

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5997902号
(P5997902)

(45) 発行日 平成28年9月28日(2016.9.28)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	7/06	(2006.01)	C07K 7/06 ZNA
C07K	1/02	(2006.01)	C07K 1/02
C08F	8/32	(2006.01)	C08F 8/32
C08F	20/06	(2006.01)	C08F 20/06
A61K	47/42	(2006.01)	A61K 47/42

請求項の数 2 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2012-4852 (P2012-4852)
 (22) 出願日 平成24年1月13日(2012.1.13)
 (65) 公開番号 特開2013-144647 (P2013-144647A)
 (43) 公開日 平成25年7月25日(2013.7.25)
 審査請求日 平成26年10月6日(2014.10.6)

特許法第30条第1項適用 発行者名：社団法人 高分子学会、刊行物名：第57回 高分子研究発表会(神戸)予稿集、第60頁(発行日：平成23年7月15日)、及び、発行者名：公益社団法人 日本化学会 コロイドおよび界面化学部会、刊行物名：第63回 コロイドおよび界面化学討論会 講演要旨集、第336頁(発行日：平成23年8月22日)に発表

(73) 特許権者 503027931
 学校法人同志社
 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武町601番地
 (74) 代理人 100076406
 弁理士 杉本 勝徳
 (74) 代理人 100117097
 弁理士 岡田 充浩
 (72) 発明者 東 信行
 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社大学内
 (72) 発明者 古賀 智之
 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社大学内

最終頁に続く

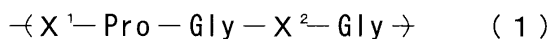
(54) 【発明の名称】 多重刺激応答型高分子及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

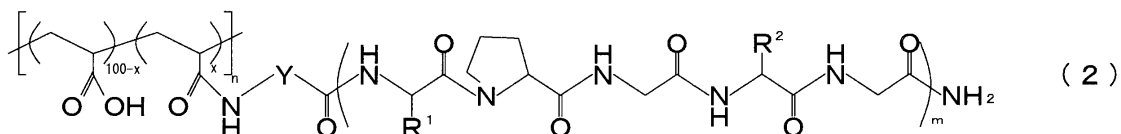
【請求項1】

イオン性官能基としてカルボキシル基を含む第1の側鎖と、下式(1)で表されるアミノ酸配列を構成単位とするペプチド構造を含む第2の側鎖とを少なくとも有し、下式(2)で表される、pH及び温度に应答して可逆的に相転移を示す多重刺激応答型高分子。

【化1】



【化2】



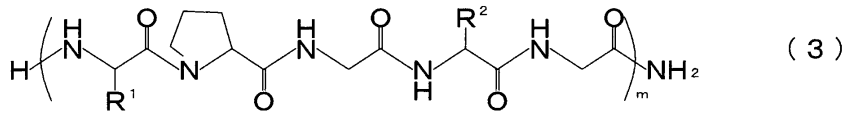
(上式(1)において、X¹及びX²は、それぞれ独立して、疎水性アミノ酸残基から選ばれる任意の - アミノ酸残基である。また、上式(2)において、xは15以上100未満の範囲であり、nは50~15000の範囲であり、mは1~8の範囲であり、Yは主鎖と第2の側鎖とを連結する任意のアミノ酸残基に由来する構造部分であり、R¹及びR²はそれぞれ前記 - アミノ酸残基X¹及びX²の種類に応じた - アミノ酸側鎖である。)

【請求項2】

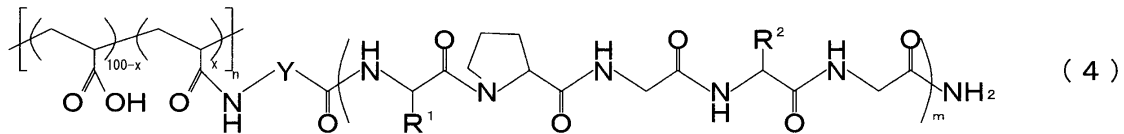
ポリアクリル酸に対し、前記ポリアクリル酸のカルボキシル基の一部に、下式(3)で

表されるペプチドのN末端をスペーサーを介して結合させてペプチド鎖をグラフトすることにより、下式(4)で表され、pH及び温度に应答して可逆的に相転移を示す多重刺激応答型高分子を製造する、多重刺激応答型高分子の製造方法。

【化3】



【化4】



(上式(3)、(4)において、mは1~8の範囲であり、R¹及びR²はそれぞれ疎水性アミノ酸残基から選ばれる -アミノ酸残基の種類に応じた -アミノ酸側鎖である。また、上式(4)において、xは15以上100未満の範囲であり、nは50~15000の範囲であり、Yは主鎖と前記ペプチドのN末端とを連結する任意のアミノ酸残基に由来する構造部分である。)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、pH及び温度に应答して可逆的に相転移を示す多重刺激応答型高分子及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

刺激応答型高分子は、外部からの刺激によって相転移を示すので、この性質を利用して、例えば、DDS(ドラッグデリバリーシステム)や細胞足場材などの生体材料としての利用が検討されている。

このような刺激応答型高分子としては、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)が知られており、このものは、32℃を境に可逆的に相転移を示す(例えば、非特許文献1,2参照)。すなわち、溶液温度が32℃を超えるとPNIPAAmは凝集して溶解性を失う(このように、低温で溶解していた高分子が温度の上昇により相分離を起こす温度をLCST又は下限臨界溶解温度という)。しかし、PNIPAAmのLCSTは一定であり、変えることができないという欠点があった。

そこで、pH応答型のポリアクリル酸(PAA)などにN-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)をグラフト鎖として導入することにより、LCSTをpHで制御することも検討されている(例えば、非特許文献3参照)。この方法によれば、LCSTをpHで制御することが可能であるが、pHの変化に対するLCSTの変化は僅かであり、十分なものではなかった。

さらに、PNIPAAmは生分解性ではないので、生体材料としての応用にも限界があった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Y. G. Takeiら、Bioconjugate Chem., 4, 341、1993年

【非特許文献2】H. Feilら、Macromolecules, 26, 2496、1993年

【非特許文献3】Allan S. Hoffman、Nature., 373, 49、1995年

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

そこで、本発明は、生体適合性に優れるとともに、高感度のpH及び温度応答性を示す多重刺激応答型高分子及びその製造方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、上記課題を解決するために、鋭意検討を行った。

その過程において、まず、側鎖としてイオン性官能基（本発明において、「適当な外部pH域においてイオン化し得る官能基」と定義する）を導入することでpH応答性を発現させることを検討し、加えて、このpH応答性に対して高感度の温度応答性を導入するための更なる検討を行った。そして、生体適合性を考慮し生体由来のエラスチンタンパクに着目して、そのVPGVG（Vはバリン残基、Pはプロリン残基、Gはグリシン残基を表し、本発明においては、それぞれ、Val、Pro、Glyと記する場合もある）という特徴的なアミノ酸配列を手本にしてエラスチン類似ペプチドを系統的に合成するとともに、高分子の側鎖として、前記イオン性官能基に加えて、前記エラスチン類似ペプチドを導入することで、高感度のpH及び温度応答性が発現されること、及び、前記アミノ酸配列におけるバリン残基を他の - アミノ酸残基に置換すると、優れた多重刺激応答性を損なうことなく、応答pH域及び応答温度域を変えることができることを見出した。

【0006】

さらに、このような多重刺激応答型高分子が、イオン性官能基を側鎖に有する高分子の該イオン性官能基の一部に特定のペプチドをグラフトすることにより容易に製造できることを見出した。

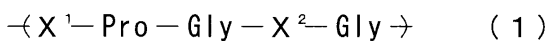
【0007】

本発明は上記知見に基づき完成されるに至った。

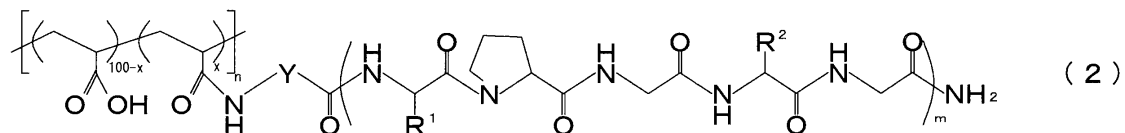
すなわち、本発明にかかる多重刺激応答型高分子は、イオン性官能基としてカルボキシル基を含む第1の側鎖と、下式(1)で表されるアミノ酸配列を構成単位とするペプチド構造を含む第2の側鎖とを少なくとも有し、下式(2)で表される、pH及び温度に応答して可逆的に相転移を示す多重刺激応答型高分子である。

【0008】

【化1】



【化2】

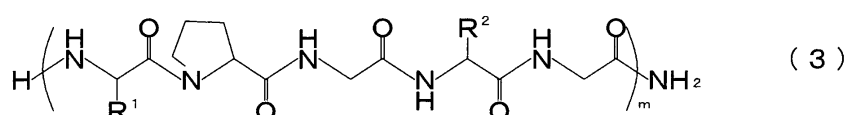


【0009】

本発明にかかる多重刺激応答型高分子の製造方法は、ポリアクリル酸に対し、前記ポリアクリル酸のカルボキシル基の一部に、下式(3)で表されるペプチドのN末端をスペーサーを介して結合させてペプチド鎖をグラフトすることにより、上式(2)で表され、pH及び温度に応答して可逆的に相転移を示す多重刺激応答型高分子を製造するものである。

【0011】

【化3】



10

20

30

40

50

【0012】

(上式(3)において、 m は1～8の範囲であり、 R^1 及び R^2 はそれぞれ疎水性アミノ酸残基から選ばれる - アミノ酸残基の種類に応じた - アミノ酸側鎖である。)

【0013】

なお、本発明において、アミノ酸に関して「残基」というときは、ペプチド結合によりアミノ酸のカルボキシル基のOH、アミノ基の水素原子の少なくともいずれかが除かれた構造部分を指す。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、生体適合性を有するエラスチン類似ペプチドを用いているため、生体材料としての幅広い利用が期待できるとともに、高感度のpH及び温度応答性を示す点でも優れており、さらに、ペプチド構造を利用しているためそのアミノ酸配列を変更するという簡易な手法により高い自由度で応答域を制御することができる利点もある。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】実施例1及び従来技術における多重刺激応答型高分子の一定pH下での温度応答性を示すグラフである。

【図2】実施例1～5の多重刺激応答型高分子について、pHごとのLCSTの測定結果をプロットしたグラフである。

【図3】実施例1の多重刺激応答型高分子の一定温度下でのpH応答性を示すグラフである。

【図4】実施例1の多重刺激応答型高分子について、LCSTを超えるサンプルに酵素を添加した後の濁度の経時変化を示すグラフである。

【図5】実施例1の多重刺激応答型高分子について、LCST未満のサンプルに酵素を添加した後の濁度の温度依存性を示すグラフである。

【図6】実施例1の多重刺激応答型高分子についてのCDスペクトルである。

【図7】実施例1～5の多重刺激応答型高分子について、波長198nmでのCDスペクトルの測定結果を温度ごとにプロットしたグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明にかかる多重刺激応答型高分子及びその製造方法の好ましい実施形態について詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更実施し得る。

【0017】

〔多重刺激応答型高分子〕

本発明にかかる多重刺激応答型高分子は、以下に詳述する第1の側鎖と第2の側鎖とを少なくとも有するものである。

【0018】

<第1の側鎖>

第1の側鎖は、イオン性官能基を含むものである。このイオン性官能基は、外部pHが変動したときに可逆的にイオン化するが、イオン化した際には、各イオン間で電荷による反発が生じる。この外部pHに依拠したイオン間反発の有無により、高分子にpH応答性を与える。

【0019】

イオン性官能基としては、例えば、カルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基などのアニオン性官能基や、アミノ基、4級アンモニウム塩基などのカチオン性官能基が挙げられる。中でも、カルボキシル基又はアミノ基が好ましく挙げられる。

【0020】

<第2の側鎖>

第2の側鎖は、下記(1)で表されるアミノ酸配列を構成単位とするペプチド構造を含

10

20

30

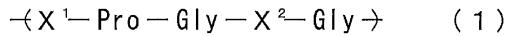
40

50

むものである。この第2の側鎖は、エラスチン類似の前記特定のペプチド構造を含むことにより、外部温度に応じて、ランダムコイルと α -ターン構造の構造転移を示し、これにより、高分子に温度応答性を与える。

【0021】

【化4】



【0022】

(上記において、 X^1 及び X^2 は、それぞれ独立して、任意の α -アミノ酸残基である。)

【0023】

ここで、第2の側鎖がイオン性官能基を有していると、第1の側鎖との間で電荷による相互作用が生じて、多重刺激応答性の制御が複雑化するおそれがあるので、このような制御の複雑化を避ける場合には、 X^1 、 X^2 として、非イオン性アミノ酸残基を選択することが好ましく、例えば、バリン残基、アラニン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基などの疎水性アミノ酸残基が好ましく挙げられる。中でも、バリン残基、アラニン残基、イソロイシン残基が好ましく挙げられる。

なお、上記(1)では、便宜上、 X^1 を左末端に、Glyを右末端に表示しているが、これはN末端側が X^1 、C末端側がGlyでなければならないという意味ではない。すなわち、前記アミノ酸配列を構成する α -アミノ酸単位のいずれがN末端側にあってもよく、例えば、GlyがN末端側にあつて、C末端側に向けて、順に X^2 、Gly、 X^1 、Proが結合している場合も、上記(1)は含んでいる。

【0024】

また、前記ペプチド構造は、上記(1)で表されるアミノ酸配列からなる構成単位を1つのみ含むものであっても良いし、2以上含むものであっても良い。中でも、前記構成単位を1~8含むものが好ましく、3~5含むものがより好ましい。なお、2以上含む場合は、各構成単位における X^1 、 X^2 は同一でも良いし、異なっても良い。

【0025】

さらに、前記ペプチド構造は、主鎖に直接に結合していても良いが、適当なスペーサーを介して結合されていても良い。このようなスペーサーとしては、本発明の多重刺激応答性を害することなく主鎖と前記ペプチド構造を隔てて連結する働きを有するものであれば特に限定されないが、具体的には、両末端に反応性官能基を有する二官能化合物、例えば、アミノ酸、ジオール、ジアミン、ジカルボン酸などを用いて得られる有機鎖が導入し易く好ましい。アミノ酸は2以上組み合わせ(ペプチド鎖として)用いることもできる。

【0026】

<多重刺激応答型高分子>

本発明にかかる多重刺激応答型高分子は第1の側鎖と第2の側鎖とを少なくとも有するものであればよく、本発明の効果を害しない範囲であれば、第1の側鎖及び第2の側鎖以外の側鎖を有していても良い。第1の側鎖と第2の側鎖の割合については特に限定するわけではないが、例えば、モル比において、両者の合計を100としたとき、第2の側鎖の割合が15以上100未満であることが好ましい。いずれかが過剰でありすぎると、多重刺激応答性が十分に得られにくくなるおそれがある。

【0027】

なお、ここにいう側鎖とは、直鎖状の主鎖に結合したものだけでなく、例えば、 dendrimer における dendron のごとき多分岐高分子における側鎖も含む。 dendrimer としてはポリアミドアミン構造を有するものが広く知られており、特に限定するわけではないが、本発明においても、このポリアミドアミン構造を有するものが好適に採用できる。後述するが、ポリアミドアミン dendrimer は、そのアミンの一部に第2の側鎖となるペプチド鎖を導入することで、本発明の多重刺激応答型高分子を比較的容易に得ることができる。

【0028】

10

20

30

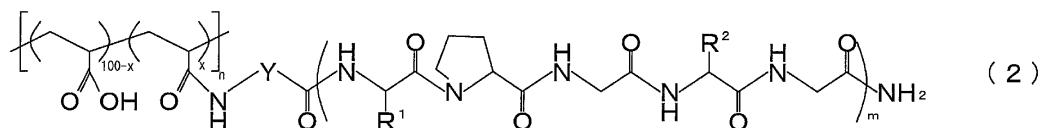
40

50

直鎖状の主鎖に前記第1の側鎖及び第2の側鎖が結合した構造を有するものとしては、特に限定するわけではないが、例えば、下式(2)で表される多重刺激応答型高分子が好ましく挙げられる。

【0029】

【化5】



10

【0030】

上式(2)において、xは第1の側鎖と第2の側鎖とのモル比率に等しく、特に限定するわけではないが、上述のように、15以上100未満の範囲であることが好ましい。

nは高分子の重合度を表しており、特に限定するわけではないが、50~15000の範囲であることが好ましい。

上式(2)において、第2の側鎖における括弧内の特定のアミノ酸配列は、上記(1)に記載の表現で言えば、X¹をN末端側に有し、C末端側に向けて、順に、Pro, Gly, X², Glyが結合しているものである。R¹、R²は、前記(1)における -アミノ酸残基X¹、X²の種類によって自動的に定まる -アミノ酸側鎖であって、例えば、バリン残基であればイソプロピル基であり、アラニン残基であればメチル基であり、イソロイシン残基であればsec-ブチル基である。

20

mは、上記特定のアミノ酸配列の繰り返し数であり、特に限定するわけではないが、上述したように、1~8の範囲であることが好ましく、3~5の範囲であることがより好ましい。

上記(2)で示される上記多重刺激応答型高分子では、スペーサーとしてアミノ酸が用いられている。すなわち、Yは、スペーサーとなるアミノ酸のアミノ酸残基に由来する構造部分であり、このような任意のアミノ酸残基としては特に限定されないが、例えば、-アラニン残基(-Y- = -CH₂-CH₂-)などが好ましく挙げられる。

【0031】

〔多重刺激応答型高分子の製造方法〕

上述した本発明の多重刺激応答型高分子は、例えば、以下に詳述する本発明の製造方法により容易に製造することができる。

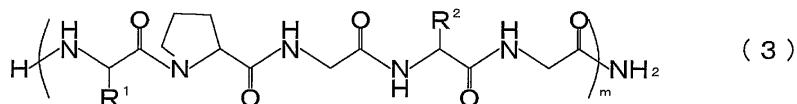
30

【0032】

すなわち、上述した本発明の多重刺激応答型高分子は、イオン性官能基を側鎖に有する高分子に対し、前記イオン性官能基の一部に、下式(3)で表されるペプチドのN末端もしくは下式(4)で表されるペプチドのC末端を直接に又はスペーサーを介して結合させてペプチド鎖をグラフトする、ことにより製造することができる。

【0033】

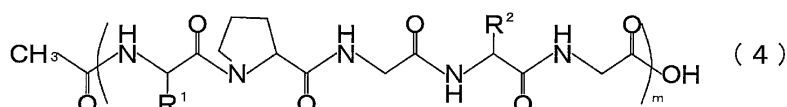
【化6】



40

【0034】

【化7】



【0035】

50

多重刺激応答型高分子について上述したように、 m は1～8の範囲であることが好ましく、3～5の範囲であることがより好ましい。

R^1 及び R^2 はそれぞれ - アミノ酸残基の種類に応じて自動的に定まる - アミノ酸側鎖である。

【0036】

高分子のイオン性官能基としては、多重刺激応答型高分子について上述したように、例えば、カルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基などのアニオン性官能基や、アミノ基、4級アンモニウム塩基などのカチオン性官能基が挙げられる。中でも、カルボキシル基又はアミノ基が好ましく挙げられる。

【0037】

前記カルボキシル基を側鎖に有する高分子としては、特に限定するわけではないが、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、マレイン酸、クロトン酸、無水マレイン酸などのカルボキシル基含有ビニル系単量体の単独重合体もしくは共重合体、グルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸を主たる構成アミノ酸とするポリペプチドなどが挙げられる。

【0038】

前記アミノ基を側鎖に有する高分子としては、特に限定するわけではないが、例えば、アリルアミンなどのアミノ基含有ビニル系単量体の単独重合体もしくは共重合体、リシンやキトサンなどの塩基性アミノ酸を主たる構成アミノ酸とするポリペプチドなどが挙げられる。また、ポリアミドアミンデンドリマーのごとき、アミノ基を側鎖に有する多分岐高分子も好ましく挙げられる。

【0039】

上記において、高分子のイオン性官能基の一部に、式(3)で表されるペプチドのN末端もしくは式(4)で表されるペプチドのC末端を「直接」結合する場合の例としては、例えば、カルボキシル基を側鎖に有する高分子の該カルボキシル基の一部に式(3)で表されるペプチドのN末端をアミド結合する場合、あるいは、アミノ基を側鎖に有する高分子の該アミノ基の一部に式(4)で表されるペプチドのC末端をアミド結合する場合などが好適に挙げられる。

【0040】

また、高分子のイオン性官能基の一部に、式(3)で表されるペプチドのN末端もしくは式(4)で表されるペプチドのC末端を「スペーサーを介して」結合する場合の例としては、例えば、スペーサーが1もしくは2以上のアミノ酸であれば、これを介して、カルボキシル基を側鎖に有する高分子の該カルボキシル基とペプチドのN末端、あるいは、アミノ基を側鎖に有する高分子の該アミノ基とペプチドのC末端とを連結することができる。

また、スペーサーがジオール、ジアミンなどであれば、これを介して、カルボキシル基を側鎖に有する高分子の該カルボキシル基とペプチドのC末端とを連結することができる。

さらに、スペーサーがジカルボン酸などであれば、これを介して、アミノ基を側鎖に有する高分子の該アミノ基とペプチドのN末端とを連結することができる。

このように、高分子が有するイオン性官能基の種類や用いるスペーサーの種類により種々の態様が有り得る。

このうち、アミノ酸をスペーサーとして用い、これを介して、カルボキシル基を側鎖に有する高分子の該カルボキシル基とペプチドのN末端、あるいは、アミノ基を側鎖に有する高分子の該アミノ基とペプチドのC末端とを連結するか、または、ジエチレングリコールをスペーサーとして用い、これを介して、カルボキシル基を側鎖に有する高分子の該カルボキシル基とペプチドのC末端とを連結することが好ましい。

【0041】

上記した種々の実施形態のうち、前記イオン性官能基を側鎖に有する高分子としてポリアクリル酸を用い、該ポリアクリル酸のカルボキシル基の一部に、上式(3)で表される

10

20

30

40

50

ペプチドのN末端を直接に又は1もしくは2以上の任意のアミノ酸（例えば、 α -アラニン酸）を介して結合させてペプチド鎖をグラフトする方法が特に好ましい。

【0042】

上式(3)や上式(4)で表されるペプチドは、Fmoc基(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基)やBoc基(tert-ブトキシカルボニル基)などの保護基を用いた固相ペプチド合成法などの従来公知の方法で合成することができる。

但し、第2の側鎖がイオン性官能基を有していると第1の側鎖との電荷による相互作用が生じて、多重刺激応答性の制御が複雑化するおそれがあるので、上式(3)で表されるペプチドはC末端がアミド化され、上式(4)で表されるペプチドはN末端がアセチル化されている。

10

上式(3)で表されるペプチドにおけるC末端のアミド化は、例えば、ペプチドアミン用レジン担体として用いることで得ることができる。このようなペプチドアミン用レジンとしては、例えば、Fmoc-NH-SAL-MBHA樹脂、CLEAR-Amide樹脂などが知られている。

また、上式(4)で表されるペプチドにおけるN末端のアセチル化は、例えば、N末端に無水酢酸を作用させることで容易に行うことができ、具体的には、アセチル化を行う対象となるペプチドの溶液に対し、無水酢酸溶液、DIPC(ジイソプロピルカルボジイミド)溶液、HOAt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)溶液を加え、攪拌混合する方法などが挙げられる。この場合、溶媒としては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)などが好適である。

20

【0043】

次に、前記高分子と前記ペプチドにおけるカルボキシル基とアミノ基との縮合反応も、従来公知の方法で行うことができる。通常、溶媒中で縮合剤の存在下で反応を行う。

【0044】

前記溶媒としては、たとえば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アセトニトリル、エタノールなどの有機溶媒、水などが挙げられる。溶媒は、1種単独であるいは2種以上を混合して用いることができる。

【0045】

縮合剤を用いる場合、例えば、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩(DMT-MM)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDCまたはWSC)などが挙げられる。また、N-メチルモルホリン(NMP)、NHSなどの活性化剤を前記縮合剤と併用して用いることもできる。

30

前記縮合反応は、特に限定するわけではないが、例えば、0~60の範囲の温度で、1~48時間程度行うことができる。

【0046】

なお、本発明の多重刺激応答型高分子は、グラフト技術を用いた上記製造方法以外の共重合技術によっても得ることができる。

例えば、カルボキシル基やアミノ基などのイオン性官能基を有する単量体と、上記所定のペプチド鎖を有する単量体を別々に調製し、これらを共重合することにより得ることができる。この場合、共重合は、ランダム共重合でもブロック共重合でも良いが、ランダム共重合がより好ましい。ブロック共重合の場合、得られる多重刺激応答型高分子は、イオン性官能基を有する第1の側鎖同士が近接し、また、ペプチド構造を有する第2の側鎖同士が近接したものとなるので、両側鎖の挙動が個別に現れてしまって、これらの相乗作用に基づく所望の多重刺激応答性が得られなくなるおそれがあるからである。

40

【0047】

〔多重刺激応答型高分子の用途〕

本発明の多重刺激応答型高分子は、pH及び温度に応じて相転移を示すことから、DDS、細胞足場材料、アクチュエーター、分離材料などとして好適に利用することができる。

50

【実施例】

【0048】

以下、実施例を用いて、本発明にかかる多重刺激応答型高分子及びその製造方法について説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

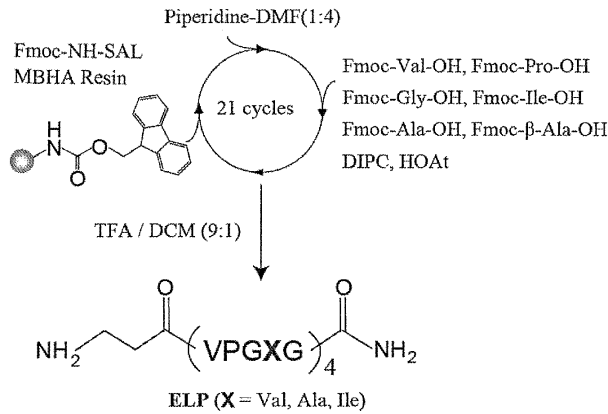
【0049】

〔エラスチン類似ペプチドの合成〕

下記合成経路1に従い、合成例1～3にかかるエラスチン類似ペプチド(ELP)を合成した。

【0050】

【化8】



10

20

【0051】

<合成例1>

以下に詳述するようにして、上記合成経路1に記載の最終生成物において、X = Valである合成例1のELPを得た。

すなわち、まず、Fmoc-NH-SAL-MBHA樹脂1.5g(0.67mmol/g)をDMF15mLにより一晩膨潤させた。このFmoc-NH-SAL-MBHA樹脂に対して、下記(1)脱保護基及び(2)アミノ酸鎖の伸長を逐次行った。

【0052】

(1)脱保護基(脱Fmoc基)

Fmoc基を除去するため、ピペリジン/DMF(体積比=1/4)15mLを加え攪拌した。この操作を3分×2回、20分×1回行った。その後、DMFで溶液が中性になるまで洗浄を繰り返した。

【0053】

(2)アミノ酸鎖の伸長(縮合反応)

伸長したいアミノ酸鎖に応じたFmoc-アミノ酸のDMF溶液(7mL)、DIPC:0.38g(3.02mmol)のDMF溶液(3mL)、HOAt:0.42g(3.02mmol)のDMF溶液(5mL)を加え、2時間攪拌することで所望のFmoc-アミノ酸鎖を縮合結合した。縮合後、DMFにより洗浄し、未反応のFmoc-アミノ酸を除去した。Fmoc-アミノ酸の使用量は、それぞれ、Fmoc-Gly-OH:0.9g(3.02mmol)、Fmoc-Val-OH:1.02g(3.02mmol)、Fmoc-Pro-OH:1.01g(3.02mmol)とした。

30

40

【0054】

上記(1)、(2)の手順を繰り返すことでFmoc-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)₄-NH-SAL-MBHA樹脂を得た。

【0055】

その後、Fmoc-Ala-OH:0.936g(3.02mmol)をスペーサーとして導入し、Fmoc基を除去することでNH₂-Ala-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)₄-NH-SAL-MBHA樹脂を合成した。

50

【0056】

次に、合成した NH_2 - - Ala - (Val - Pro - Gly - Val - Gly)₄ - NH - SAL - MBHA 樹脂を DMF および DCM により洗浄したのち、デシケーター内で減圧乾燥させた。乾燥後、TFA / DCM (体積比 = 9 / 1) 30 mL で 2 時間 × 2 回攪拌し、樹脂からのペプチドの切り出しを行った。その後、メタノールと TFA を共沸させることで減圧濃縮した。最後に、水に溶解させ凍結乾燥することで目的のエラスチン類似ペプチド NH_2 - - Ala - (Val - Pro - Gly - Val - Gly)₄ - NH₂ を得た。

【0057】

< 合成例 2 >

Fmoc - アミノ酸の一つとして Fmoc - Ile - OH : 1.07 g (3.02 mmol) を用いたこと以外は合成例 1 と同様にして、上記合成経路 1 に記載の最終生成物において、X = Ile である合成例 2 の ELP を得た。

【0058】

< 合成例 3 >

Fmoc - アミノ酸の一つとして Fmoc - Ala - OH : 0.99 g (3.02 mmol) を用いたこと以外は合成例 1 と同様にして、上記合成経路 1 に記載の最終生成物において、X = Ala である合成例 3 の ELP を得た。

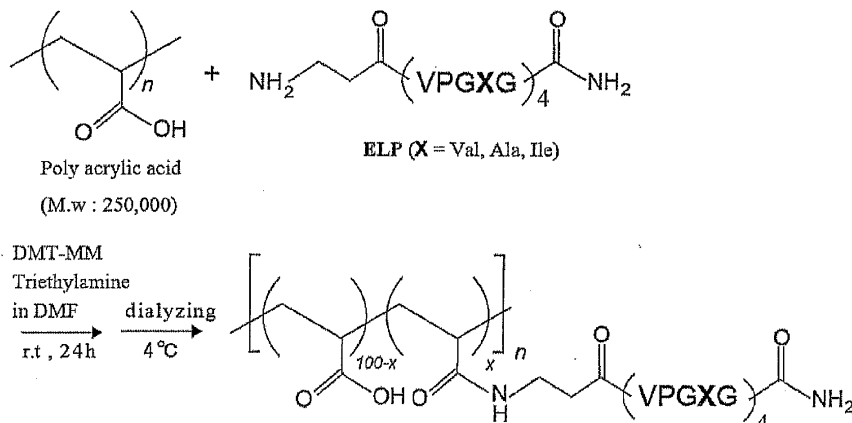
【0059】

〔多重刺激応答型高分子の合成〕

下記合成経路 2 に従い、実施例 1 ~ 5 にかかる多重刺激応答型高分子を合成した。

【0060】

【化 9】



【0061】

< 実施例 1 >

以下に詳述するようにして、上記合成経路 2 に記載の最終生成物において、x = 36、X = Val である実施例 1 の多重刺激応答型高分子を得た。

すなわち、まず、ナスフラスコ内で前記合成例 1 のエラスチン類似ペプチド 0.80 g (0.46 mmol) を DMF に溶解させ、さらに、トリフルオロ塩を除去するためにトリエチルアミン 77 μl (0.576 mmol) を加えた。

ここに、重量平均分子量 25 万のポリアクリル酸 (PAA) 0.083 g (0.00035 mmol) を溶解させた。溶解後、縮合剤として DMT - MM 0.45 g (1.44 mmol) を用いて、DMF 30 ml 中で縮合を行った。縮合は、室温で 24 時間行った。縮合後は、DMF を減圧除去し、超純水に溶解後、蒸留水中 4 下で分画分子量 12000 ~ 14000 の透析膜を用いて透析を行い、未反応のペプチドおよび縮合剤を除去することで精製を行った。精製確認は UV - vis スペクトルにより行った。具体的には、蒸留水を交換する際に透析後の外液を測定し、ペプチドのカルボニル基の - 遷移に

10

20

30

40

50

基づく198nm付近のピークが消失したことから確認した。透析後、目的物の水溶液を凍結乾燥させることで実施例1の多重刺激応答型高分子を得た。この多重刺激応答型高分子について¹H-NMRスペクトルにより構造確認を行いグラフト率 $x = 36(\%)$ と算出した。

【0062】

<実施例2～5>

実施例1において、合成例1のエラスチン類似ペプチドに代えて、合成例2,3のエラスチン類似ペプチドを用いるとともに、各仕込み量を表1に示す量としたこと以外は同様にして、ペプチド鎖の構成アミノ酸残基及びグラフト率が異なる実施例2,3にかかる多重刺激応答型高分子を得た。また、実施例1において、各仕込み量を表1に示す量としたこと以外は同様にして、グラフト率の異なる実施例4,5にかかる多重刺激応答型高分子を得た。

10

【0063】

【表1】

	用いたペプチド	グラフト率 (%)	仕込み量			
			ペプチド (mg)	PAA (mg)	DMM-MM (mg)	TEA (μ l)
実施例1	合成例1 (X=Val)	36	800	83	450	77
実施例2	合成例2 (X=Ile)	30	800	81	440	75
実施例3	合成例3 (X=Ala)	28	800	89	480	83
実施例4	合成例1 (X=Val)	21	800	110	450	77
実施例5	合成例1 (X=Val)	54	800	51	450	77

20

※PAA=ポリアクリル酸 TEA=トリエチルアミン

【0064】

〔物性及び性能の評価〕

<濁度測定による多重刺激応答性の評価>

(濁度の測定方法)

多重刺激応答性の評価は、濁度を測定することにより行い、この濁度測定は日本分光社製J-820型を用いて行った。光路長1cmの石英セルを用いるようにし、また、温度変化は日本分光社製PTC-423L型ペルチェ式恒温装置とLAUDA社製E200を用い、温度勾配1/minで行った。各温度での濁度は700nmの吸光度から求め、濁度が50%変化したときの温度をLCSTと定義した。

30

【0065】

(一定pH下での温度応答性)

実施例1の多重刺激応答型高分子を用い、これを、所定のpHの50mM、 Na_2HPO_4 /クエン酸緩衝溶液に溶解させてサンプル(高分子濃度=1wt%)を調製した。上記方法に従って、一定pH下(pH3.3)での濁度の温度依存性を測定した。同様にして、pH3.9, pH4.2, pH4.9, pH5.4, pH5.9, pH6.4のそれぞれについても測定した。

結果を図1にまとめて示す(図1下図)。

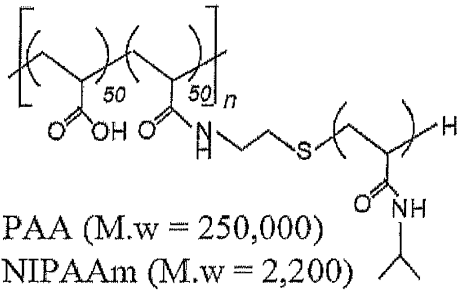
比較のため、従来の多重刺激応答型高分子の温度応答性も併せて図1に示す(図1上図。Allan S. Hoffman, Nature. 373, 49(1995)からの引用)。

40

この従来の多重刺激応答型高分子は、下式に示す構造を有するもので、ポリアクリル酸(重量平均分子量250000)にNIPAAm(重量平均分子量2200)がグラフトしたものである。

【0066】

【化10】



10

【0067】

図1に見るように、本発明の多重刺激応答型高分子は、従来の多重刺激応答型高分子（ $\text{pH} 2.5$ に対し $\text{LCST} = 18$ 程度）と比べて、 pH 変化に対する温度応答性の感度が非常に大きい。

【0068】

次に、第2の側鎖のペプチド構造における構成アミノ酸残基（及びグラフト率）が異なる実施例2, 3の多重刺激応答型高分子、グラフト率が異なる実施例4, 5の多重刺激応答型高分子のそれぞれについても同様にサンプル（高分子濃度 = 1 wt %）を調製し、上記方法に従って、 pH を様々に変えて、一定 pH 下での温度応答性を測定し、 LCST を導出した。これらの結果を、実施例1の結果とともに、図2にまとめた。

20

【0069】

図2に見るように、第2の側鎖のペプチド構造における構成アミノ酸残基やグラフト率を変化させることで、多重刺激応答性を損なうことなく応答域に変化を持たせることができることが分かる。

【0070】

（一定温度下での pH 応答性）

実施例1の多重刺激応答型高分子を用い、上記と同様にしてサンプル調製及び濁度の測定を行い、一定温度下（ $= 35$ ）での pH 応答性を測定した。

結果を図3に示す。

【0071】

図3から、温度を一定として pH を変化させた場合にも、溶解特性を変化させることができることが分かった。なお、 pH を 3.5 から 6.0 に変化させた場合と、 6.0 から 3.5 に変化させた場合とでは、若干の違いが認められた。

30

【0072】

（酵素添加時の刺激応答性の挙動）

本発明の多重刺激応答型高分子が有する第2の側鎖は、エラスチン類似のペプチド構造を含む。この特徴的な構成に基づく特異な挙動について観察した。

すなわち、まず、実施例1の多重刺激応答型高分子を溶解した 50 mM 、 $\text{pH} 4.2$ 、クエン酸 / Na_2HPO_4 緩衝液にパピンを溶解させてサンプル（高分子濃度 = 1 wt %、酵素濃度 = 1 mg/mL ）を得た。このサンプルの濁度を上記方法に従って測定し、その経時変化を 50 （ LCST を超える温度）下で測定した。

40

結果を図4に示す。

【0073】

得られた結果から、 LCST 以上の 50 という温度条件にあって、凝集状態にあった高分子が、酵素（パピン）を添加して5分程度で溶解したことが分かった。

また、上記と同様にして、 5 （ LCST 未満の温度）のサンプル（高分子濃度 = 1 wt %、酵素濃度 = 1 mg/mL ）を調製し、これを 50 （ LCST を超える温度）まで昇温したところ、図5に示すように、もはや凝集が起こることはなかった。

以上の結果から、本発明の多重刺激応答型高分子は、生分解性という従来の多重刺激応答型高分子にない特性を有することが確認できた。このような特性を有することにより、

50

例えば、温度やpHに関係なく、強制的かつ不可逆的に凝集性を失わせることができることが分かる。

【0074】

<立体配座の温度依存性>

上記のごとき本発明の多重刺激応答型高分子における特徴的な挙動が、特に第2の側鎖における特徴的なペプチド構造によってもたらされていることを、円偏光二色性(CD)スペクトル測定により立体配座の温度依存性を測定することにより確認した。

【0075】

このCDスペクトルの測定は日本分光社製J-820型を用い、光路長0.1cmの石英セルを用いて、積算回数4回、走査速度100nm/minで行った。

具体的には、測定対象となる各高分子をそれぞれ5mM、pH6.4、Na₂HPO₄/クエン酸緩衝溶液に溶解させ、ストック溶液とした。ストック溶液を緩衝溶液で希釈することでpH6.4のサンプル溶液の調製を行った。これらのサンプル溶液について、島津製作所製UV-2100分光光度計を用いて光路長1mmの石英セルでUV-visスペクトル測定を行い、198nm付近のペプチド結合に基づく吸収を測定することにより濃度を決定した(高分子濃度=40μM)。温度を変えてCDスペクトルの測定を行う際には、日本分光社製PTC-423L型ペルチェ式恒温装置とLAUDA社製E200を用い、温度勾配1/minで昇温するとともに、その温度に達してから50秒後に測定を行うようにした。

【0076】

上述のようにして測定した実施例1の多重刺激応答型高分子のCDスペクトルを図6に示す。

また、実施例1~5の多重刺激応答型高分子について、波長198nmでの温度ごとの測定値をプロットしたグラフを図7に示す。

【0077】

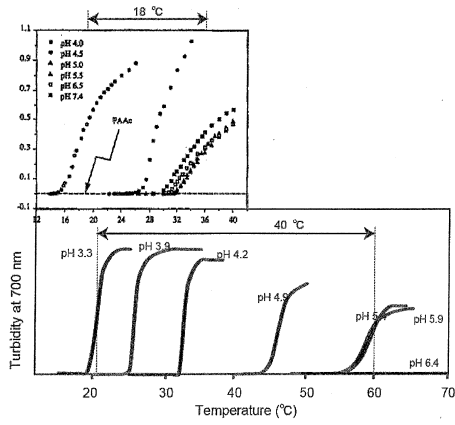
図6,7に示す結果から、本発明の多重刺激応答型高分子においては、外部温度に依存して、可逆的にランダムコイルと α -ターンの2つの立体配座をとることが分かり、これが第1の側鎖に基づくpH応答性と相俟って特徴的な多重刺激応答性を発現していることが分かる。上記実施例1~5における前記立体配座の可逆的变化は、第2の側鎖におけるペプチド構造のバリン残基とXの各アミノ酸側鎖間の相互作用によるものであるから、これらバリン残基とXの種類を様々に変更することにより、多重刺激応答性を高い自由度で制御できることが実証された。

【産業上の利用可能性】

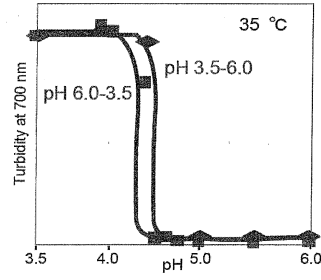
【0078】

本発明にかかる多重刺激応答型高分子及びその製造方法は、特にDDSや細胞足場材などの生体材料に好適に利用することができる。

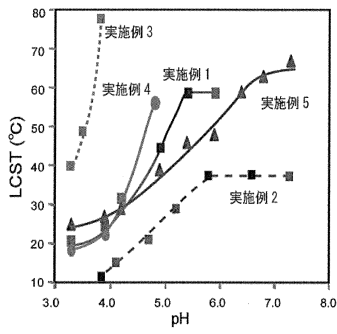
【 1 】



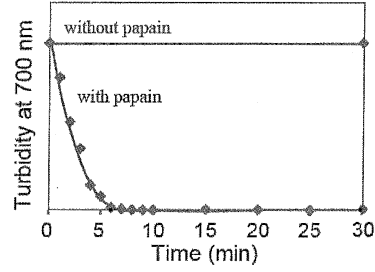
【 3 】



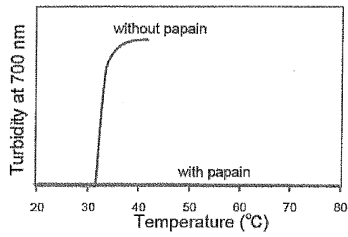
【 2 】



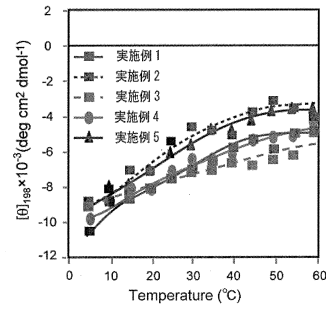
【 4 】



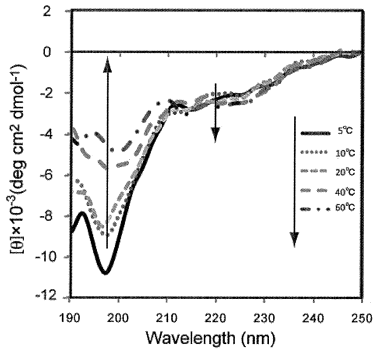
【 5 】



【 7 】



【 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 松尾 祐作
京都府京田辺市多々羅都谷1 - 3 同志社大学内

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 特開2002 - 256075 (JP, A)
特開2012 - 232961 (JP, A)
深見史郎, ほか, elastin類似ペプチドをグラフト鎖に有する新規刺激応答性高分子の合成とその特性, 日本化学会講演予稿集, 2009年 3月13日, Vol. 89, No. 1, p. 165, 4 D1-20
Colloids Surf B Biointerfaces, 2011, Vol. 85, No. 1, pp. 12-18

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C08F 8/32

C08F 20/06

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)