

ポリ(アルブチン)-*g*-ポリ(γ -ベンジルグルタミン酸)の 合成と特性評価

岩手大理工 ○西澤好汰・高田裕平・塚本匡・芝崎祐二・大石好行

Abstract

In this study, we aimed to synthesize a novel amphiphilic copolymer by incorporating a hydrophobic polypeptide as a side chain into the hydrophilic poly(arbutin) (PArb). Oxidative polymerization of arbutin (Arb) and tosylated arbutin (TArb) was first conducted in aqueous media, followed by the aminolysis with NH_3 , resulting in the poly(arbutin)-*co*-poly(amino arbutin) (PArb-*co*-PAArb) copolymer. Ring opening polymerization of γ -benzyl-L-glutamate *N*-carboxyanhydride (BLG-NCA) was conducted using PArb-*co*-PAArb as a macro initiator. The prepared novel amphiphilic copolymer PArb-*g*-Poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PArb-*g*-PBLG) showed the critical micelle concentration (CMC) of 2.1 mg/mL estimated by pendant drop method.

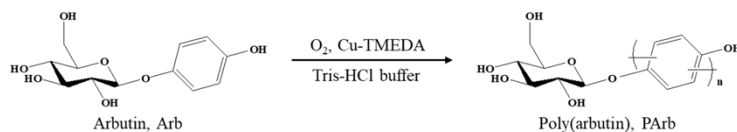
要旨

本研究では生体適合性をもつ水溶性ポリマーであるポリ(アルブチン) (PArb)の側鎖に疎水性のポリペプチドを導入することで新規生体適合性両親媒性高分子を開発することを目的とした。アルブチン (Arb)とトシル化アルブチン (TArb)を酸化共重合、次いでアミノリシスを行うことでポリ(アルブチン)-*co*-ポリ(アミノアルブチン) (PArb-*co*-PAArb)とし、これを開始種として γ -ベンジル-L-グルタメート *N*-カルボキシ無水物 (BLG-NCA)の開環重合を行うことで新規両親媒性高分子であるポリ(アルブチン)-*g*-ポリ(γ -ベンジル-L-グルタメート) (PArb-*g*-PBLG)を合成した。水溶液の表面張力を懸滴法により測定、表面張力と濃度をプロットしたところ臨界ミセル濃度 (CMC)は 2.1 mg/mL となり、汎用界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウムと同等の値を示した。

1. 緒言

ナノキャリアは抗癌治療のための標的薬物送達システムの戦略の一つとして注目を集めている。ナノスケール製剤としては、ナノ粒子、リボソーム、マイクロカプセル、ナノゲル、高分子ミセルが開発されている。これらのキャリアの中で、高分子ミセルは水溶性の向上、副作用の低減、生体適合性の改善、腫瘍組織への薬物の受動的蓄積、薬物循環時間の調整など、多くのメリットのために注目を集めている。特に、ポリペプチドセグメントと親水性ポリマー鎖からなるグラフト共重合体及びブロック共重合体からなる高分子ミセルは、薬物送達キャリアとしての可能性を秘めている。

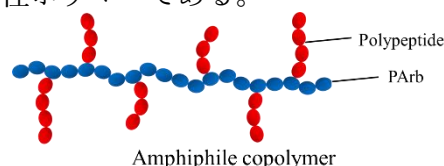
当研究室では梨の皮から得られる天然フェノール配糖体である Arb を水系媒体中、安価な銅アミン触媒である Cu-TMEDA を用いて酸化重合することで PArb を



Scheme 1. Oxidative polymerization of Arbutin

合成することに成功している¹⁾。PArb はほぼ完全な C-C カップリング生成物であり、硬いポリフェニレン骨格と糖を側鎖に持つ水溶性ポリマーである。

本研究では PArb を主鎖として側鎖に疎水性のポリペプチドであるポリ(γ -ベンジル-L-グルタメート)(PBLG)を導入することで親水部と疎水部を併せ持つ新規両親媒性高分子の設計、開発を行った。最初に Arb と TArb を酸化重合を行うことで共重合体であるポリ(アルブチン)-*co*-ポリ(トシルアルブチン) (PArb-*co*-PTArb)、次いでアミン分解することにより PArb-*co*-PAArb へと誘導し、これを高分子開始剤として BLG-NCA の開環重合によりグラフト共重合体を設計、合成、新規生体的合成両親媒高分子の開発とデリバリー材料への展開を検討した。



2. 実験

TArb は既報に従い合成した²⁾。酸素雰囲気、Cu-TMEDA 存在下、トリス塩酸塩緩衝溶液中で Arb、TArb を 60°C、72 時間攪拌し酸化重合、反応溶液を透析、凍結乾燥

することでトシル基を有する PArb-co-PTArb を合成した。続いて PArb-co-PTArb を 28 wt% アンモニア水中で 130 °C、24 時間、高圧下で攪拌することでアミン分解、反応溶液を透析、凍結乾燥することにより、アミノ基を有する PArb-co-PAArb を合成した。

γ -ベンジル-L-グルタミン酸 *N*-カルボキシ無水物 (BLG-NCA) は既報に従い合成した³⁾。すなわち、ベンジルアルコールに L-グルタミン酸を加え、硫酸を滴下、70 °C、24 時間攪拌、反応溶液にトリエチルアミンを加えて析出した沈殿物を蒸留水で 2 回再結晶し γ -ベンジル-L-グルタミン酸 (BLG) を合成、続いて BLG を脱水 THF 中でトリホスゲンと 50 °C、24 時間反応させ、溶液を脱水ヘキサンに投入沈殿させることで白色の沈殿物を得た。これを脱水酢酸エチル/脱水ヘキサンで再結晶することにより精製し BLG-NCA を合成した。

次に、所定量の PArb-co-PAArb、BLG-NCA を脱水 DMF 中に溶解させ、30 °C、48 時間攪拌することで開環重合を行い、反応溶液をジエチルエーテルに投入、沈殿物をクロロホルムで洗浄することで PArb-*g*-PBLG を合成した。得られた PArb-*g*-PBLG の ¹H NMR、FT-IR 測定を行い、目的とする共重合体の生成を確認した。また、PArb-*g*-PBLG の水溶液を異なる濃度で調整し、懸滴法によって表面張力を測定、濃度と表面張力をプロットすることで臨界ミセル濃度(CMC)を決定した。

3. 結果と考察

TArb の NMR 測定の結果を図 1 に示す。¹H NMR より、フェノール性ヒドロキシ基由来の a のシグナルが 9.0 ppm に、Arb のフェニル基、トシル基由来の r、q、b、c のシグナルが 6.6–7.7 ppm に、加えて糖骨格のアノマー水素 d が 4.65 ppm に、ヒドロキシ基 k が 5.2–5.3 ppm に観測された。また、¹³C NMR より炭素数とシグナルの数が一致し、図 1 に示す通り帰属ができていることから合成を確認した。

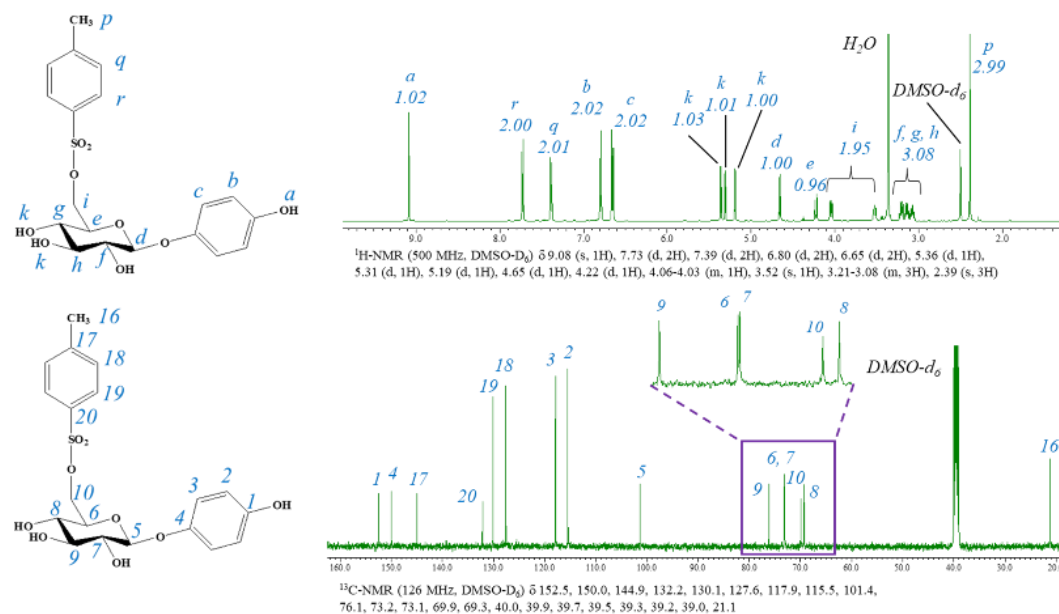


Figure 1. ¹H and ¹³C NMR spectra of TArb

Arb と TArb の共重合体である PArb-co-PTArb は当研究室で手法を確立している水媒体中での酸化カップリング重合により合成した。酸素雰囲気、Cu-TMEDA 存在下、トリス塩酸塩緩衝溶液中で Arb、TArb を 60 °C で所定時間攪拌し、反応溶液を透析、凍結乾燥することで PArb-co-

Run	Feed		Reaction time (h)	Yield (%)	Composition ^{b)}		GPC ^{c)}			[η] ^{d)} (dL/g)
	Arb : TArb				Arb : TArb		M _n (kDa)	M _w (kDa)	M _w / M _n	
	mol%				mol%					
1	70	30	48	46.0	67	33	5.6	8.9	1.6	0.0697
2	70	30	72	68.2	70	30	9.3	11.4	1.2	0.0433
3	70	30	120	61.7	71	29	11.7	15.8	1.3	0.0482
4	50	50	48	72.4	43	57	5.9	8.6	1.4	0.0453
5	50	50	72	88.9	44	56	7.6	8.9	1.2	0.0490
6	30	70	48	73.0	28	72	4.5	7.0	1.3	0.0378
7	30	70	72	74.5	25	75	6.4	7.3	1.3	0.0415

a) Conditions; O₂ atmosphere, 60 °C, Tris HCl buffer, Cu-TMEDA 8 mol%, b) Calculated by ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆), c) Determined by GPC (NMP, PSt standard), d) Inherent viscosity in NMP (0.3 g/dL)

PTArb を合成した。PArb-*co*-PTArb の各種重合条件、GPC 測定の結果を表 1 に示す。表 1 より、重合時間が長くなるに従い分子量が増大していることがわかる。また、仕込み比と ^1H NMR 測定により計算した実際の組成比が概ね一致していることから共重合体が目的の仕込み比通りで得られていることを確認した。

Arb : TArb の組成比 70 : 30 mol%、数平均分子量約 9000 のものをアミン分解し、これを開始種として BLG-NCA との開環重合を行うことにより PArb-*g*-PBLG を褐色粉末として収率 49.7% で得た。アミン分解によって得られたマクロ開始剤である PArb-*co*-PAArb と目的生成物である PArb-*g*-PBLG の GPC 測定の結果を図 2 に示す。マクロ開始剤と共重合体では GPC のピークトップが高分子両側に移動しており、数平均分子量は 9.0 kDa から 12.1 kDa へと高分子両側にシフトした。また、共重合体の重量平均分子量は 24.9 (kDa)、分子量分布は 2.1 であり、BLG-NCA の開環重合が PArb 上から進行したと

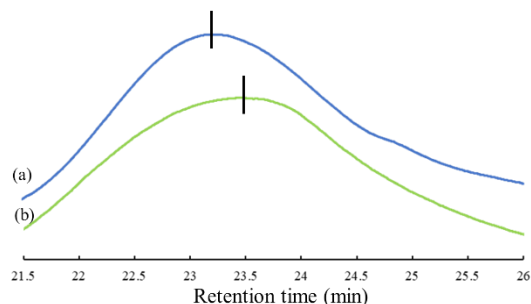


Figure 2. GPC profiles of (a) PArb-*g*-PBLG and (b) PArb-*co*-PAArb (RI, NMP with LiBr, PSt)

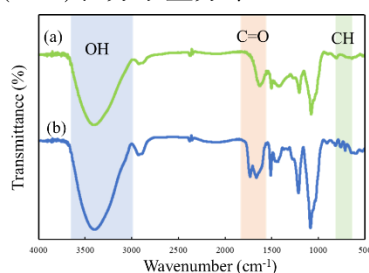


Figure 3. FT-IR spectra (KBr) of (a) PArb-*co*-PAArb and (b) PArb-*g*-PBLG

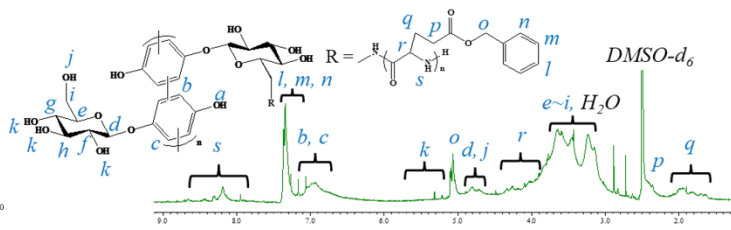


Figure 4. ^1H NMR spectrum of PArb-*g*-PBLG in $\text{DMSO}-d_6$

が示唆される。

FT-IR 測定の結果を図 3 に示す。PArb-*g*-PBLG のスペクトルにおいて、PArb の吸収に加えて新たにエステル結合由来の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動の吸収が約 1700cm^{-1} に観測された。また、 ^1H NMR スペクトルにおいて、PArb 骨格、PBLG ポリマー由来のシグナルがともにブロードしたシグナルとして観測された (図 4)。以上の結果から、目的とする PArb-PBLG 共重合体の合成を確認した。

ポリマーの溶解性試験の結果を表 2 に示す。BLG-NCA は微量の水で重合してしまうことから、共重合体中に PBLG ホモポリマーの混入が懸念された。別途合成した PBLG ホモポリマーはクロロホルムに溶解したことから、共重合体を合成し単離する際

Table 2. Solubility test of PArb-*co*-PAArb, PBLG and PArb-*g*-PBLG

	DMSO ^{a)}	NMP ^{a)}	DMF ^{a)}	DMAc ^{a)}	THF ^{a)}	Acetone	CHCl_3	MeOH	Et_2O	H_2O
PArb- <i>co</i> -PAArb	++	+	+	+	—	—	—	—	—	++
PBLG	++	+	++	++	++	—	++	—	—	—
PArb- <i>g</i> -PBLG	++	++	++	++	±	—	—	±	—	++

Polymer 2 mg / Solvent 1 mL (+ + soluble at r.t.; + soluble after heating; ± partially insoluble; — insoluble), a) DMSO; dimethyl sulfoxide, NMP; N-methyl-2-pyrrolidone, DMF; N,N-dimethylformamide, DMAc; N,N-dimethylacetamide, THF; tetrahydrofuran

にクロロホルムでの洗浄を行い、共重合後に副生成物として存在する PBLG ホモポリマーを除去した。その結果、PBLG ホモポリマーは水に不溶であったのに対して、合成した PArb-*g*-PBLG 共重合体は PArb-*co*-PAArb と同様、水に良好な溶解性を示し、目的とする共重合体の単離を達成したといえる。

➤ Pendant drop method

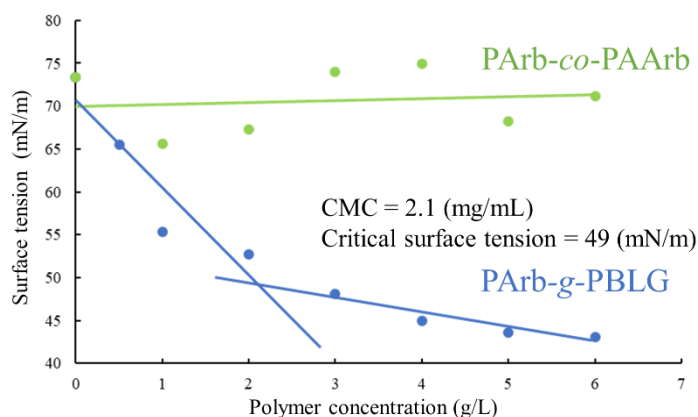
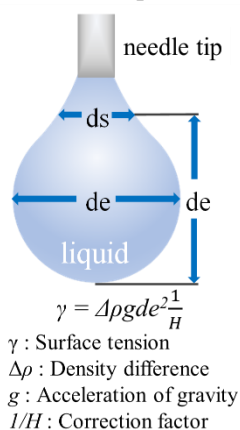


Figure 5. Surface tension of PArb-co-PAArb, PArb-g-PBLG solution in distilled water at 21.0 °C

水に溶解した両親媒性ポリマーは、疎水性部を持ち、水と空気の界面に存在する方が安定であるために表面に集まりやすくなる。これにより、表面張力の低下が起こる。

両親媒性ポリマー水溶液の表面張力はポリマー濃度の増加に伴って減少し、一定の濃度になるとそれ以上減少することがなくなる。これは表面が完全にポリマーで満たされ、占有されるとバルク中のポリマーの分子数が増加し、溶解状態を維持することができなくなり、ミセルを形成するためである。このときの濃度を臨界ミセル濃度(CMC)とする。PArb-co-PAArb、PArb-g-PBLGを所定濃度で蒸留水に溶解させ、懸滴法により表面張力を測定した。懸滴法では細管の先端から鉛直下向に液体を押し出し、液滴を作製(懸滴と呼ぶ)し、懸滴の形状は液体量、密度、表面張力に依存するため、形状を解析することで表面張力を求めることができる。懸滴の最大径 d_e 懸滴径 d_s を実測し、式より表面張力を算出し、プロットしました。これを図5に示す。PArb-co-PAArbの表面張力は濃度にかかわらずほぼ一定であったものの、PArb-g-PBLGは濃度が高くなるにつれて表面張力が低下し、ある濃度で変曲点を迎えると傾きが緩やかになるという両親媒性化合物の典型的な挙動を示した。PArb-g-PBLGのCMCは2.1mg/mL、臨界表面張力は49mN/mであった。CMCに関しては汎用界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウムと同等の値を示した。

4. 結論

本研究では生体適合性を持つ水溶性ポリマーであるPArbを主鎖として側鎖に疎水性のポリペプチドであるPBLGを導入することで親水部と疎水部を併せ持つ新規両親媒性高分子PArb-g-PBLGを合成した。ArbとTArbを酸化重合することでPArb-co-PTArbを合成、次いでアミノリシスによってPArb-co-PAArbとし、これを開始種としてBLG-NCAとの開環重合により目的の新規両親媒性グラフトコポリマーであるPArb-g-PBLGを合成した。数平均分子量12.1(kDa)、重量平均分子量24.9(kDa)、分子量分布2.1であり、ポリマー水溶液の表面張力を懸滴法により測定したところCMCは2.1mg/mL、臨界表面張力は49mN/mとなり、ラウリル硫酸ナトリウムなどの汎用界面活性剤同等の値を示すことがわかった。

5. 参考文献

- (1) M. Hashimoto, S. Iwabuchi, Y. Oishi, Y. Shibasaki, *Europ. Poly. J.*, 81 (2016), pp. 152-160
- (2) J. Kadokawa 日本化学会誌 11(2001), pp. 533-553.
- (3) X. Chuan, C. Shan, H. Juan, P. Yun, A. Haleem, *Polymer*, 151 (2018) pp. 1-5.