

酸性 pH 応答性コイルドコイルを利用したヒアルロン酸プロドラッグの設計と合成

日大生産工(院)

○高橋 明日美

日大生産工

柏田 歩

1 緒言

通常血中に投与された薬物はあらゆる組織へ拡散することから目的患部以外にも薬物が作用し、薬物の効力の軽減や副作用などの問題が起こる。そこで、薬物を目的患部に送達させるための手段として薬物担体システム(DDS)に関する研究が広く行われ、がん治療などへ応用が期待されている。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薬物担体であり、リンカー部分に外部刺激により切断可能な結合様式を取り入れることにより、目的患部における薬物放出が可能となる。一般に、血液は中性であるのに対し、腫瘍細胞内は酸性であることから酸性条件下で解離が可能なリンカーは腫瘍細胞のための高分子プロドラッグ設計に有用である。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。S. Danmarkらは、4分岐ポリ(エチレングリコール) (star-PEG)の架橋点にコイルドコイルを用いた自己組織化ゲルを報告している¹⁾。この報告された系は、異なる2種類のコイルドコイルを高分子担体のリンカーとして用いることで、ペプチドの電荷の差によりリンカーであるコイルドコイルを解離し、特定の条件で薬物放出が可能となる。

本研究では、親水性高分子であるヒアルロン酸(HA)と疎水性薬物と見立てたデオキシコール酸とを結合するためのリンカーとして、温度や pH などの外部刺激により会合・解離の制御が可能であるヘテロ 2 量体コイルドコイル会合体を用いたプロドラッグを設計する。

2 実験操作

2-1 ポリペプチドの合成

高分子プロドラッグのリンカーとして用いるポリペプチドは Fmoc 固相合成法により 0.25 mmol スケールで合成した。

活性化試薬として HOBt・H₂O, 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) /エタレンジチオール (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

ポリペプチドの二次構造を評価するために 20 μM のポリペプチド溶液(pH 5.0 および pH 7.0)の CD スペクトルを 200 nm から 240 nm の範囲で測定した。

2-3 HA-ペプチドコンジュゲートの合成

はじめに HA の COOH 末端に N-(2-アミノエチル)マレイミドを導入させ、その後ポリペプチドの末端に導入した Cys(C)のチオール基をマイケル付加により結合させて HA-ペプチドコンジュゲートを合成した。透析を行い、¹H NMR 測定により確認を行った。

3 結果と考察

3-1 ポリペプチドの設計

本研究では、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 2 種類のポリペプチド(APE と APK)に加え、pH 応答性が期待されるポリペプチド(APE2 と APK2)を設計した。コイルドコイルは 2 種類のヘリックスが疎水性コアを形成して会合する。また、その周りに電荷を有するアミノ酸

Design and Synthesis of Hyaluronic Acid Prodrug using Acidic pH responsive Coiled-Coil

Asumi TAKAHASHI and Ayumi KASHIWADA

を配置することで静電相互作用により会合を安定化させている。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²⁾、コイルドコイル形成時に疎水性コア形成する Ile (I)と Leu(L)を配置するとともに、APE と APE2 については Glu(E)を、APK と APK2 については Lys(K)を配置した。また、APE2 と APK2 は酸性条件下でコイルドコイル構造を解離させるために疎水性コア内に His(H)をそれぞれ 1 残基ずつ配置した。His(H)は pKa が 6.04 であることから His(H)を導入することで酸性条件下(目的患部条件)におけるコイルドコイルの解離が期待できる³⁾。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。

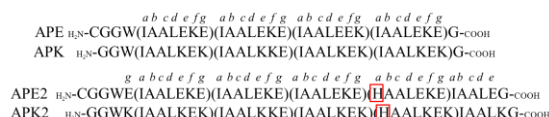


Fig. 1 Amino acid sequences of the designed polypeptides.

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、合成したポリペプチド APE および APK と APE2 および APK2 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、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。その結果を Fig. 2 に示す。

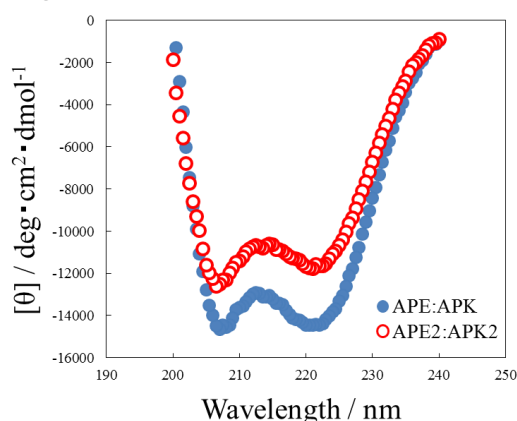


Fig. 2 CD spectra of APE:APK=1:1 mixture and APE2:APK2=1:1 mixture in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0) at 20 °C.

いずれの系も 207 nm および 222 nm 付近に負の極大が観測されたことから設計通りヘリ

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。

一方、疎水性コアを改善した APE2 : APK2 の 1 : 1 混合系は pH 5.0 おいてコイルドコイル構造の不安定化が確認されたが予想したコイルドコイルの崩壊は認められなかった。これは、疎水性コア内に配置した His(H)の電荷の影響よりも疎水性相互作用の会合が強かったことによると考えられる。

3-3 HA-ペプチドコンジュゲート

の合成と評価

本研究ではヒアルロン酸と薬物をリンカーを介して会合させる系も必要となる。そこで高分子とコイルドコイルポリペプチドのコンジュゲートの合成も行う。ここではじめに HA の COOH 末端にマレイミド基を導入させた HA-マレイミドコンジュゲートを合成した。さらに現在 HA に導入したマレイミド基に合成したポリペプチド(APE および APE2)の末端に存在する Cys(C)のチオール基をマイケル付加により結合させ、HA-ペプチドコンジュゲートの合成を行った。

4 結言

本研究では、コイルドコイル構造をヒアルロン酸(HA)と疎水性薬物とのリンカーとして利用することを目的として、2 種類のコイルドコイルの設計および合成を行った。

さらに、プロドラッグの基盤となる HA へのマレイミド基の導入を行った。

今後は合成したポリペプチドを基本とし、導入する His(H)の数や位置を考慮することで pH 応答性の向上を考える。そして、合成したポリペプチドとマレイミド基導入 HA を組み合わせ、コイルドコイルリンカーを用いた新規高分子プロドラッグの合成を行う。

[参考文献]

- 1) S. Dänmark, C. Aronsson, D. Aili, *Biomacromolecules*, **2016**, 17, 2260–2267.
- 2) M. Pechar, R. Pola, R. Laga, A. Braunová, S. Filippov, A. Bogomolova, L. Bednárová, O. Vaněk, K. Ulbrich, *Biomacromolecules*, **2014**, 15, 2590–2599.
- 3) Y. Zimenkov, S. Dublin, R. Ni, R. Tu, V. Breedveld, R. Apkarian, V. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6770–6771.