

DOI: 10.13376/j.cbls/2017020

文章编号: 1004-0374(2017)02-0160-04

聚谷氨酸衍生物及其在生物医药领域中的应用

耿旭*, 林波, 谢振兴, 叶文凌

(河南大学医学院, 开封 475004)

摘要: 聚谷氨酸衍生物是在 γ -聚谷氨酸的基础上发展而来的, 具有独特的结构和性能, 在医药领域中有潜在的应用价值。聚谷氨酸衍生物按照其设计和制备特点, 可分成 3 种类型: γ -聚谷氨酸修饰衍生物、含谷氨酸结构单元的衍生物和 γ -聚谷氨酸交联衍生物。现分别介绍不同类型衍生物的合成思路、性质特征和具体应用。这将有助于 γ -聚谷氨酸衍生物在医药领域的研究和应用, 同时也能为这一领域其他高分子材料的开发提供借鉴。

关键词: γ -聚谷氨酸; 衍生物; 药物

中图分类号: R318.08 **文献标志码:** A

Poly (glutamic acid) derivatives and their application in biomedical fields

GENG Xu*, LIN Bo, XIE Zhen-Xing, YE Wen-Ling

(Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Poly (glutamic acid) derivatives which are developed on base of poly (γ -glutamic acid) have unique structure and performance and have potential application in the field of medicine. According to the characteristics of its design and preparation, poly (glutamic acid) derivatives can be divided into three types: derivatives of poly (γ -glutamic acid) modified, derivatives containing structural unit of glutamate and derivatives of poly (γ -glutamic acid) cross-linked. This review introduced synthesis methods, characteristics and application of different types of derivatives respectively. This will contribute to the research and application of poly (glutamic acid) derivatives in biological and medical fields, and it also can provide reference for other polymer materials development in the field.

Key words: poly (γ -glutamic acid); derivatives; pharmaceuticals

γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是一种具有生物可降解性、无毒性、生物相容性、无免疫原性的天然高分子聚合物^[1]。 γ -PGA 在食品、农业、化妆品、医药和环保等领域有着广泛应用前景^[2]。 γ -PGA 是在 1937 年被 Ivanovics 等首次发现, 由谷氨酸单元之间的 γ -羧基与 α -氨基以酰胺键的方式聚合而成, 其侧链为单一 α -羧基基团。 γ -PGA 的合成有两条途径: (1) 生物合成是利用微生物, 例如地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌发酵而获得; (2) 化学合成通常采用 γ -苄基-L-谷氨酸先转化为 N-羧基环内酸酐单体 (NCA), 由经过开环聚合 (ring opening polymerization, ROP)、脱去苄基和纯化等过程制备^[3-5]。近年来, 随着对 γ -PGA 开发利用研究的深入, 不同类型的 γ -PGA 衍生物不断出现, 它们具有新的特性, 有着新的用途,

受到人们广泛关注。

γ -PGA 众多衍生物按照其结构特征可以粗略分成 3 类: 第一类衍生物是以生物来源的 γ -PGA 为基础对其进行化学修饰而获得; 第二类衍生物是以谷氨酸作为结构单元, 以有机合成的方式接入有机聚合物而形成复杂的聚合物; 第三类衍生物是以 γ -PGA 自身或与其他有机聚合物相互交联形成水凝胶。本文将从这 3 方面介绍 γ -PGA 的衍生物及它们在生物医药领域中的应用, 为后续开发利用提供参考和借鉴。

收稿日期: 2016-04-07; 修回日期: 2016-05-30

基金项目: 博士启动基金(B2012047)

*通信作者: E-mail: gengxu@163.com

1 γ -聚谷氨酸修饰衍生物

γ -PGA 的这类修饰衍生物是在 γ -PGA 聚合物的基础上通过化学反应接入修饰分子,往往是从生物合成 γ -PGA 开始经过几步化学反应而获得;它们利用接入分子的特性而赋予 γ -PGA 新的特征,获得新的用途。 γ -PGA 可以利用侧链羧基借助酯化或酰胺反应接入各种类型的小分子化合物形成衍生物,其中酰胺反应接入形式更为常见,所用的催化剂多为温和的碳化二亚胺类,如二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)和 1-乙基-(3'-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)等^[6],如 γ -PGA 溶解于硫酸二甲酯(Me_2SO)中在碳酸氢钠作用下可以与苄基溴或丁溴发生酯化反应,所得产物在二甲基亚砷、氯仿、甲醇和水中的溶解特性发生显著变化^[7];如叶酸修饰 γ -PGA (γ -PGA-FA)是通过叶酸蝶啶基团上的氨基与 γ -PGA 羧基酰胺反应而获得。 γ -PGA-FA 的具体反应过程:50 mL 的 γ -PGA 溶液(1 mg/mL, pH 6.5)中滴加 EDC 溶液(8 mg)室温搅拌 30 min;然后,加入叶酸溶液(DMSO 为溶剂,12 mg)室温搅拌反应 24 h。 γ -PGA-FA 对过表达叶酸受体的卵巢癌细胞 A2780/AD 有靶向作用,可用作抗癌药物的靶向治疗^[8]。例如, γ -PGA (MW = 48 万)在 50 mL 的碳酸氢钠溶液中(50 mmol/L, pH 8.5),用 EDC 作为催化剂,与氨基酸乙酯盐酸盐(如 L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-蛋氨酸、L-色氨酸或 L-苯丙氨酸)发生酰胺反应,在室温下作用 24 h,获得氨基酸乙酯修饰的 γ -PGA (γ -PGA-graft-AAE)。 γ -PGA-graft-AAE 溶液(10 mg/mL, DMSO)滴加等体积的 NaCl 溶液并用移液管混合几次,可以获得纳米粒,这类纳米粒可用于开发纳米类型的疫苗佐剂。苯丙氨酸修饰的 γ -PGA (γ -PGA-Phe)所形成的纳米粒装载多肽疫苗(EphA2 的衍生肽),对小鼠肝癌细胞 MC38 能够产生获得性免疫抗肿瘤的治疗效果^[9-10]。

γ -PGA 还可以利用末端氨基经酰胺反应接入高分子,如 500 mg 的 γ -PGA 可以与 200 mg 乙烯砷基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯(VS-PEG-NHS)在磷酸缓冲液(1.0 mol/L, pH = 8)中室温反应,获得共聚物 VS-PEG-PG。在二甲基甲酰胺(DMF)溶剂中,VS-PEG-PG 经 DIC 和吡啶作用下与阿霉素(DOX)发生酰胺反应而装载药物;在进一步与带巯基抗体 C225(针对表皮生长因子受体)作用而偶联靶向配体,成为靶向阿霉素复合物(C225-PEG-PG-DOX)。

C225-PEG-PG-DOX 可通过受体介导的内吞快速进入人外阴鳞状癌细胞 A431(靶细胞),可以显著抑制 A431 细胞的生长^[11]。

2 含谷氨酸结构单元的衍生物

含谷氨酸结构单元的衍生物是在化学合成 γ -PGA 的基础上衍化发展而来的,可以形成共聚物、接枝聚合物和树状大分子等各种类型的聚合物。谷氨酸作为一个结构单元与其他单元结合而构建形成聚合物,它能够以侧链形式、共聚主链、主链和末端修饰基团等多种形式存在。这些衍生物在结构和组成上与 γ -PGA 有显著差异,具有独特的理化性质,能够被应用于医药领域。例如,梳形聚合物 alkyne-PAMA- γ -PLGA 是由末端炔基聚丙烯酰胺(alkyne-PAMA)作为大分子引发剂与 L-谷氨酸- γ -苄酯-N-羧酸酐(BLG-NCA)开环聚合而获得。alkyne-PAMA- γ -PLGA 制备过程:alkyne-PAMA 与 BLG-NCA 聚合,经 HBr/乙酸(33 wt%)作用脱去苄酯基团。alkyne-PAMA- γ -PLGA 可以装载 DOX,能有效抑制细胞增殖,体外实验表明其药物释放特性受介质 pH 值的影响。因此,它在肿瘤的治疗方面有应用前途^[12]。例如, γ -PGA-MAL-PLA-DPPE 是由含有马来酰亚胺基团的谷氨酸衍生物(L-Glu-MAL)与丙交酯(L-lactide)聚合再接入二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)而形成的共聚物。 γ -PGA-MAL-PLA-DPPE 制备过程:被保护的谷氨酸(Boc-Glu(OtBu)-OH)与 N-(2-氨基)马来酰亚胺盐酸盐(MAL-NH₂)发生酰胺反应脱去保护基团得到 L-Glu-MAL;L-Glu-MAL 与 L-lactide 按 1:5 的比例聚合得到 γ -PGA-MAL-PLA; γ -PGA-MAL-PLA 经对硝基苯基氯甲酸酯(pNP)活化再与 DPPE 反应。 γ -PGA-MAL-PLA-DPPE 偶联巯基化的转铁蛋白(Tf-SH),装载抗癌药物紫杉醇(PTX)对高表达转铁蛋白受体(TfR)的癌细胞有靶向作用^[13]。例如, mPEG_{2K}PCL_{4K}-PGA_{1K} 是 mPEG_{2K} 分别与 ϵ -己内酯和谷氨酸 5-苄酯-N-羧基环内酸酐(NCA-BLG)两次开环聚合反应而形成包含有聚谷氨酸的三段聚合物。mPEG_{2K}PCL_{4K}-PGA_{1K} 制备过程:mPEG_{2K} 作为引发剂与 ϵ -己内酯发生开环聚合反应得到 PEG_{2K}PCL_{4K}; PEG_{2K}PCL_{4K} 经与 N-叔丁氧羰基-L-苯丙氨酸(Phe-N^{BOC})反应使其末端羟基转化为氨基,再与 NCA-BLG 发生环聚合反应。mPEG_{2K}PCL_{4K}-PGA_{1K} 同时装载 DOX 和维拉帕米(VER)能够抑制 P-糖蛋白的表达,逆转耐药性而提高阿霉素的抗癌作用^[14]。

mPEG_{2K}PCL_{4K}-PGA_{1K} 可以进一步与 NHS-folate [叶酸 (folic acid) 与 N-羧基丁二酰亚胺 (NHS) 反应产物] 发生酰胺反应获得 mPEG_{2K}-PCL_{4K}-PGA_{1K}-FA。mPEG_{2K}-PCL_{4K}-PGA_{1K}-FA 同时装载 DOX 和 VER 能够靶向高表达叶酸受体的癌细胞^[15]。例如, 接枝聚谷氨酸甲氧基聚乙二醇共聚物 (PLG-g-mPEG) 是由聚谷氨酸 (PLG) 和 mPEG 经 Steglich 酯化反应而获得。PLG- γ -mPEG 装载抗癌药物顺铂 (CDDP) 对荷人乳腺癌细胞 MCF-7 肿瘤动物模型和荷小鼠结肠癌细胞 C26 肿瘤动物模型均表现出抗肿瘤作用^[16-17]。

3 γ -聚谷氨酸交联衍生物

γ -PGA 自身或与其他高分子发生分子间及分子内反应而相互交联, 可以形成高分子网络在水中溶胀保持大量水分成为水凝胶, 也可以进一步制备形成纳米颗粒^[18]。 γ -PGA 能够以多种方式进行自身交联或与其他聚合物交联; 交联能够显著改变 γ -PGA 分子结构使其具备高吸水性, 可用于药物缓释、伤口组织修复和酶包装等方面。例如, 10% PGA (w/v%) 在 48 kGy 的辐射剂量作用下发生交联形成水凝胶, 吸水倍率可高达其干重的 1 370 倍; 其吸水能力受离子强度和离子种类影响, 还具有热水解的特性^[19]。例如, 多巴胺修饰的 γ -PGA (catechol-PGA) 是通过多巴胺 (又名儿茶酚乙胺) 的氨基与 γ -PGA 羧基酰胺反应而获得。catechol-PGA 的制备过程: γ -PGA 和多巴胺盐酸盐溶解于 0.1 mol/L 2-(N-吗啉) 乙磺酸缓冲液 (MES, pH 5) 中, 加入 EDC 溶液在氮气保护下室温搅拌 12 h。catechol-PGA 纳米粒是 catechol-PGA 交联而形成, 用 0.1 mol/L NaOH 将 catechol-PGA 溶液的 pH 值调整为 8.9, 可以引起儿茶酚基团的交联, 再重新调低 pH 值至 6.8 而制备。catechol-PGA 纳米粒具有抗氧化能力, 可以清除活性氧 (ROS) 如 H₂O₂, 在抗氧化治疗中有应用前景^[20]。例如, γ -PGA 可以与聚丙烯酰胺形成半穿透网络形式的水凝胶, 具体制备过程: γ -PGA 溶液 (10% w/v) 加入到 100 mL 的溶液 (包含 29 g 丙烯酰胺和 1 g N,N'-亚甲基双丙烯酰胺) 中, 用过硫酸铵 (PSA) 和 1,2-双(二甲基氨基)乙烷 (TEMED) 引发自由基聚合。 γ -PGA/聚丙烯酰胺水凝胶通过溶胀平衡法吸胀装载阿莫西林, 对阿莫西林有控制释放作用^[21]。例如, 不同当量的 γ -聚谷氨酸与丝胶蛋白溶解于 7.1 mL 的去离子水中, 用交联剂乙二醇二缩水甘油醚 (EGDGE), pH 值调为 5.0, 倒入玻璃模具中, 60℃ 交联反应 5 h, 获得 γ -聚谷氨酸/丝胶蛋白水凝胶。

在体内研究中, γ -聚谷氨酸/丝胶蛋白水凝胶对伤口的肉芽组织和血管形成有显著的激活作用。这表明该水凝胶有保持愈合环境的湿润、防止伤口的细菌感染、吸收多余的分泌物和促进细胞增殖重建受损组织的作用^[22]。例如, γ -PGA 与明胶溶解于 PBS 缓冲液中, 加入 EDC (终浓度为 2 mg/mL) 和酯酶 (SulE) 或水解酶 (MPH), 混合均匀 25℃ 交联反应 1 h, 冷冻干燥获得颗粒大小为 20 μ m 的粉末。 γ -PGA/明胶水凝胶能用于封装酶, 可以在热稳定性、pH 稳定性和重用性方面改善酶性质^[23-24]。

4 结论与展望

γ -PGA 衍生物不仅在分子结构和组成上发生了显著的改变, 更是具备了不同于 γ -PGA 的独特性质, 使其在生物医药领域中有广泛的应用前景。本文依据 γ -PGA 衍生物的结构特征将其分成 γ -聚谷氨酸修饰衍生物、含谷氨酸结构单元的衍生物和 γ -聚谷氨酸交联衍生物等 3 种类型, 并对众多 γ -PGA 衍生物进行初步探讨, 为新型 γ -PGA 衍生物设计开发提供借鉴和参考。 γ -PGA 衍生物应用于生物医药领域的开发研究有着巨大的潜力, 不仅会推动该领域的技术变革, 也会带动生物高分子开发利用。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang L, Geng X, Zhou J, et al. Fabrication of poly (γ -glutamic acid)-based biopolymer as the targeted drug delivery system with enhanced cytotoxicity to APN/CD13 over-expressed cells. *J Drug Target*, 2015, 23: 453-61
- [2] 曹名锋, 金映虹, 解慧, 等. γ -聚谷氨酸的微生物合成、相关基因及应用展望. *微生物学通报*, 2011, 38: 388-95
- [3] Tang B, Lei P, Xu Z, et al. Highly efficient rice straw utilization for poly-(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresource Technol*, 2015, 193: 370-6
- [4] Kongklom N, Luo H, Shi Z, et al. Production of poly- γ -glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. *Biochem Eng J*, 2015, 100: 67-75
- [5] Li C. Poly (L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 695-713
- [6] Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, 61: 10827-52
- [7] Krecz A, Pócsi I, Borbély J. Preparation and chemical modification of poly- γ -L-glutamic acid. *Folia Microbiol*, 2001, 46: 183-6
- [8] Keresztessy Z, Bodnár M, Ber E, et al. Self-assembling chitosan/poly- γ -glutamic acid nanoparticles for targeted drug delivery. *Colloid Polym Sci*, 2009, 287: 759-65
- [9] Shima F, Akagi T, Akashi M. Synthesis and preparation of nanoparticles composed of amphiphilic poly (γ -glutamic

- acid) with different hydrophobic side chains and their potential of membrane disruptive activity. *Colloid Polym Sci*, 2014, 292: 2663-71
- [10] Yamaguchi S, Tatsumi T, Takeharar T, et al. EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly (γ -glutamic acid) nanoparticles elicits an anti-tumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol Immun*, 2010, 59: 759-67
- [11] Vega J, Ke S, Fan Z, et al. Targeting doxorubicin to epidermal growth factor receptors by site-specific conjugation of C225 to poly (L-glutamic acid) through a polyethylene glycol spacer. *Pharm Res*, 2003, 20: 826-32
- [12] Ding J, He C, Xiao C, et al. pH-responsive drug delivery systems based on clickable poly (L-glutamic acid)-grafted comb copolymers. *Macromol Res*, 2012, 20: 292-301
- [13] Zhao C, Liu X, Liu J, et al. Transferrin conjugated poly (γ -glutamic acid-maleimide-co-L-lactide)-1,2-dipalmitoylsn-glycero-3-phosphoethanolamine copolymer nanoparticles for targeting drug delivery. *Colloid Surface B Biointerfaces*, 2014, 123: 787-96
- [14] Li N, Zhang P, Huang C, et al. Co-delivery of doxorubicin hydrochloride and verapamil hydrochloride by pH-sensitive polymersomes for the reversal of multidrug resistance. *RSC Adv*, 2015, 5 : 77986-95
- [15] Li N, Huang C, Luan Y, et al. Active targeting co-delivery system based on pH-sensitive methoxy-poly (ethylene glycol)_{2K}-poly(e-caprolactone)_{4K}-poly (glutamic acid)_{1K} for enhanced cancer therapy. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 472: 90-8
- [16] Yu H, Tang Z, Li M, et al. Cisplatin loaded poly (L-glutamic acid)- γ -methoxy poly (ethylene glycol) complex nanoparticles for potential cancer therapy: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12: 69-78
- [17] Yu H, Tang Z, Zhang D, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and *in vivo* efficacy of cisplatin loaded poly (L-glutamic acid)- γ -methoxy poly (ethylene glycol) complex nanoparticles for tumor therapy. *J Control Release*, 2015, 205: 89-97
- [18] 王静心, 李政, 张健飞, 等. γ -聚谷氨酸水凝胶研究与应用进展. *微生物学通报*, 2014, 41: 1649-54
- [19] Choi SH, Whang KS, Park JS, et al. Preparation and swelling characteristics of hydrogel from microbial poly (γ -glutamic acid) by γ -irradiation. *Macromol Res*, 2005, 13: 339-43
- [20] Moriyama M, Uyama H, Vlies AJ, et al. Cross-linked catechol-bearing poly (γ -glutamic acid) self-aggregates with antioxidant activity. *Colloid Polym Sci*, 2015, 293: 1245-51
- [21] Rodriguez-Felix DE, Perez-Martinez CJ, Castillo-Ortega MM, et al. pH-and temperature-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels composed of poly (acrylamide) and poly (γ -glutamic acid) as amoxicillin controlled-release system. *Polym Bull*, 2012, 68:197-207
- [22] Shi L, Yang N, Zhang H, et al. A novel poly (γ -glutamic acid)/silk-sericin hydrogel for wound dressing: synthesis, characterization and biological evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48: 533-40
- [23] J Xie, Zhang H, Li X, et al. Entrapment of methyl parathion hydrolase in cross-linked poly (γ -glutamic acid)/gelatin hydrogel. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 690-7
- [24] Yang L, Li X, Li X, et al. Improved stability and enhanced efficiency to degrade chlorimuron-ethyl by the entrapment of esterase SulE in cross-linked poly (γ -glutamic acid)/gelatin hydrogel. *J Hazard Mater*, 2015, 287: 287-95