



〔原著論文〕

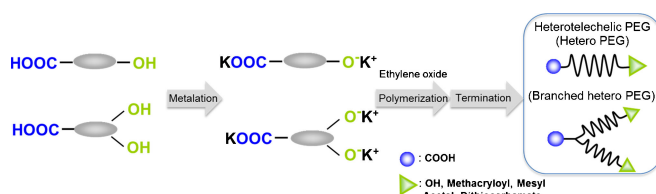
カルボキシル基を α 末端に有するヘテロテレケリックポリエチレングリコールの合成

飯島 道弘*¹・河田 麻衣子*¹・佐藤 憂菜*¹
 プア ミンリー*¹・亀山 雅之*¹

(受付 2019 年 1 月 30 日・審査終了 2019 年 4 月 13 日)

(早期公開 2019 年 6 月 4 日・DOI:10.1295/koron.2019-0006)

要 旨 カルボキシル基を α 末端に有するヘテロテレケリックポリエチレングリコール(ヘテロ PEG)の精密合成法を検討した。カルボキシル基とヒドロキシ基を分子内に有するヒドロキシピバル酸を出発物質として用いた。カリウムナフタレン溶液にヒドロキシピバル酸溶液を滴下することで生成するカルボン酸塩を微分散させ、エチレンオキシドをアニオン開環重合することにより、定量的にヘテロ PEG を合成できることを明らかにした。また、 ω 末端に重合基を導入したマクロモノマーの定量的な合成にも成功した。さらに、この合成法を利用し、 α 末端に一つのカルボキシル基を有し、二つの PEG 鎖を有する分岐型ヘテロ PEG の合成方法も確立した。このような α 末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG の定量的合成法の確立は、高機能性材料を創製するためにも有用である。



1 緒 言

近年、科学技術の進歩に伴い、材料開発における機能も多様化している。このような材料の高機能化を可能にするものとして、多様な性質を制御できる多成分系高分子が注目されている。多成分系高分子とは、複数の高分子鎖を分子内に有する高分子であり、導入する高分子鎖の種類や並び方、形状により機能を多様に変化させることができるもので、ブロックポリマーやグラフトポリマーなどがある。このような多成分化を可能にするためには、ポリマー末端の官能基や分子量の精密な制御が重要である。このような精密制御された機能性高分子が注目されている分野として、医療用、薬学用材料の分野があげられる¹⁾。

医療用材料には、生体機能の代行・制御のための材料と新しい診断・治療システムを支える素材群となり一時的に生体機能を補助する材料などがある。これらは、免疫工学や細胞工学といった関連分野へも展開され、人工臓器、検査診断、薬物・遺伝子治療、再生医療などで幅広く用いられている。このような生体に接触するバイオマテリアル(生体材料)に展開できる材料としても、高

分子材料が非常に大きな役割を担っている²⁾。その理由として、高分子材料は、他材料と比較して多様な化学的・物理的特長をもつ材料を容易に設計できること、安価で軽量であることに加えて種々の複雑な形状に形成・加工できるところから幅広い分野に応用しやすいためと考えられている。最近では、とくにナノレベルでの構造制御が注目されており、精密な分子設計による一次構造制御から分子間相互作用による高次構造制御までの精密な材料設計技術が求められている³⁾。

バイオマテリアルとしては、対象が生体であるために、機能性、非毒性、可滅菌性、機械的強度、生体適合性(生体親和性)など多様な性質が求められている。ここで、生体適合性とは、非毒性とは異なる性質であり、バルク的な適合性、界面的な適合性と大別されている。現在では、高分子材料は、縫合糸、人工臓器、人口血管、コンタクトレンズ、歯科用樹脂などに広く利用されている。このような生体適合性を有する高分子材料を開発する方法は、材料表面の物理化学的制御、生体分子による表面修飾、生体膜類似表面の構築に大きく分類される。たとえば、ポリジメチルシロキサンや芳香族ポリスルホンなどは、疎水性表面により表面自由エネルギーが低くなり生体成分の吸着を抑制するとされ、医療用機能膜や血液透析膜として用いられている。しかし、これらの生体適合性は短期間に限られており、長期の利用を目

*¹ 小山工業高等専門学校物質工学科 (☎ 323-0806 小山市中久喜 771)

的とした医療用デバイス材料としては課題点がある。一方で、親水性高分子や含水率が高い高分子鎖が血漿タンパク質の吸着や血小板の粘着を抑制し補体系の活性も抑制できるということも知られている^{2)~4)}。その代表的な高分子として知られているのが、ポリエチレングリコール [Poly(ethylene glycol); PEG] である^{5)~7)}。

PEGは、ポリエチレンオキシド(PEO)とも同じ化学構造であり、エチレングリコールの縮合またはエチレンオキシド(EO)の開環重合によって合成される。なかでも、EOの開環重合によるPEG合成法は、リビングアニオン重合が可能であり精密な分子量制御が可能なが知られている。PEGの主鎖はエチレンとエーテルを主骨格に有する直鎖状であり単結合で形成されているため、この周りの回転運動が容易で柔軟な構造であるため、極めて高い運動性を持ち、優れたタンパク質吸着抑制能を有する。また、PEGは、低毒性、非イオン性で両親媒性を有するポリマーでもある。これらの特性から、近年では医学・薬学分野への利用が期待されている。とくに、PEGを含有するブロックポリマーを代表例とする多成分系高分子は、異種のポリマー鎖を一分子内に有することから多様な性質の発現が可能になることから、医療用途だけでなく、化粧品、塗料、インク、食品などの用途にも展開されている。最近では、疎水性のポリマー鎖とPEGを組合せたAB型の親-疎水ブロックポリマーが注目を集めており、これらが水中で自己会合して形成するナノサイズの高分子ミセルが癌治療を目指した薬物送達システム(Drug Delivery System; DDS)用の微粒子型キャリアとして有用であることが明らかになりつつある^{8),9)}。

これらのPEG関連物質を医薬学分野などの多様な分野へ応用する際に重要となるのが、PEG末端の官能基やそれらの反応性である。つまり、末端の官能基は、異種ポリマー鎖との結合による多成分系ポリマーの合成や材料や微粒子表面との結合を可能にするものである。このようなPEGの末端反応性を利用し、材料表面や微粒子表面、またタンパク質や酵素などの生体由来物質などに固定化して、溶解性や分散安定性、タンパク質などの非特異吸着の抑制などの機能化をすることをペグレーション(PEGylation)といい、医薬学だけでなく、インキ、塗料、表面改質剤、接着剤などでも注目を集めている^{5),6),10)}。

一般に用いられる末端反応性PEGとしては、片末端のみに官能基を有するセミテレケリックPEG(セミPEG)と両末端に同じ官能基を有するホモテレケリックPEG(ホモPEG)が知られている。セミPEGは官能基が一つであるため第二の機能を他端の自由末端に導入することができず、またホモPEGは両末端に同じ反応性基がついているため選択性、反応制御が困難であり、それぞれの拡張性が制限される。これらを改善し、異種分子間の結

合や多成分系ポリマーの合成、表面修飾したPEGブラシへの特異的な機能の付与などを可能にするものが両末端に異なる官能基を有するヘテロテレケリックPEG(ヘテロPEG)であり、材料の高機能化に重要な役割を担いつつある。とくに、PEGの特長を活かした医療用材料やバイオセンサ、DDS用薬物キャリアなどへのヘテロPEGの利用は非常に興味深く、医学・薬学分野でさらなる展開が期待できる¹⁰⁾。

ヘテロPEGに用いられる末端官能基として、これまでにさまざまな種類のもものが報告され、市販されているものもある。たとえば、アミノ基¹¹⁾、カルボキシル基¹²⁾、ヒドロキシ基、アルデヒド基¹³⁾、メルカプト基¹⁴⁾などが知られている。このようなヘテロPEGの工業的な製造法としては、ホモPEGの両末端ヒドロキシ基などを化学反応により官能基変換し、目的のヘテロPEGを分離回収する方法が一般的である。しかし、この方法では反応後に未反応のホモPEGと目的物などが混在し精製方法が煩雑で、低収率になることが知られている^{10),15)}。

片岡、長崎および筆者らは、官能基を保護した化合物を出発物質とし、その末端からEOのリビングアニオン開環重合を行うことで、分子量が精密に制御されたヘテロPEGの定量的合成に成功している^{16)~19)}。この方法は、上記の出発物質のヒドロキシ基末端などをアルカリ金属ナフタレンなどでメタル化し、モノマーを添加することで簡単に、ワンポットで合成できるだけでなく、停止剤としてさまざまな官能基を有する化合物を添加することで、停止末端(ω 末端)にも自由に官能基を導入できることが知られている。しかしながら、官能基を保護した化合物も数多くあるわけではなく、導入できる官能基は限定されてしまう。

本研究では、とくにカルボキシル基に注目した、末端にカルボキシル基、もう一方に他の反応性基を有するヘテロPEGは、PEGバイオコンジュゲートに重要な前駆体である。また、別の高分子化合物を合成できるヘテロPEGの反応中間体としても用いることができる。例として末端にカルボキシル基を有するヘテロPEGは、反応性に富むSuccinimidylエステル中間体を形成することにより活性化することができる。Succinimidylエステルは、安定なアミド結合を形成するアミンを含むさまざまなレポーターグループ、タンパク質あるいは核酸の誘導体などを結合させることができる^{11),20)}。これらの技術を用いて、多くの生物学上で関連した配位子にPEGが固定化されている。とくに生医学的応用の面では、エステル結合により基質につながったヘテロPEGの安定性を考慮しなければならない。これらのエステル結合は特定の状況下で加水分解でき、目的の生体分子を放出するために応用することも可能であり、薬学分野への展開にも重要である。

工業的なヘテロ PEG の合成法は、ホモ PEG を用いて、末端基の化学修飾を行い、分離精製する方法が一般的である。開始側末端 (α 末端) にカルボキシル基を有するヘテロ PEG も同様に合成されてきたが、保護基を有する開始剤を用いる方法も検討されているが、この方法では、保護基が反応途中ではずれてしまい、反応が進行しなくなるという欠点があり、定量的な合成法は確立されていない。また、工業的なホモ PEG を化学修飾する方法では、さまざまな混合生成物が得られるため、精製分離が複雑になるので収率や純度が定量的ではない。これらの理由から、定量的な合成方法の確立が求められている。なお、保護した開始剤を用いる方法における停止末端 (ω 末端) へのカルボキシル基の導入については、無水コハク酸などの反応により定量的な導入が可能であるが²¹⁾、 α 末端基の定量的な導入法はほとんど知られていない。

α 末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG の合成に関して、類似の合成例が報告されている。K.B.Wagenerらは、カリウムとヒドロキシピバル酸からジカリウム塩を合成し、EO と反応させることで目的物を得ている²²⁾。この合成では、重合は進行するが、分子量制御が困難であるため、高分子量の PEG が得られなかった。これらの方法では、ジカリウム塩を精製してから使用していることで実験が多段階となり定量的な反応が困難であるという欠点がある。F. Zengらは、ヒドロキシカルボン酸をテトラヒドロフラン (THF) 中でカリウムナフタレン (K-Naph) によりメタル化させ、EO と反応させることで PEG を合成している。この合成では、ヒドロキシカルボン酸をグリコール酸または 3-ヒドロキシ酪酸を用いたときは重合しないと報告している²³⁾。またカリウムアルコールからでは重合制御が難しいが、カリウムチオレートからならば重合制御が可能であると報告している。また、カルボキシル基を保護したエステル化合物を開始剤として重合する例も考えられるが、反応過程で副反応が進行し保護基が外れ不均一になりやすいことも懸念される。

以上のようにいくつかの報告例はあるが、 α 末端に定量的にカルボキシル基を有する PEG を得る方法は確立されていない。これらのことから、定量的で簡便な合成法を確立する必要がある。

筆者らは、以前より医用高分子、とくに末端に異なる官能基を有するヘテロ PEG 誘導体の精密合成法を確立してきた^{16),17)}。また、PEG セグメントを有する新しいグラフトポリマーやブロックポリマーを精密分子設計し、機能性評価を行っている。これまでに、親-疎水型ブロックポリマーを用いた反応性ナノミセルを設計し、それらのドラッグキャリアや機能性表面修飾剤としての可能性を明らかにしてきた^{24)~26)}。最近では、反応性

PEG イニフィーターや PEG マクロモノマーを合成し、温度応答性を有するグラフトポリマーやブロックポリマーの合成法を確立し、温度変化により単分散なナノ会合体が得られることを明らかにしている^{27),28)}。また、PEG とポリアミノ酸を有する新しいブロックポリマーの合成にも成功している²⁹⁾。末端反応性 PEG の合成法の確立は、これらの研究すべての基礎になっているものである。

本研究では、ヒドロキシカルボン酸をカルボン酸塩の状態均一に分散させ、EO の重合を進行させることにより、 α 末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG の新しい合成法を確立することを目的とした。さらに、 ω 末端への他の官能基の導入も検討した。また、これらの合成方法を参考に分岐型ヘテロ PEG の合成方法の検討も行った。分岐型ヘテロ PEG は、デンドリマーなどの分岐型超分子の素構造や表面修飾用的高分子、ゲル化および架橋剤などに有効である。分岐した末端反応性 PEG は、表面修飾などにおいて、タンパク質の非特異吸着を効果的に抑制できることや³⁰⁾、タンパク質の表面修飾においても安定性保持などに効果が高いことが示されている³¹⁾。さらに、分岐型 PEG は、高強度なゲル創製にも有効なことが明らかとなっており³²⁾、有用性は非常に高いものである。本研究の概念図を Figure 1 に示した。

2 実験

2.1 試薬

Ethylene oxide (EO), tetrahydrofuran (THF), カリウムナフタレン THF 溶液 (K-Naph), methacrylic anhydride, triethylamine (TEA), methylsulfonyl chloride, tetrahydrofuran (THF), bromoacetaldehyde diethyl acetal は、市販品を一般的な方法で精製したものを使用した³³⁾。ジエチルエーテル、2-プロパノール (IPA), sodium *N,N*-diethyl-dithiocarbamate (NaDC), クロロホルムは、市販品をそのまま使用した。開始剤である Hydroxipivalic acid (HPA), 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid (DMPA) は市販品を、次の二通りの方法で乾燥させたものを使用した。1) 減圧乾燥法：HPA または DMPA 1.0 mmol をフラスコに入れ室温で一晩減圧乾燥を行った。乾燥した開始剤に THF 10 mL を加えて溶解させた。2) 昇華精製法：開始剤 1.0 mmol を加温し昇華させ、アルゴン置換したフラスコに回収した。これを一晩減圧乾燥し、アルゴン下で THF を所定量加えて溶液として使用した。

2.2 α 末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG の合成

代表的な実験方法を次に示した。アルゴン置換したフラスコに THF 5 mL, K-Naph 1.8 mmol を加え、HPA 溶液 (1 mmol) を滴下漏斗で一滴ずつ滴下し、所定時間メタル化反応を行った。その後、EO 80 mmol を加え、室温で

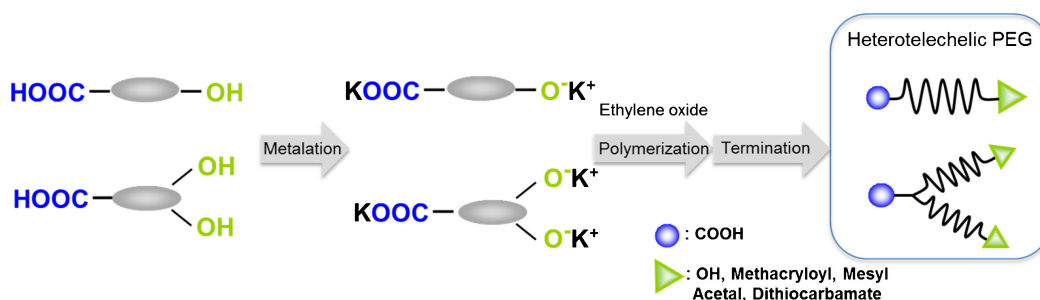


Figure 1. (Color online) Synthesis of hetero-telechelic poly(ethylene glycol)s with a carboxyl group at the alpha-terminus.

二日間かくはんし反応させた。重合の進行が明らかに確認できたポリマー溶液に対して、1 mol/L 塩酸を過剰量に加え、重合を停止させた。これにクロロホルムを加え溶解し、分液漏斗に移し飽和食塩水により洗浄したものを脱水後、30 倍量のジエチルエーテルに沈殿し、吸引ろ過により精製して回収した。

2.3 α 末端にカルボキシル基を有する分岐型ヘテロ PEG の合成

代表的な実験方法を次に示した。昇華精製した DMPA をフラスコに入れ、0.1 mol/L 溶液になるように THF を加え溶解させた。これを開始剤溶液とし合成に用いた。アルゴン下でフラスコに K-Naph 2.7 mmol と THF 5 mL を加えた。滴下漏斗に開始剤溶液 1 mmol を加え、これをフラスコの中に一滴ずつ滴下し、約 2 時間メタル化反応をさせた後、EO 100 mmol を加え、室温で 2 日間かくはんし反応させた。

重合の進行が確認できた溶液について、1 mol/L 塩酸を過剰量に加え重合を停止させた。これに同量のクロロホルムを加え、飽和食塩水を用いて抽出および洗浄を行った。抽出したポリマー溶液に硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ジエチルエーテルを用いて沈殿させた。これらを吸引ろ過して目的物を回収した。

2.4 ω 末端への多種官能基の導入

前述の合成方法を用いて、末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG を合成し、 ω 末端側へのさまざまな官能基の導入検討を行った。官能基として、マクロモノマーとして応用可能なメタクリロイル基、アルデヒド基への変換が可能なアセタール基、官能基変換が可能なメシル基およびリビングラジカル重合が可能なジチオカルバメート基などに注目し、導入方法の検討を行った。

2.4.1 メタクリロイル基

重合の進行が確認できたポリマー溶液に対して、重合停止剤として過剰量の無水メタクリル酸(末端基の 5 倍モル量)を加え、室温で 2 日間反応させた。これをろ過しながら 30 倍量の冷却した IPA に沈殿させ、遠心分離 (2500 rpm, 1150 G) により沈殿物を回収した。沈殿した

ポリマー溶液の溶媒をエバポレートし、これらをベンゼンに溶解させ 2 日間凍結乾燥をして ω 末端にメタクリロイル基を有する PEG (PEG-MA) を回収した。

2.4.2 アセタール基

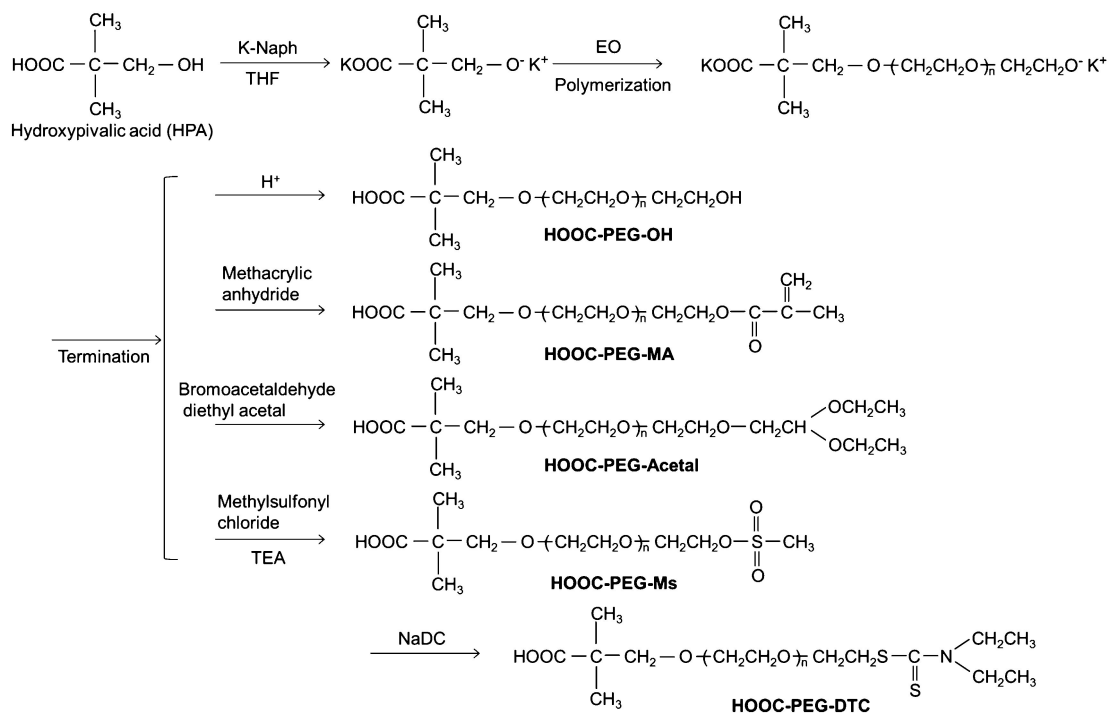
重合の進行が確認できたポリマー溶液に対して、重合停止剤として、bromoacetaldehyde diethyl acetal (末端基の 5 倍モル量)、NaH (末端基の 5 倍モル量)、NaI (末端基と等モル量) を加え 1 日反応させた。これらをろ過し 30 倍量のジエチルエーテルに沈殿させ、吸引ろ過により精製して ω 末端にアセタール基を有する PEG (PEG-Acetal) を回収した。

2.4.3 メシル基およびジチオカルバメート基

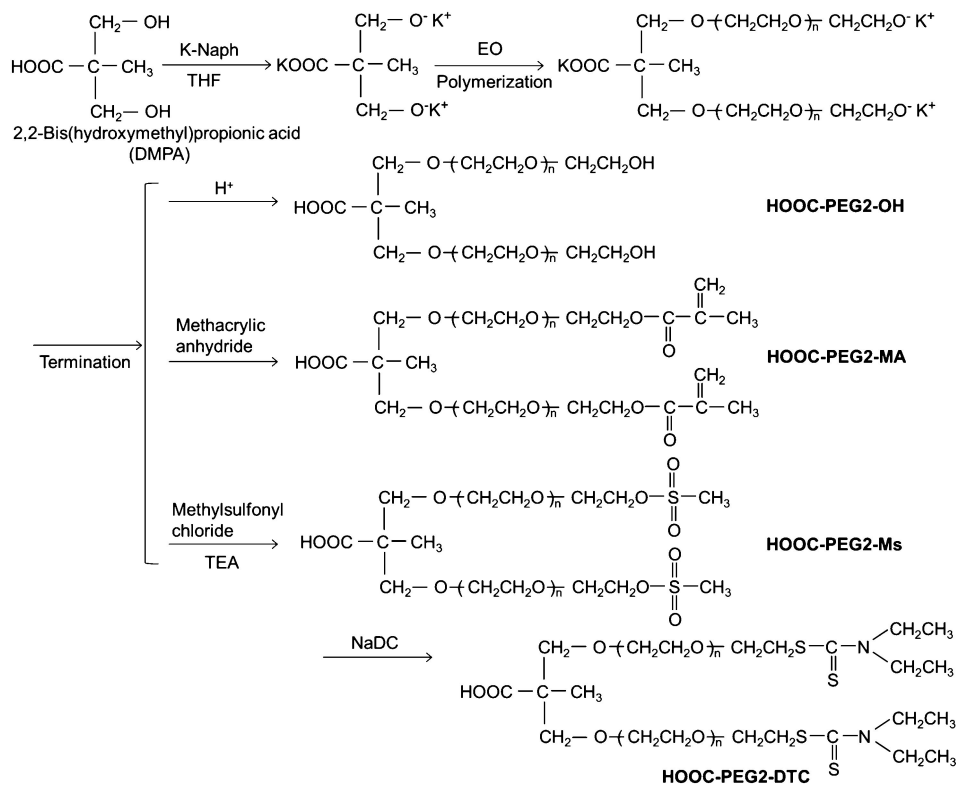
重合の進行が確認できたポリマー溶液に対して、過剰量のトリエチルアミン (TEA) (ω 末端基の 6 倍モル量) を加えた。別のフラスコに THF と methanesulfonyl chloride (ω 末端基の 3 倍モル量) を加え混合し、これを重合溶液へ全量加え、水冷下で 1 時間反応させた。簡易的なろ過後に 30 倍量のジエチルエーテルに沈殿させ、吸引ろ過により精製してメシル化 PEG (PEG-Ms) を回収した。ジチオカルバメート基を導入するため、PEG-Ms と sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate (ω 末端基の 10 倍モル量) をそれぞれ THF に溶解し、混合して室温で 3 時間反応させた。その後、溶媒をエバポレートし、クロロホルムに溶解し、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水し、30 倍量のジエチルエーテルに沈殿させ、吸引ろ過により精製して ω 末端にジチオカルバメート基を有する PEG (PEG-DTC) を回収した。

2.5 装置

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) は Shimadzu C-R4A [カラム ; Shodex GPC LF-804, キャリア ; THF (0.5% TEA), 流速 ; 1 mL/min. (40°C)] と東ソー HLC-8320GPC EcoSec [カラム ; TSKgel SuperMultiporeHZ-M, キャリア : THF, 流速 : 0.35 mL/min. (40°C)] を使用して分析した。核磁気共鳴スペクトルは、JEOL EX-270 (270 MHz) および JNM-EXC400II (400 MHz) を使用した。蛍光分光光度計は、JASCO FP-8300 spectrofluorometer を



Scheme 1. Synthesis of hetero-telechelic poly(ethylene glycol)s with a carboxyl group at the alpha-terminus initiated with HPA.



Scheme 2. Synthesis of hetero-telechelic poly(ethylene glycol)s with a carboxyl group at the alpha-terminus initiated with DMPA.

使用した。紫外可視分光光度計 (UV-Vis) は、JASCO V-550 を使用した。遠心分離機は、コクサン H-501FR を使用した。

3 結果および考察

3.1 α 末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG の合成

開始剤としてグリコール酸を用いて重合を試みたところ、K-Naph 添加時に大きな沈殿し、EO を添加しても重合が進行しなかった。これは、F. Zeng らの報告結果を支持しているものと考えられる²³⁾。そのため、HPA を用いて重合条件の検討を行い、 α 末端にカルボキシル基を有する PEG の合成方法確立を目指した。始めに、減圧乾燥した HPA を使用して EO の重合を行った。

HPA 溶液に K-Naph 溶液を滴下すると、反応直後に沈殿が生じ、EO 添加後も均一に重合が進行しなかった。これは、生成したカルボン酸塩の溶解性が低く、均一分散せずに沈殿し重合が進行しなかったためと思われる。そのため、合成方法を検討し、Figure 2 に示したよ

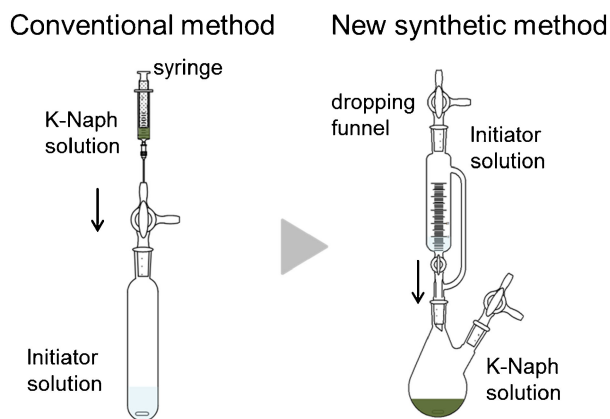


Figure 2. (Color online) Synthetic methods of poly(ethylene glycol) with a carboxyl group.

うに K-Naph 溶液に HPA 溶液を滴下漏斗により滴下する方法を用いることで、メタル化した化合物をより均一分散させる方法を検討した。その結果、EO 添加後に沈殿物は確認されず重合は均一に進行し、GPC よりほぼ単峰性のピークが確認され、ほぼ仕込み比から算出した分子量に近いポリマーの生成を確認した。このことより、合成方法の変更より EO の重合が効果的に進行していることが示唆された。得られたポリマーの ^1H NMR 測定結果では、カルボキシル基 (12.2 ppm) とヒドロキシ基 (4.6 ppm) および PEG 主鎖 (3.6 ppm) に由来するピークが現れ、目的とするカルボキシル基とヒドロキシ基を有するヘテロ PEG の生成が明らかとなった。しかし、カルボキシル基の導入率が 80% 以下と低くなった。これは、両末端がヒドロキシ基の PEG が副生成物としてわずかに生成したためと考えられる。この原因として、HPA の精製が不十分であり、微量に存在する水分などから重合が進行している可能性も考えられたため、HPA の精製条件の再検討を行った。

HPA を 80°C で昇華し減圧乾燥したものを使用した場合、均一な重合体が得られた。重合結果を Table 1 に示した。GPC 測定結果から単峰性で分子量分布の狭いポリマーが得られ、 ^1H NMR 測定結果より、末端基および主鎖に由来する各ピークを確認し、カルボキシル基とヒドロキシ基の積分比から計算された末端導入率は 94% となった。NMR から計算された分子量は、仕込み比から計算した分子量とほぼ一致しており、カルボキシル基を有する PEG の定量的な合成が可能になった。

HPA の精製方法については、昇華条件は 80°C 以上が最適であり、それ以下の温度であると乾燥が不十分な可能性があり重合が定量的に進行しないことが明らかとなった。また、滴下する HPA 溶液の濃度についても検討を行った。溶媒量が多い場合は、溶液濃度が薄くなり重合が定量的に進行しないこと、溶媒量が少ない場合は、滴下後に分散性が低下し沈殿が生じ不均一な重合

Table 1. Synthetic results of hetero-telechelic poly(ethylene glycol) with a carboxyl group at the alpha-terminus

Sample	Initiator ^{a)}	[K-Naph]/[I]	Mn (kDa)		Mw/Mn ^{b)}	Yield (%)	Reactive α group ^{c)}	Introduction rate (%) ^{d)}	Introduction α	Introduction ω
			Calcd.	Obsd ^{b)}						
1	HPA	1.8	3.64	3.48	1.13	75	COOH	OH	98	100
2	HPA	1.8	7.16	5.98	1.07	66	COOH	OH	84	100
3	HPA	2.0	3.64	3.35	1.08	75	COOH	MA	—	99
4	HPA	2.0	3.64	3.18	1.16	74	COOH	Acetal	—	83
5	HPA	2.0	3.64	2.50	1.13	50	COOH	Mesyl	—	95
6	DMPA	2.7	4.54	4.67	1.24	53	COOH	OH	87	100
7	DMPA	2.7	8.93	6.31	1.29	94	COOH	OH	80	100
8	DMPA	2.7	13.3	11.1	1.54	80	COOH	OH	82	100
9	DMPA	3.0	13.3	10.7	1.35	84	COOH	MA	—	100
10	DMPA	3.0	13.3	11.9	1.35	77	COOH	Mesyl	—	99

^{a)} HPA: hydroxipivalic acid, DMPA: 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid, ^{b)} Determined from GPC results, ^{c)} MA: methacryloyl group, Acetal: diethyl acetal group, Mesyl: methanesulfonyl group, ^{d)} Determined from ^1H NMR results.

となることが明らかとなった。最適な濃度としては、0.1 mol/L 程度であることが推定できる。

開始剤溶液を K-Naph 溶液へ滴下した後の反応時間の影響について、2 時間から 4 時間の反応時間で検討した。その際、溶液の色の変化を観察したところ、時間経過とともに K-Naph 由来の濃緑色から茶色、桃色、最終的に白濁色へと変化した。さらに、均一に白濁したときに EO を加えると、EO の付加とともに溶解性が向上し重合が定量的に進行していることが、得られたポリマーの NMR 測定結果より示唆された。代表例として、Sample 1 の GPC および ^1H NMR 測定結果をそれぞれ Figure 3, Figure 4 に示した。Figure 3 の GPC 測定結果より、単峰性のピークが得られ仕込み分子量とほぼ一致していたこと、次に Figure 4 の ^1H NMR 測定結果より、末端官能基と PEG 主鎖構造式由来の各ピークを確認した。カルボキシル基とヒドロキシ基の積分比から計算した末端導入率は 98% となった。また、Sample 2 のように仕込み分子量を変化させてもそれに応じて大きな分子量となり、分子量制御ができる可能性が示された。

以上の結果より、合成条件として上記の HPA の精製方法、K-Naph との反応方法や時間などを考慮することで、カルボキシル基とヒドロキシ基を有するヘテロ PEG をワンポットで容易に合成できることが明らかとなった。

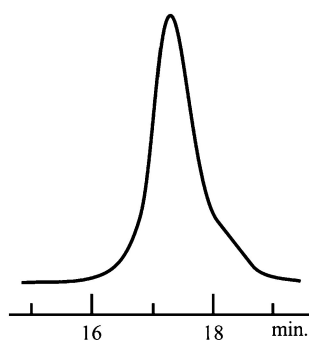


Figure 3. GPC result of HOOC-PEG-OH (sample 1).

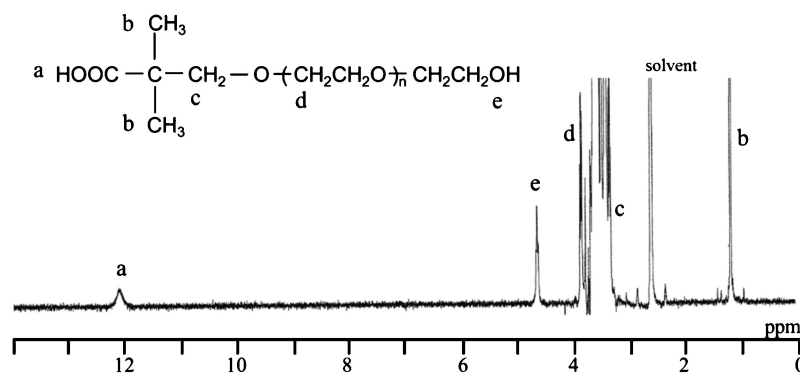


Figure 4. ^1H NMR spectrum of HOOC-PEG-OH (sample 1) in DMSO.

このように、HPA に K-Naph を反応させることでカルボキシル基をカルボン酸塩として安定化させ、同時に添加方法により均一に分散させることでアルコキシド末端から EO の重合が可能になり、 α 末端にカルボキシル基を有し、他端にヒドロキシ基を有するヘテロ PEG を容易に合成できることが明らかとなった。このようなカルボン酸塩を分散させることで、ワンポットで α 末端にカルボキシル基を有するヘテロ PEG を定量的に合成する方法は、他にほとんど例がないものである。

3.2 α 末端にカルボキシル基を有する分岐型ヘテロ PEG の合成

3.1 節の合成条件を参考に、二つの PEG 鎖を有する分岐型ヘテロ PEG の合成方法を検討した。DMPA の精製条件として、HPA と同様に昇華精製が最適であることがわかった。DMPA 溶液と K-Naph の反応では、HPA との反応と同様の色の変化を示した。EO を加えると白さが増し、2 日後には薄黄色がかかった透明になり粘度が増加し、GPC では単峰性のピークを示した (Figure 5)。これらのポリマーの NMR スペクトル (Figure 6) では、末端基および PEG 主鎖に由来するピークが現れた。NMR から計算した分子量は、仕込み比とほぼ一致しており、カルボキシル基の導入率は、87% であった。このことから、 α 末端にカルボキシル基、 ω 末端に二つのヒドロキシ基を有するヘテロ PEG の合成に成功したといえる。

しかし、得られたポリマーには、合成条件によりナフタレン誘導体のピーク (7~8 ppm 付近) がわずかに確認された。これは、未反応の K-Naph により生成した PEG が混在しているためと考えられる。実際に、アルカリ金属ナフタレンから EO が重合する報告例は知られており³⁴⁾、精密合成するためには開始剤と K-Naph のモル比をできるだけ精密に一致させることが必要となる。はじめに、滴下漏斗にわずかに残る可能性や仕込み比の誤差も考慮し、ヒドロキシ基末端の 9 割程度の K-Naph を用いて合成を行った。ヒドロキシ基末端とカリウムアルコラート末端が混在している場合においても EO の重合が

ほぼ定量的に進行し、ヘテロ PEG の合成が可能なのは明らかであるが、重合中のヒドロキシ基の増加に伴う分子量制御の難しさや停止末端官能基の導入率低下を導く可能性もある。そこで、さらなる合成条件の検討を行った。メタル化反応を効率的に進行させるための条件として、分散させるための溶媒の量、反応時間、開始剤と K-Naph の比率の最適化などがあげられる。検討した結果、溶媒量が多くなるに伴って、ナフタレン末端基のピークが減少する傾向があることが明らかとなり、3 倍量の溶媒を用いるとナフタレン末端基由来のピークが完全に消失することが明らかとなった。これは溶媒が少ない状態において、生成したカルボン塩の分散性や溶解性が低くなるため、ヒドロキシ基末端と K-Naph の反応が定量的に進行せず、結果として残存している K-Naph と EO が反応したものと考えられる。また、反応時間については、直鎖型の HPA と比べ、DMPA はメタル化反応に時間が必要であり、2 時間から 1 晩程度の反応時間で、溶液の色が白濁色になったところで EO を添加すると再現性良く定量的な合成が可能であることがわかった。さらに、開始剤のヒドロキシ基と K-Naph のモル比については、未反応の K-Naph が残存することを避けるために、ヒドロキシ基よりわずかに少ないモル量の K-

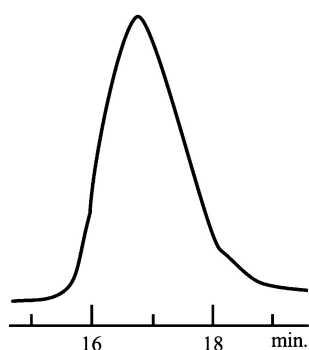


Figure 5. GPC result of HOOC-PEG2-OH (sample 6).

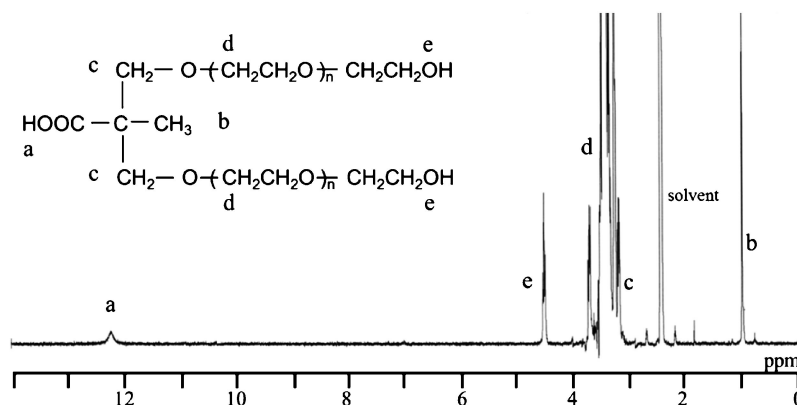


Figure 6. ^1H NMR spectrum of HOOC-PEG2-OH (sample 6) in DMSO.

Naph を添加していたが、上記の溶媒量および反応時間を最適化することにより、ヒドロキシ基末端に対して等モル量にすることで、カルボキシル基とヒドロキシ基を有する PEG を精密に合成することが可能になった。また、PEG 分子量が小さいものほど、得られたポリマーの GPC 測定結果が二峰性になる傾向があり、PEG 鎖が長くなるに伴い、単峰性のピークとなった (Figure 7)。これは、反応過程において PEG 鎖が長いほどポリマーの溶媒への溶解性が向上し、均一に重合が進行したためと考えられる。

以上のように、カルボキシル基を α 末端に有し、二つの PEG 鎖末端にヒドロキシ基を有する分岐型ポリマーの新規合成法を確立した。このような PEG は、機能性材料の素構造としても非常に有用である。これらの PEG の有用性を検討する目的で、多様な官能基の導入方法を検討した。これらの末端機能化については、筆者らの研究グループにより報告されており、それらの反応条件を参考にした^{18),25),28),29)}。

3.3 さまざまな官能基の導入検討

3.3.1 メタクリロイル基

ω 末端へのメタクリロイル基の導入は、生長末端に無水メタクリル酸を反応させることで行った (Sample 3)。HPA を開始剤として EO を重合し、無水メタクリル酸を反応させて回収したポリマーの GPC 測定結果では単峰性のピークを示した。それらの ^1H NMR スペクトル (Figure 8) では、ヒドロキシ基に由来するピークが完全に消失し、6 ppm 付近にメタクリロイル基の二重結合に由来するピークが現れた。メタクリロイル基の導入率は、99% であり、 ω 末端に定量的にメタクリロイル基を導入できることが明らかとなった。これらの導入率は、HPA と K-Naph のモル比によりわずかに変動し、K-Naph が HPA のヒドロキシ基に対して等量比に近いものほど定量的に導入できることがわかった。このように、目的のヘテロ PEG をワンポットで容易に合成できる方法を

確立した。これらのポリマーおよび方法は、PEGの工業的応用において非常に価値が高いものと推測できる。

DMPAから重合した二つのPEG鎖を有するポリマーの末端に、前述のHPAと同様の条件でメタクリロイル基の導入を検討した(Sample 9)。Figure 9の¹H NMRから計算した結果、メタクリロイル基の導入率は90%以上であり、精密な合成が可能となった。これらのポリマー末端のカルボキシル基の定量については、酸による停止反応を行っていないため、¹H NMRではピークが確認できなかった。

このようなα末端にカルボキシル基とω末端に重合性官能基を有するPEGは、直鎖型PEGの場合には、末端反

応性のPEGマクロモノマーとして機能性グラフトポリマーの創製に、また他のモノマーとの共重合後に重合性官能基を導入することにより、ブロック型マクロモノマーなどさらなる機能性材料としての展開が見込まれる。また、複数のPEG鎖と重合性官能基を有するポリマーは、機能性架橋剤などとして医用材料として有用である。

3.3.2 アセタール基

末端のアセタール基は、容易にアルデヒド基に変換できることから工業的にも利用価値が高い。アルデヒド基は、水中で安定であり、タンパク質や酵素などのアミノ基と選択的に反応することができるため、とくに医薬学分野において注目されている。

アセタール基をα末端に有するPEGは、報告されており¹⁶⁾、アルデヒド基に変換し、DDS用キャリアや表面修飾剤などに展開されている。

本研究では、ω末端にアセタール基を導入するため、HPAから重合したポリマー溶液にbromoacetaldehyde diethyl acetalを加えて反応させた(Sample 4)。得られたポリマーの¹H NMRスペクトル(Figure 10)において、ヒドロキシ基末端に由来するピークが消失し、ジエチルアセタール基由来のピーク(CH: 4.6 ppm)が新たに現れ、定量的にヒドロキシ基が導入されていることが明らかとなった。これらのポリマーは、塩酸処理などによりアルデヒド基に変換できることを確認しており、アミノ基などとの選択的な反応に有効である。

3.3.3 メシル基およびジチオカルバメート基

メシル基は、さまざまな官能基導入に重要な官能基であり、PEG末端に導入することは応用展開に有用であると考えられる。メシル基をω末端に導入するため、HPAから重合したポリマー溶液にTEA存在下でmethanesulfonyl chlorideを反応させた(Sample 5)。精製

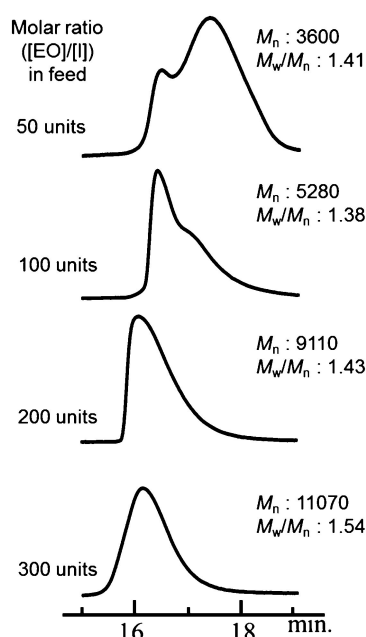


Figure 7. GPC results of HOOC-PEG2-OH.

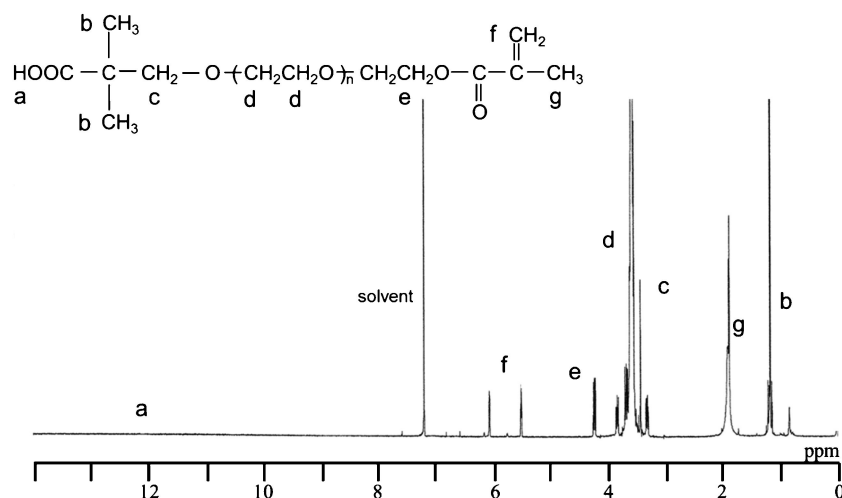
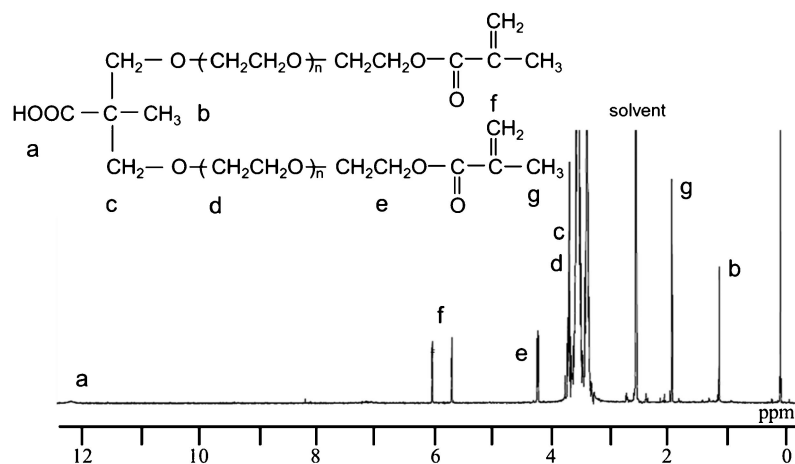
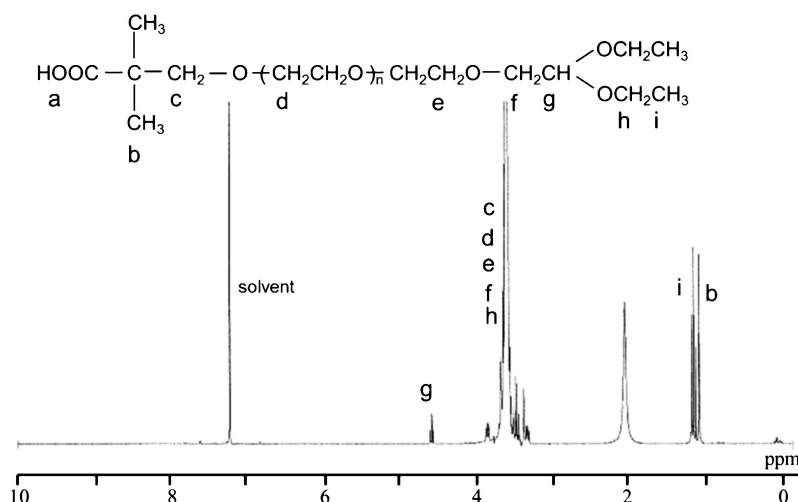


Figure 8. ¹H NMR spectrum of HOOC-PEG-MA (sample 3) in CDCl₃.

Figure 9. ^1H NMR spectrum of HOOC-PEG2-MA (sample 3) in CDCl_3 .Figure 10. ^1H NMR spectrum of HOOC-PEG-Acetal (sample 4) in CDCl_3 .

したポリマーの ^1H NMR (Figure 11)では、メシル基に由来するピーク (CH_3 : 3.2 ppm) が確認され、 ω 末端メシル基の導入率は90%以上であった。これらのPEG-Msにジチオカルバメート (DTC) 基を導入するために、sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate と反応させたところ、NMR測定においてメシル基に由来するピークが完全に消失し、DTC基に由来するピークが現れた。DTC基の導入率は、80%程度であった。

また、DMPAから開始したPEGについても同様の反応条件でメシル基を導入できることが明らかとなった (Sample 10)。これらのDTC化についても検討し、 ω 末端DTC基の導入率98%、収率90%以上で高選択的に α 末端にカルボキシル基およびDTC基の導入が可能になった。このようなジチオカルバメート基は、リビングラジカル重合が可能な光イニフィーターとしても有効であり²⁸⁾、ブロックポリマーの合成に有効である。実際に、 ω 末端DTC基から *N*-isopropyl acrylamide (NIPAM) や

n-butyl methacrylate などのラジカル重合が進行することも確認されており、多成分系高分子を開発するために有用である。また、ジチオカルバメート基は、カチオンRAFT重合のRAFT化合物として用いられる例もあり³⁵⁾、PEG誘導体の利用範囲の拡大が期待できる。メシル基は、アンモニア存在下で一級アミノ基に変換することも可能であり²⁹⁾、官能基変換によるさらなる応用展開も可能である。

4 結 論

α 末端にカルボキシル基を有するPEGを高選択的に合成するために、カルボン酸塩として有機溶媒中に均一分散し、EOを重合する方法³⁶⁾によりヘテロPEGを精密に合成した。開始剤の選択により、直鎖型および分岐型のPEGの合成方法を検討し、ワンポットで定量的に、かつ容易に得られる方法を確立した。反応時間や濃度、混合比などの調整により精密に合成できることが明らか

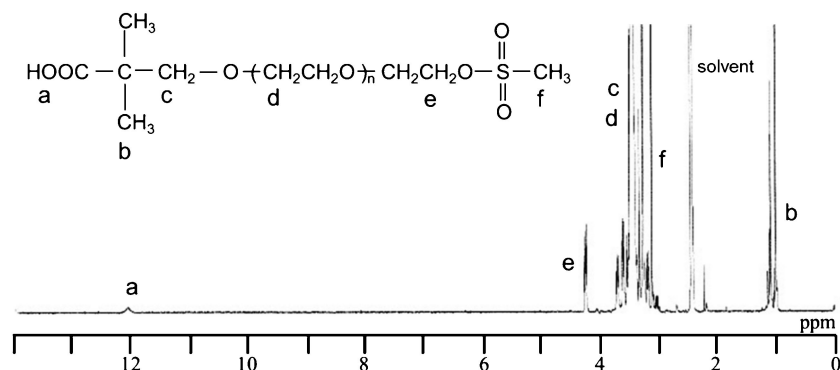


Figure 11. ^1H NMR spectrum of HOOC-PEG-Mesyl (sample 5) in DMSO.

となった。これらの ω 末端には、多様な官能基を導入できることから、本研究のヘテロ PEG や新規合成法は、医薬学用高分子材料への展開を目指した末端反応性ブロックポリマーやグラフトポリマーの合成に有用である。

謝辞 本研究の一部は、筑波大学長崎幸夫教授および東京工業大学西山伸宏教授、片岡一則東京大学名誉教授の御協力により実施されたものである。

文献

- 井上祥平, “高分子合成化学”, 裳華房, 東京 (1996).
- 片岡一則, “生命材料工学”, 裳華房, 東京 (1991).
- 片岡一則, 岡野光夫, “生体適合性ポリマー”, 共立出版, 東京 (1988).
- 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 大矢裕一, “バイオマテリアルサイエンス”, 東京化学同人, 東京 (2003).
- 飯島道弘, *New Food Industry*, **54**, 40 (2012).
- 長崎幸夫, *高分子*, **61**, 77 (2012).
- 吉本敬太郎, 長崎幸夫, *化学と教育*, **62**, 60 (2014).
- K. Kazunori, H. Atsushi, and N. Yukio, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **47**, 113 (2001).
- A. Harada and K. Kataoka, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 949 (2006).
- “Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, J. M. Harris ed., Plenum Press (1992).
- S. Zalipski, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 150 (1995).
- M. S epulchre, G. Paulus, and R. J er ome, *Makromol. Chem.*, **184**, 1849 (1983).
- M. S. Paley and J. M. Harris, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **25**, 2447 (1987).
- J. M. Harris and R. S. Herati, *Polymer Preprints*, **32**, 154 (1991).
- “Poly(ethylene glycol)”, J. M. Harris and S. Zalipsky, eds., ACS Symposium Series, Volume 680, American Chemical Society, Washington DC (1997).
- Y. Nagasaki, T. Kutsuna, M. Iijima, M. Kato, K. Kataoka, S. Kitano, and Y. Kadoma, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 231 (1995).
- Y. Nagasaki, M. Iijima, M. Kato, and K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 702 (1995).
- Y. Nagasaki, R. Ogawa, S. Yamamoto, M. Kato, and K. Kataoka, *Macromolecules*, **30**, 6489 (1997).
- Y. Akiyama, H. Otsuka, Y. Nagasaki, M. Kato, and K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 947 (2000).
- T. Miron and M. Wilchek, *Bioconjugate Chem.*, **4**, 568 (1993).
- H. Hayashi, M. Iijima, K. Kataoka, and Y. Nagasaki, *Macromolecules*, **37**, 5389 (2004).
- K. B. Wagener and J. C. Matayabas Jr., *Macromolecules*, **25**, 5585 (1992).
- F. Zeng and C. Allen, *Macromolecules*, **39**, 6391 (2006).
- M. Iijima, Y. Nagasaki, T. Okada, M. Kato, and K. Kataoka, *Macromolecules*, **32**, 1140 (1999).
- C. Scholz, M. Iijima, Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *Macromolecules*, **28**, 7295 (1995).
- K. Emoto, Y. Nagasaki, M. Iijima, M. Kato, and K. Kataoka, *Colloids Surf., B*, **18**, 337 (2000).
- M. Iijima and Y. Nagasaki, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **44**, 1457 (2006).
- M. Iijima and S. Nakajima, *Kobunshi Ronbunshu*, **69**, 102 (2012).
- M. Iijima, D. Ulkoski, S. Sakuma, D. Matsukuma, N. Nishiyama, H. Otsuka, and C. Scholz, *Polym. Int.*, **65**, 1132 (2016).
- K. Berostr om, E.  sterberg, K. Holmberg, A. S. Hoffman, T. P. Schuman, A. Kozlowski, and J. M. Harris, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **6**, 123 (1995).
- C. Monfardini, O. Schiavon, P. Caliceti, M. Morpurgo, J. M. Harris, and F. M. Veronese, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 62 (1995).
- T. Sakai, T. Matsunaga, Y. Yamamoto, C. Ito, R. Yoshida, S. Suzuki, N. Sasaki, M. Shibayama, and U. Chung, *Macromolecules*, **41**, 5379 (2008).
- D. D. Perrin and W. L. F. Armarego, “Purification of Laboratory Chemicals”, Pergamon Press, Elmsford, NY (1980).
- I. Cabasso and A. Zilkha, *J. Macromol. Sci.: Part A-Chem.*, **8**, 1313 (1974).
- 内山峰人, 佐藤浩太郎, 上垣外正己, *日本ゴム協会誌*, **88**, 391 (2015).
- 飯島道弘, 公開特許公報, P2011-32349A (2011).

[Original Papers]

Synthesis of Hetero-Telechelic Poly(ethylene glycol)s with a Carboxyl Group at the Alpha-Terminus

Michihiro IJIMA^{*1}, Maiko KAWADA^{*1}, Yuna SATO^{*1}, MinLey PUA^{*1}, and Masayuki KAMEYAMA^{*1}

^{*1}*National Institute of Technology, Oyama College Department of Materials Chemistry and Bioengineering (771 Nakakuki, Oyama 323-0806, Japan)*

A method for the precision synthesis of hetero-telechelic poly(ethylene glycol) (PEG)s with a carboxyl group at the alpha-terminus was studied. Hydroxyypivalic acid (HPA) that contains both a hydroxyl group and a carboxyl group, was used as the starting compound. Anionic ring opening polymerization of ethylene oxide (EO) proceeded quantitatively by dropping a solution of HPA into potassium naphthalate THF solution, which induces highly dispersible initiators. In addition, it is indicated that macromonomers with a polymerizable group at the omega-terminus of PEG were synthesized quantitatively. And furthermore, a synthetic method to produce branched hetero PEGs with one carboxyl group at the alpha-terminus and two PEG chains were established by using a similar method. These quantitative synthetic methods of hetero PEGs possessing a carboxyl group at the alpha-terminus are promising for the creation of highly functionalized materials in the future.

KEY WORDS Poly(ethylene glycol) / Anionic Polymerization / Hetero-Telechelic Polymer / Biocompatible Polymer /

(Received January 30, 2019; Accepted April 13, 2019; Advance Publication June 4, 2019)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **76**, 276—287 (2019)]

©2019, The Society of Polymer Science, Japan