

M13

リン酸化シグナル応答型高分子カプセルの合成条件の検討

(北九州高専)○尚山 堅士郎・園田 達彦*・山本 和弥
(九大院工)片山 佳樹・(北九州高専) (正)山田 憲二

【緒言】

現在のドラッグターゲティングシステムでは、悪性細胞と正常細胞の認識が困難なため、薬物が正常細胞において薬理活性を発揮し、副作用を引き起こすことが問題点となっている。その問題点を解決するために、本研究室では正常細胞と悪性細胞のシグナル伝達機構の違いに着目した。疾病の原因の多くはシグナル伝達機構の異常にあり、悪性細胞では、正常細胞では見られない何らかの異常なシグナルが生じていると考えられる。そのような異常なシグナルにのみ応答する薬物キャリアーを創製できれば、悪性細胞に導入されたときにのみ薬理活性を発揮することが期待される。このような効果が期待される薬物キャリアーとして、poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm)をベースとし、リン酸化シグナルを受け取る事が出来るサイトを導入した高分子複合体がある。

そこで本研究では、鋭敏な反応応答性を得るために比較的分子量分布の狭い高分子複合体が得られる“RAFT 重合”に着目し、この重合法を用いて高分子複合体の合成を行う。また、得られた複合体の薬物カプセルとしての性能評価を行うことを目的としている。今回は凍結融解脱気を用いた RAFT 重合及び重合体へのペプチド導入法の検討、高分子複合体の性能評価について報告する。

【実験】

N-methacryloyloxy succinimide(MOSu)の合成及び評価

N,N-dimethyl-4-aminopyridine・N-hydroxysuccinimide・methacrylic acid・縮合剤を混合し、室温で1晩反応した。その後、シリカゲルカラム精製を行い、合成した MOSu を核磁気共鳴装置(NMR)を用いて評価を行った。

凍結融解脱気を用いた RAFT 重合及び評価

1. NIPAAm 単独での RAFT 重合

DMF 溶媒中で NIPAAm・開始剤・RAFT 剤をそれぞれ 3.00 M・0.30 mM・13.1 mM となるよう混合し、凍結融解脱気後、65°Cで反応を行った。合成したポリマーを精製し、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)にて分子量測定を行った。

2. 基質ペプチドモノマー・NIPAAm の RAFT 共重合

DMF 溶媒中で NIPAAm・開始剤・RAFT 剤・基質ペプチドモノマーをそれぞれ 3.00 M・0.30 mM・13.1 mM・14.8 mM となるよう混合し、凍結融解脱気後、65°Cで反応を行った。合成したポリマーを、GPC にて分子量測定を行った。

3. MOSu・NIPAAm の RAFT 共重合と基質ペプチドの導入

DMF 溶媒中で NIPAAm・開始剤・RAFT 剤・MOSu をそれぞれ 3.00 M・0.30 mM・13.1 mM・2.04 M 混合し、凍結融解脱気後、65°Cで反応を行った。合成したポリマーを精製し、GPC にて分子量測定と NMR にて MOSu 導入の確認を行った。このポリマーを 168 mg / ml になるよう DMF に溶解後、基質ペプチドをポリマーに対して 2 mol% となるよう添加し、室温で1晩反応した。その後、過剰の isopropylamine で未反応の MOSu を処理し、透析(分画分子量 8,000)にて精製を行い、UV 測定にてペプチドの導入を確認した。

【結果及び考察】

MOSu を合成し NMR 測定を行ったところ、MOSu の合成は確認できたが、不純物が多少含まれていることが分かった。シリカゲルカラムによる精製をしたにも関わらず、不純物の完全な除去ができなかった。今後、展開溶媒などの条件を検討する必要がある。

Fig.1 (a) 及び(b) に RAFT 重合で得られたポリマーについての GPC 測定結果を示す。まず、Fig.1 (a) に NIPAAm 単独及びペプチドモノマー・NIPAAm 共重合体の結果示す。NIPAAm 単独では、DMF 溶媒中で経時的な poly-NIPAAm の伸長が確認できた。この時の相対分子量は最大で約 8,000 程度で、分子量分布は約 1.12 だった。しかし、ペプチドモノマーとの共重合では、モノマーのピークしか確認できず、高分子の生成は確認できなかった。この原因として、ペプチドに含まれているアミノ酸がラジカルをトラップし、伸長反応を阻害していると考えられる。この問題点を解決するために、MOSu と NIPAAm を共重合し、その後ペプチドを導入する手法を試みた。MOSu・NIPAAm 共重合体の結果を Fig.1 (b) に示す。これより、経時的な poly-NIPAAm の伸長が確認できた。この時の相対分子量は最大で約 4,400 程度で、分子量分布は約 1.25 だった。また NMR 測定より、MOSu 導入率は 14.7 mol% だった。このポリマーに基質ペプチドを導入し、UV 測定を行ったところ、280nm 付近に吸収ピークを確認した。このピークは、基質ペプチドに含まれているトリプトファン特有のピークであるため、これによりペプチドの導入を確認した。

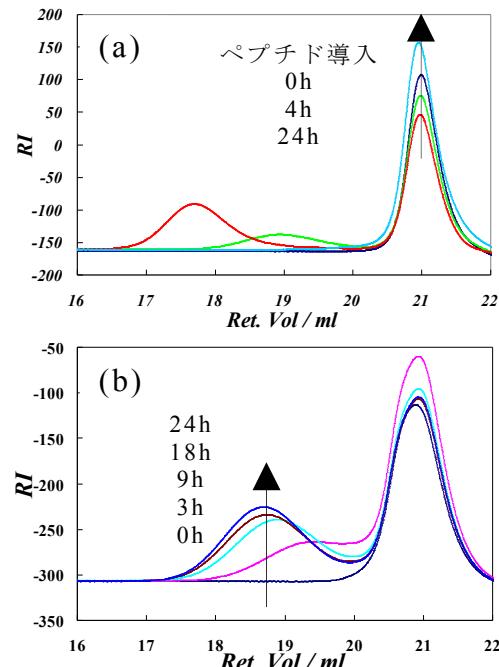


Fig.1 (a) NIPAAm 単独及び基質ペプチド共重合
(b) MOSu 導入の GPC 測定