

## 薬物担体構築を目的としたコイルドコイルの設計および特性評価

日大生産工(院)

○高橋 明日美

日大生産工

柏田 歩

## 1 緒言

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は高分子材料などからなる薬物担体を使用し薬物の体内動態を制御して治療の最適化を目指すシステムである。

DDSに用いられる薬物担体の例として高分子プロドラッグを用いたものがある。高分子プロドラッグは高分子と薬物とがリンカーを介して結合した構造となっている。そして、リンカー部分に適切な外部刺激により切断可能となる結合様式をとり入れることにより、目的患部の場所において薬物を遊離させることが可能となる。

このような高分子プロドラッグを生体内で使用するためには、生体適合性および生分解性の付与が必要となる。そこでわれわれはリンカーの構成要素としてポリペプチド間による自己組織化により形成され、これまで多くの研究例が報告されているコイルドコイル構造に注目した。

M. Pecharらは、ポリ(*N*-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)とコイルドコイルを組み合わせた薬物担体モデルについて報告している<sup>1)</sup>。この報告では、コイルドコイルを高分子担体と標的のリンカーとして用いて、高分子治療法および診断法に使用することが可能であることが示唆されている。

本研究では、コイルドコイル構造をリンカーとして利用し、生体適合性や生分解性を有し、さらに適切な外部刺激に応答した薬物放出が可能となる。新規薬物担体を合成することを目的とする。そのためには、合成したコイルドコイルの性質を評価する必要がある。そこでコイルドコイルを形成する新規なポリペプチドの設計および特性評価を行った。

## 2 実験操作

## 2-1 ポリペプチドの合成

ポリペプチドの合成を Fmoc 固相合成法により、0.25 mmol スケールで行った。

活性化試薬として HOBt·H<sub>2</sub>O, HBTU, DIEA を用い、Fmoc-Gly-Wang resin 上で目的のアミノ酸配列を有するポリペプチドの合成を行った。

その後、樹脂上に伸長したポリペプチド鎖をトリフルオロ酢酸 (TFA) /水/トリイソプロピルシラン (TIS) /エタンジチオール (EDT) (94/2.5/1.0/2.5) の混合溶液と反応させることで脱樹脂を行った。

ポリペプチド粗生成物は、分画分子量 1000 g/mol の透析膜(Cellu・Sep H1)を用いた透析、さらに、逆相 HPLC により精製した。

## 2-2 円二色性(CD)スペクトル測定

## 2-2-1 ポリペプチドの二次構造評価

CD スペクトル測定を 20 μM のポリペプチド溶液について 200 nm から 240 nm の範囲で行った。

## 2-2-2 コイルドコイルの温度依存性評価

コイルドコイル構造の熱変性はヘリックス構造特有の 222 nm の CD シグナル強度の温度変化を追跡することにより評価した。

## 3 結果と考察

## 3-1 ポリペプチドの設計

本研究では、異なる安定性を有するヘテロ二量体コイルドコイルを得るためにこれまで設計、合成した ECC と KCC に加えてヘリックス鎖長がより長い APE と APK の異なるコイルドコイルポリペプチドを設計した。設計にあたっては二量体コイルドコイル構造形成モデルのアミノ酸配列を参考にして<sup>2)</sup>、疎水性コア形成に寄与する a と d 位にそれぞれ

## Design and Characterization of Coiled-Coils for Constructing Drug Carriers

Asumi TAKAHASHI and Ayumi KASHIWADA

Ile (I) と Leu (L) を配置した。また、ECC と APE では e と g 位には Glu (E) を配置し、KCC と APK では Lys(K) を配置した。Fig. 1 に設計した 4 種類のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

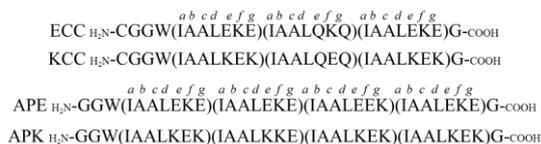


Fig. 1 Amino acid sequences of the designed polypeptides.

### 3-2 CD スペクトル測定による

ポリペプチドの二次構造の確認

設計したポリペプチド ECC および KCC と APE および APK をそれぞれ 1:1 で混合した際には選択的にヘテロ二量体コイルドコイル構造を形成することが予想される。そこで、CD スペクトル測定により pH 7.0 の水溶液中におけるそれぞれのポリペプチドの構造を評価した。ECC および KCC と APE および APK の 1:1 混合系について CD スペクトル測定を行った結果を Fig. 2 に示す。

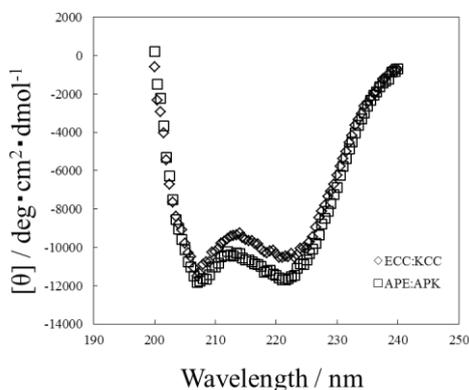


Fig. 2 CD spectra of ECC:KCC=1:1 mixture and APE:APK=1:1 mixture in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0) at 20 °C.

Fig. 2 の結果から ECC : KCC の 1 : 1 混合系と APE : APK の 1 : 1 混合系はいずれも 207 nm および 222 nm 付近に負の極大スペクトルが観測されたことからヘリックス構造にもとづくコイルドコイルを形成しているということが示された。

また、ECC と KCC の混合系と APE と APK

の混合系の CD 強度を比較すると、APE と APK からなる系の方がシグナル強度が大きく、コイルドコイルの会合における安定性はヘリックス鎖長がより長い APE と APK の 1 : 1 混合系の方が高いことがわかった。

### 3-3 コイルドコイルの温度依存性評価

形成したコイルドコイルの熱力学的安定性を CD スペクトル測定により確認を行った。CD スペクトルの強度のみならず熱に対しても、ECC と KCC の混合系よりも APE と APK の混合系の方が安定するはずである。

CD スペクトルの温度依存性に関して評価を行ったところ APE と APK の混合系より高温で構造変性することが確認できた。また、APE と APK の混合系は加熱による強度の減少が少ないことが確認された。以上の結果からも、APE と APK の混合系の方が ECC と KCC の混合系よりも安定していることが示された。

## 4 結言

本研究では、コイルドコイル構造を高分子と薬物をつなぐリンカーとして利用する薬物担体を合成するため、2 種類のコイルドコイルの安定性評価を行った。

ECC と KCC の混合系と APE と APK の混合系は水溶液中でヘテロ二量体コイルドコイルを形成していることが示された。また温度変化による熱力学的安定性の評価では、いずれの系も熱変性挙動を示すとともに APE と APK の混合系のほうがより高い熱安定性を示した。このことから APE と APK の混合系の方が、より安定なリンカーとして薬物担体に応用することが可能である。

今後は合成したポリペプチドを基本とし配列を改良することで機能性の付与を考え、高分子と薬物のリンカーとしてコイルドコイルを用いた新規薬物担体の設計を検討中である。

### [参考文献]

- 1) M. Pechar, R. Pola, R. Laga, K. Ulbrich, L. Bednarova, P. Malon, I. Sieglava, V. Kral, M. Fabry, O. Vanek, *Biomacromolecules*, **2011**, *12*, 3645–3655.
- 2) J. Yang, C. Xu, C. Wang, J. Kopeček, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 1187–1195.