

Title	Studies on Biodegradable Stereocomplex Nanoparticle Composed of Enantiomeric Poly( $\gamma$ - glutamic acid) - graft - poly(lactide) Copolymers as a Protein Delivery Carrier
Author(s)	朱, 葉
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34479">https://doi.org/10.18910/34479</a>
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## Abstract of Thesis

Name (Ye Zhu )	
Title	<p>Studies on Biodegradable Stereocomplex Nanoparticle Composed of Enantiomeric Poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid)-<i>graft</i>-poly(lactide) Copolymers as a Protein Delivery Carrier (蛋白質キャリアとして機能するポリ (<math>\gamma</math>-グルタミン酸) - ポリ乳酸グラフト共重合体からなる生分解性ステレオコンプレックスナノ粒子に関する研究)</p>
<p>Abstract of Thesis: Preparation of stereocomplex NPs composed of enantiomeric poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid)-<i>graft</i>-poly(lactide) (<math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLA) copolymers as protein delivery carriers for vaccines that can deliver antigenic proteins and elicit potent immune responses is the research objective of this dissertation. The effects of the molecular weight of <math>\gamma</math>-PGA main chain, the grafting degree of the PLA side chain for the formation, stability and crystallinity of stereocomplex NPs were investigated in detail. The ability for antigen loading, delivery and the impact of crystalline structure of inner NPs on degradation profiles of NPs, release/degradation behavior of encapsulated antigens were evaluated. The results throughout this thesis are summarized as follows.</p> <p>In chapter 1, the amphiphilic graft copolymers, <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLLA and <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PDLA, consisting of a hydrophilic backbone of <math>\gamma</math>-PGA and hydrophobic side chains of enantiomeric PLLA or PDLA, were successfully synthesized. The number of enantiomeric PLA chains coupled onto <math>\gamma</math>-PGA can be controlled by changing the molar amount of PLA added into the reaction system. These <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLA copolymers could form NPs, and stereocomplex crystallites were formed in the case of the mixture of <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLLA and <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PDLA copolymers having a relatively large number of PLA grafts.</p> <p>In chapter 2, the effects of the molecular weight of the hydrophilic <math>\gamma</math>-PGA main chain and the grafting degree of the hydrophobic PLA side chain for the formation, stability and crystallinity of NPs formed by isomers and the equal molar mixture of the isomers were investigated. The crystallinity of stereocomplex NPs can also be enhanced by using different preparation method. It is shown that stereocomplex NPs formed from acetonitrile have a higher crystallinity. Expected as a potential delivery system, the loading of model protein OVA into both the isomeric NPs and stereocomplex NPs were successfully achieved by both surface immobilization and physical encapsulation method.</p> <p>In chapter 3, the efficacy of <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLA stereocomplex NPs on cellular uptake, intracellular degradation of protein encapsulated into the NPs <i>in vitro</i> and immune induction of protein-encapsulated stereocomplex NPs <i>in vivo</i> were investigated. The prepared protein-encapsulated <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLA stereocomplex NPs can efficiently take up by dendritic cells (DCs), and also affected the intracellular degradation of the encapsulated ovalbumin (OVA). The degradation of OVA encapsulated into the stereocomplex NPs was attenuated as compared to free OVA and the corresponding isomer NPs. Interestingly, immunization with OVA stereocomplex NPs predominantly induced antigen-specific cellular immunity.</p> <p>In this thesis, a kind of potential antigen delivery vehicle with higher thermodynamic and kinetic stability were successfully prepared from the self-assembly of enantiomeric <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLA graft copolymers. The author demonstrated that the crystalline structure of PLA in NPs is a key factor to control the intracellular degradation of encapsulated protein. Importantly, the stereocomplex NPs were able to deliver encapsulated antigen to DCs and regulate intracellular degradation of antigen and NPs, thereby modulating the immune response to the antigen. It is possible that <math>\gamma</math>-PGA-<i>g</i>-PLA stereocomplex NPs carrying vaccine antigens could provide a novel protein-based vaccine capable of inducing strong cellular immunity. These innovative vaccine delivery platforms could facilitate the development of effective vaccine therapy.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 朱 葉 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 明石 満
	副 査 教 授 井上 佳久
	副 査 教 授 神戸 宣明
	副 査 教 授 三浦 雅博
	副 査 教 授 茶谷 直人
	副 査 教 授 生越 専介
	副 査 教 授 関 修平
	副 査 教 授 真嶋 哲朗
	副 査 教 授 安蘇 芳雄
	副 査 教 授 芝田 育也

## 論文審査の結果の要旨

高分子系ナノ粒子の調製には、高分子鎖の分子間および分子内での相互作用による自発的会合が粒子形成の駆動力として利用されており、特に生分解性高分子からナノ粒子はナノバイオマテリアルとして医療分野への応用が期待されている。本学位論文では、生分解性高分子であるポリ乳酸 (PLA) の鏡像異性体 (ポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸: PLLA, PDLA) より形成されるステレオコンプレックス (SC) に着目し、親水性のポリアミノ酸であるポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) ( $\gamma$ -PGA) と疎水性の PLA からなる両親媒性高分子を合成し、SC 形成を駆動力としたナノ粒子の創製とワクチンキャリアとして機能評価を目的としたものであり、主な成果を要約すると以下の通りである。

一章では、 $\gamma$ -PGA-PLA グラフト共重合体 ( $\gamma$ -PGA-PLLA および  $\gamma$ -PGA-PDLA) の合成を行い、 $\gamma$ -PGA に対する PLA の導入率を制御することで、鏡像異性体である PLLA と PDLA のステレオコンプレックス (SC) 形成を利用した  $\gamma$ -PGA-PLA SC ナノ粒子の調製に成功している。

二章では、 $\gamma$ -PGA-PLA SC ナノ粒子形成の対する分子量、PLA 導入率の効果および物性評価として、粒子の臨界会合濃度、SC 結晶化度、動力学的安定性を評価している。SC ナノ粒子は、PLA の疎水性相互作用によって形成される  $\gamma$ -PGA-PLLA ナノ粒子と比較して高い動力学的安定性を示し、その安定性は粒子内部の SC 結晶化度に依存していることを見出している。また、 $\gamma$ -PGA-PLA SC ナノ粒子および  $\gamma$ -PGA-PLLA ナノ粒子の薬物担持能を評価し、ナノ粒子表面および内部に効率よく蛋白質・ペプチドを固定化できることを明らかにしている。

三章では、 $\gamma$ -PGA-PLA SC ナノ粒子のワクチンキャリアとしての機能評価として、モデル抗原である卵白アルブミン (OVA) を内包したナノ粒子を調製し、樹状細胞によるナノ粒子取込み、内包 OVA の細胞内分解挙動、マウス免疫実験による免疫応答を解析している。粒径 400 nm の OVA 内包 SC ナノ粒子は樹状細胞に効率よく取り込まれ、細胞内での内包蛋白質の分解を抑制することで、抗原特異的な細胞性免疫を優先的に誘導できることが明らかになっている。

以上、本論文では、PLA の SC 形成を会合体形成の駆動力とした新規な生分解性ナノ粒子を調製し、薬物キャリアとしての応用の可能性を示している。PLA からなる SC 結晶は、PLLA からなるホモ結晶やアモルファスに比べ、高い熱力学的安定性、加水分解耐性、酵素分解耐性を有しており、これらの長をナノ粒子に組み込みことで、生体内での分解性を制御可能な新たな機能性ナノ粒子の創製に成功している。 $\gamma$ -PGA-PLA SC ナノ粒子はワクチンキャリアとして、細胞性免疫を優位に誘導できる長を有していることから、がんや自己免疫疾患などの細胞性免疫の選択的な誘導が求められる免疫疾患に対する有用なキャリア開発に繋がると期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。