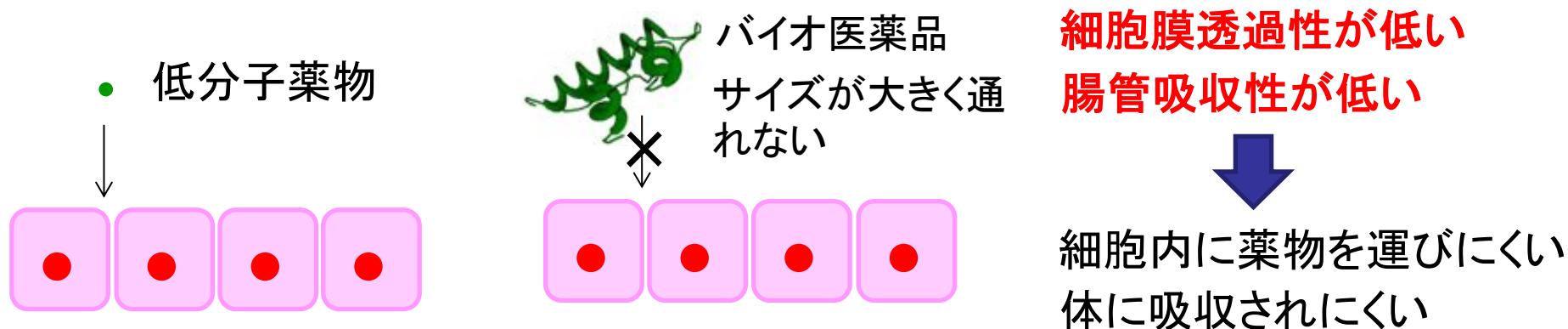


細胞膜透過性ペプチドを模倣した グアニジル化キトサン

鳥取大学 工学部 化学バイオ系学科
准教授 井澤 浩則

令和3年3月2日

バイオ医薬品の問題点



細胞膜透過性ペプチド(CPP)

RRRRRRRRRR

GRKKRRQRRRPPQ

RQIKIWFQNRRMKWKK

Oligoarginine (R9)

HIV-TAT

Penetratin

RRWWRRWRR

LLIILRRRIRKQAHASK

MVTVLFRRRLRIRACGPPRVRV

R6/W3

pVEC

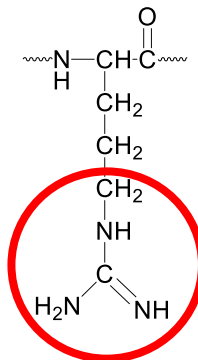
M918

塩基性 K, R, H

酸性 D, E

非極性 A, V, L, I, M, F, W, P

極性 G, S, T, C, Y, N, Q



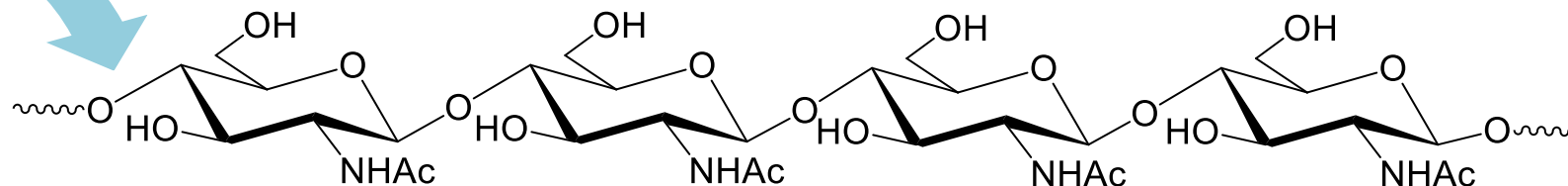
アルギニン(R)リッチCPPでは、アルギニンのグアニジノ基が細胞膜透過性に寄与することが明らかになっている。

T. Takeuchi, S. Futaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 1431-1437, (2016).

キトサン

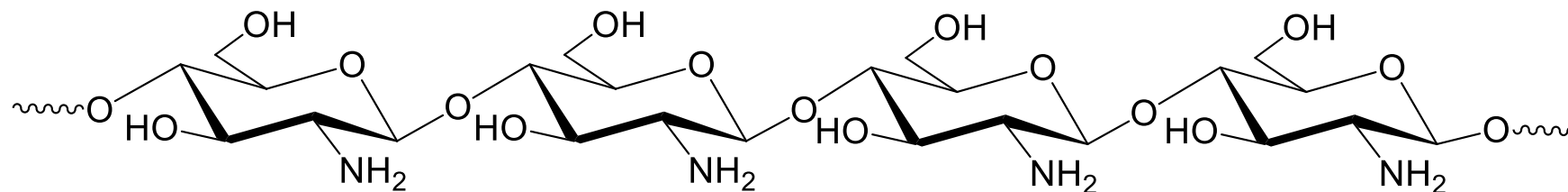


精製



キチン

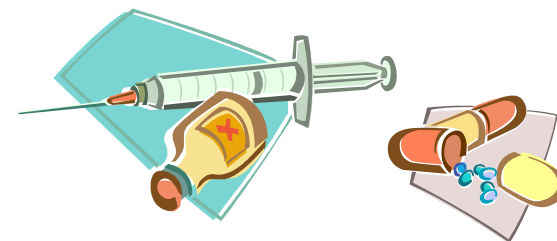
アルカリ処理



キトサン(CS)

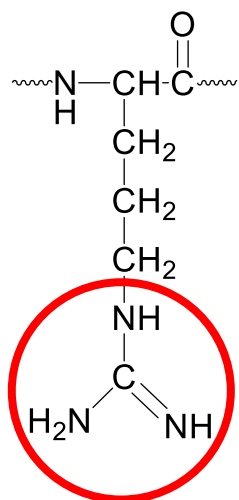
利点

- ・細胞膜透過性の向上
- ・生体適合性、生体分解性
- ・アミノ基の反応性

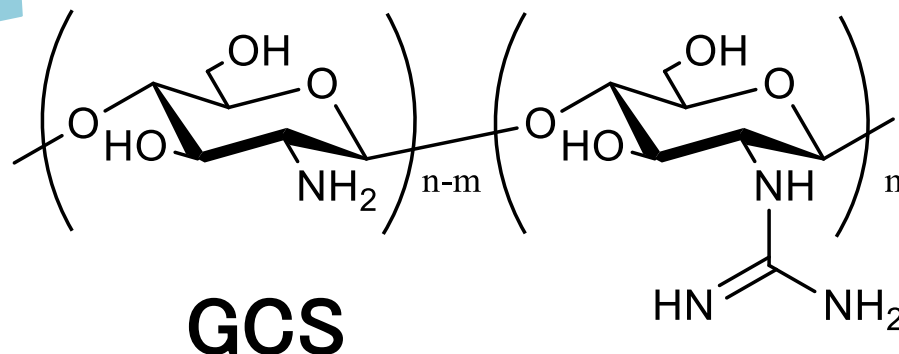


医薬品用添加剤に開発に有効な素材

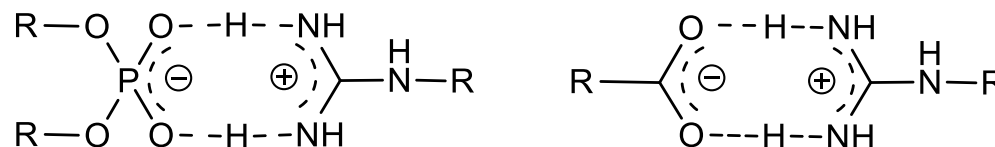
グアニジル化キトサン (GCS)



グアニジノ基

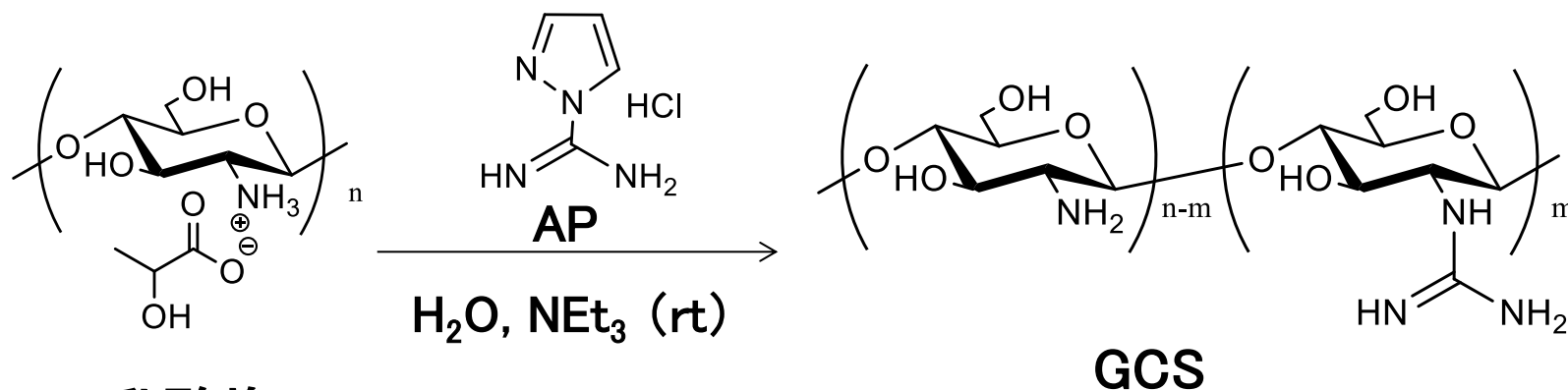


- ・細胞膜透過性の向上
- ・中性域でも正に帯電 (pKa = 12.5)
→ 中性域での溶解性・分散性の向上
- ・リン酸やカルボン酸と強くイオン結合



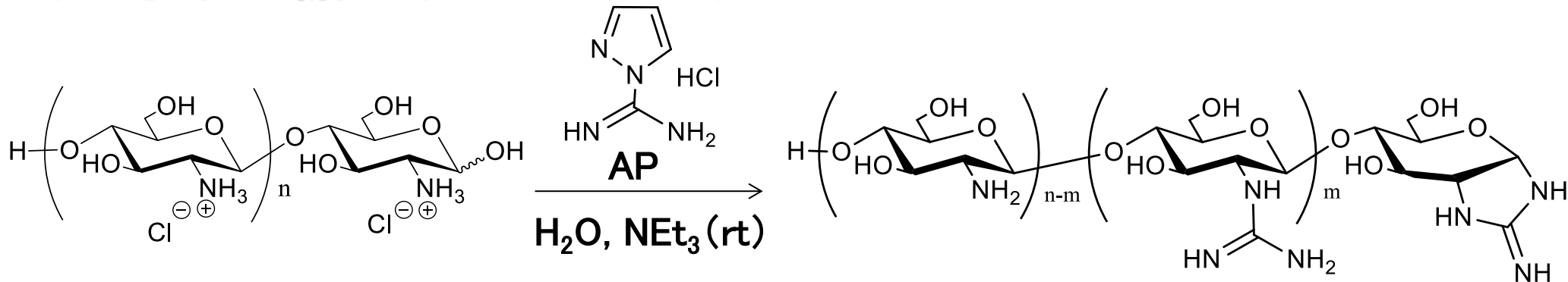
CSをグアニジル化すれば、CSの細胞膜透過性を強化できる？

キトサンのグアニジル化



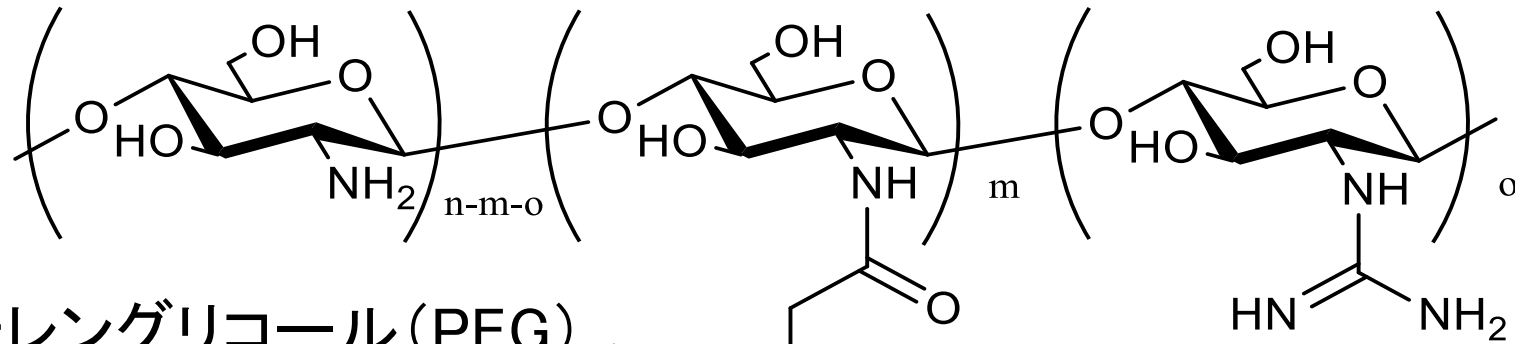
H. Izawa, M. Kinai et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 125, 901–905 (2019).

キトオリゴ糖のグアニジル化



H. Izawa, M. Kinai et al., *Biomolecules.*, 9, 259–268 (2019).

グアニジル化PEGグラフトキトサン

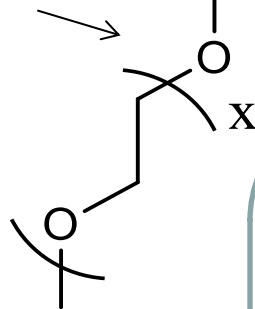


ポリエチレングリコール (PEG)

PEG化ユニット

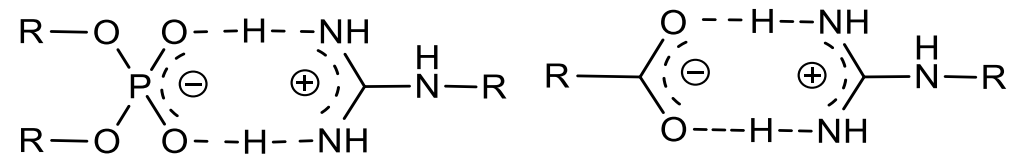
- ・中性の親水性基
(分散性・安定性の向上)
- ・生体内でのステルス効果
(RES回避機能)

M. L. Immordino et al., *Int. J. Nanomedicine*, 1, 297-315 (2006).



グアニジル化ユニット

- ・中性域でも正に帯電 (pKa = 12.5)
→ 中性域での溶解性・分散性の向上
- ・リン酸やカルボン酸と強くイオン結合



- ・細胞膜透過性の向上

R. Mogaki et al., *Chem. Soc. Rev.*, 46, 6480-6491 (2017).

グアニジル化PEGグラフトキトサン (PEG-GCS)

発明者: 井澤浩則、齋本博之、発明の名称: グアニジル化ポリエチレングリコールグラフトキトサン及びそれを含む医薬用キャリア、特願2019-084140 (2019/04/25出願)。

1. GCS及びPEG-GCSの合成

2. GCS及びPEG-GCSのHeLa細胞への
取り込み挙動

3. GCSのBSAとの複合化

4. GCS及びPEG-GCSのオリゴDNAとの複合化

GCSの報告例

一段階反応

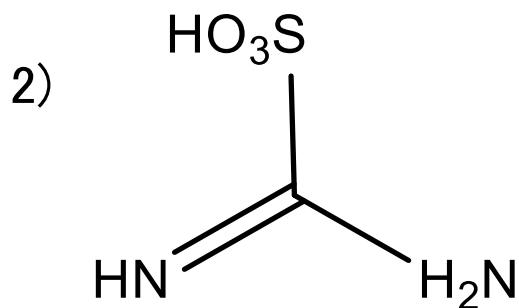
Guanidylating reagent



シアナミド

導入率(14%)が**低い**

1) Xinyun Zhai et al, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011, 121, 3569–3578

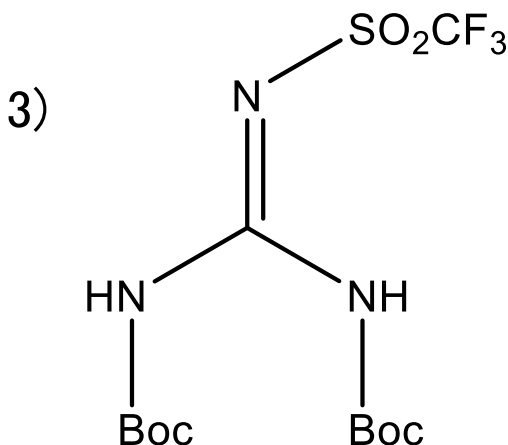


ホルムアミジンスルホン酸

導入率は比較的高い(30%)が、**市販**されていない。

2) Ying Hu et al, *Carbohydr. Polym.*, 2007, 67, 66–72

多段階反応



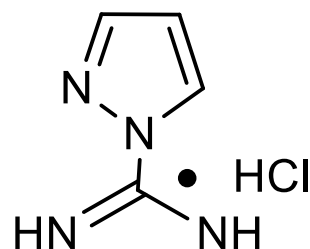
多段階でのキトサンの保護・脱保護が必要

高価(5g, 111,000円)

1,3-ビス(tert-ブトキシカルボニル)-2-(トリフルオロメタンスルホニル)グアニジン

3) Priyanka sahariah et al, *Carbohydr. Polym.*, 2015, 127, 407–417

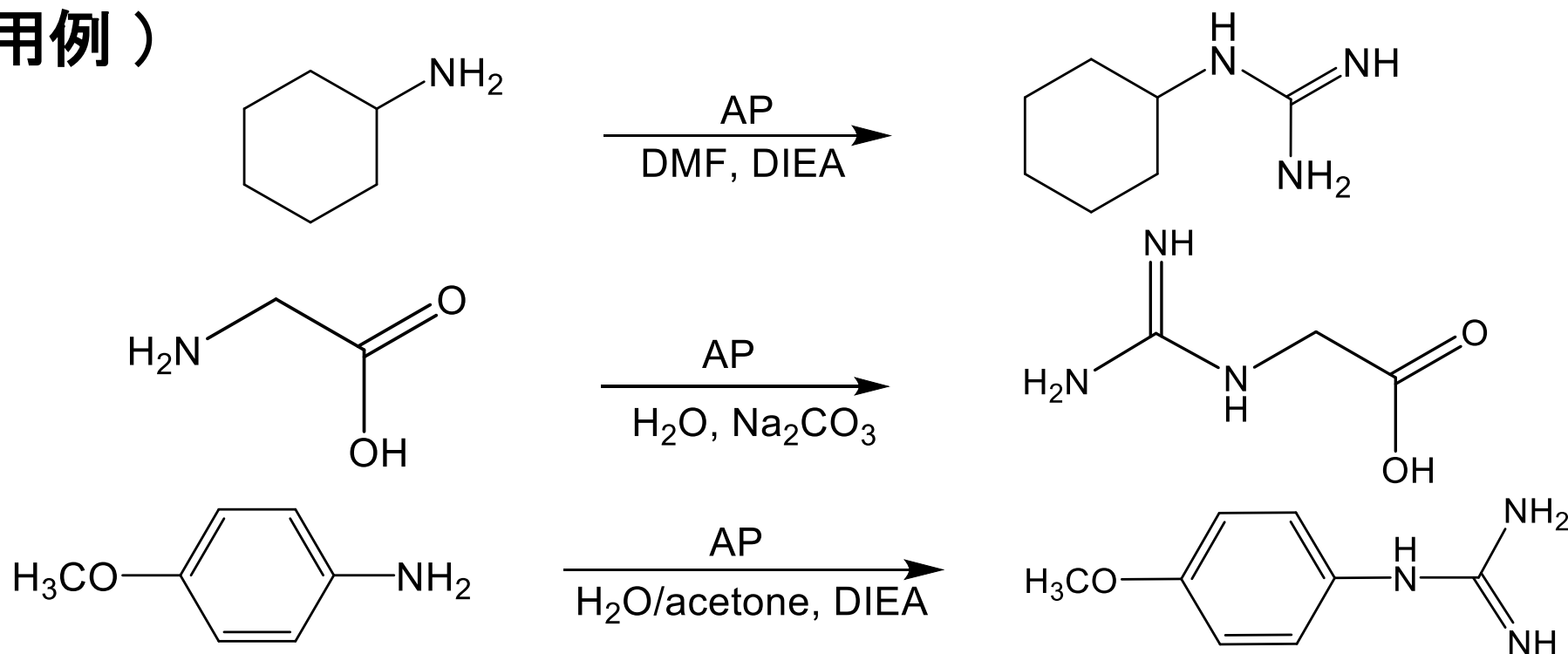
1-アミジノピラゾール塩酸塩



1-Amidinopyrazole Hydrochloride (AP)

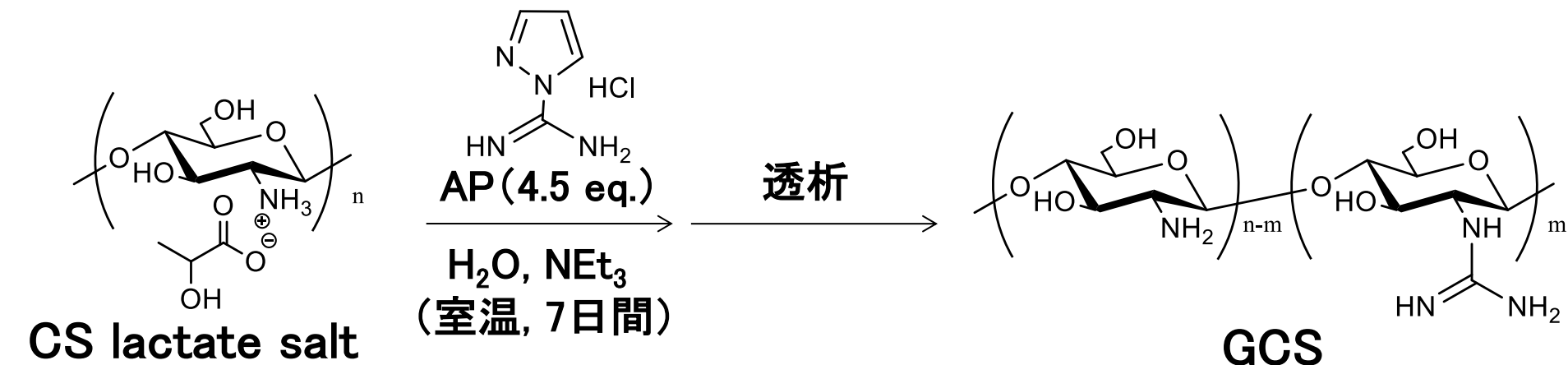
安価な Guanidyl 化試薬
25 g, 9400円 (東京化成)

試薬使用例)



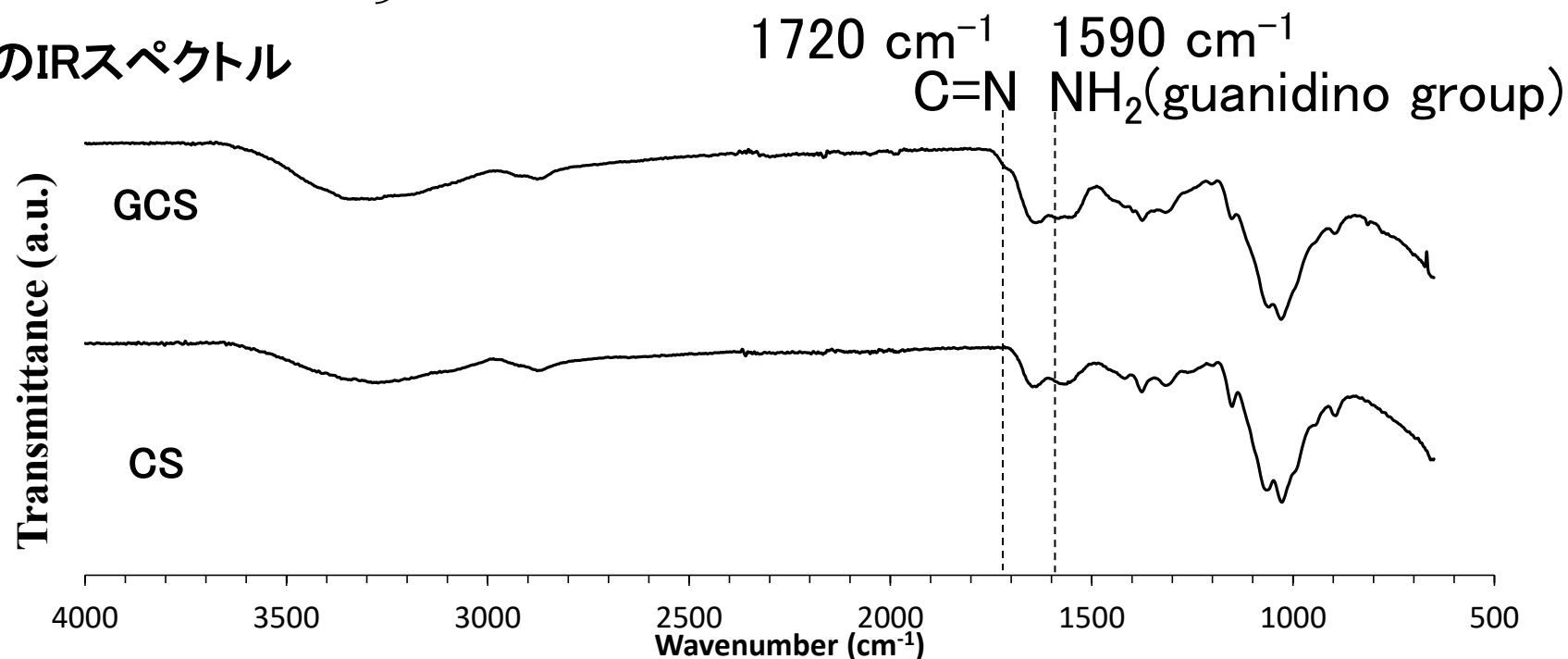
Michael S. Bernatowicz et al, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2497–2502.

APを用いるCSのグアニジル化

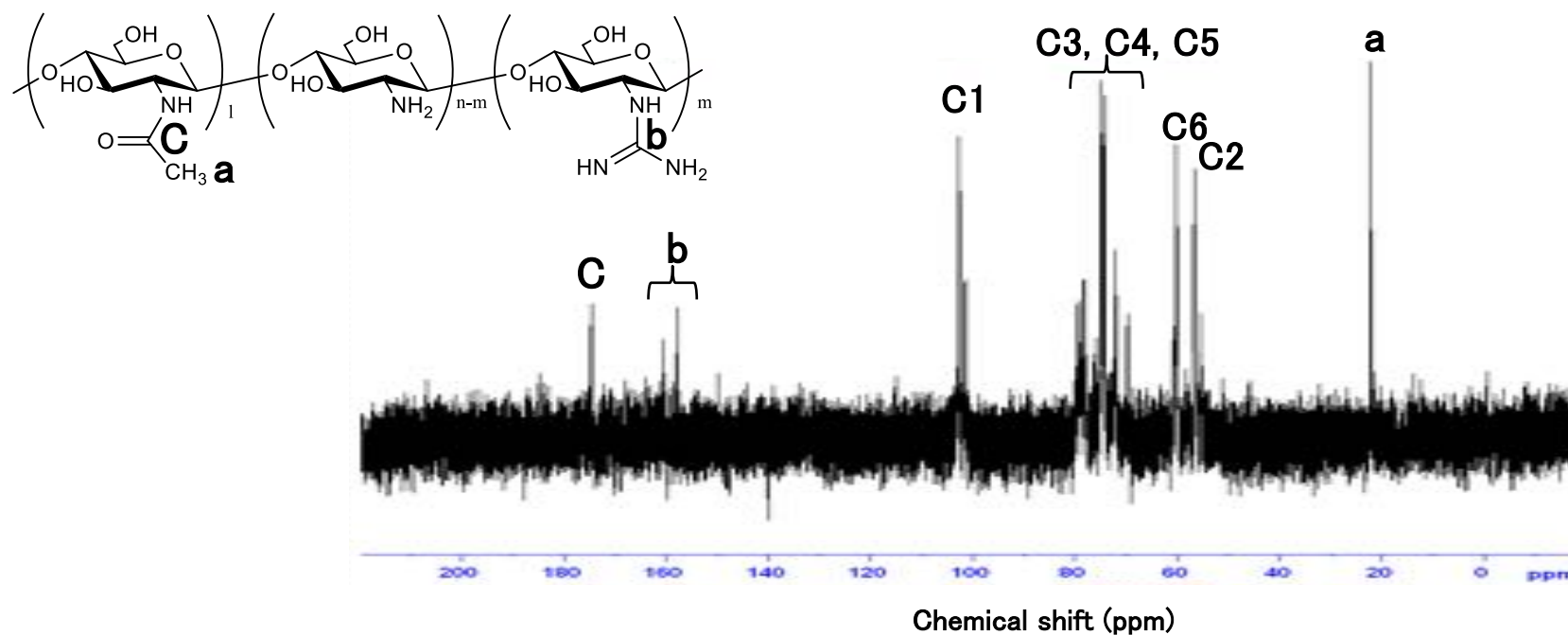
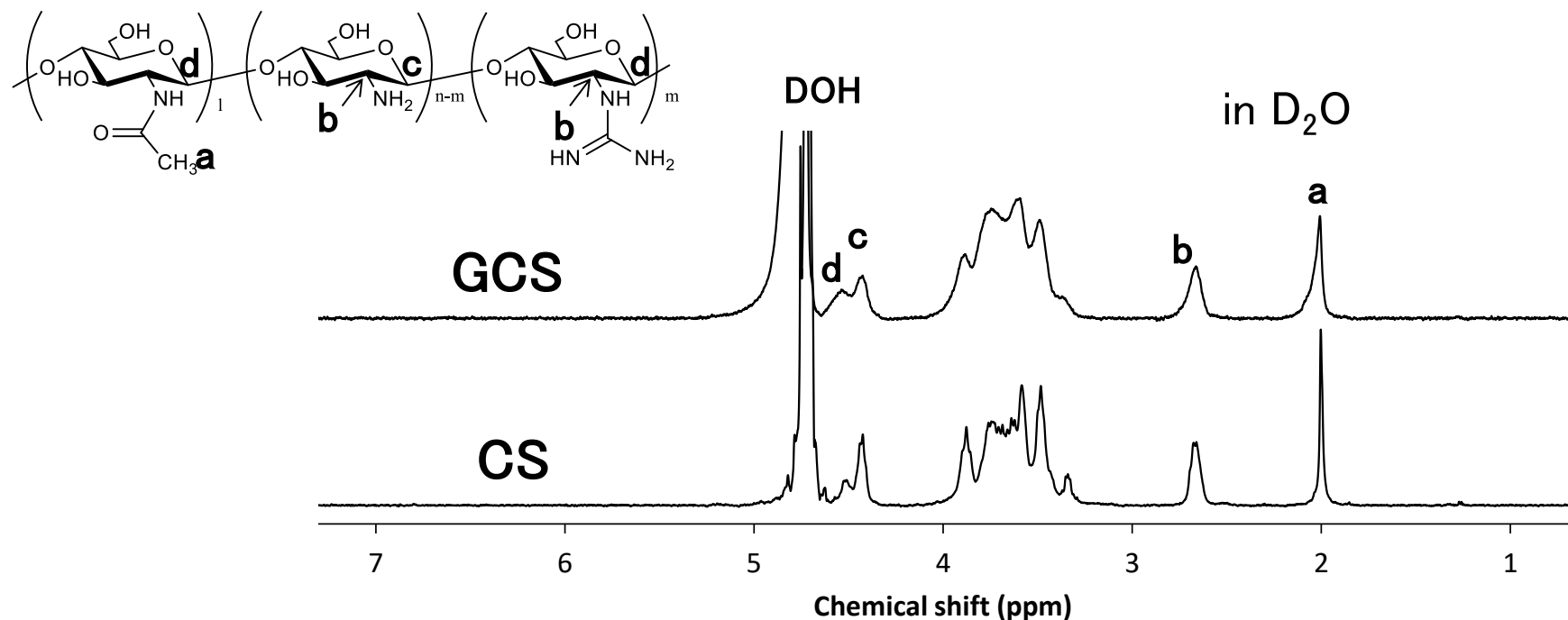


DDA; 68.8%
M_n; 7600 (M_w/M_n=1.47)

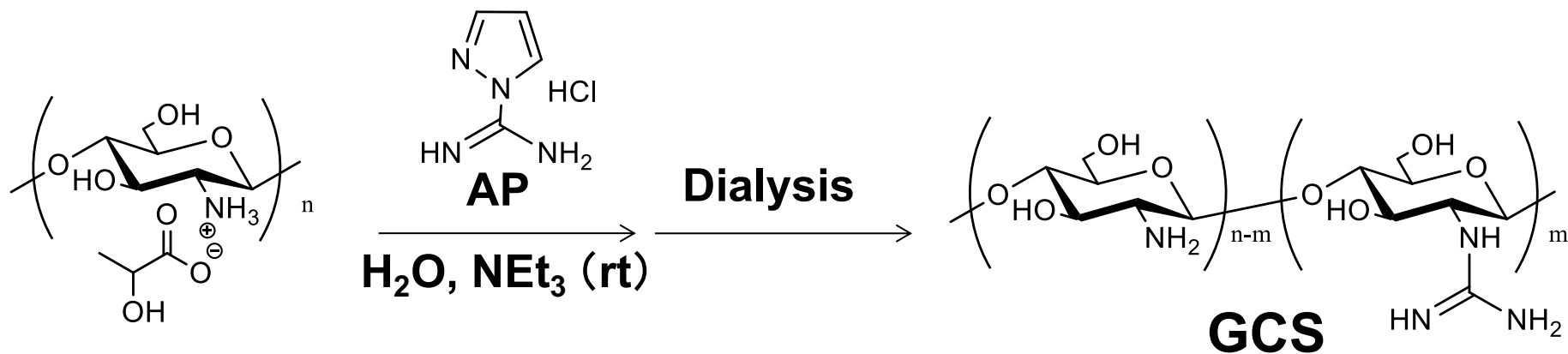
生成物のIRスペクトル



GCSの¹H NMR及び¹³C スペクトル



様々な条件下でのGCSの合成



CS lactate salt

Degree of Guanidinylation

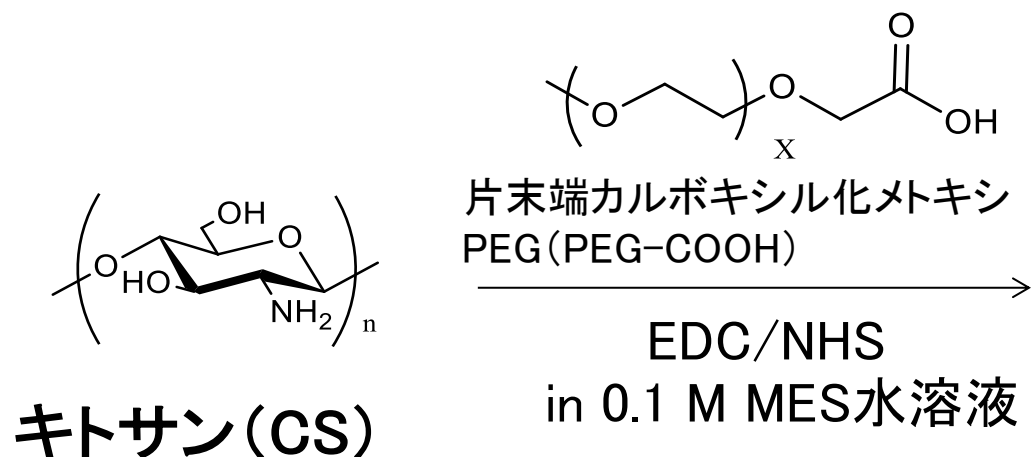
Entry	CS (g)	CS unit (mmol)	AP (mmol)	NEt ₃ (mmol)	Reaction time (day)	DG ^a (%)	Yield ^b (%)
1	1.0	4.0	6.1	0	7	2.3	23.7
2	1.0	4.0	6.1	16.5	1	9.6	40.3
3	1.0	4.0	6.1	16.5	7	25.6	49.3
4	1.0	4.0	18.3	33.0	1	12.2	49.0
5	1.0	4.0	18.3	33.0	7	42.3	55.3

^a Estimated as follows: (GCS unit determined from elemental (mol)/total units (mol) in CS)x100.

^b Estimated as follows: (yield of GCS (g)/theoretical yield (g) when CS is perfectly converted to GCS)x100.

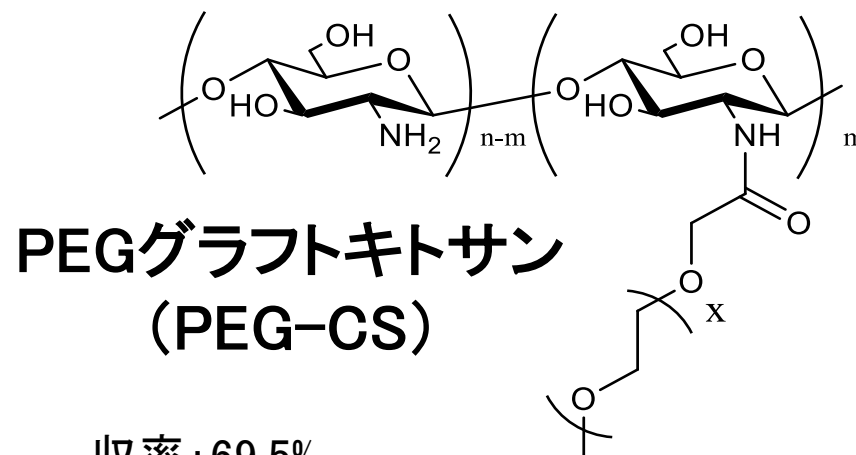
(高分子量CSでも同程度のDGのGCSが得られる)

PEG-GCSの合成



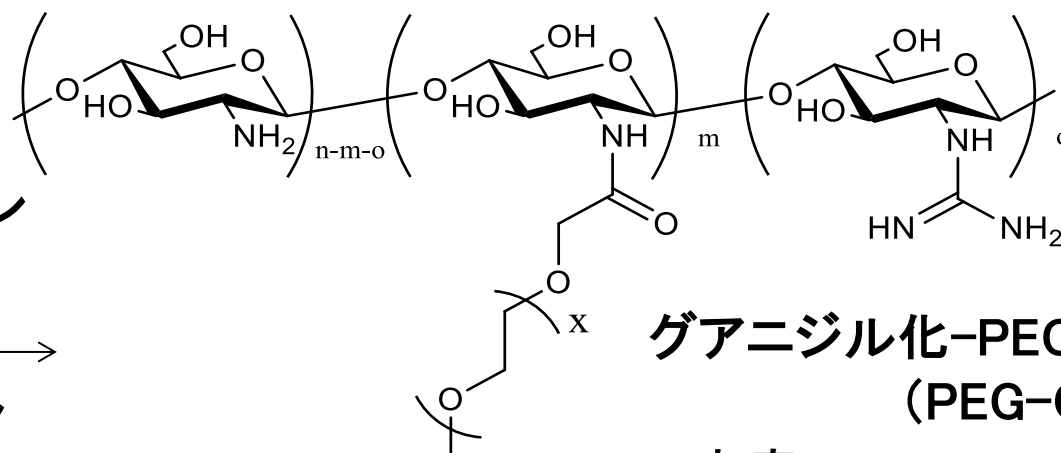
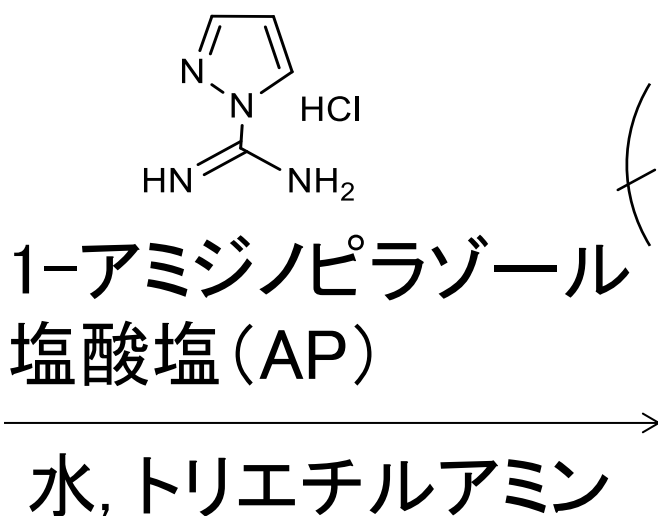
キトサン(CS)

$M_n (M_n/M_w) = 7.6 \times 10^3 (1.5)$
脱アセチル化度68.8%



PEGグラフトキトサン
(PEG-CS)

収率: 69.5%
導入率: 11.3
 $M_n (M_n/M_w) = 5.6 \times 10^4 (2.2)$



グアニジル化-PEGグラフトキトサン
(PEG-GCS)

収率: 93.8%
導入率: 39.0(元素分析)
 $M_n (M_n/M_w) = 4.5 \times 10^4 (1.6)$

1. GCS及びPEG-GCSの合成

**2. GCS及びPEG-GCSのHeLa細胞への
取り込み挙動**

3. GCSのBSAとの複合化

4. GCS及びPEG-GCSのオリゴDNAとの複合化

HeLa細胞の播種

37°C、CO₂5 %、24時間

培地除去、Hank's平衡塩溶液(HBSS)で洗淨

TM(CS溶液含有)を加え、2時間静置(37°C、CO₂5 %)

TMを除去し、リン酸緩衝塩水(PBS)で洗淨

TMの添加

CLSM観察

Transport Medium(TM)

グルコース

HEPES

NaHCO₃

HBSS(10×)

+

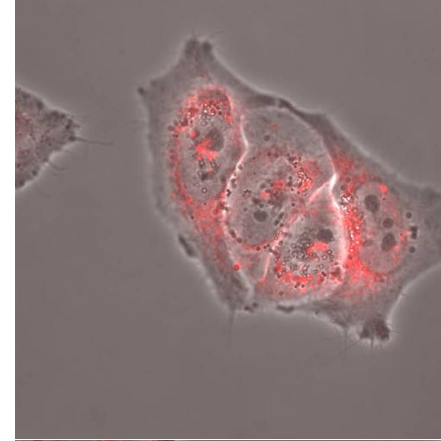
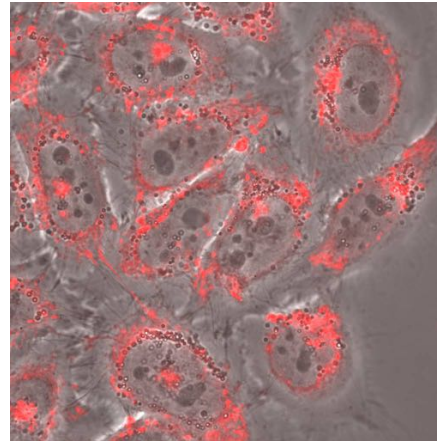
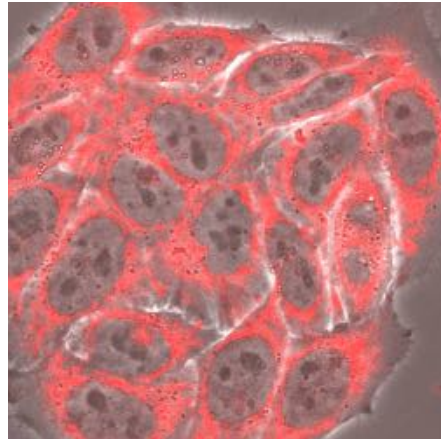
CS or GCS or PEG-GCS
(ローダミンBでラベル化)

CS

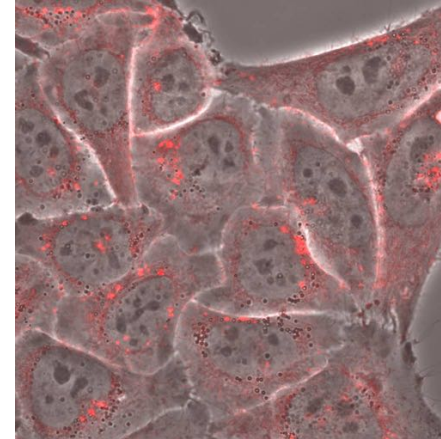
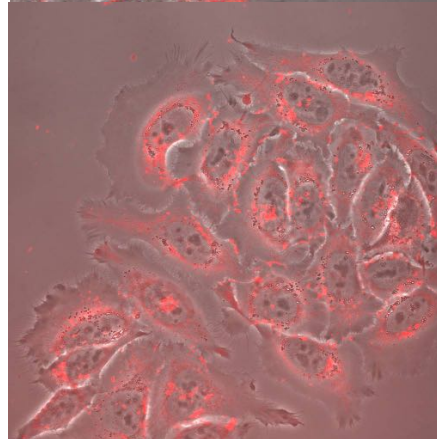
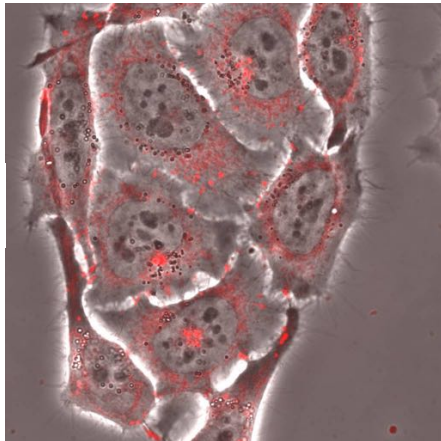
GCS

PEG-GCS

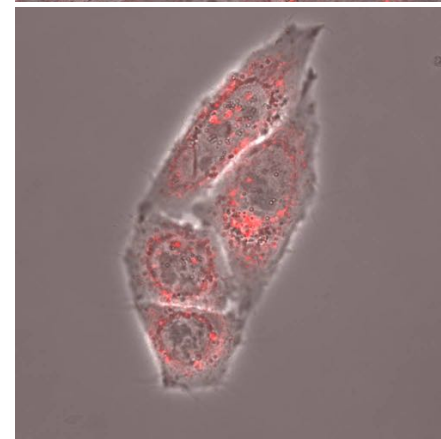
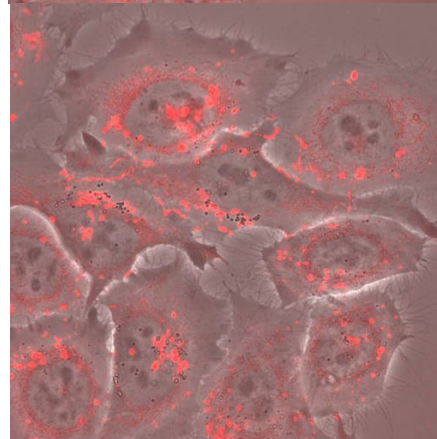
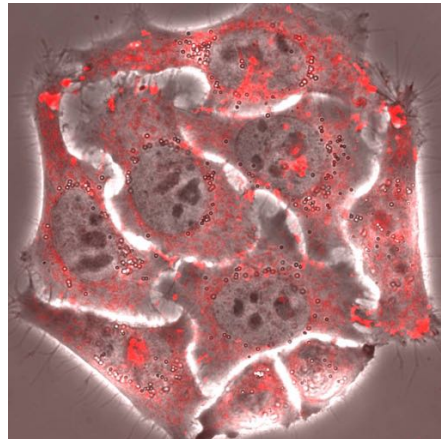
0.25 mg/mL



0.125 mg/mL

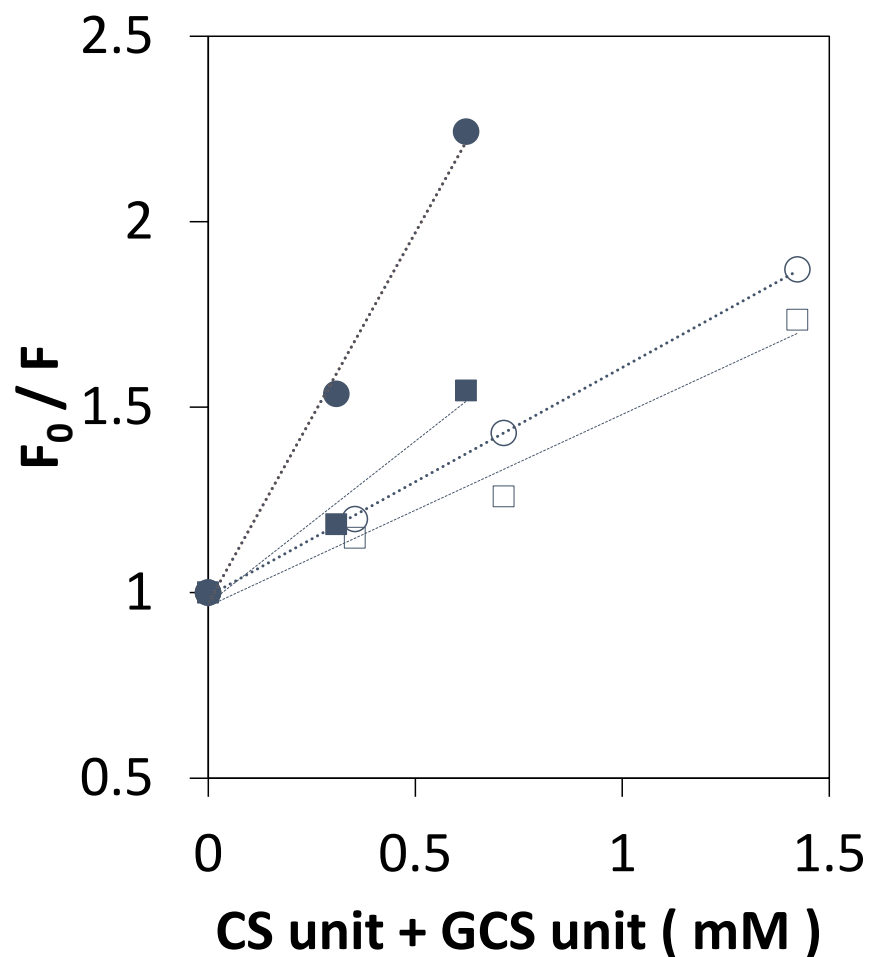


0.05 mg/mL



1. GCS及びPEG-GCSの合成
2. GCS及びPEG-GCSのHeLa細胞への取り込み挙動
- 3. GCSのBSAとの複合化**
4. GCS及びPEG-GCSのオリゴDNAとの複合化

BSAとCS及びGCSの結合定数



Acetate buffer (pH 3.6)

□ CS-BSA system ($K = 517 \text{ M}^{-1}$)

○ GCS-BSA system ($K = 875 \text{ M}^{-1}$)

Tris-HCl buffer (pH 7.4)

■ CS-BSA system ($K = 616 \text{ M}^{-1}$)

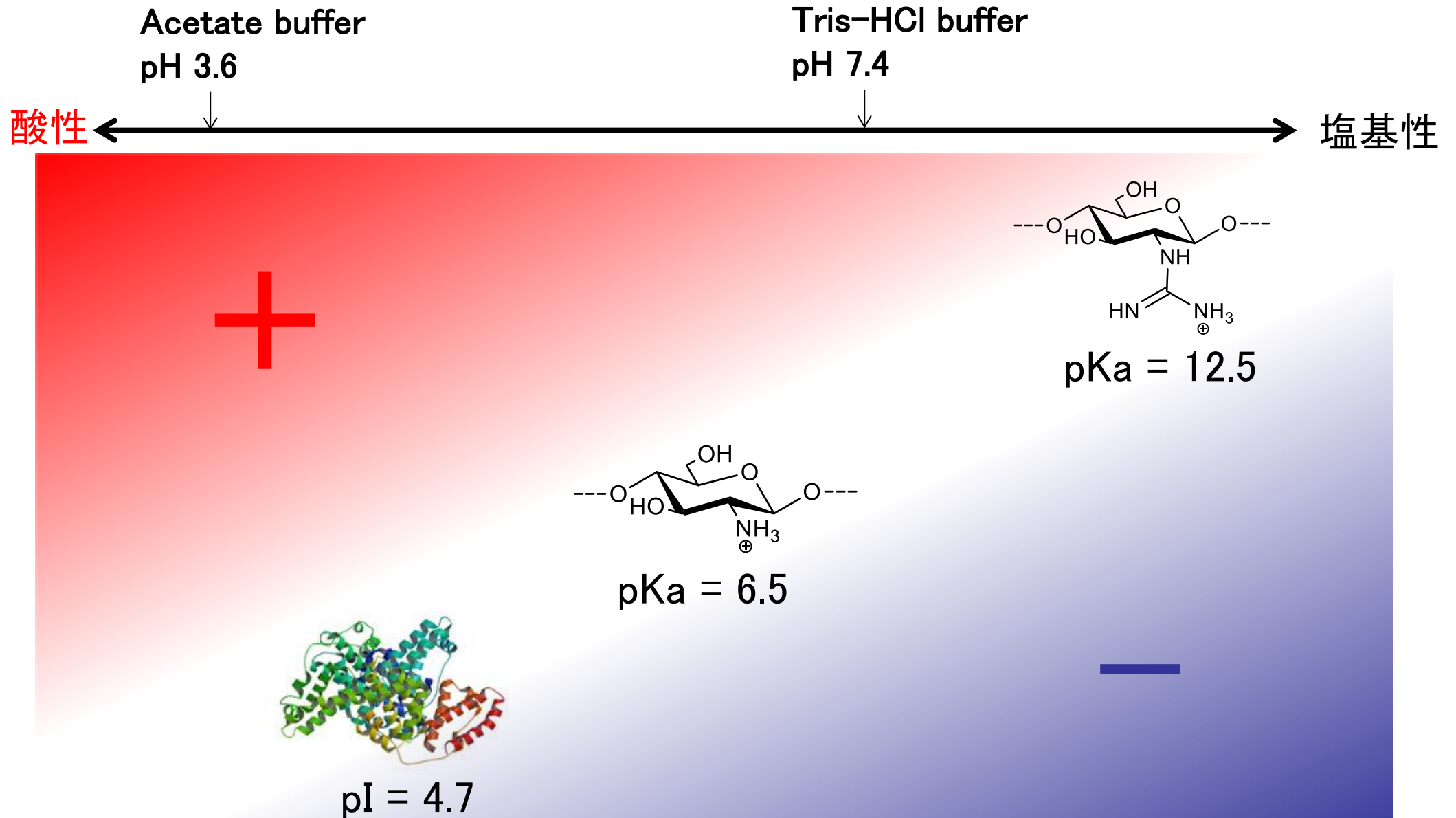
● GCS-BSA system ($K = 1955 \text{ M}^{-1}$)

Stern-Volmer plot

$$\frac{F_0}{F} = K \cdot [\text{CS unit} + \text{GCS unit}] + 1$$

Stern-Volmer plots of the CS-BSA and GCS-BSA systems in 0.1 acetate buffer (pH 3.6) (○ and □, respectively) or 0.1 Tris-HCl buffer (pH 7.4) (● or ■, respectively)

結合の強さと電荷の関係



1. GCS及びPEG-GCSの合成
2. GCS及びPEG-GCSのHeLa細胞への取り込み挙動
3. GCSのBSAとの複合化
4. **GCS及びPEG-GCSのオリゴDNAとの複合化**

水中でのdA₂₁との複合体形成

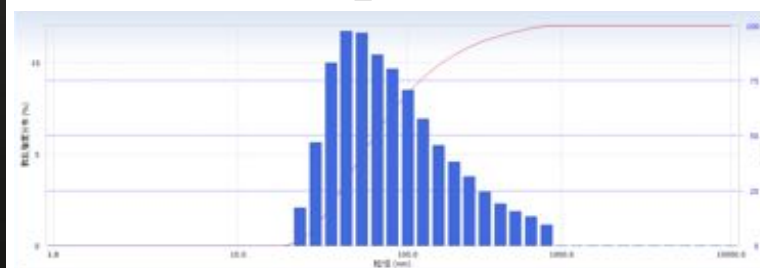
一本鎖オリゴDNA(デオキシアデノシン-リン酸の21量体:dA₂₁)を用いて複合体形成挙動を観察した。

CS, GCS, PEG-CS, 及びPEG-GCS (Sample 1)とdA₂₁を超純水中で混合し、得られた水溶液の写真



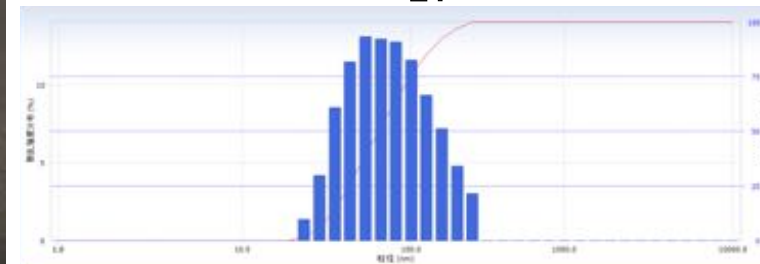
CS/dA₂₁ GCS/dA₂₁ PEG-CS/dA₂₁ PEG-GCS/dA₂₁
(CS主鎖の総ユニット数/dA₂₁の総ユニット数 = 1)

PEG-CS/dA₂₁



平均粒径: 90.6 nm

PEG-GCS/dA₂₁



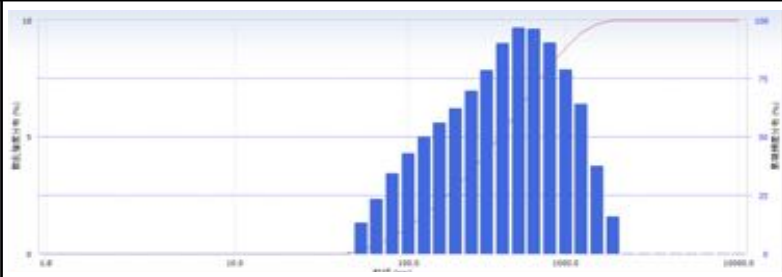
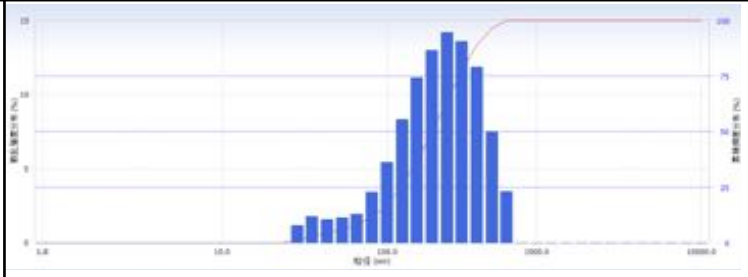
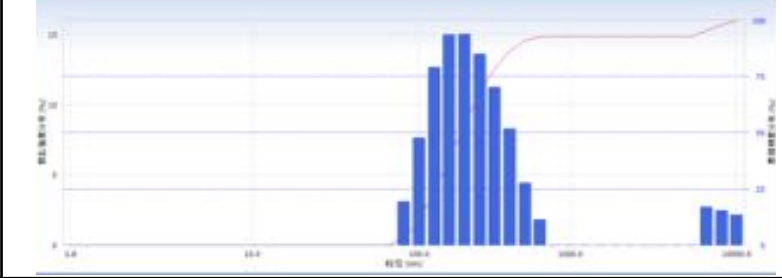
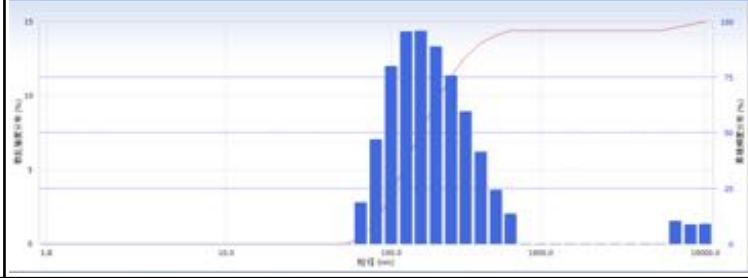
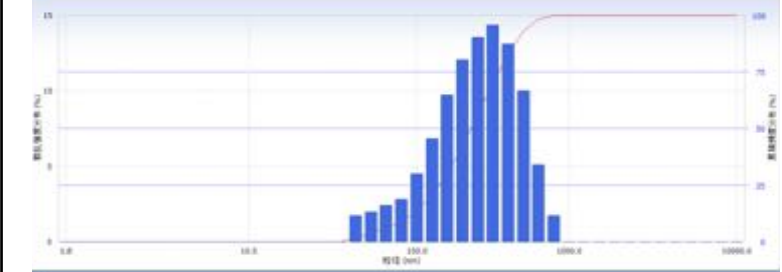
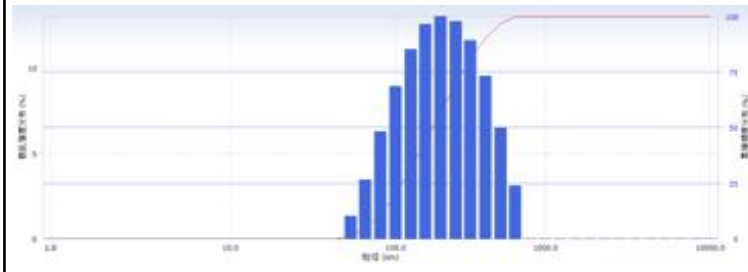
平均粒径: 80.7 nm

CSとGCSでは白濁する→過凝集したマクロな複合体が析出する

PEG-CS及びPEG-GCSでは透明なまま→PEGによって過凝集が抑制されている

酸性条件でのPEG-GCSとdA₂₁との複合体形成

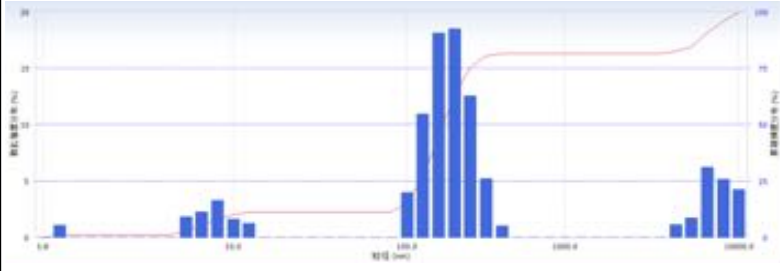
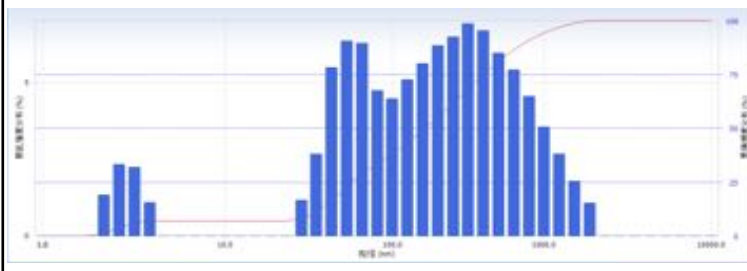
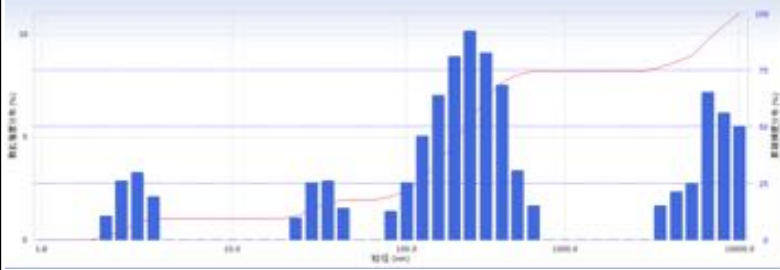
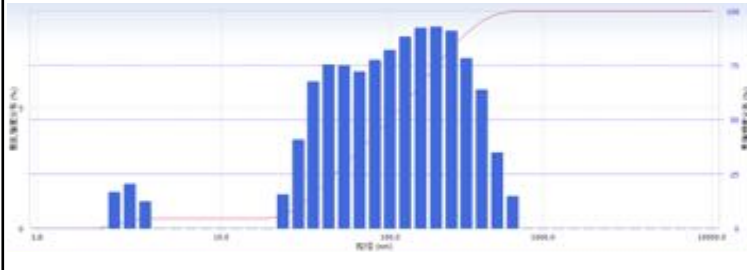
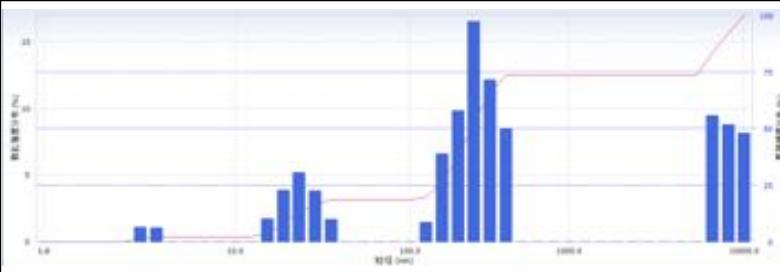
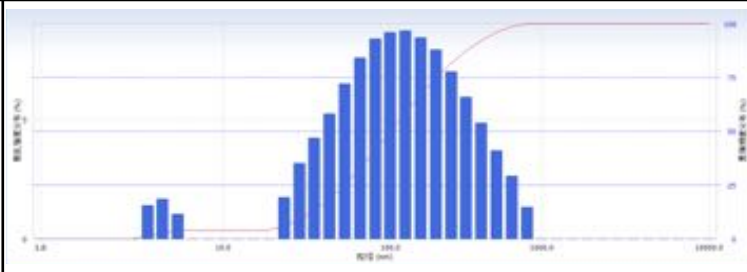
0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中での複合体の粒径分布をDLSにて測定した。

ユニット比	PEG-CS/dA ₂₁	平均粒径 (nm)	PEG-GCS/dA ₂₁	平均粒径 (nm)
1		312.4		199.9
3		223.3		188.2
5		220.8		190.8

ユニット比 = CS主鎖の総ユニット数 (mol) / dA₂₁の総ユニット数 (mol)

中性条件でのPEG-GCSとdA₂₁との複合体形成

トリス緩衝塩水 (pH 7.4, 25 mmol/L-Tris, 0.137 mmol/L-NaCl, 2.68 mmol/L-KCl) 中での複合体の粒径分布を測定した。

ユニット比	PEG-CS/dA ₂₁	平均粒径 (nm)	PEG-GCS/dA ₂₁	平均粒径 (nm)
1		232.2		152.0
3		321.3		102.6
5		331.6		105.9

従来技術とその問題点

キトサンの問題点

- ・通常のキトサンは酸性条件にしか溶解しない。
- ・未修飾のキトサンでは機能が不十分
- ・化学修飾で上記問題点は解決可能であるが、生産性・コストの面で実用的なものは無い。

新技術の特徴・従来技術との比較

- キトサンよりも中性域で溶解しやすい
- 大量合成が可能(10 g程度のサンプル提供の実績があります。)
- GCSは、細胞の核に移行しやすい
- GCSは、タンパク質との結合定数が3倍高い
- 用途に応じて置換基の導入も可能
- PEG-GCSは中性域でのオリゴDNAとのナノ複合体形成に効果的

想定される用途

- バイオ医薬品（中、高分子量医薬品）の吸収促進を目的とした医薬品添加剤
- その他、DDS用素材
- 遺伝子デリバリー用人工ベクター
- 生体接着剤用素材
- バイオマテリアル用素材

実用化に向けた課題

- グアニジル化の反応時間が長い。
- 応用展開に向けた機能検証が実施できていない。

企業への期待

- 応用展開に向けた明確なビジョンと技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、遺伝子デリバリーを開発中の企業、経口製剤分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称： グアニジル化ポリエチレン
グリコールグラフトキトサン
及びそれを含む医薬用
キャリア
- 出願番号： 特願2019-84140
- 出願人： 国立大学法人鳥取大学
- 発明者： 井澤 浩則、齋本 博之

お問い合わせ先

国立大学法人鳥取大学 研究推進機構

TEL: 0857-31-5703

FAX: 0857-31-5571

e-mail: sangakucd@ml.cjrd.tottori-u.ac.jp