

## PEG-PLLA 高分子ミセルによるアセタール化ヒドロキノンの効率的包接

岩手大理工 ○西條未来・塚本匡・大石好行・芝崎祐二

### Abstract

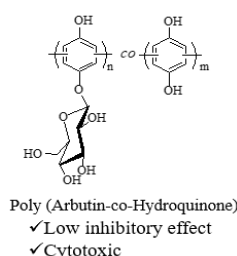
In this work, a OH-protected hydroquinone with 3,4-dihydro-2H-pyran (P-HQ) was prepared and encapsulated into a biocompatible amphiphilic block copolymer, PEG-PLLA as a dark-spots, hyperpigmentation, and melasma remover. The formation of the nano-capsule was conducted by dilution of the THF solution (polymer : P-HQ 5:1 – 15 :1 in wt) with water at the rate of 3 ml/min. The spherical micelle was observed by TEM, and the incorporation of P-HQ was confirmed by UV-vis spectroscopy.

### 【要旨】

本研究では、ヒドロキノンの疎水性を向上させたアセタール化ヒドロキノン(P-HQ)を生体適合性ポリマーである PEG-PLLA で包接させたナンドラッグの開発を目的とした。カプセル化ミセルは濃度の変化で凝集体が形成できることが目視と TEM での観察から確認できた。Polymer : P-HQ の仕込み比が 5 : 1 ~ 15 : 1、IEW 注入速度 3 ml/min での調整したカプセル化ミセルを TEM で観察したところ、凝集体の形成は観られず、分散性を有した球状のカプセル化ミセルが確認できたことから、適切な P-HQ カプセル化が行われていることを示唆している。

### 【緒言】

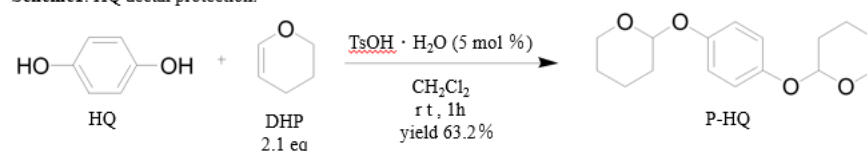
ポリフェノールはチロシナーゼ阻害作用を持ち、皮膚がんであるメラノーマ細胞の増殖を抑制することが知られている。中でもヒドロキノンはその効果が高い。当研究室ではアルブチンの酸化重合によるポリマー化に成功し、ポリフェノール合成経路の確立を達成している。このアルブチンポリマーとヒドロキノンとの共重合体では、十分なメラノーマ細胞増殖抑制効果が表れず、投与量を増加させると正常細胞毒性が見られた。そこで、本研究では、ヒドロキノンの疎水性を向上させたアセタール化ヒドロキノン(P-HQ)を生体適合性ポリマーである PEG-PLLA で包接させたナンドラッグの開発を目的とした。



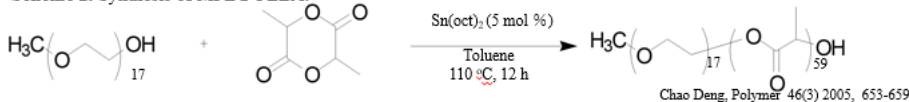
### 【実験】

P-HQ の合成は、HQ と DHP (3,4 ジヒドロ 2H ピラン) を塩化メチレンを溶媒として、パラトルエンスルホン酸を 5 mol % 存在下、室温で 1 h 反応させ白黄色粉末として得た (収率 63.2%)。構造は <sup>1</sup>H NMR と FT-IR から決定した。

Scheme 1. HQ acetal protection.



Scheme 2. Synthesis of MPEG-PLLA.



次に P-HQ を包接するポリマーの合成は既報に従い合成した。すなわち、トルエンを溶媒として MPEG を高分子開始剤、L-ラクチド、2エチルヘキサン酸スズ (II) を触媒として加え、110°C、12 h 重合し合成した。合成したポリマーは <sup>1</sup>H NMR、GPC で測定し構造の確認を行った。UV 測定のためのミセル溶液の調整は MPEG-PLLA 0.5 mg に対して P-HQ を設定量加え、THF 0.5 ml で溶解させ、攪拌下でイオン交換水 (IEW) を 1 ml/min の速度で 9 ml 加えて調整した。P-HQ 添加量を変化させながら UV 吸収を測定し、P-HQ のミセル導入可能量を計算した。ミセル収率におけるミセル溶液の調整は、PEG-PLLA 300 mg に対して任意の HQ を加えて THF 10 ml で溶解し、攪拌下でイオン交換水を注入速度 0.5、1、3 ml/min でサンプルを調整した。その後、二日間透析し凍結乾燥でミセルを単離したものを <sup>1</sup>H NMR の積分値からカプセル化された P-HQ の量を計算した。TEM で撮影するためのミセル溶液の調整は次のように行った。すなわち、MPEG-PLLA と P-HQ のストック溶液 (10 mg/ml) を準備し、MPEG-PLLA

溶液 500  $\mu\text{l}$  に対して任意の P-HQ 溶液を加え、溶媒の 10 倍の IEW を加えて調整した。その後、透析、溶媒を除去した後に溶液を 10 倍で希釈し TEM グリッドに塗布、乾燥し、TEM で観察した。

【結果と考察】

Fig 1 には P-HQ の  $^1\text{H}$  NMR と IR スペクトルを示す。芳香環由来のシグナルが 7ppm 付近に、また b のアセタール水素が 5.3ppm 付近に観測された。また、メチレン水素である c,d,e については 1.3~1.9ppm 付近に観測された。さらに、これら水素の積分値から目的化合物の生成を確認した。HQ では  $3200\text{ cm}^{-1}$  付近にヒドロキシ基の吸収がみられ、 $1500\text{ cm}^{-1}$  付近には C=C の吸収みられた。P-HQ ではヒドロキシ基の吸収は見られず  $1200\text{ cm}^{-1}$  にエーテルの吸収が新たにみられた。

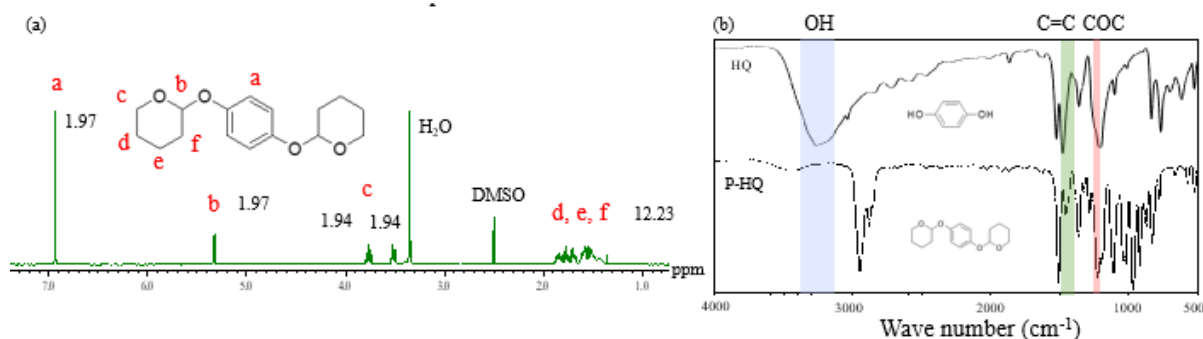


Fig 1. (a)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of P-HQ in  $\text{DMSO}-d_6$  and (b) FT-IR (KBr) spectra of HQ and P-HQ.

Table 1. Solubility of HQ and P-HQ

	NMP	THF	DMF	Ethyl acetate	$\text{CHCl}_3$	Acetone	Dioxane	$\text{CH}_3\text{OH}$	$\text{H}_2\text{O}$
HQ	++	++	++	++	-	++	++	++	++
P-HQ	++	++	++	++	++	++	++	++	-

5 mg / solvent 4 ml ( ++ soluble at room temperature, - insoluble)

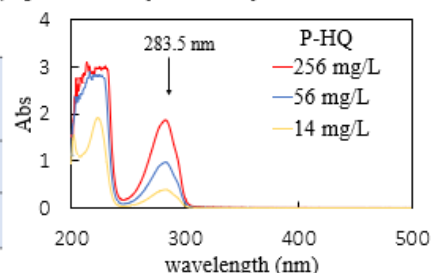


Fig 2. UV-Vis spectra of P-HQ. (solvent is methanol)

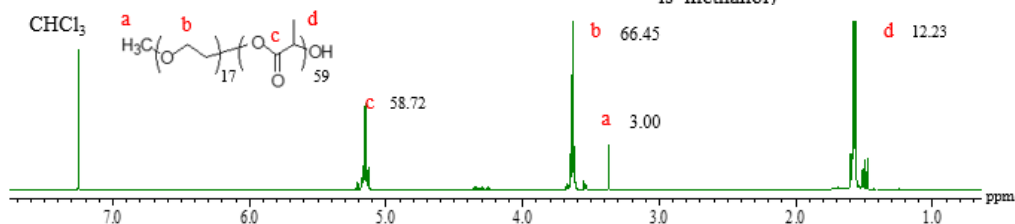


Fig 3.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of MPEG-PLLA in  $\text{CDCl}_3$ .

Table 2. Properties of copolymers

Run	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Feed (EO:LLA)	Yield <sup>c)</sup> (%)	Composition	$M_n$ <sup>a)</sup> ( $^1\text{H}$ NMR)	$M_n$ <sup>b)</sup> (GPC)	$M_w/M_n$
Ref <sup>d)</sup>	110	17:20	90.1	17:23	4100	5700	1.04
1	110	17:20	72.4	17:29	5100	5800	1.17

<sup>a)</sup> Determined by  $^1\text{H}$  NMR. <sup>b)</sup> Determined by GPC (THF) <sup>c)</sup> diethyl ether insoluble part <sup>d)</sup>Chao Deng, Polymer 46(3) 2005, 653-659

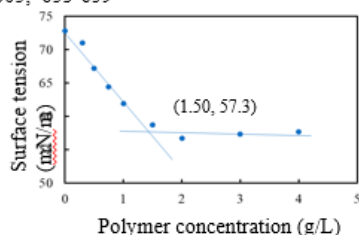
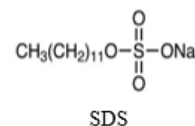


Fig 4. Surface tension of MPEG-PLLA.

Table 3. CMC of MPEG-PLLA and SDS

micelle	CMC (g/L)
MPEG-PLLA	1.5
SDS	2.3



P-HQ のミセルへの導入量を決定するためメタノールを溶媒として紫外可視分光測定を行った。Table 1 には HQ と P-HQ の溶解性試験を示す。HQ ではクロロホルム以外の有機溶媒と水に溶解した。一方、P-HQ では水以外のクロロホルムを含む有機溶媒に溶解し疎水性が向上していることを確認した。また、P-HQ のミセルへの導入量を決定するためメタノールを溶媒として紫外可視分光測定を行ったところ P-HQ の極大吸収は 283.5 nm に吸収を確認した。

Fig 3 は合成した MPEG-PLLA の <sup>1</sup>H NMR を示す。MPEG のメチル末端のシグナルが 3.4ppm 付近にシングレットで観測され MPEG 由来の b のシグナルが 3.7ppm、ラクチド由来のメチン基、メチル基が 5.2、2.6ppm に観測された。PEG のエチレングリコールとラクチドの仕込み比は 17 : 20 であり NMR の積分値から求めたポリマー中の組成比は 17 : 30 であった。ポリマーの分子量は  $M_n = 5.1$  kDa,  $M_w/M_n = 1.17$  であり、以上のことは本重合系が理想的なリビング重合で進行していることを示唆している。

次にこのポリマーの臨界ミセル濃度 CMC を界面張力法にて評価した。ポリマーの濃度を変え界面張力を測定したところ 1.50 g/L で変曲点が認められ、ここを CMC とした。代表的な界面活性剤である SDS の CMC が 2.3g/L であり同等の値を示した。

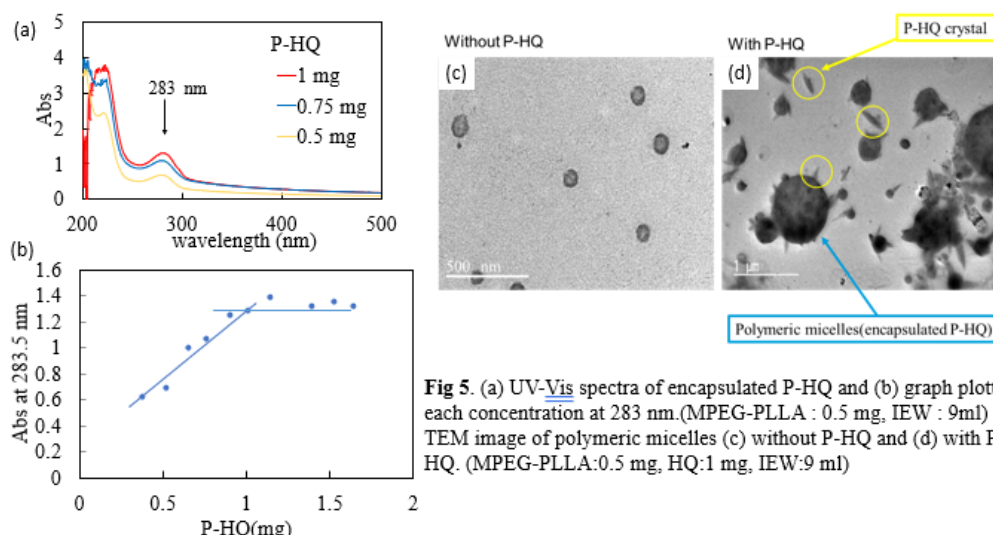


Fig 5. (a) UV-Vis spectra of encapsulated P-HQ and (b) graph plotting each concentration at 283 nm. (MPEG-PLLA : 0.5 mg, IEW : 9ml) TEM image of polymeric micelles (c) without P-HQ and (d) with P-HQ. (MPEG-PLLA:0.5 mg, HQ:1 mg, IEW:9 ml)

ミセル溶液の UV を測定したところ、P-HQ のポリマーミセルへのカプセル化したものも同様に紫外可視分光測定により 283 nm の吸収を確認できたことから P-HQ の導入を確認した。なお、吸収強度は P-HQ の添加量とともに上昇しており、P-HQ が 1 mg の時に飽和に達した。次に吸収の強度が飽和に達した P-HQ 1mg でのカプセル化ミセル溶液を TEM で観察した。c,d は P-HQ を添加していないものとしたものである。A では 100~200 nm 程度の球状ミセルが確認できた。B では 1 μm 程度の巨大なミセルが観測され、一部の P-HQ 結晶がミセル内部から飛び出しており、カプセル化が適切でないことを確認できた。こちらは濃度が濃すぎたために P-HQ の結晶化が進んでしまったためと考えられる (Fig 5)。

カプセル化された P-HQ を定量するためにミセル収率を計算した結果が Table 4 である。0.5、3ml/min のサンプルは収率が低かったが、1.0ml/min では収率が改善した。ミセル溶液調整時における濃度が濃すぎるため、凝集体が形成してしまい、濾過の段階で大きいミセルが取り除かれてしまったため、収率が低下したと考えられる。

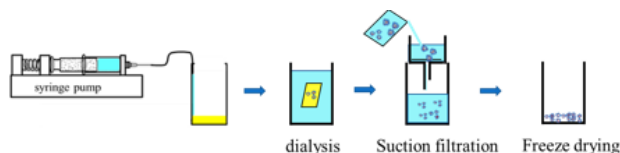
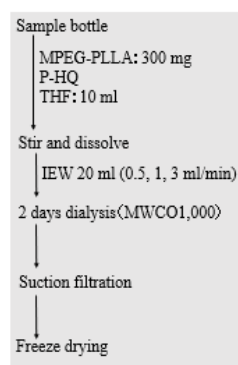


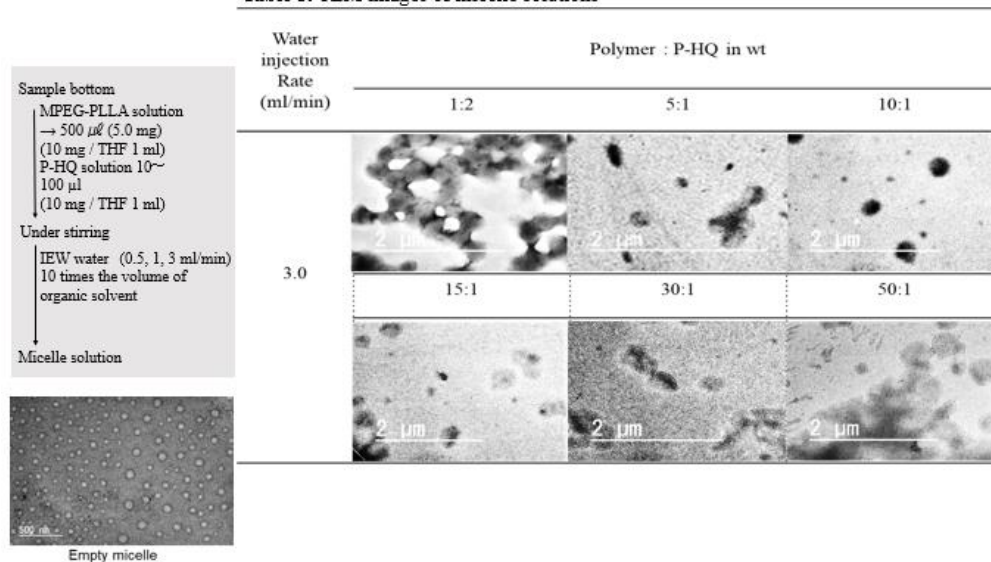
Table 4. P-HQ containing MPEG-PLLA micelle yield

Water injection rate	Micelle yield (%) (polymer : P-HQ in wt )				
	5:1	10:1	15:1	30 : 1	50:1
0.5 ml/min	6.5	7.0	43.6	6.8	2.8
1.0 ml/min	24.1	26.2	(8.3)	38.7	9.1
3.0 ml/min	6.8	15.4	29.5	11.1	17.3

Yield was determined by <sup>1</sup>H NMR using the isolated P-HQ micelles.

1 : 2 から 50 : 1、水の注入速度 3.0 ml/min までの TEM 画像を撮影した (Table 5)。1 : 2 では P-HQ がポリマーに対して重量比の 2 倍入っているため、カプセル化自体はおそらくできてはいると考えるが、凝集体を形成してしまっており、球状のミセルが観察できていない。5 : 1 から 15 : 1 のサンプルについては、ミセル内に P-HQ が結晶化せず包摂されているのが確認でき、凝集せずに分散性を有しているのが確認できた。30 : 1、50 : 1 に関しては先ほどのように適切な包接が行われているが、P-HQ が包接されていないミセルである空ミセルが確認できる。試薬を無駄なく使用し、P-HQ 効率よく包接するという観点から考えれば 5 : 1 から 15 : 1 までの 3 ml/min がナノドラッグとして適切である。

Table 5. TEM images of micelle solutions



### 【結論】

脂溶性ヒドロキノン誘導体の合成を行い、溶解性試験の結果疎水性の向上が認められた。またメタノールを溶媒として UV を測定したところ 283.5 nm に極大吸収が確認できた。PEG-PLLA 共重合体の合成は既報に従い行い、CMC からミセル形成能を確認した。カプセル化ミセルを調整し UV を測定したところ、283 nm に極大吸収が見られ P-HQ の包接を確認した。その溶液の TEM を撮影したところ、P-HQ の針状結晶が確認でき、適切なカプセル化が行われていなかった。P-HQ が包摂されたミセルの収率を測定するため新たにミセル溶液を調整し、ミセルを単離したものを <sup>1</sup>H NMR から計算した結果、最大で 44% の P-HQ が包接されているのが確認できた。TEM で各仕込み比におけるミセル溶液の撮影をしたところ、適切な包接と分散性を併せ持つ 5 : 1 から 15 : 1 の 3 ml/min ナノドラッグとして適切であることが確認できた。

### 【参考文献】

- 1) Chao Deng, *Polymer* 46(3) 2005, 653-659
- 2) Van, Boom, J. H., et al. *Synthesis*, 42, 1977, 3722
- 3) Po-Liang Laia, *Polymers* 72(11) 2012, 846-855