌药物的输送.此外,利用磷酸根的金属配位能力,我们可以构建基于磷酸根-Pt(II)并含有靶向基团iRGD的超分子纳米药物(iPpY/Pt)^[54](图3(c)).实验结果表明该纳米药物在细胞外和血清等生理条件下有优异的稳定性,不发生聚集沉淀;而对细胞内的高ATP和弱酸性pH有双重响应,从而实现在癌细胞内快速释放Pt(II)药物,发挥其抗癌功能,最终得到良好的活体内抗肿瘤疗效和相对顺铂更好的安全性能.

以上结果表明通过模拟蛋白质PTM结构,可以构筑具有生物分子响应和活性的功能聚氨基酸.如将其与蛋白质偶联,预期将在免疫调控、

抗体开发以及蛋白质递送等方向有潜在应用.

4.2 刺激响应聚氨基酸

刺激响应聚氨基酸能够对外界环境中的温度、氧化还原、pH和光等刺激有明显响应且自身物化性质发生显著改变^[55,56].与其它刺激响应性聚合物相比,刺激响应聚氨基酸独特的二级结构响应性,使人们可以通过聚氨基酸本身二级结构的变化来实现蛋白质活性和性能的动态调控,设计和发展全新的蛋白质-聚氨基酸偶联物.

根据临界温度的不同,温度响应聚氨基酸可分为具有低临界溶解温度(lower critical solution temperature, LCST)和高临界溶解温度(upper critical solution temperature, UCST)2种.青岛科技大学李志波等^[57-59]将寡聚乙二醇(OEG)引入到聚谷氨酸侧链,得到具有LCST的温度刺激响应聚氨基酸.湘潭大学唐浩宇等^[60]通过将离子液体引入到聚谷氨酸侧链,得到具有UCST性质的聚氨基酸.

氧化还原响应聚氨基酸通常在聚合物的主链、侧链或交联结构中存在可被还原的二硫键或可被氧化的硫醚.如中国科学院长春应用化学研究所陈学思^[61]和武汉大学张先正^[62]分别通过胱氨酸NCA单体的聚合和聚半胱氨酸侧链巯基的氧化交联得到具有细胞内谷胱甘肽还原响应性的聚氨基酸药物载体. Deming等^[63]则合成侧链糖基化的聚半胱氨酸,利用硫醚可被H₂O₂氧化成较亲水的砜结构,得到构象可转变的氧化响应性聚氨基酸.

pH响应聚氨基酸主要是基于氨基酸侧链氨基、咪唑和羧基等的pH响应性来实现.苏州大学钟志远等^[64]合成了不同pH下聚氨基酸构型和组装形貌可转变的聚乙二醇-聚亮氨酸-聚谷氨酸三嵌段共聚物. Bae等^[65]报道了基于组氨酸的pH响应聚多肽. Lecommandoux等^[66]合成了聚谷氨酸和聚赖氨酸链段等摩尔比的两性离子嵌段共聚物,得到不同pH下核壳相互转换的“schizophrenic”型胶束. Kataoka等^[67]通过酰胺键将抗癌药物连接在聚乙二醇-聚天冬氨酸侧链,该聚合物在生理环境下可形成稳定的胶束.随着环境pH值从7.4降低到3.0,酰胺键的断裂使得药物逐渐被释放出来.

与其他刺激信号相比,光具有安全、清洁、

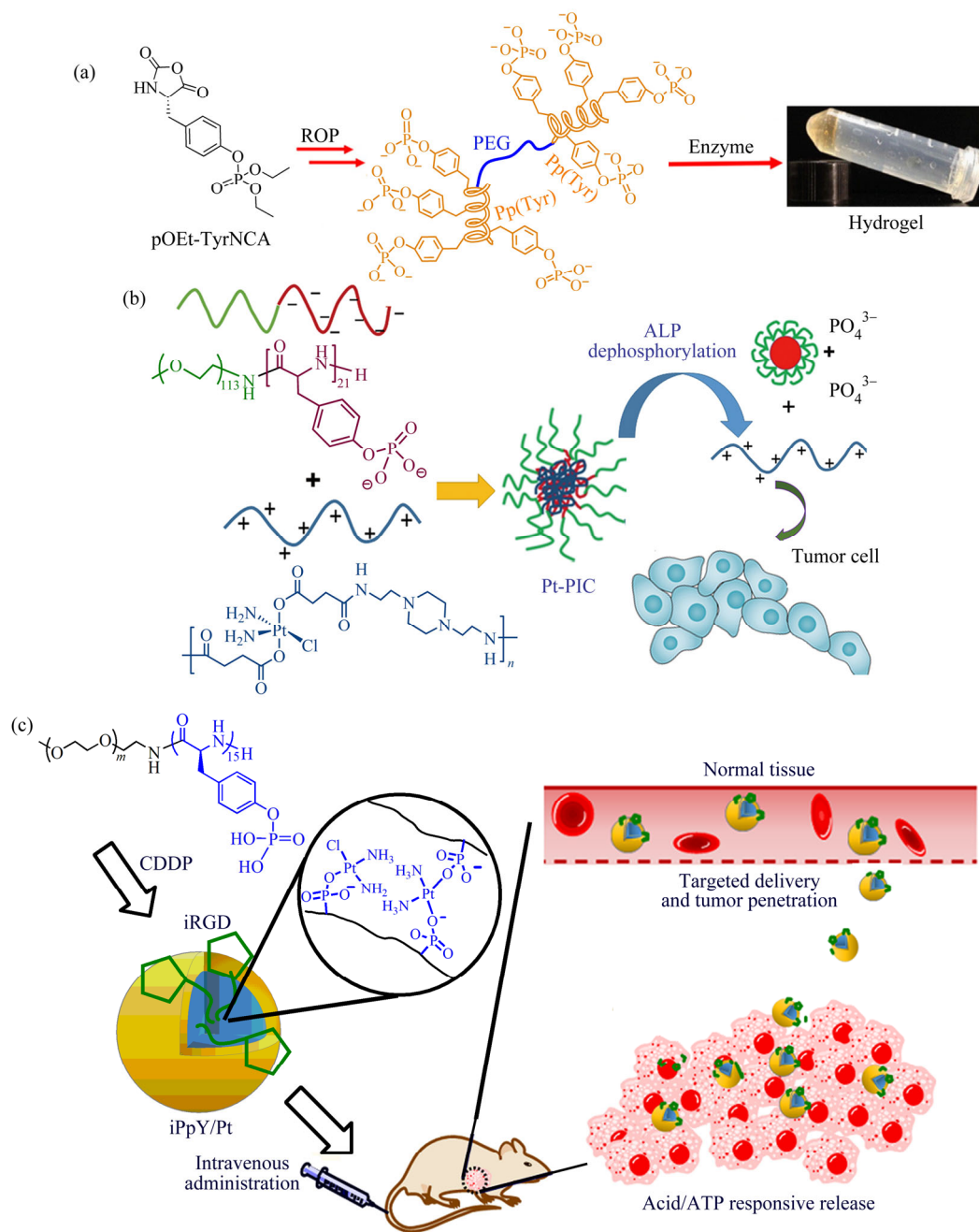


Fig. 3 (a) Synthesis and enzyme-induced hydrogelation of poly(L-phosphotyrosine) (PpY) (Adapted with permission from Ref.[52]; Copyright (2015) American Chemical Society); (b) Schematic illustration of the alkaline phosphatase-triggered dissociation of Pt(IV)-based polyion complex (Pt-PIC) to releases Pt(II) prodrug (Adapted with permission from Ref.[53]; Copyright (2017) The Royal Society of Chemistry); (c) Schematic illustration of acid/ATP-responsive cisplatin release using iPPY/Pt micelle (iPPY/Pt was prepared based on phosphate-patinum complexation and equipped with targeting ligand iRGD) (Adapted with permission from Ref.[54]; Copyright (2017) American Chemical Society)

非侵入等优点, 可在时间和空间上进行精确控制, 并且可通过调控波长和光强实现多种光化学反应分别或同时发生. Mezzenga等^[68]将螺吡喃接枝到聚乙二醇-*b*-聚谷氨酸侧链得到光照下组装形貌可逆的光致异构型聚氨基酸. 董常明等^[69]采

用聚乙二醇引发侧基带有紫外光响应的邻硝基苄基团的半胱氨酸NCA聚合得到光致降解型聚氨基酸. Yin和Cheng等^[70]将4,5-二甲氧基-2-硝基苄酯保护的聚谷氨酸引入到阳离子聚多肽中, 利用紫外光下光敏基团的离去使得聚多肽构象和

电荷密度发生改变, 实现了DNA的光可控释放并增强了基因转染效率.

近期, 我们课题组^[71]设计合成了一类侧链同

时带有偶氮苯和寡聚乙二醇的新型NCA单体 $\text{OEG}_m\text{-AzoNCA}$, 采用HMDS引发该单体聚合得到同时具有光 and 热多重响应性的聚氨基酸

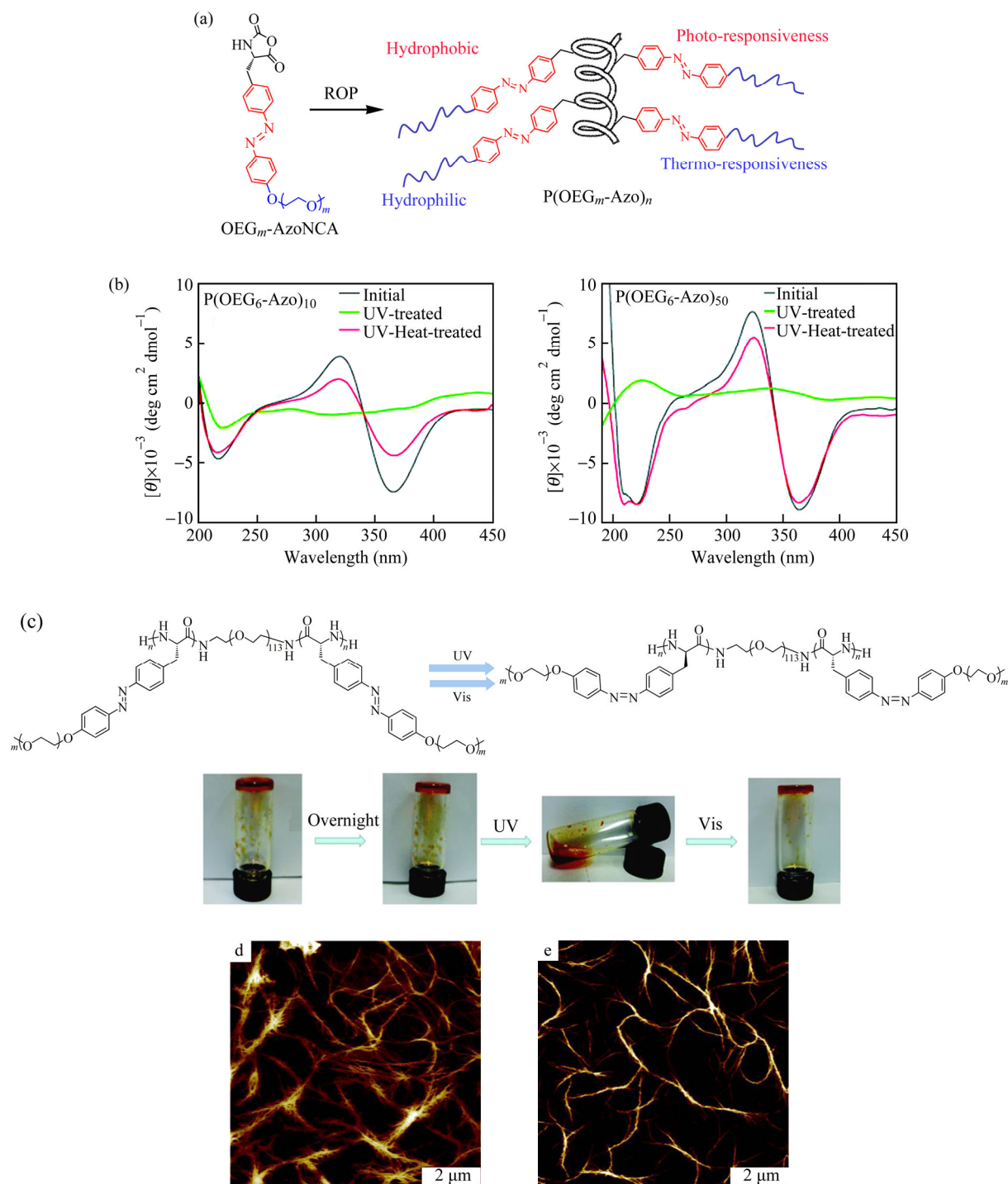


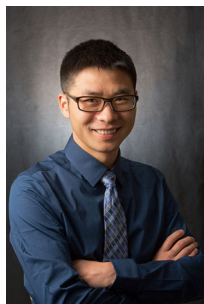
Fig. 4 (a) Synthesis of dual photo- and thermal- responsive PαAAs; (b) CD spectra of $\text{P(OEG}_6\text{-Azo)}_{10}$ and $\text{P(OEG}_6\text{-Azo)}_{50}$ in 2,2,2-trifluoroethyl alcohol (the polymers were first irradiated with UV at 365 nm for 5 min, followed by heating at 70 °C for 60 min) (The online version is colorful.); (c) Photographs of triblock copolymer $\text{P(OEG}_6\text{-Azo)}_7\text{-PEG-P(OEG}_6\text{-Azo)}_7$ solution in THF showing reversible UV-Vis triggered gel-sol transition; AFM images of $\text{P(OEG}_6\text{-Azo)}_7\text{-PEG-P(OEG}_6\text{-Azo)}_7$ organogel in its original state (d) and after UV irradiation (e) (Adapted with permission from Ref.[71]; Copyright (2016) The Royal Society of Chemistry)

$P(\text{OEG}_m\text{-Azo})_n$ (图4(a)). 圆二色光谱 (circular dichroism, CD) 研究发现, 低分子量的 $P(\text{OEG}_6\text{-Azo})_{10}$ 在三氟乙醇中具有典型的 β -sheet结构, 而高分子量的 $P(\text{OEG}_6\text{-Azo})_{50}$ 则表现出较弱的 α -螺旋构型(图4(b)). 在365 nm紫外光照下, 偶氮苯由可见光下极性较小的反式构型转化为极性较大的顺式构型, 导致聚氨基酸由二级结构转变为无规卷曲. 进一步将紫外光照后的聚氨基酸溶液加热到70 °C, CD结果表明聚氨基酸又从无规卷曲转变为二级结构. 同时, 我们也合成了 $P(\text{OEG}_m\text{-Azo})_n\text{-PEG-}P(\text{OEG}_m\text{-Azo})_n$ 三嵌段共聚物(图4(c)). 在THF溶液中, 由于分子链之间形成交联度较高的纤维状结构, 该聚氨基酸溶液形成凝胶. 紫外光照下, 分子链间的交联程度降低, 溶液呈溶胶状. 有意思的是, 可见光下, 溶胶可进一步凝胶化, 实现了光致溶胶-凝胶(sol-gel)之间的转换(图4(d)). 这种集光和热响应基元一体化的NCA单体为刺激响应型聚氨基酸材料的多功能化设计提

供了新的思路.

5 总结与展望

过去20年, NCA活性可控聚合带来了聚氨基酸材料的迅速发展, 人们得以制备结构规整、功能各异的聚氨基酸新分子, 并且对聚氨基酸的二级结构和自组装性质进行细致的研究. 然而目前人们对聚氨基酸材料在蛋白质偶联物中的应用研究仍处于初始探究阶段. 预期, 在拓宽聚氨基酸种类的基础上, 我们认为可以从以下几个方面进行考虑: (1)快速、便捷地在聚氨基酸链上引入高活性生物正交反应基团, 制备和发展具有位点特异性的蛋白质-聚氨基酸材料; (2)充分利用聚氨基酸独特的二级结构调控蛋白活性, 以及进一步发展功能聚氨基酸分子对蛋白质功能进行可逆干预与动态调控; (3)深入探讨蛋白质-聚氨基酸偶联物的构效关系: 如位点效应、拓扑结构效应和聚氨基酸二级结构效应等.



作者简介: 吕华, 男, 1983 年出生. 2006 年于北京大学获学士学位, 2011 年于美国伊利诺伊大学香槟分校获博士学位, 2011~2014 年在美国斯克里普斯研究所从事博士后研究. 2014 年任北京大学化学与分子工程学院研究员, 博士生导师. 2015 年度获得中组部青年千人计划支持(第十一批)资助. 研究方向包括可控开环聚合、聚氨基酸生物材料和蛋白质偶联物.

REFERENCES

- 1 Swinney D C, Anthony J. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(7): 507 – 519
- 2 Abuchowski A, Vanes T, Palczuk N C, Davis F F. *J Biol Chem*, 1977, 252(11): 3578 – 3581
- 3 Alconcel S N S, Baas A S, Maynard H D. *Polym Chem*, 2011, 2(7): 1442 – 1448
- 4 Schellekens H, Hennink W E, Brinks V. *Pharm Res*, 2013, 30(7): 1729 – 1734
- 5 Gauthier M A, Klok H A. *Polym Chem*, 2010, 1(9): 1352 – 1373
- 6 Kochendoerfer G G. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9(6): 555 – 560
- 7 Pelegri-O'Day E M, Lin E W, Maynard H D. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(41): 14323 – 14332
- 8 Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert U S. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(36): 6288 – 6308
- 9 Bontempo D, Maynard H D. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(18): 6508 – 6509
- 10 Gao W, Liu W, Mackay J A, Zalutsky M R, Toone E J, Chilkoti A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(36): 15231 – 15236
- 11 Boyer C, Bulmus V, Liu J, Davis T P, Stenzel M H, Barner-Kowollik C. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(22): 7145 – 7154
- 12 Hu J, Zhao W, Gao Y, Sun M, Wei Y, Deng H, Gao W. *Biomaterials*, 2015, 47: 13 – 19
- 13 Cho H, Daniel T, Buechler Y J, Litzinger D C, Maio Z, Putnam A M H, Kraynov V S, Sim B C, Bussell S, Javahishvili T, Kaphle S, Viramontes G, Ong M, Chu S, Becky G C, Lieu R, Knudsen N, Castiglioni P, Norman T C, Axelrod D W, Hoffman A R, Schultz P G, DiMarchi R D, Kimme B E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(22): 9060 – 9065

- 14 Kochendoerfer G G, Chen S Y, Mao F, Cressman S, Traviglia S, Shao H Y, Hunter C L, Low D W, Cagle E N, Carnevali M, Gueriguian V, Keogh P J, Porter H, Stratton S M, Wiedeke M C, Wilken J, Tang J, Levy J J, Miranda L P, Crnogorac M M, Kalbag S, Botti P, Schindler-Horvat J, Savatski L, Adamson J W, Kung A, Kent S B H, Bradburne J A. *Science*, 2003, 299: 884 – 887
- 15 Dumas A, Spicer C D, Gao Z, Takehana T, Lin Y A, Yasukohchi T, Davis B G. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(14): 3916 – 3921
- 16 Zhang B, Xu H, Chen J, Zheng Y, Wu Y, Si L, Wu L, Zhang C, Xia G, Zhang L, Zhou D. *Acta Biomater*, 2015, 19: 100 – 111
- 17 Biedermann F, Rauwald U, Zayed J M, Scherman O A. *Chem Sci*, 2011, 2(2): 279 – 286
- 18 Cao L, Shi X, Cui Y, Yang W, Chen G, Yuan L, Chen H. *Polym Chem*, 2016, 7(32): 5139 – 5146
- 19 Barz M, Luxenhofer R, Zentel R, Vicent M J. *Polym Chem*, 2011, 2(9): 1900 – 1918
- 20 Merrifield R B. *J Am Chem Soc*, 1963, 85(14): 2149 – 2154
- 21 Tao Youhua(陶友华). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2016, (9): 1151 – 1159
- 22 Huang J, Heise A. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(17): 7373 – 7390
- 23 Wang Mingzhi(王明智), Du Jianzhong(杜建忠). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2014, (9): 1183 – 1194
- 24 Cheng J, Deming T J. *Topics in Current Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, 2012, 310: 1 – 26
- 25 Leuchs H. *Chem Ber*, 1906, 39: 857 – 861
- 26 Deming T J. *Nature*, 1997, 390(6658): 386 – 389
- 27 Deming T J. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(17): 4240 – 4241
- 28 Dimitrov I, Schlaad H. *Chem Commun*, 2003, 23: 2944 – 2945
- 29 Conejos-Sánchez I, Duro-Castano A, Birke A, Barz M, Vicent M J. *Polym Chem*, 2013, 4(11): 3182 – 3186
- 30 Peng Y, Lai S, Lin C. *Macromolecules*, 2008, 41(10): 3455 – 3459
- 31 Peng H, Ling J, Shen Z. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem*, 2012, 50(6): 1076 – 1085
- 32 Aliferis T, Iatrou H, Hadjichristidis N. *Biomacromolecules*, 2004, 5(5): 1653 – 1656
- 33 Zhao W, Gnanou Y, Hadjichristidis N. *Biomacromolecules*, 2015, 16(4): 1352 – 1357
- 34 Zhao W, Gnanou Y, Hadjichristidis N. *Polym Chem*, 2015, 6(34): 6193 – 6201
- 35 Li P, Dong C. *ACS Macro Lett*, 2017, 6(3): 292 – 297
- 36 Lu H, Cheng J. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(46): 14114 – 14115
- 37 Lu H, Cheng J. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(38): 12562 – 12563
- 38 Lu H, Wang J, Lin Y, Cheng J. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(38): 13582 – 13583
- 39 Bai Y, Lu H, Ponnusamy E, Cheng J. *Chem Commun*, 2011, 47(38): 10830 – 10832
- 40 Baumgartner R, Fu H, Song Z, Lin Y, Cheng J. *Nat Chem*, 2017, 9(7): 614 – 622
- 41 Yuan J, Sun Y, Wang J, Lu H. *Biomacromolecules*, 2016, 17(3): 891 – 896
- 42 Grotzky A, Manaka Y, Kojima T, Walde P. *Biomacromolecules*, 2010, 12(1): 134144
- 43 Talelli M, Vicent M J. *Biomacromolecules*, 2014, 15(11): 4168 – 4177
- 44 Hou Y, Yuan J, Zhou Y, Yu J, Lu H. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(34): 10995 – 11000
- 45 Deng C, Wu J, Cheng R, Meng F, Klok H A, Zhong Z. *Prog Polym Sci*, 2014, 39(2): 330 – 364
- 46 Lu H, Wang J, Song Z, Yin L, Zhang Y, Tang H, Tu C, Lin Y, Cheng J. *Chem Commun*, 2014, 50(2): 139 – 155
- 47 Walsh C T, Garneau-Tsodikova S, Gatto G J. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44(45): 7342 – 7372
- 48 Kramer J R, Deming T J. *Polym Chem*, 2014, 5(3): 671 – 682
- 49 Pratt M R, Bertozzi C R. *Chem Soc Rev*, 2005, 34(1): 58 – 68
- 50 Pati D, Shaikh A Y, Das S, Nareddy P K, Swamy M J, Hotha S, Gupta S S. *Biomacromolecules*, 2012, 13(5): 1287 – 1295
- 51 Rubin C S, Rosen O M. *Annu Rev Biochem*, 1975, 44(1): 831 – 887
- 52 Sun Y, Hou Y, Zhou X, Yuan J, Wang J, Lu H. *ACS Macro Lett*, 2015, 4(9): 1000 – 1003
- 53 Li S, Hou Y, Hu Y, Yu J, Wei W, Lu H. *Biomater Sci*, 2017, 5: 1558 – 1566
- 54 Hou Y, Wang Y, Wang R, Bao W, Xi X, Sun Y, Lu H. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(21): 17757 – 17768
- 55 Shen Y, Fu X, Fu W, Li Z. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(3): 612 – 622
- 56 Yuan Jingsong(袁劲松), Lu Hua(吕华). *Polym Bull(高分子通报)*, 2015, (9): 210 – 216
- 57 Chen C, Wang Z, Li Z. *Biomacromolecules*, 2011, 12(8): 2859 – 2863
- 58 Fu X, Ma Y, Sun J, Li Z. *Chinese J Polym Sci*, 2016, 34(12): 1436 – 1447
- 59 Zhang S, Chen C, Li Z. *Chinese J Polym Sci*, 2013, 2(31): 201 – 210

- 60 Ge C, Liu S, Liang C, Ling Y, Tang H. *Polym Chem*, 2016, 7(38): 5978 – 5987
- 61 Shi F, Ding J, Xiao C, Zhuang X, He C, Chen L, Chen X. *J Mater Chem*, 2012, 22(28): 14168 – 14179
- 62 Wang K, Luo G, Liu Y, Li C, Cheng S, Zhuo R, Zhang X. *Polym Chem*, 2012, 3(4): 1084 – 1090
- 63 Kramer J R, Deming T J. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(9): 4112 – 4115
- 64 Chen P, Qiu M, Deng C, Meng F, Zhang J, Cheng R, Zhong Z. *Biomacromolecules*, 2015, 16(4): 1322 – 1330
- 65 Lee E S, Oh K T, Kim D, Youn Y S, Bae Y H. *J Control Release*, 2007, 123(1): 19 – 26
- 66 Rodríguez-Hernández J, Lecommandoux S. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(7): 2026 – 2027
- 67 Bae Y, Fukushima S, Harada A, Kataoka K. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42(38): 4640 – 4643
- 68 Kotharangannagari V K, Sánchez-Ferrer A, Ruokolainen J, Mezzenga R. *Macromolecules*, 2011, 44(12): 4569 – 4573
- 69 Liu G, Dong C. *Biomacromolecules*, 2012, 13(5): 1573 – 1583
- 70 Yin L, Tang H, Kim K H, Zheng N, Song Z, Gabrielson N P, Lu H, Cheng J. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(35): 9182 – 9186
- 71 Xiong W, Fu X, Wan Y, Sun Y, Li Z, Lu H. *Polym Chem*, 2016, 7(41): 6375 – 6382

Efficient Synthesis and Application of Protein-Poly(α -amino acid) Conjugates

Chong Zhang, Hua Lu*

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Polymer Chemistry and Physics of Ministry of Education, Center for Soft Matter Science and Engineering, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Protein-polymer conjugates are important therapeutics for various diseases. There are currently two major challenges in this field: one is the search of new biodegradable polymers beyond traditional PEGylation, and the other is to develop highly efficient and site-specific conjugation strategy. Poly(α -amino acid)s (PaAAs) are biodegradable and biocompatible polymers with tunable properties and numerous functions, making them promising candidates for protein modification. In this review, we summarize our recent progresses in protein-PaAAs conjugates. Specifically, we discuss our developments in: (1) Recent developments in the controlled ring-opening polymerization (ROP) of α -amino acid *N*-carboxyanhydrides (NCAs), including amine-based initiators, organometallic initiators, organosilicon amines initiators and sulfide-based initiators. For instance, trimethylsilyl phenylsulfide (PhSTMS) is a novel initiator for controlled ROP of NCAs. It exhibits higher nucleophilicity than conventional amine-based initiator, and thus affords considerably higher chain initiation rate to ensure a more controlled polymerization. Moreover, this initiator is well-tolerated to various functional groups. (2) *In situ* functionalization of PaAAs for site-specific protein conjugation, and construction of various topological structures. Using PhSTMS initiator, it *in situ* generates a reactive phenyl thioester group at one end of the PaAAs, which can be used for protein *N*-terminus conjugation *via* native chemical ligation (NCL); moreover, ROP of glycine NCA yields oligoglycine at the other end of PaAAs, which can be used for C-terminus protein conjugation *via* sortase-A mediated ligation (SML). More interestingly, combinatory use of the two methods can construct various topological protein-PaAA conjugates including the head-to-tail circular conjugates. (3) Development of functional PaAAs for potential protein conjugation. Various functional PaAAs have been developed as delivery materials or hydrogels. To further expand the arsenal of PaAAs for potential modulation of protein functions, PaAAs that mimic protein post-translational modifications (PTM) are synthesized; On the other hand, a series of multiple stimuli-responsive PaAAs are also produced. These PaAAs show interesting enzyme, light, and/or thermal responsiveness, which could be potentially harnessed for modulation of protein functions in the future.

Keywords Protein conjugation, Poly(α -amino acid), PTM mimicking, Topology, Stimuli-responsiveness

*Corresponding author: Hua Lu, E-mail: chemhualu@pku.edu.cn